

行政院國家科學委員會補助
大專學生參與專題研究計畫研究成果報告

* ***** ***** *
* 計畫：利用酵母菌 sGASP 系統來探討 Tmprss3 突變後造成聽障 *
* 名稱：的機轉 *
* ***** ***** *

執行計畫學生： 陳品樺
學生計畫編號： NSC 99-2815-C-040-015-B
研究期間： 99 年 07 月 01 日至 100 年 02 月 28 日止，計 8 個月
指導教授： 李宣佑

處理方式： 本計畫涉及專利或其他智慧財產權，2 年後可公開查詢

執行單位： 中山醫學大學生物醫學科學學系（所）

中華民國 100 年 03 月 30 日

行政院國家科學委員會補助

大專學生參與專題研究計畫研究成果報告

* 計畫 : 利用酵母菌 sGASP 系統來探討 TMPRSS3 突變後 *
* 名稱 : 造成聽障的機轉 *

執行計畫學生：陳品樺

學生計畫編號：NSC 99-2815-C-040-015-B

研究期間：99年7月1日至100年2月底止，計8個月

指導教授：李宣佑教授

處理方式(請勾選)：立即公開查詢

涉及專利或其他智慧財產權，一年二年後可公開查詢

執行單位：中山醫學大學生物醫學科學學系(所)

中華民國 100年 03月 28日

目錄

摘要.....	1
實驗動機與問題.....	2
研究方法及材料.....	3
結果與討論.....	6
圖表.....	9
參考資料.....	16
附錄.....	17

摘要

TMPRSS3 (transmembrane protease, serine 3) 是屬於第二型穿膜絲氨酸蛋白 (type II transmembrane serine protease, TTSPs)。先前文獻指出 *TMPRSS3* 基因的突變會影響耳蝸內 Na^+ 的再吸收而造成非症候群聽障 DFNB8/10。本研究利用酵母菌 sGASP (secretory genetic assay for site-specific proteolysis) 系統來探討 *TMPRSS3* 突變後造成聽障的機轉。在本研究中我們利用 sGASP 發現 *TMPRSS3* C194F、R80H 和 A418V 突變確實會造成 *TMPRSS3* 酵素功能活性的下降，而影響正常的功能。然而先前我們實驗室發現的這些突變點皆屬 heterozygous，因此我們進一步的利用共同轉殖方式(co-transfection)的方式進行研究，研究結果發現 heterozygous 表現的突變型 *TMPRSS3* 酵素功能活性的下降的活性同樣下降。由研究結果我們建議當 *TMPRSS3* C194F、R80H 和 A418V 突變時，會造成酵素活性的降低，進而影響耳蝸內 Na^+ 的再吸收而造成非症候群聽障。

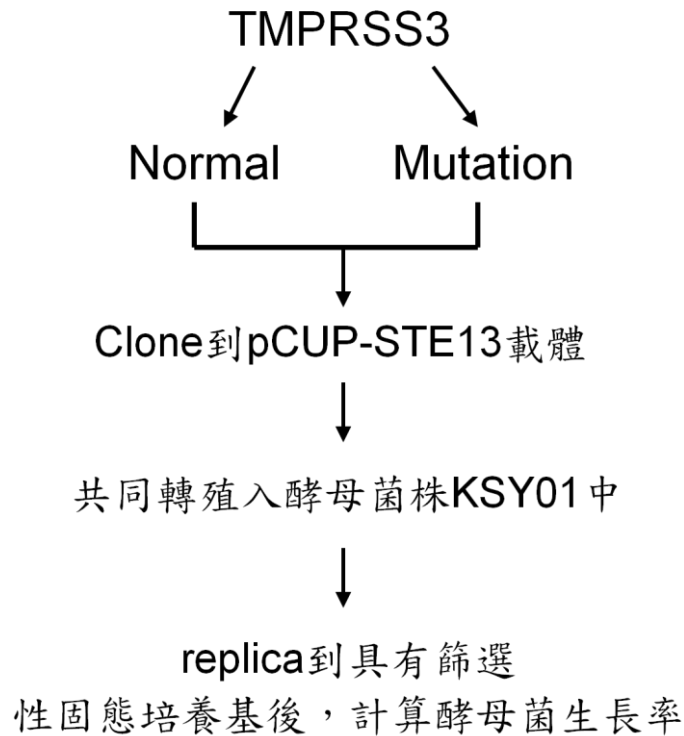
實驗動機

先前我們實驗室的研究在非症候群聽障患者身上發現 heterozygous 的 *TMPRSS3* 基因突變，包括 R80H (LDLRA domain Exon4 239G>A/wt)、L184S (SRCR domain Exon6 551T>C/wt)、A418V (Serine protease domain Exon12 1253C>T/wt)，以及由 Lee 等作者(2003)所發現的 D103G(LDLRA domain Exon4 308A>G)、C194F(LDLRA domain Exon4 581G>T)、W251C(Serine protease domain Exon8 753G>C)、P404L(Serine protease domain Exon12 1211C>T) 然而到目前為止我們並不清楚這些突變造成非症候群聽障的致病機轉。因此本研究的主要動機是想要探討 *TMPRSS3* 基因上所發現的 7 個突變點對正常 *TMPRSS3* 基因所造成的影響，藉以了解這 7 個 *TMPRSS3* 基因突變後造成聽障的致病機轉。

根據上述的動機，我們將利用酵母菌 sGASP(secretory genetic assay for site-specific proteolysis)表現系統來探討先前實驗室在非症候群聽障學童中所發現 *TMPRSS3* 基因的 3 個 heterozygous 的錯異突變(missense mutation)R80H、L184S、A418V，以及由 Lee 等作者(2003)所發現的 missense 突變 D103G、C194F、W251C、P404L 對正常 *TMPRSS3* 基因所造成的影響。

研究方法及材料

研究步驟



研究方法

1) 建構 pCUP-STE13-TMPRSS3

1-1 由 pGAD424 質體建構 pCUP-STE13-TMPRSS3 正常型質體和突變型質體

本實驗室所使用的 *TMPRSS3* 質體、pASHS-SR 質體及酵母菌株 KSY01(MAT α leu2 ura3 trp1 lys2 suc2⁻△9kex2)是由韓國 Park 教授實驗室所提供。此質體是將 pGAD424 質體(附圖一)上的 ADH promoter 由 CUP promoter 所置換，並利用 *Hind*III 將 Gal4 activation domain 及 multicloning site 換掉改由 *Eco*RI、*Xho*I、*Not*I、*Pst*I 等所取代，再利用 *Eco*RI、*Xho*I 兩個酵素，將 STE13 蛋白連接 *TMPRSS3* 的 LDLRA、SRCR 及 Serine protease 等 domain，成為 pCUP-STE13-TMPRSS3 質體(附圖二)，此質體上具有 LEU2 的 marker。

