

國立臺灣大學生命科學院分子與細胞生物學研究所

碩士論文

Institute of Molecular and Cellular Biology

College of Life Science

National Taiwan University

Master Thesis



以小鼠細胞株以及斑馬魚研究細胞外 P<sub>gk</sub>1 與其神經膜  
受器的交互作用會促進運動神經突的生長

Using Mouse Cell Line and Zebrafish as Models to  
Determine that the Neurite Outgrowth of Motor Neurons  
is Enhanced by the Interaction between Extracellular P<sub>gk</sub>1  
and its Neural Receptor

陳泓宇

Hong-Yu Chen

指導教授：蔡懷楨 博士

Advisor : Huai-Jen Tsai, Ph.D.

中華民國 111 年 8 月

August 2022



國立臺灣大學碩士學位論文  
口試委員會審定書



以小鼠細胞株以及斑馬魚研究細胞外 P<sub>gk1</sub> 與其神經膜受器的  
交互作用會促進運動神經突的生長

Using Mouse Cell Line and Zebrafish as Models to Determine  
that the Neurite Outgrowth of Motor Neurons is Enhanced by the  
Interaction between Extracellular P<sub>gk1</sub> and its Neural Receptor

本論文係陳泓宇君 (R09B43020) 在國立臺灣大學分子與細胞生物學研  
究所完成之碩士學位論文，於民國 111 年 8 月 31 日承下列考試委員審  
查通過及口試及格，特此證明。

論文口試委員

召集人

長庚大學生物醫學研究所  
鄭邑荃 教授

鄭邑荃

委員

台灣大學分子與細胞生物學研究所  
蔡懷楨 教授

蔡懷楨

馬偕醫學院生物醫學研究所  
林正勇 副教授

林正勇

屏東大學應用化學系  
黃鐘慶 副教授

黃鐘慶

研究所所長

董桂書

## 誌謝

碩士生涯轉瞬即逝，回首這兩年的經歷，除了埋首苦幹於實驗外，也感受到自身對於科學研究能力上的提升，在這些日子中，當然也有對自己個工作內容產生懷疑，也深怕自己無法達成目標，其中不乏許多瓶頸，很感謝實驗室的各位給予實驗建議以及勉勵我繼續加油，也感謝家人無條件的支持，我才能勇往直前的持續前行，最終，順利完成碩士論文，並於台灣大學分子與細胞生物學研究所論文壁報競賽中，獲得傑出獎的殊榮。

在此鄭重感謝實驗室的老師、學長、同儕以及學弟在這兩年的指導與陪伴，想當初我是連進度報告都寫不清楚，感謝老師對於實驗與寫作上的提點，我才能逐漸進步，並在口試時能有自信表達研究內容，除此之外，老師也時常考量到學生的身體狀況，由衷的感謝蔡老師。而傳揚學長除了要完成自己的研究工作外，花了很多實驗在指導我，包含實驗設計、文獻閱讀以及點出我論述的不足，使我更能注意到實驗的邏輯以及細節，同時讓我的研究內容更具說服力。而正勇學長則是在背課之餘，仍十分關心我的心理狀況，也欽佩他對實驗室付出之精神。而鴻杰學長總是在我實驗遇上困難時，告訴我許多我沒注意到的可能性，其平易近人的風格讓我在實驗室中更能放鬆。秉璋學長則是包辦實驗室的大小事務，甚至幫我解決一些生活上的困擾，讓我可以專心於研究工作。柏翔學長則是幫忙處理了很多實驗室中的瑣事，使實驗室能夠順利運行，且除了實驗的幫助外，也提供我住宿以及生活上的種種管道。韋霖則是會提醒我許多學校的事物，這段期間也感謝他跟我同甘共苦。另外，期許實驗室新進學弟能妥善利用實驗室資源，並努力完成自己的研究工作。

最後，感謝蔡老師推薦我申請扶輪社獎金，這份獎學金對我而言，不僅僅只是獎金上的資助，更肯定了我在研究所的研究工作，有了這份獎學金，不只能夠減緩研究金費的壓力，還可以負擔自己的生活費以減少家庭支出，使我能更專心的投入研究之中。

## 中文摘要

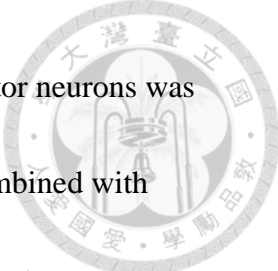


肌萎縮性脊髓側索硬化症 (Amyotrophic lateral sclerosis, ALS) 是由於脊髓的運動神經元退化而逐漸無法支配肌肉，病人肌肉逐漸萎縮而癱瘓，最終由於橫膈膜肌肉也逐漸萎縮，導致病人無法呼吸而死亡。近年來發現 extracellular Phosphoglycerate Kinase 1 (ePgk1) 會透過 Rac1-GTP/Pak1-T423/p38-T180/MK2-T334/Limk1-S323/ Cofilin-S3 訊息傳遞路徑來促進運動神經元的神經突生長。然而，尚不清楚骨骼肌肉細胞所分泌的 ePgk1 如何觸發運動神經元細胞，以經此傳遞路徑增強它們的神經突生長。另一方面，最近又發現若把重組 Pgk1 浸泡在 NSC34 神經細胞培養液發現細胞膜周圍可以檢測到外加的重組 Pgk1 信號，且透過 Pull down/LC-MS/MS 分析可能與 Pgk1 結合的神經細胞 membrane proteins，接著利用 Cell-surface Cross-linking immunoprecipitation 找到神經細胞膜蛋白 Py2 與分泌的 ePgk1 有著最高的親和性。所以，本研究想進一步確認運動神經元膜上存在著 Py2 receptor，它會與肌肉細胞分泌的 ePgk1 ligand 相互作用以觸發信號傳遞，而增強運動神經元的神經突生長。首先，我在 NSC34 細胞中過量表現 Py2，發現 Py2 分佈於細胞膜上，且在其培養液中添加 Pgk1 則會在細胞膜上與 Py2 產生信號重疊。其次將 *py2* 過量表現於 Tg(*mnx 1:GFP*) 斑馬魚轉殖品系，透過觀察胚胎之初級運動神經元 (primary motor neurons) 發現過量表現 *py2* 會增強促進神經突生長的能力；若過量表現 *py2* 再浸泡 Pgk1 則對其神經突生長的促進力具有加乘性的作用。相反地，若將 *py2* knockdown 時，則會使其神經突生長被阻礙。另外，當注射 truncated forms 的 *py2*，那促進神經突生長的能力便會消失，表示 ePgk1 domain 促進神經突生長是重要的。最後，我應用分子對接 (molecular Docking) 程式推測 *py2* 與 Pgk1 透過電荷 (Electrostatics) 作用將兩蛋白質以 ligand 和 receptor 方式結合。有趣的是當我用突變 Pgk1 浸泡斑馬魚胚胎時，那促進神經突生長的能力就會消失。綜合以上，我們利用 *in vitro* system 的 NSC34 細胞與 *in vivo* system 的斑馬魚轉基因品系 Tg(*mnx 1:GFP*) 證實了 *py2* 作為運動神經細胞的 membrane receptor，與 ePgk1 的 ligand 產生結合而傳遞訊息，以促使細胞斑馬魚胚胎運動神經元的神經突生長。

## 英文摘要



Amyotrophic lateral sclerosis (ALS) is the progressive loss of muscle innervation due to the degeneration of motor neurons in the spinal cord, resulting in gradual atrophy and paralysis of muscles. Our lab previously found that extracellular Phosphoglycerate Kinase 1 (ePgk1) secreted from skeletal muscle cells could promote the neurite outgrowth of motor neurons through the Rac1-GTP/Pak1-T423/p38-T180/MK2-T334/Limk1-S323/ Cofilin-S3 signaling pathway. However, how ePgk1 could trigger motor neuron cells to promote neurite outgrowth via this pathway remains unknown. More recently, our lab also reported that when recombinant Pgk1 was added into the medium cultured mouse motor neuron hybrid NSC34 cells, the signal of recombinant ePgk1 could be detected around the cell membrane. Furthermore, when we used pull down/LC-MS/MS combined with cell-surface cross-linking immunoprecipitation, one of neural cell membrane proteins, Py2, showed the highest affinity with ePgk1. Therefore, in this study, I proposed that Py2 might serve as a receptor to interact with the ligand ePgk1 and enhance the neurite outgrowth of motor neurons through triggering the signal transduction described above. To answer this issue, first, I overexpressed Py2 cDNA in NSC34 cells and observed that Py2 was distributed around the cell membrane, which was colocalized the signal from the ePgk1 added in the culture medium. Second, I microinjected *py2* mRNA into the transgenic zebrafish line



Tg (*mx1:GFP*) and found that the neurite outgrowth of primary motor neurons was increased in embryos. Moreover, if overexpression of *py2* mRNA combined with supplementary addition of eP<sub>gk1</sub>, I found that the neurite growth of motor neurons was increased synergistically. In contrast, knockdown of *py2* in embryos displayed the retarded growth of motor neurons. Additionally, the capability of neurite outgrowth promotion was lost if I overexpressed the truncated form of Py2, suggesting that the domain is important for eP<sub>gk1</sub> in the promotion of neurite outgrowth. Finally, using molecular docking program, I predicted that Py2 receptor might interact electrostatically with eP<sub>gk1</sub> ligand. Interestingly, the promotion of neurite outgrowth was failure in the zebrafish embryos incubated with the mutant P<sub>gk1</sub>, suggesting that the fragment within P<sub>gk1</sub> is a critical structure for eP<sub>gk1</sub> function. Taken together, I concluded that Py2, serving as a membrane receptor of motor neurons, interacts with the ligand of eP<sub>gk1</sub> to trigger the molecular signal, resulting in promotion of neurite outgrowth of zebrafish embryonic motor neurons.

## 目 錄



口試委員會審定書.....	i
誌謝.....	ii
中文摘要.....	iii
英文摘要.....	iv
文獻回顧.....	1
前言.....	8
材料與方法.....	13
結果.....	25
討論.....	32
結論.....	35
參考文獻 .....	36
圖說.....	50
附錄.....	57

# 文獻回顧



## 1. Motor neuron disease

肌萎縮性脊髓側索硬化症 (Amyotrophic lateral sclerosis, ALS)，是一種致命的神經退化性疾病，由於脊髓的運動神經元退化而逐漸無法支配肌肉，病人肌肉逐漸萎縮，而癱瘓，最終由於橫膈膜肌肉也逐漸萎縮，導致病人多數於 3 至 5 年內無法呼吸而死亡 (Kiernan *et al.*, 2011; Renton *et al.*, 2014)。大約 10 % 的 ALS 病人屬於家族性遺傳 (familial ALS, FALS)，其餘 90 % 屬於偶發性 sporadic ALS, SALS)，且最常於 50 歲左右的中年時期發病 (Brown *et al.*, 2017)。而 FALS 在 ALS 病人中佔有 10 %，致病原因為特定基因變異所造成，Superoxide dismutase (SOD1) 是第一個被發現與 ALS 高度相關的基因 (Rosen *et al.*, 1993)；而在 ALS 患者中，elongated protein 3 (ELP3) 中的單核苷酸多態性 (Single nucleotide polymorphism, SNP) 對神經元存活很重要；在 FALS 和 SALS 患者中都發現了 TAR-DNA 結合蛋白 (TARDBP) 基因的突變 (Kabashi *et al.*, 2008; Sreedharan *et al.*, 2008)；另外在 ALS 與大多數神經退行性疾病患者的屍檢報告中，其包涵體 (inclusion bodies) 含有大量 TDP-43 (Neumann *et al.*, 2006)。

脊髓性肌萎縮症 (Spinal Muscular Atrophy, SMA) 是人類的一種體染色體隱性遺傳神經退化性疾病，該疾病罹患率為六千分之一，是造成嬰兒死亡的常見遺傳原因。該疾病首先發生於脊髓的前角細胞 (anterior horn cell)，並進一步導致四肢和軀幹運動神經元丟失和骨骼肌萎縮。發生原因為兩個高度同源的 SMN1 和 SMN2 基因，包括 intron 和 promoter 序列 (Monani *et al.*, 1999)；SMN1 含由 9 個 exon，位於反向重複 (inverted duplication) 序列中，其著絲粒的一半包含幾乎相同的拷貝基因 SMN2，能彌補 SMN1 的部分功能，但 SMN2 會因為選擇性剪接導致 exon 7 被跳過 (Cartegni *et al.*, 2002; Kashima *et al.*, 2003)，造成轉錄水平較低。由於 95% 的 SMA 患者 SMA1 發生突變，因此，當患者僅表現功能性低下的



SMN 突變蛋白時，便無法維持運動神經元的存活(Coover *et al.*, 1997; Lefebvre *et al.*, 1997)。




## 2. Motor neuron disease in zebrafish model

斑馬魚對於運動神經疾病的研究優勢源於脊髓的快速發育。神經出現大約於 10 hpf (hours post-fertilization, hpf)，突觸出現與第一次運動行為大約於 18 hpf，而在 24 hpf 時，中樞神經系統的許多相關特徵皆已出現，可供識別神經元群並進行研究。在這個階段，脊髓與體節發育相互對應，每個體節包含約十幾種細胞類型，因此可以分析運動神經元及其軸突分支。此外，在 48 hpf 時，可對斑馬魚胚胎之泳動行為與觸摸反應進行觀察。這些特性使斑馬魚適合作為運動神經元疾病的模型。

在斑馬魚 ALS 研究中，若 SOD1 突變導致運動軸突截短、分支過早與對觸摸逃離反應不足有關 (Lemmens *et al.*, 2007)；knockdown 斑馬魚 Als2 (與人類 ALS2 具有 61% 的胺基酸 identity) 導致運動軸突縮短、退化以及脊髓中神經元的喪失 (Gros-Louis *et al.*, 2008)；若是 knockdown 斑馬魚 Elp3 會導致運動軸突縮短與分支增加 (Simpson *et al.*, 2009)；knockdown Tardbp (與人類蛋白質 73% 的 identity) 會導致運動神經元分支和運動缺陷 (Kabashi *et al.*, 2010)。

在斑馬魚 SMA 研究中，knockdown Smn1 (與人類 SMN1 有 49% identity) 會導致早期發育中的運動神經元走向與軸突生長缺陷 (McWhorter *et al.*, 2003)，這些缺陷可藉由人類 *SMN1* mRNA 改善 (Workman *et al.*, 2009)；此外，SMN1 exon 7 中的一個保守區域 (QNQKE) 對於軸突生長表型至關重要，而當 plastin 3 (PLS3) 過量表現時，可改善 knockdown Smn1 所引起的缺失 (Oprea *et al.*, 2008)；另外，也有研究指出，knockdown Smn1 會造成斑馬魚的神經肌肉接頭 (neuromuscular junction, NMJ) 形成缺陷，並導致胚胎死亡 (Boon *et al.*, 2009)。

在 ALS 疾病研究中，knockdown 斑馬魚 Als2，由於可以使用針對起始密碼

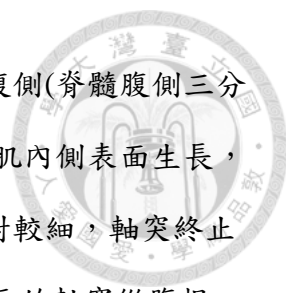


ATG 的 MO 進行轉譯抑制 (Gros-Louis *et al.*, 2008)，但 *Als2* 敲除小鼠會自行將 exon1 或 exon2 刪除，導致不完全敲除 (Hadano *et al.*, 2006)。故在斑馬魚中 knockdown *Als2* 會造成運動神經缺陷，但 *Als2* 敲除小鼠則未能觀察到此現象。這說明了斑馬魚在某些情況下，對於基因功能破壞之操作會更加容易。

### 3. Motor neuron development in zebrafish

骨骼肌以精確的模式受神經支配，以確保身體運動協調性。在雞 (Hollyday *et al.*, 1980; LanceJones and Landmesser, 1981)和牛蛙 (Fare1 and Bemelmans, 1985) 中，後肢的運動神經元發育起初是投射到適當的區域中，接著軸突會沿著既定的路線生長；在斑馬魚中，運動神經元可以透過脊髓內的細胞體的位置、外周喬木 (peripheral arbors) (Westerfield *et al.*, 1986)、早期軸突形成進行識別並建立於肌肉周圍 (Eisen *et al.*, 1986)。除此之外，許多分子也參與運動軸突尋路，包括免疫球蛋白超家族 (immunoglobulin superfamily, IgSF) 的表面識別分子 (Eisen, 1998)，如：鳥類和哺乳動物 DM-GRASP，是魚類 *Neurolin* 的同源蛋白質 (Paschke *et al.*, 1992)，它由五個 Ig 結構域、一個跨膜片段和一個短的細胞質結構域所組成 (Kanki *et al.*, 1994)，*Neurolin* 被指出在神經系統中作為受體引導著軸突生長 (Leppert *et al.*, 1999)。在鳥類和哺乳動物中，DM-GRASP 介導細胞粘附並促進軸突生長 (Burns *et al.*, 1991)；在斑馬魚中，*Neurolin* 在次級運動神經元的軸突上瞬時表達 (Fashena and Westerfield, 1999)。


斑馬魚胚胎中存在兩類不同的脊髓運動神經元，分別為初級和次級運動神經元 (Myers, 1985)。利用同位素標定實驗發現，初級運動神經元生成於 9 到 16 小時之間，而次級運動神經元則在初級運動神經元生成後的 5 到 6 小時生成 (Myers *et al.*, 1986)。初級和次級可以通過許多形態學標準來區分，例如：初級運動神經元具有較大的細胞體，位於相對背側(脊髓腹側三分之一以上)，隨著軸突的伸展，細胞體會逐漸往背側移動，軸突在肌肉表面形成環狀並橫向生長，軸突



相對較粗；次級運動神經元具有較小、圓的細胞體，位於相對腹側(脊髓腹側三分之一處)，細胞體隨著時間的推移而縱向分散，軸突首先沿著軸肌內側表面生長，接著側向生長到肌肉中並產生分支，但分支程度較低，軸突相對較細，軸突終止點也與初級運動神經元不同 (Myers *et al.*,1986)。初級運動神經元的軸突從腹根(ventral root)離開脊髓，並沿著突觸訊號向水平隔肌(horizontal septum)延伸 (Eisen *et al.*, 1986)，而次級運動神經元的生長錐(growth cone)會沿著初級運動神經元的軸突軌跡進行尋路，並被分配到不同的肌節區域以進行生長，但延伸距離較短 (Eisen, 1991; Pike *et al.*, 1992)。因此，初級運動神經元具有促進次級運動生長錐生長的能力，但初級運動神經元需留下足夠的引導信息，使次級運動神經元能到達目標位置。

