

行政院國家科學委員會專題研究計畫 期中進度報告

具腦部特異性表現新穎蛋白激酶基因 (BSK146)之選殖與功能鑑定(2/3)

計畫類別：個別型計畫

計畫編號：NSC91-2311-B-038-005-

執行期間：91年08月01日至92年07月31日

執行單位：臺北醫學大學生物化學科

計畫主持人：周志銘

報告類型：精簡報告

處理方式：本計畫可公開查詢

中華民國 92 年 5 月 28 日

一、計畫名稱：

具腦部特異性表現新穎蛋白激酶基因 (BSK146) 之選殖與功能鑑定

Molecular cloning, expression and characterization of a novel protein kinase gene (BSK146), which is specifically expressed in the brain

二、中文摘要

關鍵詞：m146 gene organization, southern blot, targeting vector, protein kinase 146

依據目前的研究發現蛋白激酶在許多腦部特有的功能上扮演極重要的角色，包括神經的分化、神經突觸的生長、long-term potentiation (LTP)，long-term depression (LTD) 和神經傳導物質的釋放。因此，研究具有腦組織特異表現的新穎蛋白激酶，為一重要的課題。

本計畫擬延續過去圓斑河豚 (*Tetraodon fluviatilis*) 蛋白激酶相關的研究，以圓斑河豚具腦部特異表現的蛋白激酶 146 基因片段當作探針 (probe)，分別選殖出斑馬魚與老鼠之蛋白激酶 146 基因。並利用斑馬魚系統進行快速基因功能的鑑定，進而利用基因剔除老鼠的製作系統深入分析此新穎蛋白激酶的生理功能。

三、英文摘要

Keywords：whole-mount *in situ* hybridization, immunocytochemistry, protein kinase 146

In previously studies, protein kinases play very important roles in the regulation of several brainspecific functions, including neuronal differentiation, neurite outgrowth, neuronal plasticity, longterm potentiation (LTP), longterm depression (LTD) and neurotransmitter release. Therefore, novel protein kinases in the brain has been pursued all the time. In this report, we isolated BSK146, a new member of the novel protein kinase family, and showed that it was expressed primarily in the brain and might be involved in early neurogenesis.

Protein kinases play important roles in the development of the nervous system and are also critical for neuronal cell survival. We recently isolated BSK146, a new member of the novel protein kinase family, and showed that it was expressed primarily in the brain by RT-PCR analysis. The BSK146 gene encoded a protein of 385 amino acids. To investigate the role of BSK146 in the development of the nervous system, we examined the temporal and spatial patterns of BSK146 expression using *in situ* hybridization. In 24h embryos and adult brain, BSK146 mRNA was expressed predominantly in the developing eye and neural structures including the forebrain, midbrain, hindbrain and spinal cord. Our analyses suggest that there may be novel functions of BSK146 in early neurogenesis.

In order to characterize the protein kinase activity, ~~full~~ length and KR mutant of zebrafish BSK146 were produced in insect cells using the baculovirus expression system, respectively. Whether BSK146 is a serine/threonine protein kinase needs to be further investigated.

四、計劃特點與目標

本計畫主要有二特點：(一) 主要是利用斑馬魚當作模式生物系統，進行具腦部組織特異表現的新穎蛋白激酶基因功能快速鑑定，(二) 擬利用基因剔除老鼠來深入研究此具腦部組織特異表現的新穎蛋白激酶基因功能。

由於斑馬魚近來已成為國際間用於研究脊椎動物胚胎發育和遺傳之模式動物，主要因為其體型較小(3-4公分)、飼養容易、胚胎發育期較短(受精後約72小時孵化，在28.5°C)、胚胎為透明(胚胎可直接在低倍顯微鏡下觀察)、大約三個月即可性成熟、生殖週期短(數天為一週期)、可利用光週期來調控其產卵時間，並利用體外受精方式，容易取得大量同步發育的胚胎，且可使用化學突變方法造成突變種魚，做為胚胎發育與遺傳研究使用。

