

2016 年臺灣國際科學展覽會 優勝作品專輯

作品編號 090013

參展科別 醫學與健康科

作品名稱 後轉譯化學修飾對 Programmed Cell Death
5(PDCD5)功能之影響

得獎獎項 大會獎：三等獎

就讀學校 臺北市立第一女子高級中學

指導教師 曾賢忠、吳淑芳

作者姓名 郭妍均、曾麒樺

關鍵字 細胞凋亡(apoptosis)、PDCD5、位點突變

作者簡介



摘要

PDCD5，簡稱 PD5，屬於 PDCD (programmed cell death) 家族成員，本身具有 125 個胺基酸，本身能引起細胞凋亡，也有報導細胞自噬，並且在作用時會從細胞質進入細胞核，除此之外，PD5 在人類許多腫瘤表達下降，跟 p53 也有協同促進細胞凋亡的作用。PD5 被推測可能可以誘使癌細胞進行細胞凋亡，雖然目前與這個蛋白質有關的研究並沒有很多，作用機制也尚不明確，但我們相信 PD5 有值得我們研究的價值，於是我們進一步探討 PDCD5 的結構，以及各種蛋白質修飾後可能的結果，還有相關的反應機制。

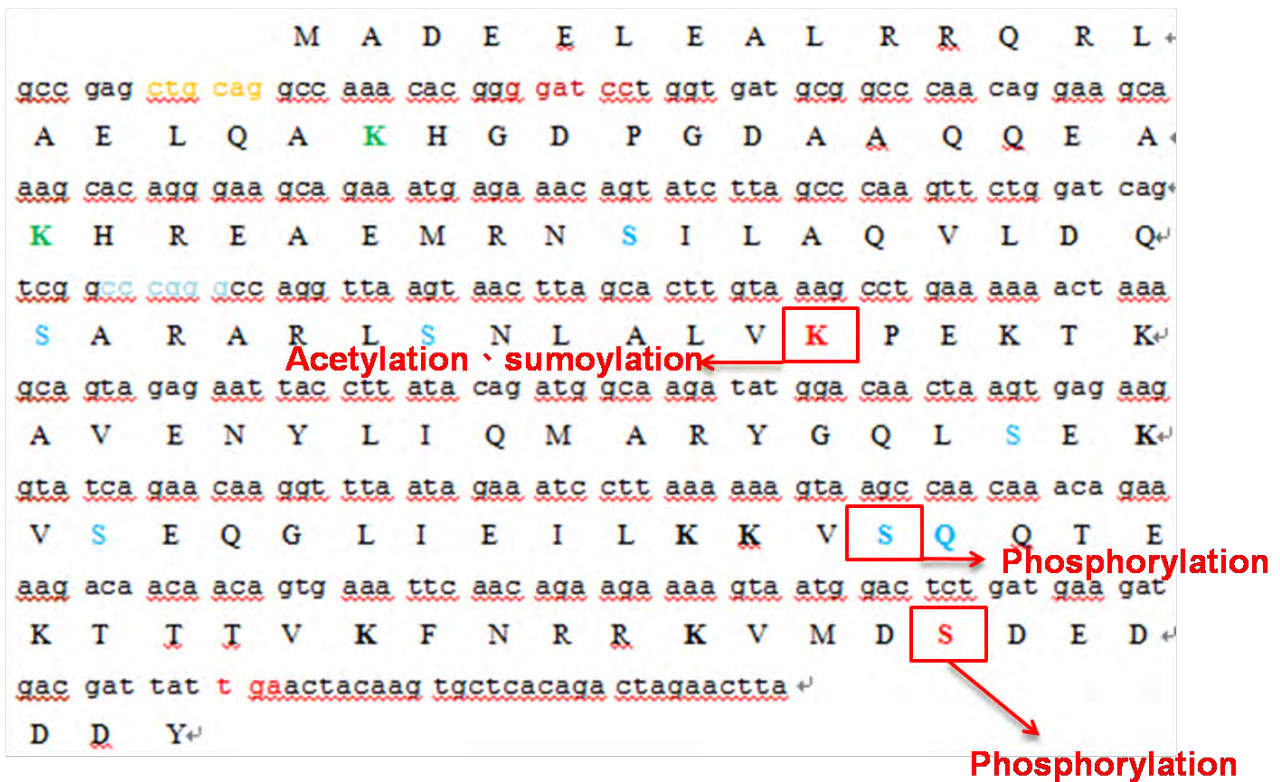


圖 1 PDCD5 蛋白質胺基酸序列(125 個胺基酸)

Abstract

PDCD5, whose abbreviation is PD5, belonging to PDCD (programmed cell death) family. It has 125 amino acids. It can induce apoptosis, and it has been reported to induce autophagy. When acting, it will enter into the nucleus from the cytoplasm. In addition, PD5' s expression in many human tumors cell decreases, and it can also have synergistic effect with p53 on promoting apoptosis. PD5 is speculated that it might be able to induce apoptosis in cancer cells, although there are not many research which is related to this protein, and the mechanism of action is not clear. However, we believe that doing some research on PD5 is worthy, so we further explore the PDCD5' s structure, try to figure out some possible outcomes after the protein modification, as well as the associated response mechanisms.