在斑馬魚中，有三個初級運動神經元(primary motor neuron)，分別為 caudal primary (CaP)、 middle primary (MiP)、 rostral primary (RoP) motor neuron (Eisen *et al.*, 1986; Westerfield *et al.*, 1986)，大約在 20 hpf 時，從生長錐萌生。CaP 初級運動神經元從細胞體沿著肌節 (myotome)的內側表面往腹側生長，其生長錐起初從脊髓中出現時通常較大，隨著它們的生長，生長錐逐漸縮小，並在到達水平隔肌(horizontal septum)時，會暫停長達 2 小時，暫停後 CaP 生長錐將再次變大並繼續向腹側生長，而 CaP 軸突會在水平隔肌處維持明顯的串珠樣膨體(varicosity)；MiP 初級運動神經元之生長錐最初往腹側生長，其路徑與 CaP 相同。然而，在到達水平隔肌時，生長錐停止往腹側生長，反而在背側長出生長錐，並在脊髓表面和軸肌(axial muscle)內側之間向背側生長；RoP 生長錐最初也遵循了由 CaP 生長錐開創的水平隔肌的路徑，同樣在到達水平隔肌後暫停，接著橫向轉動朝著肌肉的側面生長，並於水平隔肌的肌肉周圍產生分支 (Myers *et al.*,1986)。

在運動神經元發育過程中，生長錐 (growth cones)會遵循路徑到達目標肌肉 (Eisen, 1998)，而水平隔肌是一個重要指標 (Eisen *et al.*, 1986)，每種初級運動神經元的生長錐皆會生長到水平隔肌，然後做出不同的細胞選擇。當 CaP 消失時，次




級運動軸突停留在水平隔肌的時間會延長並造成異位分支，而其餘正常的神經仍會在發育晚期形成 (Pike *et al.*, 1992)；另外當運動神經元的生成位置錯誤，其會在發育晚期進行選擇性的細胞死亡來消除異常的運動神經元 (Lamb, 1977; McGrath and Bennett, 1979)。研究顯示非洲爪蟾 (Lamb, 1976)、蠓蠟 (McGrath and Bennett, 1979) 和小雞前肢 (Pettigrew *et al.*, 1979) 的運動神經元發育中，其最初生成的位置遠比後天引導來的重要。此外，即使運動神經元的引導路徑異常，最終仍會達到其適當的目標，指出運動軸突即使受到異常引導，仍能通過環境中的線索找到目標。

#### 4. Phosphoglycerate kinase 1 (Pgk1)

在醱解作用 (glycolysis) 與糖質新生 (gluconeogenesis) 過程中，Phosphoglycerate kinase 1 (Pgk1) 是參與催化的重要酵素。在醱解作用中，Pgk1 是促使第一個 ATP 生成的酵素，方式為將 1,3-bisphosphoglycerate 中的 acyl phosphate 轉移到 ADP 上，形成 3-phosphoglycerate 並同時產生一單位的 ATP；在糖質新生作用中，此步驟為逆反應進行，兩者皆須鎂離子參與。Pgk1 廣泛存在於所有生物體中，並且具有高度保留性。無論是人類亦或是家鼠的 Pgk1 皆由 417 胺基酸組成，分子量大約為 45KDa。Pgk1 由一條 polypeptide 所組成，含有 N-terminal 與 C-terminal 兩個 domain，形成一個雙葉 (bilobed) 結構，1,3-bisphosphoglycerate 以及 3-phosphoglycerate 會與 N-domain 結合，核苷酸 ADP 以及 ATP 則會與 C-domain 結合。Pgk1 雙葉結構中含有一個 hinge-bending 的結構，經過構型改變，能拉近 N-domain 與 C-domain，進而達到催化 1,3-bisphosphoglycerate 或 3-phosphoglycerate 與核苷酸 ADP 或 ATP 的反應 (Blake *et al.*, 1981)

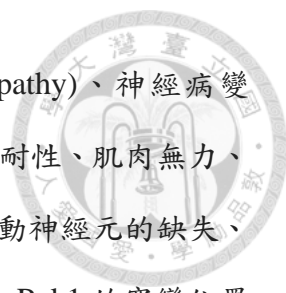
Pgk1 除了醱解作用以及糖質新生，近年許多未知功能也陸續被提及。在斑馬魚中，若將 Pgk1 knockout 時，會影響到與 Fibroblast growth factor (Fgf) 發育相關的細胞，如耳囊中的毛細胞、神經元或其他 central/peripheral nervous system (CNS/PNS) 相關神經 (Kantarci *et al.*, 2020)。從腫瘤細胞株分泌至細胞外的 Pgk1



具有 disulphide reductase 活性，能作用於 plasmin，使雙硫鍵被破壞，導致 plasmin 被裁切並釋放出 angiostatin，以抑制血管腫瘤。當 Pgk1 被注射於含有腫瘤的小鼠體內時，會抑制血管新生並減緩腫瘤生長速度(Lay *et al.*, 2000)。Pgk1 在細胞內也有許多功能，可作為 Primer recognition proteins (PRP)，PRP 為 DNA polymerase  $\alpha$  的 cofactors，協助 DNA lagging strand 複製 (Jindal *et al.*, 1990)。除此之外，在病毒複製時，病毒複製蛋白會招募 Pgk1，Pgk1 會提供 ATP 能量，達到促進病毒複製組合物組裝效率 (Prasanth *et al.*, 2017)。Pgk1 在惡性腫瘤中也扮演重要角色。在膽囊瘤細胞中，Pgk1 會調節 GBCDR1nc1 表現量並影響癌細胞的化學抗性與自噬活性 (Cai *et al.*, 2019)。在肝癌細胞中 Pgk1 可調控 miR-450b-3p 表現量來抑制癌細胞增殖與分裂 (Chen *et al.*, 2019)。在大腸癌患者的組織中，Pgk1 可使 miR-548c-5p 表現量下降，可作為大腸癌抑制因子 (Ge *et al.*, 2019)。胰腺導管腺癌病人的血液樣本中，能發現 Pgk1 量較正常人高 (Hwang *et al.*, 2006)。在 Her-2/neu 陽性的乳癌細胞中，細胞內的 Pgk1 有過量表現的現象 (D. Zhang *et al.*, 2005)。在結腸癌患者腫瘤中，Pgk1 mRNA 表現量也明顯提升 (Ahmad *et al.*, 2013)。在 HIF-1 $\alpha$  過量表現的白血病細胞中，Pgk1 顯著增加 (Sun *et al.*, 2019)。在子宮內膜腫瘤組織中發現 Pgk1 表現量較高 (Zhou *et al.*, 2019)。

Pgk1 有兩種 isoforms，分別為 Pgk1 與 Pgk2，兩者在功能與結構上相當相似，皆為 417 胺基酸長度，且序列有 87-88% 相似 (Chiarelli *et al.*, 2012)。而兩者不同之處在於表現於不同組織與由不同基因所表現。Pgk1 是持續表現在體細胞中，基因位於 X 染色體上，含有 11 個 exons 和 10 個 intron；Pgk2 主要表現於睪丸，與精子的形成有關，基因位於第六染色體上，並且沒有 intron (Michelson *et al.*, 1985)。

Pgk1 的缺失或變異對生物體會造成一定程度的影響，著名疾病為 Pgk1 deficiency，此疾病屬於 X 染色體性聯遺傳疾病，主要是 Pgk1 的突變所造成，目前已知約有 20 幾種突變會導致 Pgk1 deficiency。Pgk1 deficiency 有許多的臨床病




徵，例如：出血性溶血 (hemolytic anemia)、肌肉病變 (myopathy)、神經病變 (Neurological disorders)。肌肉病變是漸進式的過程，可由運動不耐性、肌肉無力、抽筋、肌痛的徵兆來判定；神經病變的部分，包含發育遲緩、運動神經元的缺失、癲癇、視網膜病變、漸進式的吞嚥困難等 (Valentini *et al.*, 2013)。Pgk1 的突變位置與疾病的表徵有關聯：Pgk1 A354P 會造成溶血性溶血、肌肉病變以及神經病變；Pgk1 I47N、Pgk1 L89P、Pgk1 L163V、Pgk1 D164V、Pgk1 R206P、Pgk1 C316R、Pgk1 S320N 會造成溶血性貧血以及神經病變；Pgk1 G158V、Pgk1 E252A、Pgk1 D315N、Pgk1 T378P 則會造成肌肉病變；Pgk1 I253T 以及由 RNA aberrant splicing 所造成的序列插入 IVS4+1 G>T、IVS7+5 G>A 則會造成肌肉病變以及神經病變 (Chiarelli *et al.*, 2012)。

## 前言



運動神經元疾病 (Motor neuron disease, MND) 是一種因運動神經元受損而造成全身肌肉無力的神經退化性疾病，而肌萎縮性脊髓側索硬化症 (Amyotrophic lateral sclerosis, ALS) 就是其中一種，由於脊髓的運動神經元退化而逐漸無法支配肌肉，病人肌肉逐漸萎縮而癱瘓，最終由於橫膈膜肌肉也逐漸萎縮，導致病人多數於 3 至 5 年內無法呼吸而死亡 (Kiernan *et al.*, 2011; Renton *et al.*, 2014)。大約 10% 的 ALS 病人屬於家族性遺傳 (familial ALS, FALS)，其餘 90% 屬於偶發性 (sporadic ALS, SALS)，且最常於 50 歲左右的中年時期發病 (Brown *et al.*, 2017)。Superoxide dismutase (SOD1) 是第一個被發現與 ALS 高度相關的基因因為它影響到蛋白質的 homeostasis (Rosen *et al.*, 1993)；後來又發現同樣會影響蛋白質 homeostasis 的 TANK-binding kinase 1 (TBK1) (Pottier *et al.*, 2015)；與 RNA homeostasis 和 trafficking 相關的 C9ORF72 (DeJesus-Hernandez *et al.*, 2011)；與細胞骨架動態平衡相關的 tubulin 4A (Pensato *et al.*, 2015)，這些都會與 ALS 有關。在 FALS 病人中，致病原因多為基因突變所致，常見基因有 SOD1、TAR DNA binding protein (TDP43)、fusion in sarcoma protein (FUS)、chromosome 9 open reading frame 72 (C9orf72) 等，其中 40% 為 C9orf72 突變所致；但在 SALS 病人中，只有 11% 的病人被證實為基因突變所致 (Renton *et al.*, 2014)。因此，至今為止對於 ALS 的發病機制仍舊不甚明確，也尚未有有效預防及治療之方法，故探討 ALS 致病機制及新的治療策略仍是現今重要課題。


在寡突膠質細胞 (oligodendrocytes) 上 NogoA 會用它的 Nogo66 domain 與神經細胞受體 NgR 以 Nogo66/NgR 的相互作用來抑制神經元的生長 (GrandPré *et al.*, 2000)。但近期內本實驗室 Lin *et al.* (2019) 發現，若肌肉細胞過量表現 NogoA，其 phosphoglycerate kinase 1 (Pgk1) 分泌量會減少而影響到神經細胞的神



經突生長。在運動神經元細胞培養基外源添加 Pgk1 可以促進神經突生長；注射 Pgk1 也可以改善過量表現 NogoA 斑馬魚以及肌肉 ALS 小鼠中的神經缺陷，更進一步發現外添加 Pgk1 會透過 Rac1-GTP/Pak1-T423/p38-T180/MK2-T334/Limk1-S323/ Cofilin-S3 訊息傳遞路徑並促進運動神經元的神經突生長。然而，尚不清楚骨骼肌肉細胞所分泌的 Pgk1 如何觸發運動神經元細胞，以增強它們的神經突生長。另一方面，若把重組 Pgk1 浸泡在小鼠運動神經元細胞 NSC34 培養液會發現細胞膜周圍可以檢測到外加的重組 Pgk1 訊號 (Lin *et al.*, 2022)。所以，我們推測運動神經元膜上可能存在 receptor，它會與肌肉細胞分泌的 Pgk1 相互作用以觸發訊號傳遞，而增強運動神經元的軸突生長。進一步地，本實驗室首先利用 Pull down/LC-MS/MS 分析可能與 Pgk1 結合的神經細胞 membrane protein，接著利用 Cell-surface Cross-linking immunoprecipitation 確認與 Pgk1 有著最高親和性的 membrane protein Py2 與它交互反應 (Fu *et al.*, unpubulish data)。

Pgk1 作為醣解作用 (glycolysis) 的關鍵酵素，將 1,3-bisphosphoglycerate 中的 acyl phosphate 轉移到 ADP 上，形成 3-phosphoglycerate 並同時產生一單位的 ATP。Pgk1 廣泛存在於所有生物體中，並且具有高度保留性。Pgk1 由一條 polypeptide 所組成，含有 N-terminal 與 C-terminal 兩個 domain，形成一個雙葉 (bilobed) 結構，1,3-bisphosphoglycerate 以及 3-phosphoglycerate 會與 N-domain 結合，核苷酸 ADP 以及 ATP 則會與 C-domain 結合。Pgk1 雙葉結構中含有一個 hinge-bending 的結構，經過構型改變，能拉近 N-domain 與 C-domain，進而達到催化 1,3-bisphosphoglycerate 或 3-phosphoglycerate 與核苷酸 ADP 或 ATP 的反應 (Blake *et al.*, 1981)。Pgk1 除了典型的醣解作用外，近年來許多未知功能也陸續被提及，如：Pgk1 在細胞內，可作為 Primer recognition proteins (PRP)，PRP 為 DNA polymerase  $\alpha$  的 cofactors，協助 DNA lagging strand 複製 (Jindal *et al.*, 1990)。除此之外，在病毒複製時，病毒複製蛋白會招募 Pgk1，Pgk1 會提供 ATP 能量，達到促進病毒複製






組合物組裝效率(Prasanth *et al.*, 2017)。近期斑馬魚研究中，在斑馬魚中，若將 P<sub>gk1</sub> knockout 時，會影響到與 Fibroblast growth factor (Fgf) 發育相關的細胞，如耳囊中的毛細胞、神經元或其他 central/peripheral nervous system (CNS/PNS) 相關神經 (Kantarci *et al.*, 2020)，例如運動神經突 (Lin *et al.*, 2019)。

斑馬魚作為研究人類病理學模型的優勢在於易於在體內操縱基因表達，同時，牠是一種脊椎動物，具有包括大腦和脊髓在內的常見器官和組織。此外，斑馬魚會產生大量的外部受精和透明的卵，它們會快速同步地發育，斑馬魚受精後發育一天大約相當於哺乳動物發育的前三個月，這些發育優勢允許研究整個早期發育階段的基因表達和功能。超過 80% 的斑馬魚基因結構在脊椎動物物種中具有高度的同源性，並且與大多數的人類同源物具有 50-80% 的胺基酸 identity。斑馬魚對於運動神經疾病的研究優勢源於脊髓的快速發育。神經出現大約於 10 hpf (hours post-fertilization, hpf)，突觸出現與第一次運動行為大約於 18 hpf。而在 24 hpf 時，中樞神經系統的許多相關特徵皆已出現，可供識別神經元群並進行研究。在這個階段，脊髓與體節發育相互對應，每個體節包含約十幾種細胞類型，因此可以分析運動神經元及其軸突分支。此外，在 48 hpf 時，可對斑馬魚胚胎之泳動行為與觸摸反應進行觀察。這些特性使斑馬魚適合作為運動神經疾病的模型。

在斑馬魚中，有三個初級運動神經元(primary motor neuron)，分別為 caudal primary (CaP)、middle primary (MiP)、rostral primary (RoP) motor neuron (Eisen *et al.*, 1986; Westerfield *et al.*, 1986)，大約在 20 hpf 時，從生長錐萌生。CaP 初級運動神經元從細胞體沿著肌節 (myotome) 的內側表面往腹側生長，其生長錐起初從脊髓中出現時通常較大，隨著它們的生長，生長錐逐漸縮小，並在到達水平隔肌 (horizontal septum) 時，會暫停長達 2 小時，暫停後 CaP 生長錐將再次變大並繼續向腹側生長，而 CaP 軸突會在水平隔肌處維持明顯的串珠樣膨體(varicosity)；MiP



初級運動神經元之生長錐最初往腹側生長，其路徑與 CaP 相同。然而，在到達水平隔肌時，生長錐停止往腹側生長，反而在背側長出生長錐，並在脊髓表面和軸肌 (axial muscle) 內側之間向背側生長；RoP 生長錐最初也遵循了由 CaP 生長錐開創的水平隔肌的路徑，同樣在到達水平隔肌後暫停，接著橫向轉動朝著肌肉的側面生長，並於水平隔肌的肌肉周圍產生分支 (Myers *et al.*, 1986)。

蛋白質和蛋白質之間的相互作用廣泛存在於生物體中並參與許多關鍵生化過程，例如：細胞信號傳導、酵素抑制以及免疫識別。儘管許多蛋白質結構已通過 X-ray 晶體學確定，但由於成本與時間限制，無法立即得知兩蛋白質的實際結合情形。我們可以透過分子對接 (molecular Docking) 預測兩蛋白質結合情形並加以建模 (Comeau *et al.*, 2004)，以了解它們的分子基礎；再利用 ZDOCK 預測這個蛋白質複合物的結構來將對接模型變成可視化，因它用快速「傅立葉變換算法」高效率地將對接搜索在 3D 的網格中，並利用形狀互補性以及靜電學進行評分，以獲得高準確性的預測結果 (Pierce *et al.*, 2014)。利用分子對接得到高分辨率結構，能夠進一步了解蛋白質複合物之相互作用的原子細節，並在此基礎上能夠更合理設計抑制或改善的分子治療藥物。所以，我也利用這套軟體系統去推測 ligand Pdk1 和 receptor 兩個蛋白質相互作用時，最可能的關鍵 domains 之結構特性及其重要的胺基酸，以利將來分子勝肽的設計與發展。

