

臺灣二〇〇三年國際科學展覽會

科 別：生物化學科

作品名稱：核醣核酸蛋白粒之 K 蛋白基因表現及功能之研究

得獎獎項：生物化學第三名

學 校：國立臺灣師範大學附屬高級中學

作 者：宋柏儀、洪旼暉

作者簡介



(圖右穿藍衣服的人)

宋柏儀，現在就讀於師大附中三年級的科教班。高一的時候，因為一次偶然的機會，參加了美國高中數學競賽（ARML）。高二因為學校強迫參加科展，而開始做起了實驗。我與另一位同學---洪旼暉找到了台大生化所的張靜仁老師指導我們，一路從什麼都不懂的高中生，慢慢學習這些高深的知識。經過學校的推薦，參與了這一次 2003 年的國際科展。



洪攸暉，出生於宜蘭縣，在民風純樸的羅東鎮長大，高中時，來到台北求學，現在就讀於國立台灣師範大學附屬高級中學數理實驗班。

興趣廣泛，高中一年級時，基於對生物方面的興趣而參與中研院生命科學資優培訓計畫，在台灣大學生物化學研究所張靜仁教授的指導下，有機會進一步接觸更深入的領域。

作品名稱：核糖核酸蛋白粒之 k 蛋白基因表現及功能之研究

英文摘要 (Abstract)

Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K (hnRNP K) is a multifunctional protein known to be involved in the regulation of transcription, translation, nuclear transport and signal transduction. We have identified an alternative splicing transcript of hnRNP K lacking exon 8. This novel isoform (named S form compares to L form of full-length hnRNP K) encodes a protein that is 24 amino acids depletion between RNA binding KH1 and KH2 domain. To explore the functional roles of both isoforms, we detect their expression in several tissues (including liver, lung, kidney and heart), cell lines (MCF7, 293T, HeLa, NIH3T3, WEHI, P388D1) and specimens of human mammary gland tumor by RT-PCR. The results showed that L form was expressed in all samples, whereas S form was only expressed in cell lines. Using Western blotting analysis, we found that L form existed in both cytosol and nuclear fractions, and little amount of S form was detected in the nuclear extract. Furthermore, we construct the MCF7 cell lines that stably expressed S form or L form hnRNP K. Growth rate analysis indicates that the overexpression of S form of hnRNP K could decrease cell growth rate. The molecular mechanisms of growth inhibition by S form hnRNP K are to be further investigated. On the other hand, when we blast the human genomic genebank, we found except the chromosome 9 containing complete hnRNP K genomic DNA, there are near complete hnRNP K cDNA sequence appears in chromosome 2, 3, 5, and 11. The meaning of these sequences is unclear.

中文摘要

核糖核酸蛋白粒之 K 蛋白具有多種功能，可參與在基因轉錄和蛋白質轉譯等過程。我們發現一新奇的 cDNA 較已報告的 K 蛋白 cDNA 少了 72 個核苷酸，分別命名為 S 形與 L 形。由基因組 DNA 的分析，S 形可能是經由替代剪接少了第 8 個 exon 所形成。以西方墨點法分析細胞中的 K 蛋白，亦證明有 S 形存在，其表現量較少且多存在於細胞核中。為了探究兩種 K 蛋白等形的表現和功能，我們以 PCR 偵測 K 蛋白在不同組織與細胞株和人類乳腺腫瘤組織中的 RNA 表現，結果顯示主要以 L 形為主；我們並將 S 形與 L 形 K 蛋白分別轉染至人類乳癌細胞株 MCF7 中，以抗生素篩選出穩定表現 K 蛋白之細胞株，生長速率分析顯示表現 S 形之細胞株生長速率較慢，其分子機轉仍有待研究。另外在比對 K 蛋白之基因組 DNA 時，除了在第九對色體上有完整之 K 蛋白基因組 DNA，我們亦發現在第 2、3、5 及 11 對染色體上有類似 K 蛋白基因的序列，以 cDNA 的形式存在，這些 DNA 序列是否可以表現 RNA 及其意義為何，目前尚不清楚。

研究報告

一、研究動機

RNA 的替代剪接是真核細胞調控基因表現普遍機轉(1)。同一基因可由替代剪接產生不同長度的 RNA 並進而轉譯成許多不同功能的蛋白質等形，這些蛋白質等形的表現隨著性別的不同、組織型態、發育階段或細胞環境而異。如已知果蠅性別的決定，就是由於一系列與性別有關的基因，在雌、雄分別由不同的替代剪接產生不同功能的蛋白質等形而決定。我們實驗室在研究核糖核酸蛋白粒之 K 蛋白基因表現時，偶然發現了一尚未被報導的蛋白質等形，推測是替代剪接的產物，引起我們的好奇，於是想進一步瞭解兩種 K 蛋白等形的表現是受到什麼因子在調節，及其功能差異。

