

國立臺灣師範大學附屬高級中學第 50 屆科學展覽會

作品說明書封面

科 別：動物與醫學學科

組 別：高中組

作品名稱：*hCLCN4* 突變在果蠅表現型影響之分析

關鍵詞：*hCLCN4* 突變、果蠅表現型

編 號：

摘要

現今有許多遺傳疾病因尚未了解其細胞內的分子作用機轉導致無法提供有效的診斷或治療。本研究希望能發展出一種能具有遺傳疾病診斷與初步評估疾病歷程的方法，迅速的提供診斷資訊，以利後續疾病的治療。

本研究利用不同的啟動子(promoter)使 *hCLCN4* 基因表現於果蠅的眼睛，翅膀，胸部等部位，藉由觀察這些突變果蠅的表現型，分析其與人類 *hCLCN4* 遺傳疾病症狀的嚴重程度的關聯性。結果發現，*hCLCN4* 突變果蠅的眼睛表現型的特徵差異，可做為 *hCLCN4* 疾病出現重度、中度或輕微症狀的分類依據。未來希望此一以突變果蠅表徵分析的方式，能成為快速診斷遺傳疾病的分析工具。

壹、前言

一、文獻探討

(一) 內溶體系統(Endolysosomal system)

內溶體系統 (Endolysosomal system) 為細胞內內膜系統 (endomembrane system) 中的一部分，其中分成內體 (endosome)、溶體 (lysosome) 等胞器，負責調控細胞內的物質回收與運輸。參與的作用包含胞吞作用 (Endocytosis)、細胞自噬 (autophagy)、水解作用等(Winckler et al., 2018)。另外在神經系統中也扮演調節神經降解的角色。先前研究指出系統酸化失調會導致無法正確清除異物，因而產生與阿茲海默症(Alzheimer's disease)相關之 tau 蛋白片段(Hu et al., 2015)。

內體依不同時間可分成三種階段，初級內體 (early endosome)、次級內體 (late endosome) 與再循環內體 (recycling endosome)，不同的形態其胞內酸鹼值也不同，且次級內體後續將會轉變成溶酶體處理各式細胞物質，初級內體 pH 值約為 6.5，次級內體約為 5.5，溶酶體約為 4.5。自上述可知內體 pH 值較人體細胞質正常值低，因其膜上具 ATP 酶與氯離子通道供其氫離子與平衡電荷之氯離子(Hu et al., 2015)。

(二) ClC-4 anion-proton antiporter 與細胞自噬作用(autophagy)

氯離子通道(chloride channel, ClC) 為一系列離子運輸與通道蛋白(channel and antiporter)的統稱，此系列蛋白會運輸氯離子以達成各式功能，例如調整膜電位使電荷平衡、操控離子濃度進而維持細胞水分(Jentsch and Pusch et al., 2018, Jentsch et al., 2002)。這些運輸與離子蛋白主要會表現在胞內器官如內體 (endosome) 和溶體 (lysosome) 的表面上，也有些表現於其他細胞的細胞膜上，如肌肉、腎元。在 ClC 系列

蛋白中會分成 CIC-1、CIC-2 等通道蛋白與 CIC-3、CIC-4 等運輸蛋白(Poroca et al., 2017, Stölting et al., 2014)。

細胞自噬 (autophagy) 為維持細胞恆定的關鍵作用之一，在進行細胞自噬作用時，會將欲分解的部分用囊泡 (vesicle) 分離，並運輸至溶體等胞器將其分解。而在眾多參與作用的胞器中，為了使物質分解能更有效率，其膜上會有各式蛋白使胞器內環境呈酸性，其中我們所關注的 CLC-4 運輸蛋白便坐落於自噬作用過程中會出現的內體 (endosome) 膜上，來達成胞器內酸化(Poroca et al., 2017)。

(三)有關人體的 CLCN4 疾病

人體上表現 CIC-4 通道蛋白的基因為 *CLCN4* 基因，目前研究皆表明 *CLCN4* 突變與智力缺陷、癲癇等症狀有高度相關性(Palmer et al., 2018, Palmer et al., 2023)。根據前人的研究成果，已將不同位點所造成之病人智力障礙嚴重程度統整出來(如圖 1)(Guzman et al., 2022)。但目前病例不多，不排除今後此一疾病(人類 *CLCN4* 突變，*hCLCN4* 突變)所造成的病徵嚴重程度的劃分可能會有所改變。

Variant	Protein dysfunction					Functional category	Clinical phenotype in humans (Palmer et al., 2018)
	Trafficking	Dimerization with CIC-3	$V_{0.5}$	Transport efficiency	<i>I_{ss}</i> at +175 mV		
p.D15N	Increased ER staining Perinuclear staining	Not altered	77.0 ± 1.6 mV	Not altered	Not altered	Normal function, normal homodimer localization,	Borderline intellectual disability, delayed speech, infantile hypotonia, congenital diaphragmatic hernia, bilateral hip dysplasia, umbilical hernia, and infantile failure to thrive
p.G78S	Not altered	Not altered	ND	ND	Reduced	Loss-of-function, normal trafficking	Moderate intellectual disability and anxiety
p.V212G	Increased ER staining Perinuclear staining	Not altered	51.2 ± 1.1 mV	Increased	Reduced	Gain-of-transport function, altered trafficking	Mild to moderate intellectual disability, delayed speech, self-abusive and obsessive, compulsive behavior, anxiety, and depression.
p.L221P	Increased ER staining Perinuclear staining	Reduced	ND	ND	Reduced	Heterodimerization	Moderate intellectual disability, delayed speech, self-abusive behavior, sleep initiation disorder, infantile hypotonia, and unsteady wide-base gait
p.L221V	Impaired	Reduced	27.8 ± 0.9 mV	Increased	Not altered	Loss-of-transport function, altered trafficking as homo- and heterodimer, impaired heterodimerization	Mild to moderate intellectual disability, delayed speech, depression, bipolar and seizures disorder, epilepsy, neurological features, and gastroesophageal reflux
p.V275M	Increased ER staining Perinuclear staining	Not altered	64.0 ± 1.0 mV	Reduced	Not altered	Normal trafficking, moderate impairment of Cl ⁻ -H ⁺ transport	Moderate to severe intellectual disability, delayed speech, epilepsy, brisk patella reflexes
p.S534L	Increased ER staining Perinuclear staining	Slightly reduced	ND	ND	Reduced	Loss-of-function or altered trafficking	Severe intellectual disability, delayed speech, epilepsy, infantile hypotonia, cortical visual impairment and upper limb hypertonia and spasticity at the age of 3 years
p.V536M	Increased ER staining Perinuclear staining	Not altered	112.0 ± 3.1 mV	Not altered	Reduced	Altered homodimer trafficking, normal heterodimerization, moderately impaired transport	Moderate to severe intellectual disability, delayed speech, aggressive behavior, hyperactivity, epilepsy, progressive spasticity, and progressive unsteady gait
p.G544R	Not altered	Not altered	89.2 ± 2.1 mV	Reduced	Reduced	Heterodimerization	Severe intellectual disability, epilepsy, infantile hypotonia, and dystonic posturing
p.A555V	Increased ER staining Perinuclear staining	Not altered	ND	ND	Reduced	Loss-of-transport function normal homodimer trafficking	Mild to moderate intellectual disability, delayed speech, exotropia, feeding difficulties, and constipation
p.R718W	Increased ER staining Perinuclear and surface membrane staining	Not altered	80.0 ± 1.2 mV	Reduced	Reduced	Moderately impaired transport function, normal trafficking	Severe intellectual disability, delayed speech, drooling and self-abusive behavior, epilepsy, infantile hypotonia, feeding difficulties in infancy and scoliosis
p.G731R	Increased ER staining Perinuclear staining	Impaired	70.0 ± 1.6 mV	Not altered	Reduced	Normal transport, change in homodimer trafficking, normal heterodimer trafficking	Severe to profound intellectual disability, delayed speech, hyperactivity, slowness and apathy, perseveration and anxiety, infantile hypotonia, and strabismus

PM, plasma membrane; PS, perinuclear structures; ND, = non-determined; *I_{ss}*, steady-state anion current; $V_{0.5}$ CIC-4 WT = 75.0 ± 1.05 mV or CIC-4^{traffCIC-3} = 72.0 ± 1.2 mV (Palmer et al., 2018).

