

2024年臺灣國際科學展覽會 優勝作品專輯

作品編號	080015
參展科別	生物化學
作品名稱	RBM4調控BDNF表達對發育的重要性
得獎獎項	二等獎 亞洲科學博覽會 ESA

就讀學校	臺北市私立薇閣高級中學
指導教師	譚婉玉、李權展
作者姓名	吳曉霖

關鍵詞 選擇性剪接、BDNF、生長調節

作者簡介



大家好，我是就讀薇閣高中數資班的吳曉霖，自然科學在我求學過程中，一直是我最有興趣的科目，從國小就積極參與科展競賽，並有幸在高一時錄取中央研究院高中生命科學研究人才培育計畫。非常感謝教授給我機會進入國家級實驗室進行深入的實驗與研究，並在過程中耐心指導我相關的專業知識與研究方法，同時感謝實驗室的學長及學校師長一路以來的教導與協助，這次參賽的過程與經驗更強化我對生命科學研究的熱忱，希望未來能夠持續在生命科學方面貢獻自己的一份心力，回饋國家社會。

摘要

RBM4 是種 RNA 結合蛋白，以其在各種組織中作為剪接調節因子進而豐富了蛋白質多樣性而受到關注。在我的研究中，藉由 RNA 定序找到了可能由 RBM4 主導的選擇性剪接，包含 *Rbfox2*、*Prpf40b* 和 *Add3* 等，並發現這些剪接事件在不同時間點和組織中存在差異。因為在不同的組織中看到了選擇性剪接的變化，更透過觀察組織切片比較了野生型與 *Rbm4* 基因剔除的小鼠中其腦部、心臟、骨骼肌、棕色脂肪組織和胰臟的表現型，進而發現這些差異與基因的關聯。

此外，我的研究揭示了 *Rbm4* 雙基因剔除小鼠在骨骼肌和胰臟中 *Bdnf* 和一些指標基因的 mRNA 表現量明顯下降。而令人驚訝的是，腹腔注射 TrkB 活化因子 DHF 能夠顯著地完全恢復 *Rbm4* 雙基因剔除小鼠中的 *Bdnf* 表現量。這些發現共同突顯了 RBM4 在調控 *Bdnf* 中的關鍵作用，並展示了 DHF 作為潛在治療方法的有效性。

Abstract

RBM4, an RNA binding protein, is recognized for its role as a splicing regulator in various tissues, contributing to the diversity of proteins. In our study, we conducted a comprehensive examination of alternative splicing events potentially governed by RBM4, leveraging predictive RNA sequencing data including *Rbfox2*, *Prpf40b* and *Add3*. Notably, we identified differences in these splicing events across various time points and tissues. In addition to this, histological sections subjected to HE and Nissl staining revealed distinct phenotypes in plenty of tissues. In our observations, the *Rbm4* knockout cerebellum exhibited a distinct foliation defect, particularly notable between lobules VI and VII. Moving to the cardiovascular system, we observed noteworthy disparities between the wildtype and *Rbm4* double knockout mice. Specifically, there were marked differences in ventricular area and interventricular septum thickness. Shifting focus to skeletal muscle, the knockout mice displayed a notably lower average fiber count. Examining the brown adipose tissue, we found that the distance between each brown adipose tissue was noticeably reduced in the knockout mice. Lastly, in the pancreas, a significant reduction in the number of islets was observed in the knockout mice.

Furthermore, our investigation unveiled a significant downregulation of *Bdnf* mRNA expression levels in both skeletal muscle and pancreas in *Rbm4* double knockout mice. This downregulation was accompanied by reduced expression levels of several key molecular markers. Surprisingly, the intraperitoneal injection of DHF, an agonist of TrkB, had the remarkable ability to fully restore *Bdnf* expression in RBM4 double knockout mice. These findings collectively underscore the critical role of RBM4 in the regulation of *Bdnf* and demonstrate the efficacy of DHF as a potential therapeutic intervention.

By expanding our understanding of the biological functions of RBM4 and its associated pathological mechanisms, our study paves the way for innovative pharmaceutical development strategies. These findings not only shed light on the molecular and cellular functions of RBM4 but also hold clinical relevance with the potential to impact future medical treatments.

壹、前言

一、研究背景介紹(文獻回顧)

RBM4 是一個 RNA 結合蛋白，在細胞中扮演著許多重要的角色。以下分為三點對其進行介紹：

(一)結構與構造

RBM4 包含兩個 N 端 RNA 識別序列(RNA recognition motifs, RRM)和一個 CCHC 型的鋅鉗(CCHC-Zn finger)和富含丙胺酸的 C 端 (Lai et al., 2003; Markus and Morris, 2006)。其中 RRM 負責辨認 mRNA 以與其結合進行基因的剪切；CCHC-Zn finger 在細胞中的功能尚未被確認，但研究指出其在果蠅中會與 RRM2 偕同抑制轉譯的進行(Markus et al., 2006)；C 端則是 RBM4 與其他蛋白交互作用的關鍵(McNeil et al., 2001)，並且幫助其正確的定位到細胞核中(Lai et al., 2003; Markus et al., 2006)。哺乳動物的 RBM4 有兩個異構型——RBM4a 和 RBM4b。這兩者在結構和序列上非常相似。在人類，它們都位於染色體 11q13 上，在小鼠上則位於染色體 19A 上。

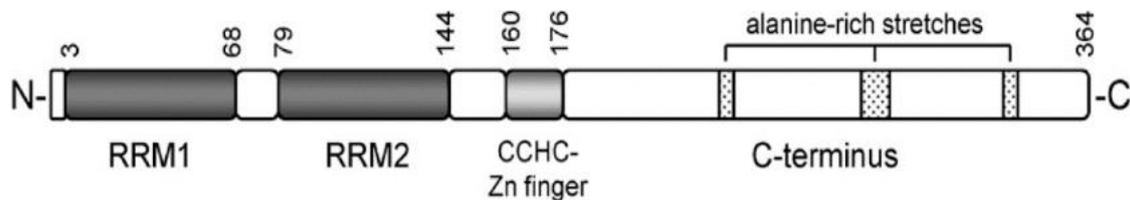


圖 1-1 RBM4 的結構(Markus and Morris, 2006)

(二)功能

在真核細胞中，mRNA 在轉錄和轉譯之間經歷了許多調控步驟，這些步驟包括剪接(splicing)、運輸、穩定性和定位，而這些在核仁中被 RBM4 調控著，進而影響大、小腦的發育以及神經細胞的生長(Tsai YY, Shen CL et al., 2023)。最初被發現在果蠅胚胎發育以及成蟲的羽化過程的生物時鐘擔任重要的角色(McNeil et al., 1998)，也有研究發現 RBM4 影響了幾個與生物鐘節律相關的 RNA，其中之一是 E74 的 RNA (Huang et al., 2007)。除此之外，RBM4 和週期蛋白 A1 的表現量在正常睪丸、生育能力下降的睪丸以

及睪丸腫瘤中呈現相關性，推測其對於精子生成至關重要(Diederichs et al., 2004)。而 RBM4 在核仁則參與了 RNA 的沉默(Hock et al., 2007)、和 miRNA (Hock et al., 2007) 直接相互作用並且參與面對壓力的反應(Lin et al., 2007)，是壓力相關的 mRNA 潛在轉譯調節因子。除此之外也參與肌肉的分化以及胰島素的分泌等等。

(三)相關疾病

RBM4 可能在多種疾病中發揮作用，包括神經退化性疾病、白血病與癌症等。RBM4 在唐氏綜合症患者的胎兒大腦中明顯降低(Bernert et al., 2002)，考慮到 RBM4 在大腦中的表達模式以及它對 tau 的剪接的影響，它可能與 tau 病變有關，而 tau 病變是一組包括癡呆在內的神經退行性疾病；WT1 在急性骨髓性白血病中經常過度表達(Yang et al., 2007)，同時 RBM4 在凋亡的人類白血病細胞株 K562 中也有表現量上升的趨勢(Jin et al., 2007)，呈現出兩者之間的關聯性；也有研究觀察到在癌症病人中的 RBM4 較少，進而發現它在胃癌病人裡可以抑制腫瘤的生長與轉移(Yong H et al., 2019)。

二、研究動機

RBM4 作為功能如此豐富多樣的蛋白，在生物體中扮演著重要且不可或缺的角色，更值得進一步的研究，因此我也想試著以自己的力量為 RBM4 之謎拼上一小片拼圖，並希望透過這個過程使自己更了解這方面的領域。首先，RBM4 作為 RNA 結合蛋白調控 mRNA 的選擇性剪接，負責外顯子的剷除或保留，以形成成熟的 mRNA，因此我想知道它調控了那些目標基因的選擇性剪接，並觀察其在不同組織與不同時間點的剪接變化。其次，除了觀察其選擇性剪接的變化，我也好奇他對於不同組織與器官生理型態的影響，想知道基因剷除與野生型的表現差異。

