

國立臺灣大學醫學院微生物學研究所

微生物及免疫學組

碩士論文

Graduate Institute of Microbiology

College of Medicine

National Taiwan University

Master Thesis

探討FAP-1去磷酸酶對角蛋白8與18的功能性影響

The Functional Effect of Fas-Associated
Phosphatase-1 (FAP-1) on Keratin 8/18 in Hepatocytes

賴亞筠

Ya- Yun Lai

指導教授：葉秀慧 老師

Advisor: Shiou- Hwei Yeh, Ph.D

中華民國 99 年 7 月

July, 2010

國立臺灣大學 (碩) 博士學位論文
口試委員會審定書

中文題目：探討 FAP-1 去磷酸酶對角蛋白 8/18 的
功能性影響

英文題目：The functional effect of Fas-associated
phosphatase -I (FAP-1) on keratin 8/18 in
hepatocytes

本論文係 賴重筠 君 (學號 R97445130) 在國立臺灣大學
微生物學所完成之碩 (博) 士學位論文，於民國 99 年 7 月 30 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：

葉永壽

(簽名)

陳培哲 (指導教授)

吳君泰

系主任、所長

陳小翠

(簽名)

中文摘要

Fas-associated phosphatase-1 (FAP-1) 屬於非受器型酪胺酸去磷酸酶(non-receptor protein tyrosine phosphatase) 的一員，本實驗室先前利用 positional cloning 的方法發現 FAP-1 可能是一個位於 chromosome 4q21-23 上，參與肝癌形成的 putative candidate tumor suppressor gene (TSG)，但目前仍不清楚 FAP-1 在肝癌形成過程中的功能性影響為何。因為 FAP-1 是一個具有多個蛋白質交互作用功能域 (protein-protein interaction domain) 的巨大骨架蛋白(scaffold protein)，因此有可能藉由和肝細胞中特定分子的交互作用進一步發揮其功能性影響。先前實驗室利用 yeast-two hybrid 的方式發現一個與 FAP-1 有交互作用的新蛋白質—角蛋白 18 (Keratin 18)；並發現 FAP-1 會與細胞凋亡時不正常堆疊的角蛋白 18 或 8 有交互作用。因此本論文研究目的為釐清 FAP-1 是否參與不正常堆疊的角蛋白 18 或 8 後續進行降解過程之調控及分子機制。

我們採取的實驗策略是在高度表現 FAP-1 的 HEK293T 細胞株建立一個 artificial system，藉由降低 FAP-1 的表現，並單獨外送角蛋白 18 或 8 製造出不正常堆疊的角蛋白，以利我們探討 FAP-1 如何調控不正常堆疊的角蛋白 18 或 8 進行蛋白質降解。本研究一開始採取 lentivirus- based RNAi 降低 FAP-1 的表現量後，發現角蛋白 18 和 8 的表現量都有增加的現象。進一步利用 cyclohexamide 抑制蛋白質新生後發現 FAP-1 會透過降低角蛋白 18 或 8 的蛋白質穩定度，影響角蛋白 18 或 8 的表現量。接著分別利用 MG132 或 3MA 這兩種蛋白質降解抑制劑的處理，發現不正常堆疊的角蛋白 18 和 8 會經由 proteasome 或 autophagy 進行降解。之後利用 siRNA 降低 FAP-1 的表現量再處理兩種蛋白質降解抑制劑，初步結果顯示 FAP-1 可能參與角蛋白 8 或 18 走向 proteasome 或 autophagy 的蛋白質降解路徑。

有鑑於長時間 lentivirus- based RNAi 和蛋白質降解抑制劑處理，可能會使兩條蛋白質降解路徑發生 cross-talk，讓我們觀察到的是兩條蛋白質降解路徑互相影響

後的 secondary effect。因此接下來我們縮短實驗流程，分析轉染 24 小時內角蛋白 18 和 8 走 proteasome 和 autophagy 降解的情形，實驗結果發現蛋白 18 和 8 進行蛋白質降解的模式不盡相同，蛋白 18 主要走 autophagy 的降解途徑，角蛋白 18 則是兩條蛋白質降解途徑都會走。降低 FAP-1 的表現量後，發現 FAP-1 似乎主要參與調控不正常堆積的角蛋白 18 走向 autophagy 降解，對不正常堆積的角蛋白 8 的降解之影響則相當有限。此結果暗示角蛋白 18 可能藉由與 FAP-1 的專一性交互作用，使其能被帶往 autophagy 降解，走一條與角蛋白 8 不同的 autophagy 降解路徑，這將是我們未來繼續研究的重點。此外目前所有的實驗結果都是來自在 HEK293T 建立的 artificial system，因此未來必須再利用另一個具有高度表現的 FAP-1 以及內生性角蛋白 18 和 8 的 assay system 來驗證此論文之發現，並進一步探討 FAP-1 調控角蛋白進行 autophagy 降解的生理意義。



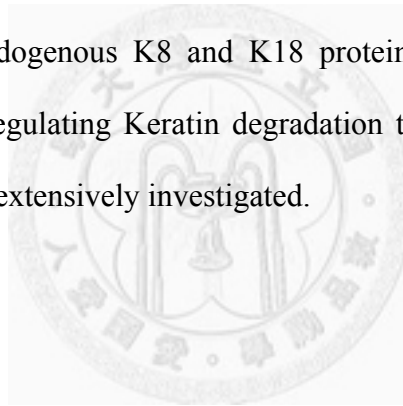
Abstract

Fas-associated phosphatase-1 (FAP-1) is a member of nonreceptor protein tyrosine phosphatase. We previously identified FAP-1 as a putative tumor suppressor gene at chromosome 4q21-23 in hepatocellular carcinoma by positional cloning. However, the functional effect of FAP-1 in hepatocarcinogenesis still remains unknown. FAP-1 is a large scaffold protein with multiple protein-protein interaction domains, we thus hypothesized that FAP-1 could through its association with specific factors to exert its function in hepatocytes. In our previous yeast-two-hybrid analysis, keratin18 was found as a novel interacting protein of FAP-1. Moreover, we found FAP-1 mainly associated with abnormally aggregated keratin18/8 during apoptosis. The specific aim of this study is to study if FAP-1 is involved in the degradation of abnormally aggregated keratin18/8 and the underlying molecular mechanisms.

We approached this by establishing an artificial system using HEK293T cell line, which expresses high level of FAP-1 without endogenous K8/K18 protein expression. We tried to generate the abnormally aggregated K8 or K18 proteins by transfection of K8 or K18 expression construct alone. In this artificial system, knockdown of FAP-1 by lentivirus-based RNAi increased the protein level of both K8 and K18. Aided by cycloheximide treatment, si-FAP-1 could increase the protein stability of K8 and K18, suggesting the involvement of FAP-1 in the degradation of K8 or K18 proteins. The treatment of specific degradation inhibitors of MG132 and 3MA demonstrated that K8 and K18 degraded through both proteasome and autophagy pathways in this assay system. The results of si-FAP1 suggested that FAP-1 might regulate the degradation of K8 and K18 through both degradation pathways.

According to that long-term lenti-virus infection and degradation inhibitor treatment might result in secondary effects caused by a crosstalk between both degradation pathways, we decided to determine degradation kinetics of both keratins through both pathways. The preliminary data showed that K8 might degrade through both proteasome and autophagy pathways while K18 seems to be degraded mainly through autophagy pathway in this artificial system. The results from si-FAP-1 revealed that it might preferentially regulate the degradation of K18 through autophagy but has little effect on the degradation of K8.

All of the current findings are derived from the artificial system in HEK293T cell line, which warrants further confirmation in some other cell lines expressing high level of FAP-1 and also the endogenous K8 and K18 proteins. Moreover, the biological significance of FAP-1 in regulating Keratin degradation through autophagy would be the next issue worthy to be extensively investigated.



目錄

口試委員會審定書.....	ii
中文摘要.....	iii
英文摘要.....	v
目錄.....	vii
序論.....	1
研究目的.....	10
材料及方法.....	12
結果.....	17
I. 在一個 artificial system 探討 FAP-1 對角蛋白 8 或 18 進行蛋白質降解的功能 性影響	
II. 探討 FAP-1 是否會影響角蛋白 18 或 8 的蛋白質穩定度 (protein stability)	
III. 探討不正常堆積的角蛋白 18 或 8 經由哪一條蛋白質降解路徑被分解	
IV. 探討 FAP-1 參與角蛋白 18 或 8 走哪一條蛋白質降解途徑	
V. 探討角蛋白 18 或 8 在不同時間點分別經由 proteasome 和 autophagy 進行 降解的情形	
VI. 探討在短時間的 lenti-virus based RNAi 和蛋白質抑制劑處理下(short- term effect) , FAP-1 參與角蛋白 18 或 8 走哪一條蛋白質降解途徑	
VII. 探討FAP-1專一性調控不正常堆積的角蛋白18走向autophagy降解的可能 機制	
結果討論.....	25
參考文獻.....	30
圖附錄.....	35

序論

肝細胞癌 (Hepatocellular carcinoma, HCC)

HBV(hepatitis B virus) 或HCV(hepatitis C virus)病毒感染後會造成慢性肝炎，數十年後約有三到四成的患者會形成肝硬化，之後再發展成肝癌；此外，酒精性脂肪肝(NAAFLD)、非酒精性肝炎(NASH)、原發性膽汁鬱積性肝硬化(primary biliary cirrhosis)等多種慢性肝臟病病也可能導致肝癌的發生。流行病學的統計報告指出每年約有超過五十萬人罹患肝癌，因此肝癌一直是全球，特別是亞洲地區所關切的健康問題之一[1-2]。

FAP-1的分子結構與功能

蛋白質的酪胺酸磷酸化(protein tyrosine phosphorylation)參與多條訊息傳導路徑，並且調控了生長、分化、代謝等多種重要的細胞生理作用；蛋白質的酪胺酸磷酸化主要由蛋白酪胺酸激酶(protein tyrosine kinase)和酪胺酸去磷酸酶(protein tyrosine phosphatase)這兩種蛋白酵素調控。

Fas-associated phosphatase-1 (FAP-1)屬於非受器型酪胺酸去磷酸酶(non-receptor protein tyrosine phosphatase)的一員，別名PTPN13、PTP-BAS、PTP1E[3]，位於染色體4q21-23的位置上，蛋白質大小為270-KDa。包含四個功能域，從N端開始分別為kinase noncatalytic C-lobe (KIND) domain、band 4.1/ezrin/radixin/moesin homology (FERM) domain、4個重複的postsynaptic density protein-95, discs large, zonula occludens (PDZ) domain，和C端的protein tyrosine phosphatase (PTP) domain[4]。一般認為FAP-1屬於一骨架蛋白(scaffold protein)，藉由不同的功能域與其他蛋白有交互作用，進而調控多種生理功能；事實上多種與FAP-1有交互作用的蛋白已被界定參與了轉錄(transcription)、細胞凋亡(apoptosis)、細胞分裂(cytokinesis)、細胞骨架的構成(cytoskeleton organization)、ephrinB的訊息傳遞等癌

化過程的調控[5]。

就FAP-1參與細胞癌化之可能分子機制，過去有研究指出FAP-1可藉由調控細胞表面Fas的分布，而抑制Fas引發的細胞凋亡[6-7]；但也有研究指出FAP-1可藉由將insulin receptor substrate-1 (IRS-1)去磷酸化，阻斷經由IRS-1/PI3K/Akt訊息傳導路徑引發的細胞生長，並促進乳癌細胞株進行細胞凋亡[8-9]。另外有研究指出FAP-1可將Src激酶(Src family kinases)Tyr419的位點去磷酸化，作為ephrinB的訊息傳遞路徑中的負向調控者，並抑制乳癌細胞的癌化[10-11]；另外在一個針對87個酪胺酸去磷酸酶(protein tyrosine phosphatase)的大規模基因突變分析(mutational analysis)中指出，大腸癌病患的FAP-1易發生體突變(somatic mutation)，突變率約為10%，顯示FAP-1在大腸癌中可能扮演抑癌基因(tumor suppressor gene)的角色。

本實驗室先前試圖利用 positional cloning的方法在一段經常在肝癌組織發生allelic loss的染色體區域—chromosome 4q21-23，尋找可能抑癌基因(tumor suppressor gene)，而後界定出FAP-1是此區域內的putative candidate TSG，實驗室後來的研究結果指出：約有50%肝癌患者的FAP-1 mRNA表現量有顯著的降低，等位基因的喪失(allelic loss)和啟動子甲基化(promoter methylation)可能是造成FAP-1 mRNA表現量降低的原因；此外，FAP-1 cSNP6304的G/G基因型與多發性家族肝癌(mutiplex familial HCC)也有顯著相關，顯示FAP-1可能為一參與肝癌形成的抑癌基因 [12]。但目前對於FAP-1的生理功能，以及FAP-1在肝癌形成過程中的功能性影響為何，仍尚未有清楚的了解。

角蛋白8/18 (keratin 8/18)

真核細胞的細胞骨架由中間絲(intermediate filament)、肌動蛋白(actin)和微管(microtubule)三種蛋白質組成，中間絲為細胞骨架的主要組成，其表現具有組織專一性(tissue specificity)。角蛋白(keratin)屬於中間絲的一種，主要表現在表皮細胞，可分為type I(K9—K20)和 type II(K1—K8)兩型；一般而言，type I和type II角蛋白

會以heterodimer 的形式共價鍵結成中間絲。角蛋白包含三種功能區域，N端和C端分別為head domain和 tail domain，磷酸化(phosphorylation)、糖基化(glycosylation)、羧基化(transglutamination)等多種轉譯後修飾(post-transcriptional modification)主要發生在此；而中央為高度保留的coiled-coil α helical rod domain。

