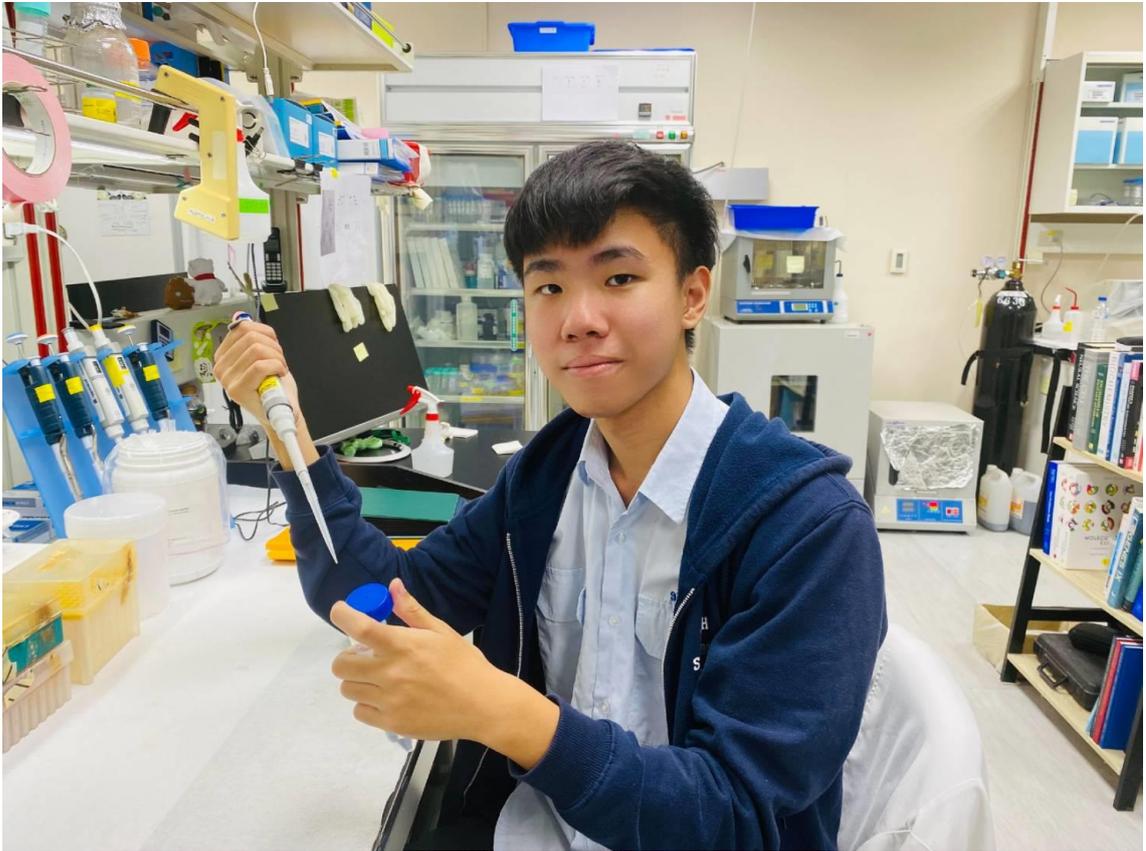


# 2023 年臺灣國際科學展覽會 優勝作品專輯

作品編號	080006
參展科別	生物化學
作品名稱	探討神經細胞特異性磷酸化 Paxillin <sup>S119</sup> 的進核 機制與其對 RNA 剪接的調控
得獎獎項	一等獎 美國 ISEF 正選代表 青少年科學獎
就讀學校	國立臺灣師範大學附屬高級中學
指導教師	鄭珮琳、林峻瑋
作者姓名	潘冠竹
關鍵詞	<u>神經細胞成熟 (neuronal maturation)</u> 、 <u>核定位序列 (nuclear localization signal)</u> 、 <u>Phospho-Paxillin<sup>S119</sup></u>

## 作者簡介



大家好！我是師大附中 1534 數理資優班的學生潘冠竹，我從國一開始就踏入了科學研究的旅程，今年是第二次參加臺灣國際科展。在高一時我抱持著對神經科學的熱忱，很榮幸的加入了中研院分生所鄭珮琳老師的團隊，除了學習到許多生物實驗的方法與知識，也一同探討了神經發育過程的種種現象與分子機制。一路走來，發覺到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遇到無數的瓶頸，但也因為如此，讓我可以不斷的成長，非常感謝陪伴我完成專題的大家！

## 摘要

神經細胞成熟的過程中可分成數個階段，每個階段間的轉換都伴隨著蛋白質的種類，RNA 異構體、細胞結構與功能等全面性的轉變。但控制神經細胞在確切的時序下成熟的分子機制尚待研究。本研究發現 Paxillin 的新功能：當腦神經細胞在活體外培養至第七天時，Paxillin 的位點 Serine119 會被磷酸化 (p-Paxillin<sup>S119</sup>)，並從細胞質轉位進入至細胞核。我們使用 N2a 細胞以神經分化的模式來探討 p-Paxillin<sup>S119</sup> 進核的分子機制與功能，發現 p-Paxillin<sup>S119</sup> 進入細胞核需要位點 Serine119 被磷酸化，且分析後確認 Paxillin 的 LIM 結構域中帶有 PY-NLS 序列，分別為 P516/Y517 及 P575/Y576。我們發現 Paxillin 藉由轉運蛋白 Importin  $\beta 2$  辨識其 PY-NLS 序列，進行蛋白間的交互作用後進入細胞核中。從螢光影像的分析，我們觀察到神經細胞的 p-Paxillin<sup>S119</sup> 在細胞核中會呈現顆粒狀，並與 RNA 剪接因子 P-SR 共定位在核斑點上。經由免疫共沉澱與細胞轉染的方式，我們證實位點 Serine119 突變，會影響 Paxillin 與 RNA 剪接因子的交互作用，及降低細胞分化與 RNA 剪接的程度。

## Abstract

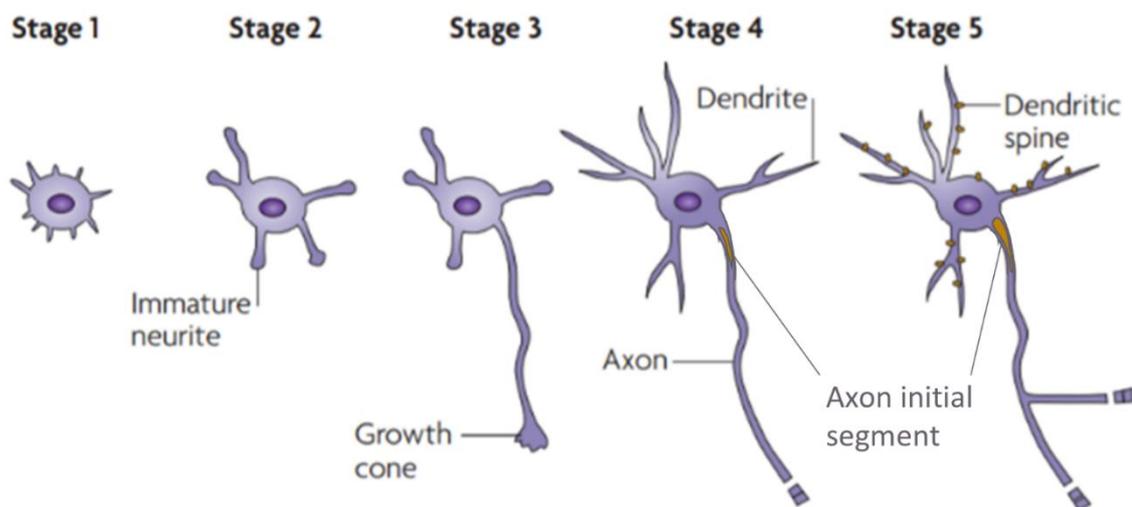
Neuron maturation is a multiple-step process in which each step involves a transformation in isoform, structure, and function. Whether and how timely maturation transitions are controlled remains illusive. We discovered a novel function of nuclear paxillin, the Ser119 of Paxillin is phosphorylated (p-Paxillin<sup>S119</sup>) and it translocates from cytoplasm to nucleus on the seventh day in vitro (DIV). We used N2a cells to explore the molecular mechanism and function of p-Paxillin<sup>S119</sup> nuclear translocation via a neural differentiation model. Blockade of nucleocytoplasmic transport Importin  $\beta 2$  activity inhibits p-Paxillin<sup>S119</sup> nuclear translocation. Both mutations of Ser119 and PY-type nuclear localization signal (PY-NLS) of paxillin significantly cause a reduction in the paxillin nuclear translocation. From co-immunofluorescence staining assay, we observed that p-Paxillin<sup>S119</sup> punctate co-localizes with the RNA splicing factor P-SR on nuclear speckles. By using co-immunoprecipitation and cell transfection, we confirmed that mutation of Ser119 reduces the degree of cellular RNA splicing.

# 壹、前言

## 一、研究背景與文獻探討

### (一) 神經細胞成熟 (neuronal maturation)

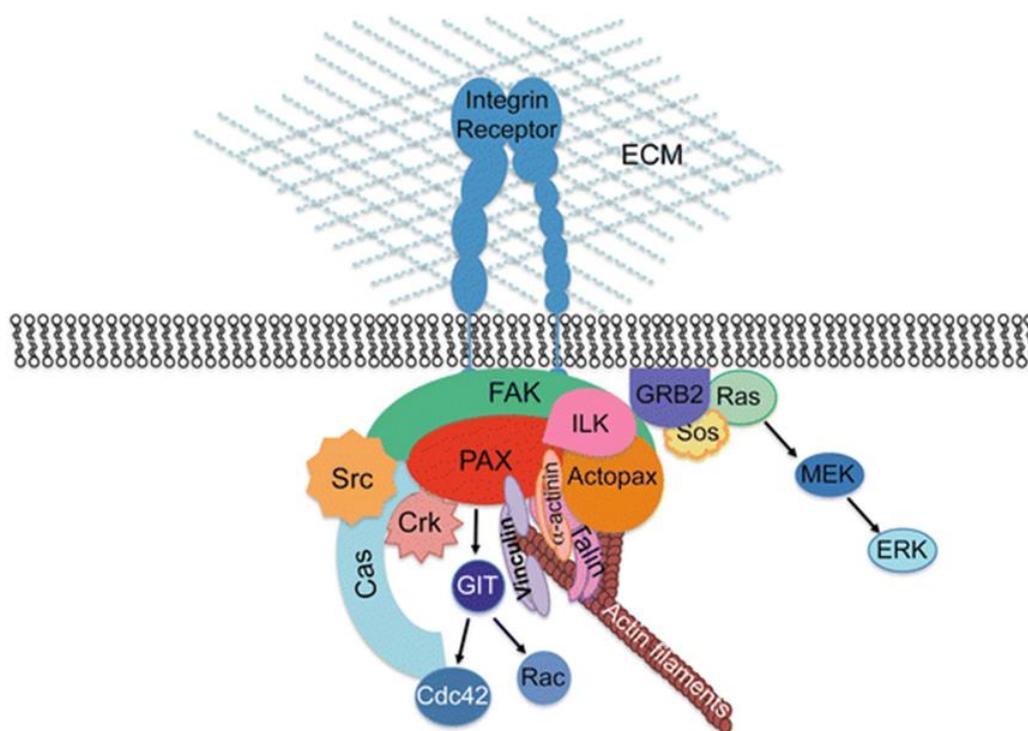
未成熟神經細胞貼附於基材後的生長主要可以分為五個階段；階段一（貼附後 6 小時），神經細胞生長出板狀偽足 (lamellipodia) 和絲狀偽足 (filopodia)；階段二（貼附後 12 小時），神經突 (neurite) 開始形成；階段三（貼附後 24 小時），特定的神經突末端形成生長錐 (growth cones)，並快速生長形成軸突 (axon)，其餘的神經突則會發育成為樹突 (dendrite)；階段四（貼附後 4 天），隨著神經細胞的成熟與軸突的生長，在軸突近端形成一個啟動電訊號傳遞的特化結構，稱為軸突起始段 (axon initial segment; AIS)，且樹突趨近成熟；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。



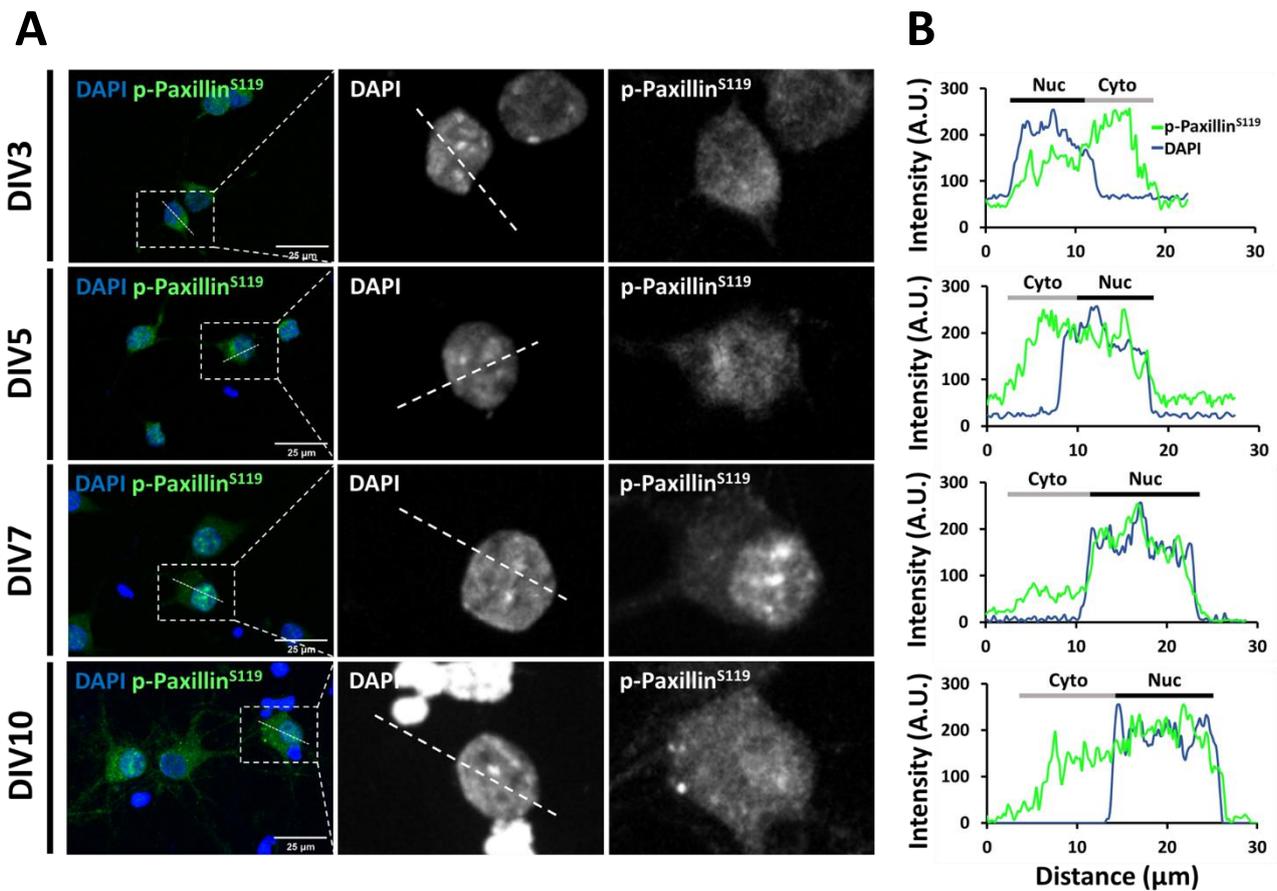
圖二、位於 Focal adhesions 的 Paxillin (López-Colomé et al. 2017)。