三、研究目的

(一)探討 RBM4 對於哪些基因進行剪接調控，並觀察其在不同組織與時間點的選擇性剪接。

(二)觀察 RBM4 基因剔除老鼠中不同組織與器官的生理型態，並且和野生型進行比較。

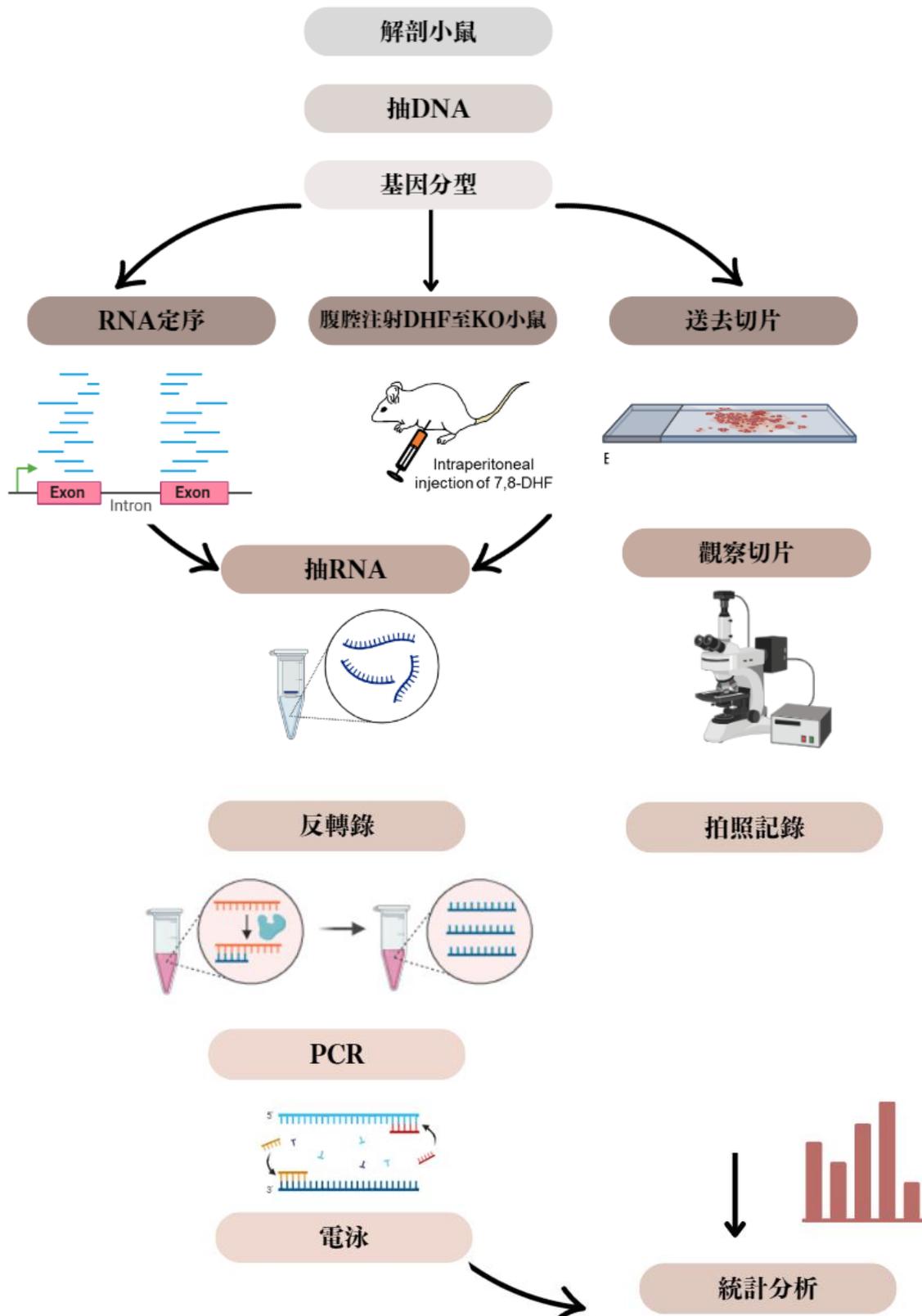
(三)若生理型態與特定的基因表現量和野生型有差異，則試圖尋找其改善缺陷的方式。

貳、研究方法與過程

一、研究設備與器材

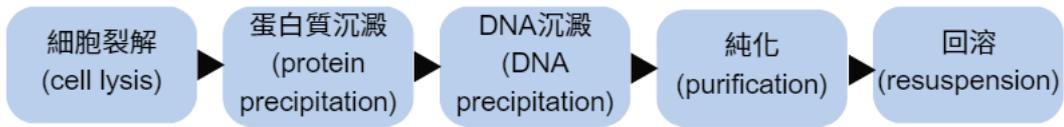
- (一)微量滴管
- (二)離心機
- (三)水浴槽
- (四)聚合酶連鎖反應器
- (五)96 微量多孔盤
- (六)DNA 膠體影像螢光分析
- (七)聚丙烯胺膠體電泳
- (八)瓊酯糖凝膠電泳
- (九)低溫冷凍櫃(4°C、-20°C)
- (十)顯微鏡
- (十一) Nanodrop

二、 研究過程



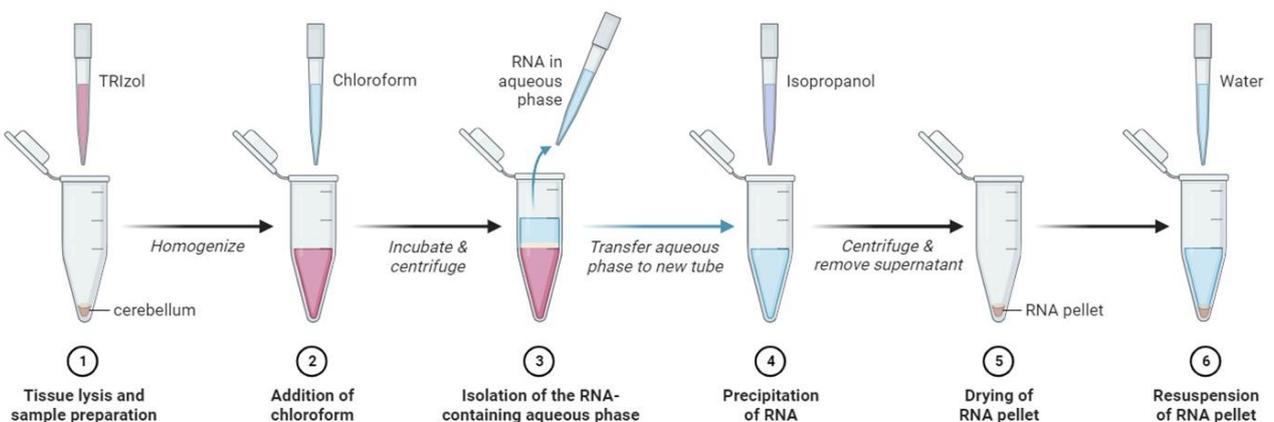
三、 研究方法

(一) 基因分型(genotyping)



1. 樣品蒐集：將老鼠的尾巴減去後裝入 1.5 ml 的微量離心管(Eppendorf)
2. 均質化與細胞裂解：加入 304 ul 的萃取液(含 proteinase K)，分解其中的蛋白質，接著反覆上下倒置 3 到 6 次，接著讓它過夜靜置在 65 度的乾浴槽
3. 蛋白質與 DNA 沉澱：加入 100 ul 的 KOAc，震動混合(vortex)直到出現白色沉澱後靜置在 4 度 30 分鐘。接著在室溫下以 12000 rpm 離心 5 到 15 分鐘。取 300 ul 的上清液到新的管子並加入同體積的異丙醇(isopropanol)，再將其過夜靜置在-20 度。接著以 12000 rpm 離心五分鐘並取出上清液，留下白色沉澱的 DNA
4. 純化：加入 400 ul 70%乙醇，以 7500 rpm 離心五分鐘，將其上清液吸出
5. 回溶:加入 30 ul 的水
6. 用 1ul 的 DNA 進行聚合酶連鎖反應

(二) 抽 RNA(RNA extraction)



1. 均質化：視組織體積大小在微量離心管中加入對應的 TRIZOL(每 50 到 100mg 加入

1 ml) ，並用微量滴管反覆吸吐，使組織溶於 TRIZOL 中成乳粉色。

2. 分相：視 TRIZOL 的量(0.2ml per 1ml TRIZOL)加入對應體積的氯仿(chloroform)，將其震動混合(vortex)15 秒，靜置在室溫兩到三分鐘，以 13200 rpm 再 4 度離心 15 分鐘，將水層取出。
3. RNA 沉澱：將其和等體積異丙醇上下輕搖混合將其過夜靜置後以 12000rpm 離心。
4. 清洗 RNA：加入 400ul 70% 的乙醇(ethanol)，使其混合，並重複此步驟 2 次。

(三) 聚合酶連鎖反應(PCR)：

利用 DNA 聚合酶對特定 DNA 序列大量合成，進行專一性的連鎖複製，將目標 DNA 片段數量放大。其中引子黏合的溫度由目標基因序列的 GC 比決定；延長時間由目標基因序列的長度(bp)決定；重複次數則依濃度進行調整，因此這三個變因因不同的基因而異。

1. 材料配置比例：

	ul per reaction tube (total of 20 ul)
2x DNA polymerase Mastermix	10
Autoclaved water	8
Primer (forward)	0.5
Primer (reverse)	0.5
gDNA/cDNA template	1

2. 反應過程與時間：

denature		annealing		extention	
95°C	95°C	60/55°C	72°C	72°C	4°C
2 min	0: 30	0: 30	1min/30s	5 min	∞
repeat 33-36 times					

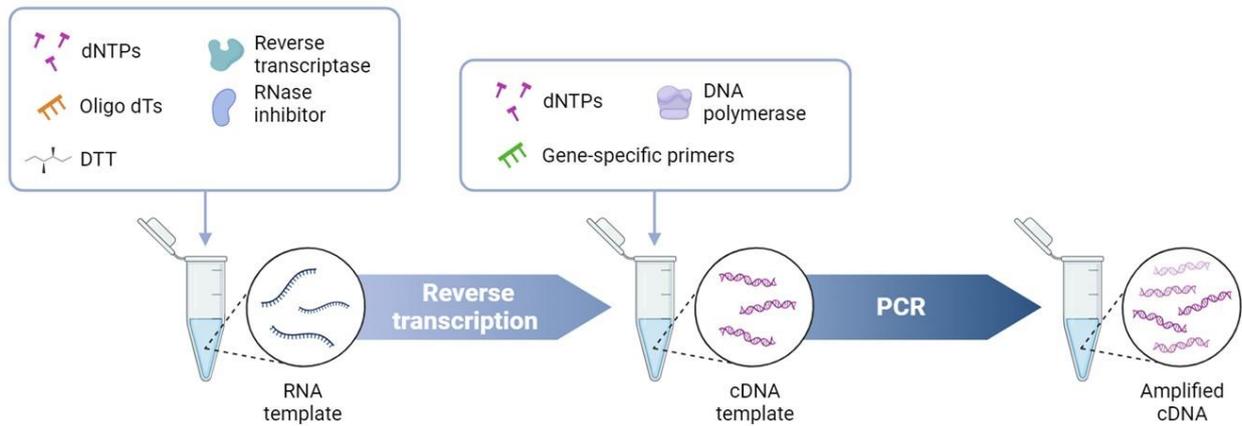
引子設計：

Genotyping	
<i>Rbm4a</i>	Forward: TTCTTGTGAGAAATAGAAGC Reverse: GCACAAAGCCATAATTCTTA
<i>Rbm4b</i>	Forward: CGTCTTGTCTCTATGTGC Reverse: GCTAACCTTGTAGAGTCAATGTGC
<i>Rbm4dKO</i>	Forward (EGFP): GCGGCCGCGACTCTAGATC Reverse (GT3): TTTGGGGCCACTCATCTTCT

