

國立臺灣大學醫學院生物化學暨分子生物學研究所

碩士論文

Graduate Institute of Biochemistry and Molecular Biology

College of Medicine

National Taiwan University

Master Thesis

一段潛藏的核仁定位訊號在 SP110 蛋白功能的作用

The role of a cryptic nucleolar-localization signal in SP110

protein function

顏廷涓

Ting-Chuan Yen

指導教授：顏伯勳 博士

Advisor: Bo-Shiun Yan, Ph.D.

中華民國 111 年 10 月

October, 2022



國立臺灣大學碩士學位論文

口試委員會審定書

MASTER'S THESIS ACCEPTANCE CERTIFICATE  
NATIONAL TAIWAN UNIVERSITY

一段潛藏的核仁定位訊號在 SP110 蛋白功能的作用

The role of a cryptic nucleolar-localization signal  
in SP110 protein function

本論文係 顏廷涓 R09442016 在國立臺灣大學 生物化學暨  
分子生物學研究所 完成之碩士學位論文，於民國 111 年 10 月 21  
日承下列考試委員審查通過及口試及格，特此證明。

The undersigned, appointed by the Department / Institute of Biochemistry and Molecular Biology  
on 21<sup>st</sup>, October, 2022 have examined a Master's thesis entitled above presented by  
Ting-Chuan, Yen R09442016 candidate and hereby certify that it is worthy of acceptance.

口試委員 Oral examination committee:

顏伯勳

詹世鵬

蘇俊毅

(指導教授 Advisor)

系主任/所長 Director:

李明傑

## 誌謝



兩年多的時間轉眼就飛逝了，感覺好像戰戰兢兢的面對入學的口試還是昨天的事，在研究所的這兩年收穫了許多，包括訓練了我對不同領域及對實驗的想法有更多不同面向的了解，而這些都要仰賴於所有我遇到的老師、學長姐以及同學們。首先非常感謝顏伯勳老師讓我進到老師的實驗室學習，我的個性比較慢熱也不夠主動，能夠順利完成碩士論文要謝謝老師對我的包容及指導，老師總是會很認真又耐心的一一解答我們在課業及實驗上的疑問，也很關心我們平常的生活上所遇到的狀況，讓我在研究所能度過豐富且愉快的時光。接著也感謝總是不遺餘力地提供許多幫助的所宜學姐，從剛進實驗室面對新環境的茫然，到之後對進行沒有操作過的實驗的無措，都是因為有學姐一步步的引導和講解，並無私地分享自己經驗，給了我們很大的安全感讓我能逐漸熟悉實驗室的一切。還要感謝在我的實驗上提供了非常大幫助的家禹學長，謝謝學長花費了許多的時間帶領我進行實驗和分析討論實驗結果，也在我遇到困難的時候提出各種解決的方式讓我的實驗可以順利的進行，也感謝宣如學姐在每次我尋求幫忙的時候都給予認真耐心的答覆和幫助。同時，很感謝我的同窗好友姿吟和儀均的陪伴，除了在平時相處中一起笑鬧，也在大大小小的報告和實驗中相互鼓勵並提供我許多幫助，也感謝羨敏很快地融入我們，讓我在研究所的生活中充滿許多歡笑的同時也共同進步。最後感謝我的家人朋友，謝謝我的父母總是尊重並支持我的想法，也給我最堅實的後盾讓我不需有後顧之憂的念完研究所，謝謝我的弟弟自己也在研究所忙碌的同時，給予我許多的鼓勵，也謝謝所有鼓勵支持我的朋友，因為這麼多人的幫助我才能如此順利的完成碩士的學業，在此感謝一路遇到所有人。

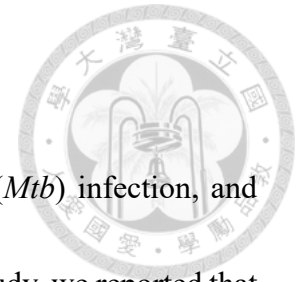
## 摘要



肺結核(tuberculosis, TB)是由結核分枝桿菌(*Mycobacterium tuberculosis*, *Mtb*)感染所引起的疾病，在先前的研究中已知，受干擾素(interferons, INFs)調控表現的核蛋白 SP110，可藉由調控先天免疫反應來對抗病原體的感染。此外，*SP110* 的基因多態性(genetic polymorphisms)與宿主對肺結核的易感性相關。SP110 蛋白是 SP100/SP140 蛋白家族中的一員，這類蛋白會在細胞核中與核小體(nuclear bodies, NBs)共定位(co-localization)形成聚集體。許多核小體蛋白在轉錄、細胞分化、細胞凋亡、老化和對 DNA 受損及感染的反應中扮演很重要的作用。在實驗室先前的研究中，確認在 SP110 蛋白的中間區域具有兩段核定位訊號(nuclear localization signal, NLS)，且透過綠色螢光蛋白標定 SP110<sup>275-314</sup> (NLS1) 的蛋白定位表現，發現 NLS1 可能是一個潛藏的核仁定位訊號(nucleolar localization signal, NoLS)。然而雖然有核仁定位訊號的存在，表現在 H1299 肺癌細胞中的 SP110b 蛋白也只有很低的比例(小於 5%)會使 SP110b 蛋白定位在核仁。實驗室近期的研究中發現，在微氧環境下 SP110b 蛋白會大幅轉移到核仁。且發現核仁定位訊號突變的 SP110b Mut1+3 突變蛋白，即使在常氧環境下也會有很高的比例定位在核仁。為了探索 NoLS 在 SP110 蛋白中的作用，本研究產生一系列突變 NoLS 的 SP110b 突變蛋白，並建立持續表現 SP110b 突變蛋白的 H1299 單一細胞株。接著分析 NoLS 的突變對 SP110b 在細胞中定位的影響，並進一步了解在面對微氧壓力時，細胞定位對 H1299 肺癌細胞生長的影響，以探討 NoLS 對 SP110b 功能的作用。

關鍵字：SP110、細胞定位、核定位訊號、核仁定位訊號、微氧壓力

## Abstract



Tuberculosis (TB) is caused by *Mycobacterium tuberculosis* (*Mtb*) infection, and host genetics contribute to the infection outcomes. In our previous study, we reported that *SP110* gene, which encodes an interferons (IFNs)-induced nuclear protein, is a genetic determinant that confers host innate immunity to *Mtb* infection. The SP110 protein is a member of SP100/SP140 protein family, and these proteins form aggregations that co-localize with nuclear bodies (NBs) in the nucleus. Many NB proteins have been revealed to play a key role in the regulation of transcription, cell division, apoptosis, senescence, and response to DNA damage or pathogen infection. Protein structural analyses showed that the SP110 contains several functional domains and may function as a transcriptional co-activator or co-repressor. Recently, two potential nuclear localization signals (NLSs) in the middle region of the SP110 protein have been identified. Besides, one of the NLSs, NLS1, has been demonstrated to direct the SP110 protein into the nucleolus, indicating that the NLS1 is a cryptic nucleolar localization signal (NoLS). Although there is an NoLS in SP110 protein, the protein localized to the nucleolus at a low frequency in H1299 lung cancer cell. However, our recent studies showed that the percentage of nucleolar-localized SP110 protein would significantly increase under hypoxia. To explore the role of the NoLS in the SP110 protein, SP110b mutants with a series of mutated NoLS were generated in this study. Their cellular localization as well as their effect on cell death were

examined to clarify the role of the NoLS in the SP110 function.



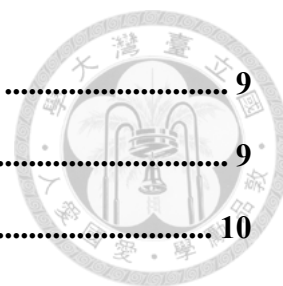
Key words: SP110, Cellular localization, Nuclear localization signal (NLS), Nucleolar localization signal (NoLS), Hypoxia

# 目錄



誌謝 .....	i
摘要 .....	ii
Abstract .....	iii
圖目錄 .....	vii
附錄 .....	viii
<b>Chapter 1 緒論 .....</b>	<b>1</b>
1.1 肺結核 (Tuberculosis, TB) .....	1
1.2 SP110.....	2
1.3 核定位訊號 (nuclear localization signal, NLS) .....	3
1.4 核仁 (nucleolus) .....	3
1.5 核仁定位訊號 (nucleolar localization signal, NoLS) .....	4
1.6 微氧環境 (hypoxia) .....	5
1.7 研究目標 .....	5
<b>Chapter 2 實驗材料與方法 .....</b>	<b>6</b>
2.1 細胞株和細胞培養 .....	6
2.2 質體 (Plasmids).....	6
2.3 細胞轉染 (Transfection) .....	7
2.4 慢病毒生產 (Lentivirus production) .....	7
2.5 慢病毒轉導 (Lentivirus transduction) .....	7
2.6 單細胞克隆 (Single clones selection) .....	8
2.7 西方墨點法 (Western blot) .....	8
2.8 免疫螢光染色 (Immunofluorescence staining) .....	8

2.9	細胞群落形成分析 (Colony formation assay, CFA) .....	9
2.10	細胞存活率分析 (MTT assay) .....	9
2.11	統計分析 .....	10
<b>Chapter 3</b>	<b>結果 .....</b>	<b>11</b>
3.1	建構 SP110b 突變株質體 .....	11
3.2	確認細胞中 SP110b 蛋白表現 .....	12
3.3	建立 SP110b 突變體單一細胞株 .....	12
3.4	NoLS 突變影響 SP110b 定位在核仁的比例.....	13
3.5	SP110b 定位影響 H1299 細胞群落生長 .....	14
3.6	SP110b 定位影響 H1299 細胞生長趨勢 .....	15
<b>Chapter 4</b>	<b>結論與討論 .....</b>	<b>16</b>
<b>Chapter 5</b>	<b>參考資料 .....</b>	<b>19</b>
<b>Chapter 6</b>	<b>圖附錄 .....</b>	<b>23</b>
<b>Chapter 7</b>	<b>附錄 .....</b>	<b>45</b>





## 圖目錄



Figure 1. 建構 pHAGE-CMV-eGFP-SP110b Mut1+2+3 質體示意圖 .....	25
Figure 2. 表現 SP110b 蛋白在 HEK293T 細胞.....	26
Figure 3. 建構 Tet-on 系統質體 .....	27
Figure 4. 表現 SP110b 蛋白在 H1299 細胞.....	28
Figure 5. H1299 SP110b Mut 1+3 單一細胞株螢光表現.....	29
Figure 6. H1299 SP110b Mut 1+2+3 單一細胞株螢光表現 .....	30
Figure 7. 確認單一細胞株中 SP110b 蛋白的表現 .....	31
Figure 8. 常氧環境下 SP110b 蛋白的定位表現 .....	33
Figure 9. 微氧環境下 SP110b 蛋白的定位表現 .....	35
Figure 10. 常氧環境細胞群落分析.....	37
Figure 11. 微氧環境下細胞群落分析.....	39
Figure 12. 常氧環境下細胞生長趨勢.....	41
Figure 13. 微氧環境下細胞生長趨勢.....	43
Figure 14. SP110b 蛋白中核仁定位訊號作用機制假說模型 .....	44

# 附錄



Appendix 1. SP110 蛋白中的 NLS1 為潛在的核仁定位訊號 .....	45
Appendix 2. 微氧環境下 eGFP-SP110b 的細胞分佈 .....	46
Appendix 3. 常氧環境下 SP110b 突變體的細胞分佈 .....	47
Appendix 4. 北方墨點法分析結果 .....	48
Appendix 5. 本研究中所使用質體列表 .....	49
Appendix 6. 本研究中所使用引子清單 .....	50

# Chapter 1 緒論



## 1.1 肺結核 (Tuberculosis, TB)

肺結核(tuberculosis, TB)是由結核分枝桿菌(*Mycobacterium tuberculosis, Mtb*)感染所引起的疾病，肺結核的臨床症狀包括咳嗽、咳血、胸痛、發燒、體重減輕、盜汗等，若沒有進行適當的治療會有很高的致死率。根據統計，全球每年約有 100 多萬人死於肺結核，甚至在近兩年來由於 COVID-19 的大流行使醫療資源受到壓縮，肺結核的罹患人數及死亡人數都有增加的趨勢。其實大多肺結核患者若進行妥善治療是可以被治癒的，但由於藥物的濫用和不適當的用藥方式導致結核桿菌突變產生抗藥性菌株，其中，對一線藥物異煙肼 (Isoniazid) 和利福平 (Rifampin) 具有抗藥性的菌株稱為多重抗藥性結核病 (multidrug-resistant tuberculosis, MDR TB)。MDR TB 大幅降低了治療的成功率，甚至更進一步產生對治療多重抗藥性結核病的氟喹諾酮類 (Fluoroquinolone) 抗生素及二線藥物也具抗藥性的廣泛性抗藥性結核病 (extensively drug-resistant tuberculosis, XDR TB)，造成了全球性傳染病防治的嚴重問題 [1, 2]。

全世界約有四分之一的人口曾被結核分枝桿菌感染，大多數感染者可以藉由自身的免疫反應對抗結核分枝桿菌感染抑制結核分枝桿菌的生長，但其中約有 10% 的感染者會患有臨床疾病 [3]，這樣的情況除了環境因素或是疾病造成的免疫低下之外，也與宿主的基因多態性 (genetic polymorphisms) 有關 [4-6]。在先前的研究中已發現，小鼠中的 *Ipr1* (intracellular pathogen resistance 1) 基因及人類的同源基因 *SP110* 基因會參與調控結核分枝桿菌感染後宿主的先天性免疫反應 (innate immunity)，從而影響宿主對肺結核的易感性 (susceptibility) [7, 8]。



## 1.2 SP110

在真核細胞 (eukaryotic cells) 的細胞核 (nucleus) 中含有一些沒有模的結構，稱為核小體 (nuclear bodies, NBs)。許多核小體蛋白在轉錄 (transcription)、細胞分化 (cell division)、細胞凋亡 (apoptosis)、老化 (senescence) 和對 DNA 受損 (DNA damage) 及感染 (infection) 的反應中扮演很重要的作用 [9, 10]。其中 SP110/SP140 家族中的蛋白為核小體蛋白中的一種，又被稱作斑點蛋白 (speckled proteins, SPs)，因為他們會在細胞核中的大分子結構共定位 (co-localization) 形成聚集體 [11]。而由 *SP110* 基因編碼出的 SP110 蛋白是屬於 SP110/SP140 蛋白家族中的一員，是一種核蛋白 [12]。SP110 蛋白有三種主要的同源異構型 (isoforms)，分別為 SP110a/b/c，而在所有同源異構型中，又以 SP110b 與小鼠中同源蛋白 Ipr1 的結構最為相似。另外由蛋白結構的分析得知，SP110 蛋白包含 SP100 domain、SAND domain、PHD finger 及 bromodomain 這些功能域 (functional domain)，根據這些功能域推測 SP110 可作為轉錄調節因子幫助調控轉錄 [11]。

*SP110* 基因表現會受到干擾素 (interferons, INFs) 所調控 [13]，表示 SP110 的功能與免疫有關，也已有許多研究表明 *SP110* 的基因多態性與肺結核易感性相關 [14-17]。在實驗室先前的研究中發現，SP110b 可以藉由其 N 端片段 (N-terminal region) 與 nuclear factor- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) 的亞基 (subunit) p50 交互作用來調控 NF- $\kappa$ B 的轉錄活性 (transcriptional activity)，而下調腫瘤壞死因子 (tumor necrosis factor- $\alpha$ , TNF $\alpha$ ) 啟動子 (promoter) 的活性從而降低 TNF $\alpha$  的表現，並上調 NF- $\kappa$ B 誘導的抗細胞凋亡基因的表現，減低 IFN- $\gamma$  誘導造成的巨噬細胞死亡，避免宿主在對抗感染時自身過度的免疫反應引起的損傷 [15, 18]。




### 1.3 核定位訊號 (nuclear localization signal, NLS)

核定位訊號 (nuclear localization signal, NLS) 主要是由離氨酸 (lysine, K) 及精氨酸 (arginine, R) 的鹼性氨基酸短序列組成，並由內輸蛋白 (importin) 辨識並進行結合，幫助帶有核定位訊號的蛋白通過核孔複合體 (nuclear pore complex, NPC) 運輸 (transport) 至細胞核[19]。典型的核定位訊號分為兩類，一種是單分子核定位訊號 (monopartite NLS)，是由一組 4-8 個鹼性氨基酸組成的序列，另一種是雙分子核定位訊號 (bipartite NLS)，由兩組鹼性氨基酸序列組成，且兩組之間會被 10-12 個氨基酸隔開，兩組鹼性氨基酸序列需同時存在才可作用[19]。

在實驗室先前對 SP110 蛋白結構分析的研究中，已確認了 SP110 蛋白的中間區域具有兩段核定位訊號，分別稱為 NLS1 及 NLS2，其中 NLS1 中帶有三組離氨酸/精氨酸的集中簇 (lysine/arginine-rich (KR) clusters, 後文簡稱為 KR cluster)[18]。並為了更進一步確認 NLS1 的類型，透過分別將 NLS1 中三組 KR clusters 的正電荷氨基酸替換為不帶電的丙氨酸 (alanine, A)，或同時替換兩組 KR clusters 正電荷氨基酸的 SP110 片段突變體，以綠色螢光蛋白標定進行定位分析。根據結果可以將這三組 KR clusters 分成一組單分子核定位訊號 (cluster 1) 及一組雙分子核定位訊號 (cluster 2+3)，表示在 NLS1 中同時包含兩組典型的核定位訊號。並且又透過綠色螢光蛋白標定的 SP110 (a.a.275-314) (NLS1) 之定位表現，發現有與核仁蛋白 (nucleolin) 共定位 (co-localization) 的現象，因此 NLS1 同時可能是一段核仁定位訊號 (nucleolar localization signal, NoLS) [18] (Appendix 1)。

### 1.4 核仁 (nucleolus)

核仁 (nucleolus) 是真核細胞的細胞核中最明顯且沒有膜包覆的結構，每個細胞中的核仁數目、大小及形狀會依的細胞種類、生理狀況等等而定[20]。核仁主要是由核糖體 DNA (ribosomal DNA, rDNA)、核糖體 RNA (ribosomal RNA, rRNA)



