

2020 年臺灣國際科學展覽會 優勝作品專輯

作品編號 090025

參展科別 醫學與健康科學

作品名稱 探討 Naa10p 突變對神經發育的影響

得獎獎項 大會獎：四等獎

就讀學校 臺北市立第一女子高級中學

指導教師 阮麗蓉、吳雅嵐

作者姓名 蘇蓁葳、何柔葳

關鍵詞 Naa10p、神經分化、CRISPR

作者簡介



我們是蘇綦葳和何柔葳，目前都是北一女中的高三學生。我們都有廣泛興趣以及為之付出的熱忱，也喜歡在實驗室裡做實驗、解決及探索的過程。雖然過程並不是一路順遂，但在這一路上的學習和經驗，對我們來說都是寶貴的機會，也是之後前進的基石。一路上受了實驗室學長姐們和指導老師們許多照顧，真的很感激你們的陪伴和教導。

摘要

Naa10p (N-alpha-acetyltransferase 10 protein) 突變患者多半有智力障礙的問題，如：奧格登症候群患者常有早夭、腦萎縮及其他發育問題。Naa10p 是一種 N- α -乙醯轉移酶，負責新生肽鏈 N- α -乙醯化。人體中約有 80% 的蛋白質經乙醯化修飾，其中 46% 為 NatA 複合體執行，而 Naa10p 即是 NatA 中執行乙醯化的蛋白酶。先前研究顯示 Naa10p 會影響神經發育，但對 Naa10p 影響神經發育的機制並不清楚。本研究利用 CRISPR/Cas9 製作 Naa10p 的小鼠胚胎幹細胞(mESC)突變株，觀察突變株細胞分裂速率與分化型態的差異，並分析胚胎發育過程 Naa10p 以及相關基因的表現。

本研究結果證明特定 Naa10p 突變會加快 mESC 生長，使其分化為神經母細胞的異常。而其中 V111G 突變株的 Naa10p 無法和 HYPK 結合，且突變 S37P 及 R116W 使 Naa10p 與 Naa15p 的結合降低，推論此結果可能造成 NatA 無法正常形成，並改變其與核糖體蛋白的親和力，影響蛋白質乙醯化。目前我們發現突變株中，與細胞分化相關的基因:Oct4、Pax6 皆表現異常。以上結果可能可以初步解釋 Naa10p 突變造成人類疾病的機制。

Abstract

Most of the patients with Naa10p (N-alpha-acetyltransferase 10 protein) mutations have mental retardation problems. For instance, Ogden syndrome leads babies to early death, cerebral atrophy and other developmental problems. Naa10p, one of the catalytic subunits of N-acetyltransferase A complex (NatA complex), is in charge of the execution of N- α -acetylation on peptide chain. About 80% of protein in human body needs N- α -acetylated modified, and NatA complex is responsible for acetylating 46% of the protein in them. Previous studies have shown that Naa10p affects neuronal development. However, the mechanism by which Naa10p affects neurodevelopment is still unclear.

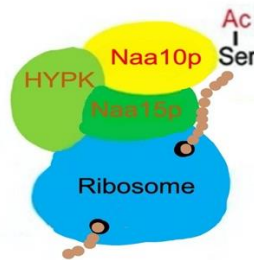
In this study, we use CRISPR/Cas9 to make Naa10p mouse embryonic stem cell mutants, and observe the cell division rate and differentiation pattern of mutant cells.

Our study shows peculiar types of mutations speed up embryonic stem cell growth, and cause abnormality when embryonic stem cells are differentiated to neural stem cells. Besides, Naa10p mutations affect the combination of NatA complex, and change its affinity with ribosomal protein that may also affect the expression of growth genes and neural development genes (Oct4, Pax6) in embryonic stem cells. These results may be a preliminary explanation of the mechanism by which the Naa10p mutation causes human disease.

壹、 研究動機與背景

一、 研究動機與背景

在不改變 DNA 序列的前提下，通過某些機制引起可遺傳的基因表達或細胞表現型的變化，稱之為表觀遺傳(epigenetics)。表觀遺傳主要透過甲基化、乙醯化等方式加工在 DNA 或蛋白質上，和癌症、細胞分化、腦部疾病等問題有著極大的關聯。N 末端乙醯化是一種表觀遺傳修飾手法，其可作為共轉譯修飾(Co-translational modification)或轉譯後修飾 (Post-translational modification)的一種加工方法。共轉譯修飾指的是轉譯時，多肽鏈從核糖體釋放之前，改變多肽鏈中一個或多個胺基酸修飾的過程。真核生物中約有 80% 的蛋白質經過乙醯化這項加工，並且有 38%是由 NatA 複合體負責(N-terminal acetyltransferase complex A)(Drazic A, Myklebust LM, Ree R, &Arnesen T. 2016)。



圖一、 NatA 複合體和核糖體結合示意圖 (Aksnes H, 2016)

NatA 複合體(圖一)共包含了三個次單元(subunit)：Naa10p(N-alpha-acetyltransferase 10 protein)、Naa15p、HYPK(huntingtin interacting protein K)。NatA 複合體能夠與核糖體的大次單元結合，其中，Naa10p 執行目標蛋白質的乙醯化加工，能夠在新生多肽鏈的絲胺酸 (serine)、丙胺酸 (alanine)、酪胺酸 (threonine)、半胱胺酸 (cysteine) 或纈胺酸 (valine) 末端接上乙醯基；Naa15p 以環狀的方式包圍 Naa10p，改變 Naa10p 催化位點的構型，使多肽鏈進入相關催化位置，並作為最主要的核糖體錨定次單元；HYPK 能夠抑制 Naa10p 的催化活性，也有人推測 HYPK 會在 NatA 與核糖體互動時發揮功能；Naa50p 目前已知不影響 Naa10p 活性，但能夠穩定 NatA 與核糖體結合時的結構。Naa10p 和 Naa15p 在真核生物之中保守演化，而 HYPK 只有在高等動物才會出現在 NatA 複合體

中。目前 NatA 各個次單元的功能尚未完全釐清，但數個 NatA 次單元被發現在癌症之中過度表現，也和神經發育與人類疾病有密切關聯。

而在人體 Naa10p 變異的病例之中，普遍都有智力障礙、發育遲緩等問題(Myklebust LM, Støve SI, & Arnesen T, 2015)。目前臨床發現的 Naa10p 突變有以下幾種：

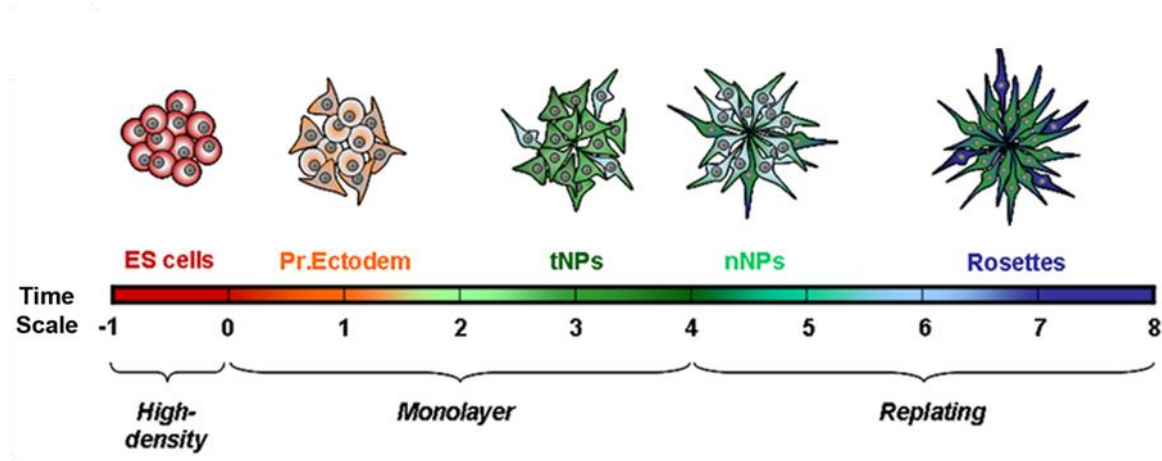
簡稱	臨床症狀	參考資料
S37P	嬰兒時期死亡、肌張力低下、發育遲緩、皮膚鬆弛、畸形、腦萎縮與發育不全	Myklebust LM, 2015
T43S	智力障礙、面部畸形、脊柱側凸	Casey JP, 2015
I72T	肥厚性心肌病、發育遲緩、智能障礙	Svein Isungset Støve, 2018
R83C	中度到嚴重的智力及發育障礙、海馬迴發育不全	Sidhu M, 2017
V107F	嚴重的發育障礙，身材矮小、小頭畸形	Popp B, 2015
V111G	中度智力障礙、語言發育遲緩	McTiernan N, 2018
R116W	嚴重發育遲緩、行為異常、骨骼異常、嚴重智力殘疾	Popp B, 2015
F128I	智力及發育障礙、餵養困難、出生後小頭畸形	Saunier C, 2016
F128L	嚴重的發育障礙、餵養困難、嬰兒時期腦室擴大	Saunier C, 2016

表(一)、Naa10p 突變整理

在上述的 Naa10p 變異病例中，最為嚴重是 Naa10p S37P 突變。這是 Naa10p 突變中第一個發現的病例，在猶他州的奧格登被確定，因此這種突變暫時被命名為奧格登症候群(Ogden Syndrome)。這是一種 N- α -乙醯轉移酶缺陷症 (N-terminal alpha acetyltransferase deficiency, NATD)，也是與 X 染色體突變相關的遺傳性疾病，因此得病的幾乎都是男生。症狀包含老化的外觀、發育遲緩以及智能障礙，且患者皆無法活過一歲半。其他 Naa10p 變異的病例症狀雖不盡相同，卻皆有智能障礙及發育遲緩的問題。

目前研究表明，Naa10p 會在胚胎發育期間以及成熟後的大腦大量表現。為了找出 Naa10p 在神經發育過程扮演的角色，必須先釐清 NatA 複合體與神經形成 (Neurogenesis) 之間的關聯。在胚胎幹細胞分化成神經期間，會經歷階段性的轉變(圖