mRNA expression	
<i>mRbm4a</i>	Forward: ATGGTGAAGCTGTTTCATTGG Reverse: CTGCTGCTGCTGCAGCTCCTGAAGG
<i>mRbm4b</i>	Forward: ATGGTGAAGCTGTTTCATTGG Reverse: CGGGAAGCACAGCCGCATTC
<i>Gapdh</i>	Forward: GTCGTGGAGTCTACTGGTGT Reverse: TACTTGGCAGGTTTCTCCAG
<i>Bdnf</i>	Forward: TGGCTGACACTTTTGAGCAC Reverse: CCAGCCAATTCTCTTTTGC
<i>Myogenin</i>	Forward: GCTGCCTAAAGTGGAGATC Reverse: GGAAGGCAACAGACATATC
<i>MyoD</i>	Forward: GAGACAGCAGACGACTTCTATG Reverse: CGCTGTAATCCATCATGCCATC
<i>Insulin1</i>	Forward: TAACCCCCAGCCCTTAGTGACCAGCTATAA Reverse: AAAGTTTTATTTCATTGCAGAGGGGTGGGGC
<i>Ngn3</i>	Forward: AAGAGCGAGTTGGCACTGAGCAAG Reverse: GCTGTGGTCCGCTATGCCAG
<i>NeuroD1</i>	Forward: CTTGGCCAAGA ACTACATCTGG Reverse: GGAGTAGGGATGCACCGGGAA
<i>MafA</i>	Forward: GCTTCAGCAAGGAGGAGGTCATC Reverse: GCCCGCCA ACTTCTCGTATTC

Splicing profile	
<i>Rbfox2</i>	Forward: AGCTGCTTTCCGAGGAGC Reverse (B40): CCGTCCTGGTAAACCACA Reverse (M43): GCATATCCACCCTGAGGTATT
<i>Prpf40b</i>	Forward: ACGTTCGCTTTGCCAACAT Reverse: ATCGAGCCTTCAACTCCTCC
<i>Add3</i>	Forward: ATCGAGAGAAAGCAGCAAGG Reverse: CAAGCTCGTCTTCGACATCA
<i>Ntrk2</i>	Forward: GCCAACTGACATTGGGGATA Reverse (FL): CCTCCGAAGAAGATGGAGTG Reverse (T1): TACCCATCCAGTGGGATCTT

(四) RNA 反轉錄成 cDNA (reverse transcription)



oligo(dT)	5x buffer	dNTP	DTT	RNase inhibitor	RT
1ul	4ul	4ul	1ul	0.6ul	0.5ul

1. 使用 Nanodrop 測得 RNA 的濃度後。
2. 取 1ug 的 RNA 加入 1ul 10uM 的 oligo(dT)，並補水至 9.9ul，再將其放入聚合酶連鎖反應器以 78°C 反應五分鐘。
3. 依序加入表格中的物質後將其放入聚合酶連鎖反應器以 42°C 反應一小時使其進行反轉錄，再以 70°C 反應時十五分鐘使反轉錄酶(reverse transcriptase, RT)失去活性

(五) 電泳-瓊脂糖凝膠電泳(agarose gel electrophoresis)

取 1.5% agarose 粉加入 0.5xTAE 溶液，加熱等待凝固後放入電泳槽等待 20-30 分鐘電泳完成後放入 EtBr(Ethidium Bromide)進行染色，在退染 30 分鐘後將其取出放入 DNA 膠體影像螢光分析儀，進行成像。

(六) 電泳-聚丙烯胺膠體電泳 (polyacrylamide gel electrophoresis)

Volume of Reagents Used to Cast polyacrylamide Gels

Gel%	30% Acrylamide	H2O	5xTBE	10% APS	TEMED
8%	3.2ml	8.4ml	2.4ml	200ul	10ul

在加入表格中的物質後等待其凝固約 15 分鐘，放入電泳槽以 100 的電壓等待 60-80 分鐘電泳完成後放入 EtBr(Ethidium Bromide)進行染色，在退染 10 分鐘後將其取出放入 DNA 膠體影像螢光分析儀，進行成像。

參、研究結果與討論

實驗一、：探討 RBM4 對於哪些基因進行剪接調控，並觀察其在不同組織與時間點的選擇性剪接。

(一) 基因分型(genotyping)

在這次實驗中選用的是 RBM4-dKO 小鼠(RBM4a 和 RBM4b 兩個基因都被剔除)，因此 KO 小鼠不會出現 RBM4a 和 RBM4b 的蛋白。因為利用 CRISPR/Cas9 方式製作的 RBM4 基因剔除老鼠才會插入 EGFP 的序列，因此在基因分型的實驗中只有 KO 小鼠才可以顯現出設計好的序列，如果是正常的野生型小鼠則不會顯示。GAPDH 作為 internal control 則是野生型和 RBM4-dKO 小鼠都有表現，代表 RNA 轉 cDNA 的過程沒有出錯，可以確定 KO 小鼠沒有 RBM4 基因。

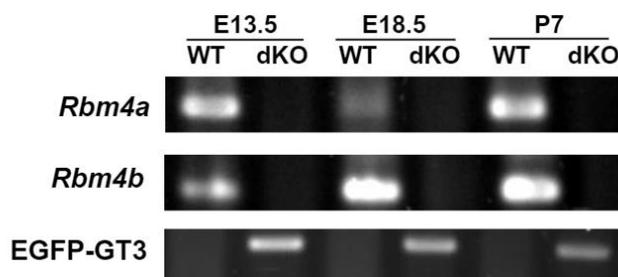


圖 3-1 基因分型

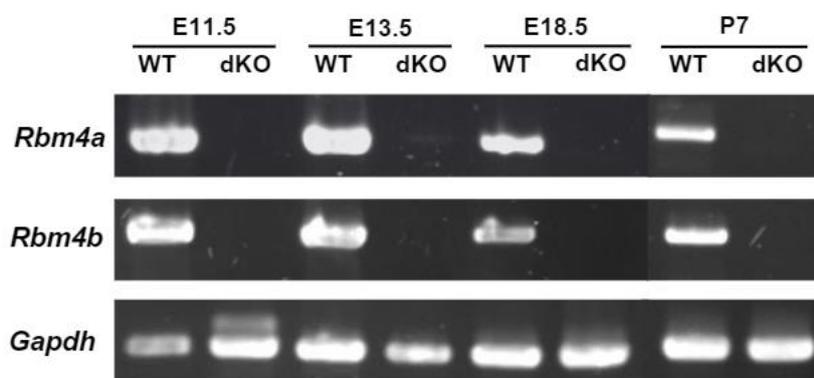


圖 3-2 Rbm4 mRNA 在小腦的表現量

(二) 不同時間點的選擇性剪接

由 RNA 定序的結果，尋找富含 CU 的潛在結合序列，挑選了三個有可能受到 *Rbm4* 調控的基因(分別為 *Rbfox2*，*Prpf40b* 與 *Add3*)並取不同時間點(E11.5，E13.5，E18.5 和 P7)老鼠小腦進行觀察，並且在用不同的檢體重複實驗多次後選擇一些具代表性的作為實驗結果。比較 WT 和 KO 小鼠中有哪些基因的外顯子與內含子有剪接的差異

1. *Rbfox2*



圖 3-3 *Rbfox2* 的兩種 isoform

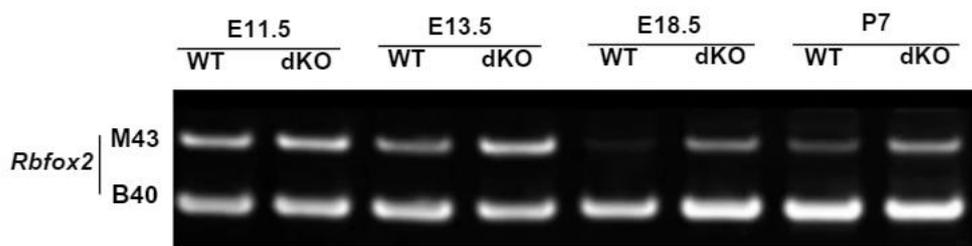


圖 3-4 *Rbfox2* 在不同時間點的選擇性剪接

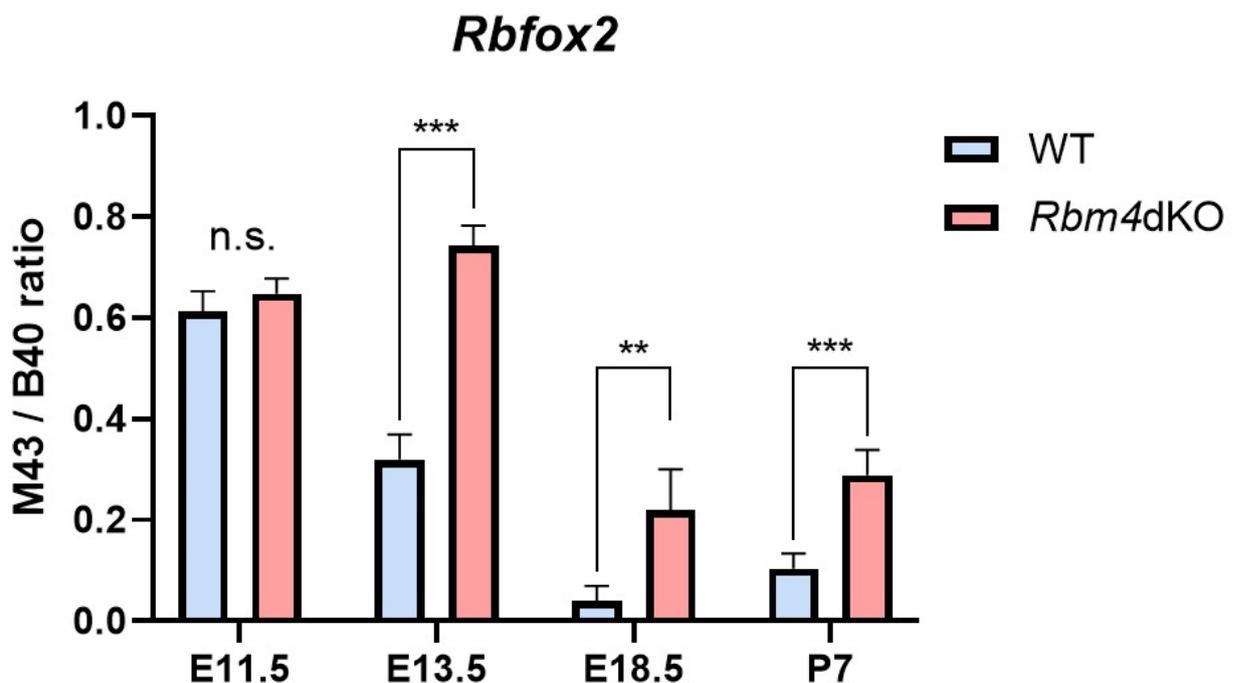


圖 3-5 *Rbfox2* 在不同時間點的選擇性剪接的統計圖

我從三個角度分析這張圖。首先，就同一個時間點而言，KO 的 M43 占比($M43/(M43+B40)$)皆較 WT 來得多，代表在 KO 中較傾向做出 M43 的 isoform。其次，就單獨 WT 不同的時間點而言選擇 M43 的比例逐漸下降而選擇 B40 的比例逐漸上升。最後，就單獨 KO 的不同時間點而言，和 WT 有相同的趨勢，然而其開始的速度較慢。