及蛋白質所組成，目前從純化的核仁中已鑑定出多種不同的人類蛋白，但對於其中大部分蛋白的功能及核仁定位訊號還不明確[20]。核仁蛋白的組成會隨細胞的情況而產生動態變化，表示核仁會因應不同的條件參與不同的調控，因而表示對於蛋白的核仁定位需要嚴格的調控 [20, 21]。而目前核仁最明確的功能是核糖體的生合成 (ribosomal biogenesis)，包含 rRNA 的合成、加工及核糖體的組裝[22]。但也已有許多研究表明，核仁也會參與調控有絲分裂 (mitosis) [23]、細胞週期進程 (cell cycle progression) [24]、應激反應 (stress response) [25] 等其他功能，並有許多研究顯示核仁功能與許多疾病 [26]包括癌症 [27]、病毒感染 [28]、神經退化性疾病 [29, 30]等相關。

## 1.5 核仁定位訊號 (nucleolar localization signal, NoLS)

核仁定位訊號 (nucleolar localization signal, NoLS) 是一段幫助蛋白定位到核仁的短片段序列，通常認為是通過與核仁的主要組成包括核糖體 DNA (ribosomal DNA, rDNA)、核糖體 RNA (ribosomal RNA, rRNA) 或蛋白的交互作用使蛋白定位在核仁[31]。相較於核定位訊號，核仁定位訊號較沒有明確的特徵，但有許多核仁定位訊號序列富含鹼性氨基酸—離氨酸及精氨酸，並會與核定位訊號重疊 [31]。

而在實驗室先前的研究中，一般常氧環境 (normoxia) 培養下沒有觀察到表現在 HEK293T 細胞中的 SP110b 蛋白會定位在核仁，但表現在 H1299 肺癌細胞中的 SP110b 蛋白會有小於 5% 的比例定位在核仁 [18]，因此我們認為 NLS1 可能是一段潛在的核仁定位訊號，推測 SP110 蛋白會依據環境條件或是細胞類型來調控核仁定位的狀況，而本篇研究中進一步的推測 SP110b 蛋白在核仁的定位與癌症具有關聯性。



## 1.6 微氧環境 (hypoxia)

在腫瘤微環境 (tumor microenvironment, TME) 中，由於腫瘤細胞的快速生長會大量消耗氧氣，加上周圍異常增生的血管減少了氧氣的運輸，使血液供氧不足而造成缺氧的環境[32]。而癌細胞會因應微氧的環境改變基因的表現、影響細胞代謝、抑制細胞凋亡、促進細胞侵襲及轉移等等，來增加癌細胞的存活[32]。因此本篇研究中將細胞培養在 0.5% O<sub>2</sub>、5% CO<sub>2</sub>、37°C 的微氧環境 (hypoxia)，來模擬癌細胞在人體中的生長環境。

## 1.7 研究目標

在實驗室進行的研究中，已經確定培養在微氧環境 (hypoxia) 下表現在 H1299 肺癌細胞中的 SP110b 蛋白，相較於常氧環境下會有更高的比例定位在核仁 (Appendix 2)，表示當細胞處在微氧的壓力下會促使 SP110b 蛋白轉移 (translocation) 到核仁。研究中並參考了一篇探討 MDM2 中核仁定位訊號的論文中對 NoLS 進行突變的實驗 [33]。本研究發現 NoLS 中 KR clusters 突變的 SP110b 突變體蛋白，即便在常氧環境下，H1299 細胞中表現的突變型 SP110b 也會有較高的比例定位在核仁，尤其是 SP110b Mut1+3 及 SP110b Mut2+3 的組別 (Appendix 3)。

在本論文研究中，首先會先建構將三個 KR clusters 都進行突變的質體，以完整建立 NoLS 突變的 SP110b 突變體，並接著分析 NoLS 的突變對 SP110b 蛋白在細胞中定位的影響，之後再更進一步去探討 SP110b 蛋白的核仁定位對於細胞功能所造成的影響。

## Chapter 2 實驗材料與方法



### 2.1 細胞株和細胞培養

本篇研究中使用人類胚胎腎臟細胞株 (human embryonic kidney cell line) HEK293T, 及人類非小細胞肺癌細胞株 (human non-small cell lung cancer cell line) H1299, 以 RPMI 1640 培養液培養細胞, 培養液中含有青黴素、鏈黴素 (Penicillin/Streptomycin) 及 7.5% 和 12.5% 不含四環黴素的胎牛血清 (tetracycline-free FBS), 在常氧環境 (normoxia) 下 5% CO<sub>2</sub>、37°C 的細胞培養箱, 和在微氧環境 (hypoxia) 0.5% O<sub>2</sub>、5% CO<sub>2</sub>、37°C 的細胞培養箱進行培養。

### 2.2 質體 (Plasmids)

本篇使用實驗室嘉勳學長已建構的 pHAGE-CMV-eGFP-SP110b mut1+3 質體和 Mut2 引子 (primer), 利用 QuikChange Lightning Multi Site-Directed Mutagenesis Kit (Agilent Technologies) 以聚合酶連鎖反應 (Polymerase Chain Reaction, PCR) 將 SP110b NLS1 中的 KR cluster 2 進行突變 (mutagenesis), 再通過轉型作用 (transformation) 將質體送入大腸桿菌 (*Escherichia coli*) DH5  $\alpha$  菌株。

為了方便後續調控基因的表現, 利用限制酵素將上述突變成功的 SP110b 片段置換到 pHAGE-TRE-eGFP-SP110b-UBC-rtTA-IRES-LNGFR 質體上, 可以藉由去氧羥四環素 (doxycycline, Dox) 誘導基因的表現。本篇中所使用的質體及引子清單列於附錄中 (Appendix 1&2)。





## 2.3 細胞轉染 (Transfection)

在六孔盤 (6-well plate) 中每孔分種  $5 \times 10^5$  顆 HEK293T 細胞，細胞貼盤後更換新鮮 RPMI 培養液，在每孔中加入混合均勻的 2.5  $\mu\text{g}$  的質體 DNA、5  $\mu\text{l}$  的 T-pro NTR II Transfection Reagent 及 30  $\mu\text{l}$  的無血清 RPMI 培養液，培養一至兩天後進行觀察及後續實驗。

## 2.4 慢病毒生產 (Lentivirus production)

在 10 公分培養盤中分種  $5 \times 10^6$ - $10^7$  顆 HEK293T 細胞，細胞貼盤後加入與無血清 RPMI 混合的 Lipofectamine 3000 reagent、P3000 reagent、2.5  $\mu\text{g}$  pHDM-gag、2.5  $\mu\text{g}$  pRCL-rev1b、2.5  $\mu\text{g}$  pHDM-tat1b、5  $\mu\text{g}$  pHDM-VSVG 的病毒質體與 4.3  $\mu\text{g}$  的表現質體，六小時後更換新鮮 RPMI 培養液，收取轉染後 24 小時及 48 小時的培養液，以 0.22  $\mu\text{m}$  過濾器過濾並分裝後置於  $-80^\circ\text{C}$  保存。

## 2.5 慢病毒轉導 (Lentivirus transduction)

在六孔盤 (6-well plate) 中每孔分種  $2 \times 10^5$  顆 H1299 細胞，加入 1 ml 置備好的含有慢病毒的培養液及 polybrene (10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ )，室溫下以 1000  $\times g$  離心一小時，在  $37^\circ\text{C}$  培養箱培養六小時後，更換新鮮 RPMI 培養液，並加入 doxycycline (2  $\mu\text{g}/\text{ml}$ )，48 小時後透過螢光顯微鏡觀察綠色螢光蛋白 (eGFP) 的表現，以確認感染的效率。



## 2.6 單細胞克隆 (Single clones selection)

將感染成功後的 H1299 細胞，以一孔一顆細胞的比例分種至 96 孔盤 (96-well plate) 中進行培養，約培養 7-14 天後篩選出單細胞克隆，並加入 doxycycline (2  $\mu\text{g/ml}$ ) 培養 48 小時後，透過螢光顯微鏡觀察綠色螢光蛋白的表現。


## 2.7 西方墨點法 (Western blot)

將細胞透過 RIPA buffer (10 mM sodium phosphate, 150 mM NaCl, 1% NP-40, 0.25% sodium deoxycholate, 0.1% SDS [pH 7.2], protease inhibitor 及 phosphatase inhibitor) 置於冰上作用 30 分鐘進行裂解後，在 4°C 下以 15000 rpm 離心 10 分鐘後，收取含有蛋白的上清液，再透過 BCA protein assay kit (Pierce Biotechnology) 以波長 560 nm 測量蛋白濃度來進行蛋白定量，並用 5x sample buffer 進行蛋白樣品配置再以 95°C 加熱 15 分鐘使蛋白完全變性。

配置 8-10% 的 SDS-PAGE 膠體，並架設 Bio-Red 電泳裝置，以上膠 80V、下膠 120V 將蛋白以大小進行分離，再透過濕式轉漬以 100V、90 分鐘將蛋白轉漬 (transfer) 到聚偏氟乙烯膜 (PVDF membrane)，之後以 5% 脫脂牛奶阻斷 (blocking) 一小時，再依序作用一級抗體 4°C 至隔天和二級抗體室溫一小時，最後以 HRP 酵素冷光試劑 (Immobilon Western HRP substrate, Millipore) 來進行呈色。

## 2.8 免疫螢光染色 (Immunofluorescence staining)

將直徑 10 mm 圓形蓋玻片放置於 12 孔盤 (12-well plate) 中，以 UV 照射 30 分鐘，在每孔分種  $5 \times 10^4$  顆 H1299 細胞，並加入 doxycycline (2  $\mu\text{g/ml}$ ) 作用兩天後，去除培養液，以 1x PBS 潤洗兩次，以 4% 三聚甲醛 (Paraformaldehyde, PFA) 在室溫下避光作用 20 分鐘進行固定 (fixation)，再以 1x PBS 潤洗兩次，以 0.1%



Triton X-100 (Sigma-Aldrich) 作用 20 分鐘進行細胞穿孔 (permeabilization)，之後再以 1x PBS 潤洗兩次。接著，在室溫下用抗核仁蛋白 (anti-nucleolin, Thermo) 的一級抗體以 1：500 的比例作用 1.5 小時後，以 1x PBS 潤洗三次，再利用帶有紅色螢光的山羊抗小鼠二級抗體 (Alexa Fluor™ 594 goat anti-mouse antibody, Thermo) 作用 1.5 小時，以 1x PBS 潤洗三次，再以 1：100000 的比例稀釋 Hoechst (Sigma) 作用 20 分鐘，以 1x PBS 潤洗兩次，最後用 Mounting buffer (Thermo) 將蓋玻片封片至載玻片上，再透過共軛焦顯微鏡 (confocal microscopy) Leica SP5 和 Zeiss LSM880 進行後續螢光拍攝及觀察。

## 2.9 細胞群落形成分析 (Colony formation assay, CFA)

在六孔盤 (6-well plate) 中每孔分種 500 顆 H1299 細胞，使細胞均勻分布於培養盤中，於常氧或微氧環境下培養 7-9 天，去除培養液後，以 1x PBS 潤洗兩次，以 4% 三聚甲醛在室溫下避光作用 30 分鐘進行固定，再以 1x PBS 潤洗兩次，加入用 0.45  $\mu\text{m}$  過濾器過濾後 1：10 稀釋的吉姆薩染劑 (Giemsa stain, ) 作用至隔天，以去離子水潤洗多次，最後進行計數統計。

## 2.10 細胞存活率分析 (MTT assay)

在 96 孔盤 (96-well plate) 中每孔分種 500 顆或 1000 顆 H1299 細胞，去除培養液後，加入 1：10 混合的 50 mg/ml MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) 及新鮮的 RPMI 培養液，在 37°C 下作用三小時後，再將培養液去除，加入 100  $\mu\text{l}$  DMSO 溶解紫色結晶，以波長 595 nm 測吸光值推算細胞存活率。

## 2.11 統計分析

本篇研究數據利用 GraphPad Prism 軟體進行雙因子變異數分析 (Two-way ANOVA)、非成對獨立樣本檢定 (unpaired Student's t-test) 和圖表繪製，P 值小於 0.05 在統計上視為具有顯著差異，圖示中星號數目代表 P 值顯著差異的程度。\*：P<0.05，\*\*：P<0.01，\*\*\*：P<0.005。



## Chapter 3 結果



### 3.1 建構 SP110b 突變株質體

由於實驗室先前已經建構完成表現 SP110b NLS1 中單一 KR cluster 突變和雙 KR clusters 突變的質體，所以為了更深入的探討 NLS1 對 SP110b 蛋白的定位及功能影響，本篇研究首先要建構表現 SP110b NLS1 的三組 KR clusters 突變質體。此實驗利用實驗室先前建構完成的 pHAGE-CMV-eGFP-SP110b mut1+3 質體來進行後續製備，但由於 pHAGE-CMV-eGFP-SP110b mut1+3 為較大片段的質體，不利於進行 PCR 突變 (PCR mutagenesis)，所以先以 SP110-XhoI-forward 和 SP110b549-BglIII-SalI-reverse 作為引子，利用 PCR 放大 SP110b Mut1+3 序列片段後，透過 XhoI 及 BamHI 限制酵素切位將 DNA 序列接入較小片段的 pBluescript KS 載體中 (Figure 1A)。之後再利用 QuikChange Lightning Multi Site-Directed Mutagenesis Kit (Agilent Technologies)，以 Mut2 作為引子進行 PCR 突變 (Figure 1B)。由於 Mut2 序列上帶有限制酵素 PvuII 的切位，所以可以透過 PvuII 切割質體後以膠體電泳篩選成功突變的質體 (Figure 1C)，後續再透過序列確認 (Figure 1D)。最後利用 Tth111I 及 BamHI 限制酵素切位，將 pBluescript KS 載體中成功突變的 SP110b mut1+2+3 片段接回至 pHAGE-CMV 載體中，完成 pHAGE-CMV-eGFP-SP110b mut1+2+3 質體建構 (Figure 1E)，並同樣利用 PvuII 切割後透過膠體電泳篩選 (Figure 1F)，實驗中所使用的質體及引子清單列於附錄中 (Appendix 5 & 6)。




### 3.2 確認細胞中 SP110b 蛋白表現

為了確認 SP110b 蛋白是否可以成功的在細胞中表現，我們將建構好的 pHAGE-CMV-eGFP-SP110b mut1+2+3 質體利用轉染 (transfection) 的方式送入 HEK293T 細胞。由於所送入的質體表現出的 SP110b 蛋白是有綠色螢光蛋白標定的融合蛋白 (fusion protein)，所以在轉染兩天之後，可以利用螢光顯微鏡進行螢光觀察確認蛋白表現 (Figure 2A)，同時也收取細胞蛋白萃取溶液，以及轉染其他 SP110b KR clusters 突變質體的細胞蛋白萃取溶液，以西方墨點法確認 eGFP-SP110b 融合蛋白可以成功在細胞當中表現 (Figure 2B)。

由於希望在後續實驗進行時能夠調控 SP110b 蛋白的表現，所以我們利用 Tet-on 系統藉由加入去氧羥四環素 (doxycycline, Dox) 來控制基因的表現。在實驗室先前研究中，已知 SP110b Mut1+3 蛋白相較於其他雙 KR clusters 突變組別會有最高的比例定位在核仁 (nucleolus) (Appendix 3)，所以本論文研究中分別將 pHAGE-CMV-eGFP-SP110b mut1+3 質體 (Figure 3A) 及 pHAGE-CMV-eGFP-SP110b mut1+2+3 質體 (Figure 3B)，利用 Tth111I 及 BamHI 限制酵素將 SP110b 突變片段置換到 pHAGE-TRE-eGFP-SP110b-UBC-rtTA-IRES-LNGFR 質體 (Figure 3C)，完成本實驗中所有質體建構。

### 3.3 建立 SP110b 突變體單一細胞株

由於先前尚未建立可以持續表現 SP110b 突變體的 H1299 細胞株，所以本論文利用慢病毒感染，分別將 pHAGE-TRE-eGFP-SP110b mut1+3 及 pHAGE-TRE-eGFP-SP110b mut1+2+3 以轉導 (transduction) 的方式送入 H1299 細胞，並加入 doxycycline (2  $\mu$ g/ml) 誘導基因表現，感染兩天後利用螢光顯微鏡觀察細胞帶有綠色螢光的比例，來估算感染的效率 (Figure 4)。由於每顆細胞受到感染的情況不一，在後續實驗要想進一步去探討 SP110b 突變對於細胞的影響，細胞中 SP110b 突變蛋白表



現不平均可能會造成結果的誤差，因此建立單一細胞株 (single clone) 可以避免造成上述的干擾。分別將感染後未加入 doxycycline 的 H1299 細胞，以一孔洞一顆細胞的比例分種至 96 孔盤中，待單一細胞生長後，取部分細胞加入 doxycycline ( $2 \mu\text{g/ml}$ ) 作用兩天後觀察綠色螢光表現，並以螢光表現的情況來篩選單一細胞株。SP110b Mut1+3 組別分別挑選了 A6、C6 及 G11 三組單一細胞株 (Figure 5)，而 SP110b Mut1+2+3 也挑選了 B3、B6、B11 三組單一細胞株 (Figure 6)。而依各細胞株的情況選用了 SP110b Mut1+3 的 C6、G11 及 SP110b Mut1+2+3 的 B3、B11 單一細胞株來進行後續的實驗。因此分別收取 SP110b Mut1+3 的 C6、G11 及 SP110b Mut1+2+3 的 B3、B11 突變細胞株蛋白萃取液，以及 wild-type SP110b H1299 細胞株蛋白萃取液，利用西方墨點法來確認 SP110b 蛋白的表現，並以 eGFP-H1299 細胞株及親代 H1299 細胞株 (parental cell line) 作為控制組 (Figure 7)。

### 3.4 NoLS 突變影響 SP110b 定位在核仁的比例

在先前的研究中已知，SP110 蛋白中間區域的核定位訊號 (nuclear localization signal, NLS) NLS1 具有核仁定位訊號 (nucleolar localization signal, NoLS) 的功能，且在一般常氧環境 (normoxia) 下，表現在 H1299 肺癌細胞的 wild-type SP110b 蛋白有很低的比例會定位於核仁[17]。而實驗室先前的研究中發現，當細胞處於微氧壓力 (hypoxia) 下，wild-type SP110b 蛋白會大幅的轉移 (translocate) 到核仁 (Appendix 2)，並發現表現在 H1299 細胞中 NoLS 突變的 SP110b Mut1+3 蛋白，即便在常氧環境下也會有很高的比例定位在核仁 (Appendix 3)。所以 SP110b NoLS 突變的 H1299 單一細胞株建立後，接著想了解 NoLS 的突變對 SP110b 蛋白分別在常氧及微氧環境下對細胞中分布的影響。