本實驗室 Lin *et al.* (2019) 發現了骨骼肌肉細胞分泌的 Pdk1 具有增強運動神經元的神經突生長的能力。然而，尚不清楚細胞外分泌的 Pdk1 如何增強神經突生長，如上述我的推測運動神經元膜上可能存在 receptor，且 Py2 與 Pdk1 有著高親和性。所以，本研究欲 (1) 利用運動神經元專一表現綠螢光的 Tg(*mnx:GFP*) 斑馬魚轉殖品系探討肌肉分泌的 Pdk1 是否透過膜蛋白 py2 觸發神經元細胞訊號傳遞，並促進運動神經元中的神經突生長；(2) 利用小鼠運動神

經元 NSC34 細胞探討細胞外 Pgl1 是否與細胞膜蛋白 Py2 結合;(3) 利用 Docking 進一步分析 Pgl1 與 Py2 的 domain,推測最可能影響神經突生長的未知 domain 內的胺基酸。



## 材料與方法



### 1. 斑馬魚(*Danio rerio*)飼養


野生種斑馬魚 (AB strain) 或其他基因轉殖品系分別飼養於光週期為 14/10 小時的 28 °C 環境培養，並且以人工飼料及豐年蝦餵食。約三個月達性成熟，即可進行配對產卵。配對時會在下卵前一天的傍晚將一公一母放入含有格網的小型寵物箱，隔天以濾網收集受精卵，在將卵培養於 28 °C 培養箱即可。斑馬魚轉殖品系 Tg(*mnx 1:GFP*) 從 ZIRC 購買，Tg(*mnx 1:GFP*)轉殖品系能在運動神經元專一表現綠色螢光 (Flanagan-Steet *et al.*, 2005)

### 2. HEK293T 人類腎臟細胞與 NSC34 小鼠運動神經元細胞的培養

HEK293T 細胞與 NSC34 細胞 (感謝 Dr. Cashman 提供) (Cashman *et al.*, 1992) 以含有 10 % FBS (Gibco) 以及 1% penicillin/streptomycin (Biowest) 的 DMEM medium (Gibco) (進行培養，並且置於 5 % CO<sub>2</sub> 的 37°C 恆溫培養箱培養；NSC34 神經細胞在含 10% FBS 的 DMEM medium 情況下會開始增生，但使用 1% FBS 的 DMEM medium 時，由於環境養分的缺乏 (serum deprivation) 會傾向於分化。

### 3. 斑馬魚胚胎 RNA 萃取

取特定時期之斑馬魚胚胎約 100 顆，加入 500µl 的 TRIzol<sup>®</sup> reagent 並以組織研磨器將胚胎磨碎；取 100µl 的 chloroform(CHCl<sub>3</sub>)加入後，於室溫下以旋轉混和方式作用 3 分鐘後，以 4°C, 13000 rpm 離心 15 分鐘收集上清液後，再加入 0.7 倍體積的 isopropanol，於室溫中進行 15 分鐘之 RNA 沈澱；沈澱後以 4°C, 13000 rpm 離心 30 分鐘。去除上清液後，加入 1mL 之 70% ethanol 清洗沈澱物中所含有之鹽類，以 4°C, 13000 rpm 離心 15 分鐘，去除上清液後進行



烘乾。接著再加入 50  $\mu$ l 的 DEPC 水將乾燥之 RNA 溶解後，再加入 50 $\mu$ l 的 4M LiCl，於 -20 $^{\circ}$ C 進行沈澱(至少 3 小時)。取出沈澱後 RNA，以 4 $^{\circ}$ C, 13000 rpm 離心 30 分鐘，去除上清液後，再加入 1mL 之 70% ethanol 清洗沈澱物中所含有之鹽類，以 4 $^{\circ}$ C, 13000 rpm 離心 10 分鐘，去除上清液後，再進行烘乾。最後加入 50  $\mu$ l 的 DEPC 水，將乾燥之 RNA 溶解並保存於-80 $^{\circ}$ C。

#### 4. 細胞 RNA 萃取

將細胞利用 PBS 沖洗並收集，以 4 $^{\circ}$ C, 3000 rpm 離心 5 分鐘，移除上清液後，再加入 200 $\mu$ l 的 TRIzol<sup>®</sup> reagent 以及 40 $\mu$ l 的 chloroform 後，於室溫下以旋轉混和方式作用 3 分鐘後，以 4 $^{\circ}$ C, 13000 rpm 離心 15 分鐘收集上清液後，再加入 0.7 倍體積的 isopropanol，以 4 $^{\circ}$ C, 13000 rpm 離心 30 分鐘，去除上清液後，再加入 1mL 之 70% ethanol 清洗沈澱物中所含有之鹽類，以 4 $^{\circ}$ C, 13000 rpm 離心 30 分鐘，去除上清液後，再進行烘乾。最後加入 30  $\mu$ l 的 DEPC 水，將乾燥之 RNA 溶解並保存於-80 $^{\circ}$ C。

#### 5. 反轉錄實驗(Reverse Transcription)

取 5 $\mu$ g 的 RNA(稀釋使體積為 11 $\mu$ l)後，再加入 1 $\mu$ l 的 10mM Oligo primer 以及 1 $\mu$ l 的 10 mM dNTP，於 65 $^{\circ}$ C 作用 5 分鐘後，立即置於冰上冷卻 1 分鐘並 spin down 後，依序加入下列反應試劑：4 $\mu$ l 的 5X First Strand Buffer (Invitrogen<sup>™</sup>)、1 $\mu$ l 的 RNase inhibitor (Promega)、1 $\mu$ l 的 0.1M DTT、1 $\mu$ l 的 SuperScript<sup>™</sup> III Reverse Transcriptase(Invitrogen<sup>™</sup>)，總體積為 20 $\mu$ l，於 50 $^{\circ}$ C 作用 30 分鐘後，再以 70 $^{\circ}$ C 作用 15 分鐘後將此 complementary DNA (cDNA) 模板保存於-20 $^{\circ}$ C。



## 6. 聚合酶連鎖反應(Polymerase Chain Reaction)

針對目標基因設計專一性 primer (源資公司)來將目標基因夾出，以利於選殖於適當之載體中。每一個 PCR 反應樣品中，含有下列反應試劑：約 0.3  $\mu\text{g}$  的核酸模版、各 1 $\mu\text{l}$  的 10 $\mu\text{M}$  正反向 primer、1 $\mu\text{l}$  10 mM 的 dNTP、4 $\mu\text{l}$  的 5X HiFi Fidelity Buffer with  $\text{MgCl}_2$  (KAPA)、0.5 $\mu\text{l}$  HiFi DNA Polymerase(KAPA)，補充 2 次水至總體積為 20 $\mu\text{l}$  均勻混合後，於 PCR 儀器進行反應，PCR 反應行程為：98 $^{\circ}\text{C}$ (5 mins)  $\rightarrow$ [98 $^{\circ}\text{C}$ (30 sec)  $\rightarrow$ 60 $^{\circ}\text{C}$ (30 sec)  $\rightarrow$ 72 $^{\circ}\text{C}$ (1 min)]此 cycle 進行 30 次  $\rightarrow$ 72 $^{\circ}\text{C}$ (2 mins)  $\rightarrow$ 25 $^{\circ}\text{C}$ (1 sec)，共 30 cycle。

## 7. 定點突變(Point Mutation)

設計包含目標單點突變的專一性短 primer，利用 RCR 分別將該基因點突變位置的前段與後段分別夾取，以利於選殖於適當之載體中。每一個 PCR 反應如(6)所述，除了用 5 $\mu\text{l}$  該基因點突變位置前段與後段核酸作為模版。

## 8. 質體構築

### (A)三種斑馬魚 Protein Y 之質體構築(pCS2-py1-Flag、pCS2-py2-Flag 以及 pCS2-py3-Flag)：

全長之斑馬魚 py1、py2 以及 py3 取得是使用 48 hpf 野生種斑馬魚的 cDNA 作為模版，並設計斑馬魚 py1、py2 以及 py3 專一性 primers：5'- py1 與 3'- py1\_Flag、5'-py2 與 3'-py2\_Flag 以及 5'-py3 與 3'-py3\_Flag，以 PCR 進行夾取。PCR 取得之斑馬魚 py1、py3 cDNA 作為 insert；pCS2 (由 Y.C.Cheng 提供)作為 vector，並利用限制酵素 EcoRI-HF (NEB)以及 XhoI (NEB)切割；而 py2 cDNA 以及 pCS2 則是利用限制酵素 ClaI (NEB)以及 EcoRI-HF (NEB)切割，切割後以 Gel/PCR DNA Fragment Extraction Kit

(Geneaid)回收；將兩片段之 DNA 接合並挑選 py1、py2 以及 py3 為正向接入(以 SP6 動子為轉錄聚合酵素)之質體。



**(B)兩種小鼠 Protein Y 之質體構築(pCS2-Py1-Myc 以及 pCS2-Py2-Myc)：**

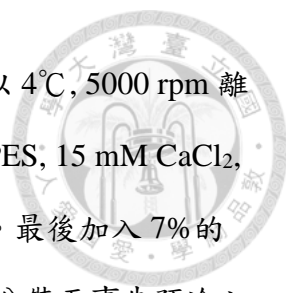
全長之小鼠 Pt1 以及 Py2 取得是使用 NSC34 細胞株的 cDNA 作為模版，並設計小鼠 Py1 以及 Py2 專一性 primers：5'- Py1 與 3'- Py1\_Myc 以及 5'- Py2 與 3'- Py2\_Myc ，以 PCR 進行夾取。PCR 取得之小鼠 Py1 cDNA 作為 insert；pCS2 作為 vector，並利用限制酵素 ClaI (NEB)以及 XhoI (NEB)切割；而 Py2 cDNA 以及 pCS2 則是利用限制酵素 EcoRI-HF (NEB)以及 XhoI (NEB)切割，切割後以 Gel/PCR DNA Fragment Extraction Kit (Geneaid)回收；將兩片段之 DNA 接合並挑選 Py1 以及 Py2 為正向接入(以 SP6 動子為轉錄聚合酵素)之質體。

**(C) 設計去除 py2 部分 domain 之質體構築：**

以 pCS2-py2-Flag 作為模版，設計斑馬魚 py2 專一性 primers，以 PCR 進行夾取。此 5'- primer 利用 codon 第三位置核甘酸的搖擺性(wobble)來避免被 py2 MO block。PCR 取得之斑馬魚 wobble-py2 以及 wobble-py2 truncated forms cDNA 作為 insert；pCS2 作為 vector，並利用限制酵素 ClaI (NEB)以及 EcoRI-HF (NEB)切割後，以 Gel/PCR DNA Fragment Extraction Kit (Geneaid)回收；將兩片段之 DNA 接合並挑選 wobble-py2 以及 wobble-py2 truncated forms cDNA 為正向接入(以 SP6 動子為轉錄聚合酵素)之質體。

**9. 勝任(Competent Cell)細胞之製備**

挑取大腸桿菌 DH5 $\alpha$  菌株之單一落(colony),接種於 5ml 之 LB 培養液中，於 37 $^{\circ}$ C 培養 16 小時後，取 300 $\mu$ l 菌液種入 300 ml 之 LB 培養液中，於 16 $^{\circ}$ C



培養至 OD600 為 0.5-0.6 時，立即將菌液冰浴 10 分鐘後，以 4°C, 5000 rpm 離心 5 分鐘去除上清液後，再加入預冷之 TB buffer(10 mM PIPES, 15 mM CaCl<sub>2</sub>, 250mM KCl, 55mM MnCl<sub>2</sub>)重新懸浮菌體，此步驟重複兩次。最後加入 7% 的 dimethyl sulfoxide(DMSO)充分混合均勻後，將菌液以 100µl 分裝至事先預冷之微量離心管中，保存於-80°C。

#### 10. 大腸桿菌之轉型作用(Transformation)

將 10 µl 的 ligation DNA 加入 100 µl 的 competent cell 於冰上 20 分鐘後，水浴 42°C 進行 1 分鐘，然後再放於冰上 3 分鐘，接著於 Laminar flow 內加入 1 ml 的 LB，水浴 37°C 培養 10 分鐘，以 13200 rpm 離心 30 秒，於 Laminar flow 內去除 1ml 的 LB，並利用殘餘的 LB 將 pellet 均勻打散，然後均勻塗盤於 LBA agar plate 上，培養 16 小時。

#### 11. 質體小量置備(mini-preparation of plasmid DNA)

利用 HiYield™ Plasmid Miniprep Kit(ArrowTec)進行質體置備。取隔夜培養的 5 ml 菌液置於 2 ml 離心管，分批以 13200 rpm 離心 30 秒，期間需倒掉上清液，加入 200 µl PH1，利用 vortex 的方式均勻將 pellet 打散後，再加入 200 µl PH2，溫和的上下倒轉 2 分鐘後，再加入 300 µl PH3，溫和的上下倒轉 2 分鐘後，以 13200 rpm 離心 10 分鐘。將所有上清液至 column 以 13200 rpm 離心 30 秒，移除 collection tube 內的液體後，再加入 400 µl 的 W1 buffer 以 13200 rpm 離心 30 秒，移除 collection tube 內的液體後，再加入 600µl wash buffer 以 13200 rpm 離心 30 秒，移除 collection tube 內的液體後，再空離 13200 rpm 離心 3 分鐘。最後加入 65°C 的二次水約 20 µl 於 membrane，以 13200 rpm 離心 2 分鐘並保存於-20°C。





## 12. DNA 限制酵素作用(Restriction Enzyme Digestion)

取約 5 $\mu$ g 載體 DNA(vector)與欲接入之 DNA 片段(insert)分別加入 5  $\mu$ l 的 10X NEBuffer 以及限制酵素(NEB)3  $\mu$ l (限制酵素資訊詳見 25.)，補二次水至體積 50 $\mu$ l，至於 37 $^{\circ}$ C incubator 16 小時。

## 13. DNA 接合反應(Ligation)

將 vector 及 insert 經限制酵素切割後回收適當片段進行。進行接合反應時，每一個反應樣品中，含有下列反應試劑：以體積比為 1:7 之 vector 及 insert、1 $\mu$ l 的 10X Ligase Buffer(NEB)以及 1 $\mu$ l 的 T4 DNA Ligase(NEB)，靜置於 4 $^{\circ}$ C 冰箱作用 overnight 或室溫作用 1 小時。

## 14. mRNA 合成

利用 mMessage mMachine SP6 Kit (Ambion)合成 5'-capped mRNA，合成步驟主要參照 Ambion Kit 中所提供的實驗步驟。首先，以 NotI(NEB)將質體線性化，以 Gel/PCR DNA Fragment Extraction Kit(Geneaid)回收線性化質體。mRNA 合成試劑需在冰上進行，依序加入下列反應物：6 $\mu$ l 的線性化質體、2 $\mu$ l 的 10X SP6 reaction buffer、10 $\mu$ l 的 2X NTP/CAP 及 2 $\mu$ l 的 SP6 polymerase enzyme mix。總體積為 20 $\mu$ l 之反應試劑置於 37 $^{\circ}$ C 水浴槽反應 2 小時。反應結束後，加入 30 $\mu$ l 的 nuclease-free water 及 30 $\mu$ l 的 Lithium Chloride，並於-20 $^{\circ}$ C 中沉澱 overnight。沉澱後，以 4 $^{\circ}$ C, 13000 rpm 離心 30 分鐘去除上清液後，將 mRNA 以 70% ethanol 以 4 $^{\circ}$ C, 13000 rpm 離心 30 分鐘清洗沈澱物中所含有之鹽類，去除上清液後，再進行烘乾，並將 mRNA 溶解於 30 $\mu$ l 之 nuclease-free water 中，保存於-80 $^{\circ}$ C。



## 15. 注射 Morpholino Oligonucleotides(MO)

MO 為特定序列、磷酸鍵經過修飾之短片段 oligonucleotides,其序列與目標基因之 mRNA 互補，當 MO 與斑馬魚體內之 mRNA 結合後，可抑制 mRNA 之轉譯作用及/或使 mRNA 分解，以抑制斑馬魚胚胎體內之特定基因 (Nasevicius and Ekker, 2000)。2 條 MO 委由 GeneTools 設計,針對斑馬魚 *py2* 基因進行設計，2 條 MO 分別為: *py2* MO 及 *py2* control MO2。

## 16. 顯微注射(Microinjection)

將毛細管製成有寬度為 10  $\mu\text{m}$  且 30 度角的斜口，並將毛細管注入礦物油裝入顯微注射器，吸取欲注射的 mRNA 或 MO，進行顯微注射時，需先將 mRNA 或 MO 稀釋至注射所需濃度並加入 phenol red 染劑，並注射於一細胞時期的斑馬魚胚胎之動物極(animal pole)中，每次注射量為 2.3nl。本研究所使用的 mRNA 濃度為 400pg/embryo；所使用的 MO 濃度為 14ng/embryo。

## 17. 斑馬魚 P<sub>gk1</sub> 浸泡與運動神經元觀察

以顯微注射方式，注射 mRNA(400 pg/embryo)或 MO(12 ng)於一細胞基因轉殖 Tg(*mnx1*:GFP) 斑馬魚胚胎，6 hpf (hours post fertilization)以鑷子 (DUMONT No.5)將卵膜撕開並浸泡 zP<sub>gk1</sub>-Flag (300 ng/ml)持續到 30 hpf，收取斑馬魚胚胎並加入 4% PFA 進行固定。再玻片上進行 mounting 後，於共軛焦顯微鏡(Leica TCS SP2)下 200 倍放大觀察結果。本研究觀察範圍為胚胎兩側之運動神經元且介於第 10 至 20 體節，當 30 hpf 斑馬魚胚胎的 primary motor neuron 沿正常路徑向腹部生長時，若有另外非 primary motor neuron 運動神經元的神經突生長出來則定義為神經突延伸生長所造成的分支。



## 18. 細胞轉染(Transfection)

將 HEK293T 細胞株培養在 10 cm dish 中，以含有 10%FBS 以及 1% penicillin/streptomycin 的 DMEM medium (Growth medium, GM)培養細胞至 7 成滿時進行轉染，準備欲轉染之 10  $\mu$ g DNA 與 25  $\mu$ l 的 jetPRIME<sup>®</sup>以及 reagent buffer 500  $\mu$ l 震盪混和，spin down 後靜置 10 分鐘，將混和液加入 medium 中，4~6 小時後替換 10% FBS medium，隔天收取細胞進行蛋白質純化；將 NSC34 細胞株以每個 well 培養  $3 \times 10^3$  顆細胞的數量培養於六孔盤，以 GM 培養，準備欲轉染之 1.5  $\mu$ g DNA 與 3  $\mu$ l 的 jetPRIME<sup>®</sup>以及 reagent buffer 200  $\mu$ L 震盪混和，spin down 後靜置 10 分鐘，將混和液加入 medium 中，4~6 小時後替換 medium，隔天更換 1% FBS 以及 1% penicillin/streptomycin 的 DMEM medium (Serum deprivation medium, SDM)進行細胞免疫螢光染色。

