

國立臺灣大學生命科學院生化科技學系



碩士論文

Department of Biochemical Science and Technology

College of Life Science

National Taiwan University

Master Thesis

表皮生長因子促進 *Cten* 基因表現之機制探討

Elucidating the Mechanism of
EGF-Induced *Cten* Gene Expression

張佳鈞

Chia-Chung Chang

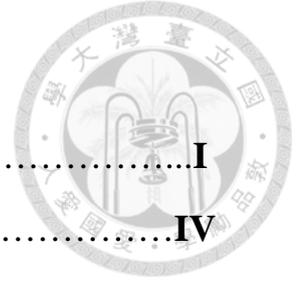
指導教授：廖憶純 博士

Advisor: Yi-Chun Liao, Ph.D.

中華民國 102 年 7 月

July, 2013

目錄



目錄.....	I
縮寫表.....	IV
摘要.....	VI
Abstract.....	VII
一、本論文之研究基礎.....	1
1.1 表皮生長因子受體訊息傳導路徑.....	1
1.2 EGF 誘導 focal adhesion turnover 及細胞遷移機制.....	2
1.2.1 Focal adhesion.....	3
1.2.2 EGF 誘導 focal adhesion turnover 及細胞遷移之機制.....	4
1.3 Cten 於 EGFR signaling 中扮演的角色.....	5
1.3.1 Tensin 家族.....	5
1.3.2 Cten.....	6
1.3.3 Cten 於 EGFR signaling 中參與的調控機制.....	8
1.4 EGFR signaling 調控基因表現的可能機制.....	9
1.4.1 EGF-responsive <i>cis</i> -acting elements.....	9
1.4.2 EGF 增加 mRNA 的穩定性.....	10
1.4.3 EGF 參與表觀基因調控.....	12
1.5 本論文之研究目的.....	15
二、材料與方法.....	16
2.1 實驗材料.....	16
2.1.1 菌種.....	16
2.1.2 質體 DNA.....	16
2.1.3 細胞株.....	18
2.1.4 細胞培養基.....	18
2.1.5 EGF 及抑制劑.....	18
2.1.6 抗體.....	18



2.2	實驗儀器設備	19
2.2.1	核酸電泳設備	19
2.2.2	蛋白質電泳設備	19
2.2.3	離心機	19
2.2.4	其他	19
2.3	實驗方法	20
2.3.1	細胞實驗	20
2.3.2	DNA 分析與質體之建構	23
2.3.3	RNA 分析	26
2.3.4	蛋白質分析	27
2.3.5	Dual luciferase assay	28
2.3.6	Chromatin accessibility by real-time PCR (CHART PCR)	28
2.3.7	染色質免疫沉澱 (Chromatin Immunoprecipitation assay, ChIP)....	30
三、	研究結果	33
3.1	選擇適用於探討 Cten 表現受 EGF 調控之機制的細胞株	33
3.2	不同 EGF 濃度及處理時間對 RWPE-1 細胞株中 Cten 表現的影響....	33
3.3	EGF 於 RWPE-1 中藉由活化 ERK 進而調控 Cten 表現	34
3.4	於轉錄層次探討 Cten 受 EGF 誘導之機制	35
3.5	EGF 對 <i>Cten</i> mRNA 穩定性的影響	36
3.6	於表觀基因調控層次探討 Cten 受 EGF 誘導之機制	36
3.6.1	以 nucleosome positioning 探討 EGF 調控 Cten 表現之機制	37
3.6.2	以 histone modification 探討 EGF 調控 Cten 表現之機制	37
3.7	用癌症細胞株 HeLa 及 DU145 探討 Cten 受 EGF signaling 誘導之調 控機制	39
3.8	利用染色質免疫沉澱法探討細胞株 HeLa 中 Cten 受 EGF signaling 誘 導之分子機制	40
四、	討論與未來研究方向	42
五、	參考文獻	49



六、圖與表.....	57
圖 3.1 不同細胞株中 Cten 表現量受 EGF 影響之分析.....	58
圖 3.2 不同 EGF 濃度及處理時間對 RWPE-1 細胞株中 Cten 表現量的影響.....	59
圖 3.3 MEK inhibitor U0126 對 RWPE-1 細胞株中 EGF 誘導之 Cten 蛋白質 含量及 ERK 磷酸化之影響.....	60
圖 3.4 Cten 啟動子活性受 EGF 影響之分析.....	61
圖 3.5 EGF 對 Cten mRNA 穩定性的影響.....	62
圖 3.6 EGF 於 RWPE-1 細胞株中對 Cten 啟動子受 MNase 之 accessibility 的 影響。.....	63
圖 3.7 HAT P300 inhibitor anacardic acid (AA) 及 HDAC inhibitor TSA 對 EGF 誘導之 Cten 表現量的影響.....	65
圖 3.8 Anacardic acid 可抑制 EGF 所誘導之 Cten mRNA 轉錄而不影響 p300 mRNA.....	66
圖 3.10 TSA 可促進 HeLa cells 中 Cten mRNA 之表現量.....	68
圖 3.11 MEK inhibitor U0126 對 HeLa 細胞株中 EGF 誘導之 Cten 蛋白質含 量及 ERK 磷酸化之影響.....	69
圖 3.12 HeLa 細胞株中 Cten 啟動子活性受 EGF 影響之分析.....	70
圖 3.13 利用 ENCODE 資料庫分析 Cten 基因中具有 histone acetylation 位 置及轉錄因子結合位。.....	71
圖 3.14 以 ChIP assay 分析 Cten 啟動子之 histone acetylation 受 EGF 之影響.....	72
表一.....	73
表二.....	74
表三、表四、表五.....	75



縮寫表

縮寫	全名
AA	anacardic acid
ActD	actinomycin D
AP-1	activator protein 1
Bp	base pair
cDNA	complementary DNA
ChIP	chromatin immunoprecipitation
Ct	threshold cycle
Cten	C-terminal tensin-like molecule
DLC1	deleted in liver cancer 1
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's medium
DMSO	dimethyl sulfoxide
DNA	deoxyribonucleic acid
dNTP	deoxynucleoside 5'-triphosphate
ECL	enhanced chemiluminescence
EDTA	ethylene diamine tetraacetic acid
EGFR	epidermal growth factor receptor
EGR1	early growth response protein 1
ENCODE	Encyclopedia of DNA Elements
ERK1/2	extracellular signal-regulated kinase 1/2
FAK	focal adhesion kinase
FBS	fetal bovine serum
FGF	fibroblast growth factor
GDP	guanosine 5'-diphosphate
Grb2	growth factor receptor-bound protein 2
GTP	guanosine 5'-triphosphate
H3K9Ac	acetylated histone lysine 9
HAT	histone acetyltransferase
HDAC	histone de-acetylase
IgG	Immunoglobulin G

IPTG	isopropyl- β -thiogalactopyranoside
kb	kilobase pair
kDa	kilo Dalton
LB	Luria-Bertani
MAPK	mitogen-activated protein kinase
MEK	MAPK or ERK kinase
MNase	Micrococcal nuclease
mRNA	messenger RNA
p300	E1A binding protein p300
PAGE	polyacrylamide gel electrophoresis
PBS	phosphate-buffered saline
PCR	polymerase chain reaction
PTB	phospho-tyrosine binding
PVDF	polyvinylidene fluoride
Raf	rapidly accelerated fibrosarcoma
Ras	rat sarcoma
Rho A	Ras homolog gene family, member A
RNA	ribonucleic acid
SDS	sodium dodecyl sulfate
SFM	serum free medium
SH2	Src homology 2
Sos	Son of Sevenless
SP1	Specificity Protein 1
Src	Sarcoma
SRE	serum responsive element
stat3	Signal transducer and activator of transcription 3
Tris	tris (hydroxymethyl) aminomethane
TSA	trichostatin A
UTR	untranslated region
X-gal	5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactopyranoside





摘要

EGFR signaling 是調控細胞遷移的訊息傳導路徑之一，而癌細胞中不正常活化的 EGFR signaling 會促進腫瘤的侵入性或癌細胞轉移。已知 EGFR signaling 可透過調控 focal adhesion 中 tensin 家族的 tensin3 及 Cten 蛋白質含量的消長，使蛋白質含量增加的 Cten 取代 tensin3，進而拆卸 actin fiber 增強乳癌細胞遷移的能力，且 EGF 誘導大量表現的 Cten 還可進一步延長 EGFR signaling 的活化時間，但 EGFR signaling 調控 Cten 表現上升的機制目前仍不清楚。本研究於 *Cten* 啟動子中並未發現與 EGF 調節有關的 *cis*-acting elements，且 EGF 的刺激也不會增加 *Cten* mRNA 之穩定性，進一步分析 *Cten* 啟動子上 nucleosome positioning 及 histone modification 等表觀基因調控方式，實驗結果發現 EGF 可促使 *Cten* 啟動子區域的 chromatin 結構變得較鬆散，並增加 *Cten* 啟動子上 histone tail 的 acetylation 修飾，而 histone acetyltransferase p300 的抑制劑 anacardic acid 可降低 EGF 誘導的 *Cten* 表現量，因此推測 EGF signaling 可能是藉由 histone acetyltransferase p300 增加 *Cten* 啟動子區域 histone 的 acetylation 進而活化 *Cten* 基因的表現。

Abstract



Epidermal growth factor receptor (EGFR) signaling is involved in regulation of cell migration. Aberrant activation of the pathway contributes to the tumor invasion and metastasis. Recent studies showed that EGF-driven breast cancer cells migration is mediated by a tensin3-Cten switch mechanism. EGF-induced up-regulation of Cten displaces tensin-3 from cytoplasmic tail of integrin and causes actin fiber disassembly then promotes cell migration. Furthermore, elevated expression of Cten by EGFR activation can prolong EGFR signaling. However, the molecular mechanism underlying EGFR signaling regulates the increased expression of Cten is still incompletely understood. Our results have shown that no EGF-responsive *cis*-acting elements were found within *Cten* promoter and *Cten* mRNA stability was not increased by EGF. Nonetheless, analyses of nucleosome positioning and histone modification within *Cten* promoter demonstrated that EGF stimulation increased the chromatin accessibility of *Cten* promoter and enhanced histone acetylation. Moreover, anacardic acid, a histone acetyltransferase p300 inhibitor, suppressed EGF-induced Cten expression, which suggested that the histone acetyltransferase p300 may be involved in the regulation of EGF-induced Cten expression.



一、本論文之研究基礎

環境中的刺激可引發細胞中複雜的訊息傳導路徑，進而調控細胞遷移 (cell migration) 的發生，而癌細胞中不正常活化的訊息傳導路徑，也會促進癌細胞侵入性 (invasion) 或轉移 (metastasis) 的能力。表皮生長因子受體訊息傳導路徑 (epidermal growth factor receptor signaling, EGFR signaling) 是目前已知可調控細胞遷移的訊息傳導路徑之一，透過影響集中附著點 (focal adhesion) 的形成與拆解，達成細胞遷移的目的。

1.1 表皮生長因子受體訊息傳導路徑

面對不同的環境及刺激，細胞需要整合複雜的訊息傳遞至細胞內並做出適當的反應，而細胞膜上主要用於感應環境訊息的為穿膜受體 (transmembrane receptors)，通常帶有內生性 receptor kinase activity (RTK)，可將訊息以磷酸化的方式傳遞。表皮生長因子受體 (epidermal growth factor receptor, EGFR) 也稱作 human EGF receptor 1 (HER1) 及 ErbB-1，為 ErbB 家族的一員，也是最早被發現具有 tyrosine kinase 活性的受體。當受質 (ligand) 與 EGFR 結合後，可活化 EGFR 的 tyrosine kinase 活性，使其磷酸化自身或下游目標蛋白質的 tyrosine residues，進一步活化複雜的訊息傳導網路 (signal pathway network)，影響細胞增生 (proliferation)、細胞遷移、細胞分化 (differentiation) 及細胞內的平衡 (homeostasis) (Citri and Yarden, 2006)。

EGFR 活化的過程中，EGFR cytoplasmic tail 上磷酸化的 tyrosine (pTyr) 可提供細胞內許多訊息傳導分子結合，因此可同時活化諸多訊息傳導路徑，包括 GRB2/RAS/RAF/MEK/ERK pathway (MAPK pathway)、JAKs/STATs pathway、PLD,PLC γ /PI3-K pathway 及 Src pathway (Jorissen *et al.*, 2003)。其中 MEK/ERK cascade 參與在 EGF 所誘導的 focal adhesion 解體及細胞遷移機制中 (Xie *et al.*, 1998)。



Ras/Raf/MEK/ERK 機制介紹

當環境中的 EGF ligands 與 EGFR 結合時，會促進 EGFR 發生一系列的活化過程，包括 EGFR dimerization、tyrosine kinase activity 的活化及磷酸化 EGFR cytoplasmic tail 上特定的 tyrosine residues，這些 pTyr 可提供許多 SH2 domain-containing proteins 進行結合。Adaptor protein GRB2 於 EGFR 活化之前會在細胞質中與 RAS exchange factor SOS 持續結合，當 EGFR 活化後，EGFR 上的 pTyr 可提供 GRB2 的 SH2 domain 結合 (Grb2 在某些情況需透過 SHC 才能和 EGFR 結合)，進而活化 RAS/RAF/MEK/ERK cascade。EGFR 活化後，GRB2/SOS 複合體會從細胞質中移動至細胞膜上，並使 SOS 得以與位於細胞膜的 RAS 進行結合，SOS 可將 RAS-GDP 轉換成 RAS-GTP，使 RAS 呈現活化狀態。RAS-GTP 可與 serine/threonine kinase RAF-1 進行結合並使其活化，RAF-1 可磷酸化並活化 mitogen-activated protein kinase kinase 1/2 (MEK1/2)，接著 MEK1/2 會再進一步磷酸化及活化 p44/p42 mitogen-activated protein kinase (MAPK) (或稱 extracellular signal-regulated kinase 1/2, ERK1/2)，促使 ERK1/2 進入細胞核中，ERK1/2 為 serine/threonine kinase，可利用磷酸化的方式將訊息傳遞至下游的目標蛋白質中，活化轉錄因子進而影響下游基因表現 (Jorissen *et al.*, 2003)。

1.2 EGF 誘導 focal adhesion turnover 及細胞遷移機制

細胞遷移是胚層發育、組織形成、傷口癒合、發炎或癌細胞轉移的基本條件 (Clark and Henson, 1996; Stossel, 1993)，而在遷移中的細胞其前端會形成偽足，當偽足與細胞外基質 (extracellular matrix, ECM) 接觸時，會透過細胞膜上的受器向外與細胞外基質連接，向內則透過一群複雜的蛋白質複合體與細胞骨架 actin 相連，形成特殊的細胞構造稱為集中附著點 (focal adhesion)。而細胞後端原有的 focal adhesion 會進行拆解，以前端新形成的 focal adhesion 為支點，藉此將細胞往前拉達成細胞遷移 (Lauffenburger and Horwitz, 1996)。調控細胞遷移的機制非常複雜，許多細胞外基質的刺激或一



些生長因子都可調控細胞遷移，而 EGFR signaling 是目前研究已知會促進細胞遷移的訊息傳導方式之一 (Manske and Bade, 1994)，研究發現許多上皮細胞癌都具有 EGFR signaling 過度活化的現象，進而促進癌細胞轉移 (Kuan *et al.*, 2001)，除此之外，EGFR signaling 也會影響 focal adhesion 之 turnover (McLean *et al.*, 2005)。

1.2.1 Focal adhesion

Focal adhesion 為細胞貼附於細胞外基質時，於細胞膜上形成特化的穿膜結構，負責連接細胞外基質及細胞骨架 (BurrIDGE *et al.*, 1988)，此穿膜結構主要由穿膜蛋白質 integrin 負責調控 (Hynes, 1992)，透過其 extracellular domain 向外與細胞外基質連接，而 integrin cytoplasmic tails 向內則透過一群 focal adhesion complex 將細胞骨架 actin stress fibers 固定於細胞膜附近 (Brigitte *et al.*, 1995)。

目前已知 focal adhesion complex 中約有超過上百種的蛋白質參與其中 (Geiger *et al.*, 2001)，根據不同蛋白質間的交互作用，大致上可分成四類：(1) 可直接與細胞膜上 integrin 及細胞骨架進行交互作用，當作兩者之間橋梁的 integrin-actin linker (Lin and Lin, 1996); (2) 並不會與細胞骨架直接相連，必須透過其他的 focal adhesion 蛋白質間接與細胞骨架連接的 integrin-associated proteins; (3) 不會直接和 integrin 有交互作用的 actin-binding proteins; (4) 可分別和 integrin-associated proteins 及 actin-binding proteins 有交互作用，並將兩者連結再一起的 adaptor proteins。在這之中有些蛋白質也扮演 structural proteins 的角色，可支撐 focal adhesion 的結構並維持細胞形態 (Rajfur *et al.*, 2002)；也有些為 scaffold proteins，可做為平台提供不同蛋白質之間的交互作用。這些複雜的蛋白質交互作用可提供細胞在面對不同環境或行為時，組成不同的 signaling complex 因應不同的刺激 (Wozniak *et al.*, 2004)；除了具有專一性的

