

臺灣二〇〇六年國際科學展覽會

科 別：生物化學

作 品 名 稱：Poly(ADP-ribose)polymerase-1 對細胞內 DNA damage
修補的調控

得 獎 獎 項：第三名

學 校 / 作 者：臺北市立第一女子高級中學 芮裕馨

作者簡介



我 1989 出生於美國俄亥俄州，在那裡上了幼稚園，6 歲的時候回台灣，接受台灣的教育。這是我第一次參加科展，以前國中的時候，我的強項是英文演講，參加北市賽曾得過第二名，因此當時並沒有把心力放在科學研究上。國中畢業後，進了台大醫院的實驗室幫忙，我才發現實驗是這麼好玩的事，從此開始著手這項研究。研究過程中，我經歷了挫折與失敗的痛苦，也體驗了成就與喜悅，讓我對科學產生了濃厚的興趣。

目錄

	標題	頁數
1.	英文摘要	4
2.	中文摘要	5
3.	簡介	6
4.	研究過程與方法	8
5.	研究結果與討論	10
6.	結論與應用	11
7.	參考資料	21

英文摘要

Abstract

Poly(ADP-ribose) polymerase-1 (PARP-1) is a nuclear enzyme activated by DNA strand breaks during DNA damage response and catalyzes the transfer of ADP-ribose units from the substrate NAD(+) to acceptor proteins. These acceptor proteins involve in modulation of chromatin structure, DNA synthesis, DNA repair, transcription, and cell cycle control. Thus, PARP-1 is believed to play an important role in maintaining genome integrity through modulation of protein-protein and protein-DNA interactions. PARP-1 has been the target for design of inhibitors for over twenty-five years. Inhibitors of the activity of PARP-1 have been claimed to have applications in the treatment of many disease states, including cancer, cardiac infarct, stroke, diabetes, inflammation and retroviral infection. However, are there potential problems associated with inhibition of this DNA-repair enzyme? To answer this question, we need to further understand the biological function of PARP-1 during DNA damage response. In this report, an enzyme dead mutant (E988K) of PARP-1 was generated. Detailed studies of E988K show that E988K could be used in the following studies. Compare and identify the different associated proteins of PARP-1 wild-type and E988K will shed light into the molecular mechanism of PARP-1-mediated DNA repair.

中文摘要

Poly(ADP-ribose) polymerase-1 (PARP-1)是一個細胞核內的酵素，它可以被因DNA damage而形成的DNA片段活化，並將NAD(+)上的ADP-ribose轉載到結合蛋白質。這些結合蛋白質對於DNA的合成、DNA的修補、以及細胞週期的調控都有關係。因此，PARP-1被認為是維持基因完整性的重要角色。根據初步的研究，抑制PARP-1的活性對許多疾病的治療都可能有效，其中包括癌症、心臟病、中風、糖尿病、發炎以及反轉錄病毒的感染。然而，以藥物抑制一個對DNA修補這麼重要的酵素會有什麼潛在的問題呢？爲了要得到解答，我們需要進一步了解PARP-1在DNA damage反應的機能。在這一份報告中，我製造了一個失去活性的PARP-1突變種，即E988K。經過對E988K詳細的研究，我將比較及分析PARP-1野生型與E988K之間不一樣的互動蛋白質，希望能對PARP-1所控制的DNA修補有更進一步的了解。

壹.簡介

Poly(ADP-ribose)polymerase-1(PARP-1)是一個位在細胞核內的酵素，它有許多的功能，在各種動物中都找得到它。PARP-1 會將 NAD(+)的 ADP-ribose 接到自己或是其它蛋白質上，因為 ADP-ribose 帶負電，故會造成蛋白質的特性改變，進而改變蛋白質的功能(圖 1)。目前已知 PARP-1 於 DNA 的修補中有著重要的地位 (2, 6)。當 DNA 受到 UV、自由基、化學藥品的作用而斷裂時，PARP-1 可以偵測到損壞的 DNA 部位，並馬上在斷裂發生處進一步活化，召集修補 DNA 所需的其它蛋白質。之前的研究顯示，抑制 PARP-1 的活性或利用分生的技術把 PARP-1 從細胞中去除，將會造成細胞無法修補 DNA(2, 6)。

