

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

* *****
* 計畫名稱：建立斑馬魚為模式動物探討人類 TMPRSS3 基因造成聽障的成因 *
* *****

執行計畫學生：王怡文
學生計畫編號：NSC 100-2815-C-040-038-B
研究期間：100年07月01日至101年02月28日止，計8個月
指導教授：楊建洲

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 101年03月30日

目錄

目錄.....	p.2
摘要.....	p.3
前言.....	p.3
研究方法及步驟.....	p.5
結果.....	p.7
結論.....	p.9
圖和表.....	p.9
參考文獻.....	p.14

摘要

斑馬魚是目前常用於研究脊椎動物發育的動物模式，先前已有文獻指出斑馬魚重要的調控蛋白質其表現位置和時間也都和哺乳類動物類似，所以可利用突變的方法改變特定基因的表現及產生基因轉殖魚來研究基因與發育和疾病之間的相關機制。先前我們實驗室對於非症候群聽障的研究，已在聽障病人的身上發現 *TMPRSS3* 基因的突變與聽障的發生有關聯。先前也利用酵母菌為模式去研究和確認 *TMPRSS3* 基因突變所造成的影響。

在本研究中，我們探討了和人類 *TMPRSS3* 相似的斑馬魚基因之功能。我們以生物資訊的方法找到了可能和人類 *TMPRSS3* 相似的斑馬魚基因 *zftmprss4a* 及 *zftmprss4b*。進一步觀察這兩個基因在胚胎發育時期的表現，可以發現 *zftmprss4a* 基因在 1.5 hpf 到 120hpf 有持續性的大量表現。而 *zftmprss4b* 則是在 1.5 hpf 與 9 hpf 之時期有明顯的表現，12 hpf 之後到 120 hpf 則是表現量大量減弱。在全胚胎原位雜交(Whole-mount in situ hybridization)的結果可以發現 *zftmprss4a* 表現在 72 hpf 胚胎的側線、咽喉及內耳。綜合以上所述，我們的研究成果將可提供一個好的基礎來進行後續的實驗。

前言

斑馬魚的聽覺主要是藉由內耳(inner)和側線(lateral line)來偵測外來顫動(水下聲波)的刺激而產生(Moorman, 2001)。在斑馬魚的內耳構造，經顯微分析後發現在內耳聽斑區(macula)和側線(lateral line)的毛細胞構造類似於人類耳蝸內感覺受器的毛細胞構造是相類似的(Popper and Platt, 2003)，同樣的在斑馬魚內耳中上皮細胞內襯(epithelial lining)也和人類耳蝸內上皮細胞內襯一樣有各種細胞所

組成的，目前為止至少有 granular 和 ionocytes 細胞牽涉其中 (Mayer-Gostan et al., 1997; Pisam et al., 1998)。關於以斑馬魚為模式動物來研究聽覺的形成機制，在國外早有研究學者利用大量篩檢內耳發育缺陷的斑馬魚突變種來了解基因突變造成內耳缺陷的關係，在這研究中找到了58種內耳缺陷的突變斑馬魚(Whitfield et al., 1996)。

1996年在巴基斯坦家族 (DFNB8) 及巴勒斯坦家族 (DFNB10) 找到第一個染色體隱性遺傳基因座，且被定位於第21號染色體的長臂上的21q22.3。TMPRSS3 (transmembrane serine pretease) 是屬於第二型穿膜絲氨酸蛋白酶 (type II transmembrane serine pretease, TTSPs) 的超級家族之一，TMPRSS3轉譯出的蛋白包含了兩個區塊：LDLRA (low-density lipoprotein receptor class A) 和 SRCR (scavenger receptor cysteine rich)，此家族包括TMPRSS1、TMPRSS2、TMPRSS3、TMPRSS4、TMPRSS5共有五個 (Hooper et al., 2001; Ahmed et al., 2004)，TMPRSS3基因位於色體21q22.3的位置。最近有研究指出染色體隱性非症候群聽障和TMPRSS3的突變有關。有十四個突變會致病，這十四種突變除了會發生在催化的區域外也發生在LDLRA和SRCR區域 (Guipponi M et al., 2008)。