## 19. 生產含 Flag 重組蛋白之 HEK293T 細胞蛋白質萃取

將轉染完成之 HEK293T 細胞株利用 PBS 沖洗並收集，以 4°C, 3000 rpm 離心 5 分鐘，移除上清液後加入 whole cell extract (WCE：20mM Hepes, 0.2M NaCl, 1% Triton X-100, 20% glycerol, 1mM EDTA, protease inhibitor cocktail (Roche), Phosphatase inhibitor(Roche))，短暫震盪後靜置於冰上 10 分鐘，此步驟重複三次。最後以 4°C, 13200 rpm 離心 12 分鐘收集上清液，即為 HEK293T 細胞總蛋白質。

## 20. 斑馬魚胚胎蛋白質萃取

收取已用 PBS 清洗完之斑馬魚胚胎後，加入 deysolking buffer(0.5M Hepes, 1M NaCl, 1M KCl)，反覆 pipetting 至胚胎只剩下軀幹，以 4°C, 3000 rpm 離心 1 分鐘後，再加入與胚胎數量相等體積的 WCE 並以組織研磨機處理 10 秒後，靜置於冰上 10 分鐘，此重複此步驟 3 次。最後以 4°C, 13200 rpm 離心 12

分鐘收集上清液，即為斑馬魚胚胎總蛋白質。



## 21. 蛋白質純化

將 40  $\mu$ l 的 Flag beads(Sigma,A2220)以 PBS 清洗 3 次後，再以 WCE 清洗 1 次，過程中離心條件為 4  $^{\circ}$ C, 13000 rpm 離心 30 秒，清洗完畢加入用 WCE 萃取之總蛋白質，用 WCE 將總體積補足至 1 ml，置於 4  $^{\circ}$ C 反應 overnight，隔天以相同離心條件去除上清液，以 WCE 清洗 3 次，之後再加入 20 倍稀釋的 3X Flag peptide(Sigma,F4799)，置於 4 $^{\circ}$ C 反應 1 小時，進行 elute，之後吸取上清液，即為純化之蛋白質。利用 Bradford (Biorad)進行蛋白質定量，最後將蛋白質保存於-80 $^{\circ}$ C。

## 22. 銀染色法 (Silver staining)

將蛋白質用含有 SDS 的 sample buffer 煮沸 6 分鐘後，以 10% 的 polyacrylamide 製作下膠 (Running gel)，以及 4% 的 polyacrylamide 製作上膠 (Stacking gel)，上膠以 90 伏特的電壓進行，待 loading dye 至下膠轉為 120 伏特進行電泳。將膠體浸泡於 Fixation buffer (20% Trichloroacetic acid)，並於 shaker 上 60rpm 反應 30 分鐘後，以二次水清洗膠體 5 分鐘 3 次；接著再加入 Sensitizing buffer (0.3% Sodium thiosulphate, 10% Sodium acetate, 30% Ethanol, 0.125% Glutaraldehyde) 於 shaker 上 60rpm 反應 30 分鐘後，以二次水清洗膠體 5 分鐘 3 次；接著再加入 Silver reaction buffer (0.25% Silver nitrate, 0.015% Formaldehyde) 於 shaker 上 60rpm 反應 30 分鐘後，以二次水清洗膠體 1 分鐘 2 次；接著再加入 Developing buffer (2.5% Sodium carbonate, 0.0075% Formaldehyde) 於 shaker 上 60rpm 反應 3 分鐘；接著再加入 Stopping buffer (4% Acetic acid) 於 shaker 上 60rpm 反應 5 分鐘。最後以 chemiluminescence imaging system (Minichem<sup>TM</sup>) 拍照並進行蛋白質濃度分析。



### 23. 西方浸漬法 (Western Blotting)

將蛋白質用含有 SDS 的 sample buffer 煮沸 6 分鐘後，以 10 % 的 polyacrylamide 製作下膠 (running gel)，以及 4 % 的 polyacrylamide 製作上膠 (stacking gel)，上膠以 80 伏特的電壓進行，待 loading dye 至下膠轉為 120 伏特進行電泳。以 100 伏特的電壓、400 毫安培的電流將膠體內的蛋白質轉印 (transfer) 到 PVDF 膜上，時間設定為 90 分鐘。PVDF 膜以 5% 的 BSA 在室溫下 Blocking 1 小時，之後加入一級抗體，於 4°C 在 shaker 上反應 overnight。以 TBST 清洗 membrane 3 次，每次 5 分鐘，將一級抗體洗淨後，加入帶有 HRP (Horseradish peroxidase) 的二次級抗體，於室溫下在 shaker 上搖晃 1 小時。以 TBST 清洗 membrane 3 次，每次 5 分鐘，最後以 chemiluminescence imaging system (Minichem™) 以及 ECL 進行呈色與拍照。

### 24. 神經細胞 neurite outgrowth 的量化

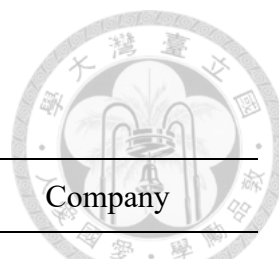
將 NSC34 細胞株以每個 well 培養  $3 \times 10^3$  顆細胞的數量培養於六孔盤，以 GM 培養 24 小時後，再置換成 SDM 培養 24 小時，再置換成含有 66 ng/ml 之不同 truncated forms 或正常 mPgl-Flag 的 SDM 培養，連續浸泡兩天。拍攝明視野下於倒立相位差顯微鏡 (Nikon Tis) 下 200 倍放大的影像，拍攝約 25 張照片，並隨機挑選 40 顆細胞，對影像中每一顆神經突長度總和大於 100  $\mu\text{m}$  的細胞，透過 ImageJ 計算其神經突長度，將神經突長度總和大於 200  $\mu\text{m}$  的細胞定義為 neurite-bearing cell，最後計算每個組別神經突的平均長度。

### 25. 生物統計分析

將獨立的三次實驗獲得的數據以 Student's t-test 檢驗統計顯著性，採取單尾檢定，樣本變異數為同質，數據結果為平均值與  $\pm$  標準誤差 (SEM)，若  $p < 0.05$  則被認為具有統計學意義。(\*,  $p < 0.05$ ; \*\*,  $p < 0.01$ ; \*\*\*,  $p < 0.001$ )。

## 26. NSC34 細胞免疫螢光染色

在六孔盤中放置玻片，並以 polylysine 浸泡 20 分鐘。進行 coating。每個 well 種植 3000 個 NSC34 細胞，培養一天後，分別使用 cDNAs 各別將 pCS2-Py1-Myc、pCS2-Py2-Myc 或 pCS2-EGFP-Myc 轉染到 NSC34 細胞後以 GM 培養 24 小時，再置換成 SDM 培養 24 小時，再置換成含有 66 ng/ml mPgl1-Flag 或 EGFP-Flag 的 SDM 培養，連續浸泡兩天。以 3.7% PFA 固定 10 分鐘，經 PBS 清洗兩次後，以 0.1% Triton 處理 10 分鐘，並以 Blocking buffer(5% BSA, 0.1% Triton)處理 1 小時。之後加入一級抗體 anti-Flag 與 anti-Myc 於 4°C 染色 16 小時後以 PBST 清洗兩次；之後加入二級抗體 anti-mouse DyLight 488 與 anti-rabbit Rhodamin 於室溫染色 1 小時後以 PBST 清洗兩次。DAPI 以 1:2000 的比例進行稀釋，於室溫下染色 5 分鐘，以 PBST 清洗兩次，便可以 confocal 顯微鏡 (Zeiss LSM 780) 以 400 倍放大觀察拍照。



**Table 1.**

**(a) 初級抗體**

antibodies	Dilution	Dilution buffer	Host	Company
<b>Monoclonal anti-Py2</b>	1:1000	TBST/5% BSA	Rabbit	Novus Biologicals
<b>Monoclonal anti-<math>\alpha</math>-tubulin</b>	1:10000	TBST/5% BSA	Mouse	Sigma
<b>Polyclonal anti-Flag</b>	1:200	PBST/5% BSA	Rabbit	abcam
<b>Monoclonal anti-Myc</b>	1:200	PBST/5% BSA	Mouse	Sigma

**(b) 次級抗體**

antibodies	Dilution	Dilution buffer	Company
<b>goat anti-mouse IgG-HRP</b>	1:10000	TBST/5% skim milk	abcam
<b>goat anti-rabbit IgG-HRP</b>	1:10000	TBST/5% skim milk	Cell Signaling
<b>goat anti-mouse IgG DyLight™ 488</b>	1:500	PBST/5% BSA	ROCKLAND
<b>goat anti-rabbit IgG Rhodamin</b>	1:500	PBST/5% BSA	Sigma

## 結果



### 1. 在斑馬魚胚胎中，過量表現三種不同斑馬魚 Protein Y isoforms 對運動神經突造成分支的影響。

為了探討在斑馬魚中 ligand P<sub>gk1</sub> 和 receptor Protein Y 是否促進運動神經元的生長，我利用了能在運動神經元專一表現綠螢光的 Tg(*mnx:GFP*) 斑馬魚轉殖品系，首先於斑馬魚胚胎一細胞時期，將 mRNA (400 pg) 注射至胚胎動物極，但由於 zP<sub>gk1</sub> 位於細胞外並與細胞膜上的 py2 產生交互作用，故以外添加方式於 shield stage (6 hpf) 外添加 zP<sub>gk1</sub>-Flag (300 ng/ml)，直到 30 hpf。正常 30 hpf 的斑馬魚胚胎，其運動神經元只有 primary motor neuron (PMN) 開始生長，secondary motor neuron (SMN) 尚未成熟，另外，PMN 主要有三種：rostral primary (RoP)、middle primary (MiP) 和 caudal primary (CaP) (Eisen *et al.*, 1986)，我們觀測以 CaP 在第 10 體節至第 20 體節的兩側，當 PMN 沿正常路徑向腹部生長時，觀察是否有分支生長 (Figure 1A)。因此，在 30 hpf 收取 Tg(*mnx 1:GFP*) 斑馬魚胚胎，觀察在 *vivo* 系統中運動神經元生長造成分支的情形。

本實驗方法為存在 zP<sub>gk1</sub> 的形況下，注射不同的 Protein Y isoform 的 mRNA，觀察運動神經元的 phenotypes，以探討不同的 Protein Y isoform 對於運動神經突造成分支的影響。實驗結果顯示，與未處理斑馬魚運動神經元突相比，浸泡 zP<sub>gk1</sub> 的胚胎會提升 26% 個體出現 branched neurons (n=45)，而在都有浸泡 zP<sub>gk1</sub> 的情況下，過量表現 *py1* 和 *py3* 的胚胎對於 branched neurons 之增減在統計上並沒有顯著差異 (n=45、n=39)。然而過量表現 *py2* 的胚胎卻會提升 39% 之 branched neurons 個體出現 (n=45) (Figure 1C)。綜合上述所知，在 ligand P<sub>gk1</sub> 存在時，只有過量表現 *py2* 才會促進運動神經元的生長而產生異位分支。



## 2. 於 NSC34 轉染小鼠 Py2 cDNA 會與外添加之小鼠 Pgk1 (mPgk1) 在細胞膜表面結合

利用細胞免疫螢光染色觀察探討細胞外 Pgk1 是否會與膜上表現的 Py2 產生交互作用。我們從細胞免疫螢光染色可以觀察到轉染 Py2-Myc cDNA 並用 anti-Myc 抗體偵測，發現在 NSC34 細胞膜上可偵測到綠色訊號 (Figure 2B)，表示 Py2 確實表現於細胞膜上。考慮到 Pgk1 需要與膜上 Py2 結合，故以浸泡方式添加到 DMEM 培養液中，同時，在細胞膜上觀察到紅色 Flag 訊號 (Figure 2C)，表示 Pgk1 也座落於細胞膜上，merge 在細胞膜上顯示出黃色訊號，表示 Pgk1 確實會與 Py2 在膜上產生交互作用 (Figure 2E)，最後，依照箭頭方向表示螢光強度，觀察到綠色 Myc 訊號與紅色 Flag 訊號於細胞膜上重疊 (Figure 2F)，更加驗證了 Pgk1 與 Py2 的結合關係。為了確認本實驗的正確性；首先，在同樣轉染 Py2-Myc cDNA 的情況下浸泡 EGFP-Flag，並沒有在細胞膜上觀察到紅色訊號，表示 EGFP 並不會與 Py2 產生交互作用 (Figures 2G-L)，作為浸泡 negative control；其次，在浸泡 Pgk1-Flag 的情況下，轉染 EGFP-Myc cDNA，可以觀察到 EGFP 是整個細胞都會表現，但仍然沒有在細胞膜上觀察到紅色訊號，表示 Pgk1 並不會與 EGFP 產生交互作用 (Figures 2M-R)，這個也作為轉染 negative control；最後，在浸泡 Pgk1-Flag 的情況下，轉染 Py1-Myc cDNA，由於 Py1 與 Py2 屬於同個家族，且同樣表現於細胞膜上，結果顯示仍然沒有在細胞膜上觀察到紅色訊號，表示 Pgk1 並不會與 Py1 產生交互作用 (Figures 2S-X)，作為細胞膜上的 negative control。

## 3. 同時浸泡斑馬魚 Pgk1 (zPgk1) 又過量表現斑馬魚 py2 對促進斑馬魚胚胎運動神經元的神經突的效果

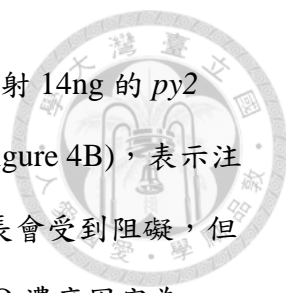
為了更進一步了解細胞外添加 zPgk1 與細胞內過量表現 py2 對斑馬魚胚胎運動神經元的神經突生長發育的影響，我先將 py2 mRNA 注射至 Tg(*mx1:GFP*) 品系的斑馬魚胚胎一細胞時期，之後於 shield stage 再浸泡外源性 zPgk1 蛋白質，之

後於 30 hpf 觀察斑馬魚胚胎其運動神經元的神經突生長情形。

(Figure 3A)。實驗結果顯示，與未注射的斑馬魚運動神經元相比，過量表現 *py2* 的胚胎會提升 25% 個體出現 branched neurons (n=42)；若外添加 zPgl1 會提升約 28% 的胚胎出現 branched neurons (n=45)；但若過量表現 *py2* 並且同時外添加 zPgl1 則會提升到 64% 個體顯現 branched neurons (n=45) (Figure 3B)。這些證據皆顯示，無論是過量表現 *py2* 或 zPgl1 皆能促進斑馬魚胚胎運動神經元的神經突生長而造成分支，而在細胞內過量表現 *py2* 並同時細胞外添加 zPgl1 則具有協同促進神經突生長效果，指出 Pgl1 與 Py2 之間存在著 ligand 和 receptor 關係的可能性。

#### 4. Knockdown 斑馬魚 *py2* 導致斑馬魚胚胎的運動神經元的神經突發生缺陷

為了進一步了解 *py2* 對斑馬魚的運動神經元的神經突影響，設計具有專一抑制斑馬魚 *py2* mRNA 轉譯功能之 *py2* MO；同時，為確認 MO 不會對運動神經元突產生毒性，設計含有 5 個不同核苷酸密碼的 *py2* mismatched MO，由於有 5 個位置不同，使得 *py2* mismatched MO 無法與 *py2* mRNA 結合，故不會阻止轉譯，作為 *py2* control MO。利用顯微注射系統將 *py2* MO 或 *py2* control MO 於一細胞時注入基因轉殖 Tg(*mnx 1:GFP*) 斑馬魚胚胎體內，之後於 30 hpf 觀察斑馬魚胚胎其運動神經元的神經突生長情形。從斑馬魚運動神經元 phenotype 方面得知，顯微注射 *py2* control MO 的胚胎中，胚胎運動神經元的神經突發育不會受到影響；然而顯微注射 *py2* MO 的胚胎中，胚胎運動神經元的神經突發育呈現輕微缺陷 (mild defect) 及嚴重缺陷 (severe defect)：輕微缺陷即運動神經突仍會往腹側生長，但長度明顯不足，約為 Wild Type 運動神經元的一半；而嚴重缺陷即運動神經突停留在水平隔肌 (horizontal septum) 前，甚至完全無法生長 (Figure 4A)。接著，我們分別注射 12ng 或 14ng 的 *py2* MO 並統計缺陷比例。結果顯示，注射



12ng 的 *py2* MO 的胚胎有 27% 個體出現輕微缺陷 (n=13)；而注射 14ng 的 *py2* MO 則有 20% 個體出現輕微缺陷以及 20% 的嚴重缺陷 (n=12) (Figure 4B)，表示注射 *py2* MO 於斑馬魚胚胎中即可觀察對運動神經元的神經突生長會受到阻礙，但又因 14ng 則會對神經突受損過於嚴重，故之後實驗注射 *py2* MO 濃度固定為 12ng。

我用 Western blot 來解析 MO 處理過的胚胎所含 *py2* 蛋白質的表現量。實驗結果顯示注射 *py2* control MO 之胚胎其 *py2* 與  $\alpha$ -tubulin 表現量之比值 (ratio) 標準化為 1 時，注射 *py2* MO 之胚胎其 *py2* 蛋白質表現量下降到 0.20 (Figure 4C)，表示只有 *py2* MO 會大幅降低斑馬魚胚胎內的 *py2* 蛋白質表現量。

