

鈣離子通道基因剔除小鼠微陣列資料分析

林守羿¹ 蔡孟勳^{1,2} 何宜霖¹¹ 國立中興大學資訊管理研究所² 國立中興大學基因體暨生物資訊學研究所

xup6zeo@gmail.com

摘要

大腦內的各個腦區分別執掌不同的功能，其中的海馬負責空間記憶及短期記憶形成長期記憶。Cav3.2 T型鈣離子通道的開啟會觸發許多細胞內生物化學的反應，例如肌肉收縮、基因表達、神經傳導物質的釋放等。近期文獻指出， $\alpha 1H$ T型鈣離子通道在海馬中有高度表現，並造成依賴海馬相關的學習障礙缺陷。本研究中利用微陣列基因晶片，取得 $\alpha 1H$ T型鈣離子通道剔除小鼠在接受痕跡恐懼實驗前後的左右側海馬內之基因表達數據，進行成對樣本T檢定分析 (Paired-Samples T-Test)，確認小鼠於訓練前後左右兩側海馬內基因表現量具有顯著差異；再利用線性迴歸分析 (Linear Regression Analysis) 篩選出表現量顯著改變之標靶基因。接著，利用階層式分析 (Hierarchical Clustering) 找出尚未在醫學中被證實生物功能的NA (non-available) 基因所屬分群，並透過基因資料庫比對標靶基因是否與海馬功能有所關聯，進而探討標靶基因對學習記憶之影響。研究結果顯示， $\alpha 1H$ T型鈣離子通道剔除小鼠的右側海馬在接受訓練後基因表現量改變不大；記憶訓練則使左側海馬內基因表現量回復到 $\alpha 1H$ T型鈣離子通道未被剔除之野生型小鼠相似之水準，本論文之研究成果將為基礎醫學研究者未來針對這些標靶基因進行功能探討之可行方向。

關鍵詞：鈣離子通道、微陣列晶片、學習與記憶、成對樣本T檢定、線性迴歸、關聯階層式分群

1. 緒論

海馬是大腦形成長期記憶的區塊，和情境學習與空間記憶有所關連。已有研究證實 $\alpha 1H$ -T型鈣離子通道確實在依賴海馬學習試驗上扮演一個重要角色[1]。目前已知 $\alpha 1H$ T型鈣離子通道相關疾病，如自閉症 (Autism)、兒童癲癇症候群 (Childhood absence epilepsy)，便是因為鈣離子通道的結構和功能異常所導致的。又當記憶不再重複使用，或是在腦部受到損傷、罹患疾病如阿茲海默症、過度壓抑痛苦經驗下，記憶學習能力也就慢慢喪失。本研究動機便是希望可以發現在鈣離子通道受損的狀況

下，是否導致其他基因表現量顯著改變，並且是否在接受學習訓練後可以改善其基因表現程度。本研究中運用小鼠腦中Cav3.2 T型鈣離子通道基因剔除小鼠之海馬微陣列基因晶片數據進行分析，比較左右兩側海馬內之基因在恐懼制約前後的表達量是否有差異，並且探討差異表達之基因群中與學習記憶相關者，其表達程度與Cav3.2 T型鈣離子通道剔除間的關聯性。

2. 研究方法與架構

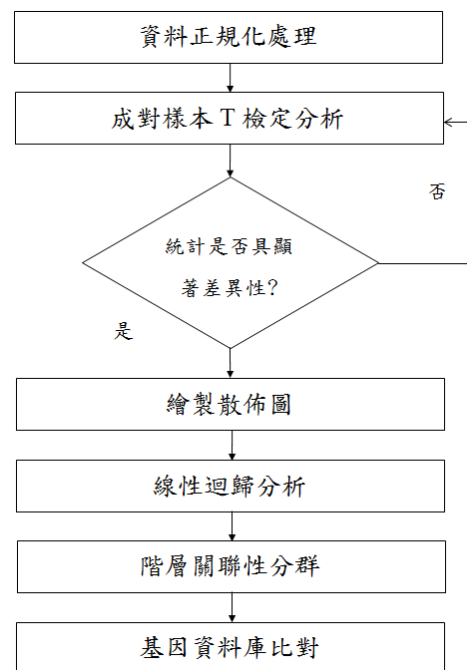


圖 1 系統流程圖

本研究先將微陣列基因晶片數據進行正規化處理。再利用成對樣本T檢定，分析Cav3.2基因剔除小鼠在訓練前後的基因表現量是否具有顯著差異。若無顯著差異，則調整P-Value 並重新進行統計分析；若有顯著差異，則透過散佈圖來觀察樣本間呈現的相關模型。接著，利用直線迴歸分析篩選離群值作為本研究之可能標靶基因。因數據中有尚未被醫學證實生物功能之NA (non-available) 基因，故利用階層式分析分群，生物醫學可依結果進一步