圖 1 人類 *CLCN4* 點突變名稱與其表徵對照表(Guzman et al., 2022)

人類的 *CLCN4* 突變，錯譯突變相較於框移突變或缺失對於人體的影響較大，故此可以推測一個不正常運作的 CLC-4 通道比起功能減弱或完全消失的 CLC-4 通道具有更大的威脅性。在老鼠的研究中發現若老鼠失去 *CLCN4* 基因將會導致神經細胞的樹突

總數減少，但對於 *CLCN4* 突變所造成的功能異常或是 CLC-4 運輸蛋白在人體中確切的功能，依然有許多不明之處(Palmer et al., 2018)。

(四) GAL4-UAS system

GAL4-UAS system 為 Hitoshi Kakidani 與 Mark Ptashne 一同發現的一種使特定基因表達的方式。*GAL4* 是於酵母菌基因中所發現的序列，其轉譯出的蛋白可與人類特別製作的 *UAS* 序列結合，進而使 *UAS* 下游的基因被轉錄(圖 2)。此外，經由選用不同的啟動子，能使 *GAL4* 突變基因表現於果蠅的特定部位。故此，將設計好如圖 2 的基因卡匣，轉入果蠅的第二與第三對染色體中，即可在果蠅的特定部位觀察到因 *CLCN4* 突變基因所造成的不同表現型特徵。在此研究中，我們使用了 *EY*, *GMR*, *MS1096*, *PNR* 四種基因的啟動子，其分別會在果蠅的眼睛發育、翅膀發育、胸背部發育時表現，進而讓 *CLCN4* 蛋白能被轉譯出來影響果蠅表徵。

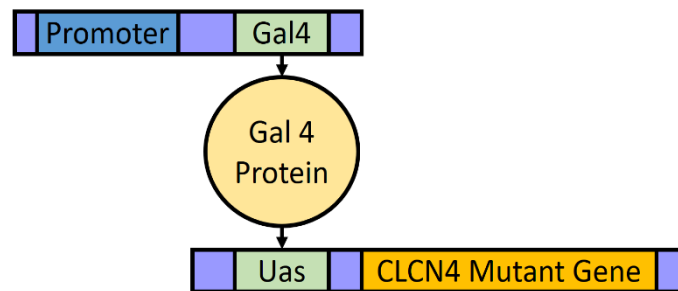


圖 2 GAL4-UAS system

(五) 果蠅眼睛、翅膀與胸背部的發育過程

眼睛於果蠅幼蟲時期稱為眼角盤 (eye-antennal disc)，在三齡幼蟲的階段開始其主要的發育。一開始會由外部往觸角盤(antenna disc)的方向開始分化，而分化前後的細胞中間會形成一條型態發生溝 (morphogenetic furrow) (圖 3)。此時 *Glass Multiple Reporter(GMR)*基因中的 *Glass* 基因片段之轉譯蛋白將幫助溝後細胞繼續分化。邁入蛹型態後，許多細胞會進入細胞凋亡的過程並重新排列，最後形成果蠅成體的複眼 (Casares and McGregor et al., 2021)。

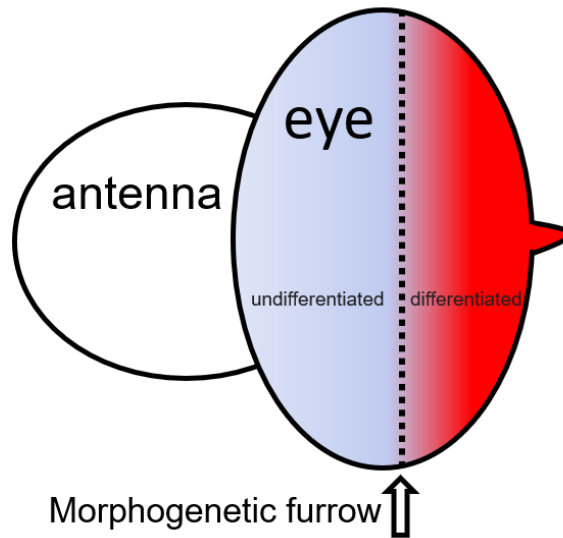


圖 3 型態發生溝示意圖(Chanut and Heberlein et al., 1995)

果蠅翅膀的原型為果蠅翅成蟲盤 (*Drosophila* wing imaginal disc)，屬於幼蟲背部未分化的細胞區域。在翅膀成長期間，背部的細胞會分化為不同區域，區域之間以細胞型態區分，同時翅膀根部的範圍形成皺褶。受 Hedgehog (Hh), Decapentaplegic (Dpp) 和 Wingless (Wg) 等訊號分子形成的活性梯度影響。我們觀察翅膀表徵時所使用的增強子為 *MS1096*，而 *MS1096* 對於翅膀發育僅會造成輕度的缺陷且不會影響翅膀大小(Dahal et al., 2017)。

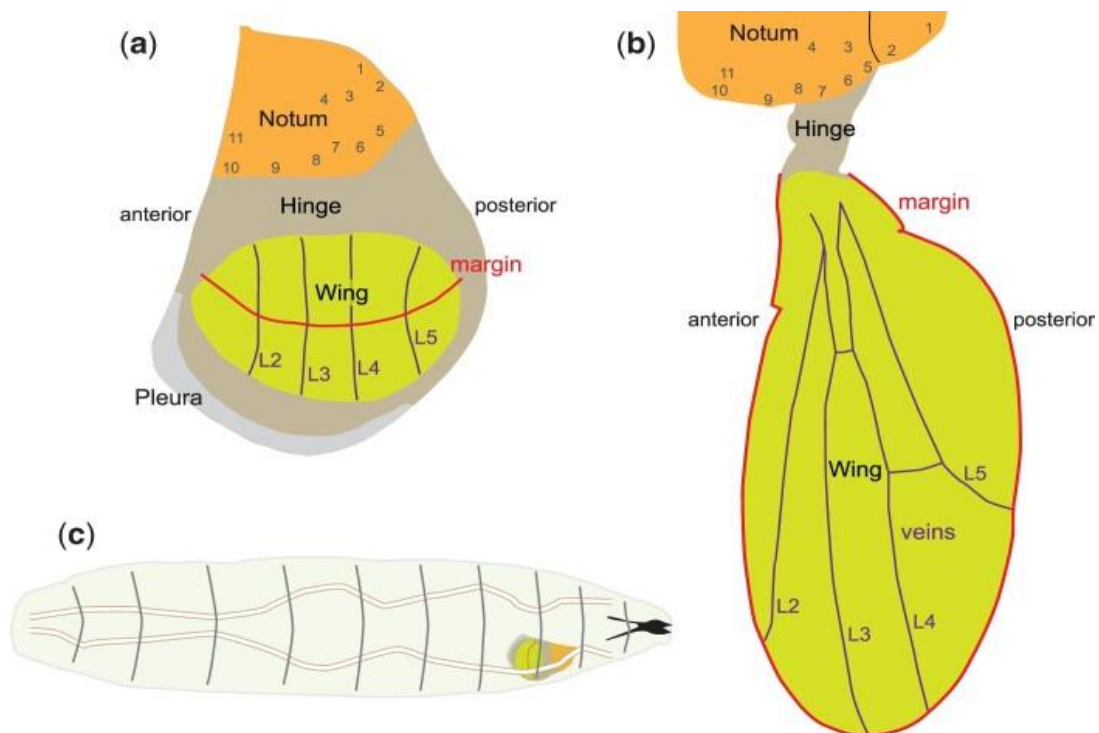


圖 4 果蠅翅成蟲盤示意圖(Tripathi and Irvine et al., 2022)