壹、前言

一、研究動機

在搜尋資料的過程中，我們發現在與 PDCD5 有關的研究中都顯示出 PDCD5 與細胞凋亡有很大的關連，但卻很少人去研究此蛋白質要如何與酵素作用才能表現出這樣的特性，於是我們再進一步仔細探討、規劃實驗，希望能藉由這次的研究，找出 PDCD5 的作用機制和在其位點上的突變的重要性，以及對於癌細胞的抑制效果，並進一步提供治癌藥物的相關研發依據。

二、研究目的

從與 PD5 蛋白質本身穩定度和活化有關的轉譯後後修飾探討其作用機制

- 1.位點突變的重要性:乙醯化、小泛素化(sumoylation)、磷酸化。
- 2.如果突變會影響 PD5 的作用機制，那這些可以使 PD5 在這些位點後修飾的酵素應具重要性,或許也可以提供藥物研發依據。

貳、研究過程及方法

一、突變的重要性

位點突變:K63(推測乙醯化、Sumoylation)、S100(推測磷酸化)、S119(磷酸化)

(一)PCR 點突變接著定序。

1.點突變

經過我們推測以及參考文獻過後，我們決定突變的點分別是 K63、S100、S119，而原因分別如下：

K63: a.前人未研究過。

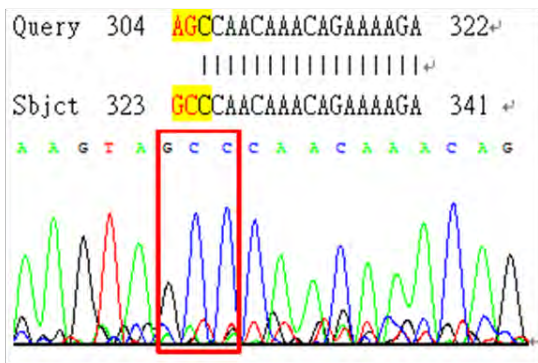
b.用 Sumoylation 預測軟體只預測到這個位點。

c.也被預測可以乙醯化、Ubiquitination(泛素化)。

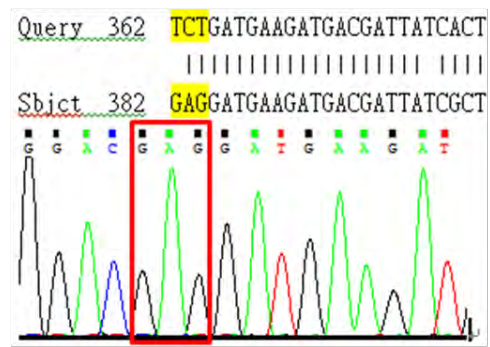
S100:後面接 Q 容易產生密集磷酸化(SQ 或 TQ)。

S119:有報導過被 CK2(Casein Kinase 2)磷酸化，此位點的磷酸化跟促進細胞凋亡有關。

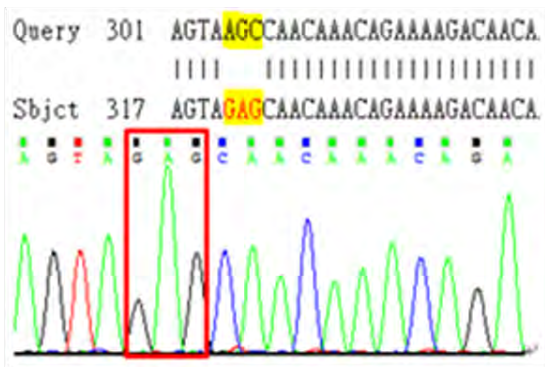
實驗會將 K 突變成 A(去乙醯化和泛素化)或 Q(模仿乙醯化)，S 會被突變成 A(去磷酸化)或 E(模仿磷酸化)，藉此設計判定乙醯化、泛素化或磷酸化是否對 PD5 的功能造成影響。



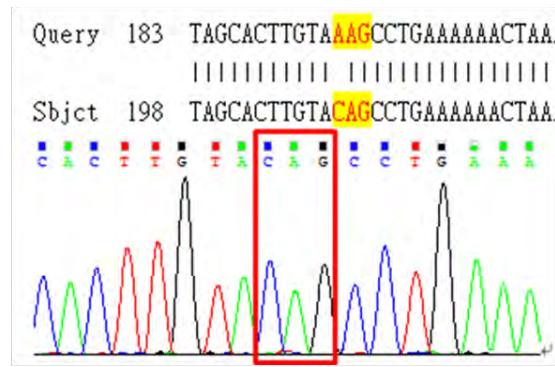
S100A(AGC→GCC)