而有關真核生物基因調控的研究，一般常以轉染(transfection)至細胞株的方式來進行分析。此種離體(*in vitro*)方式容易操作和定量，但仍有少許限制，包括：1) 細胞株種類有限，無法涵蓋生物體所有細胞類型2) 能繼代培養下來的細胞株多經轉形(transformation)的過程，可能以喪失原來細胞的部分特性，無法充分反應出原始細胞在生物體內的性質；3) 細胞株的培養需要血清的添加才能維持生長，而血清中的各種生長因子(growth factor)容易影響轉染基因的表現造成實驗分析的困擾。而基因轉殖斑馬魚，用於活體基因調控機制分析，最近亦受到極大的重視(Iyengar *et al.*, 1996)，因易取得大量透明受精卵，且為體外孵化，使基因轉殖操作較為簡易，而基因注射後約數小時至三天即可觀察或測得基因表現的情形，因此可部分取代傳統利用細胞株作基因調控之研究。

而為了瞭解生物體內基因表現的真正調控方式與基因的功能，近年來許多人嘗試使用基因轉殖鼠和基因剔除老鼠的技術進行基因功能的鑑定與分析。

根據上述有關斑馬魚研究的特點，本計劃擬延續部分過去圓斑河豚(*Arodon fluviatilis*)蛋白激酶相關的研究(Chou, *et al.*, 1998)，利用選殖出的圓斑河豚蛋白激酶146基因(novel protein kinase)當作探針，由斑馬魚基因庫中選殖出斑馬魚蛋白激酶146基因。此蛋白激酶在圓斑河豚各個組織(腦、鰓、心臟、腸道、腎臟、肝臟和睪丸等組織)的RT-PCR研究中發現，主要是在腦部表現。此蛋白激酶的功能目前未知，相關基因結構、啟動子活性與蛋白激酶活性也不清楚，值得更深入的研究。

在本計畫第二年執行其間，主要完成的工作有：

一、斑馬魚蛋白激酶 BSK146 基因功能的相關研究：

目前已完成，斑馬魚蛋白激酶 BSK146 基因的選殖與基因結構之研究、斑馬魚蛋白激酶 BSK146 組織特異性的分析和部分斑馬魚蛋白激酶 BSK146 活性分析。近期內可將上述結果彙整，準備發表論文。

二、老鼠蛋白激酶 BSK146 基因功能的探討與基因剔除老鼠系統建立相關研究：

而有關老鼠蛋白激酶 BSK146 基因的研究，目前已成功的由老鼠的基因體 BAC clone 中選殖出此基因片段，並進行此基因組成之分析；在基因功能分析方面，已分別構築 wild type 和 KR mutant 蛋白激酶，進行老鼠蛋白激酶 BSK146 在離體系統之活性分析；同時亦進行老鼠蛋白激酶 BSK146 基因剔除老鼠系統的建立的初步工作，構築 targeting vector，並準備進行 ES 細胞的轉殖與篩選。

參、參考文獻

- Austin, C. P., Feldman, D. E., Ida, J. A. J., and Cepko, C. L. (1995) Vertebrate retinal ganglion cells are selected from competent progenitors by the action of *Notch* *Development* **121**: 3637-3650.
- Baxendale, S., Abdulla, S., Elgar, G., Buck, D., Micklem, G., Durbin, R., Bates, G., Brenner, S., Beck, S., and Lehrach, H. (1995). Comparative sequence analysis of the human and pufferfish Huntington's disease genes. *Nature Genet.* **10**: 67-75.
- Brenner, S., Elgar, G., Sandford, R., Macrae, A., Venkatesh, B., and Aparicio, S. (1993). Characterization of the pufferfish (*Fugu*) genome as a compact model vertebrate genome. *Nature* **366**: 567-571.
- Chou, C. M., Lin, W. C., Leu, J. H., Su, T. L., Chou, C. K., and Huang C. J. (1998) Isolation and identification of novel protein kinase genes from the spotted pufferfish (*Tetraodon fluviatilis*) genomic DNA. *J. Biomed. Sci.* **5**: 127-134.
- Dean, N. M., and McKay, R. (1994) Inhibition of protein kinase- α expression in mice after system administration of phosphorothioate antisense oligodeoxynucleotides. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**: 11762-11766.
- Elgar, G., Sandford, R., Aparicio, S., Macrae, A., Venkatesh, B., and Brenner, S. (1996). Small is beautiful: comparative genomics with the pufferfish (*Fugu rubripes*). *Trends Genetics* **12**: 145-150.
- Faiella, A., Zappavigna, V., Mavilio, F. and Boncinelli, E. (1994) Inhibition of acid-induced activation of human *HOXB* genes by antisense oligonucleotides affects sequential activation of genes located upstream of the *HOX* clusters. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**: 5335-5339.
- Guimera, J., Casas, C., Pucharcos, C., Solans, A., Domenech, A., Planas, A. M., Ashley, J., Lovett, M., Estivill, X., and Pritchard M. A. (1996) A human homologue of *Drosophila* minibrain (MNB) is expressed in the neuronal regions affected in Down syndrome and maps to the critical region. *Hum Mol Genet* **5**: 1305-1310.
- Hinegardner, R., and Rosen, D. E. (1972). Cellular DNA content and the evolution of teleostean fishes. *Am. Nat.* **106**: 621-644.
- Hsu, K.S., Ho, W. C., Huang, C.C., and Tsai, J.J. (1999) Prior short-term synaptic disinhibition