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)。

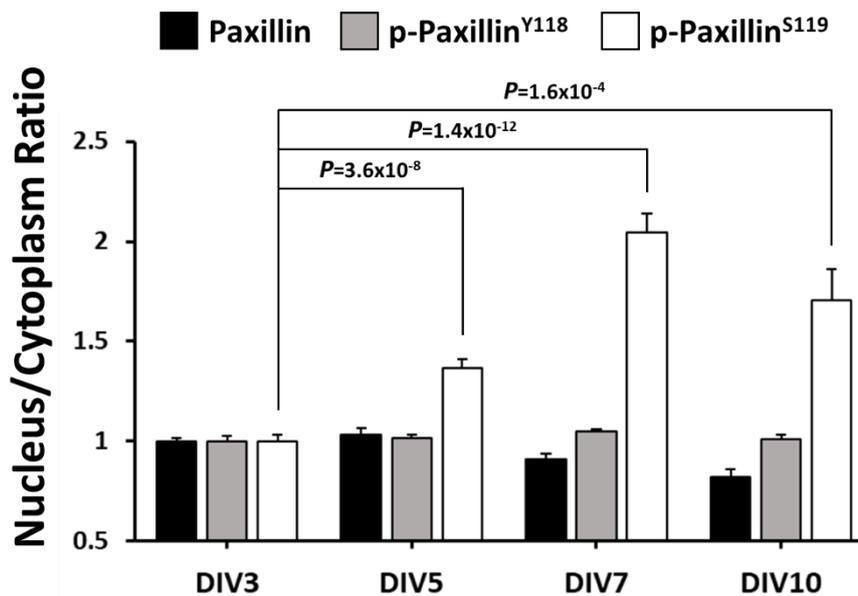
先前的實驗發現，在腦神經成長期間，或神經細胞生長於類似腦部物理環境的軟介質上時，由於 FA 相關蛋白表現量降低，Paxillin 因此傾向與細胞內吞性因子結合而促進囊泡的內陷，加速神經突的生長 (Chang et al. 2017)，這顯示 Paxillin 在神經細胞生長的過程中，具有別於表現在其他非神經細胞時的功能。

## 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<sup>S119</sup> (phospho-Paxillin<sup>S119</sup>; p-Paxillin<sup>S119</sup>) 的表現量高於另外兩種組織。於是我們培養初代腦神經細胞 (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<sup>S119</sup> 在神經細胞中的分布。我們發現隨著天數的增加，p-Paxillin<sup>S119</sup> 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<sup>S119</sup> 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<sup>S119</sup> (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<sup>S119</sup> 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<sup>S119</sup> 主要位於細胞質中；到了 DIV5 時，會較均勻的分佈在細胞中；而在 DIV7 時，可以明顯看到 p-Paxillin<sup>S119</sup> 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，在神經成熟的其間，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。特別的是 p-Paxillin<sup>S119</sup> 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<sup>S119</sup> 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

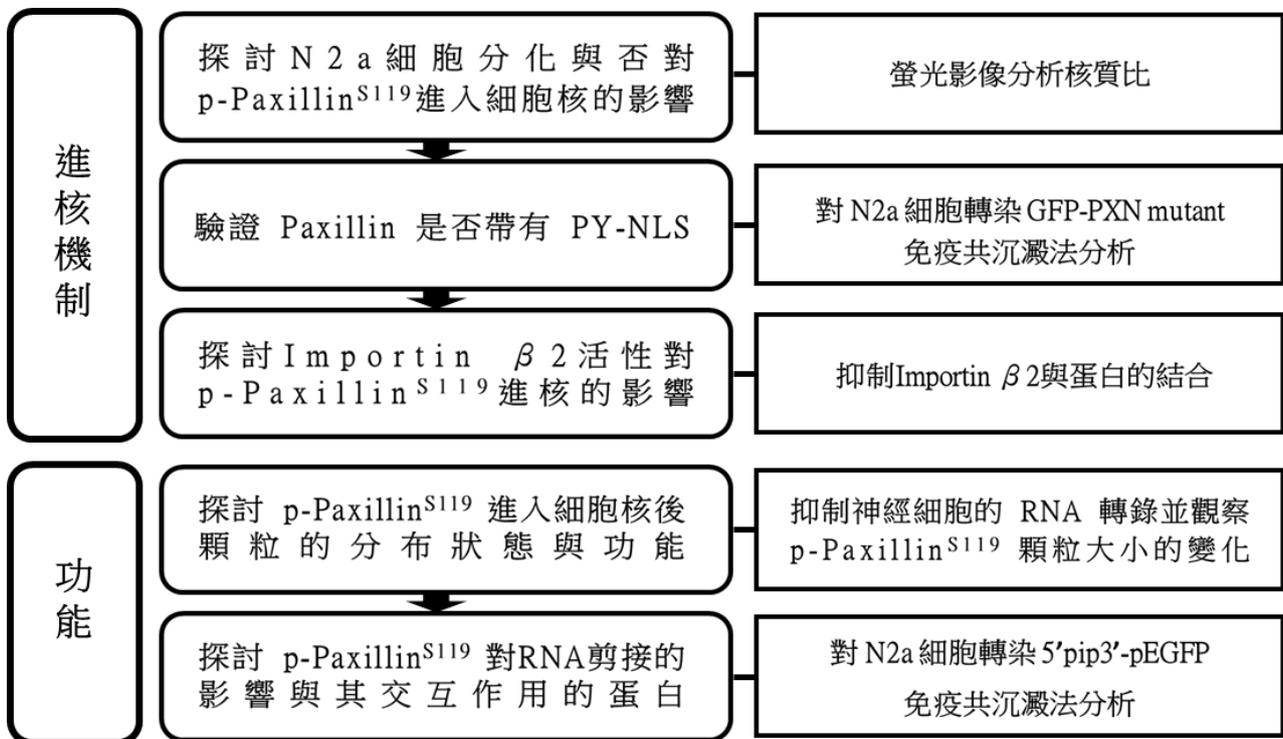
- (一) 探討 p-Paxillin<sup>S119</sup> 進入細胞核的分子機制
- (二) 探討 p-Paxillin<sup>S119</sup> 對神經生長的影響與功能

## 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) 細胞來源

本研究利用初代神經細胞與神經母細胞瘤 Neuro-2a (N2a) 細胞株進行探討，皆由實驗室提供。初代神經細胞取自大鼠受孕後 17.5 天的胚胎，是實驗室從組織分離後，有剩餘足量的細胞才進行培養及實驗。

### (二) 細胞繼代培養 (Passage)

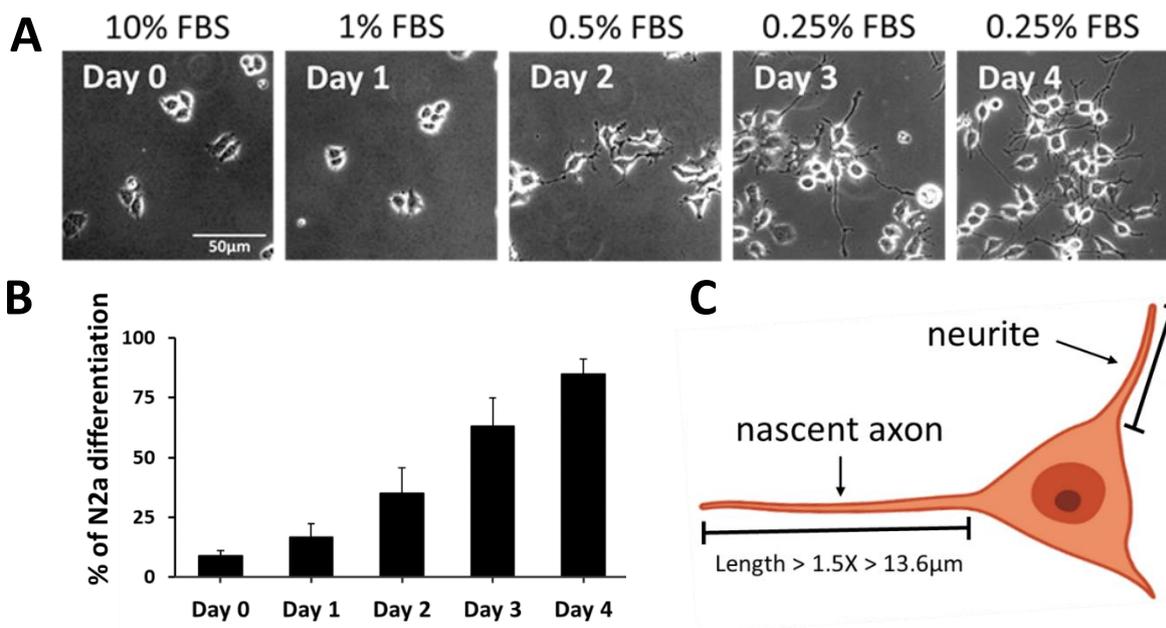
將培養皿中的培養液移除，加入 1mL PBS (Phosphate buffered saline, PBS) 將殘餘的培養液移除，再加入 2mL 的胰蛋白酶 (trypsin)，並放入含 5% 二氧化碳 (CO<sub>2</sub>) 的 37 °C 培養箱 (Incubator) 中反應約 2 分鐘後，加入 1mL 培養液，把混和液裝入 15mL 的試管中，以 300g 離心 3 分鐘集中細胞。將上清液抽掉並加入適量含有 10% 胎牛血清 (Fetal bovine serum, FBS)、1mM Sodimm pyruvate 及 2mM L-Glutamine 的 MEM 培養液 (Minimum 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。

### (三) 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 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。

### (四) 誘導細胞分化

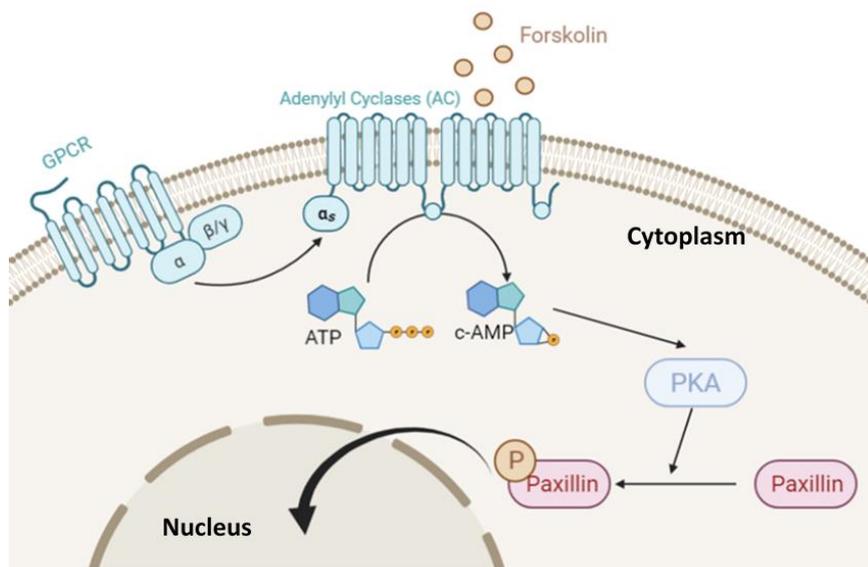
透過降低培養基中的血清 (serum) 濃度促使 N2a 細胞分化。先將細胞種植在含有 10% 胎牛血清的培養基中，然後以特定的比例置換不含血清的培養基，共更換 3 次，每次間隔 24 小時，最後以含有 0.25% 胎牛血清的培養基持續培養。如圖五(A)與(B)。細胞長出的新生軸突 (nascent axon) 長度需大於細胞直徑 (界定為 13.6 $\mu$ m，來自 82 顆 N2a 細胞的平均值)，也要大於其他神經突的平均長度，才視為已分化的細胞。如圖五(C)。



圖五、N2a 細胞的分化情形。(A) 為 N2a 細胞隨著 FBS 濃度降低的穿透光以影像。(B) 為統計結果，細胞分化百分比之數據為平均值  $\pm$  SEM。(C) 為判定 N2a 細胞分化的示意圖。