綜合以上所述，實驗室希望藉由動物模式——斑馬魚——來探討先前已在非聽障症候群病人當中尋找到的基因TMPRSS3，此基因的突變與聽障有關。所以在斑馬於內尋找人類基因TMPRSS3的同源基因是非常重要的。本實驗利用生物資訊學的方式找尋可能在斑馬於內與人類TMPRSS3的同源基因，接下來則利用WISH與RT-PCR去觀察人類TMPRSS3的同源基因在斑馬魚上的表現位置及進一步的利用顯微注射做loss of function和gain of function，若順利建立斑馬魚動物模式對於未來探討非症候群聽障基因功能的研究，將會很有幫助。

研究方法及步驟

1. 生物資訊學

a. NCBI-Blast (Protein Blast)

(<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)

尋找與人類 *TMPRSS3* 基因位在斑馬魚內相似度高的同源基因。

選擇條件：coverage 高於 80%、期望值越小越好、identity 大於 30%。

b. Ensembl (Search for a DNA or protein sequence)

(<http://www.ensembl.org/Multi/blastview>)

利用此網站去確認蛋白序列所位在的染色體及 loci。

c. NCBI-Blast (tblastn-ESTs)

(<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)

確認此蛋白序列在斑馬魚上是否有表現

d. ClustalX2.1 program

進行多重序列比對

e. Phylip program

Drawtree-Tree Editor

2. 斑馬魚 (*Danio rerio*) 之飼養

野生型斑馬魚 (AB strain)，飼養於 28°C 恆溫系統中，日夜週期為光週期 14 小時與暗週期 10 小時，並以適量人工飼料與豐年蝦餵食。

3. 不同胚胎時期及成魚組織 total RNA 萃取

將不同胚胎發育時期之胚胎 (20~50 個胚胎)、成魚組織之各個器官，加入 TRI REAGENT (Molecular Research Center, Inc.)，

將樣品均質化後，可以先暫存-80°C保存。然後參照TRI REAGENT說明書萃取total RNA。加入原本體積1/10倍的BCP，劇烈震盪15秒，靜置室溫反應2~15分鐘，4°C離心12000g15分鐘，離心後可明顯分出水層（透明澄清）與有機層（粉紅），吸取水層至新的離心管，加入原本體積的1/2倍的isopropanol，混合均勻後靜置室溫反應5~10分鐘，4°C離心12000g8分鐘，使RNA沉澱，移除上清液，加入原本體積的75%酒精清洗，4°C離心7500g5分鐘，移除上清液，靜置室溫乾燥，用DEPC水回溶17 μ l。萃取出來的RNA，加入2 μ l10X RQI RNase-Free DNase buffer，再加入1 μ l的RQI RNase-Free DNase（Promega），於37°C反應30分鐘後加入480 μ l的DEPC水，接著加入500 μ l的Phenol/Chloroform（1：1、PH4.3），混合均勻後，靜置室溫5分鐘，4°C離心13000rpm 5分鐘，取上層液到新的離心管，加入上層液1/10體積的3M NaOAc，混合均勻後加入上層液2倍體積的100%酒精（-20°C），混合後靜置於-80°C1小時以上（或過夜）。再以4°C離心最高轉速20分鐘，移除上清液後再加入等體積70%酒精清洗，以4°C離心最高轉速5分鐘，將酒精移除，在室溫中使酒精殘留發揮掉，最後用DEPC水回溶20 μ l。回溶完全後以分光光度儀（Spectrophotometer）測定波長260nm之吸光值及260nm/280nm吸光比值進行定量分析，並取1 μ l跑agarose gel看所萃取的RNA品質。RNA可再加入1/10體積的3M NaOAc，混合均勻後加入2倍的絕對酒精（-20°C）並混合均勻靜置於-80°C保存。

4. RT-PCR

RT（Reverse Transcription）部分參考Invitrogen SuperScript™ III Reverse Transcriptase（Invitrogen）說明書。首先將定量過的total RNA取5 μ g，加入1 μ l Oligo（dT）15（500ng/ μ l）、1 μ l dNTP Mix（10mM），補DEPC水至總體積13 μ l於65°C反應5分鐘立即冰浴3分