S119E(TCT→GAG)



S100E(AGC→GAG)

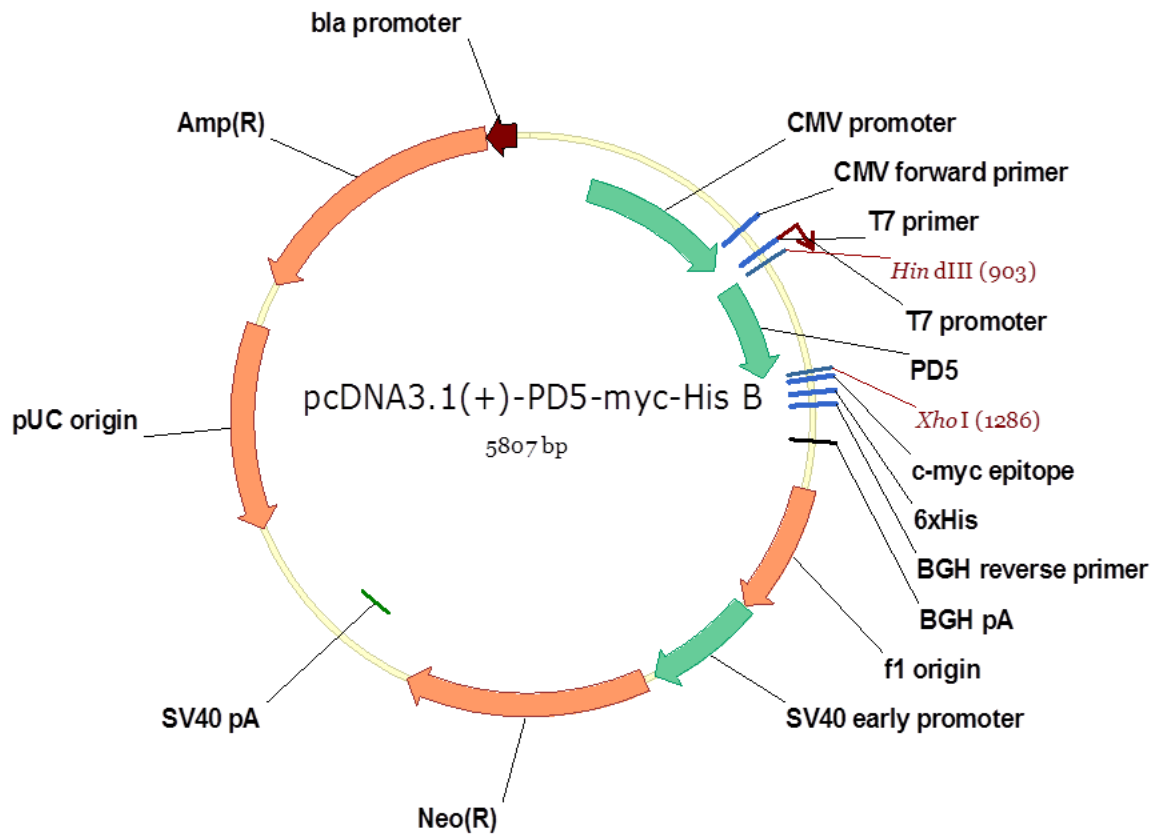


K63Q(AAG→CAG)