二、研究背景

核糖核酸蛋白粒(heterogeneous nuclear ribonucleoprotein)是由蛋白質與前訊息核糖核酸 (pre-mRNA) 結合而成，其包含至少 20 種蛋白質，命名由 hnRNP A 至 U，具有多種功能，在結構上皆具有與 RNA 結合的區域 (2,3)。K 蛋白 (hnRNP K)，更是一多功能而有趣的蛋白質。它具有 KH 區段的 RNA 結合區，與 poly(rC)或 poly(dC)序列有高親和力(4)。並有穿梭於細胞核質間的能力(5)。而且 K 蛋白可與 c-myc 基因啟動子上的 CT element 結合而刺激其轉錄表現也參與多種啟動子的活化(6,7,8)，還可抑制轉錄因子 C/EBP β 的活性(9)；它可被磷酸化而調節其功能，另外它可與一些致癌基因蛋白如 Src、Fyn、Lyn、和 Vav 這些蛋白質的 SH3 區結合(10,11)。最後在細胞轉化時 (transformation)及癌症細胞中，K 蛋白的表現量皆增加(12,13)。

人類基因定序完成，初步估計的包含 40,000 個基因，但每個基因在轉錄成 RNA 時，又可經過替代剪接 (alternative splicing) 的方式，而製造出長短不同、功能有別的蛋白質，值此後基因時代，研究探討同一基因產生之不同蛋白質的功能，是了解生命現象的重要課題。

我們發現一新奇的 k 蛋白 RNA，在第 330 個核苷酸之後少了 72 個核苷酸，產生的蛋白質少了 24 個胺基酸，我們想進一步探究此種蛋白產物的表現和功能。

三、研究設備與器材

聚合酶鏈鎖反應機器
水平式與直立式電泳槽
電源供應器
拍立得照相機
UV 光源箱
桌上型微量離心機
超高速離心機
均質機
細胞培養箱
無菌操作台
倒立顯微鏡
乾式恆溫槽

四、研究過程和方法

(一)電腦比對人類基因序列

利用 NCBI 網站上的基因庫進行 cDNA 與基因組 DNA 的比對。

(二) 萃取細胞或組織的 RNA，以聚合酶鏈鎖反應偵測其中兩種 K 蛋白等形的表現，詳細方法如下：

1. 細胞培養：培養老鼠或人類細胞株於培養皿反應偵測其中兩種 K 蛋白等形的表現，詳細方法如下：上，培養液為 DMEM 加上 10 %的胎牛血清。

2. RNA 的萃取：

(1) 組織：從老鼠的身上取出各種器官或人類乳房腫瘤的檢體，將其剪碎後瀝乾血漬，加入 GTC 溶液中，用均質機將各其打碎。加入 1 克的 CsCl，再加入已經有 0.1M 的 CsCl 的新容器中(密度較大)，上超高速離心機以三萬五千轉速離心二十個小時。取出後會因 RNA 的密度最大而沉到最底部。上面不要的東西抽掉，便可得到 RNA。

(2) 細胞株：細胞用 PBS 清洗，加入 PBS 將細胞刮下，加入 blue extract 和 CHCl_3 混合均勻(細胞會被打破)，離心後利用 RNA 不溶於有機溶液中的特性，便可以取得 RNA。

3.單股互補 RNA 的製備：

取 20 μg 的 RNA 加入 0.25 μg 的 oligo(dT)和 dNTP 以反轉錄酶合成單股的互補 DNA。

4.聚合酶鏈鎖反應：

合成對 K 蛋白具有特異性的兩段引子，以來自組織或細胞株的單股互補的 DNA 為模板，進行聚合酶鏈鎖反應。條件為：(1) 94°C 三分鐘 (2) 94°C 四十秒、55°C 四十秒、72°C 四十秒如此進行三十五個循環 (3) 最後再 72°C 十分鐘，反應產物以洋菜膠體電泳分析。

(三) 分別將兩種 K 蛋白等形穩定表現於乳癌細胞株，研究其對細胞生長及基因表現的影響

1. 基因的選殖：利用對 k 蛋白專一的兩段引子 (F:5' ATGGAGACCGAACGACCAG3' R:5' GAATCCTTCAACTACTGC3')，以聚合酶連鎖反應選殖出 k 蛋白的兩種 cDNA，將此兩種 cDNA 接到 pCMV-Flag 載體中，此載體可在哺乳細胞中表現出這個載體可表現出 Flag 標記的蛋白質，可以抗 Flag 之抗體偵測。

2.表現 Flag-k 蛋白等形之細胞株的選殖：以 DMEM 培養液加上 10% 胎牛血清培養人類乳癌細胞株 MCF7，分別將兩種 pCMV-Flag-hnRNP k 質體轉染入細胞中，以抗生素 G418 選殖出可表現 Flag-k 蛋白之細胞株。並以西方墨點法偵測 k 蛋白之表現。