##### 5. 在缺乏 *py2* 的情況下，外添加斑馬魚 *Pgk1* (z*Pgk1*) 無法促進運動神經元其神經突的分支。

為了探討在運動神經元的神經突中，*py2* 與 *Pgk1* 之間的相互關係，我利用顯微注射系統將 *py2* MO 或 *py2* control MO 於一細胞時注入基因轉殖 Tg(*mnx1*:*GFP*) 斑馬魚胚胎體內，並於 shield stage 再浸泡 z*Pgk1*，之後於 30 hpf 觀察斑馬魚胚胎其運動神經元的神經突生長情形。實驗結果顯示，從斑馬魚運動神經元 phenotype 方面得知，浸泡外源 z*Pgk1* 會使斑馬魚胚胎的運動神經元突產生分支；相反地，注射 *py2* MO 則會使運動神經元突缺陷，但注射 *py2* control MO 則不會影響運動神經元突發育 (Figure 5A)。若與未處理斑馬魚運動神經元突相比，浸泡 z*Pgk1* 的胚胎會提升 30% 個體出現 branched neurons (n=43)，而注射 *py2* MO 的胚胎對 branched neurons 沒有明顯影響 (n=37)。但在同樣浸泡 z*Pgk1* 的情況下，若是注射 *py2* MO 來 knockdown *py2* 表現量，則會使胚胎個體會產生 branched neurons 的比例下降為 27% (n=41)，表示若沒有足夠的 *py2* 存在，過量表現 z*Pgk1* 也無法促進斑馬魚胚胎運動神經元的神經突產生分支，且與 untreated control 沒有

顯著性差異 (Figure 5B)。另一方面，同樣於浸泡 zPgk1 的情況下，注射 *py2* control MO 也不會影響到 branched neurons 產生的胚胎數 (n=37)，表示 MO 對斑馬魚胚胎運動神經元突的影響與毒性無關 (Figure 5B)。這些結果都表明了:當 *py2* 表現量不足時，過多的 Pgk1 也無法促進運動神經元的神經突產生更多的分支。

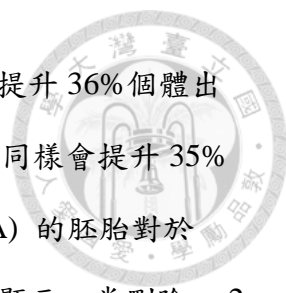
## 6. 利用軟體推測膜蛋白 Protein Y 蛋白質的可能特性

為了探討 *py2* 是如何促進運動神經元的神經突，我首先利用 TMHMM - 2.0 (Krogh *et al.*, 2001) 軟體分析斑馬魚 *py2* 與小鼠 *Py2* 的穿膜情形。紅色表示穿膜區域，藍色表示位於膜內，粉紅色表示位於膜外。從分析結果發現，無論是 *py2* 還是 *Py2* 皆發現大部分位於膜外，但可以觀察到些許穿膜訊號，故 *py2* 可能屬於膜周邊蛋白 (Peripheral protein) 而非鑲嵌型蛋白 (Integral protein)。

另一方面，利用 ProtScale (Gasteiger *et al.*, 2005) 分析 *py2* 與 *Py2* 的親水性質。Score > 0 表示該區域屬於疏水性，Score < 0 則表示該區域屬於親水性。從分析結果發現:無論是 *py2* 還是 *Py2* 的胺基酸序列中，有約 40% 疏水性則可能附著於細胞膜上，而其他 60% 屬於親水性可能暴露於膜外，其中含有連續且密集的親水性區域，表示該區域很可能如 Cho and Stahelin (2005) 所述是位於細胞膜外並接受細胞外信息。

## 7. 在斑馬魚胚胎中，過量表現截短的斑馬魚 *py2* domain 對運動神經元的神經突造成分支的影響

為了更進一步了解 *py2* 的 truncated forms 對斑馬魚胚胎運動神經元的神經突生長發育的影響，我利用 *py2* 的兩種 truncated forms，並且使用 *py2* MO 抑制內生性 *py2* mRNA 表現，另外我又額外注射可以避免被 *py2* MO 抑制的 *py2* wobble (WB-*py2*) mRNAs。如 Figure 6 結果顯示，在同樣注射 *py2* MO 與浸泡 zPgk1 的



斑馬魚胚胎運動神經元相比，再額外注射 WB-py2(FL)的胚胎會提升 36%個體出現 branched neurons (n=44)；而再額外注射 WB-py2( $\Delta$ B) 的胚胎同樣會提升 35%個體出現 branched neurons (n=43)；唯獨再額外注射 WB-py2( $\Delta$ A) 的胚胎對於 branched neurons 沒有顯著差異 (n=42) (Figure 6B)。這些證據皆顯示，當刪除 py2 部份胺基酸序列時，對於斑馬魚胚胎運動神經元的神經突生長而造成分支效果會消失，顯示該 domain 對於 ePgk1 促進神經突生長至關重要。

#### 8. 在 NSC34 中，外添加 Pgk1 具有促進細胞神經突生長的關鍵 domain

在上述的斑馬魚實驗中，已證實 Pgk1 具有促進運動神經突生長並造成分支的效果，接著我以小鼠運動神經元細胞 NSC34 觀察外添加各種不同的 truncated form 之 Pgk1，探討何段為促進神經突生長之重要區域。

我先將由 HEK293T 產生的 Pgk1 與 truncated form 的 Pgk1 以外源添加方式將蛋白質加入培養液中，之後以倒立相位差顯微鏡觀察 NSC34 的神經突生長情況(Figure 7A)。從 40 顆細胞中，統計神經突長度總和大於 200  $\mu$ m 的 neurite bearing cells 所佔的比例。結果發現；與 untreated 相比，外浸泡 mPgk1 和 mPgk1 A fragment-Flag 都會提升約 24%的 neurite-bearing cells 個數；外浸泡 mPgk1 C fragment-Flag 和 D fragment-Flag 都會提升約 12%的 neurite-bearing cells 個數，但外浸泡 mPgk1 C fragment-Flag 所提升的 neurite-bearing cells 百分比與 untreated 沒有顯著性差別 (Figure 7B)。另一方面，統計神經突的平均長度方面分析發現，當 untreated 的神經突平均長度標準化為 1 時，外浸泡全長的 mPgk1 和 mPgk1 A fragment-Flag 的神經突平均長度都會提升約 1.47 倍；外浸泡 mPgk1 C fragment-Flag 和 D fragment-Flag 的神經突平均長度都會提升約 1.27 倍，但外浸泡 mPgk1 B fragment-Flag 的神經突平均長度與 untreated 沒有顯著性差別 (Figure 7C)。



## 9. 推測 human Py2 與 human Pgk1 的結合構型與關鍵 domain

在斑馬魚實驗中，已發現 Py2 與 Pgk1 兩蛋白質將對神經突有促進效果，甚至具有協同促進神經突的能力(Figure 3)；而在 NSC34 細胞實驗中，也發現到 Py2 與 Pgk1 於細胞膜上結合並產生 colocalization 之黃色訊號 (Figure 2)。

我利用 ZDOCK 模擬 human Py2 與 human Pgk1 可能的結合構型，接著使用 APBS electrostatics 推算出 Py2 與 Pgk1 的電性分布，而在蛋白質結構中， $\alpha$ -螺旋與二級結構折疊息息相關，且不少文獻指出  $\alpha$ -helix 對於蛋白質結合有一定的貢獻 (Gibson *et al.*, 2022 ; Czarna *et al.*, 2011)，故我透過分析兩蛋白質交接面發現 Py2 胺基酸序列會與 Pgk1 胺基酸序列有電荷作用，且 Py2 與 Pgk1 的主要作用力為電荷作用，而不是極性作用力。

## 10. 利同人類突變 Pgk1 會失去促進斑馬魚胚胎運動神經元其神經突分支的能力。

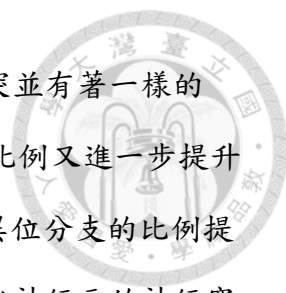
為了確認突變 hPgk1 是否對促進神經突生長的功能有所影響，我先構築突變 human Pgk1，然後於 Tg(*mx1:GFP*) 品系的斑馬魚發育到 shield stage 時，分別浸泡正常的 hPgk1 與突變 hPgk1，之後於 30 hpf 觀察斑馬魚胚胎其運動神經元的神經突生長情形。實驗結果顯示，與未處理的斑馬魚運動神經元相比，浸泡正常的 hPgk1 的胚胎會提升 36% 個體出現 branched neurons (n=44)；但若浸泡突變 hPgk1 的胚胎對 branched neurons 沒有明顯影響提升的功能 (n=44)。這些證據顯示，若將 Pgk1 中與 Py2 產生作用的關鍵結構破壞時，會使得 Pgk1 失去它促進運動神經元的神經突生長的能力。

## 討論



### 1. py2 作為膜上 receptor 會與 ligand Pkg1 一同促進斑馬魚運動神經元的神經突生長

有關斑馬魚的 ALS 研究中，*Alsin 2* (*zAls2*) 基因發生突變會導致上/下運動神經元都受到影響，常見病徵為上運動神經元的側索硬化症 (primary lateral sclerosis, PLS) 以及遺傳性痙攣性截癱 (infantile onset ascending hereditary spastic paraplegia, IAHSP)，若是 knockdown 斑馬魚 *Als2* 則會導致運動神經元生長走向 (projections) 以及泳動缺陷之發育不正常的胚胎 (Gros-Louis *et al.*, 2008)。TDP-43 存在於多種神經系統疾病的包涵體 (inclusion bodies) 中，包括 ALS、額顳葉癡呆 (frontotemporal dementia)、帕金森氏症 (Parkinson's disease) 以及阿爾茨海默症 (Alzheimer's disease)。無論是在斑馬魚中過量表現人類 *Tardbp* 還是 knockdown 內生性 *Tardbp* 都會導致其胚胎出現不成熟和過多分支及較短的運動神經元 (Kabashi *et al.*, 2010)。ELP3 是 RNA 聚合酶 II 中的組成部分並參與轉錄延伸，但基因突變會使神經軸突退化，若是 knockdown 斑馬魚 *ELP3* 會導致其胚胎腹部運動神經元長度縮減以及異常分支 (Simpson *et al.*, 2009)。在有關斑馬魚的 SMA 研究中，發現致病原因為 SMN 的蛋白質水平量過低引起，並使得脊髓運動神經元的缺失。當 *Smn1* 被 knockdown 時，會導致斑馬魚的運動神經元先被截斷 (truncated)，然後在截斷部位產生大量的分支缺陷 (McWhorter *et al.*, 2003)。而在本研究中，當我在斑馬魚胚胎中 knockdown *py2* 時，我觀察到其運動神經突有縮短甚至消失的情形，這現象說明了 *py2* 對於運動神經元的發育確實重要，但並無觀察到運動神經元有分支過早的現象 (Figure 4)。此外，無論是注射 *py2* 或是浸泡 *zPkg1* 都能觀察到胚胎運動神經元的神經突分支比例提升，而這種現象與上述文獻中所提到運動神經元長度不足而產生大量的分支有所不同：本研究觀察到的是在胚胎運動神經元發育正常 (軸突無縮短現象) 的情況下，額外產生額外的神經



突，表示過量表現 py2 或是 zPgk1 都能促進運動神經元的神經突並有著一樣的 phenotype，而若是注射 py2 並同時浸泡 zPgk1 出現異位分支的比例又進一步提升 (Figure 3)；若是 knockdown py2 時，再外添加 zPgk1 則無法使異位分支的比例提升，表示若 py2 表現量不足時，過量表現 zPgk1 也無法促進運動神經元的神經突產生分支 (Figure 5)。這些實驗結果支持 Pgk1 與 py2 之間存在著 ligand 和 receptor 關係的可能性。

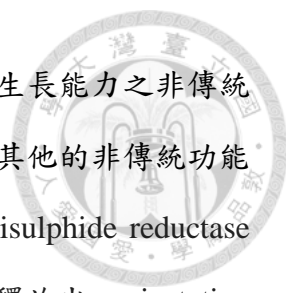
## 2. 在 py2 以及 Pgk1 中促進神經突生長的關鍵 domains

近期內本實驗室 Lin *et al.* (2019a) 發現外添加 Pgk1 至 NSC34 神經細胞會透過 Rac1-GTP/Pak1-T423/p38-T180/MK2-T334/Limk1-S323/ Cofilin-S3 訊息傳遞路徑並促進突觸生長。在一些蛋白的交互作用中， $\alpha$ -helix 對於結合有一定貢獻，例如：Nup358 是一種核孔複合物(nuclear pore complex)蛋白，會與動力調節蛋白(dynein adaptor) BicD2 產生交互作用並造成核定位。其作用機制為 Nup358 胺基酸序列 2162-2184 胺基酸片段在與 BicD2 結合後，該片段會轉換成  $\alpha$ -helix 構型並形成交互作用的核心交界面，若將該區域的  $\alpha$ -helix 突變則會降低 Nup358/BicD2 相互作用，並導致動力蛋白募集減少和運動受損 (Gibson *et al.*, 2022)。哺乳動物隱花色素 mCRY1/2 會和 mBMAL1 參與生物時鐘轉錄反饋抑制，他們包含兩個結合位點，其中一個即為 mBMAL1 的  $\alpha$ -helix 區域 (Czarna *et al.*, 2011)。這些研究都展示了  $\alpha$ -helix 對於蛋白質的結合相當重要。在我的研究中，透過 ZDOCK 分析，我推測 Py2 胺基酸序列與 Pgk1 的這兩個  $\alpha$ -helix 具有交互作用的可能性。

## 3. Pgk1 非傳統的功能

根據本實驗室 Lin *et al.* (2019) 的研究發現，外添加 Pgk1 會藉由降低 Cofilin 磷





酸化以促進神經生長，然而細胞外之 P<sub>gk1</sub> 則具有能促進神經突生長能力之非傳統的功能。細胞外 P<sub>gk1</sub> 除了促進神經突生長的非傳統功能之外，其他的非傳統功能很早就被報告。例如從腫瘤細胞株分泌至細胞外的 P<sub>gk1</sub> 具有 disulphide reductase 活性，能作用於 plasmin，使雙硫鍵被破壞，導致 plasmin 被裁切並釋放出 angiostatin，以抑制血管腫瘤。當 P<sub>gk1</sub> 被注射於含有腫瘤的小鼠體內時，會抑制血管新生並減緩腫瘤生長速度(Lay *et al.*, 2000)。

至於在細胞內 P<sub>gk1</sub> 的非傳統功能也早有陸續被發現，例如：在斑馬魚中，若將 P<sub>gk1</sub> knockout 時，會影響到與 Fibroblast growth factor (Fgf) 發育相關的細胞，像是控制毛細胞的聽平衡神經節(statoacoustic ganglion)數量減少，以及三叉神經(trigeminal)、面部和舌咽神經節(ganglia)、後腦的網狀脊髓神經元(reticulospinal neurons)和嗅覺上皮細胞(olfactory epithelium)發育不良(Kantarci *et al.*, 2020)。P<sub>gk1</sub> 在細胞內可作為 Primer recognition proteins (PRP)，PRP 為 DNA polymerase  $\alpha$  的 cofactors，協助 DNA lagging strand 複製 (Jindal *et al.*, 1990)。除此之外，在病毒複製時，病毒複製蛋白會招募 (recruit) P<sub>gk1</sub>，P<sub>gk1</sub> 會提供 ATP 能量，達到促進病毒複製組合物組裝效率 (Prasanth *et al.*, 2017)。P<sub>gk1</sub> 在惡性腫瘤中也扮演重要角色。在膽囊癌細胞中，P<sub>gk1</sub> 會調節 GBCDRlnc1 表現量並影響癌細胞的化學抗性與自噬活性 (Cai *et al.*, 2019)。在肝癌細胞中 P<sub>gk1</sub> 可調控 miR-450b-3p 表現量來抑制癌細胞增殖與分裂 (Chen *et al.*, 2019)。在大腸癌患者的組織中，P<sub>gk1</sub> 可使 miR-548c-5p 表現量下降，可作為大腸癌抑制因子 (Ge *et al.*, 2019)。胰腺導管腺癌病人的血液樣本中，能發現 P<sub>gk1</sub> 量較正常人高 (Hwang *et al.*, 2006)。在 Her-2/neu 陽性的乳癌細胞中，細胞內的 P<sub>gk1</sub> 有過量表現的現象 (D. Zhang *et al.*, 2005)。在結腸癌患者腫瘤中，P<sub>gk1</sub> mRNA 表現量也明顯提升 (Ahmad *et al.*, 2013)。在 HIF-1 $\alpha$  過量表現的白血病細胞中，P<sub>gk1</sub> 顯著增加 (Sun *et al.*, 2019)。在子宮內膜腫瘤組織中發現 P<sub>gk1</sub> 表現量較高 (Zhou *et al.*, 2019)。總結，P<sub>gk1</sub> 功能不再只是單純負責細胞內 glycolysis 催化酵素，在細胞內及細胞外的 P<sub>gk1</sub> 都有其重要非傳統的功能。

## 結論

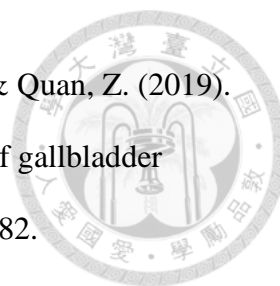


在斑馬魚胚胎實驗中，我發現在 Protein Y 具有促進運動神經元的神經突生長的能力，與 Pgc1 共同過量表現的情況下，對斑馬魚胚胎的神經突生長具有加乘性作用，若將 py knockdown 時，則會使斑馬魚胚胎失去神經突生長的效果。我也進一步發現 py 能促進運動神經元的神經突生長的主要功能區為胺基酸序列，而這些促使斑馬魚胚胎的神經突生長皆與醣解產生的能量無關。在小鼠運動神經元細胞 NSC34 實驗中，我發現 Py 與 Pgc1 於細胞膜上產生 colocalization，同時，在 NSC34 也能觀察到 Pgc1 具有促進神經突生長的能力，也進一步發現一些 Pgc1 truncated form 時，會失去促進神經突生長的效果。綜合以上實驗結果，我認為骨骼肌細胞所分泌的 Pgc1 會與神經膜上 receptor py 產生交互作用，在觸發神經細胞內的訊息傳遞 (Lin *et al.*, 2019) 後，使得運動神經元的神經突生長。

## 參考文獻



- Ahmad, S. S., Glatzle, J., Bajaeifer, K., Bühler, S., Lehmann, T., Königsrainer, I., Vollmer, J. P., Sipos, B., Ahmad, S. S., Northoff, H., Königsrainer, A., & Zieker, D. (2013). Phosphoglycerate kinase 1 as a promoter of metastasis in colon cancer. *International Journal of Oncology*, *43*(2), 586–590. doi:10.3892/ijo.2013.1971
- Blake, C. C., & Rice, D. W. (1981). Phosphoglycerate kinase. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. B, Biological Sciences*, *293*(1063), 93–104. doi:10.1098/rstb.1981.0063
- Boon, K. L., Xiao, S., McWhorter, M. L., Donn, T., Wolf-Saxon, E., Bohnsack, M. T., Moens, C. B., & Beattie, C. E. (2009). Zebrafish survival motor neuron mutants exhibit presynaptic neuromuscular junction defects. *Human Molecular Genetics*, *18*(19), 3615–3625. doi:10.1093/hmg/ddp310
- Brown, R. H., & Al-Chalabi, A. (2017). Amyotrophic Lateral Sclerosis. *New England Journal of Medicine*, *377*(2), 162–172. doi:10.1056/NEJMra1603471
- Burns, F. R., von Kannen, S., Guy, L., Raper, J. A., Kamholz, J., & Chang, S. (1991). DM-GRASP, a novel immunoglobulin superfamily axonal surface protein that supports neurite extension. *Neuron*, *7*(2), 209–220. doi:10.1016/0896-6273(91)90259-3



Cai, Q., Wang, S., Jin, L., Weng, M., Zhou, D., Wang, J., Tang, Z., & Quan, Z. (2019).