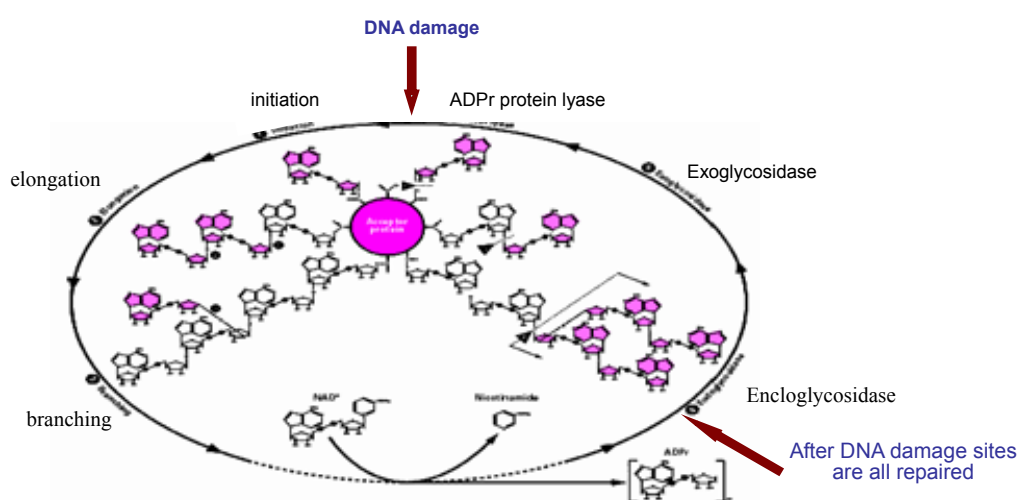


圖 1 PARP-1 於 DNA 修補時改變蛋白質的功能

因為 PARP-1 在 DNA 的修補中扮演著決定性的角色，所以在很多疾病的治療上，控制 PARP-1 的活性已成為一個輔助治療的重要方法，例如，在關於癌症治療的研究中發現在正常情況下不論是使用化學治療藥劑還是放射線治療來處理癌細胞使其 DNA 損壞，雖然的確可殺死癌細胞，但並非 100%，這是因為癌細胞本身具有 DNA 修補的能力，可以修補損壞的 DNA。然而若同時加入 PARP-1 的抑制劑，則可因為癌細胞修補的能力被抑制而使癌細胞加速死亡(1)。而在其它疾病方面，例如糖尿病、心血管疾病、帕金森氏症…等，也都有相關的研究顯示藉由調控 PARP-1 的活性來協助疾病的治療，對醫學及人們的未來發展將會非常有幫助。

另外，其它的研究也顯示 PARP-1 在發炎時扮演重要的角色(4, 5)。在細胞發炎時細胞內有一個重要的蛋白質，名為 NF- κ B，其活化後會進一步調控許多發炎反應及其它有關的蛋白質，可以說是發炎反應中最重要的幕後操手。許多研究指出 PARP-1 會和 NF- κ B 交互作用，影響 NF- κ B 所調控的發炎反應，故在治療各種發炎疾病，像是敗血症時，PARP-1

也是一個很好的應用對象。

由以上可知 PARP-1 實在是非常的重要，因此我希望能更深入的研究它。相信對它有愈深入的研究，對疾病的治療就愈有了解，對人類也會愈有助益。科學家已發現若把 PARP-1 第 988 個胺基酸由 Glutamic acid(麩氨酸)換成 Lysine acid(離氨酸)，其在試管實驗中是沒有活性的(3)。爲了要探討 PARP-1 的活性對 PARP-1 和其它蛋白質的交互作用以及在 DNA 修補中的功能，我已利用分生技術製造一個含有點突變 PARP-1 蛋白質 (E988K)。經過詳細比較 WT 與 E988K 分子量的大小、細胞內的分布、以及在細胞內活性反應，結果顯示兩者在前兩方面並沒有什麼不同，而唯一的差別在於其酵素的活性。因此接下來我將要研究 PARP-1 與 E988K 互動蛋白的不同，以了解其在 DNA 修補的機制。

貳.研究過程與方法

一、點突變

1. PCR reaction

4 μ l	2.5mM dNTP
5 μ l	10xbuffer
1 μ l	DNA (50ng) PARP-1 wild type full length
1.5 μ l	primer F1 (150ng)
1.5 μ l	primer F2 (150ng)
37 μ l	H ₂ O

total 50 μ l

+1 μ l enzyme(PFU Turbo DNA Polymerase)

2. PCR cycle

a. 95°C 2min

b. 18 cycles:

95°C 30s

54°C 30s

72°C 8min

c. 72°C 10min

3.

10 μ l PCR product

2 μ l 10x NEB buffer4

7 μ l H₂O

1 μ l DPNI

total 20 μ l

二、DNA sequencing

三、蛋白質電泳和西方墨點法

利用 SDS-PAGE 將細胞中的所有蛋白質依分子量大小分開後，再將蛋白質從膠體轉印(transfer)到 nitrocellulose membrane。

接著進行西方墨點法：首先利用 5% skin milk 做 blocking，接著加入 1°Ab 並置於室溫中一小時，PBST 清洗三次後，加入 2°Ab 置於室溫中 1hr，最後再用 PBST 清洗三次後利用 ECL 呈色技術，使底片感光。

四、Immunostaining

將 293T 細胞養在蓋玻片上，送入 DNA 讓蛋白質表現 24hr，稍微清洗蓋玻片後，用 2%Formaldehyde 將細胞固定，再利用 5%Tu-ton X-100 在細胞膜上打洞，加入 1°Ab 靜置 1hr，利用 PBS 清洗三次後，加入 2°Ab 靜置 1hr，最後用 PBS 清洗三次後即可到螢光顯微鏡下觀察。

五、in vitro poly(ADP-ribosyl)ation

將 WT 與 E988K 送入 293T 細胞表現，並將其蛋白質純化。把 0.1 μ gDNA 片段和所純化之蛋白質加入反應溶液(10M Tris-HCl, pH7.5, 1mM MgCl₂, 1mM DTT)，離心 8000rpm 10sec 後取出 500mM 上清液並加入 NAD(+), 此時反應開始。於 37°C 反應 10 分鐘後加入 SDS sample buffer 停止反應。將產物經 100°C 的水煮 10 分鐘後，以 SDS-PAGE 分離不同分子量之蛋白質，最後用 10-H 抗體 (1:1000)結合 PARP-1 及其他蛋白質進行分析。

