

臺北醫學大學醫學科學研究所碩士論文

Taipei Medical University

Graduate Institute of Medical Sciences

Master Thesis

指導教授：周志銘 博士

(Chih-Ming Chou, PhD)

新穎蛋白激酶 mSBK 功能的鑑定

Characterization of a novel brain predominant protein  
kinase, mouse SH3 binding kinase (mSBK)

研究生：黃一斌

(Yi-Pin Huang)

中華民國九十八年七月

## 致謝

首先要感謝周志銘老師對我的細心指導，才能在兩年內順利的畢業；感謝李怡萱老師及尚萱學姐在細胞實驗上的提供，使得實驗可以順利進行。謝謝羅正汎老師、阮淑惠老師對我論文細心的批閱至正；謝謝中研院黃銓珍老師實驗室的學長姐在顯微注射技術的教導。感謝奕萍學姊在飼養斑馬魚上的幫助與教導，感謝丁豪這個在實驗上或是生活上的夥伴。最後感謝我的父母的支持，感謝有你們陪我走過這段人生歲月，感謝在這兩年間關心我的大家，謝謝！



## 中文摘要

蛋白激酶在調節大腦功能上扮演著重要角色，其中包括：神經細胞的分化 (neuronal differential)、神經的多變性 (neuronal plasticity)、LTP (long-term potentiation)、LTD (long-term depression) 和神經傳導物質 (neurotransmitter release) 的釋放等。實驗室過去在斑馬魚的研究中發現一個新穎的 serine /threonine 蛋白激酶 BSK146，結果顯示此蛋白激酶可能參與後腦發育；而此新穎的蛋白激酶依胺基酸序列相似性分析發現，在大鼠研究中也有一序列相似的蛋白激酶 sbk，過去的研究報告指出此蛋白激酶 C 端有一 proline-rich 的區域。為了要鑑定新穎蛋白激酶的功能，我們以老鼠腦部的 cDNA 選殖出小鼠的 *sbk* 基因 (*msbk*)，來探討這一新穎蛋白激酶可能的機制。利用 pull-down 的實驗，在星狀細胞細胞萃取液中發現 MYH9 (non-muscle myosin heavy chain IIA) 會與 mSBK 結合；此外，為了要瞭解 *msbk* 基因的調控情形，我們分析了 *msbk* 基因上游 5kb 的片段，發現許多具有神經組織專一性結合的轉錄因子結合位置。在 promoter 活性分析的實驗中發現，在神經細胞內 mSBK 片段七的區域具有 promoter 活性。而免疫染色證實在神經細胞當中存在著 MYH9 蛋白。在本研究中，我們發現了會與 mSBK 結合的蛋白以及預測會與轉錄因子結合的位置。是否 mSBK 透過與 MYH9 結合進而影響下游蛋白以調控腦部功能或是在發育階段使神經細胞遷移到適當位置值得未來進一步的探討。

## 英文摘要

Protein kinases play important roles in the regulation of several brain-specific functions, including neuronal differentiation, neuronal plasticity, LTP (long-term potentiation), LTD (long-term depression) and neurotransmitter release. In the previous studies, we have identified a novel serine/threonine protein kinase, BSK146, in the brain of zebrafish. In the present data suggest that BSK146 may involve in hindbrain development. By using the BLAST program to search the currently available database, we found a BSK146 homologue, rat SH3-binding kinase (sbk), with distinct kinase domain and proline-rich C-terminal region. To identify this novel protein kinase function, we isolated and characterized a mouse protein kinase msbk, which is homologous to that of rat SH3-binding kinase (sbk), and explore this novel protein kinase possible mechanism. Using pull-down approach, we have identified a candidate msbk interaction protein in astrocytes cell lysate, MYH9 (non-muscle myosin heavy chain IIA). In addition to elucidate the regulation of msbk gene expression, we analyzed the 5kb fragment corresponding to the 5'-upstream region of msbk gene, revealed numerous putative binding sites for transcription factors. Promoter analysis proved that the mSBK 7<sup>th</sup> fragment had promoter activity in nerve cells. By using the immuno-fluorescence analysis also found the MYH9 in nerve cells. In this study, we have identified a candidate interaction molecule for msbk and revealed numerous putative regulation elements. Whether the mSBK were associated with MYH9 to affect the downstream protein and regulated the other specific brain functions or nerve cells to migrate properly during developmental stages need to be further explored.

# 目錄

致謝.....	I
中文摘要.....	II
英文摘要.....	III
目錄.....	IV
一、前言.....	1
二、材料與方法.....	5
三、結果.....	14
四、討論.....	17
五、未來展望.....	20
參考文獻.....	21
圖表.....	24

# 一、前言

蛋白激酶在調節許多大腦特殊功能上扮演非常重要的角色，其所調節的功能包括：神經細胞的分化 (neuronal differential)、神經的多變性 (neuronal plasticity)、LTP (long-term potentiation)、LTD (long-term depression) 和神經傳導物質 (neurotransmitter release) 的釋放等。有趣的是腦部是唯一表現所有 11 種 PKC isoforms 的組織，而且根據目前研究發現  $\text{Ca}^{2+}$ /calmodulin-dependent protein kinase II (CaMKII) 是在哺乳類動物腦組織中表現最多的一 serine/threonine protein kinases。在 CaMKII mutant 的老鼠試驗研究發現 CaMKII 的磷酸化與大腦的長期記憶 (long-term potentiation, LTP) 與空間感有相關性。另外一些調控腦部功能及生長的蛋白激酶其功能已被證實，如：minibrain 蛋白激酶在胚胎期之後的神經發生過程中，與神經母細胞增生有關，目前已知其是造成 Down syndrome 學習缺陷的主因之一 (Tejedor et al., 1995)；而在 cdk5 突變老鼠的研究顯示出在大腦皮質的結合上有明顯的缺陷，顯示此蛋白激酶在胚胎發育時，參與神經細胞間的結合及移動 (Homayouni and Curran, 2000)。

## 1. 絲胺酸/蘇胺酸蛋白激酶 (Serine /threonine protein kinase)

過去的許多研究指出，絲胺酸/蘇胺酸蛋白激酶，會透過調控轉錄因子的磷酸化、細胞週期的調節以及細胞核內外的效應，來穩定細胞的狀態及訊息的傳遞。其中 c-Jun NH2 terminal kinase (Jnk) 這類 serine /threonine 蛋白激酶家族已被認為與細胞處在壓力狀態，致使細胞凋亡的調控有關。但目前的研究顯示，在不同的細胞裡，Jnk 之訊息傳導路徑竟會有造成細胞凋亡或抗細胞凋亡兩種截然不同的結果產生 (Ashkenazi and Dixit, 1998; Berberich et al., 1996; Luo et al., 1998; Roulston et al., 1998; Xia et al., 1995)。因此 Jnk 的活化對細胞凋亡的影響可能存在著細胞差異 (Ip and Davis, 1998)。

目前的證據顯示 Jnk1、Jnk2 和 Jnk3 這 3 個 Jnk 家族基因，有著不同的功能；Jnk1 及 Jnk2 在各成體組織裡廣泛的表現，而 Jnk3 則主要在神經系統表現 (Martin et al., 1996) 且其功能為保護神經細胞，避免神經細胞因壓力致使之細胞凋亡。而 Jnk1 及 Jnk2 則是與胚胎腦部早期發育有關，且會對特定的腦部區域產生細胞凋亡或抗細胞凋亡兩種不同的結果 (Kuan et al., 1999)。

在圓斑河豚蛋白激酶的相關研究 (Chou et al., 1998) 中發現，有一個新穎 serine /threonine 蛋白激酶 146 (BSK146)，會在圓斑河豚腦部組織有很強的表現，而腸道、腎臟和心臟等組織則有少量的表現，但此基因的功能仍未清楚。利用這個新穎的蛋白激酶在基因庫中，進行同源性的比對，發現有兩個類似的蛋白激酶，分別為牛爪蛙 pk9.7 和大鼠 sbk 新穎蛋白激酶。

牛爪蛙 pk9.7 新穎蛋白激酶 也是一種 serine /threonine 蛋白激酶，而 pk9.7 只表現在牛爪蛙發育過程中之 mid-blastula 到 gastrula 的階段；當利用注射 pk9.7 mRNA 進入牛爪蛙的卵子，使 pk9.7 蛋白得以表現，如此會促使卵子之減速分裂完成；若於胚胎時期注射 pk9.7 mRNA，pk9.7 蛋白過量表現，則會在 blastula 期阻斷細胞的分裂，且會使染色體從 spindle 分離，這些結果顯示 pk9.7 參與細胞分裂，且會調控染色體與 spindle 接合之過程 (Snape and Smith, 1996)。

而在大鼠 sbk gene 研究亦指出，此蛋白激酶主要在胚胎發育晚期的腦部表現，於胚胎第 18 天蛋白表現達到最高，而在出生後逐漸的降低表現，顯示此蛋白激酶可能與腦部發育有關，不過在成鼠組織之北方墨點法分析中雖然主要在腦部表現，但在心臟、肝臟、腎臟亦有少量表現，因此可知 sbk 在成體也會表現且在其它組織亦有少量表現；而在細胞中之分析則是利用免疫染色法，去分析從大鼠海馬迴上所培養之神經細胞，得知此蛋白激酶在細胞質中表現，另外體外蛋白激酶活性分析及蛋白質二維電泳則顯示 SBK 為 serine/threonine 蛋白激酶且具有自體磷酸化功能之蛋白激酶 (Nara et al., 2001)

而在斑馬魚蛋白激酶 bsk146 基因的研究中亦發現，此新穎蛋白激酶在胚胎發育過程中，受精後 24hr 即可偵測到此基因的表現，而 36hr 後開始明顯的表現；同樣

的在成熟的組織中主要會在腦部組織表現。利用 *bsk146* morpholino antisense oligonucleotide (MO) gene knockdown 技術進行研究，發現，經 MO 處理斑馬魚的胚胎腦室會呈空泡狀且身體呈彎曲狀的情形出現，結果顯示 *bsk146* 可能與腦部發育有關 (Chou et al., 1998)

## 2.非肌肉的肌凝蛋白 II (nonmuscle myosin-II)

肌球蛋白家族的組成多達 24 種類的分子 (Foth et al., 2006)，在哺乳類當中非肌肉的肌凝蛋白 II (nonmuscle myosin-II) 主要分為三類，分別是 nonmuscle myosin-IIA (MYH9)、nonmuscle myosin-IIB (MYH10) 及 nonmuscle myosin-IIC (MYH14)，這三類保守的蛋白分子在胺基酸序列上有 64–80% 的相似程度 (Golomb et al., 2004)。在將老鼠 Myosin-IIA 基因剔除 (knockout) 的研究發現，會在胚胎發育早期影響 cell-cell adhesions 和 tissue organization 造成缺陷 (Conti et al., 2004)。因此當 myosin-IIA 發生缺失時，胚胎會早期死亡。而 Myosin-IIB 在腦和心臟組織有高度的表現，當 Myosin-IIB 發生缺失時，會導致心臟血管及神經的缺陷 (Uren et al., 2000)。另外在小鼠的耳蝸上也發現到，當 Myosin-IIC 在這個部位發生突變時，會造成顯性的聽力損傷 (Donaudy et al., 2004)。

在非肌肉的細胞中，Myosin II filament 的聚合情形是動態的，且受到空間和時間上的調節 (Matsumura, 2005; Watanabe et al., 2007) Myosin light chain (MLC) 上的磷酸化，可以穩定 Myosin II filament 聚合的情形是在過去許多研究中已了解十分清楚。而磷酸化 myosin II heavy chain 同樣會降低 Myosin II filaments 聚合能力。利用受體活化劑引起 MHC IIA (Buxton and Adelstein, 2000; Ludowyke et al., 2006; van Leeuwen et al., 1999) 和 MHC IIB (Even-Faitelson and Ravid, 2006; Rosenberg and Ravid, 2006; Straussman et al., 2001) 暫時的磷酸化，使 myosin II filaments 不會有聚合的情形。有許多蛋白激酶可以磷酸化 MHC IIA 和 MHC IIB，包括 calmodulin kinase II (CaMKII)、casein kinase II (CKII) 和 protein kinase C (PKC) family (Clark et



al., 2006)。但另一方面的實驗結果卻支持有另一種機制與 Myosin II filament 聚合的情形相關。Myosin II filaments 透過 myosin II heavy chain (MHCII) 螺旋狀尾部的相互間靜電力，進而互相聚集，直接干擾螺旋狀尾部的相互間靜電力提供了一個潛在的機制，以瓦解 myosin II filaments 的聚合 (Hostetter et al., 2004)。而直接和螺旋狀尾部結合的蛋白質，也會影響 myosin 單體間的結合力，進而影響 myosin II filaments 的聚合，例如，與癌症轉移相關的蛋白質 S100A4 (Mts1) 會與 myosin IIA heavy chain (MHC IIA) 結合，並利用調控  $Ca^{2+}$ -dependent 的方式改變 filament 的形成，因而促進 cell migration and tumor metastasis (Li and Bresnick, 2006; Li et al., 2003)。

### 3.研究目的

在過去的研究中已了解到在非肌肉的肌凝蛋白 II 上，無論是 heavy chain 或是 light chain 的磷酸化對於 cell migration 和 tumor metastasis 都有著一定的影響。而在神經細胞間的結合及移動研究中也發現，有些絲胺酸/蘇胺酸蛋白激酶也參與其中。而在利用 mSBK C-端蛋白質片段進行 pull-down 實驗，結果發現 mSBK 會與 myosin IIA 結合，因此本論文想要探討老鼠 mSBK 蛋白激酶是否是透過 myosin IIA 來進行其對於大腦組織特殊功能的執行？同時也對老鼠 mSBK 的 promoter 進行分析，想要瞭解 *msbk* 基因的表現調節，是否有組織的特異性？瞭解 mSBK 基因可能的調節機轉和其參與的訊息傳遞途徑，將可釐清老鼠 mSBK 在胚胎發育過程中所扮演的角色。

## 二、材料與方法

### 北方墨點法 (Northern blot analysis)

在本實驗中，我們是利用 Mouse MTN blot (Clontech)，來分析老鼠 *msbk* 基因在不同組織間表現的情形。首先將老鼠 *msbk* 的 cDNA 片段，標定上放射線物質( $P^{32}$ )，將此具放射性的 cDNA 探針與 Mouse MTN blot 利用 Quick Hybridization buffer (Clontech) 在  $42^{\circ}\text{C}$  下進行雜合反應 16 小時，將雜合後之 membrane 利用 NaCl/Cit/0.1% SDS 溶液進行清洗，清洗三次每次 10 分鐘。最後利用自動放射顯影技術 (autoradiography) 將結果呈現在 X 光片上 (Kodak BioMax MS Film)。

### 洋菜膠電泳分析 (agarose gel electrophoresis)

取適量洋菜膠 (agarose)，先以 TBE 緩衝液 (50 mM Tris-HCl、pH 8.0、50 mM Boric acid、1 mM EDTA) 混和，使最終濃度為 0.8~1.5%，最終濃度視分析 DNA 大小決定，再經微波爐加熱溶解，使冷卻至  $60^{\circ}\text{C}$ ，加入 ethidium bromide (EtBr) 最終濃度為 0.5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ )，並將洋菜膠倒至膠盤上，待其凝膠後，將之移至電泳槽中，以 0.5x TBE 緩衝液覆滿膠盤，加入欲分析之 DNA (已加入 gel loading buffer：最終濃度為 0.05% bromophenol blue、0.05% xylene cyanol 及 5% glycerol)，以電壓 100 伏特進行電泳，並以紫外光偵測並照相留存。

### DNA 膠體純析 (DNA gel extraction)

將要純析之 DNA 片段從洋菜膠上切下，裝入小離心管，加入 0.5 ml PG buffer (EasyPure, Bioman) 並置於  $55^{\circ}\text{C}$  乾浴中加熱至膠體完全溶解為止；然後將溶解的膠體溶液移至 spin column 中，並以 10000 rpm 離心 1 分鐘，之後加入 0.5 ml wash buffer 洗滌，10000 rpm 離心 1 分鐘，再經過空轉 3 分鐘後放入烘箱中待酒精揮發。最後以 30  $\mu\text{l}$  滅菌水，並以 10000 rpm 離心 2 分鐘，即可收集到純析之 DNA 片段。