推論是否同一分群內具有相近之生物功能。最後，將標靶基因透過基因資料庫比對，期望可以找出在剔除Cav3.2 T型鈣離子通道後對學習記憶有所影響之基因，以達成研究目的。

2.1 資料正規化

本研究所使用的資料是以cDNA微陣列所記錄的39,200筆基因表現資料，將一些空值、雜訊等可能會影響結果的數據刪除後，左腦剩下39,194筆數據；右腦剩下39,187筆數據。本研究中分為剔除鈣離子通道之未受訓練組的左腦、未受訓練組的右腦、受訓練組的左腦、受訓練組的右腦各2組，共8組的資料去做分析(表1)。

表 1 老鼠鈣離子表型實驗樣本表

NO	Sample	Name	Gpr	備註
1	KONLHIP080907	ut_L1	H09-1060806055	未受訓練組_左腦
2	KONLHIP080907	ut_L2	H10-1060806054	未受訓練組_左腦
3	KOTLHIP080907	t_L1	H13-1060807337	受訓練組_左腦
4	KOTLHIP080907	t_L2	H14-1060807338	受訓練組_左腦
5	KONRHIP080907	ut_R1	H11-1060807213	未受訓練組_右腦
6	KONRHIP080907	ut_R2	H12-1060807214	未受訓練組_右腦
7	KOTRHIP080907	t_R1	H15-1060807358	受訓練組_右腦
8	KOTRHIP080907	t_R2	H16-1060807359	受訓練組_右腦

利用公式來調整基因表現量顯著程度，正規化公式如下：

$$\log_2 \left\{ \left(\frac{X - \min}{(\max - \min)} \right) * (\max - \min) \right\}$$

公式中X為基因表現量；max為母群體中最大值；min為母群體中最小值。經過正規化後數據便介於0至19之間。

2.2 成對樣本T檢定 (Paired-Sample t-test)

自成對母體中抽取元素，同一元素前後兩個觀察值所構成的樣本稱為成對樣本 (paired samples) [2]。若兩群體的資料是成對出現，也就是資料間具有相依性，如未訓練和訓練後的數據，則必須應用成對樣本T檢定。此類T檢定同樣是檢定兩群體特性的期望值是否相等之一種常用的統計方法。

本研究中，設定一個標準的P-value值來做為標靶基因的篩選。P-value值越小期信賴水準度越高 (如P-value小於0.05，信賴水準為95%；若P-value小於0.01，信賴水準為99%)。在研究中設定虛無假設H₀為基因於受訓練前後無顯著差異、對立假設H₁為基因於受訓練前後有顯著差異。若計算出的P-value值大於前述的標準值，則表示接受虛無假設，

代表訓練前後基因表現量無顯著差異；反之則拒絕虛無假設H₀，表示訓練前後基因表現量具顯著差異。

2.3 散佈圖分析 (Scatter Plot)

分別在散佈圖之橫軸(X)與縱軸(Y)上標示未受訓練的基因表現量與受訓練的基因表現量。每一筆資料對應圖中的一個點，可顯示在同一個體上度量的兩個變數之間的關聯、方向、強度。直線關聯是普遍的散佈型態，當點的分佈接近直線，則表示兩變數間關聯强度高，反之若點的分佈較廣，則表示兩變數間關聯強度低，而偏離整體的點，稱之為離群值 (outlier)。利用相關係數 (γ) 可以觀察兩變數之間直線關聯的方向和強度，其值介於-1 到+1之間。當 γ 值靠近0，代表關聯性強度低；若 γ 值向-1 或+1接近時，表示關聯性強度逐漸增強，並且點的分佈接近於一直線。

2.4 迴歸分析 (Regression Analysis)