肝細胞的中間絲主要由角蛋白8 (keratin 8)和18 (keratin 18)組成，正常生理狀況下，角蛋白8和18會以1:1的比例存在，成對地形成絲狀構造[13]。最基本的功能為提供物理性的支持(mechanical maintenance)，以維持肝細胞的型態和完整性。此外，角蛋白8和18還可作為壓力蛋白(stress protein)，在肝細胞受到氧化壓力或毒性傷害時，做為phosphate sponge，以減少SAPK(stress-activated protein kinase)對其他受質的過度磷酸化；角蛋白8和18還可藉由影響與其有交互作用的蛋白如14-3-3蛋白，進一步調控訊息傳遞和細胞週期、影響胞器(如:高基氏體)或膜蛋白(如Fas受器)的分布[13-15]。

目前已有多篇研究指出：角蛋白8或18的點突變與許多隱原性肝臟疾病(cryptogenic liver disease)或原發性膽汁鬱積性肝硬化(primary biliary cirrhosis)、猛爆性肝炎(fulminant hepatitis)等非隱原性肝臟疾病的發生有高度相關，是肝臟疾病形成的危險因子[16-17]；肝癌形成過程中也常見到磷酸化的角蛋白8或18有表現量增加的現象[18]；此外，有研究指出：酒精性或非酒精性肝炎等多種肝臟疾病中常見的病理變化Mallory-Denk body，除了有p62蛋白和泛素蛋白(ubiquitin)的累積外，還有高度磷酸化及泛素化的角蛋白8和18，因無法被正常降解，而形成inclusion body，不正常地堆積在肝臟細胞中[19]。

Mallory-Denk body的組成與形成機制

Mallory-Denk body最早是在1911年由Professor Frank B. Mallory在肝細胞中所發現的一種細胞質透明堆積物(cytoplasmic hyaline inclusion)，它是酒精性肝炎(alcoholic steatohepatitis, ASH)和非酒精性肝炎(non-alcoholic steatohepatitis, NASH)

中常見的病理變化，但也可見於肝癌或原發性膽汁鬱積性肝硬化(primary biliary cirrhosis)等多種慢性肝臟疾病[19]。Mallory- Denk body主要由四類蛋白質組成：

(I)角蛋白和經轉譯後修飾的角蛋白：角蛋白8、角蛋白18、高度磷酸化(hyperphosphorylation)或泛素化(ubiquitination)的角蛋白

(II)伴隨蛋白(chaperone)：Hsp70、Hsp90 family、Hsp25 family

(III)參與蛋白質降解的蛋白：ubiquitin、UBB+1、sequestosome-1 (p62)

(IV)其他蛋白：transglutaminase 2、tubulin

當肝細胞受到氧化壓力或毒化物刺激時，角蛋白8和18的表現量會不成比例地增加 (K8>K18)，並且被高度磷酸化或泛素化；此外，transglutaminase 2會被激活，並藉由轉胺作用(transamidation)將角蛋白連結成更大分子的聚合物(aggregate)。p62的表現量也會受氧化壓力而增加，並與泛素化的角蛋白有交互作用，將不正常聚積的角蛋白帶往 proteasome 或 autophagy分解，但當 proteasome的功能不正常或無法負荷過多的大分子聚合物時，p62可能會與不正常堆積的角蛋白形成更大的聚合物，促進 Mallory- Denk body的形成。

Prof. Denk的團隊首先利用 2.5% grideofulvin(GF)餵食小鼠145到194天，建立了第一個Mallory- Denk body的小鼠模式[20]； Prof. Yokko的團隊之後利用 diethyl-1,4-dihydro-2,4,6- trimethyl-3,5-pyridinedicarboxylate (DDC)建立一個更快產生Mallory- Denk body的老鼠模式[21]；之後角蛋白8和18的基因剔除小鼠或基因轉殖小鼠的建立為研究Mallory- Denk body的形成提供了更多訊息，例如過去研究發現DDC不會在角蛋白8基因剔除小鼠中誘發Mallory- Denk body的產生[22]，但卻可誘發角蛋白18基因剔除小鼠產生Mallory- Denk body[23]；此外，將過度表現角蛋白8的基因轉殖鼠餵食DDC後，會使Mallory- Denk body的產生從三個月提前至六週，過度表現角蛋白8的基因轉殖鼠甚至會隨著老化自然產生Mallory- Denk body[24]。以上的研究顯示角蛋白8的表現量大於角蛋白18 (K8>K18)是Mallory- Denk body產生的重要成因。

其他基因轉殖小鼠的建立也為Mallory- Denk body產生的機制提供進一步的資訊，例如有研究發現在小鼠的肝臟條件式剔除參與細胞自噬的重要基因Atg7後，會產生含有泛素的蛋白堆積物[25]；此外，對肝臟細胞株處理蛋白酶體抑制劑 (proteasome inhibitor)會誘發角蛋白堆積物的產生，但處理細胞自噬活化劑 (autophagy activator) —rapamycin後，可減少角蛋白的堆積[26-27]。之後研究更進一步利用過度表現角蛋白8的基因轉殖鼠證明蛋白酶體抑制劑 Bortezomib可誘發Mallory - Denk body類似物的產生，利用rapamycin活化細胞自噬後可有效減少蛋白堆積物的產生[28]。以上的研究顯示細胞自噬是清除Mallory- Denk body等不正常蛋白堆積物的重要機制。

Ubiquitin- proteasome system

Ubiquitin- proteasome system (UPS) 和 macro- autophagy 是細胞中分解物質的兩條途徑，過去認為 UPS 和 autophagy 是兩條獨立且幾乎沒有交互作用分解路徑，因為兩者在本質上有非常大的不同，例如：UPS 對於受質具有專一性 (specificity)，主要是分解半生期短的可溶性蛋白(short- lived soluble protein)，在並且直接在細胞質中進行一系列的酵素催化反應；而 autophagy 沒有受質專一性，可分解胞器、多種蛋白和半生期長的不可溶大分子蛋白 (long- lived bulky protein)，並且需要在特殊的液泡構造 (vesicle trafficking pathway)中進行反應。

UPS 的受質會先經三種酵素的作用，接上泛素(ubiquitin)後，再被送往 proteasome 被分解。此三種酵素分別為 E1 活化酶 (E1 activating enzyme)、E2 結合酶 (E2 conjugating enzyme)和 E3 結合酶 (E3 ligase)；而 proteasome 是一個由 20S 中心複合體 (20S central complex)和兩個 19S 蓋狀複合物 (19S lid complex)組成的桶狀胞器。19S 蓋狀複合物可辨識運送蛋白、移除受質上的泛素 (deubiquitination) 並協助受質進入 20S 中心複合體；而 20S 中心複合體包含有六個水解位點，分別具有不同的蛋白水解活性[29]。

細胞自噬 (autophagy)

細胞自噬(autophagy)是指將細胞質內的養分、老化或受損的胞器、不正常摺疊的蛋白質等大分子受質運往溶小體(lysosome)分解的一個過程，細胞自噬的功能主要有三種：

1. 調控養分和能量的動態平衡 (homeostasis)
2. 維持胞器和胞內蛋白的品質 (quality control)
3. 提供免疫防禦反應 (immune defense)

根據受質與溶小體融合方式的不同可將細胞自噬分為三類 micro- autophagy、chaperone-mediated autophagy 和 macro- autophagy。micro- autophagy 是指溶小體的部分胞膜直接包圍住細胞質內的細胞自噬受質(autophagic substrate)，與溶小體融合後直接被分解[30]；chaperone-mediated autophagy 是由伴隨蛋白(chaperone)辨識某些細胞自噬受質上的五肽結構後 (pentapeptide motif)，將受質送往溶小體分解[31]。macro- autophagy 又可被簡稱為 autophagy，是指細胞內的特殊液泡(vesicle)包圍住含有細胞自噬受質(autophagic substrate)的區域，形成一個 autophagosome 的雙層膜構造後，再與溶小體融合。真核生物細胞在飢餓狀況下可利用 macro- autophagy 分解細胞內含物以維持養分和能量的供給，macro- autophagy 也是細胞用來分解老化胞器或不正常堆疊的蛋白質大分子的主要方式，也是本篇論文探討的重點[32]。

細胞自噬的發生是由一系列的 Atg 基因調控，Atg 基因為 autophagy-related gene 的縮寫，最早在酵母菌中發現，在演化過程中被高度保留，目前已知的 Atg 基因約有三十種。細胞自噬的發生主要可分為三個步驟，分別由不同的 Atg 基因參與其中的調控。

1. vesicle nucleation：phagophore 雙層磷脂膜的初生成
autophagy 會直接受 mTOR 激酶 (mammalian target of rapamycin kinase)的調控，當養分供應不足或是處理藥物 Rapamycin 時，mTOR 激酶會被抑制，進而促進 Atg1、

Atg13 和 Atg17 共同組成的 serine-threonine 激酶複合體(kinase complex)被激活，進而活化 phagophore 雙層磷脂膜的初生成；接著由 class III phosphatidyl inositol 3-phosphate kinases vsp34、vsp 15、Beclin1 和 UVRAG (UV-radiation resistance associated gene)共同組成的脂質激酶附合體(lipid kinase signaling kinase)會聚集到雙層磷脂膜上，進一步調控 phagophore 的生成和延展[33]。

2. vesicle elongation and completion：autophagosome 的形成

兩個類泛素結合系統 (ubiquitin-like conjugation system)會共同調控 phagophore 的延長，使 phagophore 逐漸包圍住細胞質內含有細胞自噬受質(autophagic substrate)的區域，形成一個完整的 autophagosome。此類泛素結合系統分別指 Atg5-Atg12-Atg16 和 Atg8-PE conjugation system，首先 Atg7(E1 activating enzyme)和 Atg10(E2 conjugating enzyme)會促進 Atg5-Atg12-Atg16 複合體的生成，同時 Atg7(E1 activating enzyme)和 Atg3(E2 conjugating enzyme)會促進 LC3 I 與 PE (phosphatidylethanolamine)結合，Atg5-Atg12-Atg16 複合體再促進 LC3 I-PE 嵌上逐漸延展的 phagophore 雙層磷脂膜，最後形成一個完整的 autophagosome。LC3 (microtubule-associated protein 1A/B light chain 3)為酵母菌 Atg8 在哺乳類的同源基因 (homolog)，以兩種同型蛋白(isoform)存在，分別是與 PE 結合的 LC3 I 和鑲嵌在 phagophore 雙層磷脂膜上的 LC3 II。autophagosome 形成後，位於外膜上的 LC3 II 會被 Atg4B 蛋白酶切除，釋放到細胞質中再被回收利用，因此 LC3-I 和 II 可做為細胞自噬過程中的標記物 (indicator)[34-36]。

3. docking and fusion with lysosome：autophagosome 與 lysosome 融合

autophagosome 可能在細胞質的任何位置形成，有研究指出 autophagosome 可能藉由細胞骨架的微小管(microtubulin)和運動蛋白(dynein)將 autophagosome 送往靠近細胞核的位置[37-38]，並在 class C Vps 複合物、Rab7 和 Rab11 的參與下與溶小體融合[39-40]，形成 autolysosome，並由溶小體水解酶(lysosome hydrolase)將細胞自噬受質分解。

p62 和 NBR1

p62/A170/SQSTM1 最早被報導為一個 p56^{lck} Src homolog 2 功能域 (SH2 domain)上一個與磷酸化酪胺酸無關的配體(phosphotyrosine-independent ligand)，同時也被報導為與非典型蛋白激酶 C ζ (atypical protein kinase C ζ) 的有交互作用的蛋白[41-42]。p62 蛋白包含五種功能域，從 N 端到 C 端依序為 PB1 功能域 (Phox and Bem1p domain)、ZZ 功能域 (zinc finger)、TB 功能域 (TRAF6 binding site)、LIR 功能域 (microtubule-associated protein light chain 3 (LC3)- interacting region) 和 UBA 功能域 (ubiquitin-associated domain)。N 端的 PB1 功能域除了與 MEK、ERK 和 aPKC ζ 蛋白激酶有交互作用外，也與 p62 的自體聚合(self oligomerization)有關；C 端的 UBA 功能域可與泛素化蛋白(ubiquitinated protein)結合，再藉由前端的 LIR 功能域與 phagophore 雙層磷脂膜上的 LC3 II 結合，同時扮演泛素受器(ubiquitin receptor)和運輸蛋白 (shuttle protein)的角色，將泛素化蛋白送往 autophagosome 生成的區域後，p62 和其所攜帶的泛素蛋白再進一步在 autolysosome 中被分解；此外，p62 也是細胞自噬的專一性受質 (specific substrate)，當細胞自噬受抑制或 p62 的 LIR 功能域被突變時，p62 會顯著累積，並與其受質蛋白共同形成堆積體(inclusion body)[43-44]。過去研究發現：在細胞自噬基因剔除鼠或果蠅常會發現含有 p62 的泛素化蛋白累積[45-46]，在許多人類疾病中常見的泛素化蛋白累積物，如帕金森氏症(Parkinson's disease)的 Lewy bodies、阿茲海默症(Alzheimer disease)的 neurofibrillary tangles、亨丁頓舞蹈症(Huntingtin disease)的 Huntingtin aggregates 和酒精性及非酒精性肝炎(alcoholic and nonalcoholic steatohepatitis)的 Mallory bodies 中，也可發現 p62 的存在[46]。

NBR1最早被報導為一個子宮頸癌抗原CA125的基因[47]，其N端為PB1功能域 (Phox and Bem1p domain)，C端帶有LIR功能域 (microtubule-associated protein light chain 3 (LC3)- interacting region) 和UBA功能域 (ubiquitin-associated domain)，與 p62的功能域有高度的相似性；UBA功能域可與泛素化蛋白(ubiquitinated protein)

結合，再藉由前端的LIR功能域與phagophore雙層磷脂膜上的LC3 II結合，將泛素化蛋白送往autophagosome分解。NBR1本身除了會自體聚合(self oligomerization)外，還會與p62有直接的交互作用，本身也是細胞自噬的專一性受質 (specific substrate)，與p62的功能極為類似[48-49]。