1-2 由 pASHS 質體建構 pASHS-SR 質體

另一由韓國 Park 教授實驗室所提供的 pASHS-SR 質體是利用 pASHS 質體作為骨架，利用在 cloning site 的 *EcoRI* 及 *NotI* 兩酵素，將 substrate 的序列 VNLN SSRQSR↓IVGGE 插入 pASHS 質體中，即成為 pASHS-SR 質體(附圖三)，此質體具有 Trp1 的 marker。

2) 質體 DNA 的大量製備

目的是將我們送進去細菌內繁殖的質體與細菌本身以及細菌的染色體 DNA 分離。先前實驗室已將 pCUP-STE13-TMPRSS3 正常型及突變型質體建構完畢，並將帶有質體的大腸桿菌菌液保存於 -80°C 冰箱，取出 10 μl 培養菌 5ml 培養液，放入培養箱中 16 小時。將 5ml 的菌液離心 3000rpm/10 分鐘，丟棄上清液，再使用 High-speed plasmid mini kit(Geneaid)抽取細菌質體。首先加入 PD1 200 μl ，與細菌充份混合均勻後，移至將 5ml 的菌液離心 3000rpm/10 分鐘，丟棄上清液，再使用 High-speed plasmid mini kit(Geneaid)抽取細菌質體。首先加入 PD1 200 μl ，與細菌充份混合均勻後，移至 eppendorf。加入 PD2 200 μl ，gently 均勻搖 5-6 次，靜至 2 分鐘。PD3 300 μl ，gently 均勻搖 5-6 次後進行離心 13200rpm/10分鐘。之後抽取上清液至 column，離心 30 秒，並去除離心液。加入 W1 buffer 400 μl ，離心 30 秒，倒掉離心液。加入 600 μl wash buffer 離心 30 秒，去除離心液後，再離心 3 分鐘。之後將 column 置於 eppendorf 並加入 50 μl 的 ddH₂O。

3) 將 pCUP-STE13-TMPRSS3 正常型和突變型質體，和 pASHS-SR 質體共同轉殖(cotransformation transformation)入酵母菌中

首先將酵母菌株 KSY01 養在 2ml 液態培養管 YPD 中，於 30°C 培養 overnight，然後取培養菌液總體積 1/50~1/100 放於含有 50ml 培養液 YPD 的錐形瓶中，於 30°C 培養箱中搖 6~8 小時使 O.D.595 值約 0.5~0.6。O.D.595

值到達後，分裝至離心管中，離心 3000rpm 5min 並倒掉上清液，接著使用 10ml d2H2O 清洗一次，再離心 3000rpm 5min 並倒掉上清液，然後加入 87.5ul 10X TE buffer、87.5ul 10X LiAc、700ul d2H2O 均勻懸浮後，再分裝 87.5ul 至 eppendorf 中。

取10ul Salmon sperm DNA denature(95°C 10min後插入冰上至少10min)，salmon sperm DNA當作一個攜帶者(carrier)，對於酵母菌來說，質體或線狀DNA太小，不易進入細胞中，必須靠攜帶者一起帶進去。接著將欲轉殖的兩種質體pCUP-S TE13-TMPRSS3和pAHSH-SR各備1ug、salmon sperm DNA加入酵母菌中，接著50% PEG3350 560ul、10X TE buffer 70ul、10X LiAc 70ul等加入並pipet均勻，30°C水浴30min後，42°C 熱休克(heat shock)15min，之後快速離心5sec吸掉上清液【9】，再加入1X TE buffer 500ul清洗一次並快速離心5sec，再吸掉上清液，最後加入100ul ddH₂O回溶，塗抹在具有篩選性的固態培養基SC-L,-W，置於30°C培養箱中4天。

4) 複印(replicate)於具有篩選性固態培養基，計算酵母菌生長率

將長出酵母菌的篩選性固態培養基 SC-L,-W 進行複印(replica)動作，使滅菌過的 filter paper 平綁在圓木柱上，篩選性固態培養基 SC-L,-W 倒蓋在 filter paper 上，垂直並均勻施力輕拍培養基背面，使菌落均勻黏上 filter paper，輕緩將固態培養基拿起，接著取 YPS 固態培養基覆蓋在以沾有菌落的濾紙上，垂直並均勻施力輕拍培養基背面，輕緩垂直的將固態培養基拿起，接下來換 YPD 固態培養基重複之前的動作。最後將以上兩種 YPS 置於 30°C 培養箱中 7 天、YPD 固態培養基置於 30°C 培養箱中 1 天。計算生長於 YPD 和 YPS 上的酵母菌落數目，可得其生長率，即可知突變型基因是否會影響正常型基因表現。

結果與討論

先前實驗室已將實驗所需的質體 pASHS-SR 和正常型或突變型的 pCUP-STE13-TMPRSS3 等質體建構完畢，並已將此質體冷凍儲存於 -80°C 冰箱中，因此只需準備足夠量的質體於實驗中。

1) 利用酵母菌 sGASP 系統分析 TMPRSS3 基因正常型與突變型

利用 sGASP 系統實驗，使用醋酸鋰轉殖法(LiAc transformation)，將 pASHS-SR 以及 pCUP-STE13-TMPRSS3 WT 質體(或是 pCUP-STE13-TMPRSS3 R80H、D103G、L184S、C194F、W251C、P404L、A418V 突變型)同時送入 KSY01(suc2⁻)酵母菌中，均勻塗抹於具有篩選性的固態培養基 SC-L,-W 上，確保 pASHS-SR 以及突變型或正常型 pCUP-STE13-TMPRSS3 質體皆送入酵母菌中，將培養基置於 30°C 培養箱中 4 天。接著進行複印的動作，將篩選性 SC-L,-W 固態培養基上菌落轉印到 YPD 和 YPS 固態培養基上，培養於 30°C 培養箱中。YPD (含 glucose)固態培養基於 30°C 培養箱中置放一天，而 YPS (含 sucrose) 固態培養基於 30°C 培養箱中置放七天(圖一)。生長率的計算方式為，YPS 上的菌落(不含只有痕跡沒長的菌落)/YPD 上的菌落數，經多次實驗後得到實驗結果。