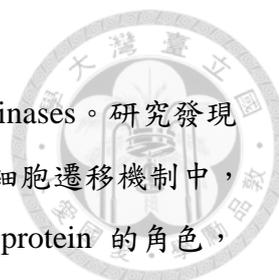


protein-protein interaction 之外，還有許多蛋白質為酵素，包括 kinase, phosphatase, GTPase, protease.....等，同時也有很多的訊息傳導分子也參與在 focal adhesion 中，因此 focal adhesion 能夠將外界感應到的訊息傳遞至細胞內，並在 focal adhesion 中整合不同的訊息傳導路徑，進而影響 focal adhesion 的功能以及不同的細胞生理行為，於細胞附著、遷移、增生、分化與基因表現等方面都扮演重要角色 (Geiger *et al.*, 2001)。Focal adhesion 也必須受到嚴謹的調控才能執行正確的功能，研究發現，focal adhesion 蛋白質缺失或過度活化的也會導致疾病或是癌症的發生，例如在大多數大腸癌腫瘤及 80% 以上的乳癌腫瘤中，都可觀察到 focal adhesion kinase (FAK) 的表現量上升且過度活化的現象 (Cance *et al.*, 2000)。

參與在 focal adhesion 中的蛋白質種類非常複雜，研究發現其中一群 focal adhesion 蛋白質為 EGFR signaling 下游的調控目標，如 FAK、p130Cas、Src、paxillin 等 (Ojaniemi and Vuori, 1997; Tapia *et al.*, 1999; Sieg *et al.*, 2000; Hauck *et al.*, 2001; Lu *et al.*, 2001)，因此當細胞受 EGF 刺激後，EGF signaling pathway 可能會對這些 focal adhesion 蛋白質進行轉譯後修飾 (如 phosphorylation)，並影響蛋白質原本的功能或蛋白質之間的交互作用，拆解或形成不同的訊息傳導複合體，影響細胞骨架的結構，改變細胞形態或促進細胞遷移的發生。

1.2.2 EGF 誘導 focal adhesion turnover 及細胞遷移機制

Cui 等人 (2004) 發現在沒有 EGF 刺激之下，focal adhesion 蛋白質 tensin3 會與 FAK 及 p130Cas 一同形成複合體，但在 EGF 的刺激下，卻會促使 tensin3-FAK-p130Cas 複合體的解體。另外，研究顯示於細胞中過量表現 tensin 3 會抑制癌細胞的細胞遷移及細胞侵略性，表示 EGFs 促使 tensin3-FAK-p130Cas 複合體的解體現象可能有助於細胞遷移 (Martuszevska *et al.*, 2009)。



FAK 及 Src kinase 為 focal adhesion 中最主要的 kinases。研究發現在 plate derived growth factor (PDGF) 或 EGF 所誘導的細胞遷移機制中，當 FAK 被 Src 進一步磷酸化時，FAK 可扮演 adaptor protein 的角色，吸引 ERK2、calpain-2 至 focal adhesion，並組成 functional complex。Calpain-2 為廣泛存在之 cysteine protease，當 ERK2 於 focal adhesion 處磷酸化並活化 calpain-2 後，calpain-2 可水解 focal adhesion 蛋白質，使 focal adhesion 發生解體並促進細胞遷移 (Carragher *et al.*, 2003; Glading *et al.*, 2004)。

上述例子說明 EGFR signaling 誘導細胞遷移的機制中，促使 focal adhesion 中不同 signaling complex 的形成及解體進而影響 focal adhesion 結構是很重要的調控步驟。

1.3 Cten 於 EGFR signaling 中扮演的角色

近年研究發現，EGFR signaling 促進乳癌細胞的細胞遷移行為是透過 focal adhesion 中 tensin 家族的 tensin3 及 C-terminal tensin like molecule (Cten) 之互換機制達成 (Katz *et al.*, 2007)。Cten 在許多組織癌化的過程中都有大量表現的情況，且在癌細胞轉移的過程中扮演重要角色。

1.3.1 Tensin 家族

Tensin 的蛋白質結構連接了細胞骨架與細胞膜上的 integrin receptors，因此在 focal adhesion 中扮演著結構性蛋白的角色，協助支撐 focal adhesion 的結構。另外，tensin 可和許多的結構性蛋白或訊息傳導分子結合，因此也為一種 scaffolding 蛋白質 (Lo, 2004)。再者，許多因子可促進 tensin 的 tyrosine 磷酸化的現象，包括貼附於細胞外基質時 (Bockholt and Burridge, 1993)、處理細胞生長因子 PDGF (Jiang *et al.*, 1996)、thrombin、angiotensin (Ishida *et al.*, 1999) 及 oncogenes Src、BCR/ABL (Davis *et al.*, 1991; Salgia *et*



al., 1995) 等，顯示 tensin 在 focal adhesion 中可藉由磷酸化提供組成不同的訊息傳導複合體所需的平台，以因應不同的環境。

研究 tensin 基因剔除小鼠 (knockout mice) 發現，tensin 在腎臟功能、肌肉新生方面都扮演重要角色 (Lo *et al.*, 1997; Ishii and Lo, 2001)，從 tensin-null mice 的胚胎中分離出的纖維細胞 (fibroblasts) 也發現具有較慢的細胞遷移速率，顯示 tensin 在細胞遷移中也扮演重要角色 (Chen *et al.*, 2002)。

Tensin 家族具有四個成員，分別為 tensin1、tensin2、tensin3 及 tensin4/Cten (Lo, 2004)。Tensin 蛋白質結構的 N 端具有 actin-binding domain (ABD)，可與 actin filaments 進行結合，影響細胞骨架的 cross-link (Lo *et al.*, 1994)；C 端則具有兩個 pTyr-binding motifs，分別為 Src Homology 2 (SH2) domain 及 pTyr-binding (PTB) domain。SH2 domain 可和 tyrosine-phosphorylated 蛋白質結合，包括 phosphoinositide-3-kinase (PI3K)、p130Cas 及 FAK (Auger *et al.*, 1996; Davis *et al.*, 1991)。雖然 PTB domain 為另一種 pTyr-binding motifs，但 tensin 的 PTB domain 卻不和 tyrosine-phosphorylated 蛋白質結合，反而會和 β -integrin 的 cytoplasmic tail 中的 NPXY motif 結合 (Calderwood *et al.*, 2003)。不同成員之間的 N 端及 C 端區域具有高度的保守性，唯獨 tensin4 不具有 N 端的 ABD，只有 C 端的 SH2 及 PTB domain 與其它 tensin 成員相似，因此又名 C-terminal tensin-like molecules，簡稱 Cten (Lo and Lo, 2002)。

1.3.2 Cten

相較於其他 tensin 成員廣泛表現於各種人類組織中 (Chen *et al.*, 2000)，Cten 則高度表現於正常前列腺組織及胎盤組織之中，顯示 Cten 具有組織特異性 (Lo and Lo, 2002)。另一方面，相較於正常前列腺細胞，Cten 在前列腺癌細胞中有蛋白質含量較低的情況，因此在前列腺組織中被認為是



tumor suppressor 的角色 (Lo and Lo, 2002); 但 Cten 在胸腺癌 (Sasaki *et al.*, 2003 b)、肺癌 (Sasaki *et al.*, 2003 a)、胃癌 (Sakashita *et al.*, 2008)、乳癌 (Katz *et al.*, 2007) 及大腸癌 (Albasri *et al.*, 2009; Liao *et al.*, 2009) 中都有蛋白質含量大量提升的情形，且隨著腫瘤的惡化，Cten 蛋白質含量也有更進一步上升的現象，因此在這些組織中被認為 oncogene 的角色。

許多研究指出 Cten 主要參與在細胞遷移及細胞侵入等生理機制中。在大腸癌細胞株 HCT116 及 SW480 中，過量表現的 Cten 會促進表皮-間葉細胞轉換 (epithelia-mesenchymal transition, EMT) 的發生，同時伴隨著細胞遷移及細胞侵入的能力上升 (Albasri *et al.*, 2009)。研究也發現在大腸癌細胞株 HCT116 中，Cten 及 integrin-linking kinase (ILK) 都會與 integrin 有交互作用，且 Cten 可調控 ILK 的表現，同時 Cten-ILK pathway 在調控細胞遷移甚至是癌細胞轉移方面也很重要 (Albasri *et al.*, 2011)。在許多具有 *K-ras/B-raf* mutation 的大腸癌及胰臟癌組織當中發現，Cten 為 K-RAS 的下游調控基因之一，且 Cten 也參與在 K-RAS 所誘導的細胞遷移機制中 (Al-Ghamdi *et al.*, 2011)。這些研究皆指出 Cten 在癌細胞侵入或擴散至周圍組織中扮演關鍵性的角色。除了上述機制外，在正常的前列腺表皮細胞中，當細胞發生細胞凋亡時 (apoptosis)，Cten 會被 Caspase-3 進行水解，水解後的產物 PTB domain 片段 (571-715 a.a.) 可進一步促進細胞凋亡，顯示 Cten 參與在細胞凋亡的機制中 (Lo *et al.*, 2005)。

在調控 Cten 表現的訊息傳導方面，許多生長因子，如 EGF、FGF2、NGF、PDGF、TGF β 、IGF-1 等，以及一些 cytokines，如 IL-6 及 IL-13 皆可誘導 Cten 的表現，顯示 Cten 為與癌症相關的生長因子及 cytokines 所調控的下游共同目標之一 (Hung *et al.*, 2013)，同時 Cten 也參與在 EGF、FGF2 所誘導的細胞遷移機制中 (Katz *et al.*, 2007; Hung *et al.*, 2013)。而在非惡性 (nontransformed) 的人類乳腺細胞株 MCF10A 中，IL-6 可藉由轉錄因子 Stat3 誘導 Cten 的大量表現進而促進細胞遷移發生 (Barbieri *et al.*,



2010)。除此之外，在狗的腎臟上皮細胞株 MDCK 中，Stat3-Cten pathway 會影響 epithelial sheet invasion 及 tubulogenesis 的發生 (Kwon *et al.*, 2012)。在人類皮膚角質細胞株 HaCaT 中發現，Cten 為轉錄因子 Δ Np63 α 的下游調控基因之一，且 Δ Np63 α -Cten pathway 對一切皮膚病變 (Seborrhoeic keratoses) 很重要 (Seo *et al.*, 2012)。但在 EGF 所誘導的 Cten 表現機制中，是否涉及 Stat3、 Δ Np63 α 或其他相關的轉錄因子目前仍不明確。

1.3.3 Cten 於 EGFR signaling 中參與的調控機制

Katz 等人 (2007) 研究報告指出，在人類非惡性乳腺表皮細胞株 MCF10A 中，EGF 誘導的細胞遷移現象是透過位於 focal adhesion 的 tensin family 進行調控，在 EGF 的刺激下，細胞中不具有 actin-binding domain 的 Cten 表現量會上升，而 tensin3 的表現量卻下降，大量表現的 Cten 取代了 tensin3 與 integrin 的結合，進而促使細胞骨架瓦解，促進細胞遷移，並有助於乳癌細胞的侵犯性。該研究並發現，EGF 誘導 Cten 的表現量上升是專一性透過 EGFR signaling 下游的 ERK kinase 所調控。

Cao 等人 (2012) 發表的研究報告探討了更下游的調控機制，他們發現蛋白質 deleted in liver cancer 1 (DLC1) 及 RhoA 參與在 EGF 所誘導的 tensin3-Cten 的調控機制中。在沒有 EGF 的刺激下，tensin3 的 actin-binding domain 會和 DLC1 的 SAM domain 結合，抑制了 DLC1 本身的 autoinhibition 效果，活化 DLC1 上的 Rho-GAP (GTPase activation proteins) domain 活性，RhoA-GTP 因而被水解並失活，降低了細胞遷移性；但在 EGF 刺激之下，受 EGF 誘導表現量上升的 Cten 取代了 tensin 3 與 DLC1 的結合，但因為 Cten 不具有 actin-binding domain，因此使 DLC1 可進行 autoinhibition，使其無法活化自身 Rho-GAP 的活性，因而提高 RhoA-GTP 的含量，活化的 RhoA 可促使 focal adhesion 及 stress fibers 的形成，並促進細胞遷移。



Hong 等人 (2013) 則發現 EGF 可促進 Cten 的 SH2 domain 與 E3 ubiquitin ligase c-Cbl 的結合，降低 EGFR 被 ubiquitination 的現象，也降低 EGFR 因 ligand 所誘導的降解現象 (ligand-induced degradation)，而得以延長 EGFR signaling 的活化時間，突顯了 Cten 除了於 EGFR signaling 下游中的轉譯後調控功能。

以上研究描述 Cten 在 EGF 所誘導的細胞遷移機制中扮演的重要角色，且 EGF 所誘導的 Cten 表現量上升，可進一步以正回饋的方式延長 EGFR signaling 的活化時間。但 EGFR signaling 如何調控 Cten 的表現並無進一步探討，此部分也是本論文擬探討的主題。

1.4 EGFR signaling調控基因表現的可能機制

訊息傳導路徑調控基因表現的機制很複雜，大致上可以歸納為三類，於轉錄層次調控啟動子活性 (transcriptional regulation)、於後轉錄層次影響 mRNA 穩定性或 turnover (post-transcriptional regulation) 及表觀基因調控方式 (epigenetic regulation) 影響基因表現。

1.4.1 EGF-responsive *cis*-acting elements

基因的表現是透過轉錄因子結合於特定的 DNA 序列上進行調控，若該轉錄因子結合位與其所調控的基因位於同一條 DNA 序列上，則將之稱 *cis*-acting element 或 *cis*-regulatory element。許多探討 EGF 調控基因表現的機制中，EGF 的刺激會促進特定轉錄因子結合到相對應的 *cis*-acting element 中，促使基因轉錄，因此本論文將之稱為 EGF-responsive *cis*-acting element，也有些文獻將之稱為 serum response elements (SRE)。

目前在 *EGFR* 及 *keratin 16* 等基因啟動子上都發現有 EGF-responsive *cis*-acting elements。Gregg 與 Fraizer (2011) 發現在前列腺癌細胞株 PC3 中



EGF 透過 ERK 調控 *EGR1* 的表現，以螢火蟲報導基因分析法分析其啟動子區域，發現近端啟動子 (-771~-245) 為對 EGF 刺激有所反應的區域 (EGF-responsive region)，而此區域含有三個可能的 serum response elements (SRE)。進一步以染色質免疫沉澱法 (chromatin immunoprecipitation assay, ChIP) 分析這些 SRE，發現 EGF 會促進轉錄因子 Elk-1 結合 SRE 序列上。

Wang 與 Chang (2003) 發現 EGF 透過 MEK1/ERK cascade 調控 *keratin 16* 的表現，且啟動子 (-162~-114) 為該基因受 EGF 調控之區域，該區域內具有一個轉錄因子 SP1 可能結合位及數個轉錄因子 AP-1 的可能結合位。進一步以 ChIP 分析，發現 Sp1 可持續結合於啟動子上且不受 EGF 的處理而影響，但 EGF 會促進 AP-1 的結合，且 co-activator p300 在 EGF 刺激之下，會與 Sp1 與 AP-1 結合，一同調控 EGF 所誘導 *keratin 16* 的表現。

上述例子說明，EGF 調控目標基因表現的機制中，EGF 促使受調控之轉錄因子結合到特定的 EGF-responsive *cis*-acting element 上，或是利用其它轉錄因子吸引與 EGF 相關之 co-activator 至啟動子區域上，都是可能調控基因表現之機制。

1.4.2 EGF 增加 mRNA 的穩定性

除了轉錄層次調控基因表現外，於後轉錄層次調控 mRNA 的穩定性或是降解速率 (mRNA stability or decay rate)，也是決定細胞中轉錄子 (transcripts) 含量的重要因素 (Wilusz *et al.*, 2001; Wilusz and Wilusz, 2004)。研究發現，若無法正常調控 mRNA 的降解/合成速率 (mRNA turnover rate) 和癌症、慢性發炎反應或慢性疾病都有關聯 (Audic and Hartley, 2004; Hollams *et al.*, 2002)。以人類 T-cell leukemia 為例，*c-myc* 基因因為喪失了 3'



端非轉譯區 (3' untranslated regions, 3' UTRs)，使得 *c-myc* mRNA 比平常更趨於穩定且不易降解，因而引發疾病 (Aghib *et al.*, 1990)。

mRNA 的序列上具有可供特定 RNA 結合蛋白質 (RNA-binding proteins) 結合的 *cis*-acting elements，二者之間的交互作用可調控 mRNA 的穩定性或是降解速率。這些 *cis*-acting elements 通常存在於 3' UTR 中，依照序列的特性可分成二類。第一類為 adenylylate- 及 uridylylated-rich (AU-rich) element (ARE)，在許多半衰期較短的 mRNAs 中可發現此序列 (Chen and Shyu, 1995)，而目前已知能結合此序列的 ARE-binding proteins 有 AUF1、HuR、TIA-1 及 tristetraprolin 等，對 mRNA 的穩定性有正向或負向的調控功能。第二類為 C-rich elements (Weiss and Liebhaber, 1995)，能結合此序列的為 poly(C) binding proteins，包括 PCBP1 及 PCBP2，具有防止 mRNA 被降解的功能。

以 *gastrin* 基因受 EGF 調控之機制為例：*gastrin* mRNA 在大腸癌或胰臟癌中皆有高度表現的情況，且研究發現 EGF 可促使 *gastrin* mRNA 的穩定性上升，顯示調控 mRNA turnover 在影響 *gastrin* mRNA 的機制中扮演重要角色。實驗發現，heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K (hnRNP K) 及 poly(C) binding protein 1 (PCBP1) 會結合到 *gastrin* mRNA 3' UTR 的 C-rich region，而 nucleolin 會結合到 AGCCCU motif 上並且會和 hnRNP K 有交互作用。在 EGF 刺激之下，nucleolin 和 hnRNP K 及 *gastrin* mRNA 的結合會增加。雖然 nucleolin 在 EGF 所誘導 *gastrin* mRNA 穩定性上升的機制中扮演較重要的角色，但 hnRNP K/PCBP1 複合體的形成卻可促進 nucleolin 與 *gastrin* mRNA 的結合 (Lee *et al.*, 2013)。

