

行政院國家科學委員會專題研究計畫 成果報告

聽障基因 TMPRSS3 突變之功能分析(第 3 年) 研究成果報告(完整版)

計畫類別：個別型
計畫編號：NSC 98-2320-B-040-012-MY3
執行期間：100 年 08 月 01 日至 101 年 07 月 31 日
執行單位：中山醫學大學生物醫學科學學系(所)

計畫主持人：李宣佑

計畫參與人員：碩士班研究生-兼任助理人員：陳品樺
碩士班研究生-兼任助理人員：鄭宜婷
碩士班研究生-兼任助理人員：李東隆
大專生-兼任助理人員：王怡文
博士班研究生-兼任助理人員：黃瑞喜

公開資訊：本計畫涉及專利或其他智慧財產權，2 年後可公開查詢

中華民國 101 年 10 月 31 日

中文摘要：TMPRSS3 (transmembrane protease, serine 3) 已經發現牽涉在非症候群聽障中的一個新基因，當 TMPRSS3 基因發生突變後已知會影響到耳蝸內 Na⁺的再吸收因而造成聽障(DFNB8 和 DFNB10)。TMPRSS3 (transmembrane protease, serine 3)是屬於第二型穿膜絲氨酸蛋白(type II transmembrane serine protease, TTSPs)的超級家族之一。這是第一個被提出與非症候群有關的酵素基因。台灣地區對於 TMPRSS3 基因在非症候聽障患者中的相關研究相當闕乏，在之前我們實驗室針對台灣地區的非症候群聽障患者進行 TMPRSS3 基因的突變分析，結果在 230 位聽障患者中發現有 14 位聽障學童有突變的發生，所佔的比例為 6.09 % (14/230)，然而針對這些突變所造成的致病機轉我們並不清楚。而且 TMPRSS3 在耳蝸內活化 epithelial sodium channel (ENaC)促使 Na⁺再吸收的機制也很模糊，可能是直接作用或者間接作用。再者有些研究推測 in vivo 的狀態下 TMPRSS3 在耳蝸內的受質可能不只有 ENaC 一種。因此本計畫將進一步的探討 TMPRSS3 基因在聽力形成中的機制和其突變所造成的影響。本計畫的結果，在利用 sGASP (secretory genetic assay of site-specific proteolysis) 的研究，我們發現在我們先前所找到的 TMPRSS3 基因突變確實會造成 TMPRSS3 酵素功能活性的下降，而影響正常的功能。同時我們也建立了爪蟾卵母細胞 (*Xenopus oocyte*)表現系統，利用雙電極電壓鉗技術(Two-electrode voltage clamp)並測得正常 TMPRSS3 的蛋白具有水解的功能，也更加的證實所發現的 3 個突變點是會影響 TMPRSS3 蛋白的功能。另外，我們也發現 TMPRSS3 基因突變在細胞內的表現位置和正常 TMPRSS3 蛋白都一樣是在內質網(ER)上，因此 TMPRSS3 的突變並沒有造成影響其蛋白在細胞內的表現位置。綜合以上結果，我們的計畫已經證明在病人上所發現的 TMPRSS3 基因突變確實會造成蛋白功能上的喪失，進而影響到聽覺。

中文關鍵詞：基因、非症候群聽障、功能研究、鈉離子通道

英文摘要：Recently, some studies have shown that mutations in TMPRSS3 were responsible for non-syndromic deafness (DFNB8 and DFNB10). TMPRSS3 is a member of the Type II Transmembrane Serine Protease (TTSP). This was the first description of a serine protease involved in deafness. However, in Taiwan, the data of TMPRSS3 gene associated with non-syndromic deafness is still insufficient. Previously, we have found many mutations in the TMPRSS3 genes from screening of 230

children with non-syndromic deafness (14/230 ; 6.09%). However, functional alteration in these mutants of TMPRSS3 gene remains unknown. Moreover, the mechanism of ENaC activation by TMPRSS3 remains elusive. Additionally, some studies suggested have the presence of other substrates for TMPRSS3. Therefore, further research is worthy to conduct. Our results indicated that the missense mutation of TMPRSS3 in previously study, resulted in greatly diminished the proteolytic activity of TMPRSS3. In the *Xenopus* oocyte expression system, proteolytic processing of TMPRSS3 was associated with increased ENaC mediated currents (about 6000~7000 nA). However, ENaC mediated currents is decreased to about 1000 nA in the missense mutation of TMPRSS3. In addition, localization assay of TMPRSS3 missense mutant reveals their distributions in the ER of the HeLa cell, which is similar to the WT. In summary, we have understood the effect of TMPRSS3 mutants in the study. These results provide a novel molecular explanation for the role TMPRSS3 plays in the development of hearing loss.

英文關鍵詞： TMPRSS3、nonsyndromic deafness、functional study、epithelial sodium channel

行政院國家科學委員會補助專題研究計畫 成果報告
 期中進度報告

聽障基因 TMRSS3 突變之功能分析

計畫類別： 個別型計畫 整合型計畫

計畫編號：NSC 98-2320-B-040-012-MY3

執行期間： 98年 08月 01日至 101年 7月 31日

計畫主持人：李宣佑

計畫參與人員：黃瑞喜、楊燦鴻、陳品樺、李東隆、王怡文

成果報告類型(依經費核定清單規定繳交)： 精簡報告 完整報告

處理方式：除產學合作研究計畫、提升產業技術及人才培育研究計畫、列管計畫及下列情形者外，得立即公開查詢

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

中 華 民 國 101 年 10 月 31 日

中文摘要 關鍵詞：基因、非症候群聽障、功能研究、鈉離子通道

TMPRSS3 (transmembrane protease, serine 3) 已經發現牽涉在非症候群聽障中的一個新基因，當 *TMPRSS3* 基因發生突變後已知會影響到耳蝸內 Na^+ 的再吸收因而造成聽障(DFNB8 和 DFNB10)。*TMPRSS3* (transmembrane protease, serine 3) 是屬於第二型穿膜絲氨酸蛋白(type II transmembrane serine protease, TTSPs) 的超級家族之一。這是第一個被提出與非症候群有關的酵素基因。台灣地區對於 *TMPRSS3* 基因在非症候聽障患者中的相關研究相當闕乏，在之前我們實驗室針對台灣地區的非症候群聽障患者進行 *TMPRSS3* 基因的突變分析，結果在 230 位聽障患者中發現有 14 位聽障學童有突變的發生，所佔的比例為 6.09 % (14/230)，然而針對這些突變所造成的致病機轉我們並不清楚。而且 *TMPRSS3* 在耳蝸內活化 epithelial sodium channel (ENaC) 促使 Na^+ 再吸收的機制也很模糊，可能是直接作用或者間接作用。再者有些研究推測 *in vivo* 的狀態下 *TMPRSS3* 在耳蝸內的受質可能不只有 ENaC 一種。因此本計畫將進一步的探討 *TMPRSS3* 基因在聽力形成中的機制和其突變所造成的影響。本計畫的結果，在利用 sGASP (secretory genetic assay of site-specific proteolysis) 的研究，我們發現在我們先前所找到的 *TMPRSS3* 基因突變確實會造成 *TMPRSS3* 酵素功能活性的下降，而影響正常的功能。同時我們也建立了爪蟾卵母細胞(*Xenopus oocyte*) 表現系統，利用雙電極電壓鉗技術(Two-electrode voltage clamp) 並測得正常 *TMPRSS3* 的蛋白具有水解的功能，也更加的證實所發現的 3 個突變點是會影響 *TMPRSS3* 蛋白的功能。另外，我們也發現 *TMPRSS3* 基因突變在細胞內的表現位置和正常 *TMPRSS3* 蛋白都一樣是在內質網(ER) 上，因此 *TMPRSS3* 的突變並沒有造成影響其蛋白在細胞內的表現位置。綜合以上結果，我們的計畫已經證明在病人上所發現的 *TMPRSS3* 基因突變確實會造成蛋白功能上的喪失，進而影響到聽覺。

Abstract

Keywords: *TMPRSS3*、nonsyndromic deafness、functional study、epithelial sodium channel

Recently, some studies have shown that mutations in *TMPRSS3* were responsible for non-syndromic deafness (DFNB8 and DFNB10). *TMPRSS3* is a member of the Type II Transmembrane Serine Protease (TTSP). This was the first description of a serine protease involved in deafness. However, in Taiwan, the data of *TMPRSS3* gene associated with non-syndromic deafness is still insufficient. Previously, we have found many mutations in the *TMPRSS3* genes from screening of 230 children with non-syndromic deafness (14/230; 6.09%). However, functional alteration in these mutants of *TMPRSS3* gene remains unknown. Moreover, the mechanism of ENaC activation by *TMPRSS3* remains elusive. Additionally, some studies suggested have the presence of other substrates for *TMPRSS3*. Therefore, further research is worthy to conduct. Our results indicated that the missense mutation of *TMPRSS3* in previously study, resulted in greatly diminished the proteolytic activity of *TMPRSS3*. In the *Xenopus* oocyte expression system, proteolytic processing of *TMPRSS3* was associated with increased ENaC mediated currents (about 6000~7000 nA). However, ENaC mediated currents is decreased to about 1000 nA in the missense mutation of *TMPRSS3*. In addition, localization assay of *TMPRSS3* missense mutant reveals their distributions in the ER of the HeLa cell, which is similar to the WT. In summary, we have understood the effect of *TMPRSS3* mutants in the study. These results provide a novel molecular explanation for the role *TMPRSS3* plays in the development of hearing loss.

前言

*TMPRSS3*基因是第一個被提出與非症候群有關的酵素基因，同時也是少數提到和維持Na⁺

在耳蝸內淋巴液中的平衡有關的基因。然而在台灣地區對於*TMPRSS3*基因在非症候聽障患者中的相關研究相當闕乏，在先前的研究我們實驗室針對台灣地區的非症候群聽障患者進行*TMPRSS3*基因的突變分析，結果在230位聽障患者中發現有14位聽障學童有突變的發生，所佔的比例為6.09% (14/230)，然而針對這些突變所造成的致病機轉我們並不清楚。另外，有研究指出*TMPRSS3*在耳蝸內可活化epithelial sodium channel (ENaC)促使Na⁺再吸收，然而其機制也很模糊，可能是直接作用或者間接作用。再者有些研究推測*in vivo*的狀態下*TMPRSS3*在耳蝸內的受質可能不只有ENaC一種。因此，*TMPRSS3*基因在聽力形成所扮演的角色實質的探討的。

研究動機和目的

本研究的動機和目的是進一步的瞭解 *TMPRSS3* 在內耳的功能角色和我們所發現的 *TMPRSS3* 突變點造成聽障的致病機轉。在本研究中，我們將針對下列四點加以分析：(1) 探討 *TMPRSS3* 基因突變後造成非症候群聽障的功能影響；(2) 瞭解 *TMPRSS3* 與 ENaC 在 Na⁺ 的再吸收作用機制中彼此的相互關係；(3) *TMPRSS3* 基因在耳蝸內除了 ENaC 外是否還有其他受質；(4) *TMPRSS3* 與 *TMPRSS1* 或 *TMPRSS5* 之間在聽力的產生上是否會相互影響。

文獻探討

耳蝸(Cochlea)內充滿液體，由基底膜(Basilar membrane)和覆膜 (Reissner's membrane) 畫分成三個充滿液體的腔室，當聲波傳入耳蝸，會產生像水波的振動，因基底膜向覆膜的垂直移動，活化位於基底膜上的柯蒂氏器內的內毛細胞，產生電化學物質傳送到聽神經，使聽神經傳遞訊息至大腦而產生聽覺。此過程是將聲波轉換成電神經衝動(electrical nerve impulses)，其中涉及許多離子的進出(Coulogigner et al., 2006)。耳蝸(Cochlea)是一個很複雜的器官，由數十種細胞及特化的區域組成，有許多與聽覺相關的基因，部份顯示其影響了耳蝸管內的離子恆定(ion homeostasis)，如果發生突變，鉀離子和鈉離子濃度不正常，造成聽障。在老鼠，內淋巴有高鉀離子及低鈉離子濃度，並保留在高正靜止電位約+100mV，這個高靜止電位是正常毛細胞功能所必須，當電位還原成零時，耳聾即發生(Steel et al., 1987)。Gap junction和 tight junction在聽力功能上的重要角色已被許多研究確認，其在鉀離子循環、耳蝸內離子平衡及聽力產生的過程中扮演重要的角色。