研究目的

先前本實驗室的研究發現FAP-1的表現量在肝癌組織有顯著的下降，並提供基因層面的證據證明FAP-1在肝癌形成過程中可能扮演抑癌基因(tumor suppressor gene)的角色，但對於FAP-1在肝細胞的生理性功能，以及FAP-1降低對肝癌形成過程的功能性影響為何，仍尚未有清楚的了解。

因為FAP-1是一個具有多個蛋白質交互作用功能域 (protein-protein interaction domain)的巨大骨架蛋白(scaffold protein)，目前對於FAP-1功能的了解大部分是來自與其有交互作用的蛋白質，因此我們假設FAP-1可能藉由和肝細胞中特定分子 (specific factor)的交互作用進一步發揮其功能性影響。因此實驗室利用yeast-two hybrid的方式發現一個與FAP-1的exon7有交互作用的新蛋白質—角蛋白18 (Keratin-18)。角蛋白8和18是肝臟細胞骨架的主要組成，可提供肝細胞物理性的支持，並保護肝臟細胞抵抗外來壓力；在酒精性肝炎等多種慢性肝病中常見的特殊堆積體 Mallory- Denk body，主要是由不正常堆積的ubiquitinated角蛋白8和18組成之inclusion body，並有K8>K18不成比例的增加的現象，目前已知這些ubiquitinated角蛋白8和18是因為無法順利被降解而形成不正常的堆積，但對於Mallory-Denk body形成的機制、為何ubiquitinated的角蛋白8和18無法被順利降解，以及造成K8>K18的分子機制仍尚未有清楚的了解。

因此本篇論文主要將探討FAP-1是否有可能透過與角蛋白18的交互作用，調控角蛋白18的表現量，進而影響肝細胞的功能，甚至進一步探討FAP-1參與Mallory-Denk body形成以及參與調控造成K8>K18的imbalance之可能性。

本篇論文的研究內容主要包含以下三項

1. 探討FAP-1調控何種形式的角蛋白8 / 18，以及對角蛋白8 / 18表現量的影響
2. 探討FAP-1調控角蛋白8 / 18表現量的分子機制

3. 探討FAP-1透過調控角蛋白8 / 18表現量，進一步影響Mallory-Denk body形成的可能性



材料和方法

實驗試劑

Lipofectamin™ 2000 (Invitrogen Corp.)

DNA/RNA extraction kit (Viogene)

Genopure Plasmid Maxi kit (Roche, UK, Lewes)

Luria Broth and Terrifix Broth (Nio Basix INC)

Cycloheximide (Sigma-Aldrich)

MG132 (Z-Leu-Leu-Leu-al) (Sigma-Aldrich)

3-Methyladenine (Sigma-Aldrich)

Rapamycin (Sigma-Aldrich)

一級抗體

Rabbit anti- FAP-1 (H-300, Santa Cruz, CA, USA) 1 : 400

Rabbit anti-Keratin 8 (GeneTex, Inc.) 1 : 1000

Rabbit anti-Keratin 18 (Epitomics, CA, USA) 1 : 5000

Rabbit anti-p62 (H-290, Santa Cruz, CA, USA) 1 : 1000

Rabbit anti-LC3 (NB100-2220, Novus, USA) 1 : 1000

Rabbit anti-ubiquitin (DAKO, Denmark) 1 : 1000

Mouse anti-βcatenin

Mouse anti-βactin (Sigma, St. Louis, MO, USA) 1 : 2000

二級抗體

Donkey anti-rabbit (Amersham Bioscience, Piscataway, NJ) 1 : 2000

Donkey anti-rabbit (Amersham Bioscience, Piscataway, NJ) 1 : 2000

RNA 萃取 (RNA extraction)

以10cm培養皿為例，以1ml REzol (Protech)刮下細胞至離心小管後，於室溫作用5分鐘，再加入200 μ l氯仿(choloroform)，搖晃15秒後靜置在室溫2~3分鐘，再以13000rpm於4 $^{\circ}$ C離心15分鐘。取出上清液至新的離心小管後，加入等量異丙醇(isopropanol)，於-80 $^{\circ}$ C作用30分鐘以上，再以13000rpm於4 $^{\circ}$ C離心30分鐘，移除上清液，留下RNA沉澱物。之後加入1ml 75%酒精，以13000rpm於4 $^{\circ}$ C離心5分鐘後，移除上清液，風乾RNA沉澱物，最後加入DEPC水，置於50 $^{\circ}$ C水浴10分鐘以回溶RNA沉澱物，並將RNA儲存於-80 $^{\circ}$ C。

定量聚合酶連鎖反應 (Quantitative RT-PCR)

先利用SuperScriptTM III First-Strand Synthesis System (Invitrogen)將RNA反轉錄成cDNA後，再以 LightCycler FastStart DNA SYBR Green kit (Roche Applied Science)將1 μ l cDNA、0.5mol/L primer F/R、2mmol/L MgCl₂、1 μ l FastStart SYBR Master Mix和ddH₂O配製成10 μ l的樣本混合液，最後利用LightCycler thermal cycler對FAP-1的mRNA表現量進行分析，並以PBGD (porphobilinogen deaminase)做為internal control。

FAP-1 F primer : 5'-TGATTCATTCTCCACGGTTGCTG-3'

FAP-1 R primer : 5'-TCGCAGTCTGTATCTTCTGTTCTC-3'

PBGD F primer : 5'-CATGAAGATGGCCCTGAGGAT-3'

PBGD R primer : 5'-GGCATCTGTGCCCCACAAACCAG-3'

Mode		temperature	cycle	time
Pre-incubation		95 $^{\circ}$ C	1	10min
Amplification	denaturation	95 $^{\circ}$ C	45	10s

	annealing	59°C		5s
	extention	72°C		18s
	fluorescence detection	79°C		0s (single)
Melting curve	denaturation	95°C	1	0s
	annealing	60°C		15s
	fluorescence detection	95°C		0s (continunous)
Cooling		40°C	1	30s

細胞轉染 (transfection)

將細胞培養液換成只含10%胎牛血清的DMEM培養液，再依建議用量將DNA質體加入opti-MEM 培養液，另外再依建議用量將Lipofectamin™ 2000 (Invitrogen Corp.)加入opti-MEM 培養液，靜置五分鐘後，與前述的DNA質體培養液混和，靜置20分鐘後，再均勻地將混合液加入細胞，4到6小時後將培養液換成新的DMEM培養液。

質體轉形與製備 (transformation and plasmid extraction)

從-80°C取出DH5 α 勝任細胞 (competent cell) (益生公司)後，加入100ng質體DNA，靜置冰上30分鐘後，再放到42°C水浴槽進行 heat shock45秒；之後快速置於冰上1到2分鐘，再加入200 μ l LB混合均勻，並置於37°C震盪培養45分鐘，最後取出20 μ l菌液均勻塗抹在含有特定抗生素的LB洋菜膠培養皿上，於37°C培養16~18小時後，挑選轉形成成功的單一菌落至含有特定抗生素的3ml LB培養液，於37°C培養12~14小時後，利用DNA extraction kit (Viogene)小量純化出質體DNA；最後再將菌液轉移至含有特定抗生素的200ml LB培養液，利用Genopure Plasmid Maxi kit大量純化出質體DNA。

蛋白質萃取及定量 (Protein extraction and quantitation)

用PBS將細胞清洗兩次後，加入適量的 8M urea，將細胞從培養皿上刮下後靜置於冰上30分鐘，再利用超音波(sonication)進一步分解細胞均質液(強度 2，10次)。之後利用BCA™ Protein Assay Kit (Pierce, Rockford, IL)進行蛋白質定量，將濃度為2、1、0.5、0.25、0.125、0μg/μl的牛血清白蛋白標準液(bovine serum albumin, BSA)以及細胞均質液分別取 10μl放入96孔微孔盤，再加入200μl的混合試劑 (試劑A：試劑B=49：1)，置於37°C作用30分鐘後，用Gen5 Elisa reader偵測吸收波長540nm下吸光質。利用牛血清白蛋白標準液的吸光質做出標準蛋白濃度曲線(standard curve)後，在以內插法求得細胞均質液的蛋白質濃度。

SDS—PAGE蛋白質膠體電泳

將蛋白質樣本與4倍的sample buffer混合均勻後，置於100°C加熱板上加熱10分鐘，再利用SDS—PAGE(sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis)，在running buffer中依序以50、80、100、120volt的電壓將蛋白質分離。

西方墨點法 (Western blotting)

將0.45μM Nitrocellulose membrane纖維轉印膜 (Amersham Biosciences)裁成7×9cm的大小後浸潤於轉印緩衝液中 (transger buffer)，接著在轉印卡夾中依序放上多孔性海綿、濾紙、SDS-PAGE蛋白質膠體以及浸潤的纖維轉印膜，最後蓋上濾紙和多孔性海綿。將卡夾綁緊後放置入裝有轉印緩衝液的轉印槽，以4°C、100volt轉印100分鐘後，將轉印膜取出，浸泡在 blocking buffer (5% skim milk in TBST buffer)中30分鐘。

之後將適當稀釋過的一級抗體配在blocking buffer中，與轉印膜在4°C進行隔夜反應，隔天利用TBST buffer潤洗轉印膜30分鐘，再將適當稀釋過的二級抗體配在blocking buffer中，與轉印膜在室溫下反應1小時，同樣在用TBST buffer潤洗轉印膜

30分鐘，之後加入ECL (enhanced chemiluminescence, Amersham)呈色試劑，再以底片偵測蛋白表現量。

RNAi病毒製備與感染 (RNAi virus package and infection)

將293FT細胞培養至六至七成滿後，以Lipofectamin™ 2000 (Invitrogen Corp.) 進行細胞轉染，以10cm培養皿為例，先將細胞培養液換成只含10%胎牛血清的DMEM培養液(加入5ml)，再將4μg pLKO.1-shRNA vector、4μg pcDNA-DR8.91和0.4μg pMDG加入500μl opti-MEM 培養液，另外取 21μl Lipofectamin™ 2000放入500μl opti-MEM 培養液，靜置五分鐘後，與前述的DNA質體培養液混和，靜置20分鐘後，再均勻地將混合液加入細胞，4到6小時後將培養液換成新鮮的DMEM培養液。轉染後24小時收取第一次病毒培養液，取出4ml病毒培養液，在4°C以3000rpm離心10分鐘後取出上清液保存於-80°C，另外再補充4ml新鮮的DMEM培養液置細胞培養皿，轉染後48和72小時再依同樣方式收取第二和第三次病毒培養液。

siFAP-1(clone no. 2889)：

5'-CCGGGCCACGGTCTATTCTTACTAACTCGAGTTAGTAAGAATAGACCGTGGCTTTTT-3'

將三次收取的病毒培養液混和後，對細胞進行感染，以6 well培養皿為例，每個well加入1ml的病毒培養液和 8μg/ml polybrene，感染24小時後換成新鮮的DMEM培養液，並在感染72小時內收取細胞均質液做後續的分析。

研究結果

FAP-1 藉由其 N 端功能域與角蛋白 18 有交互作用

先前實驗室的研究發現 FAP-1 的在肝癌形成過程中可能扮演抑癌基因的角色，之後擴大樣本數後進一步確認 FAP-1 在 cancer phase 的 mRNA 表現量較 precancer phase 有顯著的降低，並且 FAP-1 在 cancer phase 表現量的下降並沒有性別或是 B 型肝炎或 C 型肝炎病毒感染性的 significant 差異。

接下來我們想進一步探討 FAP-1 在肝細胞的功能性影響為何，因為 FAP-1 是一個具有多個蛋白質交互作用功能域 (protein-protein interaction domain) 的巨大骨架蛋白(scaffold protein)，目前對於 FAP-1 功能的了解大部分是來自與其有交互作用的蛋白質，因此我們假設 FAP-1 可能藉由和肝細胞中特殊分子(specific factor)的交互作用進一步發揮其功能性影響。因此先前實驗室利用 yeast-two hybrid 的方式，以 FAP-1 N 端 a.a.1087-1795 的區域(包含 exon7 和前後各涵蓋一部分 exon6 和 exon8)為餌，對肝臟的 cDNA library 進行 screening 後發現一個會與 FAP-1 有交互作用的新蛋白質—角蛋白 18 (圖一)。

FAP-1 會與不正常堆疊的角蛋白 8/18 有交互作用

角蛋白 8 和 18 是肝臟細胞骨架的主要組成，正常的生理狀況下角蛋白 8 和 18 會以一比一的方式形成完整的絲狀架構 (filament conformation)，或是在有絲分裂 (mitosis) 時被磷酸化，絲狀架構暫時瓦解成聚集狀的角蛋白 (disassembled form)，一旦細胞完成有絲分裂，角蛋白 8 和 18 會再次形成完整的絲狀架構，此為正常生理狀況下一個可逆的過程 (reversible phenomena)。但在不正常的病理狀態下，如酒精性肝炎，或是發生細胞凋亡 (apoptosis) 時，中間絲的絲狀架構會瓦解，角蛋白 8 和 18 會形成不正常的堆疊 (abnormal aggregation)，此為病理狀況下一個不可逆的過

程(irreversible phenomena)。為了探討 FAP-1 與角蛋白 8/18 的交互作用有何功能性影響，我們必須先了解 FAP-1 是與何種形式的角蛋白 8/18 有交互作用。角蛋白 8/18 可能形式有：