在背部發育的過程中，有一種受 *achaete-scute (AS-C)* 基因複合體大量表現影響的特殊感覺器官前驅細胞 (sensory organ precursor, SOP) 會形成，而 *Pannier (Pnr)* 基因中的 *Beadex* 基因片段則調控 *AS-C* 基因複合體表現 (Milán et al., 1998)。此感覺前驅細胞 (SOP) 之後便會形不對稱分裂而分化出神經、剛毛 (bristle) 等構造 (Smith J. et al., 1961)。

(六) *SM5a-TM6B(S)* 與 *Tb(T)* 基因

SM5a-TM6B(S) 與 *Tb(T)* 基因是一對可導致果蠅死亡的致死性基因。如果果蠅擁有 *S* 或 *T* 其中之一時，在幼蟲階段就會死亡。特別的是，當一隻果蠅同時具有 *S* 和 *T* 兩個基因時，在 *S* 與 *T* 兩基因作用下，只會使其身上的毛增長而不會造成死亡 (Craymer et al., 1984)。在使用突變果蠅雜交以產生實驗所需的特殊果蠅性狀下，利用 *S* 與 *T* 基因的特性，可更方便的篩選並分辨出哪些果蠅具有目標基因的表現。

二、研究動機

罕見疾病 (rare diseases) 一直以來皆是醫學上一大難題，目前已有超過 6000 種罕見疾病被診斷，並影響全球超過 3 億人的生活。而罕見疾病中有 72% 的疾病與基因異常相關，且有 70% 的罕見疾病於童年時期即引起發病 (Nguengang et al., 2020)。由於疾病種類太過零散且病例不多，很少資源被投入至罕見疾病的醫治與診斷中。本研究的目標便是建立一個快速診斷基因罕見疾病的系統使疾病可於早期被診斷出來以利後續醫治。

本研究選用人類 *CLCN4* 突變基因所造成的神經病變 (hCLCN4) 作為實驗的檢測項目，除了 *hCLCN4* 突變所造成的神經相關病變為罕見疾病的因素外，也因對於 *hCLCN4* 的研究已有些許基礎。在先前的研究中，已將 *hCLCN4* 各式點突變所引起的病徵，歸納成重症 (severe)、中症 (moderate) 與輕症 (mild) (圖 1)。在此一研究的基礎上，可將 *hCLCN4* 各式點突變基因轉殖入黑腹果蠅中，進行果蠅表徵與 *hCLCN4* 病症程度的比較，以期找到不同 *hCLCN4* 突變點在果蠅不同性狀表徵之規律性。

三、研究目的

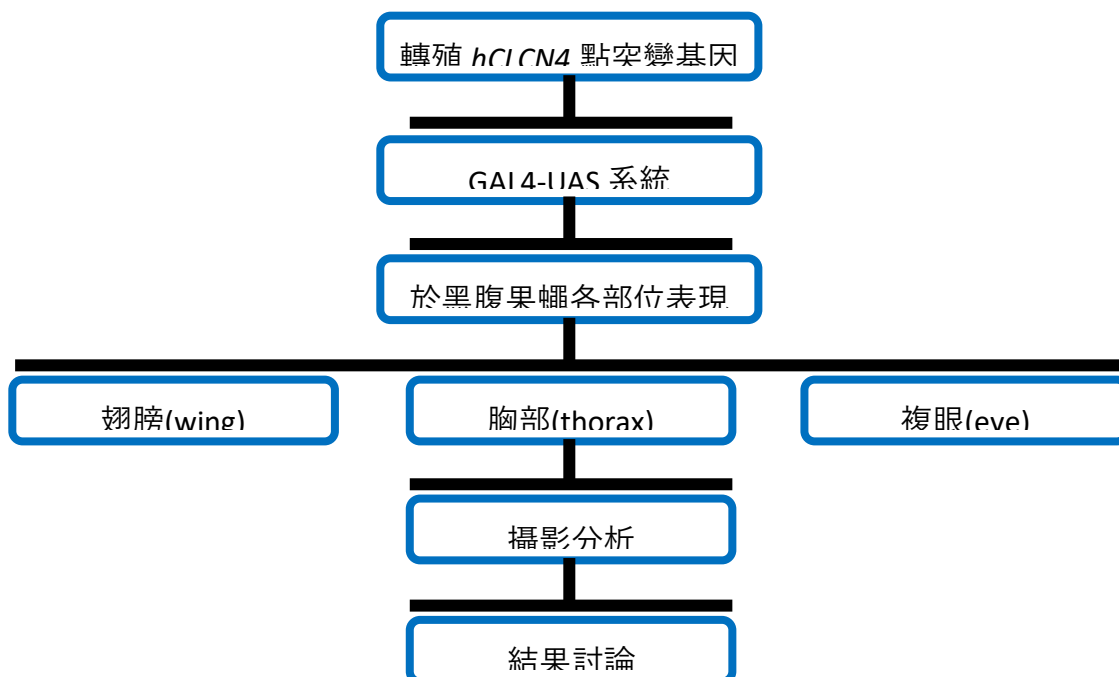
- (一) 將 *hCLCN4* 基因轉殖於黑腹果蠅翅膀探討其表徵影響。
- (二) 將 *hCLCN4* 基因轉殖於黑腹果蠅胸部探討其表徵影響。
- (三) 將 *hCLCN4* 基因轉殖於黑腹果蠅眼睛探討其表徵影響。
- (四) 找出不同 *hCLCN4* 突變點的影響在果蠅不同性狀的表型之規律性。

貳、研究設備與器材

一、器材			
複式顯微鏡	培養皿	鐵針	鑷子
培養管	CO ₂	酒精	
二、分析軟體			
ImageJ 	prism 	Excel 	Snipping tool 
三、黑腹果蠅類型			
果蠅 (UAS+ hCLCN4 mutant(W118)+ST)	果蠅 (UAS+ hCLCN4 mutant((E)E224A)+ST)	果蠅 (UAS+ hCLCN4 mutant(G78S)+ST)	果蠅 (UAS+ hCLCN4 mutant(V212G)+ST)
果蠅 (UAS+ hCLCN4 mutant(L221V)+ST)	果蠅 (UAS+ hCLCN4 mutant(L221P)+ST)	果蠅 (UAS+ hCLCN4 mutant((G)E224A)+ ST)	果蠅 (UAS+ hCLCN4 mutant(V275M)+ST)
果蠅 (UAS+ hCLCN4 mutant(V455I)+ST)	果蠅 (UAS+ hCLCN4 mutant(T532K)+ST)	果蠅 (UAS+ hCLCN4 mutant(S534L)+ST)	果蠅 (UAS+ hCLCN4 mutant(V536M)+ST)
果蠅 (UAS+ hCLCN4 mutant(G544R)+ST)	果蠅 (UAS+ hCLCN4 mutant(A555V)+ST)	果蠅 (UAS+ hCLCN4 mutant(L625F)+ST)	果蠅 (UAS+ hCLCN4 mutant(R718W)+ST)
果蠅 (UAS+ hCLCN4 mutant(G731R)+ST)			
果蠅 (GMR+GAL4+ST)	果蠅 (EY+GAL4+ST)	果蠅 (Pnr+GAL4+ST)	果蠅 (MS1096+GAL4+ST)