參.研究結果與討論

1. 利用 PCR 方法製造點突變無活性的 PARP-1

爲了得到沒有活性的 PARP-1，我利用分生技術製造一個含有點突變的 PARP-1 DNA。點突變的原理如圖 2 所示。

2. 以電泳確定經 PCR 反應後的點突變 DNA 與野生型 DNA 分子量相同

將聚合酶連鎖反應 PCR 之後的產物跑洋菜膠(如圖 3 所示)lane1 是原始的 DNA，lane2 是 PCR 後的產物，經比較可發現原始的 DNA 與經 PCR 反應的 DNA 在洋菜膠上的位置是相同的，代表 PCR 得到的產物 DNA 大小和原始的 DNA 一樣。

3. 將點突變的 DNA 轉植進入細菌並將其 DNA 定序，以確定點突變後的 DNA 序列與所預期符合

把 PCR 後的產物送進細菌內並將細菌培養在含有抗生素的培養基。經過 24 小時的培養後可以得到很多菌落，挑出兩個菌落出來繼續培養，分別命名爲 R009-1 及 R009-2。將從兩菌落抽出的 DNA 送交定序，定序的結果如圖 4 所示。經由和原始的 DNA 比較可發現 R009-1 及 R009-2 都含有預期的點突變，並且是相同的突變種。本實驗將 R009-1 及 R009-2 所得到的 PARP-1 突變種命名爲 E988K。

4. 將 WT(野生型)和 E988K 的 DNA 分別送入 293T 細胞後，經蛋白質電泳和西方墨點法處理，證實 WT 和 E988K 所製造的 PARP-1 蛋白質分子量相同

結果如圖 5 所示，經由比較可發現兩者的位置相同，證明其分子量大小相同。

5. 以免疫螢光染色法比較 WT 與 E988K 於細胞中的位置分布，發現兩者有相同的分布

分別將 WT 和 E988K 的 DNA 送到 293T 細胞中表現，24 小時後利用免疫螢光染色法偵測蛋白質在細胞中的位置。結果如圖 6 所示。由圖 6A 可看到 WT 於細胞中的分佈，其中綠色代表 PARP-1 的位置，而藍色代表細胞的 DNA，兩者合在一起比較可發現其分佈相同，這表示 PARP-1 位於細胞核內，符合其他科學家所研究發表的結果(2)。而藉由近一步的觀察可發現 E988K 和 WT 在細胞中的分佈是一樣的。

6. 利用 in vitro poly(ADP-ribosyl)ation 比較 WT 與 E988K 的活性

其原理如圖 7 所示，在反應中我們加入 DNA 片段來活化 PARP-1，使 PARP-1 與所加入之 NAD(+)反應並將 NAD(+)中的 ADP ribose 轉移到自身，由於反應中 PARP-1 所轉移之 ADP ribose 數目不等，帶有越多 ADP ribose 的 PARP-1 因爲分子量越大，在蛋白質電泳中移動速度就越慢，因此利用 in vitro poly(ADP-ribosyl)ation 後跑電泳的結果中，與 ADP ribose 結合之 PARP-1 會因分子量變大而位於較上方處。

將 WT 和 E988K 的 DNA 分別送入 293T 細胞，48 小時後純化並在試管中進行反應，蛋白質電泳之結果如圖 8 所示，從結果可看出只有 WT 在上方出現 poly(ADP-ribose)訊號(lane 2) 而 E988K 沒有 poly(ADP-ribose)訊號(lane 1)，證明 E988K 確實沒有活性。

7. 比較 WT 和 E988K 交互作用蛋白質之差異

加入雙氧水，使自由基打斷 293T 細胞的 DNA 後加入 WT 及 E988K 反應 15 分鐘，用銀離子染色後的結果顯示兩者交互蛋白並無太大差異(圖 9)。

肆. 結論與應用

1. 利用 in vitro poly(ADP-ribosyl)ation 比較 WT 與 E988K 的活性，證實由點突變實驗所製成的 E988K 確實沒有活性。
2. 以銀離子染色比較 WT 和 E988K 的交互蛋白質無法看出差別，然而控制組(control)與實驗組(WT 與 E988K) 確實可看到不一樣的交互蛋白質，因此本實驗的系統 並無問題，確實可以捕捉到 PARP-1 的交互蛋白質。
未看出差別可能的原因為：實驗方法不夠靈敏，無法看出不一樣的交互蛋白質，爲了彌補實驗方法的不靈敏，我將以更大量的細胞進行實驗。
3. 未來將把本實驗中所得到的 PARP-1 交互蛋白質取出利用質譜儀鑑定，希望能找出新的交互蛋白質，以便能更了解 PARP-1 對 DNA 修補的機制。