TMPRSS3 (transmembrane protease, serine 3) 已經發現牽涉在非症候群聽障中的一個基因，當 *TMPRSS3* 基因發生突變後已知會影響到耳蝸內 Na⁺的再吸收因而造成聽障(DFNB8 和 DFNB10)(Ben-Yosef et al., 2001; Masmoudi et al., 2001; Scott et al., 2001; Wattenhofer et al.,

2002, 2005; Ahmed et al., 2004; Hutchin et al., 2005)。TMPRSS3 屬於第二型穿膜絲氨酸蛋白酶 (type II transmembrane serine protease, TTSPs) 的超級家族之一。TMPRSS3 基因可表現在人體的子宮、結腸、胚胎組織、腎臟、睪丸、胃、膀胱、氣管、子宮頸和耳蝸。在 RT-PCR 的分析中 TMPRSS3 在耳蝸中可表現在 stria vascularis、spiral ganglion neurons、modiolus 和柯蒂氏器(Guipponi et al, 2007)。TMPRSS3 基因位於染色體 21q22.3 的位置，此基因含有 13 個 exons 和轉譯出 453 個胺基酸，其蛋白結構類似此家族的其他成員含有一個短的 N 端、有一個穿膜(transmembrane; TM) domain 和一大片段的 C 端位在細胞膜內。在 TMPRSS3 蛋白的 C 端含有特殊的 domains 和活化位置來執行特殊的功能，如 LDLRA (low-density lipoprotein receptor A) domain、SRCR(scavenger receptor cysteine-rich) domain、蛋白水解的切點位在 R216 and I217 之間和 serine protease domain，另外在 serine protease domain 上 H257、D304 和 S401(HDS)是三個重要活化的位置，這三個位置(HDS) 形成 catalytic triad 的特徵(Hooper et al., 2001)。根據上述 TMPRSS3 的蛋白結構，可以推測 TMPRSS3 是屬於一種可以在細胞膜上被活化的 transmembrane serine protease。這是第一個被提出與非症候群有關的酵素基因，同時也是少數提到和維持 Na^+ 在耳蝸內淋巴液中的平衡有關的基因。

目前針對 TMPRSS3 功能的研究主要有兩種異源性的表達系統(Heterologous Expression) ----sGASP(secretory Genetic Assay for Site specific Proteolysis)系統和爪蟾卵母細胞(*Xenopus oocyte*)表現系統。sGASP 系統是利用 pGAS424 質體當質體骨架，以酵母菌(KSY01)為表現宿主來進行 TMPRSS3 蛋白水解活性分析。此系統主要的原理是當 substrate 被具有特異性的 protease 切斷時，invertase 會被釋放到細胞質中，再分泌至細胞外將蔗糖分解成葡萄糖及果糖。因此 TMPRSS3 的功能可藉由轉殖後的酵母菌(KSY01)是否可在含有蔗糖的選擇性固態培養基上生長來判斷。另外有些學者利用爪蟾卵母細胞(*Xenopus oocyte*)表現系統測量 Na 電流 (I_{Na})來評估 TMPRSS3 蛋白質水解功能，結果發現正常的 TMPRSS3 具有蛋白質水解功能，並可活化 epithelial sodium channel (ENaC)，使 Na 電流(I_{Na})增加。依據先前的研究我們認為 sGASP 是一個較簡單和快速的檢測 TMPRSS3 蛋白水解活性的診斷系統。而 *Xenopus oocyte* 表現系統除了瞭解 TMPRSS3 蛋白水解的活性外，還可以瞭解 TMPRSS3 活化 ENaC 的情形，但是所需的設備較複雜。因此本研究將同時利用並建立這兩套系統來探討我們在聽障患者中所發現的 TMPRSS3 的突變點，以兼顧快速和深入瞭解這些突變點的致病機轉。

TMPRSS3 和 ENaC 的 subunits 可共同表現(co-localize)在內耳的 spiral ganglion、stria vascularis 和柯蒂氏器的支持細胞(Couloigner et al., 2001)。stria vascularis 和柯蒂氏器的支持細

胞是位於耳蝸內淋巴的邊界和 Na^+ 離子再吸收的位置。因此 TMPRSS3 和 ENaC 在內耳內淋巴液低鈉狀態的建立和維持可能扮演重要的角色(Iwasa et al., 1994; Marcus 和 Chiba 1999; Grunder et al., 2001; Couloigner et al., 2001)。另外有報告指出 ENaC 是在內質網進行 subunits 組裝和需要核心糖化作用(core glycosylation)，這些 subunits 組裝發生在通道生物合成(channel biosynthesis)的早期，而且是 ENaC 成熟(maturation)重要的決定因子(Hanwell et al., 2002)。由於 TMPRSS3 蛋白可停泊(anchored)在內質網的膜上，因此 TMPRSS3 被認為在 ENaC 的組裝過程(processing)中可能扮演一個重要角色(Guipponi et al., 2002)。由上述 TMPRSS3 和 ENaC 皆可表現在相同的組織和細胞內的位置，增加了 ENaC 是 TMPRSS3 受質(substrate)的可能性。相對的，有些研究者對此 TMPRSS3/ENaC 的理論提出質疑，因為在 pseudohypoaldosteronism type I (PHA-I)的病人中，當 ENaC α subunit 發生突變會造成 ENaC 活化的調解功能喪失，因而導致 Na^+ 的大量流失、代謝性酸中毒與脫水現象。然而到目前為止並沒有報導這些病人會造成聽障。所以作者們認為 ENaC 只是牽涉在耳蝸內維持低 Na^+ 濃度的數種 Na^+ 運輸者(transporters)之一(Oh and Warnock 2000; Guipponi et al., 2002; Peter et al., 2006)。根據上述的研究，我們推測 *in vivo* 的狀態下 TMPRSS3 在耳蝸內的受質可能不只有 ENaC 一種。先前的一些研究證據也顯示在內耳神經分佈的正常發育與 neurotrophin 的家族成員 brain-derived neurotrophic factor (BDNF)和 neurotrophin 3 (NT-3)及這些因子的 receptors (tyrosine kinase receptors---TrkB 和 TrkC)有關(Fritzsche et al., 1999)。neurotrophin 的生理作用是受到蛋白水解酶(protease)的調控，由 proneurotrophins 經由蛋白水解酶(protease)的作用釋放出有活性的 neurotrophin (Lee et al., 2001)。另外，還有一種蛋白水解酶 plasmin 和 TMPRSS3 是屬於同一類的蛋白水解酶(Type II transmembrane serine protease)，也被發現可以作用在 BDNF 的前驅物質使其變成 BDNF(Lee et al., 2001)。同時 BDNF、neurotrophin 3 (NT-3)和他們的 receptor (tyrosine kinase receptors---TrkB 和 TrkC)也和 TMPRSS3 一樣都有表現在柯蒂氏器和 spiral ganglion (Gestwa et al., 1999; Wiechers et al., 1999)。由上述的這些研究我們推測 neurotrophin 家族的成員(BDNF 和 neurotrophin 3 (NT-3))可能是 TMPRSS3 的受質之一，如果 neurotrophin 家族的成員是 TMPRSS3 的受質，那麼 TMPRSS3 的功能也可能牽涉在耳蝸神經的發育和生存(survival)。因為 TMPRSS3 是一種蛋白水解酶，因此確定除了 ENaC 可能為受質外，是否還有其他受質是很重要且值得探討的，這研究將可釐清整個 TMPRSS3 突變後造成聽障的成因。

最近的研究也針對 16 型已知的 *TMPRSS* 基因族依據是否有在內耳表現、基因連鎖分析是否位在聽障的基因座內及評估 *TMPRSS* 基因剔除後聽力的狀態來進行是否參與聽力功能分

析，其結果發現除了 *TMPRSS3* 基因外，其他數個 *TMPRSS* 基因可能也參與聽力的功能 (Guipponi et al., 2007)。另外在這研究中發現老鼠的 *Tmprss1*、*Tmprss3* 和 *Tmprss5* 三個基因幾乎表現在耳蝸中相同位置，包括 spiral ganglion neurons、柯蒂氏器、stria vascularis 和 modiolus。同時也發現 *TMPRSS1* 和 *TMPRSS3* 主要結合在內質網上，而 *TMPRSS5* 是結合在細胞膜上，對於這表現位置的不同作者們提出可能在聽力上扮演不同的角色 (Guipponi et al., 2007)。然而對於這些 *TMPRSS* 基因的功能目前是不清楚，因此 *TMPRSS3* 與 *TMPRSS1* 或 *TMPRSS5* 之間的關係也值得去探討。

研究方法

1. *TMPRSS3* 功能研究---利用 sGASP (secretory genetic assay of site-specific proteolysis) 來探討 *TMPRSS3* 正常和突變蛋白的功能
 - 1). 建構不含 TM domain 的正常 *TMPRSS3* 質體
 - 2). 建構不含 TM domain 突變型 *TMPRSS3* 質體
 - 3). 實驗所需培養基(液): YPD 和 YPS。YPS 固態培養基具有篩選的功能，它與 YPD 差異在醣類的提供，YPS 是以蔗糖取代葡萄糖，所以若無法自行合成葡萄糖的酵母菌是無法在其固態培養基上生長。
 - 4). 酵母菌的共同轉殖實驗 (Yeast cotransformation transformation)
 - 5). 覆印 (replica)
2. *TMPRSS3* 功能研究---利用 *Xenopus* oocyte 來探討 *TMPRSS3* 正常和突變蛋白的功能
 - 1). 建構全長 *TMPRSS3* cDNA 載體
 - 2). 將全長的 *TMPRSS3* subclone 到 pLTN 載體
 - 3). 建構全長 *TMPRSS3* 突變型質體
 - 4). 建構全長 ENaC 之 α 、 β 和 γ subunits 至 pTLN 載體上
 - 5). 製造 ENaC 之 α 、 β 和 γ subunits，*TMPRSS3* wild type 與 mutants cRNA
 - 6). 爪蟾卵母細胞的製備及微量注射將 cRNA 送入 *Xenopus* oocyte 利用雙電極電壓鉗技術 (Two-electrode voltage clamp) 測量 Na 電流 (I_{Na})。
3. *TMPRSS3* 功能研究---利用 human lung carcinoma cell (H441) 來探討 *TMPRSS3* 基因和 ENaC 三個 subunit 之間的關係
 - 1) human lung carcinoma cell (H441) 細胞的培養
 - 2) 西方式免疫墨點法 (Western blot) 和共同免疫沈澱法 (co-immunoprecipitation)

- 3) *TMPRSS3* 基因的 knowdown 和基因轉殖
- 4) Whole cell electrophysiology
4. *TMPRSS3* 功能研究---利用 Cos-7 和 HeLa 細胞來探討 *TMPRSS3* 正常和突變蛋白在細胞內的表現位置
 - 1). 建構全長正常或突變的 *TMPRSS3* 在 EGFP 或 YGFP 蛋白表現質體
 - 2). 基因轉殖(transfection)到 Cos-7 和 HeLa 細胞
 - 3). 細胞免疫螢光染色技術
5. 雷射細胞擷取技術 (Laser Capture Microdissection ; LCM) 和共同免疫沈澱法 (co-immunoprecipitation)
6. 探討 *TMPRSS3* 與 *TMPRSS1* 或 *TMPRSS5* 之間的相互關係
 - 1). 建構全長 *TMPRSS1* cDNA 載體
 - 2). 建構全長 *TMPRSS5* cDNA 載體
 - 3). 利用爪蟾卵母細胞表現系統來探討 *TMPRSS1*、 *TMPRSS3* 和 *TMPRSS55* 之間關係
 - 4) 觀察 *TMPRSS1* 和 *TMPRSS5* 基因在 Cos-7 和 HeLa 細胞內的表現位置

結果與討論

在所有表現質體的建構，第一年的研究我們已經完成要在sGASP系統和爪蟾卵母細胞 (*Xenopus oocyte*)表現系統中所需要的所有表現質體的建構，另外在細胞中表現帶螢光融合蛋白的表現質體也建構完成。在本年度我們完成所有Tet-on蛋白表現質體的建構，此質體是可以同時表現兩個基因的質體(Table 1)。

在sGASP分析系統分析*TMPRSS3*基因突變所造成功能影響的研究中，在這一年我們已經完成所有突變點的分析，結果我們也以壁報發表的方式在2011年生醫年會上發表(Figure 1~5)。