2. *Prpf40b*

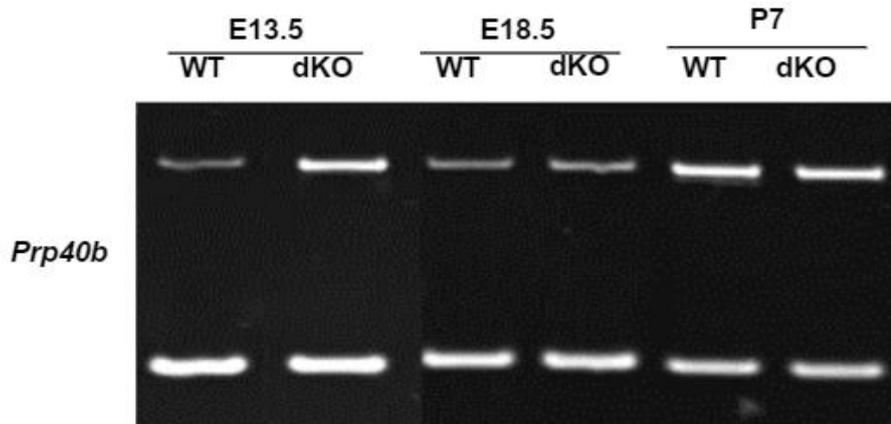


圖 3-6 *Prpf40b* 在不同時間點的選擇性剪接

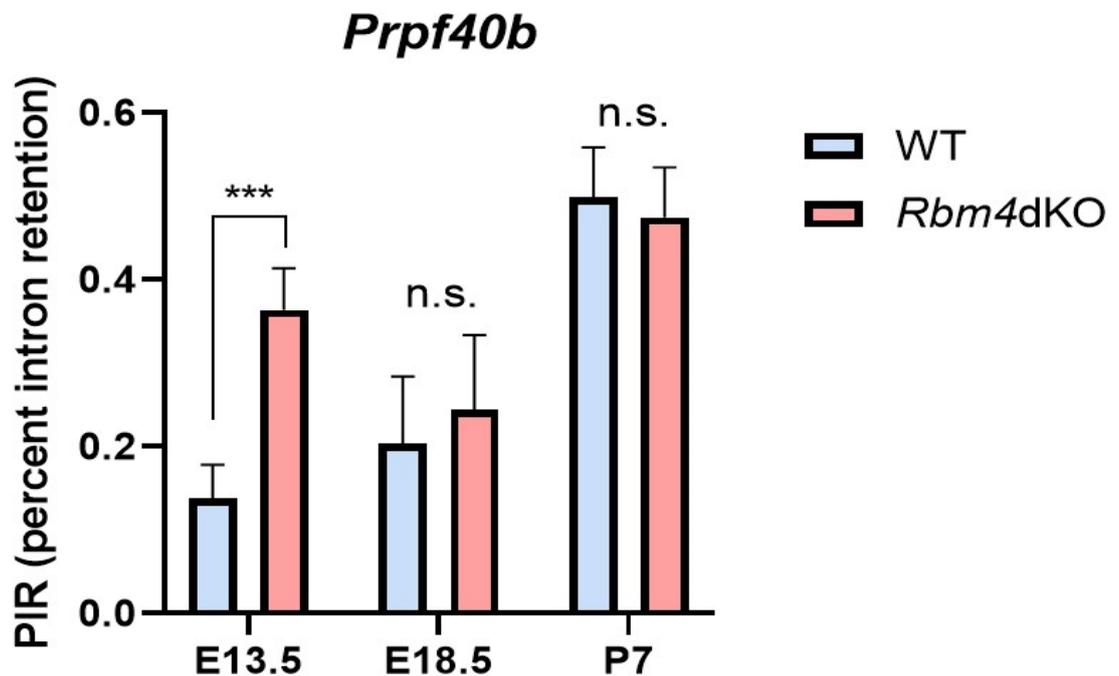


圖 3-7 *Prpf40b* 在不同時間點的選擇性剪接 統計圖

我從兩個角度分析這張圖，首先，以不同時間點而言可以看到在 WT 的腦中早期內含子的保

留(intron retention)較少，但在 P7(出生後七天)後內含子保留的比例卻增加；其次，就整體而言，較看不出 WT 和 KO 的選擇性剪接差異，唯有在 E13.5(懷胎 13.5 天)有顯著的差異，可以看到 KO 老鼠相較於 WT 老鼠有了較多的內含子保留，但是在 P7 時兩者的表現量又恢復相同。由以上兩點推測 RBM4 在小鼠胚胎發育早期對 *Prpf40b* 的剪接較有影響，長大後影響則變少。

3. *Add3* :

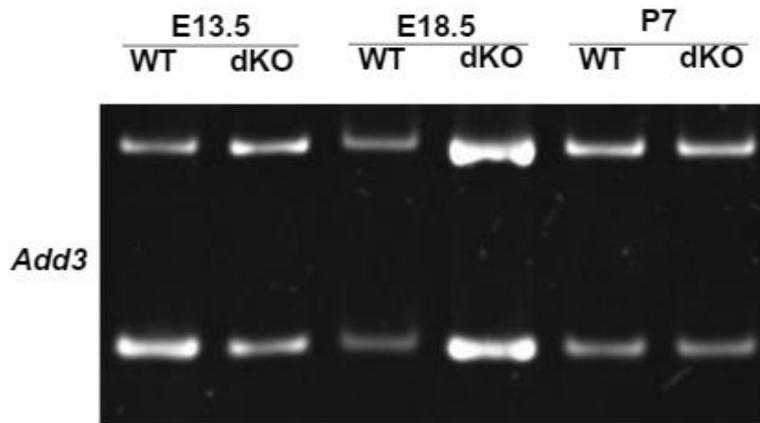


圖 3-8 *Add3* 在不同時間點的選擇性剪接

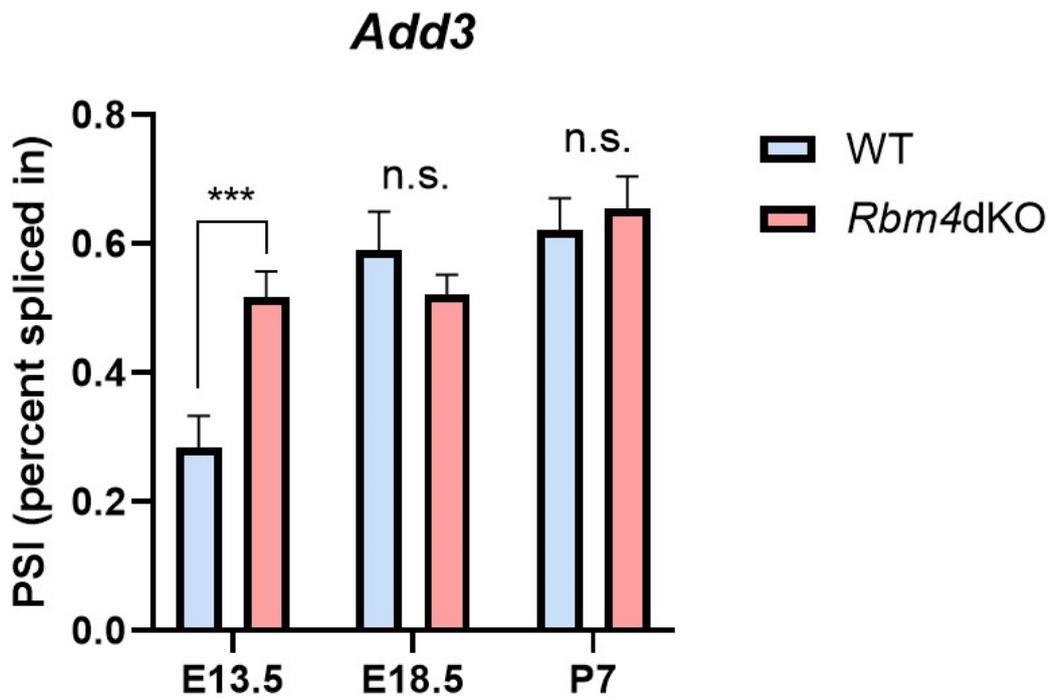


圖 3-9 *Add3* 在不同時間點的選擇性剪接 統計圖

我從兩個角度分析這張圖。首先，就整體不同的時間點而言，外顯子剔除的量逐漸下降而保留的量逐漸上升。其次，就不同時間點單獨比較，可以看到像 *Prpf40b* 一樣，唯有在 E13.5(懷胎 13.5 天)有顯著的差異，KO 老鼠相較於 WT 老鼠有了較多的外顯子保留，較少外顯子剔除，但是在其他時間點表現量則相同。因此推測 RBM4 在胚胎發育早期有一定的影響力。