於是本研究將 wild-type SP110b、SP110b Mut1+3 及 SP110b Mut1+2+3 H1299 細胞株，分別培養在常氧及微氧環境，並加入 doxycycline ( $2 \mu\text{g/ml}$ ) 誘導 SP110b 表現，兩天後利用 4%三聚甲醛 (Paraformaldehyde, PFA) 固定 (fixation) 細胞，

並利用 0.1% Triton X-100 (Sigma-Aldrich) 進行細胞穿孔 (permeabilization)，接著再進行免疫螢光染色，最後透過共軛焦顯微鏡 (confocal microscopy) 觀察和拍攝並利用 ZEN offline 軟體輸出影像，最後進行計數統計。

根據觀察及統計結果可以發現在常氧環境時，仍是 SP110b Mut1+3 蛋白會有最高比例定位在核仁，約占比 75%，而 SP110b Mut1+2+3 蛋白定位在核仁的比例約有 50% (Figure 8)。在微氧環境下，與實驗室先前研究結果相符，wild-type SP110b 會大幅轉移到核仁，定位在核仁的比例約占 75%。NoLS 突變的 SP110b 蛋白在核仁的比例雖然只有小幅度的增加，SP110b Mut1+3 蛋白約增加至 80%，而 SP110b Mut1+2+3 蛋白約有 60% (Figure 9)，但是發現蛋白定位在核仁的情況較常氧環境下會更為清楚明顯。

### 3.5 SP110b 定位影響 H1299 細胞群落生長

確定 NoLS 會影響 SP110b 蛋白在細胞中的分佈後，接著我們想探討對於 SP110b 定位在核仁，是否會對 H1299 肺癌細胞的群落生長 (colony formation) 造成影響。所以透過細胞群落形成分析 (Colony formation assay, CFA) 實驗來進行分析。首先將少量的細胞平均種在 6 孔盤中，將每組細胞株分為沒有加入 doxycycline (-Dox) 及有加入 doxycycline (+Dox) 誘導基因表現，再分別放置在常氧環境和微氧環境培養 7-9 天，待單一細胞生長成肉眼可見的細胞群落，之後透過 4% 三聚甲醛 (Paraformaldehyde, PFA) 固定 (fixation) 細胞，並以吉姆薩染劑 (Giemsa stain) 進行細胞群落染色後，以便計數觀察細胞群落生長的能力。

根據實驗結果，我們發現在常氧環境培養時，與沒有加入 doxycycline 誘導 SP110b 蛋白表現相比，SP110b 不論是 wild-type 或是突變體都有抑制 H1299 細胞群落生長的情況 (Figure 10)，而在微氧環境下，與沒有加入 doxycycline 相比，wild-type SP110b 對於細胞群落生長在數量上並沒有顯著的差異，但細胞群落的外觀上較為清晰明顯。而 SP110b Mut1+3 及 Mut1+2+3 都有明顯增加細胞群落生長的情



況，而雖然計數統計上兩種突變沒有明顯差異，但其中 SP110b Mut1+3 組別的細胞群落的外觀表現上更為清晰明顯，相較 SP110b Mut1+2+3 有最佳的細胞群落生長能力(Figure 11)。依據上述結果，我們認為 SP110b 定位在核仁有助於增加 H1299 肺癌細胞在微氧壓力下的細胞群落的生長能力。

### 3.6 SP110b 定位影響 H1299 細胞生長趨勢

接著我們想探討 SP110b 定位在核仁是否會影響 H1299 細胞生長，所以利用 MTT 試驗來分析細胞存活率。首先分別將 500 和 1000 顆細胞分種至 96 孔盤中，分別培養在常氧和微氧環境，將每組細胞株分為沒有加入 doxycycline (-Dox) 及加入 doxycycline (+Dox)，之後分別在常氧培養第 0-5 天和微氧培養第 0-7 天加入 MTT 作用後，利用測量波長 595 nm 的吸光值推算細胞的存活率。

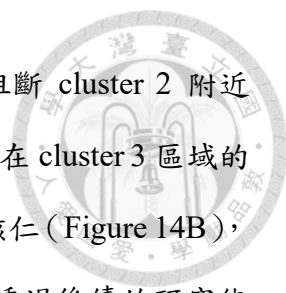
根據實驗結果，在常氧環境培養時，與前述細胞群落生長的結果相似，與沒有加入 doxycycline 誘導基因表現相比，不論是 wild-type 或是突變的 SP110b 都有抑制 H1299 肺癌細胞生長的情況 (Figure 12)。然而在微氧環境下，與沒有加入 doxycycline 相比，wild-type 和突變的 SP110b 都有延緩細胞存活率下降的趨勢，且 SP110b Mut1+3 及 Mut1+2+3 相較於 wild-type SP110b 有更為延緩的趨勢 (Figure 13)。綜合上述結果，我們認為 SP110b 在核仁的定位有助於延緩在微氧環境下 H1299 肺癌細胞的死亡。

## Chapter 4 結論與討論



最初對於 SP110 的研究是由於發現 *SP110* 是小鼠中 *Ipr1* 的同源基因，而 *Ipr1* 的功能是可以藉由調控巨噬細胞活化 (macrophage activation) 和宿主的先天免疫 (innate immunity) 來對抗病原體的感染[5, 6]，因此在目前已有的研究中，對 SP110 大多聚焦於探討與免疫相關的功能或作為轉錄調控因子 (transcriptional regulatory factor) 調控基因表現。而在實驗室先前研究中，探討 SP110 的功能區域 (functional domain) 時，發現 SP110 中的核定位訊號 (nuclear localization signal, NLS) NLS1 具有潛藏的核仁定位訊號 (nucleolar localization signal, NoLS) (Appendix 1)，但在一般常氧 (normoxia) 環境下，表現在 HEK293T 細胞中的 SP110b 蛋白並沒有出現 NoLS 的功能，而在 H1299 肺癌細胞發現只有少數的 SP110b 蛋白 (小於 5%) 定位在核仁 (nucleolus)[17]。接著在實驗室的研究中發現，當細胞處於微氧 (hypoxia) 壓力下時，SP110b 蛋白會有大量比例轉移 (translocate) 到核仁 (Appendix 2)，而此種現象在 H1299 和 CL1-5 肺癌細胞中都有被觀察到。因此我們想進一步去了解 SP110 蛋白中的這段核仁定位訊號，並探討核仁定位與 SP110b 蛋白功能之間的關係。

本研究利用先前研究中已建構表現 SP110 NoLS 中兩組 KR cluster 突變質體的基礎下，建構將三組 KR cluster 皆突變的質體，並在 H1299 細胞建立可調控基因表現的 SP110b NoLS 突變的細胞株。接著將這一系列 NoLS 突變的 SP110b 蛋白進行細胞定位的分析，發現在常氧環境下 SP110b mut1+3 突變蛋白定位在核仁的比例最高 (Appendix 3, Figure 8)。根據此細胞定位的結果我們推測，在 NoLS 中 KR cluster 2 附近是主要發揮 NoLS 功能的區域，而 KR cluster 3 是最主要調控 NoLS 是否能夠執行功能的區域，KR cluster 1 區域則可能是用來輔助 KR cluster 3 的調控，因此 SP110b Mut1+3 突變蛋白會有較高的比例定位在核仁。而我們推測 wide-type SP110b 在微氧環境下會轉移到核仁的一種可能的機制：當細胞在一般常氧環




境時，cluster 3 區域會有細胞內未知的分子結合在上面，從而阻斷 cluster 2 附近 NoLS 發揮功能 (Figure 14A)；而當細胞處於微氧壓力時，結合在 cluster 3 區域的分子會脫離，此時 NoLS 就能發揮功能，使 SP110b 蛋白轉移到核仁 (Figure 14B)，而這個未知分子可能是蛋白分子也可能是核酸分子，希望可以透過後續的研究能夠更進一步去釐清。另外還有一種可能是由於微氧環境下，細胞環境酸鹼值的變化影響 SP110b 蛋白的電性，使蛋白分子的結構發生改變，而讓 NoLS 可以發揮作用，但上述的推測都還需要更多的實驗及分析去驗證我們的猜想。

在後續研究中或許首先可以將 SP110 蛋白的 NLS1 (NoLS) 到 NLS2 的片段 (a.a.275-443) 透過綠色螢光蛋白標定，接著同樣進行本篇研究中一系列 NoLS 的突變，並分別培養在常氧及微氧環境，再進行細胞定位的分析，透過 NLS2 保留核定位訊號功能的同時，觀察 NoLS 的突變是否會對較短片段的融合蛋白與完整 SP110 蛋白有相同的定位結果，也能夠了解 NoLS 是否需要完整的 SP110 蛋白結構才可發揮功能。

在本研究中，對於在微氧環境下的實驗遭遇了一些困難，我們發現當細胞培養在微氧環境時，似乎在培養液中會長出厭氧的微生物，從而影響細胞的生長。但我們嘗試過一些方式，包括更換新鮮培養液前先以 1x PBS 潤洗，或是增加培養液中抗生素的濃度，但都無法有效清除微生物的生長。而由於實驗中需要透過加入去氧羧四環素 (doxycycline) 去誘導基因表現，然而 doxycycline 本身同時作為一種抗生素，難免會抑制微生物的生長。所以會造成一些實驗結果的誤差。像是在 MTT 試驗中原本作為 control 組的親代 H1299 及 eGFP-H1299，在有無加入 doxycycline 時，細胞的存活率就有統計上的顯著差異 (Figure 13A, B)。希望之後在進行微氧環境培養的實驗時，能夠找到有效的方式清除厭氧的微生物，以排除其對實驗結果所造成的影響。

確認 SP110b 蛋白的細胞定位後，根據本研究中對細胞群落生長及細胞存活率的分析所得到的實驗結果，發現在微氧環境下，誘導 SP110b 的表現會促進 H1299




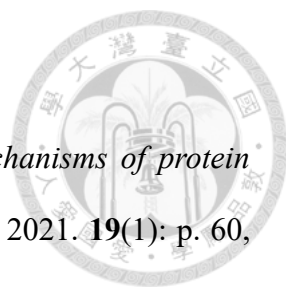
肺癌細胞的群落生長能力，並在細胞面對微氧壓力時延緩細胞的死亡，其中又以 SP110b Mut1+3 組別的差異最為顯著。此外，由於核仁最主要的功能是核糖體的合成 (ribosomal biogenesis)，在實驗室的其他研究中利用北方墨點法對核糖體 RNA (rRNA) 的表現進行分析，發現在微氧環境下誘導 SP110b 的表現，可以抑制 rRNA 的降解及維持 rRNA 的合成 (Appendix 4)。結合前述細胞定位的結果，我們認為在微氧條件下，定位在核仁的 SP110b 蛋白會發揮其功能，使細胞仍可維持 rRNA 的合成，從而增加細胞群落生長的能力和延緩細胞的死亡。未來希望能更進一步去探討在微氧條件下，定位在核仁的 SP110b 蛋白發揮作用的機制，並篩選出可以阻止 SP110b 蛋白定位到核仁的藥物，或許將來能應用在臨床上作為抑制癌細胞生長的基礎。

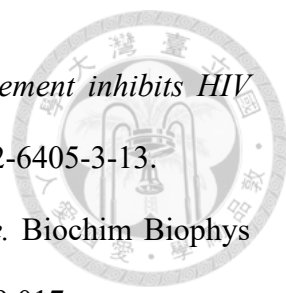
## Chapter 5 參考資料



1. World Health Organization. *Global tuberculosis report* 2022. [https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/tuberculosis] 2022.
2. Centers for Disease Control and Prevention *Tuberculosis (TB)*. 2022; Available from: https://www.cdc.gov/tb/default.htm.
3. F.O. Vannberg, Chapman, S.J., and Hill, A.V., *Human genetic susceptibility to intracellular pathogens*. *Immunol Rev*, 2011. **240**(1): p. 105-16, doi: 10.1111/j.1600-065X.2010.00996.x.
4. J.L. Casanova and Abel, L., *Genetic dissection of immunity to mycobacteria: the human model*. *Annu Rev Immunol*, 2002. **20**: p. 581-620, doi: 10.1146/annurev.immunol.20.081501.125851.
5. A.V. Hill, *The genomics and genetics of human infectious disease susceptibility*. *Annu Rev Genomics Hum Genet*, 2001. **2**: p. 373-400, doi: 10.1146/annurev.genom.2.1.373.
6. C.J. Lynch, Pierce-Chase, C.H., and Dubos, R., *A GENETIC STUDY OF SUSCEPTIBILITY TO EXPERIMENTAL TUBERCULOSIS IN MICE INFECTED WITH MAMMALIAN TUBERCLE BACILLI*. *J Exp Med*, 1965. **121**(6): p. 1051-70, doi: 10.1084/jem.121.6.1051.
7. I. Kramnik, *Genetic dissection of host resistance to Mycobacterium tuberculosis: the sst1 locus and the Ipr1 gene*. *Curr Top Microbiol Immunol*, 2008. **321**: p. 123-48, doi: 10.1007/978-3-540-75203-5\_6.
8. H. Pan, et al., *Ipr1 gene mediates innate immunity to tuberculosis*. *Nature*, 2005. **434**(7034): p. 767-72, doi: 10.1038/nature03419.
9. R. Bernardi and Pandolfi, P.P., *Structure, dynamics and functions of promyelocytic*

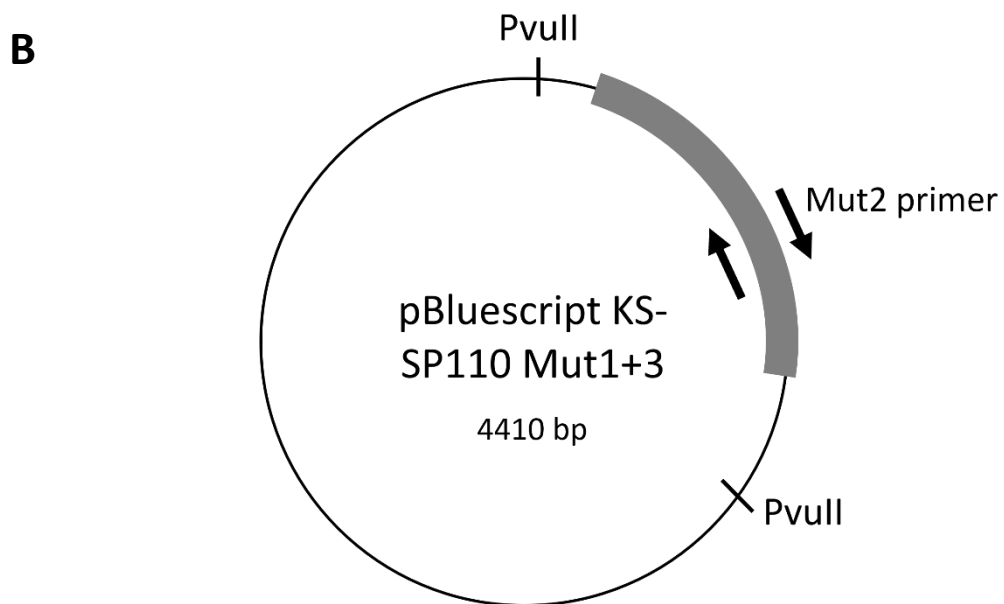
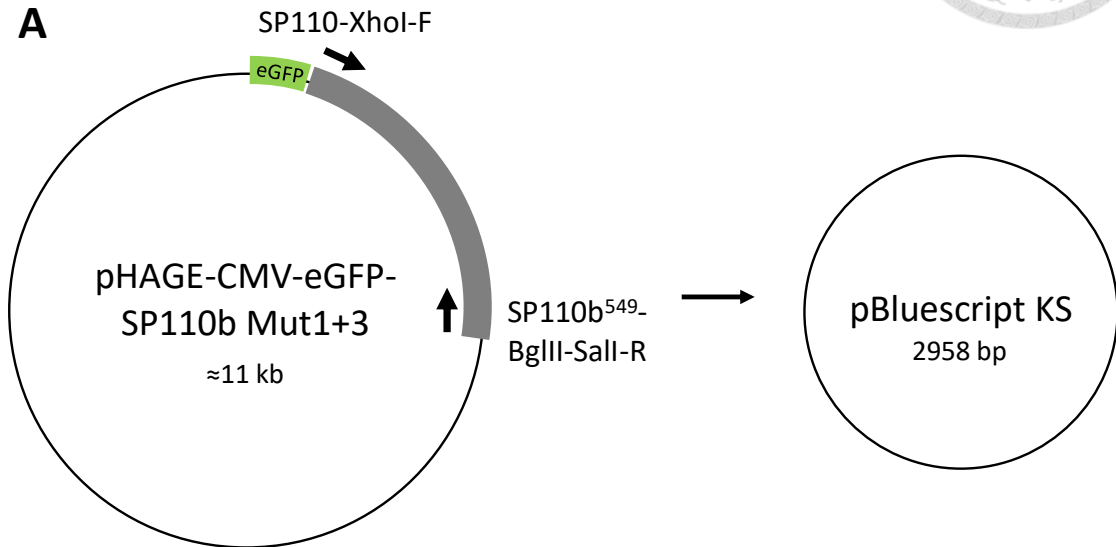
- 
- leukaemia nuclear bodies*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2007. **8**(12): p. 1006-16, doi: 10.1038/nrm2277.
10. V. Lallemand-Breitenbach and de Thé, H., *PML nuclear bodies*. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2010. **2**(5): p. a000661, doi: 10.1101/cshperspect.a000661.
  11. D.B. Bloch, et al., *Sp110 localizes to the PML-Sp100 nuclear body and may function as a nuclear hormone receptor transcriptional coactivator*. Mol Cell Biol, 2000. **20**(16): p. 6138-46, doi: 10.1128/mcb.20.16.6138-6146.2000.
  12. J. Pitkänen and Peterson, P., *Autoimmune regulator: from loss of function to autoimmunity*. Genes Immun, 2003. **4**(1): p. 12-21, doi: 10.1038/sj.gene.6363929.
  13. S. Kadereit, et al., *Molecular cloning of two new interferon-induced, highly related nuclear phosphoproteins*. J Biol Chem, 1993. **268**(32): p. 24432-41, doi: 10.1074/jbc.268.32.24432.
  14. G.J. Fox, et al., *Polymorphisms of SP110 are associated with both pulmonary and extra-pulmonary tuberculosis among the Vietnamese*. PLoS One, 2014. **9**(7): p. e99496, doi: 10.1371/journal.pone.0099496.
  15. J.S. Leu, et al., *SP110b Controls Host Immunity and Susceptibility to Tuberculosis*. Am J Respir Crit Care Med, 2017. **195**(3): p. 369-382, doi: 10.1164/rccm.201601-0103OC.
  16. J.S. Szeszko, et al., *Resequencing and association analysis of the SP110 gene in adult pulmonary tuberculosis*. Hum Genet, 2007. **121**(2): p. 155-60, doi: 10.1007/s00439-006-0293-z.
  17. K. Tosh, et al., *Variants in the SP110 gene are associated with genetic susceptibility to tuberculosis in West Africa*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(27): p. 10364-10368, doi: 10.1073/pnas.0603340103.
  18. J.-S. Leu, et al., *Functional domains of SP110 that modulate its transcriptional regulatory function and cellular translocation*. Journal of Biomedical Science,