鐘（冰浴至少1分鐘以上），隨即加入4 μ l 5X First-Strand Buffer、2 μ l 0.1M DTT及1 μ l SuperScriptTM III RT（200units/ μ l）的酵素（Invitrogen），然後50 $^{\circ}$ C反應60分鐘，70 $^{\circ}$ C反應15分鐘以結束反應。

5. 全胚胎原位雜交技術（Whole-mount *in situ* hybridization）

為了瞭解human Tmprss3的同源基因在斑馬魚胚胎空間及時間上的表現，使用全胚胎原位雜交技術（Whole-mount *in situ* hybridization，WISH）以偵測human Tmprss3之斑馬魚同源基因mRNA所表現的位置。部分參考Nature（Thisse and Thisse，2008），我們所使用的方法如下，依a~j的步驟： a.Dig-labeled RNA probe 製備;b.Rehydration；c.Proteinase K Digestion； d.Prehybridization； e.Hybridization； f.Post-hybridization wash； g.Blocking； h.Antibody incubation； i.Anti-Dig-AP抗體Wash； j.Coloring

結果

1、比對斑馬魚蛋白質序列資料庫

本研究目的是以斑馬魚為模式動物來研究聽障相關基因，因此要找出人類TMPRSS3在斑馬魚上的同源基因或相似基因，方法是以生物資訊學的方式，取人類TMPRSS3胺基酸序列，去比對斑馬魚的蛋白質資料庫，分析其比對出來的結果，來推測同源基因或相似基因。資料庫是選取NCBI與Ensembl的斑馬魚蛋白質序列資料庫，來互相驗證兩個資料庫比對出來的結果。人類TMPRSS3比對後得到的結果，共找到了16個可能的同源基因，再利用Ensembl去確定每個可能性的同源基因是位在斑馬魚的哪個染色體上，之後再利用 NCBI-Blast（tblastn-ESTs）去確定在斑馬魚上是否有表現，經過Ensembl和ESTs的確認後，最後所得到剩下的相似基因有位在斑馬魚染色體上且在斑馬魚發育過程有表現的剩下九個（Table1）。

2、建構演化樹

將比對到的9個斑馬魚基因與人類及小鼠的tmprss3基因族以蛋白質序列的方式進行多重序列比對 (fig.1) 並建構出演化樹，來觀察這些基因是否是和人類*TMPRSS3*在演化地位上接近，推測同源基因或相似基因的可能性。演化樹顯示出來的結果可以看到zftmprss4a及zftmprss4b確實和人類及小鼠tmprss3在演化上位置接近(fig.2)。由上述結果，我們建議人類*TMPRSS3*在斑馬魚上的同源基因或相似基因可能是zftmprss4a和zftmprss4b。

3、TA cloning

我們設計基因選殖的primer (Table2)，並使用斑馬魚腸胃道及卵巢的cDNA將我們要的基因片段 (fig.3a,3b) 放大，將放大後的基因片段利用TA cloning建構到pGEM-T載體上 (fig.4)，得到pGEM-T-zftmprss4a及pGEM-T-zftmprss4b兩個質體。為了確定基因大小是否正確，我們使用了EcoR1進行enzyme mapping (fig.5a,5b)，確定zftmprss4a大小為1316b.p及zftmprss4b大小為1308b.p。

4、*zftmprss4a* 及 *zftmprss4b* 在斑馬魚胚胎不同時期的基因表現

為了證明我們利用生物資訊學找到的*zftmprss4a*和*tmprss4b*基因是否為同源基因或相似基因，首先我們要觀察這些基因在斑馬魚胚胎發育時期的表現情形。首先抽取斑馬魚不同時期胚胎之RNA，以RT-PCR的方式來探討這些基因在胚胎不同發育時期的表現情況，再以全胚胎原位雜交(WISH)來觀察基因在胚胎表現的位置。由RT-PCR的實驗結果可看到*zftmprss4a*在胚胎時期1.5 hpf 到120 hpf都有著強烈表現(fig.6a)，並將得到的結果利用半定量方法以量化圖呈現(fig.7)。在 WISH的研究結果顯示*zftmprss4a*表現在72hpf 胚胎的側線、咽喉及內耳(fig.8)。*Zftmprss4b*在一開始1.5 hpf到9 hpf有明顯表現，但在12hpf後表現樣明顯下降(fig.6b)。