(三) 不同組織的表現量差異

延續上一個實驗加上所閱讀的文獻，推測這些基因可能在某些組織中較活躍表現，或是 RBM4 在這些組織中有調控的可能，因此想藉由觀察基因在這些組織中的表現量來得知 RBM4 對他們的調控。首先，先以 *Gapdh* 為對照組確認所使用的檢體(P10 出生後的十天)的 *Rbm4a* 和 *Rbm4b* 有確實的被剔除。

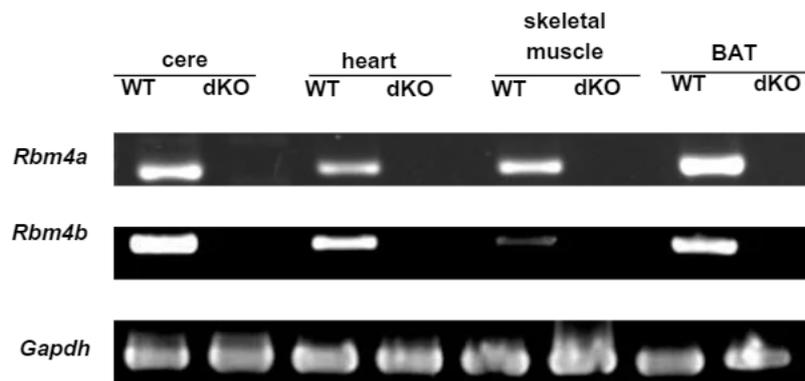


圖 3-10 *Rbm4* mRNA 在小腦、心臟、骨骼肌和棕色脂肪組織的表現量

1. *Rbfox2*

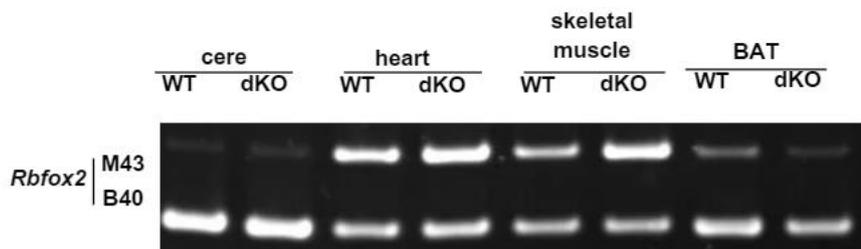


圖 3-11 不同組織的 *Rbfox2* 選擇性剪切

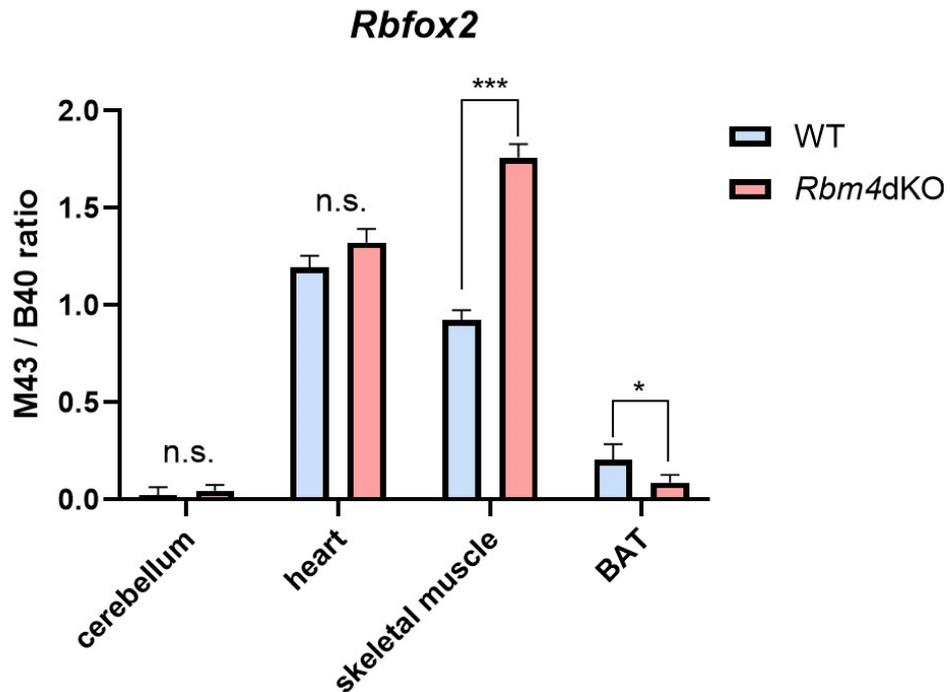


圖 3-12 不同組織的 *Rbfox2* 選擇性剪切 統計圖

我將實驗結果分為以下三項說明

- (1) 小腦：*Rbfox2* 調控著腦中重要的神經轉錄和轉錄後的修飾，進而牽連神經失調。*Rbfox2* 控制了腦的發育流程，隨後 *Rbfox1* 共同控制神經的生理和鈉離子通道的轉錄後修飾。



因此原本預期在 P30 小腦中的 *Rbfox2* 選擇性剪切在 WT 和 KO 的老鼠中會有差異，但多次(n=4)的實驗結果幾乎一致，證明 RBM4 在這個時期(P30)不會影響到小腦中的 *Rbfox2* 選擇性剪切，或是其中有其他的因子共同的調節，維持 *Rbfox2* 在腦中表現量的穩定性。

- (2) 心臟：在比較 WT 和 KO 老鼠的 M43 和 B40 的比例後，沒有顯著的差異
- (3) 骨骼肌：鈣蛋白酶體系統、自噬溶體酶系統與泛素蛋白媒體系統等共同的調控蛋白的合成與降解的動態平衡進而維持骨骼肌肉質量。有研究指出若是將老鼠中的 *Rbfox1* 和 *Rbfox2* 去除將會導致大量的肌肉質量流失。



而由實驗結果也可以看出在 KO 的老鼠中選擇 M43 的變多了，和 WT 有明顯差異，因此證明了 RBM4 會控制 *Rbfox2* 在肌肉的表現，進而影響肌肉質量的維持。

- (4) **棕色脂肪組織(BAT)**：研究指出 RBM4 會調控胰島素受體(insulin receptor)以及肌細胞增強因子(myocyte enhancer factor 2C)，進而促進棕色脂肪細胞(BAT)的分化，並用 RNA 定序分析比較 WT 和 *Rbm4a*KO 的棕色脂肪表現量，發現若是切除 RBM4a 將導致抑制棕色脂肪發育的蛋白表現量增加



由實驗結果可以看出在 KO 的老鼠中其 M43 的保留量下降，因此可以得知 RBM4 在棕色脂肪組織中對於 *Rbfox2* 的調控，並可能間接影響棕色脂肪組織的表現量。

2. *Prp40b* :

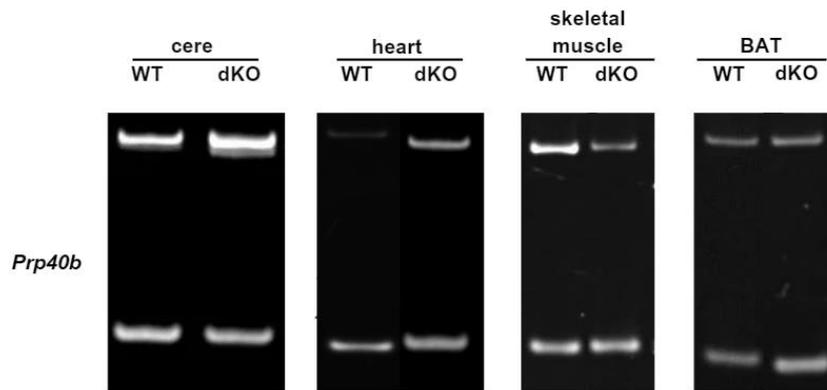


圖 3-13 *Prp40b* 在不同組織的選擇性剪切

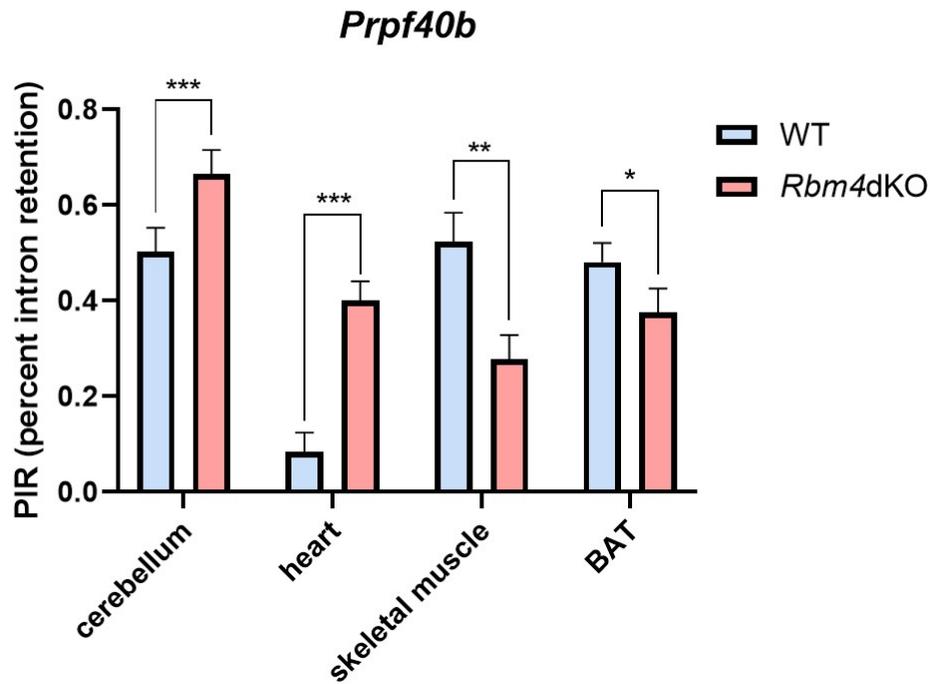


圖 3-14 Prp40b 在不同組織的選擇性剪切 統計圖

由實驗結果可以看到 KO 小鼠小腦和心臟中的保留量上升，在骨骼肌和棕色脂肪組織中保留量則下降。

實驗二、：觀察基因剔除老鼠不同組織與器官的生理型態並和野生型進行比較

(一) 小腦：

有研究指出 RBM4 會影響小腦的發育，granule cells 在增生與分化在 KO 的小鼠有延遲，因此 granule cells 由外層向內層遷移的速度 KO 較 WT 來的慢。整體而言可以看見 KO 小鼠的小腦發育速度較 WT 來得慢，而在有箭頭指出的地方可以看到在小腦的六、七個腦葉的凹槽(fissure)在 KO 的老鼠較不明顯。