迴歸分析[3] (Regression Analysis) 是由Francis Galton所發現。迴歸分析是建立因變數Y (或稱依變數, dependent variables) 與自變數X (independent variables) 之間關係的模型。可以了解自變數與依變數關係、影響方向與程度，並利用自變數與估計的方程式對依變數做預測。因微陣列基因晶片中取得的資料過於龐大，故本研究中利用迴歸分析中的簡單直線迴歸 (Simple Linear Regression) 作為篩選標靶基因的工具。將每個基因的殘差值遞增排序後，從中挑出基因表現量具顯著差異的觀察值做為標靶基因。

2.5 階層關聯性分群 (Hierarchical Clustering)

階層式分群法 (hierarchical clustering) [4] 透過一種階層架構的方式，將資料層層反覆地進行分裂或聚合，最後產生樹狀結構。常見的方式有兩種：如果採用聚合的方式，階層式分群法可由樹狀結構的底部開始，將資料或群聚逐次合併；如果採用分裂的方式，則由樹狀結構的頂端開始，將群聚逐次分裂。在本研究中，輸入的變數為左腦受訓練前與受訓練後基因表現量之平均，群數凝聚過程是以歐基里德直線距離平方測量區間，當個體間有最小歐式距離平方時，將分為同一群聚。

3. 研究結果

3.1 成對樣本 T 檢定結果

本研究中，在成對樣本T檢定中設定P-value 值來做為標靶基因的篩選，假設檢定中，虛無假設H₀

為基因於受訓練前後無顯著差異；對立假設 H_1 為基因於受訓練前後有顯著差異。表2為左海馬未訓練與訓練之成對樣本T檢定結果。基因個數為39,194個，在P-Value小於等於0.05(信心水準95%)的成對樣本T檢定之下，小鼠在接受訓練前與訓練後的數據相關性為0.959，並且達到0.000顯著性。故，拒絕虛無假設 H_0 ，表示左海馬內基因群在訓練前後具有顯著差異。表3為右海馬於訓練前後之成對樣本T檢定結果。基因個數為39,187個，P-Value 小於等於0.05(信心水準95%)的成對樣本T檢定之下，小鼠在接受訓練前與訓練後的數據相關性為0.977，並且達到0.000顯著性。故，拒絕虛無假設 H_0 ，表示左海馬內基因群在訓練前後具有顯著差異。

表 2 左海馬未訓練與訓練之成對樣本T檢定結果

基因個數		訓練前後之相關性	顯著性	
39194		.959	.000	
平均數	標準差	平均數的標準誤	差異的 95%信賴區間	
			下界	上界
-0.440293	0.837874	0.004232	-0.44859	-0.432
t	自由度	顯著性(雙尾)		
-104.033	39193	0		

表 3 右海馬未訓練與訓練之成對樣本T檢定結果

基因個數		訓練前後之相關性	顯著性	
39187		.977	.000	
平均數	標準差	平均數的標準誤	差異的 95%信賴區間	
			下界	上界
0.338054	0.678214	0.003426	0.331339	0.34477
t	自由度	顯著性(雙尾)		
98.67135	39186	0		

3.2 散佈圖分析結果

將成對樣本T檢定運算後的結果輸入散佈圖中，X軸為未受訓練之控制組的基因表現平均值(ut_average)，Y軸為受訓練之實驗組的基因表現平均值(t_average)。圖1為小鼠左側海馬中基因表現散佈圖 (P-Value \leq 0.01，信心水準99%以上)，R平方達到0.832。圖2為小鼠左側海馬中基因表現散佈圖 (P Value \leq 0.05，信心水準95%以上)，R平方達到0.865。從圖1和圖2中可以了解未訓練與受訓練兩變數之間關聯性強度，由於兩者相關係數平方均接近+1，表示關聯性強度強，並且點的分佈接近於一直線。圖3為小鼠右側海馬中基因表現散佈圖 (P-Value \leq 0.01，信心水準99%以上)，R平方達到0.323。圖4為小鼠右側海馬中基因表現散佈圖 (P-Value \leq 0.05，信心水準95%以上)，R平方達到0.807。代表兩變數間關聯性低；但信心水準95%時，