爪蟾卵母細胞(*Xenopus oocyte*)表現系統的研究方面，先前我們已經完成所有表現質體的建構。我們利用in vitro的技術合成*TMPRSS3*(正常或突變)和3個ENaC α 、 β 和 γ subunit的cRNA，利用顯微注射的方法將四種cRNA注入爪蟾卵母細胞(*Xenopus oocyte*)中，48小時後，分別處理胰蛋白酶或不處理胰蛋白酶，將處理或沒處理的爪蟾卵母細胞利用利用雙電極電壓鉗技術偵測其Na離子電流，結果我們發現沒送入cRNA的爪蟾卵母細胞(*Xenopus oocyte*)並無法測得電流，而有送入4種cRNA(含正常*TMPRSS3*)的爪蟾卵母細胞(*Xenopus oocyte*)測得的電流大小約為5000~6000 nA (Figure 6)。在確定*TMPRSS3*和ENaC能在爪蟾卵母細胞有正常功能後，之後進一步將探討所發現的突變點會不會影響*TMPRSS3*的功能，我們將正常或突變的

TNPRSS3基因連同ENaC的cRNA一同打入爪蟾卵母細胞，48小時後，利用雙電極電壓鉗技術測試在沒有胰蛋白酶的作用下的情況，我們發現，正常的TMPRSS3在沒有胰蛋白酶(Trypsin)的幫助下，也能夠使ENaC離子管道打開，造成Na⁺電流 (I_{Na})的產生，反觀突變的TMPRSS3則無法影響ENaC離子管道產生Na⁺電流。為了進一步證明，將爪蟾卵母細胞處理胰蛋白酶(Trypsin)，胰蛋白酶能夠開啟ENaC離子管道使Na⁺離子通透產生Na⁺電流。顯微注射入正常的TMPRSS3爪蟾卵母細胞在處理或沒有處理胰蛋白酶，其所產生的Na⁺電流都沒什麼變化，反觀是注射入突變的TMPRSS3的爪蟾卵母細胞在沒有胰蛋白酶處理下是沒有Na⁺電流的產生，只有在處理胰蛋白酶後，Na⁺電流才會產生(Figure 7-8)。由這樣的試驗結果得知，我們所發現的突變確實是能夠影響TMPRSS3的正常功能。在證實突變點會影響TMPRSS3之後，接著將模擬病人heterozygous的情況，就是將正常和突變TMPRSS3連同ENaC的cRNA一起注射到爪蟾卵母細胞一同表現。比較homozygous和heterozygous的實驗結果發現，在沒有處理胰蛋白酶的爪蟾卵母細胞(heterozygous) Na⁺電流會比homozygous來的高，並不會完全和homozygous來的一樣，有可能是TMPRSS3的突變是dominant negative effect，突變的蛋白影響了正常蛋白的功能，造成正常TMPRSS3蛋白無法正常的行使功能，所以導致Na⁺電流的下降(Figure 9-10)。

在細胞模式方面，我們也建構好含螢光蛋白的表現質體可以用來觀察其在細胞內的表現位置。結果我們發現正常TMPRSS3-GFP融合蛋白的表現位置在內質網而不是在高基氏體，此結果與先前的研究是一致的(Figure 11)。在我們進一步的將突變的TMPRSS3-GFP融合蛋白表現質體送入細胞中，結果發現所有的突變點的融合蛋白的表現情形皆與正常TMPRSS3-GFP融合蛋白的表現位置一樣是在內質網(Figure 11)，我們建議這些突變並沒有改變細胞內表現的位置，至於功能是否有改變需要進一步的探討。為了進一步探討這些功能，我們這一年也建立了siRNA系統，我們一共設計了5段序列進行分析H441和HeLa細胞 (Figure 9~10)，預期找到一段較強的抑制片段，將可讓我們進行後續的實驗。另外，目前我們正在進行免疫沈澱法所需抗體的測試，希望能找尋到TMPRSS3蛋白的作用物質。

計劃成果自評:

本計畫的研究結果，我們利用sGASP系統和爪蟾卵母細胞(Xenopus oocyte)表現系統完成所有突變點的分析。在細胞模式研究系統，我們也建構好所有的表現質體並分析完所有突變點在細胞內的表現位置。整體來說此計畫的結果是符合我們當初對於計畫內容所要追求的目標。本計畫的部分結果在2011(附件一和附件二)年生醫年會經由壁報發表，部分結果也將在2013年生醫年會發表，並已著手進行paper的撰寫和準備投稿在國際期刊。此計畫的成果也提供相關的資訊做為後續研究TMPRSS3基因造成非症候群聽障致病機轉的參考。另外延續性的

實驗，也開始進行。如TMPRSS3下游作用基因的研究。

參考文獻

- Ahmed ZM, Li XC, Powell SD, Riazuddin S, Young TL, Ramzan K, Ahmad Z, Luscombe S, Dhillon K, MacLaren L, Ploplis B, Shotland LI, Ives E, Riazuddin S, Friedman TB, Morell RJ and Wilcox ER (2004) Characterization of a new full length TMPRSS3 isoform and identification of mutant alleles responsible for nonsyndromic recessive deafness in Newfoundland and Pakistan. *BMC Med. Genet.* 5, 24.
- Ben-Yosef T, Wattenhofer M, Riazuddin S, Ahmed ZM, Scott HS, Kudoh J, Shibuya K, Antonarakis SE, Bonne-Tamir B, Radhakrishna U, Naz S, Ahmed Z, Riazuddin S, Pandya A, Nance WE, Wilcox ER, Friedman TB and Morell RJ (2001) Novel mutations of TMPRSS3 in four DFNB8/B10 families segregating congenital autosomal recessive deafness. *J Med Genet* 38:396–400.
- Couloigner V, Fay M, Djelidi S, Farman N, Escoubet B, Runembert I, Sterkers O, Friedlander G and Ferrary E (2001) Location and function of the epithelial Na channel in the cochlea. *Am. J. Physiol. Renal. Physiol.* 280, F214–222.
- Coulogigner V, Sterkers O and Ferrary E (2006) What's new in ion transports in the cochlea? *Eur J Physiol* 453:11-22.
- Fritsch B, Pirvola U and Ylikoski J (1999) Making and breaking the innervation of the ear: neurotrophic support during ear development and its clinical implications. *Cell Tissue Res.* 295, 369–382.
- Gestwa G, Wiechers B, Zimmermann U, Praetorius M, Rohbock K, Kopschall I, Zenner HP and Knipper M (1999) Differential expression of trkB.T1 and trkB.T2, truncated trkC, and p75(NGFR) in the cochlea prior to hearing function. *J. Comp. Neurol.*, 414, 33–49.
- Grunder S, Muller A and Ruppertsberg JP (2001) Developmental and cellular expression pattern of epithelial sodium channel alpha, beta and gamma subunits in the inner ear of the rat. *Eur. J. Neurosci.*, 13, 641–648.
- Guipponi M, Toh MY, Tan J, Park D, Hanson K, Ballana E, Kwong D, Cannon PZF, Wu Q, Gout A, Delorenzi M, Speed TP, Smith RJH, Dahl HH, Petersen M, Teasdale RD, Estivill X, Park WJ and Scott HS (2007) An Integrated Genetic and Functional Analysis of the Role of Type II Transmembrane Serine Proteases (TMPRSSs) in Hearing Loss. *Hum. Mutat.* 0, 1-12.
- Guipponi M, 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 PL, Kudoh J, Shimizu N, Scott HS, Antonarakis SE and Rossier BC (2002) The transmembrane serine protease (TMPRSS3) mutated in deafness DFNB8/10 activates the epithelial sodium channel (ENaC) in vitro. *Hum Mol Genet* 11:2829–2836.
- Hanwell D, Ishikawa T, Saleki R and Rotin D (2002) Trafficking and cell surface stability of the epithelial Na⁺ channel expressed in epithelial Madin-Darby canine kidney cells. *J. Biol. Chem.*, 277, 9772–9779.
- Hooper JD, Clements JA, Quigley JP and Antalis TM (2001) Type II transmembrane serine proteases. Insights into an emerging class of cell surface proteolytic enzymes. *J. Biol. Chem.* 276, 857–860.
- Hutchin T, Coy NN, Conlon H, Telford E, Bromelow K, Blydon D, Taylor G, Coghill E, Brown S, Trembath R, Liu XZ, Bitner-Glindzicz M and Mueller R (2005) Assessment of the genetic causes of recessive childhood nonsyndromic deafness in the UK—implications for genetic testing. *Clin. Genet.* 68:506–512.
- Iwasa KH, Mizuta K, Lim DJ, Benos DJ and Tachibana M (1994) Amiloride-sensitive channels in marginal cells in the stria vascularis of the guinea pig cochlea. *Neurosci. Lett.* 172,

163–166.

- Lee R, Kermani P, Teng KK and Hempstead BL (2001) Regulation of cell survival by secreted proneurotrophins. *Science*, 294, 1945–1948.
- Marcus DC and Chiba T (1999) K^+ and Na^+ absorption by outer sulcus epithelial cells. *Hear. Res.* 134, 48–56.
- Masmoudi S, Antonarakis SE, Schwede T, Ghorbel AM, Gratri M, Pappasavas MP, Drira M, Elgaied-Boulila A, Wattenhofer M, Rossier C, Scott HS, Ayadi H and Guipponi M (2001) Novel missense mutations of TMPRSS3 in two consanguineous Tunisian families with non-syndromic autosomal recessive deafness. *Hum. Mutat.* 18:101–108.
- Oh YS and Warnock DG (2000) Disorders of the epithelial Na^+ channel in Liddle's syndrome and autosomal recessive pseudohypoaldosteronism type 1. *Exp. Nephrol.*, 8, 320–325.
- Peters TA, Levchenko E, Cremers CW, Curfs JH and Monnens LA (2006) No evidence of hearing loss in pseudohypoaldosteronism type 1 patients. *Acta Otolaryngol.* 126(3), 237-239.
- Scott HS, Kudoh J, Wattenhofer M, Shibuya K, Berry A, Chrast R, Guipponi M, Wang J, Kawasaki K, Asakawa S, Minoshima S, Younus F, Mehdi SQ, Radhakrishna U, Pappasavas MP, Gehrig C, Rossier C, Korostishevsky M, Gal A, Shimizu N, Bonne-Tamir B and Antonarakis SE (2001) Insertion of beta-satellite repeats identifies a transmembrane protease causing both congenital and childhood onset autosomal recessive deafness. *Nat. Genet.* 27:59–63.
- Steel P, Barkway C and Bock GR (1987) Strial dysfunction in mouse with ochleo-saccular abnormalities. *Hear Res* 27:11–26.
- Wattenhofer M, Di Iorio MV, Rabionet R, Dougherty L, Pampanos A, Schwede T, Montserrat-Sentis B, Arbones ML, Iliades T, Pasquadibisceglie A, D'Amelio M, Alwan S, Rossier C, Dahl HH, Petersen MB, Estivill X, Gasparini P, Scott HS and Antonarakis SE (2002) Mutations in the TMPRSS3 gene are a rare cause of childhood nonsyndromic deafness in Caucasian patients. *J. Mol. Med.* 80:124–131.
- Wattenhofer M, Sahin-Calapoglu N, Andreasen D, Kalay E, Caylan R, Braillard B, Fowler-Jaeger N, Raymond A, Rossier BC, Karaguzel A and Antonarakis SE (2005) A novel TMPRSS3 missense mutation in a DFNB8/10 family prevents proteolytic activation of the protein. *Hum. Genet.* 117:528–535.
- Wiechers B, Gestwa G, Mack A, Carroll P, Zenner HP and Knipper M (1999) A changing pattern of brain-derived neurotrophic factor expression correlates with the rearrangement of fibers during cochlear development of rats and mice. *J. Neurosci.*, 19, 3033–3042.

Table 1. Completed plasmid constructs used in the cell model.