參、研究過程與方法

一、研究架構



二、實驗方法

(一) 轉殖果蠅培養

首先利用 GAL4-UAS 系統與跳躍子基因建立起數種帶有 *hCLCN4* 的親代突變種，其中一方帶有 *promoter-GAL4* 基因片段和 *S-T* 兩個基因片段(須注意 *S-T* 兩個基因片段需分別位於第二對染色體與第三對染色體上)，另一方則會帶有 *UAS-hCLCN4* 基因片段和 *S-T* 基因片段(須注意 *S-T* 兩個基因片段需位於第二對染色體與第三對染色體上)，並置於恆溫攝氏 18 度的培養房中。待其羽化後 8 小時內依其腹部特徵挑出處女果蠅 (virgin)。

挑選時會將培養管倒置在特製板子上，並同時會有二氧化碳從板子上噴出以迷暈果蠅，再用顯微鏡觀察其特徵並迅速以筆刷分類。

(二) 篩選轉殖果蠅

將含有 *promoter-GAL4+S-T* 基因與含有 *UAS-hCLCN4 mutant +S-T* 基因的親代果蠅置於同個管子中進行雜交，並置於攝氏 18 度的培養房中，待其產卵並產生子代後即可進行子代果蠅的挑選。由於 *S-T* 基因被獨立遺傳會有毒性，待子代羽化後依其特徵可區分成僅遺傳到 *S-T* 基因和僅遺傳到 *hCLCN4* 突變基因的突變種。僅遺傳到 *S-T* 基因的果蠅，其身上的毛相較於正常果蠅較長(如圖 6(A))，主要以觀察肩膀上的兩根毛為判斷是否有 *ST* 基因的標準。而僅遺傳到 *hCLCN4* 突變基因的突變種，其主要表徵在肉眼可見的範圍和正常果蠅無異(如圖 6(B))。篩選完成後便會將其浸至酒精中短期保存。

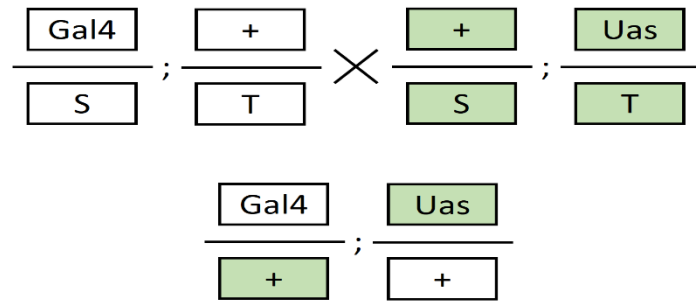


圖 5 突變株果蠅的篩選方式

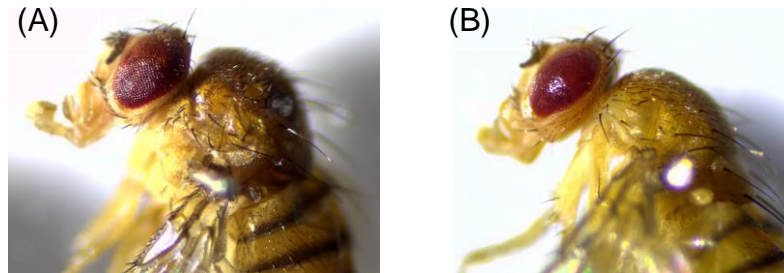


圖 6 (A) hCLCN4(S-T)果蠅 (B)hCLCN4 果蠅

(三) 拍攝果蠅的方式

將果蠅擺在含膠體的皿上並以細針固定，再用建於顯微鏡上的攝影機拍攝欲觀察之部位。一次實驗組拍攝二十隻以上之果蠅以做後續分析。

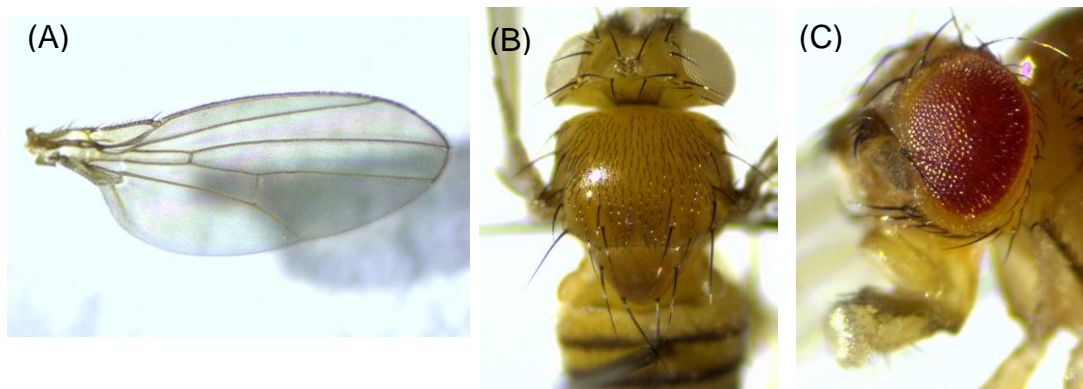


圖 7 拍照範例 (A)果蠅翅膀 (B)果蠅胸背 (C)果蠅複眼

肆、研究結果

一、不同 *hCLCN4* 點突變果蠅翅脈差異度與 *hCLCN4* 病徵程度之關係

如圖 8(A)所示，果蠅的翅脈，可分成橫向的 Ln 和縱向的 cv-a 和 cv-p (Gidaszewski et al., 2009)。經由 GAL4-UAS 系統與 MS1096 為增強子表現在果蠅翅膀上的 *hCLCN4* 點突變，可發現果蠅翅脈的型態明顯與野生型果蠅不同。如圖 8(B)所示，*hCLCN4* 點突變果蠅的翅脈變異類型，可分為：(1)粗翅脈(TVA：thick vein amount)、(2)額外翅脈(EV：extra vein)、(3)縱翅脈消失(CVA：anterior cross-vein loss)、(4)翅脈終

端消失(L5 : L5 loss)。由於跳躍子在 *hCLCN4* 序列中的作用，使具有不同 *hCLCN4* 點突變果蠅的翅脈型態可能不同(圖 9)。故此便能以「差異度=(粗翅脈數量+額外翅脈數量*2+縱翅脈消失數量+翅脈終端消失數量)/翅膀數量」，比較這些 *hCLCN4* 突變果蠅翅脈差異度。這些差異度就是由一組 20 條翅膀上頭五種種類的總數量來計算。

