

中華民國第 62 屆中小學科學展覽會
作品說明書

高級中等學校組 動物與醫學科

第一名

052006

探討神經細胞特異性磷酸化 Paxillin^{S119} 的進核
機制與其在神經細胞生長中所扮演的角色

學校名稱：國立臺灣師範大學附屬高級中學

作者： 高二 潘冠竹	指導老師： 林峻緯
---------------	--------------

關鍵詞：神經細胞成熟 neuronal maturation、核定
位序列 nuclear localization signal、
Phospho-Paxillin^{S119}

得獎感言

迷茫中的堅持

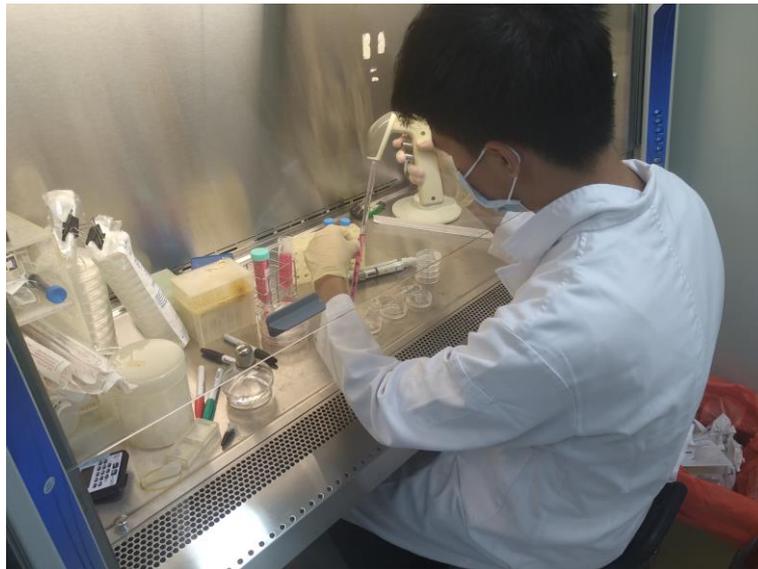
這是在科展旅途中的第五年。還記得三年前，身為國中生的我，在相同的舞台上展現研究的成果。這次因為疫情而改為線上評審，讓今年比賽在我的記憶中變得格外特別。

配合專題研究的課程，升上高一的十一月初，我進入了中研院分生所的實驗室，開始學習實驗的方法，如螢光顯微鏡的操作、細胞繼代培養及細胞轉染燈等等。剛熟悉這些實驗的操作，就被突如其來的疫情干擾。高一升高二的暑假應該是衝進度的好時機，但因為情況嚴峻，無法進入實驗室，只能待在家中閱讀文獻，或是跟老師視訊討論研究的方向與規劃實驗的架構。直到去年十月才開始進行現在這個題目的研究。

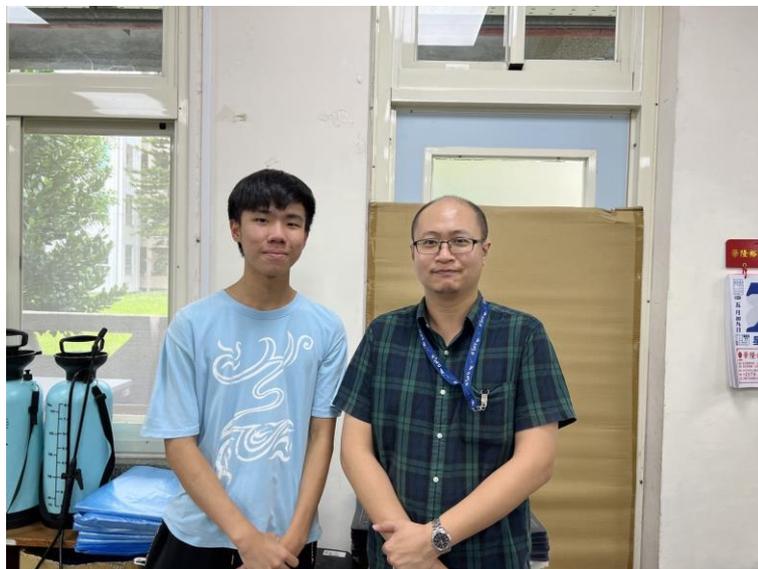
家裡住在基隆使得通勤不太方便，又加上進度大大延遲，放棄的念頭在我的腦海中閃過無數次，但當時的我還是告訴自己，竟然決定了這條道路，就盡力的把它完成吧！今年二月底選為學校代表，到參加四月中臺北科展比賽的這段時間，是我花最多時間在研究上，以及最迷茫的時候。幾乎每天的放學以及周末都在實驗室做實驗與分析數據，有時甚至做到凌晨才離開。卻一直遇到細胞狀態不佳，抗體辨認度不足的情形，導致結果不如預期，最後交稿的研究內容還不到國展的一半呢。雖然途中不斷地碰壁，但也就是經過這樣的努力，讓這個作品能得到評審們的青睞，使我可以再次開啟國展的大門。

非常感謝一路上老師、實驗室夥伴們、家人與朋友的幫助和打氣，陪伴我走過重重難關，讓我能堅持到最後一刻。這段時間對我而言是漫長而疲憊的，因為需要長時間反覆做同樣的實驗，除了上學與練團，幾乎將所有時間都耗在實驗室。而我卻在其中了解到自己越發喜愛科學研究，也發現自己的耐力與專注力有了質的飛躍。一路走來，我發覺科學研究是充滿了未知與變數，其中深奧的原理也常讓我的實驗走了無數的錯路，這對我來說反而成了一種挑戰，也讓我能夠快速地成長。

科展的路程中，除了因為遇到挫折與瓶頸而感到迷茫，生物研究豈不是如此呢？每當看到一個新的現象，我們又要如何在分子與分子交互作用的茫茫大海中，抽絲剝繭，找出正確的機制呢？生物實驗的結果永遠不會是線性方程，透過比對控制組與對照組的差異程度，找出答案，這是生命科學最有趣，最吸引人地方！



在無菌操作台裡培養細胞



和指導老師的合影



在中研院跨領域大樓和實驗室夥伴們的合影

摘要

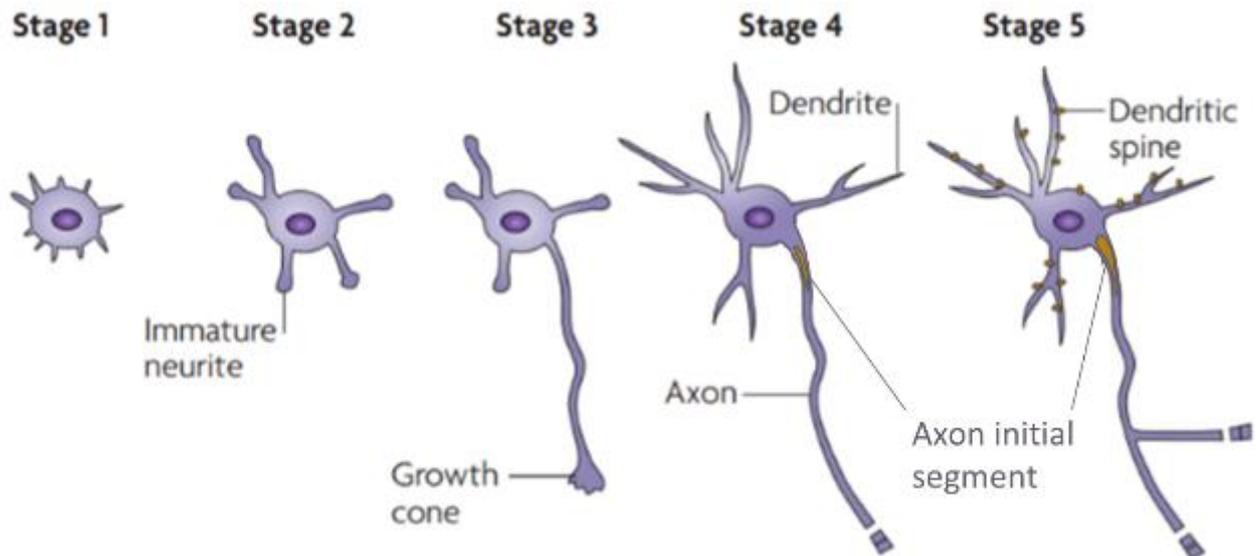
本研究發現在初代神經細胞於活體外生長至第七天時，位點 Serine119 被磷酸化的 Paxillin (p-Paxillin^{S119}) 會從細胞質轉位進入至細胞核。我們使用 N2a 細胞進行轉染來探討 p-Paxillin^{S119} 進核的分子機制，發現 p-Paxillin^{S119} 進入細胞核需要位點 Serine119 被磷酸化，且得知 Paxillin 的 LIM 結構域中有 PY-NLS 序列，分別為 P516/Y517 及 P575/Y576，是藉由轉運蛋白 Importin $\beta 2$ 辨識該序列，並與其蛋白結合後帶入細胞核中。為了瞭解 p-Paxillin^{S119} 進核對神經生長的影響，我們抑制 Importin $\beta 2$ 的蛋白核輸入功能，以及對 Paxillin 的 PY-NLS 進行點突變，皆觀察到軸突起始段的位置和長度異常，表示阻斷 p-Paxillin^{S119} 進核會使神經細胞的成熟度延緩。我們亦發現神經細胞的 p-Paxillin^{S119} 在細胞核中會呈現顆粒狀，與 RNA 剪接因子 P-SR 共定位在核斑點，也確認了 p-Paxillin^{S119} 顆粒是具有核斑點的特性，顯示 p-Paxillin^{S119} 進入細胞核後參與了 RNA 的剪接。

壹、前言

一、研究背景與文獻探討

(一) 神經細胞成熟 (neuronal maturation)

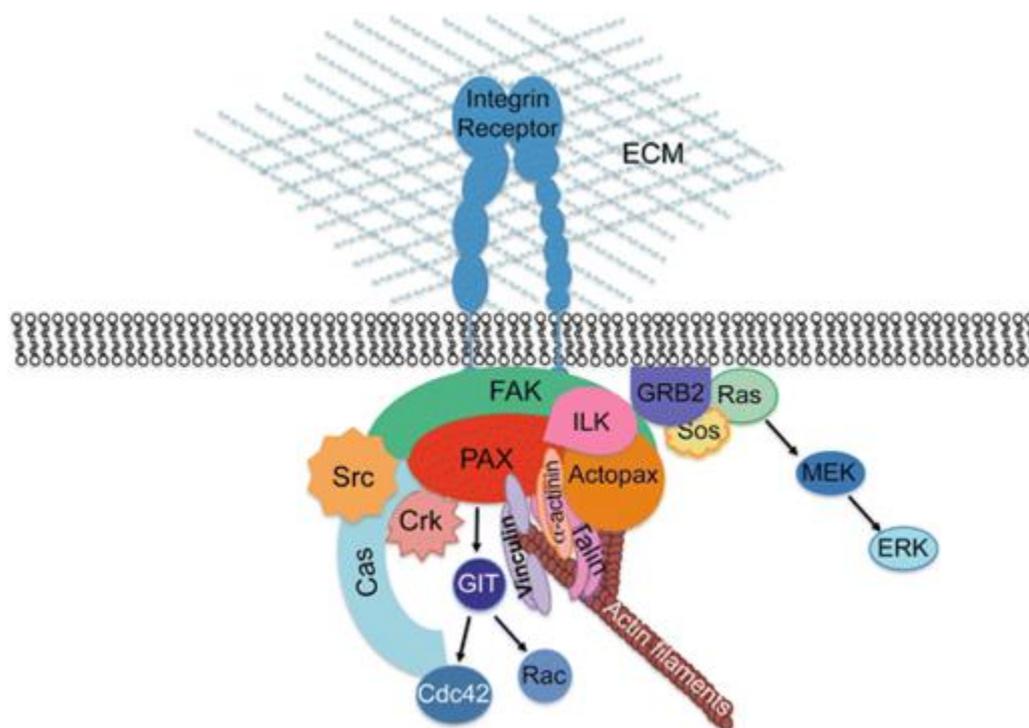
未成熟神經細胞貼附於基材後的生長主要可以分為五個階段；階段一（貼附後 6 小時），神經細胞生長出板狀偽足 (lamellipodia) 和 絲狀偽足 (filopodia)；階段二（貼附後 12 小時），神經突 (neurite) 開始形成；階段三（貼附後 24 小時），特定的神經突末端形成生長錐 (growth cones)，並快速生長形成軸突 (axon)，其餘的神經突則會發育成為樹突 (dendrite)；階段四（貼附後 4 天），隨著神經細胞的成熟與軸突的生長，在軸突近端形成一個啟動電訊號傳遞的特化結構，稱為軸突起始段 (axon initial segment, AIS)，且樹突趨近成熟；階段五（貼附後 7 天），樹突上會形成樹突小刺 (dendritic spine)，並與軸突末端進行接觸，開始建立神經迴路 (Kaibuchi & Arimura, 2017)，如圖一。神經生長的過程中，每一次的階段轉換，同時也代表了神經細胞的成熟程度，不管是在形態上還是分子機制，對於細胞而言都是巨大的考驗。許多研究表明，每個生長的階段，神經細胞會表達不同的基因與蛋白質，且在生長過程中有相對應的功能，但是神經細胞是透過什麼機制來引導生長階段的轉換，使神經細胞成熟，至今都尚未釐清，是了解神經生長的一大課題。



圖一、神經生長的過程與階段 (Kaibuchi & Arimura, 2017)。

(二) Paxillin 蛋白的功能

Paxillin 是 Focal adhesion (FA) 中的銜接蛋白，有助於傳導細胞內的激酶、輔助因子、癌蛋白和結構蛋白等，如圖二。這些傳導途徑的激活，調控 FA 結構蛋白的結合與拆解，導致細胞骨架重組、細胞附著、擴散以及遷移。



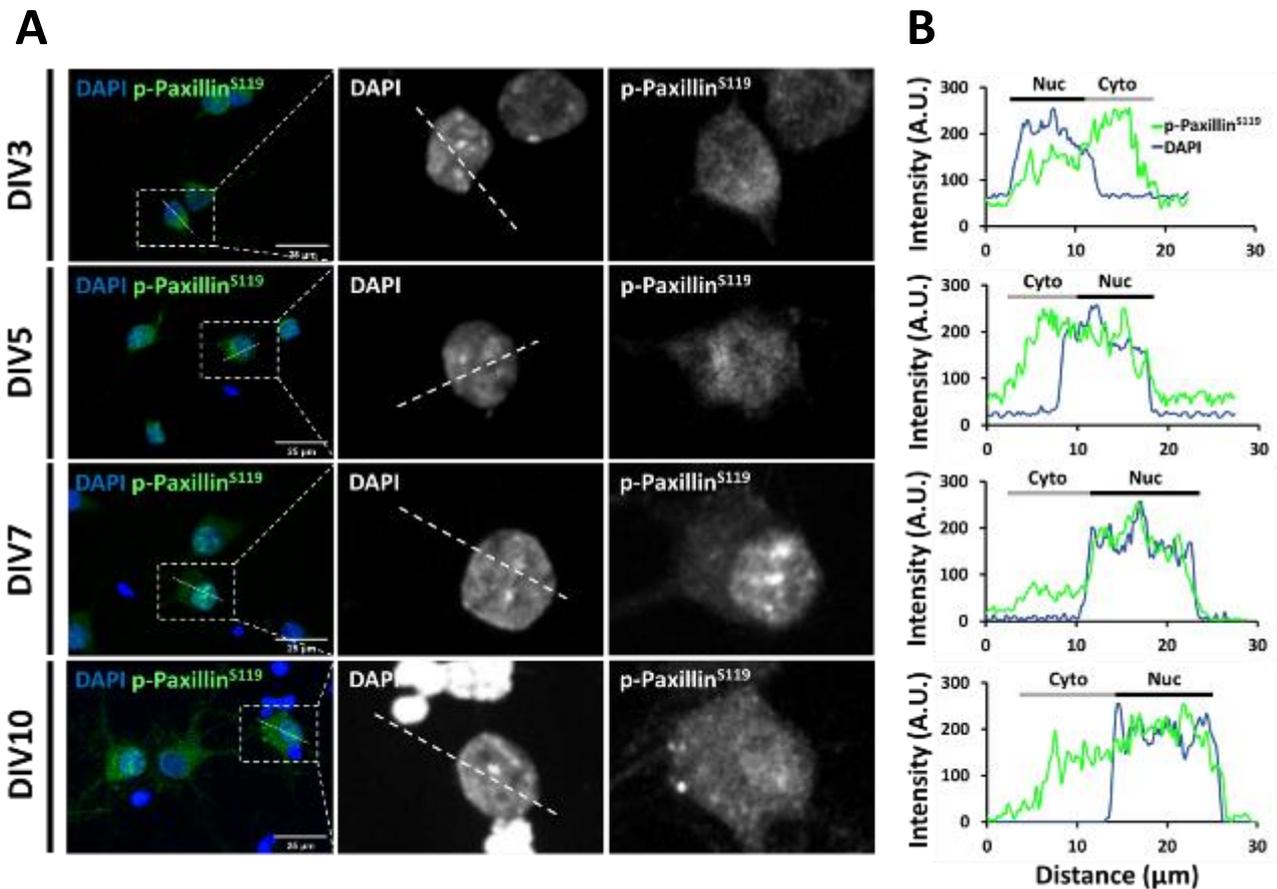
圖二、位於 Focal adhesions 的 Paxillin (López-Colomé et al. 2017)。

Paxillin 的 N 端區域包含五個 LD 結構域 (domain)，富含蛋白質-蛋白質交互作用的位點，能受到不同的蛋白激酶刺激而被磷酸化 (phosphorylation)，例如 Y118 位點被 FAK 磷酸化後，能間接激活 Rac 使細胞骨架重組，進而促使細胞進行遷移。C 端區域包含四個 LIM 結構域，有多個能與其他蛋白結合的位點，例如酪胺酸激酶 PTP-PEST 能藉由 LIM3 和 LIM4 結構域，使其與 Paxillin 結合，並將 Paxillin 定位到 FA 上 (López-Colomé et al. 2017)。

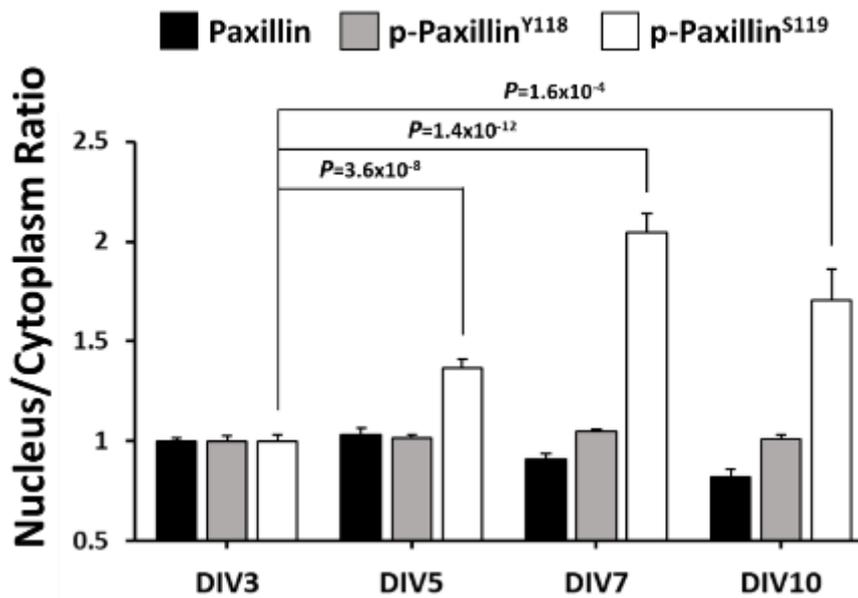
先前的實驗發現，在腦神經成長期間，或神經細胞生長於類似腦部物理環境的軟介質上時，由於 FA 相關蛋白表現量降低，Paxillin 因此傾向與細胞內吞性因子結合而促進囊泡的內陷，加速神經突的生長 (Chang et al. 2017)，這顯示 Paxillin 在神經細胞生長的過程中，具有別於表現在其他非神經細胞時的功能。

二、研究動機

先前的實驗利用大鼠的腦、心臟與肝臟等組織，來尋找神經細胞是否帶有特異性磷酸化的 Paxillin 位點，進而發現在腦組織中，磷酸化 Paxillin^{S119} (phospho-Paxillin^{S119}, p-Paxillin^{S119}) 的表現量高於另外兩種組織。於是我們培養初代神經細胞 (primary neuron)，並在活體外培養的第三、五、七及十天 (days in vitro, DIV) 時，觀察 p-Paxillin^{S119} 在神經細胞中的分布。我們發現隨著天數的增加，p-Paxillin^{S119} 逐漸從細胞質轉移至細胞核中，並且在 DIV7 的時間點達到高峰。如圖三及圖四。



圖三、神經細胞的 p-Paxillin^{S119} 在不同時間點的分布。(A)為初代神經細胞在 DIV3、DIV5、DIV7 及 DIV10 的免疫螢光影像，細胞核使用 DAPI 進行染色。(B)為 DAPI (藍線) 與 p-Paxillin^{S119} (綠線) 在虛線處的螢光強度折線圖；Cyto 為細胞質 (cytoplasm) 的簡寫；Nuc 為細胞核 (nucleus) 的簡寫。