二)。



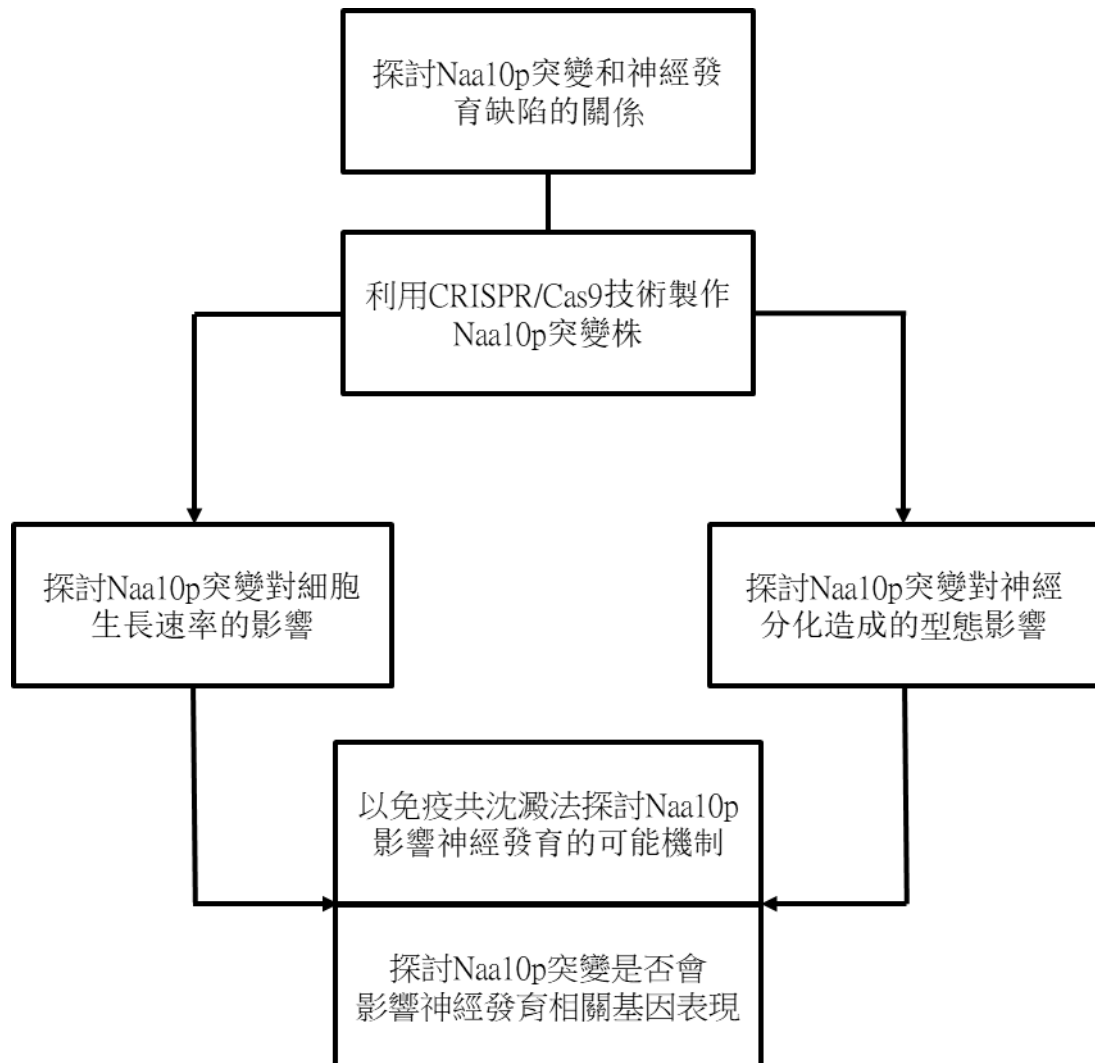
圖二、神經分化的過程 (Abranches E, 2009)

胚胎幹細胞首先攤平，成為類似外胚層的細胞群，再漸漸轉換為神經上皮細胞 (neuroepithelial progenitors cell)，神經上皮細胞會形成蓮花狀的結構，它被稱作神經花環 (Rosettes)。神經上皮細胞會集中在神經花環的中心區域附近，同時不斷進行細胞分裂，外圍則是新生的神經母細胞 (Neural progenitors)，不過神經花環的神經原性潛力會隨著時間的推移而降低。神經母細胞能繼續分化成放射狀膠質細胞 (Radial glial cell)，負責形成大腦之中的所有神經元。

而在神經發育的過程中，Naa10p 表現量降低會造成樹突長度降低 42%(Noriaki Ohkawa,2008)；HYPK 表現量上升被發現和摺疊的變性蛋白質增加相關，而 HYPK 表現量下降，與進入細胞週期 S 期的細胞數量減少相關(Claude Beaudoin,2012)；Naa15p 則和智力障礙在數據統計上有顯著相關(Holly A. F. Stessman,2017)(Hanyin Cheng,2018)。同時，蛋白質乙醯化也是生物發育及神經元發育的重要反應，例如細胞中穩定微管的形成，主要和 α -微管蛋白乙醯化加工相關(Noriaki Ohkawa,2008)。

然而至今為止，Naa10p 影響神經發育的作用途徑仍然不清楚，因此本實驗希望能藉由比較不同 Naa10p 突變株在神經發育過程之間的差異，找出 Naa10p 在神經發育過程扮演的角色，進而釐清 Naa10p 如何影響智力及神經系統的發育。

二、問題架構圖



圖三、問題架構圖

貳、研究目的

- 一、利用 CRISPR/Cas9 技術做出 Naa10p 突變株
- 二、探討 Naa10p 突變對細胞生長速率產生的影響
- 三、探討 Naa10p 突變對神經分化型態的影響
- 四、以免疫共沈澱法探討 Naa10p 影響神經發育的可能機制
- 五、探討 Naa10p 突變是否會影響神經發育相關基因表現

參、 研究設備與材料

一、細胞培養

(一) 細胞株

本研究採用的細胞株為小鼠胚胎幹細胞 (mouse embryonic stem cell, mES cell)，是從已發育 3.5 天的小鼠囊胚的內細胞團取出 (由實驗室提供)，mES cell 屬於貼附型細胞，培養於 ES 培養液中。

在質體切割效率實驗中選用 HT22 細胞株，HT22 為老鼠的海馬迴細胞，轉染效果較 mES cell 佳，因此選用此細胞當作實驗對象。

(二) 培養液

DMEM (ThermoFisher)、N2、Neurobasal medium、B27、Leukemia Inhibitory Factor、分化抑制劑 (CHIR99021、PD0325901)

(三) 其他

Trypsin ETBA、PBS、Coating gelatin (in PBS)

二、CRISPR/Cas9 系統的建構

(一) 質體:PX458

(二) HDR (Homology-directed repair) DNA 序列

1.V111A HDR：

```
CGGCGCCTTGGCCTGGCTCAGAAGCTGATGGACCAGGCCTCTCGAGCCATG
ATAGAGAACTTCAATGCCAAATACGTCTCCCTGCATGCCAGAAAGAGGTGGA
AGCCAAGTTGGGGGAAAGGGCAATGCTGGGAAGTGGGGAGGAAGGGGTAC
CCGATTG
```

2.V111G HDR:

```
CAGAAGCTGATGGACCAGGCCTCTCGAGCCATGATAGAGAACTTCAATGCCA
AATACGTCTCCCTGCATGGCAGAAAGAGGTGGAAGCCAAGTTGGGGGAAAG
GGCAATGCTGGGAAGTGGGGAGGAAGGGGTACCCGATTGATA
```

3.I72T HDR：

```
TGGCACCCATGCCAGGCTCCTTTCTAGCTTTCTTTCTAGGGAAGAGGACCC
AGACGATGTGCCCATGGACATACCACCTCACTGGTGAGTATACTACTGAG
GGTTTGGTAGAGGTAGACTGGAGATAATTGAAGGAGCCACAGTGGTC
```

(註：與原序列不同之處以橘色底表示)

(三) 細菌轉型

使用 high efficiency 勝任細胞（以氯化鈣以及冷凍離心機處理過的大腸桿菌）

(四) 轉染

使用 Thermo Fisher Lipofectamine® 3000 與 P3000™ 進行轉染。

三、Cas9 蛋白切割功能測定

Surveyor® Mutation Detection Kit (Surveyor Nuclease S、Surveyor Enhancer S、0.15 M MgCl₂ Solution、Stop Solution、Control C、Control G)

四、細胞速率實驗

Dojindo Cell Counting Kit-8

五、免疫共沈澱法以及西方墨點法

Transfer buffer、積層凝膠 (resolving gel)、解析凝膠 (stacking gel)、TBS-T (Tris buffer sailing tween 20)、blocking buffer(5%的脫脂牛奶溶液，以 TBS-T 作為溶劑)

六、銀染

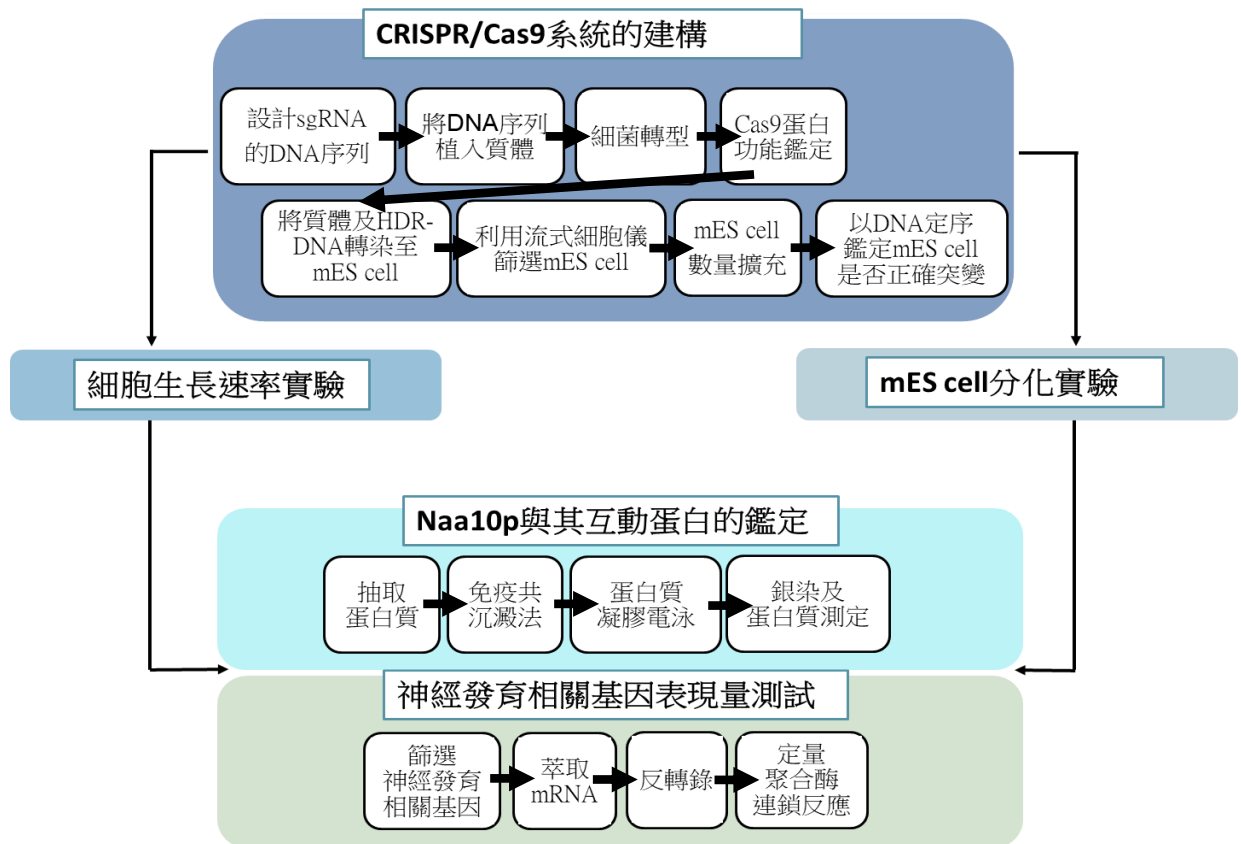
ProteoSilver™ Plus Silver Stain Kit (Fixing solution、Ethanol、ProteoSilver Sensitizer、ProteoSilver Sliver ProteoSilver、ProteoSilver Developer、Stop solution)