上述研究說明，EGF 可促使受其調控之 RNA 結合蛋白質，結合到特定基因轉錄出之 mRNA 的 3'UTR 或 5'UTR 上之目標 *cis*-acting element，進而影響 mRNA 的降解速率，亦為 EGF 調控目標基因表現的機制之一。



1.4.3 EGF 參與表觀基因調控

表觀基因調控為近年來廣泛研究的基因調控方式，是在不改變 DNA 序列的前提下，經由可逆的機制來改變 DNA 或是 histone tail 的修飾狀態，或是改變 nucleosome 或 chromatin 的結構，進而影響 genome 的功能或基因表現。相關機制包含 DNA methylation、histone modification、nucleosomal remodeling (or positioning) 及 chromosomal looping。近年研究發現，許多癌症的發生是因為抑制了 tumor suppressor 基因的表現或是促使 proto-oncogene 的活化，而導致這些現象的原因之一就是因為在癌症組織中，這些基因的啟動子或 enhancer 區域，與正常組織有著不同的表觀基因調控方式 (Chen *et al.*, 2010)。

Histone modification

隨著表觀基因學 (epigenetics) 的進展，histones 已不單純只是 DNA-packaging proteins，他們存在大量的轉譯後修飾 (post-translational modification) 現象，例如：acetylation, methylation, phosphorylation, ubiquitylation, sumoylation, ADP ribosylation, deimination 及 proline isomerization 等 (Kouzarides, 2007)，其中 histone tail 上特定 arginine 或 lysine 的 acetylation 及 methylation 在基因表現上扮演較重要的角色 (Kouzarides, 2007; Martin and Zhang, 2005)。一般認為 histone acetylation 和活化基因表現有關，而 histone deacetylation 則為抑制基因表現 (Struhl, 1998)。調控 histone acetylation 機制的酵素有二種，分別為 histone acetyl transferase (HAT) 及 histone de-acetylase (HDAC)，在未修飾前 (如 deacetylation)，histone tail 含有較多帶正電的 lysine 及 arginine 等胺基酸，因此會和帶負電的 DNA 有較大的吸引力，於是二者之間結合力較強，使 chromatin 結構較緊密，相關轉錄因子較無法結合至 DNA 序列上，抑制基因表現；若 histone tail 發生 acetylation 時，acetyl group 會中和 histone tail 上所帶有的正電荷，histone tail 和 DNA



吸引力變小，chromatin 結構較鬆散，於是轉錄因子較易結合於 DNA 上，促使基因表現。除此之外，於 histone 特定 lysine 或 arginine 上的 methylation 修飾，皆會參與基因表現的活化或抑制。

基因的轉錄除了需要 general transcription factors (如 TFIID) 外，許多 co-activators 或 co-repressors 的參與也調控基因表現的一環。研究發現許多 co-activators 具有 HAT 的活性，而 co-repressors 則具有 HDAC 的活性，說明 acetylation 或 deacetylation 在基因的活化或抑制方面扮演重要的角色。

P300 (E1A binding protein p300 or EP300, 以下簡稱 p300) 為一種 co-activator，在整合許多訊息傳導路徑上扮演重要角色，且參與許多生理機制，如 development, proliferation, differentiation 及 apoptosis。一般認為，p300 透過三種機制來促進基因的轉錄：(1) p300 一端可連接 basal transcription machinery，另一端則可連接其他轉錄因子或 enhancer complex，扮演二者之間的橋梁。(2) p300 蛋白質結構中的 CH1、CH2 及 KIX domains 可供許多轉錄因子或 cofactors 進行結合，組成不同的 multi-protein complexes，因此 p300 也扮演 scaffolding protein 的角色 (Shiama, 1997)。(3) p300 本身具有 HAT 活性，可針對 histone tail 或轉錄因子進行 acetylation，因此參與基因活化的機制 (Annister and Kouzarides, 1996)。

除此之外，p300 也被報導會直接被 EGF signaling pathway 下游的 ERK1 進行磷酸化，並促進其 HAT 的活性 (Ait-Si-Ali *et al.*, 1999)，顯示 p300 可能也參與在 EGF signaling 所活化的基因轉錄機制中。P300 也參與在 1.4.1 所介紹 EGF 所誘導的 *Egr-1* 及 *keratin 16* 基因活化的機制中：在 EGF 的刺激下 p300 會被吸引至基因的啟動子區域，ERK 會磷酸化 p300 並活化其 HAT 活性，同時，相關轉錄因子被 p300 進



行 acetylation 後，亦可促進彼此之間的交互作用，並同使 histone 3 tail 被 acetylation (Gregg and Fraizer, 2011; Wang and Chang, 2003)。

Nucleosomal remodeling

Nucleosome 為 chromatin 結構的基本單位，由四種 histones (H2A, H2B, H3 及 H4) 形成八元體後，再由約 146 個鹼基對纏繞一又四分之三圈所形成。Nucleosomes 之間則以 linker DNA 連接，再形成結構複雜的 chromatin。當 nucleosome 之間所形成的結構較緊密時，轉錄因子便無法結合於其上，使基因無法活化，此時需要一些 chromatin remodeling complexes 來改變 chromatin 的結構，使得轉錄因子更容易結合於 DNA 上，進行基因轉錄。因此 nucleosome 的組合、拆解或位移在基因調控上也是很重要的一環。研究發現，histone modification 的狀態會吸引不同的 chromatin remodeler，進而影響 nucleosome 的合成、拆解或位移等 (Deroo and Archer, 2001)。

Singh 等人 (2011) 的研究顯示，EGF 可誘導轉錄因子 c-ETS1 結合到 *cyclin E* 及 *CDK2* 基因啟動子的 c-ETS1 responsive elements 上，並觀察到 c-ETS1 responsive elements 有 mono-nucleosome remodeling 的現象。同時他們也發現，在 EGF 刺激之下會促使 HDAC1 離開啟動子，而具有 HAT 活性的 p300 被吸引至二基因的啟動子區域，對 histone 的 Lys 9 (H3K9) 進行 acetylation (H3K9Ac)。因為 H3K9Ac 為基因活化的特徵，ChIP 實驗也發現在 EGF 刺激下，有較多的 pSer5 polymerase II 結合在二基因的啟動子區域。該研究也發現 ATP-dependent chromatin remodeler hBRM1 也會被吸引至啟動子區域，顯示在 EGF 刺激之下，不只是有 histone modifiers 參與在基因表現的機制中，同時伴隨著 chromatin remodelers 的參與。



1.5 本論文之研究目的

由於 focal adhesion 蛋白質 Cten 在 EGF 所誘導之乳癌細胞的細胞遷移機制中扮演的重要角色，且 EGF 所誘導的 Cten 表現量上升，可進一步以正回饋的方式延長 EGFR signaling 的活化時間，顯示 Cten 在 EGFR signaling 中扮演重要角色。但前人研究中，並未進一步探討 EGFR signaling 如何調控 *Cten* 基因的表現，因此本論文擬探討 EGFR signaling 調控 *Cten* 基因表現之機制，期望能建構更明確分子機制，並對治療因 Cten 過度表現而導致細胞癌化的現象有所貢獻。



二、 材料與方法

2.1 實驗材料

2.1.1 菌種

大腸桿菌 *Escherichia coli* HIT-DH5 α (RBCbioscience) 作為質體轉形、增殖及保存之宿主，其基因型為 F-(80d lacZ M15)(lacZYA-argF)U169 *hsdR17*(r-m+) *recA1* *endA1* *relA1* *deoR*。

recA : prevents DNA recombination

endA : prevents plasmid degradation during extraction

hsd : enhances transformation efficiency of selected PCR DNA strands and cDNA libraries

deoR : enhances transformation efficiency of high MW plasmids and cosmids

LacZ M15: blue-white screening

2.1.2 質體 DNA

pGL3-basic 含有螢火蟲冷光報導基因 (firefly luciferase reporter gene) 但不含啟動子之質體，可將感興趣之啟動子片段選殖於 pGL3-basic 的螢火蟲冷光基因之上游，轉染進入細胞後，偵測 luciferase 活性即可代表此 DNA 片段於細胞中之啟動子活性，pGL3-basic 於 dual luciferase assay 中當作其他含有不同啟動子片段之質體的控制組。

pRL-TK 含有水母冷光報導基因 (*Renilla* luciferase reporter gene) 之質體，於 dual luciferase assay 中會與 pGL3-質體共轉染進入細胞中，由於 pRL-TK 於細胞中可穩定表現，當作校正實驗操作誤差之控制組。

pGL3-290 帶有 *Cten* 啟動子片段 (-290~+40) 之 pGL3-basic。(Chen *et al.*, 2013)

pGL3-483 帶有 *Cten* 啟動子片段 (-483~+44) 之 pGL3-basic，由本實驗室楊寬所建構。



以下為本論文所建構之質體 (使用之引子列於表一)

- pGL3-923** 以 RWPE-1 genomic DNA 為模版利用引子進行 PCR 增殖 *Cten* 啟動子片段 (-923~+69)，以 *XhoI* / *HindIII* 選殖於質體 pGL3-Basic 上。
- pGL3-1779** 以 RWPE-1 genomic DNA 為模版利用引子進行 PCR 增殖 *Cten* 啟動子片段 (-1779~+69)，以 *XhoI* / *HindIII* 選殖於質體 pGL3-Basic 上。
- pGL3-2941** 以 RWPE-1 genomic DNA 為模版利用引子進行 PCR 增殖 *Cten* 啟動子片段 (-2941~+69)，以 *XhoI* / *HindIII* 選殖於質體 pGL3-Basic 上。
- pGL3-Egr-1** 以 RWPE-1 genomic DNA 為模版利用引子進行 PCR 增殖 *Egr-1* 啟動子片段 (-771~+35)，以 *XhoI* / *HindIII* 選殖於質體 pGL3-Basic 上。
- pGL3-intron1021** 以 RWPE-1 genomic DNA 為模版利用引子進行 PCR 增殖 1.8 kb *Cten* 啟動子片段及 1kb intron 1 片段 (-1779~+1021)，以 *XhoI* / *HindIII* 選殖於質體 pGL3-Basic 上。
- pGL3-intron1962** 以 RWPE-1 genomic DNA 為模版利用引子進行 PCR 增殖 1.8 kb *Cten* 啟動子片段及 2kb intron 1 片段 (-1779~+1962)，以 *XhoI* / *HindIII* 選殖於質體 pGL3-Basic 上。
- pGL3-intron5168** pGL3-3.5kb 以 *HindIII* 作用後，將 3 kb Intron 1 之片段 (+1962~+5168) 選殖於受 *HindIII* 作用之質體 pGL3-intron1962 上，以建構帶有 1.8 kb *Cten* 啟動子片段及 5kb Intron 1 片段 (-1779~+5168) 之質體。
- pGL3-intron1.5kb** 以 RWPE-1 genomic DNA 為模版利用引子進行 PCR 增殖 1.5 kb *Cten* intron1 3'端之片段 (+3602~+5168)，以 *XhoI* / *HindIII* 選殖於質體 pGL3-Basic 上。
- pGL3-intron3.5kb** 以 RWPE-1 genomic DNA 為模版利用引子進行 PCR 增殖 3.5 kb *Cten* intron1 3'端之片段 (+1630~+5168)，以 *HindIII* 選殖於質體 pGL3-Basic 上。



2.1.3 細胞株

人類非惡性前列腺表皮細胞株 RWPE-1、人類肺癌細胞株 A549、人類大腸癌表皮細胞株 SW480、人類子宮頸癌細胞株 HeLa、人類前列腺癌細胞株 DU145。

2.1.4 細胞培養基

Keratinocyte – serum free medium (Gibco[®], 10724-011)

含有 L-Glutamine，但 EGF 及 bovine pituitary extract 需額外添加。

Dulbecco's modified Eagle's medium (Gibco[®], 11965-092)：

含有 4.5 g/L D-Glucose (High glucose) 及 L-Glutamine 但不含 sodium pyruvate。

2.1.5 EGF 及抑制劑

Epidermal growth factors (BD, # 354052)

MEK1/2 inhibitor U0126 (Cell Signaling, #9903)

Transcription inhibitor Actinomycin D (Sigma, A9415)

HDAC inhibitor Trichostatin A

HAT p300 inhibitor Anacardic acid

2.1.6 抗體

於不同分析方法中使用之抗體列於表二



2.2 實驗儀器設備

2.2.1 核酸電泳設備

DNA 電泳槽、鑄膠器：ADVANCE, Mupid-2Plus DNA Gel Electrophoresis。

2.2.2 蛋白質電泳設備

蛋白質鑄膠器：Hoefer SE245

蛋白質電泳槽：Hoefer Mighty Small II SE250-10A-.75。

蛋白質轉印槽：Hoefer TE22 Mighty Small Transphor Unit。

電源供應器：Labnet Enduro 250V Electrophoresis Power Supplies E0202-230V

2.2.3 離心機

桌上型微量離心機：Labnet Spectrafuge Mini C1301P

桌上型離心機：Labnet Spectrafuge 24D

落地小型多用途微量高速冷凍離心機：KUBOTA 3700

桌上型多功能大容量高速離心機：Eppendorf Centrifuge 5804R 15amp version

2.2.4 其他

PCR 恆溫控制器：Biometra TPersonal Thermocyclers BM 050-552

iQ5 定量 PCR：Bio-Rad iCycler Thermal Cycler w/ iQ5 optical module for
RT-PCR

UVP DNA 影像系統：UVP BioCoc-It 220

UVP 西方點墨法影像系統：UVP BioSpectrum 510

超微量分光光度計：Thermo Scientific NanoDrop 2000 Spectrophotometer

微盤式冷光偵測儀：Orion L Microplate Luminometer 112 900 50

超音波細胞破碎儀：Misonix Sonicator 3000

精密恆溫水浴槽：Firstek Water Bath B206-T1



乾浴槽：Block Incubator BI-516c

迴轉振盪器：Orbital Shaker Firstek S101

振盪器：Rocking Shaker Firstek RS101

旋渦震盪器：Vortex-GENIE 2

精密天秤：Mettler Toledo ML303

顯微鏡：Olympus CKX41 Microscope

pH meter：Mettler-Toledo S20 SevenEasy pH meter

ELISA reader：Thermo multiskan FC ELISA photometer

2.3 實驗方法

2.3.1 細胞實驗

2.3.1.1 細胞培養

人類非惡性前列腺表皮細胞株 RWPE-1 於 10-cm 細胞培養皿中以 10 mL 已添加 human recombinant EGF (10 ng/mL)、bovine pituitary extract、100 µg/mL streptomycin 及 100 units/mL penicillin (Gibco[®], 15140-122) 之 keratinocyte – serum free medium (SFM) 於 37°C、5% CO₂ 細胞培養箱中進行培養。

人類肺癌表皮細胞株 A549、人類大腸癌表皮細胞株 SW480、人類子宮頸癌細胞株 HeLa 及人類前列腺癌表皮細胞株 DU145 皆於 10-cm 細胞培養皿中以 10 mL 已添加 10% (v/v) fetal bovine serum (FBS)、100 µg/mL streptomycin 及 100 units/mL penicillin 之 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) 於 37°C、5% CO₂ 細胞培養箱中進行培養。

2.3.1.2 細胞繼代

RWPE-1:

去除 RWPE-1 細胞培養液，以 8 mL 無菌之 PBS 潤洗細胞一次，去除 PBS 後加入 1.5 mL 0.05% trypsin-EDTA (Gibco[®], 25300-054)，於 37°C



細胞培養箱中反應 11 分鐘，再以 4.5 mL 含有 10% (v/v) FBS 之 DMEM 抑制 trypsin 活性。將溶液於 15 mL 離心管中以 200 xg 離心 5 分鐘，去除上清液後，以 6 mL 培養液懸浮細胞，取 1 mL 細胞懸浮液加入 9 mL 新鮮細胞培養液於 10-cm 細胞培養盤中以 37°C 進行培養。

其他細胞株:

去除 A549 細胞培養液，以 8 mL 無菌之 PBS 潤洗細胞一次，去除 PBS 後加入 1.5 mL 0.05% trypsin-EDTA，於 37°C 細胞培養箱中反應 5 分鐘，再以 4.5 mL 含有 10% (v/v) FBS 之 DMEM 抑制 trypsin 活性。將溶液於 15 mL 離心管中以 200 xg 離心 5 分鐘，去除上清液後，以 6 mL 培養液懸浮細胞，1 mL 細胞懸浮液加入 9 mL 新鮮細胞培養液於 10-cm 細胞培養盤中以 37°C 進行培養。

◎SW480、DU145、HeLa 之繼代方法同 A549。HeLa 最後以 10 mL 細胞培養液懸浮細胞，取 1 mL 細胞懸浮液加入 9 mL 新鮮細胞培養液於 10-cm 細胞培養盤中以 37°C 進行培養。

2.3.1.3 EGF 的處理

以血球計數盤 (hemocytometer) 計算細胞數後，取細胞數 6×10^5 /well 種於六孔細胞培養盤中，於 37°C 細胞培養箱中貼附過夜。隔日，去除培養液，以 PBS 潤洗細胞三次後置換成不含血清、抗生素之 SFM，於 37°C 細胞培養箱中培養 24 小時。去除細胞培養液，以 PBS 潤洗細胞一次並置換成含有 EGF 的培養液於 37°C 細胞培養箱中培養。



2.3.1.4 抑制劑的處理

U0126、Actinomycin D (Act. D) 及 Anacardic acid (AA)