3. 細胞生長速率分析：生長中的細胞加入 MTT 【3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide】，其在活細胞中可被還原成一紫色沉澱物，可在顯微鏡下觀察，計算含有沉澱物之細胞。比較控制組 MCF7 及表現 Flag-k 蛋白之細胞株。

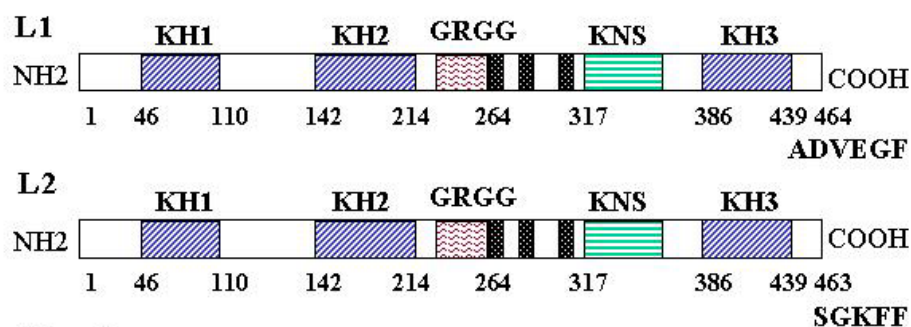
4.C-myc 基因表現分析：以前的研究報告指出 k 蛋白可以促進致癌基因 c-myc 的表現。我們萃取 MCF7，及表現 Flag-k 蛋白等形之 MCF7 此三種細胞株的 RNA，以 PCR 偵測 c-myc RNA 的表現，所用引子為 F:5' TAC GCAGCGCCTCCCTCCAC, R:5' CTGTTCTCGTCGTTTCCGCA。

五、研究結果

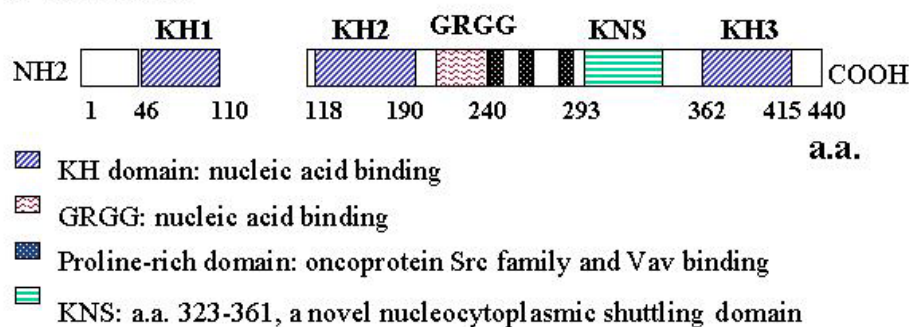
(一) K 蛋白基因之表現-三種互補 DNA

核糖核酸蛋白粒之 K 蛋白在生物體內具有多種功能，爲了研究其作用機制，我們以聚合酶鏈鎖反應選殖人類之 K 蛋白基因，並意外的發現了一種尚未被報告的 K 蛋白等形。如圖(一)所示，

L isoform



S isoform



圖(一)三種 K 蛋白等形

此種新的 S 等形較原來發現的 L 等形少了 72 個核苷酸，所以造成在第 110 個胺基酸後面少了 24 個胺基酸。剛好位於 K 蛋白與 RNA 的結合區 KHI 和 KH2 之間。比對 NCBI 網站上的人類 EST 基因庫，亦有發現二來自神經母細胞瘤的 K 序列與此相同，其餘之 K 序列都是 L 等形，又可分爲 L1 和 L2，差別在編碼出的蛋白質竣基端有五個胺基酸不同。爲了猜測此少掉的 24 個胺基酸有無功能和演化上的意義。如下圖(二)所示，