Vector	Interesting gene	Fluorescent protein	Constructed plasmid name
pBI-Tet	<i>TMPRSS3^{wt}</i>	TagRFP	pBI::TMPRSS3 ^{wt} -TagRFP
	<i>TMPRSS3^{D103G}</i>	EGFP	pBI::TMPRSS3 ^{wt} -EGFP
			pBI::TMPRSS3 ^{D103G} -EGFP
			pBI::TMPRSS3 ^{C194F} -EGFP
			pBI::TMPRSS3 ^{W251C} -EGFP
			pBI::TMPRSS3 ^{P404L} -EGFP
			pBI::TMPRSS3 ^{R50H} -EGFP
			pBI::TMPRSS3 ^{L184S} -EGFP
			pBI::TMPRSS3 ^{A415F} -EGFP
	<i>TMPRSS3^{L184S}</i>	TagRFP and EGFP	pBI::TMPRSS3 ^{wt} -TagRFP/TMPRSS3 ^{D103G} -EGFP
			pBI::TMPRSS3 ^{wt} -TagRFP/TMPRSS3 ^{C194F} -EGFP
			pBI::TMPRSS3 ^{wt} -TagRFP/TMPRSS3 ^{W251C} -EGFP
			pBI::TMPRSS3 ^{wt} -TagRFP/TMPRSS3 ^{P404L} -EGFP
			pBI::TMPRSS3 ^{wt} -TagRFP/TMPRSS3 ^{R50H} -EGFP
			pBI::TMPRSS3 ^{wt} -TagRFP/TMPRSS3 ^{L184S} -EGFP
pBI::TMPRSS3 ^{wt} -TagRFP/TMPRSS3 ^{A415F} -EGFP			

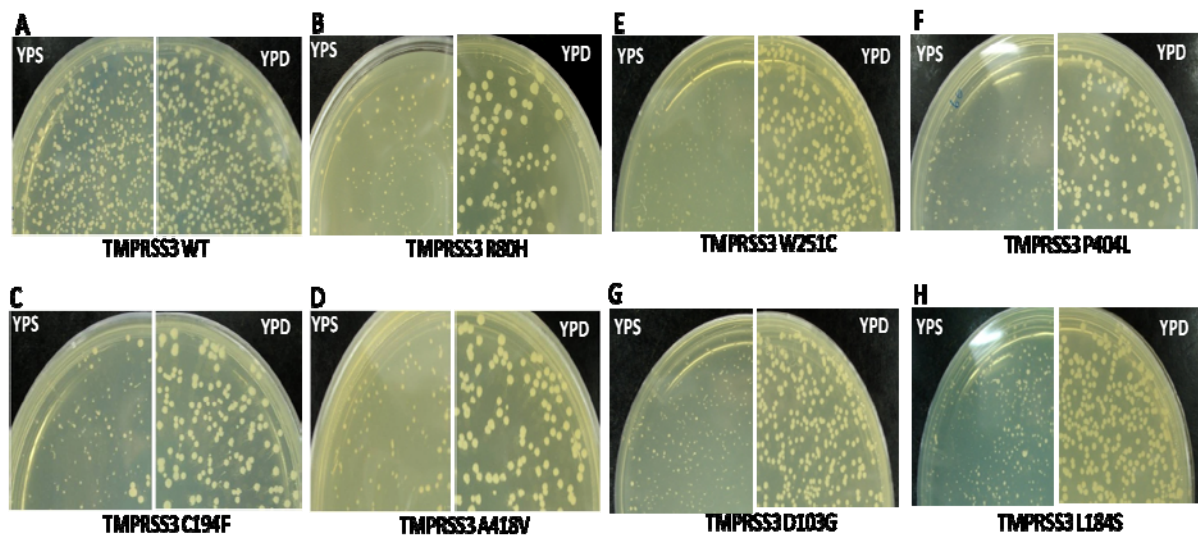


Figure 1. Assay of the catalytic activity of TMPRSS3 by sGASP. Transformants expressing both the STE13-substrate-invertase fusion protein and STE13-TMPRSS3 (wild type or variants) were plated on non-selective (glucose-YPD) and selective (sucrose-YPS) plates. A, wild type TMPRSS3; B, R80H; C, C194F; D, A418V; E, W251C; F, P404L; G, D103G; H, L184S. D103G, C194F, W251C and P404L mutation are positive control. R80H, L184S, and A418V mutation were found in our previous study in Taiwan.

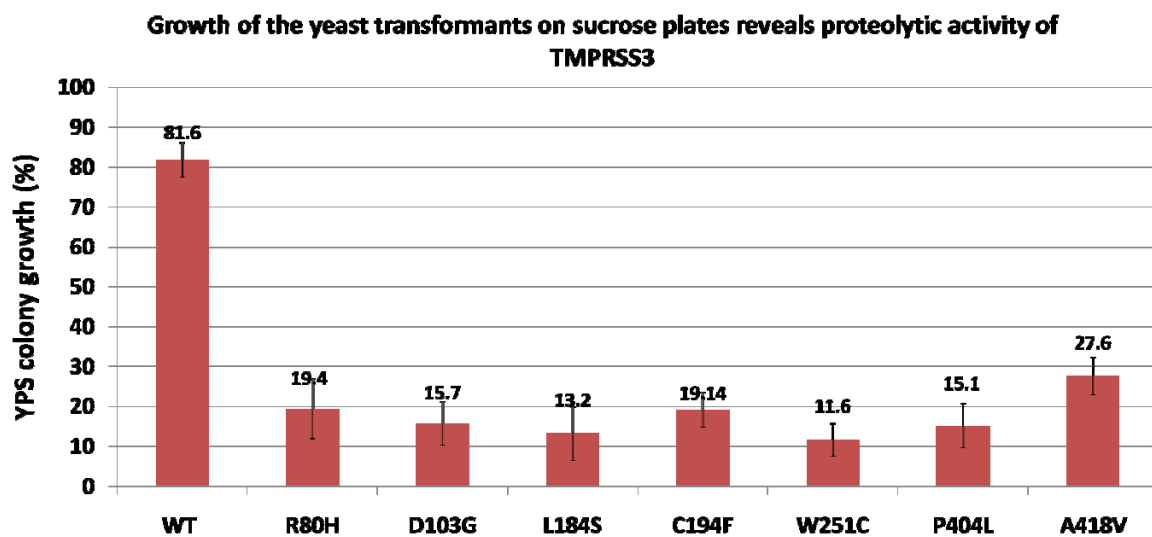


Figure 2. Quantitative assay of growth rate of yeast colony on sucrose plates. The numbers in parentheses are plating efficiency, which represent relative proteolytic activity. They are calculated by dividing the number of colony on sucrose plates by the number of colony on glucose plates. (N=5) D103G, C194F, W251C and P404L mutation are positive control. R80H, L184S, and A418V mutation were found in our previous study in Taiwan.

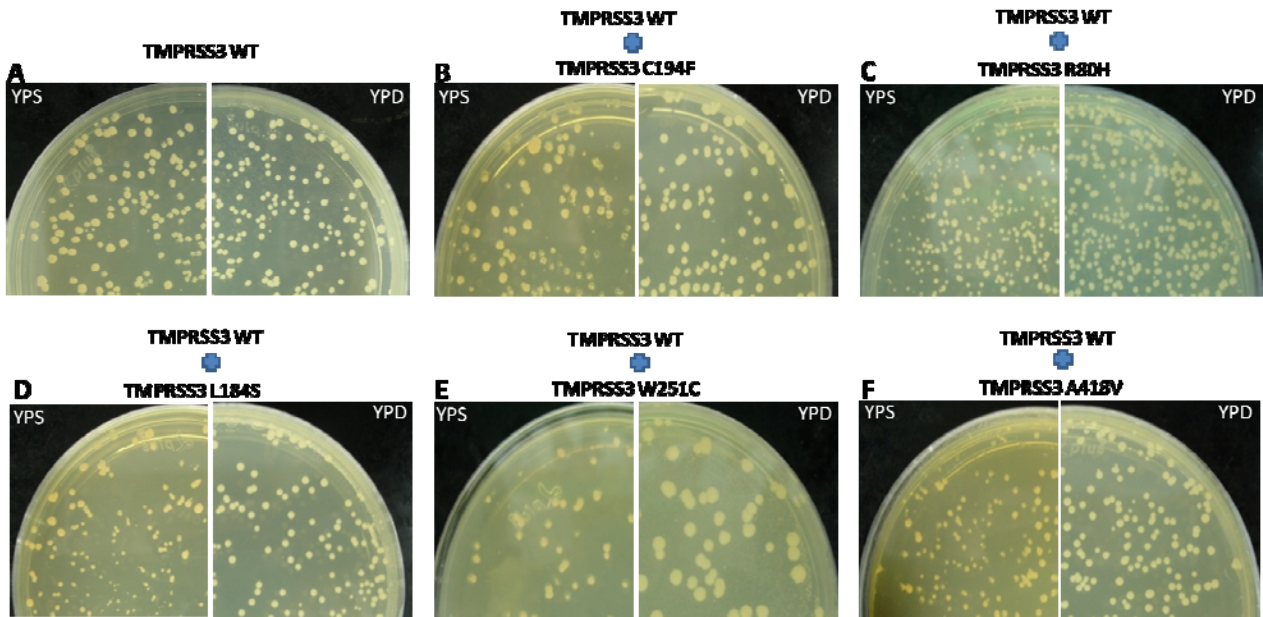


Figure 3. Assay of the catalytic activity of TMPRSS3 by sGASP. To simulate the heterozygous genotype, we co-transformants expressing three plasmid of STE13-substrate-invertase fusion protein and STE13-TMPRSS3 (wild type and variants) were plated on non-selective (glucose-YPD) and selective (sucrose-YPS) plates. A, wild type TMPRSS3; B, wild type and C194F; C, wild type and R80H; D, wild type and L184S; E, wild type and W251C; F, wild type and A418V. C194F and W251C mutation are positive control. R80H, L184S, and A418V mutation were found in our previous study in Taiwan.

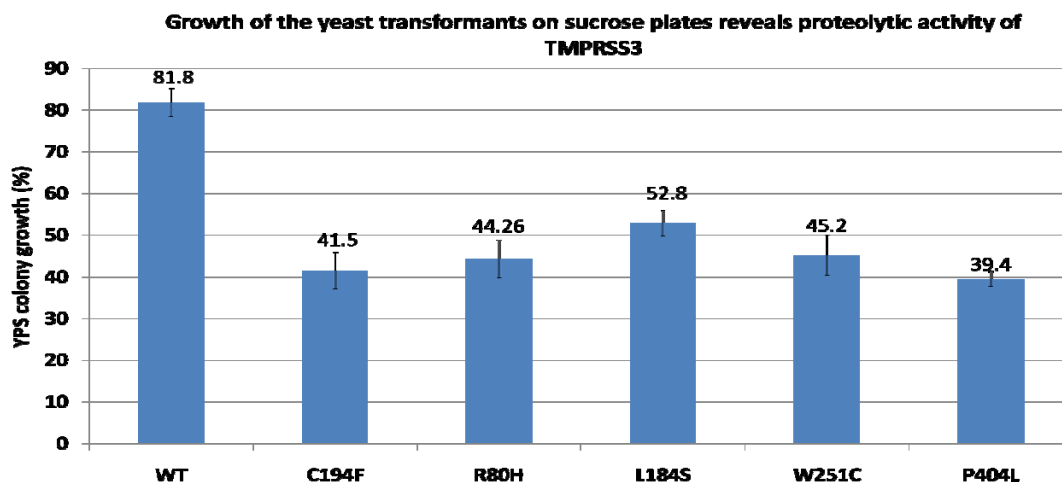


Figure 4. Quantitative assay of growth rate of yeast colony on sucrose plates. The numbers in parentheses are plating efficiency, which represent relative proteolytic activity. They are calculated by dividing the number of colony on sucrose plates by the number of colony on glucose plates. (N=5) C194F and W251C mutation are positive control. R80H, L184S, and A418V mutation were found in our previous study in Taiwan.

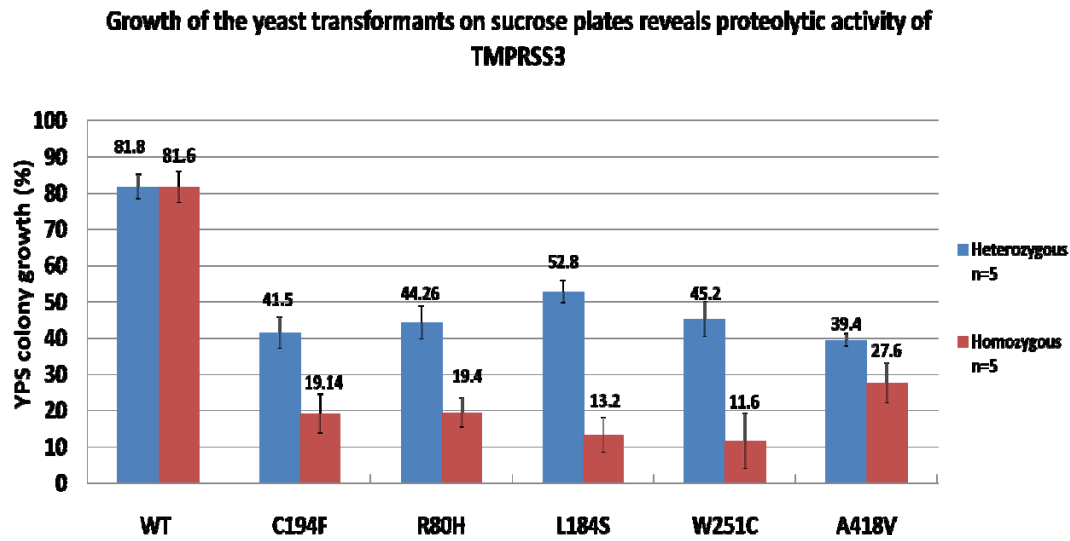


Figure 5. Compare to quantization of Homozygous and Heterozygous. The blue one is Heterozygous, the purple one is Homozygous. (N=5) C194F and W251C mutation are positive control. R80H, L184S, and A418V mutation were found in our previous study in Taiwan.