相關係數平方達到0.807，表示兩變數關聯性增強。

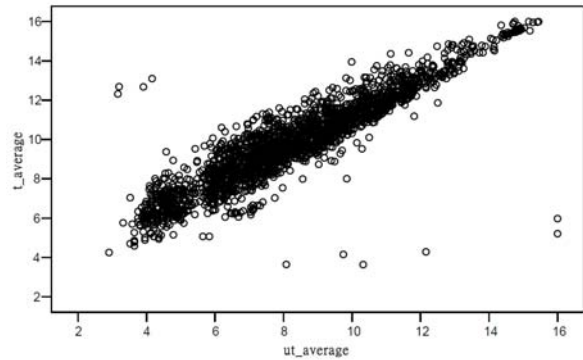


圖 1 小鼠左側海馬中基因表現散佈圖 (P \leq 0.01)

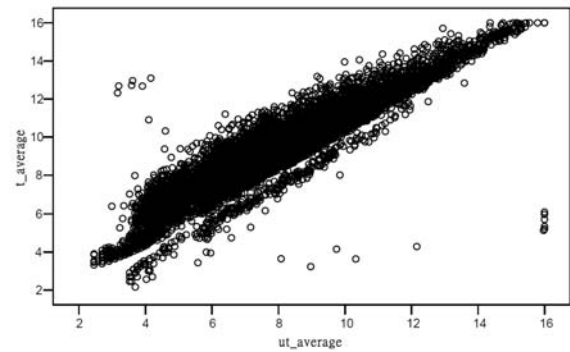


圖 2 小鼠左側海馬中基因表現散佈圖 (P \leq 0.05)

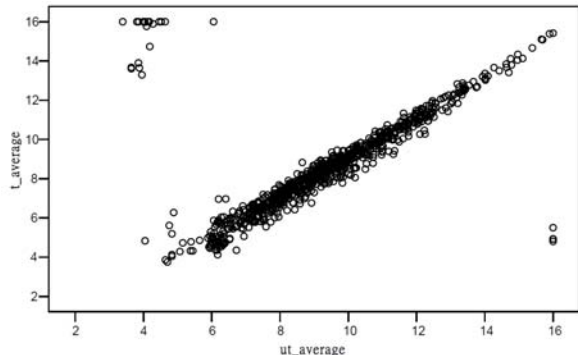


圖 3 小鼠右側海馬中基因表現散佈圖 (P \leq 0.01)

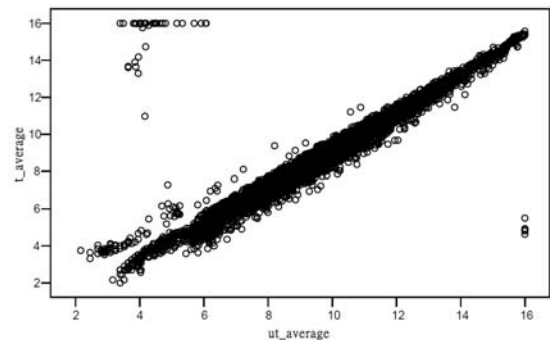


圖 4 小鼠右側海馬中基因表現散佈圖 (P \leq 0.05)

3.3 迴歸分析結果

迴歸分析的使用是希望可以降低大量數據的

維度，本研究以P-Value \leq 0.001(信賴水準99.9%)、P-Value \leq 0.005(信賴水準99.5%)、P-Value \leq 0.01(信賴水準99%)、P-Value \leq 0.05(信賴水準95%)為基準進行基因篩選。圖5為左海馬線性迴歸分析後結果。當P-Value \leq 0.001(信賴水準99.9%)時，篩選出4筆基因；當P-Value \leq 0.005(信賴水準99.5%)時，篩選出8筆基因；當P-Value \leq 0.01(信賴水準99%)時，篩選出17筆基因；當P-Value \leq 0.05(信賴水準95%)時，篩選出36筆基因。圖6為右海馬線性迴歸分析後結果。當P-Value \leq 0.001(信賴水準99.9%)時，未篩選出任何基因；當P-Value \leq 0.005(信賴水準99.5%)時，篩選出19筆基因；當P-Value \leq 0.01(信賴水準99%)時，篩選出38筆基因；當P-Value \leq 0.05(信賴水準95%)時，篩選出59筆基因。左側海馬中被篩選出來的基因與尚未被醫學驗證的NA(nonavailable)基因，將作為往後研究的標靶基因。而右側海馬內除了篩選出作為監控實驗流程的控制探針(如Ambion Control、MEEBO Tiling Control)，未有其他基因數據。在此推論出Cav3.2基因剔除小鼠，即使接受訓練也無法改善右海馬內基因水準，但在左海馬內發現可能影響學習與記憶的標靶基因。