- 正常生理狀況下的絲狀架構
- 正常生理狀況下，細胞進行有絲分裂時呈聚集狀的角蛋白
- 病理狀況下，如誘發細胞凋零時呈聚集狀的角蛋白

為了釐清這個問題，先前實驗室在 PLC5 肝癌細胞株送入 flag-FAP-1 後，分別使細胞處於正常生理狀況下以維持角蛋白 8/18 的絲狀架構、或是處理 nocodazol 使細胞停留在有絲分裂期，或是以 doxorubicin 誘發細胞凋零，之後分別以不同的螢光標定 FAP-1(標定在 anti-flag 的抗體上)和角蛋白 18，再利用共軛焦顯微鏡(confocal microscopy)的方法分析。結果發現：FAP-1 不會與正常生理狀況下的絲狀角蛋白 8/18 有交互作用(圖二 A)，也不會與有絲分裂時聚集的角蛋白 8/18 有交互作用(圖二 B)；但是將 PLC5 處理 doxorubicin 以誘發細胞凋零後，FAP-1 會與不正常堆疊的角蛋白 8/18 有交互作用(圖二 C)；因此我們發現 FAP-1 會與不正常堆疊的角蛋白 8/18 有交互作用。

I. 在一個 artificial system 探討 FAP-1 對角蛋白 8 或 18 進行蛋白質降解的功能性影響

目前已知當細胞受到 apoptosis 等壓力時，不正常堆疊的角蛋白 18 和 8 會被高度泛素化，並被送往蛋白質降解路徑進一步被降解；既然我們發現 FAP-1 會與不正常堆疊的角蛋白 8/18 有交互作用，接下來我們想探討 FAP-1 對這些不正常堆積的角蛋白 18 或 8 有何影響；我們提出的假設是：FAP-1 主要的影響可能在於角蛋白形成不正常堆疊後被送往蛋白質降解的過程。雖然先前的實驗結果指出 FAP-1 只與角蛋白 18 有直接的交互作用，但因肝臟細胞的角蛋白 8 和 18 是以一比一的方式形成網狀的中間絲細胞骨架，所以我們會同時探討 FAP-1 對角蛋白 8 和 18 的

功能性影響。

我們使用的實驗策略是在高度表現 FAP-1 且沒有內生性的角蛋白 8 和 18 的 artificial system 中製造出不正常堆疊的角蛋白 8 或 18，再利用 loss of function 的方式降低 FAP-1 的表現量，以觀察 FAP-1 對不正常存在的角蛋白 8 或 18 的影響。因此我們選用有高度 FAP-1 表現量的 HEK293T 細胞株，利用 lenti-virus based RNAi 的方式降低 FAP-1 表現量後，再單獨外送角蛋白 8 或 18 以製造出不正常堆疊的角蛋白，以觀察 FAP-1 對不正常堆疊的角蛋白 8 或 K18 的影響。我們以含有 si-LacZ 或 si-FAP-1 的病毒液感染 HEK293T 細胞 72 小時後，再外送角蛋白 8 或 18，經過 24 小時後，觀察 FAP-1 對角蛋白 8 或 18 表現量的影響。結果發現 si-FAP-1 後，角蛋白 8 和 18 的蛋白質表現量都有明顯的上升(圖三)。

II. 探討 FAP-1 是否會影響角蛋白 18 或 8 的蛋白質穩定度 (protein stability)

接下來我們想進一步探討 FAP-1 所造成角蛋白 8 或 18 蛋白量之增加是否經由影響其蛋白質穩定度(protein stability)之可能性。我們先以含有 si-LacZ 或 si-FAP-1 的病毒液感染 HEK293T 細胞 72 小時後，再外送角蛋白 8 或 18，經過 24 小時後，處理 20mg/mL cyclohexamide 抑制蛋白質的新生，並分別在 0、1、2、3、4、5、6 個小時萃取出細胞，觀察 FAP-1 對角蛋白 8 或 18 蛋白質降解速度的影響，並訂出角蛋白 8 或 18 蛋白質的半衰期。實驗結果發現：FAP-1 存在時，角蛋白 18 在一個小時內就有約 50% 的蛋白質被降解，半衰期約小於一小時(圖四 A)；但當 si-FAP-1 後，角蛋白 18 的半衰期延長至 6 小時以上；在外送角蛋白 8 並給予相同處理下的那組，也是觀察到同樣的結果(圖四 B)，當 FAP-1 存在時，角蛋白 8 易進行降解；但當 FAP-1 表現量降低時，角蛋白 8 較能穩定表現。實驗結果顯示 FAP-1 會透過降低角蛋白 8 或 18 的蛋白質穩定度，影響角蛋白 8 或 18 的表現量。

III. 探討不正常堆積的角蛋白 18 或 8 經由哪一條蛋白質降解路徑被分解

接下來要釐清的問題是 FAP-1 如何降低角蛋白 8 或 18 的蛋白質穩定度，為了探討 FAP-1 對不正常堆積的角蛋白進行降解的影響，我們希望先探討在此 artificial system 下不正常存在的角蛋白 8 或 18 會走哪一個蛋白質降解途徑。

目前已知的兩種蛋白質降解途徑為 proteasome 和 autophagy，所以我們使用的實驗策略是在 HEK293T 細胞單獨外送角蛋白 8 或 18，在質體轉染 6 小時後，分別處理 proteasome inhibitor—MG132 和 autophagy inhibitor—3MA，18 個小時後萃取細胞蛋白質，觀察角蛋白 8 或 18 的表現量。我們希望角蛋白 8 或 18 開始表現後，立即分別處理兩種蛋白質降解路徑的抑制劑，藉由觀察角蛋白 8 或 18 的累積量了解角蛋白 8 或 18 分別是走那一哪蛋白質降解途徑。實驗結果發現：分別處理 proteasome inhibitor—MG132 和 autophagy inhibitor—3MA 後，角蛋白 18 都約有四倍的累積(圖五 A)；外送角蛋白 8 的那組也是觀察到相同的結果(圖五 B)。實驗結果顯示不正常堆疊的角蛋白 8 或 18 會走 proteasome，同時也會走 autophagy 降解，並且是等量地經由這兩條途徑降解蛋白質。

IV. 探討 FAP-1 參與角蛋白 18 或 8 走哪一條蛋白質降解途徑

接著我們想進一步探討 FAP-1 是否藉由促使角蛋白 8 或 18 走向 proteasome 或 autophagy 的蛋白質降解路徑，進而降低角蛋白 8 或 18 的蛋白質穩定度。我們設計實驗之策略邏輯如下：是若 FAP-1 會促使角蛋白 8 或 18 走向 proteasome 的蛋白質降解路徑，si-FAP-1 後再處理 proteasome inhibitor MG132，不會再使角蛋白 18 或 8 有更顯著的累積。同樣的對於 autophagy 的蛋白質降解路徑亦然，若 FAP-1 會促使角蛋白 8 或 18 走向 autophagy 的蛋白質降解路徑，si-FAP-1 後再處理 autophagy inhibitor，不會再使角蛋白 18 或 8 有更顯著的累積。

因此我們先以含有 si-LacZ 或 si-FAP-1 的病毒液感染 HEK293T 細胞 72 小時後，再外送角蛋白 8 或 18，在質體轉染 6 小時後，分別處理 proteasome inhibitor—MG132 和 autophagy inhibitor—3MA，18 個小時後，觀察角蛋白 8 或 18 的表現

量是否有更顯著的累積。實驗結果發現：和對照組 si-LacZ 相比，si-FAP-1 再處理 autophagy inhibitor 後，角蛋白 18 的表現量只有些微的增加(約為 1.2 倍)(圖六 A，lane4 和 lane7)，顯示 FAP-1 可能會促使角蛋白 18 走向 autophagy 的蛋白質降解路徑。但 si-FAP-1 再處理 proteasome inhibitor 後，角蛋白 18 的表現量卻有 50% 的降低(圖六 A，lane3 和 lane6) 表示 FAP-1 的功能可能不在促進角蛋白 18 走向 proteasome 的蛋白質降解路徑。同樣的實驗流程下也在角蛋白 8 那組觀察到類似的結果(圖六 B)。上述初步的實驗結果顯示 si-FAP-1 可同時抑制角蛋白 18 和 8 走向 autophagy 的蛋白質降解路徑，因此 FAP-1 的功能可能在於促進角蛋白 18 和 8 走向 autophagy 的蛋白質降解路徑

但上述的實驗結果顯示一個有趣的現象是：si-FAP-1 再處理 proteasome inhibitor 後，角蛋白 18 和 8 的表現量反而會下降，這可能是 proteasome 和 autophagy 兩條蛋白質降解途徑會互相影響(cross-talk)的結果。事實上，過去的研究已知 proteasome 和 autophagy 這兩條蛋白質降解途徑會互相影響(cross-talk)，也有多篇研究指出當細胞自噬(autophagy)被長時間抑制時，會影響原來走 proteasome 的受質進行降解的過程[50-52]。對於 si-FAP-1 再處理 proteasome inhibitor 後，角蛋白 18 和角蛋白 8 的表現量反而會減少的現象，我們提出的可能解釋是：我們是在 si-FAP-1 96 小時後才萃取細胞蛋白質做分析，si-FAP-1 的作用相當於抑制細胞自噬，所以我們看到的現象可能是長時間抑制細胞自噬後，進一步抑制了角蛋白 18 和角蛋白 8 走 proteasome 進行降解的過程。

V. 探討角蛋白 18 或 8 在不同時間點分別經由 proteasome 和 autophagy 進行降解的情形

從前述的實驗結果得知 FAP-1 可能促進角蛋白 18 和角蛋白 8 走向 autophagy 的蛋白質降解路徑，但因 proteasome 和 autophagy 這兩條蛋白質降解途徑會互相影響(cross-talk)，長時間抑制細胞自噬也會影響受質走 proteasome 進行降解的過程，

我們之前看到的結果可能是兩條蛋白質降解路徑互相影響後的 secondary effect。因此接下來我們企圖利用縮短實驗流程，希望在兩條蛋白質降解路徑互相影響前，觀察 FAP-1 對角蛋白 18 或角蛋白 8 的功能性影響。首先我們想探討不正常堆積的角蛋白 8 或 18 在不同時間點下分別走 proteasome 和 autophagy pathway 進行降解的情形，找到兩條蛋白質降解路徑互相影響前的時間點，再進一步探討 FAP-1 參與角蛋白 8 或 18 走哪一條蛋白質降解途徑。

為此，我們所採取之實驗策略為在 HEK293T 細胞以 10:1 的比例外送角蛋白 8 和 GFP-p62 或是角蛋白 18 和 GFP-p62 (以 GFP-p62 的蛋白質表現量反映細胞自噬的進行)，在質體轉染 10 小時後，分別處理 proteasome inhibitor—MG132 和 autophagy inhibitor—3MA，並在 1、2、4、8、12 和 16 個小時後萃取細胞蛋白質，藉由觀察角蛋白 8 或 18 的累積量以了解角蛋白 8 或 18 於此 artificial system 內，在不同時間點下走哪一條蛋白質降解途徑。實驗結果顯示：處理 MG132 或 3MA 8 小時後，不正常的蛋白 18 開始走 autophagy 進行降解，直到 12 小時仍是維持相同的降解方式，但 16 小時後開始有部分角蛋白 18 走 proteasome，但仍是以 autophagy 為主(圖七 A)；但對角蛋白 8 這組處理 MG132 或 3MA 8 小時後，有一部分角蛋白 8 走 proteasome 進行降解，有另外較大一部分角蛋白 8 走 autophagy 進行降解，直到 12 小時仍是維持相同的降解方式，但 16 小時後變成會等量地走這兩條蛋白質降解途徑(圖七 B)。從上述的實驗結果得知：不正常堆積的角蛋白 8 或 18 於此 artificial system 被降解的方式並不相同，在處理蛋白質降解抑制劑 12 個小時前，角蛋白 18 只會走 autophagy，而角蛋白 8 則是兩條蛋白質降解途徑都會走。

VI. 探討在短時間的 lenti-virus based RNAi 和蛋白質抑制劑處理下(short-term effect)，FAP-1 參與角蛋白 18 或 8 走哪一條蛋白質降解途徑

為了在兩條蛋白質降解途徑互相影響並造成 secondary effect 前，清楚地釐清 FAP-1 如何影響角蛋白 18 和 8 進行蛋白質降解，我們將實驗流程修改為：質體轉

染 10 小時後處理 proteasome inhibitor—MG132 或 autophagy inhibitor—3MA，12 小時後即萃取細胞的蛋白質做分析；我們除了縮短 MG-132 和 3MA 的處理時間，也試圖縮短 lenti-si-FAP-1 的作用時間，以避免長時間抑制蛋白質降解途徑造成的 secondary effect 會影響我們的判讀。

我們先以含有 si-LacZ 或 si-FAP-1 的病毒液感染 HEK293T 細胞 24 小時後，再以 10:1 的比例外送角蛋白 8 和 GFP-p62 或是角蛋白 18 和 GFP-p62，在質體轉染 10 小時後分別處理 MG132 或 3MA，12 小時後即萃取細胞的蛋白質做分析。實驗結果顯示：在 si-LacZ 並分別處理 MG132 或 3MA 後，不正常堆積的角蛋白 18 主要是走 autophagy 進行降解；與對照組 si-LacZ 相比，si-FAP-1 後角蛋白 18 的表現量約有 2 倍的上升(圖八 A, lane1 和 lane5)，但在處理 autophagy inhibitor 的這組，與對照組 si-LacZ 相比時，si-FAP-1 後角蛋白 18 的表現量和並沒有更明顯的增加(lane3 和 lane7)，即 si-FAP-1 的效用與 autophagy inhibitor 是相同的，表示 FAP-1 會促使不正常的角蛋白 18 走向 autophagy 分解。外送角蛋白 8 的那組在相同的實驗流程下，si-LacZ 時，不正常堆積的角蛋白 8 會等量的走兩條蛋白質降解途徑；而與對照組 si-LacZ 相比，si-FAP-1 並不會使角蛋白 8 的表現量上升(圖八 B, lane1 和 lane5)，此外，si-FAP-1 也不會影響 GFP-p62 的表現量；上述的實驗結果顯示：短時間 lenti-virus based RNAi 和蛋白質抑制劑的處理可排除 secondary effect 的影響，在此實驗流程下，FAP-1 只會專一性地調控不正常堆積的角蛋白 18 走向 autophagy 降解，FAP-1 並不會調控不正常堆積的角蛋白 8 和 GFP-p62。