以血球計數盤計算細胞數後，取細胞數 6×10^5 /well 種於六孔細胞培養盤中，於 37°C 細胞培養箱中貼附過夜。隔日，去除培養液，以無菌 PBS 潤洗細胞三次後並置換成不含血清、抗生素之 SFM 於 37°C 細胞培養箱中培養 24 小時。去除細胞培養液，以無菌 PBS 潤洗細胞一次，換成含有抑制劑之細胞培養液或只含 0.1% DMSO 之細胞培養液，進行前處理 1~2 小時。去除上清液，以無菌 PBS 潤洗一次後，置換成含有 0.1% DMSO 之細胞培養液、含有 0.1% DMSO 及 EGF 的細胞培養液或含有 EGF 及抑制劑的細胞培養液，於 37°C 細胞培養箱中培養。

Trichostatin A (TSA)

以血球計數盤計算細胞數後，取細胞數 6×10^5 /well 種於六孔細胞培養盤中，於 37°C 細胞培養箱中貼附過夜。隔日，去除培養液，以無菌 PBS 潤洗細胞三次後並置換成不含血清、抗生素之 SFM 於 37°C 細胞培養箱中培養 24 小時。去除細胞培養液，以無菌 PBS 潤洗細胞一次，換成含有抑制劑 TSA 但不含 EGF 之細胞培養液於 37°C 細胞培養箱中培養。

2.3.1.5 細胞轉染 (Transfection)

本論文使用兩種 transfection 試劑：

Lipofectamine 2000[®] Transfection Reagent (Invitrogen, 11668-019)

以 12 孔細胞培養盤為例，將 $1.6 \mu\text{g}$ DNA 以 SFM 稀釋成 $100 \mu\text{L}$ ，同時取 $4 \mu\text{L}$ Lipofectamine 2000[®] transfection reagent 以 SFM 稀釋成 $100 \mu\text{L}$ ，靜置室溫 5 分鐘。將上述溶液以 1:1 比例混合後，靜置室溫 20 分鐘。每一孔加入 $200 \mu\text{L}$ 之轉染混合物，混合均勻後置於 37°C 細胞培養箱中。其餘條件參照廠商建議之操作流程。



TurboFect Transfection Reagent (Thermo, #R0531)

以 12 孔細胞培養盤為例，將 2 μg DNA 以 SFM 稀釋成 200 μL ，加入 4 μL 之 TurboFect transfection reagent，混合均勻後於室溫靜置 15 ~ 20 分鐘。每一孔加入 200 μL 之轉染混合物，混合均勻後置於 37 $^{\circ}\text{C}$ 細胞培養箱中。其餘條件參照廠商建議之操作流程。

2.3.2 DNA 分析與質體之建構

2.3.2.1 Genomic DNA 純化

以 Genomic DNA Mini Kit (Blood/Cultured Cell) (Geneaid, GB100) 進行純化，純化方法依照廠商建議之操作流程。

2.3.2.2 以聚合酶連鎖反應 (polymerase chain reaction, PCR) 增殖 DNA 片段

取 0.2 mL 微量離心管，以 100 ng 之 genomic DNA 作為模版，加入 0.5 μM 引子、200 μM dNTP、5xPhusion[®] GC buffer (含有 7.5 mM MgCl_2 ，最終反應濃度為 1.5 mM)、1 U Phusion[®] DNA polymerase (Thermo)，以無菌水調整體積至 50 μL ，置入 PCR 恆溫控制器中進行反應。根據廠商建議之 Finnzymes' Tm calculator 計算引子 Tm 值，若 Tm 值大於 69 $^{\circ}\text{C}$ (> 20nt) 則以 2-step protocol 進行反應，反應條件如下：

Step 1 Initial denaturation : 98 $^{\circ}\text{C}$, 30 sec

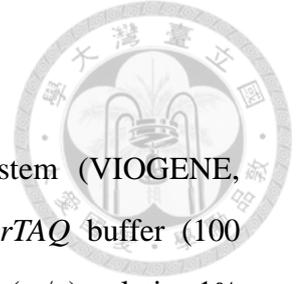
Step 2 Denaturation : 98 $^{\circ}\text{C}$, 10 sec

Step 3 Annealing/Extension : 72 $^{\circ}\text{C}$, 30 sec/kb

Step 4 Final extension : 72 $^{\circ}\text{C}$, 10 min

重複 Step2、3，進行 30 cycles。

(增殖啟動子之引子列於表一)



2.3.2.3 TA cloning

將 PCR 增殖產物以 Gel/PCR DNA Isolation System (VIOGENE, GP1002) 進行純化。於純化過之產物中，加入 10xPowerTAQ buffer (100 mM Tris-HCl, pH 9.0; 500 mM KCl, 15 mM MgCl₂, 0.1% (w/v) gelatin, 1% Triton X-100)、100 μM dNTP (以 dNTP 代替 dATP)、1 U PowerTAQ DNA polymerase (GeneTeks, GP5500)，以無菌水調整體積至 20 μL，於 PCR 恆溫控制器中以 72°C 反應 20~30 分鐘。

本論文嘗試使用兩種 TA cloning system：(1) StrataClone™ PCR Cloning Kit (Agilent Technologies, 240205-5) (2) pGM-T Ligation Kit (TIANGEN, VT202-01)。TA cloning 方法依照廠商建議之操作流程。

2.3.2.4 重組質體之轉型與篩選

將大腸桿菌 *E.coli* DH5α (100 μL/管) 於 -80°C 冰箱取出後於冰上解凍，加入適量 TA cloning 或 ligation 反應液 (體積需小於大腸桿菌之十分之一體積)，以手指輕彈使其混合均勻後置冰浴中靜置 30 分鐘，42°C 乾浴槽加熱 45 秒，立刻置冰浴 5 分鐘，之後加入 1 mL 之 LB 液態培養基 (1% Bacto tryptone, 0.5% yeast extract, 1% NaCl, pH 7.0) 混合均勻，於 37°C 震盪培養 1 小時。將菌液以 3000 xg 進行離心 10 分鐘並倒去上清後，加入 200 μL LB 液態培養基後，塗抹於含 100 μg/mL ampicillin 之 LB 固態培養基 (1% Bacto tryptone, 0.5% yeast extract, 1% NaCl, 1.5% Bacto agarose, pH 7.0) 上，若需進行藍白篩選，塗抹菌液前先塗抹 40 μL 2% X-gal 於 LB 固態培養基上) 上，培養皿於 37°C 倒置培養 16~20 小時。已長菌之藍白篩選培養皿，可置於 4°C 冰箱中過夜，使偽陽性 (false positive) 之菌落顏色加深。挑選轉形成功之白色單一菌落於 5 mL 含有 ampicillin (100 μg/mL) LB 液態培養液中，於 37°C、150 rpm 培養 16~20 小時。



2.3.2.5 質體純化

以 Gene-Spin™ MiniPrep Plasmid Purification Kit – V² (Protech Technology, PT-MP530XL-V2) 進行純化，純化方法依照廠商建議之操作流程。

2.3.2.6 質體 DNA 之限制酶分析

取 1 μg 質體 DNA 加入 2 μL 之 10x restriction enzyme reaction buffer (依照限制酶選擇適用的 buffer 系統) 以及 10x BSA，再加入 1 μL 限制酶 (New England Biolab, NEB)，以無菌水調整體積至 20 μL，於 37°C 反應 1 小時，再以 65°C 加熱 20 分鐘，終止反應後置於冰上。

2.3.2.7 DNA接合法 (DNA ligation)

取適量經適當限制酶作用之 vector 及 insert DNA 片段，以 vector : insert = 1:3 之比例，調整成 vector + insert = 150 ng，加入 2 μL 之 10x T4 DNA ligation buffer (L603L, Enzymatics) 及 1 μL 之 T4 DNA ligase (L603-LC-F, Enzymatics)，以無菌水調整體積至 20 μL，於 22~26°C 反應 1~2 小時，取 5~10 μL 之 ligation 混合物進行重組質體之轉型。

2.3.2.8 DNA瓊脂糖膠體電泳法

瓊脂糖 (agarose) 濃度為 1.2%，秤取適量的 agarose 粉末於 1xTAE (40 mM Tris-acetate, 1 mM EDTA, pH 8.0) 中，製備時於微波爐加熱溶解之瓊脂糖溶液內加入 10000 倍稀釋之 SYBR[®] Safe DNA gel stain (Invitrogen, S33102)，電泳緩衝液為 1xTAE。DNA 樣品加入 1/10 體積之 10x 電泳追蹤染劑 (50% glycerol, 0.25% bromophenol blue, 0.25% xylene cyanol, 0.1 M EDTA, pH 8.0)，混勻後加入電泳膠體樣品槽內，以電壓 100 V 進行電泳。待追蹤染劑 bromophenol blue 移動至膠體約三分之二處時即停止電泳，以 UVP DNA 影像系統觀察結果。



2.3.2.9 DNA 片段之純化

將瓊脂糖膠體電泳分離之 DNA 片段或 PCR 產物以 Gel/PCR DNA Isolation System (VIOGENE, GP1002) 進行純化，純化方法依照廠商建議之操作流程。

2.3.3 RNA 分析

2.3.3.1 RNA 純化

以 RNAspin Mini (GE Healthcare, 25-0500-71) 進行純化，純化方法依照廠商建議之操作流程。

2.3.3.2 製備 cDNA

以 Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit (Roche, 04 896 866 001, version 06) 進行反轉錄，本論文選用 anchored-oligo (dT)₁₈ 作為反轉錄之引子，其餘操作方法依照廠商建議之操作流程。

2.3.3.3 定量PCR (quantitative PCR, qPCR)

取 2 μ L 稀釋五倍之 cDNA，加入 10 μ L 2xiQTM SYBR® Green Supermix (BIO-RAD, #170-8882AP)，400 nM 之 forward primer 及 reverse primer (stock 20 μ M 取 0.4 μ L)，再以無菌水調整體積至 20 μ L。以 iQ5 定量 PCR machine (BIO-RAD) 進行定量 PCR。反應條件如下：

Step 1 95°C, 3 min (機器會自動在 step 1 前加入 95°C, 1 min)

Step 2 95°C, 10 sec

Step 3 60°C, 30 sec (重複 Step 2、3，進行 40 cycles。)

Step 4 95°C, 60 sec

Step 5 55°C, 60 sec

Step 6 Melting curve：從 55°C 開始每 30 秒上升 0.5°C 直到 95°C。

(增殖基因 cDNA 之引子列於表三)



2.3.4 蛋白質分析

2.3.4.1 蛋白質膠體電泳

以 10% SDS-聚丙烯醯胺膠體電泳 (SDS-PAGE) 進行蛋白質檢測，鑄膠方法及配方依酵素純化與分析實驗之實驗講義 (莊榮輝, 2010) 進行。將蛋白質樣品加入等體積之 2x 樣品緩衝液 (100 mM Tris-HCl, 4% SDS, 10% β -mercaptoethanol, 0.2% bromophenol blue (w/v), 20% glycerol, pH 6.8) 混合均勻，於 100°C 沸水浴中加熱 10 min 後，置於冰浴冷卻。此時將膠片裝置於電泳槽中，以電泳緩衝液 (25 mM Tris-HCl, 192 mM glycine, 1% SDS, pH 8.3) 沖洗樣品槽。將冷卻之樣品經短暫離心後，取 20 μ g 之蛋白質樣品注入樣品槽中，以 140 V 進行電泳約 75 min，待追蹤染劑泳動出膠體下後停止電泳。

2.3.4.2 Western blotting 分析

蛋白質轉印 (Towbin *et al.*, 1979)

將電泳膠片浸泡於轉印緩衝液 (25 mM Tris-HCl, 192 mM glycine, pH 8.3; 10% methanol) 中平衡 10 min。取 PVDF 轉印膜 (Immobilon[®] Transfer Membrane, Millipore IPVHH 00010) 浸於 100% 甲醇數秒後，同樣以轉印緩衝液平衡。由轉印夾上負極往正極方向，依序放上海綿、濾紙、膠片、PVDF 轉印膜、濾紙、海綿，各層間不可有氣泡，將轉印夾置入已有預冷轉印緩衝液之轉印槽中，以 400 mA 電流轉印 60 min。

免疫呈色法 (Burnette, 1981)

將轉印後之 PVDF 轉印膜以 western washing buffer (50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 0.1% Tween-20, pH 7.5) 清洗數次。加入 10 mL Gelatin-NET (0.25% gelatin, 0.15 M NaCl, 5 mM EDTA \cdot 2Na, 50 mM Tris-HCl, 0.05% (v/v) Tween-20) 於室溫下反應 1 小時，加入 10 mL 以 Gelatin-NET 稀釋之一次抗體反應反應條件列於表二。以 western washing buffer 洗三次，每次 10 分鐘，再加入 10 mL 以 Gelatin-NET 稀釋之二



次抗體，於室溫反應 1 小時，以 western washing buffer 洗三次。取 ECL 呈色劑 (Millipore, WBKLS0500) 之偵測試劑 A 及 B 各 500 μ L 混合均勻後使其均勻分佈於轉印膜上，以 UVP 西方點墨法影像系統觀察結果。

2.3.5 Dual luciferase assay

以 Dual-Luciferase[®] Reporter Assay System (Promega, E1910) 進行實驗，以 12 孔細胞培養盤為例，將轉染後之細胞以無菌 PBS 潤洗三次後，每孔加入 250 μ L 一倍 passive lysis buffer，置於 shaker 上於 4°C 反應 15 分鐘。取 20 μ L 的 cell lysate 加入 96 孔白盤中，再加入 50 μ L luciferase assay reagent II (LAR II)，立即以微盤式冷光偵測儀 (Berthold, Orion L Microplate Luminometer) 偵測 firefly luciferase 活性。再加入 50 μ L 1 倍之 Stop & Glo[®] reagent (substrate + buffer)，以微盤式冷光偵測儀偵測 *Renilla* luciferase 活性。其餘條件或操作方法依照廠商建議之操作流程。

2.3.6 Chromatin accessibility by real-time PCR (CHART PCR)

2.3.6.1 細胞準備

將 RWPE-1 以無血清細胞培養液培養 24 小時後，以含有 100 ng/mL EGF 之 SFM 處理 4 小時，控制組則繼續以無血清培養。除去培養液並將細胞以 PBS 潤洗一次後，將細胞進行 trypsinize，以 DMEM 懸浮後再以 200 xg 進行離心 5 分鐘，去除上清液，以預冷之 PBS 進行潤洗，再以 200 xg 進行離心 5 分鐘，去除上清。



2.3.6.2 細胞核沉澱 (Nuclei purification)

以 1 mL NP-40 lysis buffer (10 mM Tris-HCl, 10 mM NaCl, 3 mM MgCl₂, 0.5% NP-40, 0.15 mM spermine • 4HCl, 0.5 mM spermidine) 懸浮細胞沉澱，靜置冰上 5 min，以 2000 rpm 離心 5 min，去除上清及獲得細胞核沉澱。

2.3.6.3 MNase 作用

將細胞核以 1xMNase digestion buffer 潤洗一次，以 200 xg 進行離心 5 分鐘，去除上清。於細胞核中加入 1x MNase digestion buffer、1x BSA，再以 200 U MNase 與細胞核，以水調整體積至 50 μ L，反應 0、5、15、20 min。

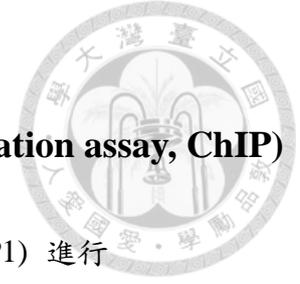
2.3.6.4 Genomic DNA 純化與 qPCR

以 Genomic DNA Mini Kit (Blood/Cultured Cell) (Geneaid, GB100) 進行純化，純化方法依照廠商建議之操作流程。以 100 ng genomic DNA 為模版進行 qPCR，qPCR 條件同 2.3.3.3。

(CHART PCR 實驗中增殖啟動子之引子列於表四)

2.3.6.5 CHART PCR 計算方式

各組 primers 先以序列稀釋之 RWPE-1 genomic DNA 為模版進行 qPCR，以 Ct 值及 log (ng of genomic DNA) 作圖，得到標準曲線。將 Ct 值與各組 primer 的標準曲線進行比較，換算成相對量，並將 MNase 作用 0 min 的 *Cten* 啟動子片段含量作為 100%，計算其它時間點的 *Cten* 啟動子片段相對含量



2.3.7 染色質免疫沉澱 (Chromatin Immunoprecipitation assay, ChIP)

本實驗以 Imprint Chromatin Immunoprecipitation Kit (Sigma, CHP1) 進行

2.3.7.1 Bind antibody to the assay wells

以 150 μ L antibody buffer 潤洗 stripwells 一次，將 1 μ g 抗體加入 100 μ L antibody buffer 中，混合均勻後加入 stripwells 中，以 parafilm 覆蓋 stripwells 後於 orbital shaker 上於室溫以 100 rpm 反應 60 ~ 90 分鐘。Anti-normal mouse IgG 抗體當作負控制組，anti-RNA polymerase II 抗體當作正控制組。

2.3.7.2 Cell culture sample preparation

將約 2×10^6 無血清培養之細胞或處理 EGF 之細胞以無菌 PBS 潤洗一次後，於 37°C 進行 trypsinize 5 分鐘，以含有 FBS 之 DMEM 懸浮細胞，於 15 mL 離心管中以 200 xg 離心 5 分鐘，去除上清後以 10 mL 無菌 PBS 懸浮細胞，再以 200 xg 離心 5 分鐘，去除上清後以 9 mL 正常細胞培養液懸浮細胞，加入 270 μ l 37% formaldehyde 使最終濃度為 1% 進行蛋白質-DNA cross link，於 orbital shaker 上以 100 rpm 室溫反應 10 分鐘。加入 1mL 1.25 M glycine 溶液終止反應，以 200 xg 離心 5 min，去除上清後以 10 mL 冰的無菌 PBS 潤洗細胞三次，期間以 200 xg 離心 5 分鐘並去除上清。