七、神經發育相關基因表現量的測試

RNeare Mini Kit (RW1 buffer、RPE buffer、gDNA column) High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit(Oligo dT、dNTP、DTT、Reverse-transcriptase)

肆、 研究方法與過程

一、 研究架構圖



圖四、 研究架構圖

二、 培養液的配置

(一) mES 培養液

以 200 : 1 的比例混合 DMEM 和 N2，再以 200 : 1 的比例混合 Neurobasal medium 和 B27，將兩罐溶液混合，配置成 N2B27，然後加入白血球抑制因子（Leukemia Inhibitory Factor）和 2 種分化抑制劑（CHIR99021、PD0325901）。

(二) 神經母細胞（neural stem cell, NSC）誘導培養液

在 N2B27 中加入 β -mercaptoethanol 0.1 mM 及 L-glutamine 2 mM。

三、細胞株及細胞培養

(一) mES cell

吸除細胞上方的舊培養液，以 10ml 的 PBS 輕輕清洗貼附在底部的細胞，洗掉殘餘的培養基，然後將 PBS 吸除，加入 1ml 的胰蛋白酶（trypsin），放入培養箱等待 3.5 分鐘，使細胞懸浮。加入 10ml DMEM 中和 trypsin，將培養皿中的液體移至離心管，離心（150rpm, 5mins）後抽掉上清液，加入 1ml 的 ES 培養液沖散細胞，再滴入事先裝好 ES 培養液的 10cm 培養盤中。細胞培養於 37°C、5%二氧化碳的恆溫培養箱中。

(二) HT22

吸除細胞上方的舊培養液，以 10ml 的 PBS 輕輕清洗貼附在底部的細胞，洗掉殘餘的培養基，然後將 PBS 吸除，加入 1ml 的胰蛋白酶（trypsin），放入培養箱等待 2-3 分鐘，使細胞懸浮。加入 10ml DMEM 中和 trypsin，將培養皿中的液體移至離心管，離心（150rpm, 3mins）後抽掉上清液，加入 1ml 的 DMEM 沖散細胞，再滴入事先裝好 DMEM 的 10cm 培養盤中。細胞培養於 37°C、5%二氧化碳的恆溫培養箱中。

四、CRISPR/Cas9 系統的建構

本實驗將利用 CRISPR/Cas9 技術做出 V11G、V111A、I72T 突變株；另外實驗選用 2 株臨床症狀最嚴重的 Naa10p 突變株，分別為 S37P、R116W，此兩株細胞由實驗室提供。

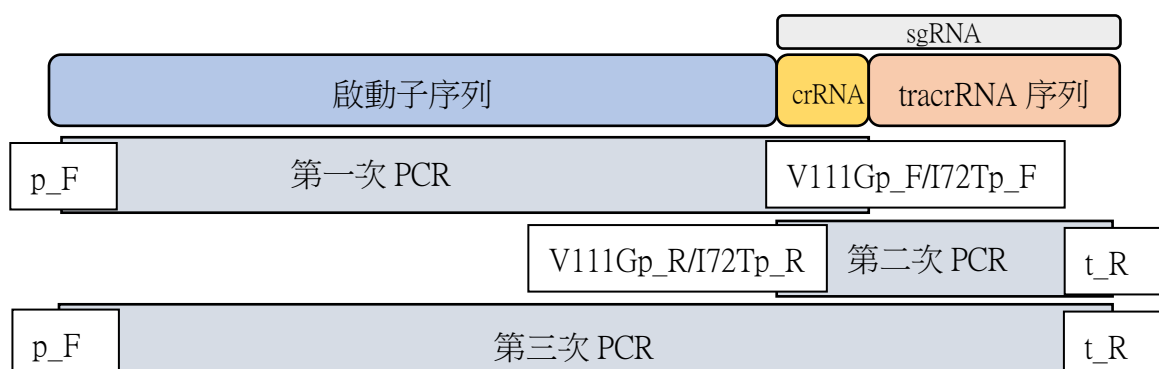
(一) 設計 sgRNA 的 DNA 序列

此實驗使用 EGFP mNaa10_S37P 質體作為修改模板，質體上的 Cas9 序列可以製作出和 sgRNA 結合的 Cas9 蛋白；AmpR 序列可以幫助得到質體的細菌不被抗生素殺死，有助於分辨質體是否進入細菌；EGFP 序列則有利之後流式細胞儀的篩選。

首先設計製作 sgRNA 的 DNA 序列的引子，序列如下：

引子名	序列
V111Gp_R	GACATGCAGGGAGACGTATT GGTGTTTCGTCCTTTCCACA
V111Gt_F	AATACGTCTCCCTGCATGTC GTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAG
I72Tp_R	GTGAGGTGATATGTCCATGG GGTGTTTCGTCCTTTCCACA
I72Tt_F	CCATGGACATATCACCTCAC GTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAG
p_F	AGTTTCTAGAGAGGGCCTATTTCCCATGAT
t_R	TTTTGGTACCAAAAAAGCACCGACTCGGTG

表(二)、使用引子表（紅字部分為限制酶切，TCTAGA 為 XbaI 的限制酶切位、GGTACC 為 KpnI 的限制酶切位，藍字部分為基因靶點）



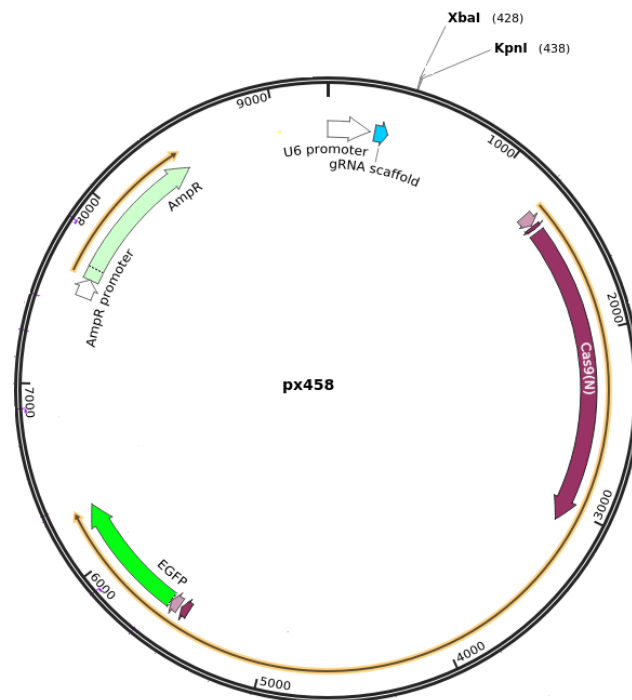
圖五、 sgRNA 替換序列示意圖

此實驗所需的 sgRNA 分為啟動子序列、crRNA 序列以及 tracrRNA 序列三部分，而試驗室目前既有質體中的 crRNA 和本實驗所需的序列不同，藉由訂製不同位置的引子，可以將其製作成此實驗所需的序列。

首先，在啟動子的頂端引子（p_F）和 tracrRNA 的尾端引子（t_R）加上之後要用的限制酶切位，在啟動子的頂端引子（V111Gp_F/I72Tp_F）和尾端引子（V111Gp_R/I72Tp_R）加上基因靶點 crRNA 的 DNA 序列（表二）。接著，經過兩次 PCR，crRNA 的 DNA 序列互補部分能夠使第一次和第二次的 PCR 產物結合，再運用啟動子的頂

端引子 (p_F) 和 tracrRNA 的尾端引子 (t_R)，第三次的 PCR 便可以得到實驗所需的 sgRNA 的 DNA 序列 (圖五)。

(二) 將 DNA 序列植入質體



圖六、EGFP mNaa10_S37P 質體

利用 DNA 限制酶 (XbaI、KpnI) 把 sgRNA 和質體剪開後，在 9 μ l 的水中把質體和 sgRNA 以數量 1:3 的比例混和，加入 1 μ l 的 DNA 連接酶，將 sgRNA 植入質體 PX458 (圖六)。

(三) 細菌轉形 (transformation)

將製作 sgRNA 的 DNA 序列鑲嵌於質體之後，將質體送入細菌中複製，以取得更大量的質體存放。此實驗使用的細菌為勝任細胞，將質體送入細胞後，待勝任細胞增殖至足夠數量，以牙籤挑起細菌株，將細菌輕劃在培養基上，並將部分細菌拿去 PCR。利用 p_F 及 t_R 這兩種引子 PCR，可將 sgRNA 的基因序列放大後確認 DNA 長度，以確保嵌入質體的 DNA 序列是否正確。而劃在培養基上的細菌放置約 12 小時，比對 PCR 結果將正確的細菌放入培養液大量複製，再經過 12 小時後萃取細菌中質體，將質體保存於 -25°C 的冰櫃中。