(二) 心臟

由圖中可以看到在 WT 中的心肌厚度較 KO 中來的大，而左心室和右心室的面積占比在兩種 genotype 間亦有所不同。

(三) 骨骼肌：

由圖中可以觀察出在 KO 小鼠中，其肌肉較分散，不如 WT 般緊密

(四) 棕色脂肪組織：

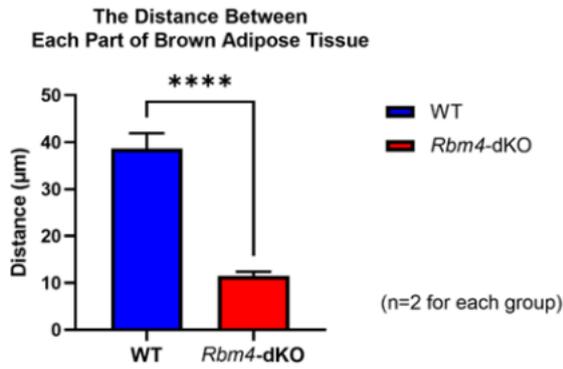


圖 4-1 野生型小鼠和RBM4-dKO 小鼠之棕色脂肪組織各部位平均間距(使用 Welch' s t 檢定計算 p value , ****表 p value < 0.0001)

量測四隻小鼠棕色脂肪組織各個部位之間的間距並量化，可以發現野生型小鼠的棕色脂肪組織間距較大，而 *Rbm4*-dKO 小鼠的棕色脂肪組織各個部分間距較小。

(五) 胰臟：

研究指出 RBM4 藉由調控胰臟的特定轉錄因子的選擇性剪接影響胰島素分泌的表現量，並且影響胰臟細胞的分化，也發現在 WT 和 KO 老鼠中部分胰島的指標基因(胰臟細胞分化的轉錄因子)表現量有明顯下降。(Lin JC et al., 2012)



途中箭頭所指的粉紅色區塊是牠的胰島(islet)，可以看到在 WT 的胰島數量明顯高出 KO 許多，而胰島數量下降有可能造成胰島素分泌量下降，進而使血糖無法下降，影響了胰臟的功能，