## DNA 接合反應 (DNA ligaton)

取適量純析後的 DNA 樣品，加入 1  $\mu$ l 載體 (比例約 3~5:1)，2  $\mu$ l 的 10x ligation buffer (Fermentas)，1  $\mu$ l (3 unit) T<sub>4</sub> DNA ligase (Fermentas)，並加無菌水使體積為 20  $\mu$ l，室溫反應 1 小時。

## 勝任細胞 (Competent cells) 製備

先準備下列 2 種溶液：

- (1) TSS 溶液：Yeast extract 0.5 g；Tryptone 1 g；NaCl 1 g；PEG-4000 10 g；DMSO (dimethylsulfoxide) 5 ml；1M MgSO<sub>4</sub> 2.5 ml 及 1M MgCl<sub>2</sub> 2.5 ml，加水至 100 ml，高溫滅菌後或以 0.45  $\mu$ m 濾膜過濾備用 (Millipore)。
- (2) Ice-cold TSS 溶液：將 (1) 與 60% glycerol 兩者等體積互相混合。

取 JM109 大腸桿菌菌種之單一菌落，接種於 5 ml LB 培養液 (1% Tryptone、0.5% Yeast extract、1% NaCl) 於 37°C 培養 16~20 小時後，取 50  $\mu$ l 菌液重新接種於 5 ml LB 培養液中，於 37°C 再培養 2~3 小時。然後以 2500 rpm 離心 10 分鐘，倒去上層澄清液，下層沉澱菌株加入 2.5 ml 之 TSS 溶液，以震盪器混合均勻。再以 2500 rpm 離心 10 分鐘。倒去上清液，菌體以 0.3 ml 之 ice-cold TSS 溶液溶解，再以震盪器震散菌液沉澱後，分裝成每份 100  $\mu$ l 存於 -80°C 冰箱備用。

## 細菌之轉型作用 (transformation)

取與載體完成接合反應之 DNA 溶液 10  $\mu$ l，在冰浴條件下加入上述製備之 100  $\mu$ l 勝任細胞中，靜置 30 分鐘後，以 42°C 乾浴熱處理 90 秒，隨後冰浴 1 分鐘。接著加入 0.2M IPTG (isopropyl- $\beta$ -D thiogalactopyranoside)，50 mg/ml X-Gel (5-bromo-4-chloro-3-indoly- $\beta$ -D-galactopyranoside) 各 15  $\mu$ l，混合均勻後取 40~50  $\mu$ l 之混合液均勻塗佈於含 ampicillin (50  $\mu$ g/ml) 之 LB 洋菜膠培養皿上，於 37°C 培養箱培養 14~16 小時。

## 少量質體 DNA 之快速製備

將單一菌株接種於含 ampicillin (最終濃度為 50  $\mu\text{g/ml}$ ) 之 5 ml LB 培養液，於 37  $^{\circ}\text{C}$  恆溫培養箱中旋轉培養 16~20 小時。取 1 ml 之菌液至於 1.5 ml 之小離心管中，以 13000 rpm 離心 30 秒後，倒掉上清液。於沉澱菌體加入 350  $\mu\text{l}$  溶解緩衝液 (0.7 mg/ml lysozyme、8% sucrose、0.5% Triton X-100、50 mM EDTA 及 10 mM Tris-HCl PH8.0)，激烈震盪後，室溫靜置 1~2 分鐘，之後於沸水中煮 45 秒；再以 13000 rpm，4  $^{\circ}\text{C}$ ，離心 15 分鐘，以牙籤挑出管底沉澱物。取上層液加上 420  $\mu\text{l}$  之異丙醇，混合均勻後，再於 13000 rpm，4  $^{\circ}\text{C}$ ，離心 15 分鐘，倒掉上清液，以 70% 酒精清洗沉澱物二次，在烘箱烘乾後，以 50  $\mu\text{l}$  無菌水溶解 DNA。

## 純化質體 DNA

以 Wizard® Plus SV Mini-preps kit (Promega, USA) 純化質體 DNA：取 5 ml 隔夜培養的大腸桿菌，於 2500 rpm 下室溫離心 10 分鐘，倒除上清液，加入 200  $\mu\text{l}$  Resuspension solution 與細菌完全混合激烈搖盪後，加入 200  $\mu\text{l}$  lysis bufer 以及 10  $\mu\text{l}$  alkaline protease 均勻混合使菌液呈現透明狀 (停留時間勿超過 5 分鐘)，再加入 300  $\mu\text{l}$  之 neutralization solution 輕輕均勻混合然後冰浴 5~10 分鐘，於 13000 rpm 下 4  $^{\circ}\text{C}$  離心 10 分鐘，將上清液倒入 spin filter，於 13000 rpm 下 4  $^{\circ}\text{C}$  離心 1 分鐘，加入 wash buffer 洗滌 2 次，然後再空轉 3 分鐘來去除殘留的酒精，最後加入無菌水，於 10000 rpm 下離心 2 分鐘收集純化的質體。保存於 -20  $^{\circ}\text{C}$  冰箱供序列分析或細胞轉殖之用。

## 帶有 HA-tag 質體之構築

所使用的載體為 pcDNA-HA (以 pCDNA3 加入一段 HA-tag)，利用該載體的多種限制酶選殖位 (multiple cloning sites)，可利用 PCR 合成不同長度的 mSBK 基因片段，並分別將這些片段殖入 pcDNA-HA 載體，以探討 mSBK 蛋白激酶的功能。

## 核酸限制酵素之切割

將純化的質體 (1 µg) 3 µl，加入 10x reaction buffer 1.5 µl 和核酸限制酵素 (restriction endonuclease) 0.5 µl，12.5 µl 無菌水於 37°C 的恆溫槽中反應 60 分鐘，再以洋菜膠體電泳分析產物之大小及片段數目。

## 老鼠 mSBK EC1 和 EC2 不同基因片段的表達

為了探討老鼠 mSBK 基因的功能，我們將 mSBK 基因分成 EC1 和 EC2 兩個不同的片段 (附錄 4)；EC1 是包含部份 kinase domain 和 SH3 binding domain 靠近 mSBK C 端的部分，而 EC2 則是只含 kinase domain 部分。首先將 mSBK EC1 和 EC2 分別轉殖入 pQE-30 載體內。之後將 pQE-30 載體 transformation 至大腸桿菌內，挑選帶有重組基因片段之單一菌落，將此大腸桿菌置入含有 ampicillin 之 LB 培養液中，經過 16 小時 (37°C) 搖晃培養；再加入 IPTG 誘發重組蛋白生成，再經 3 小時 (37°C) 搖晃培養。利用 sonicator 以超音波震盪的方式將大腸桿菌擊破，之後離心得得到表達 EC1 和 EC2 蛋白質的上清液及沉積物。

## Pull-down 和老鼠 msbk 蛋白激酶交互反應的蛋白

由於重組蛋白質上含有六個連續的組胺酸 (Histidine)，因此可利用鎳離子親合性樹脂層析管柱之 His-Bind Resin 與六個連續的組胺酸結合，又因為 Imidazole 與組胺酸的結構相似，故在不同濃度的 Imidazole 作用下，會與組胺酸發生吸附和釋放的競爭性結合反應，進而達到純化表現蛋白質之目的。將純化蛋白質用的管柱做前置處理，取適量的 His-Bind Resin 填充至管柱中，加入二次去離子水，將保存 resin 的緩衝液洗淨，接著加入 EC1 或 EC2 蛋白質之萃取液，使其緩慢地通過管柱，同時收集流出液 (flow through)；經由不同濃度的 Imidazol (20~60 mM) 將非特異性鍵結的物質沖洗過後，即完成結合 EC1 和 EC2 蛋白質管柱之製備。(附錄 5、6)

## SDS 聚丙醯胺凝膠電泳分析 (SDS polyacrylamide gel, SDS PAGE)

採用 Tricine-sodium dodecyl sulfate 電泳系統 (Schagger and von Jagow, 1987)。配製 10% SDS-PAGE (separating gel : 10% ; stacking gel : 3%)，待膠片凝固後將其架在電泳槽上，並加入電泳緩衝液。將欲分析的蛋白質樣品溶解於 gel loading buffer 中 (0.1%  $\beta$ -mercaptoethanol, 4% SDS, 0.01% serva blue G, 12% glycerol, 50 mM Tris-HCl, pH 7.0)，於熱水加熱 5 分鐘，將蛋白質樣品 spin down 後加入樣品槽內，並以 168 伏特電壓進行電泳，直至染劑 (trafficking dye) 到達凝膠底部為止。

## 西方墨點法 (Western blot analysis)

欲分析的蛋白質樣品以 SDS-PAGE 進行電泳分析後，利用 Hoefer 公司 (San Francisco, CA) 之 semi-Phor™ 轉印器將蛋白質自 SDS-PAGE 轉移至 PVDF membrane 上。轉印完成後將 PVDF membrane 浸於含有 3% skim milk 之 PBS 溶液中進行 blocking，於室溫下反應 1 小時，隨即將 PVDF membrane 與欲偵測之一級抗體於 4°C 反應 overnight。第二天將 PVDF membrane 以 PBS-T (1x PBS 內含 0.2% Tween-20) 洗滌三次；每次 5~10 分鐘，之後將 PVDF membrane 與欲二級抗體於室溫中進行反應，作用時間 45~120 分鐘，反應後再以 PBS-T 洗滌三次，每次 5~10 分鐘。之後使用 enhanced chemiluminescence (ECL) 進行冷光呈色顯影。方法略述如下：將 ECL-A, B 兩試劑及二次水以 1 : 1 : 1 之比例混合，混合均勻後與上述與抗體反應後之 PVDF membrane 反應 1~2 分鐘，然後在暗房中與高感度底片 (Fuji medical X-ray film) 進行曝光，最後將感光後的底片，經由顯影試劑組 (Kodak GBX developer and fixer)，將結果顯現，記錄及保存。

## 免疫螢光染色

將細胞以 PBS 溶液清洗細胞 2 次，然後以 4% paraformaldehyde (PFA) 固定細胞，4°C 反應 10 分鐘，PBS 溶液清洗細胞 2 次，每次 5 分鐘，在加入 1x PBS/0.1% Triton X-100, 4°C 反應 10 分鐘或於室溫 5 分鐘，以 PBS 溶液清洗細胞 2 次，每次 5 分鐘。再置於含有 3% skim milk 之 PBS 溶液 (blocking buffer) 中反應 30 分鐘，接

著加入適量之一級抗體液體至新配製之 blocking buffer 溶液於室溫作用 2 小時或 4°C 輕輕搖晃 overnight 之後，以 PBS-T (含 0.2% Tween20 的 PBS) 溶液洗 2 次，每次 5~10 分鐘，再加入二級抗體溶液於室溫輕輕搖晃 2 小時，經 PBS-T 溶液洗滌 3 次後，即可以螢光顯微鏡進行呈色觀察，並以 SPOT 影像擷取系統記錄。

### 神經膠細胞的初代培養 (primary culture of rat neuroglia)

初代培養的神經膠細胞由生理學科李怡萱老師實驗室提供，其製備方法略述如下：將出生後三天之內的新生鼠，以過量的吸入性麻醉劑 Sevoflurane (Ultane, Japan) 使其麻醉後進行解剖，從心臟先進行灌流直至腦部呈現白色，然後取出全腦並移至於含有胎牛血清 (Fetal Bovine Serum; FBS) 的培養液 (DMEM/F12) 中。

將取出的全腦以 14G cannula 機械式的將其打散成為單一細胞，然後以 70  $\mu$ m mesh 過濾，之後用 1000 rpm，離心 10 分鐘，吸除上清液後加入新的培養液使細胞再懸浮，重複以上步驟二次。完成後以適當細胞密度將細胞接種於 75T 培養瓶 (75T Flask)，置入含 5%CO<sub>2</sub>、37°C 培養箱中，不得隨意碰觸，直到第六天及第九天使換培養液。在第十一天至第十三天，利用分速離心法，即可將微膠細胞 (microglia) 以及寡突膠細胞 (oligodendrocytes) 分離出來，剩下最底層的及為星狀細胞 (astrocytes)。接著以 trypsin-EDTA 將星狀細胞從培養瓶中打散，經過離心之後依實驗所需的細胞密度接種至培養皿中備用；寡突膠細胞則以 10x10<sup>5</sup> 密度接種於 35 mm 盤上備用。

### 皮層神經元細胞的初代培養 (Primary culture of cortical neurons)

初代培養的神經膠細胞由生理學科李怡萱老師實驗室提供，其製備方法略述如下：將懷孕懷孕 17 日的母鼠經麻醉犧牲後取出仔鼠，分離出仔鼠的腦皮層的部分，經過機械性的分離方式後，在 growth medium Eagles 【basal medium Eagles (BME; Life Technology, Carlsbad, CA, USA) supplemented with D-glucose (33 mmol/L final), L-glutamine(2.0 mmol/L final), and 20% heat-inactivated fetal bovine serum (FBS; Hyclone, Logan, UT, USA)】中清洗三次並以 200xg 離心 5 分鐘。將沉澱的細胞以 3x10<sup>5</sup> 的密度

懸浮於 growth medium Eagles 中並置於有 poly-L-lysine-coated 的 cell culture dishes , 在含 5%CO<sub>2</sub>、37°C 培養箱中進行培養45分鐘，使細胞貼附，之後更換新鮮的 serum-free BME 進行後續的培養。

### **P19 細胞株的培養 (P19 Cell Line Culture)**

本實驗所用的細胞株 P19，購於 ATCC (American Type Culture Collection) ，以含 10% fetal bovine serum 的 MEM- $\alpha$  medium 培養，培養於 T25 flask，放置於含 5% CO<sub>2</sub> 之 37°C 的 incubator 中進行培養。待細胞生長至約八分滿時，則進行 subculture。首先將原來 T25 flask 中的舊培養液移除，加入 1 ml 的 Trypsin-EDTA [0.25% Trypsin, 1 mM EDTA)，作用數分鐘後(依 P19 細胞與 tissue culture surface 分離的情形而定)，加入適量的 culture medium (9ml)，終止 Trypsin-EDTA 的反應，並將細胞吸入 15 c.c.離心管，以 300 rpm 的轉速離心 5 分鐘。離心後移除上清液，加入 10 ml culture medium，如此再反覆一次。最後取適量細胞分配到新的 flask 中，以進行次代再次將細胞 resuspend，如此再反覆一次。最後取適量細胞分配到新的 flask 中，以進行次代繁衍。

### **誘導 P19 細胞株的神經分化**

#### **(Induction of P19 Cell Line Differentiated into Neurons)**

當 P19 細胞增長至 T25 flask 的七、八分滿時，即可進行神經細胞分化的誘導。得 P19 細胞以  $1 \times 10^6$  的密度培養在直徑 10 cm 的 Petri dish 中，並以含有濃度為 1  $\mu$ M 的 retinoic acid (RA) 的 culture medium 來進行為期四天的誘導；將誘導過程的第一天視為第零天 (0 days during retinoic acid treatment，簡稱為 0 DRA)。在 4DRA 時，收集 petri dish 的 medium,medium 中存在著經由 retinoic acid 誘導而形成的 P19 aggregation 細胞，以自然沉降的方式，獲得 P19 aggregation 細胞的 pallet，再使用含