結論

利用生物資訊找到了可能與人類 *TMPRSS3* 相似的斑馬魚基因 *zftmprss4a* 及 *zftmprss4b*，進一步利用 Whole-mount *in situ* hybridization 的方法觀察到 *zftmprss4a* 在內耳有表現，由以上的研究結果有助於建立斑馬魚為模式動物去探討人類 *TMPRSS3* 的功能。

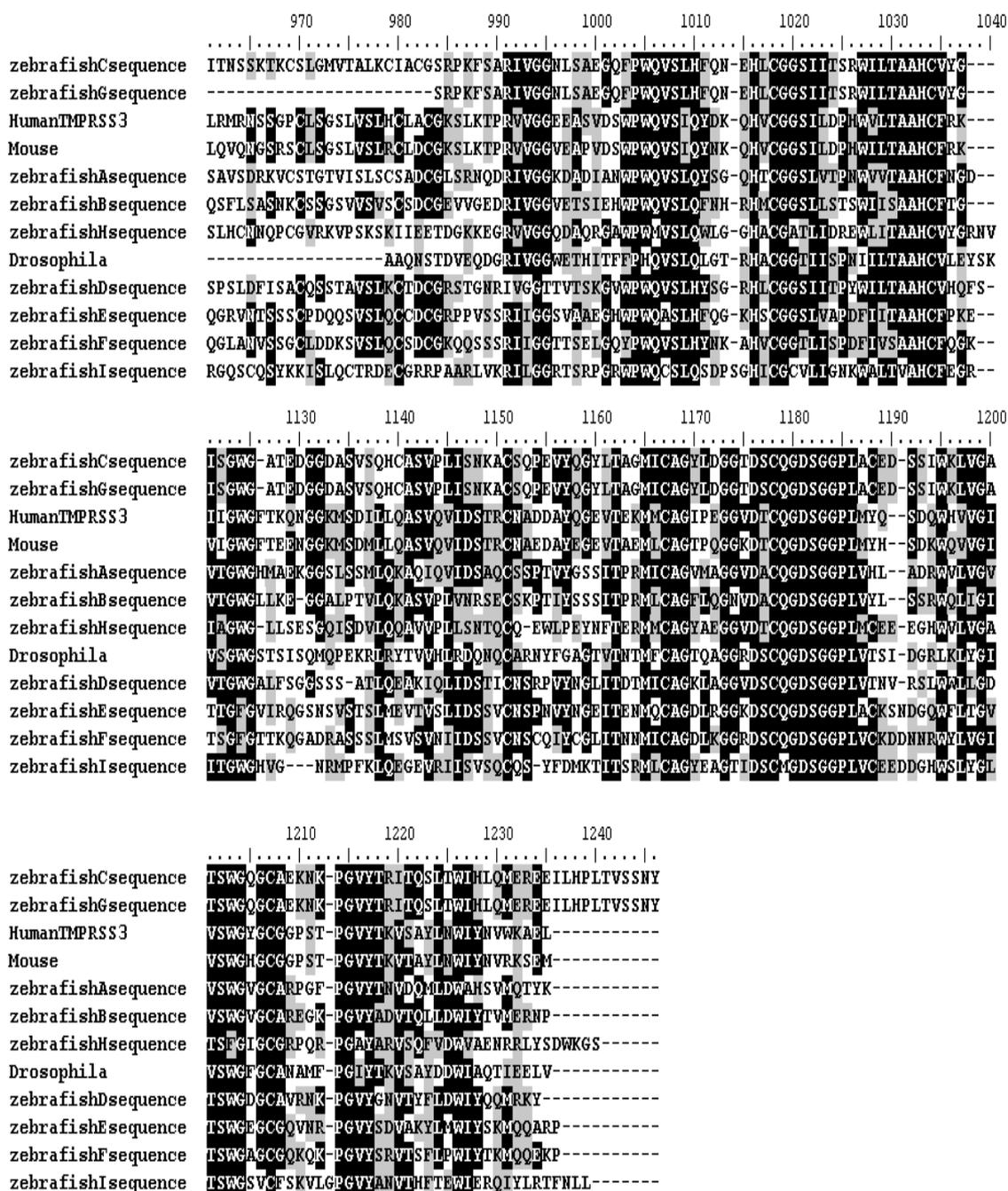


Fig.1 利用 ClustalX2.1 軟體進行多重序列比對

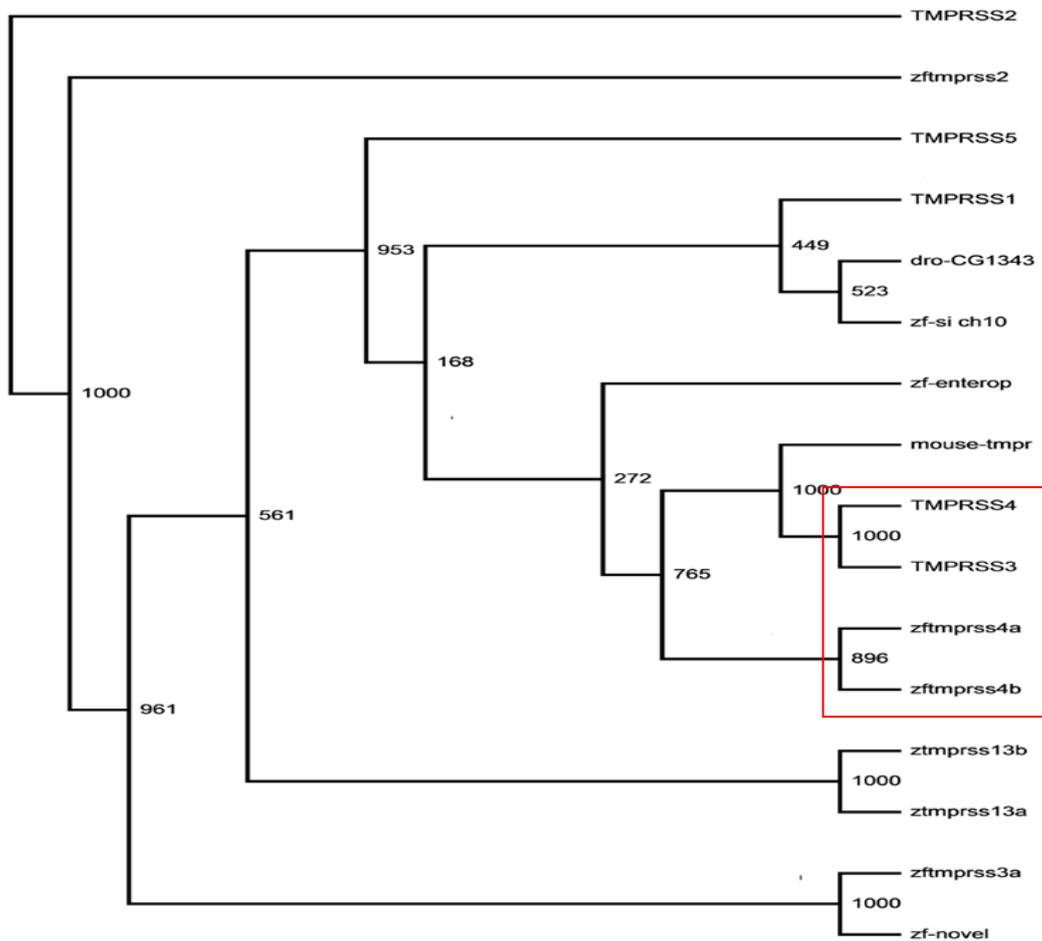


Fig.2 演化樹 (人類 *TMPRSS3* 基因與斑馬魚 *zftmprss4a* 及 *zftmprss4b* 比對分數為 765)