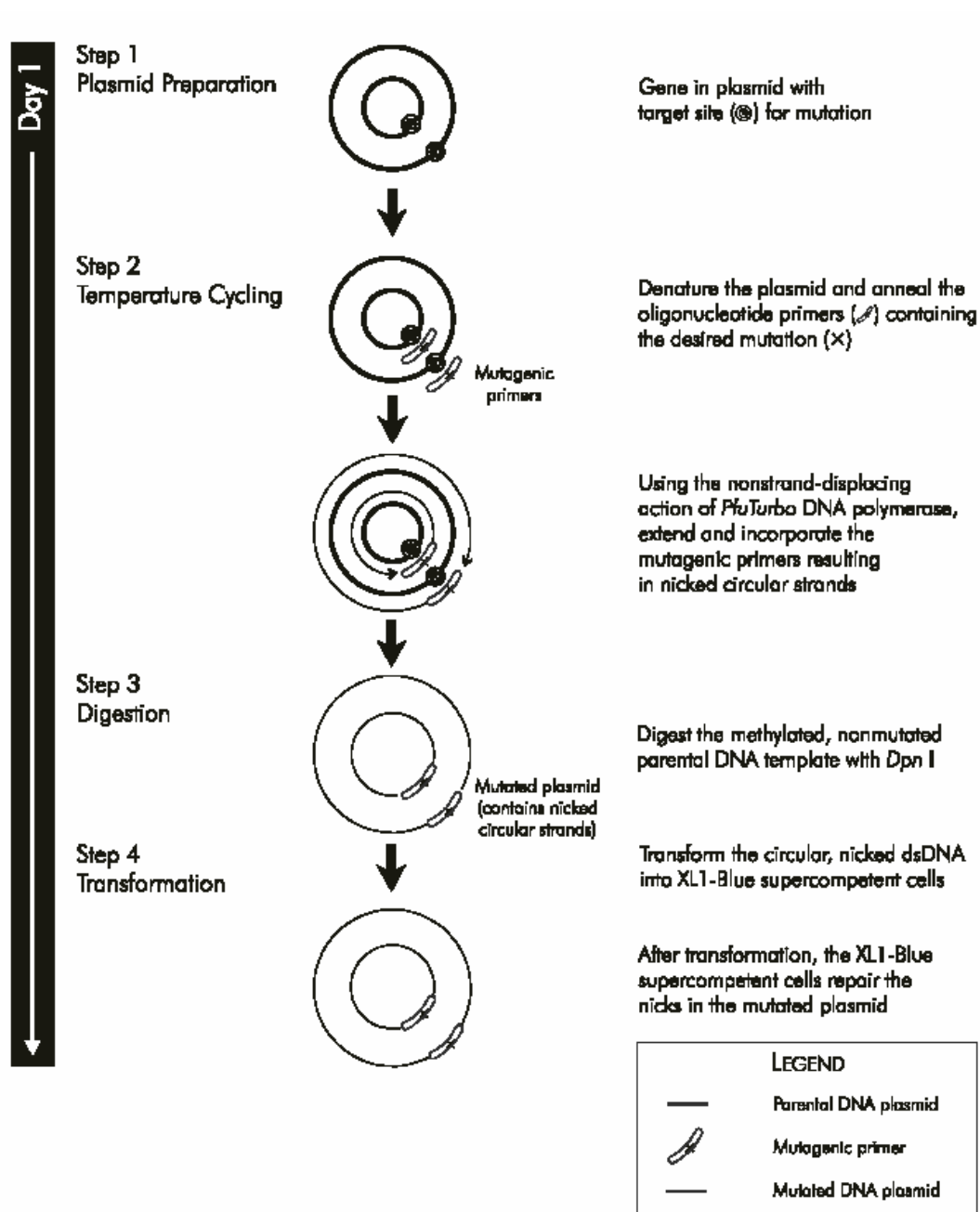


圖 2 點突變的原理

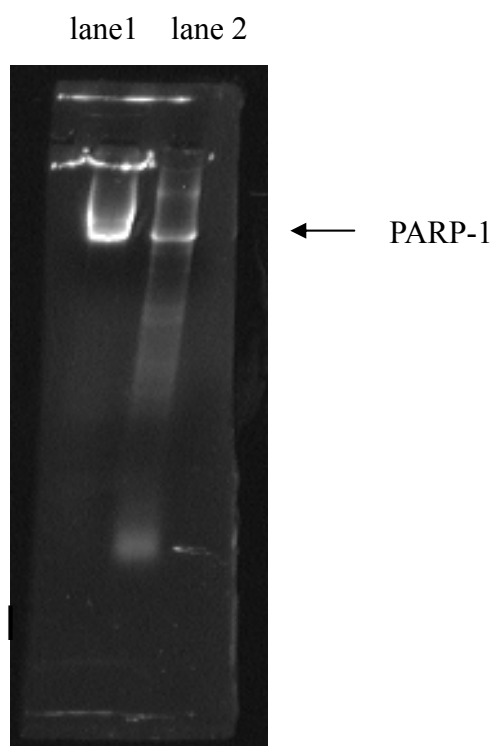


圖 3 PCR的產物

Lane 1: 原始的DNA

Lane 2: PCR 的產物 10 μ l

3001 aaaactaccc ctgaccttc agtaacatt agtctggatg gtgtagacgt tcctcttggg
3061 accgggattt catctggtgt gaatgacacc tctctactat ataacaagta cattgtctat
3121 gatattgctc aggtaaatct gaagtatctg ctgaaactga aattcaattt taagacctcc
3181 ctgtggtaat tgggagaggt agccgagtca caccgggtgg ctctggtatg aattcacccg
3241 aagcgcttct gcaccaactc acctggccgc taagttgctg atgggtagta cctgtactaa
3301 accacctcag aaaggatttt acagaaacgt gttaaagggt ttctctaact tctcaagtcc
3361 ctgttttgt gttgtgtctg tggggagggg ttgttttggg gttgttttg tttttcttg
3421 ccaggtagat aaaactgaca tagagaaaag gctggagaga gattctgttg catagactag
3481 tcctatggaa aaaaccaagc ttcgttagaa tgtctgcctt actggtttcc ccagggaagg
3541 aaaaatacac tccaccctt tttctaagt gttcgtctt agtttgatt ttggaaagat
3601 gttaagcatt tatttttagt taaaataaa aactaatttc atactattta aaaaaaaaaa
3661 aaaaaaaaaa aaaaaaa