- facilitates long-term potentiation and suppresses long-term depression at CA1 hippocampal synapses. *Eur J Neurosci.* **11**:4059-69
- Kentrup, H., Becker, W., Heukelbach, J., Wilmes, A., Schurmann, A., Huppertz, C., Kainulainen, H., and Joost, H. G. (1996) Dyrk, a dual specificity protein kinase with unique structural features whose activity is dependent on tyrosine residues between subdomains VII and VIII. *J Biol Chem* **271** : 3488-3495.
- Lei, S., Jackson, M.F., Jia, Z., Roder, J., Bai, D., Orser, B.A., and MacDonald, J.F. (2000) Cyclic GMP-dependent feedback inhibition of AMPA receptors is independent of PKG. *Nat Neurosci.***3**:559-565
- Matthews, D.B., Kralic, J.E., Devaud, L.L., Fritschy, J.M., and Marrow, A.L.(2000) Chronic blockade of N-methyl-D-aspartate receptors alters gamma-aminobutyric acid type A receptor peptide expression and function in the rat. *J Neurochem.* **74**:1522-1528.
- Nieto, M. A., Dargent, M. G., Eilkinson, D. G., and Cooke, J. (1994) Control of cell behaviour during vertebrate development by *Sluh*, a Zinc finger gene. *Science* **24**: 835-839.
- Poisbeau, P., Cheney, M.C., Browning, M.D. and Mody, I.(1999) Modulation of synaptic GABAA receptor function by PKA and PKC in adult hippocampal neurons. *J. Neurosci.* **19**: 674-683.
- Santschi, L., ReyeHarde, M., and Stanton, P.K. (1999) Chemically induced, activity-independent LTD elicited by simultaneous activation of PKG and inhibition of PKA. *Neurophysiol.* **82**: 1577-1589.
- Sherr, C. J. (1993) Mammalian G₁ cyclins. *Cell* **73**: 1059-1065.
- Shindoh, N., Kudoh, J., Maeda, H., Yamaki, A., Minohama, S., Shimizu, Y., and Shimizu, N. (1996) Cloning of a human homolog of the *Drosophila* minibrain/rat Dyrk gene from "the Down syndrome critical region" of chromosome 21. *Biochem Biophys Res Commun* **225**: 92-99.
- Siegfried, E., Chon, T. B., and Perrimon, N.(1992) wingless signaling acts through *zeste-white-3*, the *Drosophila* homolog of *glycogen synthase kinase-3*, to regulate engrailed and establish cell fate. *Cell* **71**: 1167-1179.
- Siegfried, E., Perkins, L. A., Capaci, T. M., and Perrimon, N. (1990) Putative protein kinase product of the *Drosophila* segment-polarity gene *zeste-white-3*. *Nature* **345**: 825-829.
- Snape, A. M., and Smith, J. C. (1996) Regulation of embryonic cell division by a *Xenopus* gastrula-specific protein kinase. *The EMBO J.* **15**: 4556-4565.
- Summerton, J. (1999) Morpholino antisense oligomers: the case for an RNase H-independent structural type. *Biochimica et Biophysica Acta.* **1489**:141-158.
- Tejedor, F., Zhu, X. R., Kaltenbach, E., Ackermann, A., Baumann, A., Canal, I., Heisenberg, M., Fischbach, K F., and Pongs, O. (1995) minibrain: a new protein kinase family involved in postembryonic neurogenesis in *Drosophila*. *Neuron* **14** : 287-301.
- Wu, J., Wang, Y., Rowan, M.J., and Anwyl, R. (1998) Evidence for involvement of the

cGMP-protein kinase G signaling system in the induction of longterm depression, but not long-term potentiation, in the dentate gyrus in vitro. *J Neurosci.* **18**:3589-3596.