圖四、神經細胞的 p-Paxillin^{S119} 在不同時間點的核質比。核質比之數據為平均值 ± SEM (來自 4 次獨立實驗，每組 n ≥ 13 顆細胞，以 T TEST 進行統計檢定)。

從圖三可以看到在 DIV3 時，p-Paxillin^{S119} 主要位於細胞質中；到了 DIV5 時，較均勻的分佈在細胞中；而在 DIV7 時，可以明顯看到 p-Paxillin^{S119} 主要分布於細胞核中，且核質比是四個時間點中最高的，如圖四；在 DIV10 時，又回到了均勻分布在細胞狀態。由此觀察可知，在神經生長的其間，除了與細胞內吞性因子結合促使神經突的生長之外，Paxillin 還在其他階段有著不同的功能。

神經元發育的過程分成許多階段，從分化、軸突生長、樹突形成到電訊號的成熟，會表達不同的基因、蛋白質與蛋白異構體 (isoform)，但是每個階段轉換的機制到目前為止尚不清楚。特別是 p-Paxillin^{S119} 在形成軸突起始段時間點，能明顯觀察到從細胞質進入細胞核中，或許能透過了解 p-Paxillin^{S119} 進入核的分子機制，以及進核後與哪些蛋白交互作用，來解開神經生長過程中的一環鎖。

三、研究目的

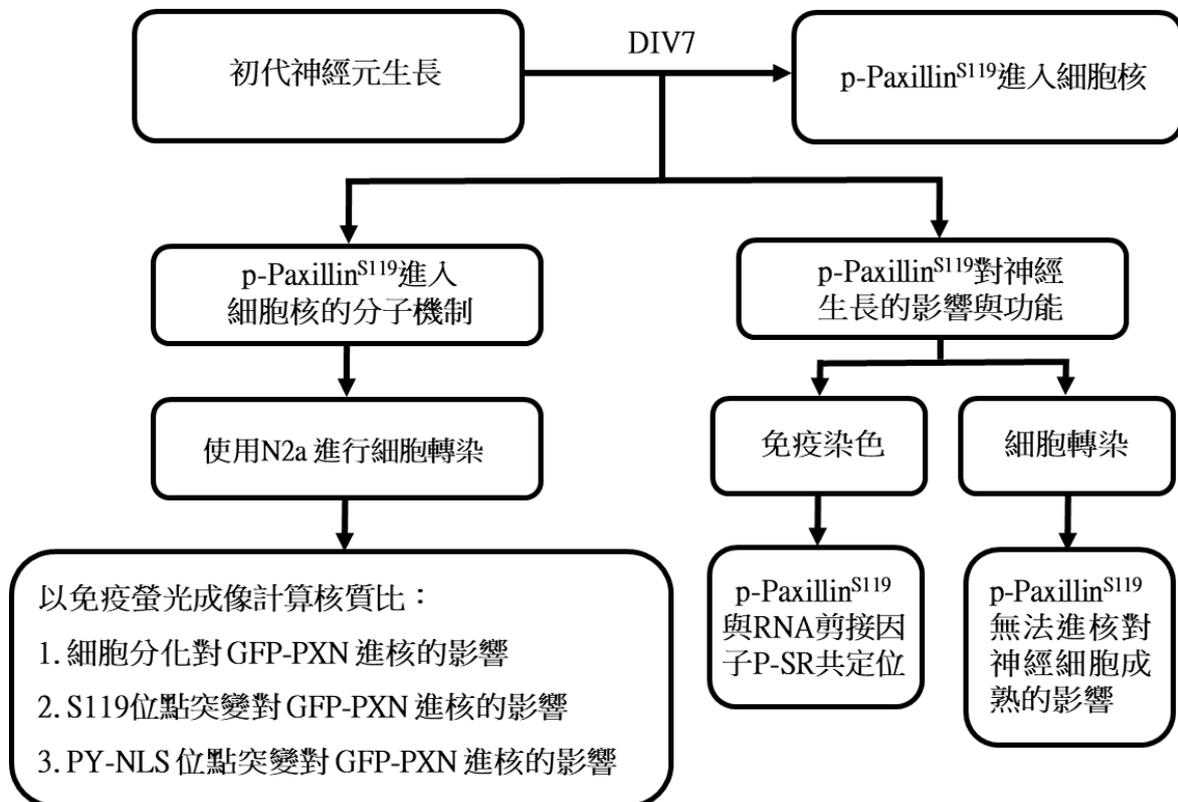
- (一) 探討 p-Paxillin^{S119} 進入細胞核的分子機制
- (二) 探討 p-Paxillin^{S119} 對神經生長的影響與功能

貳、研究設備及器材

用途	儀器設備與軟體
細胞培養	顯微鏡
	細胞培養箱
	無菌細胞操作台
	離心機
蛋白表現量分析	西方點墨法
	免疫共沉澱法
蛋白位置分佈觀察	倒立共軛焦暨超高解析度顯微鏡
數據分析	ImageJ

參、研究過程或方法

一、研究架構圖



二、實驗方法

(一) 細胞繼代培養 (Passage)

本研究採用神經母細胞瘤 Neuro-2a (N2a) 細胞株進行探討 (由實驗室提供)。將培養皿中的培養液移除，加入 1mL PBS (Phosphate buffered saline, PBS) 將殘餘的培養液移除，再加入 2mL 的胰蛋白酶 (trypsin)，並放入含 5% 二氧化碳 (CO₂) 的 37°C 培養箱 (Incubator) 中反應約 2 分鐘後，加入 1mL 培養液，把混和液裝入 15mL 的試管中，以 300g 離心 3 分鐘集中細胞。將上清液抽掉並加入適量含有 10% 胎牛血清 (Fetal bovine serum, FBS)、1mM Sodimm pyruvate 及 2mM L-Glutamine 的 MEM 培養液 (Minimum Essential Medium, MEM) 把細胞均勻打散。拿出新的 10cm 培養皿，先加入 10mL 調配好的培養液，再加入適量含有細胞的培養液，並置於培養箱中培養，待細胞長至約培養盤七、八成滿時，重複上述流程。

(二) 玻片塗層

在 6cm 培養皿中放入 4 片用酒精浸泡 24 小時的 18mm 玻片，用 pH 值 7.4 的 HEPES 把殘留的酒精沖洗掉，加入 3mL 含有 0.2% PLL (Poly L-lysine, PLL) 的 Borate buffer (以 1.24g Boric acid 和 1.9g Borax 溶於 400mL Distillation-Distillation H₂O) 放入 4°C 冰箱反應 16 小時。抽掉溶液，用 pH 值 7.4 的 HEPES 把殘留的 Borate buffer 沖洗掉，再加入 3mL pH 值 7.4 的 HEPES，並靜置在 4°C 冰箱 1 天後，把 HEPES 抽乾即可。

(三) 誘導細胞分化

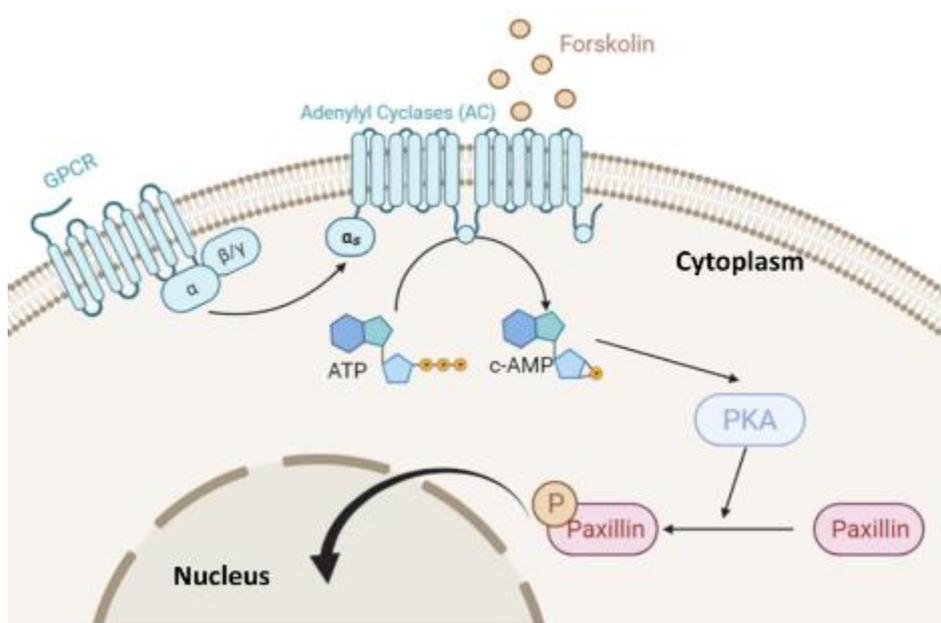
透過降低培養基中的血清 (serum) 濃度促使 N2a 細胞分化。先將細胞種植在含有 10% 胎牛血清的培養基中，然後以特定的比例置換不含血清的培養基，更換 3 次，每次間隔 24 小時，最後以含有 0.25% 胎牛血清的培養基持續培養。以細胞長出 5 μ m 的突觸來判定分化。

表一、培養基更換天數、血清濃度與分化比例

天數 (第)	0	1	2	3	4
血清濃度	10%	1%	0.5%	0.25%	0.25%
分化比例	8.9 \pm 2.3%	16.6 \pm 5.6%	35.2 \pm 10.6%	63.2% \pm 11.7%	84.8% \pm 6.2%

(四) 促進 Paxillin^{S119} 磷酸化

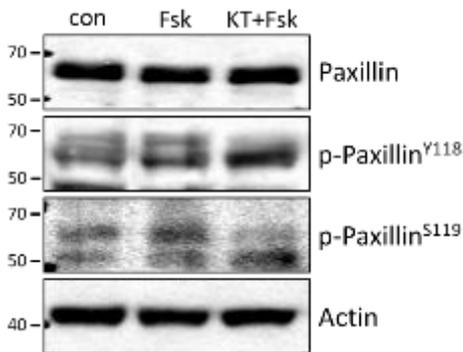
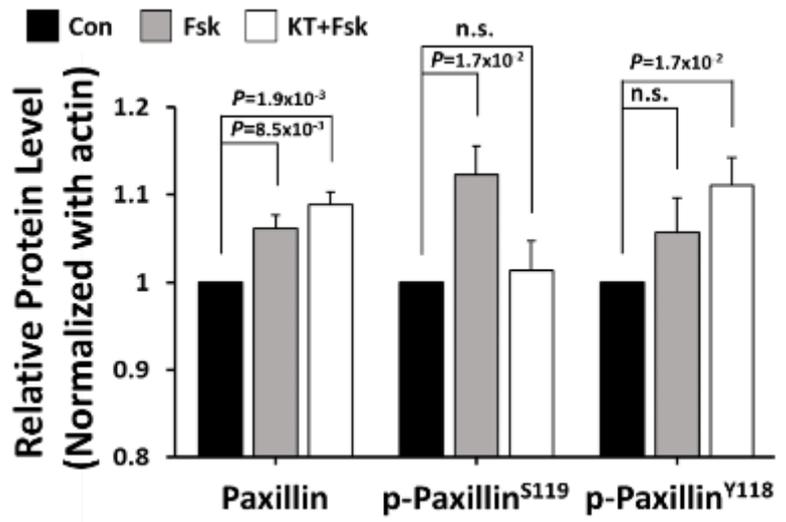
為了使培養 N2a 細胞的分化更完全，和提高 N2a 細胞中 p-Paxillin^{S119} 的表現量，當細胞分化到第四天，在細胞種於塗層玻片的 6cm 培養皿中，加入 3 μ L 的 20mM Forskolin 到 6cm 培養皿中。Forskolin 能夠激活腺苷酸環化酶 (Adenylyl Cyclases, AC)，被激活的 AC 會將細胞內的 ATP 轉換成 cAMP，細胞內 cAMP 的水平提高，會提高 Protein kinase A (PKA) 的活性，活化的 PKA 會磷酸化 Serine 和 Threonine 這兩個點位，進而促使 Paxillin^{S119} 磷酸化。如圖五。



圖五、Forskolin 促進 Paxillin^{S119} 磷酸化的過程。

為了使 N2a 細胞分化更完全，並提高 p-Paxillin^{S119} 在細胞中的表現量，本研究在細胞培養的過程中加入促使 PAK 激活的 Forskolin 進行反應。為了探討 Forskolin 是否能提高 p-Paxillin^{S119} 的表現量，使用未分化的 N2a 細胞，分析並比較 Paxillin、p-Paxillin^{Y118} 及 p-Paxillin^{S119}，在有無 Forskolin 處理的表現量，如圖六。

由圖六可知，p-Paxillin^{S119} 的表現量能透過 Forskolin 而提高，且不影響 Paxillin 與 p-Paxillin^{Y118} 的表現量。經過 KT5720 處理的細胞，加入 Forskolin 反應後，p-Paxillin^{S119} 的表現量維持在一般的水平，代表 p-Paxillin^{S119} 表現量的增加是能藉由 Forskolin 促使 PAK 活化而導致的。於是實驗以細胞在 20 μ M Forskolin 反應 1 小時為基準，探討 p-Paxillin^{S119} 進入細胞核的機制。

A**B**

圖六、Forskolin 對 Paxillin、p-Paxillin^{Y118} 及 p-Paxillin^{S119} 表現量的影響。(A)為西方墨點法的結果。(B)為統計結果，黑色組為未經任處理的細胞；灰色組為經 20 μ M Forskolin 反應一個小時的細胞；白色組為經 0.5 μ M 的 PAK 抑制劑 KT5720 (KT) 反應三十分鐘，再加入 20 μ M Forskolin 反應一個小時的細胞。表現量之數據為平均值 \pm SEM (來自 3 次獨立實驗，not significant (n.s.) 表示數據沒有顯著差異 ($P > 0.05$)，以 T TEST 進行統計檢定)。

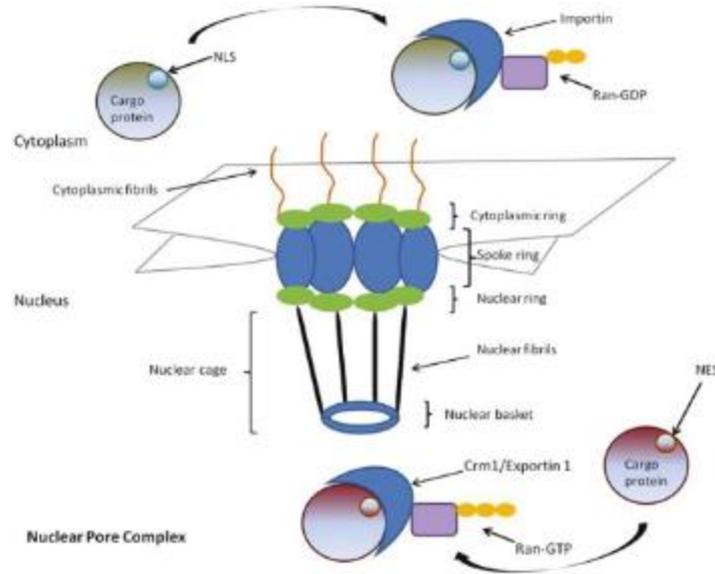
(五) 細胞轉染

首先將 N2a 細胞以 8×10^6 cells/dish 種於含有 4 片 18mm 玻片的 6cm 培養皿上 16 約小時，使要轉染的細胞控制在站培養皿四到五成滿左右。在 eppendorf 中加入 800 μ L Opti-MEM (Reduced Serum Media)、4 μ L 脂質體 (Lipofectamine) 及 4 μ g 質體 DNA 均勻混和之後，靜置 25 分鐘。將溶液加入培養皿中進行轉染，6 小時後再將舊的培養基移出，換置新的 MEM 培養液。

(六) Paxillin PY-NLS 判定

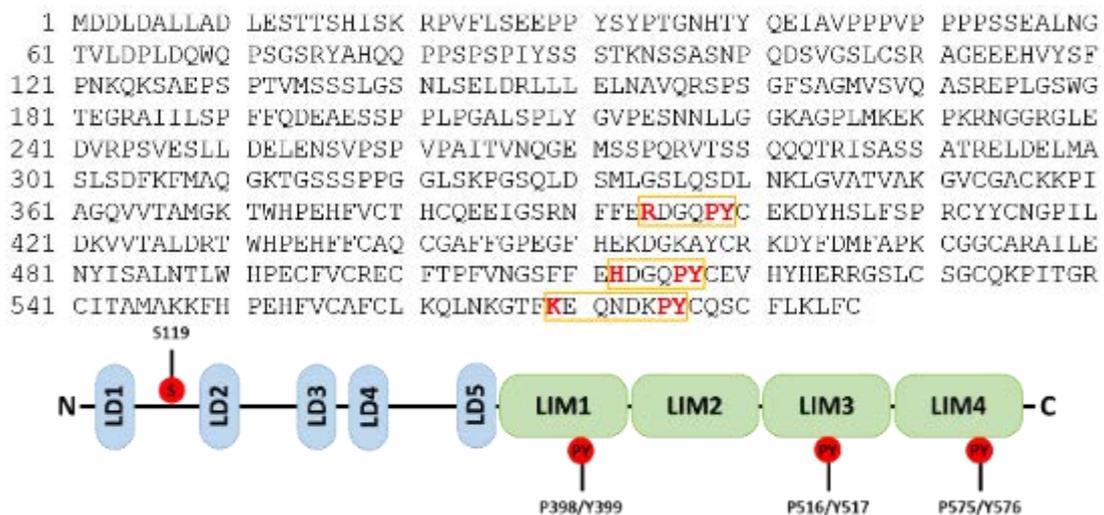
蛋白質從細胞質進入到細胞核，需要帶有核定位序列 (nuclear localization signal, NLS)，由核轉運蛋白 (Karyopherin) 所辨識並帶入細胞核中，在傳統型核定位序列 (classical nuclear localization signals, cNLS)，由 importin 來執行。importin 有兩個亞基：importin α 與 importin β 。在轉運的過程中，首先由 importin α 來辨識 cNLS 並與蛋白質結合成複合物，importin β 再與 importin α 結合並與核孔 (Nuclear pore) 交互作用，將複合物從細胞質擴散到細胞核中，接

下來 Ran-GTP 會與 importin α & β 結合，此時 importin 會與蛋白質分離，然後 RCC1 會將 Ran-GTP 水解成 Ran-GDP，使 importin α & β 帶離細胞核 (Nguyen et al. 2012)，如圖七。



圖七、蛋白質進入細胞核的過程 (Nguyen et al. 2012)。

我們將大鼠的 Paxillin 氨基酸序列帶入 NLS prediction software 網站進行分析，沒有檢測到 Paxillin 帶有 cNLS 位點。接者以非傳統型核定位序列 Non-classical nuclear localization signals (ncNLS) 進行對比，在 Paxillin 的 LIM 結構域上找到三個有淺力被轉運蛋白 Importin β 2 所辨識的 PY-NLS 位點，分別是 P398/Y399、P516/Y517 及 P575/576，如圖八。該序列的判斷條件為：[basic/hydrophobic]-X_n-[R/H/K]-(X)₂-s-PY。



圖八、Paxillin 氨基酸序列與推測 PY-NLS 的位點。

為了檢測這三個位點是否為有效的 NLS，我們破壞了標誌序列 (Proline 與 Tyrosine 改變成 Alanine)，並製作成帶有 GFP 的 mutant (由實驗室提供)，再將其轉染進 N2a 細胞中觀察與分析 GFP-PXN 的分布 (PXN 為 Paxillin 的基因名)。

(七) 西方墨點法 (Western blot)

先將細胞裂解液的上清液做蛋白質定量分析，接著取質量 60 μ g 之蛋白質進行十二烷基硫酸鈉聚丙烯醯胺凝膠電泳 (SDS-PAGE)。隨後將海綿、圖畫紙、凝膠、聚偏氟乙烯膜 (PVDF membrane) 依序放入轉印槽，使凝膠上的蛋白質轉印到 PVDF membrane 上。轉印槽中倒入 Transfer buffer (含有 25mM Tris、192mM glycine 及 20% methanol 的 ddH₂O)，以 100 伏特的電壓轉印 1.5~2 小時。接著使用含有 5% 脫脂奶粉之 TBS-T (Tris-buffered saline/Tween-20) 緩衝液覆蓋 PVDF membrane。使 membrane 上非專一性抗體結合覆蓋住，此 blocking 步驟於室溫下進行 1 小時。Blocking 結束後，倒掉奶粉溶液，以 TBS-T 沖洗 membrane 三次，每次 5 分鐘。之後加入以 Blocking buffer 稀釋的一級抗體 (Primary antibodies)，於 4 $^{\circ}$ C 冷房中作用 16 小時以上或過夜，使一級抗體結合在預測之蛋白質上。接下來以 TBS-T 沖 membrane 三次，每次 2 分鐘。接著加入以 Blocking buffer 稀釋的二級抗體 (Secondary antibodies)，於室溫下 1 小時，隨後亦以 TBS-T 沖洗 membrane 三次，每次 2 分鐘。洗淨之 membrane 最後加入化學發光底物 (ECL) 作用約 1 分鐘，以專用之透明塑膠膜封住 PVDF membrane，並放入 X 光片夾 (Hypercassette) 中曝光，最後送入壓片沖片機中成像。