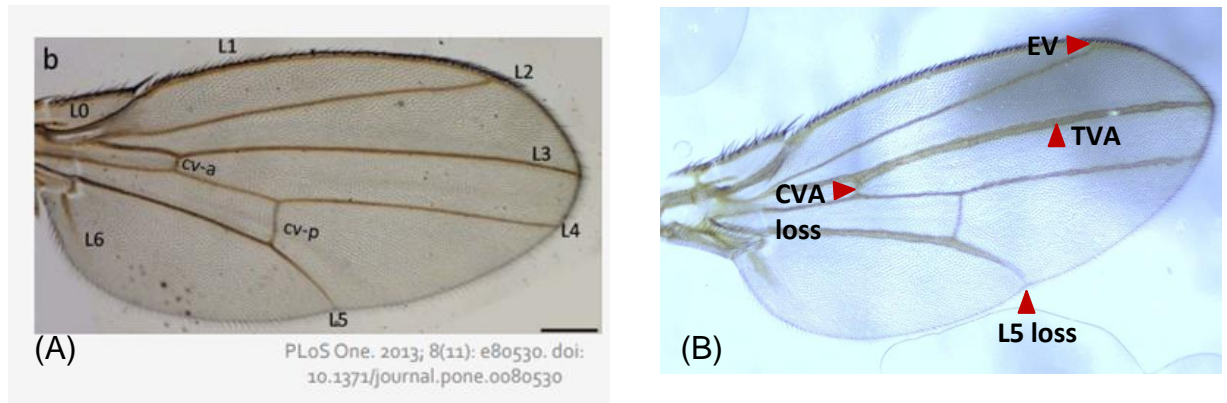


圖 8 野生型與 *hCLCN4* 突變果蠅翅脈圖 (A)野生型 (B) *hCLCN4* 點突變翅脈變異

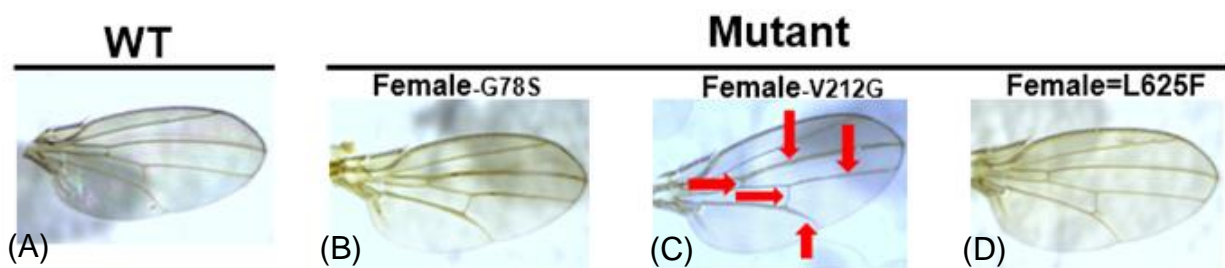


圖 9 *hCLCN4* 點突變果蠅翅脈變化 (以 G78S、V212G、L625F 突變株果蠅為例)
 (A)野生型(WT)果蠅翅脈 (B)*hCLCN4* 點突變(G78S)雌果蠅翅脈
 (C)*hCLCN4* 點突變(V212G)雌果蠅翅脈 (D) *hCLCN4* 點突變(L625F)雌果蠅翅脈

圖 10 為 *hCLCN4* 各種不同點突變果蠅翅脈上的變異程度關係圖，其中圖中的顏色代表點 *hCLCN4* 點突變在人體上的嚴重程度，從嚴重到輕度病徵，分別以紅色、藍色與綠色表示。從圖 10 中發現，不同的 *hCLCN4* 點突變果蠅，均有可能呈現出重度或中度或輕度病徵，換句話說，在 *hCLCN4* 重度病徵中，*hCLCN4* 點突變果蠅翅脈的差異度，散佈於 0.6~4.5 的差異度數值中。同樣的情況也出現在 *hCLCN4* 中度或輕度病徵中。數據顯示，這些 *hCLCN4* 點突變果蠅翅脈的差異度，無法成為判斷 *hCLCN4* 病徵程度的依據。

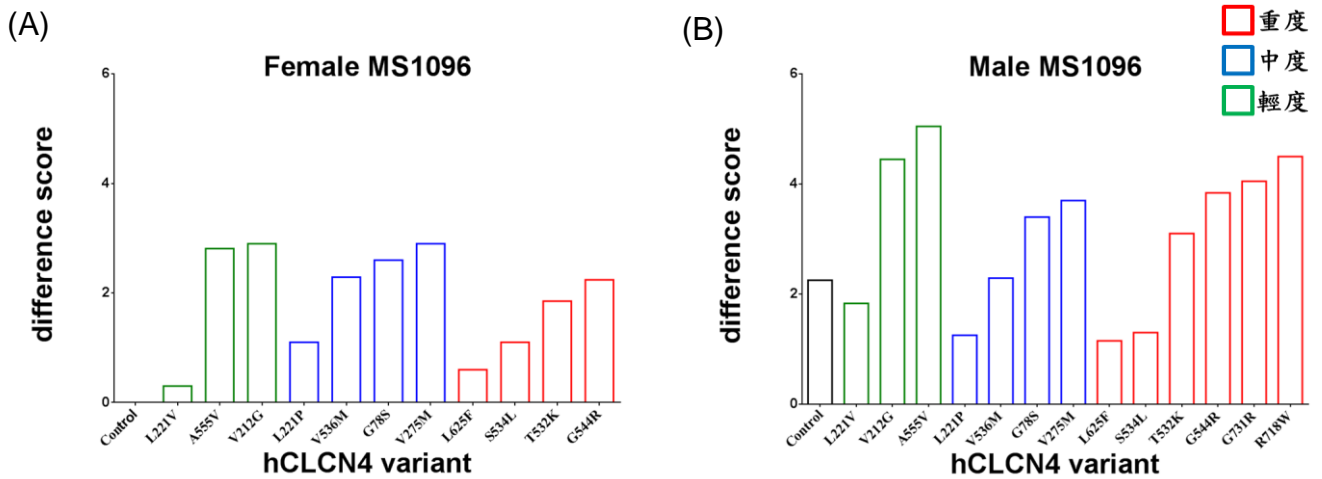


圖 10 不同 *hCLCN4* 點突變果蠅翅脈上的變異程度關係圖

(A) *hCLCN4* 點突變雌果蠅翅脈變異程度

(B) *hCLCN4* 點突變雄果蠅翅脈變異程度

圖中顏色代表 *hCLCN4* 點突變在人體上所造成的病程嚴重程度，

紅色:嚴重病徵、藍色:中度病徵，綠色:輕微病徵。

差異度(difference score)=(粗翅脈數量+額外翅脈數量*2+縱翅脈消失數量+翅脈終端消失數量)/翅膀數量

二、不同 *hCLCN4* 點突變果蠅胸背剛毛變異比例與 *hCLCN4* 病徵程度之關係

在果蠅的胸背部中，可區分成上胸背(notum)和下胸背(scutellum)。野生型果蠅的上胸背和下胸背上各有四根整齊的剛毛(圖 11)，而在以 *Pnr* 作為增強子的 *hCLCN4* 點突變果蠅胸背中，會出現剛毛生長或著生異常的現象。初步將這些剛毛異常的表徵區分成四種形式：受損(impair)、消失(loss)、增生(extra)與重複(duplicate)(圖 12)。如圖 12 所示，剛毛「受損(impair)」代表其體表上仍具有剛毛著生點但卻出現剛毛消失的情況，而「消失(loss)」則代表體表上的剛毛著生點消失的現象，「增生(extra)」則是代表上胸背或下胸背出現多於 4 根剛毛的情形，「重複(duplicate)」則表示在增生的情況下，其體表的剛毛著生點相當靠近彼此的狀況。

