

國立臺灣大醫學院學分子醫學研究所

碩士論文

Institute of Molecular Medicine

College of Medicine

National Taiwan University

Master Thesis

氧化壓力引發的粒線體DNA 甲基化對細胞存活率之影響

Oxidative Stress-Induced Mitochondrial DNA

Methylation Affect Cell Viability

楊至心

Yang Chih-Shin

指導教授:

楊偉勛 博士

吳君泰 博士

Advisor:

Yang Wei-Shiung, MD, Ph.D.

Wu June-Tai, MD, Ph.D.

中華民國 101 年 7 月

July 2012

國立臺灣大學碩士學位論文  
口試委員會審定書

氧化壓力引發的粒線體DNA 甲基化對細胞存活率之影響

Oxidative Stress-Induced Mitochondrial DNA

Methylation Affect Cell Viability

本論文係楊至心君 (P99448006) 在國立臺灣大學分子醫學研究所完成之碩士學位論文，於民國 101 年 07 月 18 日承下列考試委員審查通過及口試及格，特此證明

口試委員：

楊偉勳      吳君泰      (簽名)

(指導教授)

吳君泰

楊偉勳

陳沛隆

系主任、所長

余義和      (簽名)

## 致謝

在知識的領域裡，我永遠都是如此的渺小，但還是感謝眾人的幫忙，讓我得以完成人生計畫中很重要的一部分。以下要感謝我的指導教授楊偉勛老師，給我如此有挑戰性的題目並在概念上給予許多啟發，並讓我有充分的自主性來執行實驗，同時也感謝吳君泰老師和陳沛隆老師不吝嗇的給予我意見，幫助我進一步釐清實驗上的問題。謝謝實驗室的語喬和盈馨，熱心的與我討論許多執行上的細節，以及協助實驗購買耗材。

技術的部分，特別感謝醫檢所林亮音老師，無私的出借 PyroMark Q24。這台機器是這個實驗的靈魂，讓我心中無限感謝，還有林老師的助理毓芬，辛勞的幫助我上機，也很開心在上機的過程中我們互相提供資訊解決問題，這真是實驗裡最令人享受的部分。

能與一群真誠善良的夥伴們一起工作、讀書是上帝給我最棒的禮物。謝謝在八共的煜堃、嘉珊、幸祺、虔瑩、桂芳、群玲、紀穎，在台大五年的日子裡，是你們陪著我建築夢想並且分享所有的喜、怒、哀、樂。感謝王怡智醫師，支持我進修，在我分身乏術的時候也對我特別寬容。

最重要的永遠是家人的支持與體諒，我要告訴我的奶奶，李澤蘭女士，你是伴我成長的重要推手，碩士兩年的日子裡，每天我都牽掛在屏東的妳。謝謝我的父母，楊北斗先生、胡育屏女士對我自小的栽培，同時包容我堅持理想的任性，並在我疲累不堪的時候讓我知道家是最好的港口。謝謝秉懋，在我完成碩論期間除了精神上的支持也有許多知識上的建議，更在日常生活裡細心照料。

## 中文摘要

在近代生物遺傳學中發現了一種在不改變 DNA 序列的狀況下，造成表現型 (phenotype) 的改變，並且可以繼續遺傳到子代的新興學問，稱為上位遺傳學 (Epigenetics)，其包含了 DNA 甲基化 (DNA methylation)、組蛋白修飾 (histone modification)、非編碼 RNA (non-coding RNA) 等。其中 DNA 甲基化被認為與基因印痕 (gene imprinting)、胚胎發展 (Embryonic development)、X 染色體失活 (X-chromosome inactivation)、癌化 (oncogenesis)<sup>1</sup> 與基因沉默 (gene silencing) 有關。而有關於細胞 genomic DNA 甲基化的研究更是十分的熱門，但卻對於細胞中另一個含有 DNA 及主要能量生產來源之胞器：「粒線體」的甲基化卻是少有研究。曾有前人研究指出，粒線體 DNA 的甲基化程度很低，且粒線體 DNA 甲基化與細胞存活度的關聯也被認為相當微弱。但在 2009 與 2011 年分別有文獻證明了粒線體 DNA 各個區域間有不同的可被甲基化程度與專屬粒線體的 DNA 甲基轉移酶。且近期由於偵測技術進步，我們認為粒線體的甲基化程度或許也應被重新評估。本研究將 bisulfite conversion 後的粒線體 DNA 利用焦磷酸定序法 (Pyrosequencing) 進行直接且更精確的甲基化偵測，並比較 HeLa 與 PC9 兩種細胞在 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 所造成的氧化壓力下，粒線體的 ATP6、ND1、ND6、TERM 以及 D-loop 等 5 個區域甲基化程度的變化。實驗結果顯示 HeLa 與 PC9 在 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 處理後，PC9 顯現出較高的存活率，表示其對於氧化壓力具有較好的抗性與耐受性。在 HeLa cells 處理 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 後，各基因甲基化程度並無顯著變化，但 TERM 與 D-loop 趨勢呈現上升；PC9 cells 在 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 處理後，5 個區域的甲基化程度均是上升的。另一方面，在未處理 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 的狀態下，HeLa cells 甲基化程度皆高於 PC9 cells，但經過 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 處理後則為 PC9 cells 較高且差異大。由本次研究結果我們推測，當細胞受到氧化壓力的影響時，會引起粒線體 DNA 的甲基化，並且不同細胞會有不同程度的差異。另外，我們也推測甲基化的程度會影響細胞在抵抗氧化壓力時的細胞存活率。

## Abstract

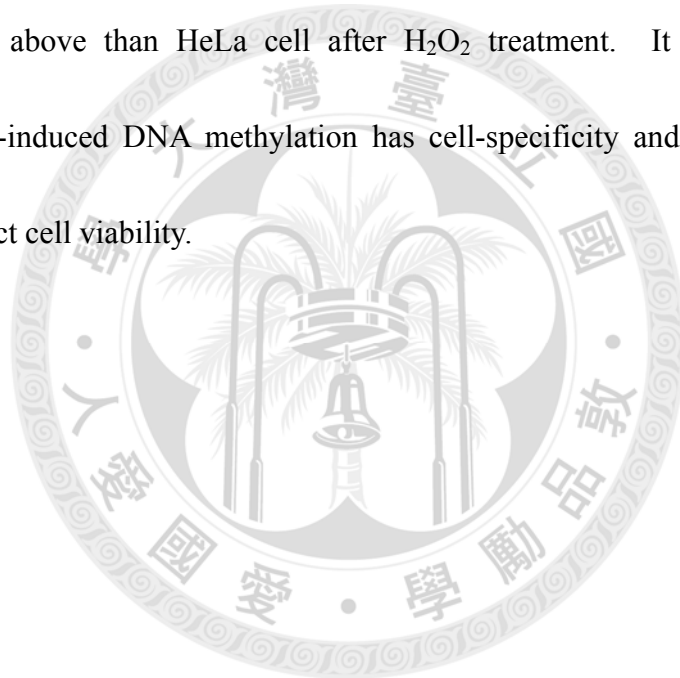
Epigenetics which is defined as ” *A phenomenon that changes the phenotype without changing the underlying DNA sequence, and it can inherit to offspring.*” is one of the major research topics in modern biology. In addition, epigenetics includes DNA methylation, histone modification, and non-coding RNA. In which DNA methylation is associated with gene imprinting, embryonic development, X-chromosome inactivation, oncogenesis, and gene silencing. By focusing on DNA methylation, there are lots of researches in nuclear DNA, however, the information about mitochondrial DNA methylation is relatively rare. Nevertheless, it is known that mitochondria play an important role in ATP producing.

Previous study shows a low methylation pattern in mitochondria and consider that the relationship between mtDNA methylation and cell viability is weak . But, there were two papers which were published in 2009 and 2011 respectively were focusing on this issue as well. One indicates the different methylated accessibility of mtDNA and the other shows the appearance of mitochondrial DNA methyltransferase 1. Recently, the mitochondrial DNA methylation might need re-evaluation due to the detection technology progress.

In this project, one of the major technology, pyrosequencing which is more direct and accurate method to detect oxidative stress-induced mtDNA methylation on HeLa

cell and PC9 cell, is applied. By carrying out this technique, five mitochondrial-encode gene: ATP6, ND1, ND6, TERM and D-loop are analysed.

Based on our research, PC9 cell has better viability than HeLa cell after H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> treatment. Moreover, methylation level of five genes are all increasing in PC9 cell, but no significant difference in HeLa cell. Therefore, baseline data shows that HeLa cell has higher methylation level than PC9 in mtDNA, however, the methylation level of PC9 cell is above than HeLa cell after H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> treatment. It is believed that oxidative stress-induced DNA methylation has cell-specificity and the methylation level might affect cell viability.



# 目錄

口委審定書.....	I
致謝.....	II
中文摘要.....	III
Abstract.....	IV
1. 緒論.....	1
1.1 Epigenetics 與 DNA 甲基化.....	1
1.2 DNMT.....	2
1.3 粒線體.....	4
1.4 粒線體 DNA 的甲基化需重新評估.....	5
2. 材料與方法.....	7
2.1 細胞株培養.....	7
2.2 Genomic DNA 萃取.....	7
2.3 RNA 萃取.....	8
2.4 Reverse Transcription.....	8
2.5 H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 處理.....	8
2.6 MTS assay.....	9
2.7 qPCR.....	9
2.8 Pyrosequencing.....	9
2.9 Bisulfite Conversion.....	10
3. 結果.....	11
3.1 Cell viability (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ).....	11
3.2 HeLa cell mtDNA 甲基化.....	11
3.3 PC9 cell mtDNA 甲基化.....	12
3.4 DNMT 1 expression.....	13

4. 討論.....	14
4.1 氧化壓力引發的粒線體 DNA 甲基化會影響細胞存活率.....	14
4.2 粒線體 DNA 甲基化具有基因與細胞的特異性.....	15
4.3 D-loop 與 ND6 高度甲基化對細胞的影響.....	16
4.4 H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 引發甲基轉移酶表現量與甲基化程度的改變.....	17
4.5 檢討與未來展望.....	17
參考文獻.....	19





## 圖目錄

圖一、PC9 cell 經過 H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 處理後的細胞存活率 .....	21
圖二、HeLa cell 經過 H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 處理後的細胞存活率 .....	22
圖三、HeLa 細胞 ATP6 區域內所有 CpG 位點甲基化之平均值 .....	23
圖四、HeLa 細胞 ND1 區域內所有 CpG 位點甲基化之平均值 .....	24
圖五、HeLa 細胞 D-loop 區域內所有 CpG 位點甲基化之平均值 .....	25
圖六、HeLa 細胞 ND6 區域內所有 CpG 位點甲基化之平均值 .....	26
圖七、HeLa 細胞 TERM 區域內所有 CpG 位點甲基化之平均值 .....	27
圖八、PC9 細胞 ATP6 區域內所有 CpG 位點甲基化之平均值 .....	28
圖九、PC9 細胞 ND1 區域內所有 CpG 位點甲基化之平均值 .....	29
圖十、PC9 細胞 D-loop 區域內所有 CpG 位點甲基化之平均值 .....	30
圖十一、PC9 細胞 ND6 區域內所有 CpG 位點甲基化之平均值 .....	31
圖十二、PC9 細胞 TERM 區域內所有 CpG 位點甲基化之平均值 .....	32
圖十三、甲基轉移酶引子示意圖 .....	33
圖十四、HeLa 與 PC9 total DNMT1 之表現量 .....	34
圖十五、HeLa 與 PC9 mtDNMT1 之表現量 .....	35