(八) 免疫螢光染色

將種於 4 片 18mm 玻片的細胞，移除培養基，並置換成 PBS 清洗一次後，加入含有 4% PFA 與 4% 蔗糖的 PBS 固定細胞 12 分鐘。接著以含有 0.1% triton x 100 的 PBS 處理細胞 12 分鐘。加入含有 3% Bovineserum albumin (BSA) 的 PBS，在 4 $^{\circ}$ C 靜置 1 小時。將一級抗體與 DAPI 加至含有 3% BSA 的 PBS 中，混和均勻後覆蓋整個玻片，在 4 $^{\circ}$ C 過夜後以 PBS 清洗三次，每次 5 分鐘。將二級抗體加至含有 3% BSA 的 PBS 中，混和均勻後覆蓋整個玻片，在室溫作用 2 小時，接著以 PBS 清洗三次，每次 5 分鐘。將液體吸去，加入 PBS 靜置保存。抗體的名稱及標示蛋白如表。

表二、抗體的名稱及標示蛋白

標示蛋白	一級抗體（皆以 1 : 1000 稀釋）	二級抗體（皆以 1 : 1000 稀釋）
p-Paxillin ^{S119}	rabbit anti p-Paxillin ^{S119}	Goat anti rabbit IgG (Alex 561)
		Goat anti rabbit IgG (Alex 647)
P-SR	mouse anti P-SR	Goat anti mouse IgG (Alex 488)
		Goat anti mouse IgG (Alex 561)
Importin β 2	mouse anti Importin β 2	Goat anti mouse IgG (Alex 488)
Ankyrin G	rabbit anti Ankyrin G	Goat anti rabbit IgG (Alex 561)

（九）免疫共沉澱法 (Co-immunoprecipitation)

為了探討細胞內特定蛋白質是否與其他蛋白質形成複合體，產生交互作用。首先在 eppendorf 中加入 1 μ g 一種已知蛋白的一級抗體與 25 μ g 純化用磁珠 (Magnetic beads for purification)，置上機台緩慢旋轉，在 4°C 下均勻混合 4~6 小時。取含 1000 μ g 蛋白質裂解液，再加入 IP binding buffer 將溶液補置總體積 1mL，置上機台緩慢旋轉，在 4°C 下反應過夜。作用後以每分鐘 4000 轉離心 3 分鐘，去除上清液後，使用 NG buffer 清洗三次，再加入 sample buffer 以 100°C 煮 12 分鐘，便可分離磁珠與蛋白複合體。透過西方墨點法的方式將蛋白質轉印到 PVDF membrane 上，以帶有 HRP 的二級抗體偵測複合體中是否含有欲探討之蛋白質，如果被蛋白其抗體辨識到，證明已知蛋白的確會與有之其蛋白質形成複合體，並具有交互作用。

（十）數據分析

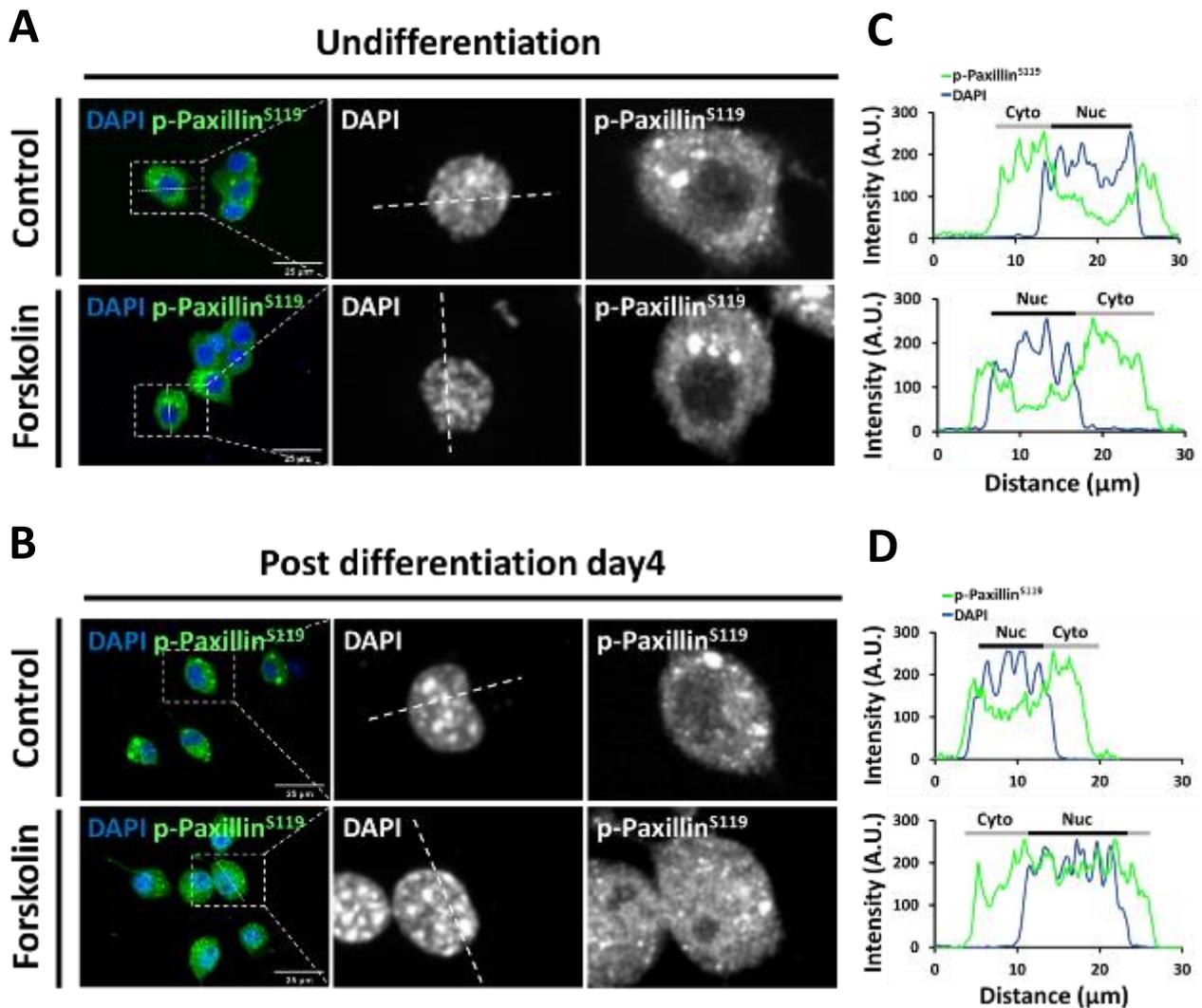
將共軛焦顯微鏡下所拍攝的照片進行疊圖，以相同參數調整螢光強度，並以 ImageJ 軟體測量細胞的細胞質與細胞核面積，以及所標示蛋白的螢光表現量，蛋白的表現量除以所占的面積後，取得核質比。將所得數據使用 Excel 軟體進行統計分析。

肆、研究結果

一、探討 N2a 細胞分化與否對 p-Paxillin^{S119} 進入細胞核的影響

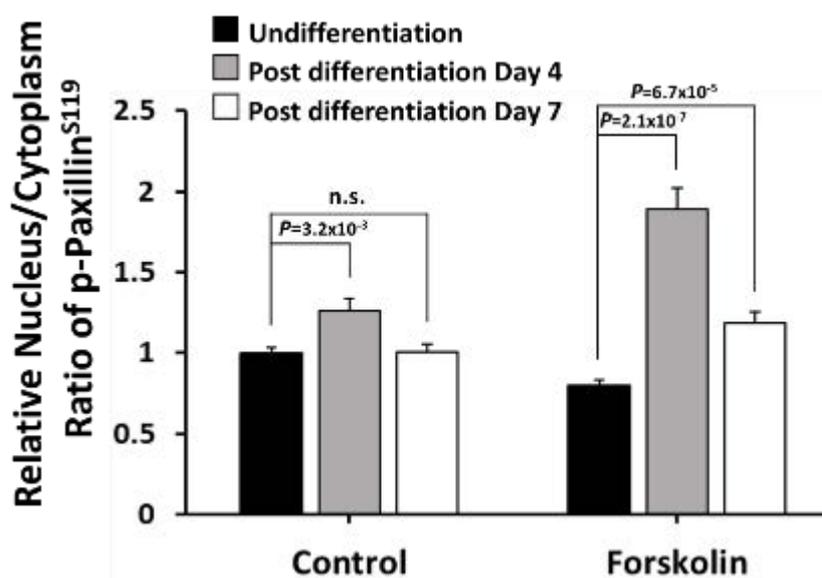
(一) 以螢光影像分析 p-Paxillin^{S119} 核質比

本研究在初代神經元中觀察到 p-Paxillin^{S119} 進入到細胞核當中，由於神經細胞在進行活體外培養前就開始進行分化，為了確認 p-Paxillin^{S119} 進核是否與神經細胞分化有關，所以比對未分化與分化的 N2a 細胞中 p-Paxillin^{S119} 的核質比。如圖九及十。



圖九、N2a 細胞的 p-Paxillin^{S119} 在細胞未分化與分化時的分布。(A)為未分化 (undifferentiation) 的 N2a 細胞螢光影像，細胞核使用 DAPI 進行染色。細胞在含有 10% FBS 的培養液中培養四天後，加入 20 μ M Forskolin 反應 1 小時，再將其製作成樣本。(B)為分化 (differentiation) 的 N2a 細胞螢光影像，細胞核使用 DAPI 進行染色。以降低 FBS 濃度使 N2a 向神經型態分化，分化至第四天時，細胞在含有 0.25% FBS 的培養液中培養，並加入 20 μ M Forskolin 反應 1 小時，

再將其製作成樣本。(C&D)分別為(A&B)中，DAPI (藍線) 與 p-Paxillin^{S119} (綠線) 在虛線處的螢光強度折線圖；Cyto 為細胞質 (cytoplasm) 的簡寫；Nuc 為細胞核 (nucleus) 的簡寫。

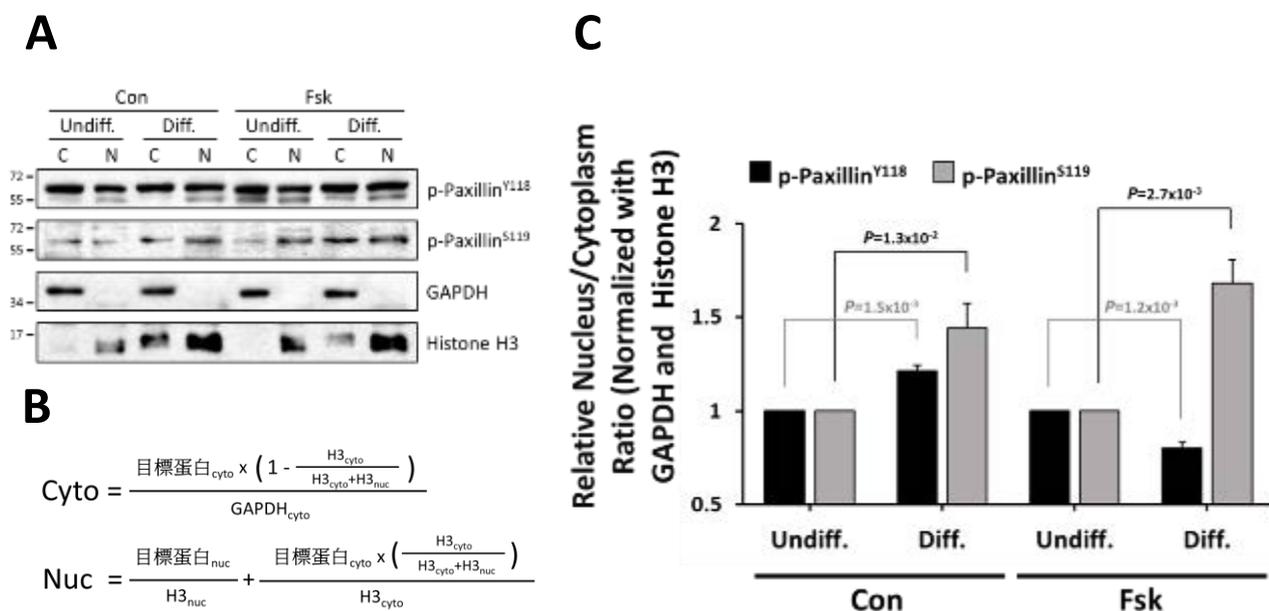


圖十、N2a 細胞的 p-Paxillin^{S119} 在細胞未分化與分化時的核質比。黑色組為未分化的細胞；灰色組為分化至第四天的細胞；白色組為分化至第七天的細胞。核質比之數據為平均值 \pm SEM (來自 2 次獨立實驗，每組 $n \geq 10$ 顆細胞，not significant (n.s.) 表示數據沒有顯著差異 ($P > 0.05$)，以 T TEST 進行統計檢定)。

比較圖九(A)與(B) p-Paxillin^{S119} 的螢光影像可以觀察到，在 N2a 細胞向神經型態進行分化時，細胞核內 p-Paxillin^{S119} 的分布明顯增加，而有 Forskolin 反應的細胞，增加的程度更顯著。在神經細胞中 p-Paxillin^{S119} 進入到細胞核是有時段性的，所以我們比較了未分化、分化至第四天與分化至第七天時，N2a 細胞的 p-Paxillin^{S119} 核質比，從圖十的統計結果可知，控制組與有 Forskolin 反應組中，分化至第四天的核質比與未分化的核質比相比皆有顯著的提高，且有 Forskolin 反應組的差異更大。而分化至第七天的核質比與未分化的核質比相比則沒有顯著差異，表示 p-Paxillin^{S119} 進核在 N2a 細胞向神經型態分化的期間是有時段性的。

(二) 西方墨點法測量細胞質與細胞核中蛋白質表現量

接下來我們透過西方墨點法進行分析，測量未分化與分化至第四天的 N2a 細胞中，p-Paxillin^{S119} 在細胞質與細胞核的表現量。如圖十一。



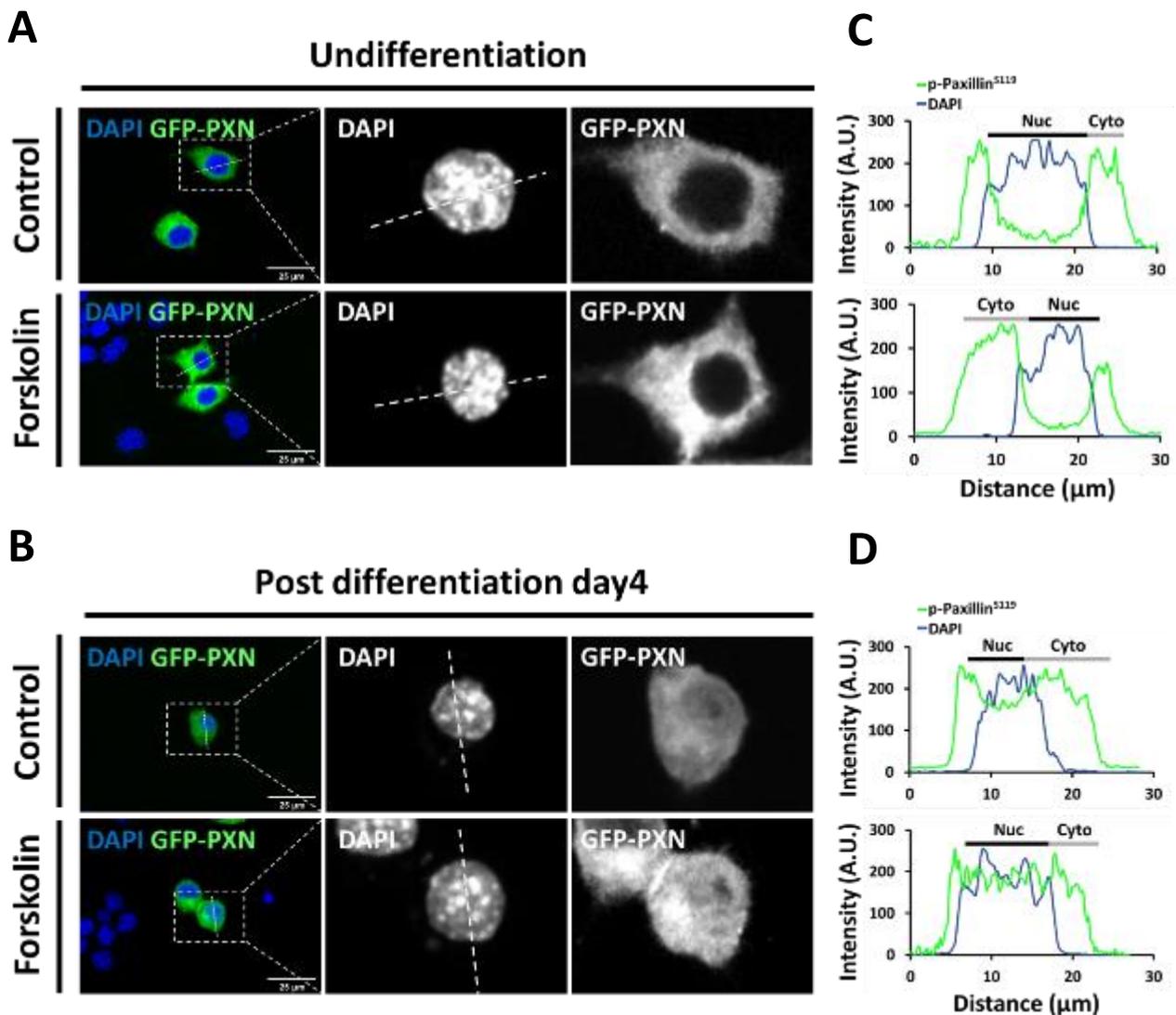
圖十一、N2a 細胞的 p-Paxillin^{S119} 在細胞未分化與分化時位於細胞質與細胞核中的表現量。(A) 為西方墨點法的結果。(B) 為細胞質 (Cyto) 與細胞核 (Nuc) 數值的計算方式。(C) 為統計結果，黑色組為 p-Paxillin^{Y118}；灰色組為 p-Paxillin^{S119}。Undiiff.代表未分化的 N2a 細胞；Diiff.代表分化至第四天的 N2a 細胞。核質比之數據為平均值 ± SEM (來自 3 次獨立實驗，以 T TEST 進行統計檢定)。

從圖十一(A)可知在對細胞進行核質分離時，部分的核模和細胞膜一起被打破，所以位於細胞核的蛋白 Histone H3 在 PVDF membrane 上細胞質的區域有些少的表現，為了校正因其所帶來的誤差，細胞質與細胞核的數值使用圖十一(B)所示的方式計算，再將兩數值相除取得核質比。從圖十的統計結果可知，控制組與有 Forskolin 反應組中，分化至第四天的核質比與未分化的核質比相比皆有顯著的提高，且有 Forskolin 反應組的差異更大。此結果與螢光影像分析的結果相同。以上結果可知 p-Paxillin^{S119} 進入細胞核需透過 N2a 細胞向神經型態分化的引導。

二、探討不同 GFP-PXN mutant 在 N2a 細胞分化時能否進入細胞核

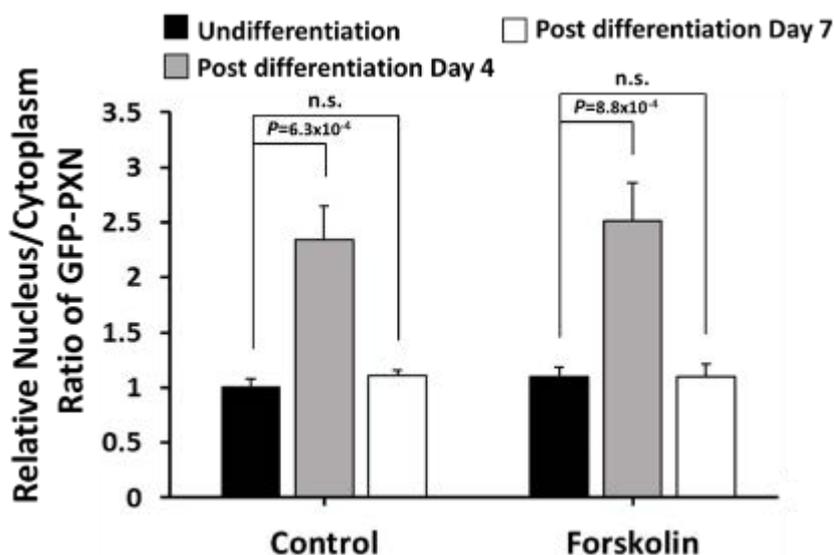
(一) N2a 細胞分化對 GFP-PXN 能否進入細胞核的影響

欲探討 p-Paxillin^{S119} 進入細胞的分子機制，使用 GFP-PXN mutant 對 N2a 細胞進行轉染。為了區分細胞原生與轉染進去的 Paxillin，在 mutant 中 Paxillin 的氨基酸序列後方接上會自發螢光的蛋白 GFP (Green fluorescent protein) 之胺基酸序列。首先將未點突變的 GFP-PXN (wild type, WT)，轉染進 N2a 細胞中，觀察 GFP-PXN 在未分化與分化至第四天的 N2a 細胞中的分布情形，並比較其核質比。如圖十二及十三。