在 pASHS-SR 和 pCUP-STE13-TMPRSS3 (WT、R80H、D103G、L184S、C194F、W251C、P404L、A418V)在 YPS 固態培養基上生長菌落的統計(圖二)，其分別為 WT: $81.7\% \pm 4.3\%$ ，R80H: $19.4\% \pm 5.4\%$ ，D103G: $15.7\% \pm 4.1\%$ ，L184S: $13.2\% \pm 4.7\%$ ，C194F: $20\% \pm 7\%$ ，W251C: $11.6\% \pm 5.5\%$ ，P404L: $15.1\% \pm 4.3\%$ ，A418V: $43\% \pm 14\%$ 。(n=5)

2) 使用共同轉殖方式轉殖正常型與突變型基因進入酵母菌 KSY01 中模擬 heterozygous 表現情形

在模擬 heterozygous 部分，同樣利用 sGASP 系統實驗，使用醋酸鋰轉殖法將 pASHS-SR 以及 pCUP-STE13-TMPRSS3 WT 和突變型 pCUP-STE13-TMPRSS3 (R80H、L184S、C194F、W251C、A418V)等質體，同時送入 KSY01(suc2⁻)酵母菌中表現。同樣複印到 YPD 和 YPS 固態培養基上，得到菌落的生長率(圖三)。

而其生長菌落的統計結果(圖四)，分別為 WT: 81.8%±3.4%，C194F: 41.5%±4.3%，R80: 44.2%±4.5%，L184S: 52.8%±3.1%，W251C: 45.2%±4.8%，A418V: 39.4%±1.8%。(n=5)

在 homozygous 的實驗中，由統計圖表中看出，突變型酵母菌生長率皆小於正常型。但是我們實驗室所發現台灣的聽障學童 *TMPRSS3* 基因的錯異突變 R80H、L184S、A418V 表現皆為 heterozygous，因此使用同樣的方式，將 *TMPRSS3* WT 質體和 *TMPRSS3* 突變型(R80H、C194F、L184S、W251C、A418V)質體，共同轉殖送入酵母菌 KSY01(suc2⁻)中表現(圖三&圖四)。其中不是我們實驗室發現的 C194F 以及 W251C，先前已經有實驗證實 *TMPRSS3* 基因在這兩點突變後，其功能性會喪失，因此選用這兩種突變點當作 positive control。

另外我們也使用另一種方式來模擬基因 heterozygous 表現，同樣利用 sGASP 系統，使用醋酸鋰轉殖法將 pASHS-SR 以及正常型 pCUP-STE13-TMPRSS3 質體，轉殖送入 KSY01(suc2⁻)酵母菌中表現，將培養基置於 30°C 培養箱中 4 天。

接著將含有 pASHS-SR 以及正常型 pCUP-STE13-TMPRSS3 WT 質體的酵母菌落再進行基因轉殖(transformation)，同樣利用醋酸鋰轉殖法將突變型 pCUP-STE13-TMPRSS3 (R80H、L184S、C194F、W251C、A418V)質體送

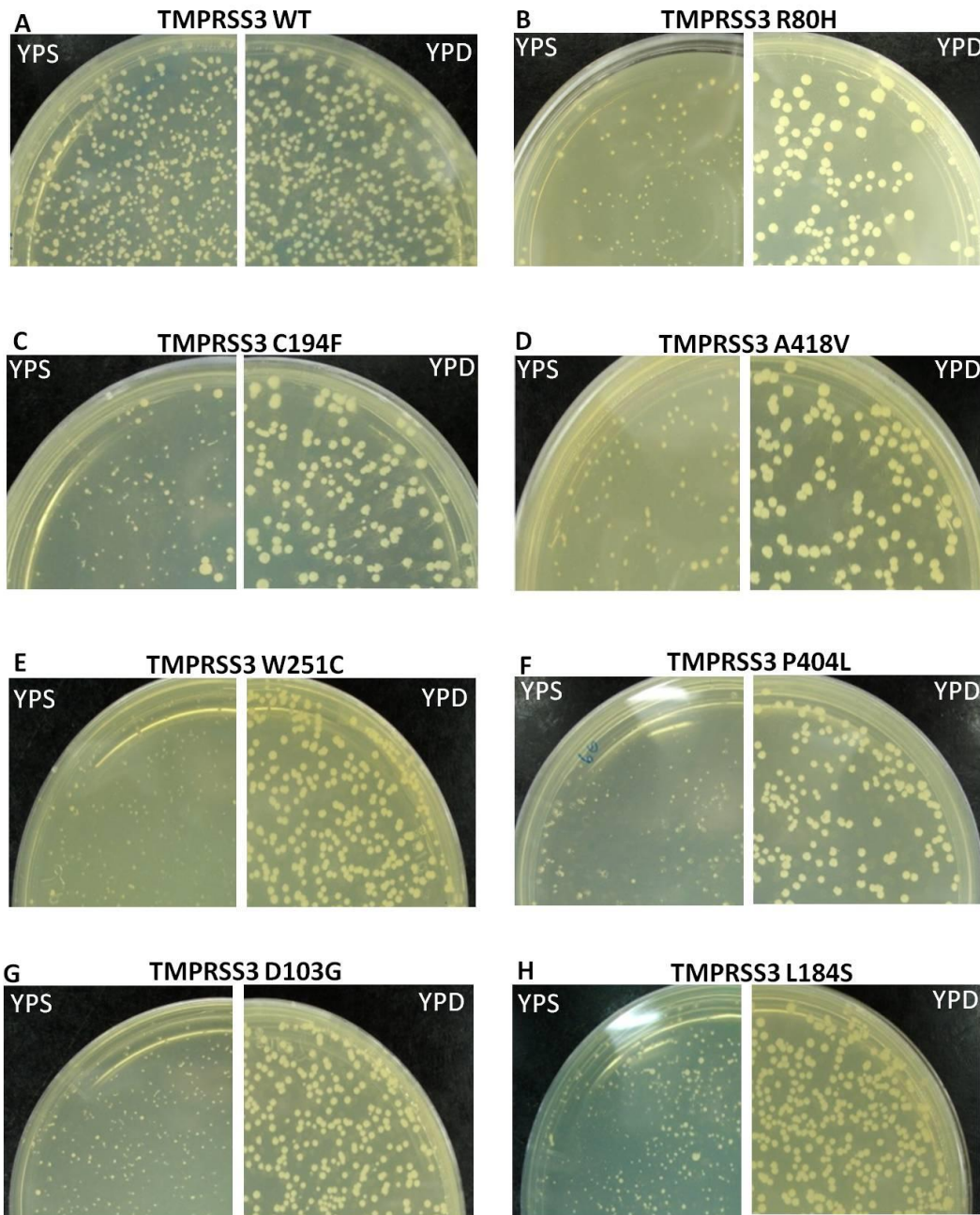
入酵母菌 KSY01(suc2⁻)中表現，將培養基置於 30°C 培養箱中 4 天，同樣複印到 YPD 和 YPS 固態培養基上，得到菌落的生長率(圖五)。