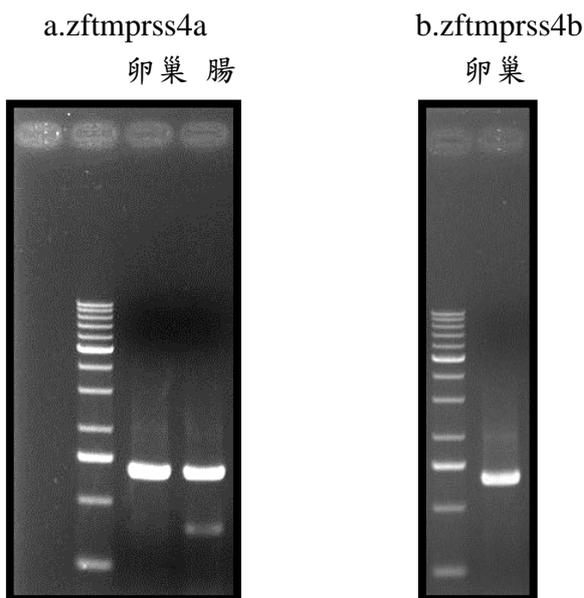


Fig.3a,b利用primer從卵巢及腸的cDNA中所夾出的基因片段，兩基因片段大小約1.3Kb

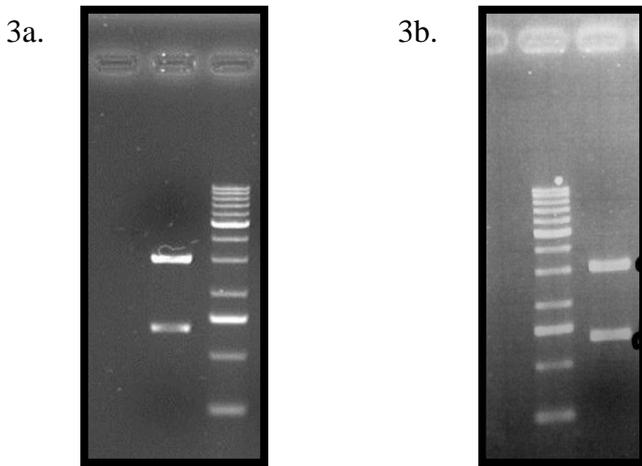
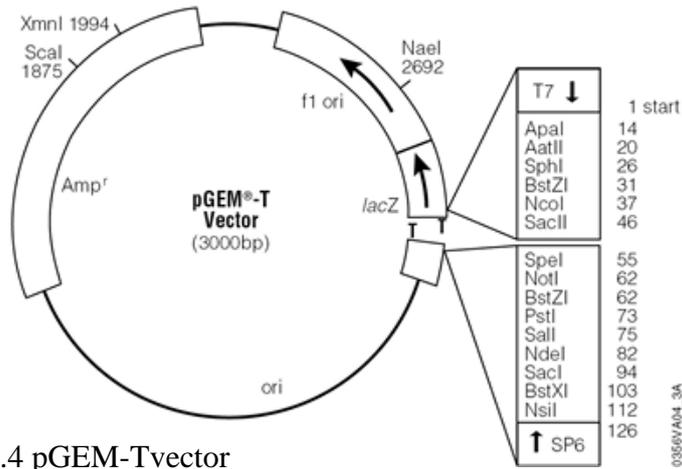


Fig.5a Enzyme mapping(pGEM-T 為 3kb,zf-tmprss4a 為 1316bp) ; 5b. Enzyme mapping (pGEM-T 為 3kb,zftmprss4b 為 1308bp)