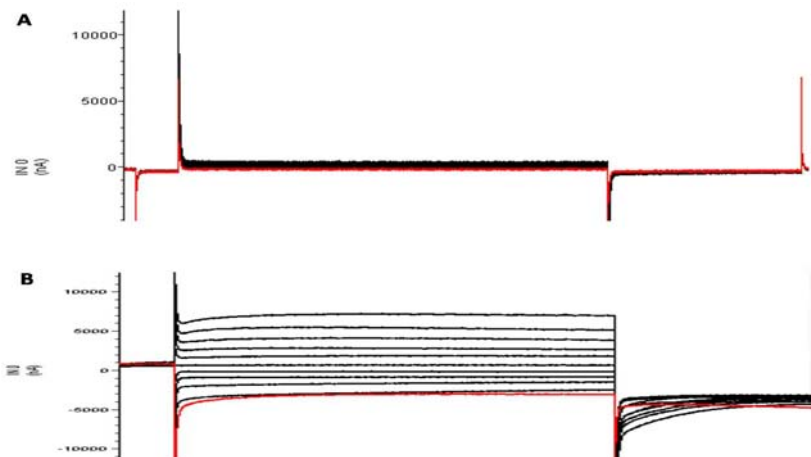


Figure 6. 我們將建構好的 ENaC α 、 β 和 γ subunits 的 cRNA 連同 TMPRSS3 的 cRNA 送入爪蟾卵母細胞(*Xenopus oocyte*)。A. 沒有送入任何 cRNA 的爪蟾卵母細胞，並沒 Na^+ 電流的產生。B. 將 ENaC α 、 β 和 γ subunits 的 cRNA 連同 TMPRSS3 的 cRNA 一同送入爪蟾卵母細胞所產生 Na^+ 電流的情況。

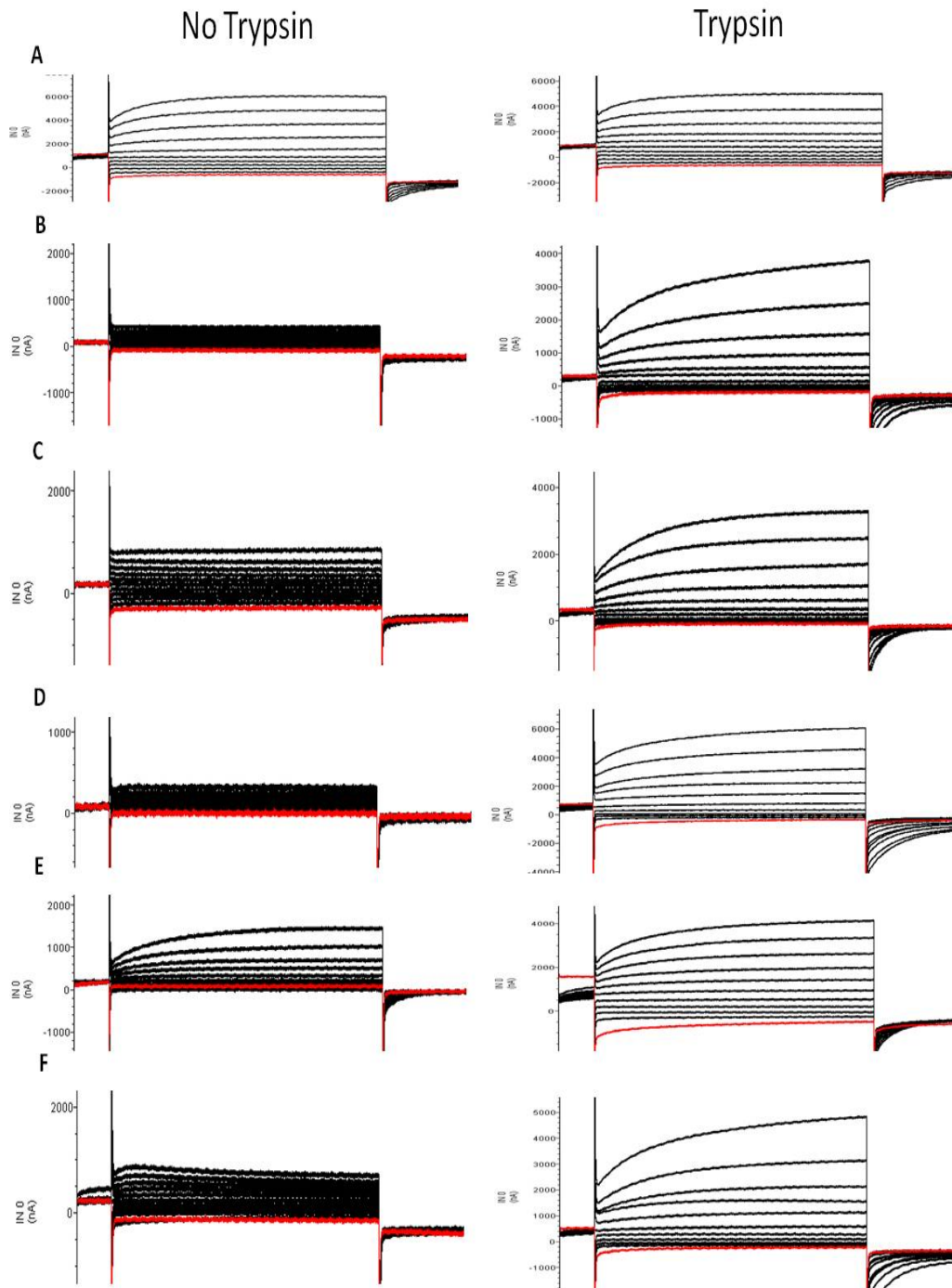


Figure 7.我們將建構好的 ENaC α 、 β 和 γ subunits 的 cRNA 連同 TMPRSS3 的 cRNA 送入爪蟾卵母細胞(*Xenopus oocyte*)。左圖. 沒有胰蛋白酶(Trypsin)作用。右圖. 有胰蛋白酶(Trypsin)作用。A. wild type TMPRSS3; B. TMPRSS3_{P404L}; C. TMPRSS3_{R80H}; D. TMPRSS3_{L184S}; E. TMPRSS3_{W251C}; F. TMPRSS3_{A418V}。

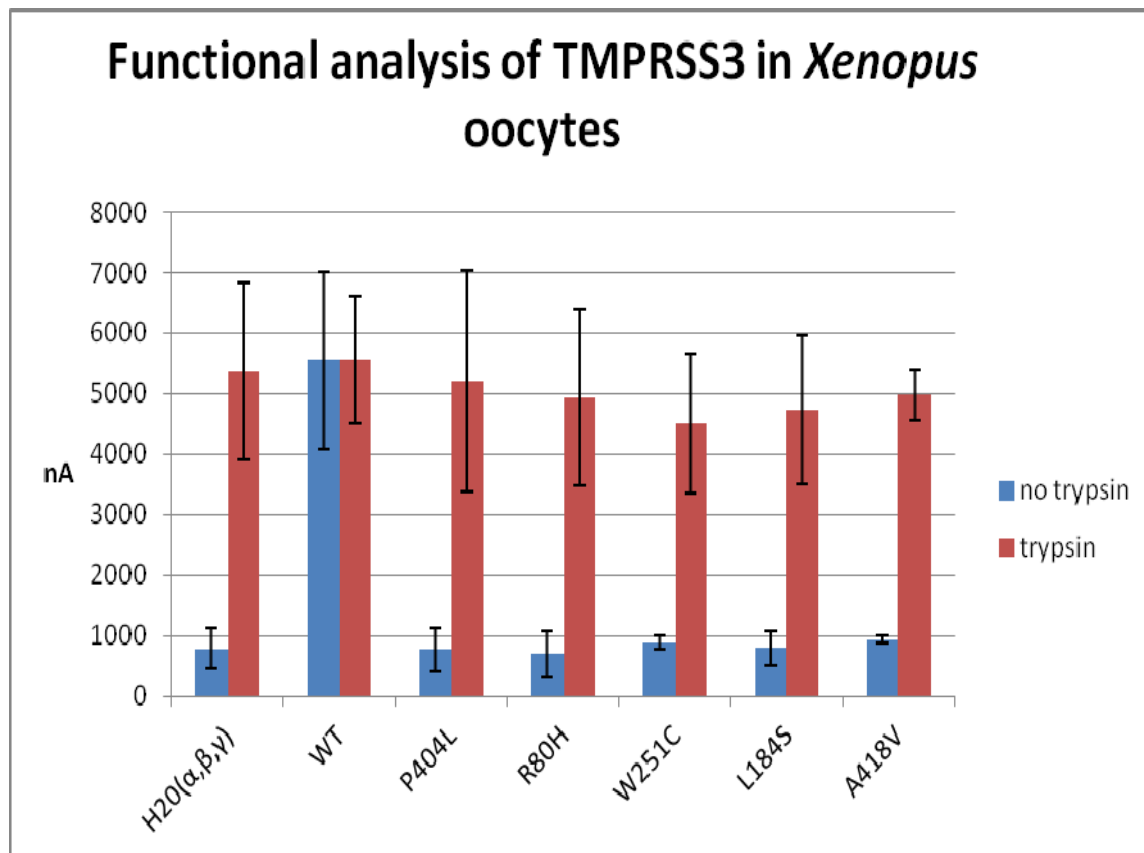


Figure 8. 利用爪蟾卵母細胞分析 TMPRSS3 的功能，將 TMPRSS3 的基因(正常或突變)連同 ENaC 的 cRNA 一起注射到卵母細胞表現分析。藍色柱狀為沒有處理胰蛋白酶(Trypsin)，紅色為有處理胰蛋白酶(Trypsin)。n=15