圖 4 E988K DNA 定序的結果

DNA 定序的結果顯示 3101 ataacgagta 3110 已經變成 ataacaagta。

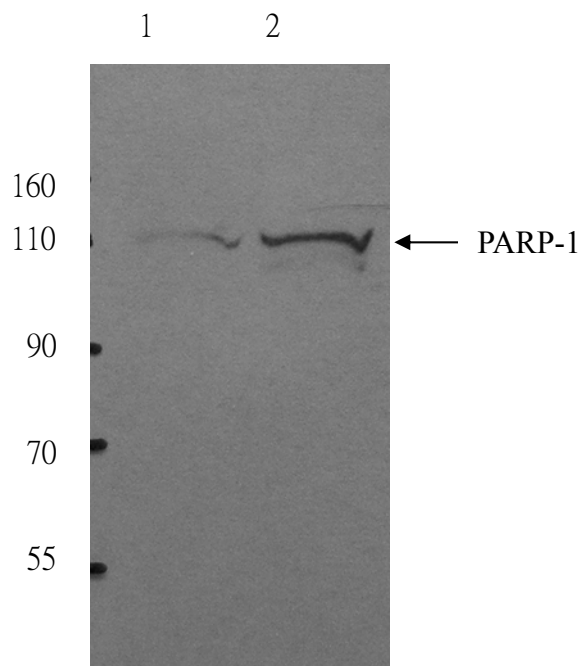


圖 5 比較 WT 和 E988K 的分子量大小。
經由蛋白質電泳(SDS-PAGE)和西方墨點法
(Western blot)顯示 WT 和 E988K 的分子量
相同。

Lane1: Wild type PARP-1

Lane2: E988K Parp-1

圖 6

利用immunostaining(免疫螢光染色)比較WT和E988K在細胞內的分布。

第一行:PARP-1於細胞之分部(綠色的部分)

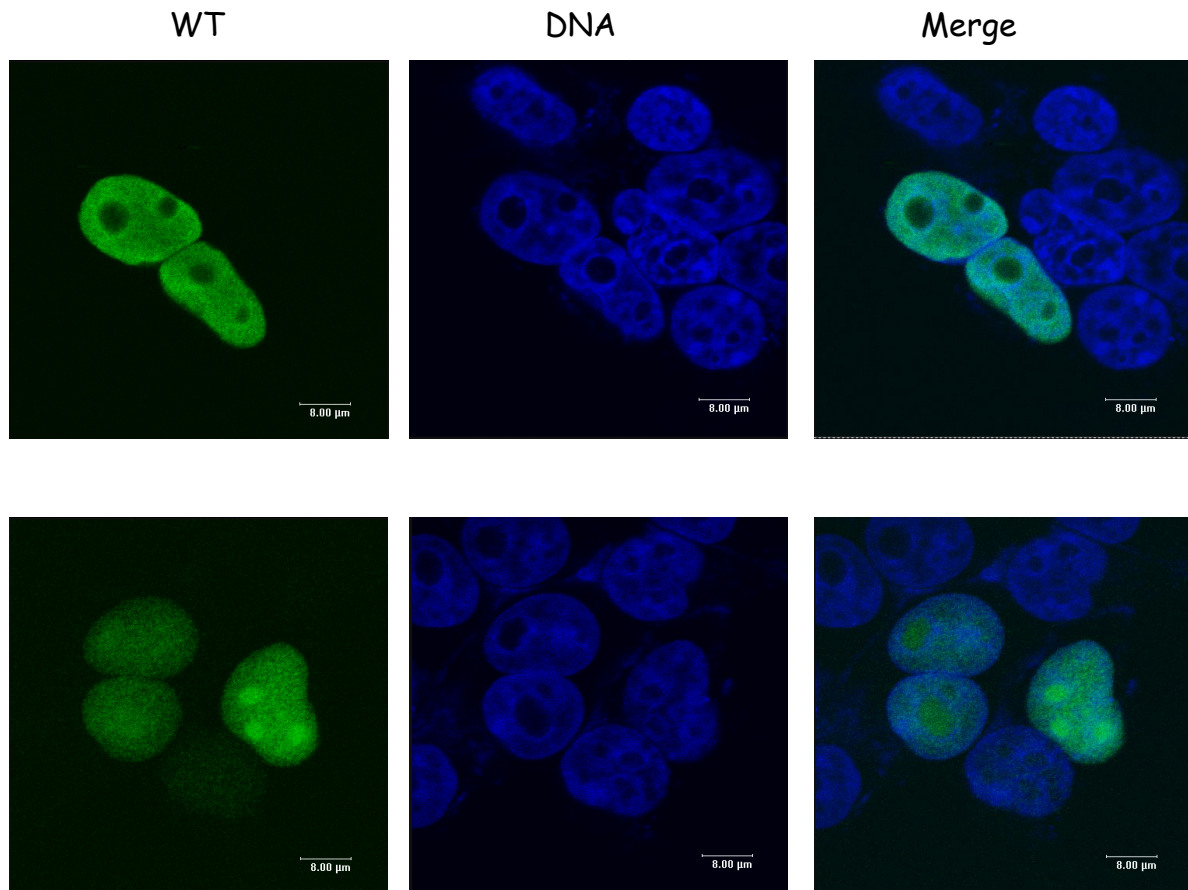
第二行:細胞之DNA位置(藍色的部分)