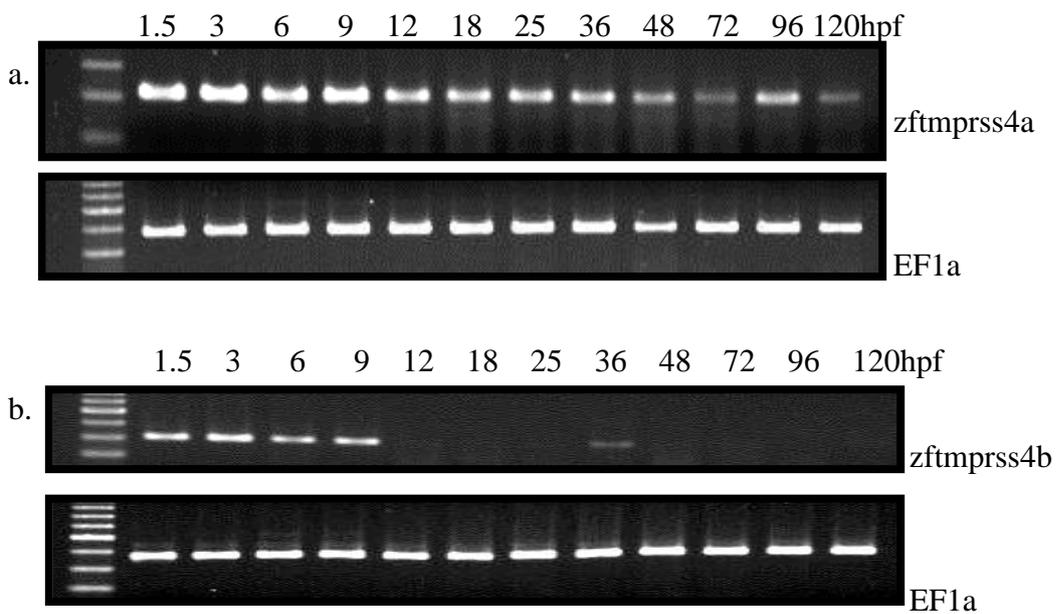


Fig.6 斑馬魚胚胎發育各個時期基因的表现---a. zftmprss4a b. zftmprss4b

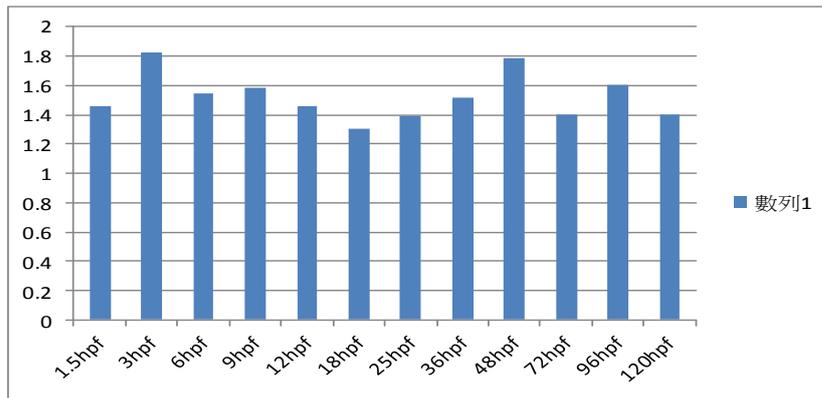


Fig.7 在斑馬魚胚胎發育各個時期中的 Zftmprss4a 表現量化圖

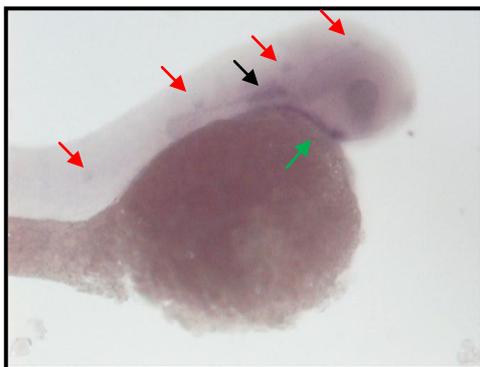


Fig.8 whole-mount *in situ* hybridization (red arrow : lateral line , green arrow : pharynx , black arrow : otic vesicle)

Table 1 利用生物資訊學找尋到與人類 *TMPRSS3* 相似的基因

Protein	Amino acid length	chromosome	Position	Tissue type	Dev_stage
Transmembrane protease, serine 4a [Danio rerio]	430aa	Ch : 15	13004044 ~ 13012563	Gut/internal organs	Adult fish of 3-4 months old
transmembrane protease, serine 4b [Danio rerio]	432aa	Ch : 5	39504534 ~ 39512219	1.Ovary 2.Whole body	1.Adult fish of 3-4 months old 2.Adult
PREDICTED: transmembrane protease, serine 3a	543aa	Ch : 9	20585700 ~ 20613388	1.Whole embryo or fish	1.Mixed stage 2.5days old

[Danio rerio]				2. Whole larvae	
transmembrane protease serine 2 [Danio rerio]	486aa	Ch : 10	39994216 ~ 40015864	1. Kidney 2. Olfactory epithelium 3. Gut	
PREDICTED: transmembrane protease, serine 13b [Danio rerio]	475aa	Ch : 5	39488519 ~ 39500715	1. Whole body 2. Brain (including tissue and cartilage around brain)	Adult fish of 3-4 months old
transmembrane protease, serine 13a [Danio rerio]	506aa	Ch : 15	13113511 ~ 13135602	1. Brain (including tissue and cartilage around brain) 2. Olfactory epithelium	Adult fish of 3-4 months old
novel protein similar to vertebrate serine transmembrane protease family [Danio rerio]	311aa	Ch : 9	20310405 ~ 20337424	Whole embryo or fish	Mixed stage
PREDICTED: enteropeptidase-1-like [Danio rerio]	977aa	Ch : 21	33959677 ~ 34006010	Brain	
PREDICTED: si:ch1073-76a20.1 [Danio rerio]	1218aa	Ch : 23	44108163 ~ 44151665	1. Whole embryo or fish 2. heart	Mixed stage