20% fetal bovine serum 之 MEM- $\alpha$  medium，以 cannula 將已形成的 aggregation 分散成單一細胞，並以 300 rpm 轉速離心 5 分鐘，再重複此步驟兩次。最後以適量的含 20% fetal bovine serum 之 MEM- $\alpha$  將細胞 resuspend，以每盤 24 well 含約  $5 \times 10^6$  個細胞，或是 35mm dish 含  $3 \times 10^5$  的密度，培養在 Poly- L-Lysine coated 之 tissue culture plate，待 45 分鐘～一小時，細胞附著後，移除含 20% FBS 之 MEM- $\alpha$  更換為含 N2-supplement、L-glutamine 之 Neurobasal Medium；plating 當天視為第零天 (0 days after retinoic acid treatment)。除了上述一般 neural induce 的方法，在本論文的研究中，將直接以 monolayer 的形式促使 P19 細胞分化。將 P19 細胞以  $1 \times 10^5$  的密度，以含 10% FBS 的 MEM- $\alpha$  培養在 35mm dish 裡，放至隔天待細胞附著完全並開始增生，更換培養液。同時使用 10% FBS 的 MEM- $\alpha$ ，但在培養液中添加了  $1 \mu\text{M}$  的 retinoic acid、 $10 \text{ ng/ml}$  的 FGF8、 $1 \mu\text{g/ml}$  的 Heparin，待 48 小時後再次更換培養液，使用 10% FBS 的 MEM- $\alpha$ ，培養液中相同地添加了  $1 \mu\text{M}$  的 retinoic acid、 $10 \text{ ng/ml}$  的 FGF8、 $1 \mu\text{g/ml}$  的 Heparin，再培養 48 小時後，以 trypsin-EDTA 處理細胞，以  $3 \times 10^5/35\text{mm dish}$  的密度重新 plating，待 45 分鐘～1 小時細胞完全附著後，移除含 10% FBS 之 MEM- $\alpha$ ，更換為含 N2-supplement、L-glutamine 之 Neurobasal Medium。此種 neural induce 的方式不經過 P19 細胞形成懸浮 aggregation 的步驟，直接以 monolayer 的方式使 P19 細胞被誘導成為 neurons。

### 細胞轉染 (transfection)

將細胞以每孔  $1.25 \times 10^5$  密度接種於 24 孔盤 (24-well) 上，接種後的細胞第二天利用 lipofectamine (TransFastIM Transfection Reagent, Promega) 將欲分析的 DNA 轉染至細胞內，進行 promoter 活性分析。過程略述如下：首先在不含血清的細胞培養液中加入  $1 \mu\text{g}$  準備進行 promoter 活性分析的 DNA，之後加入  $3 \mu\text{l}$  lipofectamine 脂溶性小體，等待 10 分鐘左右包覆並送入細胞中。然後將細胞放回培養箱培養 1 小時後，加回 0.5 ml 含有 10% FBS 的培養液，待培養 36～48 小時後依實驗需要，之後進行啟動子活性的分析。

## 雙螢光素醣偵測 (dual-luciferase assay)

將上述細胞用 1xPBS 洗去殘留的培養液後，以每 well 加入 80  $\mu$ l 的 PLB (Passive lysis buffer, SX, Promega) 細胞分解液，將細胞分解，利用 TD-20/20 luminometer (Turner Designs) 以波長 565 nm 來進行冷光偵測，並以 Dual Luciferase kit (Promega) 偵測螢光酶活性當成轉殖效率的對照組。



### 三、結果

#### 老鼠 *msbk* 蛋白激酶在不同組織表現之分析

利用北方墨點法 (Northern blotting analysis) 分析老鼠 *msbk* 基因在成鼠不同組織間的表現，結果顯示，在各種組織上都發現有老鼠 *msbk* 的表現；其中在心臟、腦部、腎臟等組織有高度表現的情形，而在肝臟及睪丸等組織有中度表現的情形，而在像是脾臟、肺臟及肌肉等組織表現的情形低於前述各組織 (圖 1)。由此可知老鼠 *msbk* 基因，主要會表現在心臟、腦部、腎臟等組織。

#### 利用 EC1 和 EC2 蛋白質管柱進行 pull-down 實驗，分析與老鼠 mSBK 交互反應的蛋白質

利用上述製備的管柱，對細胞的裂解液進行分析。將星狀細胞的萃取液流過管柱後，進行 SDS 聚丙醯胺凝膠電泳 (SDS-PAGE) 分析，經比對星狀細胞的萃取液和流過 EC1 或 EC2 純化管柱的萃取液的樣品，結果顯示，無論是流過 EC1 或 EC2 管柱的萃取液都有一明顯的蛋白質分子會跟管柱內的 EC1 或 EC2 蛋白結合 (圖 2 A)。進一步的將管柱內與 EC1 或 EC2 結合的膠體，進行 SDS-PAGE 分析 (圖 2 B)，發現在上述分析中消失的蛋白分子，在相同分子量的位置也可被偵測。為了瞭解這個可與 EC1 或 EC2 結合的蛋白為何，於是將未知的蛋白質由 SDS-PAGE 膠體中切出，並委託威適樂有限公司進行蛋白質身份鑑定。經過將蛋白質 In-gel digestion 後，利用 MALDI-TOF mass spectrometer 進行分析；將所得到的數值，利用 Mascot database 的分析，得到的結果如圖 (圖 3)。

([http://www.matrixscience.com/cgi/search\\_form.pl?FORMVER=2&SEARCH=MIS](http://www.matrixscience.com/cgi/search_form.pl?FORMVER=2&SEARCH=MIS))。

經 Mascot database 分析的結果顯示，此蛋白質為 non-muscle myosin heavy chain 9 (MYH9)。為確定這個未知的蛋白是否真的是 MYH9，我們利用星狀細胞的萃取液進行 SDS PAGE 電泳分析，再以 MYH9 抗體進行西方墨點法 (Western blot analysis) 分析，結果顯示此未知的蛋白確實為 MYH9 (圖 4)。

為了瞭解 MYH9 在神經組織中分佈的情形，於是利用星狀細胞 (astrocytes)、初代培養的大腦皮質神經細胞 (primary culture of cerebral cortical neurons) 及 p19 細胞來進行分析，於是我們針對初代培養的大腦皮質神經細胞、星狀細胞及 p19 細胞進行免疫螢光染色，分別以 MYH9、MAP2 或 GFAP 當作一級抗體，Cy3 (紅色)、Cy2 (綠色) 當二級抗體，並利用 DAPI 來標定細胞核。透過免疫螢光染色分析結果顯示 MYH9 分布在星狀細胞細胞質呈現如同細胞支架的分布情形(圖 5)，有些會集中在細胞膜附近。在大腦皮質神經細胞的細胞質當中發現也有 MYH9 的分布，但和星狀細胞發現的分佈情形不同，呈現聚集的現象 (圖 6)。而在 p19 細胞的分布情形與大腦皮質神經細胞相同，分佈在細胞質當中呈現聚集的現象 (圖 7)。

### 老鼠 mSBK promoter 分析

將老鼠 mSBK 大約 5kb promoter 片段選殖出來，並利用限制酶分別選殖9個不同區域的片段，再分別將這些片段選殖入 pGL3-basic 啟動子分析載體，利用螢光酶基因 (Luciferase) 活性來分析各個片段的啟動子活性 (圖8)，利用細胞轉染的技術，將包含螢光酶基因之不同區域的 mSBK promoter 片段的表現質體，分別轉染至星狀細胞和 P19 細胞進行初步的 promoter 活性分析。(圖9圖10)將不同長度的老鼠 mSBK promoter 轉染至星狀細胞進行 promoter 活性分析，結果顯示除了全長的 promoter 有活性外，轉染片段七及片段八也有 promoter 活性的呈現。P19 細胞是一株老鼠胚胎瘤細胞，具有分化成多種細胞型態的能力，同時伴隨著維他命 A 酸 (Retinoic acid ; RA) 的處理，P19 細胞便會分化為神經細胞、神經膠細胞以及纖維母細胞。分別轉染分化 P19 神經細胞及未分化的 P19 細胞結果顯示，在片段七的 promoter 活性，無論是未分化之 P19 細胞或是分化之 P19 神經細胞都是比其他的片段來的數值高。從這個分析的結果推測，在 mSBK promoter 片段七當中，可能存在著具有神經細胞特異性表現的特性。

## 老鼠 *mSBK* promoter 之預測分析

把老鼠 *mSBK* promoter 的序列，經由 Genomatix 網站的 Matinspector Database 預測的結果如圖（圖 11），我們可以發現在靠近 transcription start site 的區域，有出現預測為可與 RNA polymerase II transcription factor II B 結合的序列，而在此序列附近也有許多轉錄因子可能結合的序列，包括 -680~-672 Vertebrate SMAD family、-568~-552 Octamer binding protein、-491~-481 Myeloid zinc finger 1 factors (Mzf1)、-465~-449 nerve growth factor induced protein C & related factor 以及-445~-429 Nuclear respiratory factor 1 (NRF-1) 等，而這些轉錄因子是否與神經細胞表現的特異性有關，有待進一步的實驗探討。



## 四、討論

實驗室過去研究發現斑馬魚 bsk 蛋白激酶，只會專一性的再發育和成熟的腦部組織表現，而且初步的研究發現可能參與後腦的發育 (Chou et al., 2006)。利用胺基酸序列的比對分析，發現大鼠也有一類似的 ser/thr 蛋白激酶， sbk (Nara et al., 2001)。目前有關這個蛋白激酶功能的研究，仍然還不是清楚。本研究中，我們選殖出與大鼠同源的小鼠 sbk 蛋白激酶，是一個 417 氨基酸組成之 ser/thr 蛋白質激酶，分析其氨基酸序列，除有一蛋白激酶活性區域外，其 C 端有一可與蛋白交互反應的 proline-rich 區域，在先前的研究指出，proline-rich 區域會與蛋白質的 SH3 domain 進行結合 (Ren et al., 1993; Yu et al., 1992)。利用這個區域，以 pull-down 的實驗，我們得到可與老鼠 msbk 結合的蛋白質。再經過 MALDI-TOF mass spectrometer 進行分析，發現此蛋白質為 non-muscle myosin heavy chain 9 (MYH9)。分析 MYH9 蛋白質的功能區域 (ELM 網站)，發現在 myosin heavy chains (MHCs) N 端上也有著 SH3 domain，可能是透過這個 SH3 domain 和 msbk 蛋白激酶進行交互反應。在過去的研究發現，CIN85 是個擁有 SH3 domain 及 proline-rich 區域的蛋白質，CIN85 的 proline-rich 區域可以和其他蛋白質 SH3 domain 進行結合而產生功能。CIN85 會與 p130Cas 和 cortactin 結合進而調控 cytoskeletal organization (Lynch et al., 2003; Tibaldi and Reinherz, 2003)。此外，在老鼠 msbk 蛋白的氨基酸序列上也發現 WW domain，說明老鼠 msbk 蛋白可能還有其他交互反應的蛋白存在，參與影響腦部特殊功能訊息的傳遞。

已知的 MYH9 一個分子中包含二個 myosin heavy chains (MHCs)、二個 regulatory light chain (RLC) 以及二個 essential light chains (ELCs) 所組成。在過去的研究中指出，myosin regulatory light chain (RLC) Ser-19 位置的磷酸化，跟 cell contraction、stress fiber formation 及 cell migration 有關 (Gallagher et al., 1991; Somlyo and Somlyo, 1994)。最近更有報導指出 MYH9 的 myosin heavy chains (MHCs) C 端 threonine 磷酸化與否，關係著 MYH9 能否正常的組合成具有活性的分子 (Breckenridge et al., 2009)。在本篇研究裡，

透過 pull-down 的實驗，發現老鼠新穎蛋白激酶 msbk 會與 MYH9 的 myosin heavy chains (MHCs) 進行交互反應，而且新穎蛋白激酶 msbk 本身亦具有蛋白激酶的活性，可以進行磷酸化傳遞的功能。這意味著新穎蛋白激酶老鼠 msbk 的功能可能跟 cell contraction、stress fiber formation 及 cell migration 有關。先前實驗室曾經針對老鼠 *mSBK* 部份的 promoter，片段進行活性分析，分別在 COS1、C6 和 NG108-15 等細胞中進行分析（附錄 1,2,3），COS1 為猴子腎臟細胞（renal cell）、C6 為大鼠之神經膠細胞（glioma cell）、NG108-15 為老鼠之 neuroblastoma cell 與大鼠之 glioma cell 雜交而得。在 COS1 及 C6 細胞中 *mSBK* 之 promoter 活性經由 CAT assay 分析，結果顯示在此兩種細胞其啟動子活性並不明顯，但在 NG108-15 細胞中結果卻有明顯的活性呈現，特別是在 -4000/+240、-2500/+240 及 -659/+240 這 3 個片段區域。而本篇研究則在將啟動子序列，進一步的選殖，並利用 luciferase 來進行其性分析，結果也顯示無論是在神經膠細胞或是神經細胞當中，片段七有較高的 promoter 活性。片段七和 -659/+240 這個片段有互相重疊的區域，這表示 *mSBK* promoter 序列之中，特定片段只有在神經細胞內是有活性的。為進一步探討 msbk 基因表現的調控我們利用老鼠 *mSBK* cDNA 序列的 5'端與老鼠的 Genome DNA 進行比對，找出可能之轉錄起始點，以此向前在 Genomic DNA 上尋找上游 5000 個鹼基的區域來進行 promoter 之預測分析。經由 Genomatix 網站提供的分析軟體預測結果，發現 msbk 並沒有典型的 TATA-box 結合區域，而在 -179 的位置出現可與 RNA polymerase II transcription factor II B 結合的區域，這個區域跟上述實驗中具有 *mSBK* promoter 活性的位置是一致的。而在此 RNA polymerase II 可能結合區域附近，也推測出許多具有神經組織專一表現的轉錄因子結合序列，例如，SMAD 和 EGR 等，msbk 蛋白激酶是否受到這些因子的調控，有待更進一步的分析。

在過去的文獻指出，SMAD family protein 在 TGF- $\beta$  訊息傳遞的途徑（signaling pathway）中，主要是將 TGF- $\beta$  信號從細胞表面受體傳導至細胞核中，扮演著關鍵的角色。有研究指出海馬顆粒神經細胞（Hippocampal granule neurons）的增生和分化（proliferation and differentiation），可受 brain-derived neurotrophic factor（BDNF） and TGF- $\beta$  兩個因子來控制，而這兩因子是經由 SMAD 分子將信號傳導至顆粒神經細胞的

細胞核中，進而調控海馬顆粒神經細胞的增生和分化 (Lu et al., 2005)。而在大鼠 SBK 的研究中也指出，此分子也是在海馬迴 (Hippocampus) 這個區域的 cDNA 中所分離 (Nara et al., 2001)；然而在 mSBK promoter 進行預測分析時，也發現啟動子區域具有與 SMAD 結合的區域。這表示老鼠 mSBK 基因調控，可能與 smad 及 TGF- $\beta$  signaling pathway 相關。

同時在老鼠 mSBK promoter 預測分析時也發現有 early growth response factor (EGR) 的結合區域，有研究指出在海馬神經細胞 (Hippocampal Neurons) 中 BDNF 會影響 early growth response factor 3 (Egr3) 的合成，進而去調控 Type A GABA Receptor  $\alpha$ 4 Subunits 的功能 (Roberts et al., 2006)；和老鼠 mSBK 基因同源大鼠 SBK 基因的研究指出，此蛋白激酶主要在胚胎發育晚期的腦部表現 (Nara et al., 2001)；而在同源的斑馬魚蛋白激酶 *bsk146* 基因研究中亦發現，*bsk146* 基因也在腦部組織表現 (Chou et al., 1998)。

在本篇研究中，經由 pull-down 的實驗進一步的找到會與老鼠 mSBK 蛋白激酶交互反應的分子 MYH9，因此可以推測在神經細胞中，老鼠 mSBK 蛋白激酶可能會經由調控 MYH9 或是 non-muscle myosin IIA 整個分子，來影響在發育期間神經細胞的 cell contraction、stress fiber formation 及 cell migration。而透過了啟動子活性的分析，推測 mSBK 蛋白激酶在發育過程和成熟神經組織中可能受 SMAD、EGR 等轉錄因子調節，進而影響腦部組織的發育和大腦的特殊功能。



## 五、未來展望

1. 將老鼠 mSBK 蛋白激酶選殖成不同的 isoform (附錄 7)，將這些 isoform 接上 HA-tag，分別轉染入不同的神經細胞，利用免疫螢光染色，觀察不同的 isoform 在不同的神經細胞內，老鼠 mSBK 蛋白激酶和 non-muscle myosin heavy chain 9 表現位置的關係，或是利用 co-immunoprecipitation 的方式，進一步的確認老鼠 mSBK 蛋白激酶和 non-muscle myosin heavy chain 9 互相是否結合。
2. 在同樣的模式下，研究老鼠 mSBK 蛋白激酶和 non-muscle myosin IIA 磷酸化的關係，以進一步的分析老鼠 mSBK 蛋白激酶在神經細胞內所參與調控的功能。針對老鼠 mSBK 設計 siRNA，在神經細胞上進行基因 knock down，分別利用 cell migration assay、免疫螢光染色等方式，分析老鼠 mSBK 基因對神經細胞生長的影響，進而研究老鼠 mSBK 蛋白激酶的功能。
3. 利用預測會與片段七結合分子之抗體將老鼠 mSBK promoter 片段七進行 Chromatin immuno-precipitation (ChIP) assay，確定何種分子會與老鼠 mSBK promoter 片段七會進行結合，以此作為推測老鼠 mSBK 蛋白激酶功能之依據，進而解開老鼠 mSBK 蛋白激酶在神經細胞內調控細胞的分子