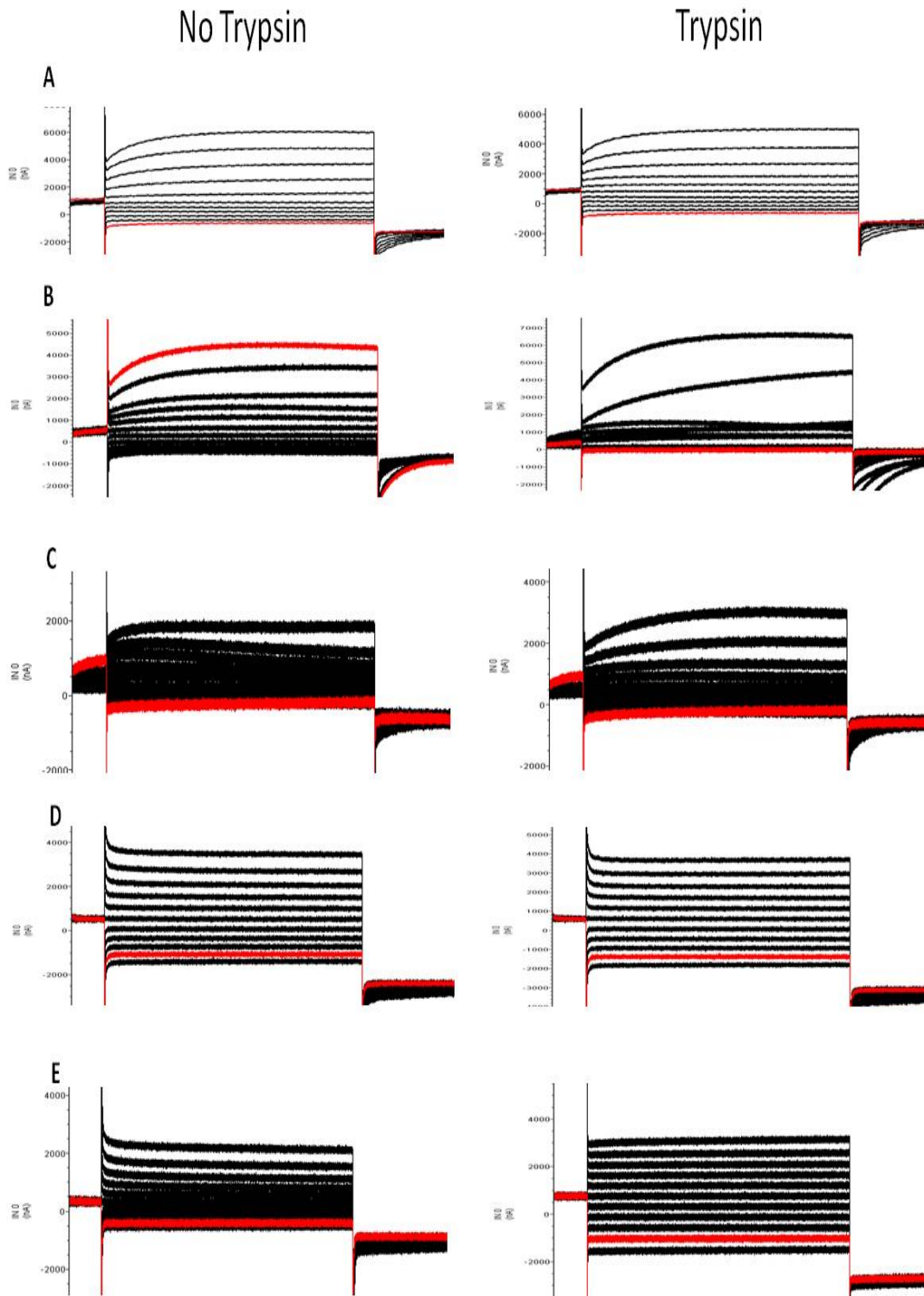


Figure 9.我們將建構好的 ENaC α 、 β 和 γ subunits 的 cRNA 連同正常與突變 TMPRSS3 的 cRNA 一併送入爪蟾卵母細胞(*Xenopus oocyte*)表現。左圖. 沒有胰蛋白酶(Trypsin)作用。右圖. 有胰蛋白酶(Trypsin)作用。A. wild type TMPRSS3; B. WT/TMPRSS3_{R80H}; C. WT/ TMPRSS3_{L184S}; D. WT/ TMPRSS3_{W251C}; E. WT/ TMPRSS3_{A418V}。

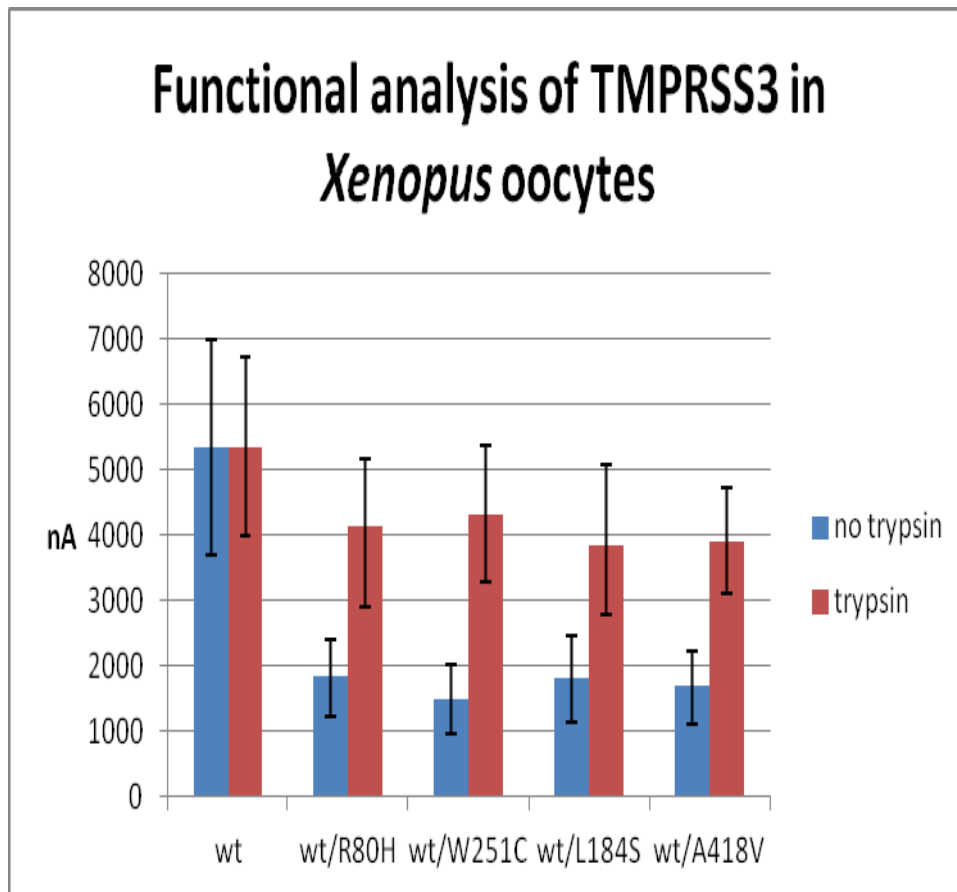


Figure 10. 利用爪蟾卵母細胞分析 TMPRSS3 的功能。為了模擬病人 Heterozygous 的形式，將 TMPRSS3 的基因(正常和突變)連同 ENaC 的 cRNA 一起注射到卵母細胞表現分析。藍色柱狀為沒有處理胰蛋白酶(Trypsin)，紅色為有處理胰蛋白酶(Trypsin)。n=15

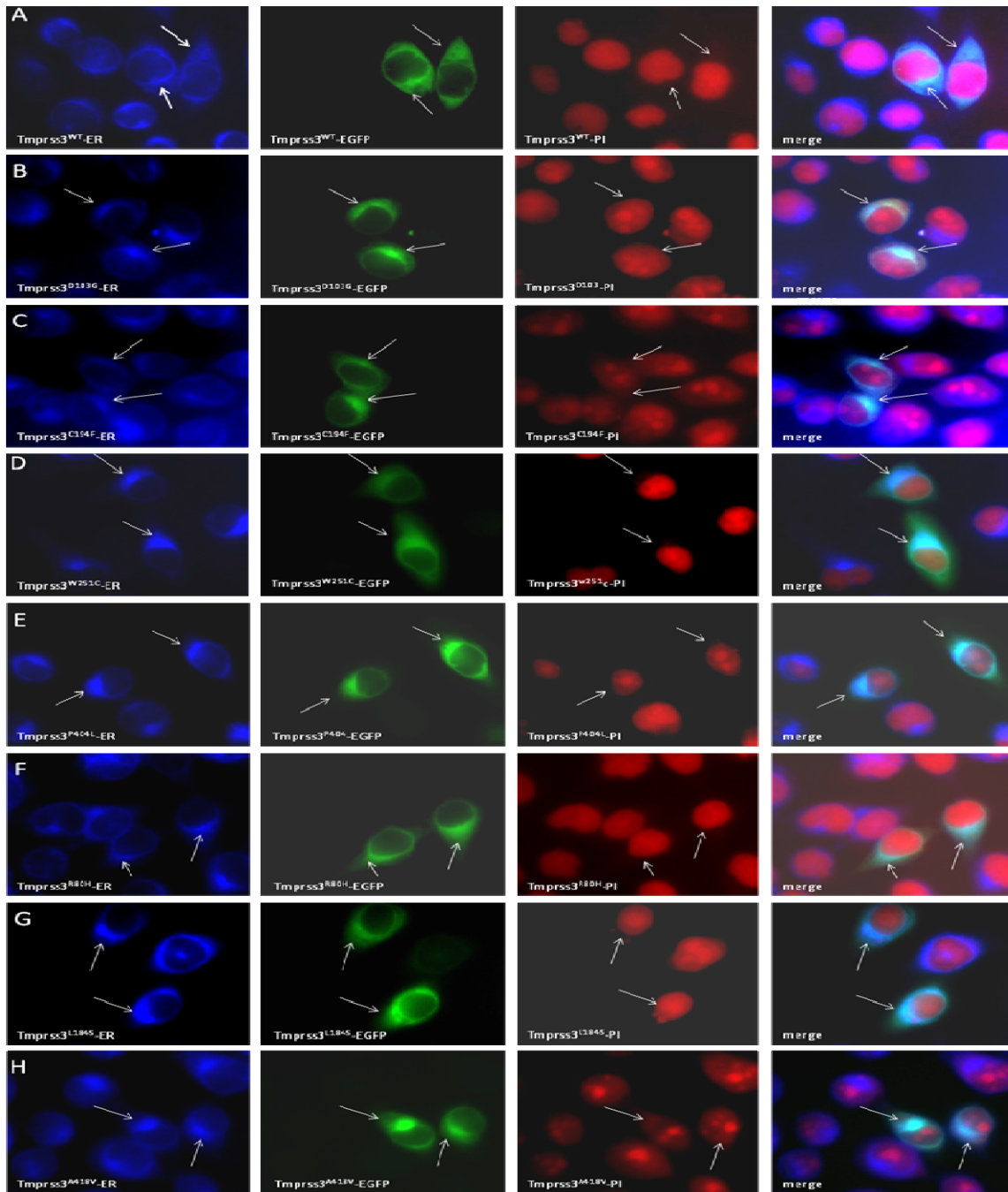


Figure 11. Intercellular localization of the wild-type and mutant Tmprss3 protein. Photomicrographs of tet-on HeLa cells transiently transfected with *TMPRSS3*^{wt}, *TMPRSS3D*^{103G}, *TMPRSS3*^{c194f}, *TMPRSS3*^{w251c}, *TMPRSS3*^{p404l}, *TMPRSS3*^{R80H}, *TMPRSS3*^{L184S} and *TMPRSS3*^{a418v} cDNA, and immunostained for use a markers of ER (A)~(H). The staining results for wt and all mutant *TMPRSS3* showed substantial co-localization in the ER (White). The cells were counterstained with PI (red) to highlight the nuclei. White arrows indicate the localization of ER.

Name	
siRNA 1	TRCN000051383
siRNA 2	TRCN000051384
siRNA 3	TRCN000051385
siRNA 4	TRCN000051386
siRNA 5	TRCN000051387

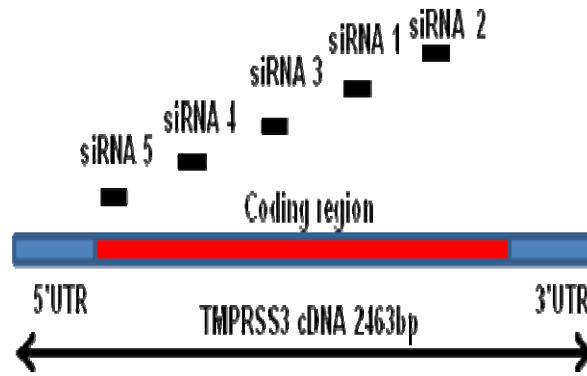


Figure 12. 左圖為建構 shTMPRSS3 質體的名字。右圖為 siRNA 結合上 TMPRSS3 cDNA 的位置。

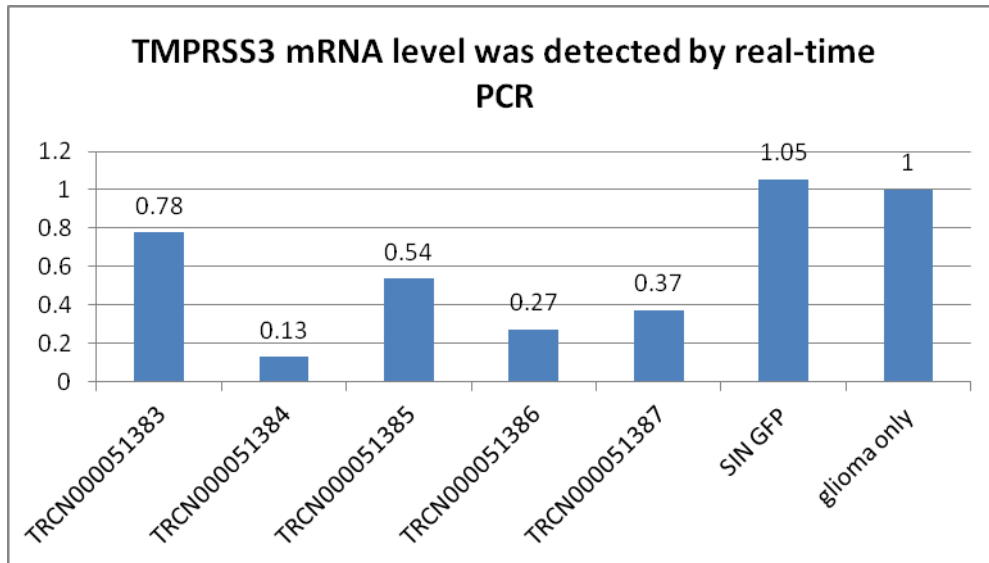


Figure 13. 利用 qPCR 分析不同 RNAi 片段 knockdown TMPRSS3 的表現的效率(上圖)。(SIN GFP) : Negative control (螢光蛋白)。