Long non-coding RNA GBCDRlnc1 induces chemoresistance of gallbladder cancer cells by activating autophagy. *Molecular Cancer*, 18(1), 82.

doi:10.1186/s12943-019-1016-0

Cartegni, L., & Krainer, A. R. (2002). Disruption of an SF2/ASF-dependent exonic splicing enhancer in SMN2 causes spinal muscular atrophy in the absence of SMN1. *Nature Genetics*, 30(4), 377–384. doi:10.1038/ng854

Cashman, N. R., Durham, H. D., Blusztajn, J. K., Oda, K., Tabira, T., Shaw, I. T., Dahrouge, S., & Antel, J. P. (1992). Neuroblastoma × spinal cord (NSC) hybrid cell lines resemble developing motor neurons. *Developmental Dynamics*, 194(3), 209–221. doi:10.1002/aja.1001940306

Chen, Z., Zhuang, W., Wang, Z., Xiao, W., Don, W., Li, X., & Chen, X. (2019). MicroRNA-450b-3p inhibits cell growth by targeting phosphoglycerate kinase 1 in hepatocellular carcinoma. *Journal of Cellular Biochemistry*, 120(11), 18805–18815. doi:10.1002/jcb.29196

Chiarelli, L. R., Morera, S. M., Bianchi, P., Fermo, E., Zanella, A., Galizzi, A., & Valentini, G. (2012). Molecular insights on pathogenic effects of mutations causing phosphoglycerate kinase deficiency. *PLoS ONE*, 7(2), e32065. doi:10.1371/journal.pone.0032065



Comeau, S. R., Gatchell, D. W., Vajda, S., & Camacho, C. J. (2004). ClusPro: A fully automated algorithm for protein-protein docking. *Nucleic Acids Research*, 32, W96–W99. doi:10.1093/nar/gkh354

Coovert, D. (1997). The survival motor neuron protein in spinal muscular atrophy. *Human Molecular Genetics*, 6(8), 1205–1214. doi:10.1093/hmg/6.8.1205

Czarna, A., Breitkreuz, H., Mahrenholz, C. C., Arens, J., Strauss, H. M., & Wolf, E. (2011). Quantitative analyses of cryptochrome-mBMAL1 interactions. *Journal of Biological Chemistry*, 286(25), 22414–22425. doi:10.1074/jbc.M111.244749

DeJesus-Hernandez, M., Mackenzie, I. R., Boeve, B. F., Boxer, A. L., Baker, M., Rutherford, N. J., Nicholson, A. M., Finch, N. A., Flynn, H., Adamson, J., Kouri, N., Wojtas, A., Sengdy, P., Hsiung, G. Y. R., Karydas, A., Seeley, W. W., Josephs, K. A., Coppola, G., Geschwind, D. H., ... Rademakers, R. (2011). Expanded GGGGCC hexanucleotide repeat in noncoding region of C9ORF72 causes chromosome 9p-Linked FTD and ALS. *Neuron*, 72(2), 245–256. doi:10.1016/j.neuron.2011.09.011

Eisen, J. S. (1991). Motoneuronal development in the embryonic zebrafish. *Development (Cambridge, England). Supplement, Suppl 2*, 141–147.

Eisen, J. S. (1998). Genetic and molecular analyses of motoneuron development. *Current Opinion in Neurobiology*, 8(6), 697–704. doi:10.1016/S0959-4388(98)80110-4



Eisen, J. S., Myers, P. Z., & Westerfield, M. (1986). Pathway selection by growth cones of identified motoneurons in live zebra fish embryos. *Nature*, 320(6059), 269–271. doi:10.1038/320269a0

Farel, P. B., & Bemelmans, S. E. (1985). Specificity of motoneuron projection patterns during development of the bullfrog tadpole (*Rana catesbeiana*). *The Journal of Comparative Neurology*, 238(1), 128–134. doi:10.1002/cne.902380112

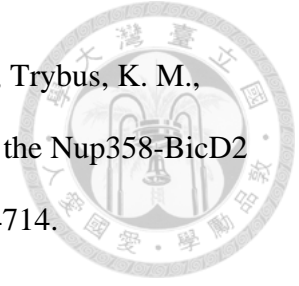
Fashena, D., & Westerfield, M. (1999). Secondary motoneuron axons localize DM-GRASP on their fasciculated segments. *The Journal of Comparative Neurology*, 406(3), 415–424. doi:10.1002/(SICI)1096-9861(19990412)406:3<415::AID-CNE9>3.0.CO;2-2

Flanagan-Steet, H., Fox, M. A., Meyer, D., & Sanes, J. R. (2005). Neuromuscular synapses can form in vivo by incorporation of initially aneural postsynaptic specializations. *Development*, 132(20), 4471–4481. doi:10.1242/dev.02044

Gasteiger, E., Hoogland, C., Gattiker, A., Duvaud, S., Wilkins, M. R., Appel, R. D., & Bairoch, A. (2005). Protein identification and analysis tools on the ExPASy server. In J. M. Walker (Ed.), *The Proteomics Protocols Handbook* (pp. 571–607). Humana Press. doi:10.1385/1-59259-890-0:571

Ge, J., Li, J., Na, S., Wang, P., Zhao, G., & Zhang, X. (2019). MiR-548c-5p inhibits colorectal cancer cell proliferation by targeting PGK1. *Journal of Cellular Physiology*, 234(10), 18872–18878. doi:10.1002/jcp.28525

Gibson, J. M., Cui, H., Ali, M. Y., Zhao, X., Debler, E. W., Zhao, J., Trybus, K. M., Solmaz, S. R., & Wang, C. (2022). Coil-to- $\alpha$ -helix transition at the Nup358-BicD2 interface activates BicD2 for dynein recruitment. *ELife*, *11*, e74714. doi:10.7554/eLife.74714

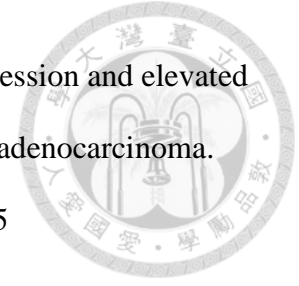


GrandPré, T., Nakamura, F., Vartanian, T., & Strittmatter, S. M. (2000). Identification of the Nogo inhibitor of axon regeneration as a Reticulon protein. *Nature*, *403*(6768), 439–444. doi:10.1038/35000226

Gros-Louis, F., Kriz, J., Kabashi, E., McDearmid, J., Millecamps, S., Urushitani, M., Lin, L., Dion, P., Zhu, Q., Drapeau, P., Julien, J. P., & Rouleau, G. A. (2008). Als2 mRNA splicing variants detected in KO mice rescue severe motor dysfunction phenotype in Als2 knock-down zebrafish. *Human Molecular Genetics*, *17*(17), 2691–2702. doi:10.1093/hmg/ddn171

Hadano, S., Benn, S. C., Kakuta, S., Otomo, A., Sudo, K., Kunita, R., Suzuki-Utsunomiya, K., Mizumura, H., Shefner, J. M., Cox, G. A., Iwakura, Y., Brown, R. H., & Ikeda, J. E. (2006). Mice deficient in the Rab5 guanine nucleotide exchange factor ALS2/alsin exhibit age-dependent neurological deficits and altered endosome trafficking. *Human Molecular Genetics*, *15*(2), 233–250. doi:10.1093/hmg/ddi440

Hollyday, M. (1980). Organization of motor pools in the chick lumbar lateral motor column. *The Journal of Comparative Neurology*, *194*(1), 143–170. doi:10.1002/cne.901940108



Hwang, T. L., Liang, Y., Chien, K. Y., & Yu, J. S. (2006). Overexpression and elevated serum levels of phosphoglycerate kinase 1 in pancreatic ductal adenocarcinoma.

*PROTEOMICS*, 6(7), 2259–2272. doi:10.1002/pmic.200500345

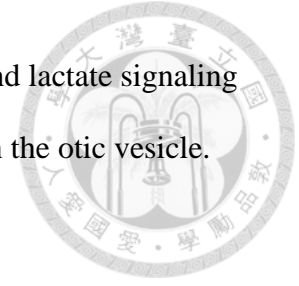
Jindal, H. K., & Vishwanatha, J. K. (1990). Functional identity of a primer recognition protein as phosphoglycerate kinase. *The Journal of Biological Chemistry*, 265(12), 6540–6543.

Kabashi, E., Lin, L., Tradewell, M. L., Dion, P. A., Bercier, V., Bourguin, P., Rochefort, D., Bel Hadj, S., Durham, H. D., Velde, C. V., Rouleau, G. A., & Drapeau, P. (2010). Gain and loss of function of ALS-related mutations of TARDBP (TDP-43) cause motor deficits in vivo. *Human Molecular Genetics*, 19(4), 671–683. doi:10.1093/hmg/ddp534

Kabashi, E., Valdmanis, P. N., Dion, P., Spiegelman, D., McConkey, B. J., Velde, C. V., Bouchard, J. P., Lacomblez, L., Pochigaeva, K., Salachas, F., Pradat, P. F., Camu, W., Meininger, V., Dupre, N., & Rouleau, G. A. (2008). TARDBP mutations in individuals with sporadic and familial amyotrophic lateral sclerosis. *Nature Genetics*, 40(5), 572–574. doi:10.1038/ng.132

Kanki, J. P., Chang, S., & Kuwada, J. Y. (1994). The molecular cloning and characterization of potential chick DM-GRASP homologs in zebrafish and mouse. *Journal of Neurobiology*, 25(7), 831–845. doi:10.1002/neu.480250708





Kantarci, H., Gou, Y., & Riley, B. B. (2020). The Warburg Effect and lactate signaling augment Fgf-MAPK to promote sensory-neural development in the otic vesicle.

*ELife*, 9, e56301. doi:10.7554/eLife.56301

Kashima, T., & Manley, J. L. (2003). A negative element in SMN2 exon 7 inhibits splicing in spinal muscular atrophy. *Nature Genetics*, 34(4), 460–463.

doi:10.1038/ng1207

Kiernan, M. C., Vucic, S., Cheah, B. C., Turner, M. R., Eisen, A., Hardiman, O., Burrell, J. R., & Zoing, M. C. (2011). Amyotrophic lateral sclerosis. *The Lancet*,

377(9769), 942–955. doi:10.1016/S0140-6736(10)61156-7

Krogh, A., Larsson, B., von Heijne, G., & Sonnhammer, E. L. L. (2001). Predicting transmembrane protein topology with a hidden markov model: Application to complete genomes<sup>1</sup> Edited by F. Cohen. *Journal of Molecular Biology*, 305(3),

567–580. doi:10.1006/jmbi.2000.4315

Lamb, A. H. (1976). The projection patterns of the ventral horn to the hind limb during development. *Developmental Biology*, 54(1), 82–99. doi:10.1016/0012-

1606(76)90288-8

Lamb, A. H. (1977). Neuronal death in the development of the somatotopic projections of the ventral horn in xenopus. *Brain Research*, 134(1), 145–150.

doi:10.1016/0006-8993(77)90932-5



Lance-Jones, C., & Landmesser, L. (1981). Pathway selection by chick lumbosacral motoneurons during normal development. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B. Biological Sciences*, 214(1194), 1–18.  
doi:10.1098/rspb.1981.0079

Lay, A. J., Jiang, X. M., Kisker, O., Flynn, E., Underwood, A., Condrón, R., & Hogg, P. J. (2000). Phosphoglycerate kinase acts in tumour angiogenesis as a disulphide reductase. *Nature*, 408(6814), 869–873. doi:10.1038/35048596

Lefebvre, S., Burlet, P., Liu, Q., Bertrand, S., Clermont, O., Munnich, A., Dreyfuss, G., & Melki, J. (1997). Correlation between severity and SMN protein level in spinal muscular atrophy. *Nature Genetics*, 16(3), 265–269. doi:10.1038/ng0797-265

Lemmens, R., Van Hoecke, A., Hersmus, N., Geelen, V., D'Hollander, I., Thijs, V., Van Den Bosch, L., Carmeliet, P., & Robberecht, W. (2007). Overexpression of mutant superoxide dismutase 1 causes a motor axonopathy in the zebrafish. *Human Molecular Genetics*, 16(19), 2359–2365. doi:10.1093/hmg/ddm193

Leppert, C. A., Diekmann, H., Paul, C., Laessing, U., Marx, M., Bastmeyer, M., & Stuermer, C. A. O. (1999). Neurolin Ig domain 2 participates in retinal axon guidance and Ig domains 1 and 3 in fasciculation. *Journal of Cell Biology*, 144(2), 339–349. doi:10.1083/jcb.144.2.339



Li, S. C., Goto, N. K., Williams, K. A., & Deber, C. M. (1996). Alpha-helical, but not beta-sheet, propensity of proline is determined by peptide environment.

*Proceedings of the National Academy of Sciences*, 93(13), 6676–6681.

doi:10.1073/pnas.93.13.6676

Lin, C. Y., Wu, C. L., Lee, K. Z., Chen, Y. J., Zhang, P. H., Chang, C. Y., Harn, H. J., Lin, S. Z., & Tsai, H. J. (2019). Extracellular Pgl1 enhances neurite outgrowth of motoneurons through Nogo66/NgR-independent targeting of NogoA. *ELife*, 8, e49175. doi:10.7554/eLife.49175

Lin, C. Y., Tseng, H. C., Chu, Y. R., Wu, C. L., Zhang, P. H., & Tsai, H. J. (2022). Cerebroventricular injection of Pgl1 attenuates MPTP-induced neuronal toxicity in dopaminergic cells in zebrafish brain in a glycolysis-independent manner.

*International Journal of Molecular Sciences*, 23(8), 4150.

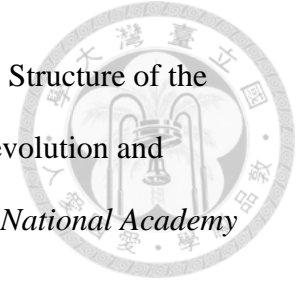
doi:10.3390/ijms23084150

McGrath, P. A., & Bennett, M. R. (1979). The development of synaptic connections between different segmental motoneurons and striated muscles in an axolotl limb.

*Developmental Biology*, 69(1), 133–145. doi:10.1016/0012-1606(79)90280-X

McWhorter, M. L., Monani, U. R., Burghes, A. H. M., & Beattie, C. E. (2003). Knockdown of the survival motor neuron (Smn) protein in zebrafish causes defects in motor axon outgrowth and pathfinding. *Journal of Cell Biology*, 162(5), 919–932. doi:10.1083/jcb.200303168

Michelson, A. M., Blake, C. C., Evans, S. T., & Orkin, S. H. (1985). Structure of the human phosphoglycerate kinase gene and the intron-mediated evolution and dispersal of the nucleotide-binding domain. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 82(20), 6965–6969. doi:10.1073/pnas.82.20.6965



Monani, U. R. (1999). A single nucleotide difference that alters splicing patterns distinguishes the SMA gene SMN1 from the copy gene SMN2. *Human Molecular Genetics*, 8(7), 1177–1183. doi:10.1093/hmg/8.7.1177

Myers, P., Eisen, J., & Westerfield, M. (1986). Development and axonal outgrowth of identified motoneurons in the zebrafish. *The Journal of Neuroscience*, 6(8), 2278–2289. doi:10.1523/JNEUROSCI.06-08-02278.1986

Myers, P. Z. (1985). Spinal motoneurons of the larval zebrafish. *The Journal of Comparative Neurology*, 236(4), 555–561. doi:10.1002/cne.902360411

Neumann, M., Sampathu, D. M., Kwong, L. K., Truax, A. C., Micsenyi, M. C., Chou, T. T., Bruce, J., Schuck, T., Grossman, M., Clark, C. M., McCluskey, L. F., Miller, B. L., Masliah, E., Mackenzie, I. R., Feldman, H., Feiden, W., Kretzschmar, H. A., Trojanowski, J. Q., & Lee, V. M. Y. (2006). Ubiquitinated TDP-43 in frontotemporal lobar degeneration and amyotrophic lateral sclerosis. *Science*, 314(5796), 130–133. doi:10.1126/science.1134108

Oprea, G. E., Kröber, S., McWhorter, M. L., Rossoll, W., Müller, S., Krawczak, M., Bassell, G. J., Beattie, C. E., & Wirth, B. (2008). Plastin 3 Is a protective modifier

of autosomal recessive spinal muscular atrophy. *Science*, 320(5875), 524–527.

doi:10.1126/science.1155085



Paschke, K., Lottspeich, F., & Stuermer, C. (1992). Neuroilin, a cell surface glycoprotein on growing retinal axons in the goldfish visual system, is reexpressed during retinal axonal regeneration. *Journal of Cell Biology*, 117(4), 863–875.

doi:10.1083/jcb.117.4.863

Pettigrew, A. G., Lindeman, R., & Bennett, M. R. (1979). Development of the segmental innervation of the chick forelimb. *Journal of Embryology and Experimental Morphology*, 49, 115–137.

Pierce, B. G., Wiehe, K., Hwang, H., Kim, B. H., Vreven, T., & Weng, Z. (2014).