## 參考文獻

- 許毓麟. (2002). 具腦部組織特異表現的蛋白激酶 *msbk* 基因之選殖與特性分析. 臺北醫學大學醫學研究所碩士論文
- Ashkenazi, A. and Dixit, V. M. (1998). Death receptors: signaling and modulation. *Science* **281**, 1305-8.
- Berberich, I., Shu, G., Siebelt, F., Woodgett, J. R., Kyriakis, J. M. and Clark, E. A. (1996). Cross-linking CD40 on B cells preferentially induces stress-activated protein kinases rather than mitogen-activated protein kinases. *EMBO J* **15**, 92-101.
- Breckenridge, M. T., Dulyaninova, N. G. and Egelhoff, T. T. (2009). Multiple regulatory steps control mammalian nonmuscle myosin II assembly in live cells. *Mol Biol Cell* **20**, 338-47.
- Buxton, D. B. and Adelstein, R. S. (2000). Calcium-dependent threonine phosphorylation of nonmuscle myosin in stimulated RBL-2H3 mast cells. *J Biol Chem* **275**, 34772-9.
- Chou, C. M., Chen, Y. C., Lee, M. T., Chen, G. D., Lu, I. C., Chen, S. T. and Huang, C. J. (2006). Expression and characterization of a brain-specific protein kinase BSK146 from zebrafish. *Biochem Biophys Res Commun* **340**, 767-75.
- Chou, C. Y., Shen, M. R., Hsu, K. S., Huang, H. Y. and Lin, H. C. (1998). Involvement of PKC-alpha in regulatory volume decrease responses and activation of volume-sensitive chloride channels in human cervical cancer HT-3 cells. *J Physiol* **512** ( Pt 2), 435-48.
- Clark, K., Langeslag, M., van Leeuwen, B., Ran, L., Ryazanov, A. G., Figdor, C. G., Moolenaar, W. H., Jalink, K. and van Leeuwen, F. N. (2006). TRPM7, a novel regulator of actomyosin contractility and cell adhesion. *EMBO J* **25**, 290-301.
- Conti, M. A., Even-Ram, S., Liu, C., Yamada, K. M. and Adelstein, R. S. (2004). Defects in cell adhesion and the visceral endoderm following ablation of nonmuscle myosin heavy chain II-A in mice. *J Biol Chem* **279**, 41263-6.
- Donaudy, F., Snoeckx, R., Pfister, M., Zenner, H. P., Blin, N., Di Stazio, M., Ferrara, A., Lanzara, C., Ficarella, R., Declau, F. et al. (2004). Nonmuscle myosin heavy-chain gene MYH14 is expressed in cochlea and mutated in patients affected by autosomal dominant hearing impairment (DFNA4). *Am J Hum Genet* **74**, 770-6.
- Even-Faitelson, L. and Ravid, S. (2006). PAK1 and aPKCzeta regulate myosin II-B phosphorylation: a novel signaling pathway regulating filament assembly. *Mol Biol Cell* **17**, 2869-81.
- Foth, B. J., Goedecke, M. C. and Soldati, D. (2006). New insights into myosin evolution and classification. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 3681-6.
- Gallagher, P. J., Herring, B. P., Griffin, S. A. and Stull, J. T. (1991). Molecular characterization of a mammalian smooth muscle myosin light chain kinase. *J Biol Chem* **266**, 23936-44.
- Golomb, E., Ma, X., Jana, S. S., Preston, Y. A., Kawamoto, S., Shoham, N. G., Goldin, E., Conti, M. A., Sellers, J. R. and Adelstein, R. S. (2004). Identification and characterization of nonmuscle myosin II-C, a new member of the myosin II family. *J Biol Chem* **279**, 2800-8.

- Homayouni, R. and Curran, T.** (2000). Cortical development: Cdk5 gets into sticky situations. *Curr Biol* **10**, R331-4.
- Hostetter, D., Rice, S., Dean, S., Altman, D., McMahon, P. M., Sutton, S., Tripathy, A. and Spudich, J. A.** (2004). Dictyostelium myosin bipolar thick filament formation: importance of charge and specific domains of the myosin rod. *PLoS Biol* **2**, e356.
- Ip, Y. T. and Davis, R. J.** (1998). Signal transduction by the c-Jun N-terminal kinase (JNK)--from inflammation to development. *Curr Opin Cell Biol* **10**, 205-19.
- Kuan, C. Y., Yang, D. D., Samanta Roy, D. R., Davis, R. J., Rakic, P. and Flavell, R. A.** (1999). The Jnk1 and Jnk2 protein kinases are required for regional specific apoptosis during early brain development. *Neuron* **22**, 667-76.
- Li, Z. H. and Bresnick, A. R.** (2006). The S100A4 metastasis factor regulates cellular motility via a direct interaction with myosin-IIA. *Cancer Res* **66**, 5173-80.
- Li, Z. H., Spektor, A., Varlamova, O. and Bresnick, A. R.** (2003). Mts1 regulates the assembly of nonmuscle myosin-IIA. *Biochemistry* **42**, 14258-66.
- Lu, J., Wu, Y., Sousa, N. and Almeida, O. F.** (2005). SMAD pathway mediation of BDNF and TGF beta 2 regulation of proliferation and differentiation of hippocampal granule neurons. *Development* **132**, 3231-42.
- Ludowyke, R. I., Elgundi, Z., Kranenburg, T., Stehn, J. R., Schmitz-Peiffer, C., Hughes, W. E. and Biden, T. J.** (2006). Phosphorylation of nonmuscle myosin heavy chain IIA on Ser1917 is mediated by protein kinase C beta II and coincides with the onset of stimulated degranulation of RBL-2H3 mast cells. *J Immunol* **177**, 1492-9.
- Luo, Y., Umegaki, H., Wang, X., Abe, R. and Roth, G. S.** (1998). Dopamine induces apoptosis through an oxidation-involved SAPK/JNK activation pathway. *J Biol Chem* **273**, 3756-64.
- Lynch, D. K., Winata, S. C., Lyons, R. J., Hughes, W. E., Lehrbach, G. M., Wasinger, V., Corthals, G., Cordwell, S. and Daly, R. J.** (2003). A Cortactin-CD2-associated protein (CD2AP) complex provides a novel link between epidermal growth factor receptor endocytosis and the actin cytoskeleton. *J Biol Chem* **278**, 21805-13.
- Martin, J. H., Mohit, A. A. and Miller, C. A.** (1996). Developmental expression in the mouse nervous system of the p493F12 SAP kinase. *Brain Res Mol Brain Res* **35**, 47-57.
- Matsumura, F.** (2005). Regulation of myosin II during cytokinesis in higher eukaryotes. *Trends Cell Biol* **15**, 371-7.
- Nara, K., Akasako, Y., Matsuda, Y., Fukazawa, Y., Iwashita, S., Kataoka, M. and Nagai, Y.** (2001). Cloning and characterization of a novel serine/threonine protein kinase gene expressed predominantly in developing brain. *Eur J Biochem* **268**, 2642-51.
- Ren, R., Mayer, B. J., Cicchetti, P. and Baltimore, D.** (1993). Identification of a ten-amino acid proline-rich SH3 binding site. *Science* **259**, 1157-61.
- Roberts, D. S., Hu, Y., Lund, I. V., Brooks-Kayal, A. R. and Russek, S. J.** (2006). Brain-derived neurotrophic factor (BDNF)-induced synthesis of early growth response factor 3 (Egr3) controls the levels of type A GABA receptor alpha 4 subunits in hippocampal neurons. *J Biol*

*Chem* **281**, 29431-5.

- Rosenberg, M. and Ravid, S.** (2006). Protein kinase Cgamma regulates myosin IIB phosphorylation, cellular localization, and filament assembly. *Mol Biol Cell* **17**, 1364-74.
- Roulston, A., Reinhard, C., Amiri, P. and Williams, L. T.** (1998). Early activation of c-Jun N-terminal kinase and p38 kinase regulate cell survival in response to tumor necrosis factor alpha. *J Biol Chem* **273**, 10232-9.
- Schagger, H. and von Jagow, G.** (1987). Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Anal Biochem* **166**, 368-79.
- Snape, A. M. and Smith, J. C.** (1996). Regulation of embryonic cell division by a *Xenopus* gastrula-specific protein kinase. *EMBO J* **15**, 4556-65.
- Somlyo, A. P. and Somlyo, A. V.** (1994). Signal transduction and regulation in smooth muscle. *Nature* **372**, 231-6.
- Straussman, R., Even, L. and Ravid, S.** (2001). Myosin II heavy chain isoforms are phosphorylated in an EGF-dependent manner: involvement of protein kinase C. *J Cell Sci* **114**, 3047-57.
- 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.
- Tibaldi, E. V. and Reinherz, E. L.** (2003). CD2BP3, CIN85 and the structurally related adaptor protein CMS bind to the same CD2 cytoplasmic segment, but elicit divergent functional activities. *Int Immunol* **15**, 313-29.
- Uren, D., Hwang, H. K., Hara, Y., Takeda, K., Kawamoto, S., Tullio, A. N., Yu, Z. X., Ferrans, V. J., Tresser, N., Grinberg, A. et al.** (2000). Gene dosage affects the cardiac and brain phenotype in nonmuscle myosin II-B-depleted mice. *J Clin Invest* **105**, 663-71.
- van Leeuwen, F. N., van Delft, S., Kain, H. E., van der Kammen, R. A. and Collard, J. G.** (1999). Rac regulates phosphorylation of the myosin-II heavy chain, actinomyosin disassembly and cell spreading. *Nat Cell Biol* **1**, 242-8.
- Watanabe, T., Hosoya, H. and Yonemura, S.** (2007). Regulation of myosin II dynamics by phosphorylation and dephosphorylation of its light chain in epithelial cells. *Mol Biol Cell* **18**, 605-16.
- Xia, Z., Dickens, M., Raugeaud, J., Davis, R. J. and Greenberg, M. E.** (1995). Opposing effects of ERK and JNK-p38 MAP kinases on apoptosis. *Science* **270**, 1326-31.
- Yu, H., Rosen, M. K., Shin, T. B., Seidel-Dugan, C., Brugge, J. S. and Schreiber, S. L.** (1992). Solution structure of the SH3 domain of Src and identification of its ligand-binding site. *Science* **258**, 1665-8.

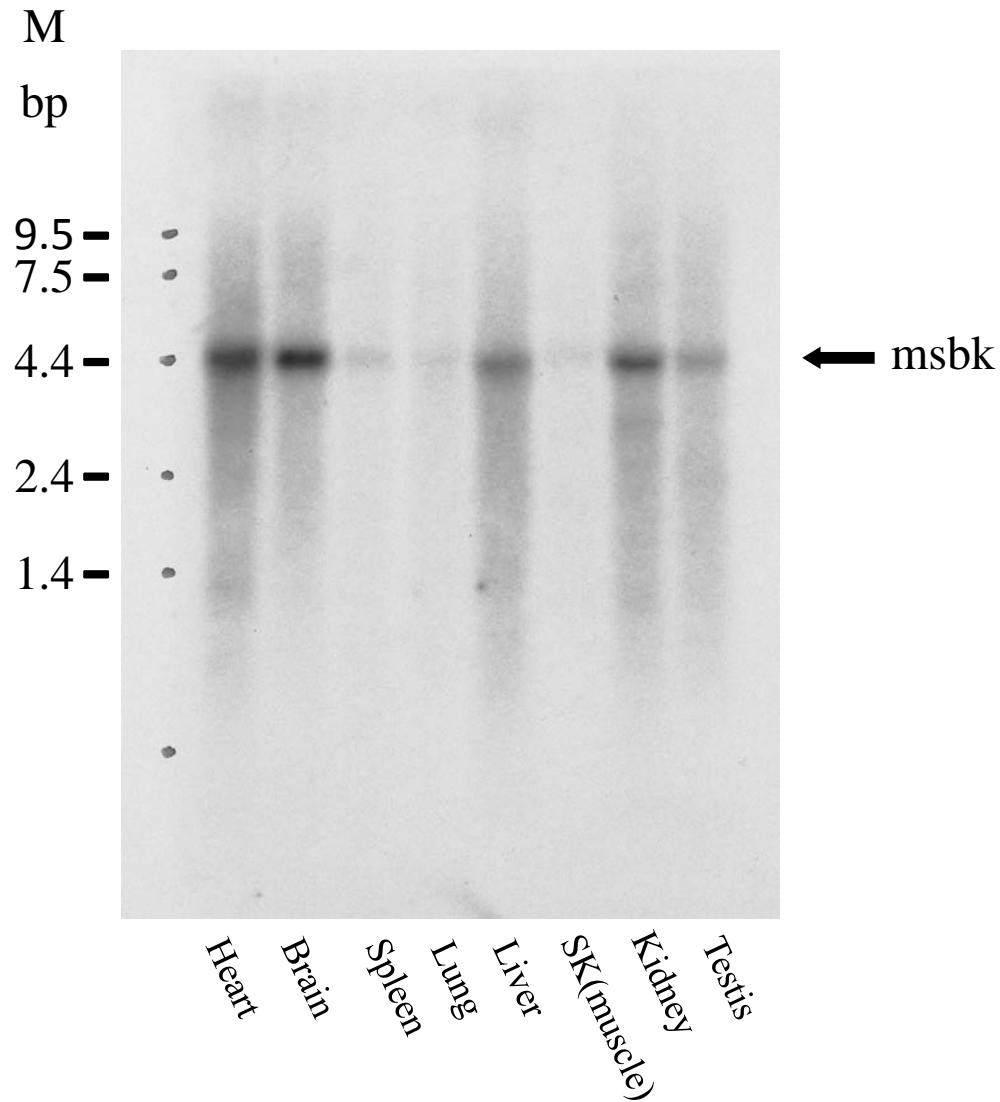


圖1. 老鼠 msbk 蛋白激酶在不同組織表現之分析

利用北方墨點法分析老鼠 msbk 蛋白激酶心臟、腦、脾臟、肺、肝臟、骨骼肌、腎臟和睪丸等不同組織表現的情形，由圖可知老鼠 msbk 在心臟、腦部及腎臟等組織有明顯的表現。箭頭所指為老鼠 msbk mRNA 表現位置。M: RNA marker