## 表目錄

表一、HeLa cell 甲基化趨勢統計.....	36
表二、PC9 cell 甲基化趨勢統計.....	37
表三、比較未處理 H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 之 HeLa cell 與 PC9 cell 甲基化的差異.....	38
表四、比較處理 H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 後 HeLa cell 與 PC9 cell 甲基化的差異.....	39
表五、交叉比較 HeLa 與 PC9 在 H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 處理前後甲基化改變.....	40



# 1. 緒論

## 1.1 Epigenetics 與 DNA 甲基化

表觀遺傳學或上位遺傳學 (Epigenetics)，最早出現在 1942 年，由 Conrad Waddington (1905-1975) 提出的一個初步概念「Epigenotype」，而這是針對很多非孟德爾遺傳定律所能解釋的現象做出的推論，認為基因和基因產物間有許多不同的交互作用，使得外在的表現型 (phenotype) 產生了多樣性，是生物學展新的分支<sup>2</sup>。隨研究發展慢慢有了具體的定義，現今則是將其定義為：在不改變基因序列下，所造成表現型的改變，而這些改變是可遺傳到下一代的。綜文獻所知，以下幾個機制都包含在 Epigenetic 裡：DNA 甲基化 (DNA methylation)、組蛋白修飾 (histone modification)、非編碼 RNA (non-coding RNA)。本研究則聚焦在 DNA 甲基化的部分。

DNA 甲基化在生物體中是一個自然的現象，不僅在原核生物會發生，真核生物也不例外。原核生物 DNA 的甲基化目的是在當受到外來 DNA 入侵時，保護自己的 DNA 免於被自身之限制酶 (restriction enzyme) 切割破壞，而外來 DNA 因為沒有甲基化的保護則會被限制酶切割破壞，達到防禦外來 DNA 的目的。更進一步，真核生物的 DNA 甲基化則是與調控基因表現有關<sup>3</sup>。隨研究發展日新月異，近年來更認為真核生的 DNA 甲基化在基因印痕 (gene imprinting)、胚胎發展 (Embryonic development)、X 染色體失活 (X-chromosome inactivation)、癌化 (oncogenesis)<sup>1</sup> 與基因沉默 (gene silencing) 上扮演重要的角色，無疑的，DNA 甲基化在上位遺傳調控的領域裡，提供了穩定且可遺傳的重要元素<sup>2</sup>。

DNA 甲基化多發生在 5'- CpG- 3' site 的 Cytosine 上，DNA 序列中部分區域富含 CG 時，此區域則被稱為 CpG 島 (CpG island)<sup>2</sup> 當這些區域發生甲基

化時，基因表現量會受到抑制 (repression)<sup>4</sup>，而人體中有 80% 的 CpG 都是被甲基化的，其餘 20% 未被甲基化的 CpG 則多集中在基因的啟動子 (promoter) 或第一個外顯子 (exon) 處，換言之，當啟動子或是外顯子的甲基化模式改變時，基因也會受到影響而沉默 (silencing)。

## 1.2 DNMT

在哺乳類動物中，由 DNA methyltransferase (DNA 甲基轉移酶，DNMT) 執行甲基化的工作，其作用的機制是利用 S-腺苷基甲硫氨酸 (S-adenosyl methionine, SAM) 做為甲基 (methyl group) 的捐贈者 (donor)。首先，甲基轉移酶與 DNA 結合，將目標核苷酸反轉 (flipped out) 暴露於 DNA 雙螺旋之外，之後半胱氨酸 (cysteine) 的親和基團與胞嘧啶第六號碳 (C6) 共價結合，從 SAM 上轉甲基至胞嘧啶的第五號碳 (C5) 上<sup>5</sup>，通過這種甲基化機制和組蛋白修飾、染色質重組等共同作用，細胞可以不改變 DNA 序列而調控不同基因在不同細胞和組織中的表現。

一般認為哺乳類的甲基轉移酶 (DNMT) 依功能不同分為三型：DNMT1、DNMT3 與 DNMT2。DNMT1 是最大宗的甲基轉移酶，分子量約 183 kDd，基因位於第 19 對染色體 p12~13 處主要的功能在於維持 (maintain) 既有的甲基化模式<sup>6</sup>，其活性相較於其他甲基轉移酶在體內更為活躍。DNMT1 會針對半甲基化的 DNA (hemimethylated DNA)，只要一股是 CpG，而相對的另一股是 C，即使 DNA 出現不正常的結構或序列，DNMT1 依舊會進行甲基化，這樣寬鬆的辨識條件讓 DNMT1 可以迅速的完成維持甲基化模式的工作<sup>1</sup>，同時、這種維持作用可以將 DNA 甲基化資訊傳遞給子代細胞。而 DNMT3 家族有三個成員：DNMT3a、DNMT3b 及 DNMT3L。其中 3a 和 3b 的基因則分別位於染色體 2p23 與 20q11.2 上，主要功能在新生 (de novo)

甲基化模式<sup>7</sup>，這在胚胎發育早期與配子生成 (gametogenesis) 的過程中扮演重要的功能，其次，DNMT3L 目前被認為是一個輔助性蛋白，結構與 DNMT3 類似但缺乏 C 端的催化活性區，因此於法自行執行甲基化，但透過與 3a、3b 的交互作用，可能參與轉錄抑制的反應 (transcriptional repression)。第三型 DNMT2，又稱 TRDMT1 (tRNA aspartic acid methyltransferase 1) 在 2006 年被發現是人類體內第一個針對 RNA 甲基化的酵素<sup>8</sup>，所以本質上並不屬於 DNA 甲基轉移酶。

由於 DNMT1 負責了多數甲基化的工作，相關研究也較發達，事實上 DNMT1 也具有幾個不同的 isoform，DNMT1b 是源自於 transcript variant，比 DNMT1<sup>9</sup> 少一個 exon，其蛋白質表現量約佔 DNMT1 的 2~5%；更令人感到興趣的是 2011 年屬於粒線體的 DNA 甲基轉移酶被發現，被命名為 Mitochondrial DNMT1 (mtDNMT1)，其結構與 DNMT1 相同只是在蛋白質的 N 端 (N-terminal) 多了一段粒線體導引序列 (mitochondrial targeting sequence, MTS)。和 DNMT1 不同，mtDNMT1 使用的轉譯起始點 (translational start site) 並非大家了解的起始點而是自原本的起始點又向前位移一個。據研究顯示，粒線體導引序列經多物種的序列比對分析後發現，在哺乳類中是一段高度保留的序列 (conserved sequence)<sup>10</sup>，當 DNMT1 有這段序列後，便會被帶到粒線體去出現在粒線體的基質裡 (matrix)。另外，若細胞處於氧化壓力 (oxidative stress) 的狀態下會導致 peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$ -coactivator1 $\alpha$  (PGC1 $\alpha$ ) 以及 nuclear respiratory factor 1 (NRF1) 表現上升，並進一步使 transcription factor of activated mitochondria (TFAM) 和粒線體呼吸鏈複合體 (mitochondrial respiratory chain complex) 的成員表現上升<sup>11</sup>。另先前之研究分別或者同時轉染 PGC1 $\alpha$  及 NRF1 進入 HCT116 細胞株，且觀察到 mtDNMT 的蛋白表現增加，並導致粒線體上的基因表現量有所變化。這也意指著粒線體有其專屬

的甲基化系統，以往認為粒線體的甲基化不具影響性的這個觀念也受到了新的挑戰。

### 1.3 粒線體

粒線體細細胞內的重要胞器 (organelle)，也是細胞內能量轉換的主要場所。細胞利用醣解作用 (glycolysis)，將葡萄糖 (glucose) 分解成丙酮酸 (pyruvate)，而丙酮酸就成了細胞轉換能量上的重要產物，在一般粒線體功能與供氧正常的狀況下，丙酮酸會進入粒線體接著進行檸檬酸循環 (citric acid cycle or tricarboxylic acid cycle) 與氧化磷酸化反應 (oxidative phosphorylation) 產生 36 個 ATP 成為細胞能量主要的來源。但在粒線體功能異常與低壓氧 (hypoxia) 時，丙酮酸則會選擇另一條途徑進行無氧呼吸，被細胞質中的乳酸脫氫酶 (lactate dehydrogenase) 轉換成乳酸 (lactic acid) 排出細胞外，並產生 2 個 ATP<sup>12</sup>。在以上一系列過程中還會直接或間接產生：乙醯輔酶 A (acetyl-CoA)、S-腺苷基甲硫氨酸與 (SAM)、煙醯胺腺嘌呤二核苷酸 (Nicotinamide adenine dinucleotide, NAD<sup>+</sup>)，acetyl-CoA 和 NAD<sup>+</sup> 是細胞內重要的輔酶參與醣解作用、葡萄糖新生 (gluconeogenesis)、脂肪酸分解 ( $\beta$ -oxidation) 等重要反應；而 SAM 則是細胞內甲基的主要供應者影響細胞甲基化程度<sup>13</sup>，由此可知，粒線體在體內扮演非常重要的功能。

粒線體是唯一具有自己 DNA 的胞器，根據 1981 Anderson 等人的研究知道人類的粒線體 DNA (mtDNA) 長度約 16,569 bp，為一雙股環型結構，外側的一股有較多的基因，稱作重股 (heavy strand)，內側的一股基因較少，稱作輕股 (light strand)，雖然多數出現在粒線體內的蛋白質是由細胞核所做的，但粒線體 DNA 上卻有著 rRNA 與 tRNA 的基因，使得粒線體也擁有與細胞質內不同的轉譯系統 (translation system)<sup>14</sup>。總體來說，粒線體 DNA

包含有：13 個呼吸鏈蛋白質基因（如 ND1、C03、ATP6、Cyt B 等）、2 個 rRNA 基因、22 個 tRNA 基因，即使如此，粒線體 DNA 的轉錄、轉譯與複製仍需要許多細胞核做的蛋白質幫忙<sup>15</sup>。

粒線體的轉錄、轉譯及複製皆是從其 DNA 上的替代環區（Displacement loop, D-loop）開始，D-loop 區域裡包含了複製起始點（replication origin）與雙股的啟動子（promoter），近年來也有研究顯示，當 D-loop 區域發生變異時，粒線體的拷貝數（copy number）或基因的表現量也會連帶受到影響<sup>16,17</sup>，這足以顯示 D-loop 區域的重要性。

#### 1.4 粒線體 DNA 的甲基化需重新評估

在 1980 年代認為粒線體 DNA 上只有少數幾個 CpG island，甲基化程度也相當低，因此被認為粒線體 DNA 的甲基化對細胞的影響性並不重要，但隨研究方法的不斷進步，針對甲基化的偵測靈敏度也隨之提升。2009 年 Rebelo 等人的研究顯示，將細菌的甲基轉移酶加上粒線體導引序列後轉染至人類細胞株後發現，粒線體 DNA 的甲基化程度改變，但轉錄與複製相關的區域則是被粒線體的轉錄因子（mitochondrial transcription factor A, TFAM）高度保護，無法被甲基化，這也顯示了粒線體 DNA 被甲基化的程度會因區域功能不同而有差異<sup>18</sup>。隨後 Shock 等人也在 2011 年發現了屬於粒線體的甲基轉移酶，且發現細胞同時轉染 PGC1 $\alpha$  及 NRF1 以模擬氧化壓力時 mtDNMT1 表現亦會上升，同時用抗體偵測粒線體 DNA 上不同基因，發現 mtDNMT 在個基因有不同程度的結合力。基於以上之成果，本研究將比較細胞在一般跟氧化壓力的環境下，mtDNA 甲基化程度之差異。因此以 bisulfite conversion 處理 mtDNA 後，再以焦磷酸定序法（pyro-sequencing）針對 mtDNA 作區域性的分析，如此可以達到用更直接且更靈敏的方式偵測 CpG site 或 CpG

island 上 cytosine 被甲基化的改變。同時，我們也想要進一步了解 mtDNMT 1 的表現量是否與 mtDNA 的甲基化相關，且其作用機制為何，最後，mtDNA 的甲基畫是否會對細胞造成影響。