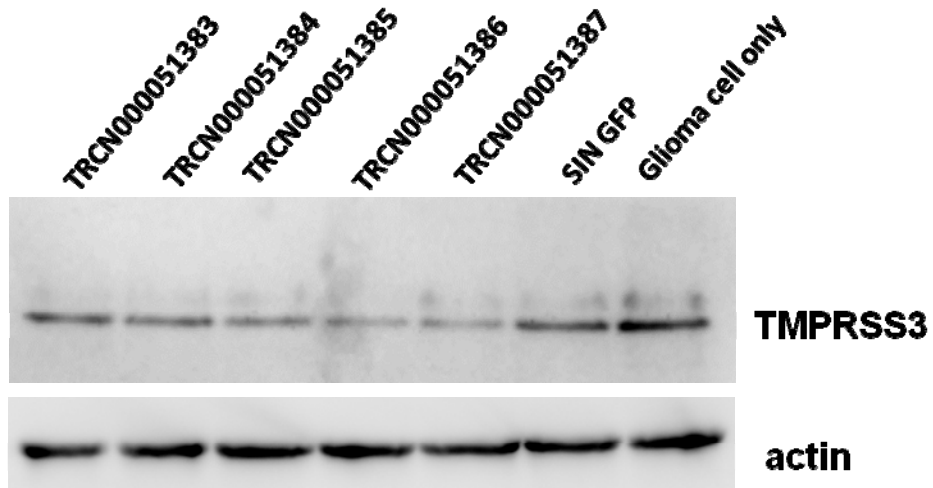


Figure 14. 利用西方點膜法(western blot)分析不同 RNAi 片段 knockdown TMPRSS3 蛋白的表現效率(上圖)。(SIN GFP) : Negative control (螢光蛋白) actin: internal loading control,。

Functional analysis of TMPRSS3 mutant gene in nonsyndromic hearing loss using cell model

Cen-Hong-Yang, Jiann-Jou Yang, Shuan-Yow Li#

Department of Biomedical Sciences, Chung Shan Medical University, Taichung, Taiwan, ROC

ABSTRACT

TMPRSS3 (transmembrane protease, serine 3) has been found to cause in non-syndromic hearing loss. *TMPRSS3* are type II transmembrane serine protease (TTSPs). *TMPRSS3* protein mainly in the endoplasmic reticulum location, and the endoplasmic reticulum is the ENaC subunits assembly and the need to carry out the role of core glycosylation. It is considered in the ENaC and *TMPRSS3* assembly process may play an important role. Previously, we found three missense mutation, 239G>A (R80H), 551T>C/wt (L184S), 1253C>T(A418V) of *TMPRSS3* gene in the patients with non-syndromic hearing impairment. At present, functional alteration in the three missense mutations is unclear. In this study, we examined the protein expression location of wild type *TMPRSS3* and those mutations of *TMPRSS3* within cells using the cell model. Our results found that the normal and mutants *TMPRSS3* protein position was not different, which were expressed in the endoplasmic reticulum of the cell. Nevertheless, *TMPRSS3* can be activated of the ENaC and increase Na⁺ current, but whether these mutations cause the loss of function, there by affecting the Na⁺ currents are currently unknown. Therefore, activation of ENaC function in these mutations of *TMPRSS3* should be further explored.

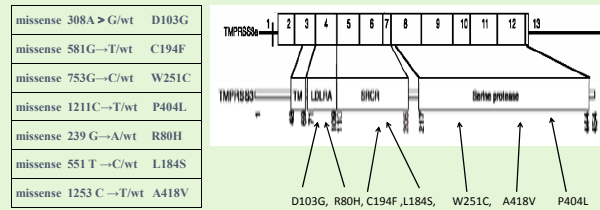


Figure 1. Schematic representation of the domain structure of the *TMPRSS3* protein with indication of known variants. (A) We made a summary of the variants of *TMPRSS3* gene may be association with nonsyndromic hearing loss. (B) Located on chromosome 7q22.1, human *TMPRSS3* gene is contains 13 exons and encode 454 amino acid with four domain, including transmembrane domain (TM), low-density lipoprotein receptor A domain (LDLRA), Scavenger receptor cysteine-rich domain (SRCR), Serine protease domain (sp). The arrows indicate the R80H, D103G, C194F, L184S, W251C, A418V and P404L variant in *TMPRSS3*.

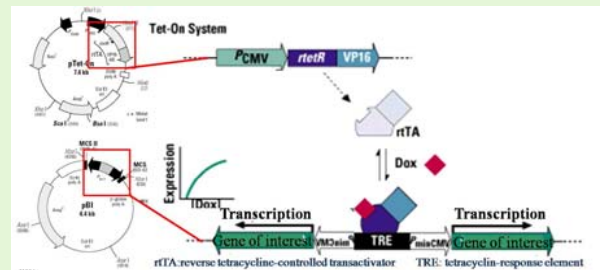


Figure 3. Tet-on expression system. The Tet-On expression system allows doxycycline (Dox)-regulated gene expression under the control of the rTA (reverse tetracycline-controlled transactivator) protein and TRE (tetracycline response element) (Clontech). When a vector containing the gene of interest preceded by a TRE is introduced into a cell line stably expressing the rTA, expression of the gene can be controlled by doxycycline in the culture medium. The rTA can only bind to the TRE and initiate transcription of the gene in the presence of doxycycline. Furthermore, co-expression of two genes can be obtained by using Bidirectional Tet Expression Vectors which contain a central bidirectional TRE element. For this work, the bidirectional vectors pBI, containing two available multiple cloning sites, was used.

Table 1. Completed plasmid constructs used in the cell model.

Vector	Interesting gene	Fluorescent protein	Constructed plasmid name	
pBI-Tet	<i>TMPRSS3</i> ^{wt}	TagRFP	pBI:: <i>TMPRSS3</i> ^{wt} ::TagRFP	
			EGFP	pBI:: <i>TMPRSS3</i> ^{wt} ::EGFP
				pBI:: <i>TMPRSS3</i> ^{D103G} ::EGFP
				pBI:: <i>TMPRSS3</i> ^{R80H} ::EGFP
				pBI:: <i>TMPRSS3</i> ^{C194F} ::EGFP
				pBI:: <i>TMPRSS3</i> ^{L184S} ::EGFP
				pBI:: <i>TMPRSS3</i> ^{W251C} ::EGFP
				pBI:: <i>TMPRSS3</i> ^{A418V} ::EGFP
				pBI:: <i>TMPRSS3</i> ^{P404L} ::EGFP
				pBI-Tet
pBI:: <i>TMPRSS3</i> ^{D103G} ::TagRFP/ <i>TMPRSS3</i> ^{D103G} ::EGFP				
pBI:: <i>TMPRSS3</i> ^{R80H} ::TagRFP/ <i>TMPRSS3</i> ^{R80H} ::EGFP				
pBI:: <i>TMPRSS3</i> ^{C194F} ::TagRFP/ <i>TMPRSS3</i> ^{C194F} ::EGFP				
pBI:: <i>TMPRSS3</i> ^{L184S} ::TagRFP/ <i>TMPRSS3</i> ^{L184S} ::EGFP				
pBI:: <i>TMPRSS3</i> ^{W251C} ::TagRFP/ <i>TMPRSS3</i> ^{W251C} ::EGFP				
pBI:: <i>TMPRSS3</i> ^{A418V} ::TagRFP/ <i>TMPRSS3</i> ^{A418V} ::EGFP				
pBI:: <i>TMPRSS3</i> ^{P404L} ::TagRFP/ <i>TMPRSS3</i> ^{P404L} ::EGFP				

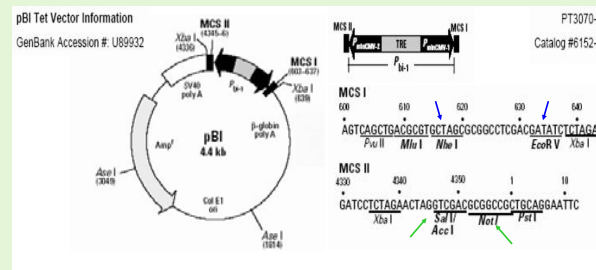


Figure 2. Subcloning of wild-type and mutant *TMPRSS3* gene in pBI vector. The plasmids for expressing proteins of heteromeric *TMPRSS3* wt/*TMPRSS3* mutant were based on the pBI vector (Clontech), which has two available multiple cloning sites. cDNA encoding *TMPRSS3* mutant proteins were subcloned into the upstream cloning site on pBI using the *NotI* and *SacI* sites (green arrow). cDNA encoding wt *TMPRSS3* subcloned into the *NheI* and *EcoRV* restriction sites of the downstream cloning site on pBI vector (blue arrow). All constructs were verified by restriction digest and sequencing.

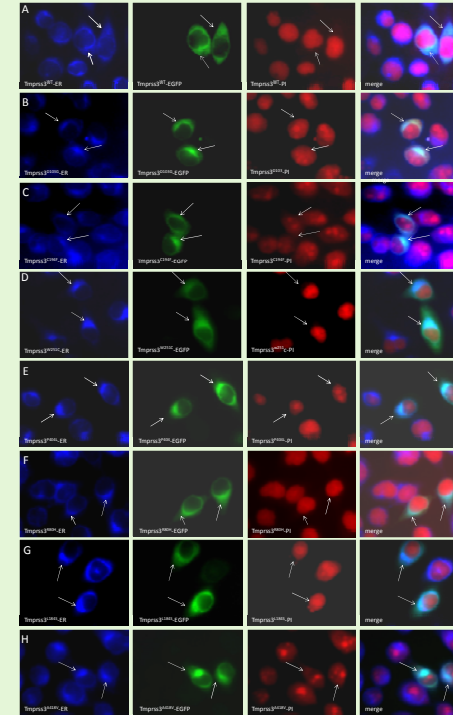


Figure 4. Intercellular localization of the wild-type and mutant *Tmprss3* protein. Photomicrographs of tet-on HeLa cells transiently transfected with *TMPRSS3*^{wt}, *TMPRSS3*^{D103G}, *TMPRSS3*^{R80H}, *TMPRSS3*^{C194F}, *TMPRSS3*^{L184S}, *TMPRSS3*^{W251C}, *TMPRSS3*^{P404L}, *TMPRSS3*^{A418V}, *TMPRSS3*^{wt}-EGFP and *TMPRSS3*^{wt}-DsRed cDNA, and immunostained for use a markers of ER (A)-(H). The staining results for wt and all mutant *TMPRSS3* showed substantial co-localization in the ER (White). The cells were counterstained with PI (red) to highlight the nuclei. White arrows indicate the localization of ER.

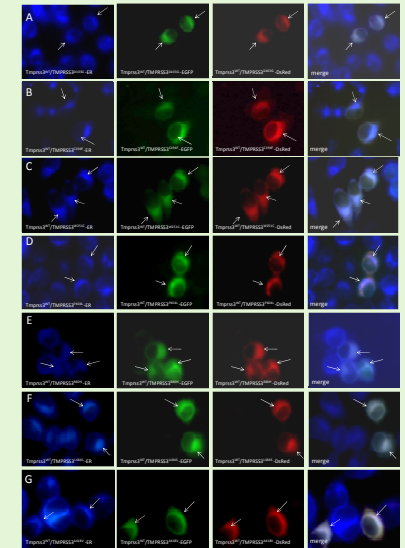


Figure 5. Co-expression of mutant proteins with wild-type *TMPRSS3* by tet-on protein expression system. Tet-on HeLa cells co-expressing wild-type *TMPRSS3*-DsRed with *TMPRSS3*^{D103G}, *TMPRSS3*^{C194F}, *TMPRSS3*^{W251C}, *TMPRSS3*^{P404L}, *TMPRSS3*^{R80H}, *TMPRSS3*^{L184S} and *TMPRSS3*^{A418V}-EGFP (A)-(G) revealing co-localization of the two proteins around the nucleus regions. Arrows indicate co-expression protein.

CONCLUSION

1. Our results found that wt and all mutant *TMPRSS3* protein expressed in the same location within HeLa cell, which is in the endoplasmic reticulum (ER).
2. These results indicated that mutant *TMPRSS3* do not produced the trafficking and location effect in the HeLa cell.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank the National Science Council of the Republic of China, Taiwan for financially supporting this research under Contract No. NSC 98-2320-B040-012-MY3 .