ZDOCK server: Interactive docking prediction of protein-protein complexes and symmetric multimers. *Bioinformatics*, 30(12), 1771–1773.

doi:10.1093/bioinformatics/btu097

Pike, S. H., Melancon, E. F., & Eisen, J. S. (1992). Pathfinding by zebrafish

motoneurons in the absence of normal pioneer axons. *Development*, 114(4), 825–

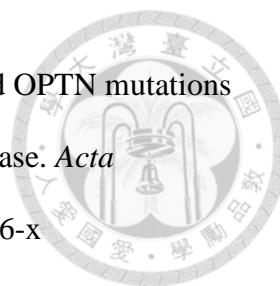
831. doi:10.1242/dev.114.4.825

Pottier, C., Bieniek, K. F., Finch, N., van de Vorst, M., Baker, M., Perkersen, R.,

Brown, P., Ravenscroft, T., van Blitterswijk, M., Nicholson, A. M., DeTure, M.,

Knopman, D. S., Josephs, K. A., Parisi, J. E., Petersen, R. C., Boylan, K. B.,

Boeve, B. F., Graff-Radford, N. R., Veltman, J. A., ... Rademakers, R. (2015).



Whole-genome sequencing reveals important role for TBK1 and OPTN mutations in frontotemporal lobar degeneration without motor neuron disease. *Acta Neuropathologica*, 130(1), 77–92. doi:10.1007/s00401-015-1436-x

Prasanth, K. R., Chuang, C., & Nagy, P. D. (2017). Co-opting ATP-generating glycolytic enzyme PGK1 phosphoglycerate kinase facilitates the assembly of viral replicase complexes. *PLOS Pathogens*, 13(10), e1006689.

doi:10.1371/journal.ppat.1006689

Renton, A. E., Chiò, A., & Traynor, B. J. (2014). State of play in amyotrophic lateral sclerosis genetics. *Nature Neuroscience*, 17(1), 17–23. doi:10.1038/nn.3584

Rosen, D. R., Siddique, T., Patterson, D., Figlewicz, D. A., Sapp, P., Hentati, A., Donaldson, D., Goto, J., O'Regan, J. P., Deng, H. X., Rahmani, Z., Krizus, A., McKenna-Yasek, D., Cayabyab, A., Gaston, S. M., Berger, R., Tanzi, R. E., Halperin, J. J., Herzfeldt, B., ... Brown, R. H. (1993). Mutations in Cu/Zn superoxide dismutase gene are associated with familial amyotrophic lateral sclerosis. *Nature*, 362(6415), 59–62. doi:10.1038/362059a0

Simpson, C. L., Lemmens, R., Miskiewicz, K., Broom, W. J., Hansen, V. K., van Vught, P. W. J., Landers, J. E., Sapp, P., Van Den Bosch, L., Knight, J., Neale, B. M., Turner, M. R., Veldink, J. H., Ophoff, R. A., Tripathi, V. B., Beleza, A., Shah, M. N., Proitsi, P., Van Hoecke, A., ... Al-Chalabi, A. (2009). Variants of the elongator protein 3 ( ELP3 ) gene are associated with motor neuron degeneration. *Human Molecular Genetics*, 18(3), 472–481. doi:10.1093/hmg/ddn375

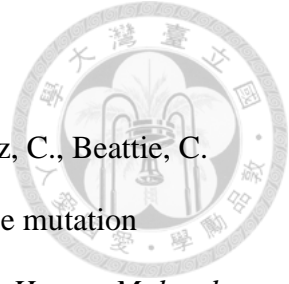
Sreedharan, J., Blair, I. P., Tripathi, V. B., Hu, X., Vance, C., Rogelj, B., Ackerley, S., Durnall, J. C., Williams, K. L., Buratti, E., Baralle, F., de Bellerocche, J., Mitchell, J. D., Leigh, P. N., Al-Chalabi, A., Miller, C. C., Nicholson, G., & Shaw, C. E. (2008). TDP-43 Mutations in Familial and Sporadic Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Science*, *319*(5870), 1668–1672. doi:10.1126/science.1154584

Sun, R., Meng, X., Pu, Y., Sun, F., Man, Z., Zhang, J., Yin, L., & Pu, Y. (2019). Overexpression of HIF-1a could partially protect K562 cells from 1,4-benzoquinone induced toxicity by inhibiting ROS, apoptosis and enhancing glycolysis. *Toxicology in Vitro*, *55*, 18–23. doi:10.1016/j.tiv.2018.11.005

The SLAGEN Consortiu, Pensato, V., Tiloca, C., Corrado, L., Bertolin, C., Sardone, V., Del Bo, R., Calini, D., Mandrioli, J., Lauria, G., Mazzini, L., Querin, G., Ceroni, M., Cantello, R., Corti, S., Castellotti, B., Soldà, G., Duga, S., Comi, G. P., ... Silani, V. (2015). TUBA4A gene analysis in sporadic amyotrophic lateral sclerosis: Identification of novel mutations. *Journal of Neurology*, *262*(5), 1376–1378. doi:10.1007/s00415-015-7739-y

Valentini, G., Maggi, M., & Pey, A. (2013). Protein stability, folding and misfolding in human PGK1 Deficiency. *Biomolecules*, *3*(4), 1030–1052. doi:10.3390/biom3041030

Westerfield, M., McMurray, J., & Eisen, J. (1986). Identified motoneurons and their innervation of axial muscles in the zebrafish. *The Journal of Neuroscience*, *6*(8), 2267–2277. doi:10.1523/JNEUROSCI.06-08-02267.1986



Workman, E., Saieva, L., Carrel, T. L., Crawford, T. O., Liu, D., Lutz, C., Beattie, C.

E., Pellizzoni, L., & Burghes, A. H. M. (2009). A SMN missense mutation complements SMN2 restoring snRNPs and rescuing SMA mice. *Human Molecular Genetics*, 18(12), 2215–2229. doi:10.1093/hmg/ddp157

Zhang, D., Tai, L. K., Wong, L. L., Chiu, L. L., Sethi, S. K., & Koay, E. S. C. (2005).

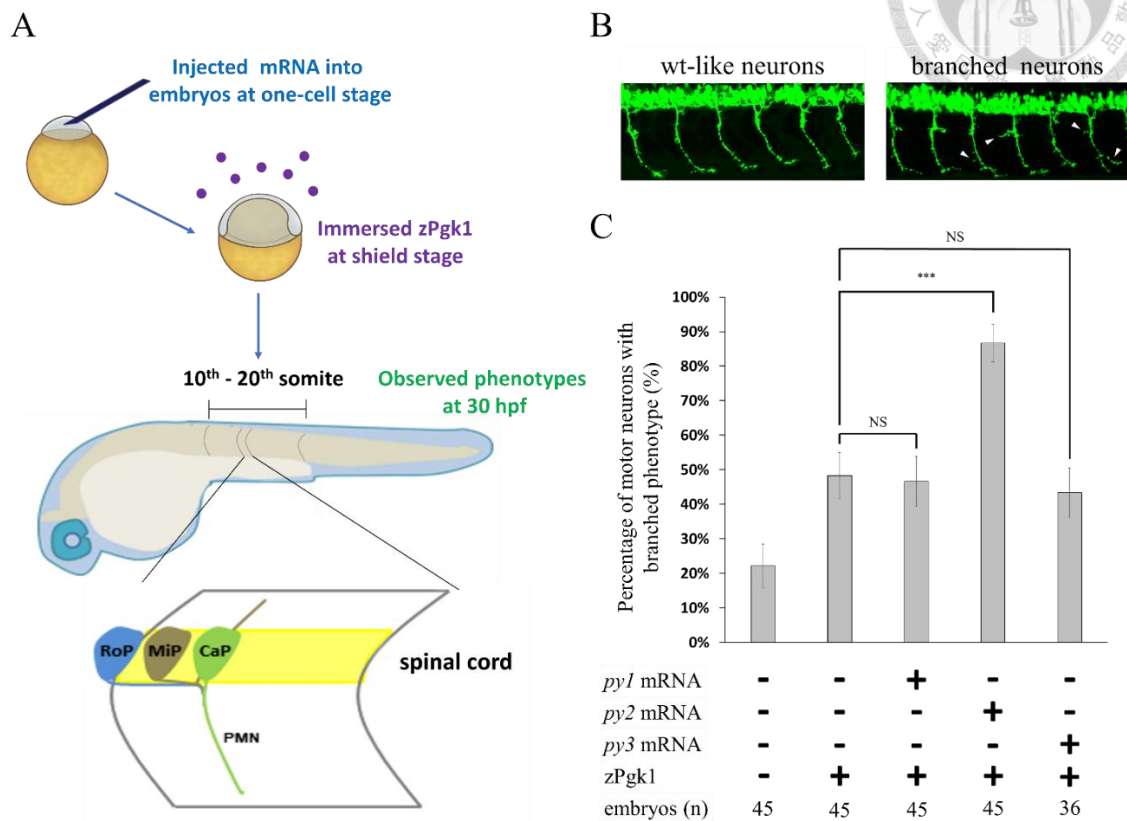
Proteomic study reveals that proteins involved in metabolic and detoxification pathways are highly expressed in HER-2/neu-positive Breast Cancer. *Molecular & Cellular Proteomics*, 4(11), 1686–1696. doi:10.1074/mcp.M400221-MCP200

Zhou, J. W., Tang, J. J., Sun, W., & Wang, H. (2019). PGK1 facilitates cisplatin

chemoresistance by triggering HSP90/ERK pathway mediated DNA repair and methylation in endometrial endometrioid adenocarcinoma. *Molecular Medicine*, 25(1), 11. doi:10.1186/s10020-019-0079-0

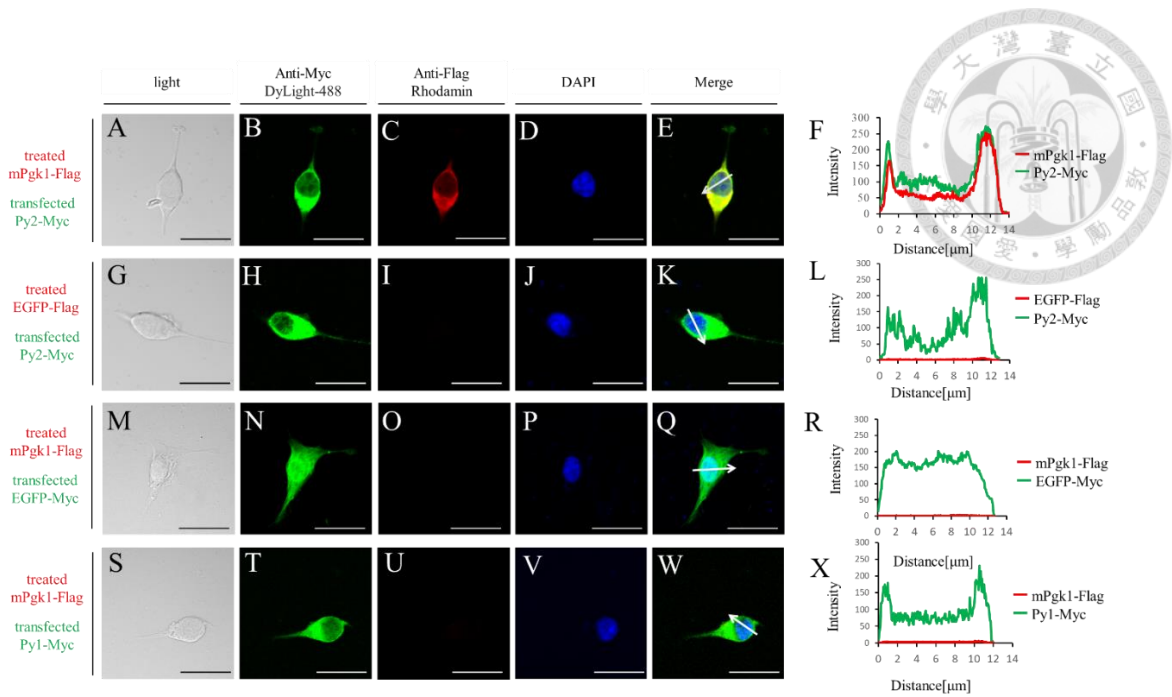


## 圖說



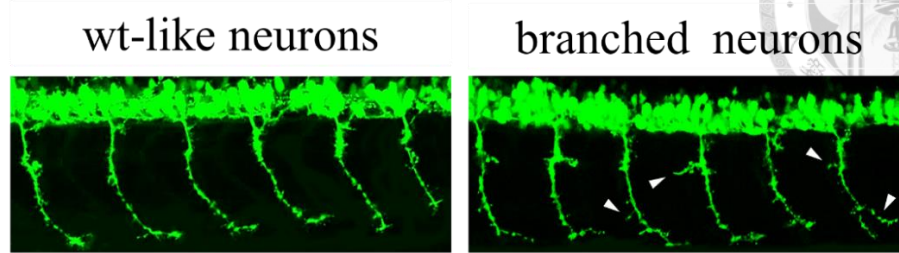
**Figure 1. 在斑馬魚胚胎中過量表現不同 Protein Y 家族 mRNA 對運動神經元發育影響**

(A) 示意圖。注射 mRNA 於一細胞基因轉殖 *Tg(mnx 1:GFP)* 斑馬魚胚胎，外添加 zPgk1(zebrafish Pgk1)於 shield stage，並收取 30 hpf (hours post fertilization) 時期的胚胎，固定後於共軛焦顯微鏡觀察。示意圖顯示 30 hpf 斑馬魚胚胎的三種 primary motor neuron (PMN)：rostral primary (RoP)、middle primary (MiP) 與 caudal primary (CaP)正常走向軌跡。本研究觀察範圍為胚胎兩側之 CaP 運動神經元且介於第 10 至 20 體節。(B) wild-type like (wt-like) neurons:基因轉殖斑馬魚 *Tg(mnx 1:GFP)*胚胎在 30 hpf 時於共軛交顯微鏡下所見的運動神經元的綠色螢光神經突。branched neurons：運動神經元的神經突延伸生長所造成的分支(如箭頭所指)。(C) 量化注射 zebrafish *py1*、*py2* 或 *py3* 之 mRNA 並浸泡 zPgk1 後，造成胚胎含有運動神經元顯現分支神經突的胚胎比例。n 為實驗斑馬魚胚胎總數。以上各數據皆來自獨立的三次實驗，每組數據至少為 10 隻個體，以 Student t-test 進行統計分析。(N.S., no significant ; \*\*\*,  $p < 0.001$ )

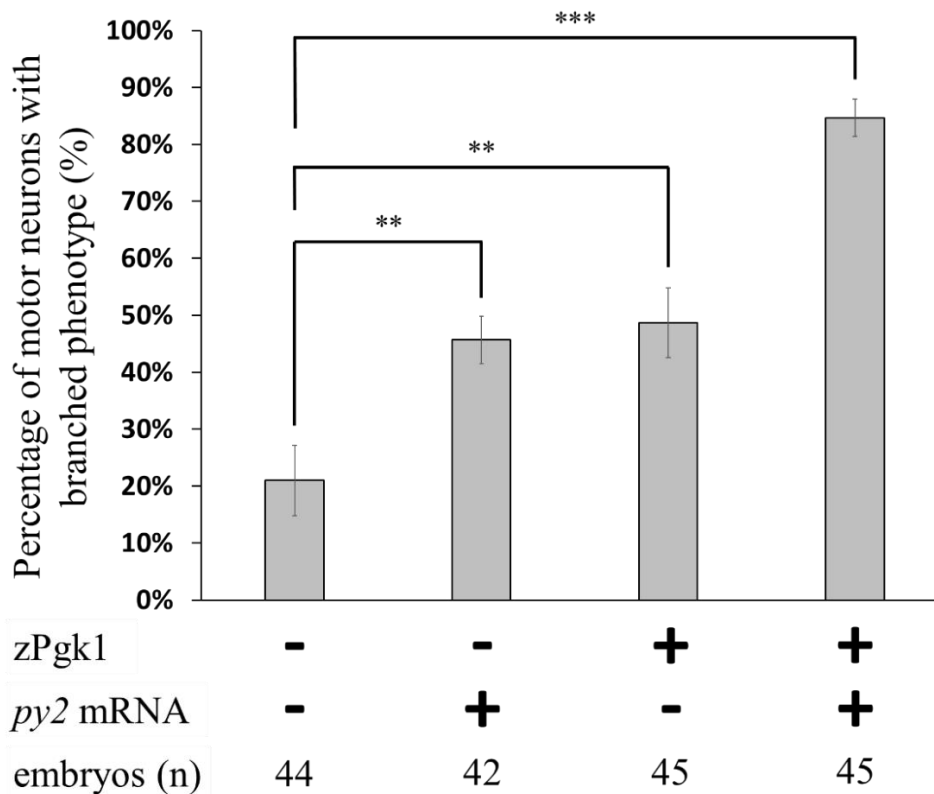


**Figure 2.** 使用細胞免疫螢光染色探討細胞外 Pgk1 是否與細胞膜蛋白 Py2 結合。使用 cDNAs 各別含有小鼠 Py1-Myc、小鼠 Py2-Myc 或 EGFP-Myc 轉染到小鼠運動神經元 NSC34 細胞後，並在含有小鼠 Pgk1-Flag (mPgk1-Flag) 或 EGFP-Flag 的培養基中培養，細胞免疫螢光染色後於共軛焦顯微鏡觀察。(A、G、M、S) 為透光。(B、H、N、T) 綠色訊號為 Myc。(C、I、O、U) 紅色訊號為 Flag。(D、J、P、V) 藍色訊號為 DAPI。(E、K、Q、W) Merge 為綠、紅及藍色訊號同時呈現圖。(F、L、R、X) 為箭號軌跡生成的螢光強度。Scale bar, 20  $\mu\text{m}$ 。