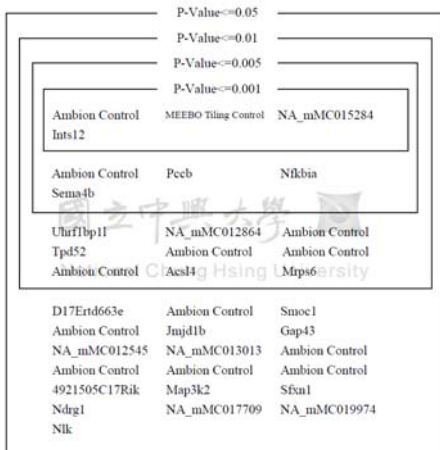


圖 5 左海馬線性迴歸分析後結果

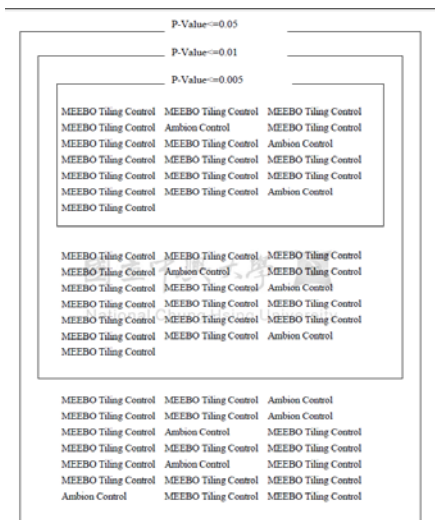


圖 6 右海馬線性迴歸分析後結果

3.4 階層關聯性分群結果

針對左海馬，在迴歸分析P-Value \leq 0.05時篩選出來的36筆標靶基因進行聚合式關聯性分析。先將標靶基因在未受訓練時的基因表現量進行群數凝聚過程，產生了圖7的分群結果。以歐式距離平方來看，當距離等於3時，可以分為三個群組；當距離等於5時，可以分為三個群組；當距離等於10時，可分為兩個群組。

將標靶基因在受訓練後的基因表現量進行群數凝聚過程，產生了圖8的分群結果。以歐式距離平方來看，當距離等於3時，可以分為四個群組；當距離等5時，可以分為三個群組；當距離等於10時，可分為兩個群組。從結果來看，小鼠剔除大腦鈣離子通道後，接受相關訓練會導致基因間的調控產生了變化，過訓練前後分群會有所不同。生物醫學也可以針對這樣的分群結果，找出同一分群基因的生物功能關聯性，並推論到分群中尚未被證實的NA基因。

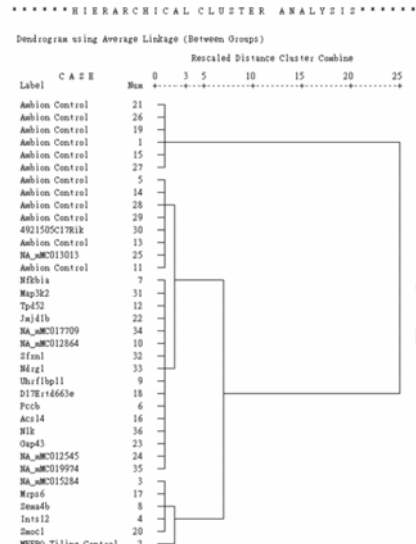


圖 7 左海馬未受訓練時，標靶基因分群結果

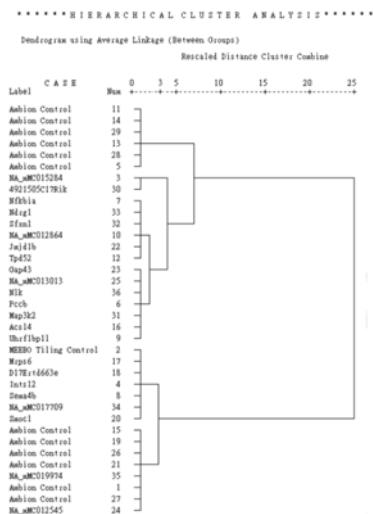


圖 8 左海馬受訓練後，標靶基因分群結果

4. 研究結果分析

首先我們觀察標靶基因在Cav3.2基因剔除前後和訓練前後之基因表現量。以基因Gap43(Growth Associated Protein 43)為例，表4中表示野生型小鼠組(WT)在受訓練前後基因Gap43 的表現量平均約2500左右；而基因剔除小鼠組(KO)中明顯發現基因表達下降，但經過訓練後可以改善原本不正常的狀況，並且接近野生型小鼠組受訓練後之基因表達程度。