圖 2 突變點的定序

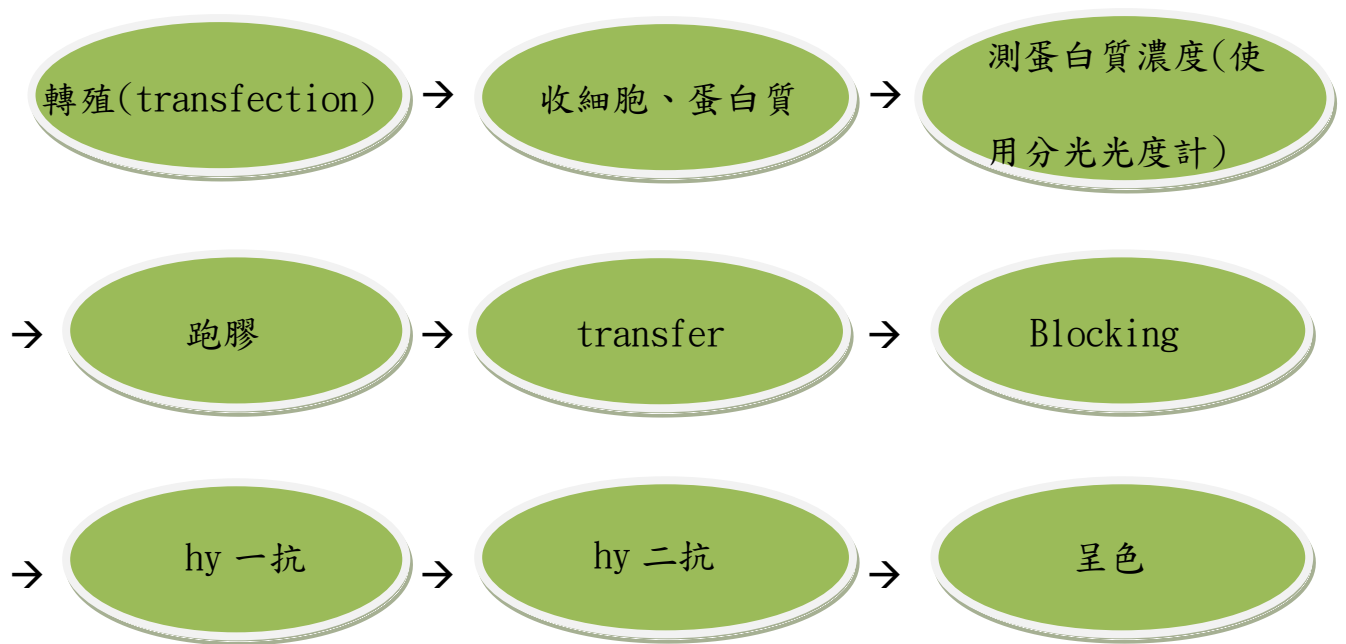
2.PCR(Polymerase Chain Reaction)

PCR(Polymerase Chain Reaction，聚合酶鏈反應)是指體外酶促合成特異DNA片段的一種分子生物學實驗方法，主要由高溫變性、低溫退火和適溫延伸三個步驟反復的熱循環構成，可以使特定的DNA片段呈幾何倍數擴增。我們使用PCR的目的除了使PD5大量複製外，也是為了讓PD5-Myc DNA用限制酵素作用後，將純化的DNA克隆至載體內。



如圖 3 PDCD5-myc 質體:在 PD5 上接一個 Myc 才得以分辨所抗體雜合(hybridization)到的 PD5 是否為我們所克隆進入的 PD5 而不是細胞本身的 PD5