以 400 μ L Nuclei Preparation Buffer 懸浮細胞沉澱後，至於微量離心管中於冰上靜置 10 分鐘，以 vortex 劇烈震盪 10 秒後，以 200 xg 離心 5 分鐘。以尖頭吸管小心去除上清後，以 300 μ L 含有 protease inhibitor cocktail (1:100) 之 shearing buffer 懸浮細胞核沉澱，於冰上靜置 10 分鐘，期間偶爾進行 vortex。接著於冰上以超音波細胞破碎儀 (Sonicator 3000) 將 chromatin DNA 震碎成片段約 200-1000 bp 之 DNA 大小 (以方法 2.3.7.3 進行電泳確認 DNA 片段大小)。以 12,000 rpm 進行離心 10 分鐘後，取上清並保存於 -80°C，或是直接進行 Protein/DNA immunoprecipitation。

2.3.7.3 Optimize shearing conditions

取 50 μ L 已進行 sonication 之產物，加入 2 μ L 5M 之 NaCl，使最終濃度為 0.2

M。於 98°C 乾浴槽中反應 15 分鐘，待回到室溫後，加入 0.5 μ L 20 mg/mL RNase A (Invitrogen, part no. 8003090) 於 37°C 乾浴槽中反應 10 分鐘，以 Gel/PCR DNA Isolation System (VIOGENE, GP1002) 進行純化並以電泳分析 DNA 片段大小。

2.3.7.4 Protein/DNA immunoprecipitation

將步驟 2.3.7.2 之上清與 dilution buffer 以 1:1 混合後 (如各 50 μ L)，取 5% (如 5 μ L) diluted supernatant 置於新的微量離心管中，並標記 “Input 5%”。

移除步驟 2.3.7.1 之 antibody solution，以 150 μ L antibody buffer 潤洗 (pipetting up and down) stripwells 3 次，每 well 加入 100 μ L diluted supernatant，蓋上 stripcaps，於 orbital shaker 上於室溫以 100 rpm 反應 60~90 分鐘。

接著去除上清後，以 150 μ L IP wash buffer 潤洗 stripwells 6 次，每次潤洗 2 分鐘，每次潤洗後可於數張擦手紙上以敲擊的方式將液體甩乾。再以 150 μ L 1xTris-EDTA buffer 潤洗 stripwells 1 次。

2.3.7.5 Cross-link reversal

於 stripwells 及 input vial 中加入 40 μ L 含有 proteinase K (1:40) 之 DNA release buffer，以 pipetting 進行混合，蓋上 stripcaps 後於 65°C 水浴槽中反應 15 分鐘。加入 40 μ L reversing solution，蓋上 stripcaps 後於 65°C 中反應 90 分鐘。

2.3.7.6 DNA purification

將 GenElute Binding Column G 置於 Collection Tube 中，加入 500 μ L Column Preparation Solution，以 12,000 xg 進行離心 1 分鐘後去除濾液。將 ChIP lysate 及 400 μ L Binding Solution 混合後，短暫震盪後，將溶液加入 column 中，以 12,000 xg 進行離心 1 分鐘並去除濾液。加入 500 μ L diluted Wash Solution Concentrate，以 12,000 xg 進行離心 1 分鐘並去除濾液。再以 12,000 xg 進行離心 2 分鐘使 column 離心至乾。加入 30 μ L Elution Solution 後靜置 2 分鐘，再以 12,000 xg 進行離心 2 分鐘，若想提高回收率，可將濾液重新加入 column 中再次進行離心。



2.3.7.7 PCR 及電泳分析

取 5 μ L ChIP DNA 進行 PCR，並將 PCR 產物以 1.5% 瓊脂糖膠體電泳分析。

PCR 反應條件如下：

Step 1 Initial denaturation : 95°C, 2 min

Step 2 Denaturation : 95°C, 30 sec

Step 3 Annealing : 58°C, 30 sec

Step 4 Extension : 72°C, 30 sec

Step 5 Final extension : 72°C, 10 min

重複 Step2~4，進行 50 cycles。

(ChIP 實驗中增殖啟動子之引子列於表五)



三、 研究結果

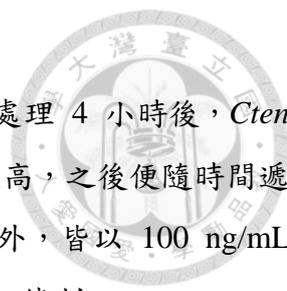
3.1 選擇適用於探討 *Cten* 表現受 EGF 調控之機制的細胞株

本論文擬探討 *Cten* 表現受 EGF 調控之機制，但由於許多癌症細胞株的 EGFR signaling 都有不正常活化的現象，本論文推測這會導致 *Cten* 的表現對 EGF 的處理不敏感，因此本論文首先於不同的細胞株中觀察 *Cten* 表現受 EGF 影響的現象，以選用適合的細胞株進行研究。本論文在人類非惡性前列腺表皮細胞株 RWPE-1、EGFR signaling 過度活化的大腸癌細胞株 SW480 及肺癌細胞株 A549 中，以 20 ng/mL EGF 處理已於無血清培養基中培養一天的細胞 24 小時，再分別利用 qRT-PCR 及 western blotting 觀察 *Cten* mRNA 或 *Cten* 蛋白質受 EGF 誘導之情形。結果顯示，不論是在 mRNA (圖 3.1 A) 及蛋白質 (圖 3.1 B) 的層次上，RWPE-1 中 *Cten* 受 EGF 誘導之現象都較 EGFR signaling 過度活化的癌症細胞株 SW480、A549 顯著。因此本論文選用 RWPE-1 進行後續的研究。

然而，除了人類非惡性表皮細胞株 RWPE-1 之外，本論文也想探討在其它癌症細胞株中 *Cten* 受 EGF 調控的機制，因此本論文也選用了於文獻中 EGFR signaling 未被發表過度活化的子宮頸癌細胞株 HeLa 及前列腺癌細胞株 DU145 進行部份研究，實驗也證實 HeLa 及 DU145 分別在 EGF 處理 8~12 及 24 小時後，可觀察到 *Cten* 有最高的蛋白質含量 (圖 3.1 C, D)，因此本論文也選用 HeLa 及 DU145 進行後續部份的研究。

3.2 不同 EGF 濃度及處理時間對 RWPE-1 細胞株中 *Cten* 表現的影響

初步實驗證實 EGF 可誘導 RWPE-1 細胞株中 *Cten* 的表現，接著想進一步觀察處理不同條件的 EGF 對 RWPE-1 細胞株中 *Cten* 表現的影響。首先以不同濃度的 EGF 處理已於無血清培養基中培養一天的 RWPE-1 24 小時，抽取細胞的 total RNA 並反轉錄成 cDNA 後，進行 qPCR 分析。結果顯示，以 100 ng/mL EGF 刺激 24 小時後可誘導 *Cten* mRNA 的累積量達到最高 (圖 3.2 A)。再進一步以 100 ng/mL EGF 處理



不同時間，觀察 Cten 於不同時間點的蛋白質含量，發現在 EGF 處理 4 小時後，Cten mRNA(圖 3.2 B) 及 Cten 蛋白質 (圖 3.2 C) 之累積量都可達到最高，之後便隨時間遞減。根據圖 3.2 結果，之後的實驗除了 3.4 啟動子活性的研究以外，皆以 100 ng/mL EGF 處理 RWPE-1 4 小時的條件，探討 Cten 表現受 EGF 調控之機制。

3.3 EGF 於 RWPE-1 中藉由活化 ERK 進而調控 Cten 表現

EGFR signaling pathway 下游的訊息傳導路徑很複雜，前人研究已於人類正常乳腺細胞株 MCF10A 中證實 EGF 是透過 MEK-ERK cascade 調控 Cten 的表現 (Katz *et al.*, 2007)，當細胞中的 EGFR signaling 被活化後，活化的 MEK 會對 ERK 進行磷酸化 (pERK) 並使其活化，pERK 會進入細胞核中進一步磷酸化相關轉錄因子或參與下游基因調控。因此本論文首先也針對 RWPE-1 中 EGF 是否透過 MEK-ERK cascade 調控 Cten 的表現進行瞭解。本論文選用 MEK inhibitor U0126 來抑制 MEK 活性，使其無法磷酸化 ERK 並抑制其活性後，觀察 Cten 受 EGF 誘導表現是否會被抑制。結果顯示，U0126 的確可抑制 EGF 誘導之 Cten 表現量 (圖 3.3 A)。

然而 ERK 的磷酸化情形卻不符合預期，原本預期 EGF 的誘導可促使 ERK 磷酸化程度上升，且 U0126 則會抑制 ERK 磷酸化，但圖 3.3 A 所呈現的結果卻與預期相反。過去研究顯示，ERK 活化的動態有兩種：transient activation 及 sustain activation，前者 ERK 磷酸化的程度會在 EGF 刺激後的短時間內達到最高，之後隨時間遞減；而後者 ERK 磷酸化的程度可持續到 24 小時。因此本論文推測 RWPE-1 中 ERK 受 EGF 的活化動態為 transient activation，於是本論文以 EGF 刺激 RWPE-1 後，於不同時間點觀察 ERK 磷酸化程度的變化。結果顯示，Cten 蛋白質含量在 EGF 處理 4 小時 (240 min) 後會達到最高 (圖 3.3 B, lane 6)，而 ERK 磷酸化的程度卻在 EGF 刺激 5 分鐘後達到最高 (圖 3.3 B, lane 2)，之後便隨時間遞減，表示 RWPE-1 中 ERK 磷酸化的動態如本論文所推測的是屬於 transient activation。接著，為了證實 U0126 可抑制 ERK 磷酸化，本論文選擇於 EGF 處理 0、5、30 分鐘後，觀察 ERK 磷酸化受 U0126 之影響。結果顯示，



在處理 U0126 後的可抑制 EGF 所誘導的 ERK 磷酸化現象 (圖 3.3 C)。此部分實驗證實本論文所選用之 RWPE-1 也是透過 MEK-ERK cascade 來調控 Cten 蛋白質含量。

3.4 於轉錄層次探討 Cten 受 EGF 誘導之機制

瞭解 EGF 於 RWPE-1 細胞株中是透過 MEK-ERK cascade 調控 Cten 的表現後，本論文想進一步探討 EGF 如何透過基因表現層次調控 Cten 的表現。許多受 EGF 調控之基因，是由於 EGFR signaling 促使一些轉錄因子結合到基因啟動子 (promoter) 中的 *cis-acting elements* 上，進而提高啟動子活性促使基因轉錄，於是本論文推測 Cten 表現受 EGF 調控的機制可能在啟動子轉錄層次上。

為了探尋 *Cten* 啟動子上與 EGF 調控有關的 *cis-acting elements*，本論文首先以 PCR 法合成包含轉錄起始點上游 1779 bp 至轉錄起始點下游 69 bp (包含 exon1) 約 1.8 kb 之 *Cten* 啟動子區域 (圖 3.4 A, 方法參照材料與方法 2.3.2)，將之選殖於 pGL3-basic 之螢火蟲報導基因的上游，建構出質體 pGL3-1779，再將之轉染進入 RWPE-1 細胞株後，進行無血清培養及處理 EGF，並以 dual luciferase reporter assay 分析 *Cten* 啟動子活性是否會受 EGF 刺激而上升。本論文發現 pGL3-1779 雖然具有相對於不含啟動子的 pGL3-basic 約 40 倍的啟動子活性，但 EGF 的刺激與否卻不影響其活性 (圖 3.4 B)。進一步探討更上游的區域 (-2941) 或往下游縮減 (包含 -923, -483, -290) 也都沒有發現 *Cten* 啟動子活性受 EGF 誘導的現象 (圖 3.4 B)。

為了證明 *Cten* 啟動子活性不受 EGF 所誘導之結果並非實驗操作不正確或 EGF 降解，本論文建構帶有 *Egr-1* 啟動子 (約 800 bp) 之質體 pGL3-*Egr-1*，由於前人研究顯示 *Egr-1* 基因的啟動子區域中含有數個 serum response elements，且該基因會受 EGF 誘導而表現 (Gregg and Fraizer, 2011)，因此本論文將 pGL3-*Egr-1* 轉染進入 RWPE-1 中做為 positive control，分析啟動子活性受 EGF 誘導之情形。結果顯示，EGF 可誘導 *Egr-1* 啟動子活性上升約三倍 (圖 3.4 C)，進一步證明目前已分析之 *Cten* 啟動子區域的活性並不受 EGF 所誘導。



3.5 EGF 對 *Cten* mRNA 穩定性的影響

後轉錄 (post-transcription) 調控也是影響基因表現很重要的機制之一，研究顯示 EGF 的刺激可能會促使一些 RNA 結合蛋白質結合到 RNA 的特定區域，影響該 RNA 之穩定性 (Chen and Shyu, 1995; Weiss and Liebhaber, 1995)。基於 3.4 結果，本論文發現 EGF 調控 *Cten* 表現的機制可能不在啟動子轉錄層次上，因此本論文推測 EGFR signaling 可能在後轉錄的層次上調控 *Cten* mRNA 的累積。本論文首先以 100 ng/mL EGF 處理已於無血清培養基中培養一天之 RWPE-1 4 小時，目的為誘導 *Cten* mRNA 進行轉錄，再以 10 nM 轉錄抑制劑 actinomycin D 進行前處理 2 小時，抑制細胞中新的 *Cten* mRNA 產生，接著同時處理不含或含有 EGF 及 actinomycin D 之細胞培養液，於不同時間點分析 *Cten* mRNA 的含量。圖 3.5 結果顯示，在 EGF 的刺激下，*Cten* mRNA 的穩定性相較於未處理 EGF 的組別並沒有顯著的提升，因此排除 EGF 調控 *Cten* mRNA 穩定性的可能。

3.6 於表觀基因調控層次探討 *Cten* 受 EGF 誘導之機制

基因表現的差異性除了轉錄層次調控啟動子活性及後轉錄層次影響 mRNA 穩定性之外，表觀基因調控 (epigenetic regulation) 也是近年來被廣泛探討可影響基因表現的重要調控層次。根據 3.4 及 3.5 的實驗結果，本論文已排除 EGF 透過轉錄層次及後轉錄層次影響 *Cten* 的表現，於是本論文推測 EGFR signaling 誘導 *Cten* 的表現可能經由表觀基因調控。已有研究顯示，短暫性轉染 (transient transfection) 到細胞的質體，其 DNA packaging 與細胞中 chromatin 的結構不盡相同 (Deroo and Archer, 2001)，若基因表現是受 chromatin remodeling 的調節，利用質體轉染的方法可能無法反映這種調控機制，目前已知的表觀基因調控機制包含 chromosome looping、nucleosome positioning、histone modification 及 DNA methylation 等 (Chen *et al.*, 2010)。由於 *Cten* 啟動子區域中並沒有典型的 CpG island，因此，先排除 DNA methylation 參與調控的可能性。而 chromosome looping 可能牽涉到一些如 enhancer 的 DNA 區域，但 enhancer 的位置並不一定，並且目前沒有足夠的實驗證據指出參與調控 *Cten* 表現的 enhancer 區域，因此本論文先探討 nucleosome positioning 及 histone modification 參與 *Cten* 受 EGF 調控機制的可能性。



3.6.1 以 nucleosome positioning 探討 EGF 調控 Cten 表現之機制

針對 nucleosome positioning, 本論文初步假設 *Cten* 啟動子區域的 accessibility 會因為 EGF signaling 的活化而提高, 導致 *Cten* mRNA 的表現量上升。因此, 首先利用 Chromatin accessibility by real-time PCR (CHART-PCR, 圖 3.6 A, modified from Rao *et al.*, 2001) 的方法來測試此假設是否成立。此方法之原理是以 micrococcal nuclease (MNase) 進行分析, MNase 為一種非專一性之 endo/exonuclease, 於適當反應條件下可分解 chromatin 結構較鬆散之處, 如圖 3.6 A 所示, 若未受刺激的細胞中, 某段會受調控之區域其 chromatin 結構較緊密, 因此 MNase 較無法作用; 當接受刺激後, 可能促使該區域發生 nucleosome positioning 導致該區域的 chromatin 結構較為鬆散, MNase 得以對其進行分解, 接著純化 genomic DNA 進行 qPCR 分析調控之區域, 若其結構鬆散而被 MNase 分解, 則其 PCR 產物會在 qPCR 的過程中於較晚的 cycle 才被偵測到, 以此結果表示 MNase 對該區域的 accessibility 較好。

本論文針對圖 3.4 結果, 將具有啟動子活性之 1.8 kb 分成六個區域, 並設計專一性引子 (圖 3.6 B) 進行 CHART-PCR。圖 3.6 C 結果顯示, 在 MNase 作用不同時間後, MNase 對處理 EGF 的細胞之 *Cten* 啟動子之 accessibility 都較好, 表示 *Cten* 啟動子在 EGF 刺激之後, 其 chromatin 結構較為鬆散, 推測可能可以使一些轉錄因子更容易結合, 促進基因之轉錄。

3.6.2 以 histone modification 探討 EGF 調控 Cten 表現之機制

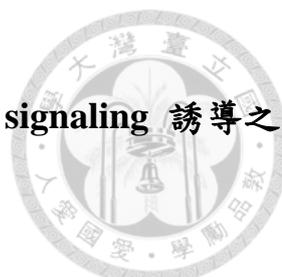
Nucleosome positioning 的機制是透過一些 chromatin remodeler 來改變 nucleosome 的位置, 而研究發現, 通常 histone tail 會先被修飾之後, 這些 chromatin remodeler 才會被吸引至啟動子區域 (Fyodorov and Kadonaga, 2001), 因此本論文也探討 histone modification 參與調控 *Cten* 表現的可能性。目前已知的 histone modification 包含 acetylation, methylation, ubiquitination, sumoylation, phosphorylation