第三行:前兩者重疊後的圖

A:WT

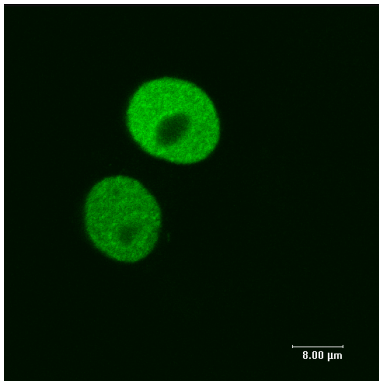
B:E988K

A

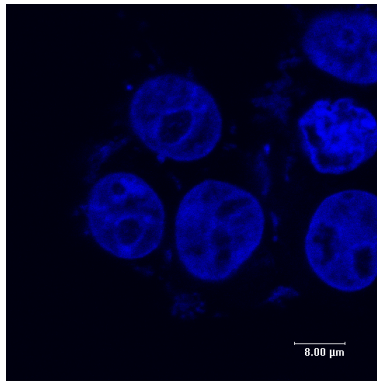


B

E988K



DNA



Merge

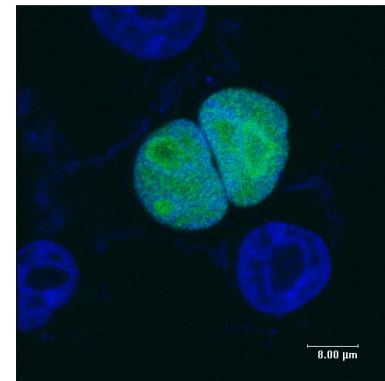
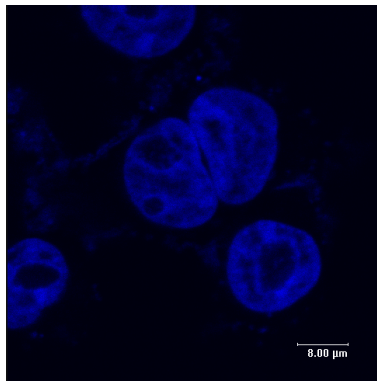
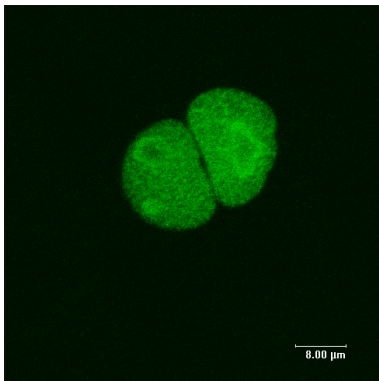
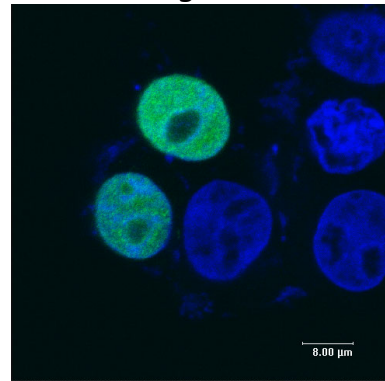