(二)確認是否正確表達:西方點墨法。



西方點墨法的功能是分離不同分子量的物質，進而確認蛋白質是否有表達正確，步驟包括:膠體電泳、transfer、抗體雜和以及呈色和定量分析。

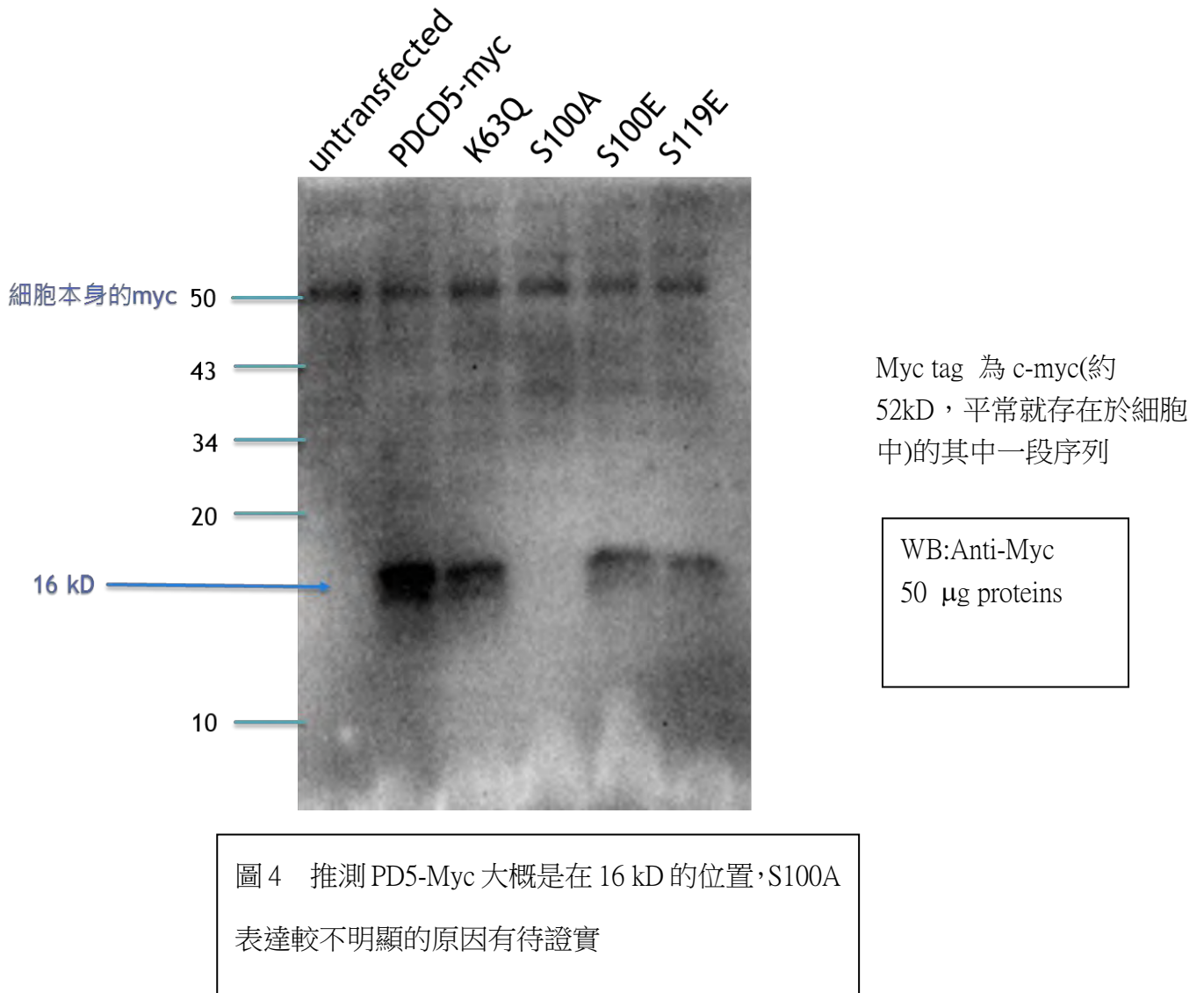
(三)觀察 PDCD5 在細胞內的位置:螢光染色。

是否進入細胞核(表示進行細胞凋亡)。

參、研究結果與討論

一、位點突變

1. 用 HEK293 人類腎臟細胞株做轉殖，確認蛋白質是否正確表達。



多次做 hy Anti-Myc 的呈色，結果都不甚理想，推測有可能是抗體不夠特定的緣故，故改用 Anti-PD5 與螢光染色法來進行確認。

兩次的呈色圖中，在 52 kD 左右的位置皆有 band，原本以為是雜 band，後來查了文獻並討論後才得知那是細胞本有的 C-Myc，大小約 52 kD，Myc-tag 只是 C-Myc 的其中一段序列。