- 
2018. **25**(1): p. 34, doi: 10.1186/s12929-018-0434-4.
19. J. Lu, et al., *Types of nuclear localization signals and mechanisms of protein import into the nucleus*. Cell Communication and Signaling, 2021. **19**(1): p. 60, doi: 10.1186/s12964-021-00741-y.
20. L. Stenström, et al., *Mapping the nucleolar proteome reveals a spatiotemporal organization related to intrinsic protein disorder*. Mol Syst Biol, 2020. **16**(8): p. e9469, doi: 10.15252/msb.20209469.
21. T. Miyake and McDermott, J.C., *Nucleolar localization of c-Jun*. Febs j, 2022. **289**(3): p. 748-765, doi: 10.1111/febs.16187.
22. D. Hernandez-Verdun, et al., *The nucleolus: structure/function relationship in RNA metabolism*. Wiley Interdiscip Rev RNA, 2010. **1**(3): p. 415-31, doi: 10.1002/wrna.39.
23. A. Di Bacco, et al., *The SUMO-specific protease SENP5 is required for cell division*. Mol Cell Biol, 2006. **26**(12): p. 4489-98, doi: 10.1128/mcb.02301-05.
24. A.K. Leung, et al., *Quantitative kinetic analysis of nucleolar breakdown and reassembly during mitosis in live human cells*. J Cell Biol, 2004. **166**(6): p. 787-800, doi: 10.1083/jcb.200405013.
25. I. Grummt, *The nucleolus—guardian of cellular homeostasis and genome integrity*. Chromosoma, 2013. **122**(6): p. 487-97, doi: 10.1007/s00412-013-0430-0.
26. L. Hua, et al., *Nucleolus and Nucleolar Stress: From Cell Fate Decision to Disease Development*. Cells, 2022. **11**(19), doi: 10.3390/cells11193017.
27. K. Peltonen, et al., *Small molecule BMH-compounds that inhibit RNA polymerase I and cause nucleolar stress*. Mol Cancer Ther, 2014. **13**(11): p. 2537-46, doi: 10.1158/1535-7163.Mct-14-0256.

- 
28. A. Michienzi, et al., *A nucleolar localizing Rev binding element inhibits HIV replication*. *AIDS Res Ther*, 2006. **3**: p. 13, doi: 10.1186/1742-6405-3-13.
29. J. Lee, et al., *Nucleolar dysfunction in Huntington's disease*. *Biochim Biophys Acta*, 2014. **1842**(6): p. 785-90, doi: 10.1016/j.bbadis.2013.09.017.
30. R. Parlato and Kreiner, G., *Nucleolar activity in neurodegenerative diseases: a missing piece of the puzzle?* *Journal of Molecular Medicine*, 2013. **91**(5): p. 541-547, doi: 10.1007/s00109-012-0981-1.
31. C.-P. Yang, et al., *Identification and characterization of nuclear and nucleolar localization signals in 58-kDa microspherule protein (MSP58)*. *Journal of Biomedical Science*, 2015. **22**(1): p. 33, doi: 10.1186/s12929-015-0136-0.
32. A. Emami Nejad, et al., *The role of hypoxia in the tumor microenvironment and development of cancer stem cell: a novel approach to developing treatment*. *Cancer Cell International*, 2021. **21**(1): p. 62, doi: 10.1186/s12935-020-01719-5.
33. M.A.E. Lohrum, et al., *Identification of a cryptic nucleolar-localization signal in MDM2*. *Nature Cell Biology*, 2000. **2**(3): p. 179-181, doi: 10.1038/35004057.



# Chapter 6 圖附錄

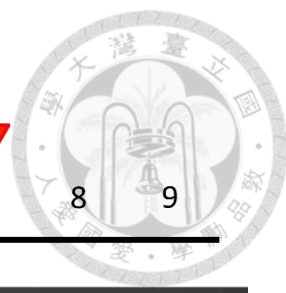


**Mut 2**

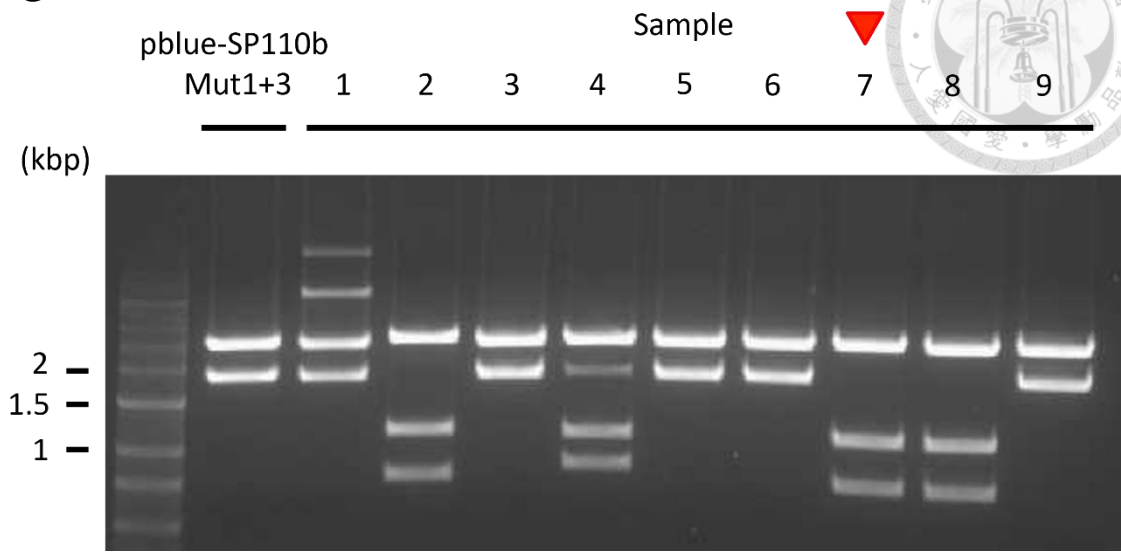
PvuII cut site

Sense : CTGGTCAACTC **CAGCTG** CCGCACATGCTGCCGCAAGCCTCCCAGGAGG

Anti-sense : CCTCCTGGGAGGCTTGCGGCAGCATGTGCGG **CAGCTG** GAGTTGACCAG



C



D

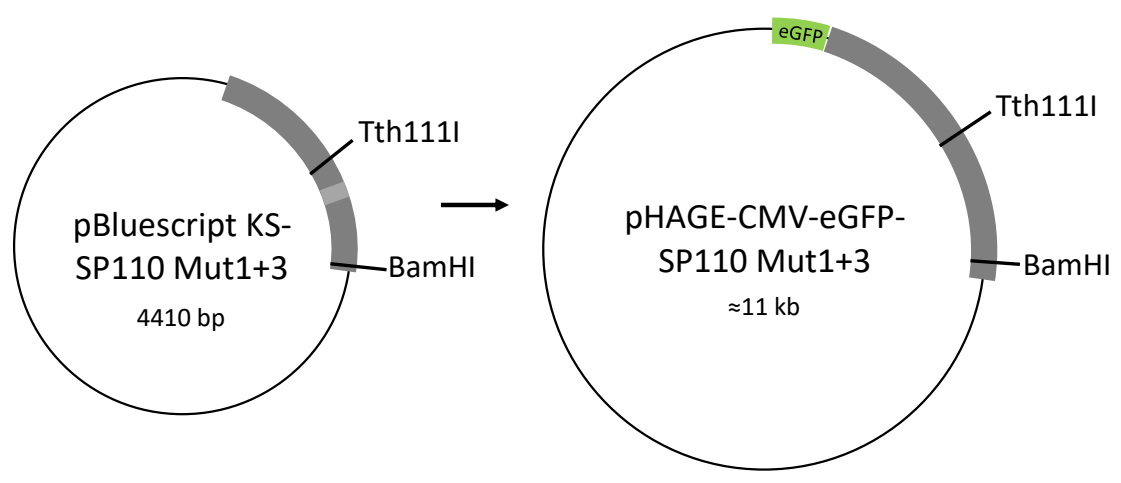
**NLS1 (Mut1+3)**

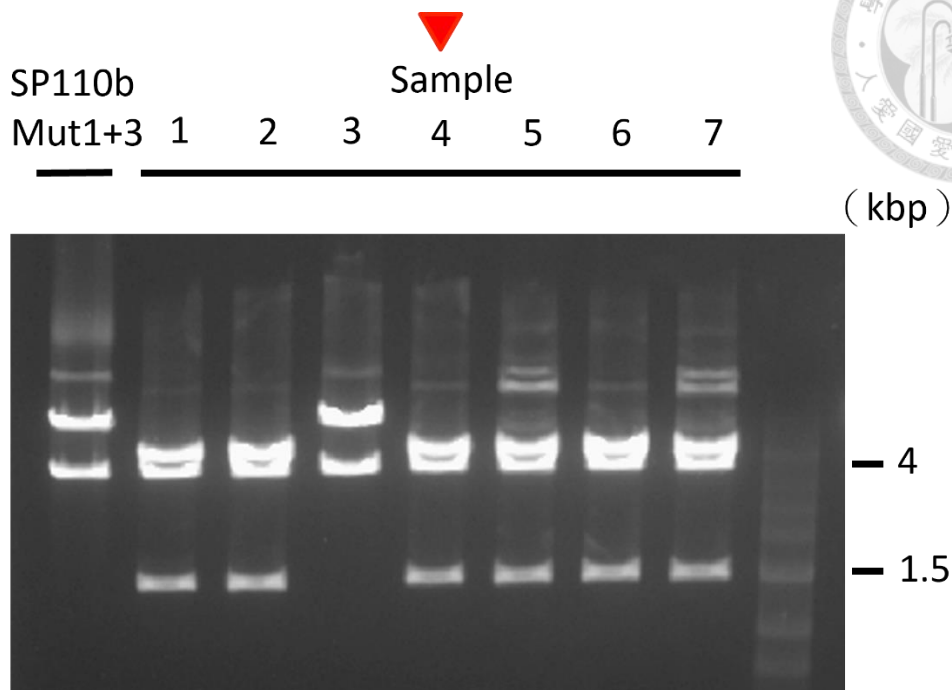
GAGGTGTCCAGCACACCTTCAGACAAGAAAGGAGCTGCCGCAGCGG  
CTTGTATCTGGTCAACTCCA AAAAGGAGACATAAGAAAAA AGCCTC  
CCAAGAGGGACAGCCTCATCTAGACACGGAATCCAAGCTGCCCTCGC  
TGCCGTGGATCAGGTTCTCAAAGAAAGATGACTCAACT



CTGGTCAACTCCA GCTGCCGCACATGCTGCCGCA AGCCTCCCAGGAGG

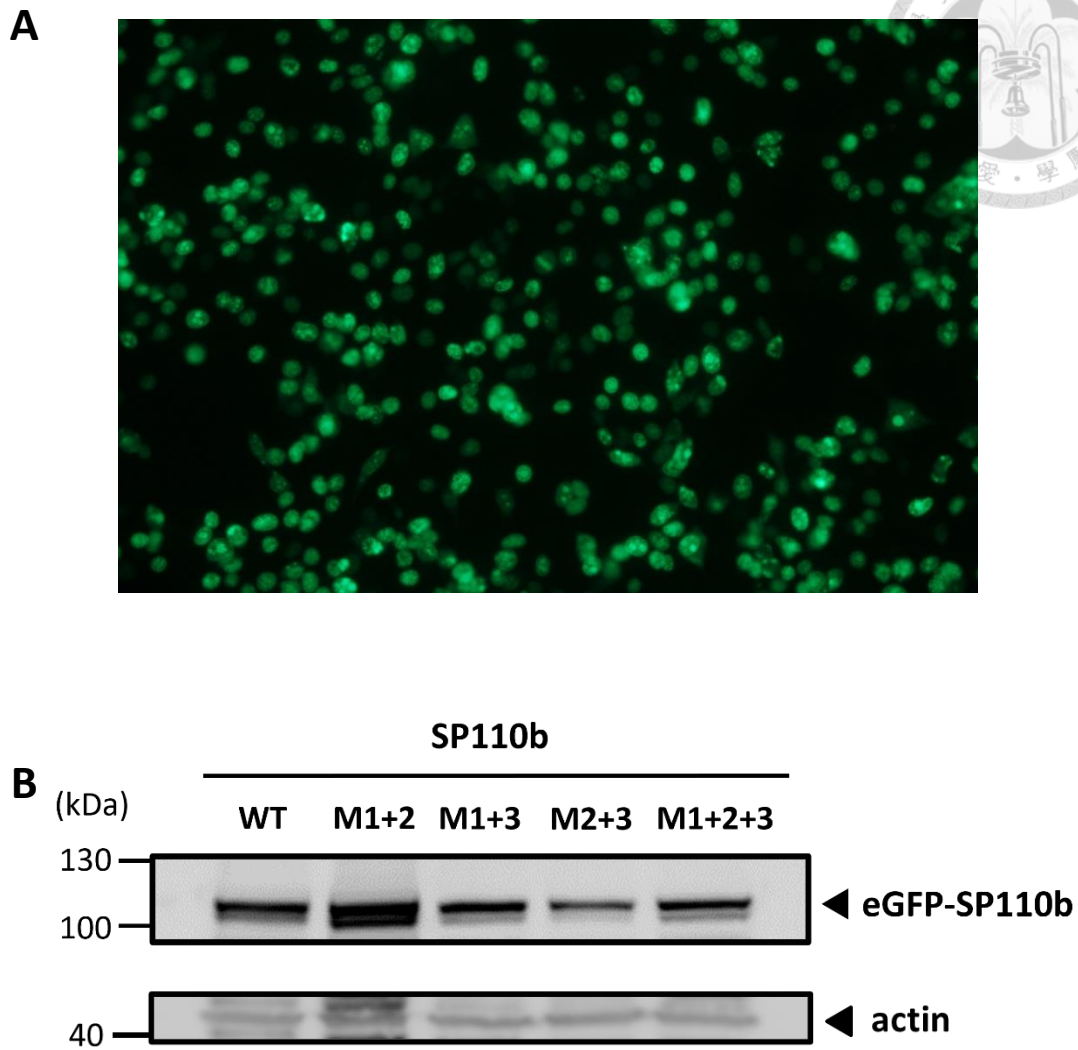
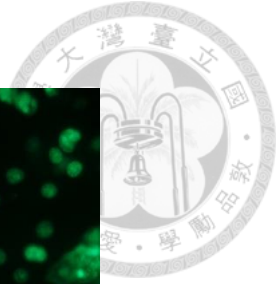
E



**F**

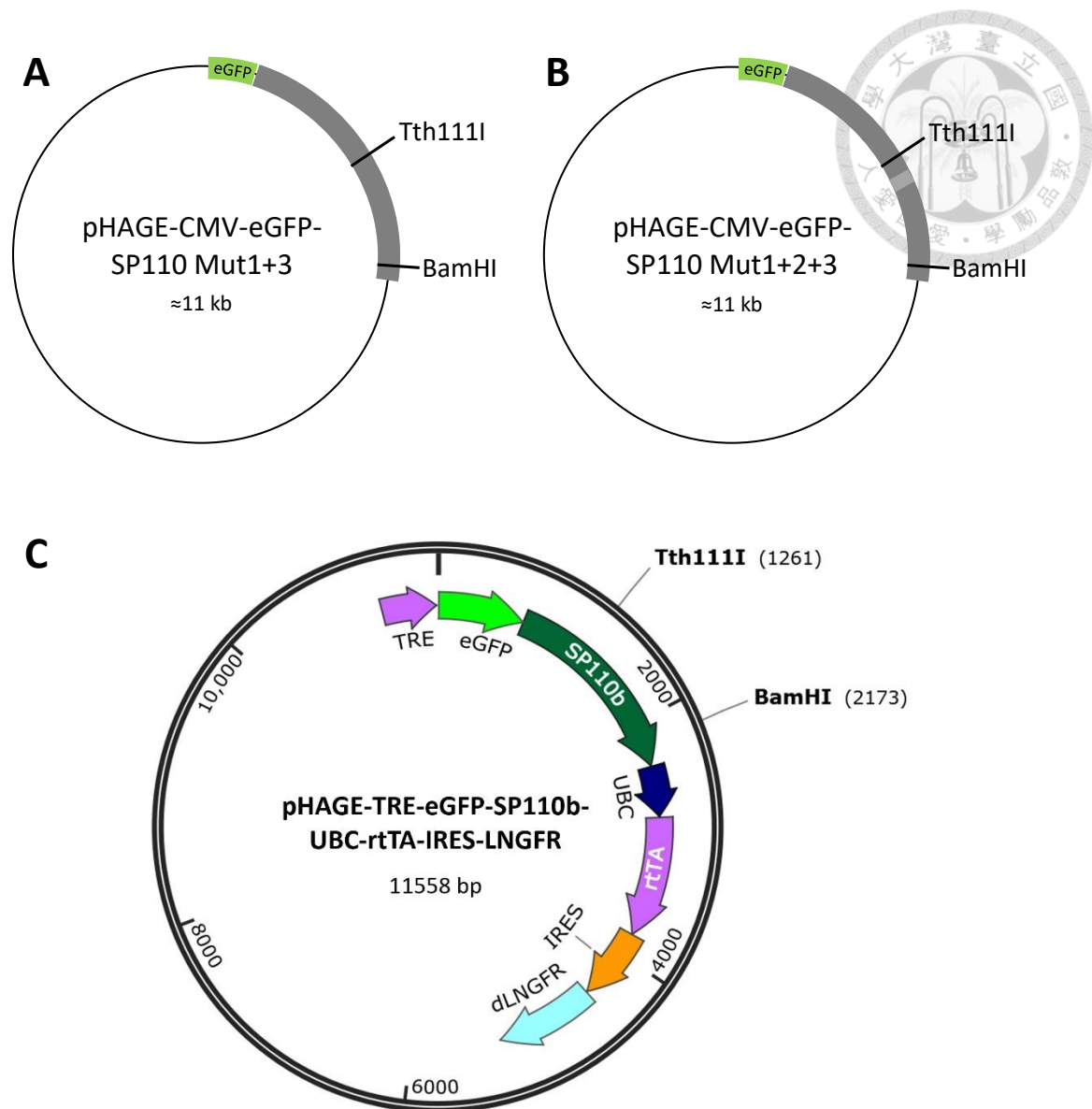
**Figure 1. 建構 pHAGE-CMV-eGFP-SP110b Mut1+2+3 質體示意圖**