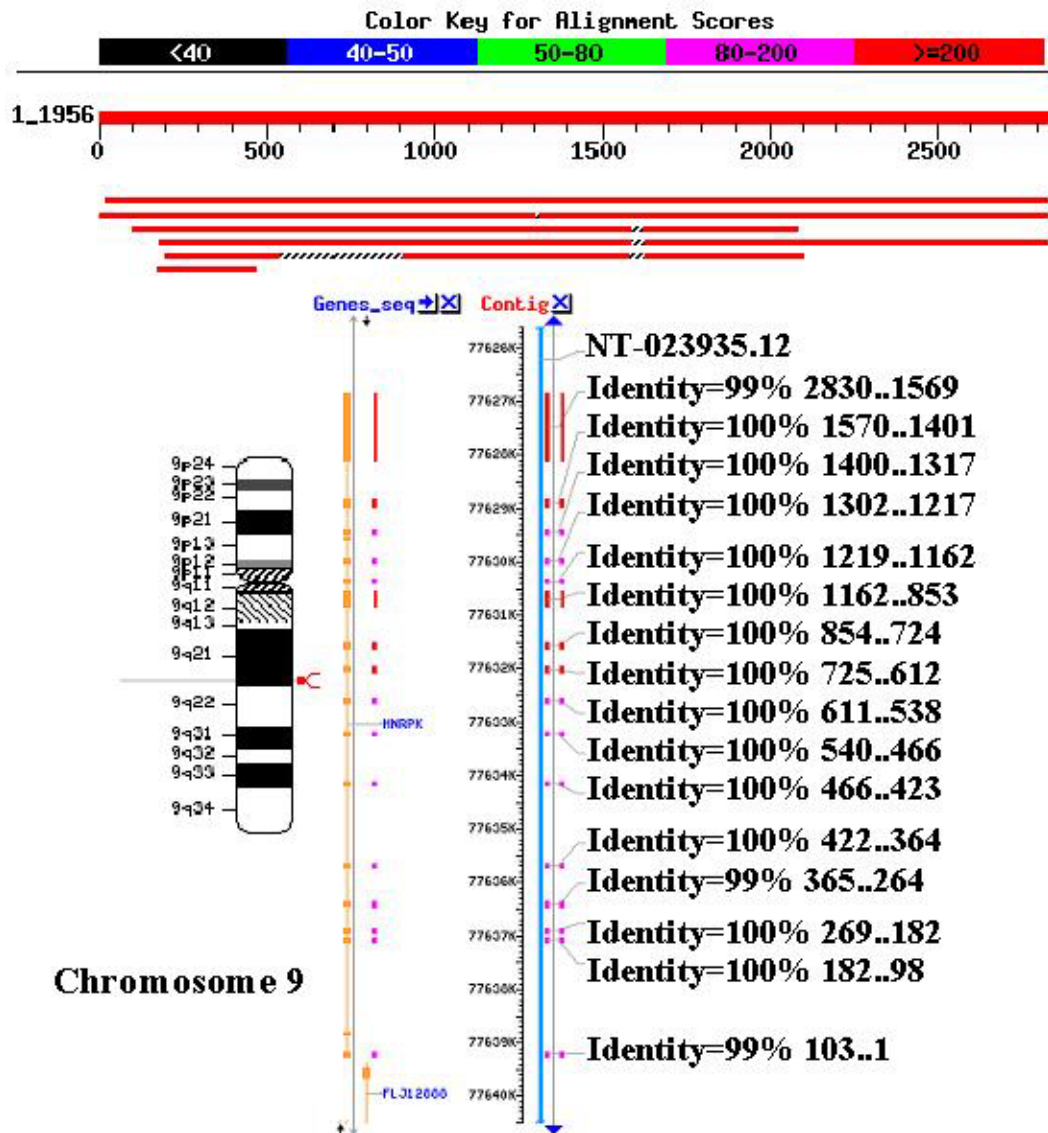
Human L	METEQPETTFPNTETNCEFGKRPADMEE—EGAFKRSNTDE-----MVVLRI	47
Human S	METEQPETTFPNTETNCEFGKRPADMED—EGAFKRSNTDM-----MVVLRI	47
Xenopus	METEQEEVEFTNTETNG--KRPADMEE—EGAFKRSNTDE-----MVVLRI	44
Drosophila	-----MKREMND-EGEGPQDQKRNRRNEE-----TV--RI	27
C.elegans	-----KKREHDNDGDRTGHRKRPKTDGFTTAIFTQQGKFEV--RL	39
KH1		
Human L	LLQSKNACAVIGKGGKNI-KALRTDYNASVSPDSSGPERILSISADIETIGEI--LKKI	104
Human S	LLQSKNACAVIGKGGKNI-KALRTDYNASVSPDSSGPERILSISADIETIGEI--LKKI	104
Xenopus	LLQSKNACAVIGKGGKNI-KALRTDYNASVSPDSSGPERILSISADIETIGEI--LKKI	101
Drosophila	LIPSSIACAVIGKGGQHIQKM-RTQYKATVSVDDSQGPRTIQISADIESTLEI--IT-E	83
C.elegans	LVSSKSACAVIGKGGENI-KRLRAEFNAHVQVPDSNTPERVCTVTAD-EKTVFTLNILKD	97
KH2		
Human L	I-PTLEEGQLPSPTATSQLPLESDAVECLNYQHYKGSDFDCELRLLIHQSLAGGIICVK	163
Human S	I-PTLEE-----YQHYKGSDFDCELRLLIHQSLAGGIICVK	139
Xenopus	I-PTLEEHF-----KGNDFDCELRLLIHQSLAGGIICVK	134
Drosophila	MLKYFEE-----PDEDFD--VRLLIHQSLAGGVIGKC	113
C.elegans	VLPRLEDNF-----SERD-PCFVRMLVHQSHAGALIGRN	130
Human L	GAKIKELRENTQTT-IKLFQ--ECCPHSTDRVVLIGGKPD RVVEC IKIIL-DLIS-ESPI	218
Human S	GAKIKELRENTQTT-IKLFQ--ECCPHSTDRVVLIGGKPD RVVEC IKIIL-DLIS-ESPI	194
Xenopus	GAKIKELRENTQTT-IKLFQ--ECCPHSTDRVVLIGGKPD RVVEC IKVIL-DLIS-ESPV	189
Drosophila	GQKIKELDRIGCRPLKVFS--NVAPQSTDRVVQT VGRQSQVIEAVREVI-TL-TEDTPI	169
C.elegans	GSKIKELREKCSAR-LKIFTGFTCAPGSTDRVLITSGEQKNVLGIIIEVMKELK--EIP I	187
Human L	KGRAQPYDPN-F--Y-DETY—DYCGF-TMMFDDRGRPVGFPMRG—RCGFDRMPPG-	267
Human S	KGRAQPYDPN-F--Y-DETY—DYCGF-TMMFDDRGRPVGFPMRG—RCGFDRMPPG-	243
Xenopus	KGRSQPYDPN-F--Y-E-TY—DYCGF-TMMFDDRGRPHGFSMHA—RCGFDRMPPG-	237
Drosophila	KGAIHNYDPMNFD R VYADE----YGGYGTGSGSTRPSQRGNRRNGGG-AGGVAGGAAGN	223
C.elegans	KGSATPYLPA-FN--Y-DPSNISDYCGFFTPGNMPAGGPP-NNRC PAPQRGGQ--GPPGG	240