Novel mutations in the *TMPRSS3* gene may contribute to nonsyndromic hearing loss

Swee-Hee Wong, Jiann-Jou Yang, Shuan-Yow Li

Department of Biomedical Sciences, Chung Shan Medical University, Taichung, Taiwan, ROC

Abstract

Recently, some studies have shown that mutations in *TMPRSS3* were responsible for non-syndromic deafness (DFNB8 and DFNB10). *TMPRSS3* is a member of the Type II Transmembrane Serine Protease (TTSP). This was the first description of a serine protease involved in deafness. Previously, we have found many mutations in the *TMPRSS3* genes from screening of 230 children with non-syndromic deafness (14/230; 6.09 %). However, functional alteration in these mutants of *TMPRSS3* gene remains unknown. In this study, we examined the functional change of *TMPRSS3* mutations using the secretory genetic assay for site-specific proteolysis (sGASP) system. In the system, the growth of yeast cells with sucrose as a sole carbon source depends on the ability of functional *TMPRSS3* to site-specifically cleave its substrate such that invertase moiety can be released from Golgi membrane to periplasmic space allowing conversion of sucrose into glucose and fructose. The ratio of the number of colonies on sucrose versus glucose plate reflects the function of *TMPRSS3*. Our results showed that all *TMPRSS3* mutations gave the ratio decrease than wild type from 81.6% to 11.6% in the sGASP system. Therefore, we suggested that these *TMPRSS3* mutations may affect its proteolytic activity.

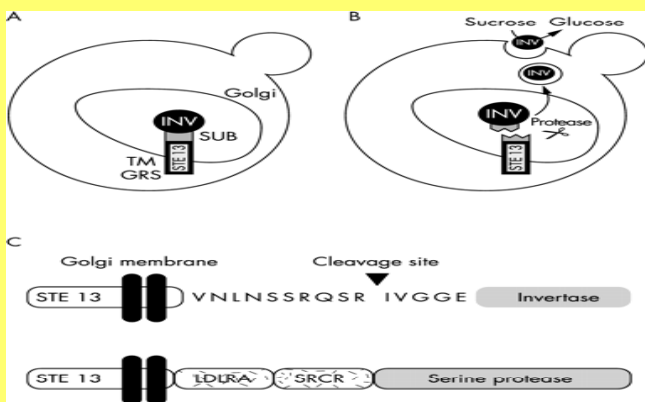


Fig.1 Principle of sGASP. In a yeast strain lacking invertase activity (suc2), a fusion protein is expressed in which invertase is linked to the truncated lumenal domain of an integral Golgi membrane protein, STE13, by a short substrate sequence containing linker. In the absence of cleavage of the substrate sequence, the invertase moiety remains anchored to the Golgi membrane (A). However, upon cleavage of the substrate sequence by a specific protease, invertase is released into the periplasmic space where it degrades sucrose into glucose and fructose. As a result, transformants are able to grow on selective plates containing sucrose as the sole carbon source (B). The structures of the STE13-substrate-invertase fusion protein and STE13-TMPRSS3 are shown in (C). Targeting proteases to Golgi apparently augments the protease-substrate interaction and hence the proteolysis.

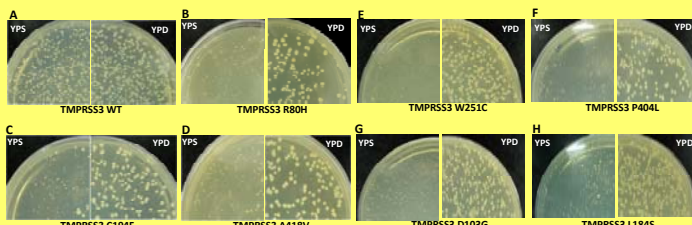


Fig.2 Assay of the catalytic activity of *TMPRSS3* by sGASP. Transformants expressing both the STE13-substrate-invertase fusion protein and STE13-TMPRSS3 (wild type or variants) were plated on non-selective (glucose-YPD) and selective (sucrose-YPD) plates. A, wild type *TMPRSS3*; B, R80H; C, C194F; D, A418V; E, W251C; F, P404L; G, D103G; H, L184S. D103G, C194F, W251C and P404L mutation are positive control. R80H, L184S, and A418V mutation were found in our previous study in Taiwan.

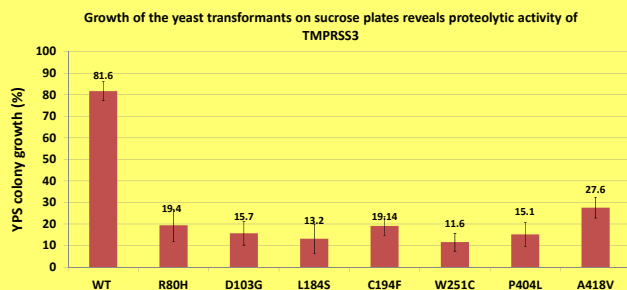


Fig.3 Quantitative assay of growth rate of yeast colony on sucrose plates. The numbers in parentheses are plating efficiency, which represent relative proteolytic activity. They are calculated by dividing the number of colony on sucrose plates by the number of colony on glucose plates. (N=5) D103G, C194F, W251C and P404L mutation are positive control. R80H, L184S, and A418V mutation were found in our previous study in Taiwan.

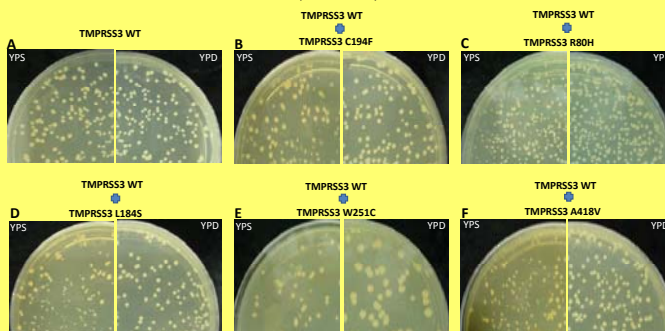


Fig.4 Assay of the catalytic activity of *TMPRSS3* by sGASP. To simulate the heterozygous genotype, we co-transformants expressing three plasmid of STE13-substrate-invertase fusion protein and STE13-TMPRSS3 (wild type and variants) were plated on non-selective (glucose-YPD) and selective (sucrose-YPD) plates. A, wild type *TMPRSS3*; B, wild type and C194F; C, wild type and R80H; D, wild type and L184S; E, wild type and W251C; F, wild type and A418V. C194F and W251C mutation are positive control. R80H, L184S, and A418V mutation were found in our previous study in Taiwan.

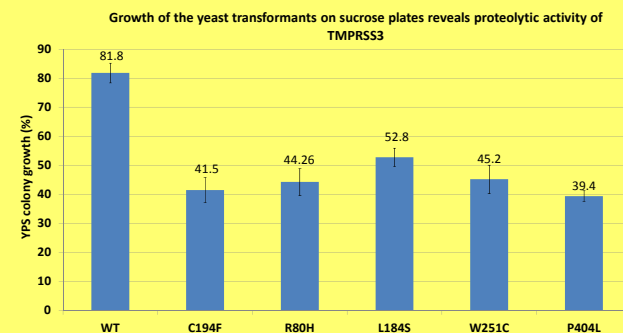


Fig.5 Quantitative assay of growth rate of yeast colony on sucrose plates. The numbers in parentheses are plating efficiency, which represent relative proteolytic activity. They are calculated by dividing the number of colony on sucrose plates by the number of colony on glucose plates. (N=5) C194F and W251C mutation are positive control. R80H, L184S, and A418V mutation were found in our previous study in Taiwan.

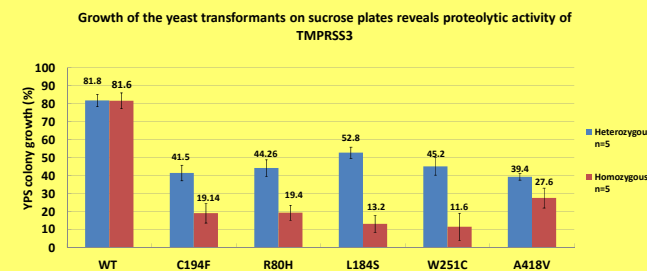


Fig.6 Compare to quantization of Heterozygous and Homozygous. The blue one is Heterozygous, the purple one is Homozygous. (N=5) C194F and W251C mutation are positive control. R80H, L184S, and A418V mutation were found in our previous study in Taiwan.

Conclusion:

Our results indicated that all missense mutations in the *TMPRSS3* are able to affect the proteolytic activity of *TMPRSS3* in the study. Therefore, we suggest that these mutation of *TMPRSS3* may be cause nonsyndromic hearing loss.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank the National Science Council of the Republic of China, Taiwan for financially supporting this research under Contract No. NSC 98-2320-B040-012-MY3.

國科會補助計畫衍生研發成果推廣資料表

日期:2012/10/30

國科會補助計畫	計畫名稱: 聽障基因TMPRSS3突變之功能分析
	計畫主持人: 李宣佑
	計畫編號: 98-2320-B-040-012-MY3 學門領域: 醫學之生化及分子生物
無研發成果推廣資料	

98 年度專題研究計畫研究成果彙整表

計畫主持人：李宣佑		計畫編號：98-2320-B-040-012-MY3					
計畫名稱：聽障基因 TMPRSS3 突變之功能分析							
成果項目		量化			單位	備註（質化說明：如數個計畫共同成果、成果列為該期刊之封面故事...等）	
		實際已達成數（被接受或已發表）	預期總達成數（含實際已達成數）	本計畫實際貢獻百分比			
國內	論文著作	期刊論文	0	0	100%	篇	
		研究報告/技術報告	0	0	100%		
		研討會論文	2	0	100%		
		專書	0	0	100%		
	專利	申請中件數	0	0	100%	件	
		已獲得件數	0	0	100%		
	技術移轉	件數	0	0	100%	件	
		權利金	0	0	100%	千元	
	參與計畫人力 （本國籍）	碩士生	3	0	100%	人次	
		博士生	1	0	100%		
		博士後研究員	0	0	100%		
		專任助理	0	0	100%		
國外	論文著作	期刊論文	0	0	100%	篇	
		研究報告/技術報告	0	0	100%		
		研討會論文	0	0	100%		
		專書	0	0	100%		章/本
	專利	申請中件數	0	0	100%	件	
		已獲得件數	0	0	100%		
	技術移轉	件數	0	0	100%	件	
		權利金	0	0	100%	千元	
	參與計畫人力 （外國籍）	碩士生	0	0	100%	人次	
		博士生	0	0	100%		
		博士後研究員	0	0	100%		
		專任助理	0	0	100%		

<p>其他成果 (無法以量化表達之成果如辦理學術活動、獲得獎項、重要國際合作、研究成果國際影響力及其他協助產業技術發展之具體效益事項等，請以文字敘述填列。)</p>	<p>無</p>
--	----------

	成果項目	量化	名稱或內容性質簡述
科 教 處 計 畫 加 填 項 目	測驗工具(含質性與量性)	0	
	課程/模組	0	
	電腦及網路系統或工具	0	
	教材	0	
	舉辦之活動/競賽	0	
	研討會/工作坊	0	
	電子報、網站	0	
	計畫成果推廣之參與(閱聽)人數	0	

國科會補助專題研究計畫成果報告自評表

請就研究內容與原計畫相符程度、達成預期目標情況、研究成果之學術或應用價值（簡要敘述成果所代表之意義、價值、影響或進一步發展之可能性）、是否適合在學術期刊發表或申請專利、主要發現或其他有關價值等，作一綜合評估。

1. 請就研究內容與原計畫相符程度、達成預期目標情況作一綜合評估

達成目標

未達成目標（請說明，以 100 字為限）

實驗失敗

因故實驗中斷

其他原因

說明：

2. 研究成果在學術期刊發表或申請專利等情形：

論文： 已發表 未發表之文稿 撰寫中 無

專利： 已獲得 申請中 無

技轉： 已技轉 洽談中 無

其他：（以 100 字為限）

3. 請依學術成就、技術創新、社會影響等方面，評估研究成果之學術或應用價值（簡要敘述成果所代表之意義、價值、影響或進一步發展之可能性）（以 500 字為限）

本計畫的研究結果，我們利用 sGASP 系統和爪蟾卵母細胞(Xenopus oocyte)表現系統完成所有突變點的分析。在細胞模式研究系統，我們也建構好所有的表現質體並分析完所有突變點在細胞內的表現位置。整體來說此計畫的結果是符合我們當初對於計畫內容所要追求的目標。此計畫的成果也提供相關的資訊做為後續研究 TMPRSS3 基因造成非症候群聽障致病機轉的參考。另外延續性的實驗，也開始進行。如 TMPRSS3 下游作用基因的研究。