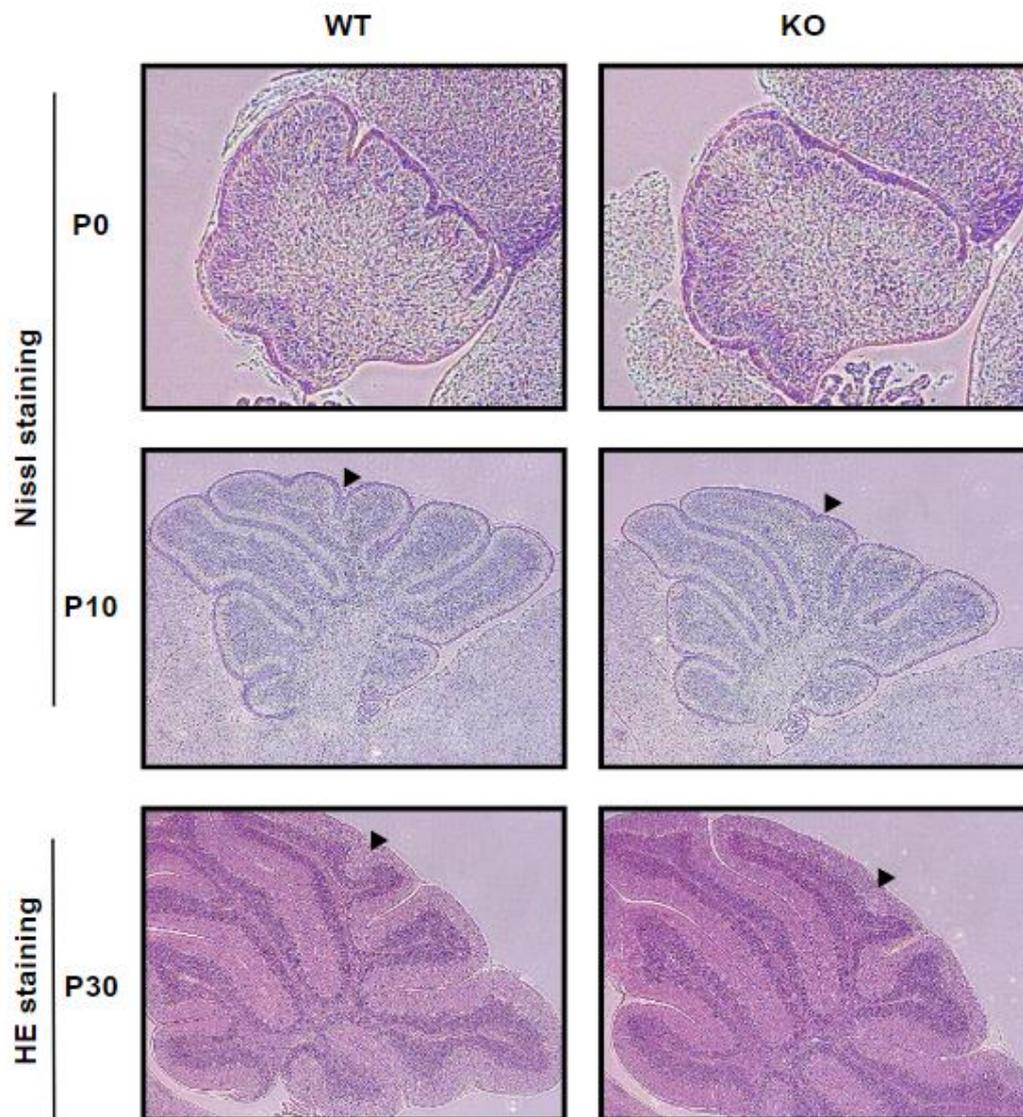


圖 4-2 小腦切片

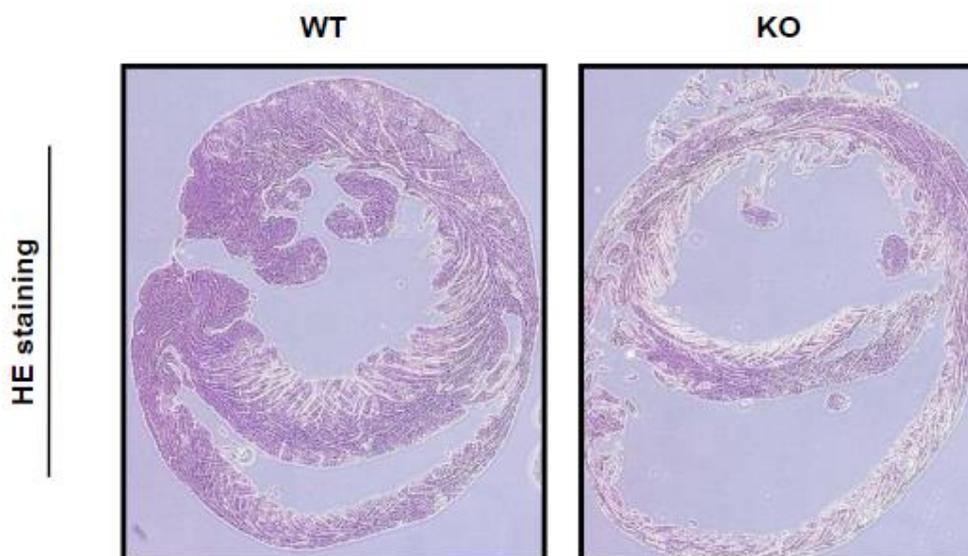


圖 4-3 心臟切片

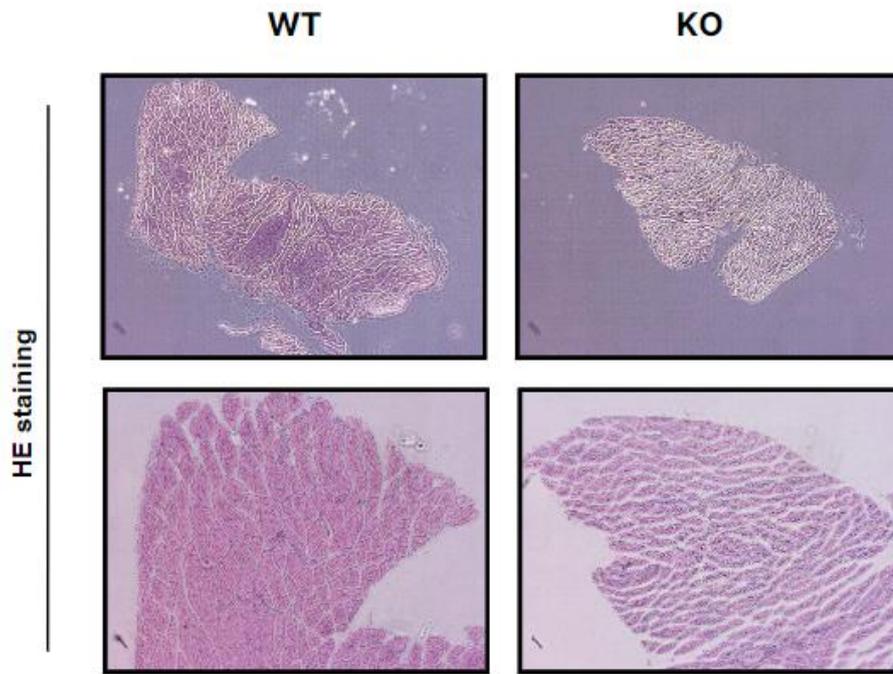


圖 4-4 肌肉切片

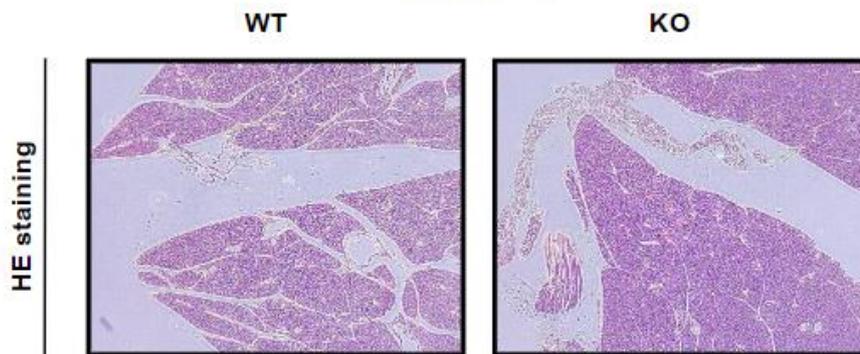


圖 4-5 棕色脂肪組織切片

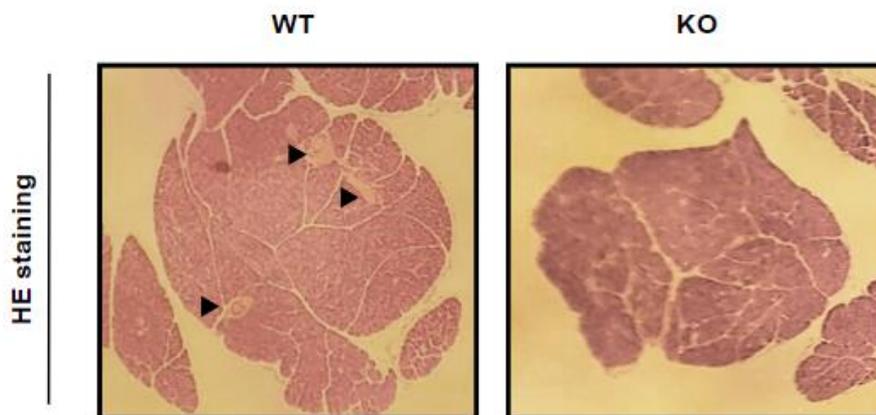


圖 4-6 胰臟切片

備註：圖 4-1 箭頭所指的地方為小腦的六葉與的七葉之間的凹槽。

圖 4-5 箭頭所指的粉紅色區塊是胰島

實驗三：若生理型態與特定的基因表現量和野生型有差異，則試圖尋找其改善缺陷的方式。

有研究指出從 E18.5 以後 *Rbm4KO* 的老鼠小腦中的 *Bdnf* 表現量較少，因此我也想知道除了小腦以外的其他組織是否有差異，因此選擇了骨骼肌與胰臟作為研究目標進行實驗。

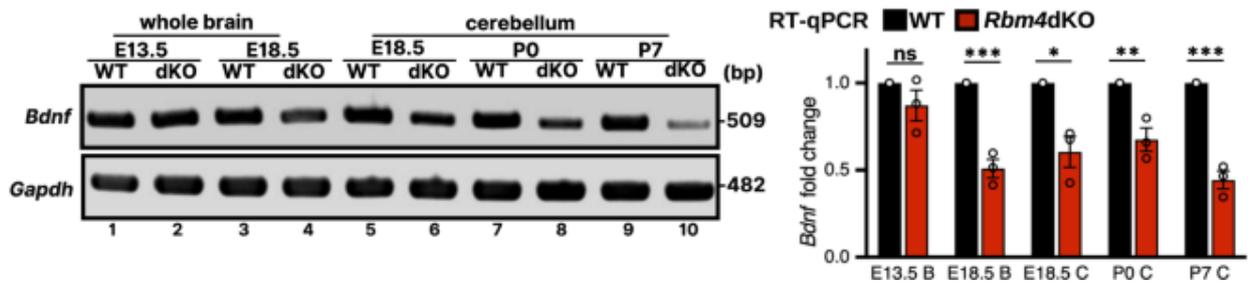
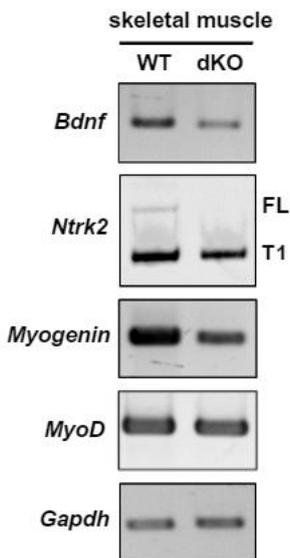


圖 5-1 *Bdnf* mRNA 在小腦表現量(Tsai YY, Shen CL et al.,2023)

(一)骨骼肌



首先，*Bdnf* 的表現量在 KO 老鼠比 WT 還低，證實了除了小腦以外，在骨骼肌中亦是如此。其次，我也發現骨骼肌指標基因 *MyoD* 的表現量沒有顯著差異，但是 *Myogenin* 的有。而我也想要知道 *Bdnf* 的表現量為何比較低，根據先前的研究，TrkB 作為 *Bdnf* 的受器(TrkB 為 *Ntrk2* 所製造出的蛋白)，發現在 KO 小鼠小腦中 *Ntrk2* T1 isoform 的占比較高，因此無法做出完整功能的 TrkB，而我在骨骼肌中也發現類似的現象因此推論這可能是導致骨骼肌中 *Bdnf* 表現量下降的原因之一。

圖 5-2 *Bdnf* 和其他骨骼肌的指標基因 mRNA 的表現量

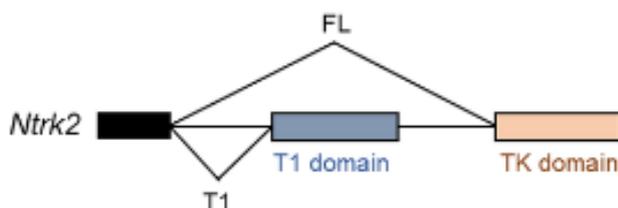


圖 5-3 *Ntrk2* 的 isoform

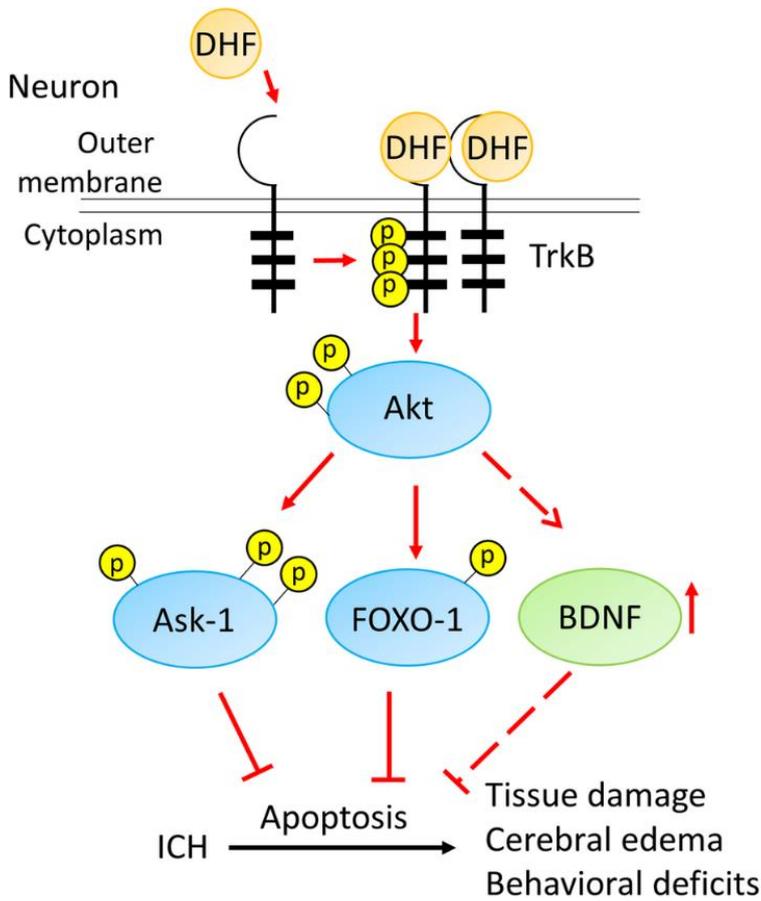


圖 5-4 TrkB-BDNF pathway(Wu, CH. et al., 2019)

DHF(dihydroxyflavone)作為 TrkB 的活化因子，因此我嘗試以腹腔注射 DHF 的方式試圖使 KO 小鼠的 *Bdnf* 表現量回升。注射方式以從懷孕的 15.5 天開始，注射 DHF 到媽媽中藉由臍靜脈傳給胚胎，直到其出生為止，再等到出生後第十天收樣本，發現相較於注射生理食鹽水(PBS)，注射 DHF 的 *Bdnf* 表現量有回升。

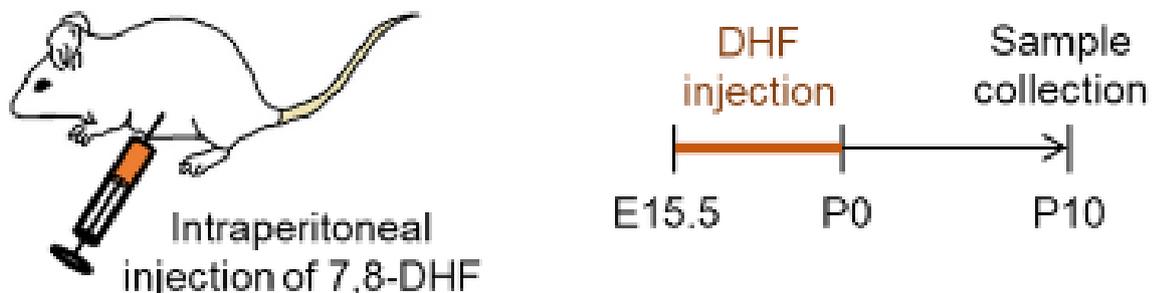


圖 5-5 腹腔注射 DHF 流程圖

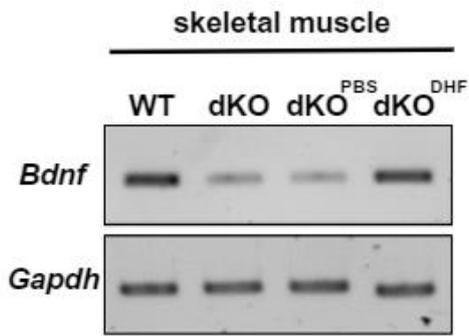
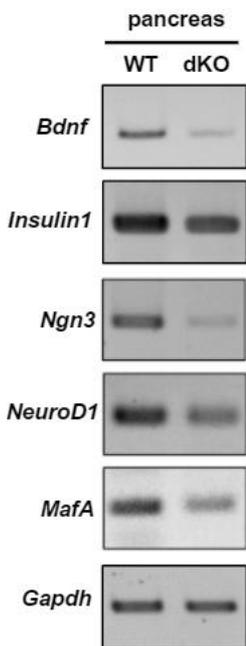