圖(二)各種物種 K 蛋白序列之比較

將人類 S 等形和 L 等形之 K 蛋白與其他物種的 K 蛋白比較，發覺其他物種之 K 蛋白較接近 S 等形，在 KH1 和 KH2 之間無多餘之胺基酸。

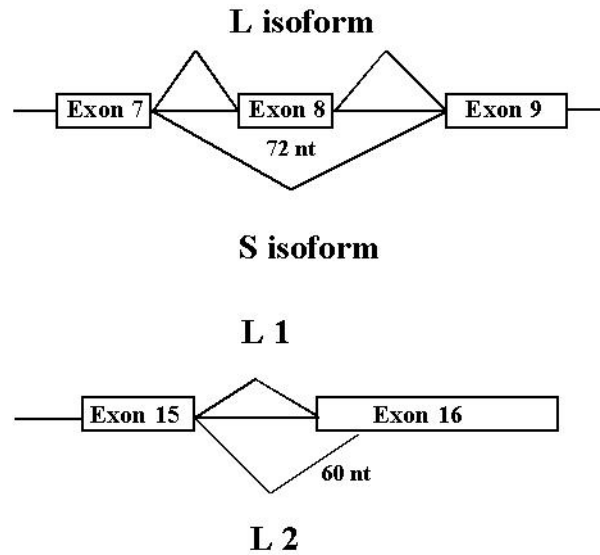
(二) K 蛋白基因組結構

K 蛋白基因位於人類第九條染色體上(圖三)。比對人類基因發現 L 等形的 K 蛋白的基因是由 16 個 exon 組成。



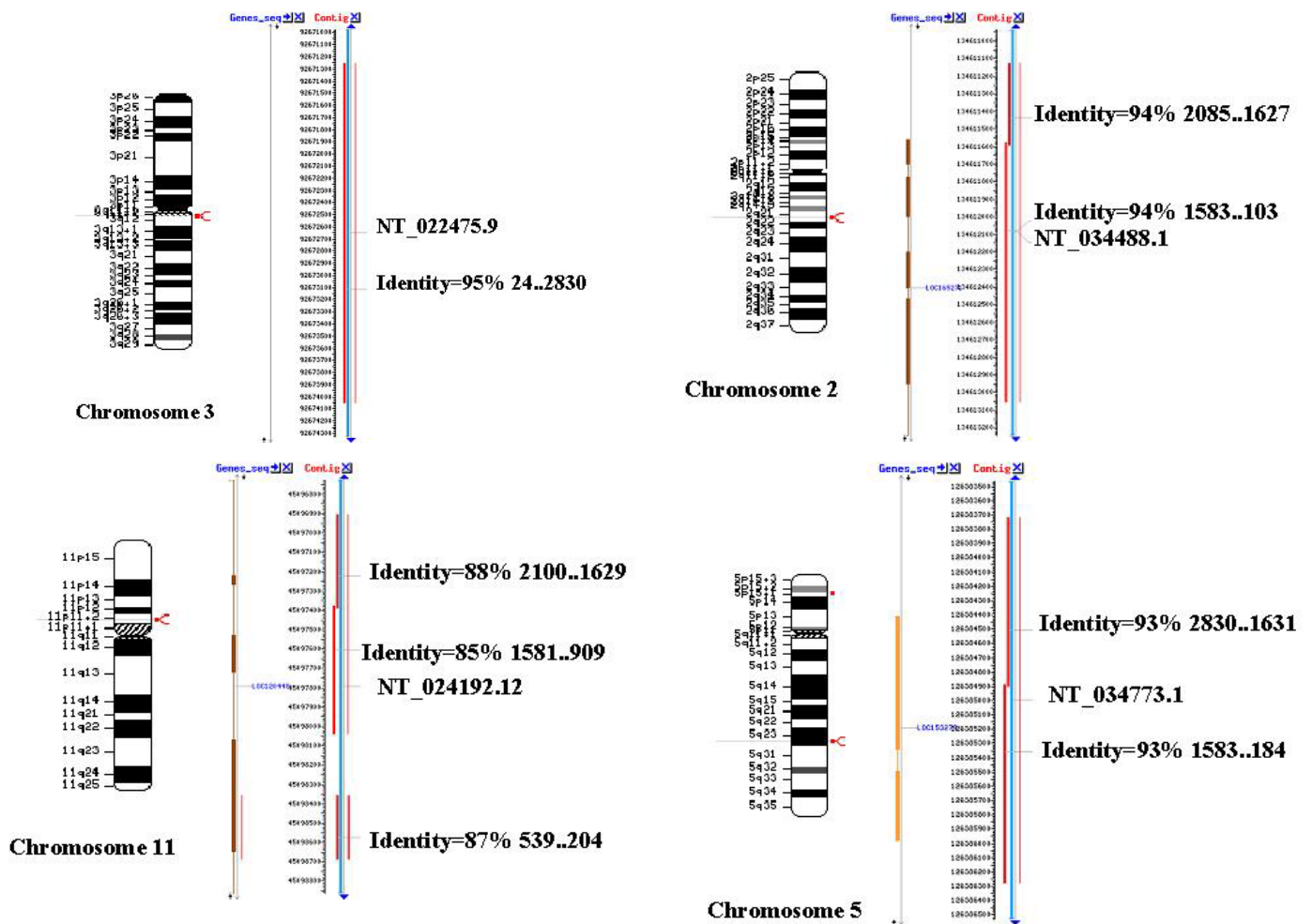
圖(三)a. K 蛋白基因組結構

而 S 等形是少了其中第 8 個 exon 的序列。所以兩種等形是基因轉錄後，經由不同的剪接形成的。而 L1 與 L2 則是在於所用的第 16 個 exon 的 5' 端不同如下(圖四)。