## 2. 材料與方法

### 2.1 細胞株培養

實驗使用兩種不同細胞株，一是 HeLa Cell(人類子宮頸癌細胞)，以 Eagle's minimal essential medium (EMEM) 外加 10% Fetal Bovine Serum (FBS, GIBCO)、PSA (Antibiotic-Antimycotic, Invitrogen)、L-Glutamine (GlutaMAX™, Invitrogen) 作為培養基；二是 PC9 Cell (人類肺癌細胞) 以 Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) 外加 10% Fetal Bovine Serum (FBS, GIBCO)、PSA (Antibiotic-Antimycotic, Invitrogen)、L-Glutamine (GlutaMAX™, Invitrogen) 作為培養基。培養在 37°C、5% CO<sub>2</sub> 的培養箱中。

### 2.2 Genomic DNA 萃取

收九成滿的 10 公分盤細胞作為萃取的材料，吸除盤中培養基後，以 1X PBS 去除殘留培養基後，加入 1X Trypsin 1mL，37°C 靜置 5 至 15 分鐘，隨後立即加入兩倍體積的培養基中和反應。吸取細胞混合液到 15mL 離心管，以 800rpm、4°C 離心 5 分鐘後，小心移除懸浮液，利用管中殘留液體將 pellet 打散，再加入 3mL 的 cell lysis buffer 混合均勻置於室溫 20 分鐘，等待細胞溶解，緊接著加入 1mL 的 protein precipitation buffer，震盪 20 秒混合均勻後，以 13,000g 離心 10 分鐘，此時，蛋白質與細胞碎片會沉積至管底形成 pellet，而 DNA 則存於上清液中。取新管加入 3mL 的 isopropanol，離心好的上清液取至新管，借由上下翻轉離心管約 50 次把 DNA 沉澱出來，13,000g 離心 3 分鐘形成 DNA pellet，再用 70%酒精清洗 pellet，隨後清除酒精風乾 3~5 分鐘，以 30~50μl 二次水回溶，存於-20°C。

### 2.3 RNA 萃取

以 6-wells 盤的一格（細胞約九成滿）做為 RNA 萃取的材料，加入 1mL 的 TriPure reagent (Roche)，置於室溫 5 分鐘等待蛋白質分解，隨後加入 chloroform（氯仿）震盪 15 秒後，置於室溫 10 分鐘後 12,000g、4°C 離心 15 分鐘，此時管中液體會分成三層，由上至下依序是含有 RNA 的水層與含有 DNA 及 protein 的中間層與有機層。將含有 RNA 的水層移至新管，加入 0.5mL 的 isopropanol（異丙醇）後，上下翻轉離心管將 RNA 沉澱出來，以 12,000g°C 離心 10 分鐘，去除上清液並用 75%酒精清洗 RNA pellet，隨後去除酒精風乾 3~5 分鐘，以含有 DEPC 的二次水回溶，存於-80°C。

### 2.4 Reverse Transcription

採用 QuantiTect Reverse Transcription Kit (QIAGEN)，先將 RNA 放在冰上回溫溶解，配製 Genomemic DNA Elimination Buffer，隨後加入 1 $\mu$ g RNA，置於 42°C 下 2 分鐘後，立即放回冰上，配製 reverse-transcription master mix（依產品說明），將冰上的 RNA 混合液加入 master mix 中，置於 42°C 下 15 分鐘，再將溫度調到 95°C 放 3 分鐘始反轉錄沒失活，結束反轉錄，所得的 cDNA 存放於-20°C。

### 2.5 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 處理

HeLa 及 PC9 於 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 處理前一天分別繼代 1X10<sup>6</sup>/well 和 6X10<sup>5</sup>/well 之細胞數於 6-well 盤中，24 小時後細胞培養至九成滿。分別以各自之培養基配製 2mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 溶液，再以最終濃度為 0.1mM、0.2mM 和 0.4mM 的 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 處理並培養於 37°C 培養箱中 30 分鐘。H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 之處理完結後吸掉含 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 培養基，再以 3ml 之 PBS/well 清洗細胞後，立即收集細胞並萃取 genomic

DNA 與 RNA。

## 2.6 MTS assay

為釐清  $H_2O_2$  處理 HeLa 及 PC9 是否影響其存活，本實驗利用 MTS assay 來測定細胞之存活率。細胞於  $H_2O_2$  處理前一天分別繼代  $3.3 \times 10^4$ /well 和  $2 \times 10^4$ /well 之細胞數於 96-well 盤中，24 小時後細胞培養至九成滿。分別以各自之培養基配製 2mM  $H_2O_2$  溶液，再以最終濃度為 0.1mM、0.2mM 和 0.4mM 的  $H_2O_2$  處理並培養於  $37^\circ C$  培養箱中 30 分鐘。其中一盤加入 catalase 以終止  $H_2O_2$  反應另一盤則加入等體積之培養基，5 分鐘後加入 MTS 試劑 ( $20 \mu L$ /well) 並於 2 小時後以 ELISA reader 進行測定。

## 2.7 qPCR

採用 LightCycler system (Roche)，利用 SYBR Green 會鑲嵌在雙股 cDNA 或 DNA 的特性，再藉由機器偵測 SYBR Green 的螢光量來測定 RNA 的表現量。在反應管中各加入等量的 HeLa 與 PC9 之 cDNA，由於表現量與 Ct 值成反比，也就是說，隨著 PCR 的循環次數增加，target DNA 也會迅速增幅，當螢光超過閾值 (Threshold) 時所對應的 Cycle 數就是 Ct 值，表現量越多，Ct 值越小，用此偵測細胞內甲基轉移酶 I (Methyltransferase I, DNMT 1) 的表現量，在氧化壓力 (ROS) 前後是否有差異。

## 2.8 Pyrosequencing

為能精準的偵測粒線體 DNA 的甲基化程度，實驗採用焦磷酸定序法 (Pyrosequencing, PyroMark Q24, QIAGEN)，利用 PCR 時 DNA 聚合酶 (DNA Polymerase) 會與去氧核苷酸 (dNTP) 結合，釋放出焦磷酸根離子 (PPi)，

隨後三磷酸腺苷硫酸化 (ATP sulfurylase) 會將 PPi 與腺苷磷酸硫酸 (adenosine phosphosulfate: APS) 轉換成三磷酸腺苷 (adenosine triphosphate: ATP)，而 ATP 則會提供 Luciferase 能量激發冷光，再藉由 CCD 偵測達到定量的目的。該技術是 ssDNA-base 的定序方式，因此需要一支 5' 標記 Biotin 的 primer，藉由 PCR 放大產物的同時順便將 Biotin 也加在欲分析的產物上，此後，利用高溫下可將 dsDNA 解開的原理讓雙股分開，再以磁珠吸取 5' 標記 Biotin 的 ssDNA 作為定序分析的模板 (Template)。

## 2.9 Bisulfite Conversion

甲基轉移酶 (Methyltransferase) 會針對 CpG site 上的胞嘧啶 (Cytosine) 環上的第五個碳加甲基 (Methyl Group)，使得 Cytosine 變成 5'-甲基胞嘧啶 (5'-methylcytosine)。而亞硫酸鹽 (Bisulfite) 這種化學藥品，可以將 Cytosine 透過脫胺 (Deamination) 的反應轉換成尿嘧啶 (Uracil)，隨後進行 PCR 時，Uracil 又會被轉換成胸腺嘧啶 (Thymidine)；反之，甲基化後的 5'-methylcytosine 則不會被轉換，經過定序時仍然為 Cytosine，藉此即可以分析該位點是否被甲基化，故 Bisulfite Conversion 可說是分析甲基化最常用且重要的技術。本實驗採用 EZ DNA Methylation Kit (ZYMO RESEARCH)，經過亞硫酸鹽轉換後的 DNA 會透過 PCR，增幅放大欲研究的基因片段，為提升 PCR 的精準度與達到足夠的產量，通常會使用具有 Hot-Star 功能的 DNA Polymerase (PyroMark PCR Kit, QIAGEN)，並且將 PCR 的循環次數調整至 40~45 次。

### 3. 結果

#### 3.1 Cell viability ( $H_2O_2$ )

先前的研究指出，當細胞在氧化壓力的條件下會使 mtDNMT1 的表現量增加，所以本研究想利用  $H_2O_2$  的給予來使細胞處於氧化壓力的環境，並抽取細胞 DNA 及 RNA 來進行後續之甲基化程度分析及 mtDNMT1 表現量測定。首先，本研究先測試不同  $H_2O_2$  濃度對細胞毒害程度之影響。其中，由於實驗的設計為以  $H_2O_2$  處理 30 分鐘後隨即將細胞收集，並做後續 DNA 及 RNA 之純化，所以在 MTS assay 的試驗中，我們以處理 30 分鐘  $H_2O_2$  再加入 catalase 的組別來模擬此條件對細胞存活之影響，而沒有加入 catalase 的組別為對照組。MTS assay 的結果指出，PC9 在處理 0、0.1、0.2 及 0.4mM  $H_2O_2$  30 分鐘後並無明顯之影響(圖一)，且沒有加入 catalase 的組別亦同(圖一)。而 HeLa 在處理 0~0.4mM  $H_2O_2$  30 分鐘後，存活率有下降的現象，並在 0.2 及 0.4 mM 之  $H_2O_2$  濃度中下降了 30% (圖二)，且沒有加入 catalase 的組別更下降了 40% 及 70% (圖二)。此結果顯示 PC9 比起 HeLa 對於  $H_2O_2$  所造成氧化壓力所造成環境的耐受性及抵抗性較好。在後續的實驗中將選取 0.4 mM  $H_2O_2$  處理之細胞做為氧化壓力的環境下，粒線體 DNA 之甲基化程度分析及 mtDNMT1 表現量測定的材料。

#### 3.2 HeLa cell mtDNA 甲基化

細胞在氧化壓力下，甲基化程度可能隨之改變，因此本實驗利用  $H_2O_2$  做為氧化壓力的來源，並抽取細胞的 DNA 再經過重亞硫酸鹽轉換後，針對粒線體上不同的基因，以焦磷酸定序法測定氧化壓力前後，甲基化程度的改變。實驗測定 HeLa cell 的範圍包括：ATP6、ND1、ND6、D-loop 與 TERM 等 5 個區域，結果顯示，以 0.4mM  $H_2O_2$  處理 30 分鐘後這 5 個區域的甲基化

程度並沒有明顯的改變，其中幾個 CpG 位點其甲基化變異的 P 值雖小於 0.05，但甲基化的差異介於 1~6%，幅度較小(圖三、四、五、六、七)。但從甲基化趨勢而言，統計基因裡所有 CpG 位點的趨勢分析發現，經氧化壓力後，HeLa cell 的 ATP6 有 61.1% 的位點顯示甲基化程度下降；ND1 則有 71% 的位點顯示甲基化程度下降(表一)。另外，與轉錄複製相關的區域中，TERM (transcription termination region) 所有位點甲基化程度皆上升；而 D-loop 則有 94.4% 的位點甲基化程度有上升的趨勢(表一)。整體來說，HeLa cell 經過氧化壓力後，ATP6 與 ND1 甲基化趨勢下降，TERM 與 D-loop 甲基化趨勢上升，而 ND6 的甲基化上升與下降的位點比例相同，因此趨勢差異不大。顯示 HeLa cell 對於氧化壓力的反應會因基因不同而有差異，但改變的幅度都不顯著，只能以趨勢來綜觀。