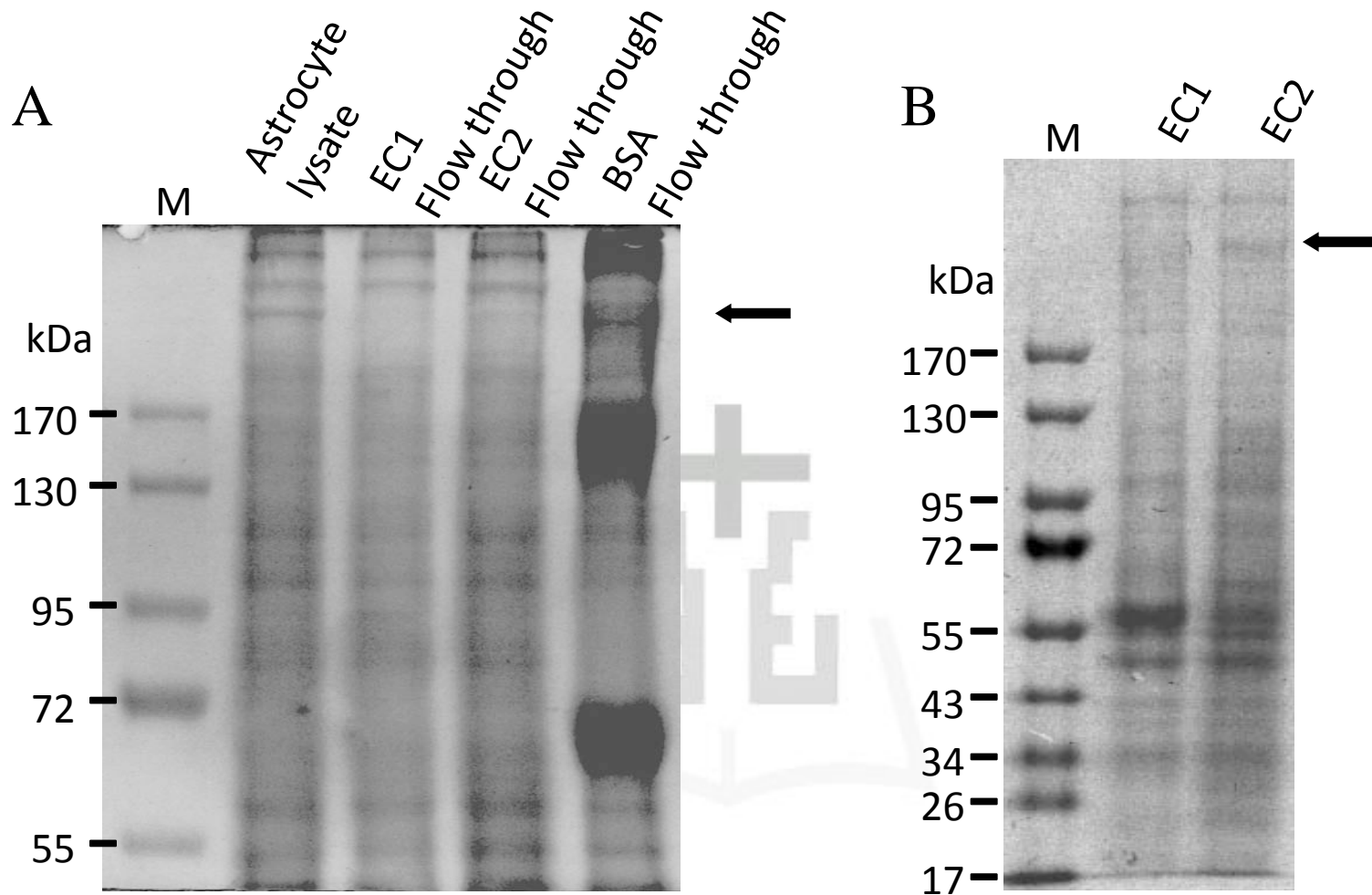


圖2 . 與老鼠 mSBK 交互反應蛋白之分析

(Coomassie Blue G-250)

利用 pull-down 的實驗方法，分別將表達的 EC1 和 EC2 兩區域蛋白質鍵結在 Ni-NTA 管柱，以星狀細胞 (astrocytes) 萃取液進行分析 (A) 將星狀細胞萃取液分別通過鍵結 EC1、EC2 和 BSA 的純化管柱，將流過管柱 (flow through) 的樣品和 (B) 將通過星狀細胞萃取液，結合在 EC1 及 EC2 管柱中的蛋白沖洗出，經 SDS-PAGE 電泳後利用 Coomassie Blue G-250 進行蛋白質染色。箭頭所指為可能與 EC1 和 EC2 結合的蛋白質，M: 蛋白質分子大小 marker。

## Mascot Search Results

MS data file : 971008IGD2.pkl

Database : NCBI nr 20090613 (9069431 sequences; 3106408609 residues)

Taxonomy : Mus musculus (house mouse) (143106 sequences)

Timestamp : 15 Jun 2009 at 04:23:38 GMT

Protein hits : [gi|17978023](#) nonmuscle heavy chain myosin II-A [Mus musculus]  
[gi|33598964](#) myosin heavy chain 10, non-muscle [Mus musculus]  
[gi|7305295](#) myosin, heavy polypeptide 11, smooth muscle [Mus musculus]  
[gi|29336026](#) myosin, heavy polypeptide 14 [Mus musculus]  
[gi|6978545](#) Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> -ATPase alpha 2 subunit [Rattus norvegicus]  
[gi|56104633](#) Dock7 protein [Mus musculus]  
[gi|6755698](#) surfeit gene 4 [Mus musculus]  
[gi|148670518](#) talin 1, isoform CRA\_a [Mus musculus]  
[gi|26006199](#) mKIAA0678 protein [Mus musculus]  
[gi|52139023](#) Gcn111 protein [Mus musculus]  
[gi|26006117](#) mKIAA0219 protein [Mus musculus]

## Probability Based Mowse Score

Ions score is  $-10 \cdot \log(P)$ , where P is the probability that the observed match is a random event.

Individual ions scores  $> 37$  indicate identity or extensive homology ( $p < 0.05$ ).

Protein scores are derived from ions scores as a non-probabilistic basis for ranking protein hits.

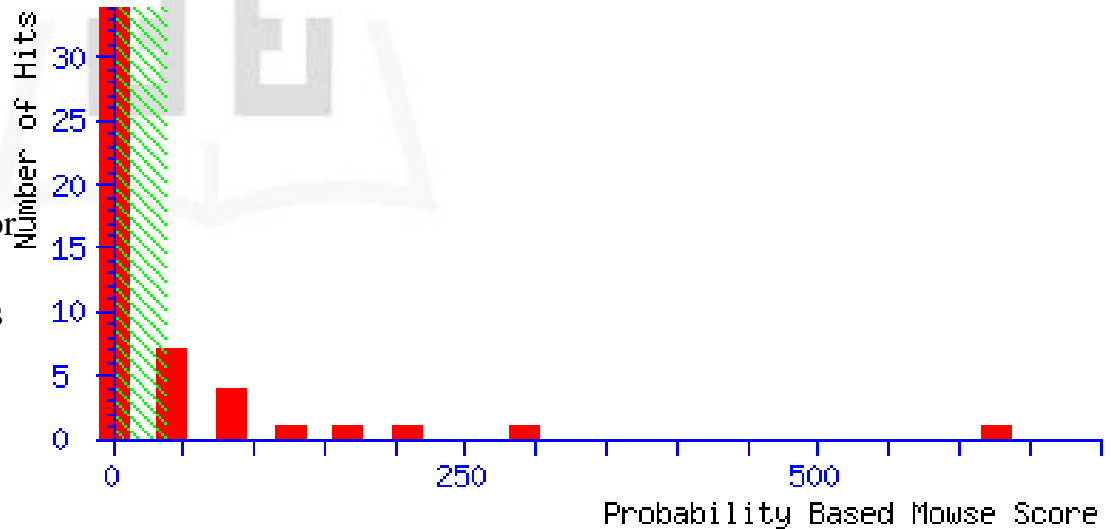


圖3 . 與老鼠 mSBK 交互反應的未知蛋白質質譜儀分析之結果

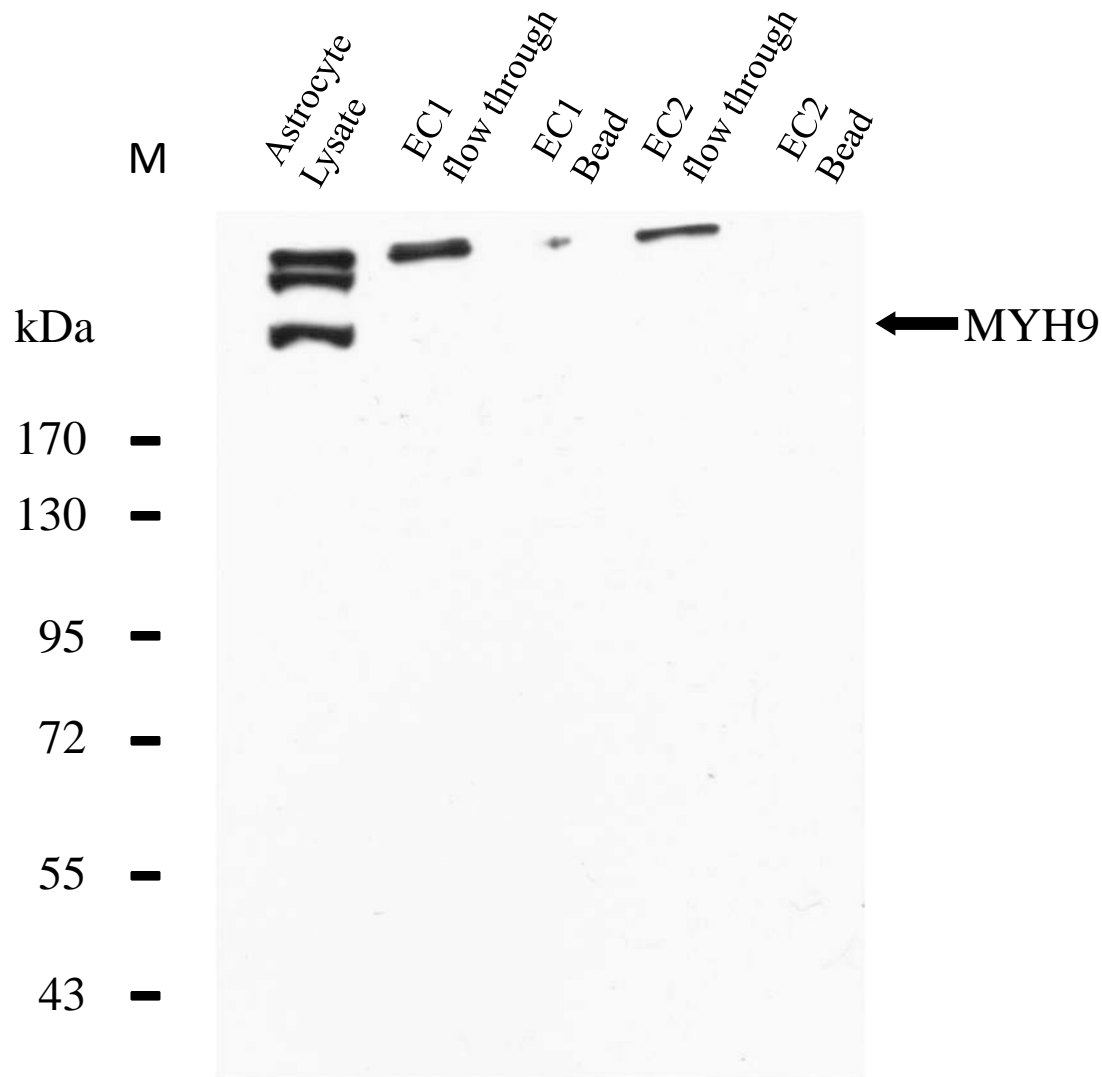


圖4 利用西方墨點法確認 mSBK 結合蛋白為 MYH9。

以西方墨點法利用 MYH9 之抗體對星狀細胞萃取液、EC1 及 EC2 flow through 和 Bead 沖洗蛋白進行西方墨點法分析，結果顯示，MYH9 的確是會與 mSBK 結合的蛋白質。箭頭所指為 MYH9 的位置。



## Astrocytes

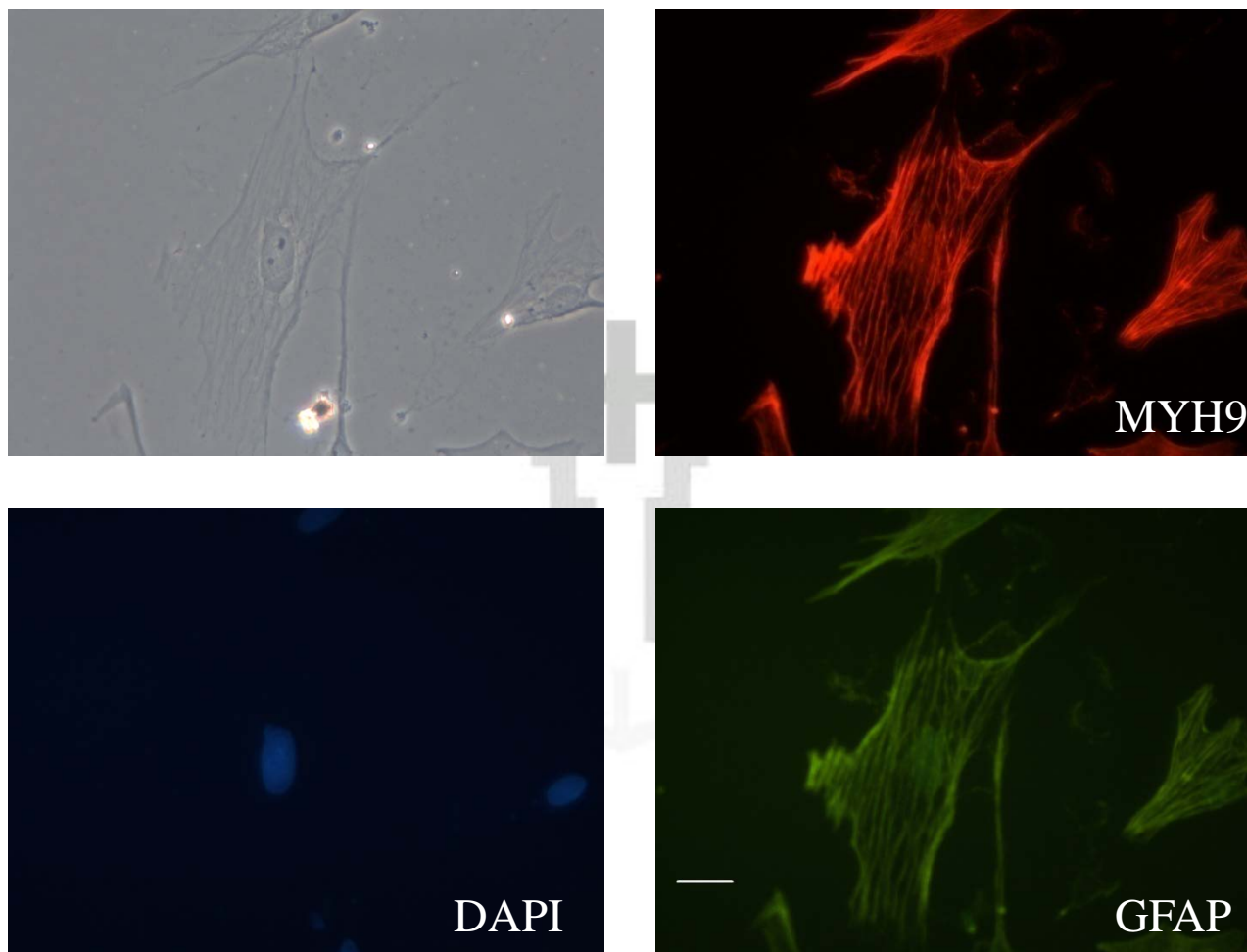


圖5. 星狀細胞免疫螢光染色分析

利用 MYH9 及 GFAP 之抗體對大腦皮質神經細胞進行免疫螢光染色，瞭解 MYH9 在神經細胞中分佈的情形 MYH9 (Cy3), GFAP (Cy2), DAPI 染細胞核。