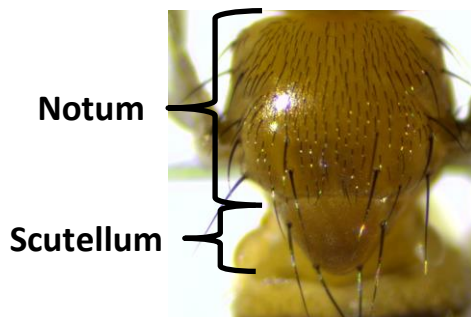


圖 11 野生型果蠅的胸背部

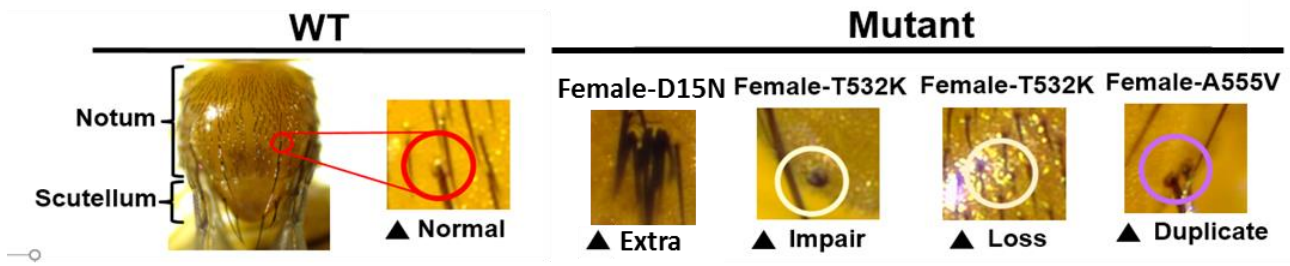


圖 12 野生型與 *hCLCN4* 突變果蠅胸背中剛毛生長與著生方式

實驗中，以「突變株剛毛異常比例(Proportion of mutated) = (突變株果蠅中剛毛數量 - 野生型果蠅剛毛數量) x 100% / 突變株剛毛總數量」進行突變株果蠅剛毛異常的分析。從圖 13 中發現，在下胸背(scutellum)中，代表 *hCLCN4* 中症病徵的 *hCLCN4* 點突變果蠅的剛毛異常比例大致上均落在 0.5 左右。此結果顯示 *hCLCN4* 點突變果蠅的剛毛異常特徵，有很大的機會成為判斷 *hCLCN4* 中度病徵的依據。

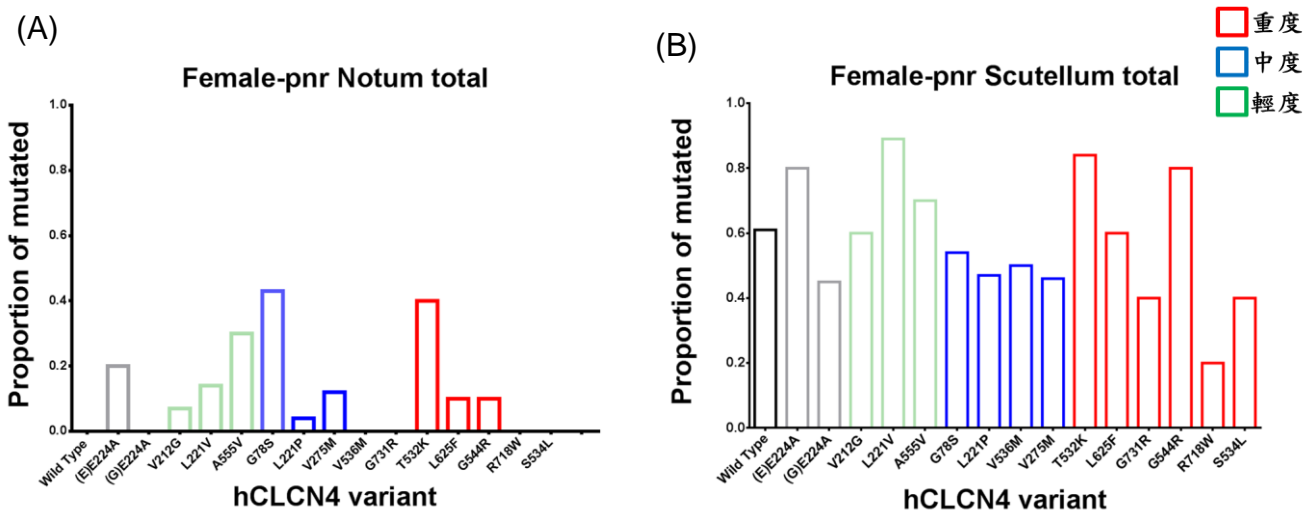


圖 13 不同 *hCLCN4* 點突變果蠅胸背部剛毛異常比例之關係圖

(A) *hCLCN4* 點突變雌果蠅上胸背剛毛異常比例

(B) *hCLCN4* 點突變雌果蠅下胸背剛毛異常比例

圖中顏色代表 *hCLCN4* 點突變在人體上所造成的病程嚴重程度，

紅色:嚴重病徵、藍色:中度病徵，綠色:輕微病徵。

突變株剛毛異常比例(Proportion of mutated) =

(突變株果蠅中剛毛數量 - 野生型果蠅剛毛數量) x 100% / 突變株剛毛總數量(N)

三、不同 *hCLCN4* 點突變果蠅複眼表徵與 *hCLCN4* 病徵程度之關係

最後我們將 *hCLCN4* 各式點突變轉殖進果蠅眼睛上，並觀察其表徵。首先進行眼睛面積大小的測量比較，如圖 14 所示，在輕症果蠅中複眼的面積大小從低於 50000 pixel 到接近 150000 pixel 都有，中症果蠅的面積多數位於 125000 pixel 附近但其誤差值較大，重症果蠅的複眼面積在單個點突變中就有很大的差異。基於以上因素，推測果

蠅複眼面積大小與 *hCLCN4* 病徵程度沒有明顯的關係。

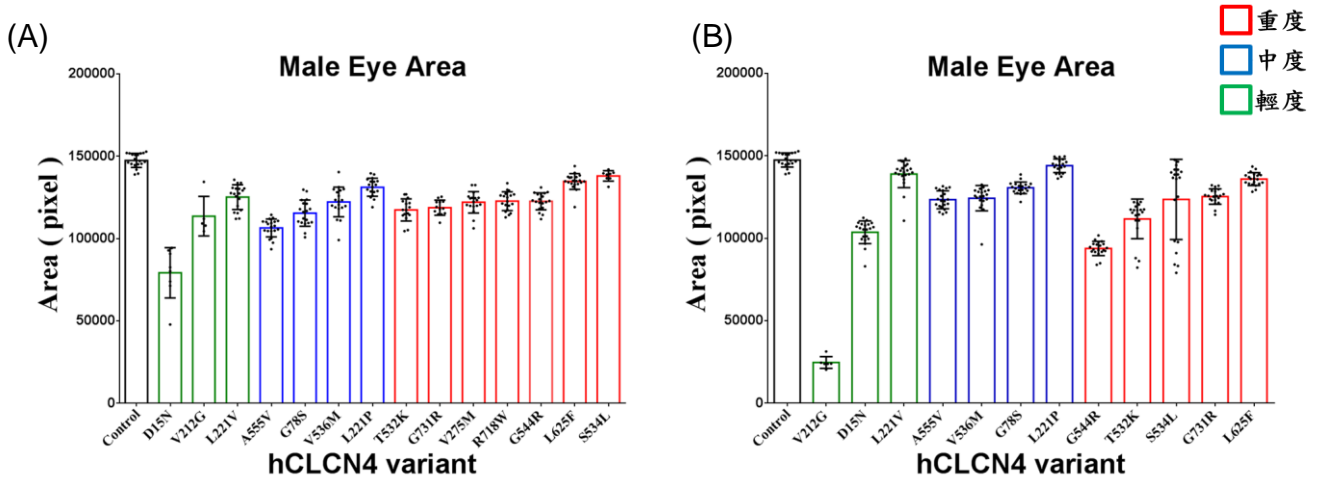


圖 14 不同 *hCLCN4* 點突變果蠅複眼平均面積之關係圖

(A) (B) *hCLCN4* 點突變雄果蠅上複眼平均面積。圖中顏色代表 *hCLCN4* 點突變在人體上所造成之病徵嚴重程度，紅色:嚴重、藍色:中度，綠色:輕微病徵