而其生長菌落的統計結果(圖六)，其分別為 WT: 83.8% ±3.4%，C194F: 76.2% ±12.9%，R80H: 75% ±10.3%，L184S: 76% ±8.7%，W251C: 79%±4.5%，A418V: 80%±10.1%。(n=5)

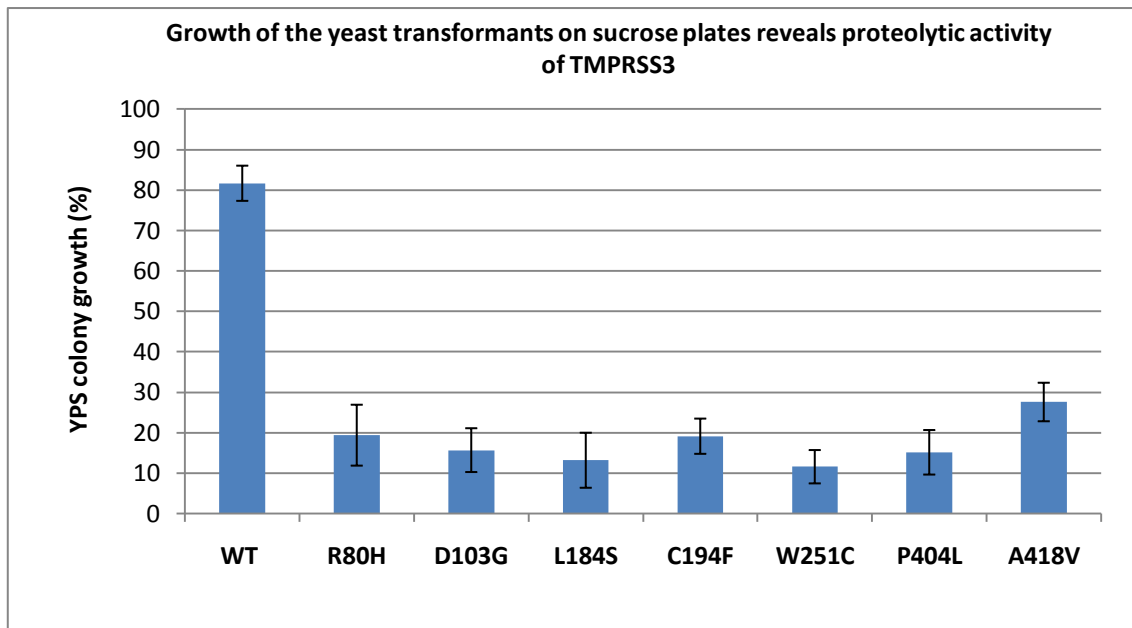
在模擬 homozygous 和 heterozygous 所做的實驗中，固態培養基 YPD 和 YPS 的酵母菌生長率在這兩種實驗結果中，可以很明顯的由菌落大小看出不同(圖一&圖三)。將這兩種 homozygous 和 heterozygous 生長率的統計結果放在一起後，可以很明顯的看出 heterozygous 的菌落生長率皆比 homozygous 菌落生長率來的高(圖七)，顯示出沒有我們先前所預測得的突變型抑制正常型的 dominant negative effect 的現象。

另外由統計結果中推測(圖七)，突變型 TMPRSS3 蛋白功能性降低，鈉離子的再回收率也降低，因此耳蝸內中庭皆的內淋巴液高鉀低鈉的環境無法維持平衡，而影響到電極的傳送，進而因此影響到聽力，而產生聽障。