Bar : 40  $\mu$ m

## Cortical neurons

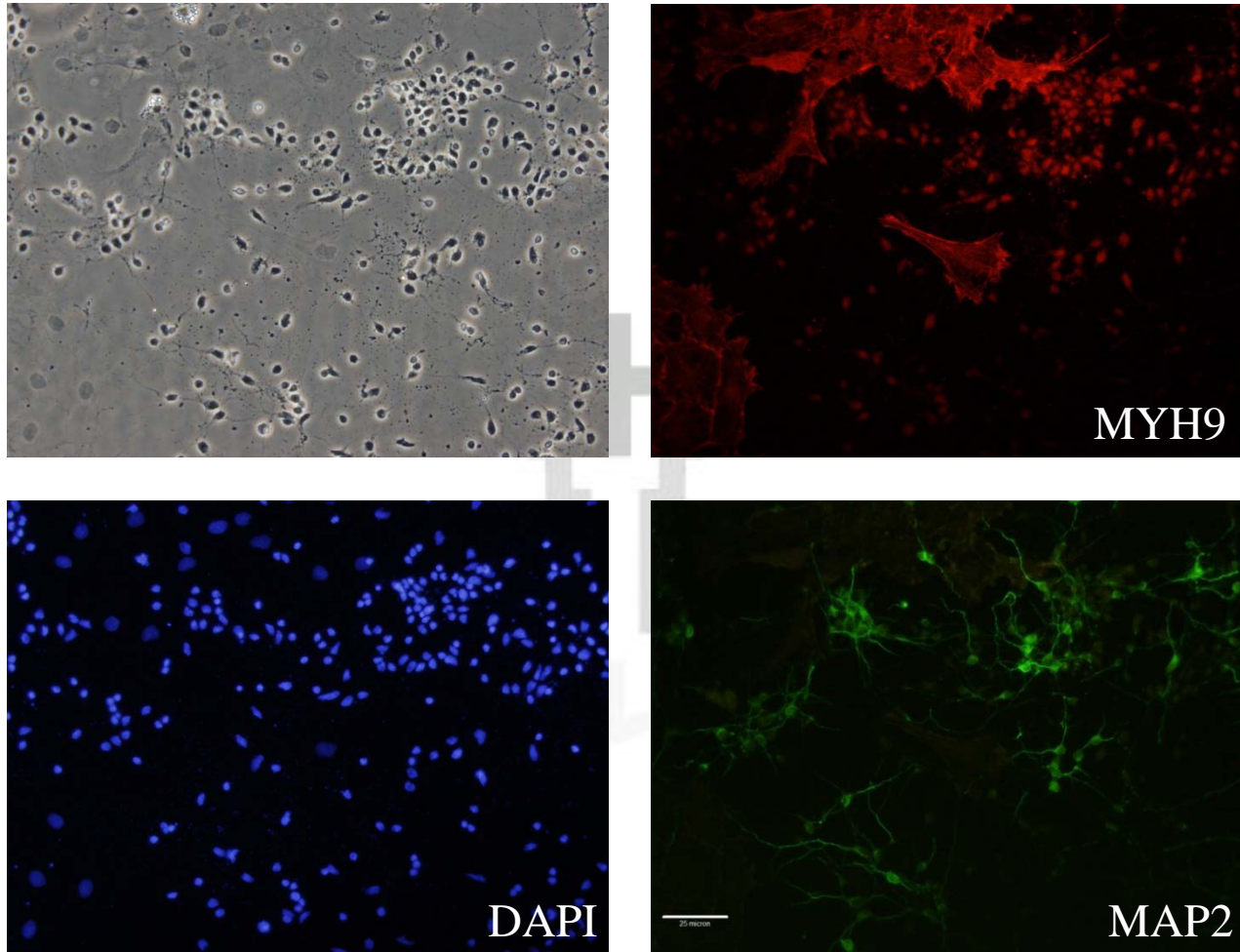


圖6. 大腦皮質神經細胞免疫螢光染色分析

利用 MYH9 及 MAP2 之抗體對大腦皮質神經細胞進行免疫螢光染色，瞭解 MYH9 在神經細胞中分佈的情形 MYH9 (Cy3), MAP2 (Cy2), DAPI 染細胞核。  
Bar : 25  $\mu$ m

## P19 neurons

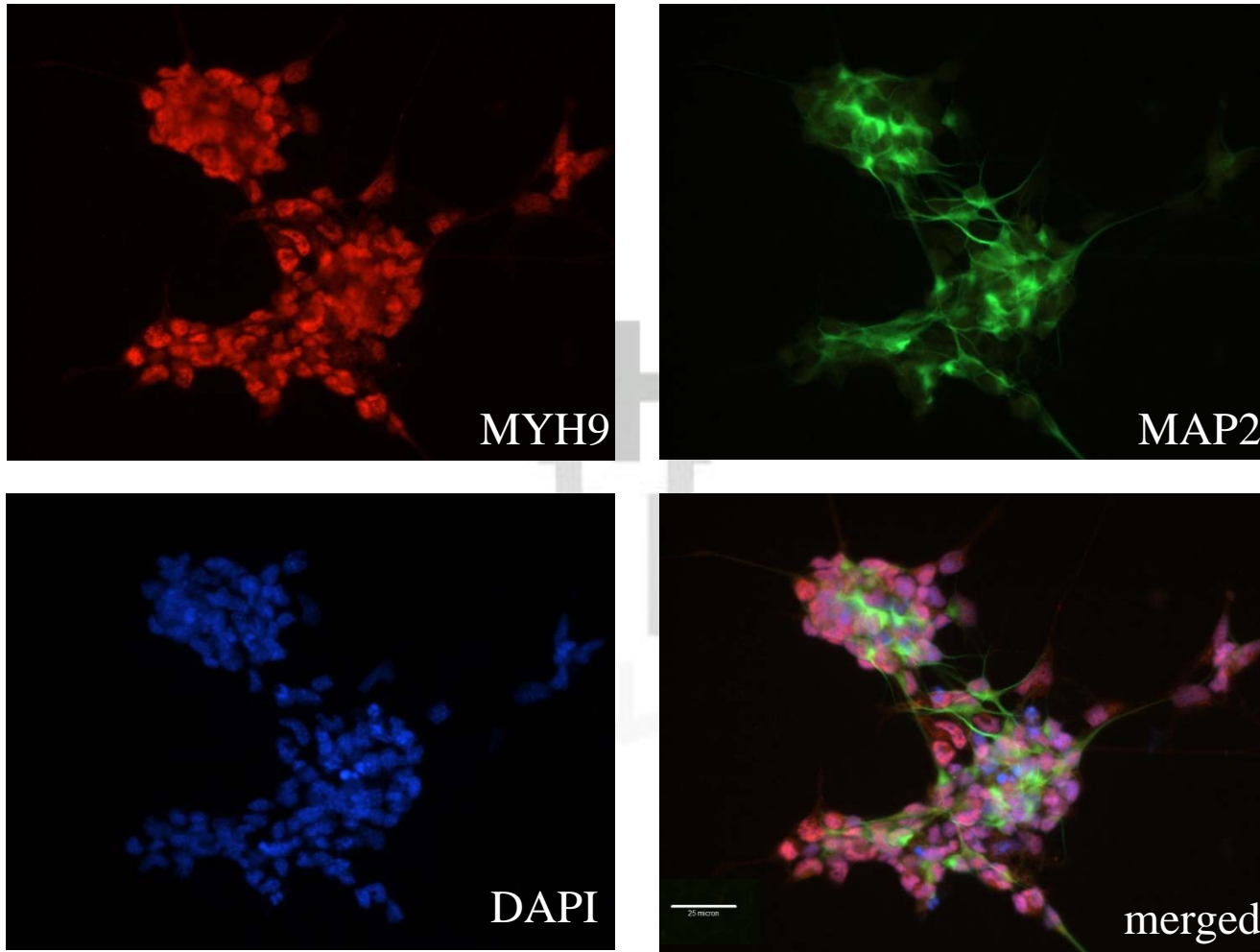


圖7. p19 神經細胞免疫螢光染色分析

利用 MYH9 及 MAP2 之抗體對 p19 神經細胞進行免疫螢光染色，瞭解 MYH9 在 p19 神經細胞中分佈的情形 MYH9 (Cy3), MAP2 (Cy2), DAPI 染細胞核。Bar: 25  $\mu$ m