圖十二、轉染進 N2a 細胞的 GFP-PXN 在細胞未分化與分化時的分布。(A)為未分化的 N2a 細胞螢光影像，細胞核使用 DAPI 進行染色。細胞在含有 10% FBS 的培養液中培養至第三天時進行細胞轉染，6 小時後更換一次含有 10% FBS 的培養液，靜置 24 小時後再加入 20μM Forskolin 反應 1 小時，再將其製作成樣本。(B)為分化的 N2a 細胞螢光影像，細胞核使用 DAPI

進行染色。以降低 FBS 濃度使 N2a 向神經型態分化，分化至第三天時進行細胞轉染，6 小時後更換一次含有 0.25% FBS 的培養液，靜置 24 小時後再加入 20 μ M Forskolin 反應 1 小時，再將其製作成樣本。(C&D)分別為(A&B)中，DAPI (藍線) 與 p-Paxillin^{S119} (綠線) 在虛線處的螢光強度折線圖；Cyto 為細胞質 (cytoplasm) 的簡寫；Nuc 為細胞核 (nucleus) 的簡寫。

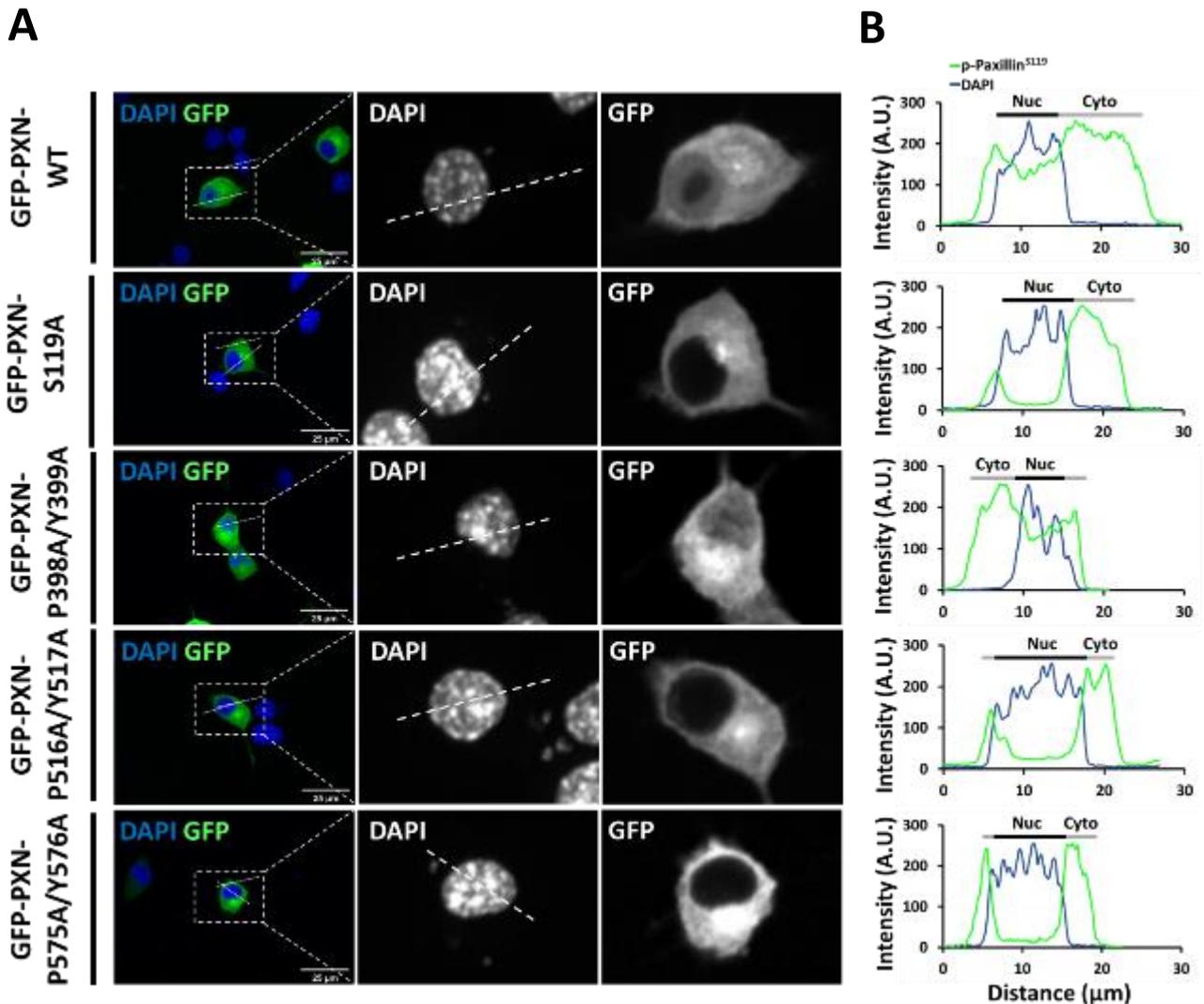


圖十三、轉染進 N2a 細胞的 GFP-PXN 在細胞未分化與分化時的核質比。黑色組為未分化的細胞；灰色組為分化至第四天的細胞；白色組為分化至第七天的細胞。數據代表平均值 \pm SEM (來自 2 次獨立實驗，每組 $n \geq 8$ 顆細胞，not significant (n.s.) 表示數據沒有顯著差異 ($P > 0.05$)，以 T TEST 進行統計檢定)。

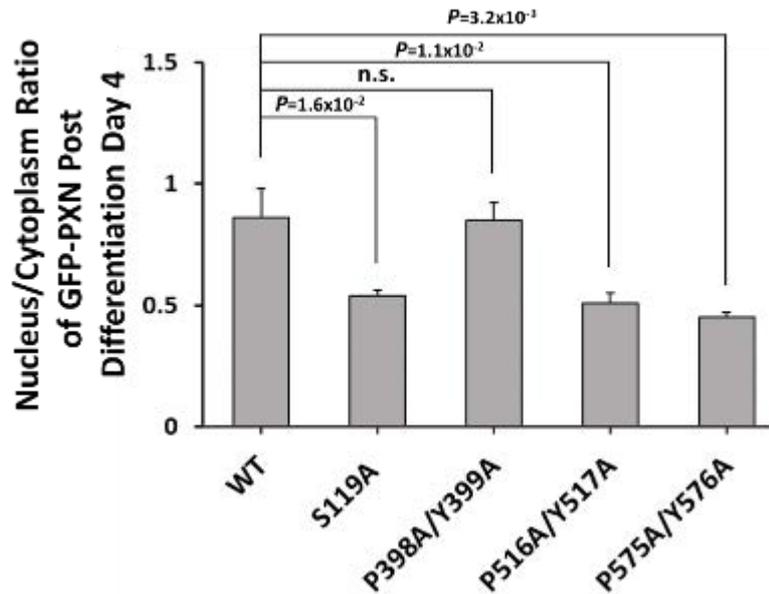
比較圖十二(A)與(B) GFP-PXN 的螢光影像可以觀察到，在 N2a 細胞向神經型態分化時，細胞核內 GFP-PXN 的分布明顯增加，而有 Forskolin 反應的細胞，增加的程度更顯著。從圖十三的統計結果可知，控制組與有 Forskolin 反應組中，分化至第四天的核質比與未分化的核質比相比皆有顯著的提高。而分化至第七天的核質比與未分化的核質比相比則沒有顯著差異。表示帶有 GFP 的 Paxillin，在 N2a 細胞向神經型態分化的其間，能夠進入細胞核，不受到 GFP 的影響。

(二) S119 與 PY-NLS 位點突變對 GFP-PXN 進入細胞核的影響

為了釐清 GFP-PXN 進入細胞核是否需要 S119 位點被磷酸化，以及 Paxillin 是否帶有我們預測的 PY-NLS，接下來將 S119 與 PY-NLS 位點點突變為 Alanine 的 GFP-PXN mutant 對 N2a 細胞進行轉染，在 N2a 細胞分化至第四天的狀態下，與 WT 進行比較。如圖十四及十五。



圖十四、轉染進 N2a 細胞的不同點突變之 GFP-PXN 在細胞分化時的分布。(A)為分化的 N2a 細胞螢光影像，細胞核使用 DAPI 進行染色。以降低 FBS 濃度使 N2a 向神經型態分化，分化至第三天時進行細胞轉染，6 小時後更換一次含有 0.25% FBS 的培養液，靜置 24 小時後再加入 20 μM Forskolin 反應 1 小時，再將其製作成樣本。(B)為 DAPI (藍線) 與 GFP-PXN (綠線) 在虛線處的螢光強度折線圖；Cyto 為細胞質 (cytoplasm) 的簡寫；Nuc 為細胞核 (nucleus) 的簡寫。



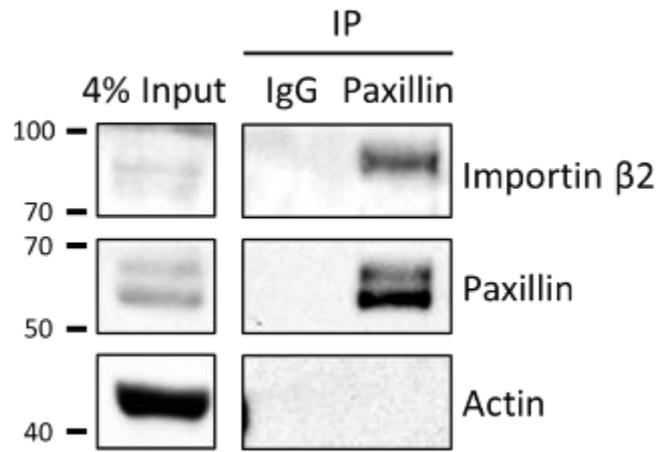
圖十五、轉染進 N2a 細胞的不同點突變之 GFP-PXN 在細胞分化時的核質比。核質比數據代表平均值 \pm SEM(來自 2 次獨立實驗，每組 $n \geq 9$ 顆細胞，not significant (n.s.) 表示數據沒有顯著差異 ($P > 0.05$)，以 T TEST 進行統計檢定)。

比較圖十四(A)的 GFP-PXN 螢光影像可以觀察到，S119 與 P516/Y517 和 P575/Y576 點突變，和 WT 相比之下，皆明顯降低 GFP-PXN 在細胞核的分布，而 P398/Y399 點突變則沒有明顯差異。從圖十五的統計可以看到，S119A 與 WT 相比有顯著的差異，表示了 Paxillin 進入細胞核是需要 S119 位點被磷酸化。而 P516/Y517 和 P575/Y576 與 WT 相比也有顯著的差異，代表這兩個位點的破壞會使 GFP-PXN 無法進入細胞核。

三、探討 Importin $\beta 2$ 活性對 p-Paxillin^{S119} 進核的影響

(一) Importin $\beta 2$ 與 Paxillin 在初代神經細胞中是否會進行交互作用

為了更進一步確認與了解 Paxillin 的進核機制，前述有提到 PY-NSL 是經由 Importin $\beta 2$ 辨識並帶入細胞核中，所以我們在 p-Paxillin^{S119} 於初代神經細胞中開始進入到細胞核的 DIV5 時間點，使用免疫共沉澱法，來探討 Importin $\beta 2$ 與 Paxillin 是否會進行交互作用。如圖十六。



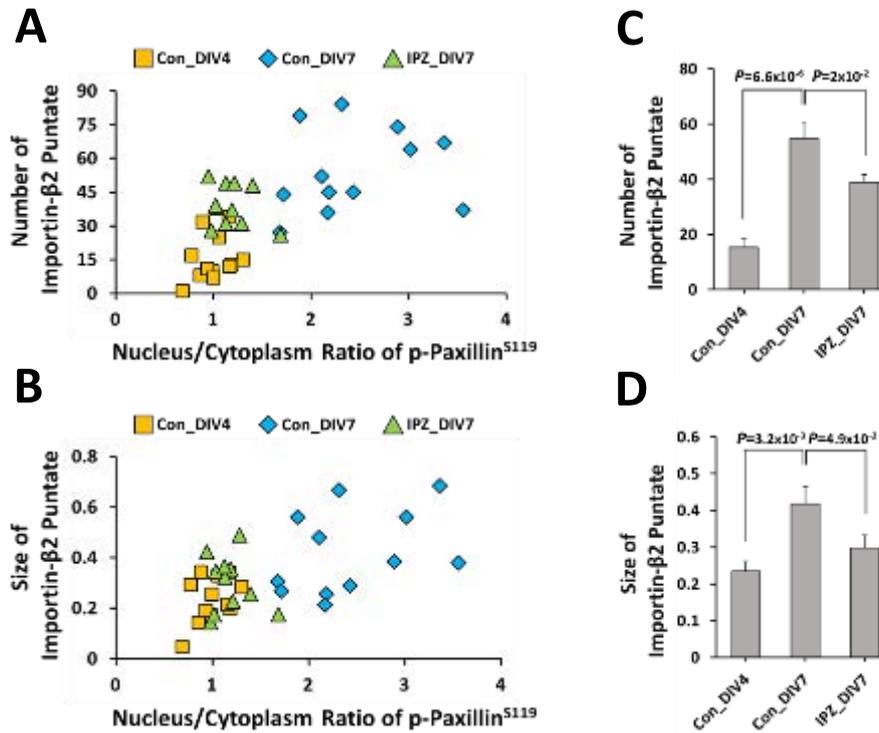
圖十六、Importin $\beta 2$ 與 Paxillin 在初代神經細胞於活體外培養至第五天時進行交互作用。

使用磁珠與 Paxillin 的一級抗體使神經細胞中的蛋白質進行沉澱，在利用 Importin $\beta 2$ 的抗體辨識其蛋白。我們可以看到 Importin $\beta 2$ 被該抗體所辨識到，表示在 DIV5 的神經細胞中，Paxillin 與 Importin $\beta 2$ 會形成複合體，並進行交互作用。

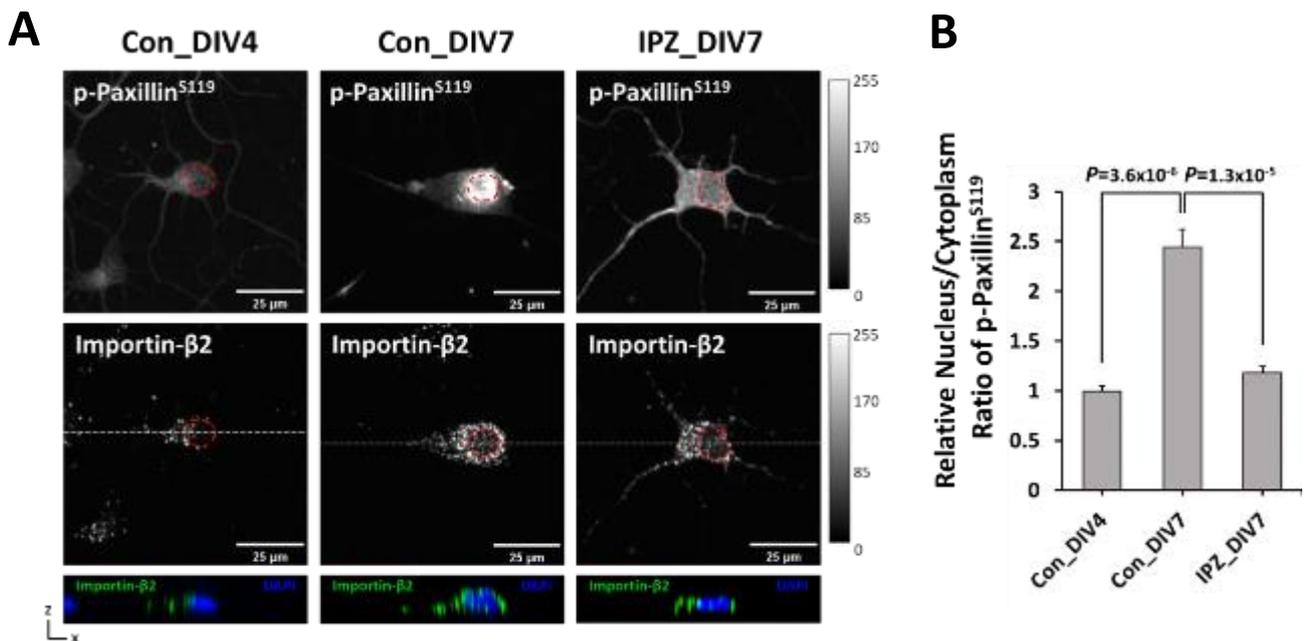
(二) 抑制 Importin $\beta 2$ 特性對 p-Paxillin^{S119} 進核的影響

接下來我們在初代神經細胞於活體外培養的第四天 (DIV4) 與第六天 (DIV6)，加入 $5\mu\text{M}$ Importin β 的抑制劑 Importazole (IPZ)，探討 Importin $\beta 2$ 與 Paxillin 的交互作用是否受到影響。從螢光影像我們觀察到 Importin $\beta 2$ 在神經細胞中呈現顆粒狀的型態，而 IPZ 是一種能阻斷 Importin β 與目標蛋白結合的一種藥劑，於是我們以 Importin $\beta 2$ 的顆粒數量與大小，來判斷 Importin $\beta 2$ 是否受到 IPZ 的影響。如圖十七(C)與(D)所示，加入 IPZ 反應後，神經細胞中 Importin $\beta 2$ 的顆粒數量與大小皆有顯著的下降，並且發現 Importin $\beta 2$ 的顆粒數量與大小和 p-Paxillin^{S119} 進核程度呈現正相關，如圖十七(A)與(B)所示。

我們使用螢光影像觀察 Importin $\beta 2$ 與 p-Paxillin^{S119} 核神經細胞中的分布，如圖十八(A)。可以觀察到正常生理狀況下，在 DIV7 的神經細胞，p-Paxillin^{S119} 聚集在細胞核中，並且 Importin $\beta 2$ 會圍繞在細胞核的外圍；而受到 IPZ 影響的神經細胞，p-Paxillin^{S119} 與 Importin $\beta 2$ 則是散佈在細胞質中，p-Paxillin^{S119} 的核質比如圖十八(B)，與控制組相比有顯著的下降，表示抑制 Importin $\beta 2$ 的特性會使 p-Paxillin^{S119} 的無法進入細胞核。



圖十七、神經細胞的 Importin $\beta 2$ 顆粒數量與大小在 IPZ 反應下的影響。(A&B)分別為神經細胞中 Importin $\beta 2$ 的顆粒數量和大小，與 p-Paxillin^{S119} 核質比的分布圖。黃色正方形與藍色四邊形別為正常生理狀態下，於活體外培養至第四天 (DIV4) 與第七天 (DIV7) 的神經細胞，綠色三角形為活體外培養至第四天 (DIV4) 與第六天 (DIV6) 在 5 μ M IPZ 反應 3 小時，並持續生長至第七天的神經細胞。(C&D)分別 Importin $\beta 2$ 的顆粒數量和大小之平均值 \pm SEM (來自 2 次獨立實驗，每組 $n \geq 12$ 顆細胞，以 T TEST 進行統計檢定)。

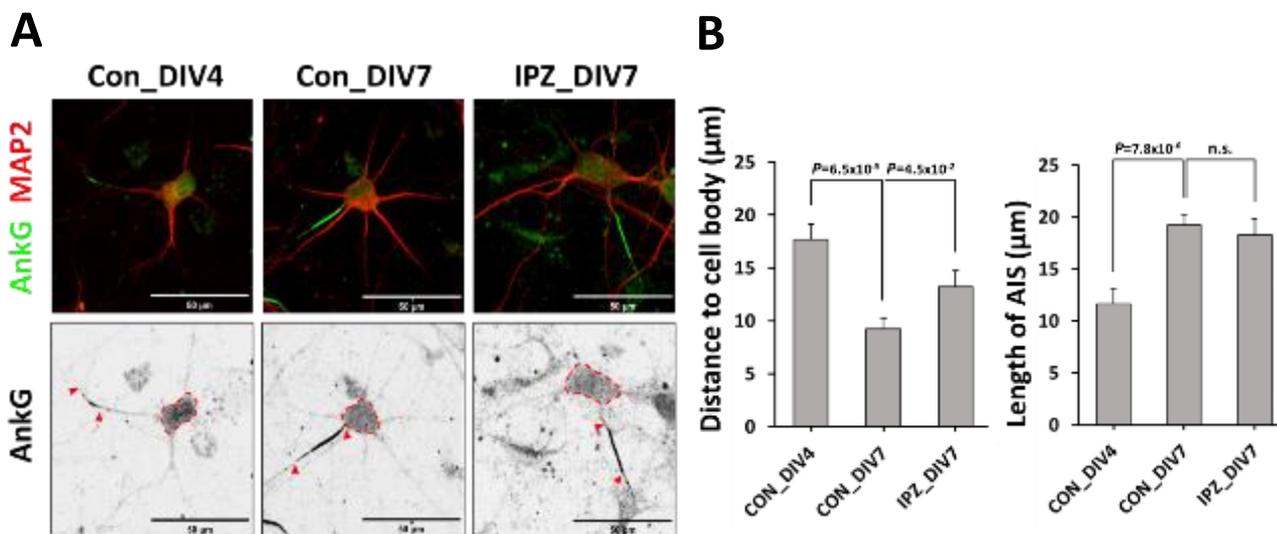


圖十八、神經細胞的 Importin $\beta 2$ 與 p-Paxillin^{S119} 在 IPZ 反應下的分布與核質比。(A)為神經細胞的 Importin $\beta 2$ 與 p-Paxillin^{S119} 在正常生理狀態與受到 IPZ 反應下時的螢光影像。紅色虛線為