### 3.3 PC9 cell mtDNA 甲基化

在 PC9 cell 裡，所有測定的基因區域裡皆有 74~100% 的位點顯示甲基化趨勢增加(表二)，也就是說在氧化壓力下，5 個區域的甲基化程度普遍是上升的(圖八、九、十、十一、十二)。經過統計發現，ND6 132~141、ND6 433~541、D-loop 407~479 以及 D-loop 627~645 等四個區域，其 CpG 位點甲基化變異之 P 值皆小於 0.05，統計達差異性(圖十、十一)。進一步比較氧化壓力前後的甲基化改變數值，ND6 的甲基化較 baseline 上升了 8~18 倍；而 D-loop 的甲基化則上升了 1.5~5 倍。從整體 CpG 位點改變的角度分析，ND6 和 D-loop 區域內甲基化上升的 CpG 位點佔區域內所有位點的 100% 和 86.7%，比例相當高。

再把 PC9 與 HeLa 交叉比對發現，在控制組 (no H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> treatment) 裡，ND1、TERM 與 D-loop 的甲基化程度在兩株細胞間並沒有明顯的高低差異，而

ATP6 在 PC9 甲基化稍高於 HeLa，ND6 在 PC9 則是略低於 HeLa (表三)，但經過 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 處理後，所有五個基因區域除了 TERM 外在 PC9 中的甲基化皆高於 HeLa，且甲基化增加的幅度達四至七成 (表四)。這個結果顯示，PC9 cell 對於氧化壓力所引發的甲基化變異較敏感，並且甲基化的變化程度也較大。

### 3.4 DNMT 1 expression

為了瞭解粒線體 DNA (mtDNA) 甲基化的改變是否與粒線體甲基轉移酶 (mtDNMT 1) 的表現量成正比，我們參照 Shock 等人在 2011 年發表的期刊文章，利用 mRNA 序列在 mtDNMT 1 的轉錄起始點 (transcription start site) 與 1 號外顯子 (exon 1) 兩者區域前後，設計引子 (primer) 做為測定 mtDNMT 1 表現量之用，同時也設計 total DNMT 1 的引子做為輔助 (圖十三)，並用 PPIA 做為 internal control 的基因。數據分析後發現，氧化壓力的確會讓 total DNMT 1 的表現量增加，在 HeLa cell 中 total DNMT 1 表現量上升了約 3 倍，而 PC9 cell 則上升了約 6 倍。在 mtDNMT1 的表現量部分，在 HeLa cell 上升約 4 倍，在 PC9 cell 則上升約 3 倍。在此，我們的實驗結果顯示，氧化壓力會導致 total DNMT 1 和 mtDNMT 1 的表現量增加，與我們預測的結果一致。

## 4. 討論

### 4.1 氧化壓力引發的粒線體 DNA 甲基化會影響細胞存活率

在先前的文獻中已證實除了細胞本身之 genomic DNA 會被甲基化外，粒線體的 DNA 亦有甲基化的反應發生。但以往認為粒線體的甲基化程度非常低<sup>19</sup>且對於直接作用於粒線體 DNA 的 DNMT 也沒有被找到。直到 2011 年 Shock 等作者於細胞 DNMT1 基因的 start codon 序列之前找到另外 in-frame 的 start codon，並且也發現在新的 ATG 與原本 ATG 之間的序列為 N-terminal mitochondrial targeting sequence (MTS)，因此 Shock 等人認為粒線體亦有自己的 DNMT1(mtDNMT1)，並利用西方墨點法(western blotting)證明當細胞在氧化壓力的條件下會使 mtDNMT1 的表現量增加<sup>10</sup>。在本實驗中利用 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 處理來觀察在氧化壓力的環境之下 mtDNA 本身的甲基化程度有何變化。結果發現 PC9 cell 的所有區域甲基化皆有上升的趨勢，尤其是 D-loop 與 ND6 區域在經氧化壓力後，統計結果顯示甲基化有顯著的上升，而 HeLa cell 卻沒有明顯的改變。再比較 HeLa cell 和 PC9 cell 在 0.4mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 處理 30 分鐘後的存活率，發現 PC9 cell 對於氧化壓力有較好的抵抗能力，有 90% 以上的細胞存活率，而 HeLa cell 對於氧化壓力的抵抗則較差，細胞存活率約只有 70%。這樣的結果使我們感到好奇，為什麼在同樣的氧化壓力條件下，細胞間會有不同程度的抵抗差異。更進一步探討發現，過多的活性氧化物(reactive oxygen species, ROS)會導致核 DNA (nDNA) 和粒線體 DNA (mtDNA) 的損壞，包括增加點突變率、單股或雙股斷裂甚至影響 DNA 與其他分子間的交互作用，而粒線體 DNA (mtDNA) 就處於離 ROS 生成最近的區域，同時不像核 DNA，粒線體 DNA 缺乏組蛋白的保護，再加上粒線體的 DNA 修復能力有限，使得它比核 DNA 更容易受到氧化壓力的損傷<sup>20</sup>。當氧化壓力造成的粒線體 DNA 損傷到達無負荷的程度時，粒線體 DNA 上的蛋白質表現



量、細胞的呼吸功能甚至是電子傳遞鏈 complex 1 的活性都會開始異常，隨之而來的是粒線體的膜電位瓦解，最後細胞色素 C (cytochrome c) 被釋放，細胞走向凋亡 (apoptosis)<sup>21</sup>。然而最近有研究表示，DNA 的甲基化不僅在修復上扮演重要的角色，對於 genome stability 也有重要的影響<sup>22,23</sup>，因此我們推測，粒線體 DNA 的甲基化可使其得到較好的能力去抵抗氧化壓力所造成的 DNA 損害，進一步使細胞的存活率提升。

#### 4.2 粒線體 DNA 甲基化具有基因與細胞的特異性

看到細胞經過氧化壓力而產生甲基化與存活率的改變後，我們進一步想了解，氧化壓力所引發的甲基化改變在粒線體 DNA 各個基因區域是否有不同的影響。粒線體 DNA 上有 37 個基因，其中有 13 個會做出與呼吸鏈和細胞凋亡 (apoptosis) 相關的蛋白質，ATP6 蛋白質是 ATP synthase (又稱 complex V) 的次單位，而 ATP synthase 主要的功能是将 ADP 轉換成 ATP 成為細胞可使用的能量；ND1 與 ND6 分別位於重股 (heavy strand) 和輕股 (light strand) 是 NADH dehydrogenase-ubiquinone reductase (又稱 complex I) 的次單位<sup>24</sup>，complex I 位於粒線體的膜上並將電子從 NADH 轉移至 coenzyme Q 上，是電子進入電子傳遞鏈的重要轉換站。再者，D-loop 和 TERM 則與粒線體轉錄、複製的調控有關。Rebalo 等人，2009 年的研究顯示，將細菌的甲基酶轉染細胞後發現，整個粒線體 DNA 對於甲基轉移酶有不同的可結合程度，也就是甲基化在粒線體 DNA 上的每個基因間也有程度上的差異<sup>18</sup>。又 2011 年，Shock 等人的研究也推測 mtDNMT1 針對粒線體的兩股有不同的作用形式<sup>10</sup>。而在我們的甲基化程度分析發現，HeLa cell 經氧化壓力後，ATP6 與 ND1 的甲基化程度下降，ND6 維持不變，而 D-loop 與 TERM 則是甲基化程度上升，有趣的是，在 PC9 cell 我們卻看到了不同模式的甲基化程度變異，所有的 5 個區域的甲基化均是上升的趨勢，特別是 ND6 與 D-loop 統計上達顯著

差異。以上的結果顯示，氧化壓力所引發的甲基化在基因間和細胞間的影響有所差異，具有基因及細胞的特異性（表五）。

### 4.3 D-loop 與 ND6 高度甲基化對細胞的影響

在甲基化程度的改變上，以同樣條件所得的 DNA 進行焦磷酸定序，發現 PC9 cell 的所有區域皆有上升的趨勢，尤其是 D-loop 與 ND6 區域依統計結果甲基化皆有顯著的上升，HeLa 則否。D-loop 區域包含粒線體的 HSP、LSP 及 OL，與轉錄複製相關控制著粒線體的融合（fusion）與分裂（fission），其上有粒線體轉錄因子（mitochondrial transcription factor, mtTFA）或是粒線體的 RNA 聚合酶（mtRNAPol, mtRNA polymerase）的結合位置，是粒線體 DNA 中最重要的一個區域<sup>24</sup>。且哺乳動物細胞中多數的 CpG island 位於基因的 promoter 區域，而甲基化可以藉由影響 DNA 與蛋白質之間的交互作用，改變染色質的結構（chromatin structure），使其變的緊密（condense），讓原本可以和 DNA 結合的蛋白質包括轉錄因子等無法結合，進而抑制轉錄活性<sup>25</sup> 導致下游基因沉默。因此我們認為，當氧化壓力導致 D-loop 被高度甲基化時，粒線體會傾向抑制本身的轉錄與分裂，降低內生性的壓力。

呼吸鏈本身就是細胞內 ROS 的最大製造來源，而 ND6 是呼吸鏈 complex I 的次單元，complex I 是電子進入粒線體的第一站。曾有研究指出，糖尿病第一型與第二型患者常合併有心肌病變（cardiomyopathy），而這與過多的 ROS 堆積在心臟組織有關，當給予這些病人適量的 catalase 時，可以有效減緩 ROS 對心肌的傷害，使心肌保有正常的收縮功能<sup>26</sup>。細胞本身也可能有類似的保護機制，故我們認為當細胞面對外來的氧化壓力時，可能藉由減少自身 ROS 的製造，來降低氧化壓力的傷害，換言之，ND6 的高度甲基化可能會影響 complex I 的功能，使得呼吸鏈的作用降低，達到減少 ROS 以保護細胞的目的。

#### 4.4 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 引發甲基轉移酶表現量與甲基化程度的改變

以往對粒線體 DNA 的甲基化程度與機制尚不清楚，直到偵測甲基化程度的技術有了突破，可以針對單一 CpG site 做測量且精準度也大為提升，更重要的是 2011 年首次發現了專屬於粒線體的甲基轉移酶 (mtDNMT 1)，對於粒線體 DNA 甲基化的研究又邁進了一大步，但關於粒線體的甲基轉移酶 (mtDNMT 1) 在細胞自然環境下的表現程度與作用模式，仍知之甚少，因此，我們希望利用直接製造細胞內氧化壓力並比較其前後 mtDNMT 1 的表現量差異，幫助我們更進一步了解 mtDNMT 1 在粒線體 DNA 上的作用模式與重要性。曾有研究表示細胞經過 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 處理後，會導致 DNA 甲基轉移酶 1 (DNA methyltransferase 1, DNMT1) 與組蛋白去乙酰酶 1 (histone deacetylase 1, HDAC1) 的表現量上升，並且改變了基因啟動子區域的甲基化模式，使得下游基因表現受到抑制<sup>27</sup>。故我們也進一步想要討論，經過氧化壓力後，粒線體 DNA 的甲基化程度改變，是否也與粒線體甲基轉移酶 (mtDNMT1) 的表現量有關。qPCR 實驗結果顯示，比較 HeLa cell 與 PC9 cell 在經過氧化壓力後，total DNMT1 和 mtDNMT 1 的表現量均有上升，同時在粒線體 DNA 上我們也看到了甲基化上升的趨勢，顯示氧化壓力的確會刺激細胞製造甲基轉移酶，其中也包含了粒線體甲基轉移酶，隨後粒線體甲基轉移酶會在粒線體 DNA 上作用，導致粒線體 DNA 區域性的甲基化。

#### 4.5 檢討與未來展望

在甲基化程度測定的部分，焦磷酸定序雖然可以區分每一個 CpG 位點的甲基化程度，但再現性較差，造成許多位點標準差過大，影響統計的可信度，推測可能是因為某些基因區域受限於二級結構不易解開的關係，針對此一缺點，可以利增加樣本數來提升統計的可信度，但利用焦磷酸定序仍是相較於