(A) 利用 PCR 放大 SP110b mut1+3 片段後，利用 XhoI 及 BamHI 限制酵素切位將 DNA 序列接入 pBluescript KS 載體中。(B) 將接入 SP110b mut1+3 片段的 pBluescript KS 以 Mut2 作為引子進行 PCR mutagenesis，利用 Mut2 序列上的 PvuII 限制酵素切位進行切割，確認突變結果。(C) PvuII 作用後，成功突變的質體會被切割成大小分別約為 2.5 kpb、1 kpb、0.75 kpb 三個片段，以 1% agarose 進行膠體電泳確認，挑選 sample 7 進行後續定序確認。(D) 透過基龍米克斯提供的定序服務，確認已將 NLS1 中 cluster 2 的序列置換成功。(E) 利用 Tth111I 及 BamHI 限制酵素切位將 SP110b mut1+2+3 片段接回 pHAGE-CMV 載體中。(F) 利用 PvuII 進行切割，以 1% agarose 進行膠體電泳確認，挑選 sample 4 作為最後建構完成的 pHAGE-CMV-eGFP-SP110b mut1+2+3 質體。



**Figure 2. 表現 SP110b 蛋白在 HEK293T 細胞**

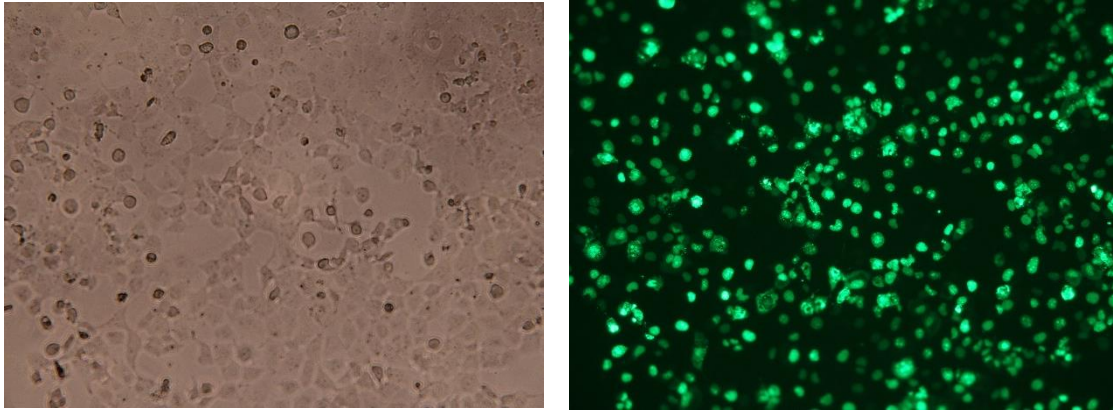
(A) 將 pHAGE-CMV-eGFP-SP110b mut1+2+3 以轉染送入 HEK293T 細胞，兩天後利用螢光顯微鏡觀察綠色螢光，確認 eGFP-SP110b 蛋白表現，(B) 將 SP110b 突變株質體以轉染送入 HEK293T 細胞兩天後，收取蛋白萃取液進行西方墨點法，確認 eGFP-SP110b 突變體蛋白表現。



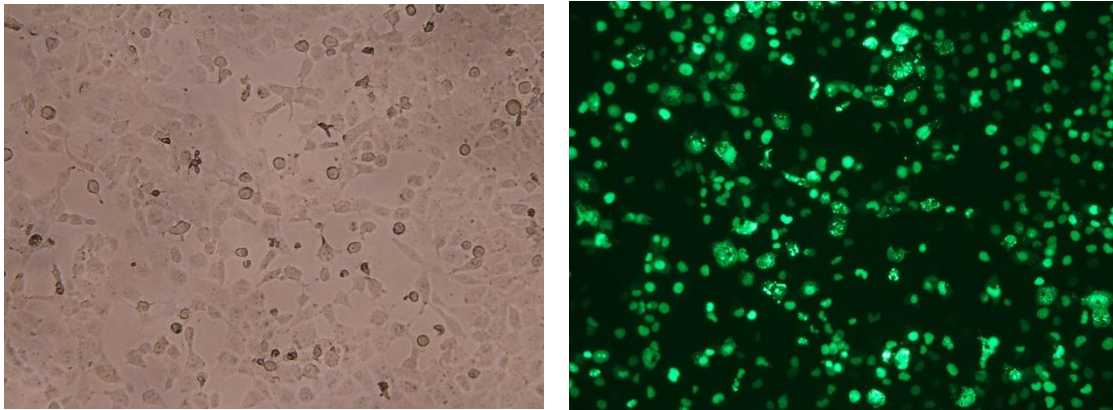
**Figure 3. 建構 Tet-on 系統質體**

分別將 (A) pHAGE-CMV-eGFP-SP110b mut1+3 質體及 (B) pHAGE-CMV-eGFP-SP110b mut1+2+3 質體，利用 Tth111I 及 BamHI 限制酵素將 SP110 突變片段置換到受 Tet-on 系統所調控的 (C) pHAGE-TRE 載體上，以便後續實驗進行時控制 SP110b 表現。

**A**

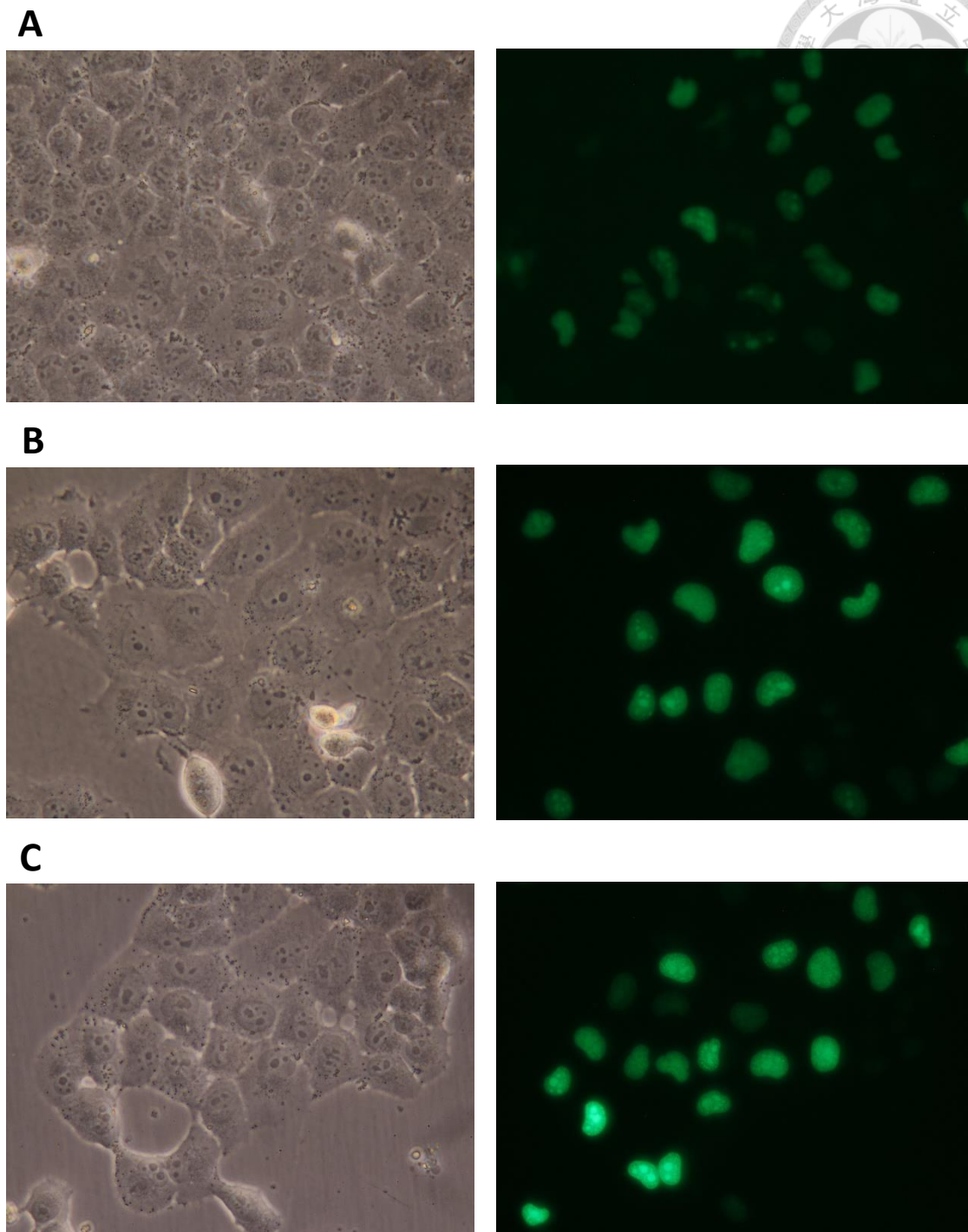


**B**



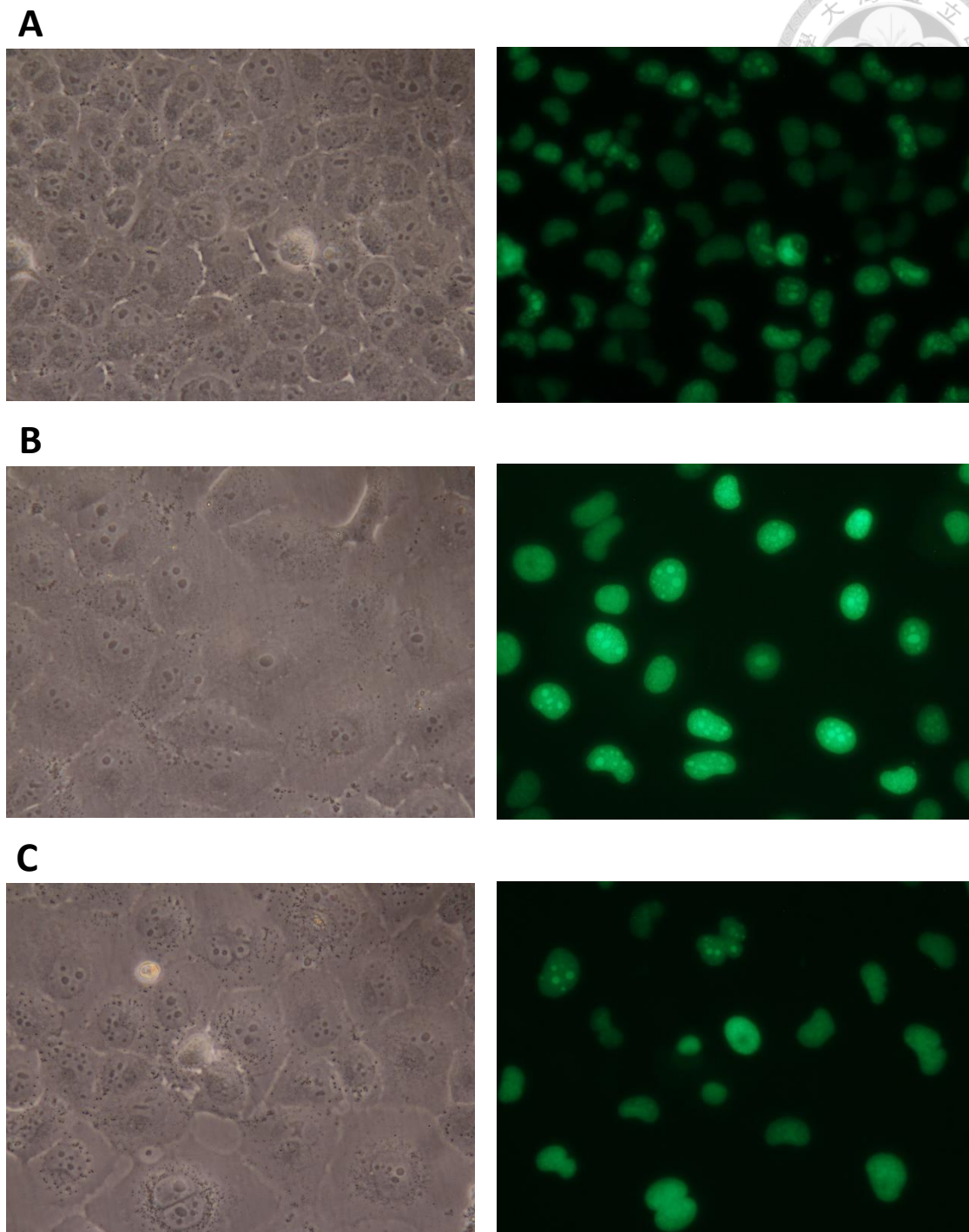
**Figure 4. 表現 SP110b 蛋白在 H1299 細胞**

利用慢病毒將分別將 SP110b Mut1+2+3 及 SP110b Mut 1+3 轉導至 H1299 細胞中並加入 doxycycline 誘導 SP110b 表現，感染兩天後，透過觀察綠色螢光估算感染效率。(A)為 SP110b Mut 1+3 在 H1299 細胞中綠色螢光蛋白表現情況，(B)為 SP110b Mut 1+2+3 在 H1299 細胞中綠色螢光蛋白表現情況。根據螢光表現，SP110b Mut1+2+3 及 SP110b Mut 1+3 兩組都約有 80%的感染效率。



**Figure 5. H1299 SP110b Mut 1+3 單一細胞株螢光表現**

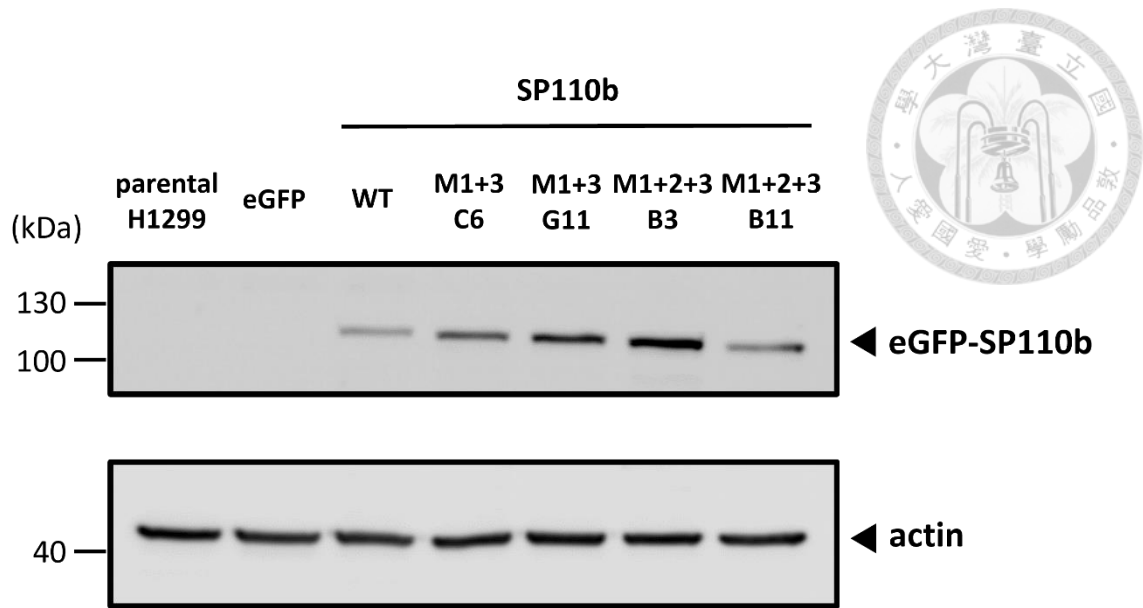
將單一細胞株加入 doxycycline 誘導 eGFP-SP110b 表現，利用螢光顯微鏡觀察綠色螢光表現，篩選出螢光表現比例及亮度較佳的單一細胞株，挑選出三個 SP110b Mut 1+3 單一細胞株 A6、C6 及 G11，(A) (B) (C) 分別為其螢光表現情形。