(四) Cas9 蛋白切割功能測定

此實驗將質體轉染至 HT22 細胞株中，等待兩天使 Cas9 蛋白作用於 DNA 上，從細胞中萃取出 DNA 後拿去 PCR 並純化，由於切割後重新修補的 DNA 有可能發生缺失情況，此時 DNA 中會有不同長短的 DNA。首先，取濃度 50ng/μl 的 PCR 純化產物 10μl，加入 0.3μl 的 2M KCl，依照規定溫度降溫（表三），使 DNA 重新配對（有機率將不同的長度 DNA 配對），接著加入 MgCl₂（濃度 0.15M） 1.3μl、Surveyor Enhancer S 1 μL、Surveyor Nuclease S 1 μL，Surveyor S 會將不同長度的 DNA 配對切斷，放入 42°C 的恆溫槽等待 1 小時，最後加入 stop solution 1.3μl，進行膠體電泳後可透過 DNA 長度差別判斷質體中的 Cas9 蛋白是否具有切割功能。

Temperature	Time	Temperature ramp
95°C	10 min	
95°C to 85°C		(-2.0°C/sec)
85°C	1 min	
85°C to 75°C		(-0.3°C/sec)
75°C	1 min	
75°C to 65°C		(-0.3°C/sec)
65°C	1 min	
65°C to 55°C		(-0.3°C/sec)
55°C	1 min	
55°C to 45°C		(-0.3°C/sec)
45°C	1 min	
45°C to 35°C		(-0.3°C/sec)
35°C	1 min	
35°C to 25°C		(-0.3°C/sec)
25°C	1 min	
4°C	Hold ∞	

表(三)、DNA 重新配對之溫度變化

(五) 將質體及 HDR-DNA 轉染至 mES cell

本實驗使用微脂粒（liposome）進行轉染，此技術是以帶正電的微脂粒將帶負電的 DNA 包裹起來，形成 DNA-陽離子脂質體複合體，從而吸附到帶負電的細胞膜表面，經過內吞被導入細胞。

在轉染前，需先將要轉染的細胞培養液換成 DMEM+LIF（10000:1）。取兩個 1.5 ml 離心管，第一管之中加入 OMEM 250 μl 稀釋 Lipofectamine® 3000 10 μl，第二管加入 OMEM 250 μl、質體 5 μg、HDR-DNA 5 μg、WT-100™ 5 μl，將兩管均勻混和後靜置在室溫 20 分鐘，接著將其滴入細胞培養皿中，靜置於 37°C 恆溫培養箱中一天。

(六) 利用流式細胞儀篩選 mES cell

細胞培養皿上的 mES cell 移置離心管中，離心（150rpm, 5mins）後加入 PBS 1 ml 用 Pipetman 沖散細胞，接著過細胞篩，使溶液成為單細胞懸浮液。經過流式細胞篩選，具有 EGFP 螢光蛋白的細胞被注入到事先填充 ES 培養液的 96 孔培養皿之中。

(七) mES cell 數量擴充

經過流式細胞儀篩選後的胚胎幹細胞在 96 孔培養皿中發育，由單一顆的細胞開始不斷分裂，直到長成肉眼可見的細胞團，約需要 1~2 個星期，接著逐次把細胞團移到 24 孔培養皿、6 孔培養皿、直徑 10cm 培養皿，讓細胞數量不斷擴增，直到將細胞移動到直徑 10cm 的培養皿。

(八) 以 DNA 定序鑑定 mES cell 是否正確突變

得到足夠的細胞後，會將一半的細胞凍起來存放，另一半會抽出 DNA 送公司定序，鑑定細胞是否正確突變。

五、細胞生長速率實驗

(一) 以 mES cell 製作標準曲線

分別定量 1000 顆/孔、2000 顆/孔、4000 顆/孔、8000 顆/孔、16000 顆/孔、32000 顆/孔以及 64000 顆/孔的 mES cell，滴入 Dojindo_Cell Counting Kit-8（CCK-8）10 μ l，置入 37 $^{\circ}$ C、5% 二氧化碳的恆溫培養箱中等待 1.5 小時後，測試細胞之吸光質，製作標準曲線。

(二) 測定各種突變細胞的生長速率

此實驗選用的 mES cell 細胞株，包括 WT(實驗室提供)、KO(實驗室提供)、V111A、V111G、S37P(實驗室提供)以及 R116W(實驗室提供)。

將定量細胞置入 96 孔的細胞培養盤中（本實驗採 4000 顆/孔），分成五組，各組分別於第零天、第一天、第二天、第三天及第四天的同一時時滴入 Dojindo_Cell Counting Kit-8（CCK-8）10 μ l，置入 37 $^{\circ}$ C、二氧化碳 5% 的恆溫培養箱中等待 1.5 小時，接著測試該孔細胞之吸光值，以標準曲線估計該孔細胞株的數目。

六、胚胎幹細胞分化實驗

在細胞培養皿之中加入trypsin使細胞懸浮，用 DMEM沖起 mES cell放入離心管後以150g離心3分鐘，吸除上清液後加入PBS沖散細胞，再以同樣轉速離心3分鐘，再次吸除上清液後以NSC誘導培養液沖散細胞，並計算細胞的數量，接著取適量細胞液（讓培養皿中的細胞密度為10000個/cm²），注入事先以NSC誘導培養液填充的培養皿之中，輕微搖晃培養皿使細胞均勻分佈，然後培養於37°C恆溫培養箱，第一天讓細胞靜置，接下來的一個星期必須每天幫細胞更換培養液。

七、Naa10p 與其互動蛋白的鑑定

(一) 抽取蛋白質

把培養皿中的培養基吸除，加入 PBS 1ml 和 Lysis Buffer（裂解緩衝液） 10 μ l，用細胞刮勺將細胞刮起靜置 30 分鐘，離心（12000rpm, 3mins），抽起上清液，加入呈色劑 Bio-Rad protein assay，測試波長 595nm 的吸光質，得到蛋白質的濃度。

(二) 免疫共沉澱法

將抽取的蛋白質濃度定量後加入 Naa10p 抗體，等待隔夜讓抗體和 Naa10p 結合，加入親合磁珠 30 μ l，以捕捉抗體抗原複合物，搖晃一小時，吸去廢液再加入 1ml Lysis Buffer，搖晃 15 分鐘，重複此步驟 4 次，再以 56 度加熱 1 小時，破壞磁珠與抗體之間的連結，最後吸取上清液，取得 Naa10p 及與 Naa10p 的互動蛋白的蛋白質混合液。

(三) 蛋白質凝膠電泳

取以免疫共沉澱法抓下的蛋白質，以 95°C 加熱 10 分鐘使蛋白質變性，破壞蛋白質的三級結構，變成帶負電的線性分子，混和均勻後注入凝膠片電泳，以分離不同分子量的蛋白質鏈。

(四) 西方墨點法

切除膠上的積層凝膠，將解析凝膠放到轉漬膜上，前後各夾一片濾紙，在前後各夾上一片多孔性襯墊，最後夾入裝置版中，形成轉漬用“三明治”，將“三明治”放入轉漬槽，使向著轉漬膜的那面朝向正極，將轉漬槽注入 Transfer buffer，至於冰桶內，通入 100V 的電壓。

等待 1.5 小時後，將轉漬槽取出，用 TBS-T 清洗乾淨，在浸泡於 blocking buffer 中置於搖擺振盪器 1 小時，吸掉 blocking buffer 再加入以 blocking buffer 稀釋 1000 倍的一級抗體，在安置在搖擺震盪器上 1 小時，之後取出轉漬膜，浸入 TBS-T 溶液內，並放置在數位顯示迴旋式震盪混合器上 5 分鐘，重複此步驟三次。

將與一級抗體相對應的二級抗體以 blocking buffer 稀釋 5000 倍，將轉漬膜浸入並安置在搖擺震盪器 1 小時，再以 TBS-T 溶液沖洗五次。

將 Enhanced chemiluminescence (ECL) detection buffer 低於轉漬膜上後用生物分子成像儀 LAS 4000 拍攝轉漬膜上蛋白質所發出的冷光影像。

(五) 銀染及蛋白質測定

將膠片銀染之後，找出各種突變細胞中抓下的 Naa10p 及 Naa10p 的互動蛋白與正常細胞的差異，並將蛋白質從膠中萃取純化，送去打質譜儀，分析該蛋白的種類和數量。

八、神經發育相關基因表現量的測試

(一) 篩選神經發育相關基因

本實驗先比較 WT 以及 KO 在 RNA sequence 的數值差異，從中篩選 P 值小於 0.05 的進行篩選，找出與神經發育相關的基因，篩選過後，再利用 qPCR 測定這些基因在 Naa10p 突變株的分子量。

(二) 萃取 mRNA

自培養箱取出細胞後，加入 RLT Buffer、2-Mercaptoethanol 以 100:1 所配置成的溶液每盤取 350 μ l 加入，使細胞破裂，接著加至 QIA Shredder mini column 離心

(13200 rpm, 1min), 將離心完的細胞液加至 gDNA Eliminator spin column 離心 (13200rpm, 30 sec), 後將離心後澄清液加 70%酒精 350 μ l, 並混合均勻。將細胞液全部加入 RNeasy spin column, 離心(13200rpm, 30 sec)接著去除濾液, 並加入 buffer RW1 700 μ l 後離心(13200rpm, 30 sec)。再加入 buffer RPE 500 μ l 後, 離心 (13200rpm, 30 sec), 重複此步驟兩次, 最後加入 25 μ l RNase-free water, 離心 1 分鐘後取出濾液。

(三) 反轉錄

測量完濃度後, 取 4.5 μ g 的 RNA 放入試管中, 再加入 dNTPs 1 μ l 以及 T 重複寡核苷酸(Oligo(dT))1 μ l, 放入聚合酶反應器(PCR thermocycler)加熱至 60°C 5 分鐘後於試管中加入 1 μ l 二硫蘇糖醇(dithiothreitol; DTT), 1 μ l SuperScript III 反轉錄酶, 4 μ l 5X First-Strand Buffer, 再放入聚合酶反應器加熱至 42°C 45 分鐘、99°C 5 分鐘、4°C 5 分鐘後, 拿出放至冰上。

(四) 定量聚合酶連鎖反應

將每個 well 加入目標基因的 forward primer 及 reverse primer 各 0.1 μ l, Fast SYBR®Green Master Mix 10 μ l, 水 7.8 μ l, 接著再加入 2 μ l 的 sample, 加完後, 以透明膠封口, 並以轉速 2000rpm, 室溫離心 3 分鐘, 再將 multiwell plate 放入 Real-time PCR thermal cycler 加熱(pre-incubation 95°C 10 分鐘、amplification 95°C 10 秒, 60°C 10 秒, 72°C 7 秒, 重複 43 次、melting curve 95°C 5 秒, 70°C 15 秒, 再以 95°C 持續加溫、cooling 40°C 30 秒), 最後以其 C_T 值換算出此基因在 scramble 組與 TET2 knockdown 組之 cDNA 量的相對值。