此外，S100A 在兩次的呈色圖中皆不明顯，可能(1)loading 的量有誤差(2)造成 PD5 不穩定而失去功能。

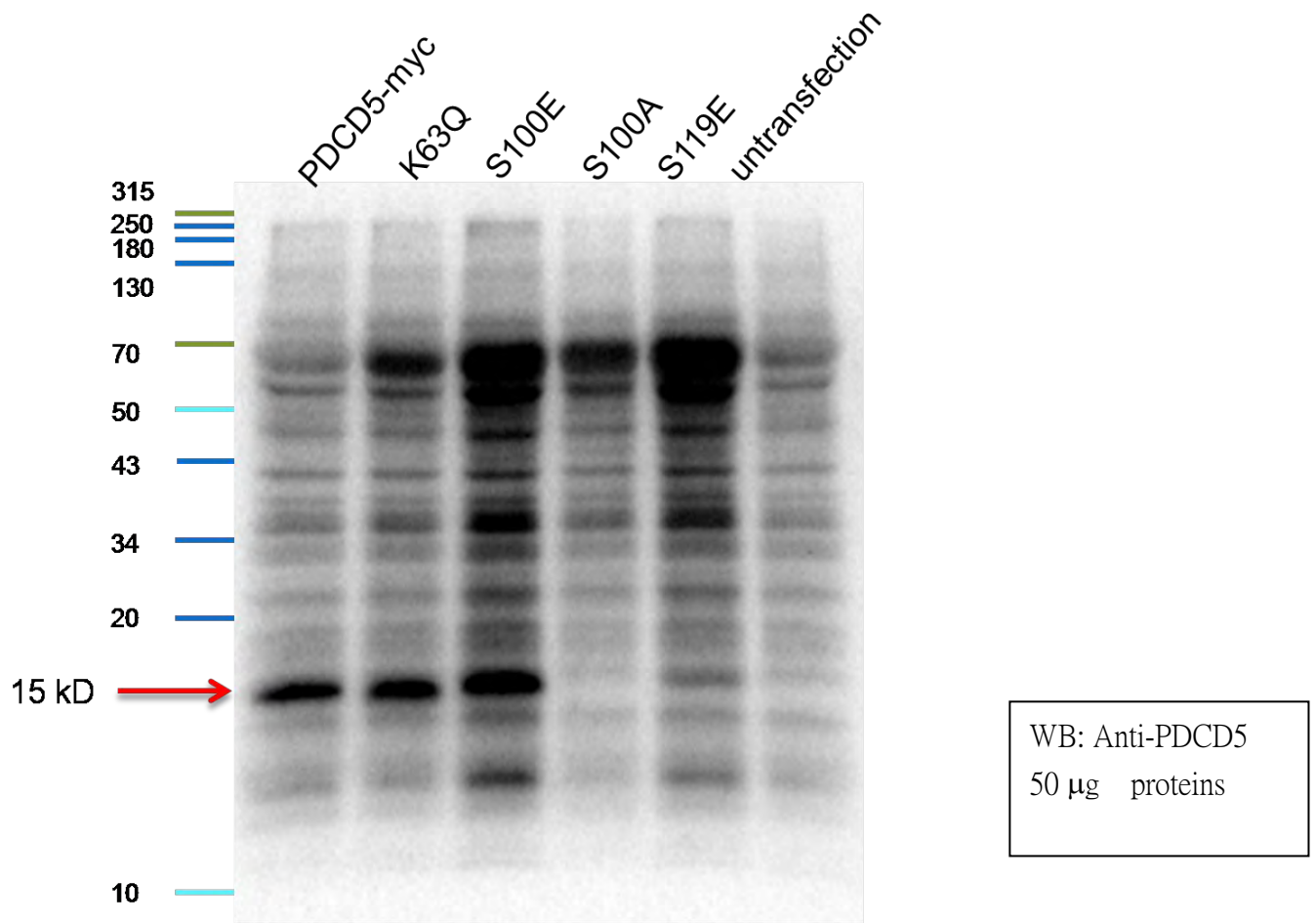


圖 5 由於 hy Anti-Myc 的呈色圖結果不甚理想，於是直接 hy Anti-PD5，PD5 的大小大約是 15 kD，從圖可以得知除了 S100A 外其他突變體的 BAND 都較 untransfection 的濃，而 S100A 在 Anti-Myc 的呈色圖中表達也不明顯，推斷(1)突變造成 PD5 不穩定(2)LOAD 的 SAMPLE 量過少

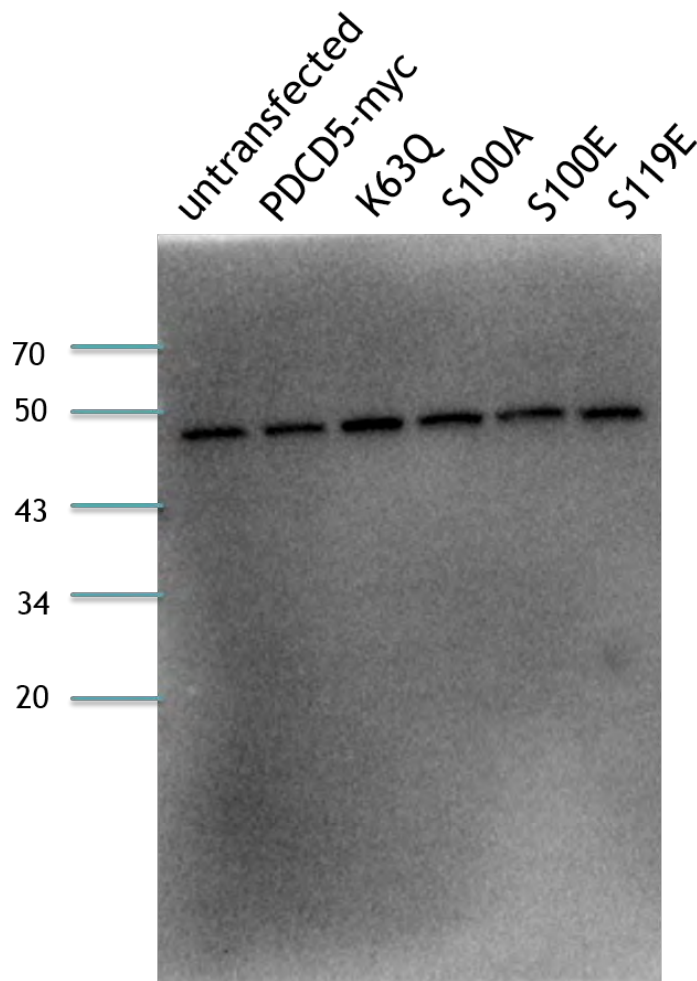


圖 6 Hy internal control ，藉由每 50 mg 的 protein 都應該存在等量 mouse Anti β -actin，看 protein load 的量是否有太大的誤差，以檢查是否對實驗數據有太大的影響