表 4 Gap43(Growth Associated Protein 43)的基因表現量比較表

Name	Raw Intensity			
	WT_ut1	WT_ut2	WT_t1	WT_t2
Gap43 (Growth Associated Protein 43)	2813	3075	2712	2116
	KO_ut1	KO_ut2	KO_u1	KO_u2
	123	80	2189	1742

在實驗結果中，我們發現右側海馬內並無法篩選出標靶基因，故針對左側海馬中標靶基因之散佈位置做進一步的分析。圖9為P_Value<=0.05 時的基因表現量散佈情形，每個點代表不同的基因，顏色較深的點則為標靶基因。圖中被圈選出來的區塊A，代表的均是做為監控實驗流程的控制探針(Ambion Control)；再以相關係數平方0.865 來切割散佈圖，從左上與右下兩部分來看，表5為右下部分的標靶基因列表；表6為左上部分的標靶基因列表。

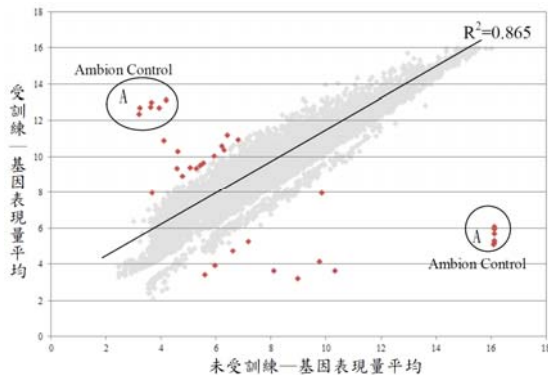


圖 9 加強標示左側海馬內之標靶基因散佈位置，P-Value<=0.05

表 5 散佈圖中，位於右下角的標靶基因

NA_mMC015284	Mrps6	NA_mMC012545
Ints12	D17Ert663e	NA_mMC017709
Sema4b	Smoc1	NA_mMC019974

表 6 散佈圖中，位於左上角的標靶基因

Pccb	Acsl4	Map3k2
Nfkbia	Jmjd1b	Sfxn1
Uhrf1bp11	Gap43	Ndr1
NA_mMC012864	NA_mMC013013	Nlk
Tpd52	4921505C17Rik	

針對挑選出來的標靶基因，進行文獻探討與基因資料庫的相關研究。透過基因資料庫等文獻資料，我們發現Nfkbia (NF-kappa-B inhibitor alpha)、Acsl4 (Acyl-CoA synthetase 4)、Mrps6 (Mitochondrial ribosomal protein subunit 6)、Smoc1 (SPARC related modular calcium binding 1)、Gap43 (Growth Associated Protein 43)、Ndr1 (N-myc downstream-regulated gene 1)、Nlk (Nemo-like kinase) 等7個基因均與大腦有關。以下分別概述各個基因具有的生物性功能。

NF-kB (NF-kappa-B inhibitor alpha) 是轉錄因子的一種 (transcription factor)，調節許多基因表現並在細胞過程如增殖、凋亡和發展等扮演關鍵角色。NF-kB 的活性影響神經退化性疾病，如阿茲海默症[5]、帕金森氏症、亨廷頓氏病[6][7]，在認知缺陷中驗證NF-kB 信號是缺損的[8]。Acsl4 (Acyl-CoA synthetase 4)在腦中的arachidonate 代謝與神經細胞分化扮演重要角色[9]。Mrps6 (Mitochondrial ribosomal protein subunit 6)為可能導致智力低下如唐氏症的候選基因[10]。Smoc1 (SPARC related modular calcium binding 1)在人類基因重組表現中是種具有鈣依賴特性的醣蛋白(glycoprotein)[11]。在早期發育階段，海馬錐體神經元中的Ndr1 (N-myc downstream-regulated gene 1)可能與未成熟大腦的代謝變化有關[12]。NLK (Nemo-like kinase) 是多功能性蛋白，參與神經細胞生長與存活且可能會增強突觸關於記憶與學習的機制[13]，又與腦傷後神經細胞凋亡有關[14]。