此外，在 *hCLCN4* 點突變果蠅複眼上，可觀察到異於野生型的特殊表徵。如圖 15 所示，有些 *hCLCN4* 突變果蠅的複眼可能因出現部分細胞壞死(necrosis)的現象，而出現黑色斑點(圖 15(B))；有些 *hCLCN4* 突變果蠅的複眼因眼睛發育異常，而導致複眼表面較為光滑(圖 15(C))，稱之為複眼粗糙度(roughness)異常的果蠅。

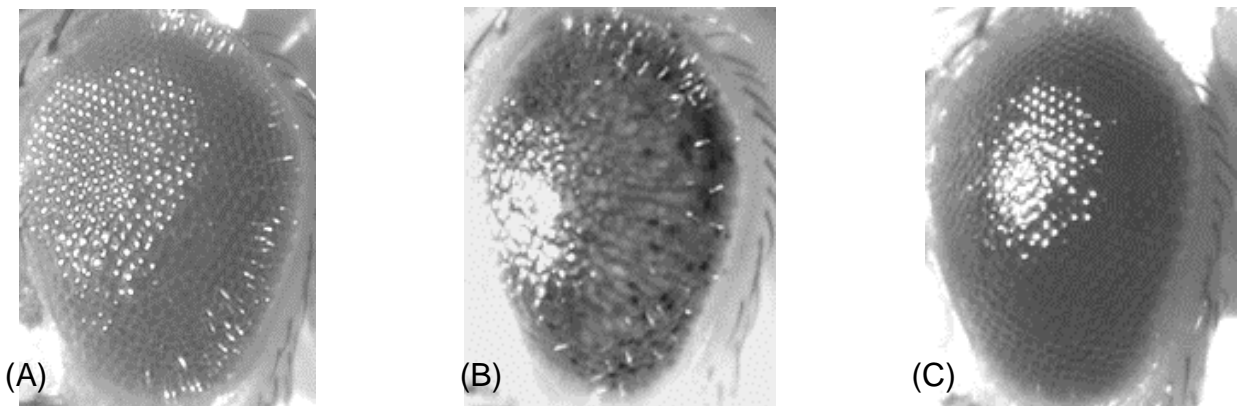


圖 15 野生型與 *hCLCN4* 突變果蠅複眼外觀圖

(A) 野生型果蠅複眼 (B) 出現黑斑之果蠅複眼 (例如 G78S)
(C) 粗糙度異常之果蠅眼睛(例如 S534L)

為了分析果蠅複眼外觀的變異，實驗中分別以「總數中粗糙度異常個數*100%/總體數」和「總體中細胞壞死異常個數*100%/總體數」進行突變株果蠅複眼外觀粗糙度與細胞壞死程度之百分比分析。從圖 16 中發現，代表 *hCLCN4* 重度病徵(紅色)的 *hCLCN4* 點突變果蠅複眼粗糙度異常與複眼出現細胞壞死的比例大多介於 50%~100%。顯示，若 *hCLCN4* 點突變果蠅的複眼粗糙度與細胞壞死比例介於

50%~100%時，判斷 *hCLCN4* 出現重度病徵的機率較高。此外，當 *hCLCN4* 點突變果蠅複眼細胞壞死比例接近 100%時，可判斷 *hCLCN4* 出現中度(藍色)以上病徵的機率較高。最後若是 *hCLCN4* 點突變果蠅複眼粗糙度異常比例為 100%而細胞壞死比例為 80%時，可判斷 *hCLCN4* 出現輕度病徵(綠色)的機率較高。由此結果可知，合併判斷 *hCLCN4* 點突變果蠅的複眼粗糙度與細胞壞死程度的特徵比例，有很大的機會成為判斷 *hCLCN4* 重度、中度、及輕度病徵的依據。

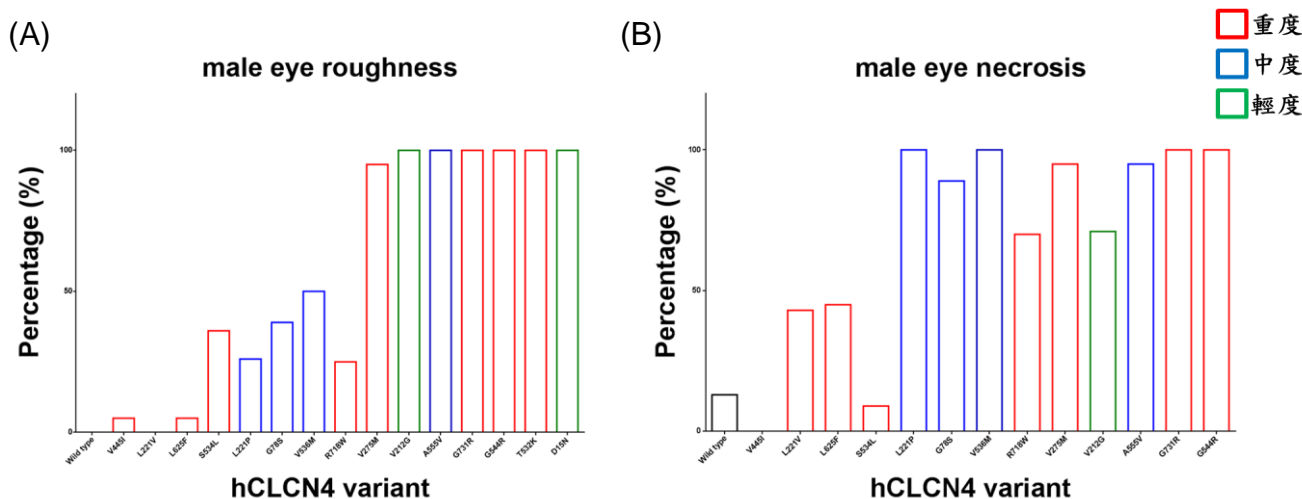


圖 16 不同 *hCLCN4* 點突變果蠅複眼粗糙度與發生細胞壞死百分比之關係圖

(A) *hCLCN4* 點突變雄果蠅複眼粗糙度之百分比

(B) *hCLCN4* 點突變雄果蠅複眼發生細胞壞死之百分比

圖中顏色代表 *hCLCN4* 點突變在人體上所造成的病程嚴重程度，紅色:嚴重病徵、藍色:中度病徵，綠色:輕微病徵。

伍、研究討論

一、不同 *hCLCN4* 點突變果蠅翅脈、胸背部、複眼異常表徵之探討

在觀察翅脈變化時，若以 *MS1096* 為增強子時會造成翅脈缺陷而顯得偏細，很可能會誤判正常翅脈為突變翅脈。未來將可增加控制組果蠅數量並利用 AI 訓練模型來作為判斷輔助減少誤差的出現。

在針對不同 *hCLCN4* 點突變果蠅複眼面積大小的統計分析中，主要是以所含像素作計算，但照相時可能因些微的放大倍率不同因而會出現些微的誤差。為減少此類誤差的出現，未來可以「眼睛佔整的頭部面積」的百分比來做紀錄，如此可排除因放大率不同的誤差之外，也能排除因個體差異所造成的差異。