圖 5-6 *Bdnf* 在肌肉的表現量

(二)胰臟：



由這次的實驗結果得知 *Bdnf* 和其他作為胰臟細胞分化的轉錄因子(指標基因)的表現量有下降，和所觀察到的組織切片生理型態表現量的結果產生一定的關聯(在 KO 小鼠中胰島的數量較少)。因此我也嘗試以腹腔注射 DHF 的方式試圖使其表現量恢復。

圖 5-7 *Bdnf* 和其他胰臟的指標基因 mRNA 的表現量

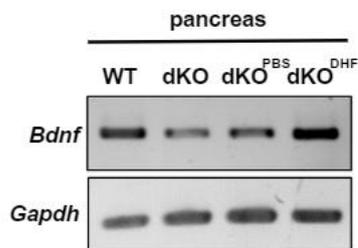


圖 5-8 *Bdnf* 在胰臟的表現量

肆、結論與應用

一、結論

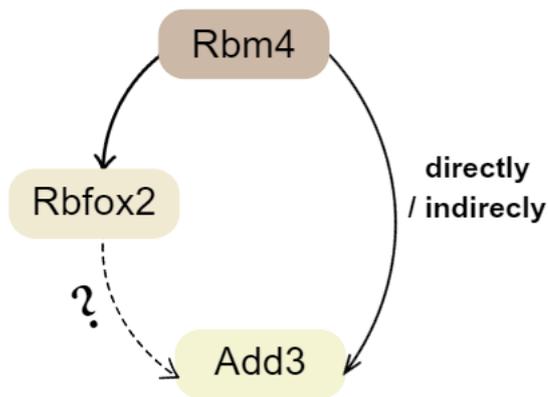
(一) 實驗一中可以證明 RBM4 對於 Rbfox2、Prp40b 與 Add3 的剪接具有調控的能力，使他們在不同的時間點與組織有著基因表現量的變化；在實驗二中，透過染色的結果發現牠都有生理型態的差異；在我的觀察中，Rbm4 基因敲除小鼠在小腦的六、七個腦葉的凹陷較不明顯，整體而言則可以看見 KO 小鼠的小腦發育速度較 WT 來得慢；在心血管系統，心室面積和心室間隔厚度存在顯著差異；在骨骼肌，敲除小鼠的平均纖維數較低，肌肉細胞也排列的腳鬆散；在棕色脂肪組織，我發現敲除小鼠之間的棕色脂肪組織之間的距離明顯減少；最後，在胰臟中觀察到敲除小鼠的胰島數量顯著減少。在實驗三中，首先觀察到在小鼠的胰臟與肌肉中，*bdnf* 以及其他有關肌肉及胰臟分化轉錄因子的基因的表現量都明顯變少，可能導致小鼠部分功能上的缺失，但在注射可以活化 *bdnf* 受器 (TrkB) 的 DHF 後，發現 *bdnf* 在胰臟以及肌肉細胞的表現量都有明顯回升，代表 DHF 有一定的能力可以修復 RBM4 基因剔除所導致的缺陷。

二、未來應用

- (二) 由實驗三所得到的結果，發現在注射 DHF 後，*Bdnf* 在胰臟以及肌肉細胞的表現量都有明顯回升，因此我也想將注射 DHF 後的老鼠送去切片後，觀察其組織切片，看其是否有恢復成與 WT 表現型的趨勢；除此之外，我也想用聚合酶連鎖反應與電泳跑膠的方式測試在注射 DHF 後的小鼠中，其肌肉與胰臟分化轉錄因子的基因表現量是否回升。
- (三) RBM4 調控 *Bdnf* 在胰臟與肌肉中的路徑仍是未知的，因此我想藉由測量中間過程產物蛋白的方法將其可能的調控路徑找出。
- (四) 在 KO 的小鼠中，其胰島細胞較少，產生較少的胰島素，因此我推論在基因剔除的小鼠的血糖可能無法下降，於是我想測量 KO 老鼠的血糖濃度，將其與 WT 比較，並且觀察在注射 DHF 後其血糖是否有降低的趨勢。
- (五) 因為使用小鼠會有個體之間的差異，增加實驗的變數，因此我想用養細胞的方式將我的

實驗重複進行，增加結果的可信度

(六) 在實驗一中可以得知 RBM4 對於 *Rbfox2*、*Prp40b* 與 *Add3* 剪切的調控，又因為 RBFOX2 同時也是 mRNA 結合蛋白，而 *Prp40b* 與 *Add3* 上也有潛在的結合位點，因此我也好奇 *Rbfox2* 是否也會調控 *Prp40b* 與 *Add3* 等目標基因。若在 KO 的老鼠中放入帶有 *Rbfox2*-B40 的質體使細胞表現此 isoform 的蛋白，是否會減少 *Add3* 的外顯子保留量與 *Prp40b* 的內含子移除比例上升？



伍、參考文獻

1. Bernert G, Fountoulakis M, Lubec G. Manifold decreased protein levels of matrin 3, reduced motor protein HMP and hark in fetal Down's syndrome brain. *Proteomics* 2002; 2:1752–7.
2. Diederichs S, Baumer N, Ji P, Metzelder SK, Idos GE, Cauvet T, et al. Identification of interaction partners and substrates of the cyclin A1–CDK2 complex. *J Biol Chem* 2004; 279:33727–41.
3. Hock J, Weinmann L, Ender C, Rudel S, Kremmer E, Raabe M, et al. Proteomic and functional analysis of Argonaut-containing mRNA-protein complexes in human cells. *EMBO Rep* 2007; 8:1052–60.
4. Huang Y, Genova G, Roberts M, Jackson FR. The LARK RNA-binding protein selectively regulates the circadian eclosion rhythm by controlling E74 protein expression. *PLoS One* 2007; 2:e1107.
5. JinW, Wu J, Zhuang Z, Li J, Fei F, Di G, et al. Gene expression profiling in apoptotic k562 cells treated by Hom harringtonine. *Acta Biochim Biophys Sin* 2007; 39:982–91.
6. Kar A, Havlioglu N, Tarn WY, Wu JY. RBM4 interacts with an intronic element and stimulates tau exon 10 inclusion. *J Biol Chem* 2006; 281:24479–88.
7. Lai MC, Kuo HW, Chang WC, Tarn WY. A novel splicing regulator shares a nuclear import pathway with SR proteins. *EMBO J* 2003; 22:1359–69.
8. Lin JC, Hsu M, Tarn WY. Cell stress modulates the function of splicing regulatory protein RBM4 in translation control. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007; 104:2235–40.
9. Lin JC, Yan YT, Hsieh WK, Peng PJ, Su CH, Tarn WY. RBM4 promotes pancreas cell differentiation and insulin expression. *Mol Cell Biol*. 2013 Jan;33(2):319-27. doi: 10.1128/MCB.01266-12. Epub 2012 Nov 5. PMID: 23129807; PMCID: PMC3554116.
10. Markus AM, Morris BJ. Lark is the splicing factor RBM4 and exhibits unique subnuclear localization properties. *DNA Cell Biol* 2006;25:457–64.

11. McNeil GP, Schroeder AJ, Roberts MA, Jackson FR. Genetic analysis of functional domains within the *Drosophila* LARK RNA-binding protein. *Genetics* 2001; 159:229–40.
12. Tsai YY, Shen CL, D D, Tsai CY, Tarn WY. Activation of TrkB signaling mitigates cerebellar anomalies caused by Rbm4-Bdnf deficiency. *Commun Biol.* 2023 Sep 5;6(1):910. doi: 10.1038/s42003-023-05294-z. PMID: 37670183; PMCID: PMC10480162.
13. Wu, CH., Chen, CC., Hung, TH. *et al.* Activation of TrkB/Akt signaling by a TrkB receptor agonist improves long-term histological and functional outcomes in experimental intracerebral hemorrhage. *J Biomed Sci* **26**, 53
14. Yang L, Han Y, Suarez Saiz F, Minden MD. A tumor suppressor and oncogene: the WT1 story. *Leukemia* 2007; 21:868–76.
15. Yong H, Zhao W, Zhou X, Liu Z, Tang Q, Shi H, Cheng R, Zhang X, Qiu Z, Zhu J, Feng Z. RNA-Binding Motif 4 (RBM4) Suppresses Tumor Growth and Metastasis in Human Gastric Cancer. *Med Sci Monit.* 2019 May 30; 25:4025-4034. doi: 10.12659/MSM.914513. PMID: 31145716; PMCID: PMC6559002.

【評語】 080015

本研究藉由 RNA 定序找到了可能由 RBM4 (RNA 結合蛋白) 主導的選擇性剪接，包含 Rbfox2、Prpf40b 和 Add3 等，並發現這些剪接事件在不同時間點和組織中存在差異。因為在不同的組織中看到了選擇性剪接的變化，更透過觀察組織切片比較了野生型與 Rbm4 基因剔除的小鼠中其腦部、心臟、骨骼肌、棕色脂肪組織和胰臟的表現型，進而發現這些差異與基因的關聯。這些發現共同突顯了 RBM4 在調控 Bdnf 中的關鍵作用，並展示出 DHF 作為潛在治療方法的有效性。

優點：

1. 實驗發想、設計與執行皆有很高的水準。
2. 有重要的研究成果：Rbm4 雙基因剔除小鼠在骨骼肌和胰臟中 Bdnf 和一些指標基因的 mRNA 表現量明顯下降。而腹腔注射 TrkB 活化因子 DHF 能夠顯著地完全恢復 Rbm4 雙基因剔除小鼠中的 Bdnf 表現量。這些發現共同突顯了 RBM4 在調控 Bdnf 中的關鍵作用，並展示了 DHF 作為潛在治療方法的有效性。

建議：

1. 由實驗得知 RBM4 調控 BDN 下是在於改變基因的表現量，但非產生不同長度的 mRNA，似乎跟 RBM4 作為 altanative splicing regulator 的功能不一致。
2. 由大數據是否可找到疾病中 RBM4 基因缺失的證據？