圖(四)K 蛋白基因之替代剪接

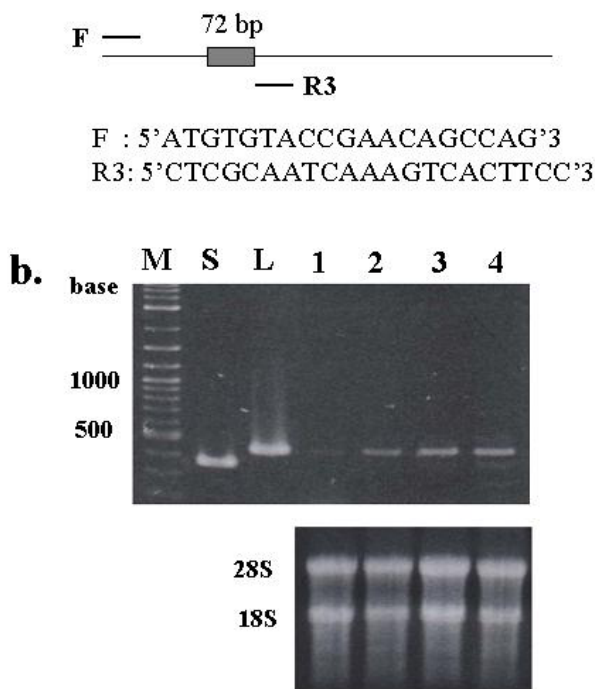
在比對人類基因序列時，我們很意外的發現除了第九條染色體上有 K 蛋白基因，在第二，三和五條染色體上亦有幾近相同的 intron-less k 蛋白基因存在，在第十一條染色體上也比對到 K 蛋白基因之片段(圖三 b.)，這些 K 的類似基因是否表現，又有何意義，尚不清楚。



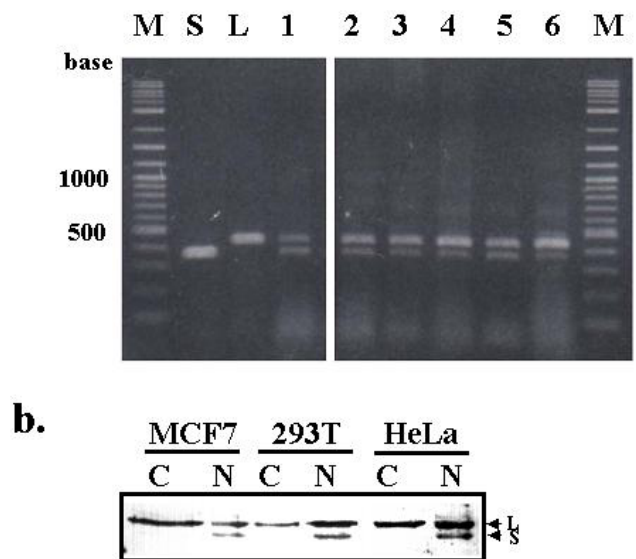
圖(三)b.近相同的 intron-less K 蛋白基因存在，在其他條染色體上也比對到 K 蛋白基因之片段