細胞核的位置。最下方圖片為白色虛線處的側視圖，細胞核使用 DAPI 進行染色。(B)為神經細胞的 p-Paxillin^{S119} 在正常生理狀態與受到 IPZ 反應下時的核質比，核質比之數據為平均值 ± SEM (來自 2 次獨立實驗，每組 n ≥ 12 顆細胞，以 T TEST 進行統計檢定)。

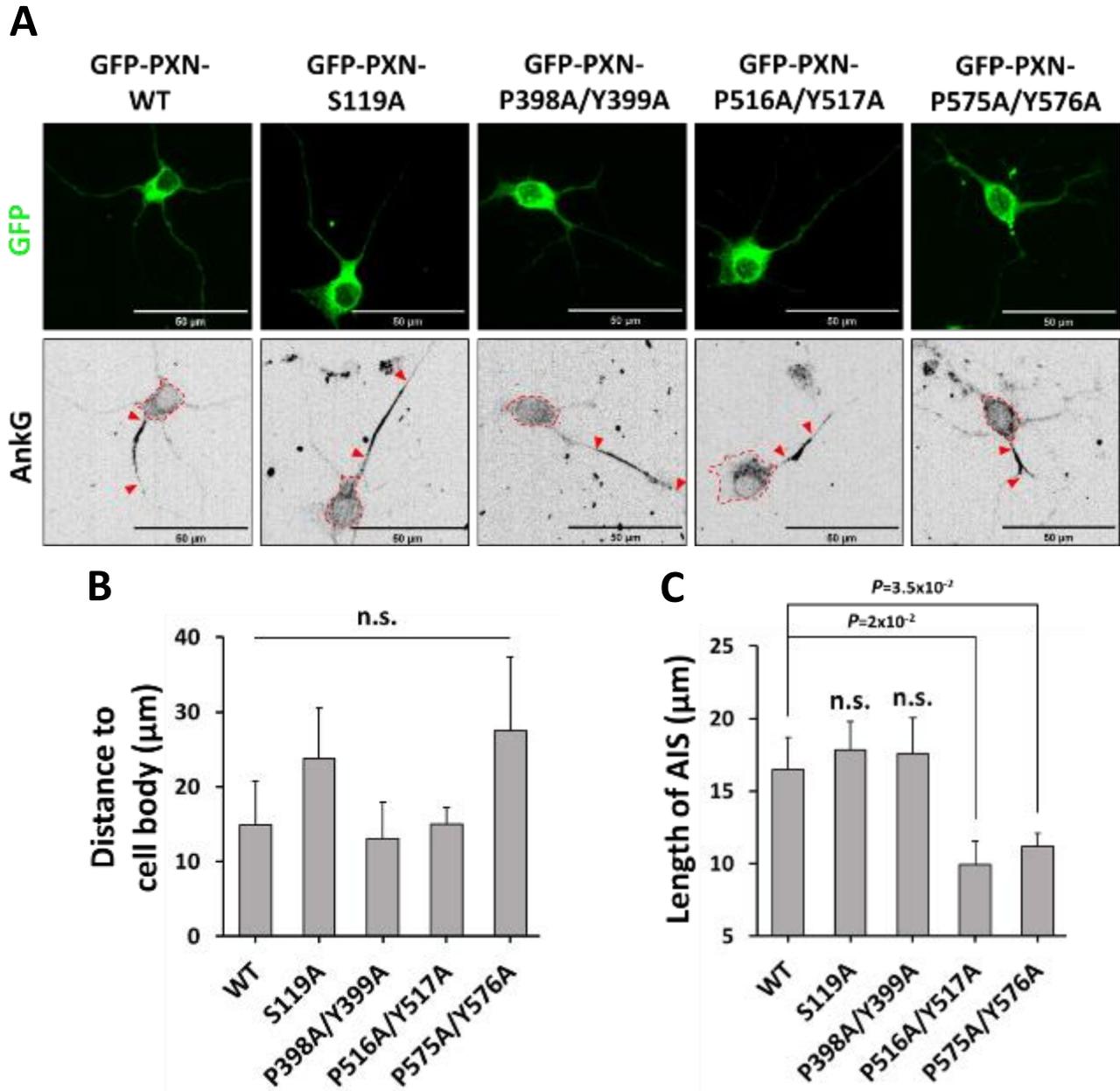
四、探討阻斷 p-Paxillin^{S119} 進入細胞核對神經成熟程度的影響

神經細胞在活體外培養至第四天時，軸突起始段會在距離細胞本體約莫為 20 至 40 μm 之處開始形成，隨著神經細胞的成熟，軸突起始段長度增加，並向細胞本體靠近，所以我們藉由分析軸突起始段與細胞本體間的距離和長度，來判定阻斷 p-Paxillin^{S119} 無法進入細胞核是否對神經細胞的成熟度影響。我們使用 IPZ 抑制了 Importin β2 的活性，讓 p-Paxillin^{S119} 無法進入到細胞核內，如圖十九(A)，受到 IPZ 反應與正常生理狀態的神經細胞相比，軸突起始段與細胞本體間的距離延長，如十九(B)所示，此結果在統計上有顯著得差異。而軸突起始段的長度則沒有影響。



圖十九、軸突起始段在 IPZ 反應時與細胞本體間距離和長度的影響。(A)為軸突起始段在正常生理狀態與受到 IPZ 反應時的螢光影像。神經細胞於活體外培養至第四天 (DIV4) 與第六天 (DIV6) 時，在 5μM IPZ 反應 3 小時，並持續生長至第七天 (DIV7) 再將其製作成樣本。MAP2 蛋白的染色呈現樹突所在位置，AnkG 蛋白的染色為軸突起始段所在位置，紅色虛線為細胞體。(B)分別為神經細胞的軸突起始段在正常生理狀態與受到 IPZ 反應時與細胞本體間距離和長度。距離與長度之數據為平均值 ± SEM (來自 2 次獨立實驗，每組 n ≥ 11 顆細胞，not significant (n.s.) 表示數據沒有顯著差異 (P > 0.05)，以 T TEST 進行統計檢定)。

接下來我們使用不同點突變的 GFP-PXN mutant 轉染進神經細胞中，同樣分析軸突起始段與細胞本體間的距離和長度，來判定阻斷 GFP-PXN 無法進入細胞核是否對神經細胞的成熟度影響，如圖二十。

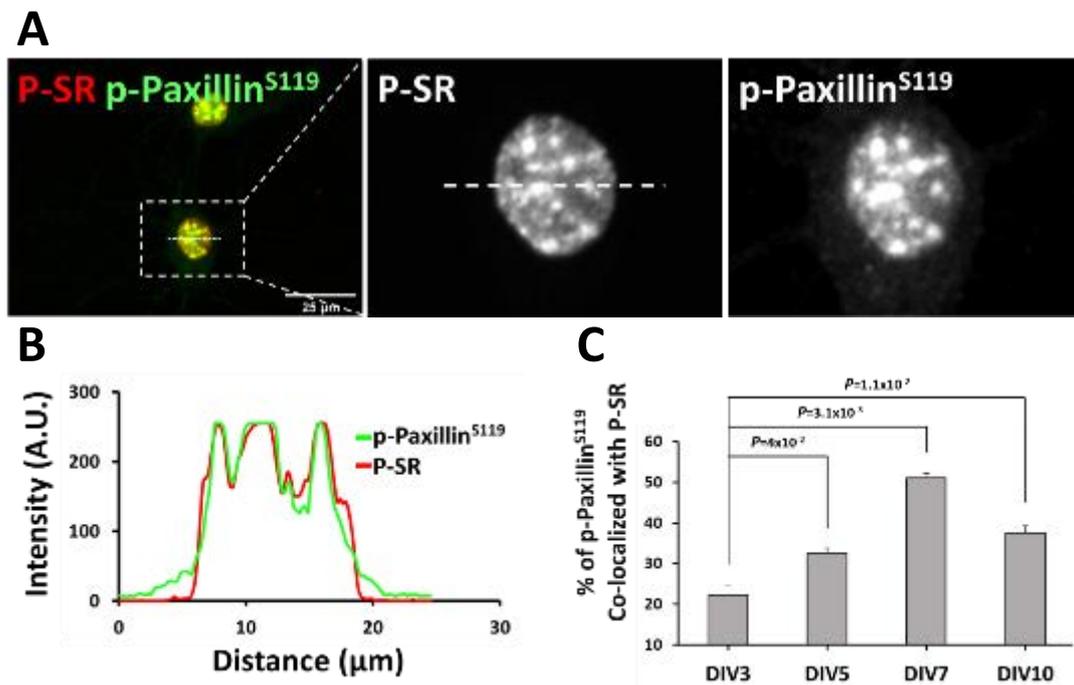


圖二十、軸突起始段在轉染不同點突變之 GFP-PXN mutant 時與細胞本體間距離和長度的影響。(A)為軸突起始段在轉染不同點突變之 GFP-PXN mutant 時的螢光影像。神經細胞在活體外生長至第三天 (DIV3) 進行細胞轉染，並持續生長至第七天 (DIV7) 再將其製作成樣本。(B&C)分別為軸突起始段在轉染不同點突變之 GFP-PXN mutant 時與細胞本體間距離和長度，距離與長度之數據為平均值 \pm SEM(來自 1 次獨立實驗，每組 $n \geq 5$ 顆細胞，not significant (n.s.) 表示數據沒有顯著差異 ($P > 0.05$)，以 T TEST 進行統計檢定)。

從圖二十(A)看到，我們在神經細胞轉染了不同點突變的 GFP-PXN mutant，與 WT 相比發現 P516/Y517 和 P575/Y576 的點突變使軸突起始段的長度縮短，如二十(C)所示，此結果具有顯著的差異，S119 和 P398/Y399 的點突變則沒有影響。如二十(B)所示，不同點突變的 GFP-PXN mutant 與 WT 相比，軸突起始段與細胞體之間的距離沒有顯著的差異。

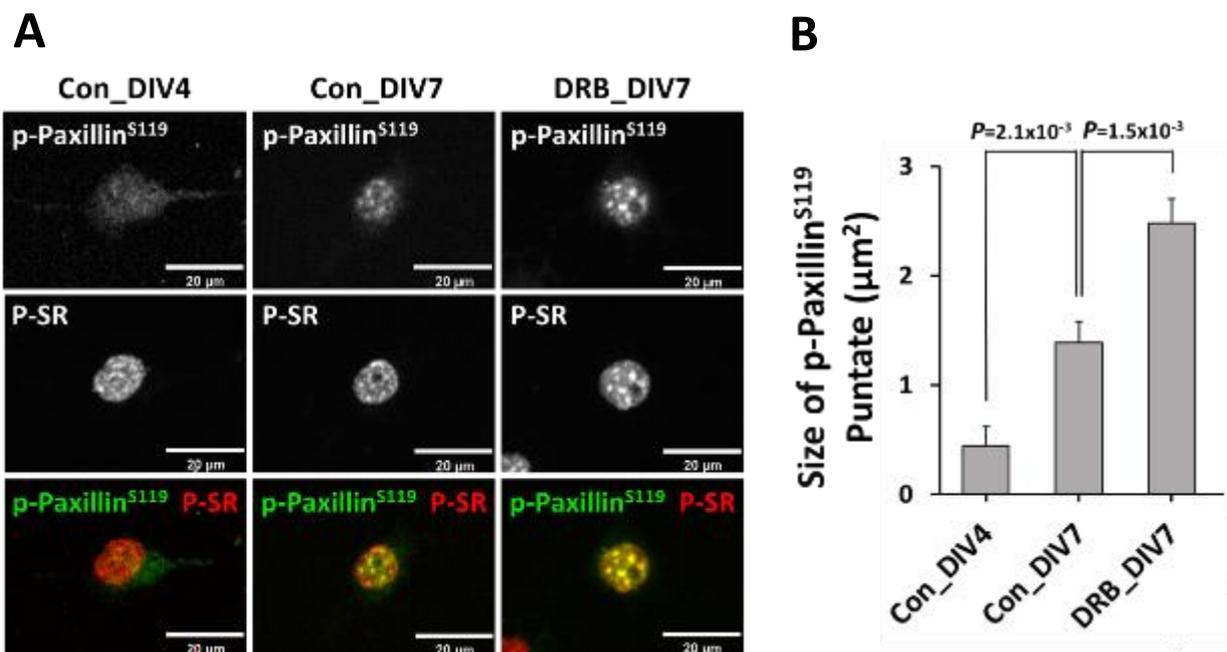
五、細胞核中的 p-Paxillin^{S119} 與 RNA 剪接因子 P-SR 共定位

我們觀察到神經細胞於活體外生長至第五天 (DIV5) 至第七天時 (DIV7)，p-Paxillin^{S119} 會進入細胞核中，並觀察到 p-Paxillin^{S119} 會呈現直徑約為 1~3 μ m 的顆粒散布在細胞核中。於是推測 p-Paxillin^{S119} 進入到細胞核後可能位於核斑點 (nuclear speckles) 中。核斑點是由眾多 RNA 剪接因子所組成的大型結構，是進行主要進行 RNA 剪接 (Splicing) 的區域。於是我們將已被證實會定位在核斑點的 SR 蛋白 (Ser-Arg-rich proteins) 與 p-Paxillin^{S119} 共同染色，觀察在神經細胞於活體外生長至第七天 (DIV7) 時的分布，如圖二十一。



圖二十一、神經細胞的 p-Paxillin^{S119} 與 P-SR 在活體外生長至第七天 (DIV7) 時的分布。(A)為神經細胞於活體外生長至第七天 (DIV7) 時的螢光影像。使用能辨識 Phosphoepitope SR proteins (P-SR) 的抗體進行染色。(B)為 P-SR (紅線) 與 p-Paxillin^{S119} (綠線) 在虛線處的螢光強度折線圖。(C)為神經細胞於活體外生長至第三、五、七及十天 (DIV3、5、7、10) 時，在相同螢光強度下，p-Paxillin^{S119} 與 P-SR 於細胞核中重疊的百分比。

從圖二十一(A)可以看到在神經細胞於活體外生長至第七天 (DIV7) 時, p-Paxillin^{S119} 與 P-SR 皆呈現顆粒狀, 且如圖二十一(B)所示, 兩者螢光強度的分佈在細胞核中重疊, 表示 p-Paxillin^{S119} 與 P-SR 共定位 (co-localization)。由圖二十一(C)所示, p-Paxillin^{S119} 與 P-SR 共定位的高峰, 為神經細胞於活體外生長至第七天 (DIV7)。目前已知終止 RNA 的轉錄, 會使 RNA 剪接因子向核斑點聚集, 使顆粒增大 (Lamond & Specto. 2017)。為了了解 p-Paxillin^{S119} 是否具有該特性, 我們使用 RNA 聚合酶 II 的抑制劑 Benzimidazole (DRB), 終止神經細胞的 RNA 轉錄, 分析 p-Paxillin^{S119} 的顆粒大小, 如圖二十二。



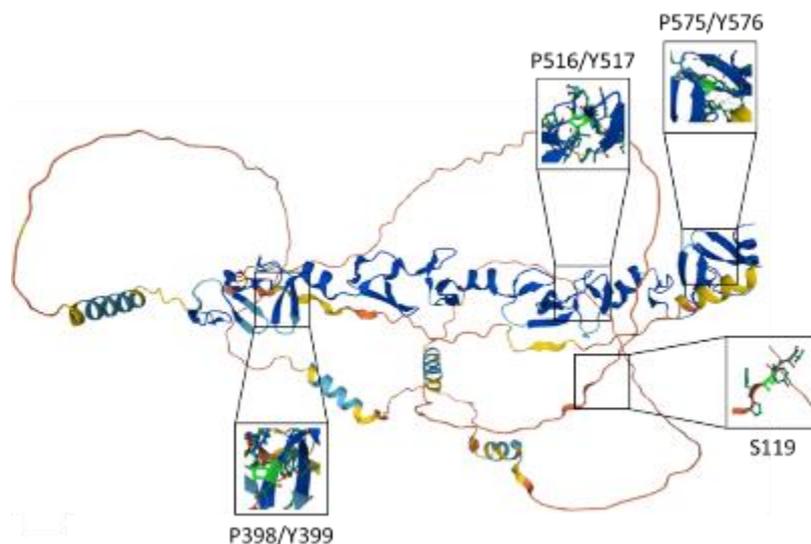
圖二十二、神經細胞的 p-Paxillin^{S119} 在 DRB 反應下的影響。(A)為神經細胞的 p-Paxillin^{S119} 在正常生理狀態與受到 DRB 反應下的螢光影像。神經細胞於活體外培養至第四天 (DIV4) 與第六天 (DIV6) 時, 在含有 100μM DRB 的培養液中反應 3 小時, 並持續生長至第七天 (DIV7) 再將其製作成樣本。(B)為神經細胞的 p-Paxillin^{S119} 在正常生理狀態與受到 DRB 反應下時的顆粒大小, 顆粒大小之數據為平均值 ± SEM (來自 1 次獨立實驗, 每組 n ≥ 10 顆細胞, 以 T TEST 進行統計檢定)。

由圖二十二(A)可以看到神經細胞的 p-Paxillin^{S119} 受到 DRB 反應下, 與正常生理狀態相比, 顆粒的大小明顯變大, 且如由圖二十二(B)所示, 此結果有顯著的差異。表示我們所觀察到的 p-Paxillin^{S119} 顆粒是具有核斑點的特性, 所以推測 p-Paxillin^{S119} 進核後會參與 RNA 的剪接。

伍、討論

本研究對神經細胞的 p-Paxillin^{S119} 於活體外生長至第七天 (DIV7) 時，進入細胞核的分子機制以及其在神經生長的影響進行探討。蛋白質要進入細胞核，需帶有轉運蛋白能辨識的 NLS，我們在 Paxillin 的 LIN 結構域中，比對到三個有淺力被轉運蛋白 Importin $\beta 2$ 所辨識的 PY-NLS 位點。Importin $\beta 2$ 是能夠獨自進行 PY-NLS 的辨識，並定位蛋白質到細胞核的一種轉運蛋白，有別於 cNLS 是需要 importin α & β 結合才能將蛋白質帶入細胞核。透過細胞轉染的方式，觀察到 P516/Y517 及 P575/Y576 位點突變後，使 GFP-PXN 在分化至第四天時的 N2a 細胞中，無法進入到細胞核，P398/Y399 位點突變則沒有其影響。P516/Y517 及 P575/Y576 分別位 Paxillin 的 LIN3 和 LIN4 結構域中，先前的實驗表明，這兩個結構域可以使 PTP-PEST 與 Paxillin 結合，並將 Paxillin 定位到 FA 上 (López-Colomé et al. 2017)，由此增加了 Paxillin 是能被轉運蛋白所辨識與結合，並帶入細胞核中的可信度。

透過免疫共沉澱法得知 Paxillin 會與 Importin $\beta 2$ 進行交互作用，且抑制 Importin $\beta 2$ 特性使 p-Paxillin^{S119} 無法進入細胞核等結果，更進一步證明了 Paxillin 序列中有 PY-NLS。而 S119 位點突變也使 GFP-PXN 在分化至第四天時的 N2a 細胞中，無法進入到細胞核，表示進入細胞核的 GFP-PXN 需要 S119 位點被磷酸化。蛋白質的磷酸化會使其結構發生改變，可能使 PY-NLS 被覆蓋或是裸露，進而影響專運蛋白 Importin $\beta 2$ 的辨識 (Zhang et al.2021)。於是我們使用 swiss-pdbviewer 軟體觀察 Paxillin 的立體結構，如圖二十三。



圖二十三、Paxillin 蛋白質立體結構。綠色為標誌的位點。

從 Paxillin 蛋白質立體結構可知，S119 位點相較於 P398/Y399 位點，更靠近 516/Y517 及 P575/Y576 位點，且兩位點皆位於第一級蛋白質結構。所以推測 S119 位點的磷酸化，會影響到對於 Importin β 2 與 Paxillin 結合的能力。