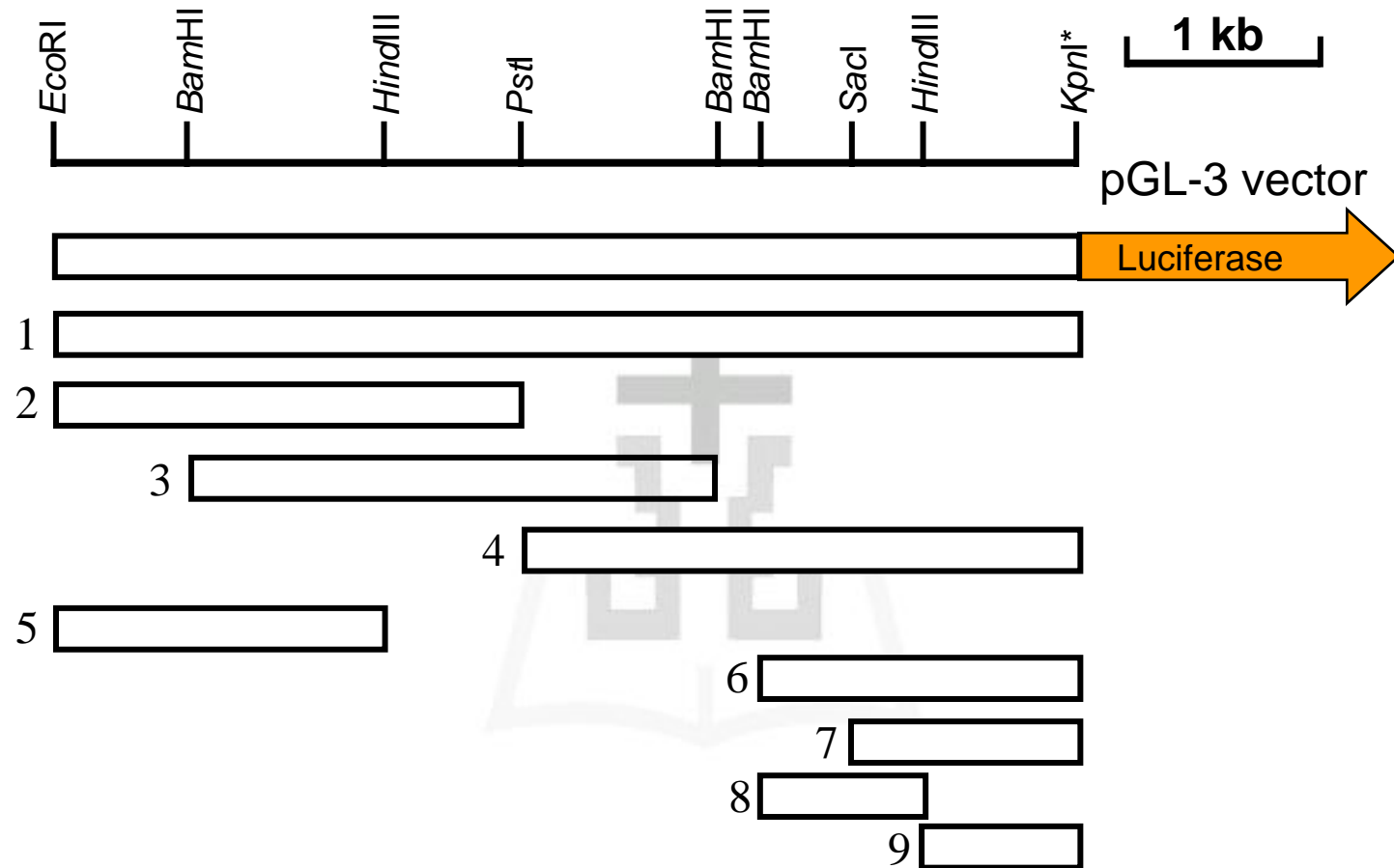


圖8 . Cnstruction of pGL3-mSBK promoter expression vector

利用不同限制酶切位構築不同長度的 mSBK promoter ，一共有九個不同的片段

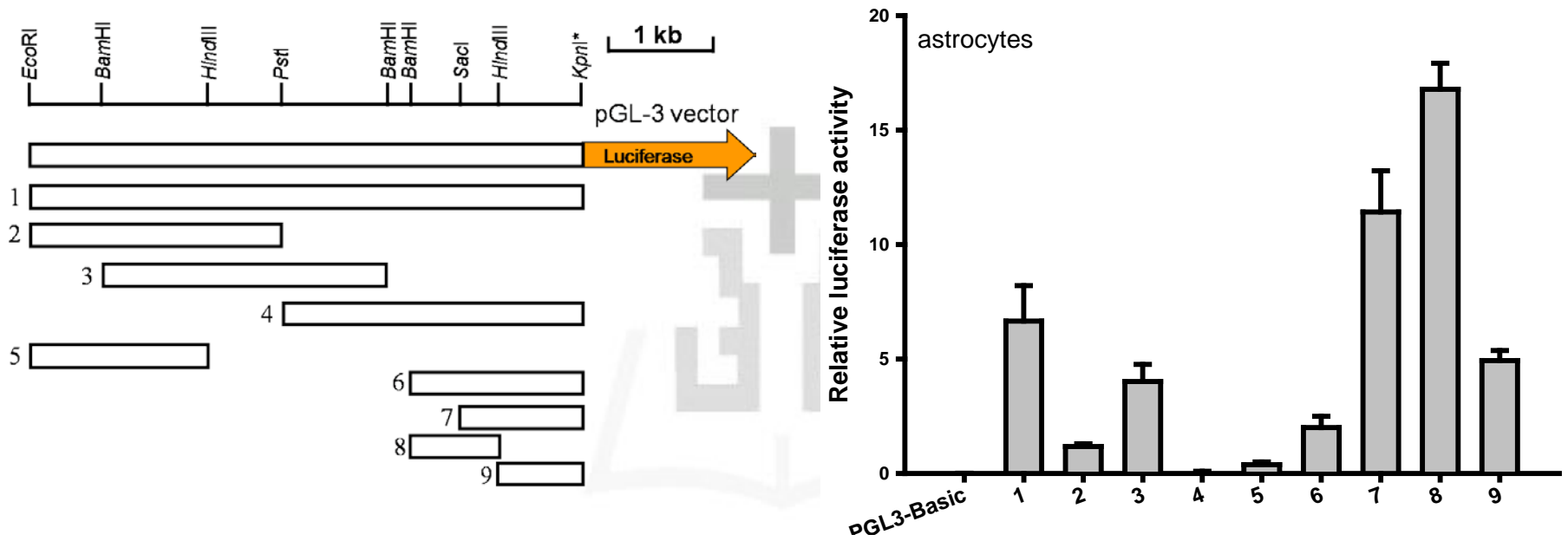


圖9 . Analysis of mSBK promoter activity in astrocytes

將不同長度片段的 mSBK promoter 轉染至星狀細胞中進行啟動子活性分析，結果如圖所示在片段七及片段八是具有較高的啟動子活性。

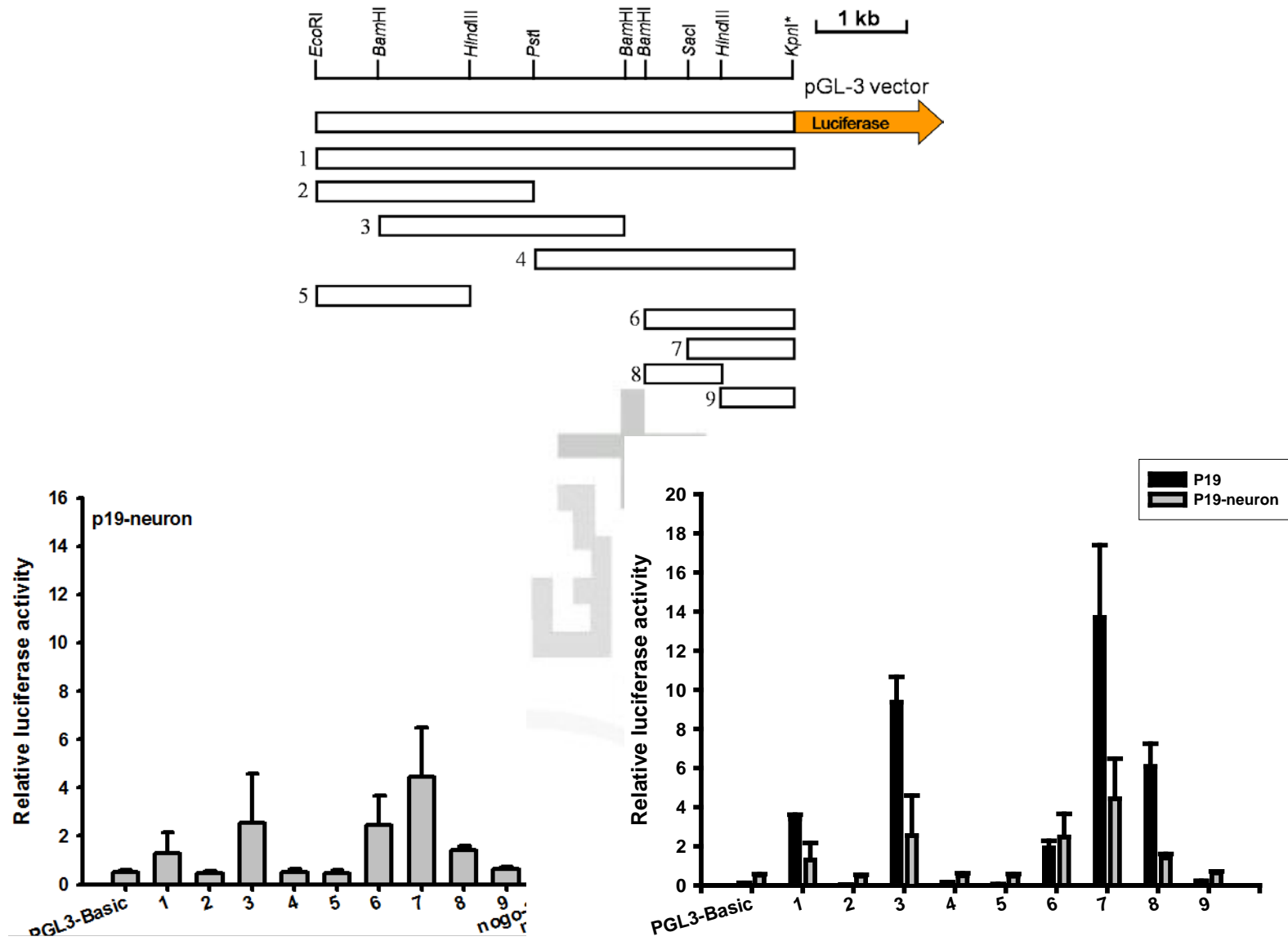


圖10 . Analysis of mSBK promoter activity in p19 cells

將不同長度的 mSBK promoter 片段轉染至 p19 細胞中進行啟動子活性分析，結果顯示，在片段七具有較高的啟動子活性。

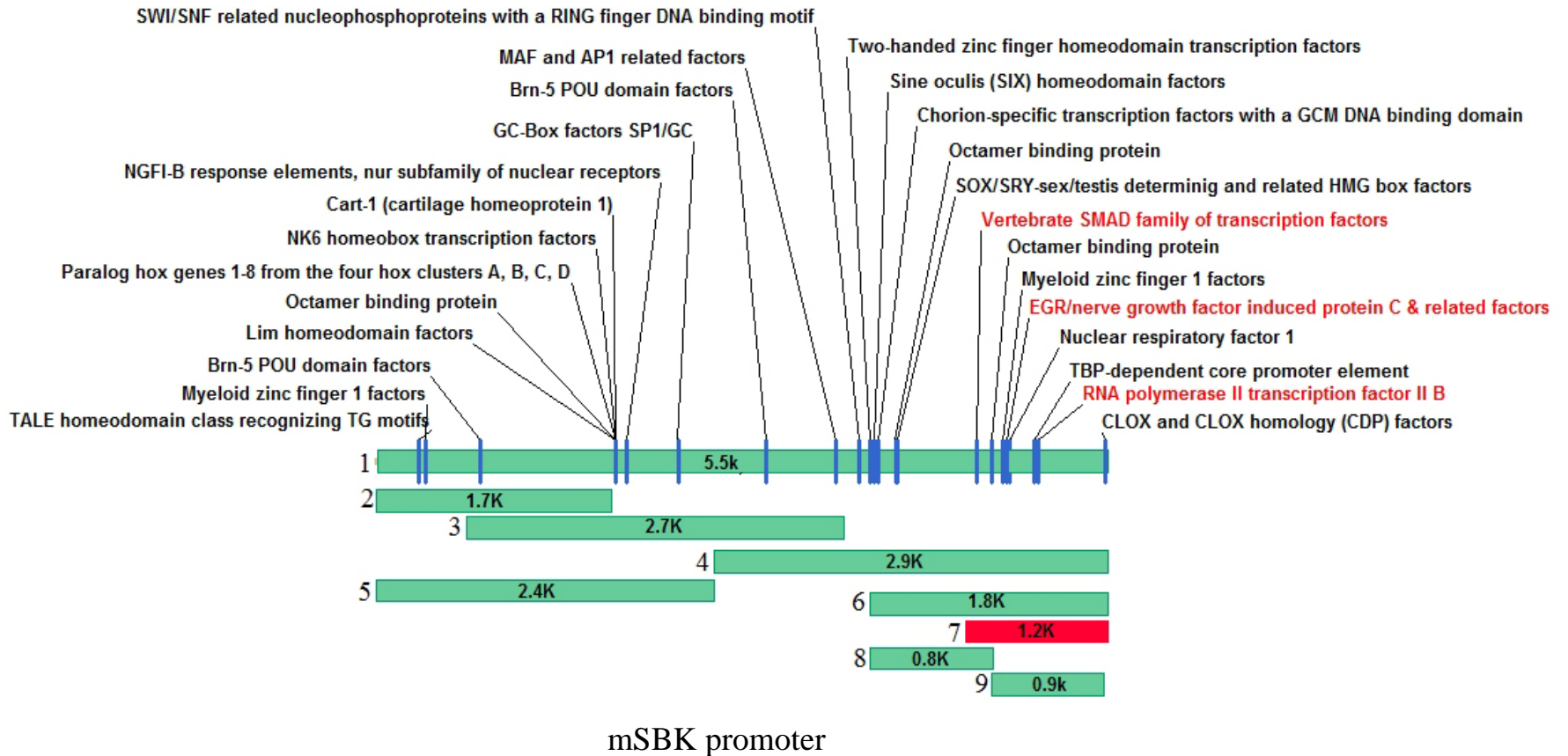
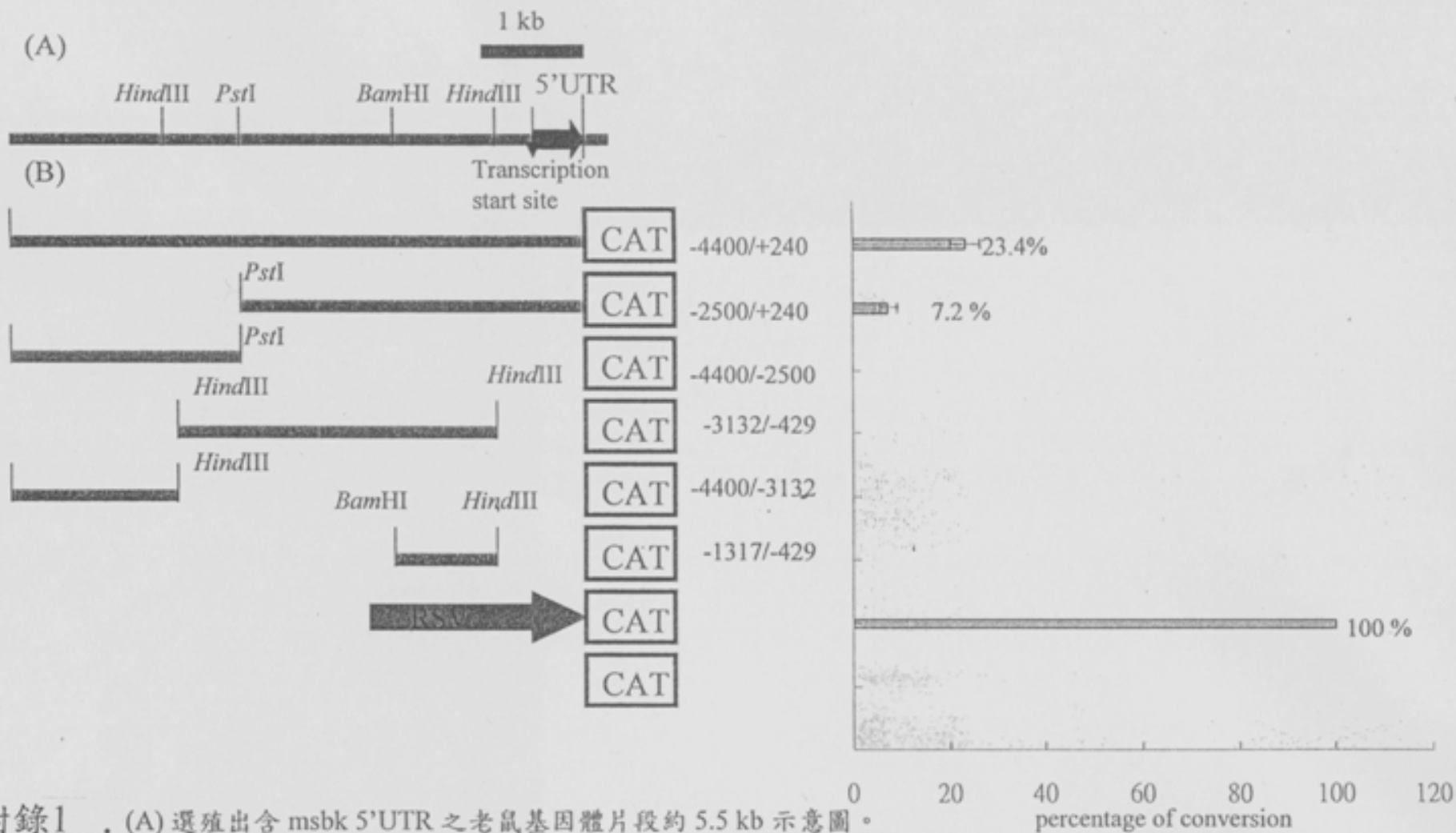


圖11 . 老鼠 mSBK promoter之預測分析

把老鼠 mSBK promoter 大約5kbs 的序列，經 Genomatix 網站的 Matinspector Database 來進行轉錄因子結合序列的預測分析。

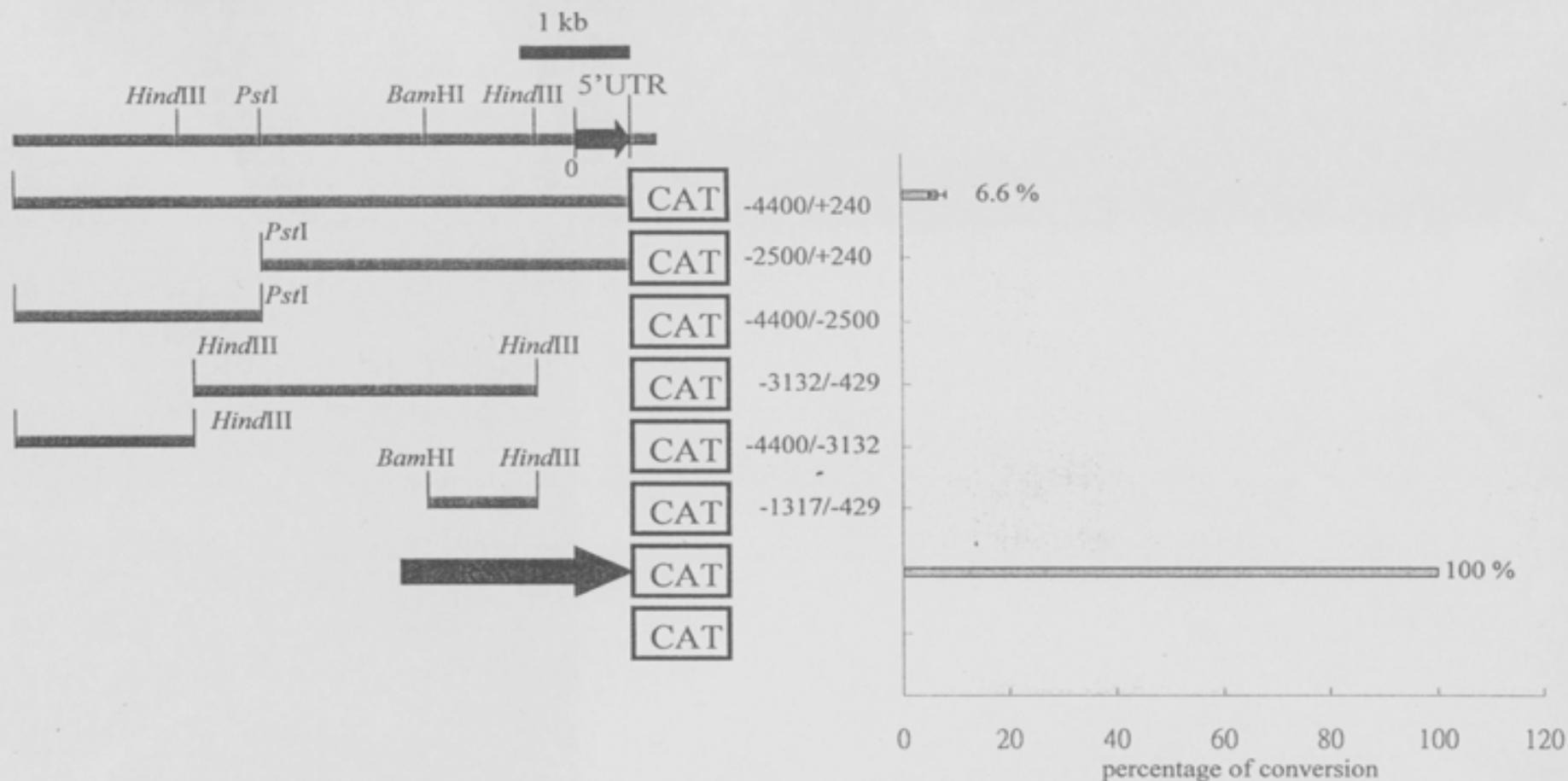


附錄1 . (A) 選殖出含 *msbk* 5'UTR 之老鼠基因體片段約 5.5 kb 示意圖。

(B) 在COS1 細胞中之 *msbk* 啟動子活性分析。

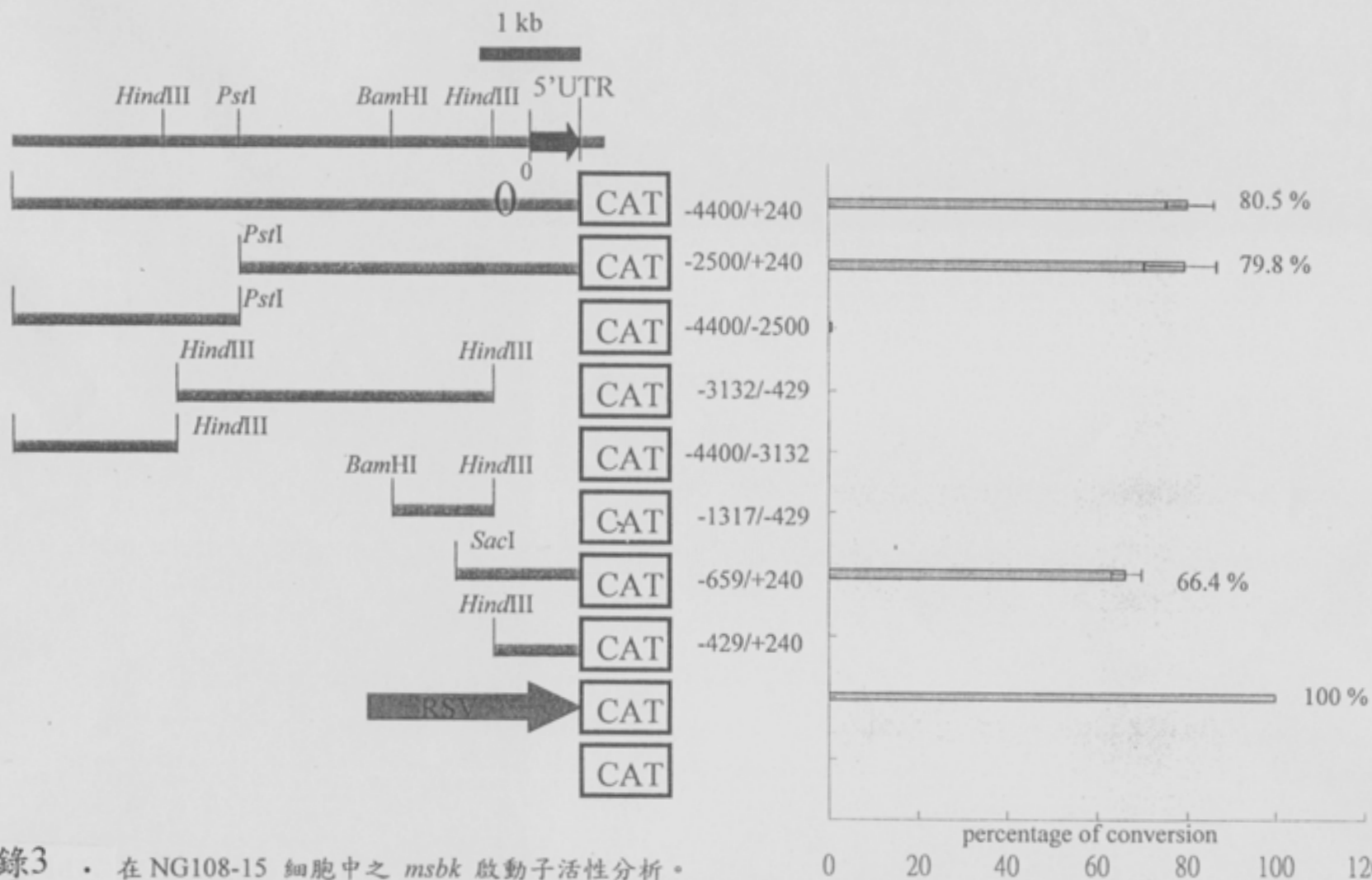
將在COS1 細胞進行 CAT assay 之放射顯影圖，以 phosphoimage 去進行定量，並以pRSV-CAT 為正控制組，對乙酰基之轉換率定為 100 %；pCAT-basic 為負控制組，對乙酰基之轉換率定為 0 %；得此乙酰基之轉換率相對圖。在-4400/+240，-2500/+240 這兩組具有啟動子活性。( n=2)