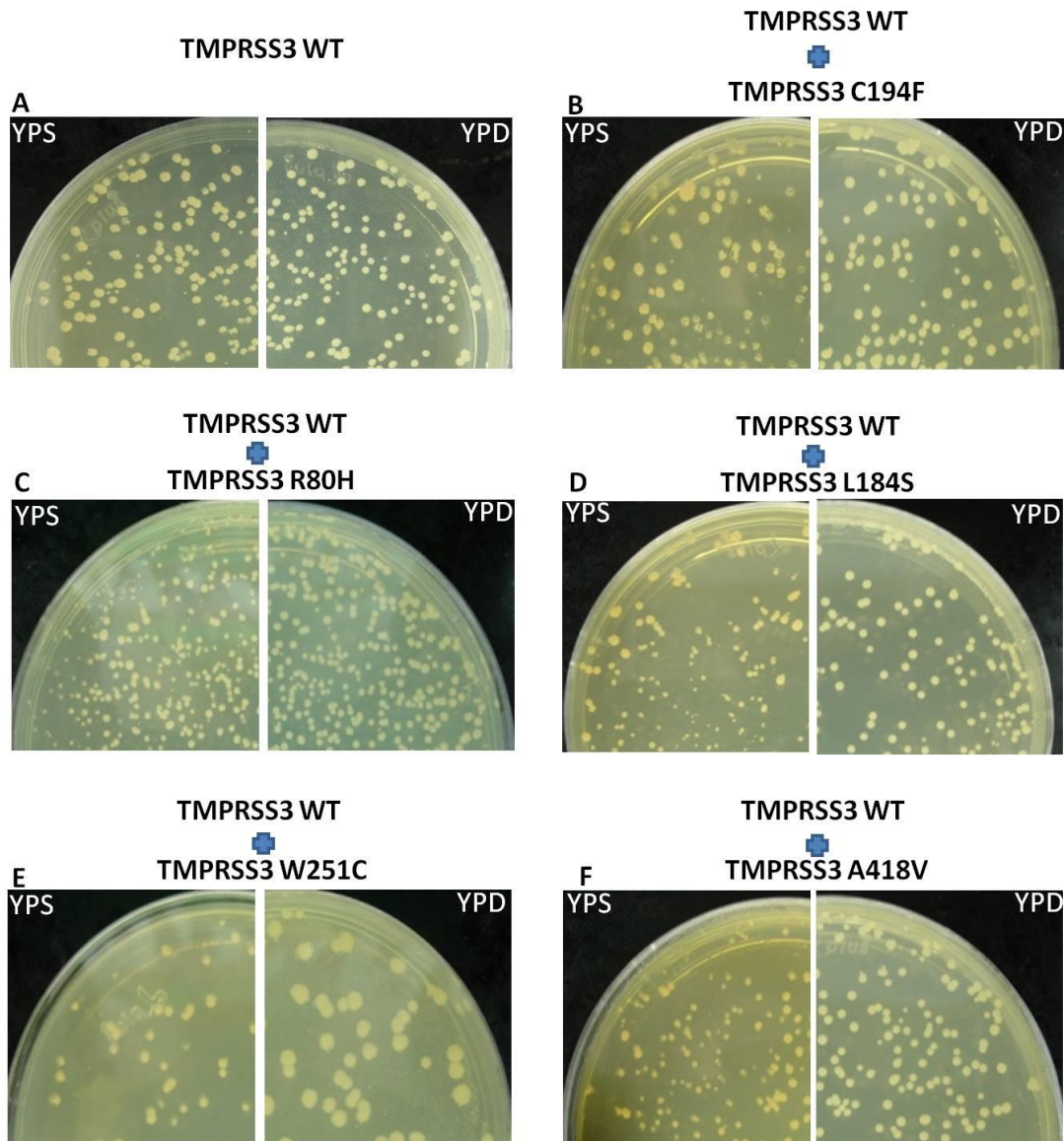
圖表



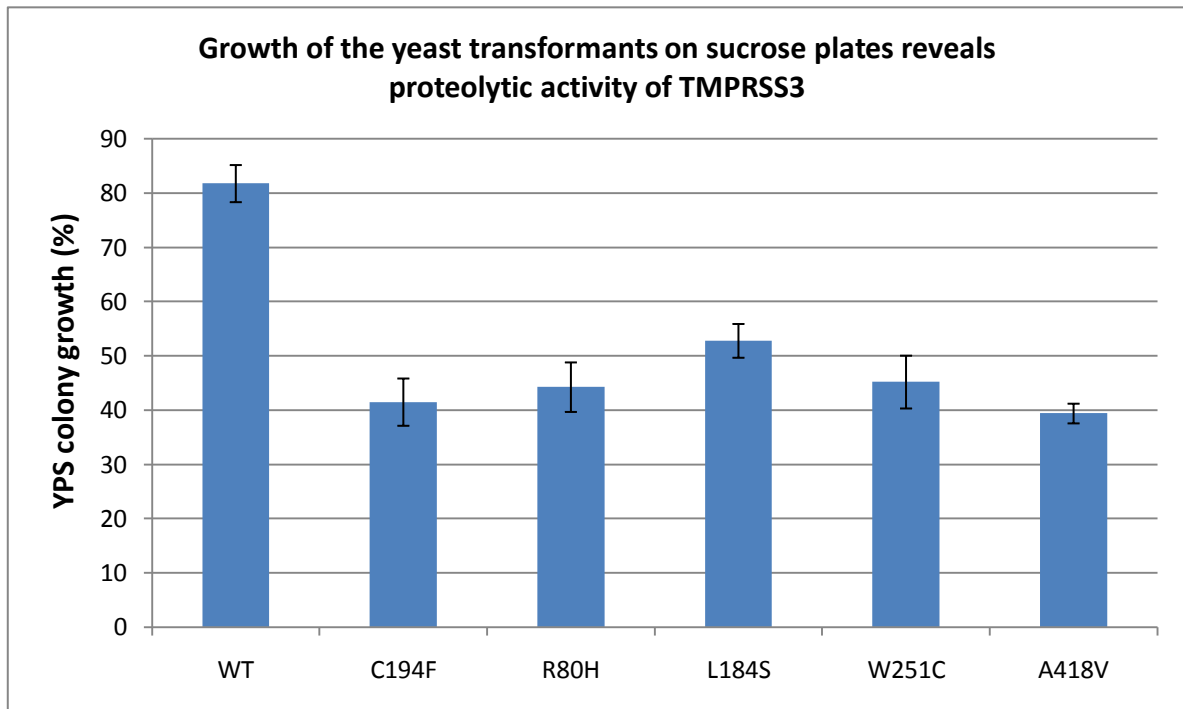
(圖一) 利用 sGASP 實驗，將 pASHS-SR 和 pCUP-STE13-TMPRSS3 WT(或是 pCUP-STE13-TMPRSS3 R80H、D103G、L184S、C194F、W251C、P404L、A418V 突變型)同時送入 KSY01(suc2⁻)酵母菌中，再用覆印的方式轉印到 YPD 和 YPS 固態培養基上，培養於 30°C 培養箱中。生長率的計算方式為，YPS 上的菌落(不含只有痕跡沒長的菌落)/YPD 上的菌落數。