(三) K 蛋白基因之表現

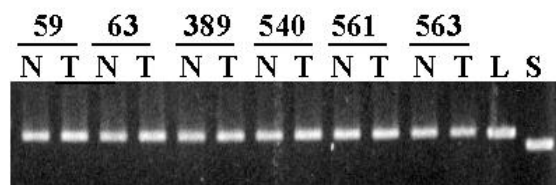
爲了探究 S 與 L 等形之差異性，首先我們偵測他們在各種組織及細胞株之表現，如圖(五 a)所示。我們合成 K 蛋白基因特異的兩段引子(F+R)，進行聚合酶鏈鎖反應。針對 L 等形可得到長度 438 核苷酸之 DNA 片段，S 等形則可得到 366 核苷酸片段圖(五 b)。洋菜膠體電泳顯示，在肝、肺、腎、心臟中 K 蛋白之表現以 L 等形爲主，圖(六)亦顯示幾種所偵測的人類或老鼠的細胞株，仍以 L 等形表現爲多，但其中人類乳癌細胞株 MCF7，S 等形與 L 等形的表現幾乎相等。爲了進一步探究兩種等形在人類乳癌組織的表現，我們分析了來自臺大醫院外科的乳癌的臨床檢體圖(七)，6 組實驗皆顯示來自同一病人的正常或癌症組織，皆以 L 等形的表現爲主。



圖(五) k 蛋白在組織中之表現
a.PCR所用之引子.
b.PCR之結果, M:marker, S:366 bp,
L:438bp 1:肝臟, 2:肺臟, 3:腎臟, 4:心臟.
下圖以18S和28SRNA顯示RNA的品質



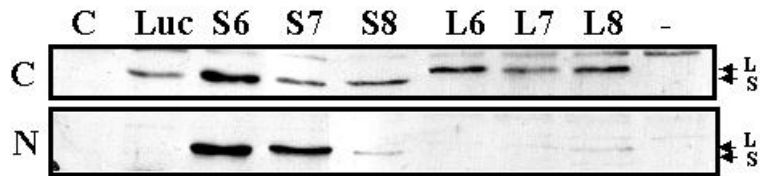
圖(六)
a. 細胞株 1:MCF7 (人類乳癌細胞),
2:293T, 3:HeLa, 4:NIH3T3, 5:WEHI,
6: P388D1
b. K蛋白之蛋白表現，西方墨點分析來自
MCF7, 293T 和HeLa細胞株之細胞質液
(C)及細胞核液(N)的K蛋白



圖(七)K蛋白在人類乳腺組織中的表現 N:normal,
T:tumor, 不同的號碼表示不同的病人檢體。

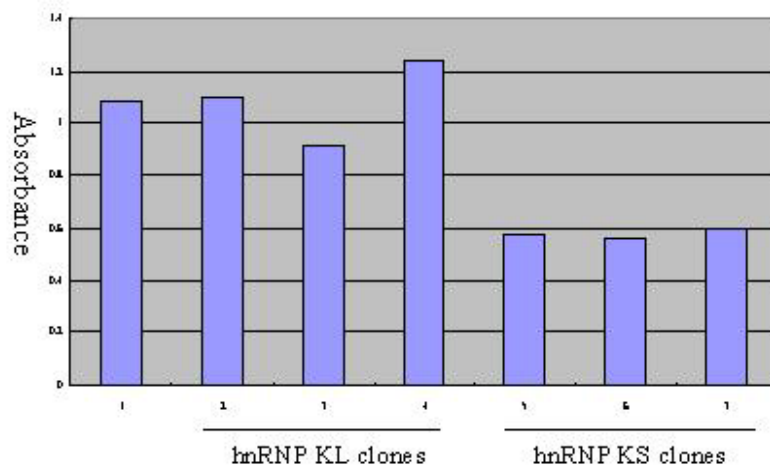
(四) L 與 S 等形 k 蛋白功能之研究

我們已成功的製造出在大腸桿菌中及在哺乳動物細胞表現之兩種 K 等形蛋白。在大腸桿菌中表現出之重組蛋白由另外的實驗室伙伴進行功能分析，我們則進一步分別將此兩種 K 等形蛋白穩定表現於人類乳癌細胞株 MCF-7，目前已選殖出可表現重組 K 蛋白的細胞株(圖八)，分析其生長速率，結果顯示大量表現 S 等形可使細胞生長速率變慢(圖九)。



圖(八)表現K蛋白之MCF7細胞株之選殖

MCF7細胞送入pCMV-Tag2載體(C), 或pCMV-Tag2-Luc(Luc),或pCMV-Tag2-hnRNP K(L),或pCMV-Tag2-hnRNP K (S), 經過抗生素G418選殖,分別抽取細胞質液(C)及細胞核液(N),利用抗Flag之抗體進行西方墨點分析.