生長相關蛋白GAP-43 (Growth-associated protein 43) 在神經發育過程中或是神經受損後的修復過程中，對於神經纖維的生長以及調節神經可塑性、突觸重整(reorganization) [15]、刺激軸突末梢的生長[16]等均扮演的重要角色。有研究表示，當細胞內鈣離子濃度增加或神經細胞活化進而活化protein kinase C (PKC)時，PKC會將GAP-43 Ser41 的位置磷酸化，進而使其於神經細胞體的囊泡轉位至生長中神經纖維的細胞膜內面，促使軸突延伸[17]。

綜合以上統計結果分析，我們發現標靶基因中有尚有未被醫學發表的NA(non-available)基因，對於其功能仍缺乏相關文獻驗證，也無法了解真正的生物功能和基因間調控方式。但在階層式分析下，依照分群結果可以推論同一組的基因應該會具有相似的生物功能，這部分仍須仰賴醫學上的驗證。

剔除Cav3.2基因會導致細胞間無法順調節生長與增殖，也影響相關神經細胞及海馬的表現，進而影響海馬的記憶與學習運作。小鼠左側海馬在剔除Cav3.2基因後，發現有些基因如Gap43產生表現量低落或者驟增的數據；在接受痕跡恐懼實驗後，基因表現程度卻接近野生型小鼠(WT)接受訓練後的基因表現水平。這代表，即使剔除Cav3.2基因會導致基因的不正常表現，但只要經過適當的訓練，就可以讓基因表現量幾乎恢復到正常水平。在就基因

剔除鼠(KO)之右側海馬內基因來討論，在訓練前後所篩選出來的標靶基因，均為監控實驗流程的控制探針，表示右側在剔除Cav3.2基因後，小鼠的訓練與否並無法修正海馬內其他基因的表現量程度，也就是右側海馬的記憶與學習能力不會因為剔除Cav3.2基因而有所差異。

最後，針對標靶基因Gap-43來看，目前尚未有研究明確指出Gap-43基因表現量低落會對記憶產生影響，但相關研究提出小鼠在基因Gap-43高表現量時記憶力有所增強，並且基因Gap-43在海馬區域中扮演了助記憶的雙向調節處理的舉足輕重角色[18]。故推論大腦剔除Cav3.2基因後，會影響海馬無法順利進行細胞功能，小鼠在接受訓練後，基因Gap43與鈣調蛋白激酶II 進行調控維持了生物活動平衡，修正了海馬的記憶與學習的功能。本資訊分析系統之推論仍待更多生物醫學加以驗證，並做更深入之探討。

5. 未來展望

生物功能是在神經系統、細胞、基因之間的環環相扣，進行相互抑制與促進等機制下正常運作。若生物體內的控制機制出現失衡，也會因此導致疾病的產生，如 α 1H T型鈣離子通道缺損導致的兒童癲癇症候群(Childhood absence epilepsy)，便是在教育環境中會遇到的類型。但在研究結果中我們發現只要有適當的訓練方式，仍可讓學習者改善與提升學習與記憶能力，甚至接近一般常模。

本研究中運用統計分析與基因資料庫分析方法，統整出以下結論。(1)、基因剔除鼠之左側海馬只要經過適當訓練，便可以改善基因表現水準，而右側海馬則不會因為接受訓練與否而有所改變。(2)、尚未被醫學發表的NA基因，可能與同一分群基因有相似的生物功能。(3)、篩選出與海馬之記憶功能相關的標靶基因。這些研究結果仍須仰賴醫學上的驗證與深入探討。

致謝

本人誠摯感謝審稿者提出的寶貴建議與意見，改善了本文的內容與品質。本文與台中榮民總醫院與國立中興大學合作研究計畫(榮興計畫)，計畫編號TCVGH-NCHU 1027619，以及行政院國家科學委員會，計畫編號NSC 102-2622-E-005-011-CC3 共同合作。

參考文獻

- [1] 沈哲緯、劉怡均博士(2007), "Hippocampal-dependent learning of mice deficient in α 1H T-type calcium channel", 慈濟大學人類遺傳學研究所。
- [2] 林惠玲、陳正倉, 基礎統計學觀念與應用, 雙葉書廊(2004) 382 頁