圖7 in vitro poly(ADP-ribosyl)ation原理

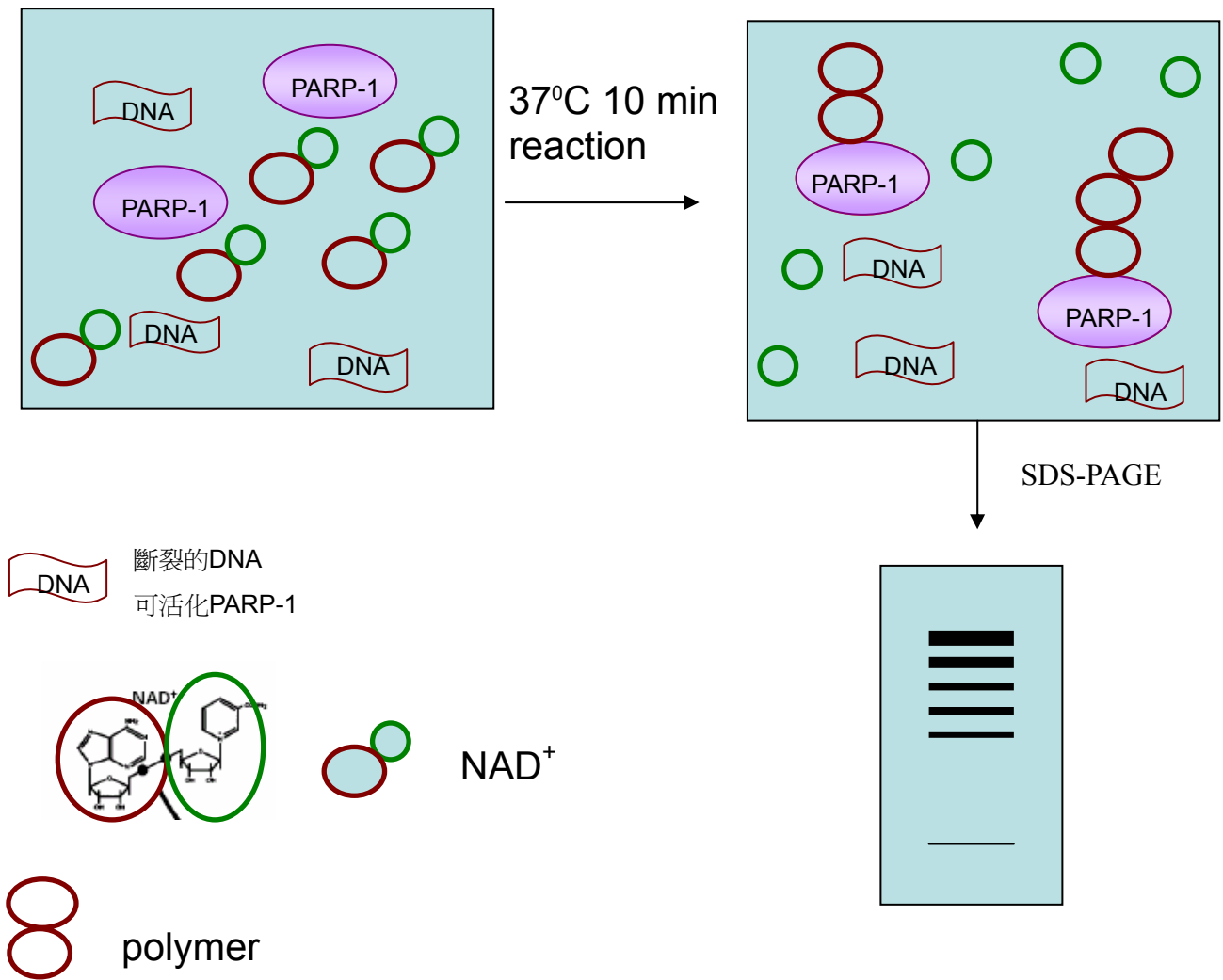


圖 8 比較 WT 與 E988K 酵素活性:

將 WT 與 E988K 分別放入 293Tcell 表現，48 小時後將其純化並在試管中進行 in vitro poly(ADP-ribosyl)ation 反應後的電泳圖。

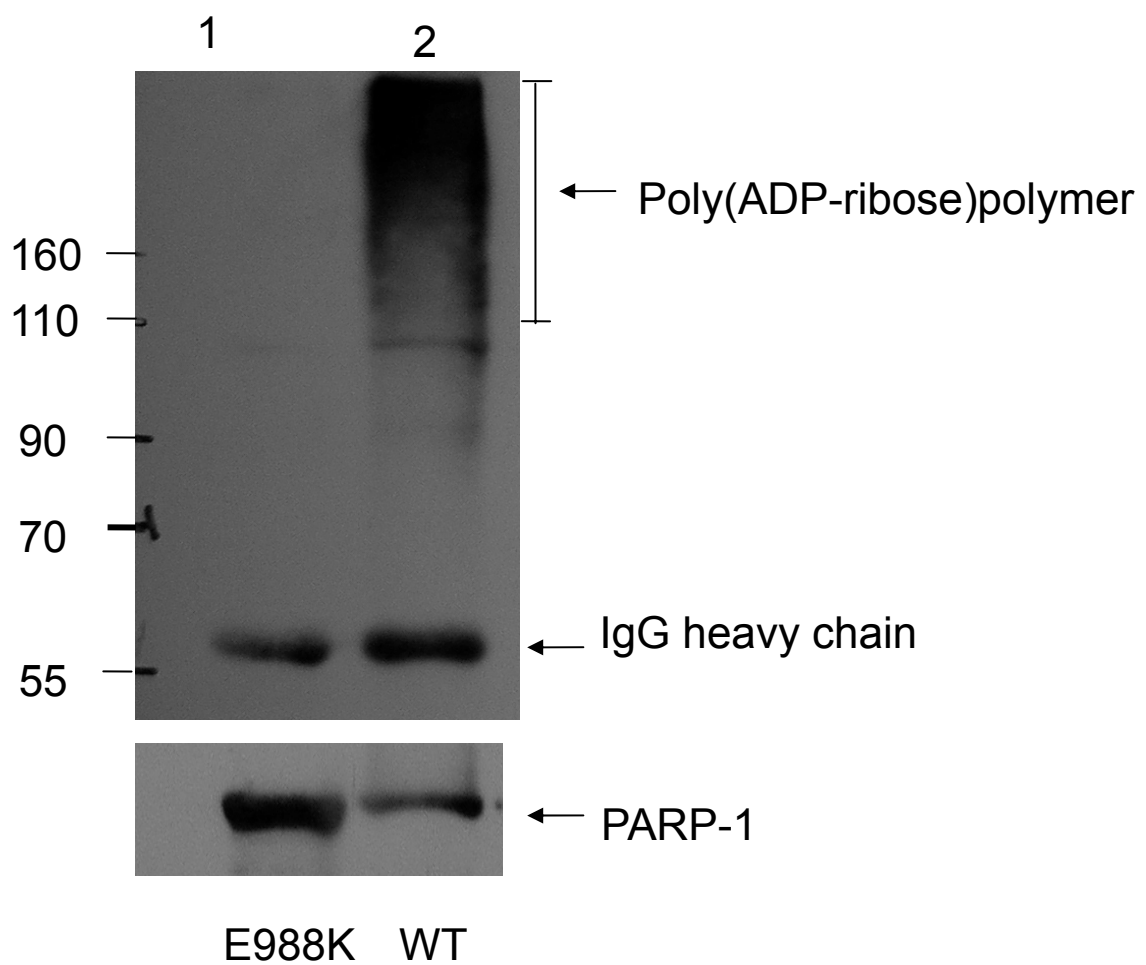
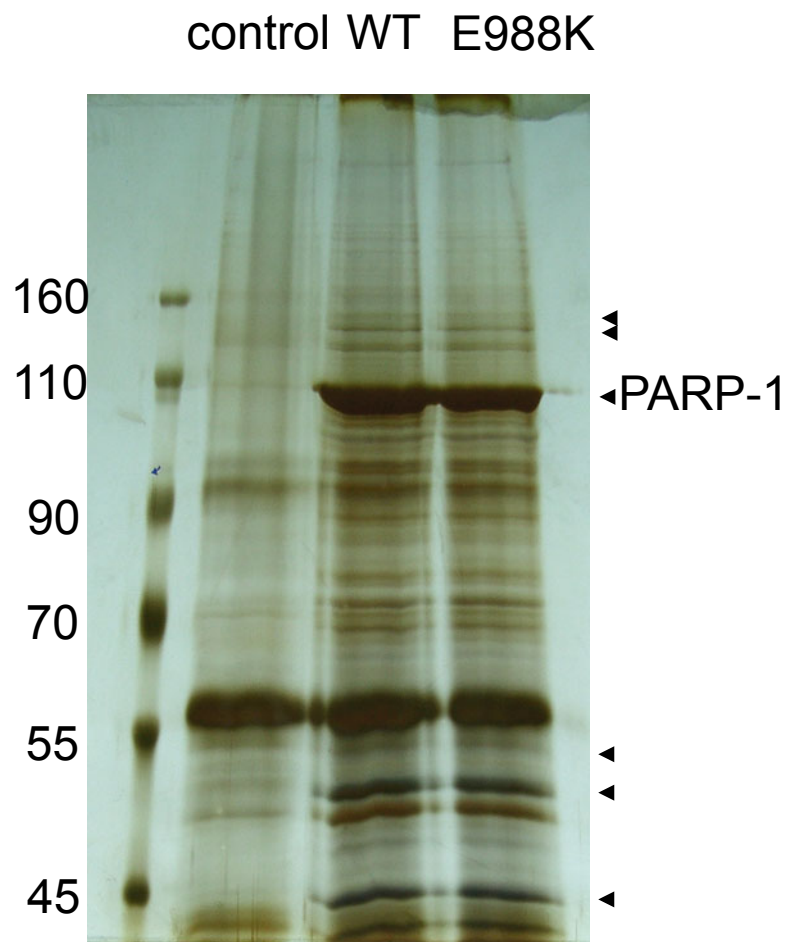