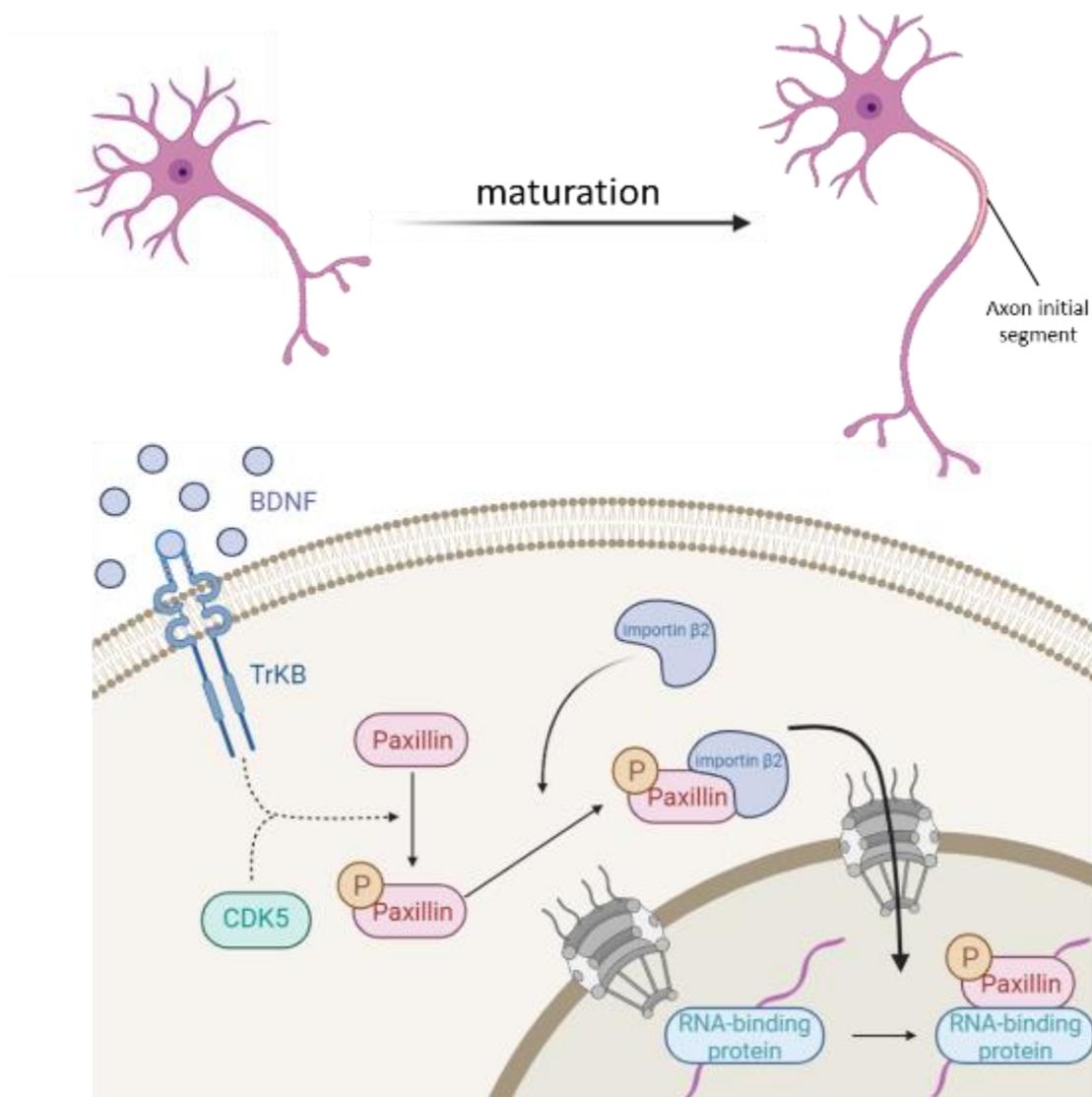
我們在培養神經細胞時，藉由抑制 Importin β 2 特性與轉染不同點突變的 GFP-PXN mutant，使 p-Paxillin^{S119} 和 GFP-PXN 無法進入細胞核中，探討對神經細胞生長的影響。並分析軸突起始段與細胞本體間的距離和長度，來判定神經細胞的成熟程度。我們發現神經細胞於活體外培養至第四天 (DIV4) 與第六天 (DIV6) 時，若在受到 IPZ 的影響，在生長至第七天 (DIV7) 時，軸突起始段的位置發生異常。這表明了神經細胞的成熟，於活體外生長的第五 (DIV5) 至七天 (DIV7) 這段時間，需要細胞質中的蛋白質進入細胞核中。在活體外生長至第三天 (DIV3) 時，對神經細胞轉染不同點突變之 GFP-PXN mutant，與原生的 Paxillin 互相競爭之下，轉染 P516/Y517 及 P575/Y576 位點突變的 GFP-PXN 與 WT 相比，軸突起始段的長度受到了影響，表示阻斷了 GFP-PXN 的進核會讓神經細胞的成熟程度延緩。

觀察神經細胞的 p-Paxillin^{S119} 於活體外生長至第七天 (DIV7) 時的螢光影像中，我們發現位於細胞核中的 p-Paxillin^{S119} 以顆粒的型態呈現。藉由 p-Paxillin^{S119} 與 RNA 剪接因子 P-SR 的共定位，以及抑制轉錄使 p-Paxillin^{S119} 顆粒的變大，表示進入細胞核的 p-Paxillin^{S119} 會定位在核斑點上，並參與 RNA 的剪接。被磷酸化的 SR 蛋白會與轉錄出來的 RNA 結合，並儲存在核斑點中，當 SR 蛋白去磷酸化時，才會參與 RNA 的剪接 (Lamond & Specto. 2017)。我們觀察到神經細胞的 p-Paxillin^{S119} 於活體外生長至第十天 (DIV10)，核質比有下降的趨勢，由此推測 p-Paxillin^{S119} 進入細胞核後可能被去磷酸化，進而調控 RNA 的剪接。查閱文獻後得知 Paxillin 沒有與 RNA 結合的序列，但前人的實驗中發現 Paxillin 在神經細胞中，會與核蛋白 Matrin 3 進行交互作用 (Chang et al. 2017)。這表示 p-Paxillin^{S119} 在細胞核中，可能與蛋白質形成複合體，進而影響 RNA 的剪接。

本實驗使用 Forskolin 來激活 PKA，使 N2a 細胞內的 serine 位點被大量磷酸化，提高 p-Paxillin^{S119} 的表現量。而正常的生理狀態下的神經細胞，神經生長的過程中，會有腦源性神經

營養因子 (Brain-derived neurotrophic factor, BDNF) 及細胞週期蛋白依賴性激酶 5 (Cyclin-dependent kinase 5, CDK5) 來促進軸突和樹突的生長。並且 BDNF 的受體原肌球蛋白受體激酶 B (Tropomyosin receptor kinase B, TrkB)與 CDK5 都是能促進 serine 磷酸化的激酶，因此推測神經細胞中，Paxillin^{S119} 位點的磷酸化可能受 TrkB 與 CDK5 所調控。

綜合以上實驗結果與討論，當神經細胞逐漸成熟，於活體外生長至第五天 (DIV5) 時，Paxillin^{S119} 位點被特定的激酶磷酸化，被磷酸化的 Paxillin^{S119} 使 Importin β 2 辨識 P516/Y517 及 P575/576 這兩個 PY-NLS 位點，結合成複合體，再透過與核孔進行交互作用，讓 p-Paxillin^{S119} 進入到細胞核中，並定位到核斑點上，與其他 RNA 剪接因子結合，進而調控 RNA 的剪接，如圖二十四。



圖二十四、p-Paxillin^{S119} 進入細胞核的機制。

陸、結論與應用

一、結論

- (一) p-Paxillin^{S119} 在神經生長的 DIV7 時進入細胞核並定位於核斑點。
- (二) N2a 細胞的 p-Paxillin^{S119} 進入細胞核需要細胞向神經型態分化。
- (三) p-Paxillin^{S119} 進入細胞核需要 S119 位點被磷酸化。
- (四) Paxillin 帶有 P516/Y517 及 P575/Y576 兩個 PY-NLS 位點，藉由 Importin $\beta 2$ 將其帶入細胞核。
- (五) 阻斷 p-Paxillin^{S119} 進入細胞核，會使神經細胞的成熟度延緩。
- (六) p-Paxillin^{S119} 進入細胞核後參與 RNA 的剪接。

二、應用

神經細胞如何生長並建立神經網路，是一個很大的研究課題。神經細胞生長至成熟的過程分成許多的階段，每一個階段都是環環相扣的，然而階段的轉換機制至今都尚未釐清。本研究觀察到 p-Paxillin^{S119} 在神經生長期間可能會進入到細胞核中參與 RNA 剪接，或許釐清了 p-Paxillin^{S119} 在細胞核內的功能與交互作用，能了解到神經生長過程中，還有哪些基因與蛋白質需要被表達出來，進而影響神經細胞成熟。清楚神經細胞成熟的過程與機制後，讓我們不管是在神經發育、型態可塑性與神經老化的基礎研究上，都能有更進一步的貢獻與認知。

柒、未來展望

從 p-Paxillin^{S119} 進核後與 P-SR 在核斑點共定位，顯示 p-Paxillin^{S119} 進核後可能參與 RNA 的剪接。目前正在對神經細胞的 p-Paxillin^{S119} 進行生物質譜分析 (biological mass spectrometry)，進一步去了解 p-Paxillin^{S119} 在細胞核中，可能會與哪些 RNA 結合蛋白進行交互作用，並尋找出被剪接的 RNA 片段。藉此釐清神經細胞的成熟，在活體外培養的第五 (DIV5) 至七天 (DIV7) 這一段時間，受哪些基因表現的影響，讓我們確認 p-Paxillin^{S119} 的核轉移對神經細胞生長的重要性。

捌、參考文獻資料

- López-Colomé, A.M., Lee-Rivera, I., & Benavides-Hidalgo, R. (2017). Paxillin: a crossroad in pathological cell migration. *J Hematol Oncol*, 10, 50.
- Mboukou, A., Rajendra, V., Kleinova, R., Tisné, C., Jantsch, MF., & Barraud, P. (2021). Transportin-1: A Nuclear Import Receptor with Moonlighting Functions. *Front. Mol. Biosci*, 8, 638149.
- Chang, T. Y., Chen, C., Lee, M., Chang, Y. C., Lu, C. H., Lu, S. T., Wang, D. Y., Wang, A., Guo, C. L., & Cheng, P. L. (2017). Paxillin facilitates timely neurite initiation on soft-substrate environments by interacting with the endocytic machinery. *eLife*, 6, e31101.
- Lu, J., Wu, T., Zhang, B., Liu, S., Song, W., Qiao, J., & Ruan, H. (2021). Types of nuclear localization signals and mechanisms of protein import into the nucleus. *Cell Commun Signal*, 19, 60.
- Nguyen, K. T., Holloway, M. P., & Altura, R. A. (2012). The CRM1 nuclear export protein in normal development and disease. *International journal of biochemistry and molecular biology*, 3(2), 137 - 151.
- Arimura, N., & Kaibuchi, K. (2007). Neuronal polarity: from extracellular signals to intracellular mechanisms. *Nat Rev Neurosci*, 8, 194 - 205.
- Luo L. (2002). Actin cytoskeleton regulation in neuronal morphogenesis and structural plasticity. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 18, 601-35.
- Lamond, A.I., & Specto, D.L. (2003). Nuclear speckles: a model for nuclear organelles. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 4, 605 - 612.

【評語】 052006

1. 本研究主題在於探討 Paxillin 其 Serine-119 位點被磷酸化後，進入神經細胞核的分子機制及其對神經生長成熟的影響。研究結果顯示 Serine-119 位點被磷酸化的 Paxillin 能被轉運蛋白 Importin $\beta 2$ 所辨識並由細胞質轉移到細胞核內，其進核後會定位在核斑點上，可能被去磷酸化並參與了 RNA 的剪接，以促進神經細胞成熟。
2. 本作品研究主題清楚且聚焦，適時參考前人的文獻資料。研究方法採單項變因控制，對控制變因與變因清楚及適當，並有系統地收集數據及運用統計方法分析。
3. 本研究探討磷酸化的 Paxillin 進入細胞核的分子機制及探討其對神經生長的影響與功能，結論推測 p-PaxillinS119 進核後會參與 RNA 的剪接需再進一步實驗確認。

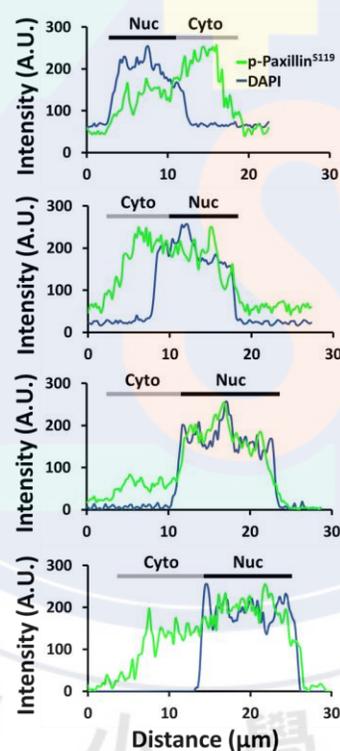
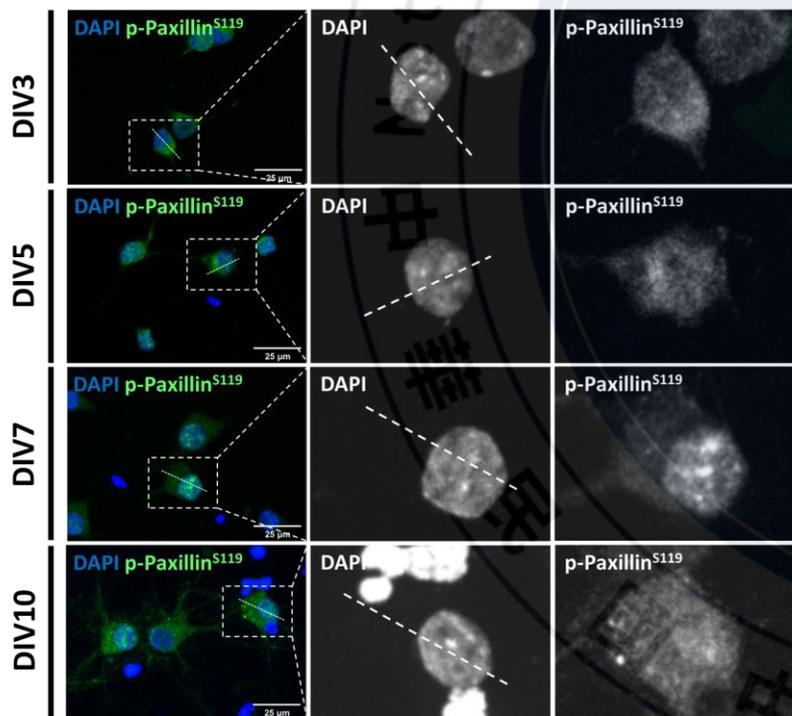
作品簡報

探討神經細胞特異性
磷酸化Paxillin^{S119}的進核機制與
其在神經細胞生長中所扮演的角色

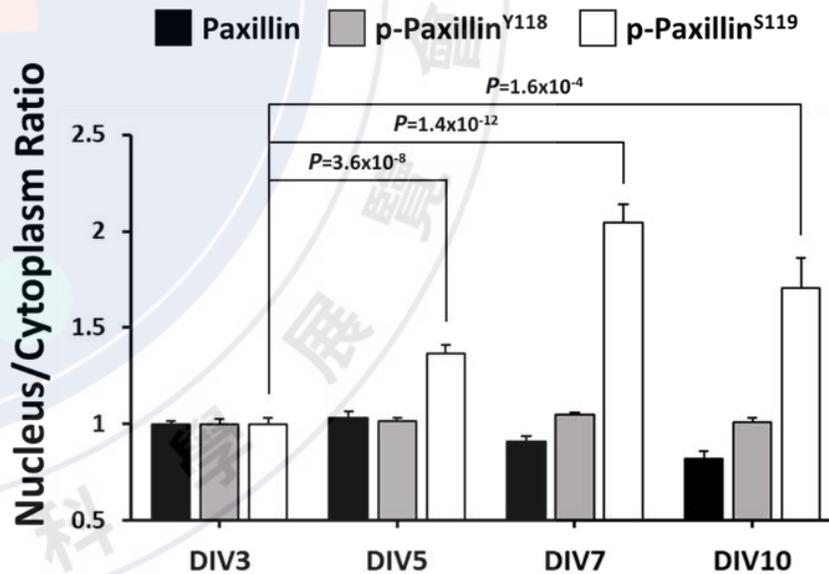
高級中等學校組
動物與醫學學科

研究動機

Paxillin在大部分細胞中，位於細胞膜周圍調節細胞的遷移。而本研究觀察到初代腦神經細胞（primary neuronal）在活體外培養第五至七天（days in vitro; DIV）時，發現Ser119磷酸化的 Paxillin (p-Paxillin^{S119}) 從細胞質轉移至細胞核中，並呈現顆粒狀。



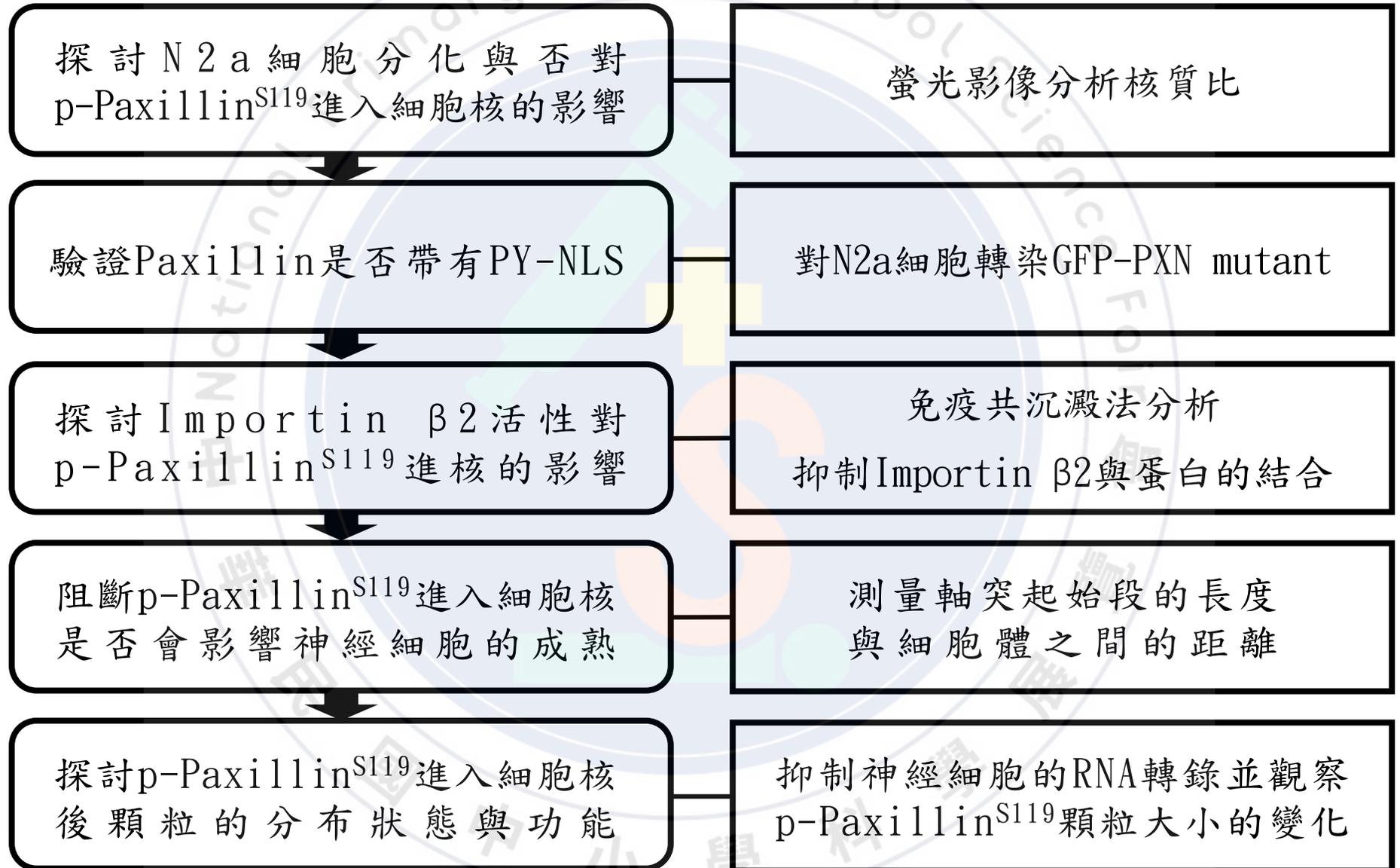
Phospho-Paxillin^{S119} = p-Paxillin^{S119}



圖一、神經細胞的p-Paxillin^{S119}在不同時間點的分布

圖二、Paxillin在不同時間點的核質比

研究流程與方法

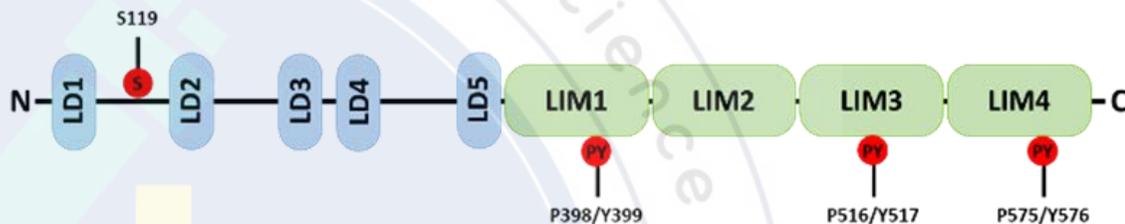


一、Paxillin的NLS判定

蛋白質進核需要擁有核定位序列(nuclear localization signal; NLS)，我們在Paxillin的序列中，找到有三個有淺力被轉運蛋白Importin β 2所辨識的PY-NLS。