- [3] Armstrong, J. Scott (2012). "Illusions in Regression Analysis". *International Journal of Forecasting (forthcoming)* 28 (3): 689.
- [4] Arvind K. Virmani, Jeffrey A. Tsou, Kimberly D. Siegmund, et al. "Hierarchical Clustering of Lung Cancer Cell Lines Using DNA Methylation Markers", *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention* 2002; 11:291-297.
- [5] Kaltschmidt B., Uherek M., Volk B., Baeuerle P.A., Kaltschmidt C., "Transcription factor NF-kappaB is activated in primary neurons by amyloid beta peptides and in neurons surrounding early plaques from patients with Alzheimer disease." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1997;94:2642-2647.
- [6] Hunot S., Brugg B., Ricard D., Michel P.P., et al. "Nuclear translocation of NF-kappaB is increased in dopaminergic neurons of patients with parkinson disease." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1997;94:7531-7536.
- [7] Khoshnan A., Ko J., Watkin E.E., Paige L.A., Reinhart P.H., Patterson P.H., "Activation of the IkappaB kinase complex and nuclear factor-kappaB contributes to mutant huntingtin neurotoxicity." *J. Neurosci.* 2004;24:7999-8008.
- [8] Orianne Philippe, Marlène Rio, Astrid Carioux, et al. "Combination of Linkage Mapping and Microarray-Expression Analysis Identifies NF-kB Signaling Defect as a Cause of Autosomal-Recessive Mental Retardation", *Am J Hum Genet.* 2009 December 11; 85(6): 903-908.
- [9] Yong-Yeon Cho, "A novel role of brain-type ACS4 isotype in neuronal differentiation", *Biochemical and Biophysical Research Communications* Volume 419, Issue 3, 16 March 2012, Pages 505-510.
- [10] Marc Sultan, Ilaria Piccini, Daniela Balzereit, Ralf Herwig, I Nidhi G Saran, et al. "Gene expression variation in Down's syndrome mice allows prioritization of candidate genes", *Genome Biol.* 2007; 8(5): R91. Published online 2007 May 25.
- [11] Vannahme C, Smyth N, Miosge N, Gösling S, Frie C, Paulsson M, Maurer P, Hartmann U, "Characterization of SMOG-1, a novel modular calcium-binding protein in basement membranes.", *J Biol Chem.* 2002 Oct 11;277(41):37977-86. Epub 2002 Jul 18.
- [12] Wakisaka Y, Furuta A, Masuda K, Morikawa W, Kuwano M, Iwaki T., "Cellular Distribution of NDRG1 Protein in the Rat Kidney and Brain During Normal Postnatal Development", *J Histochem Cytochem.* 2003 Nov;51(11):1515-25.
- [13] Luo Y, Long JM, Lu C, Chan SL, Spangler EL, Mascarucci P, Raz A, Longo DL, Mattson MP, Ingram DK, Weng NP., "A link between maze learning and hippocampal expression of neuroleukin and its receptor gp78.", *J Neurochem.* 2002 Jan;80(2):354-61.
- [14] Li Z, Cui G, Wang J, Yu Z, Zhao L, Lv Z., "Nemo-like kinase (NLK) involves in neuronal apoptosis after traumatic brain injury.", *Cell Mol Neurobiol.* 2012 Apr;32(3):381-9. doi: 10.1007/s10571-011-9766-2. Epub 2011 Nov 30.
- [15] Min-Ching, Hsu(2003), "Regulatory Mechanisms of Growth-Associated Protein 43 (GAP-43) Expression and Phosphorylation in Developing Neurons", Taipei Medical University Graduate Institute of Medical Sciences.
- [16] A.J.G.D. Holtmaat et al., "Directed expression of the growth-associated protein B-50/GAP-43 to olfactory neurons in transgenic mice results in changes in axon morphology and extraglomerular fiber growth", *J. Neurosci.*, 15 (1995), pp. 7953-7965.
- [17] Yu-Ting, Hsu(2006), "Protein-Protein Interaction of GAP-43 and Gephyrin in Developing Cortical Neurons", Taipei Medical University Graduate Institute of Medical Sciences.
- [18] Jerome L. Rekart, Karina Meiri, Aryeh Routtenberg, "Hippocampal-dependent memory is impaired in heterozygous GAP-43 knockout mice", *Hippocampus* Volume 15, Issue 1, pages 1-7, 2005.