VII. 探討 FAP-1 專一性調控不正常堆積的角蛋白 18 走向 autophagy 降解的可能機制

過去的研究指出高度泛素化的大分子蛋白可能經由兩種方式被帶往細胞自噬發生的位置，一是透過與 p62 的交互作用被帶往 autophagosome 形成的位置，另一種方式是經由 HDAC6 和 actin 形成的細胞骨架被帶往微管形成中心 (MTOC)：

microtubule organizing center)，並在此與lysosome融合成autolysosome。接下來我們想先了解不正常堆積的角蛋白18或8是透過何種方式被帶往細胞自噬發生的位置，我們採取的實驗策略是在HEK293T細胞以10:1的比例外送角蛋白18和GFP-p62，並以10:1的角蛋白18和vector做為對照組(角蛋白8也依相同的比例轉染)；GFP-p62除了可反映細胞自噬的進行外，還可做為受質與細胞自噬之間的傳輸蛋白(shuttle protein)，因此我們可藉由外送過量的p62，促進經由此方式進行細胞自噬的受質被降解。在質體轉染10小時後，分別將細胞處理autophagy activator—Rapamycin或 autophagy inhibitor—3MA 12小時後即萃取細胞蛋白質做分析。實驗結果顯示：和對照組相比，外送過量的p62對角蛋白18走autophagy的降解路徑並沒有明顯影響(圖九 A，lane1和lane4)，但卻可促進角蛋白8走autophagy的降解路徑(圖九 B，lane1和lane4)。此外，處理autophagy activator—Rapamycin後可促使p62走autophagy，卻無法促使角蛋白18走autophagy(圖九 A，lane2和lane5)，但可同時促進角蛋白8走autophagy降解(圖九 B，lane2和lane5)；表示角蛋白8和p62會以相同的方式走向autophagy進行降解，但角蛋白18則是以另一種p62-independent的方式走向autophagy。

上述的實驗結果可為FAP-1如何專一性地調控不正常堆積的角蛋白18走向autophagy降解提供可能的解釋，我們推測角蛋白8可能藉由p62被帶往autophagy進行降解，而角蛋白18則可能透過另一條途徑—HDAC6被帶往autophagy降解；我們已知在短時間的實驗流程下，FAP-1只會專一性地調控不正常堆積的角蛋白18，並不會影響角蛋白8和p62的表現量，因此我們推測FAP-1可能參與在HDAC6將角蛋白18帶往autophagy降解的過程。

結果討論

實驗室先前的研究指出 FAP-1 在肝癌形成過程中可能扮演抑癌基因的角色，並且發現肝臟細胞骨架組成分之一的角蛋白 18 是與 FAP-1 有交互作用的一個新蛋白質，因此本論文的研究目的在於：探討 FAP-1 如何透過對角蛋白 18 的調控進一步發揮其對肝細胞的功能性影響。因為角蛋白 18 和 8 是肝臟細胞骨架主要的中間絲(intermediate filament)組成，兩種角蛋白會以 heterodimer 的方式鍵結，共同維持肝細胞的完整性，並提供物理性的支持保護，以及非物理性的訊息傳導功能。因此我們同時針對角蛋白 18 和 8 進行研究，本論文的研究主題在於探討 FAP-1 是否專一性地調控角蛋白 18，但同時會以角蛋白 8 做為控制組，以利我們了解角蛋白 18 和 8 在本質上是否受到不同的調控，未來或許可幫助我們釐清 Mallory- Denk body 過程中角蛋白 18 和 8 不成比例增加(K8>K18)的分子機制。

本研究一開始的實驗策略是採取較長的 lentivirus- based RNAi 感染時間和 overnight 的蛋白質降解抑制劑處理，初步的實驗結果發現：利用 siRNA 降低 FAP-1 的表現量後，角蛋白 18 和 8 的表現量都有增加的現象；我們進一步利用 cyclohexamide 抑制蛋白新生後發現：FAP-1 會透過降低角蛋白 18 或 8 的蛋白質穩定度，影響角蛋白 18 或 8 的表現量；接著我們再分別利用 MG132 或 3MA 這兩種蛋白質降解抑制劑的處理後發現：不正常堆疊的角蛋白 18 和 8 會等量的經由 proteasome 或 autophagy 進行降解。之後我們利用 siRNA 降低 FAP-1 的表現量再處理兩種蛋白質降解抑制劑，以釐清 FAP-1 參與角蛋白 8 或 18 走哪一條蛋白質降解途徑。si-FAP-1 再處理 proteasome inhibitor 後，角蛋白 18 和角蛋白 8 的表現量反而會減少的現象，表示 FAP-1 的功能不在促進角蛋白 18 或 8 走向 proteasome 的蛋白質降解路徑，但 si-FAP-1 再處理 autophagy inhibitor 後，角蛋白 18 和 8 的表現量有些微的增加，表示 FAP-1 可能會促使角蛋白 18 走向 autophagy 的蛋白質降解

路徑。而 si-FAP-1 再處理 proteasome inhibitor 後角蛋白 18 和 8 表現量減少的原因可能是：長時間 lentivirus- based RNAi 和 overnight 的蛋白質降解抑制劑處理，會過度抑制 autophagy，進而抑制角蛋白 18 和角蛋白 8 走 proteasome 的進行降解的過程，我們觀察到的結果可能是兩條蛋白質降解路徑互相影響後的 secondary effect。因此接下來我們會縮短實驗流程，避免只觀察到 end-point 的結果，並且希望抓到一個兩條蛋白質降解路徑發生 cross-talk 前的時間，以利我們了解 FAP-1 如何參與在角蛋白 18 或 8 進行蛋白質降解的途徑，甚至探討 FAP-1 是否專一性地調控角蛋白 18 進行蛋白質降解。

因此接下來我們縮短在 24 小時內觀察角蛋白 18 和 8 走 proteasome 和 autophagy 降解的情形，實驗結果發現蛋白 18 和 8 進行蛋白質降解的模式並不相同，在蛋白質降解抑制劑處理 12 個小時之前，蛋白 18 只會走 autophagy，角蛋白 18 則是兩條蛋白質降解途徑都會走；但蛋白質降解抑制劑處理 16 個小時之後，角蛋白 18 和 8 會幾乎等量地走 proteasome 和 autophagy 進行降解。之後我們用縮短 lentivirus- based RNAi 的感染時間，並在質體轉染 10 小時後分別處理 MG132 或 3MA，12 小時後即萃取細胞的蛋白質做分析；在這樣較短時間的實驗流程下發現：FAP-1 只會專一性地調控不正常堆積的角蛋白 18 走向 autophagy 降解，FAP-1 並不會調控不正常堆積的角蛋白 8 和 GFP-p62。進一步藉由外送過量的 p62，促進經由此方式進行細胞自噬的受質被降解的實驗策略發現：外送過量的 p62 會促進角蛋白 8 走 autophagy 的降解路徑，此外，給予 Rapamycin 刺激 autophagy 後皆可促進角蛋白 8 和 p62 走 autophagy 降解；但外送過量的 p62 或處理 Rapamycin 並無法促進角蛋白 18 走 autophagy 降解，表示角蛋白 8 和 p62 會以相同的方式走向 autophagy，但角蛋白 18 則是以另一種 p62- independent 的方式走向 autophagy 降解。因此我們推測角蛋白 8 可能藉由 p62 被帶往 autophagy 進行降解，而角蛋白 18 則可能透過另一條途徑—HDAC6，被帶往 autophagy 降解。因此在短時間的實驗流程下，初步的實驗結果顯示：FAP-1 只會專一性地調控不正常堆積的角蛋白 18，並不會影響角蛋白 8 和 p62 的表現量，因此我們推測 FAP-1 可能參

與在HDAC6將角蛋白18帶往autophagy降解的過程。此結果與實驗室先前利用yeast-two hybrid發現FAP-1只會與角蛋白18有直接的交互作用相呼應，暗示角蛋白18可能藉由與FAP-1的專一性交互作用，使其能被HDAC6帶往autophagy降解，走一條與角蛋白8和p62不同的autophagy降解路徑。

HDAC6(histone deacetylase 6) 是一種非典型的組蛋白去乙酰基酵素(non-canonical histone deacetylase)，主要分布在細胞質，先前的研究指出HDAC6與微管(microtubule)和肌動蛋白(actin)這兩種細胞骨架有交互作用，與細胞運動(cell motility)的調控有關[53-54]；此外HDAC6 C端的BUZ功能域還會與高度泛素化的蛋白有交互作用，並同時藉由C端與dynein的交互作用，攜帶高度泛素化的蛋白在微管細胞骨架(microtubule)上運輸，並將之帶往MTOC (microtubule -organizing center)，形成聚積體(aggresome)，之後再經由細胞自噬被分解[55-56]；最近還有研究指出HDAC6可調控autophagosome與lysosome融合過程[57]，顯示HDAC6是細胞自噬的一個重要調控因子。

目前所有的實驗結果都來自在HEK293T建立的artificial system，有一個關鍵性的問題是這樣的調控機制是否也會在in vivo存在，因此未來我們必須再利用另一個具有高度表現的FAP-1以及內生性角蛋白18和8的assay system來驗證我們的發現。我們預期仍可在這樣的assay system下觀察到FAP-1對內生性角蛋白表現量18和8的影響，我們還可以利用doxorubicin 誘發細胞凋零，使角蛋白18和8形成不正常的堆疊，以利我們更清楚地看到FAP-1對角蛋白18和8的影響。

未來我們希望探討的問題可分為兩個方向：

一、FAP-1調控角蛋白18進行autophagy降解的分子機制為何

首先我們可利用藥物或siRNA的方式降低HDAC6的表現，以探討HDAC6是否參與在FAP-1調控角蛋白18進行autophagy降解的過程；接下來我們還可藉由siRNA降低FAP-1的表現量後，觀察其他經由HDAC6帶往autophagy的受質是否受到影響，以幫助我們釐清FAP-1是否只專一性地調控角蛋白18走向autophagy降解的過

程。

先前的研究曾指出FAP-1是一個巨大的骨架蛋白，其FERM功能域與肌動蛋白(Actin)有交互作用[58]，與FAP-1的PDZ2功能域有交互作用的APC、RIL和Trip6/ZRP-1蛋白也與了肌動蛋白和微管(microtubule)的調控有關[4]。此外，在HDAC6將不正常堆積的蛋白質帶往autophagy降解的過程，有多種細胞骨架蛋白參與其中，因此我們推測FAP-1極有可能參與在HDAC6將角蛋白18帶往autophagy降解的過程。未來我們還可以探討FAP-1與HDAC6間是否有交互作用，以及藉由外送FAP-1的dominant negative mutant，進一步了解FAP-1的去磷酸酶活性對於其功能的重要性。

二、FAP-1調控角蛋白18進行autophagy降解生理的意義為何(biological significance)

Mallory- Denk body是多種慢性肝臟疾病中常見的病理現象，目前對於Mallory-Denk body形成的分子機制仍未有清楚的了解，只是在Mallory- Denk body中觀察到角蛋白18和8不成比例增加(K8 > K18)以及有伴隨蛋白(chaperone)、泛素(ubiquitin)和p62等蛋白不正常的累積。我們初步的實驗結果發現FAP-1可專一性調控角蛋白18走autophagy進行降解，表示FAP-1存在下只會使不正常堆積的角蛋白18被順利降解，進一步造成角蛋白18和8不成比例的累積(K8 > K18)，因此我們推測FAP-1有可能是參與調控Mallory- Denk body的形成。

實驗室之前的研究發現FAP-1與發炎反應有高度的相關性，目前又已知Mallory-Denk body常見於酒精性肝炎，因此我們推測FAP-1的表現量在發炎的肝臟組織可能有上升的現象，而FAP-1可促進角蛋白18的降解，造成角蛋白18和8不成比例的累積(K8 > K18)，進一步影響Mallory- Denk body的形成。因此未來我們希望找數對酒精性肝炎的臨床檢體，我們預期在這些檢體中觀察到有Mallory- Denk body的形成，以及FAP-1高度表現的現象，為我們提供FAP-1與Mallory- Denk body之間的clinical association。

之前實驗室已利用餵食小鼠DDC (3,5-diethoxycarbonyl-1,4-dihydrocollidine)，

成功地建立Mallory- Denk body的動物模式(animal model)，未來我們或許可以利用FAP-1 knockout mice進一步探討FAP-1參與在Mallory- Denk body形成的可能性；若將FAP-1 knockout mice餵食DDC後並無Mallory- Denk bod被誘導產生，即可證明FAP-1是Mallory- Denk body形成過程中的一個重要調控因子。



參考文獻

- [1] D. M. Parkin, *et al.*, "Estimating the world cancer burden: Globocan 2000," *Int J Cancer*, vol. 94, pp. 153-6, Oct 15 2001.
- [2] C. J. Chen, *et al.*, "Epidemiological characteristics and risk factors of hepatocellular carcinoma," *J Gastroenterol Hepatol*, vol. 12, pp. S294-308, Oct 1997.
- [3] T. Sato, *et al.*, "FAP-1: a protein tyrosine phosphatase that associates with Fas," *Science*, vol. 268, pp. 411-5, Apr 21 1995.
- [4] K. S. Erdmann, "The protein tyrosine phosphatase PTP-Basophil/Basophil-like. Interacting proteins and molecular functions," *Eur J Biochem*, vol. 270, pp. 4789-98, Dec 2003.
- [5] O. D. Abaan and J. A. Toretsky, "PTPL1: a large phosphatase with a split personality," *Cancer Metastasis Rev*, vol. 27, pp. 205-14, Jun 2008.
- [6] V. N. Ivanov, *et al.*, "FAP-1 association with Fas (Apo-1) inhibits Fas expression on the cell surface," *Mol Cell Biol*, vol. 23, pp. 3623-35, May 2003.
- [7] V. N. Ivanov, *et al.*, "Opposite roles of FAP-1 and dynamin in the regulation of Fas (CD95) translocation to the cell surface and susceptibility to Fas ligand-mediated apoptosis," *J Biol Chem*, vol. 281, pp. 1840-52, Jan 20 2006.
- [8] G. Bompard, *et al.*, "Protein-tyrosine phosphatase PTPL1/FAP-1 triggers apoptosis in human breast cancer cells," *J Biol Chem*, vol. 277, pp. 47861-9, Dec 6 2002.
- [9] M. Dromard, *et al.*, "The putative tumor suppressor gene PTPN13/PTPL1 induces apoptosis through insulin receptor substrate-1 dephosphorylation," *Cancer Res*, vol. 67, pp. 6806-13, Jul 15 2007.
- [10] A. Palmer, *et al.*, "EphrinB phosphorylation and reverse signaling: regulation by Src kinases and PTP-BL phosphatase," *Mol Cell*, vol. 9, pp. 725-37, Apr 2002.
- [11] M. Glondu-Lassis, *et al.*, "PTPL1/PTPN13 regulates breast cancer cell aggressiveness through direct inactivation of Src kinase," *Cancer Res*, vol. 70, pp. 5116-26, Jun 15 2010.
- [12] S. H. Yeh, *et al.*, "Genetic characterization of fas-associated phosphatase-1 as a putative tumor suppressor gene on chromosome 4q21.3 in hepatocellular carcinoma," *Clin Cancer Res*, vol. 12, pp. 1097-108, Feb 15 2006.
- [13] P. Strnad, *et al.*, "Intermediate filament cytoskeleton of the liver in health and disease," *Histochem Cell Biol*, vol. 129, pp. 735-49, Jun 2008.
- [14] M. B. Omary, *et al.*, "Keratins: guardians of the liver," *Hepatology*, vol. 35, pp.