圖(九)K蛋白對細胞生長之影響-MTT分析.將等量有無表現K蛋白之MCF7細胞種在培養皿上,48小時後進行MTT分析，偵測紫色產物於波長570 nm的吸光質.Lane 1: 只轉染載體之MCF7; Lanes 2-4: 表現L等形K蛋白之MCF7, 分別是 L2, L7, L6; Lanes 5-7:表現L等形K蛋白之MCF7, 分別是 S6, S7, S8.結果顯示大量表現S等形可使細胞生長速率變慢。

六、結論

- (一) 核糖核酸蛋白粒之 K 蛋白有三種等形，分別命名為 L1、L2、和 S 形，它們是由同一基因以不同的替代剪接而產生的。
- (二) 在人類的第二、三、五、十一的染色體上都有發現和 K 相似性極高的 DNA 序列，但其功能之有無，以及和 K 的關係仍不清楚。
- (三) 以 PCR 的方法偵測發現一般組織與細胞中，K 蛋白 RNA 的表現以 L 形為主，目前尚未找出 S 形的表現受何因子影響。此外，S 形之蛋白質主要存在於細胞核中。
- (四) S 形與 L 形 K 蛋白似乎有不同的功能，在人類乳癌細胞中大量表現的 S 形 K 蛋白會使細胞生長速率減緩，L 形則否。

七、參考資料

1. 現代分子生物學 編著：朱玉賢 李毅 藝軒出版社
2. Dreyfuss, G., Matunis, G. M., Pinol-Roma, S., and Burd, C. G. (1993) hnRNP proteins and the biogenesis of mRNA. *Annu. Rev. Biochem.* 62, 289-321
3. Krecic, A. M., and Swanson, M. S. (1999) hnRNP complexes: composition, structure, and function. *Curr. Opin. Cell Biol.* 11, 363-371
4. Siomi, H., Matunis, M. J., Michael, W. M., and Dreyfuss, G. (1993) The pre-mRNA binding K protein contains a novel evolutionarily conserved motif. *Nucleic Acids Res.* 21, 1193-1198
5. Michael, W. M., Eder, P. S. and Dreyfuss, G. (1997) The K nuclear shuttling domain: a novel signal for nuclear import and nuclear export in the hnRNP K protein. *EMBO J* 16,3587-3598
6. Takimoto, M., Tomonaga, T., Matunis, M., Avigan, M., Krutzsch, H., Dreyfuss, G., and Levens, D. (1993) Specific binding of heterogeneous ribonucleoprotein particle protein K to the human *c-myc* promoter, in vitro. *J. Biol. Chem.* 268, 18249-18258
7. Tomonaga, T. and Levens, D. (1995) Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K is a DNA-binding transactivator. *J. Biol. Chem.* 270, 4875-4881
8. Michelotti, E. F., Michelotti, G. A., Aronsohn, A. I., and Levens, D. (1996) Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K is a transcription factor. *Mol. Cell Biol.* 16, 2350-2360
9. Miao, L.H., Chang, C.J., Shen, B. J., Tsai, W.H., and Lee, S.C. (1998) Identification of heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K (hnRNP K) as a repressor of C/EBP β -mediated gene activation. *J. Biol. Chem.* 273,10784-10791
10. Hobert, O., Jallal, B., Schlessinger, J., and Ullrich, A. (1994) Novel signaling pathway suggested by SH3 domain-mediated p95vav/heterogeneous ribonucleoprotein K interaction. *J. Biol. Chem.* 269, 20225-20228
11. Richards, S., Yu, D., Blumer, K. J., Hauslanden, D., Olszowy, M. W., Cennelly, P. A., and Shaw, A.S. (1995) Association of p62, a multifunctional SH2- and SH3-domain-binding protein, with src family tyrosine kinase, Grb2, and phospholipase C δ -1. *Mol. Cell. Biol.* 15,186-197
12. Dejgaard, K., Leffers, H., Rasmussen, H. H., Madsen, P., Kruse, T. A., Gesser, B., Nielsen, H., and Celis, J. E. (1994) Identification, molecular cloning, expression and chromosome mapping of a family of transformation up regulated hnRNP K proteins derived by alternatives splicing. *J. Mol. Biol.* 236, 33-48
13. Mandal, M., Vadlamudi, R., Nguyen, D., Wang, R.-A., Costa, L., Bagheri-Yarmand, R., Mendelsohn, J., and Kumar, R. (2001) Growth factors regulate heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K expression and function. *J. Biol. Chem.* 276, 9699-9704

評 語

以分子生物的先進技術，研究一個未知功能蛋白的剪接調控及在不同細胞，如癌細胞內的表達，來說明可能的關係。此作品非常有連貫性及層次性，可加強對實驗技術的瞭解。