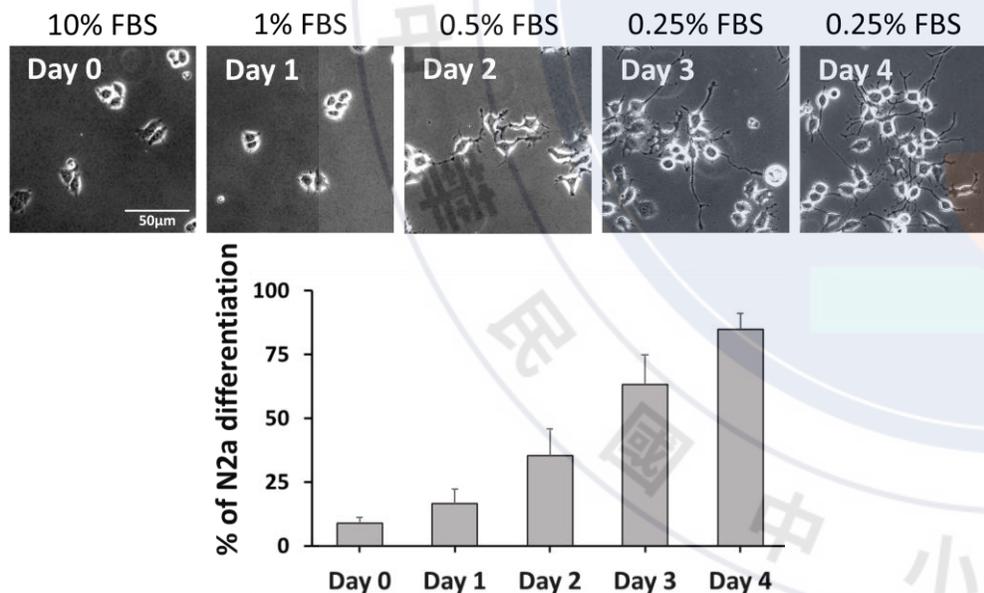
```

1  MDDL DALLAD  LESTTSHISK  RVPFLSEEP  YSYPTGNHTY  QEIAVPPVP  PPPSSEALNG
61  TVLDPLDQWQ  PSGSRYAHQQ  PPSPIYSS  STKNSSASNP  QDSVGLCSR  AGEEEHVYSF
121  PNKQKSAEPS  PTVMSSSLGS  NLSELDRL  ELNAVQRSPS  GFSAGMVSV  ASREPLGSWG
181  TEGRAIILSP  FFQDEAESS  PLPGALSPL  YVPESNLLG  GKAGPLMKE  PKRNGRGL
241  DVRPSVESLL  DELENSVPS  VPAITVNG  MSSPQRVTSS  QQQTRISAS  ATRELDELMA
301  SLSDFKFMAQ  GKTGSSSPG  GLSKPGSQ  SMLGSLQSDL  NKLGVATVA  GVCGACKPI
361  AGQVVTAMG  TWHPEHFVCT  HCQEEIGSR  FFERDGPYC  EKDYHSLFSP  RCYYCNGPIL
421  DKVVTALDR  WHEPHFCAQ  CGAFFGPEG  HEKDGKAYCR  KDYFDMFAP  CGGCARAILE
481  NYISALNTL  WHEPHFCAQ  FTPEVNGSF  HDGQPYCEV  HYHERRGSL  SGCQKPITGR
541  CITAMAKKF  PEHFVCAFCL  KQLNKGT  KE QNDKPYCQSC  FLKLCF
  
```



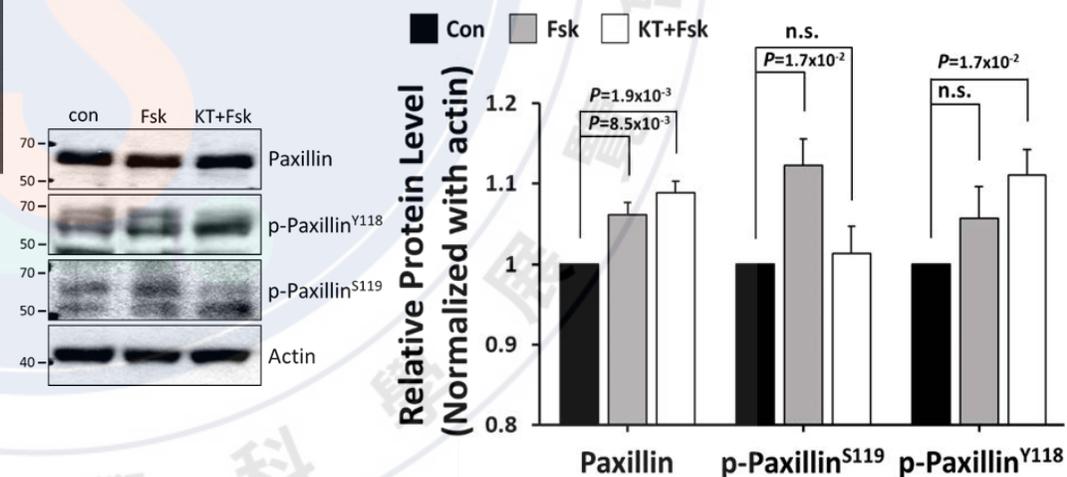
圖三、Paxillin的氨基酸序列與結構

二、N2a細胞的分化



圖四、培養液中FBS濃度與N2a細胞分化的比例

三、促進Paxillin^{S119}磷酸化

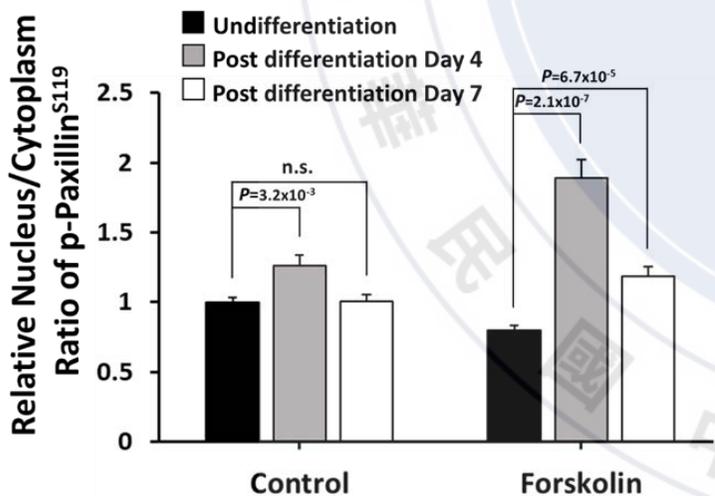


圖五、Forskolin對p-Paxillin^{S119}表現量的影響

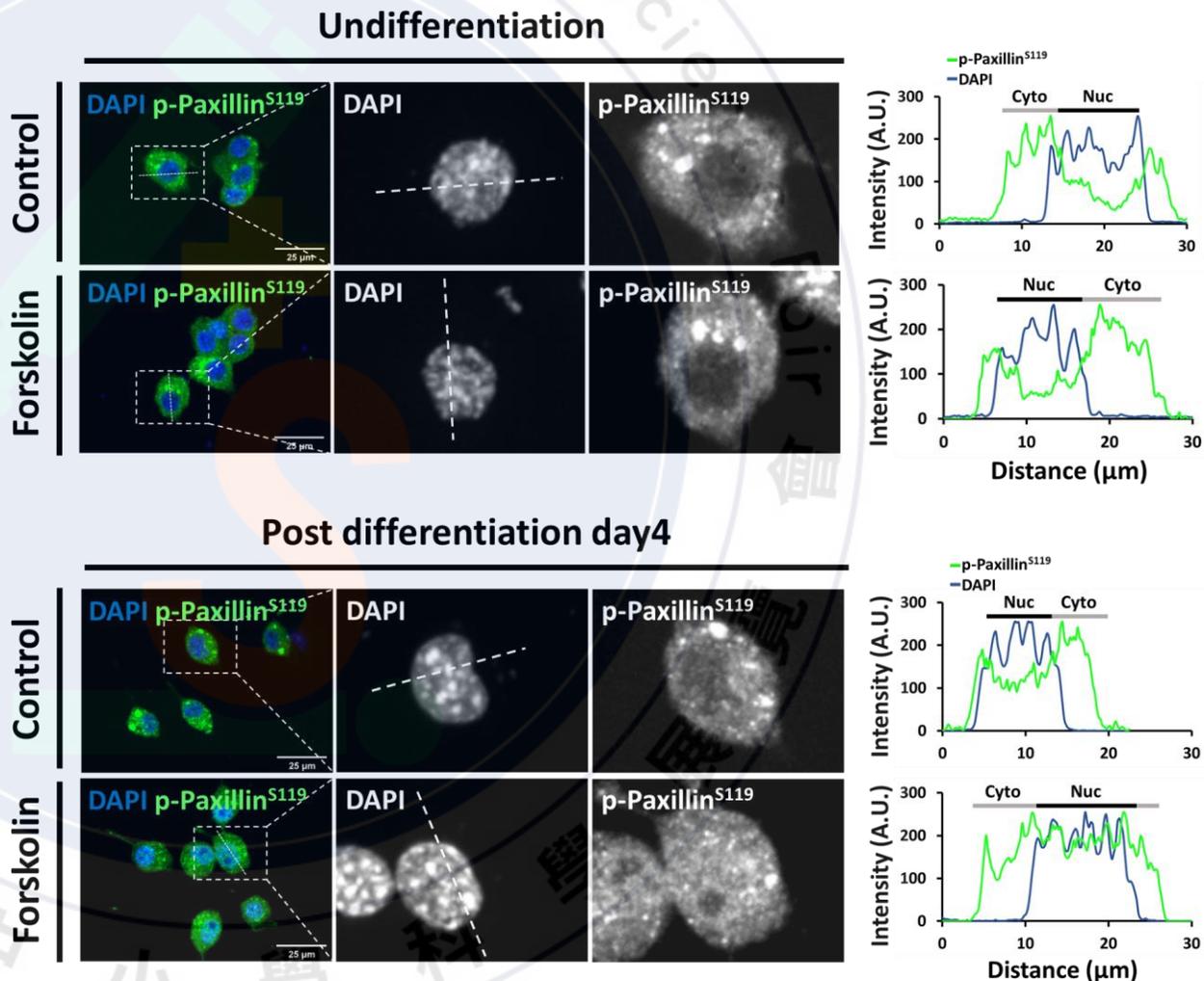
研究結果

一、N2a細胞分化使p-Paxillin^{S119}進入細胞核的比例增加

N2a細胞在分化至第四天，並且有加入20 μ M Forskolin反應一個小時的情況下，p-Paxillin^{S119}進核的比例最明顯。



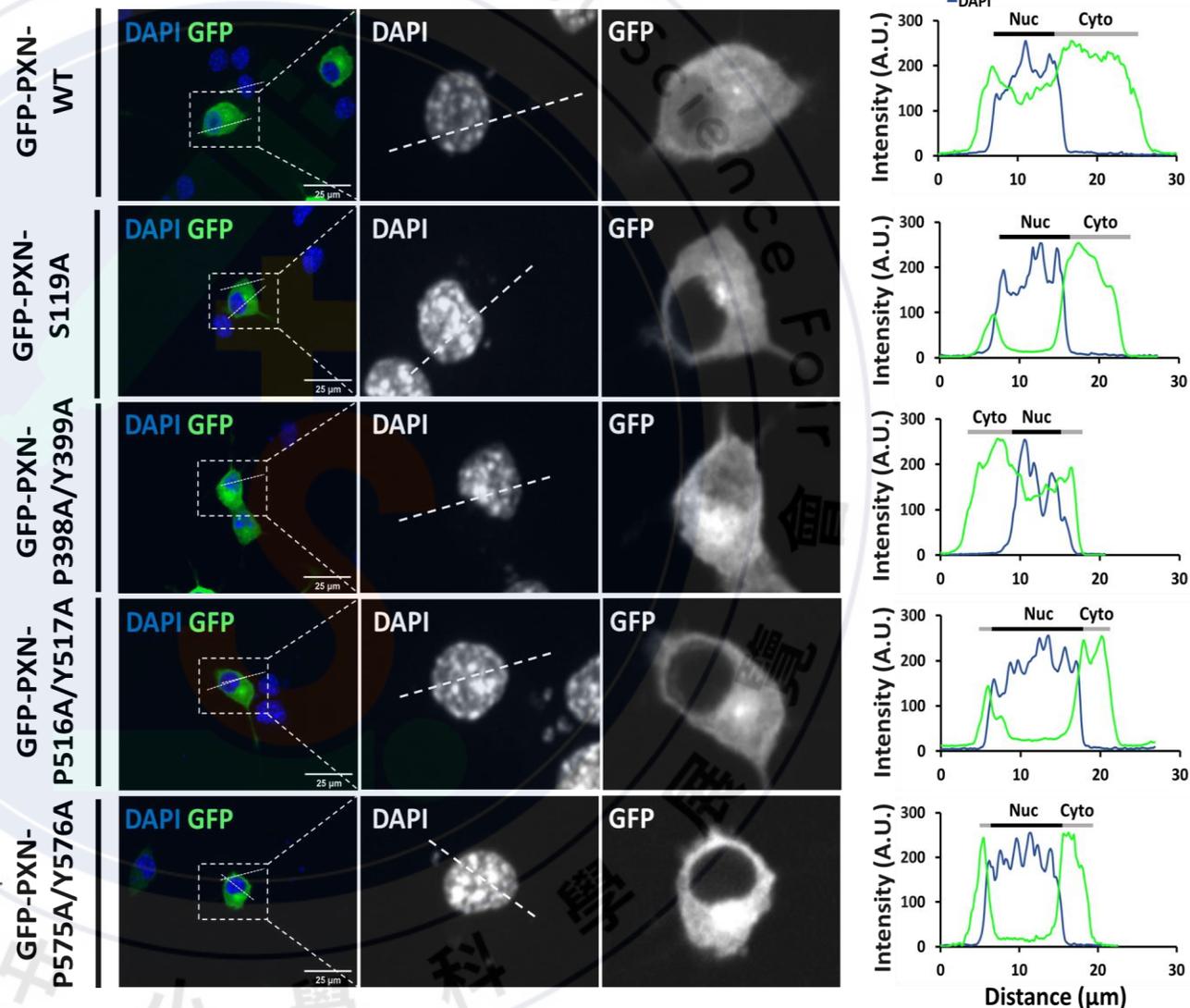
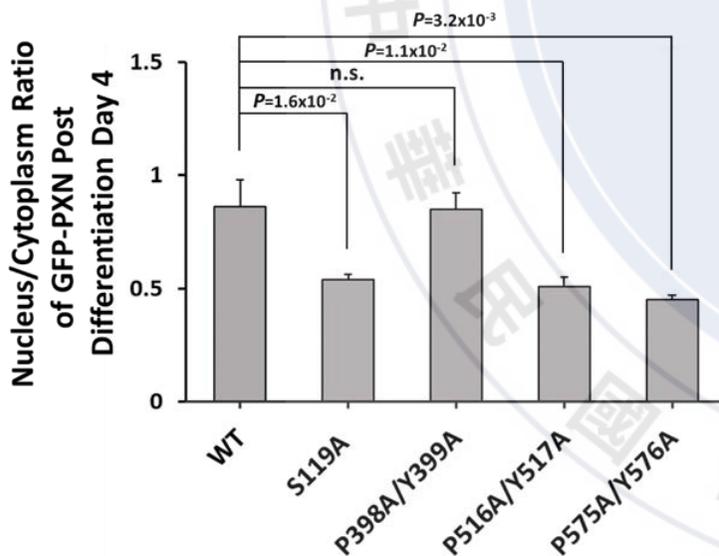
圖七、N2a細胞的p-Paxillin^{S119}核質比



圖六、N2a細胞的p-Paxillin^{S119}在細胞未分化與分化時的分布

二、S119與PY-NLS點突變使GFP-PXN無法進入細胞核

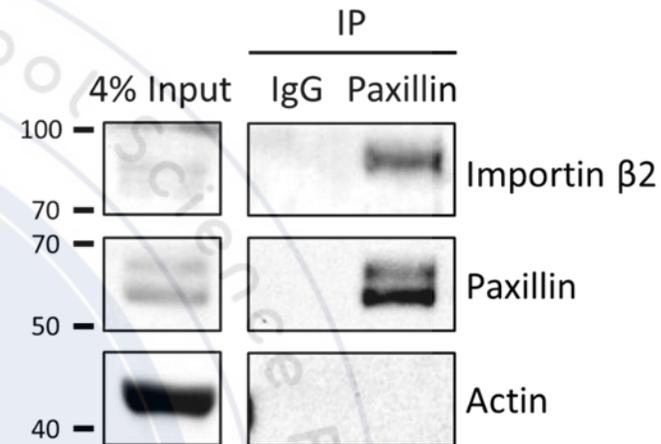
對N2a細胞轉染不同的GFP-PXN mutant，讓細胞持續分化至四天，發現S119、P516/Y517與P575/Y576點突變會使GFP-PXN無法進入到細胞核。



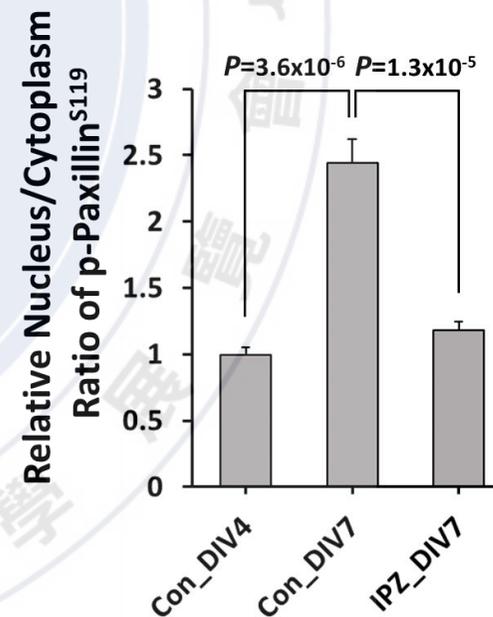
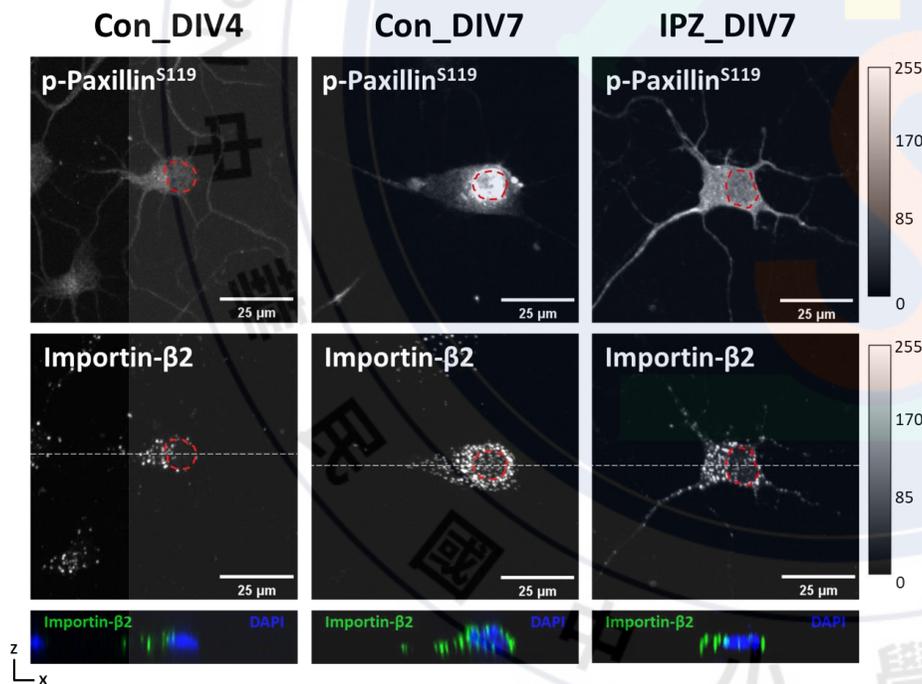
圖九、轉染進N2a細胞的GFP-PXN核質比 圖八、轉染進N2a細胞的不同點突變之GFP-PXN在細胞分化時的分布

三、抑制 Importin $\beta 2$ 活性使 p-Paxillin^{S119} 無法進入細胞核

利用免疫共沉澱法驗證 Paxillin 與 Importin $\beta 2$ 會進行交互作用。在培養神經細胞時，加入 5 μ M 能抑制 Importin $\beta 2$ 特性的 Importazole (IPZ)，觀察到 p-Paxillin^{S119} 進核的比例明顯降低。