**Figure 6. H1299 SP110b Mut 1+2+3 單一細胞株螢光表現**

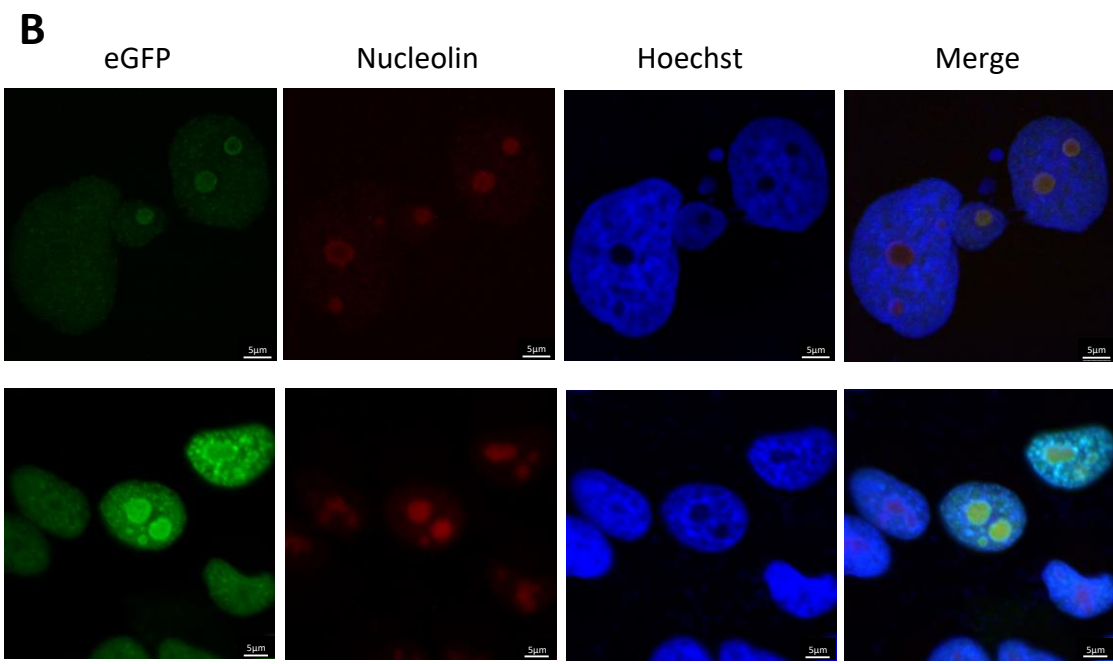
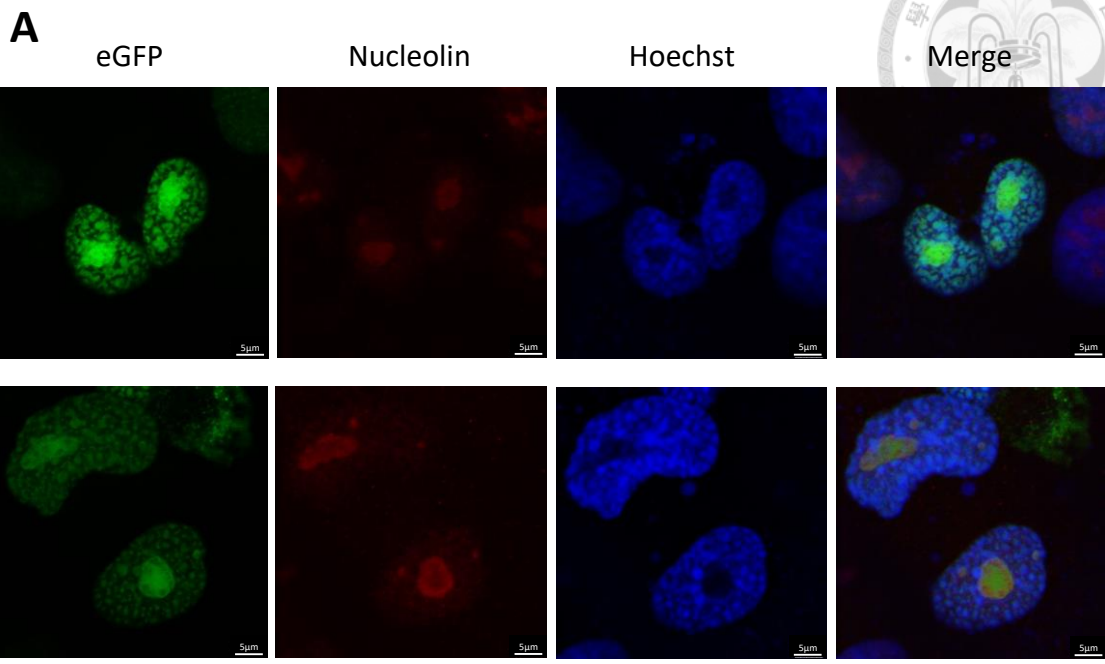
將單一細胞株加入 doxycycline 誘導 eGFP-SP110b 表現，利用螢光顯微鏡觀察綠色螢光表現，篩選出螢光表現比例及亮度較佳的單一細胞株，挑選出三個 SP110b Mut 1+2+3 單一細胞株 B3、B6 及 B11，(A) (B) (C) 分別為其綠色螢光表現情形。



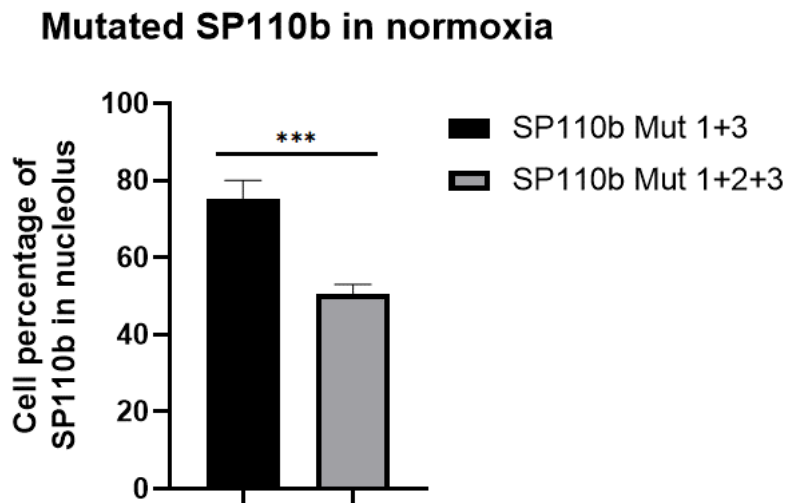


**Figure 7. 確認單一細胞株中 SP110b 蛋白的表現**

分別收取加入 doxycycline 誘導 eGFP-SP110b 表現的 wide-type SP110b、SP110b Mut 1+3 的 C6、G11 及 SP110b Mut 1+2+3 的 B3、B11 單一細胞株的蛋白萃取液，以及收取親代 H1299 細胞 (parental cell) 及 eGFP-H1299 蛋白萃取液作為控制組 (negative control)，利用西方墨點法確認所有 SP110b 的 H1299 單一細胞株中 SP110b 蛋白的表現。

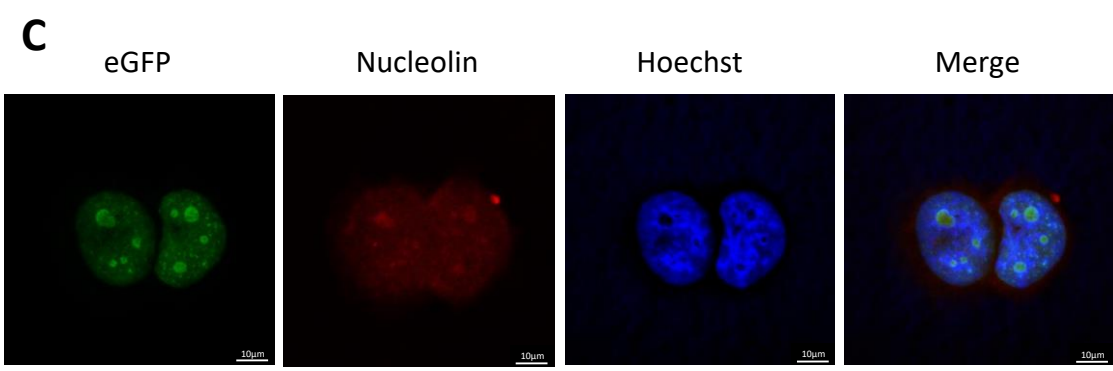
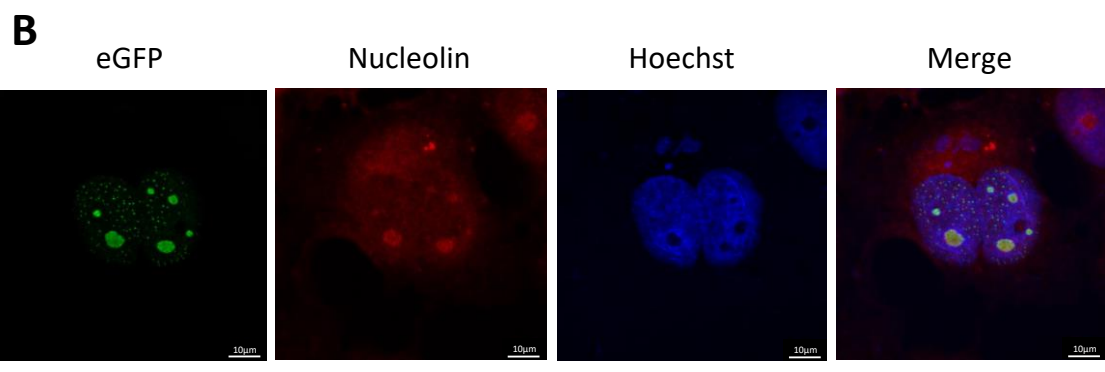
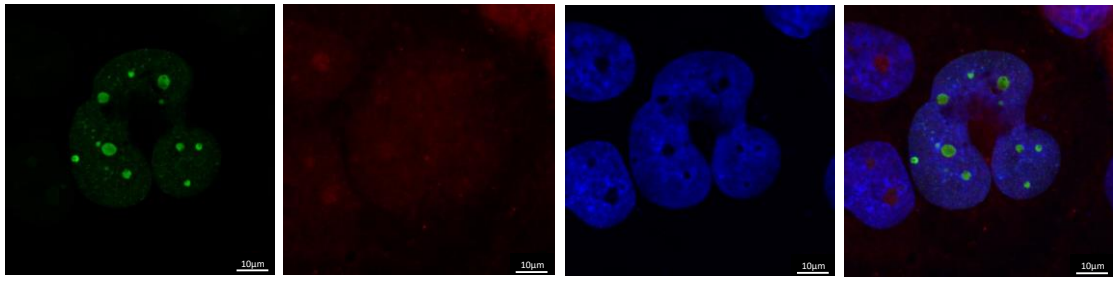
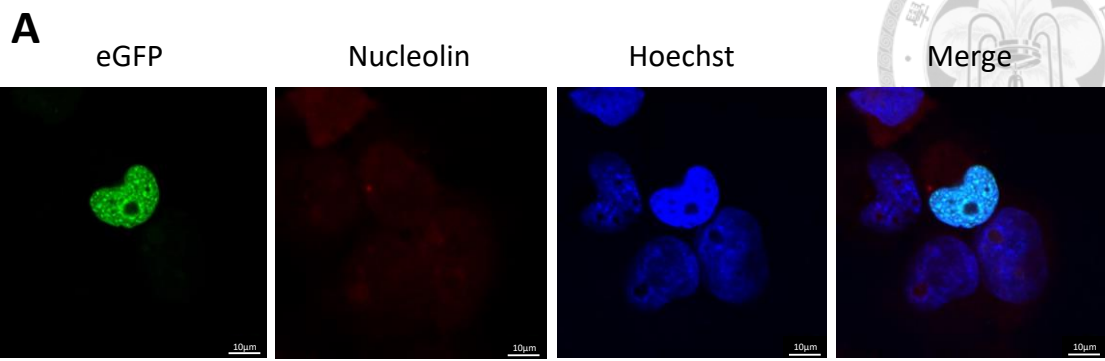


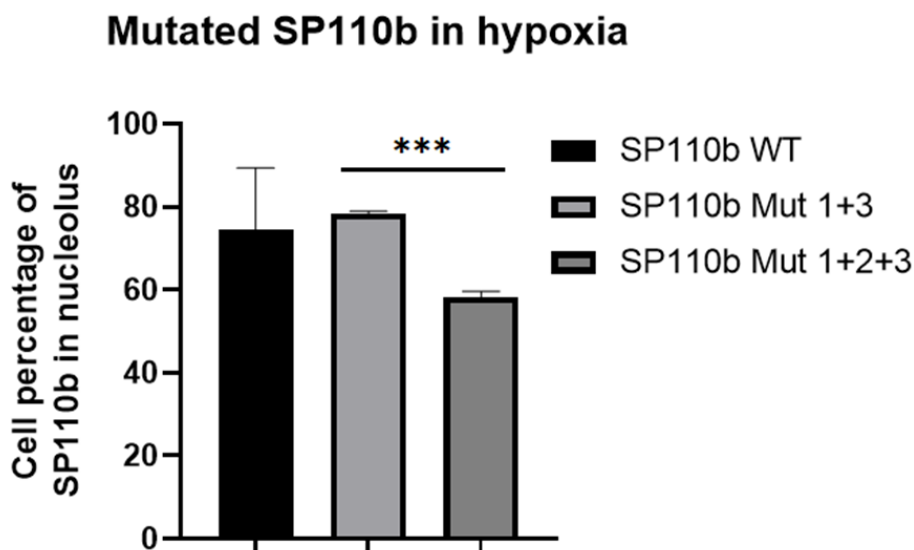
C



**Figure 8. 常氧環境下 SP110b 蛋白的定位表現**

將 SP110b Mut1+3 及 SP110b Mut1+2+3 單一細胞株培養在常氧環境，並加入 doxycycline 誘導 eGFP-SP110b 表現，培養兩天後利用螢光免疫染色，透過共軛焦顯微鏡 (confocal microscopy) 進行拍攝和觀察，並利用 ZEN offline 軟體進行影像輸出。圖中綠色螢光代表為 eGFP-SP110b，紅色螢光代表為核仁蛋白 (nucleolin)，藍色螢光 (hoechst) 則是用來標示 DNA 代表細胞核 (nucleus)，(A) 為 SP110b Mut 1+3 蛋白在 H1299 細胞中定位在核仁的情形，(B) 為 SP110b Mut 1+2+3 蛋白在 H1299 細胞中定位在核仁的情形，(C) 為統計 SP110b Mut 1+3 蛋白和 Mut 1+2+3 蛋白在常氧環境下，在 H1299 細胞中分佈在核仁的比例。統計分析是透過 GraphPad Prism 軟體進行非成對獨立樣本檢定 (unpaired Student's t-test)，圖示中星號數目代表 P 值顯著差異的程度。\*\*\*：P<0.005。

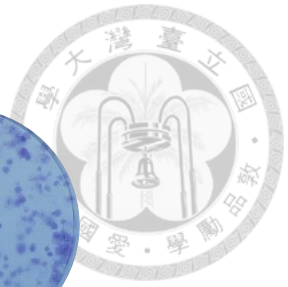
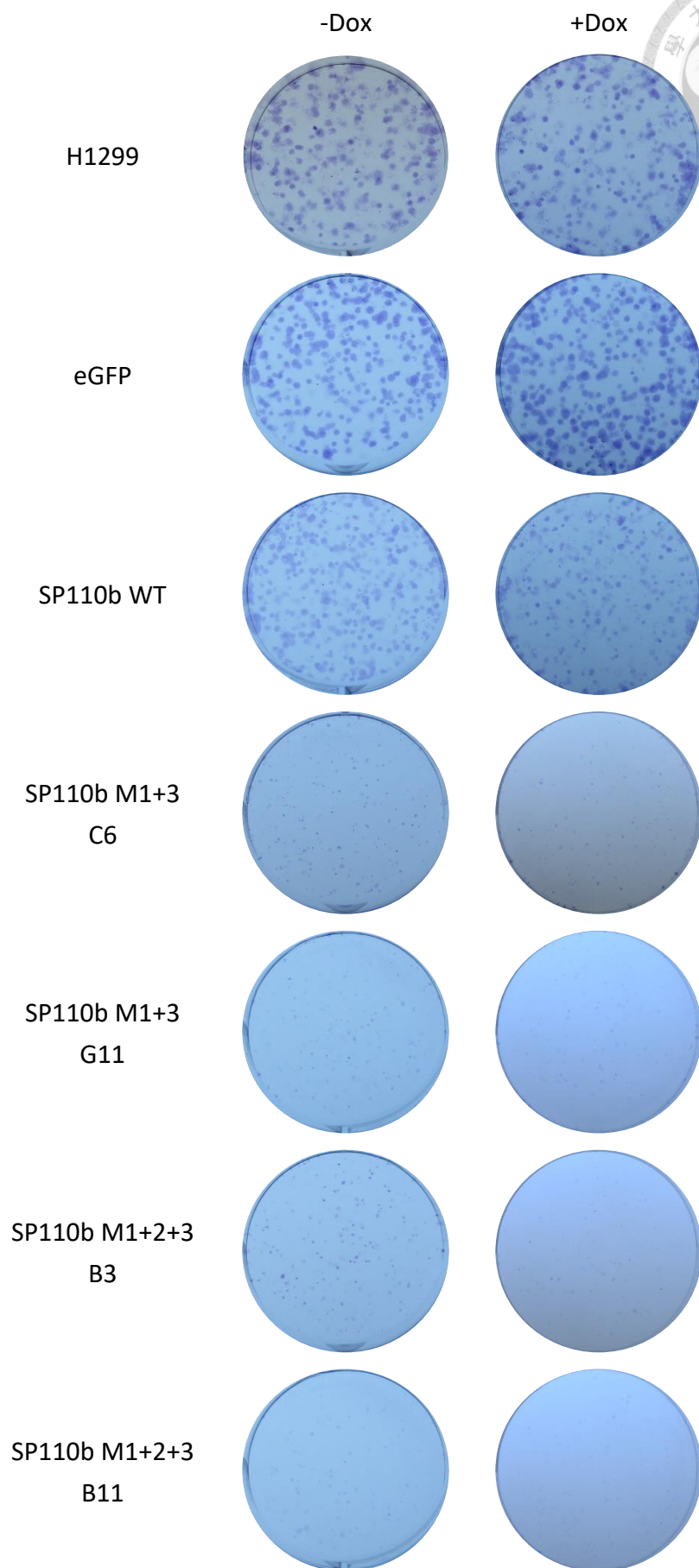