等，本論文初步先探討 histone acetylation 參與調控 *Cten* 表現的可能性，細胞中調控 acetylation 的酵素有二類，分別為 histone acetyltransferase (HAT) 與 histone deacetylase (HDAC)，當 histone tail 被 acetylation 後，被中和正電荷的 histone tail 與帶負電 DNA 之間的吸引力較小，使 chromatin 結構較鬆散，轉錄因子較能結合至 DNA 上並促進基因轉錄。本論文假設在沒有 EGF 的情況下，會有一些 HDAC 結合到 *Cten* 啟動子上對 histone tail 進行 deacetylation，使 *Cten* 啟動子的 chromatin 結構較緊密，導致基因無法表現；而在 EGF 刺激之下，這些 HDAC 可能會被趕走或吸引一些 HAT 至 *Cten* 啟動子上對 histone tail 進行 acetylation，使 *Cten* 啟動子的 chromatin 結構較鬆散，基因得以表現。

針對 HDAC 的假設，本論文嘗試使用廣泛性的 HDAC 抑制劑 Trichostatin A (TSA) 處理沒有 EGF 刺激的 RWPE-1，結果顯示，不同濃度的 TSA 並不會增加 RWPE-1 細胞株中 *Cten* mRNA 表現量 (圖 3.7 A) 及 *Cten* 的蛋白質含量 (圖 3.7 B)；另一方面，由於 *in silico* 分析 *Cten* 啟動子發現有 histone acetyltransferase p300 的可能結合位，因此，本論文利用可抑制 p300 活性的抑制劑 anacardic acid (AA) 於 EGF 誘導下同時處理細胞，結果發現 AA 可明顯的抑制 EGF 所誘導的 *Cten* mRNA 表現量 (圖 3.7 C) 及 *Cten* 的蛋白質含量 (圖 3.7 D)，且 AA 的處理並不影響 *Cten* 在缺乏 EGF 的環境中之基礎蛋白質含量 (圖 3.7 E)，顯示 p300 參與在 EGF 調控 *Cten* 表現的機制中。

除了蛋白質層次外，由於 epigenetic regulation 直接影響基因的轉錄，因此本論文以 AA 處理 RWPE-1 後，分析 *Cten* mRNA 表現，才能更瞭解 histone acetylation 對其基因表現的影響，結果顯示，AA 可顯著抑制 *Cten* mRNA (圖 3.8 A) 及 *Cten* 蛋白質 (圖 3.8 B) 受 EGF 誘導的表現量。同時，本論文也發現 *p300* mRNA 的表現量不受 EGF 及 AA 的處理而影響 (圖 3.8 C)，本論文猜測 AA 是影響了 p300 的酵素活性使其無法對 histone tail 進行 acetylation，進而抑制 *Cten* mRNA 的轉錄。



3.7 用癌症細胞株 HeLa 及 DU145 探討 Cten 受 EGF signaling 誘導之調控機制

除了非惡性的細胞，本論文也想探討癌細胞中 Cten 受 EGF signaling 調控之機制，於 3.1 已證實子宮頸癌細胞株 HeLa 及前列腺癌細胞株 DU145 之 Cten 也會受 EGF 的刺激而有蛋白質含量上升的現象。接著本論文以 AA 處理這二株癌細胞，並觀察 Cten mRNA 表現量及 Cten 蛋白質含量。結果顯示，HeLa 於此部份的實驗與 RWPE-1 具有相同的趨勢，即 AA 可抑制 EGF 所誘導之 Cten 蛋白質含量 (圖 3.9 A) 及 Cten mRNA (圖 3.9 B) 表現量上升，且不影響 p300 mRNA 的表現量 (圖 3.9 C)。而在 DU145 的部份，因為在前列腺癌組織或細胞株中，幾乎偵測不到 Cten 的蛋白質含量 (Lo and Lo, 2002)，因此 AA 處理後只檢測 Cten mRNA 的含量，結果顯示，於 DU145 中，AA 也可抑制 EGF 所誘導之 Cten mRNA 表現量 (圖 3.9 D)，但不影響 p300 mRNA 之表現量 (圖 3.9 E)。不同的癌細胞株與正常細胞株 RWPE-1 結果皆類似，顯示 EGF signaling 調控 Cten 表現的機制在目前已探討的不同細胞株中可能有類似的調控機制。

在探討 HDAC 抑制劑 TSA 是否會促進 Cten 表現的實驗中，本論文發現 TSA 並不會影響三種細胞株中 Cten 蛋白質含量 (圖 3.10 A)，由於 HeLa 細胞及 DU145 細胞在無血清培養中的 Cten 蛋白質含量較 RWPE-1 細胞中低，因此利用 western blotting 難以偵測，但本論文發現 TSA 的處理卻會促使 HeLa 細胞中的 Cten mRNA 表現量有顯著上升 (圖 3.10 B)，顯示在無血清培養的 HeLa 細胞中，TSA 可能促使 HDACs 離開 Cten 啟動子進而促進 Cten 表現。因 *P-Rex1* 基因於前人研究顯示在 RWPE-1 中可受 TSA 的誘導而表現 (Wong *et al.*, 2011)，此部分實驗也以 *P-Rex1* 基因當作 TSA 的 treatment control (圖 3.10 C)。

根據圖 3.9 A、B 及圖 3.10 B 之結果，本論文發現 HeLa 細胞株中，HAT p300 抑制劑 AA 的處理可抑制 EGF 誘導之 Cten 蛋白質及 Cten mRNA 的表現量，而 HDAC 抑制劑 TSA 的處理可提高 Cten mRNA 在不含 EGF 情形下的表現量，符合 3.6.2. 中



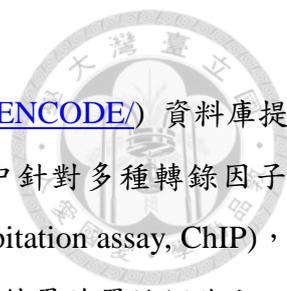
針對 histone acetylation 與 *Cten* 基因表現之假設，因此接著利用 HeLa 細胞株進一步探討 *Cten* 受 EGF signaling 調控於表觀基因層次之分子機制。

首先，本論文也想針對 HeLa 細胞株中 EGF 是否透過 MEK-ERK cascade 調控 *Cten* 的表現進行瞭解。本論文利用 MEK inhibitor U0126 來抑制 MEK 活性，使其無法磷酸化 ERK 並抑制其活性後，觀察 HeLa 細胞株中 *Cten* 受 EGF 誘導表現是否會被抑制。結果顯示，U0126 的確可抑制 HeLa 細胞株中 EGF 誘導之 *Cten* 蛋白質含量 (圖 3.11)，且 ERK 受 EGF 刺激後快速磷酸化的程度有受 U0126 處理而抑制並延遲的現象 (圖 3.11，比較 lane 2 及 lane 3)。此部分實驗證明，在 HeLa 細胞株中 EGF 也是藉由活化 MEK-ERK cascade 進而調控 *Cten* 的表現。

接著，本論文也於轉錄層次探討 HeLa 細胞株中 *Cten* 受 EGF 調控之機制。本論文將帶有不同長度之 *Cten* 啟動子質體轉染進入 HeLa 細胞中，並觀察 *Cten* 啟動子活性受 EGF 誘導之情形。結果顯示，於 HeLa 細胞株中，不同長度 *Cten* 啟動子的活性也不受 EGF 處理所影響 (圖 3.12 A)，而帶有 *Egr-1* 啟動子之質體其啟動子活性在 EGF 誘導後有顯著上升 (圖 3.12 B)。此部分實驗結果也與 RWPE-1 細胞株中類似，顯示在 HeLa 細胞株中，EGF 並非透過啟動子轉錄層次調控 *Cten* 的表現。

3.8 利用染色質免疫沉澱法探討細胞株 HeLa 中 *Cten* 受 EGF signaling 誘導之分子機制

由圖 3.9 B 及圖 3.10 B 之結果顯示，HeLa 細胞株中，EGF 透過 histone acetylation/deacetylation 調控 *Cten* 表現。經由 Genome-wide analyses 研究發現，哺乳類動物細胞中許多 histone tail 上特定 lysine 被 acetylation 的現象與基因活化有關連，例如在許多轉錄起始點 (transcription start sites, TSSs) 附近，可發現富含 H3K9Ac (acetylated histone 3 lysine 9)、H3K18Ac 及 H3K27Ac 等現象，而於 histone 4 上的 acetylation 則廣泛存在於活化的基因之啟動子區域及轉錄區域 (Wang *et al.*, 2008)。另外，利用



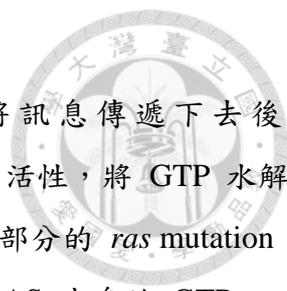
Encyclopedia of DNA Elements (ENCODE, <http://genome.ucsc.edu/ENCODE/>) 資料庫提供 ChIP-seq Experiment Matrix 的搜尋方法，該方法於不同細胞株中針對多種轉錄因子或 histone modification 進行染色質免疫沉澱 (Chromatin immunoprecipitation assay, ChIP)，並將免疫沉澱之蛋白質所結合的 DNA 序列進行 DNA 定序，將定序結果放置於網路上以供搜尋。本論文利用 ENCODE 資料庫分析 *Cten* 基因上 histone tail 可能受 acetylation 的位置，發現從啟動子、exon1 至 intron1 都具有 H3K9Ac 的修飾訊號 (圖 3.13)，因此，本論文首先選擇 H3K9Ac 做為探討是否會受 EGF 調控的目標。本論文以 100 ng/mL EGF 處理已於無血清培養一天之 HeLa 細胞株 12 小時，控制組則繼續進行無血清培養，收取細胞後以 1% formaldehyde 進行蛋白質-DNA cross-link，並以超音波震盪將 chromatin 震碎成約 200-1000 bp 之 DNA 片段，利用瓊脂糖膠體電泳分析 DNA 片段大小 (圖 3.14 A)，利用 anti-H3K9Ac、anti-IgG 抗體進行免疫沉澱，純化 DNA 後以專一性偵測 *Cten* 啟動子之引子進行 PCR，並以瓊脂糖膠體電泳分析 PCR 產物。結果顯示，EGF 的處理可造成 H3K9 被 acetylation 的修飾程度上升 (圖 3.14 B)，表示 EGF 可能透過 histone acetylation 的機制調控 *Cten* 基因的表現。



四、討論與未來研究方向

Katz 等人於 2007 年發現 EGF 誘導乳腺細胞 MCF10A 的移動是透過 tensin 3-Cten 互換的機制達成 (詳細分子機制討論於 1.3.3)，也證明 EGF 是透過 MEK-ERK cascade 調控 Cten 的表現，且在 272 個侵入性乳腺腫瘤組織樣本中發現 Cten 的蛋白質含量和同屬 ErbB 受體家族的 EGFR (HER1) 及 HER2 的高度表現量具有顯著相關，更值得注意的是 Cten 的蛋白質含量和高腫瘤級數 (high tumor grade) 及發生癌細胞轉移的能力 (metastasis) 等特性也都具有顯著相關，以上證據不僅顯示 Cten 為 EGFR signaling 下游的調控目標，也說明 Cten 在 EGFR/HER2 signaling 過度活化所誘導的乳腺腫瘤侵犯性、移動性中扮演極重要的角色。Cao 等人於 2011 年進一步發現 EGF 影響乳腺細胞移動的機制，是透過調控 tensin 3 以及 Cten 表現的差異，產生與 deleted in liver cancer 1 (DLC-1) 的不同交互作用，進一步影響 RhoA 的活性而調控 focal adhesion 及 stress fibers 的形成所達成。而 Hong 等人於 2013 年則發現 EGF 可促進 Cten 與 E3 ubiquitin ligase c-Cbl 的結合，降低 EGFR 被 ubiquitination 的現象，使 EGFR 不易被降解而得以延長 EGFR signaling 被活化的時間，突顯了 Cten 於 EGFR signaling 中的轉譯後調控功能。以上研究說明了 Cten 在 EGFR signaling 中扮演的特殊角色，但目前對於 EGF 誘導 Cten 表現的分子機制並無詳細探討。

由於將近 30% 的上皮細胞癌 (epithelia cancer) 具有 EGFR 突變或不正常活化的現象 (Kuan *et al.*, 2001)，而 EGFR/GRB2/SOS/RAS/RAF/MEK/ERK 的訊息傳導路徑中，EGFR、RAS 及 RAF 等蛋白質常因為突變而促使訊息傳導路徑過度活化。研究也指出，在一系列的大腸癌細胞株中，Cten 的高度表現與 *K-ras/B-raf* mutation 具有顯著相關，且 Cten 在大腸癌及胰臟癌細胞株中為 K-RAS 的下游調控基因之一，Cten 在 K-RAS 所誘導的細胞遷移機制中也扮演重要角色 (Al-Ghamdi *et al.*, 2011)。因此本論文推測這些突變所造成 EGFR signaling 過度活化的細胞株不適合於本論文擬探討之 Cten 表現受 EGF 調控的機制。而研究初期本論文也在具有 *K-ras* 突變的大腸癌細胞株 SW480 及肺癌細胞株 A549 中，發現 EGF 處理 24 小時的確無法明顯誘導其 Cten 的表現 (圖 3.1 A 與 B)。推究其原因可能為蛋白質 RAS 在正常情況下需要透過外界刺激活化細胞表面的受體後才會



被短暫活化成 RAS-GTP 形式，接著活化下游的 RAF 將訊息傳遞下去後，GTPase-activating proteins (GAP) 會活化 RAS 內生性的 GTPase 活性，將 GTP 水解成 GDP 後，RAS-GTP 形成不活化的 RAS-GDP 狀態。而研究發現大部分的 *ras mutation* 發生在 *Ras* 基因 exon1 的 codon 12 及 13 (Brink, 2003)，破壞了 RAS 本身的 GTPase 活性，使 ras-GTP 無法被 GAPs 抑制進而持續活化 (Bos, 1989)。因此推測突變的 ras-GTP 在 SW480 及 A549 中持續活化下游訊息傳導路徑，可能就是二細胞株對 EGF 誘導 Cten 表現不敏感的原因之一。本論文於圖 3.2 顯示在 RWPE-1 中 EGF 處理 4 小時後可觀察到有最高的 Cten mRNA 表現量及 Cten 蛋白質含量，之後便隨時間遞減，且不論是 Cten mRNA 表現量或 Cten 蛋白質含量在 EGF 處理 24 小時後皆降至與 EGF 刺激前相近的程度，本論文推測在圖 3.1 (A) 及 (B) 中無法觀察到二癌症細胞株中 Cten mRNA 及 Cten 蛋白質受 EGF 誘導表現，可能是因為於不適當的時間點進行觀察，因此我們以 EGF 刺激無血清培養之 SW480 與 A549 並於不同時間點觀察 Cten 蛋白質含量受 EGF 誘導之影響，實驗發現二癌症細胞株中的 Cten 蛋白質含量仍會受 EGF 的刺激而有所提升，接著便隨時間遞減 (結果未表)，但二癌症細胞株中 Cten 蛋白質含量受 EGF 誘導而提升的「程度」較不明顯，因此後續實驗仍使用 Cten 蛋白質含量受 EGF 誘導明顯提升的 RWPE-1 及 HeLa 進行研究。

根據圖 3.1 結果，本論文除了選擇 Cten 會受 EGF 顯著誘導的非惡性前列腺表皮細胞株 RWPE-1 之外，本論文也想探討癌細胞中 EGF 誘導 Cten 表現的機制是否和非惡性細胞中有所不同，因此本論文選擇了二株未於文獻中被發表 EGFR signaling 過度活化的子宮頸癌細胞株 HeLa 及前列腺癌細胞株 DU145 一起進行探討。本論文發現以 EGF 處理細胞株 RWPE-1 及 HeLa 雖然皆可觀察到 Cten mRNA 受誘導而表現量上升的情況，且最高表現量分別為 EGF 處理 4 小時及 12 小時，但二細胞株中 Cten 受誘導的「程度」卻有差異，RWPE-1 受 EGF 誘導 4 小時後，比起控制組 Cten mRNA 表現量約可上升約 6-8 倍 (圖 3.8 A)，但 HeLa 受 EGF 誘導 12 小時後，Cten mRNA 表現量約可上升將近 100 倍 (圖 3.9 B)，關鍵可能就在於 Cten 的組織特異性，因為在正常組織中 Cten 只大量表現於前列腺組織及胎盤組織，因此 RWPE-1 中具有較高的 Cten 蛋白質含量，所以受 EGF 誘導的程度才和內生性 Cten 蛋白質含量較少的 HeLa 有所差異。雖然