(五) 定量計算

使用 Gapdh 作為我們的管家基因, 首先先將 Control(#2)以及 Sample 的 C_t 值減掉 Gapdh 的 C_t 值, 得到 ΔC_t , 再將 WT 的 mES cell 的 ΔC_t 平均, 再將 Sample 的 ΔC_t 減掉 WT 的 ΔC_t , 便可得到 $\Delta\Delta C_t$, 最後我們以 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 作為我們比較各基因的定序。

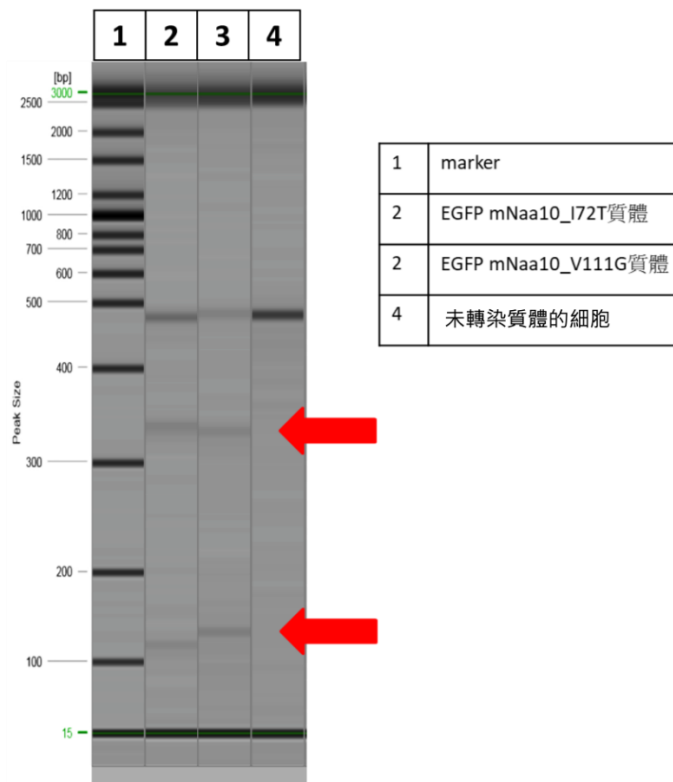
伍、 研究結果

一、 利用 CRISPR/Cas9 技術做出 Naa10p 的突變株

(一)質體製作及定序結果

將細菌中的質體萃取純化之後，將質體送公司定序，定序結果顯示 EGFP mNaa10_V111G 質體以及 mNaa10_I72T 質體和預期序列 100%的相同。

(二)利用 HT22 細胞鑑定 Cas9 蛋白切割功能測定



圖七、 Cas9 蛋白切割功能測定實驗電泳圖

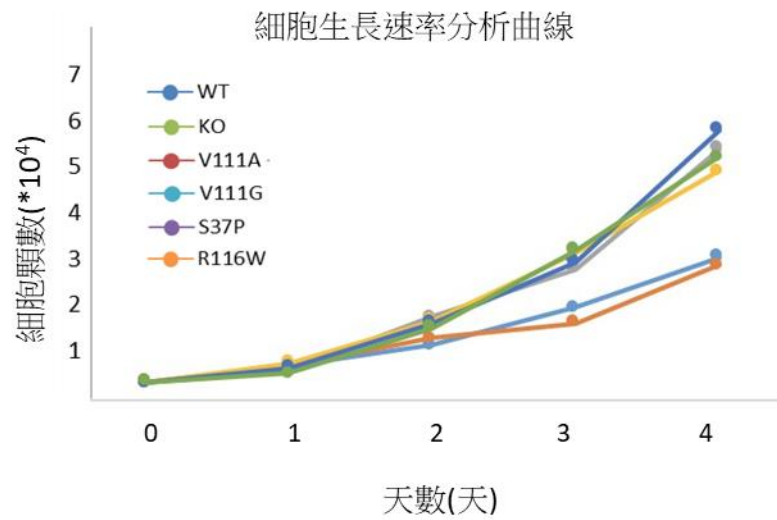
可以看出 DNA 片段已由約 470bp 被切為約 340bp 和 130bp 的片段(圖七)，由此推知，EGFP mNaa10_I72T 質體以及 EGFP mNaa10_V111G 質體的 Cas9 蛋白具有切割能力。

(三)轉染後的 mES cell 萃取 DNA 的定序結果 (表四)

mES cell clone	1	2	3	4
Naa10p 突變 的位置	V111A	V111A	V111A	V111G

表(四)、 轉染後細胞定序結果

二、探討 Naa10p 突變對細胞生長速率的影響



圖八、不同 Naa10p 突變株生長速率分析

V111A 突變株生長速率和 WT 相似，而其他四株突變株都有分裂過快的趨勢。

三、探討 Naa10p 突變對分化至神經母細胞歷程造成的影響

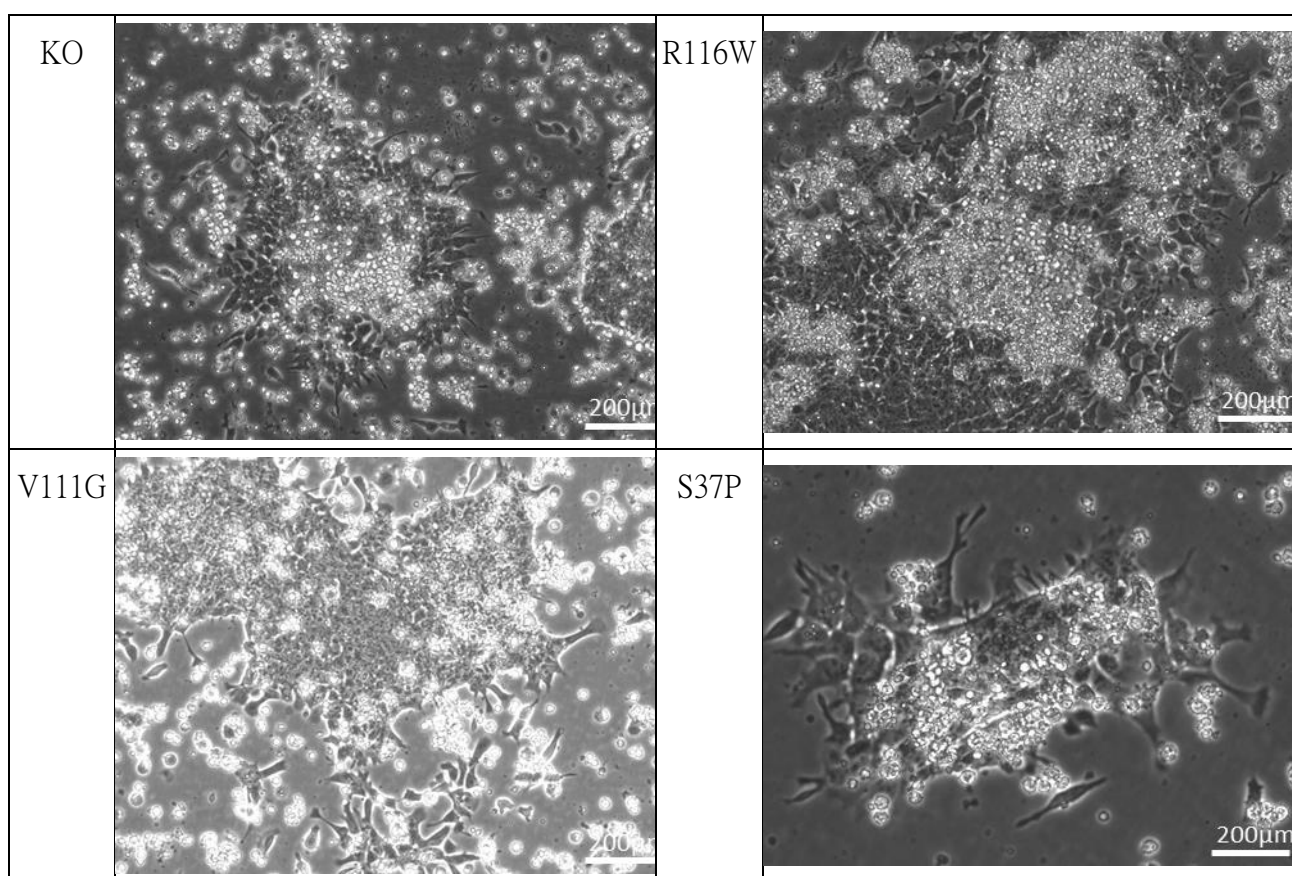
(一) 探討 WT mES cell 的分化

天數	第二天	第四天
分化 型態		
天數	第六天	
分化 型態		

圖九、WT 神經分化 (第二、四、六天)

為了測試 WT 的 mES cell 是否能分化成神經母細胞，將原始 mES cell 放入培養基後開始觀察(圖九)。在分化的第二天，細胞皆已長出突起。分化比較慢的細胞先往兩極延伸拉長，分化較快的細胞分裂數目較多，開始往側邊延伸。到了第四天，細胞已有了神經花環的雛形，細胞突起向外輻射延伸，此階段細胞應該已轉變為神經上皮細胞，細胞形狀為中間扁圓、末端細長延伸的火焰型；第六天細胞正式分化成神經母細胞的型態。

(二)探討突變株 mES cell 的分化

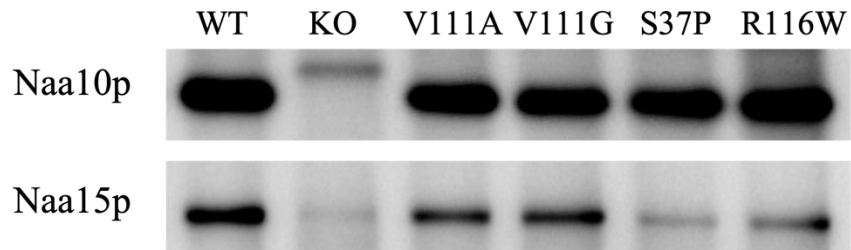


圖十、各突變株神經分化（第六天）

V111A 突變株無法在第六天時形成神經花環，而其他突變株在第六天時得到的神經花環型態也和 WT 略有差異(圖十)，推測 Naa10p 的突變會影響到神經分化的型態。