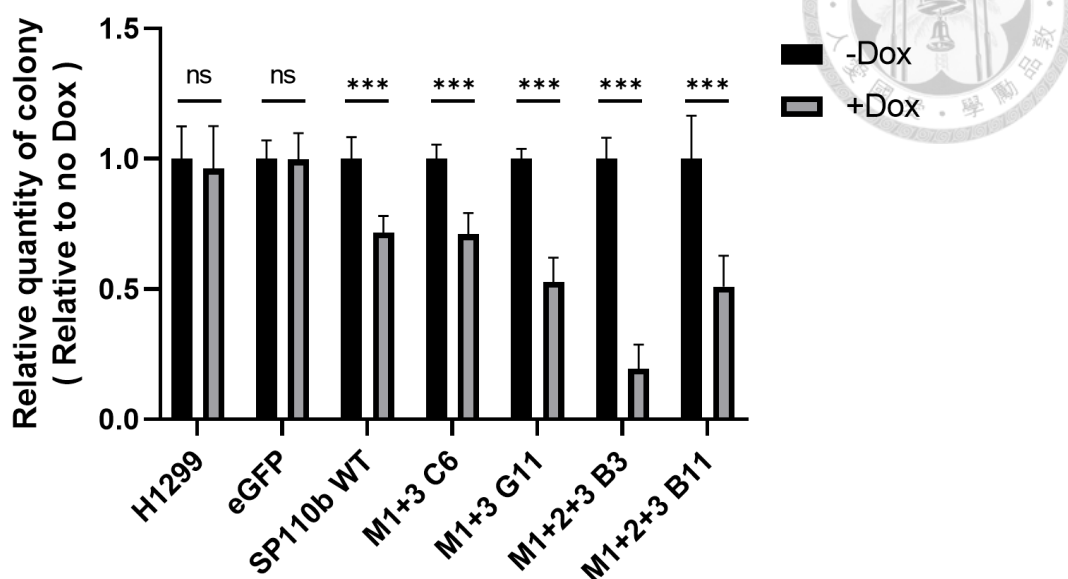
**D**

**Figure 9.** 微氧環境下 SP110b 蛋白的定位表現

將 wide-type SP110b、SP110b Mut1+3 及 SP110b Mut1+2+3 單一細胞株培養在微氧環境下，並加入 doxycycline 誘導 eGFP-SP110b 表現，培養兩天後利用螢光免疫染色，透過共軛焦顯微鏡進行拍攝和觀察，並利用 ZEN offline 軟體進行影像輸出。圖中綠色螢光代表為 eGFP-SP110b，紅色螢光代表為核仁蛋白 (nucleolin)，藍色螢光 (hoechst) 則是用來標示 DNA 代表細胞核 (nucleus)，(A) 為 wide-type SP110b 蛋白在 H1299 細胞中定位情況，上半部分代表為 wide-type SP110b 蛋白定位在細胞核的情形，下半部分為 wide-type SP110b 蛋白定位在核仁的情形，(B) 為 SP110b Mut 1+3 蛋白在 H1299 細胞中定位在核仁的情形，(C) 為 SP110b Mut 1+2+3 蛋白在 H1299 細胞中定位在核仁的情形，(D) 為統計 wide-type SP110b 蛋白、SP110b Mut 1+3 蛋白和 Mut 1+2+3 蛋白在微氧環境下，在 H1299 細胞中分佈在核仁的比例。統計分析是透過 GraphPad Prism 軟體進行非成對獨立樣本檢定 (unpaired Student's t-test)，圖示中星號數目代表 P 值顯著差異的程度。\*\*\*：P<0.005，未標註表示沒有顯著差異。

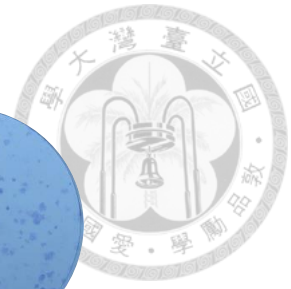
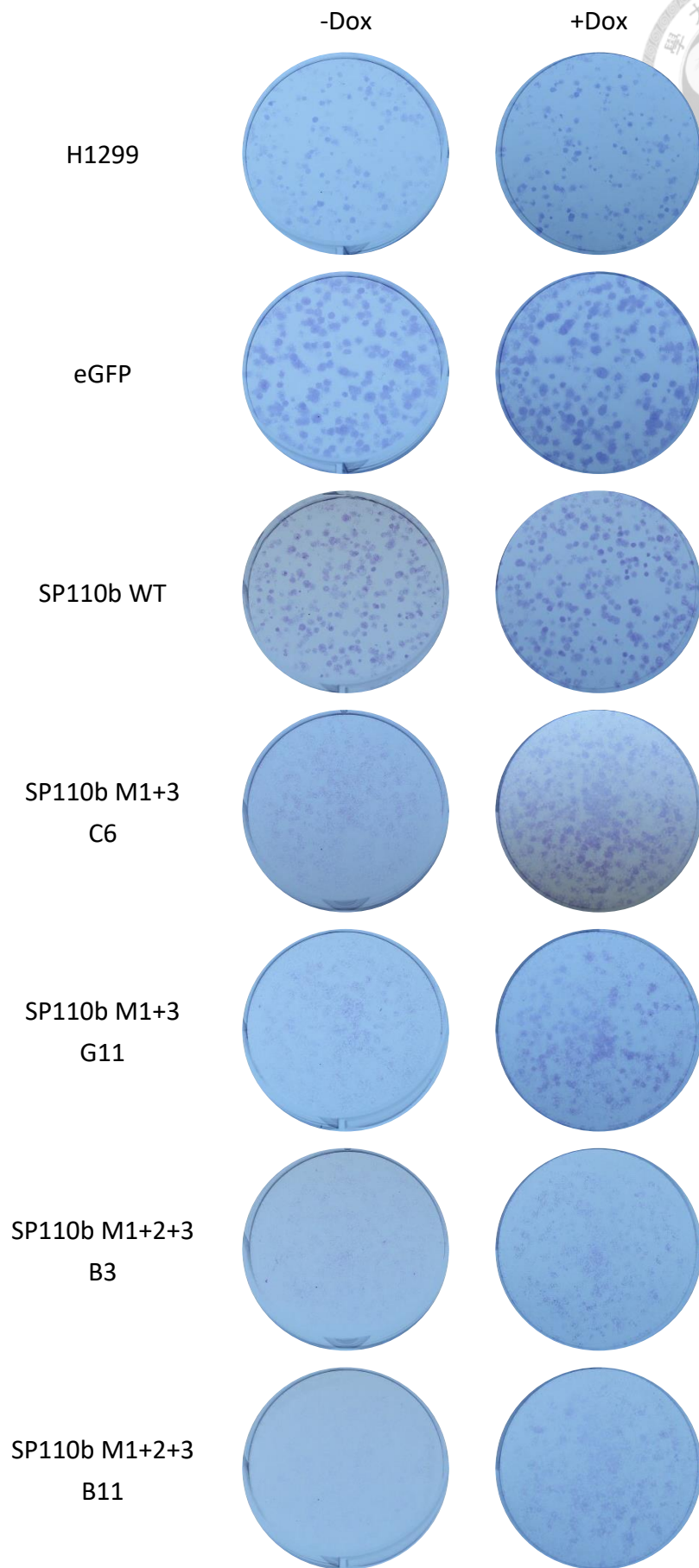
**A**



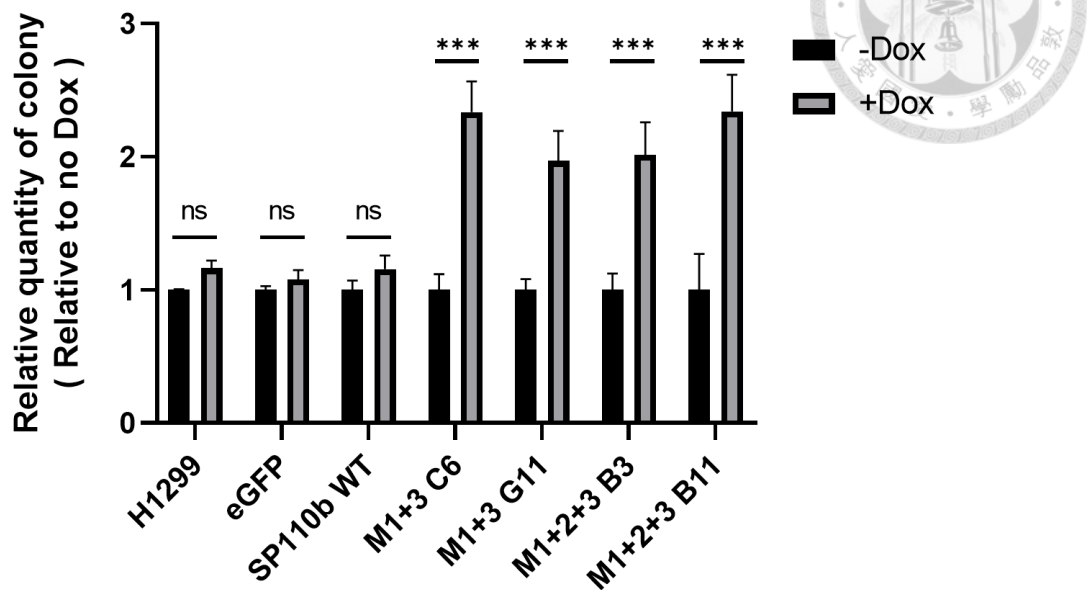
**B****Colony Formation (Normoxia)****Figure 10. 常氧環境細胞群落分析**

將 wide-type SP110b、SP110b Mut1+3 C6、G11 及 SP110b Mut1+2+3 B3、B11 單一細胞株，及作為控制組的親代 H1299 細胞及 eGFP-H1299 單一細胞株，以每孔 500 顆細胞均勻種在 6 孔盤中，每組細胞株分為 -Dox/+Dox，在常氧環境下培養 7 天，待細胞群落 (cell colony) 生成後，以吉姆薩染劑 (Giemsa stain) 進行細胞群落染色，分析細胞群落生長情況。(A) 為各組細胞株分別在不加入 doxycycline (-Dox) 和加入 doxycycline (+Dox) 下群落生長的情形，(B) 為將細胞群落數量計數統計後，以各組未加入 doxycycline (-Dox) 的平均細胞群落數量為基準，比對加入 doxycycline (+Dox) 後對細胞群落數量的影響。統計分析是透過 GraphPad Prism 軟體進行雙因子變異數分析 (Two-way ANOVA)，圖示中星號數目代表 P 值顯著差異的程度。\*：P<0.05，\*\*：P<0.01，\*\*\*：P<0.005。

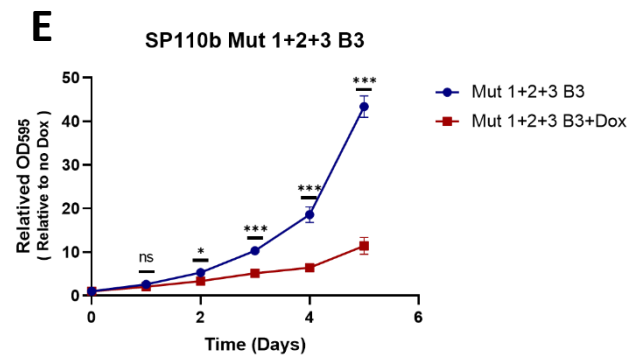
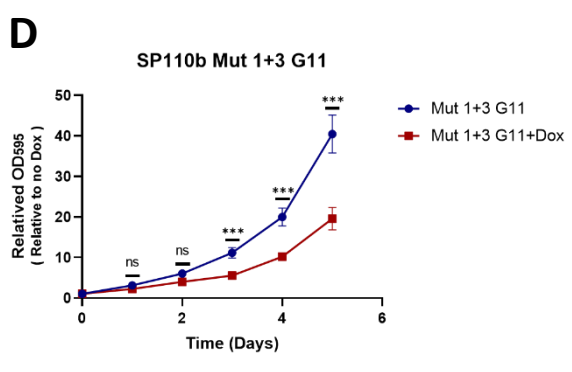
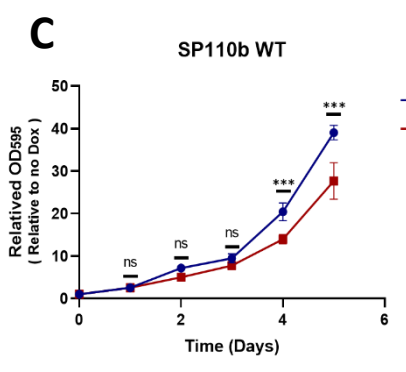
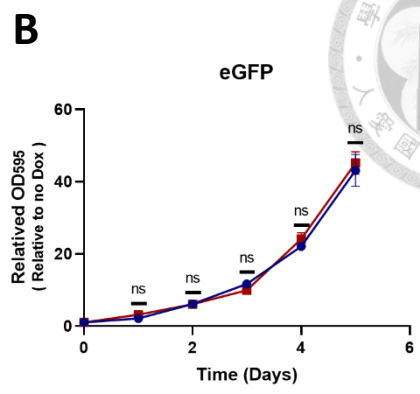
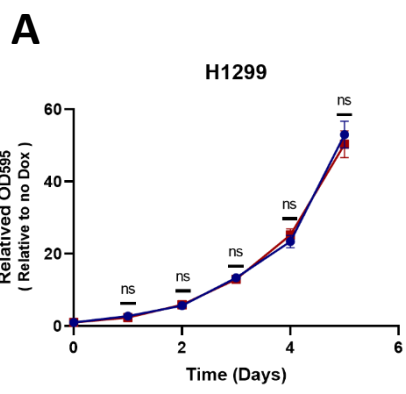
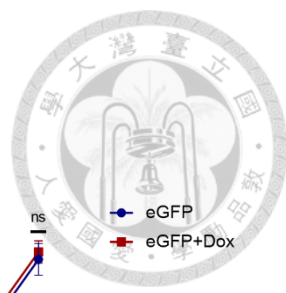
**A**





**B****Colony Formation (Hypoxia)****Figure 11. 微氧環境下細胞群落分析**

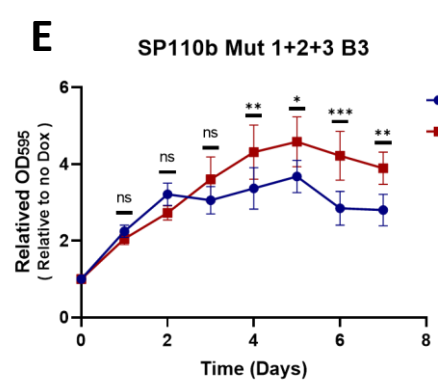
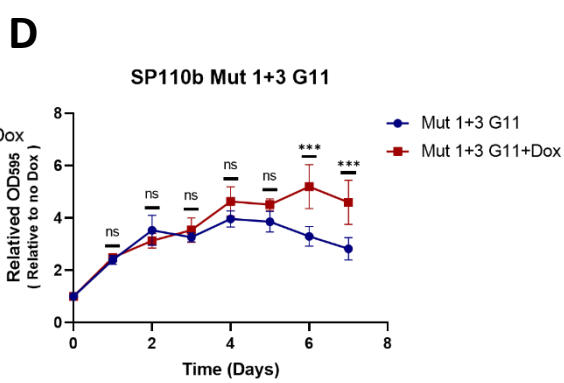
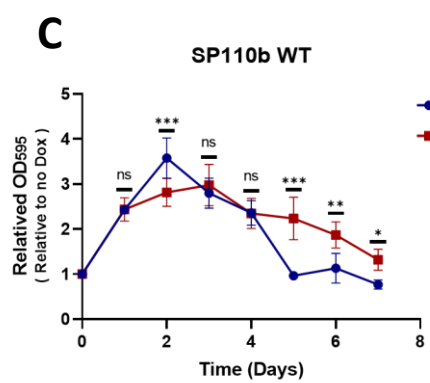
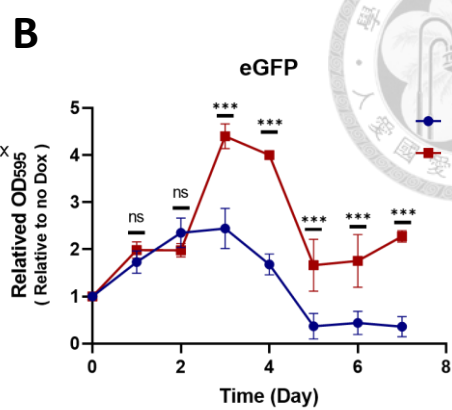
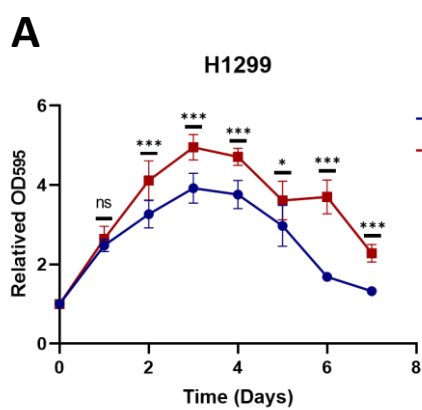
將 wide-type SP110b、SP110b Mut1+3 C6、G11 及 SP110b Mut1+2+3 B3、B11 單一細胞株，及作為控制組的親代 H1299 細胞及 eGFP-H1299 單一細胞株，以每孔 500 顆細胞均勻種在 6 孔盤中，先在常氧環境下培養 4 天，再移至微氧環境培養 5 天，並每組細胞株分為 -Dox/+Dox，待細胞群落 (cell colony) 生成後，以吉姆薩染劑 (Giemsa stain) 進行細胞群落染色，分析細胞群落生長情況。(A) 為各組細胞株分別在不加入 doxycycline (-Dox) 和加入 doxycycline (+Dox) 下群落生長的情形，(B) 為將細胞群落數量計數統計後，以各組未加入 doxycycline (-Dox) 的平均細胞群落數量為基準，比對加入 doxycycline (+Dox) 後對細胞群落數量的影響。統計分析是透過 GraphPad Prism 軟體進行雙因子變異數分析 (Two-way ANOVA)，圖示中星號數目代表 P 值顯著差異的程度。\*: P<0.05, \*\*: P<0.01, \*\*\*: P<0.005。