具有 EGF 誘導「程度」上的差異性，但於本論文所探討的機制中，RWPE-1 和 HeLa 幾乎具有相類似的結果：二細胞株皆是透過 MEK-ERK cascade 調控 Cten 表現 (圖 3.3 及圖 3.11)，且二細胞株受 EGF 調控的機制可能都不在啟動子轉錄層次上 (圖 3.4 及圖 3.12)，而 HAT p300/CBP 抑制劑皆可抑制二細胞株中 EGF 誘導的 Cten 蛋白質含量 (圖 3.8 A、B 及圖 3.9 A、B)，除此之外，過去研究發現，在前列腺癌組織或癌細胞株中，幾乎偵測不到 Cten 的蛋白質含量 (Lo and Lo, 2002)，圖 3.1 D 雖然可觀察到 DU145 中 Cten 蛋白質受 EGF 誘導表現的情況，但在以 UVP 冷光影像系統分析 western blotting 時，必須使用 high sensitivity mode 才能偵測 DU145 中的 Cten 蛋白質含量，並且在使用相同總蛋白質量進行分析的情形下，EGF 誘導 DU145 24 小時所偵測的最高 Cten 蛋白質含量 (圖 3.1 D) 仍和 RWPE-1 進行 EGF 誘導 4 小時的 Cten 蛋白質含量 (圖 3.1 D) 相差甚大，因此之後在表觀基因層次探討 EGFR signaling 誘導 Cten 的表現機制時，在處理 HAT 抑制劑 (圖 3.9 D) 或 HDAC 抑制劑 (圖 3.10 B) 的實驗中，DU145 的部分只以靈敏度相對 western blotting 較高的 qRT-PCR 進行偵測，本論文發現 HAT p300/CBP 抑制劑 (anacardic acid) 也可抑制 EGF 所誘導之 Cten mRNA 表現量 (圖 3.9 D)，與 RWPE-1 及 HeLa 細胞中的情況類似。而以上結果說明 EGF 於本論文所探討的不同細胞株中可能具有類似調控 Cten 表現的機制。

本論文在探討 EGF 於 RWPE-1 及 HeLa 細胞株中是否也透過 MEK/ERK cascade 調控 Cten 蛋白質含量的實驗中，發現 MEK 抑制劑 U0126 的確可抑制 EGF 所誘導 Cten 蛋白質含量上升 (圖 3.3 A 及圖 3.11 B)，但 U0126 在 HeLa 細胞株中無法完全抑制 ERK 的磷酸化現象，在圖 3.11 B 中 ERK 反而呈現「延遲」磷酸化的情況。有研究指出，ERK 延遲磷酸化的現象是由於 EGF 可同時活化 PI3K/Akt 訊息傳導路徑所造成，該傳導路徑下遊的 PDZ-binding kinase/T-LAK cell-originated protein kinase (PBK/TOPK) 可能參與在 ERK 「延遲」磷酸化的機制中。但此「延遲」磷酸化的機制並非在各種細胞株中都可觀察到 (Aksamitiene *et al.*, 2010)。

本論文於啟動子轉錄層次探討 EGF 誘導 Cten 表現的結果中，發現 EGF 的處理並不會促進目前已分析之啟動子區域的轉錄活性 (圖 3.4 B 及圖 3.12 A)。本論文推測 Cten



啟動子的更上游區域可能含有相關的 enhancer elements，本論文嘗試以包含轉錄起始點上游約 9 kb *Cten* 啟動子之質體探討其可能性，發現該質體不僅對 EGF 的處理沒有反應，甚至啟動子活性也被抑制（結果未表），可能是因為上游的啟動子區域可供一些 repressors 結合因此抑制了原本啟動子的活性。另一方面根據圖 3.13 發現許多轉錄因子會結合到 intron 1 的區域內，因此本論文也推測 intron 1 可能具有相關的調控功能。本論文分析了包含已知具有啟動子活性的 1.8kb 啟動子片區域及分別帶有 1 kb、2 kb 及全長約 5 kb intron 1 之 luciferase reporter 質體，發現含有 intron 1 片段之質體也不會因 EGF 的處理而使原本啟動子的轉錄活性提高（結果未表）。本論文也嘗試分析靠近 exon 2 5' 端上游之 intron 1 區域是否具有 alternative 啟動子活性，實驗結果發現不管是 exon 2 上游 1.5 kb 或 3.5 kb 都不具有任何轉錄活性（結果未表），因此更確定 *Cten* 基因可能不存在 alternative 啟動子。

本論文觀察到在 RWPE-1 中，以 EGF 處理四小時便可觀察到 *Cten* 蛋白質含量上升的現象（圖 3.2 B），顯示 EGF 主要於轉錄層次調控 *Cten* 表現，但本論文以 reporter assay 探討啟動子活性時，卻無法找到與 EGF 調控有關的啟動子區域（圖 3.4）。由於短暫性轉染 (transient transfection) 到細胞的質體與細胞核中 chromatin 的 DNA packaging 狀況不同，受調節的機制也不完全相同，Deroo 及 Archer (2001) 指出 glucocorticoid receptor (GR) 調控細胞中 mouse mammary tumor virus (MMTV) 啟動子需要透過 chromatin remodeling 的機制影響轉錄起始點上游第二個 nucleosome 的結構，促使轉錄因子 (NF1 and OTFs) 結合至啟動子上並協助組裝 transcription initiation complexes，進而活化啟動子轉錄活性。當細胞對 GR 的刺激不敏感時，transcription initiation 會停止，轉錄因子不再結合至啟動子上，受調節的 nucleosome 也回到 pre-hormone 的狀態，GR 也無法再吸引 remodeling complex 至啟動子上；但當以短暫性轉染的質體為模版時卻發現，質體上的啟動子區域對 DNase I 為 hypersensitive，表示不具有如 nucleosome 緊密纏繞的結構，且轉錄因子在 GR 刺激前就已結合在啟動子上，當細胞對 GR 刺激不敏感時，轉錄因子仍然可結合在啟動子區域中，且該質體不需要藉由 chromatin remodeling complex 便可進行轉錄。基於此研究，本論文推測短暫性轉染的質體因為 DNA packaging 的結構較鬆散，在 EGF 刺激之前相關轉錄因子便可結合在 *Cten* 啟動子上，因此對 EGF 的刺激較不敏感；但細胞中



Cten 啟動子的 chromatin 結構較緊密，EGF 可能透過 chromatin remodeling 的機制調控 *Cten* 的表現，因此利用短暫性轉染的方法可能不適用於探討相關機制。

由於推測 EGF 可能透過 chromatin remodeling 或 epigenetic regulation 等機制調控 *Cten* 表現，本論文初步以 nucleosomal positioning 的角度探討 EGF 調控 *Cten* 啟動子的現象。本論文假設在 EGF 刺激前，*Cten* 蛋白質含量較低是因為 *Cten* 啟動子的 chromatin 結構較緊密，則 endo/exonuclease MNase 應該會較無法作用於 DNA；在 EGF 刺激後，chromatin 結構較打開，MNase 則可以作用於 *Cten* 啟動子上。因此本論文利用 CHART PCR 探討在 EGF 刺激後 *Cten* 啟動子受 MNase 作用的 accessibility，結果顯示在 EGF 刺激後，*Cten* 啟動子較容易受 MNase 作用（圖 3.6 C），表示此時 *Cten* 啟動子的 chromatin 結構較鬆散，轉錄因子可結合至啟動子中促進基因轉錄。在 CHART PCR 的實驗中，本論文將帶有啟動子活性之轉錄起始點上游 1.8 kb *Cten* 啟動子分成六段並設計引子（圖 3.6 B），因此每段引子約可增殖 300-400 bp *Cten* 的啟動子片段，但每個 nucleosome 約包含 146 bp DNA，再加上 nucleosomes 中間的 linker DNA（約 20 bp），因此 1.8 kb 則至少含有 10 個 nucleosomes，但許多研究指出在基因活化的過程中約只有 1~2 個 nucleosomes 會受 chromatin remodeling 的影響（Weinmann *et al.*, 1999; Deroo and Archer, 2001），而根據本論文的結果顯示六段引子在 EGF 刺激及 MNase 截切後都只能增殖到較少的啟動子片段（圖 3.6 C），表示 1.8 kb 啟動子中所含有的 nucleosomes 都會受 chromatin remodeling 的影響，但由於本論文沒有適當的對照組，以及未利用啟動子結構不會受 EGF 誘導而改變的基因來證明並非操作上的誤差，因此對於此實驗結果本論文仍存有懷疑的態度。另外，若想找到確切受調控的 nucleosome 區域，應該將引子所增殖的 DNA 片段調整成小於一個 nucleosome (146 bp) 的 DNA 長度，如此，引子所增殖的區域可能會落在 nucleosome 內或涵蓋了 linker DNA，根據前者的引子設計方式，若該 nucleosome 會受調控，則預期在 CHART PCR 的結果中可偵測到差異較明顯的 Ct 值，反之，則會偵測到類似的 Ct 值；針對後者的引子設計方式，就算引子也能夠增殖到受調控的 nucleosome 區域，但 MNase 具有作用於 nucleosome 之間 linker DNA 的特性，因此在刺激前後 MNase 可能都可以作用於 linker DNA，在 CHART PCR 的結果便無法偵測到差異明顯的 Ct 值。因此本論文推測實驗 3.6 中可能就是因為 MNase 在 EGF 刺激 *Cten* 啟動子後較能作



用於 linker DNA，因此六段引子所偵測到的 accessibility 都較好。

本論文另一方面也從 histone modification 角度探討 Cten 受 EGF 調控的可能性。在處理細胞 HDAC 抑制劑 TSA 方面，由於研究顯示在前列腺癌細胞株 22Rv1 中，TSA 可誘導 *P-Rex1* 基因的表現 (Wong *et al.*, 2011)，因此本論文以 *P-Rex1* 基因當成 treatment control，該研究進一步以 ChIP 發現 TSA 會促使 HDAC1 及 HDAC2 離開 *P-Rex1* 啟動子區域，並伴隨著 histone 4 的 histone tail 被 acetylation 修飾的程度上升，於是本論文推測在 EGF 刺激之前，可能有一些 HDACs 結合在啟動子區域，使 *Cten* 無法轉錄，若以 TSA 處理細胞可能可以驅使這些 HDACs 離開啟動子區域，促使 *Cten* 基因轉錄。圖 3.10 B 結果發現，TSA 只能促使 HeLa 細胞株中的 *Cten* mRNA 表現量顯著上升，顯示在 EGF 或 TSA 處理前，可能有一些 HDACs 結合在 *Cten* 啟動子區域，但仍需以 ChIP 進一步證實此假設。而在 RWPE-1 及 DU145 細胞株中，*Cten* mRNA 的表現量對 TSA 的處理並無反應，可能由於 TSA 為廣泛性的 HDAC 抑制劑，因此影響了參與調控 *Cten* 表現的上游轉錄因子之表現量。

在處理細胞 HAT p300/CBP 抑制劑 anacardic acid (AA) 方面，AA 可抑制 RWPE-1、HeLa 及 DU145 中 EGF 誘導的 *Cten* 蛋白質含量 (圖 3.8 及 圖 3.9)，顯示 EGFR signaling 可能透過 HAT p300/CBP 調控 *Cten* 的表現。前人研究發現 AA 抑制 p300 的方式分為二種，抑制 *p300* mRNA 表現量 (Tan *et al.*, 2012) 或抑制 p300 的 histone acetyltransferase 的酵素活性 (Balasubramanyam *et al.*, 2003)，於是本論文也針對 *p300* mRNA 的表現量進行偵測，發現 AA 的處理對於 *p300* mRNA 的表現量影響並不大 (圖 3.8 C、圖 3.9 C 及 圖 3.9 E)，因此本論文推測 AA 是透過抑制 p300 的 HAT 酵素活性，進而抑制 EGF 誘導的 *Cten* 表現；另一方面 *in vitro* 實驗發現，活化的 ERK2 可磷酸化 GST-p300 (a.a. 1572-2370)，增強 p300 的轉錄活性 (Sang *et al.*, 2003)，而 ERK1 則可磷酸化 CBP 的 C 端並促進其酵素活性 (Janknecht and Nordheim, 1996; Ait-Si-Ali *et al.*, 2000)，以上證據顯示 p300/CBP 參與在 EGFR signaling 下游的調控機制中，但由於 EGF 的處理並不會影響 *p300* mRNA 的表現量 (圖 3.8 C、圖 3.9 C 及 圖 3.9 E)，因此本論文猜測 EGFR signaling 透過 ERK1/2 對 p300/CBP 進行磷酸化，提升 p300/CBP

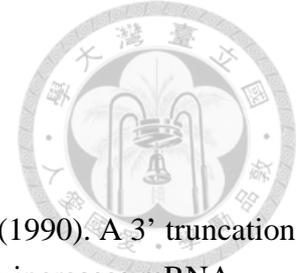


的酵素活性及轉錄活性，促進 *Cten* 的表現。

Singh 等人 (2011) 探討 EGF 誘導 cyclin E 及 CDK2 蛋白質含量上升的機制中，發現 EGF 的處理可促使 polymerase II、pSer5 pol II (transcription initiation marker) 及 HAT p300 結合至二啟動子區域的能力上升，同時伴隨著 H3K9 受 acetylation 的程度上升及 HDAC1 的離開，也發現 chromatin remodeler protein hBRM1 在 EGF 的刺激下會結合到啟動子區域中。因此本論文推測，若 p300 參與在 EGF 調控 *Cten* 表現的機制中，則 *Cten* 啟動子區域中 histone tail 的 acetylation 情況應該也會有所改變。本論文嘗試以染色質免疫沉澱法 (Chromatin-immunoprecipitation, ChIP) 來探討 EGF 處理前後，*Cten* 啟動子區域中 histone tail 受 acetylation 情況的改變。本論文發現 EGF 的處理可增加 *Cten* 啟動子中 H3K9 的 acetylation 修飾程度 (圖 3.14 B)。因此本論文推測 EGF 可能誘導 HAT p300 至 *Cten* 啟動子區域中，並利用 HAT p300 內生性的 HAT 活性對啟動子中的 histone tail 進行 acetylation，接著可能會吸引相關的 chromatin remodeler 並對 nucleosome 進行調控，使 *Cten* 啟動子區域的結構較鬆散，相關轉錄因子可結合至 *Cten* 啟動子中，促使基因轉錄。

未來本論文希望可以利用 ChIP 探討 p300 是否在 EGF 刺激之下會增加結合至 *Cten* 啟動子的能力，以及是否有 HDAC 會因為 EGF 的刺激而離開 *Cten* 啟動子，也預期探討 MEK 抑制劑 U0126、HAT p300 抑制劑 AA 是否會影響 EGF 誘導 *Cten* 啟動子中 histone tail 受 acetylation 的現象，以證實之前所發現的訊息傳導路徑也是透過類似的方式調控 *Cten* 表現。另外，許多的轉錄因子皆可和 p300 進行交互作用，以 *in silico* 分析 *Cten* 啟動子區域，可發現轉錄因子 Sp-1、CREB、AP-1、c-Myb、E2F、MyoD 及 USF2 等 p300-binding partners 的結合位，但 p300 透過何種轉錄因子一同促進 *Cten* 表現，或 EGF 的處理對何種轉錄因子有影響，仍需以實驗進一步證實以建構出更清楚的分子機制。

五、參考文獻



Aghib DF, Bishop JM, Ottolenghi S, Guerrasio A, Serra A, and Saglio G. (1990). A 3' truncation of MYC caused by chromosomal translocation in a human T-cell leukemia increases mRNA stability. *Oncogene* **5**: 707–711.

Ait-Si-Ali S, Carlisi D, Ramirez S, Upegui-Gonzalez LC, Duquet A, Robin P, *et al.* (1999). Phosphorylation by p44 MAP Kinase/ERK1 stimulates CBP histone acetyl transferase activity in vitro. *Biochem Biophys Res Commun* **262**: 157–162.

Ait-Si-Ali S, Polesskaya A, Filleur S, Ferreira R, Duquet A, Robin P, *et al.* (2000). CBP/p300 histone acetyl-transferase activity is important for the G1/S transition. *Oncogene* **19**: 2430–7.

Aksamitiene E, Kholodenko BN, Kolch W, Hoek JB, and Kiyatkin A. (2010). PI3K/Akt-sensitive MEK-independent compensatory circuit of ERK activation in ER-positive PI3K-mutant T47D breast cancer cells. *Cell Signal*. **22**: 1369–1378.

Albasri A, Al-Ghamdi S, Fadhil W, Aleskandarany M, Liao YC, Jackson D, *et al.* (2011). Cten signals through integrin-linked kinase (ILK) and may promote metastasis in colorectal cancer. *Oncogene* **30**: 2997–3002.

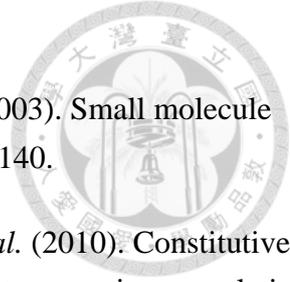
Albasri A, Seth R, Jackson D, Benhasouna A, Crook S, Nateri S, *et al.* (2009). C-terminal tensin-like (CTEN) is an oncogene which alters cell motility possibly through repression of E-cadherin in colorectal cancer. *J Pathology* **218**: 57–65.

Al-Ghamdi S, Albasri A, Cachat J, Ibrahim S, Muhammad BA, Jackson D, *et al.* (2011). Cten is targeted by Kras signalling to regulate cell motility in the colon and pancreas. *PLoS one* **6**: e20919.

Annister AJ, and Kouzarides T. (1996). The CBP co-activator is a histone acetyltransferase. *Nature* **384**: 641–643.

Audic Y, and Hartley RS. (2004). Post-transcriptional regulation in cancer. *Biol Cell* **96**: 479–498.

Auger KR, Songyang Z, Lo SH, Roberts TM, and Chen LB. (1996). Platelet-derived growth factor-induced formation of tensin and phosphoinositide 3-kinase complexes. *J Biol Chem*. **271**: 23452–23457.



Balasubramanyam K, Swaminathan V, Ranganathan A, and Kundu TK. (2003). Small molecule modulators of histone acetyltransferase p300. *J Biol Chem.* **278**: 19134–19140.