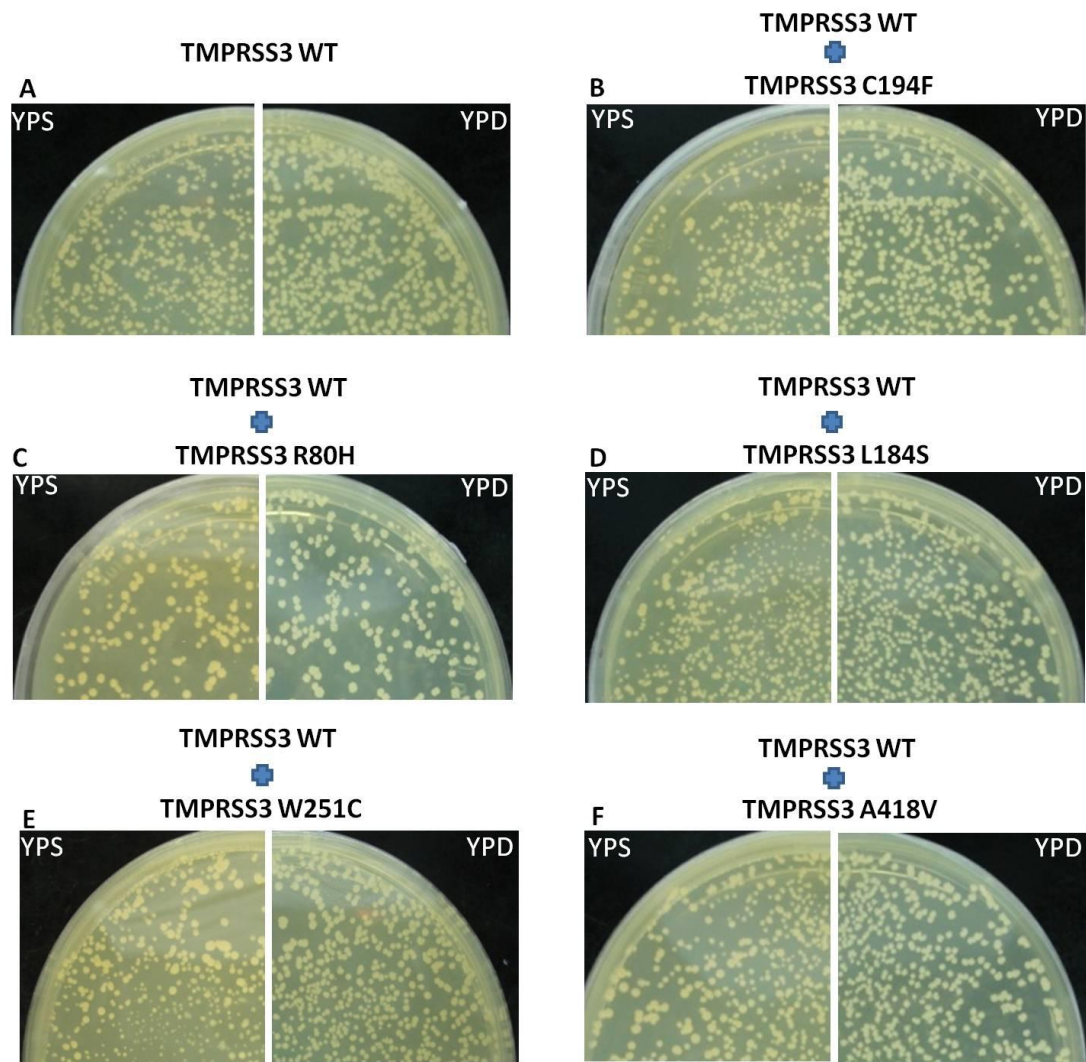
(圖二) YPS 固態培養基上生長菌落數之統計圖。pASHS-SR 和 pCUP-STE13-TMPRSS3 (WT、R80H、D103G、L184S、C194F、W251C、P404L、A418V)在 YPS 固態培養基上生長菌落的統計，其分別為 WT: 81.7%±4.3%，R80H: 19.4%± 5.4%，D103G: 15.7%±4.1R%，L184S: 13.2%±4.7%，C194F: 20%±7%，W251C: 11.6%±5.5%，P404L: 15.1%±4.3%， A418V: 43%±14%。(n=5)



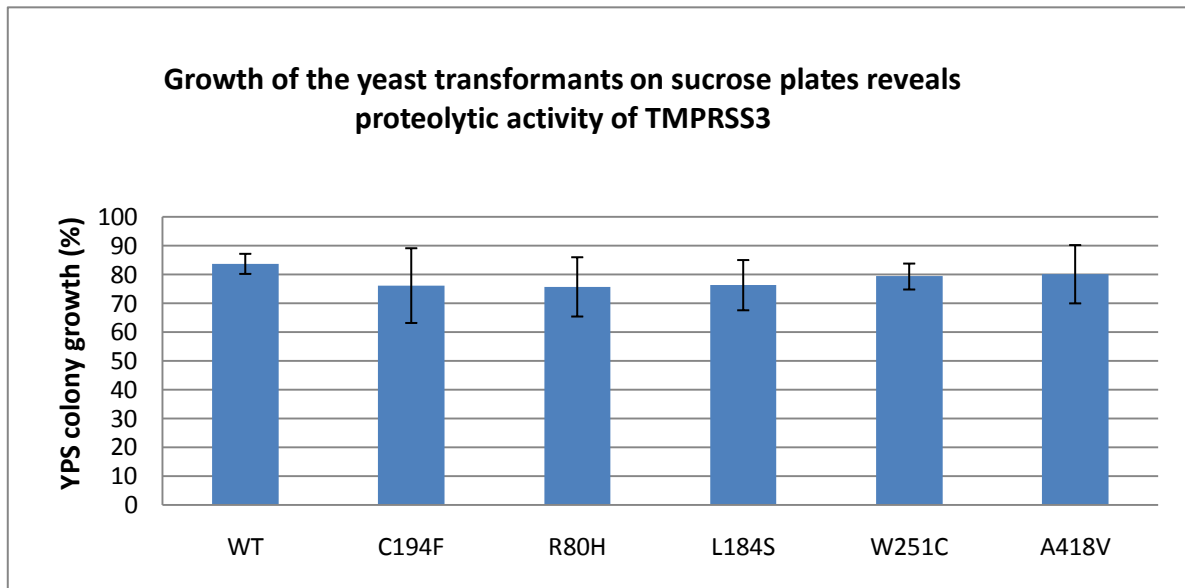
(圖三) 利用 sGASP 實驗，將 pASHS-SR 和 pCUP-STE13-TMPRSS3 WT 以及突變型 pCUP-STE13-TMPRSS3 (R80H、L184S、C194F、W251C、A418V 突變型) 同時送入 KSY01(suc2⁻) 酵母菌中，模仿聽障學童 heterozygous 表現情形，再用覆印的方式轉印到 YPD 和 YPS 固態培養基上，培養於 30°C 培養箱中。生長率的計算方式為，YPS 上的菌落(不含只有痕跡沒長的菌落)/YPD 上的菌落數。其中突變點 C194F 以及 W251C，當作 positive control。