從 loading control 的呈色圖可以得知，我們所 load 的 sample 量並無太大差異，S100A 的突變造成 PD5 不穩定的可能性增加。

二、螢光染色

1. Untransfection+不同濃度的 CoCl_2

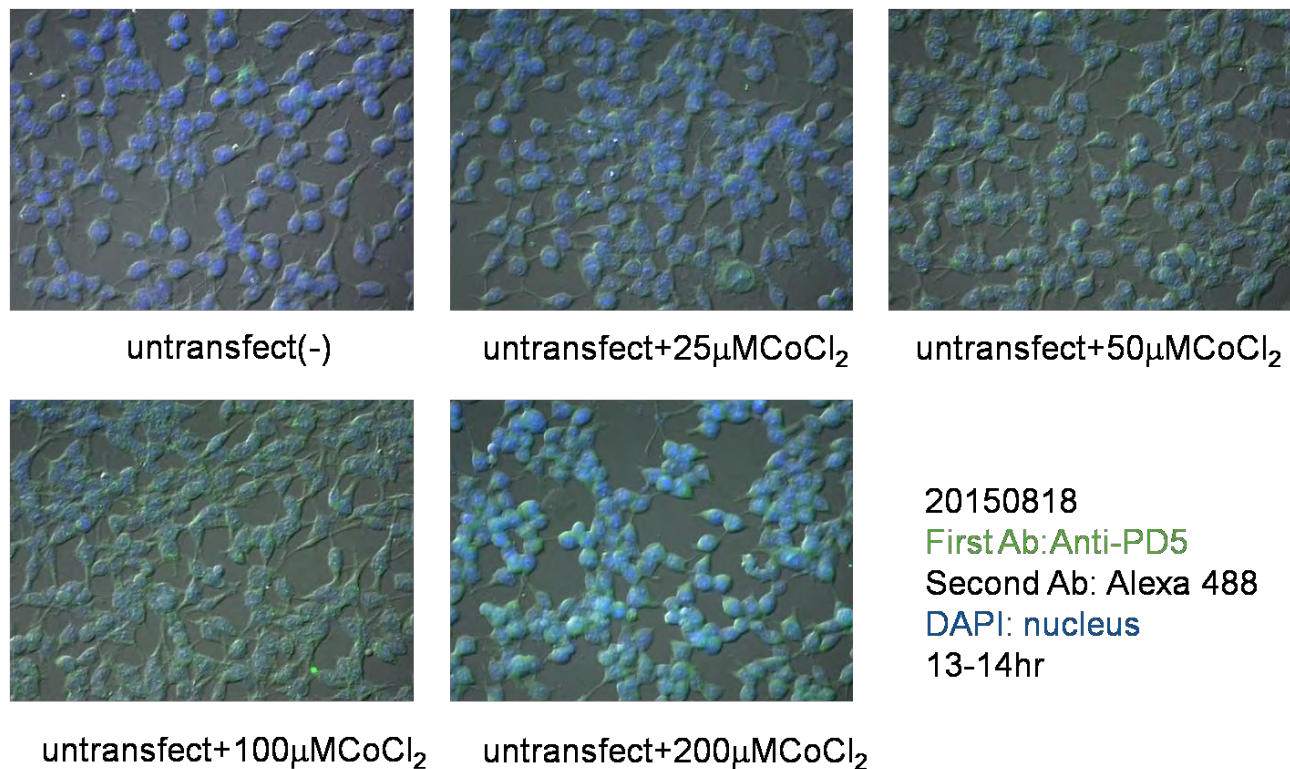


圖 7

CoCl_2 可以取代鐵，造成細胞缺氧性的細胞凋亡，可以藉此情況觀察 PDCD5 的量是否增多，再進一步使用流式細胞儀測定細胞是否真正死亡。

從 Untransfection+不同濃度的 CoCl_2 的螢光染色圖中可以得知兩件事：

- (1) 隨著濃度的增加，PDCD5 的量(綠色部分)也有增加。
- (2) 隨著濃度的增加，PDCD5 也有從 HEK293 細胞質進入細胞核的傾向，應該與誘導細胞凋亡密切相關。