#### (五) 促進 Paxillin<sup>S119</sup> 磷酸化

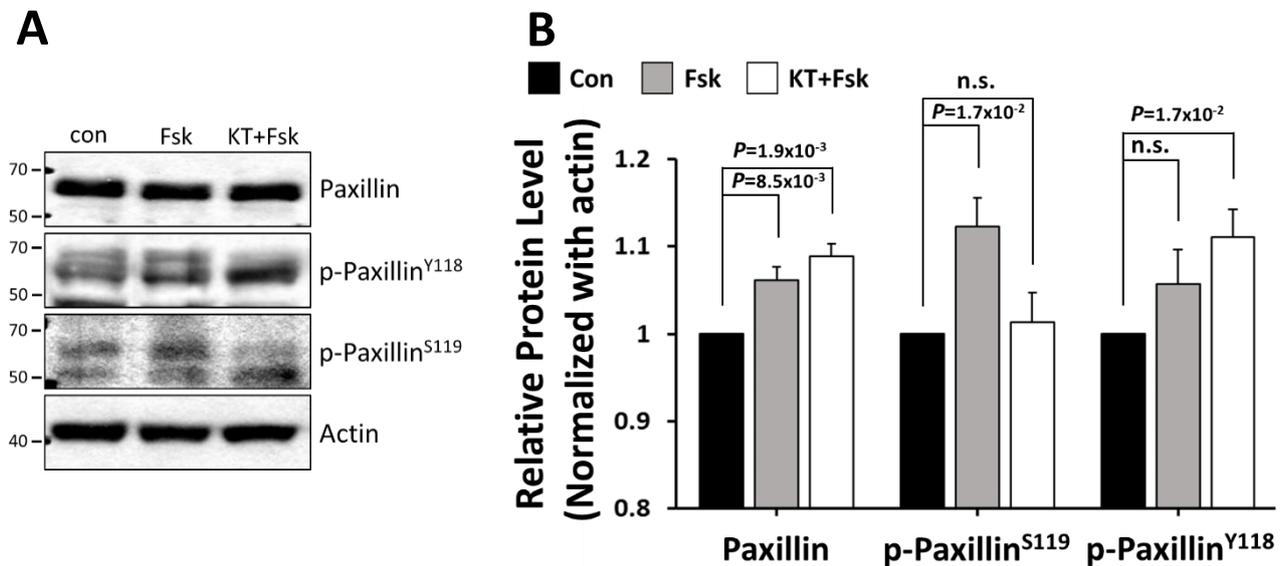
為了提高 N2a 細胞中 p-Paxillin<sup>S119</sup> 的表現量，以及讓 N2a 細胞的分化更完全，當細胞分化到第四天，在培養皿中，加入 3μL 的 20mM Forskolin 到 6cm 培養皿中。Forskolin 能夠激活腺苷酸環化酶 (Adenylyl Cyclases; AC)，被激活的 AC 會將細胞內的 ATP 轉換成 cAMP，細胞內 cAMP 的水平增加，會提高 Protein kinase A (PKA) 的活性，活化的 PKA 會磷酸化 Serine 和 Threonine 這兩個點位，進而促使 Paxillin<sup>S119</sup> 磷酸化。如圖六。



圖六、Forskolin 促進 Paxillin<sup>S119</sup> 磷酸化的過程。

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<sup>S119</sup> 的表現量，使用未分化的 N2a 細胞，分析並比較 Paxillin、p-Paxillin<sup>Y118</sup> 及 p-Paxillin<sup>S119</sup>，在有無 Forskolin 處理的表現量。如圖七。

由圖七可知，p-Paxillin<sup>S119</sup> 的表現量能透過 Forskolin 而提高，且不影響 Paxillin 與 p-Paxillin<sup>Y118</sup> 的表現量。經過 KT5720 處理的細胞，加入 Forskolin 反應後，p-Paxillin<sup>S119</sup> 的表現量維持在一般的水平，代表 p-Paxillin<sup>S119</sup> 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 20μM Forskolin 反應 1 小時為基準，探討 p-Paxillin<sup>S119</sup> 進入細胞核的機制。



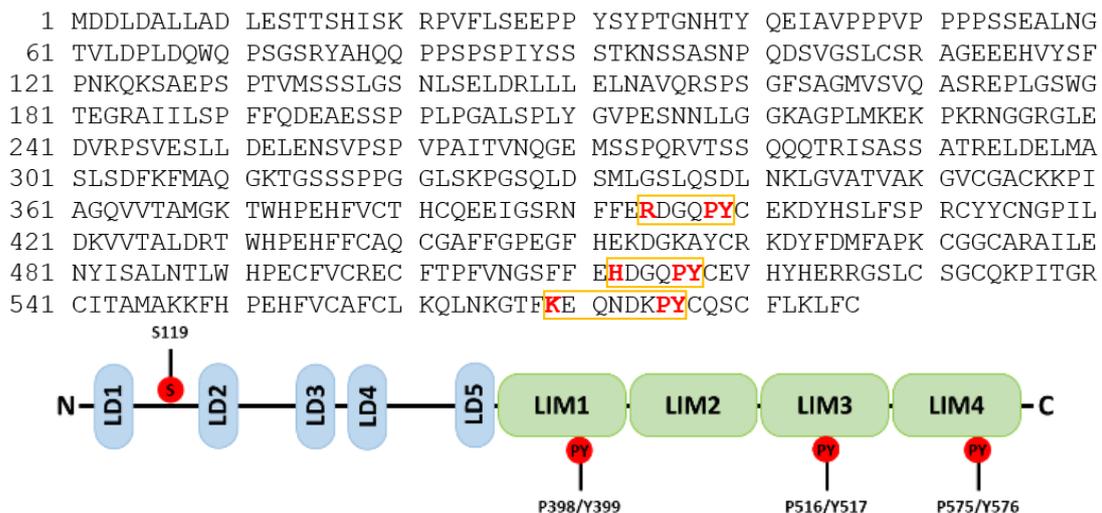
圖七、Forskolin 對 Paxillin、p-Paxillin<sup>Y118</sup> 及 p-Paxillin<sup>S119</sup> 表現量的影響。(A) 為西方墨點法的結果。(B) 為統計結果，黑色組為未經任處理的細胞；灰色組為經 20μM Forskolin 反應一個小時的細胞；白色組為經 0.5μM 的 PAK 抑制劑 KT5720 (KT) 反應三十分鐘，再加入 20μM Forskolin 反應一個小時的細胞。表現量之數據為平均值 ± SEM (來自 3 次獨立實驗，not significant (n.s.) 表示數據沒有顯著差異 (P > 0.05)，以 t test 進行統計檢定)。

## (六) 細胞轉染 (transfection)

首先將 N2a 細胞以  $8 \times 10^6$  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 $\mu$ L Opti-MEM (Reduced Serum Media)、4 $\mu$ L 脂質體 (Lipofectamine) 及 4 $\mu$ 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。

## (七) Paxillin PY-NLS 判定

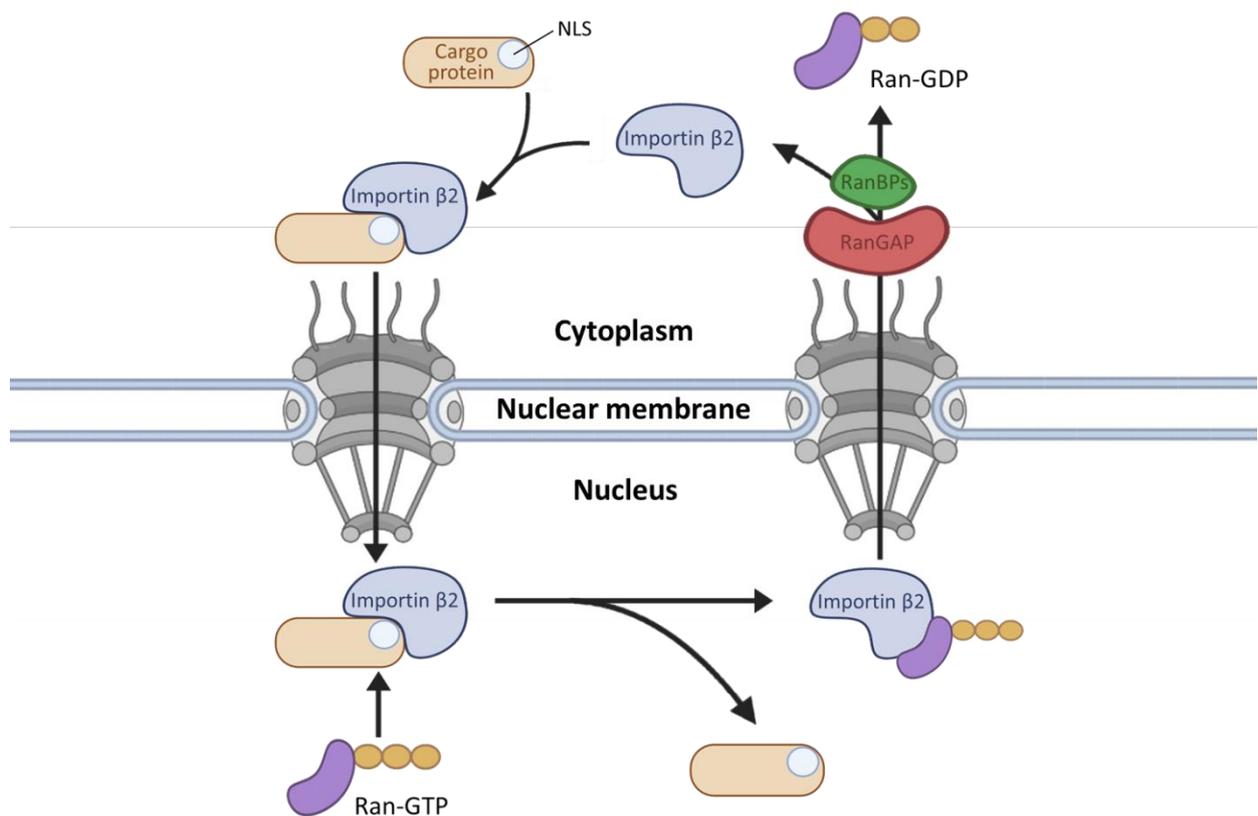
蛋白質從細胞質進入到細胞核，需要帶有核定位序列 (nuclear localization signal; NLS)，由核轉運蛋白 (Karyopherin) 所辨識並帶入細胞核中。我們將大鼠的 Paxillin 胺基酸序列帶入 NLS prediction software 網站進行分析，沒有檢測到 Paxillin 帶傳統型核定位序列 (classical nuclear localization signals; ncNLS)。接者以非傳統型核定位序列 (Non-classical nuclear localization signals; ncNLS) 進行對比，在 Paxillin 的 LIM 結構域上找到三個有淺力被轉運蛋白 Importin  $\beta$ 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<sub>n</sub>-[R/H/K]-(X)<sub>2-5</sub>-PY (Haihua Ruan et al. 2021)。



圖八、Paxillin 胺基酸序列與推測 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)，並製作成分別帶有 GFP 和 FLAG 的 mutant (由實驗室提供)，再將其轉染進 N2a 細胞中，螢光影像觀察 GFP-PXN 的分布，以及免疫共沉澱法分析 FLAG-PXN 與其他蛋白質的交互作用 (PXN 為 Paxillin 的基因名)。

Importin  $\beta 2$  (又稱 Transportin-1) 在轉運的過程中，首先會辨識貨物蛋白 (cargo protein) 序列上的 PY-NLS，再與其蛋白結合成複合體。透過 Importin  $\beta 2$  與核孔 (Nuclear pore) 交互作用，將複合體從細胞質擴散到細胞核中，接下來 Ran-GTP 會與 Importin  $\beta 2$  結合，此時 Importin  $\beta 2$  會釋放貨物蛋白質然後離開細胞核，接著在 RanGAP 與 RanBPs 的聯合作用下，Ran-GTP 水解成 Ran-GDP，並與 Importin  $\beta 2$  分離 (Pierre Barraud et al. 2021)。如圖九。



圖九、Importin  $\beta 2$  將蛋白質帶入細胞核的過程。

## (八) 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 $\mu$ 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 ddH<sub>2</sub>O)，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，倒掉溶液，以 TBS-T 沖洗 membrane 三次，每次 10 分鐘。之後加入以 Blocking buffer 稀釋的一級抗體 (Primary antibodies)，並於 4 $^{\circ}$ C 冷房中作用 16 小時以上，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 10 分鐘。接著加入以 Blocking buffer 稀釋的二級抗體 (Secondary antibodies)，並作用於室溫下 1 小時，隨後亦以 TBS-T 沖洗 membrane 三次，每次 10 分鐘。洗淨之 membrane 最後加入化學發光底物 (ECL) 作用約 1 分鐘，以透明塑膠膜封住 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。

## (九) 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 0.3% 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。

表一、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 <sup>S119</sup>	rabbit anti p-Paxillin <sup>S119</sup>	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 $\beta 2$	mouse anti Importin $\beta 2$	Goat anti mouse IgG (Alex 488)

#### （十）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，並進行交互作用。首先在 eppendorf 中加入 1 $\mu$ L FLAG 的一級抗體與 20 $\mu$ g 純化用磁珠 (Magnetic beads for purification)，放到機台上緩慢旋轉，在 4 $^{\circ}$ C 下均勻混合 5~6 小時。取含 1mg 蛋白質裂解液，再加入 IP binding buffer 將溶液補置總體積 350 $\mu$ L，在 4 $^{\circ}$ C 下緩慢旋轉使其作用 16 小時以上。作用後以每分鐘 3000 轉離心 30 秒，去除上清液後，使用 NG buffer 清洗三次，再加入 sample buffer 以 100 $^{\circ}$ 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，加入抗體來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其蛋白質形成複合體，並具有交互作用。