圖 9

WT和E988K交互蛋白之比較，可發現WT和E988K的兩lane band的位置沒什麼差別，箭頭所指為control和實驗組(WT及E988K)之不同交互蛋白



伍.參考資料

1. Boulton S, Pemberton LC, Porteous JK, Curtin NJ, Griffin RJ, Golding BT, Durkacz BW. 1995 Potentiation of temozolomide-induced cytotoxicity: a comparative study of the biological effects of poly(ADP-ribose) polymerase inhibitors. *BR J Cancer*;72:849-56.
2. D D' Amours, S Desnoyers, I D' Silva, GG Poirier 1999 Poly(ADP-ribosyl)ation reactions in the regulation of nuclear functions. *Biochem. J.*342, 249-268
3. de Murcia JM, Niedergang C, Trucco C, Dutrillaux B, Mark M, Oliver FJ, Masson M, Dierich A, Le Meur M, Walztinger C, Chambon P, et al. 1997 Requirement of poly(ADP-ribose) polymerase in recovery from DNA damage in mice and in cells. *Proc Natl Acad Sci USA*;94:7303-7.
4. Liaudet L, Soriano FG, Szabo E, Virag L, Mabley JG, Salzman AL, Szabo C. 2000 Protection against hemorrhagic shock in mice genetically deficient in poly(ADP-ribose) polymerase. *Proc Natl Acad Sci USA*;97:10203-8.
5. Oliver FJ, Menisser-de Murcia J, Nacci C, Decker P, Andriantsitohaina R, Muller S, De la Rubia G, Stocelt JC, de Murcia G. 1999 Resistance to endotoxic shock as a consequence of defective mice. *EMBO J*;18:4446-54.
6. P.O.Hassa, M.O.Hottiger 2002 The functional role of poly(ADP-ribose polymerase 1) as novel coactivator of NF- κ B in inflammatory disorders. *CMLS. Cell.Mol.Life Sci.* 59 1534-1553
7. Schreiber V, Ame JC, Dolle P, Schultz I, Rinaldi B, Fraulob V, Menissier-de Murcia J, de Murcia G. 2002 Poly(ADP-ribose) polymerase-2 (PARP-2) is required for efficient base excision DNA repair in association with PARP-1 and XRCC1. *J BioChem*;277:23028-36.

評語

1. 英語表達能力佳，思路清晰。
2. 實驗設計能觀察到 PARP-1 突變造成的生化反應改變。
3. 應更深入瞭解實驗流程中各步驟之基本原理及可能的應用。