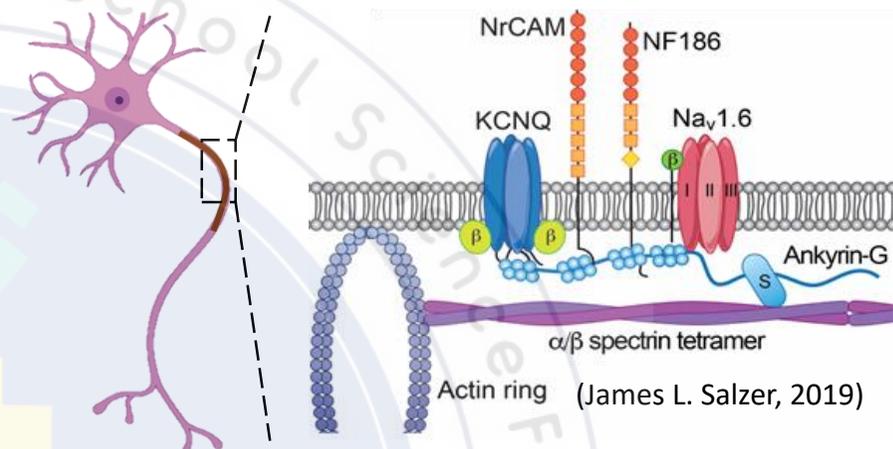
圖十、Paxillin 與 Importin $\beta 2$ 進行交互作用



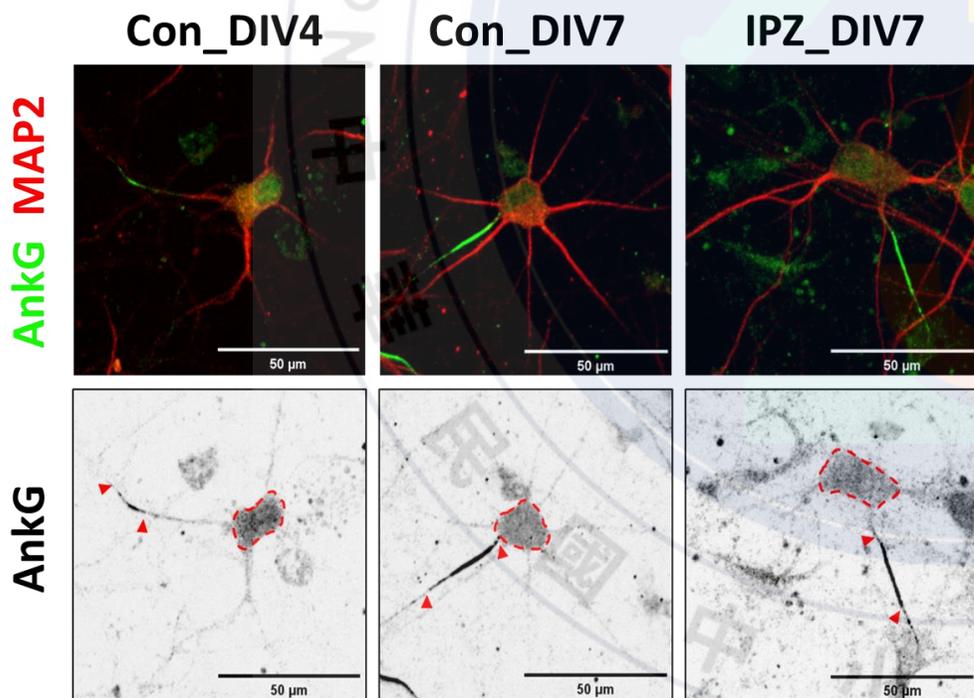
圖十一、神經細胞的 Importin $\beta 2$ 與 p-Paxillin^{S119} 在 IPZ 反應下的分布 圖十二、p-Paxillin^{S119} 的核質比

四、阻斷p-Paxillin^{S119}進入細胞核使神經細胞成熟延緩

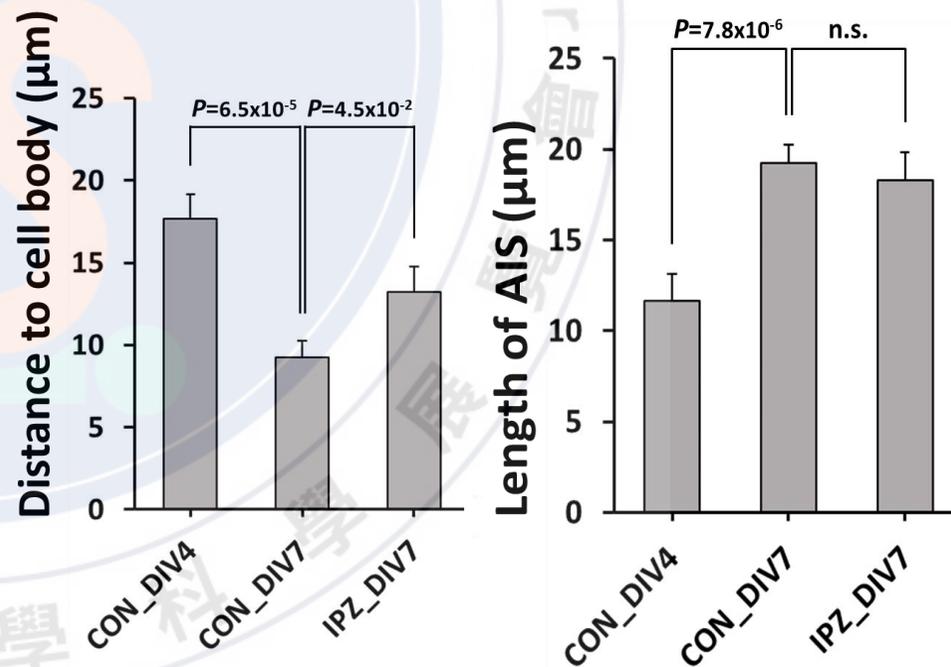
培養液中加入5 μ M IPZ讓p-Paxillin^{S119}無法進入到細胞核內。與正常生理狀態的神經細胞相比，受IPZ反應的神經細胞，軸突起始段與細胞本體間的距離延長。



圖十三、位於軸突起始段的Ankyrin G

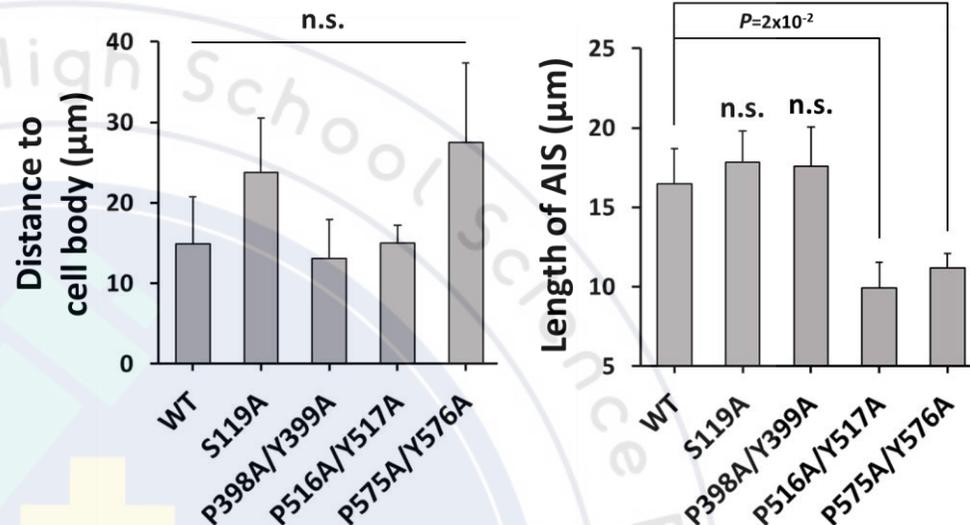


圖十四、軸突起始段在IPZ反應下的螢光影像

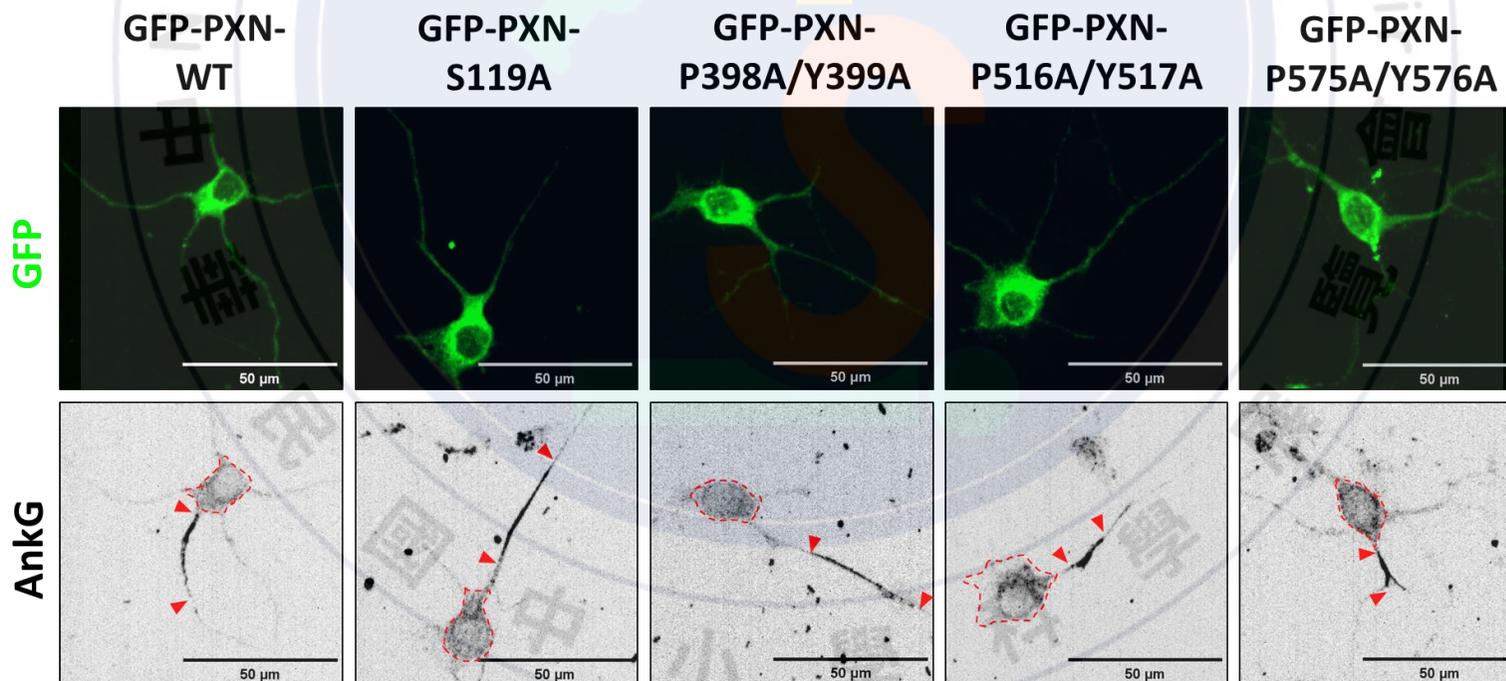


圖十五、軸突起始段與細胞本體間距離和長度

對神經細胞轉染不同的GFP-PXN mutant，與WT相比，P516/Y517與P575/Y576點突變使軸突起始段的長度縮短，與細胞體之間的距離則沒有顯著差異。



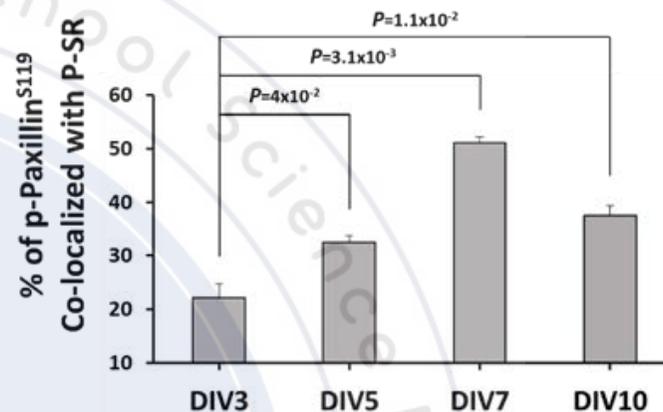
圖十六、軸突起始段與細胞本體間距離和長度



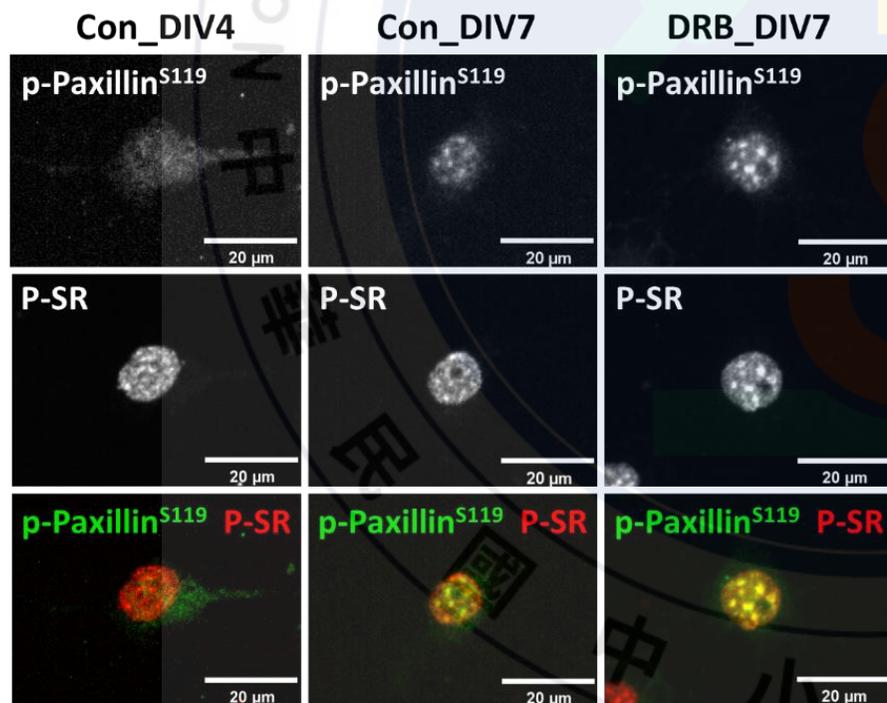
圖十七、軸突起始段在轉染不同點突變之GFP-PXN mutant時的螢光影像

五、細胞核中的p-Paxillin^{S119}聚集在核斑點

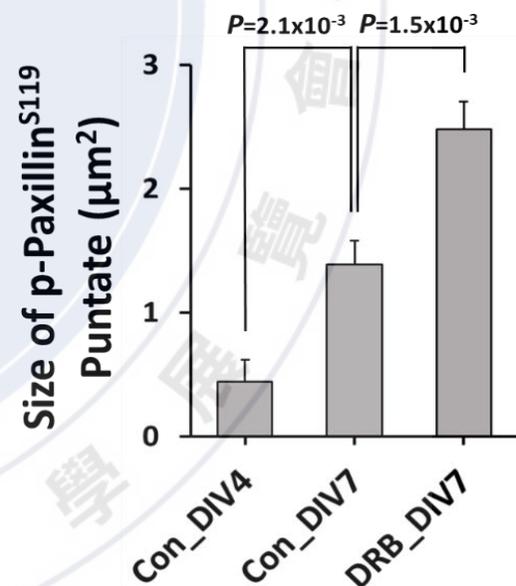
培養液中加入100 μ M RNA聚合酶II的抑制劑Benzimidazole (DRB)，終止神經細胞的RNA轉錄。觀察到p-Paxillin^{S119}顆粒變大，代表其在細胞核中，會聚集在進行RNA剪接的核斑點。



圖十八、p-Paxillin^{S119}與P-SR共定位百分比



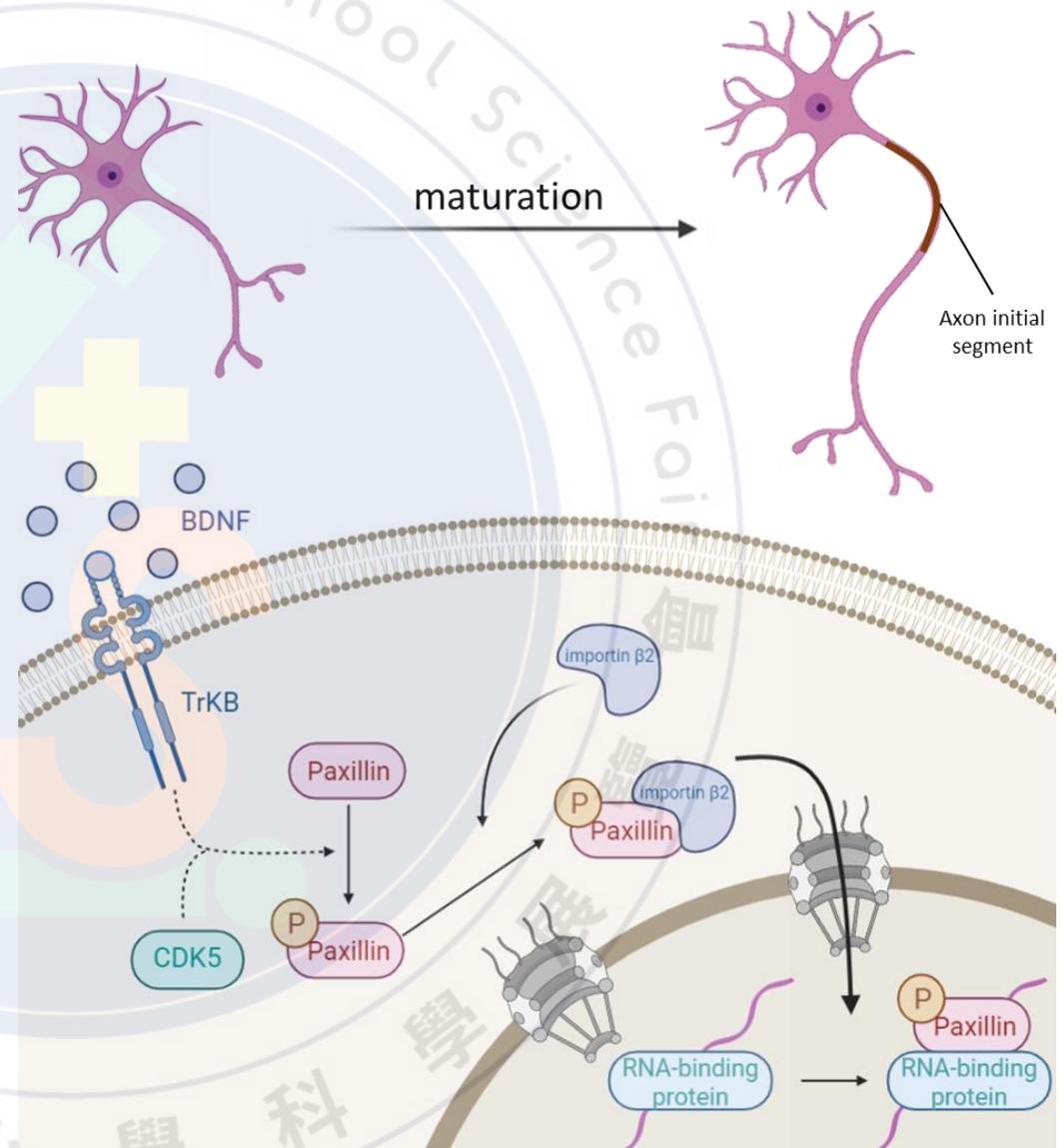
圖十九、神經細胞的p-Paxillin^{S119}在DRB反應下的分布



圖二十、p-Paxillin^{S119}的顆粒大小

結論

- 一、p-Paxillin^{S119}在神經生長的DIV7時進入細胞核並定位於核斑點。
- 二、N2a細胞的p-Paxillin^{S119}進入細胞核需要細胞向神經型態分化。
- 三、p-Paxillin^{S119}進入細胞核需要S119位點被磷酸化。
- 四、Paxillin帶有P516/Y517及P575/Y576兩個PY-NLS位點，藉由Importin β2將其帶入細胞核。
- 五、阻斷p-Paxillin^{S119}進入細胞核，會使神經細胞的成熟度延緩。
- 六、p-Paxillin^{S119}進入細胞核後參與RNA的剪接。



圖二十一、神經細胞成熟時p-Paxillin^{S119}進入細胞核的過程

未來展望

目前正在對神經細胞的Paxillin進行生物質譜分析(biological mass spectrometry)，進一步去了解p-Paxillin^{S119}在細胞核中，可能會與哪些RNA結合蛋白進行交互作用，並尋找出被剪接的RNA片段。藉此釐清神經細胞的成熟，在活體外培養的第五(DIV5)至七天(DIV7)這一段時間，受哪些基因表現的影響，讓我們確認p-Paxillin^{S119}的核轉移對神經細胞生長的重要性。

參考文獻

- 一、López-Colomé, A. M., Lee-Rivera, I., & Benavides-Hidalgo, R. (2017). Paxillin: a crossroad in pathological cell migration. *J Hematol Oncol*, 10, 50.
- 二、Mboukou, A., Rajendra, V., Kleinova, R., Tisné, C., Jantsch, MF., & Barraud, P. (2021). Transportin-1: A Nuclear Import Receptor with Moonlighting Functions. *Front. Mol. Biosci*, 8, 638149.
- 三、Chang, T. Y., Chen, C., Lee, M., Chang, Y. C., Lu, C. H., Lu, S. T., Wang, D. Y., Wang, A., Guo, C. L., & Cheng, P. L. (2017). Paxillin facilitates timely neurite initiation on soft-substrate environments by interacting with the endocytic machinery. *eLife*, 6, e31101.
- 四、Lu, J., Wu, T., Zhang, B., Liu, S., Song, W., Qiao, J., & Ruan, H. (2021). Types of nuclear localization signals and mechanisms of protein import into the nucleus. *Cell Commun Signal*, 19, 60.
- 五、Lamond, A. I., & Specto, D. L. (2003). Nuclear speckles: a model for nuclear organelles. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 4, 605 - 612.