#### （十一）數據分析

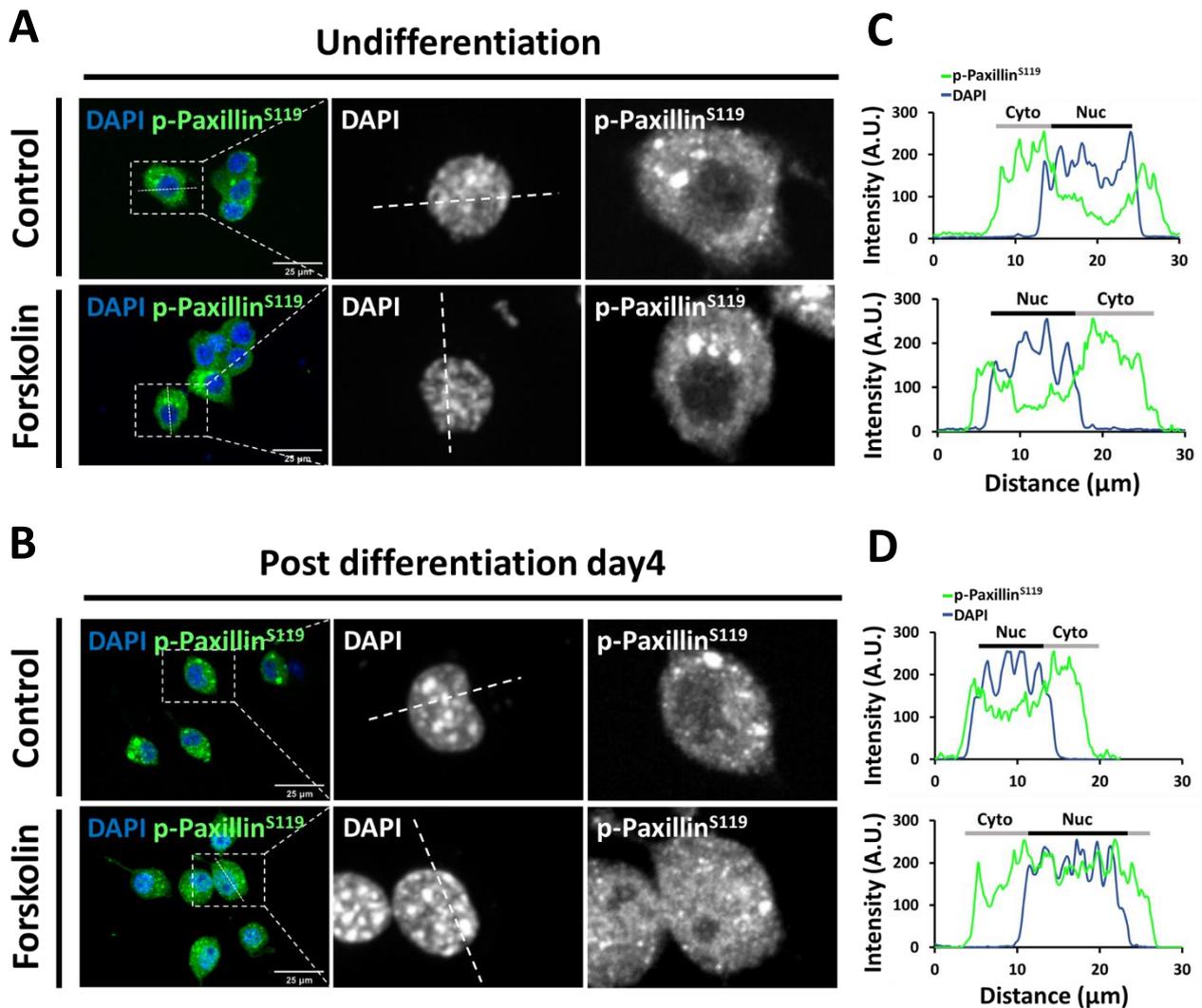
將共軛焦顯微鏡下所拍攝的照片進行疊圖，以相同參數調整螢光強度，並以 ImageJ 軟體測量細胞的細胞質與細胞核面積，以及所標示蛋白的螢光表現量，蛋白的表現量除以所占的面積後，取得核質比。將所得數據使用 Excel 軟體進行統計分析。

## 肆、研究結果

### 一、N2a 細胞分化使 p-Paxillin<sup>S119</sup> 進入細胞核的比例增加

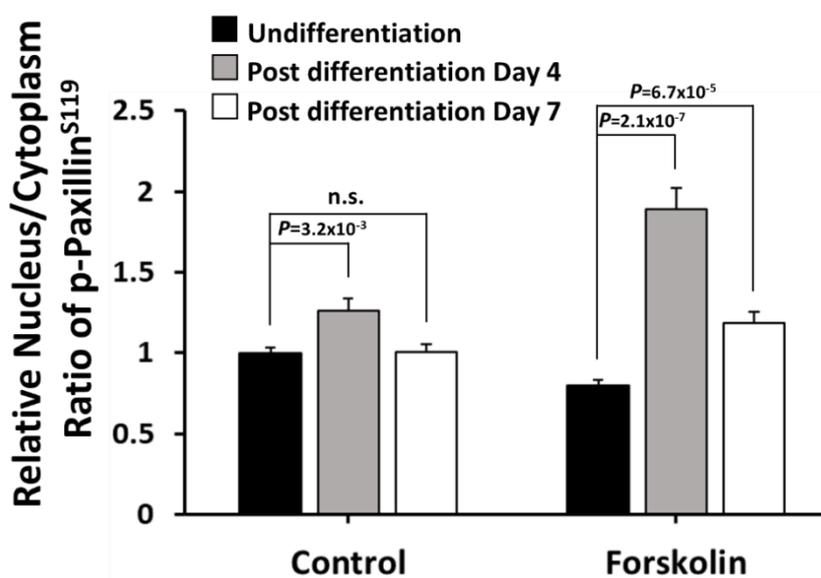
#### (一) 以螢光影像分析 p-Paxillin<sup>S119</sup> 核質比

本研究在初代神經細胞中觀察到 p-Paxillin<sup>S119</sup> 進入到細胞核中，由於神經細胞在進行活體外培養之前就開始進行分化，為了確認 p-Paxillin<sup>S119</sup> 進核是否為神經型態細胞特有的現象，我們透過比對未分化與分化的 N2a 細胞，其 p-Paxillin<sup>S119</sup> 的核質比進行探討。如圖十及十一。



圖十、N2a 細胞的 p-Paxillin<sup>S119</sup> 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 $\mu$ 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。細胞在低 FBS 濃度的培養液中培養，分化至四天，加入 20 $\mu$ 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<sup>S119</sup> (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。

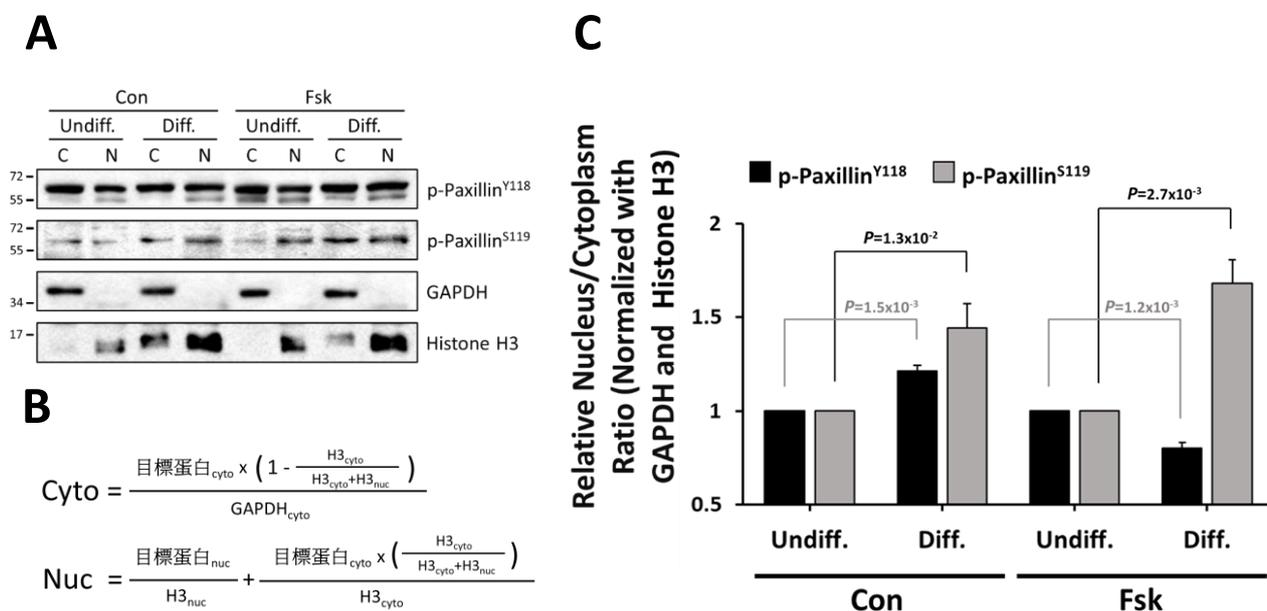


圖十一、N2a 細胞的 p-Paxillin<sup>S119</sup> 在細胞未分化與分化時的核質比。黑色組為未分化的 N2a 細胞；灰色組為分化至第四天的 N2a 細胞；白色組為分化至第七天的 N2a 細胞。核質比之數據為平均值  $\pm$  SEM (來自 2 次獨立實驗，每組  $n \geq 10$  顆細胞，not significant (n.s.) 表示數據沒有顯著差異 ( $P > 0.05$ )，以 t test 進行統計檢定)。

比較圖十(A)與(B) p-Paxillin<sup>S119</sup> 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<sup>S119</sup> 的分布明顯增加，並且有 Forskolin 反應的細胞，增加的程度更顯著。在神經細胞中 p-Paxillin<sup>S119</sup> 進入到細胞核是有時段性的，所以我們也比較了未分化、分化至第四天與分化至第七天時，N2a 細胞的 p-Paxillin<sup>S119</sup> 核質比，從圖十一的統計結果可知，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<sup>S119</sup> 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<sup>S119</sup> 在細胞質與細胞核的表現量。如圖十二。



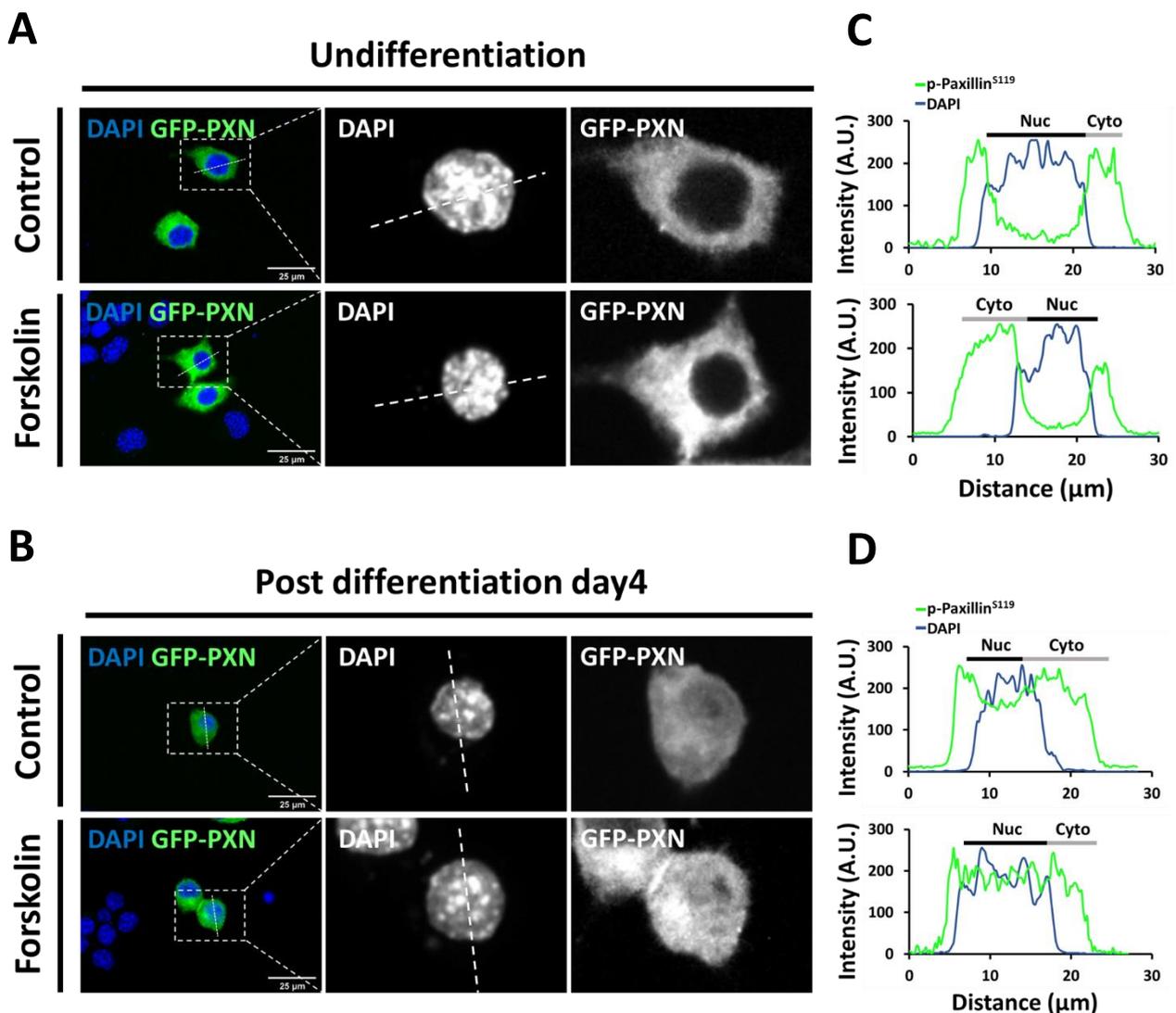
圖十二、N2a 細胞的 p-Paxillin<sup>S119</sup> 在細胞未分化與分化時位於細胞質與細胞核中的表現量。(A) 為西方墨點法的結果。(B) 為細胞質 (Cyto) 與細胞核 (Nuc) 數值的計算方式。(C) 為統計結果，黑色組為 p-Paxillin<sup>Y118</sup>；灰色組為 p-Paxillin<sup>S119</sup>。Undiiff.代表未分化的 N2a 細胞；Diiff.代表分化至第四天的 N2a 細胞。核質比之數據為平均值 ± SEM (來自 3 次獨立實驗，以 t test 進行統計檢定)。

從圖十二(A)可知，對 N2a 細胞進行核質分離時，部分的核模跟細胞膜一起被打破，所以位於細胞核的蛋白 Histone H3 在 PVDF membrane 上的細胞質區域有些許的表現，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。從圖十二(C)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。藉由以上結果再次確認了 p-Paxillin<sup>S119</sup> 進入細胞核需透過 N2a 細胞向神經型態分化的引導。

## 二、位點 S119 與 PY-NLS 突變使 GFP-PXN 無法進入細胞核

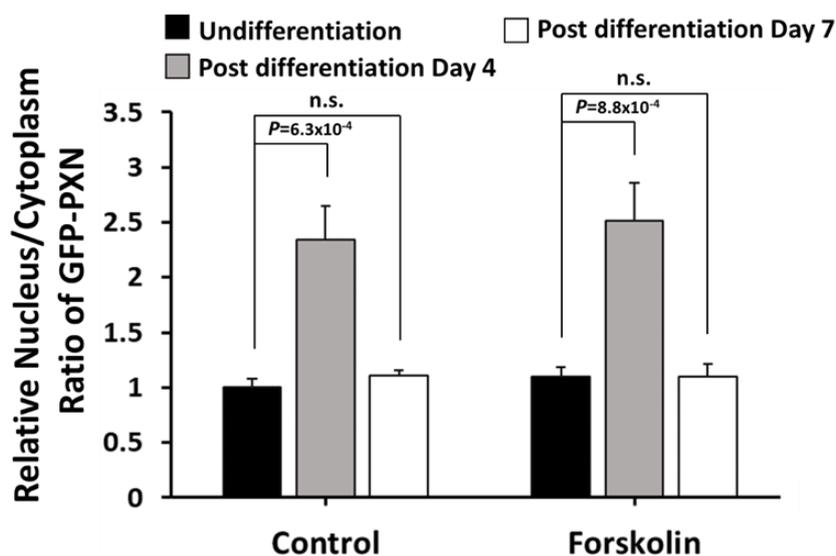
### (一) N2a 細胞分化對 GFP-PXN-WT 進入細胞核的影響

欲探討 p-Paxillin<sup>S119</sup> 進入細胞的分子機制，我們對 N2a 細胞轉染了 GFP-PXN mutant。為了區分細胞原生與轉染進去的 Paxillin，在 mutant 中 Paxillin 的胺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)，轉染到 N2a 細胞中，觀察 GFP-PXN 在未分化與分化至第四天的 N2a 細胞中分布的情形，並比較其核質比。如圖十三及十四。