2.看個突變的細胞表達情況

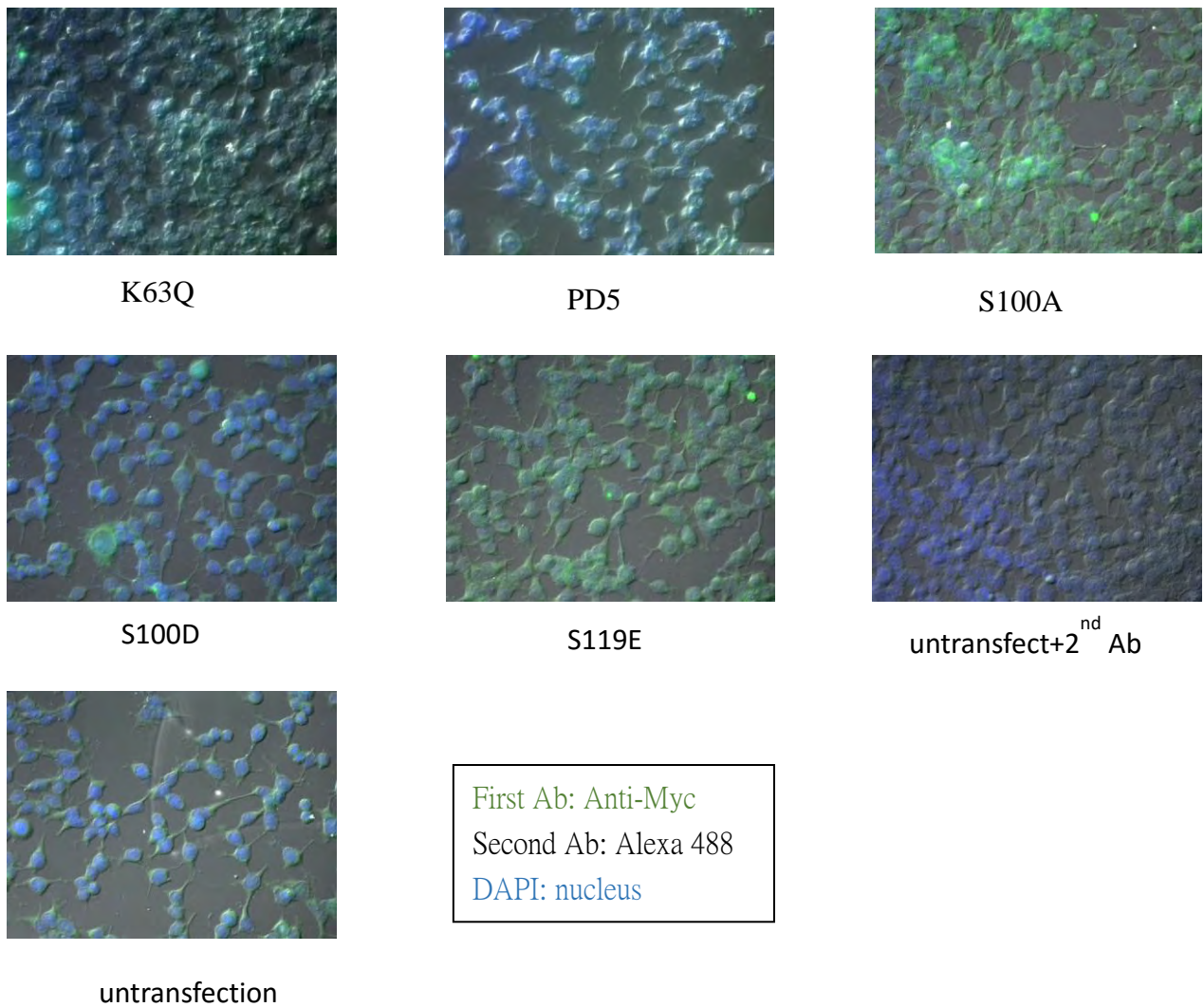


圖 8

如圖 8，可以發現到所有 SAMPLE 都顯示出有 Myc(綠色部分)，但不可就此推斷我們所克隆進的 PD5-Myc 有正確表達，因為細胞本身就具有 C-Myc，而 Myc tag 是 C-Myc 的一部分，因此也會形成綠色部分，如圖八中的 untransfection，雖然並沒有 PD5-Myc，但細胞本身的 Myc 還是與 Anti-Myc 結合，呈現綠色部分。

肆、結論與應用

一、結論

- (一)透過圖六實驗中的 internal control 的呈色圖可以得知，sample 的量並無太大的差異，推測 S100A 的突變可能確實造稱 PD5 不穩定而失去功能。DNA 定序覆驗也是完全正確。
- (二)CoCl₂ 造成了缺氧性的細胞凋亡(圖七)，而隨著濃度的增加，PD5 的量從螢光標記的圖中可以看到有增加，並確實有進入細胞核的傾向。

二、應用

- (一)確認 PD5 促進細胞凋亡的作用機制，確認突變的重要性後，可以加以調控 PD5 表達，使其能有效率地促使癌細胞凋亡，創造抑制癌症生長藥物的新可能。
- (二)因為位點突變可能會影響 PD5 造成細胞凋亡程度改變，那這些可以使 PD5 在這些位點轉譯後修飾的酵素應該具有重要性,也可提供藥物研發依據。

伍、參考文獻

- 1.PDCD5 interacts with p53 and functions as a positive regulator in the p53 pathway. Xu L,Hu J,Zhao Y,Hu J,Xiao J,Wang Y,Ma D,&Chen Y(2012).
- 2.<https://en.wikipedia.org/wiki/PDCD5> Wikipedia. PDCD5.
- 3.Programmed cell death protein 5 (PDCD5) is phosphorylated by CK2 in vitro and in 293T cells. Salvi M,Xu D,Chen Y,Cabrelle A,Sarno S,&Pinna LA(2009).

【評語】 090013

探討 PDCD5 之變異蛋汁穩定性研究，很意外的 S100A 蛋白無法表達，但其原因未明，但是其他重要功能和 P53 之結合並沒有 data。