四、以免疫共沈澱法探討 Naa10p 影響神經發育的機制

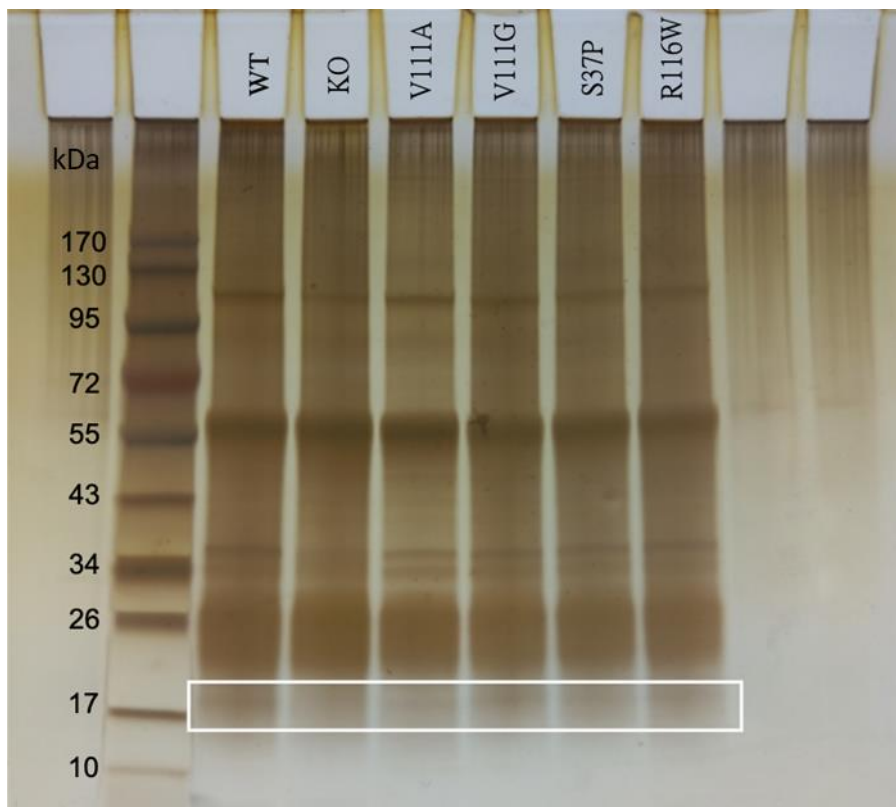
(一)西方墨點法



圖十一、西方墨點法結果

將蛋白質轉染至紙上後，染上 Naa10p 及 Naa15p 的抗體，以生物分子成像儀 LAS 4000 拍攝轉漬膜上蛋白質所發出的冷光影像，再以冷光強度分析 Naa10p 以及 Naa15p 的濃度，可以發現四種突變株 Naa10p 與 Naa15p 的親和力皆有下降的趨勢，其中以 S37P 及 R116W 最為嚴重，推測 Naa10p 的突變會影響 NatA 複合體中 Naa10p 與 Naa15p 的結合。

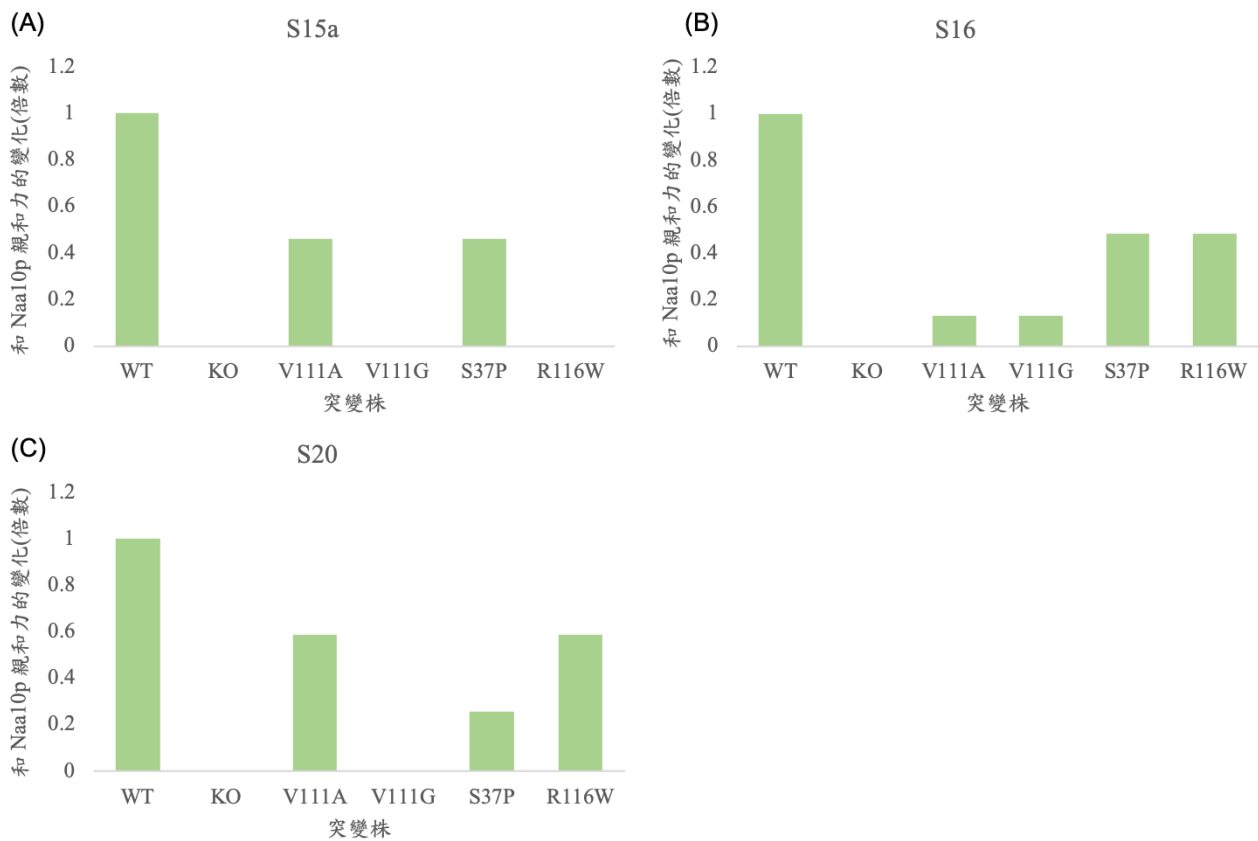
(二)銀染



圖十二、銀染後的膠片

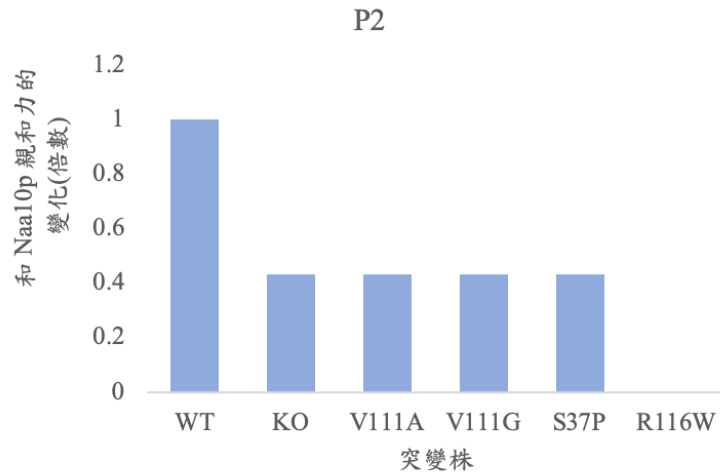
萃取穩定轉殖後的 mES cell 全蛋白質，以 Naa10p 抗體擷取結合的相關蛋白，再以 SDS-Page 膠分析後銀染。銀染後的膠片在各突變株分子量 17kDa 附近有明顯差異（圖十二），將此片段萃取純化後，放入質譜儀以鑑定與 Naa10p 結合的蛋白種類及密度。

(三)質譜儀數據分析：



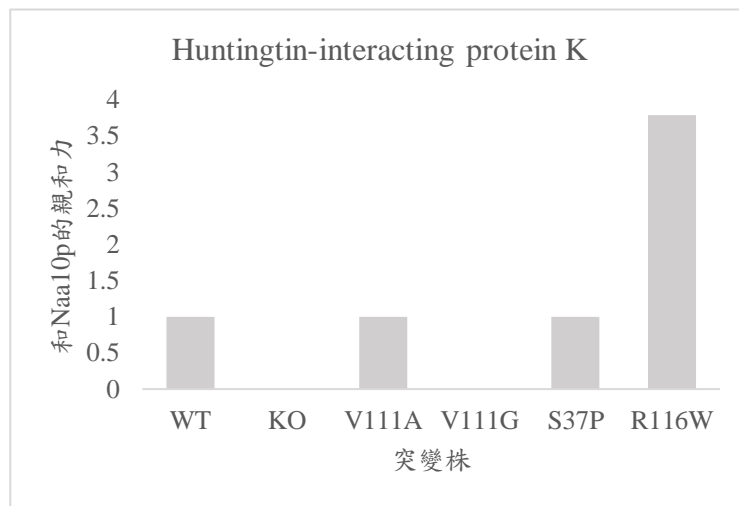
圖十三、Naa10p 和小次單元核糖體（40S）不同核糖體蛋白親和力變化

與 WT 相比，突變株的 Naa10p 與 40S 核糖體次單元的結合力普遍都有下降的趨勢，其中以 S15a、S16 與 S20 下降趨勢最明顯。



圖十四、Naa10p 和大次單元核糖體（60S）蛋白 P2 變化

由質譜儀結果分析，60S 結合蛋白和 WT 相比，突變株親和力完全下降(圖十四)。



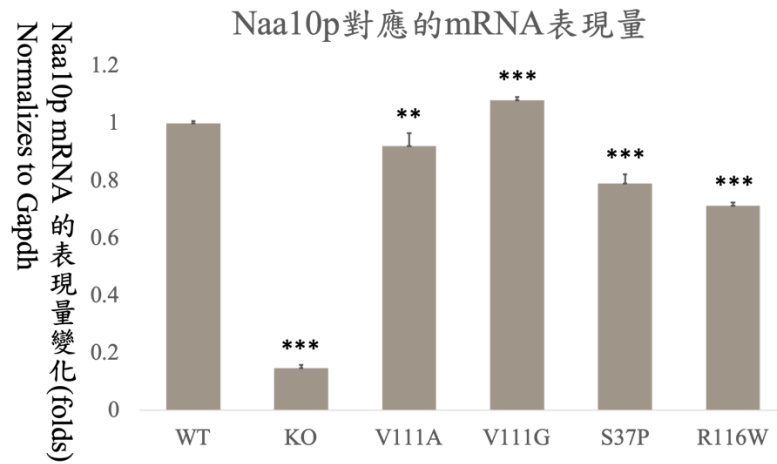
圖十五、Naa10p 和 HYPK 蛋白親和力變化

在前面的文獻中，可知 HYPK 為 Naa10p 的結合蛋白之一，因此本實驗從 HYPK 蛋白的親和力變化分析，而由上圖的數據(圖十五)可以看出 V111G 細胞株完全抓不到 HYPK 蛋白，但 R116W 突變株的 HYPK 親和力急遽增加。