圖十三、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。細胞在低 FBS 濃度的培養液中培養，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 $\mu$ 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<sup>S119</sup>(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。

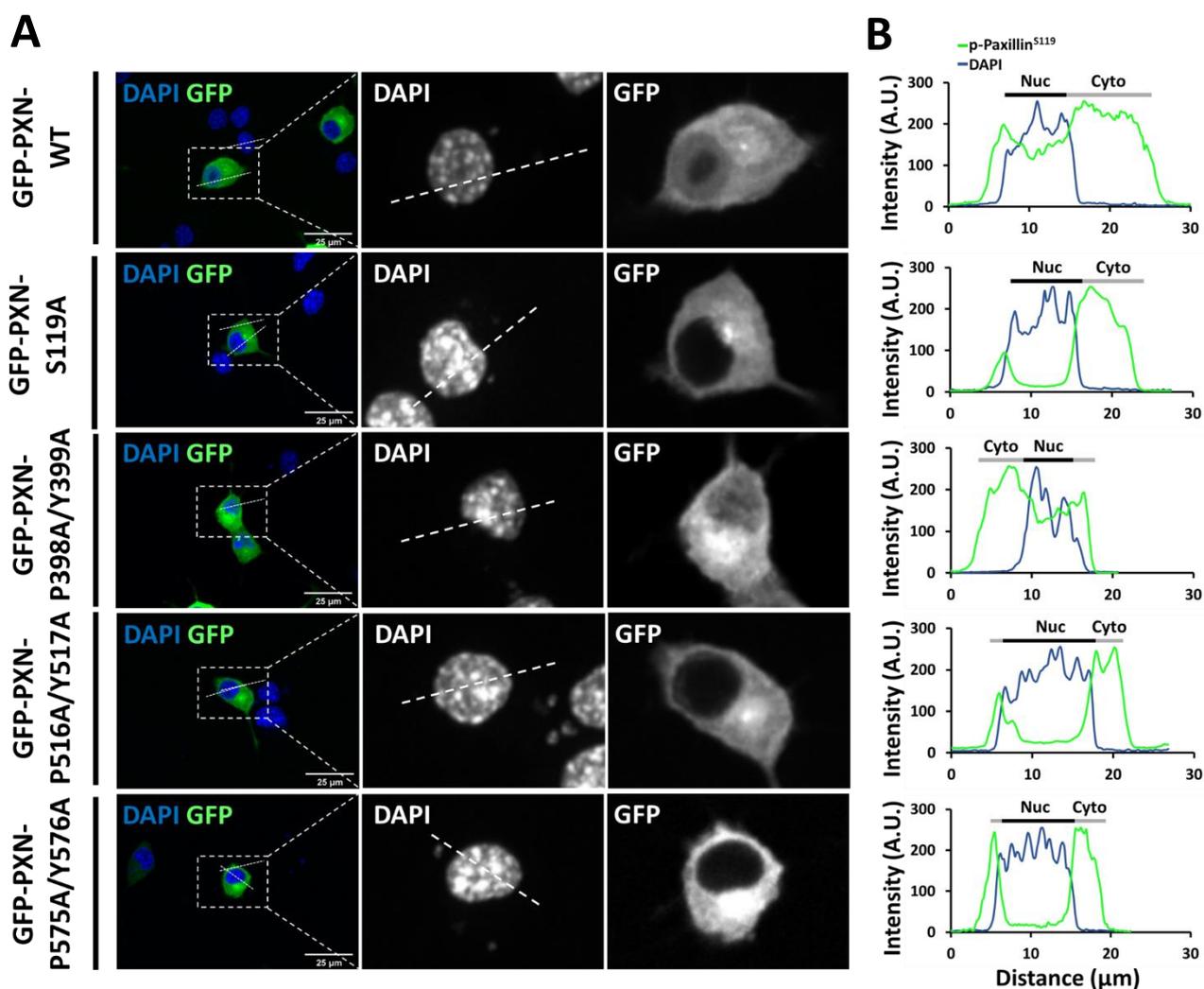


圖十四、轉染進 N2a 細胞的 GFP-PXN 在細胞未分化與分化時的核質比。黑色組為未分化的 N2a 細胞；灰色組為分化至第四天的 N2a 細胞；白色組為分化至第七天的 N2a 細胞。數據代表平均值  $\pm$  SEM (來自 2 次獨立實驗，每組  $n \geq 8$  顆細胞，not significant (n.s.) 表示數據沒有顯著差異 ( $P > 0.05$ )，以 t test 進行統計檢定)。

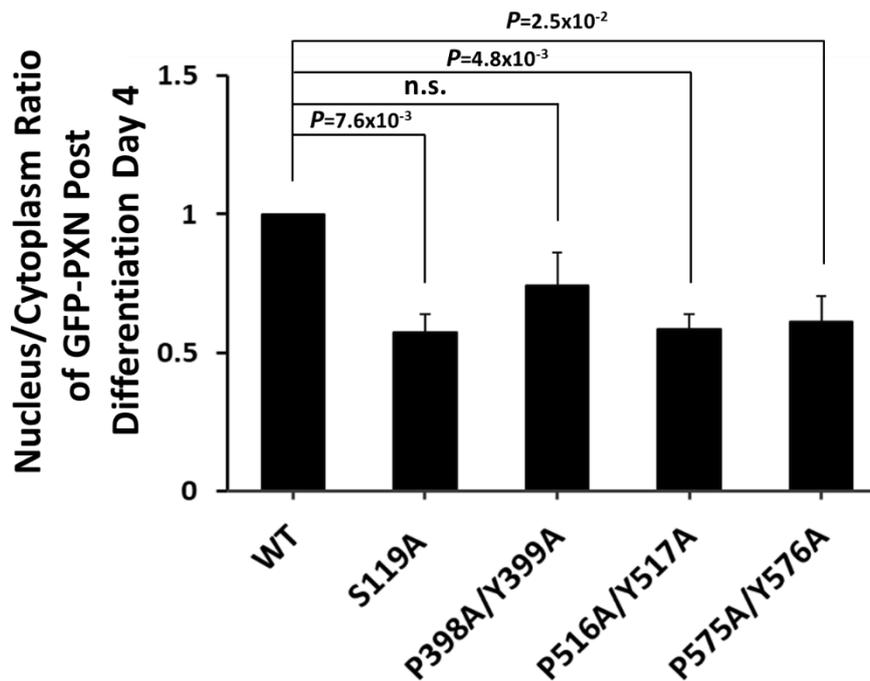
比較圖十三(A)與(B) GFP-PXN 的螢光影像可以觀察到，在 N2a 細胞向神經型態分化時，細胞核內 GFP-PXN 的分布明顯增加，而有 Forskolin 反應的細胞，增加的程度更顯著。從圖十四的統計結果可知，控制組與有 Forskolin 反應組中，分化至第四天的核質比與未分化的核質比相比皆有顯著的提高。而分化至第七天的核質比與未分化的核質比相比則沒有顯著差異。此結果與 p-Paxillin<sup>S119</sup> 進入細胞核的現象一致，表示帶有 GFP 的 Paxillin，在 N2a 細胞向神經型態分化的其間，能夠進入細胞核，不受到 GFP 的影響。

## (二) 點突變對 GFP-PXN-WT 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，接下來將位點 S119 與 PY-NLS 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。如圖十五及十六。



圖十五、轉染進 N2a 細胞的不同點突變之 GFP-PXN 在細胞分化時的分布。(A) 為分化的 N2a 細胞螢光影像，細胞核使用 DAPI 進行染色。細胞在低 FBS 濃度的培養液中培養，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 20μM 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。

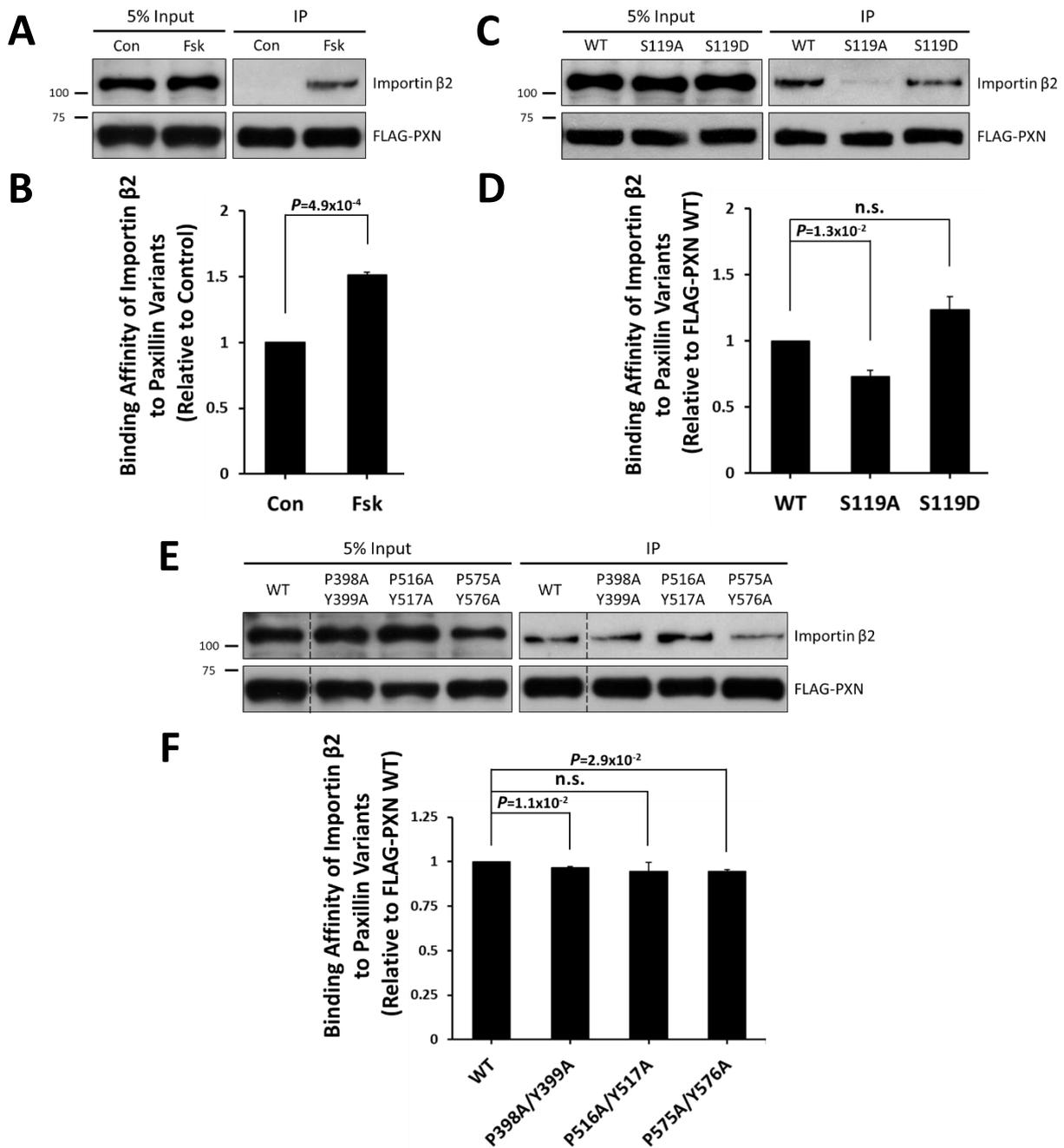


圖十六、轉染進 N2a 細胞的不同點突變之 GFP-PXN 在細胞分化時的核質比。核質比數據代表平均值  $\pm$  SEM (來自 3 次獨立實驗，每組  $n \geq 9$  顆細胞，not significant (n.s.) 表示數據沒有顯著差異 ( $P > 0.05$ )，以 t test 進行統計檢定)。

比較圖十五(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。從圖十六的統計可以看到，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 相比也具有顯著的差異，代表這兩個位點的破壞會使 GFP-PXN 無法進入細胞核。

### 三、PY-NLS 點突變影響了 Paxillin 與 Importin $\beta 2$ 的交互作用

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，於是我們對 N2a 細胞轉染了 FLAG-PXN，並使用免疫共沉澱法，來探討 S119 位點磷酸化與否及 PY-NLS 的點突變，是否對 Importin  $\beta 2$  與 Paxillin 的交互作用有影響。如圖十七。