五、預期完成之工作項目及具體成果：

請列述在執行期限內預期完成之工作項目，如分年進行，請分年列述。並請按計畫性質在研究成果方面酌加說明：a.對於學術理論有何貢獻或對於經濟建設及其他應用方面預期可獲何項效益？b.參與之工作人員，能得到何種訓練方面之獲益？

計劃之初步結果

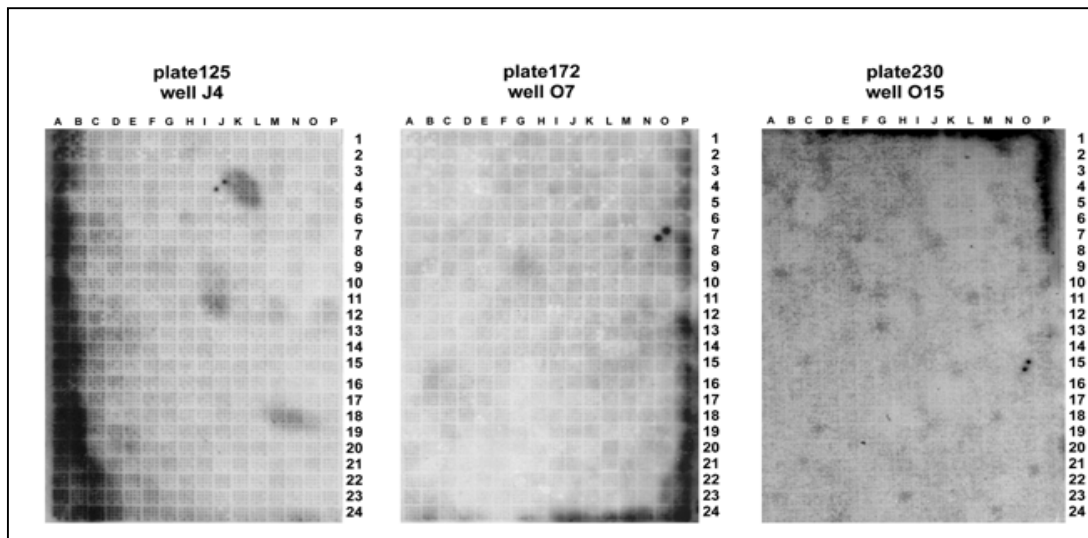
老鼠具腦部特異表現蛋白激酶基因之研究

(一) 老鼠具腦部特異表現蛋白激酶基因之選殖

利用斑馬魚的 BSK146 序列，經與 GenBank 基因庫序列進行比對，搜尋與此基因相似的老鼠 cDNA 選殖株，並利用其相似的區域合成 degenerate primers，利用老鼠 brain 製備的 cDNA 當成模版，進行 RT-PCR，目前已成功的合成出與斑馬魚 BSK146 基因 (*z-bsk*) 相似的老鼠 BSK146 基因 (*m-bsk*)。分析其氨基酸序列，結果顯示與斑馬魚相似程度為 48%。

(二) 老鼠蛋白激酶 146 基因 BAC clone 之選殖

為建立基因剔除老鼠的系統首先必序確認其基因的組成與基因周圍的序列，因此利用購自 Incyte 公司的老鼠基因體 BAC clone nylon membrane，以此基因 C 端約 500 bps 的序列當成探針，選殖出 3 個 BAC clones (圖一)，購買此 3 選殖出的 BAC clones，分別萃取其 DNA 並利用 Southern hybridization 確認此基因所在的位置 (圖二)，以利將來基因組成的分析。



圖一、老鼠蛋白激酶 146 基因 BAC clone 之選殖