### Figure 12. 常氧環境下細胞生長趨勢

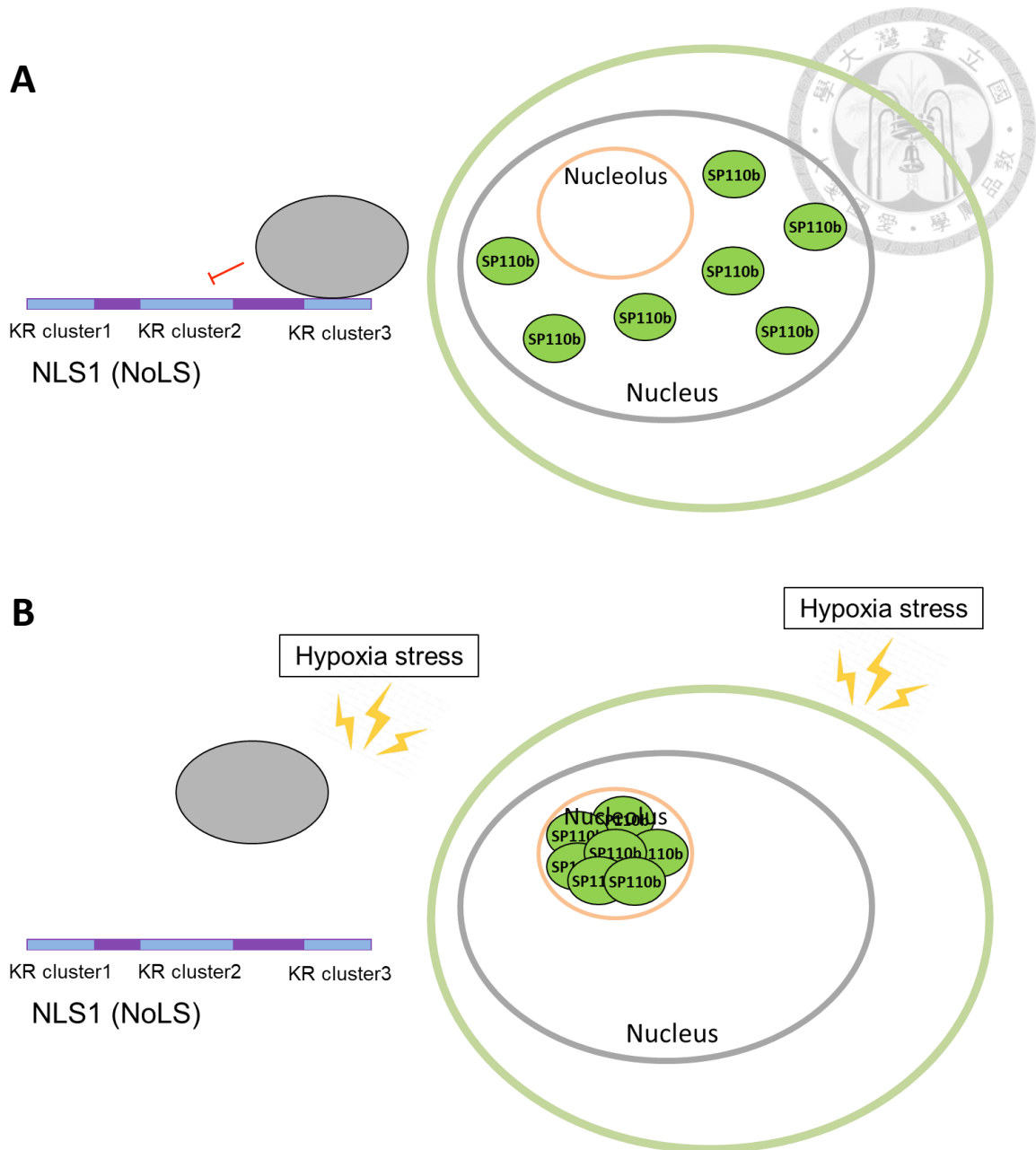
將 wide-type SP110b、SP110b Mut1+3 G11 及 SP110b Mut1+2+3 B3 單一細胞株，及作為控制組的親代 H1299 細胞及 eGFP-H1299 單一細胞株，以每孔 500 顆細胞分種在 96 孔盤中，每組細胞株分為 -Dox/+Dox，在常氧環境培養下分別偵測第 0-5 天波長 595 nm 的吸光值。各組 (A) 親代 H1299、(B) eGFP-H1299、(C) wide-type SP110b、(D) SP110b Mut1+3 G11、(E) SP110b Mut1+2+3 B3，分別以第 0 天所測得的 OD595 平均值為基準，比對有無加入 doxycycline 對細胞生長趨勢的影響。上述數據為五重複實驗取其平均值，統計分析是透過 GraphPad Prism 軟體進行雙因子變異數分析 (Two-way ANOVA)，圖示中星號數目代表 P 值顯著差異的程度。\*：P<0.05，\*\*：P<0.01，\*\*\*：P<0.005。





### Figure 13. 微氧環境下細胞生長趨勢

將 wide-type SP110b、SP110b Mut1+3 G11 及 SP110b Mut1+2+3 B3 單一細胞株，及作為控制組的親代 H1299 細胞及 eGFP-H1299 單一細胞株，以每孔 500 顆細胞分種在 96 孔盤中，每組細胞株分為 -Dox/+Dox，在微氧環境培養下分別偵測第 0-7 天波長 595 nm 的吸光值。各組 (A) 親代 H1299、(B) eGFP-H1299、(C) wide-type SP110b、(D) SP110b Mut1+3 G11、(E) SP110b Mut1+2+3 B3，分別以第 0 天所測得的 OD595 平均值為基準，比對有無加入 doxycycline 對細胞生長趨勢的影響。上述數據為五重複實驗取其平均值，統計分析是透過 GraphPad Prism 軟體進行雙因子變異數分析 (Two-way ANOVA)，圖示中星號數目代表 P 值顯著差異的程度。\*：P<0.05，\*\*：P<0.01，\*\*\*：P<0.005。



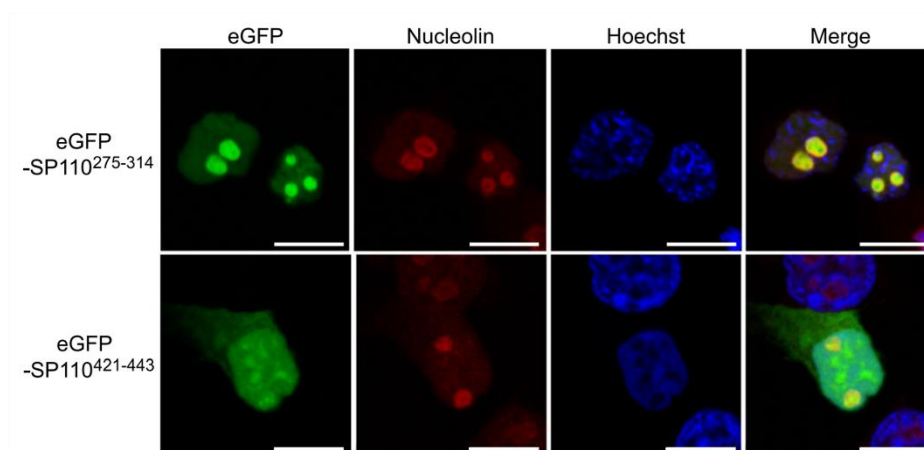
**Figure 14. SP110b 蛋白中核仁定位訊號作用機制假說模型**

推測在常氧環境下會有因子結合在 SP110b NoLS 的 KR cluster 3 區域，阻斷 KR cluster 2 區域發揮核仁定位訊號的功能 (A)，而當細胞處於微氧壓力時，結合在 cluster 3 區域的因子會脫離，cluster 2 區域就能夠發揮核仁定位訊號的功能，而使 SP110b 蛋白從細胞核轉移到核仁 (B)。

## Chapter 7 附錄



NLS1 KKGKKRKRCIWSTPKRRHKKKSLPRGTASSRHGIQKKLKR 275-314  
 NLS2 RKSRSEKKEKKEKDICSSSKRRFQ 421-443



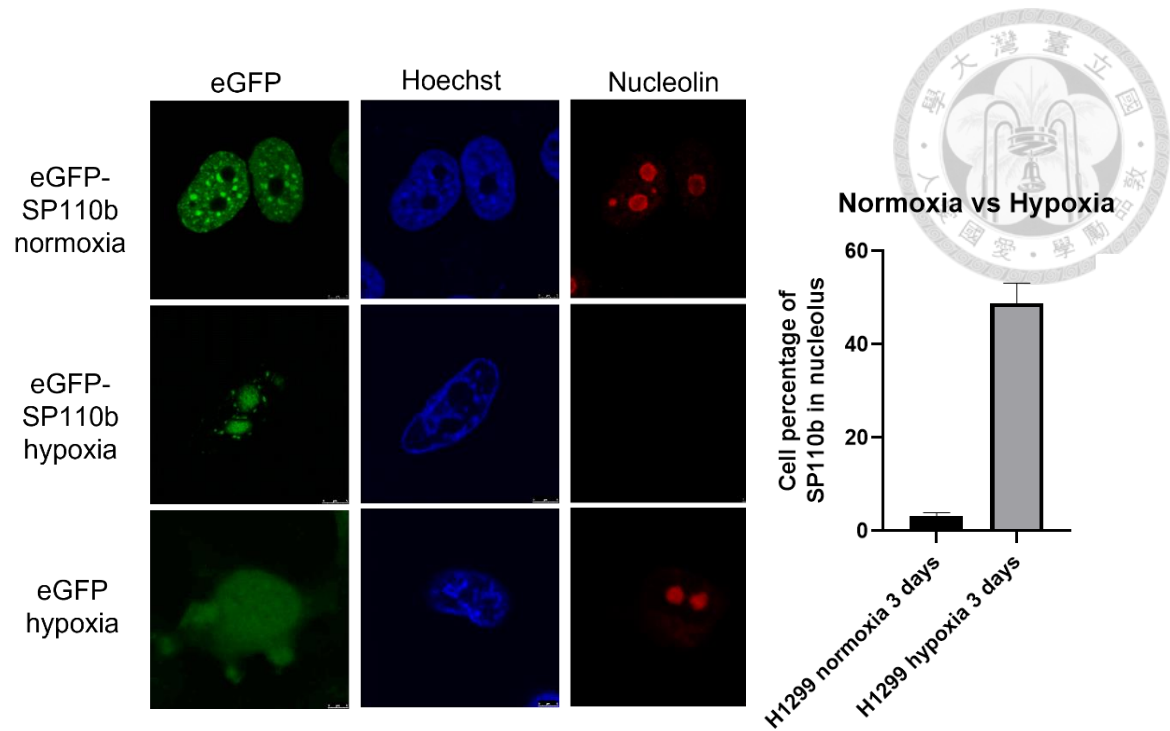
### NLS1

lysine/arginine-rich (KR) clusters

Wt QEVSTPSDKKGKKRKRCIWSTPKRRHKKKSLPGGTASSRHGIQKKLKRVDPQVPQKKDDST  
 266-326  
 Mut1 -----KKGAAAAAC-----  
 Mut2 -----STPAAAHAAASLP-----  
 Mut3 -----IQAALAAV-----  
 Mut1+2 -----KKGAAAAAC-----STPAAAHAAASLP-----  
 Mut2+3 -----STPAAAHAAASLP-----IQAALAAV-----  
 Mut1+3 -----KKGAAAAAC-----IQAALAAV-----

### Appendix 1. SP110 蛋白中的 NLS1 為潛在的核仁定位訊號

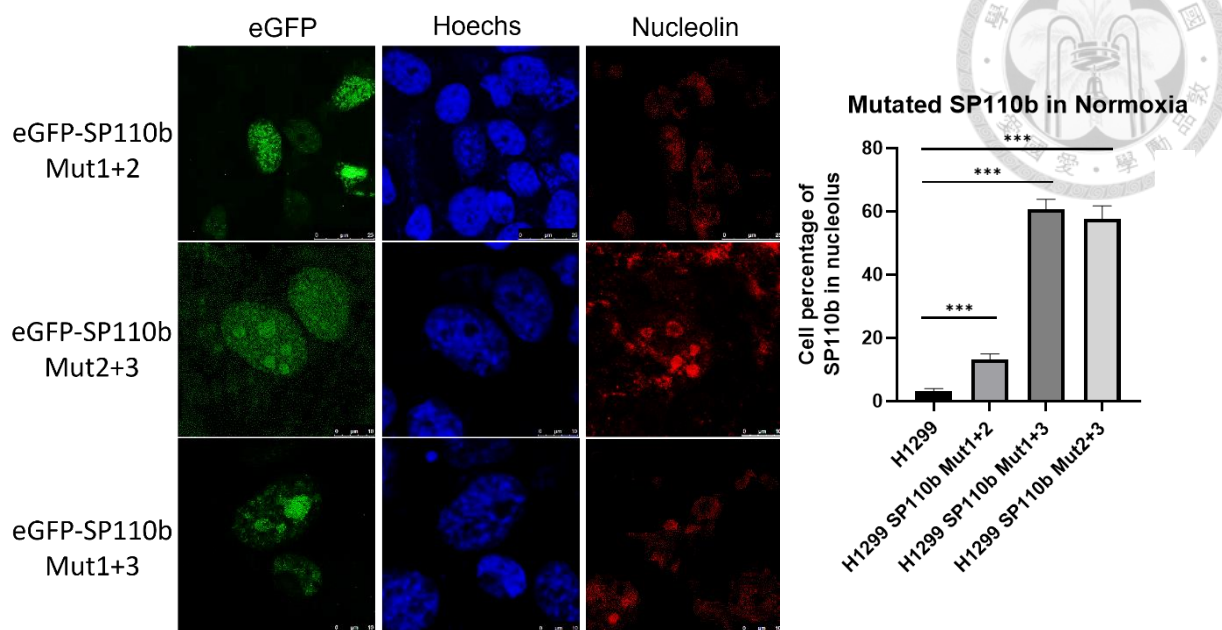
SP110 蛋白中間區域有兩段核定位訊號 (nuclear localization signal, NLS)，其中根據 eGFP-SP110<sup>275-314</sup> 蛋白定位分析發現 NLS1 也同時是一段核仁定位訊號 (nucleolar localization signal, NoLS)。而 NLS1 中帶有三組離氨酸/精氨酸集中簇 (KR clusters)，Mut1、2、3 分別對應對 KR clusters 1、2、3 的突變[18]。



## Appendix 2. 微氧環境下 eGFP-SP110b 的細胞分佈

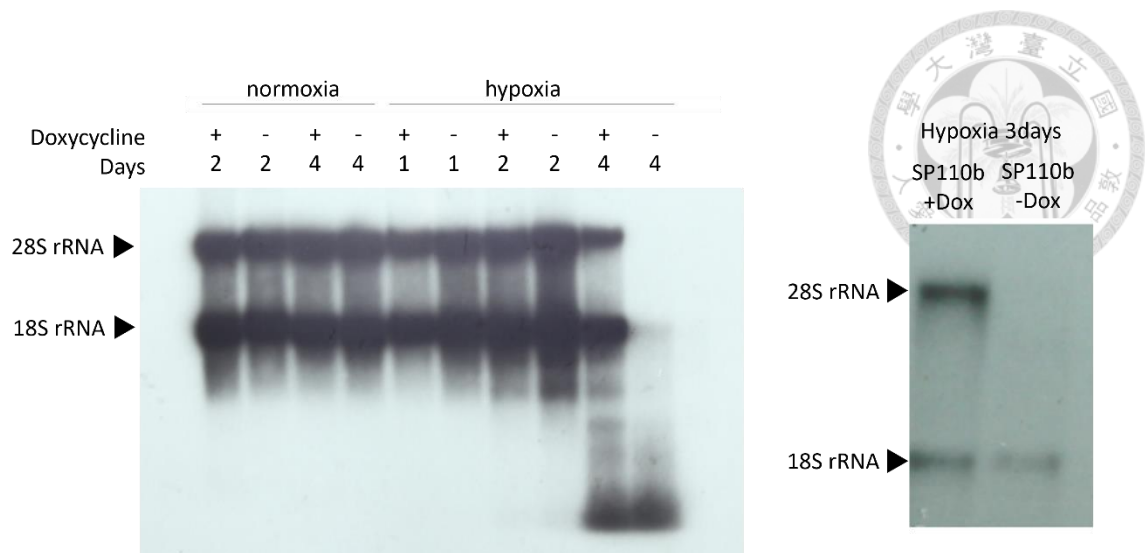
在常氧環境下時只有很少數的 eGFP-SP110 蛋白會定位在核仁，但在微氧環境下 eGFP-SP110 蛋白會大幅增加定位在核仁的比例。此實驗數據由穆家禹學長提供。





### Appendix 3. 常氧環境下 SP110b 突變體的細胞分佈

將 SP110 蛋白的 NoLS 突變後，發現即使在常氧環境下，突變的 SP110b 蛋白會提高定位在核仁的比例，其中又以 SP110b Mut1+3 蛋白定位在核仁的比例最高，SP110b Mut2+3 略低於 SP110b Mut1+3。此實驗數據由穆家禹學長提供。



#### Appendix 4. 北方墨點法分析結果

當 H1299 細胞在微氧環境下 3 至 4 天後，發現加入 doxycycline 誘導 SP110b 的表現可以維持核糖體 RNA (ribosomal RNA, rRNA) 生合成 (biogenesis) 的能力。此實驗數據由穆家禹學長提供。

質體列表	
1	pBluescript KS
2	pHAGE-CMV-eGFP-SP110b mut1+3
3	pHAGE-CMV-eGFP-SP110b mut1+2+3
4	pHAGE-TRE-eGFP-SP110b-UBC-rtTA-IRES-LNGFR
5	pHAGE-TRE-eGFP-SP110b mut1+3-UBC-rtTA-IRES-LNGFR
6	pHAGE-TRE-eGFP-SP110b mut1+2+3-UBC-rtTA-IRES-LNGFR

**Appendix 5. 本研究中所使用質體列表**

Primer name	Sequence (5'→3')
SP110-XhoI-F	TTTTTTCTCGAGATGTTCCACCATGACAAGAGC
SP110b <sup>549</sup> -BglIII-SalI-R	ATATTAGATCTGTCTGACTCACTTGCTATTTAACT CTCTC
Mut2 (1-326)-Sense	CTGGTCAACTCCAG <u>GCTGCCGCA</u> CAT <u>GCTGCCGC</u> <u>A</u> AGCCTCCCAGGAGG
Mut2 (1-326)-Anti-Sense	CCTCCTGGGAGGCT <u>TGCGGCAGC</u> AT <u>TGCGGCA</u> <u>GCTGGAGTTGACCAG</u>

**Appendix 6. 本研究中所使用引子清單**