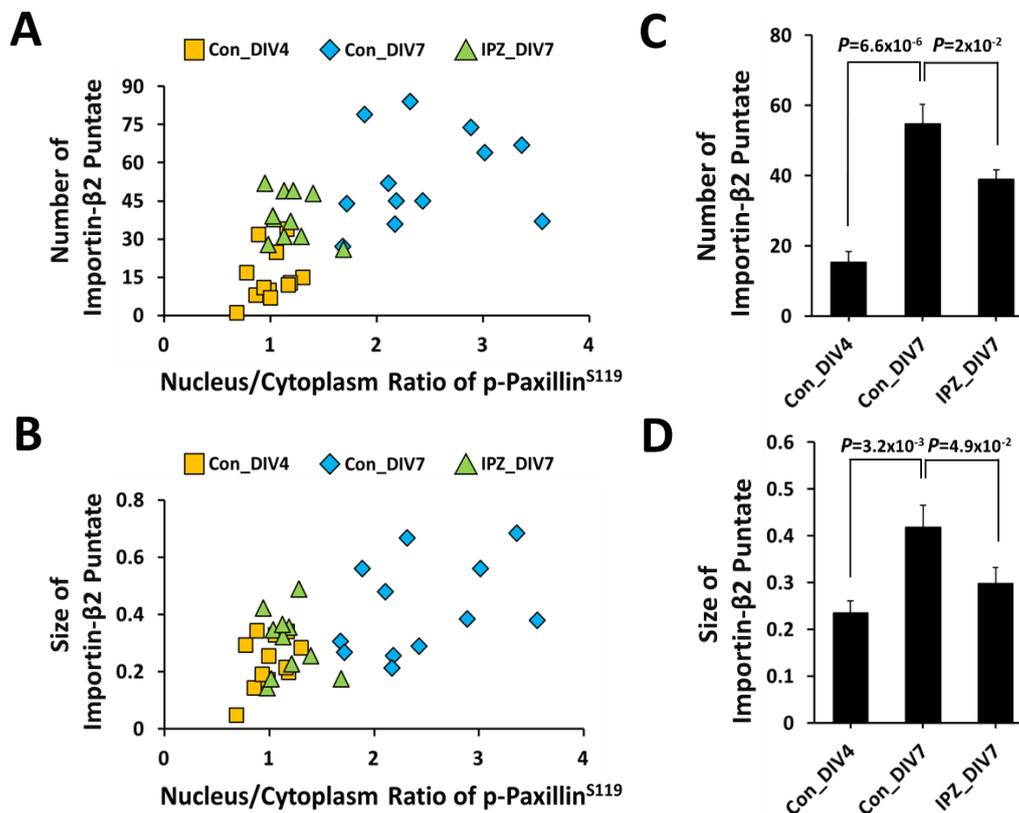
圖十七、PY-NLS 點突變對 Importin  $\beta$ 2 與 Paxillin 交互作用的影響。(A、C、E) 為西方墨點法的結果。細胞在含有 10% FBS 的培養液中培養至第二天時進行細胞轉染，6 小時後更換一次含有 10% FBS 的培養液，持續培養 48 小時後再加入 10 $\mu$ M Forskolin 反應 1 小時。(B、D、F) 分別為 (A、C、E) 的統計結果，交互作用程度之數據為平均值  $\pm$  SEM (來自 3 次獨立實驗，not significant (n.s.) 表示數據沒有顯著差異 ( $P > 0.05$ ))，以 t test 進行統計檢定)。

首先我們比較了 Forskolin 對 Paxillin 與 Importin  $\beta$ 2 交互作用的影響，如圖十七(A)與 (B)，加入 Forskolin 促進 S119 的磷酸化可以使 Importin  $\beta$ 2 與 Paxillin 有顯著的交互作用。

於是我們將 S119 點突變的 FLAG-PXN 轉染到 N2a 細胞後，都加入 10 $\mu$ M Forskolin 反應 1 小時，結果如圖十七(C&D)，當 S119 位點無法被磷酸化時，使 Paxillin 與 Importin  $\beta$  2 的交互作用降低。與 WT 相比，如圖十七(E&F)，三個 PY-NLS 點突變都使交互作用有一定程度降低，表示了這三個位點在 Paxillin 與 Importin  $\beta$  2 的交互作用中有一定的貢獻。綜合螢光影像分系的結果，P575/Y576 的影響更為明顯，也進一步證明 Paxillin 具有功能上的 PY-NLS。

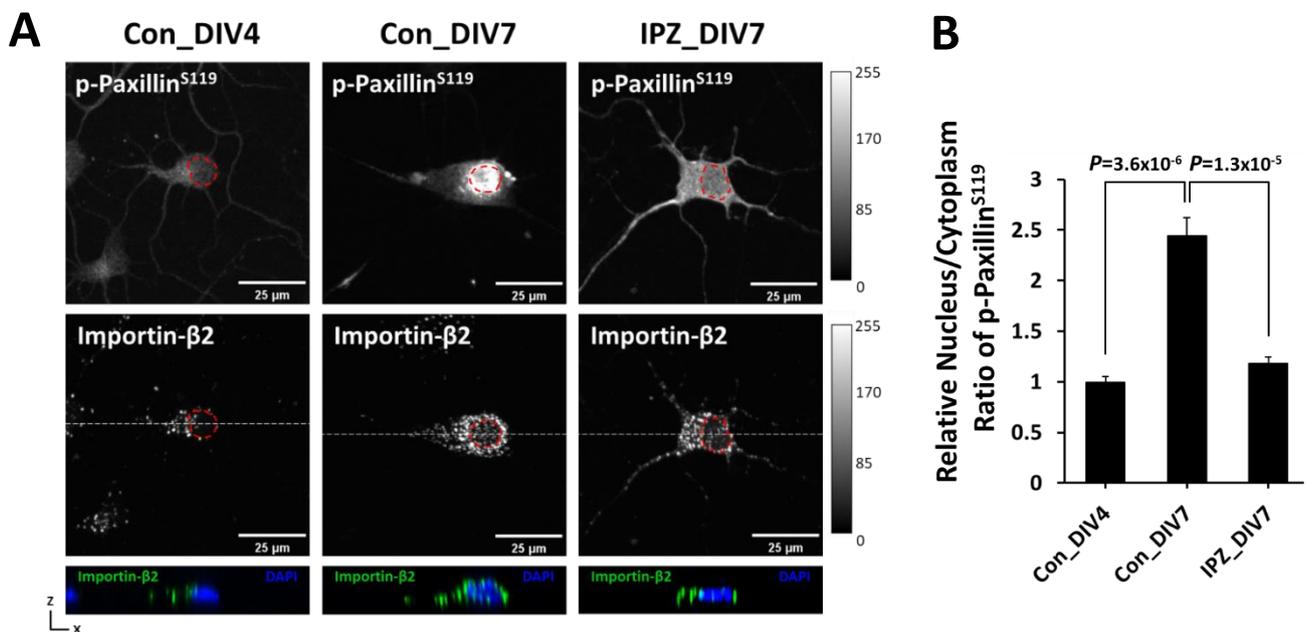
#### 四、抑制 Importin $\beta$ 2 特性對 p-Paxillin<sup>S119</sup> 進核的影響

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 $\mu$ M Importin  $\beta$  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 是一種能干擾 Importin  $\beta$  與 Ran-GTP 的結合，使其運輸功能失效的一種小分子藥劑，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。如圖十八(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<sup>S119</sup> 進核程度呈現正相關。如圖十八(A)與 (B)所示。



圖十八、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<sup>S119</sup> 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 DIV4 與 DIV7 的神經細胞，綠色三角形為活體外培養至 DIV4 與 DIV6 在 5 $\mu$ 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)。

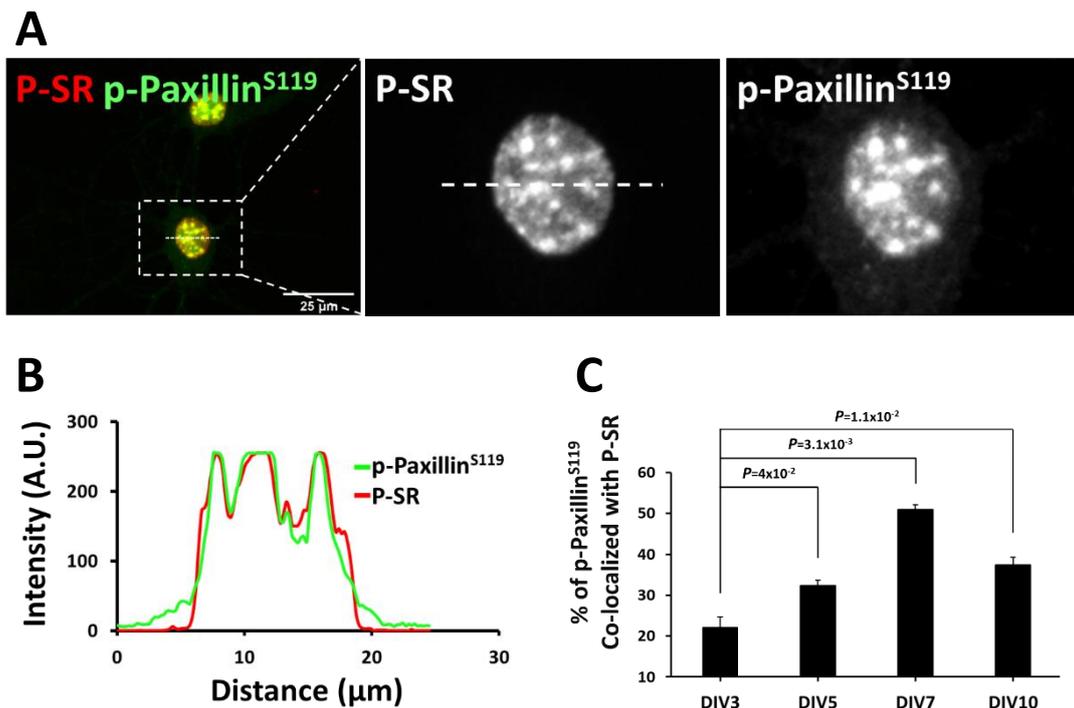
我們使用螢光影像觀察 Importin  $\beta 2$  與 p-Paxillin<sup>S119</sup> 在神經細胞中的分布。如圖十九(A)。可以觀察到正常生理狀況下，在 DIV7 的神經細胞，p-Paxillin<sup>S119</sup> 聚集在細胞核中，並且 Importin  $\beta 2$  會圍繞在細胞核的外圍；而受到 IPZ 影響的神經細胞，p-Paxillin<sup>S119</sup> 與 Importin  $\beta 2$  則是散布在細胞質中。p-Paxillin<sup>S119</sup> 的核質比如圖十九(B)，與控制組相比有顯著的下降，表示抑制 Importin  $\beta 2$  的特性會使 p-Paxillin<sup>S119</sup> 的無法進入細胞核。



圖十九、神經細胞的 Importin  $\beta 2$  與 p-Paxillin<sup>S119</sup> 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<sup>S119</sup> 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<sup>S119</sup> 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  $\pm$  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)。

## 五、細胞核中的 p-Paxillin<sup>S119</sup> 與 RNA 剪接因子 P-SR 共定位

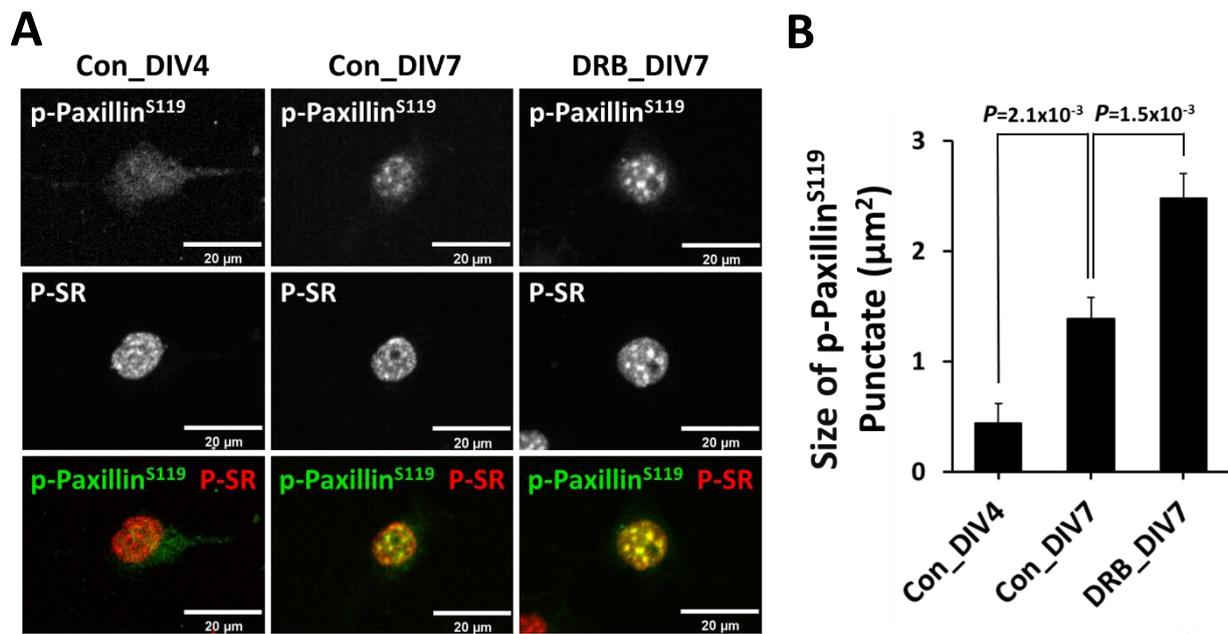
我們觀察到神經細胞於活體外生長至 DIV5 至 DIV7，p-Paxillin<sup>S119</sup> 會進入細胞核中，並發現 p-Paxillin<sup>S119</sup> 會呈現直徑約為 2~4 $\mu$ m 的顆粒散布在細胞核中。於是推測 p-Paxillin<sup>S119</sup> 進入到細胞核後可能位於核斑點 (nuclear speckles) 中。核斑點是由眾多 RNA 剪接因子 (splicing factor) 所組成的大型結構，是主要進行 RNA 剪接 (Splicing) 的區域。於是我們將已被證實會定位在核斑點的 SR 蛋白 (Ser-Arg-rich proteins) 與 p-Paxillin<sup>S119</sup> 共同染色，觀察在神經細胞於活體外生長至 DIV7 時的分布。如圖二十。



圖二十、神經細胞的 p-Paxillin<sup>S119</sup> 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 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<sup>S119</sup> (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 DIV3、5、7、10 時，在相同螢光強度下，p-Paxillin<sup>S119</sup> 與 P-SR 於細胞核中重疊的百分比。百分比之數據為平均值  $\pm$  SEM (來自 3 次獨立實驗，每組  $n \geq 11$  顆細胞，以 t test 進行統計檢定)。

從圖二十(A)可以看到在神經細胞於活體外生長至第七天 (DIV7) 時，p-Paxillin<sup>S119</sup> 與 P-SR 皆呈現顆粒狀，且如圖二十(B)所示，兩者螢光強度的分佈在細胞核中重疊，表示 p-Paxillin<sup>S119</sup>

與 P-SR 共定位 (co-localization)。由圖二十(C)所示，p-Paxillin<sup>S119</sup> 與 P-SR 共定位的高峰，為神經細胞於活體外生長至 DIV 7 時。目前已知終止 RNA 的轉錄，會使 RNA 剪接因子向核斑點聚集，使顆粒增大的特性 (Lamond & Specto. 2017)。為了瞭解 p-Paxillin<sup>S119</sup> 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<sup>S119</sup> 的顆粒大小，如圖二十二。