- 251-7, Feb 2002.
- [15] P. A. Coulombe and M. B. Omary, "'Hard' and 'soft' principles defining the structure, function and regulation of keratin intermediate filaments," *Curr Opin Cell Biol*, vol. 14, pp. 110-22, Feb 2002.
- [16] N. O. Ku, *et al.*, "Keratin 8 mutations in patients with cryptogenic liver disease," *N Engl J Med*, vol. 344, pp. 1580-7, May 24 2001.
- [17] N. O. Ku, *et al.*, "Keratin 8 and 18 mutations are risk factors for developing liver disease of multiple etiologies," *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 100, pp. 6063-8, May 13 2003.
- [18] D. M. Toivola, *et al.*, "Keratin 8 and 18 hyperphosphorylation is a marker of progression of human liver disease," *Hepatology*, vol. 40, pp. 459-66, Aug 2004.
- [19] N. O. Ku, *et al.*, "Keratins let liver live: Mutations predispose to liver disease and crosslinking generates Mallory-Denk bodies," *Hepatology*, vol. 46, pp. 1639-49, Nov 2007.
- [20] H. Denk, *et al.*, "Hepatocellular hyalin (Mallory bodies) in long term griseofulvin-treated mice: a new experimental model for the study of hyalin formation," *Lab Invest*, vol. 32, pp. 773-6, Jun 1975.
- [21] H. Yokoo, *et al.*, "Experimental production of Mallory bodies in mice by diet containing 3,5-diethoxycarbonyl-1,4-dihydrocollidine," *Gastroenterology*, vol. 83, pp. 109-13, Jul 1982.
- [22] K. Zatloukal, *et al.*, "Cytokeratin 8 protects from hepatotoxicity, and its ratio to cytokeratin 18 determines the ability of hepatocytes to form Mallory bodies," *Am J Pathol*, vol. 156, pp. 1263-74, Apr 2000.
- [23] T. M. Magin, *et al.*, "Lessons from keratin 18 knockout mice: formation of novel keratin filaments, secondary loss of keratin 7 and accumulation of liver-specific keratin 8-positive aggregates," *J Cell Biol*, vol. 140, pp. 1441-51, Mar 23 1998.
- [24] I. Nakamichi, *et al.*, "Keratin 8 overexpression promotes mouse Mallory body formation," *J Cell Biol*, vol. 171, pp. 931-7, Dec 19 2005.
- [25] M. Komatsu, *et al.*, "Impairment of starvation-induced and constitutive autophagy in Atg7-deficient mice," *J Cell Biol*, vol. 169, pp. 425-34, May 9 2005.
- [26] M. Harada, *et al.*, "Proteasome inhibition induces inclusion bodies associated with intermediate filaments and fragmentation of the Golgi apparatus," *Exp Cell Res*, vol. 288, pp. 60-9, Aug 1 2003.
- [27] M. Harada, *et al.*, "Autophagy modulates keratin-containing inclusion formation and apoptosis in cell culture in a context-dependent fashion," *Exp Cell Res*, vol. 314, pp. 1753-64, May 1 2008.
- [28] M. Harada, *et al.*, "Autophagy activation by rapamycin eliminates mouse

- Mallory-Denk bodies and blocks their proteasome inhibitor-mediated formation," *Hepatology*, vol. 47, pp. 2026-35, Jun 2008.
- [29] S. Elsasser and D. Finley, "Delivery of ubiquitinated substrates to protein-unfolding machines," *Nat Cell Biol*, vol. 7, pp. 742-9, Aug 2005.
- [30] Z. Xie and D. J. Klionsky, "Autophagosome formation: core machinery and adaptations," *Nat Cell Biol*, vol. 9, pp. 1102-9, Oct 2007.
- [31] A. C. Massey, *et al.*, "Chaperone-mediated autophagy in aging and disease," *Curr Top Dev Biol*, vol. 73, pp. 205-35, 2006.
- [32] N. Mizushima, *et al.*, "Autophagy fights disease through cellular self-digestion," *Nature*, vol. 451, pp. 1069-75, Feb 28 2008.
- [33] A. Simonsen and S. A. Tooze, "Coordination of membrane events during autophagy by multiple class III PI3-kinase complexes," *J Cell Biol*, vol. 186, pp. 773-82, Sep 21 2009.
- [34] T. Hanada, *et al.*, "The Atg12-Atg5 conjugate has a novel E3-like activity for protein lipidation in autophagy," *J Biol Chem*, vol. 282, pp. 37298-302, Dec 28 2007.
- [35] N. Fujita, *et al.*, "The Atg16L complex specifies the site of LC3 lipidation for membrane biogenesis in autophagy," *Mol Biol Cell*, vol. 19, pp. 2092-100, May 2008.
- [36] H. Nakatogawa, *et al.*, "Atg8, a ubiquitin-like protein required for autophagosome formation, mediates membrane tethering and hemifusion," *Cell*, vol. 130, pp. 165-78, Jul 13 2007.
- [37] S. Kimura, *et al.*, "Dynein-dependent movement of autophagosomes mediates efficient encounters with lysosomes," *Cell Struct Funct*, vol. 33, pp. 109-22, 2008.
- [38] E. Fass, *et al.*, "Microtubules support production of starvation-induced autophagosomes but not their targeting and fusion with lysosomes," *J Biol Chem*, vol. 281, pp. 36303-16, Nov 24 2006.
- [39] C. Liang, *et al.*, "Beclin1-binding UVRAG targets the class C Vps complex to coordinate autophagosome maturation and endocytic trafficking," *Nat Cell Biol*, vol. 10, pp. 776-87, Jul 2008.
- [40] M. G. Gutierrez, *et al.*, "Rab7 is required for the normal progression of the autophagic pathway in mammalian cells," *J Cell Sci*, vol. 117, pp. 2687-97, Jun 1 2004.
- [41] A. Puls, *et al.*, "Interaction of protein kinase C zeta with ZIP, a novel protein kinase C-binding protein," *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 94, pp. 6191-6, Jun 10 1997.
- [42] P. Sanchez, *et al.*, "Localization of atypical protein kinase C isoforms into

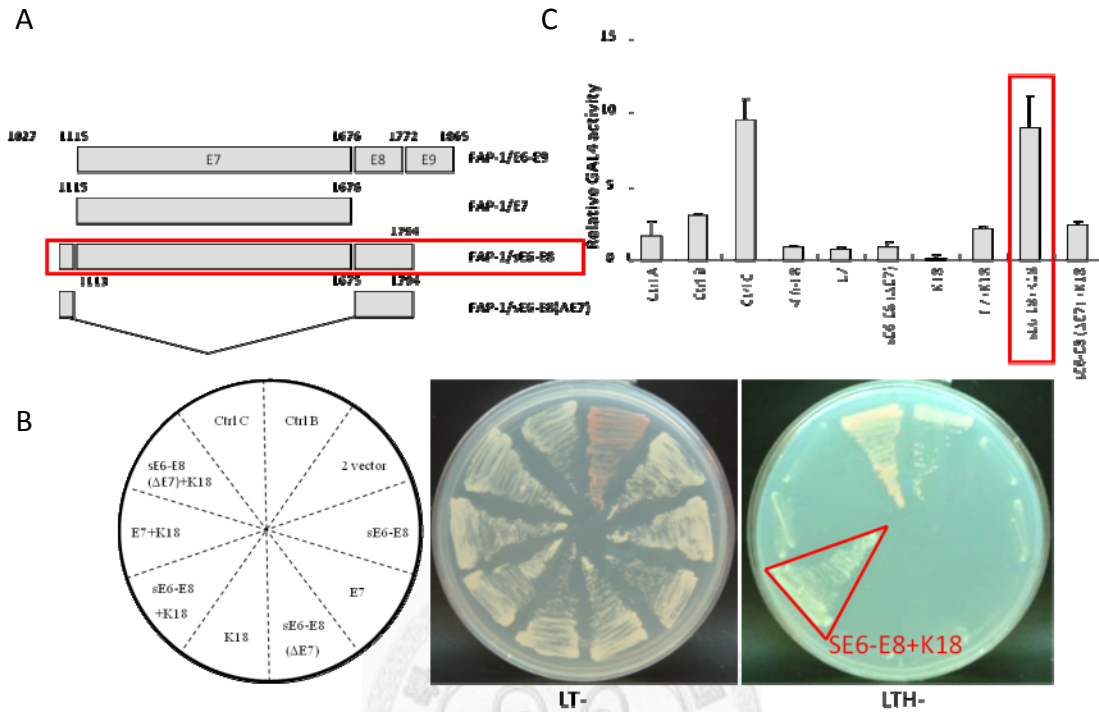
- lysosome-targeted endosomes through interaction with p62," *Mol Cell Biol*, vol. 18, pp. 3069-80, May 1998.
- [43] S. Pankiv, *et al.*, "p62/SQSTM1 binds directly to Atg8/LC3 to facilitate degradation of ubiquitinated protein aggregates by autophagy," *J Biol Chem*, vol. 282, pp. 24131-45, Aug 17 2007.
- [44] G. Bjorkoy, *et al.*, "p62/SQSTM1 forms protein aggregates degraded by autophagy and has a protective effect on huntingtin-induced cell death," *J Cell Biol*, vol. 171, pp. 603-14, Nov 21 2005.
- [45] I. P. Nezis, *et al.*, "Ref(2)P, the *Drosophila melanogaster* homologue of mammalian p62, is required for the formation of protein aggregates in adult brain," *J Cell Biol*, vol. 180, pp. 1065-71, Mar 24 2008.
- [46] M. Komatsu, *et al.*, "Homeostatic levels of p62 control cytoplasmic inclusion body formation in autophagy-deficient mice," *Cell*, vol. 131, pp. 1149-63, Dec 14 2007.
- [47] I. G. Campbell, *et al.*, "A novel gene encoding a B-box protein within the BRCA1 region at 17q21.1," *Hum Mol Genet*, vol. 3, pp. 589-94, Apr 1994.
- [48] V. Kirkin, *et al.*, "A role for NBR1 in autophagosomal degradation of ubiquitinated substrates," *Mol Cell*, vol. 33, pp. 505-16, Feb 27 2009.
- [49] T. Lamark, *et al.*, "NBR1 and p62 as cargo receptors for selective autophagy of ubiquitinated targets," *Cell Cycle*, vol. 8, pp. 1986-90, Jul 1 2009.
- [50] L. Qiao and J. Zhang, "Inhibition of lysosomal functions reduces proteasomal activity," *Neurosci Lett*, vol. 456, pp. 15-9, May 29 2009.
- [51] V. I. Korolchuk, *et al.*, "Autophagy inhibition compromises degradation of ubiquitin-proteasome pathway substrates," *Mol Cell*, vol. 33, pp. 517-27, Feb 27 2009.
- [52] V. I. Korolchuk, *et al.*, "A novel link between autophagy and the ubiquitin-proteasome system," *Autophagy*, vol. 5, pp. 862-3, Aug 2009.
- [53] Y. S. Gao, *et al.*, "Histone deacetylase 6 regulates growth factor-induced actin remodeling and endocytosis," *Mol Cell Biol*, vol. 27, pp. 8637-47, Dec 2007.
- [54] X. Zhang, *et al.*, "HDAC6 modulates cell motility by altering the acetylation level of cortactin," *Mol Cell*, vol. 27, pp. 197-213, Jul 20 2007.
- [55] A. Iwata, *et al.*, "HDAC6 and microtubules are required for autophagic degradation of aggregated huntingtin," *J Biol Chem*, vol. 280, pp. 40282-92, Dec 2 2005.
- [56] Y. Kawaguchi, *et al.*, "The deacetylase HDAC6 regulates aggresome formation and cell viability in response to misfolded protein stress," *Cell*, vol. 115, pp. 727-38, Dec 12 2003.
- [57] J. Y. Lee, *et al.*, "HDAC6 controls autophagosome maturation essential for

ubiquitin-selective quality-control autophagy," EMBO J, vol. 29, pp. 969-80, Mar 3 2010.