綜合核糖體與 HYPK 與 Naa 10p 親和力變化的結果，可推測突變的 Naa10P 可能無法形成正常的 Nat A 複合體，且 HYPK 蛋白和 Naa10p 的結合會影響 Naa10p 辨識蛋白質 α (N 末端) 的功能，進而影響蛋白質的乙醯化修飾，而若被影響的蛋白質與細胞週期與神經分化調控有關，就有可能影響細胞的分裂速度與分化情況。

五、Naa10p 突變是否會影響神經發育相關基因的表現量

(一)Naa10p mRNA 的表現量



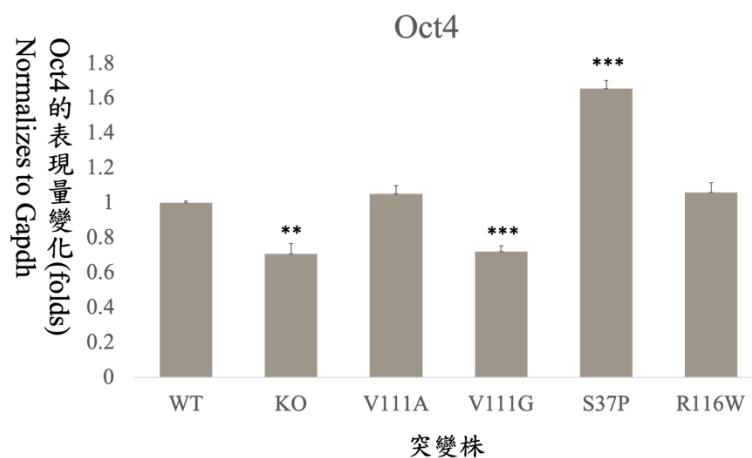
圖十六、Naa10p 在各突變株的表現量

首先測試 Naa10p 突變是否會影響 Naa10p 自身的表現量，WT 及其他突變株的表現量為正常水平(圖十六)，而 KO 則幾乎沒有表現，進一步證實了先前實驗使用的 KO 株的可信性。

(二)神經相關基因篩選結果

從 P 值小於 0.05 的 2000 多個基因分門別類後，篩選出 10 個跟神經相關的基因，分別為 Oct4、Pax6、CDRK5R1、AKT3、RBfox3、foxd1、adam23、Calm1、NGFR 以及 CAMK2G，而目前發現 Oct4 與 Pax6 的基因表現異常較明顯。。

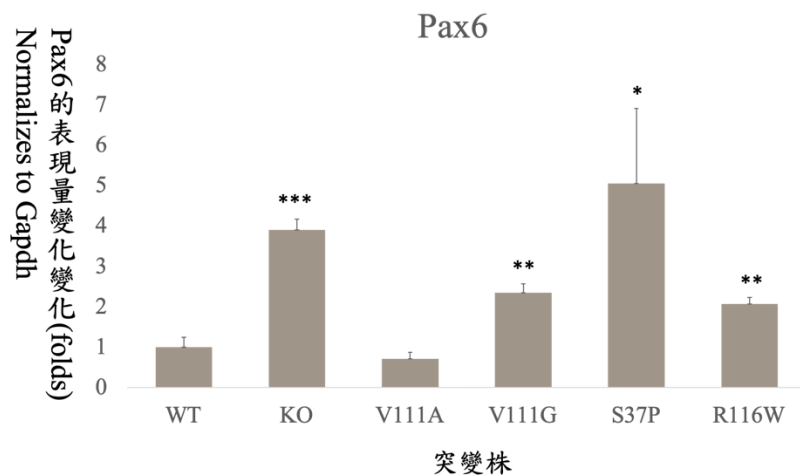
(三)Oct4



圖十七、Oct4 在各突變株的表現量

Oct4 對未分化的胚胎幹細胞的自我更新與幹性維持至關重要，也正因如此，有時 Oct4 會被用來作標記未分化細胞的分子標記。Oct4 的過表達或低表達都會造成細胞的分化，因此 Oct4 只在特定的表達強度下才能維持細胞的幹性。比較各突變 Naa10p 與 WT 細胞株的 Oct4 表現(圖十七)，大部分突變株都有表現過多或過少的趨勢，僅 V111A 以及 R116W 的表現與 WT 相近，顯示突變的 Naa10p 可影響細胞的幹性維持情況。

(四)Pax6



圖十八、Pax6 在各突變株中的表現量

Pax6 是胚胎發育過程中存在的轉錄因子，是眼睛和大腦發育的關鍵調節基因。在大腦內，Pax6 可激活或失活基因表達確保組織正常發育的模式，目前已知 Pax6 基因的突變會引起各種眼睛疾病。Pax6 在大腦發育過程中扮演很重要的角色，除了 V111A 之外，其他四株細胞都有過度表現的趨勢(圖十八)。

陸、 討論

一、 利用 CRISPR/Cas9 技術做出 Naa10p 的突變株

目前已成功作出 7 個突變株，而 I72T 的細胞在重複實驗後仍無法存活，因此推測 I72T 突變會嚴重影響小鼠細胞的生長。

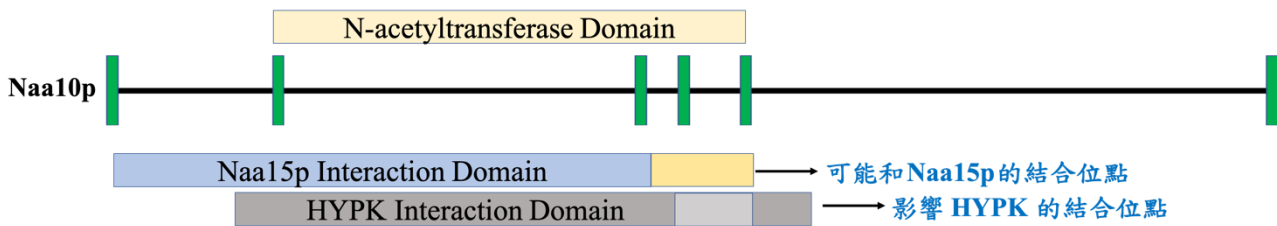
二、 Naa10p 突變對細胞生長速率的影響

由結果可以看出，V111A 細胞株生長速率和 WT 相近，生長速率正常，調控細胞週期的功能未受影響；但其他四株突變相較於 WT 明顯都有分裂過快的問題。

三、 Naa10p 的突變對神經分化型態的影響

Naa10p 突變造成細胞週期受到干擾，細胞生長速度加快，但細胞分化速度減慢，如此的突變有可能和奧格登症候群及發育遲緩的產生有關。

四、 Naa10p 影響神經發育的機制



圖十九、HYPK 推測結合位點示意圖

Naa10p 的 S37P 及 R116W 突變導致 Naa10p 與 Naa15p 的親和力有顯著下降的趨勢，因此我們推測 Naa10p 及 Naa15p 的結合位點應從第 37 個胺基酸一直延伸至第 116 個胺基酸。

在胚胎幹細胞中，V111G 突變可能導致 Naa10p 無法與 HYPK 結合，使其 NatA 複合體構造不完整，相反的，R116W 則使 HYPK 整體結合數量大幅增加。推測是因為 V111G 和 R116W 的突變位點在 HYPK 蛋白與 Naa10p 的結合域之中 (interaction domain)，Naa10p 和 HYPK 的結合位點應該包含 111 位點到 116 位點這一段蛋白質(圖十九)。HYPK 結合量增減則受突變的胺基酸碼影響，不同胺基酸碼可能改變 Naa10p 的構型，V111G 突變可能使 Naa10p 和 HYPK 的結合位點變形而完全無法結合，R116W 突變則增強 Naa10p 和

HYPK 蛋白之間的親和力。HYPK 在 NatA 複合體中可能有協助辨識轉譯複合體能力的可能性。

再進一步推測，Naa15p 在 NatA 中有協助 Naa10p 修飾正確位點的功能，而 HYPK 蛋白和 Naa10p 的結合會影響 Naa10p 辨識蛋白質 α (N 末端) 的功能，進而影響蛋白質的乙醯化修飾，而若被影響的蛋白質與細胞週期與分化調控有關，就有可能影響細胞的分裂速度與分化情況。

V111G 和 V111A 突變在相同的位點，但是其 HYPK 結合比例卻沒有受到影響，所以觀察胺基酸列表後發現纈胺酸 (Valine, V) 和丙胺酸 (Alanine, A) 末端皆為甲基，而甘胺酸 (Glycine, G) 末端缺乏甲基，可能因此才造成兩突變株不一樣的結果。

mES 突變株	核糖體次單元	增加的核糖體蛋白	減少的核糖體蛋白
KO	40S		S15a 、 S16 、 S19 、 S20 S25 、 S26
	60S		P2 、 L12 、 L30 、 L31 L34 、 L36a
V111A	40S		S15a 、 S16 、 S20 、 S25
	60S	L30	P2 、 L36a
V111G	40S	S14 、 S25	S15a 、 S16 、 S20 、 S26
	60S		P2 、 L31 、 L12 、 L36a
S37P	40S	S19 、 S25	S15a 、 S16 、 S20 、 S26
	60S		P2
R116W	40S	S19	S15a 、 S16 、 S20
	60S		P2 、 L34 、 L12 、 L30

表(五)、 Naa10p 與核糖體蛋白親和力變化

(粗體代表與 WT 比較，親和力改變 $\geq 100\%$ ，鑑別出的親和蛋白全部數據請參考附錄)

可以看出，Naa10p 的突變會影響到 NatA 複合體與核糖體的結合，進而影響到蛋白質的轉譯以及後續的修飾，推測是造成 Naa10p 突變影響發育的可能原因。

五、 Naa 10p 突變株中基因表現分析

Naa10p 的突變株會影響神經發育相關基因，進而影響到大腦的發育以及幹細胞的自我更新，而其中以 S37P 影響最為嚴重。

柒、 結論與未來應用

一、結論

- (一) 質體 EGFP mNaa10_I72T 質體以及 EGFP mNaa10_V111G 的 sgRNA 序列鑲嵌正確，且皆具有切割功能，並成功製作出 V111A 及 V111G 胚胎幹細胞突變株。
- (二) Naa10p 突變株除了 V111A 株之外，皆具有分裂速率過快的問題。
- (三) 成功得到 WT 株、KO 株及突變株 V111G 的神經母細胞，並發現其分化情況差異。
- (四) Naa10p 的突變可能造成其與 Naa15p 的結合能力下降，其中以 S37P 以及 R116W 最為嚴重，可能造成影響 NatA 複合體的形成，進而影響蛋白質的乙醯化。
- (五) Naa10p 的 V111G 突變可能造成其喪失與 HYPK 的結合能力，因而影響蛋白質的乙醯化，進而影響細胞週期與分化。
- (六) Naa10p 的突變株會影響神經發育相關基因 Oct4 及 Pax6 的表現量