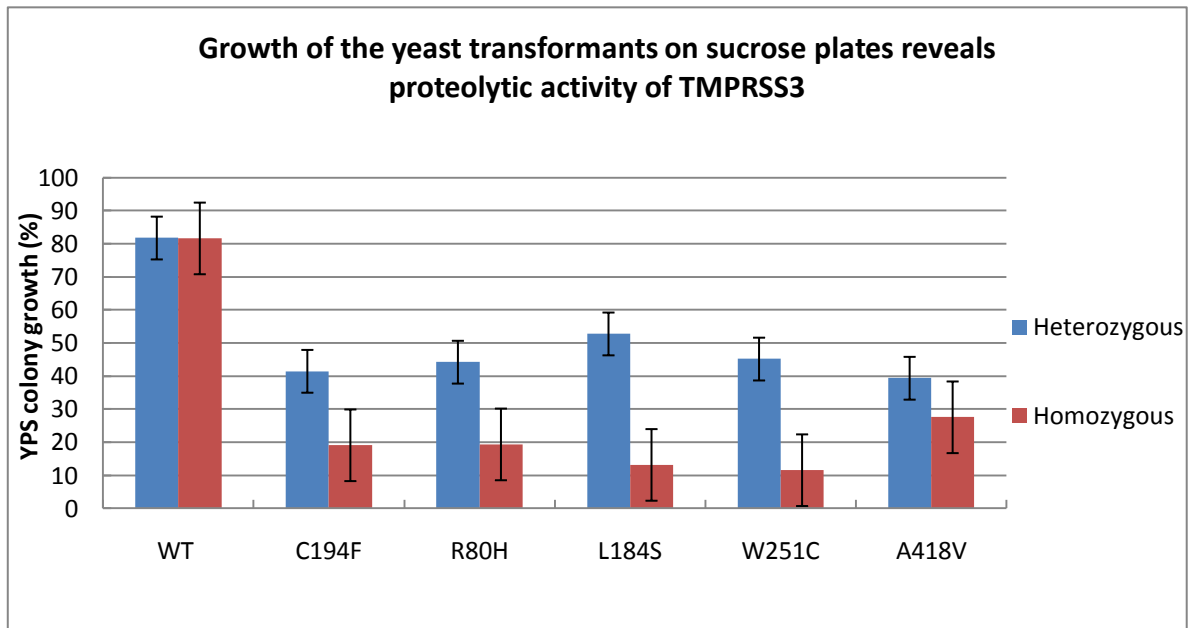
(圖四) 將正常和突變的 TMPRSS3 質體一起轉殖入 KSY01(suc2-)酵母菌中，Heterozygous 形式的 YPS 固態培養基上生長菌落數之統計圖。pASHS-SR 和 pCUP-STE13-TMPRSS3 (WT、C194F、R80H、L184S、W251C、A418V)在 YPS 固態培養基上生長菌落的統計，其分別為 WT: 81.8% ±3.4%，C194F: 41.5% ±4.3%，R80H: 44.2% ±4.5%，L184S: 52.8% ±3.1%，W251C: 45.2%±4.8%，A418V: 39.4%±1.8%。(n=5)



(圖五) 利用 sGASP 實驗，將突變 pCUP-STE13-TMPRSS3 質體送入帶有 pASHS-SR 質體和正常 pCUP-STE13-TMPRSS3 的 KSY01(suc2⁻)酵母菌中，以達到模擬病人 heterozygous 的情況，之後再用覆印的方式將篩選性 SC 固態培養基上的菌落轉印到 YPD 和 YPS 固態培養基上，培養於 30°C 培養箱中。生長率的計算方式為，YPS 上的菌落(不含只有痕跡沒長的菌落)/YPD 上的菌落數。其中突變點 C194F 以及 W251C，當作 positive control。



(圖六) 將突變 pCUP-STE13-TMPRSS3 質體送入帶有 pASHS-SR 質體和正常 pCUP-STE13-TMPRSS3 的 KSY01(suc2-)酵母菌中，Heterozygous 形式的 YPS 固態培養基上生長菌落數之統計圖。pASHS-SR 和 pCUP-STE13-TMPRSS3 (WT、C194F、R80H、L184S、W251C、A418V)在 YPS 固態培養基上生長菌落的統計，其分別為 WT: 83.8% ±3.4%，C194F: 76.2% ±12.9%，R80H: 75% ±10.3%，L184S: 76% ±8.7%， W251C: 79%±4.5%， A418V: 80%±10.1%。(n=5)