Table2 本研究所使用的 Primer

Zf-tmprss4a forward	5'-CAA AACTCATGACTGCCCCA-3'	1316b.p
Zf-tmprss4a reverse	5'-GTTCCCATCACAAACTCACTT-3'	
Zf-tmprss4a internal primer forward	5'-GACTTTCCAATCCGCTGTGT-3'	209b.p
Zf-tmprss4a internal primer reverse	5'-CCCAGTTTGGAGTCACCAGT-3'	
Zf-tmprss4b forward	5'-TGTGATGGCCATGACGCGAA-3'	1308b.p
Zf-tmprss4b reverse	5'-TCATCTCACGGATTTCTCTC-3'	
Zf-tmprss4b internal primer forward	5'-TAGGGTGGTGAACAGCAAGT-3'	305b.p
Zf-tmprss4b internal primer reverse	5'-TCACTGGGATTCGTGTGCTA-3'	

參考文獻

1. George Streisinger ,*THE ZEBRAFISH BOOK*
2. Yang JJ, Huang SH, Chou KH, Liao PJ, Su CC, Li SY(2007). Identification of mutations in members of the connexin gene family as a cause of nonsyndromic deafness in Taiwan. *Audiol Neurootol.*2007;12(3):198-208
3. Kimmel CB, Ballard WW, Kimmel SR, Ullmann B, Schilling TF(1995). Stages of embryonic development of the zebrafish. *Dev Dyn.* 1995 Jul;203(3):253-310
4. Moorman SJ (2001). Development of sensory systems in zebrafish (*Danio rerio*). *ILAR J.* 2001;42(4):292-8.
5. Whitfield TT, Granato M, van Eeden FJM, Schach U, Brand M, Furutani-Seiki M, Haffter P, Hammerschmidt M, Heisenberg CP, Jiang YJ, Kane DA, Kelsh RN, Mullins MC, Odenthal J and Nüsslein-Volhard C (1996) Mutations affecting development of the zebrafish inner ear and lateral line. *Development* 123, 241-254

6. Popper AN and Platt C (2003) *Inner ear and lateral line. Chapter 4 of The Physiology of fishes Boca Raton: CRC Press, c1993 Evans, David H., (David Hudson),1940 [ISBN0849380421]*
7. Mayer-Gostan N, Kossmann H, Watrin A, Payan P and Boeuf G (1997) *Distribution of ionocytes in the saccular epithelium of the inner ear of two teleosts (Oncorhynchus mykiss and Scophthalmus maximus). Cell Tissue Res 289, 53–61*
8. Pisam M, Payan P, LeMoal C, Edeyer A, Boeuf G and Mayer-Gostan N (1998) *Ultrastructural study of the saccular epithelium of the inner ear of two teleosts, Oncorhynchus mykiss and Psetta maxima Cell and Tissue Research 294, 261-270*
9. Whitfield TT, Granato M, van Eeden FJM, Schach U, Brand M, Furutani-Seiki M, Haffter P, Hammerschmidt M, Heisenberg CP, Jiang YJ, Kane DA, Kelsh RN, Mullins MC, Odenthal J and Nüsslein-Volhard C (1996) *Mutations affecting development of the zebrafish inner ear and lateral line. Development 123, 241-254*
10. Thisse C, Thisse B. (2008) . *High-resolution in situ hybridization to whole-mount zebrafish embryos. Nat Protoc.3,59-69.*
11. Guipponi M, Antonarakis SE, Scott HS. *Division of Medical Genetics, University Hospital of Geneva, Geneva, Switzerland. (2008) Tmprss3, a type II transmembrane serine protease mutated in non-syndromic autosomal recessive deafness. Front Biosci. Jan 1;13:1557-67.*