- [58] L. Herrmann, et al., "The protein tyrosine phosphatase PTP-BL associates with the midbody and is involved in the regulation of cytokinesis," Mol Biol Cell, vol. 14, pp. 230-40, Jan 2003.

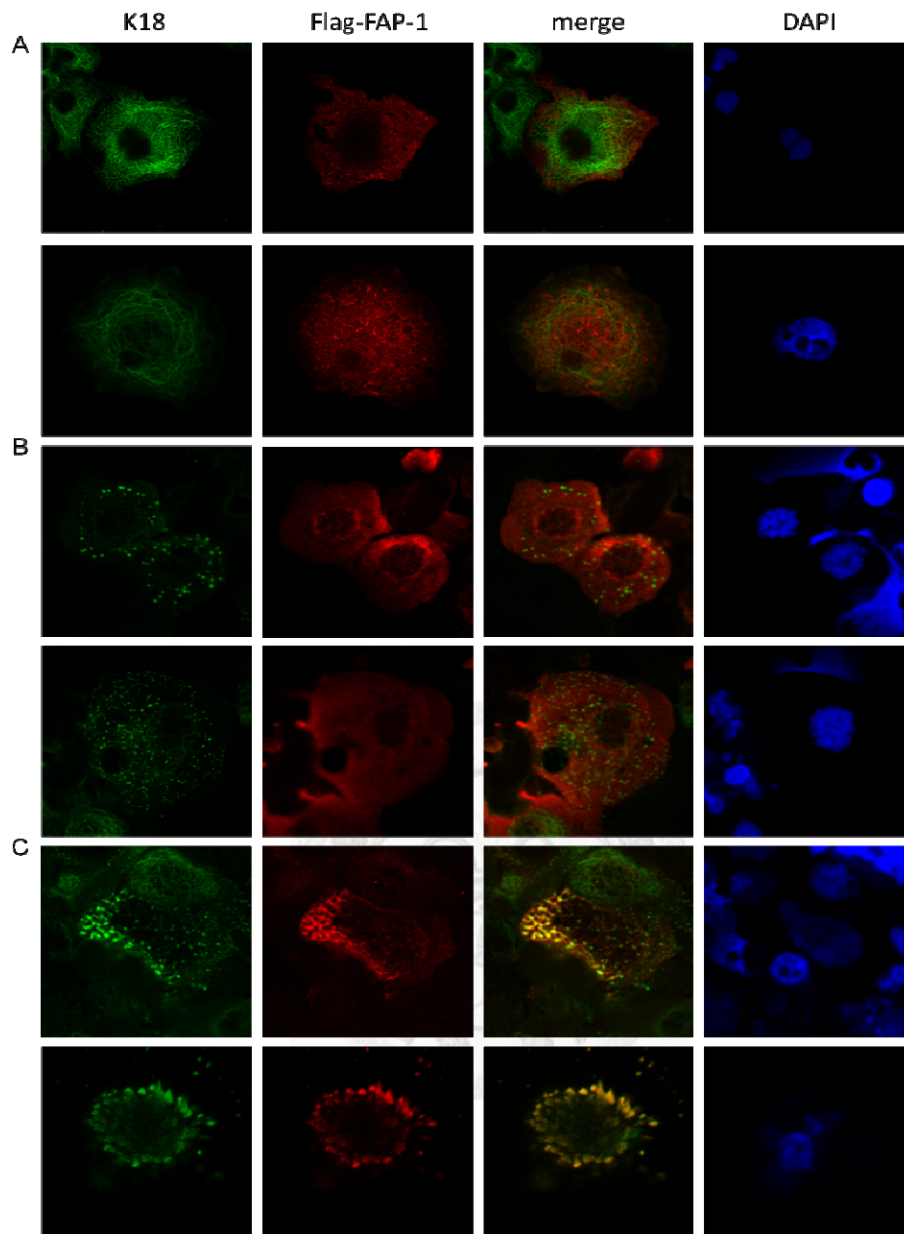


圖附錄



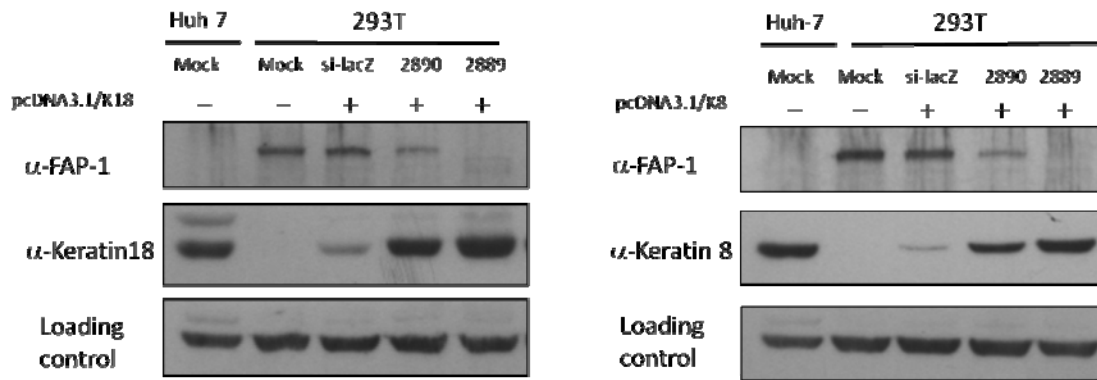
圖一、利用 yeast-two hybrid 的方式發現一個與 FAP-1 N 端功能域有交互作用的新蛋白—角蛋白 18。

(A)用以進行 yeast two-hybrid 分析的質體 (B)藉由觀察酵母菌是否生長於 LT- 和 LTH-的洋菜膠培養皿以確認 FAP-1 是透過其 N 端的 exon 7 功能域與角蛋白 18 有專一性的交互作用 (C)利用 beta-Galatosidase analysis 分析 FAP-1 N 端功能域與角蛋白 18 之間的專一性交互作用。



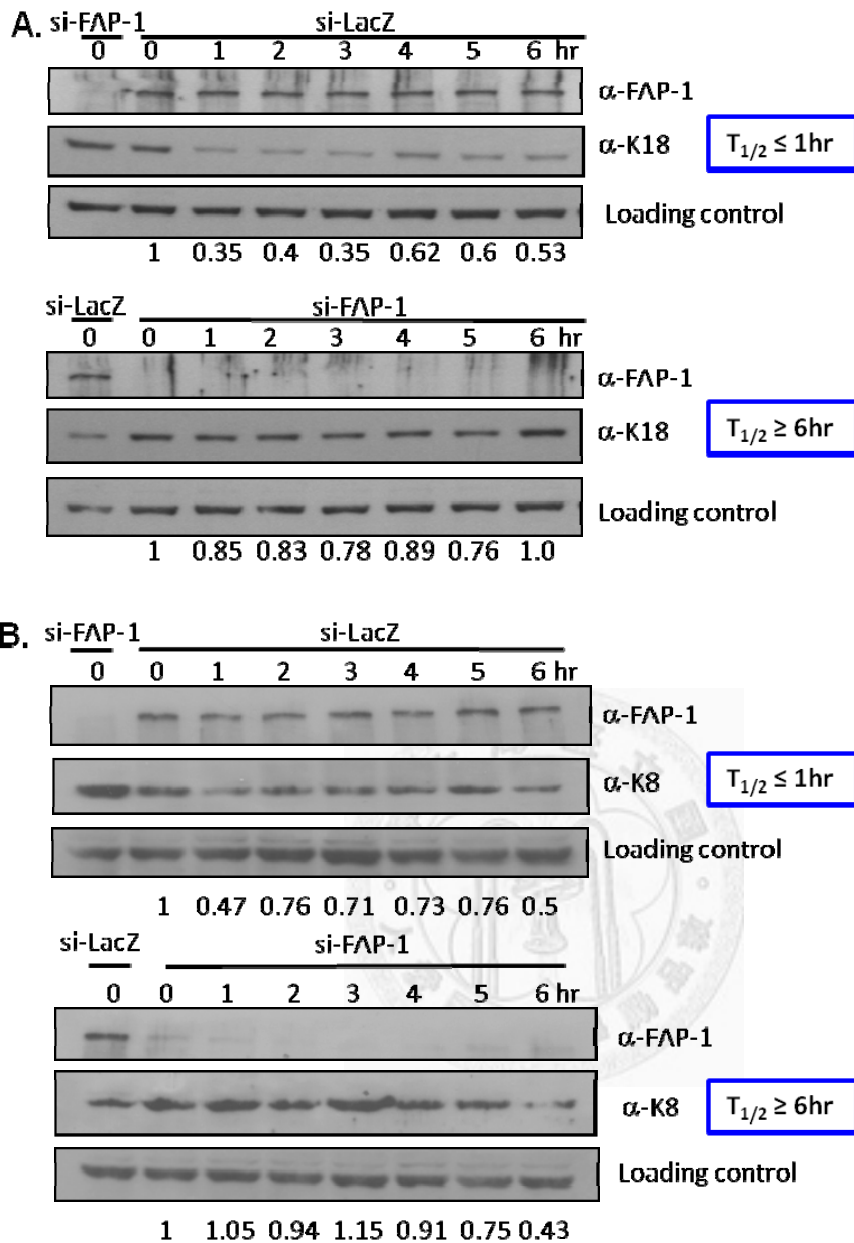
圖二、FAP-1 會與細胞凋亡時不正常堆疊的角蛋白 18 或 8 有交互作用。

在 PLC5 (A)轉染 flag-FAP-1 48 小時後直接進行免疫染色 (B)轉染 flag-FAP-1 24 小時後，處理 3mg/ml nocodazole 使細胞停留在有絲分裂期，16 小時後再進行免疫染色 (C)轉染 flag-FAP-1 24 小時後，處理 150 nM Doxorubicin 誘發細胞凋零，48 小時後再進行免疫染色，分別以綠色螢光標定角蛋白 18 和紅色螢光標定 flag 後，以共軛焦顯微鏡(confocal microscopy)觀察 FAP-1 與不同形式的角蛋白 18 發生交互作用的情形。



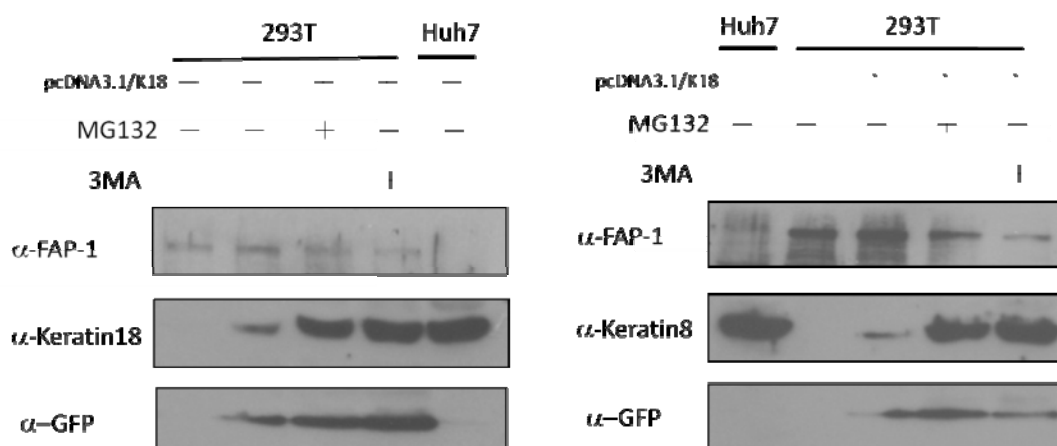
圖三、利用 si-FAP-1 降低 FAP-1 蛋白的表現量會增加外送角蛋白 18 或 8 的蛋白表現量

利用含有 si-LacZ 或 si-FAP-1 的 lenti-virus 病毒液感染 HEK293T 細胞 72 小時後，外送表現角蛋白 18 或 8 的質體，24 小時後萃取細胞蛋白質進行 Western blotting 分析，觀察 knock down FAP-1 對角蛋白 18 或 8 表現量的影響。2890 和 2889 分別為兩株不同的 lenti-siFAP-1 質體。



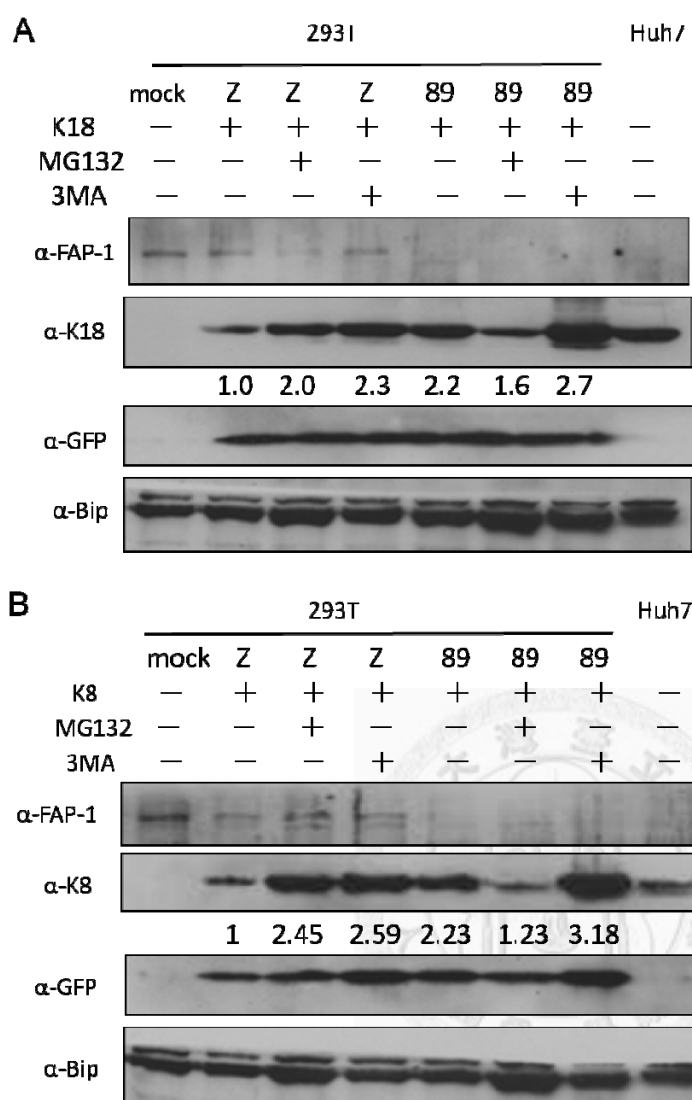
圖四、FAP-1 會透過降低角蛋白 18 或 8 的蛋白質穩定度，影響角蛋白 18 或 8 的表現量。