MSP 與 BSP 有較高的準確度，並且能針對單一 CpG 位點做分析，是甲基化偵測的一大突破。

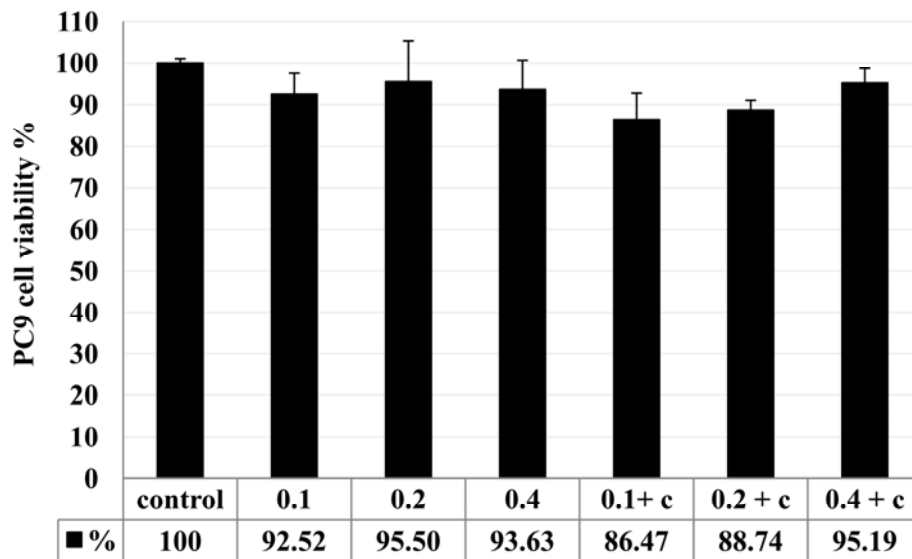
在進行 qPCR 時我們發現，不論是 HeLa 或是 PC9，經 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 處理後利用反轉錄所得的 cDNA 其降解的速度較未經 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 處理的樣本來的快上許多，增加 PCR 定量的困難性；再者，以相同的 cDNA 同時分析 mtDNMT1、DNMT1 與 PPIA，也發現 DNMT1 與 PPIA 的表現量算是穩定，但 mtDNMT1 的表現量卻差異非常大，有時甚至偵測不到產物，推測認為 mtDNMT1 的表現量本來就不多且 qPCR 使用的引子處於 MTS 與 exon1 交界，該區域 GC 比值高達 66%，高 GC 的序列因二級結構不易解開會抑制反轉錄的效率，造成後續定量上的困難。因此針對二級結構的部分，我們加入了 formamide 幫助減低二級結構的干擾並增加引子的專一性。

綜目前的實驗結果，我們認為後續仍可針對能夠穩定偵測 mtDNMT1 表現量做方法上的改良，且在本實驗中沒有討論甲基化上升是否可以表示基因的表現量隨之下降，因此，往後的研究中可以針對甲基化上升是否會造成基因表現量下降做探討，同時也可以更進一步的討論該基因表現量下降對粒線體功能以至於整體細胞功能有何影響。而粒線體 DNA 的甲基化也可能是粒線體研究展新的一頁。

## 參考文獻

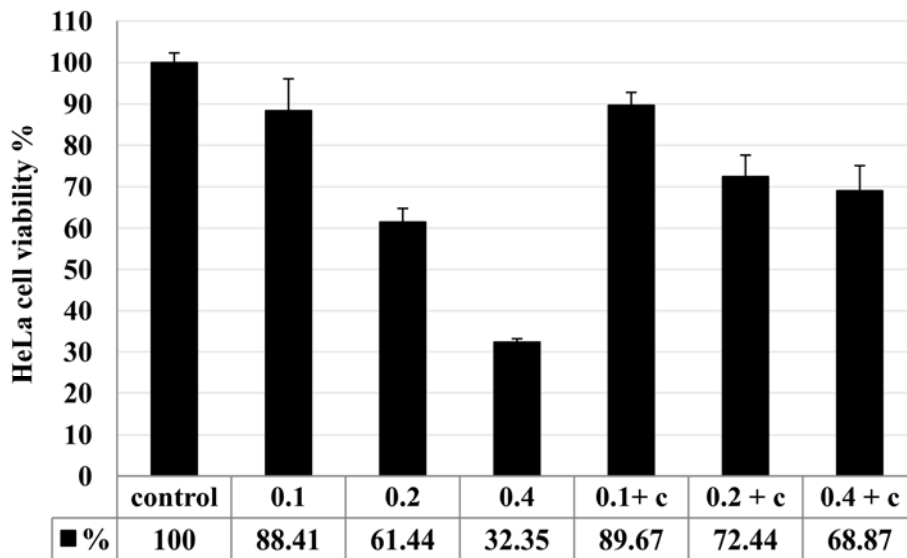
1. Stirzaker, C. *et al.* Extensive DNA methylation spanning the Rb promoter in retinoblastoma tumors. *Cancer Res* **57**, 2229-37 (1997).
2. Goldberg, A.D., Allis, C.D. & Bernstein, E. Epigenetics: a landscape takes shape. *Cell* **128**, 635-8 (2007).
3. Costello, J.F. & Plass, C. Methylation matters. *J Med Genet* **38**, 285-303 (2001).
4. Goll, M.G. & Bestor, T.H. Eukaryotic cytosine methyltransferases. *Annu Rev Biochem* **74**, 481-514 (2005).
5. Smith, S.S., Kaplan, B.E., Sowers, L.C. & Newman, E.M. Mechanism of human methyl-directed DNA methyltransferase and the fidelity of cytosine methylation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**, 4744-8 (1992).
6. Babinger, P., Volk, R., Cakstina, I., Maftai, A. & Schmitt, R. Maintenance DNA methyltransferase (Met1) and silencing of CpG-methylated foreign DNA in *Volvox carter*. *Plant Mol Biol* **63**, 325-36 (2007).
7. Okano, M., Bell, D.W., Haber, D.A. & Li, E. DNA methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b are essential for de novo methylation and mammalian development. *Cell* **99**, 247-57 (1999).
8. Goll, M.G. *et al.* Methylation of tRNA<sup>Asp</sup> by the DNA methyltransferase homolog Dnmt2. *Science* **311**, 395-8 (2006).
9. Bonfils, C., Beaulieu, N., Chan, E., Cotton-Montpetit, J. & MacLeod, A.R. Characterization of the human DNA methyltransferase splice variant Dnmt1b. *J Biol Chem* **275**, 10754-60 (2000).
10. Shock, L.S., Thakkar, P.V., Peterson, E.J., Moran, R.G. & Taylor, S.M. DNA methyltransferase 1, cytosine methylation, and cytosine hydroxymethylation in mammalian mitochondria. *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**, 3630-5 (2011).
11. Scarpulla, R.C. Transcriptional paradigms in mammalian mitochondrial biogenesis and function. *Physiol Rev* **88**, 611-38 (2008).
12. Assaily, W. & Benchimol, S. Differential utilization of two ATP-generating pathways is regulated by p53. *Cancer Cell* **10**, 4-6 (2006).
13. Wallace, D.C. & Fan, W. Energetics, epigenetics, mitochondrial genetics. *Mitochondrion* **10**, 12-31 (2010).
14. Anderson, S. *et al.* Sequence and organization of the human mitochondrial genome. *Nature* **290**, 457-65 (1981).
15. Ryan, M.T. & Hoogenraad, N.J. Mitochondrial-nuclear communications. *Annu Rev Biochem* **76**, 701-22 (2007).

16. Wallace, D.C. A mitochondrial paradigm of metabolic and degenerative diseases, aging, and cancer: a dawn for evolutionary medicine. *Annu Rev Genet* **39**, 359-407 (2005).
17. Taylor, R.W. & Turnbull, D.M. Mitochondrial DNA mutations in human disease. *Nat Rev Genet* **6**, 389-402 (2005).
18. Rebelo, A.P., Williams, S.L. & Moraes, C.T. In vivo methylation of mtDNA reveals the dynamics of protein-mtDNA interactions. *Nucleic Acids Res* **37**, 6701-15 (2009).
19. Shmookler Reis, R.J. & Goldstein, S. Mitochondrial DNA in mortal and immortal human cells. Genome number, integrity, and methylation. *J Biol Chem* **258**, 9078-85 (1983).
20. Lee, H.C. & Wei, Y.H. Oxidative stress, mitochondrial DNA mutation, and apoptosis in aging. *Exp Biol Med (Maywood)* **232**, 592-606 (2007).
21. Ricci, C. *et al.* Mitochondrial DNA damage triggers mitochondrial-superoxide generation and apoptosis. *Am J Physiol Cell Physiol* **294**, C413-22 (2008).
22. Robertson, K.D. & Jones, P.A. DNA methylation: past, present and future directions. *Carcinogenesis* **21**, 461-7 (2000).
23. Lengauer, C., Kinzler, K.W. & Vogelstein, B. DNA methylation and genetic instability in colorectal cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 2545-50 (1997).
24. Fernandez-Silva, P., Enriquez, J.A. & Montoya, J. Replication and transcription of mammalian mitochondrial DNA. *Exp Physiol* **88**, 41-56 (2003).
25. Razin, A. & Cedar, H. DNA methylation and gene expression. *Microbiol Rev* **55**, 451-8 (1991).
26. Ye, G. *et al.* Catalase protects cardiomyocyte function in models of type 1 and type 2 diabetes. *Diabetes* **53**, 1336-43 (2004).
27. Kang, K.A., Zhang, R., Kim, G.Y., Bae, S.C. & Hyun, J.W. Epigenetic changes induced by oxidative stress in colorectal cancer cells: methylation of tumor suppressor RUNX3. *Tumour Biol* **33**, 403-12 (2012).



圖一、PC9 cell 經過  $H_2O_2$  處理後的細胞存活率

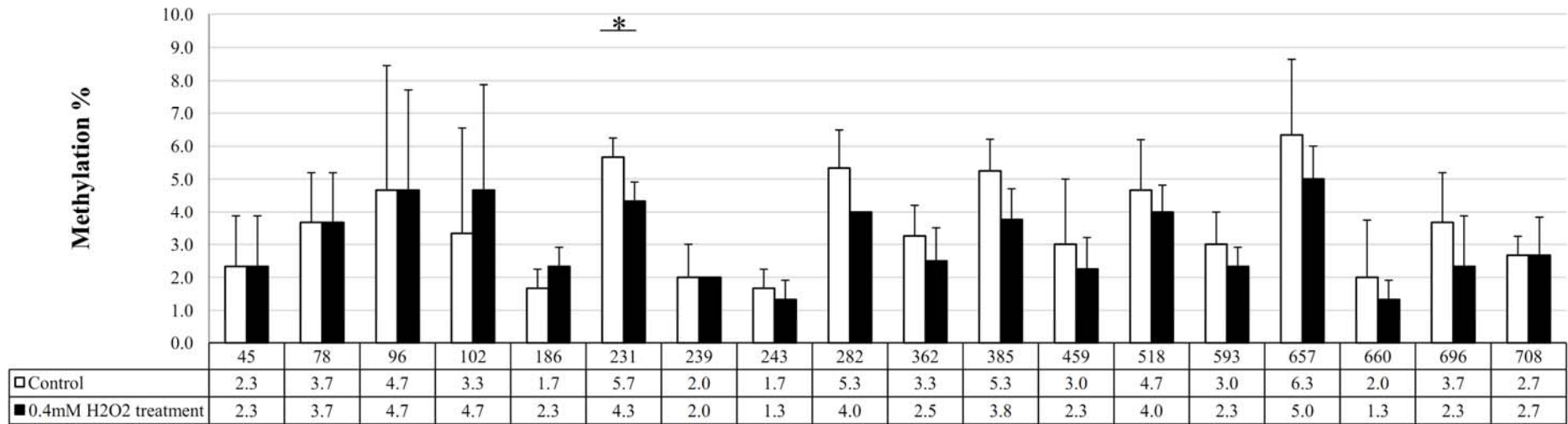
為測定  $H_2O_2$  的毒性對 PC9 細胞之影響，將沒有經過  $H_2O_2$  處理的細胞當作控制組，而實驗組則分為兩組，第一組分別用 0.1mM、0.2mM、0.4mM 的  $H_2O_2$  處理 30 分鐘後，直接進行 MTS assay；第二組則是利用相同濃度的  $H_2O_2$  處理 30 分鐘後，加入 catalase 終止反應後再進行 MTS assay。結果顯示，不論有沒有加 catalase 終止反應，PC9 細胞對於這三個濃度造成的氧化壓力有很強的抵抗性，細胞存活度皆有 85% 以上。