二、正在進行

- (一)繼續分化其他 Naa10p 突變株，以取得神經母細胞
- (二)將取得的神經母細胞做免疫共沉澱法，分析 Naa10p 的互動蛋白
- (三)以免疫共沉澱法分析神經細胞，分析 Naa10p 的作用機制在各階段是否一致。
- (四)建構 NatA 複合體與核糖體蛋白（60S、40S）的互動模式圖。

捌、 參考資料

- Aksnes H, Drazic A, Marie M, Arnesen T. First Things First: Vital Protein Marks by N-Terminal Acetyltransferases. *Trends Biochem Sci.* 2016 Sep;41(9):746-760.
- Alexander M, Tsankov, Hongcang Gu, Veronika Akopian, Michael J. Ziller, Julie Donaghey, Ido Amit, Andreas Gnirke & Alexander Meissner. Transcription factor binding dynamics during human ES cell differentiation. *Nature.* 2015 Feb 19;518 (7539) : 344-9.
- Abranches E, Silva M, Pradier L, Schulz H, Hummel O, Henrique D, Bekman E. Neural Differentiation of Embryonic Stem Cells In Vitro : A Road Map to Neurogenesis in the Embryo. *PLoS One.* 2009 Jul 21;4 (7) : e6286.
- Arnesen T. Towards a functional understanding of protein N-terminal acetylation. *PLoS Biol.* 2011 May; 9 (5) : e1001074.
- Chen-Cheng Lee, Shih-Huan Peng, Li Shen, Chung-Fan Lee, Ting-Huei Du, Ming-Lun Kang, Guo-Liang Xu, Anup K. Upadhyay, Xiaodong Cheng, Yu-Ting Yan, Yi Zhang, and Li-Jung Juan. The Role of N-acetyltransferase 10 Protein in DNA Methylation and Genomic Imprinting. *Molecular Cell.* 2017 Oct 5;68 (1) : 89-103.e7.
- Drazic A, Myklebust LM, Ree R, Arnesen T. The world of protein acetylation. *Biochim Biophys Acta.* 2016 Oct;1864 (10) : 1372-401.
- Dörfel MJ, Lyon GJ. The biological functions of Naa10 - From amino-terminal acetylation to human disease. *Gene.* 2015 Aug 10;567(2):103-31.
- Koblan LW, Doman JL, Wilson C, Levy JM, Tay T, Newby GA, Maianti JP, Raguram A, Liu DR. Improving cytidine and adenine base editors by expression optimization and ancestral reconstruction. *Nat Biotechnol.* 2018 Oct;36 (9) : 843-846.
- Leonid Schneider¹, and Fabrizio d' Adda di Fagagna. Neural stem cells exposed to BrdU lose their global DNA methylation and undergo astrocytic differentiation. *Nucleic acid research.* 2012 Jul;40 (12) : 5332-42

Mi-Ni Lee, Hyae Yon Kweon, Goo Taeg Oh . N- α -acetyltransferase 10 (Naa10) in development : the role of Naa10. *Exp Mol Med.* 2018 Jul; 50(7): 87.

Myklebust LM, Støve SI, Arnesen T. Naa10 in development and disease. *Oncotarget.* 2015 Oct 27; 6 (33) : 34041 – 34042.

Nina McTiernan, Svein Isungset Støve, Ingvild Aukrust, Marita Torrisen Mårli, Line M. Myklebust, Gunnar Houge and Thomas Arnesen. Naa10 dysfunction with normal NatA complex activity in a girl with nonsyndromic ID and a de novo Naa10 p. (V111G) variant – a case report. *BMC Med Genet.* 2018 Mar 20;19 (1) : 47.

Ohkawa N, Sugisaki S, Tokunaga E, Fujitani K, Hayasaka T, Setou M, Inokuchi K. N-acetyltransferase ARD1-NAT1 regulates neuronal dendritic development. *Genes Cells.* 2008 Nov;13 (11) : 1171-83.

Qi-Long Ying, Marios Stavridis, Dean Griffiths, Meng Li & Austin Smith. Conversion of embryonic stem cells into neuroectodermal precursors in adherent monoculture. *Nature Biotechnology.* 2003 January 13; 21 : 183 – 186.

Svein Isungset Støve, Marina Blenski, Asbjørg Stray-Pedersen, Klaas J. Wierenga, Shalini N. Jhangiani, Zeynep Coban Akdemir, David Crawford, Nina McTiernan, Line M. Myklebust, Gabriela Purcarin, Rene McNall-Knapp, Alexandra Wadley, John W. Belmont, Jeffrey J. Kim, James R Lupski & Thomas Arnesen. A novel Naa10 variant with impaired acetyltransferase activity causes developmental delay, intellectual disability, and hypertrophic cardiomyopathy. *Eur J Hum Genet.* 2018 Sep;26 (9) : 1294-1305.

Weyer FA, Gumiero A, Lapouge K, Bange G, Kopp J, Sinning I. Structural basis of HypK regulating N-terminal acetylation by the NatA complex. *Nat Commun.* 2017 Jun 6;8:15726.

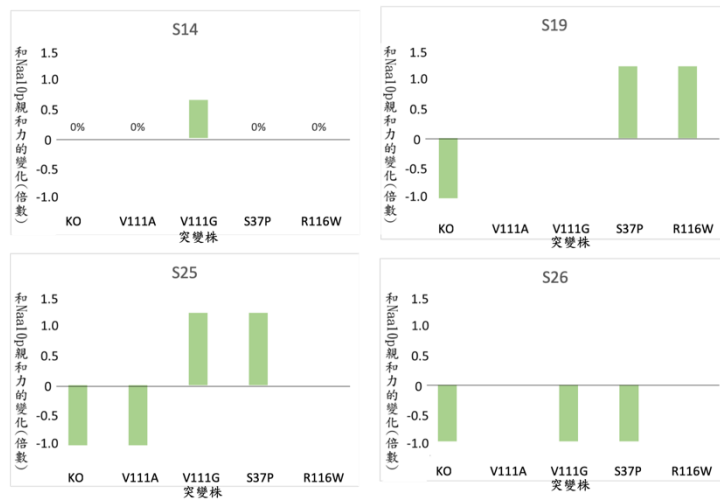
Clotech. How to design sgRNA sequences. <https://www.takarabio.com/learning-centers/gene-function/gene-editing/gene-editing-tools-and-information/how-to-design-sgrna-sequences>

力鈞生物科技有限公司。CRISPR/Cas9 基因剔除技術。取自 <http://www.zgenebio.com.tw/crispr-cas9-2140729702332872503329992.html>

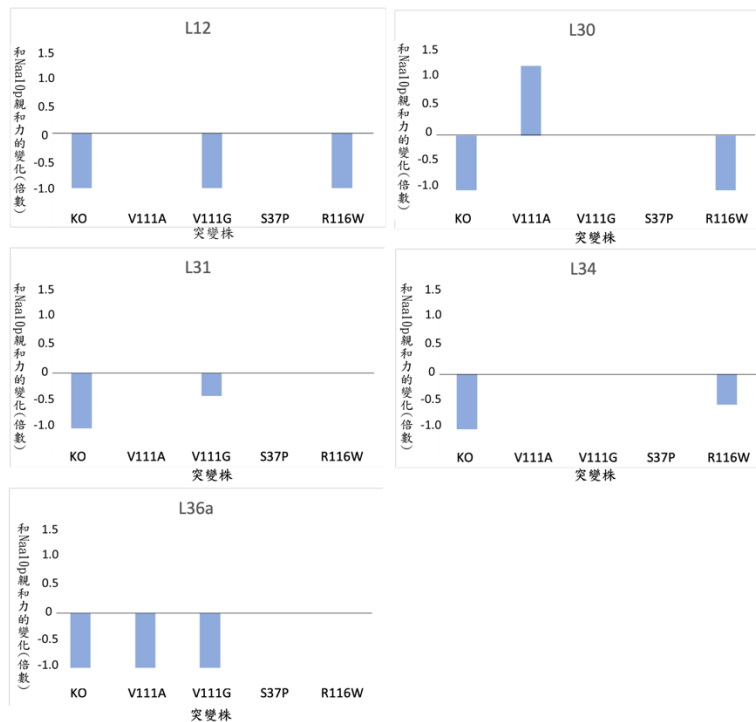
ResearchGate. https://www.researchgate.net/figure/Lipoplex-mediated-transfection-and-endocytosis-Cationic-lipids-forming-micellar_fig1_9035177

- Myklebust LM, et al. Biochemical and cellular analysis of Ogden syndrome reveals downstream N-terminal acetylation defects. *Hum. Mol. Genet.* 2015;24:1956 – 1976.
- Casey JP, et al. NAA10 mutation causing a novel intellectual disability syndrome with Long QT due to N-terminal acetyltransferase impairment. *Sci. Rep.* 2015;5:16022.
- Sidhu M, Brady L, Tarnopolsky M, Ronen GM. Clinical manifestations associated with the N-terminal-acetyltransferase NAA10 gene mutation in a girl: ogden syndrome. *Pediatr. Neurol.* 2017;76:82 – 85.
- Popp B, et al. De novo missense mutations in the NAA10 gene cause severe non-syndromic developmental delay in males and females. *Eur. J. Hum. Genet.* 2015;23:602 – 609.
- Saunier C, et al. Expanding the phenotype associated with NAA10-related N-terminal acetylation deficiency. *Hum. Mutat.* 2016;37:755 – 764.

附錄 1



圖二十、Naa10p 與其他核糖體小次單元的親和力變化 S14(A) S25 (B) S19 (C) S26(D)，以 WT 的親和力為 0%。



圖二十一、 Naa10p 與其他核糖體大次單元的親和力變化 (0%為 WT 的親和力) L12 (A)、L30 (B)、L31(C)、L34(D)、L36a (E)，以 WT 的親和力為 0%。

【評語】 090025

The author has sufficient data to support the proposal.

The poster can be improved, for example: label representative blots with Molecular Weight, add statistics methods, sample number, and p-value in the Materials and Methods, and Results sections.