利用含有 lenti-si-LacZ 或 lenti-si-FAP-1 的病毒液感染 HEK293T 細胞 72 小時後，外送表現角蛋白 18 或 8 的質體，24 小時後，處理 20mg/mL cyclohexamide 抑制蛋白質的新生，並分別在 0、1、2、3、4、5、6 個小時後萃取細胞蛋白質進行 Western blotting 分析，觀察 si-FAP-1 對於角蛋白 18 或 8 蛋白質降解速度的影響。



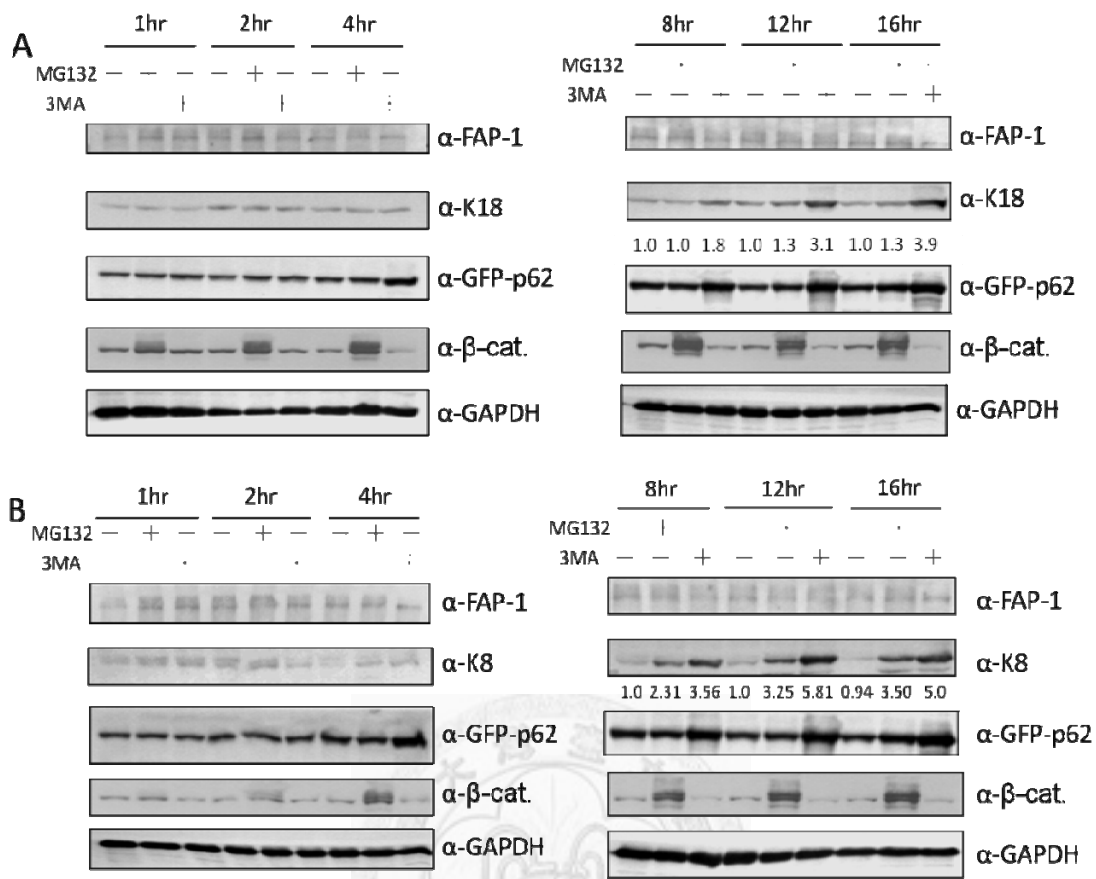
圖五、在長時間的實驗流程下(long-term effect)，不正常堆疊的角蛋白 18 或 8 會等量地經由 proteasome 和 autophagy 兩條蛋白降解途徑被分解。

先在 HEK293T 細胞單獨外送表現角蛋白 18 或 8 的質體，質體轉染 6 小時後，分別處理 5 μ M proteasome inhibitor—MG132 或 200nm autophagy inhibitor—3MA，18 個小時後萃取細胞蛋白質進行 Western blotting 分析，藉由觀察角蛋白 8 或 18 的累積量探討角蛋白 18 或 8 分別是走那一個蛋白質降解途徑。



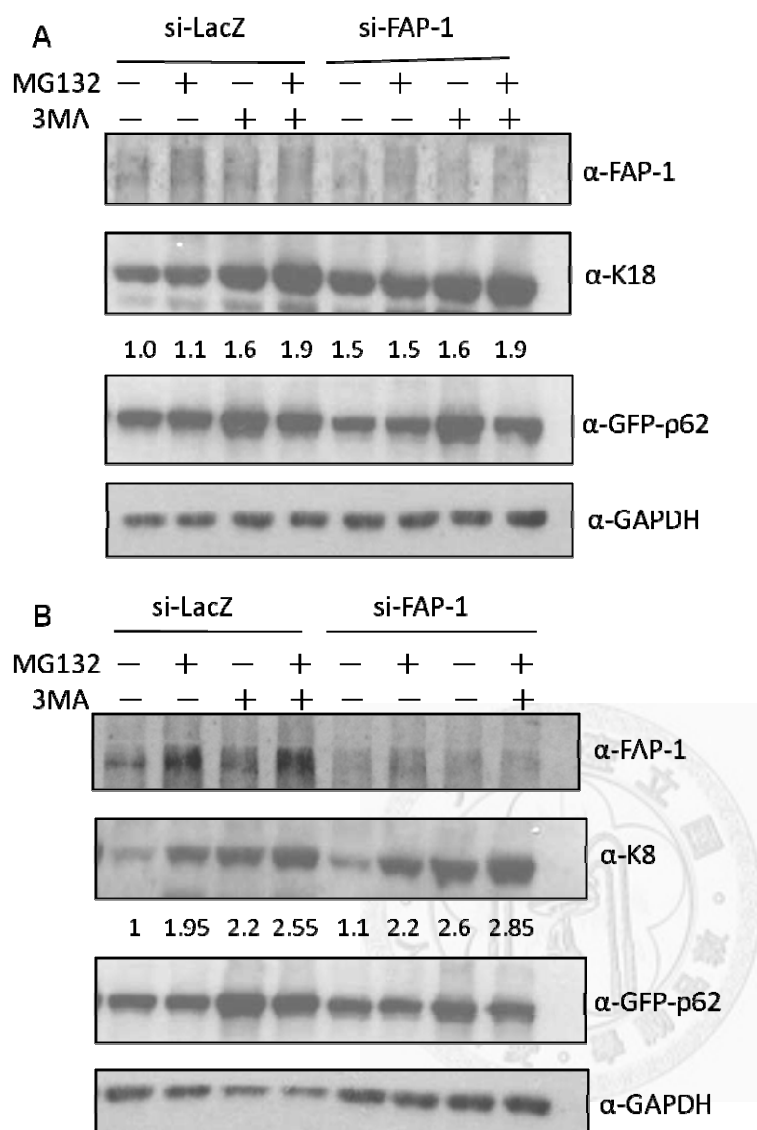
圖六、在長時間的實驗流程下(long-term effect)，FAP-1 可能會促使角蛋白 18 或 8 走向 autophagy 的蛋白質降解路徑。

利用含有 lenti-si-LacZ 或 lenti-si-FAP-1 的病毒液感染 HEK293T 細胞 72 小時後，外送表現角蛋白 18 或 8 的質體，質體轉染 6 小時後，分別處理 5 μ M 的 proteasome inhibitor—MG132 或 200nm 的 autophagy inhibitor—3MA，18 個小時後萃取細胞蛋白質進行 Western blotting 分析，藉由觀察角蛋白 8 或 18 的表現量是否有更顯著的累積，以探討 FAP-1 參與角蛋白 8 或 18 走哪一條蛋白質降解途徑。



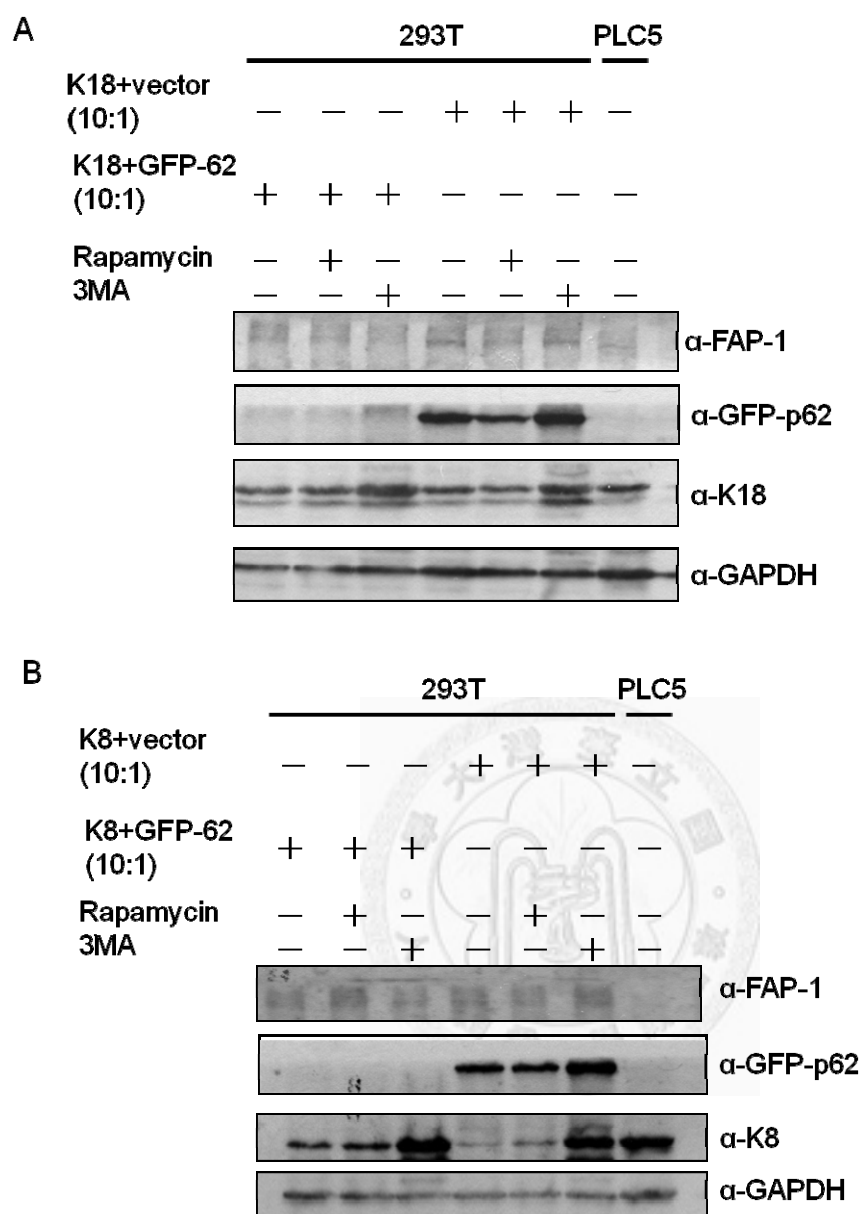
圖七、在短時間的實驗流程下(short-term effect)，不正常堆積的角蛋白 8 或 18 會以不同的方式進行降解，角蛋白 18 主要走 autophagy 蛋白質降解途徑，而角蛋白 8 則是兩條蛋白質降解途徑都會走。

在 HEK293T 細胞以 10:1 的比例轉染角蛋白 8 和 GFP-p62 或是角蛋白 18 和 GFP-p62(以 GFP-p62 的表現量反映細胞自噬的進行活性)，10 小時後，分別處理 5 μ M MG132 或 200nm 3MA，並在 1、2、4、8 和 12 個小時後萃取細胞蛋白質進行 Western blotting 分析，藉由觀察角蛋白 8 或 18 的累積量了解角蛋白 8 或 18 在不同時間點下走哪蛋白質降解途徑。



圖八、在短時間的實驗流程下(short-term effect)，FAP-1只會專一性地調控不正常堆積的角蛋白18走向autophagy降解，但FAP-1並不會調控不正常堆積的角蛋白8和GFP-p62。

利用含有lenti-si-LacZ或lenti-si-FAP-1的病毒液感染HEK293T細胞24小時後，以10:1的比例轉染角蛋白8和GFP-p62或是角蛋白18和GFP-p62，10小時後，分別處理5 μ M MG132或200nm 3MA，12小時後即萃取細胞的蛋白質進行Western blotting 分析。



圖九、角蛋白 8 可能藉由 p62 被帶往 autophagy 進行降解，而角蛋白 18 則可能透過與 p62 無關的其他途徑被帶往 autophagy 降解。

在 HEK293T 細胞以 10:1 的比例轉染角蛋白 18 和 GFP-p62，並轉染 10:1 的角蛋白 18 和 vector 做為對照組，10 小時後，分別將細胞處理 5 μ M MG132 或 200nm 3MA，12 小時後即萃取細胞蛋白質進行 Western blotting，藉由外送過量的 p62，促進經由此方式進行細胞自噬的受質被降解，進而探討角蛋白 18 與角蛋白 18 進行 autophagy 降解路徑的差異。