圖二、HeLa cell 經過  $H_2O_2$  處理後的細胞存活率

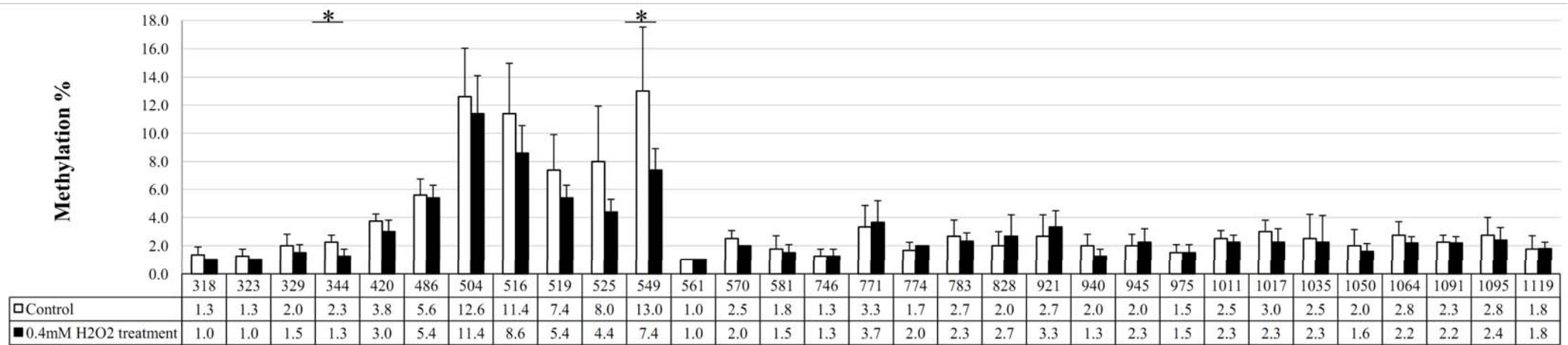
為測定  $H_2O_2$  的毒性對 HeLa 細胞之影響，將沒有經過  $H_2O_2$  處理的細胞當作控制組，而實驗組則分為兩組，第一組分別用 0.1mM、0.2mM、0.4mM 的  $H_2O_2$  處理 30 分鐘後，直接進行 MTS assay；第二組則是利用相同濃度的  $H_2O_2$  處理 30 分鐘後，加入 catalase 終止反應後再進行 MTS assay。結果顯示，加入 catalase 有助於 HeLa 細胞抵抗氧化壓力造成的細胞損傷，使細胞存活率提高，且 HeLa 細胞的存活率與  $H_2O_2$  的濃度成反比。





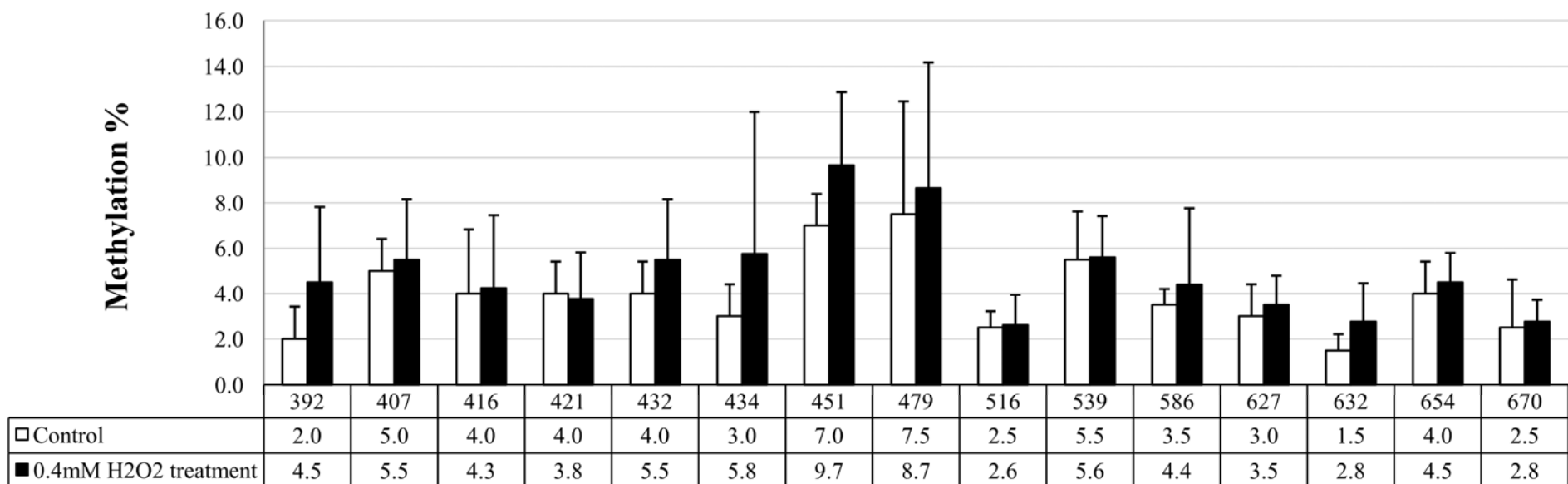
圖三、HeLa 細胞 ATP6 區域內所有 CpG 位點甲基化之平均值

圖表資料第一行數字代表 CpG 為點在基因內的相對位置，第二行數字代表未經 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 處理每個位點的甲基化的平均值，第三行數字則是代表經過 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 處理後每個為點的甲基化的平均值，圖中\*表示該位點的 P 值小於 0.05。



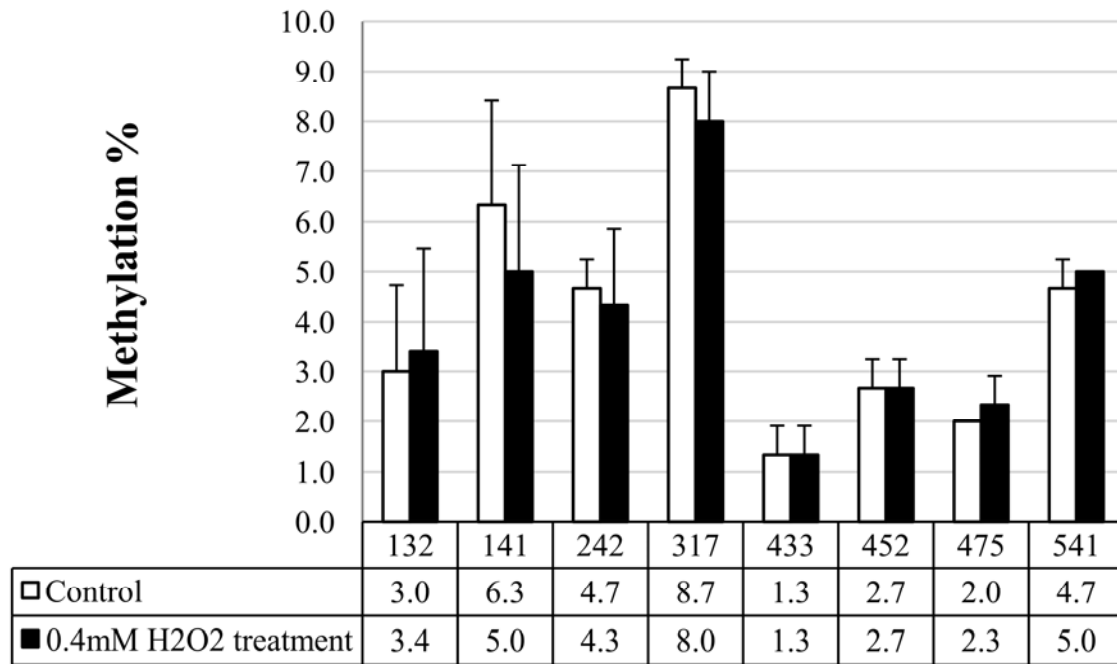
圖四、HeLa 細胞 ND1 區域內所有 CpG 位點甲基化之平均值

圖表資料第一行數字代表 CpG 為點在基因內的相對位置，第二行數字代表未經 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 處理每個位點的甲基化的平均值，第三行數字則是代表經過 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 處理後每個為點的甲基化的平均值，圖中\*表示該位點的 P 值小於 0.05。



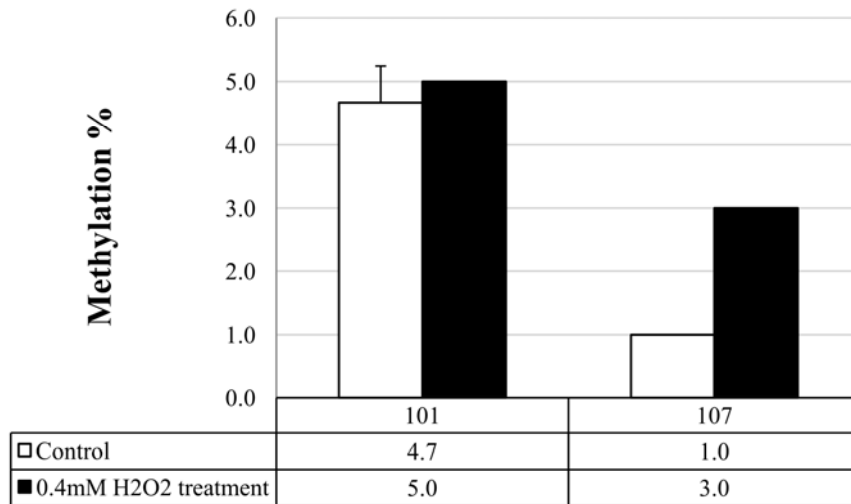
圖五、HeLa 細胞 D-loop 區域內所有 CpG 位點甲基化之平均值

圖表資料第一行數字代表 CpG 為點在基因內的相對位置，第二行數字代表未經 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 處理每個位點的甲基化的平均值，第三行數字則是代表經過 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 處理後每個為點的甲基化的平均值。