A

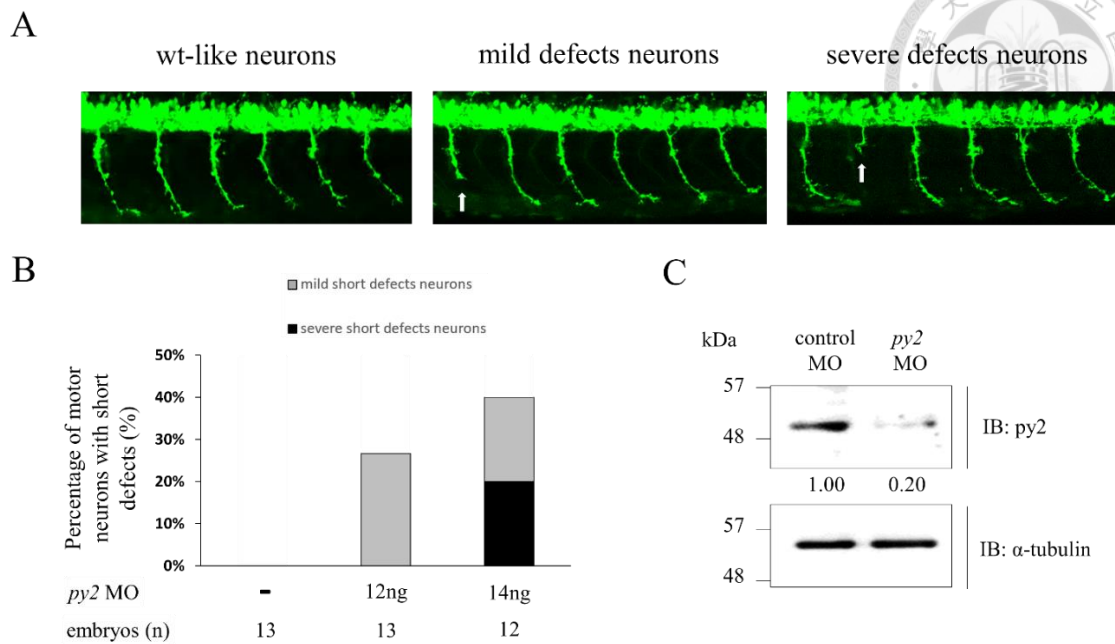


B



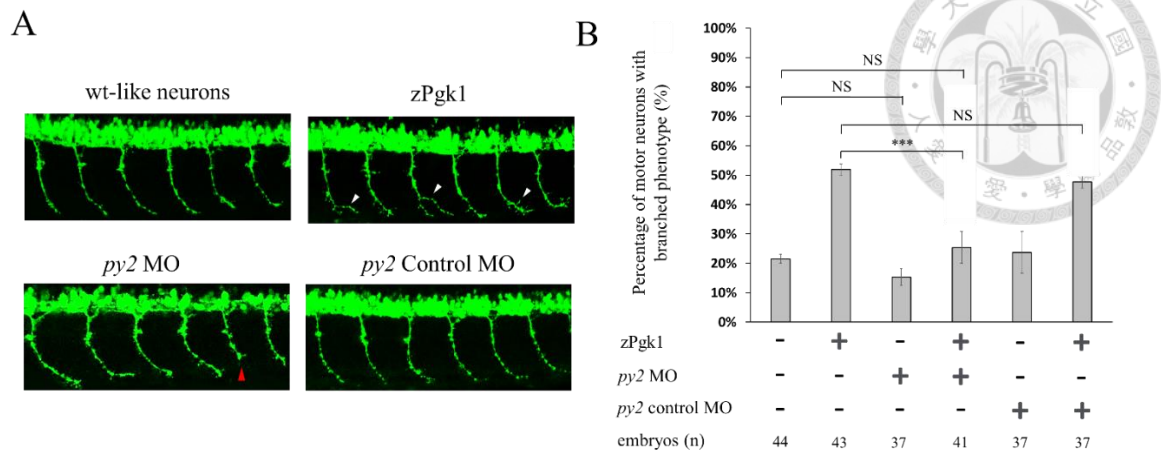
**Figure 3.**在斑馬魚胚胎中過量表現 *py2* mRNA 並外添加 zPgl 對運動神經元突的影響。

(A) wild-type like (wt-like) neurons：基因轉殖斑馬魚 *Tg(mnx 1:GFP)* 胚胎在 30 hpf 時於共軛交顯微鏡下所見的運動神經元的綠色螢光神經突。branched neurons：運動神經元的神經突延伸生長所造成的分支(如箭頭所指)。(B) 量化過量表現 *py2* mRNA 及外添加斑馬魚 Pgl (zPgl) 後，造成胚胎含有運動神經元顯現分支神經元的胚胎比例。n 為實驗斑馬魚胚胎總數。以上各數據皆來自獨立的三次實驗，每組數據至少為 10 隻個體，以 Student t-test 進行統計分析。(\*\*,  $p < 0.01$ ; \*\*\*,  $p < 0.001$ )



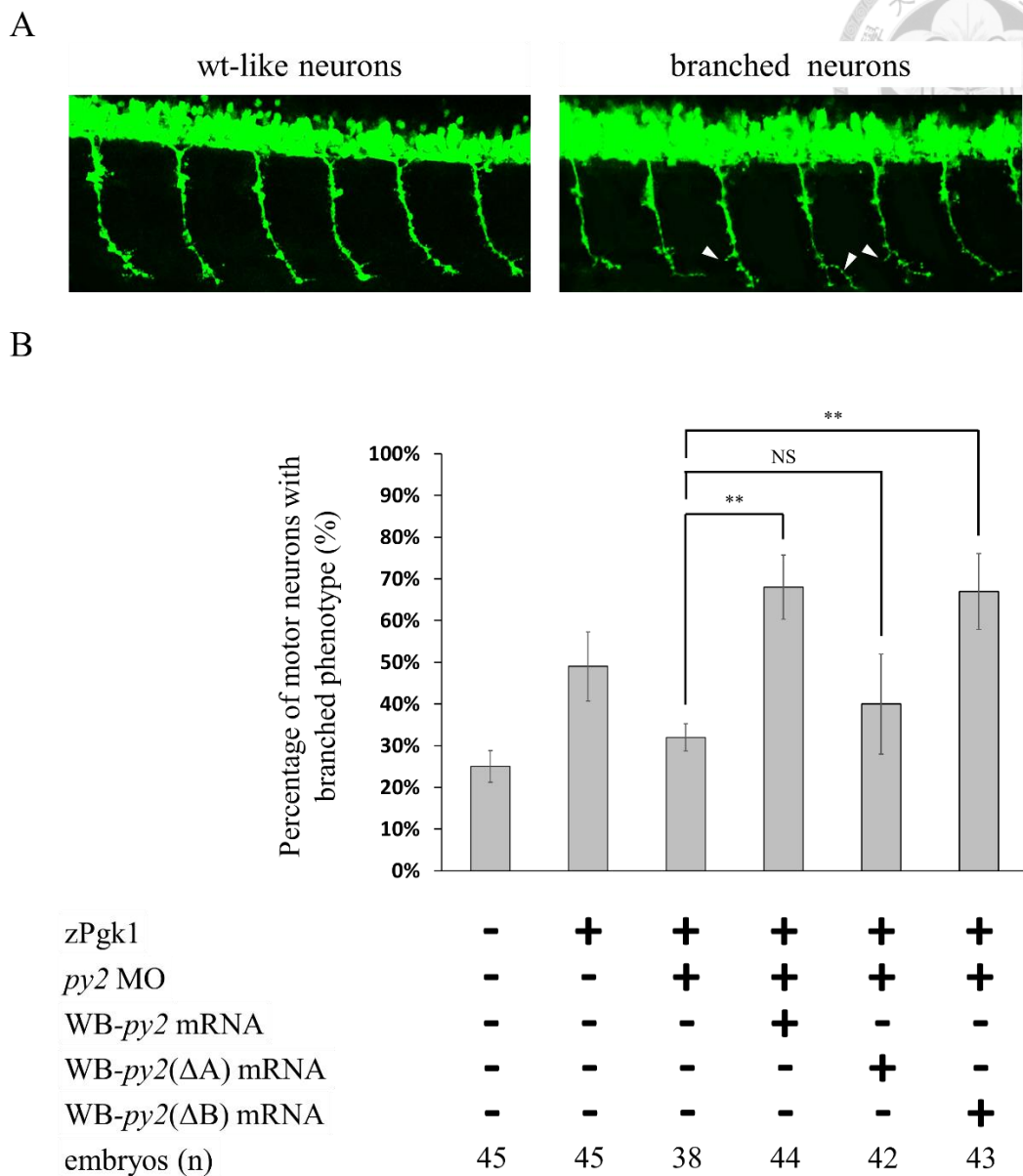
**Figure 4. Knockdown *py2* 對斑馬魚胚胎運動神經元的神經突生長發育之影響。**

(A) 設計斑馬魚 *py2* 之 antisense Morpholinos Oligonucleotides(MO)以及 *py2* control MO。*py2* MO 序列會 block 斑馬魚 *py2* 之 start codon(ATG)(長方框內紅色)而 *py2* control MO 序列因有 5 個核苷酸密碼不吻合，不會影響 *py2* mRNA 的轉譯。wild-type like (wt-like) neuron：基因轉殖 Tg(*mnx 1:GFP*) 斑馬魚胚胎在 30 hpf 時於共軛交顯微鏡下所見的運動神經元的綠色螢光神經突。mild-defect neurons：運動神經元的神經突到達水平隔肌 (horizontal septum)，但仍比正常的神經突短(如箭號所指)。severe-defect neurons：運動神經元的神經突無法到達水平隔肌(如箭號所指)。(B) 量化 Knockdown *py2* 後，造成胚胎含有運動神經元的神經突發生短缺的胚胎比例。n 為實驗斑馬魚胚胎總數 (C) 以 Western blotting 分析 30 hpf 斑馬魚胚胎 *py2* 蛋白質表現量。組別為注射 control MO 與 *py2*-MO 12ng。 $\alpha$ -tubulin 作為 internal control。每個 lane 下面的數字表示當 control MO 的 *py2* 與  $\alpha$ -tubulin 相比之後標準化為 1 時，注射 *py2* MO 胚胎內 *py2* 的表現量相對數值。



**Figure 5. 當 Knockdown *py2* 時外添加斑馬魚 Pgl1 (zPgl1) 對斑馬魚胚胎運動神經元發育的影響**

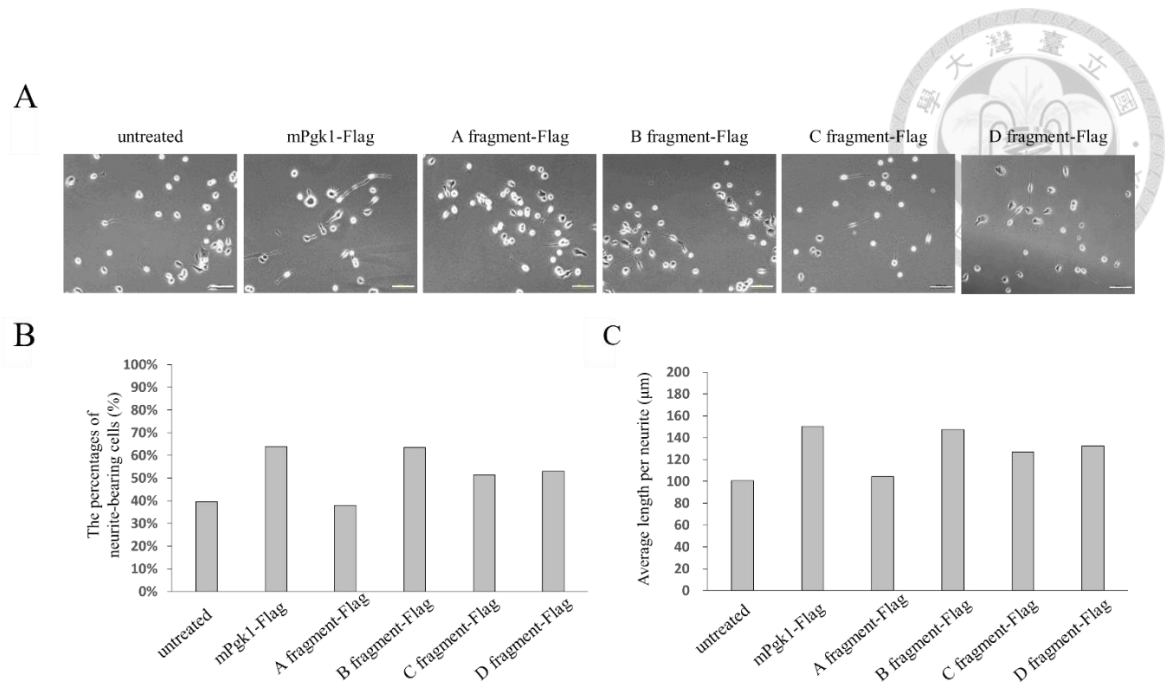
(A) 基因轉殖 *Tg(mnx 1:GFP)* 斑馬魚胚胎在四種不同處理後在 30 hpf 時於共軛交顯微鏡下所見運動神經元的綠色螢光神經突。運動神經元的神經突會延伸生長所造成的分支(如箭頭所指)。運動神經元的神經突發生短缺(如箭號所指)。(B) 量化注射 *py2* MO, *py2* control MO 及(或)浸泡 zPgl1 後，造成胚胎含有運動神經元顯現分支神經突的比例。*py2* MO 序列會 block 斑馬魚 *py2* 蛋白質的產生；*py2* control MO 序列有 5 個核苷酸密碼不吻合，不會 block 斑馬魚 *py2* 蛋白質的產生。n 為實驗斑馬魚胚胎總數，以上各數據皆來自獨立的三次實驗，每組數據至少為 10 隻個體，以 Student t-test 進行統計分析。(N.S., no significant; \*\*\*,  $p < 0.001$ )



**Figure 6.** 探討不同斑馬魚 *py2* domains 對斑馬魚胚胎神經突生長造成分支之影響。

(A) wild-type like (wt-like) neurons：基因轉殖斑馬魚 *Tg(mnx 1:GFP)* 胚胎在 30 hpf 時於共軛交顯微鏡下所見的運動神經元的綠色螢光神經突。branched neurons：運動神經元的神經突延伸生長所造成的分支(如箭頭所指)。(B) 量化注射 *py2* MO, 不同 WB(wobble)-*py2* truncated forms 和(或)浸泡斑馬魚 Pkg1 (zPkg1) 後，造成胚胎含有運動神經元顯現分支神經突的比例。以上各數據皆來自獨立的三次實驗，每組數據至少為 10 隻個體，n 為實驗斑馬魚胚胎總數。以 Student t-test 進行統計分析。(N.S., no significant; \*\*,  $p < 0.01$ )。

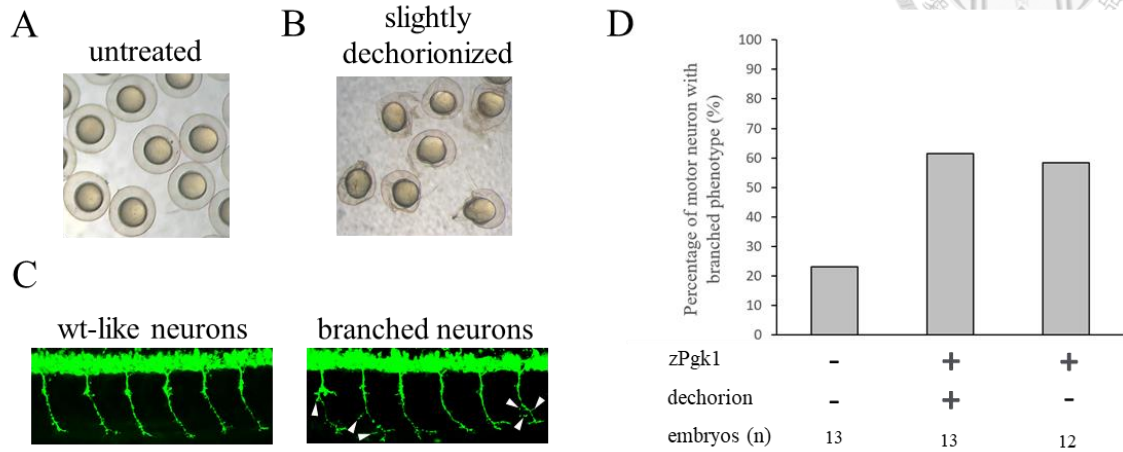




**Figure 7. Pgl1 影響運動神經元的神經突生長的關鍵胺基酸序列區域。**

(A)在培養基中個別外添加不同 truncated form 的 mPgl1 進行培養，並於明視野下小鼠運動神經元 NSC34 的細胞，在倒立相位差顯微鏡下 200 倍放大的影像。(B)統計 Neurite bearing cells (神經突總和大於 $>200 \mu\text{m}$ )在所有細胞中所佔的比例。NSC34 處理後，從各組別中隨機挑選 30~40 顆細胞，計算每顆細胞神經突的長度，並統計 neurite-bearing cells 的數目，共一次。(C) 細胞神經突的平均長度。以 untreated 控制組標準化為 1 時所進行各組的比較，共一次。Scale bar,  $100 \mu\text{m}$

## 附錄



### 附錄 1. 卵膜對於外添加之 zPgk1 的影響

(A) 未撕開(B) 撕開卵膜並浸泡 zPgk1 於 shield stage 的胚胎。(C) 綠色螢光為基因轉殖 *Tg(mnx 1:GFP)* 斑馬魚胚胎 30 hpf 時在共軛交顯微鏡下所見的運動神經元的神經突。箭頭表示運動神經元的神經突會延伸生長所造成的分支。wt-like(wild-type like) (D) 量化浸泡斑馬魚 P<sub>gk1</sub> (zP<sub>gk1</sub>) 對撕開與未撕開卵膜造成之運動神經元顯現分支神經突的胚胎比例。n 為實驗斑馬魚胚胎總數



## 附錄 2. Developmental stages in the zebrafish

Camera lucida sketches of the embryo at selected stages. The animal pole is to the top for the early stages, and anterior is to the top later, except for the two animal polar (AP) views shown below their side view counterparts for germ-ring and shield gastrulas. Face views are shown during cleavage and blastula stages. After shield stage, the views are of the embryo's left side, but before the shield arises one cannot reliably ascertain which side is which. Pigmentation is omitted. Arrowheads indicate the early appearance of some key diagnostic features at the following stages: **1k-cell**: YSL nuclei. **Dome**: the doming yolk syncytium. **Germ ring**: germ ring. **Shield**: embryonic shield. **75%-epiboly**: Brachet's cleft. **90%-epiboly**: blastoderm margin closing over the yolk plug. **Bud**: polster. **3-somite**: third somite. **6-somite**: eye primordium (upper arrow), Kupffer's vesicle (lower). **10-somite**: otic placode. **21-somite**: lens primordium. **Prim-6**: primordium of the posterior lateral line (on the dorsal side), hatching gland (on the yolk ball). **Prim-16**: heart. **High-pec**: pectoral fin bud. Scale bar: 250  $\mu\text{m}$ . ([http://zfin.org/zf\\_info/zfbook/stages/stages.html](http://zfin.org/zf_info/zfbook/stages/stages.html))