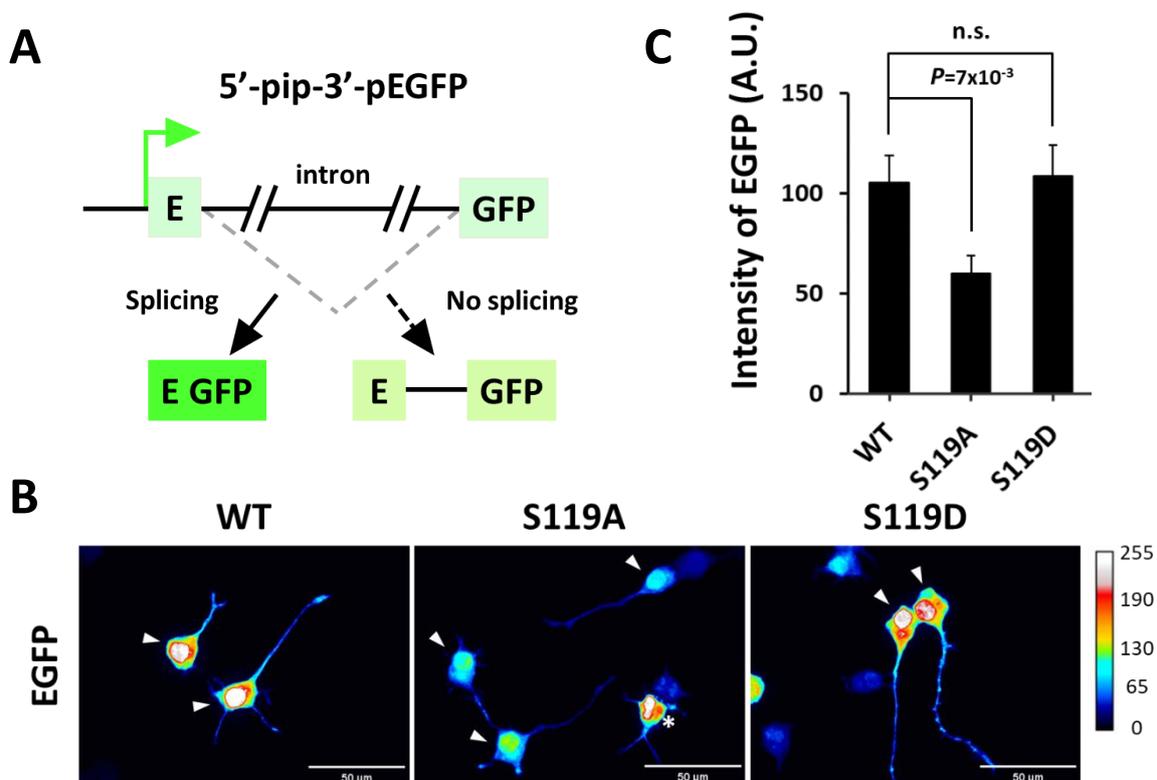
圖二十一、神經細胞的 p-Paxillin<sup>S119</sup> 在 DRB 反應下的影響。(A) 為神經細胞的 p-Paxillin<sup>S119</sup> 在正常生理狀態與受到 DRB 反應下的螢光影像。神經細胞於活體外培養 DIV4 與 DIV6 時，在含有 100μM DRB 的培養液中反應 3 小時，並持續生長至 DIV7 再將其製作成樣本。(B) 為統計結果，顆粒大小之數據為平均值 ± SEM (來自 1 次獨立實驗，每組 n ≥ 10 顆細胞，以 t test 進行統計檢定)。

由圖二十一(A)可以看到神經細胞的 p-Paxillin<sup>S119</sup> 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<sup>S119</sup> 顆粒是具有核斑點的特性，所以推測 p-Paxillin<sup>S119</sup> 進核後會調控 RNA 的剪接。

## 六、Paxillin 的 S119 點突變降低 N2a 細胞的分化與 RNA 剪接程度

### (一) 位點 S119 突變對 RNA 剪接的影響

為了證實推測，我們使用 Lentivirus 對分化的 N2a 細胞進行轉導 (transduction)，使細胞過量表現 mCherry-PXN-WT、mCherry-PXN-S119A 及 mCherry-PXN-S119D，再將片段基因 (minigene) 5'-pip-3'-pEGFP 轉染到細胞中。5'-pip-3'-pEGFP 有一個內含子 (intron)，當細胞進行 RNA 剪接時被移除，進而轉譯出 EGFP (Enhanced green fluorescent protein)，藉由測量 EGFP 的螢光強度探討 N2a 細胞的 RNA 剪接是否受到影響。如圖二十二。



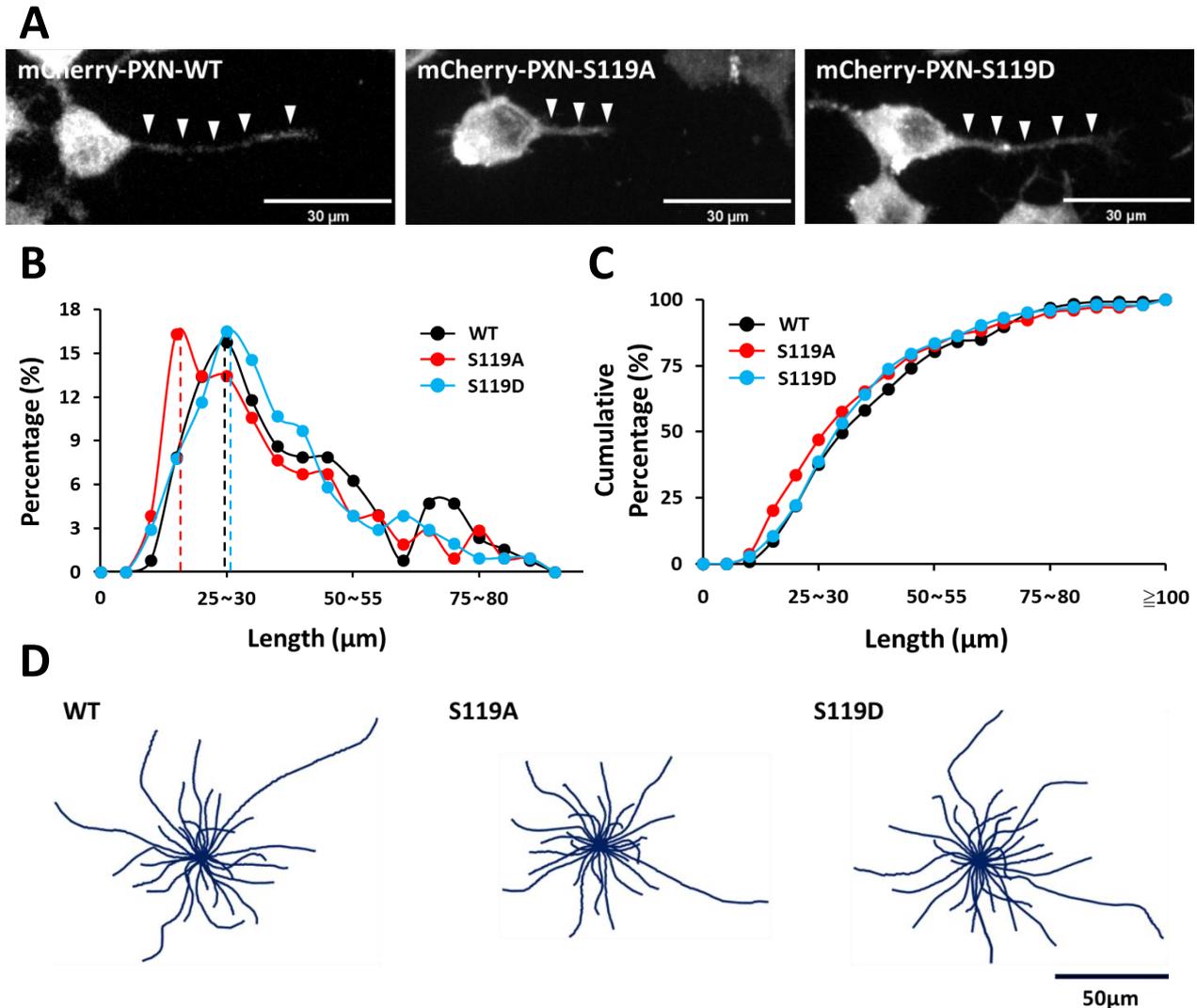
圖二十二、過量表現 mCherry-PXN-S119A 對 N2a 細胞的 RNA 剪接之影響。(A) 為 minigene 的剪接示意圖。(B) 為分化的 N2a 細胞螢光影像。細胞在低 FBS 濃度的培養液中培養，分化的第一天時加入 Lentivirus 進行轉導，16 小時後換一次含有 0.5% FBS 的培養液。分化至第三天時進行細胞轉染，4 小時後換一次含有 0.25% FBS 的培養液，再靜置 12 小時後將其製作成樣本。\* 為未分化的 N2a 細胞，不列入數據計算。(C) 為統計結果，EGFP 螢光亮度之數據為平均值  $\pm$  SEM (來自 1 次獨立實驗，每組  $n \geq 14$  顆細胞，以 t test 進行統計檢定)。

如圖二十二(B)與(C)所示，與 WT 相比，當分化的 N2a 細胞過量表現 mCherry-PXN-S119A 會使細胞所表現的 EGFP 螢光亮度下降。該結果顯示缺乏了 Paxillin<sup>S119</sup> 的磷酸化，會

降低 RNA 剪接的程度，也證實了 p-Paxillin<sup>S119</sup> 進核後會再核斑點中調控 RNA 剪接。

## (二) 位點 S119 突變對 N2a 細胞分化的影響

接下來將探討 S119 點突變對是否對神經生長有影響，我們讓分化的 N2a 細胞過量表現 mCherry-PXN-S119A，並計算新生軸突的長度來表示分化的程度，以每 5 $\mu$ m 為一個區間進行統計。如圖二十三。

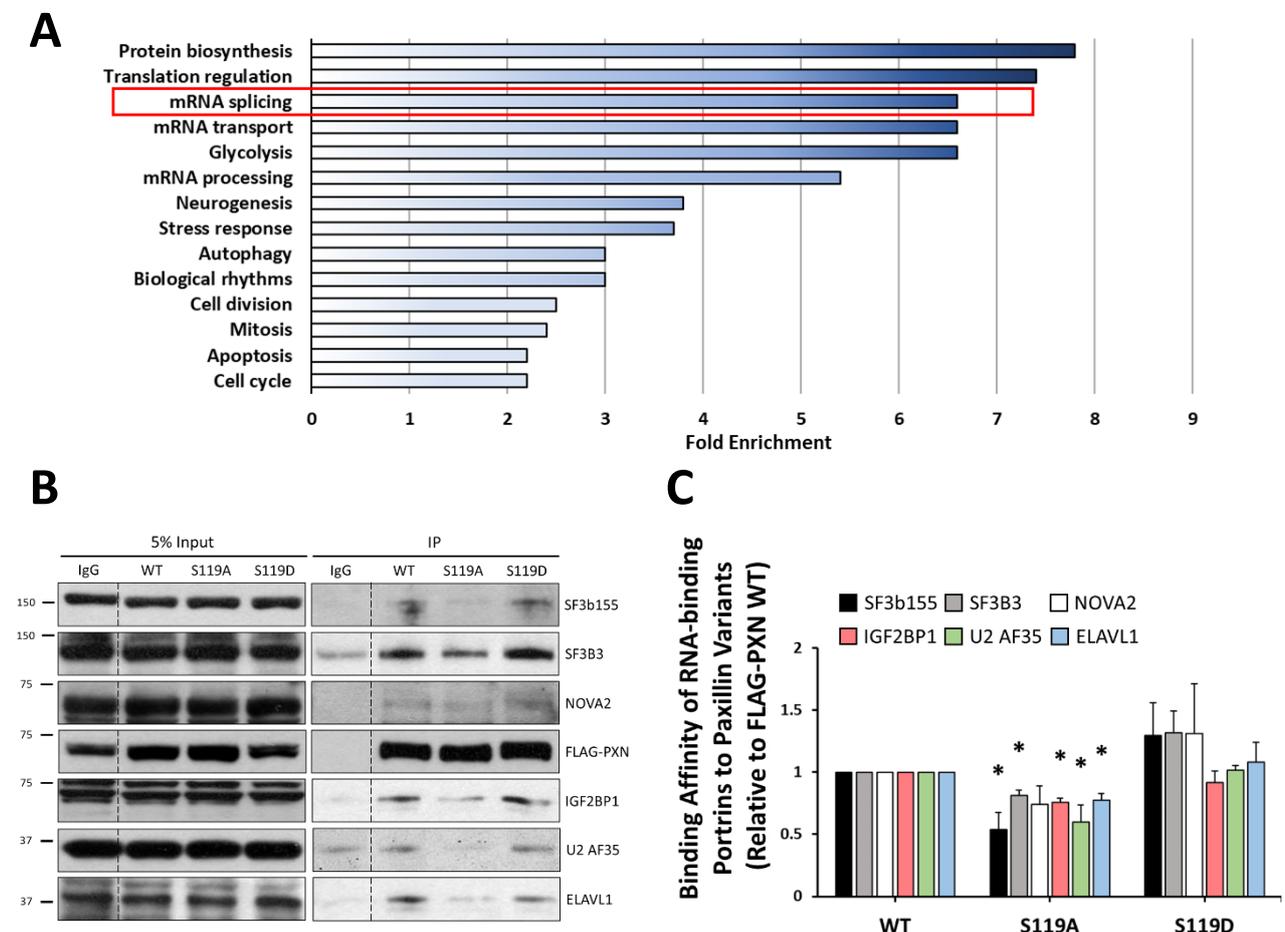


圖二十三、過量表現 mCherry-PXN-S119A 對 N2a 細胞分化的影響。(A) 為分化的 N2a 細胞螢光影像。細胞在低 FBS 濃度的培養液中培養，分化的第一天時加入 Lentivirus 進行轉導，16 小時後換一次含有 0.5% FBS 的培養液，持續分化至第四天後將其製作成樣本。(B&C) 為新生軸突長度的統計結果 (來自 1 次獨立實驗，每組  $n \geq 103$  顆細胞)。(D) 為 28 個隨機採樣的新生軸突，以表達 N2a 細胞整體分化的趨勢。