圖六、HeLa 細胞 ND6 區域內所有 CpG 位點甲基化之平均值

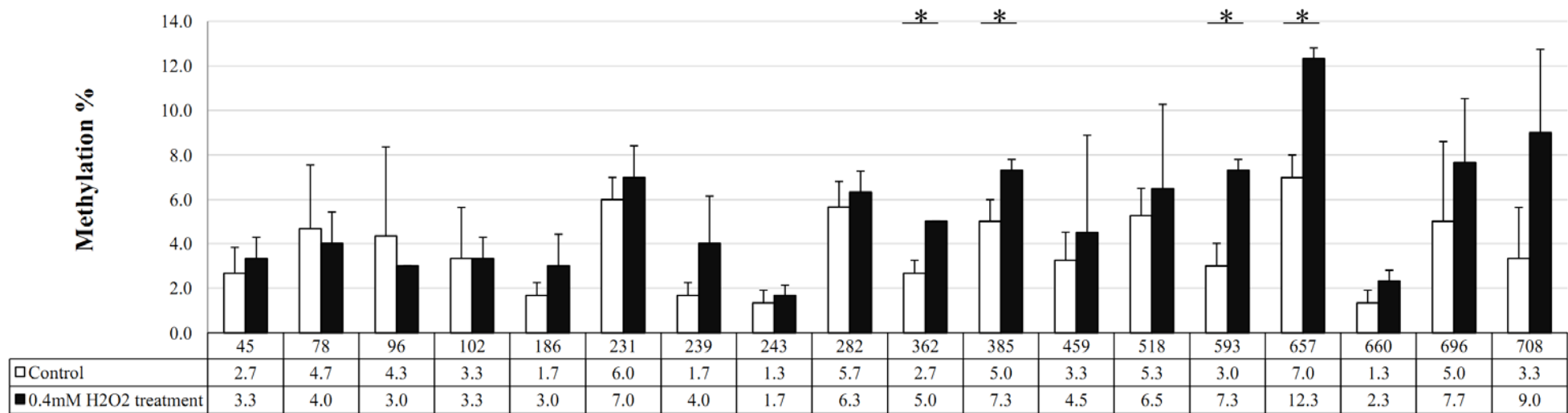
圖表資料第一行數字代表 CpG 為點在基因內的相對位置，第二行數字代表未經 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 處理每個位點的甲基化的平均值，第三行數字則是代表經過 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 處理後每個為點的甲基化的平均值。



圖七、HeLa 細胞 TERM 區域內所有 CpG 位點甲基化之平均值

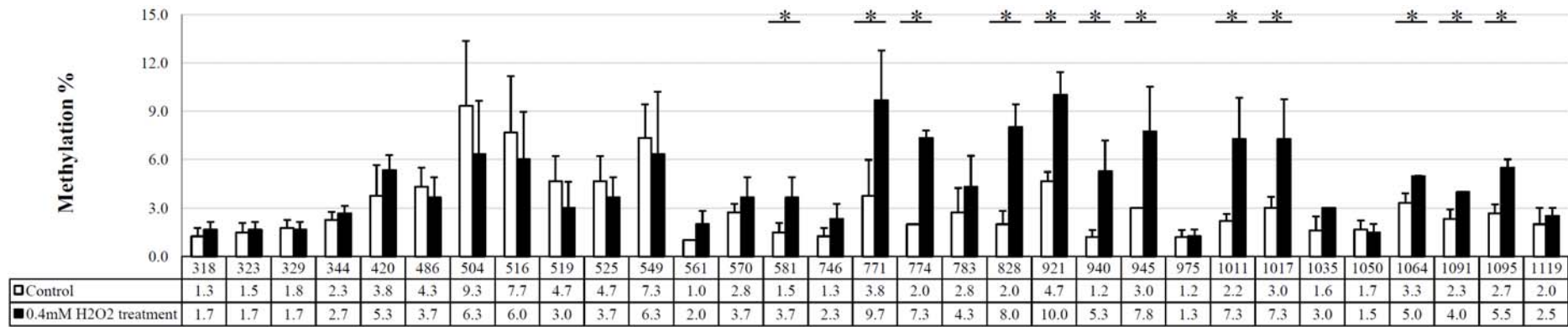
圖表資料第一行數字代表 CpG 為點在基因內的相對位置，第二行數字代表未經 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 處理每個位點的甲基化的平均值，第三行數字則是代表經過 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 處理後每個為點的甲基化的平均值。





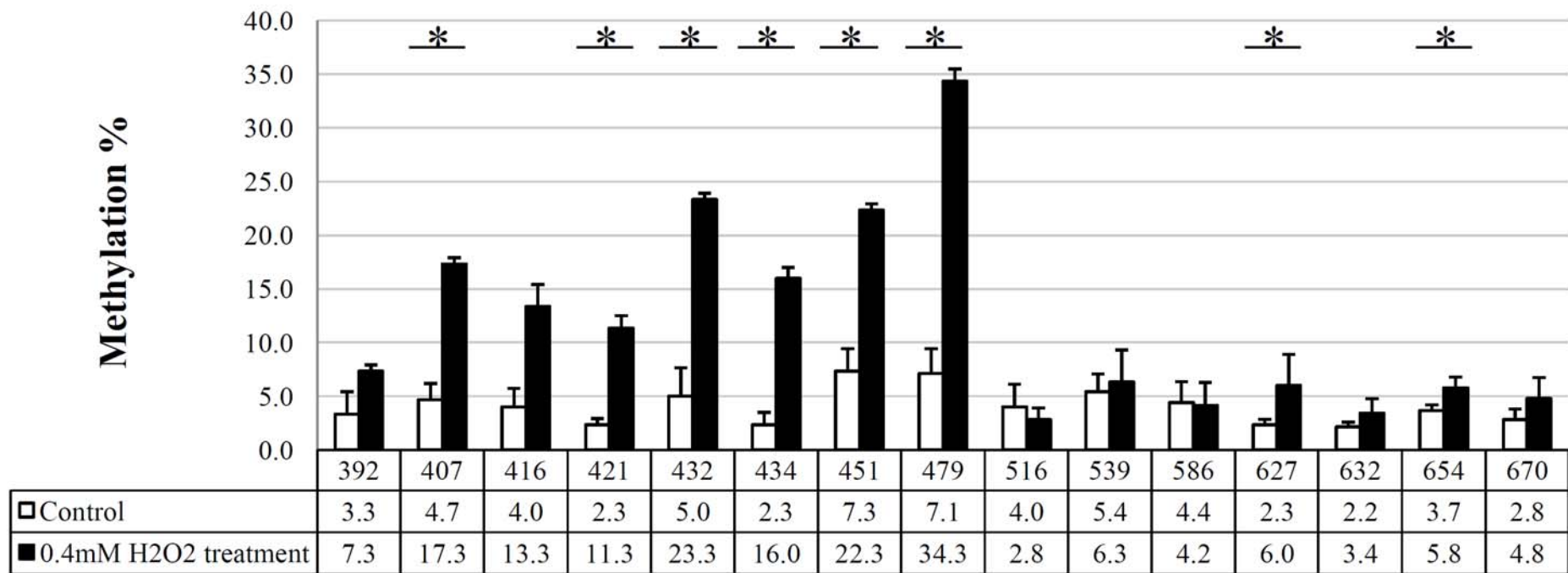
圖八、PC9 細胞 ATP6 區域內所有 CpG 位點甲基化之平均值

圖表資料第一行數字代表 CpG 為點在基因內的相對位置，第二行數字代表未經 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 處理每個位點的甲基化的平均值，第三行數字則是代表經過 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 處理後每個為點的甲基化的平均值，圖中\*表示該位點的 P 值小於 0.05。



圖九、PC9 細胞 ND1 區域內所有 CpG 位點甲基化之平均值

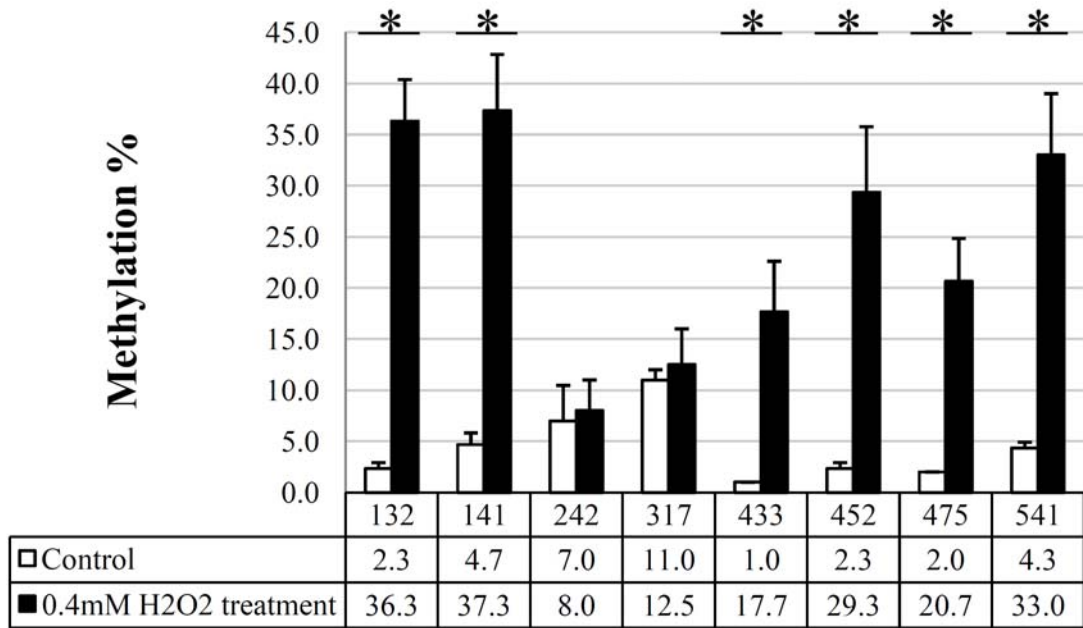
圖表資料第一行數字代表 CpG 為點在基因內的相對位置，第二行數字代表未經 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 處理每個位點的甲基化的平均值，第三行數字則是代表經過 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 處理後每個為點的甲基化的平均值，圖中\*表示該位點的 P 值小於 0.05。



圖十、PC9 細胞 D-loop 區域內所有 CpG 位點甲基化之平均值

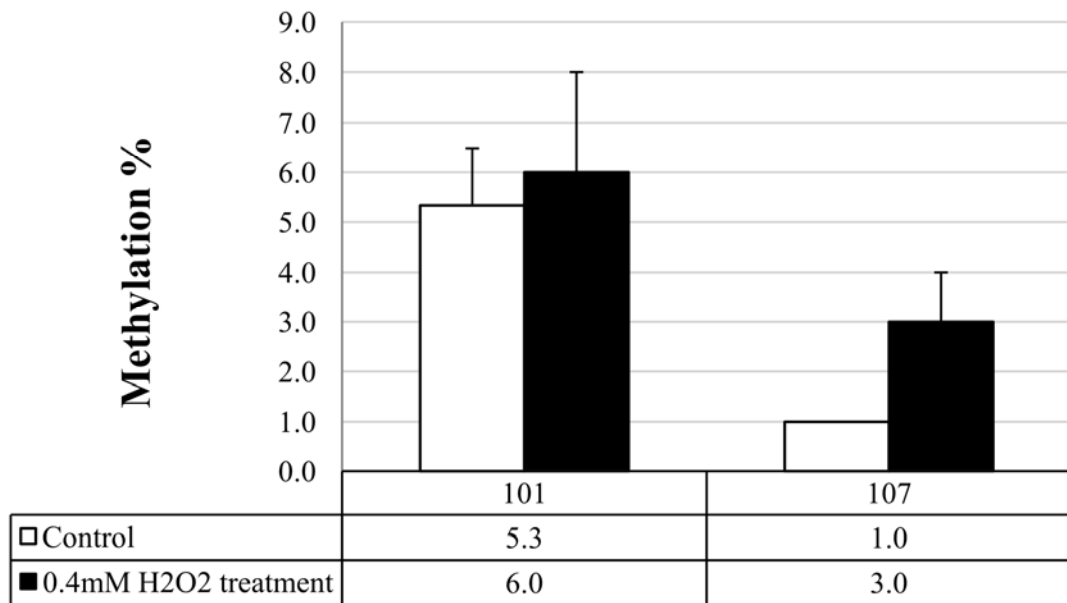
圖表資料第一行數字代表 CpG 為點在基因內的相對位置，第二行數字代表未經 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 處理每個位點的甲基化的平均值，第三行數字則是代表經過 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 處理後每個為點的甲基化的平均值，圖中\*表示該位點的 P 值小於 0.05。