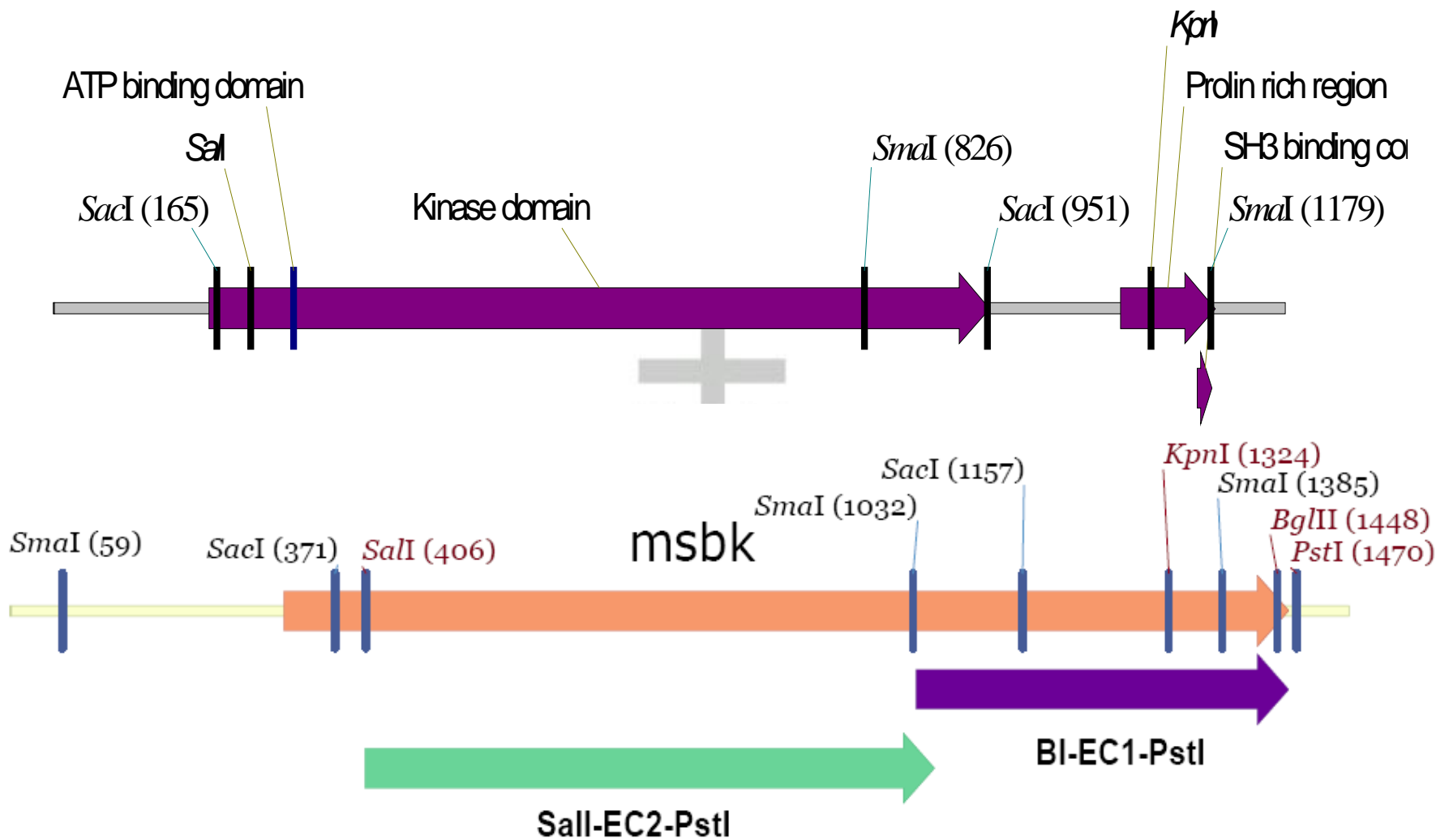
附錄2 . 在C6細胞中之 *msbk* 啟動子活性分析。

將在 C6 細胞進行 CAT assay 之放射顯影圖，以 phosphoimage 去進行定量，並以 pRSV-CAT 為正控制組，對乙酰基之轉換率定為 100 %；pCAT-basic 為負控制組，對乙酰基之轉換率定為 0 %；得此乙酰基之轉換率相對圖。只有 -4400/+240 此組具有啟動子活性。( n=2 )

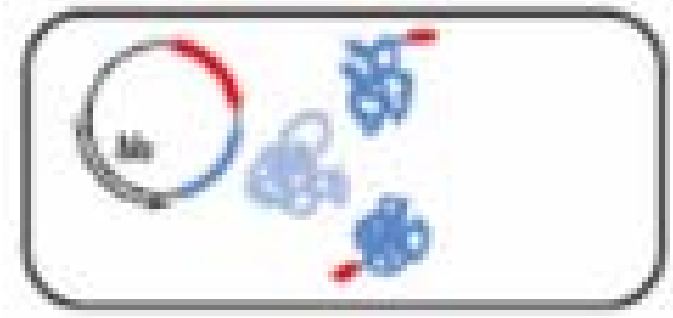
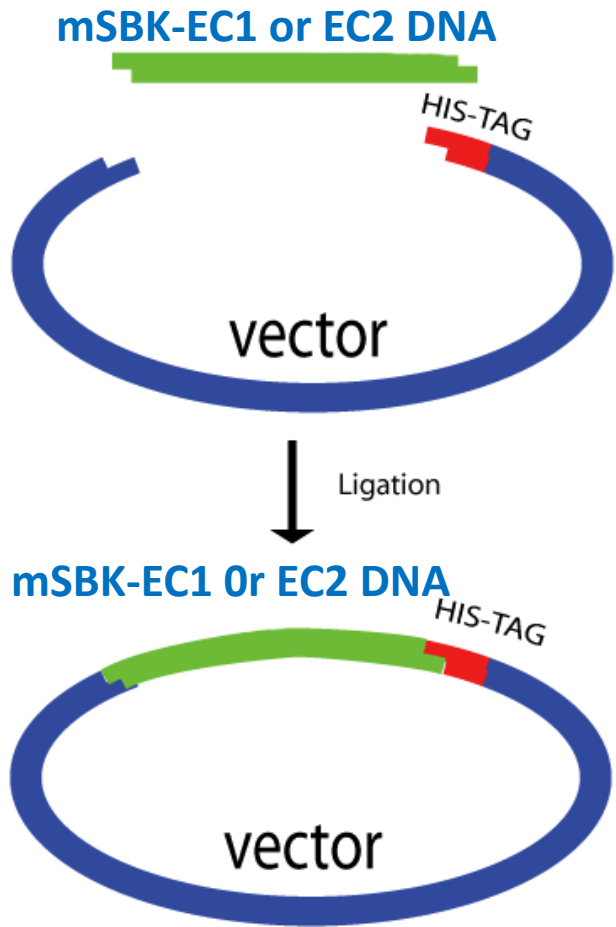


附錄3 . 在 NG108-15 細胞中之 *msbk* 啟動子活性分析。

將在 NG108-15 細胞進行 CAT assay 之放射顯影圖，以 phosphoimage 去進行定量，並以 pRSV-CAT 為正控制組，對乙酰基之轉換率定為 100 %；pCAT-basic 為負控制組，對乙酰基之轉換率定為 0 %；得此乙酰基之轉換率相對圖。在 -4400/+240，-2500/+240，-659/+240 這三組具有啟動子活性。(n=3)

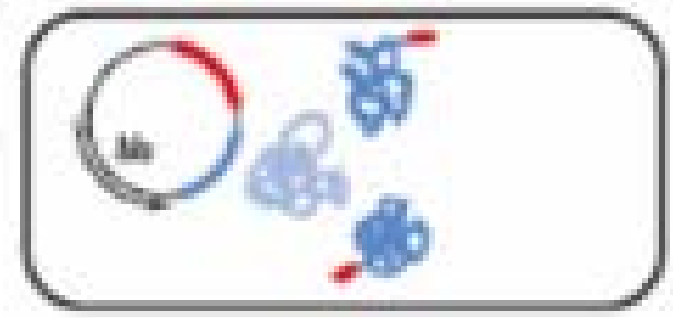


附錄4 . mSBK-EC1 and EC2 蛋白片段相關位置。



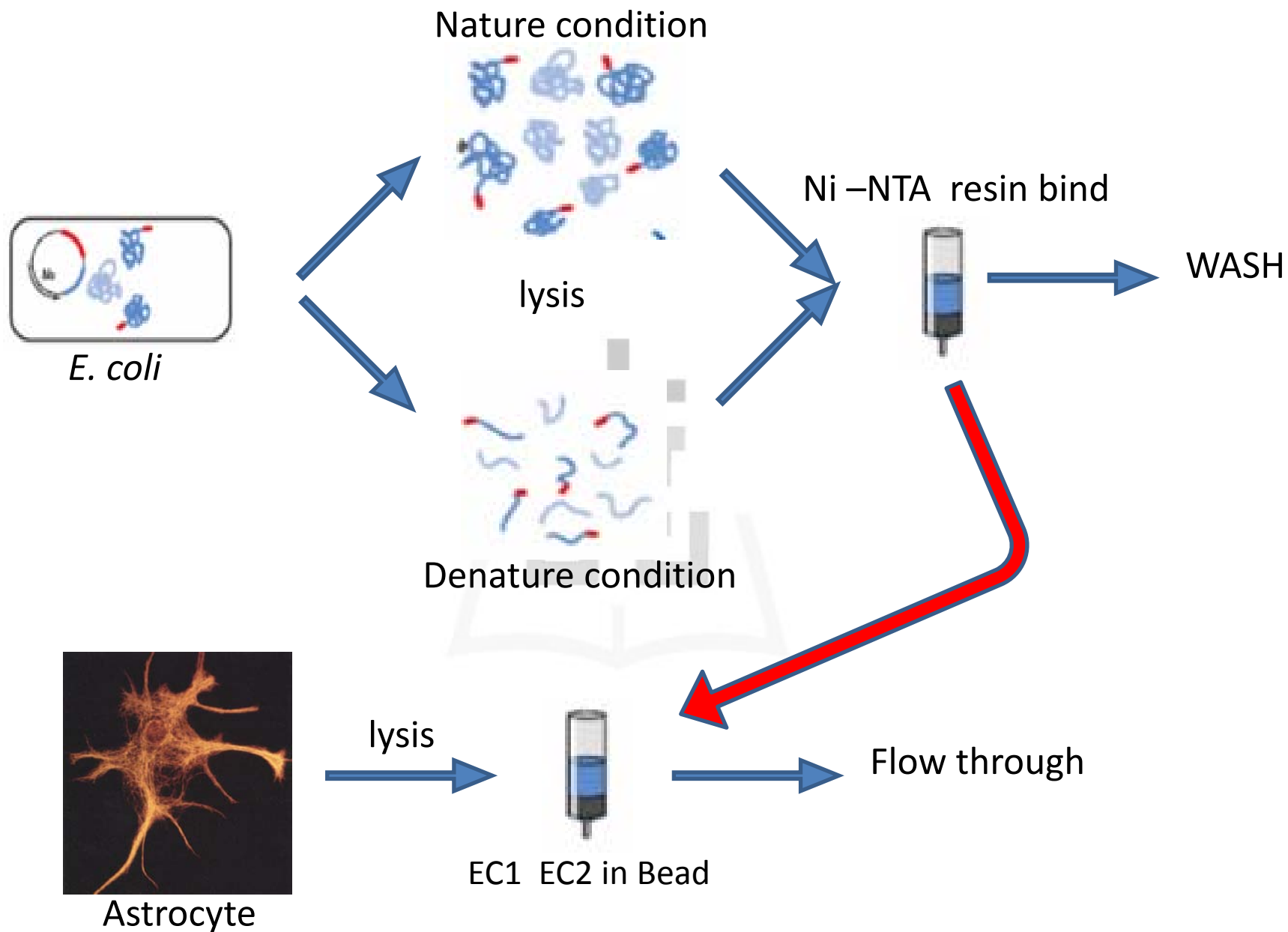
*E. coli*

LB + IPTG

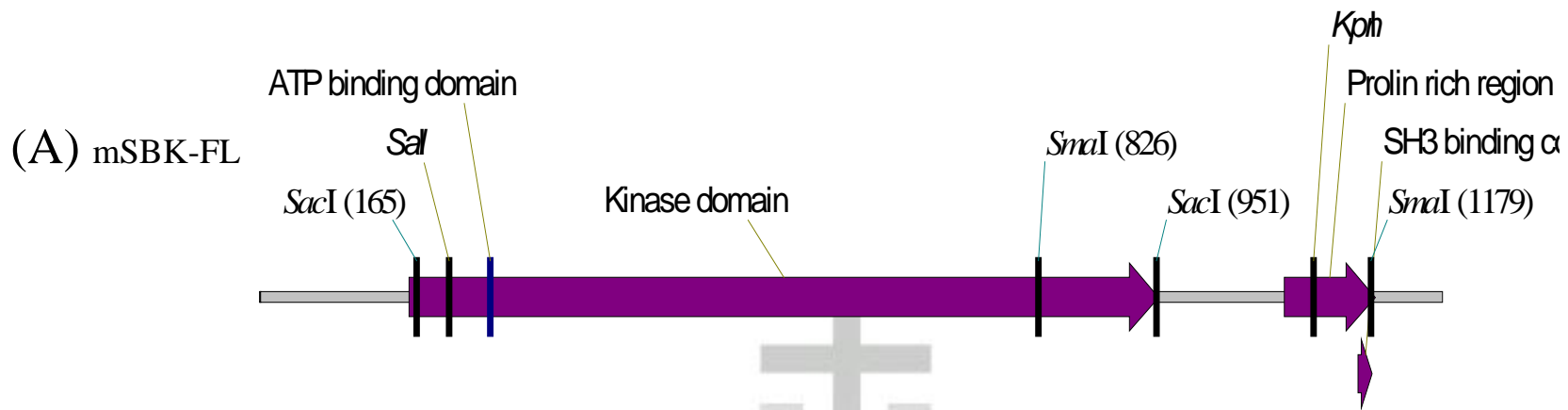


*E. coli*

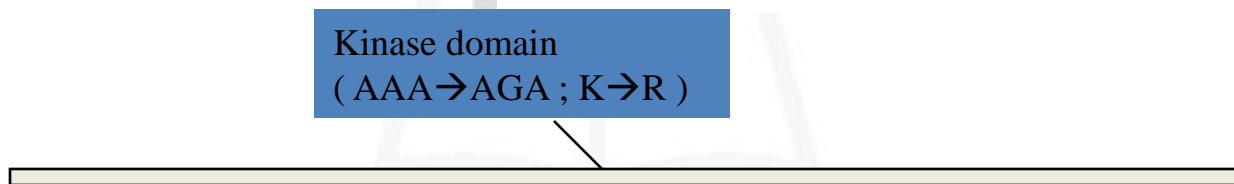
附錄5 . 表現 mSBK-EC1 and EC2 蛋白片段。



附錄6 . 利用 mSBK-EC1 and EC2 蛋白片段進行 Pull-down assay。



(B) mSBK-KR



(C) mSBK-D



附錄7 . 不同mSBK之 isoform 。