如圖二十三所示，過量表現 mCherry-PXN-WT 與 mCherry-PXN-S119D 的 N2 細胞在分化至第四天時，占最多比例的新生軸突長度落在 25-30  $\mu\text{m}$  區間，而過量表現 mCherry-PXN-S119A 則是落在 15-20  $\mu\text{m}$  區間。結果表示了在相同的分化時間，S119 的突變會使培養在低 FBS 濃度的 N2a 細胞，其神經分化程度被延緩。

## 七、位點 S119 磷酸化促進 Paxillin 與 RNA 結合蛋白的交互作用

Paxillin 有許多可以與蛋白質交互作用的位點，但沒有可以直接與 RNA 結合的序列。所以我們認為 p-Paxillin<sup>S119</sup> 進入細胞核後，會與 RNA 結合蛋白 (RNA-binding protein) 進行交互作用，進而調控 RNA 剪接。實驗室將神經細胞的裂解液用 Paxillin 抗體進行免疫共沉澱，以有加入 IPZ 反應的細胞為實驗組，進行 Mass spectrometry，再利用 GO term 進行分析。如圖二十四。在神經細胞中，與 Paxillin 交互作用的蛋白質，有一群的功能為 mRNA 剪接，於是我們轉染 FLAG-PXN 到 N2a 細胞中，再利用免疫共沉澱的方式，探討 S119 點突變對 Paxillin 與 RNA 結合蛋白交互作用的影響。如圖二十四。



圖二十四、S119 點突變對 Paxillin 與 RNA 結合蛋白交互作用的影響。(A) 為 Mass spectrometry

的結果 (來自實驗室的數據)。(B) 為西方墨點法的結果。細胞在轉染後 6 小時後更換一次含有 10% FBS 的培養液，培養 24 小時後開始將低 FBS 濃度使其分化，分化至第四天加入 10 $\mu$ M Forskolin 反應 1 小時。(C) 為 (B) 的統計結果。交互作用程度之數據為平均值  $\pm$  SEM (來自 3 次獨立實驗，\* P < 0.05)，以 t test 進行統計檢定)。

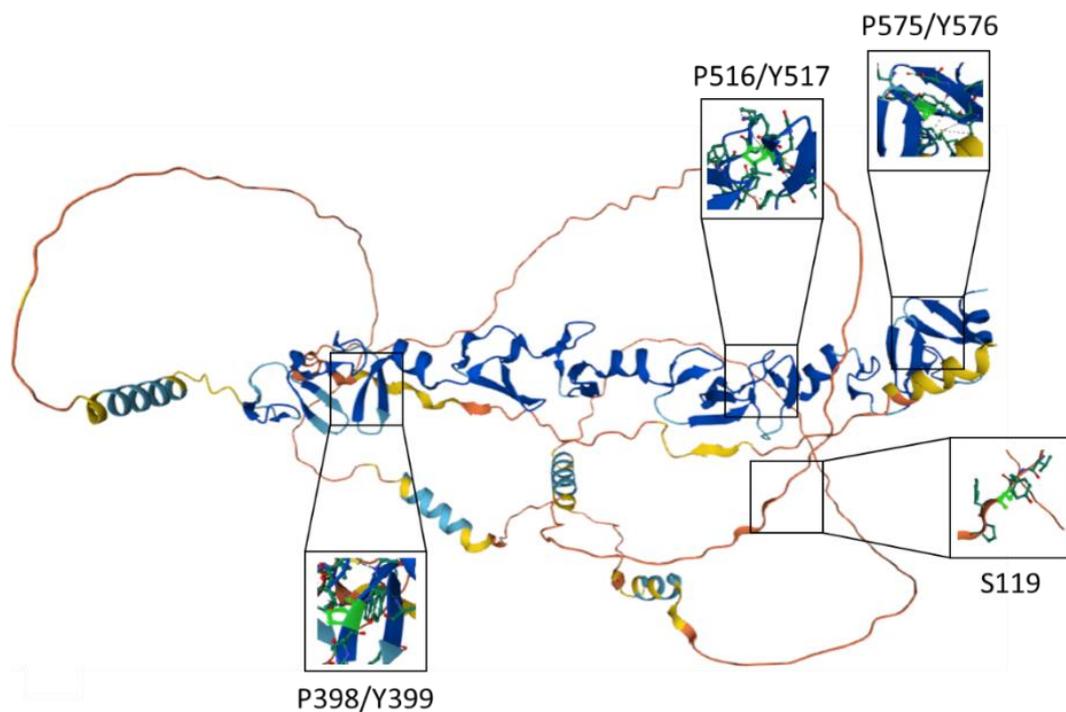
我們分別對 RNA 結合蛋白 SF3b155、SF3B3、NOVA2、IGF2BP1、U2 AF35 及 ELAVL1 進行探討，從圖二十四(B)與(C)可以看到，這些 RNA 結合蛋白與 FLAG-PXN-S119A 的交互作用程度都比 WT 低，而模擬磷酸化的 FLAG-PXN-S119D 則有上升的趨勢，表示位點 S119 磷酸化對於 Paxillin 與 RNA 結合蛋白的交互作用是需要。

## 伍、討論

本研究發現了 Paxillin 的新功能，當神經細胞於活體外生長至第七天 (DIV7) 時，p-Paxillin<sup>S119</sup> 透過與 Importin  $\beta$ 2 交互作用使其進入細胞核，並定位於核斑點中調控 RNA 剪接，並且此分子過程對於神經細胞的生長與分化是必須與重要的。

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  $\alpha$  &  $\beta$  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。透過免疫共沉澱法確認了 Paxillin 會與 Importin  $\beta$ 2 進行交互作用，並且 PY-NLS 位點突變會影響其交互作用的程度。P575/Y576 位於 Paxillin 的 LIN3 和 LIN4 結構域中，先前的研究表明，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)，這增加了 Paxillin 此結構域上的序列是能被轉運蛋白所辨識與結合，並帶入細胞核中的可信度。

從抑制 Importin  $\beta 2$  特性使 p-Paxillin<sup>S119</sup> 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 AlphaFold 的蛋白質結構數據庫查看了 Paxillin 的立體結構，如圖二十五。



圖二十五、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。並由免疫共沉澱法確認了 S119 位點的磷酸化，會影響到對於 Importin  $\beta 2$  與 Paxillin 交互作用的能力。

觀察神經細胞的 p-Paxillin<sup>S119</sup> 在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<sup>S119</sup> 以顆粒的型態呈現。藉由 p-Paxillin<sup>S119</sup> 與 RNA 剪接因子 P-SR 的共定位，以及抑制轉錄使 p-Paxillin<sup>S119</sup> 顆粒的變大，表示進入細胞核的 p-Paxillin<sup>S119</sup> 會定位在核斑點上。透過對 N2a 細胞轉染片段基因的實驗結果，我們證實了位點 S119 被磷酸化的

Paxillin 會參與 RNA 的剪接。查閱文獻後得知 Paxillin 沒有與 RNA 結合的序列，於是推測 p-Paxillin<sup>S119</sup> 在細胞核中，可能與蛋白質形成複合體，進而影響 RNA 的剪接。

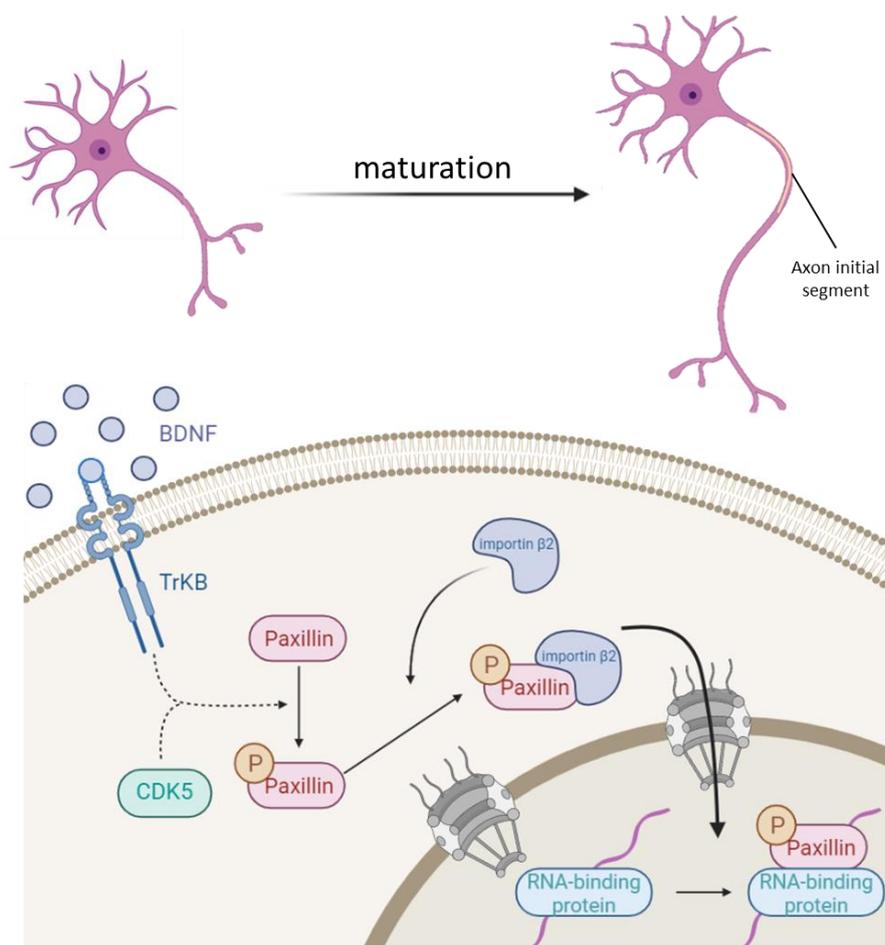
而神經細胞在成熟的每個階段會進選擇性剪接 (alternative splicing)，表現出不通的蛋白質異構體促進細胞生長 (Chaolin Zhang et al. 2018)。為了瞭解 p-Paxillin<sup>S119</sup> 進核後所參與的剪接對於神經生長的重要性，我們統計過量表現 mCherry-PXN 的 N2a 細胞生新軸突的長度，當位點 S119 突變，占最多比例的長度落在從 25-30  $\mu\text{m}$  區間縮短至 15-20  $\mu\text{m}$  區間，表示了 p-Paxillin<sup>S119</sup> 進核後的調控對於神經細胞的分化與生長是不可或缺的。

藉由免疫共沉澱法探討 FLAG-PXN 與 RNA 結合蛋白交互作用的實驗，得知位點 S119 突變會影響到 FLAG-PXN 與 SF3b155、SF3B3、IGF2BP1、U2 AF35 及 ELAVL1 等多個種蛋白質的結合。對於一個位點的磷酸化影響多個蛋白交互作用的結果，我們認為有兩種情況：p-Paxillin<sup>S119</sup> 進核後會先與一種蛋白質結合形成複合體，再一個接著一個與其它種蛋白質形成大型複合物，進而調控 RNA 剪接；或是 Paxillin 本身就能與許多 RNA 結合蛋白進行交互作用，再透過位點 S119 的磷酸化，使 Paxillin 的結構域與蛋白質交互作用程度提高。此推測還需更進一步的分析。

本研究使用 Forskolin 來激活 PKA，使 N2a 細胞內的 serine 位點被大量磷酸化，提高 p-Paxillin<sup>S119</sup> 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<sup>S119</sup> 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<sup>S119</sup> 位點被特定的激酶磷酸化，被磷酸化的 Paxillin<sup>S119</sup> 使 Importin  $\beta 2$  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<sup>S119</sup>

進入到細胞核中，並定位到核斑點上，與其他 RNA 剪接因子進行交互作用，從而調控 RNA 的剪接。如圖二十六。



圖二十六、p-Paxillin<sup>S119</sup> 進入細胞核的機制過程。

## 陸、結論與應用

### 一、結論

- (一) p-Paxillin<sup>S119</sup> 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<sup>S119</sup> 進入細胞核需要細胞向神經型態分化。
- (三) p-Paxillin<sup>S119</sup> 進入細胞核需要 S119 位點被磷酸化。
- (四) Paxillin 帶有 P575/Y576 PY-NLS 位點，藉由 Importin  $\beta 2$  將其帶入細胞核。
- (五) p-Paxillin<sup>S119</sup> 進入細胞核後與 RNA 結合蛋白交互作用，並促進 RNA 的剪接。
- (六) Paxillin<sup>S119</sup> 點突變會導致神經分化程度被延緩。

## 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。本研究發現 p-Paxillin<sup>S119</sup> 在神經生長期間進入到細胞核中參與 RNA 剪接，或許未來配合 RNA sequencing 的結果，能釐清 p-Paxillin<sup>S119</sup> 在細胞核內是如何進行交互作用，進而探討神經生長過程中，還有哪些基因與蛋白質需要被表達出來，並影響神經細胞成熟。清楚瞭解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、參考文獻

- 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.
- Arimura, N., & Kaibuchi, K. (2007). Neuronal polarity: from extracellular signals to intracellular mechanisms. *Nat Rev Neurosci* 8, 194 – 205.
- Lamond, A.I., & Specto, D.L. (2003). Nuclear speckles: a model for nuclear organelles. *Nat Rev Mol Cell Biol* 4, 605 – 612.
- Weyn-Vanhentenryck, S.M., Feng, H., Ustianenko, D., Duffié, R., Yan, Q., Jacko, M., Martinez, J.C., Goodwin, M., Zhang, X., Hengst, U., Lomvardas, S., Swanson, M.S., & Zhang, C. (2018). Precise temporal regulation of alternative splicing during neural development. *Nat Commun* 9, 2189

## 【評語】 080006

此研究發現神經傳導蛋白質 Paxillin 的新功能，釐清 Paxillin Ser119 的磷酸化及 PY-NLS 被 Importin  $\beta 2$  辨識結合後帶入細胞核中，p-PaxillinS119 進入細胞核後參與了 RNA 的剪接，控制神經軸突起始段的位置和長度的機制。利用細胞生物學、分子生物學等各種方法證明磷酸化 Paxillin 的位點及其功能，是件極佳的論文報告，文章書寫流暢、研究結果清晰詳盡，很難想像高中生一個人能利用課餘時間做出此傑出研究成果，前途不可限量。

建議：

1. 圖九、十顯示在神經細胞 N2a 分化第四天，p-PaxillinS119 的核質比最高，與結論神經細胞於活體外生長至第七天時，Serine119 被磷酸化的 Paxillin (p-PaxillinS119) 會從細胞質轉位進入至細胞核，有差異。
2. 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，帶來誤差。