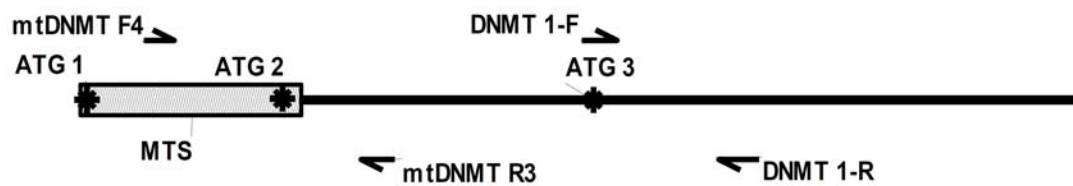
圖十一、PC9 細胞 ND6 區域內所有 CpG 位點甲基化之平均值

圖表資料第一行數字代表 CpG 為點在基因內的相對位置，第二行數字代表未經 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 處理每個位點的甲基化的平均值，第三行數字則是代表經過 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 處理後每個為點的甲基化的平均值，圖中\*表示該位點的 P 值小於 0.05。



圖十二、PC9 細胞 TERM 區域內所有 CpG 位點甲基化之平均值

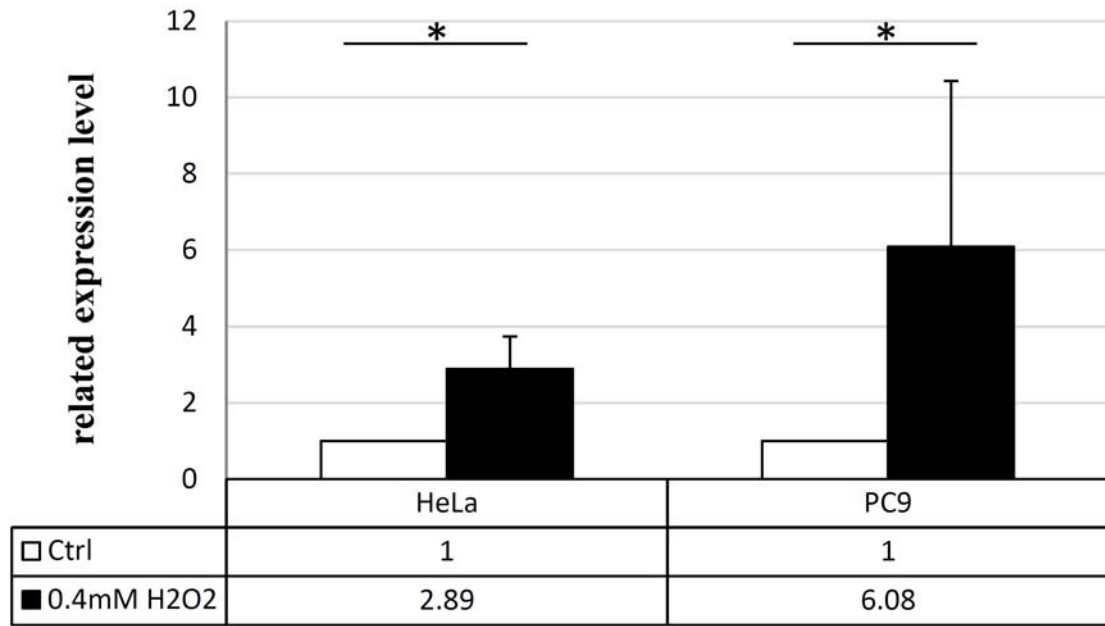
圖表資料第一行數字代表 CpG 為點在基因內的相對位置，第二行數字代表未經 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 處理每個位點的甲基化的平均值，第三行數字則是代表經過 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 處理後每個為點的甲基化的平均值。



圖十三、甲基轉移酶引子示意圖

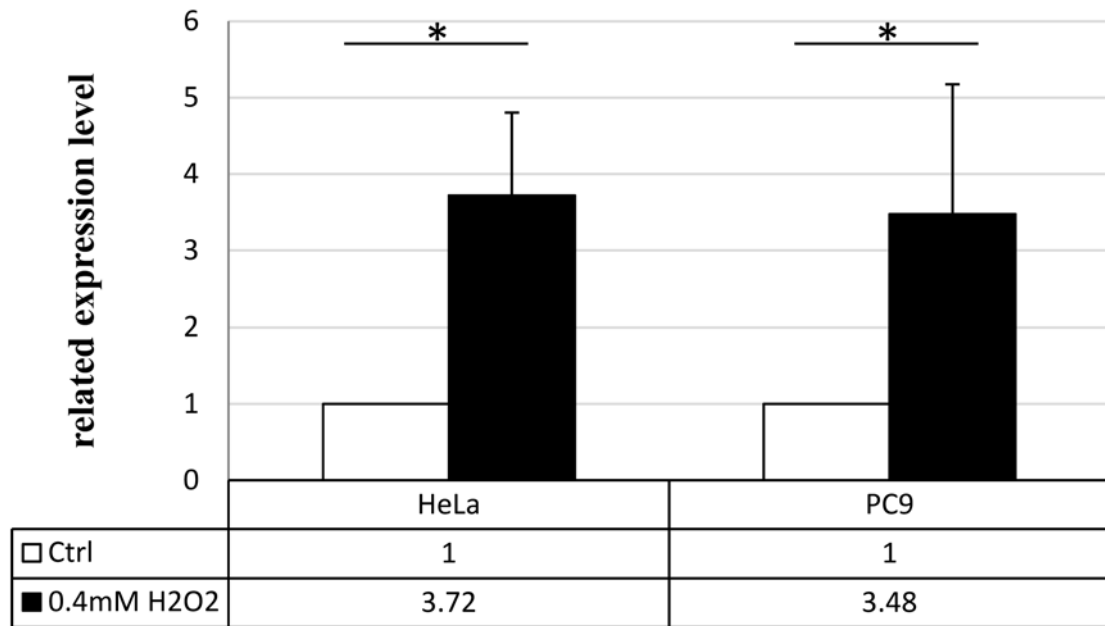
由於 total DNMT 1 與 mtDNMT 1 結構上只差前端的 mtiochondrial targeting sequence (MTS)，因此將 mtDNMT 1 的引子設計在 MTS 與 exon 1 的交界，並涵蓋 ATG 2，提升精準度；而 total DNMT1 則設計在 exon1 與 exon2 的交界。





圖十四、HeLa 與 PC9 total DNMT1 之表現量

利用 real-time 測定 HeLa 與 PC9 在處理 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 前後細胞中 total DNMT1 之表現量。其中以各自未處理 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 之條件為基準，觀察處理 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 後 total DNMT1 表現量之變化。圖中\*表示該位點的 P 值小於 0.05。



圖十五、HeLa 與 PC9 mtDNMT1 之表現量

利用 real-time 測定 HeLa 與 PC9 在處理 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 前後細胞中 mtDNMT1 之表現量。其中以各自未處理 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 之條件為基準，觀察處理 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 後 mtDNMT1 表現量之變化。圖中\*表示該位點的 P 值小於 0.05。

Gene	Increase	not change	Decrease	Total CpG number	
ATP6	2	5	11	18	
	11.1	27.8	61.1	100	%
ND1	6	3	22	31	
	19.4	9.7	71.0	100	%
ND6	3	2	3	8	
	37.5	25.0	37.5	100	%
TERM	2	0	0	2	
	100.0	0.0	0.0	100	%
D-loop	14	0	1	15	
	93.3	0.0	6.7	100	%

表一、HeLa cell 甲基化趨勢統計

表中針對每個測定基因內的所有 CpG 位點做甲基化程度改變的計算，再將結果區分為甲基化上升、不變和下降三種，並計算比例，藉以評估各個基因在氧化壓力後甲基化改變的趨勢。以 50%當作評估的閾值，例如：ATP6，有 18 個 CpG 位點，其中 11 個位點有下降的趨勢，佔所有位點的 61.1%，因此評估 ATP6 整體而言，經過氧化壓力後，甲基化有下降的趨勢。

Gene	Increase	not change	Decrease	Total CpG number	
ATP6	15	1	2	18	
	83.3	5.6	11.1	100	%
ND1	23	0	8	31	
	74.2	0.0	25.8	100	%
ND6	8	0	0	8	
	100.0	0.0	0.0	100	%
TERM	2	0	0	2	
	100.0	0.0	0.0	100	%
D-loop	13	0	2	15	
	86.7	0.0	13.3	100	%

表二、PC9 cell 甲基化趨勢統計

表中針對每個測定基因內的所有 CpG 位點做甲基化程度改變的計算，再將結果區分為甲基化上升、不變和下降三種，並計算比例，藉以評估各個基因在氧化壓力後甲基化改變的趨勢。以 50%當作評估的閾值，例如：ATP6，有 18 個 CpG 位點，其中 15 個位點有上升的趨勢，佔所有位點的 83.3%，因此評估 ATP6 整體而言，經過氧化壓力後，甲基化有上升的趨勢。

Gene	Increase	not change	Decrease	Total CpG number	
ATP6	9	3	6	18	
	50.0	16.7	33.3	100.0	%
ND1	10	6	14	30	
	33.3	20.0	46.7	100.0	%
ND6	2	1	5	8	
	25.0	12.5	62.5	100.0	%
TERM	1	1	0	2	
	50.0	50.0	0.0	100.0	%
D-loop	7	1	7	15	
	46.7	6.7	46.7	100.0	%

表三、比較未處理 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 之 HeLa cell 與 PC9 cell 甲基化的差異

將基因區域內所有的 CpG 位點，以 PC9 cell 減去 HeLa cell 所得的數值做統計，將結果區分為甲基化上升、不變和下降三種，並計算比例，用此比較這兩株細胞在未經任何處理（baseline）的情況下，甲基化程度的差異。



Gene	Increase	not change	Decrease	Total CpG number	
ATP6	16	0	2	18	
	88.9	0.0	11.1	100.0	%
ND1	23	0	8	31	
	74.2	0.0	25.8	100.0	%
ND6	8	0	0	8	
	100.0	0.0	0.0	100.0	%
TERM	1	1	0	2	
	50.0	50.0	0.0	100.0	%
D-loop	14	0	1	15	
	93.3	0.0	6.7	100.0	%

表四、比較處理 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 後 HeLa cell 與 PC9 cell 甲基化的差異

將基因區域內所有的 CpG 位點，以 PC9 cell 減去 HeLa cell 所得的數值做統計，將結果區分為甲基化上升、不變和下降三種，並計算比例，用此比較這兩株細胞在處理 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 後的情況下，甲基化程度的差異。

	ATP6	ND1	ND6	TERM	D-loop
HeLa (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> vs. normal)	↓	↓	—	↑	↑
PC9 (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> vs. normal)	↑	↑	↑	↑	↑
PC9 vs. HeLa (normal)	PC9 ↑	HeLa ↑	HeLa ↑	PC9 ↑	—
PC9 vs. HeLa (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )	PC9 ↑	PC9 ↑	PC9 ↑	PC9 ↑	PC9 ↑

表五、交叉比較 HeLa 與 PC9 在 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 處理前後甲基化改變

將 HeLa 與 PC9 五個基因的甲基化位點之百分比相互比較:第一行為 HeLa cell H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 處理前後，各基因甲基化程度變化；第二行為 PC9 cell H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 處理前後，各基因甲基化程度變化；第三行為比較 HeLa 與 PC9 各基因甲基化在未處理 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 時之高低；第四行為比較 HeLa 與 PC9 各基因甲基化在經 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 處理後之高低。