二、不同 *hCLCN4* 點突變果蠅複眼外觀粗糙度與細胞壞死程度百分比之分析結果

由於在人體中 *hCLCN4* 突變所造成的病徵，大多與神經系統有關，而在目前選擇

的觀察特徵中(翅脈、剛毛生長與著生方式、複眼狀態)，其中以複眼的發育與神經系統的關聯性較大，故果蠅複眼外觀表徵的變化(例如複眼粗糙程度，或是出現細胞壞死的程度等等)最有機會成為判斷 *hCLCN4* 病徵程度的依據。從圖十六的結果，「合併判斷複眼粗糙度與細胞壞死程度的特徵比例，有很大的機會可成為判斷 *hCLCN4* 重度、中度、及輕度病徵的依據」，符合我們的推測。

三、提高病癥程度之判斷精準度的探討

此次實驗主要以眼睛、背部、翅膀作為主要的觀察對象。然而經圖十六發現，要判斷病徵程度，也許並非觀察單一的表徵狀態，而是合併數個表徵進行交叉討論，以期找出異常表徵與疾病程度的規律性。未來，或許可加入果蠅其他身體部位的性狀作為觀察的對象，例如體節數量、平衡棍、複眼顏色等等，或是觀察果蠅發育早期的特徵，以期縮短檢驗的時間。

此外對於 *CLC-4* 的作用機制並未了解，目前僅可利用將基因植入果蠅再觀察其不同部位的反應來推測在人體的效果會是如何。若能了解此通道蛋白在神經細胞中的作用機制時，將有機會分析表徵以外的變化與疾病程度之間是否存在規律性，藉此成為判斷病徵程度的依據。

陸、結論

- 一、*hCLCN4* 各式點突變果蠅翅脈的差異度，無法成為判斷 *hCLCN4* 病徵程度的依據。
- 二、*hCLCN4* 各式點突變果蠅下胸背(scutellum)的剛毛異常特徵，可以成為判斷 *hCLCN4* 中度病徵的依據。
- 三、*hCLCN4* 各式點突變果蠅複眼面積大小，無法成為判斷 *hCLCN4* 病徵程度的依據。
- 四、合併分析 *hCLCN4* 各式點突變果蠅複眼外觀粗糙度與細胞壞死程度比例之結果，可以成為判斷 *hCLCN4* 重度、中度、輕度病徵的依據。

柒、未來展望

未來期望可以再增加用於實驗的果蠅數目，提高這個系統的準確度，並且開發出其他易於觀察的果蠅異常表徵，以利實驗操作與分析，或是使用其他種類的遺傳疾病來增加資料的豐富程度。最後希望能建立一套完整以突變果蠅表徵分析遺傳疾病病癥程度的檢測流程，以期在臨床上使患者能被早期診斷出來，以利後續治療。

捌、參考文獻資料

- 一、 Casares, F., and McGregor, A. P. (2021). The Evolution and Development of Eye Size in Flies. *Wiley Interdiscip. Rev. Dev. Biol.* 10, e380. <https://doi.org/doi:10.1002/wdev.380>
- 二、 Chanut, F., and Heberlein, U. (1995). Role of the morphogenetic furrow in establishing polarity in the *Drosophila* eye. *Development* 121, 4085–4094. [doi:10.1242/dev.121.12.4085](https://doi.org/doi:10.1242/dev.121.12.4085)
- 三、 Craymer, L. (1984). Third multiple six, b structure. *Drosophila Information Service*, 60, 234.
- 四、 Dahal GR, Pradhan SJ, Bates EA. (2017) Inwardly rectifying potassium channels influence *Drosophila* wing morphogenesis by regulating Dpp release. *Development*. 144(15):2771-2783. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5560040/>
- 五、 Françoise Chanut, Ulrike Heberlein; (1995) Role of the morphogenetic furrow in establishing polarity in the *Drosophila* eye. *Development* . 121 (12): 4085–4094. doi: <https://doi.org/10.1242/dev.121.12.4085>
- 六、 Gidaszewski N, Baylac M, Klingenberg C. Evolution of sexual dimorphism of wing shape in the *Drosophila melanogaster* subgroup. *BMC Evolutionary Biology* (2009) Evolution of sexual dimorphism of wing shape in the *Drosophila melanogaster* subgroup. *BMC Evolutionary Biology* 9(1):110 <https://doi.org/10.1186/1471-2148-9-110>
- 七、 Nguengang Wakap, S., Lambert, D. M., Olry, A., Rodwell, C., Gueydan, C., Lanneau, V., Murphy, D., Le Cam, Y., & Rath, A. (2020). Estimating cumulative point prevalence of rare diseases: analysis of the Orphanet database. *European journal of human genetics : EJHG*, 28(2), 165–173. <https://doi.org/10.1038/s41431-019-0508-0>
- 八、 Guzman, R. E., Sierra-Marquez, J., Bungert-Plümke, S., Franzen, A., & Fahlke, C. (2022). Functional Characterization of CLCN4 Variants Associated With X-Linked Intellectual Disability and Epilepsy. *Frontiers in molecular neuroscience*, 15, 872407. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2022.872407>
- 九、 Hu, YB., Dammer, E., Ren, RJ. et al. (2015) The Endosomal-lysosomal System: From Acidification and Cargo Sorting to Neurodegeneration. *Transl Neurodegener* 4, 18 <https://doi.org/10.1186/s40035-015-0041-1>
- 十、 Jentsch, T. J., Pusch, M. (2018). CLC Chloride Channels and Transporters: Structure, Function, Physiology, and Disease. *Physiological Reviews*, 98 : 1493-1590 <https://doi.org/10.1152/physrev.00047.2017>
- 十一、 Jentsch T.J., Stein V, Weinreich F, Zdebik AA. (2002) Molecular structure and physiological function of chloride channels. *Physiol Rev* 82: 503–568, <https://doi.org/10.1152/physrev.00029.2001>.
- 十二、 Milán M, Diaz-Benjumea FJ, Cohen SM. (1998) *Beadex* encodes an LMO protein that

regulates Apterous LIM-homeodomain activity in *Drosophila* wing development: a model for LMO oncogene function. *Genes Dev.* 12(18):2912-20.

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC317163/>

- 十三、Palmer E.E., Pusch M., Picollo A., Forwood C., et al. (2023) Functional and clinical studies reveal pathophysiological complexity of CLCN4-related neurodevelopmental condition. *Mol Psychiatry* 28, 668–697 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9908558/>
- 十四、Palmer, E. E., Stuhlmann, T., Weinert, S., Haan, E., Van Esch, H., et al. (2018). De novo and inherited mutations in the X-linked gene CLCN4 are associated with syndromic intellectual disability and behavior and seizure disorders in males and females. *Molecular psychiatry*, 23(2), 222–230. <https://doi.org/10.1038/mp.2016.135>
- 十五、Poroca DR, Pelis RM and Chappe VM (2017) CIC Channels and Transporters: Structure, Physiological Functions, and Implications in Human Chloride Channelopathies. *Front. Pharmacol.* 8:151. doi: 10.3389/fphar.2017.00151
- 十六、Smith J. M., Sondhi K.C. (1961) The Arrangement of Bristles in *Drosophila*. *Development* 9 (4): 661–672 <https://doi.org/10.1242/dev.9.4.661>
- 十七、Stölting G, Fischer M, Fahlke C. (2014) CLC channel function and dysfunction in health and disease. *Front Physiol.* 5:378. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4188032/>
- 十八、Tripathi, B. K., Irvine, K. D. (2022). The wing imaginal disc. *Genetics*, 220(4), iyac020. <https://doi.org/10.1093/genetics/iyac020>
- 十九、Winckler B, Faundez V, Maday S, Cai Q, Guimas Almeida C, Zhang H (2018) The Endolysosomal System and Proteostasis: From Development to Degeneration. *J Neurosci* 38:9364–9374. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1665-18.2018>