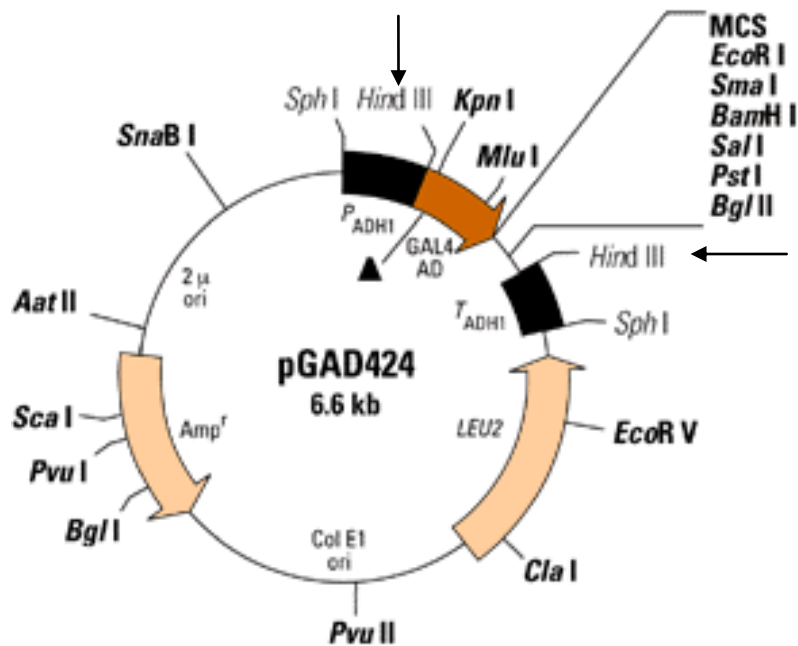


(圖七)將 Homozygous 和 Heterozygous 的量化圖做比較。藍色的是 Heterozygous，紫色的是 Homozygous (n=5)。

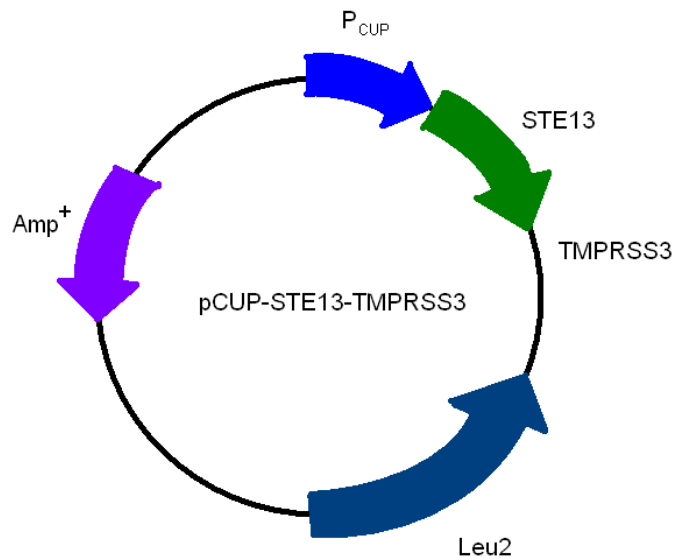
參考資料

- 【1】 Morton, N.E. (1991) Genetic epidemiology of hearing impairment. *Ann. NY Acad. Sci.*, 630, 16 - 31
- 【2】 Cohen, M.J. and Gorlin, R.J. (1995) *Epidemiology, Aetiology and Genetics Patterns*. Oxford University Press, Oxford, UK.
- 【3】 Ben-Yosef, T., Wattenhofer M., Riazuddin S., Ahmed Z.M., Scott H.S., Kudoh J, Shibuya K., Antonarakis S E, Bonne-Tamir B, Radhakrishna U (2001) Novel mutations of TMPRSS3 in four DFNB8/B10 families segregating congenital autosomal recessive deafness. *J. Med. Genet.*, 38, 396 - 400
- 【4】 Hooper J D, Clements J A, Quigley J.P, Antalis T.M. (2001) Type II transmembrane serine proteases. Insights into an emerging class of cell surface proteolytic enzymes. *J. Biol. Chem.*, 276, 857 - 860
- 【5】 Guipponi M, Gr Vuagniaux G, Wattenhofer M, Shibuya K, Vazquez M, Dougherty L, Scamuffa N, Guida E, Okui M, Rossier C, Hancock M, Buchet K, Reymond A, Hummler E, Marzella P L, Kudoh J, Shimizu N, Scott H S, Antonarakis S E, Rossier B C. The transmembrane serine protease (TMPRSS3) mutated in deafness DFNB8/10 activates the epithelial sodium channel (ENaC) in vitro. *Human Molecular Genetics*, 2002, Vol. 11, No. 23 2829 - 2836
- 【6】 Lee YJ, Park D, Kim SY, Park WJ (2000) Pathogenic mutations but not polymorphisms in congenital and childhood onset autosomal recessive deafness disrupt the proteolytic activity of TMPRSS3. *J Med Genet.* 40:629-31.
- 【7】 Vuagniaux G, Vallet V, Jaeger NF, Pfister C, Bens M, Farman N, Courtois-Coutry N, Vandewalle A, Rossier BC and Hummler E (2000) Activation of the amiloride-sensitive epithelial sodium channel by the serine protease mCAP1 expressed in a mouse cortical collecting duct cell line. *J. Am. Soc. Nephrol.* 11, 828 - 834.
- 【8】 Kim SY, Park D, Oh M, Sellamuthu S, Park WJ (2002) Detection of site-specific proteolysis in secretory pathways. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 296 (2002) 419–424.
- 【9】 Gietz D, Jean AS, Wood RA, Schiestl RH (1992) Improved method for high efficiency transformation of intact yeast cells. *Nucleic Acids Res.* 20:1425

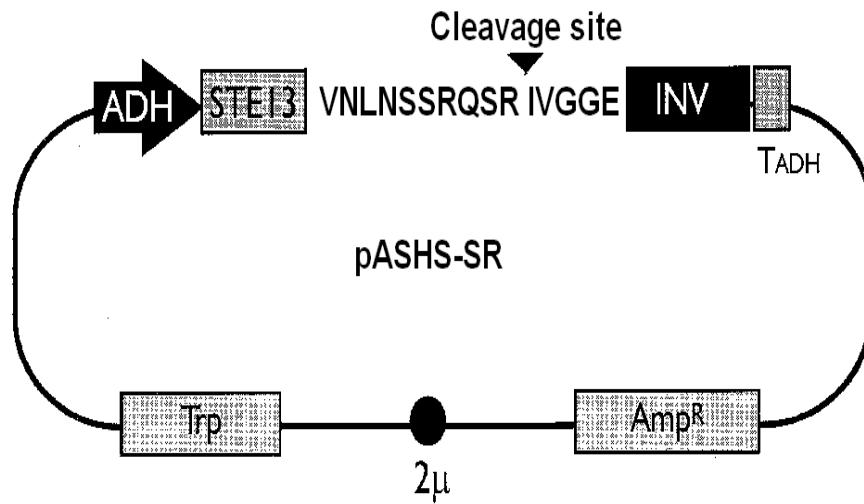
附表



(附圖一) pGAD424 質體上的 ADH promoter 由 CUP promoter 所置換，並利用 *Hind*III(黑色箭頭處)將 Gal4 activation domain 及 multicloning site 換掉改由 *Eco*RI、*Xho*I、*Not*I、*Pst*I 等所取代。



(附圖二) 利用 *Eco*RI、*Xho*I 兩個酵素，將 STE13 蛋白連接 *TMPRSS3* 的 LDLRA、SRCR 及 Serine protease 等 domain，成為 pCUP-STE13-TMPRSS3 質體，此質體上具有 *leu2* 的 marker。



(附圖三) pASHS-SR 質體是利用 pASHS 質體作為骨架，利用在 cloning site 的 *EcoRI* 及 *NotI* 兩酵素，將 substrate 的序列 VNLN SSRQSR↓IVGGE 插入 pASHS 質體中，即成為 pASHS-SR 質體，此質體具有 *trp1* 的 marker。