Barbieri I, Pensa S, Pannellini T, Quaglino E, Maritano D, Demaria M, *et al.* (2010). Constitutively active Stat3 enhances neu-mediated migration and metastasis in mammary tumors via upregulation of Cten. *Cancer Res.* **70**: 2558–2567.

Bockholt SM, and Burrridge K. (1993). Cell spreading on extracellular matrix proteins induces tyrosine phosphorylation of tensin. *J Biol Chem.* **268**: 14565–14567.

Bos JL. (1989). ras Oncogenes in Human Cancer : A Review. *Cancer Res.* **49**: 4682–4689.

Brigitte M, Bubeck P, Giehl K, Rothkegel M, Schlater K, and Stanke G. (1995). The molecular architecture of focal adhesions. *Annu Rev Cell Dev Biol.* **11**: 549–599.

Brink M. (2003). K-ras oncogene mutations in sporadic colorectal cancer in The Netherlands Cohort Study. *Carcinogenesis* **24**: 703–710.

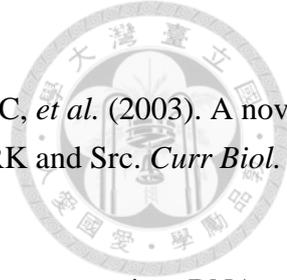
Burnette WN. (1981). “Western blotting”: electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate--polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. *Anal Biochem.* **112**: 195–203.

Burrridge K, Fath K, Kelly T, Nuckolls G, and Turner C. (1988). Focal adhesions: transmembrane junctions between the extracellular matrix and the cytoskeleton. *Ann. Rev. Cell Biol.* **4**: 487–525.

Calderwood DA, Fujioka Y, De Pereda JM, Garcia-Alvarez B, Nakamoto T, Margolis B, *et al.* (2003). Integrin beta cytoplasmic domain interactions with phosphotyrosine-binding domains: A structural prototype for diversity in integrin signaling. *PNAS* **100**: 2272–2277.

Cance WG, Harris JE, Iacocca M V, Roche E, Yang X, Chang J, *et al.* (2000). Immunohistochemical analyses of focal adhesion kinase expression in benign and malignant human breast and colon tissues : correlation with preinvasive and invasive phenotypes. *Clin Cancer Res.* **6**: 2417–2423.

Cao X, Voss C, Zhao B, Kaneko T, and Li SS-C. (2012). Differential regulation of the activity of deleted in liver cancer 1 (DLC1) by tensins controls cell migration and transformation. *PNAS* **109**: 1455–1460.



Carragher NO, Westhoff MA, Fincham VJ, Schaller MD, Frame MC, Hill C, *et al.* (2003). A novel role for FAK as a protease-targeting adaptor protein : regulation by p42 ERK and Src. *Curr Biol.* **13**: 1442–1450.

Chen CY, and Shyu AB. (1995). AU-rich elements: characterization and importance in mRNA degradation. *Trends Biochem Sci.* **20**: 465–470.

Chen H, Duncan IC, Bozorgchami H, and Lo SH. (2002). Tensin1 and a previously undocumented family member, tensin2, positively regulate cell migration. *PNAS* **99**: 733–738.

Chen H, Ishii A, Wong WK, Chen LB, and Lo SH. (2000). Molecular characterization of human tensin. *Biochem J.* **351**: 403–411.

Chen N-T, Kuwabara Y, Conley C, Liao Y-C, Hong S-Y, Chen M, *et al.* (2013). Phylogenetic analysis, expression patterns, and transcriptional regulation of human CTEN gene. *Gene* **520**: 90–7.

Chen Z, Wang L, Wang Q, and Li W. (2010). Histone modifications and chromatin organization in prostate cancer. *Epigenomics* **2**: 551–560.

Citri A, and Yarden Y. (2006). EGF-ERBB signalling: towards the systems level. *Nat Rev Mol Cell Biol.* **7**: 505–516.

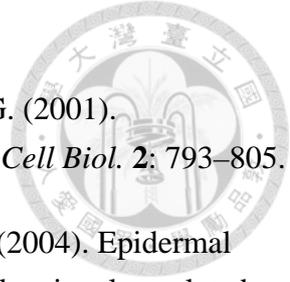
Clark RAF, and Henson PM. (1996). The molecular and cellular biology of wound repair. *Plenum Press.*

Cui Y, Liao YC, and Lo SH. (2004). Epidermal growth factor modulates tyrosine phosphorylation of a novel tensin family member , tensin3. *Mol Cancer Res.* **2**: 225–232.

Davis S, Lu ML, Lo SH, Lns S, Butler JA, Druker BJ, *et al.* (1991). Presence of an SH2 domain in the actin-binding protein tensin. *Science* **252**: 712–715.

Deroo BJ, and Archer TK. (2001). Glucocorticoid receptor-mediated chromatin remodeling in vivo. *Oncogene* **20**: 3039–3046.

Fyodorov D V, and Kadonaga JT. (2001). The many faces of chromatin remodeling: SWItching beyond transcription. *Cell* **106**: 523–525.



Geiger B, Bershadsky A, Pankov R, Yamada KM, and Correspondence BG. (2001). Transmembrane extracellular matrix– cytoskeleton crosstalk. *Nat Rev Mol Cell Biol.* **2**: 793–805.

Glading A, Bodnar RJ, Reynolds IJ, Shiraha H, Satish L, Potter DA, *et al.* (2004). Epidermal growth factor activates m-calpain (calpain II), at least in part, by extracellular signal-regulated kinase-mediated phosphorylation. *Mol Cell Biol.* **24**: 2499–2512.

Gregg J, and Fraizer G. (2011). Transcriptional regulation of EGR1 by EGF and the ERK signaling pathway in prostate cancer cells. *Genes Cancer.* **2**: 900–909.

Hauck CR, Sieg DJ, and Hsia DA. (2001). Inhibition of focal adhesion kinase expression or activity disrupts epidermal growth factor-stimulated signaling promoting the migration of invasive human carcinoma cells. *Cancer Res.* **61**: 7079–7090.

Hollams EM, Giles KM, Thomson AM, and Leedman PJ. (2002). mRNA stability and the control of gene expression: implications for human disease. *Neurochem Res.* **27**: 957–980.

Hong SY, Shih YP, Li T, Carraway KL, and Lo SH. (2013). CTEN prolongs signaling by EGFR through reducing its ligand-induced degradation. *Cancer Res.*: Electronic publication ahead of print.

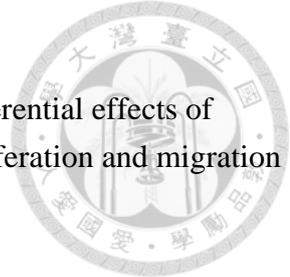
Hung SY, Shih YP, Chen M, and Lo SH. (2013). Up-regulated Cten by FGF2 contributes to FGF2-mediated cell migration. *Mol Carcinog.*: Electronic publication ahead of print.

Hynes RO. (1992). Integrins: versatility, modulation, and signaling in cell adhesion. *Cell* **69**: 11–25.

Ishida T, Ishida M, Suero J, Takahashi M, and Berk BC. (1999). Agonist-stimulated cytoskeletal reorganization and signal transduction at focal adhesions in vascular smooth muscle cells require c-Src. *J Clin Invest.* **103**: 789–797.

Ishii A, and Lo SH. (2001). A role of tensin in skeletal muscle regeneration. *Biochem J.* **356**: 737–745.

Janknecht R, and Nordheim A. (1996). MAP kinase-dependent transcriptional coactivation by Elk-1 and its cofactor CBP. *Biochem Biophys Res Commun* **837**: 831–837.



Jiang B, Yamamura S, Nelson PR, Mureebe L, and Kent KC. (1996). Differential effects of platelet-derived growth factor isotypes on human smooth muscle cell proliferation and migration are mediated by distinct signaling pathways. *Surgery* **120**: 427–431.

Jorissen RN, Walker F, Pouliot N, Garrett TPJ, Ward CW, and Burgess AW. (2003). Epidermal growth factor receptor: mechanisms of activation and signalling. *Exp Cell Res.* **284**: 31–53.

Katz M, Amit I, Citri A, Shay T, Carvalho S, Lavi S, *et al.* (2007). A reciprocal tensin-3-cten switch mediates EGF-driven mammary cell migration. *Nat Cell Biol.* **9**: 961–969.

Kouzarides T. (2007). Chromatin modifications and their function. *Cell* **128**: 693–705.

Kuan CT, Wikstrand CJ, and Bigner DD. (2001). EGF mutant receptor vIII as a molecular target in cancer therapy. *Endocr Relat Cancer.* **8**: 83–96.

Kwon SH, Nedvetsky PI, and Mostov KE. (2012). Transcriptional profiling identifies TNS4 function in epithelial tubulogenesis. *Curr Biol.* **21**: 161–166.

Lauffenburger DA, and Horwitz AF. (1996). Cell migration: a physically integrated molecular process. *Cell* **84**: 359–369.

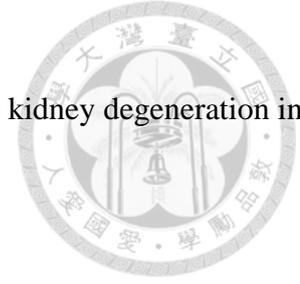
Lee P, Liao P, Chang W, and Tseng JT. (2013). Epidermal growth factor increases the interaction between nucleolin and heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K / Poly (C) binding protein 1 complex to regulate the gastrin mRNA turnover. *Mol Biol Cell.* **18**: 5004–5013.

Liao YC, Chen NT, Shih YP, Dong Y, and Lo SH. (2009). Up-regulation of C-terminal tensin-like molecule promotes the tumorigenicity of colon cancer through beta-catenin. *Cancer Res.* **69**: 4563–4566.

Lin S, and Lin D. (1996). Mapping of actin, vinculin, and integrin binding domains suggests a direct role of tensin in actin–membrane association. *Molecular Biology of the Cell.* **7**: 389a.

Lo SH, Janmey PA, Hartwig JH, and Chen LB. (1994). Interactions of tensin with actin and identification of its three distinct actin-binding domains. *J Cell Biol.* **125**: 1067–1075.

Lo SH, and Lo T Bin. (2002). Cten , a COOH-terminal tensin-like protein with prostate restricted expression , is down-regulated in prostate cancer. *Cancer Res.* **62**: 4217–4221.



Lo SH, Yu QC, Degenstein L, Chen LB, and Fuchs E. (1997). Progressive kidney degeneration in mice lacking tensin. *J Cell Biol.* **136**: 1349–1361.

Lo SH. (2004). Tensin. *Int J Biochem Cell Biol.* **36**: 31–34.

Lo SS, Lo SH, and Lo SH. (2005). Cleavage of cten by caspase-3 during apoptosis. *Oncogene* **24**: 4311–4314.

Lu Z, Jiang G, Blume-Jensen P, and Hunter T. (2001). Epidermal growth factor-induced tumor cell invasion and metastasis initiated by dephosphorylation and down- regulation of focal adhesion kinase. *Mol Cell Biol.* **21**: 4016–4031.

Manske M, and Bade EG. (1994). Growth factor-induced cell migration: biology and methods of analysis. *Int Rev Cytol.* **155**: 49–96.

Martin C, and Zhang Y. (2005). The diverse functions of histone lysine methylation. *Nat Rev Mol Cell Biol.* **6**: 838–849.

Martuszevska D, Ljungberg B, Johansson M, Landberg G, Oslakovic C, Dahlbäck B, *et al.* (2009). Tensin3 is a negative regulator of cell migration and all four Tensin family members are downregulated in human kidney cancer. *PLoS one* **4**: e4350.

McLean GW, Carragher NO, Avizienyte E, Evans J, Brunton VG, and Frame MC. (2005). The role of focal-adhesion kinase in cancer - a new therapeutic opportunity. *Nat Rev Cancer.* **5**: 505–515.

Ojaniemi M, and Vuori K. (1997). Epidermal growth factor modulates tyrosine phosphorylation of p130Cas. Involvement of phosphatidylinositol 3V-kinase and actin cytoskeleton. *J Biol Chem.* **272**: 25993–25998.

Rajfur Z, Roy P, Otey C, Romer L, and Jacobson K. (2002). Dissecting the link between stress fibres and focal adhesions by CALI with EGFP fusion proteins. *Nat Cell Biol.* **4**: 286–293.

Rao S, Procko E, and Shannon MF. (2001). Chromatin remodeling, measured by a novel real-time polymerase chain reaction assay, across the proximal promoter region of the IL-2 gene. *J Immunol.* **167**: 4494–4503.

Sakashita K, Mimori K, Tanaka F, Kamohara Y, Inoue H, Sawada T, *et al.* (2008). Prognostic relevance of tensin4 expression in human gastric cancer. *Ann Surg Oncol.* **15**: 2606–2613.



Salgia R, Brunkhorst B, Pisick E, Li JL, Lo SH, Chen LB, *et al.* (1995). Increased tyrosine phosphorylation of focal adhesion proteins in myeloid cell lines expressing p210BCR/ABL. *Oncogene* **11**: 1149–1155.

Sang N, Stiehl DP, Bohensky J, Leshchinsky I, Srinivas V, and Caro J. (2003). MAPK signaling up-regulates the activity of hypoxia-inducible factors by its effects on p300. *J Biol Chem* **278**: 14013–14019.

Sasaki H, Moriyama S, Mizuno K, Yukieu H, Konishi A, Yano M, *et al.* (2003).(a). Cten mRNA expression was correlated with tumor progression in lung cancers. *Lung Cancer* **40**: 151–155.

Sasaki H, Yukiue H, Kobayashi Y, Fukai I, and Fujii Y. (2003).(b). Cten mRNA expression is correlated with tumor progression in thymoma. *Tumour Biol.* **24**: 271–274.

Seo EY, Lee DH, Lee Y, Cho KH, Eun HC, and Chung JH. (2012). Microarray analysis reveals increased expression of Δ Np63 α in seborrhoeic keratosis. *Br J Dermatol.* **166**: 337–342.

Shiama N. (1997). The p300/CBP family: integrating signals with transcription factors and chromatin. *Trends Cell Biol.* **7**: 230–236.

Sieg DJ, Hauck CR, and Ilic D. (2000). FAK integrates growth-factor and integrin signals to promote cell migration. *Nat Cell Biol.* **2**: 249 –256.

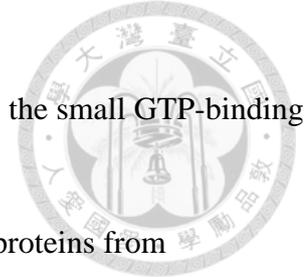
Singh AK, Swarnalatha M, and Kumar V. (2011). c-ETS1 facilitates G1/S-phase transition by up-regulating cyclin E and CDK2 genes and cooperates with hepatitis B virus X protein for their deregulation. *J Biol Chem.* **286**: 21961–21970.

Stossel TP. (1993). On the crawling of animal cells. *Science* **260**: 1086–1094.

Struhl K. (1998). Histone acetylation and transcriptional regulatory mechanisms. *Genes Dev.* **12**: 599–606.

Tan J, Chen B, He L, Tang Y, Jiang Z, Yin G, *et al.* (2012). Anacardic acid (6-pentadecylsalicylic acid) induces apoptosis of prostate cancer cells through inhibition of androgen receptor and activation of p53 signaling. *Chin J Cancer Res.* **24**: 275–283.

Tapia JA, Camello C, Jensen RT, and Garcia LJ. (1999). EGF stimulates tyrosine phosphorylation of focal adhesion kinase (p125FAK) and paxillin in rat pancreatic acini by a phospholipase



C-independent process that depends on phosphatidy- lino-sitol 3-kinase, 15 the small GTP-binding protein, p21rho, and the int. *Biochim Biophys Acta*. **1448**: 486–499.

Towbin H, Staehelin T, and Gordon J. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. . *PNAS* **76**: 4350–5354.

Wang YN, and Chang WC. (2003). Induction of disease-associated keratin 16 gene expression by epidermal growth factor is regulated through cooperation of transcription factors Sp1 and c-Jun. *J Biol Chem*. **278**: 45848–45857.

Weiss IM, and Liebhaber SA. (1995). Erythroid cell-specific mRNA stability elements in the alpha 2-globin 3' nontranslated region. *Mol Cell Biol*. **15**: 2457–2465.

Wilusz CJ, and Wilusz J. (2004). Bringing the role of mRNA decay in the control of gene expression into focus. *Trends Genet*. **20**: 491–497.

Wilusz CJ, Wormington M, and Peltz SW. (2001). The cap-to-tail guide to mRNA turnover. *Nat Rev Mol Cell Biol*. **2**: 237–246.

Wong CYA, Wuriyangan H, Xie Y, Lin MF, Abel PW, and Tu Y. (2011). Epigenetic regulation of phosphatidylinositol 3,4,5-triphosphate-dependent Rac exchanger 1 gene expression in prostate cancer cells. *J Biol Chem*. **286**: 25813–25822.

Wozniak MA, Modzelewska K, Kwong L, and Keely PJ. (2004). Focal adhesion regulation of cell behavior. *Biochim Biophys Acta*. **1692**: 103–19.

Xie H, Pallero MA, Gupta K, Chang P, Ware MF, Witke W, *et al.* (1998). EGF receptor regulation of cell motility: EGF induces disassembly of focal adhesions independently of the motility-associated PLCgamma signaling pathway. *J Cell Sci*. **111**: 615–624.

莊榮輝 (2010) 酵素純化與分析實驗。SDS 膠體電泳法及蛋白質電泳轉印法，莊榮輝主編，國立台灣大學生物技術研究中心，p. 173–175 及 p. 183。



六、圖與表

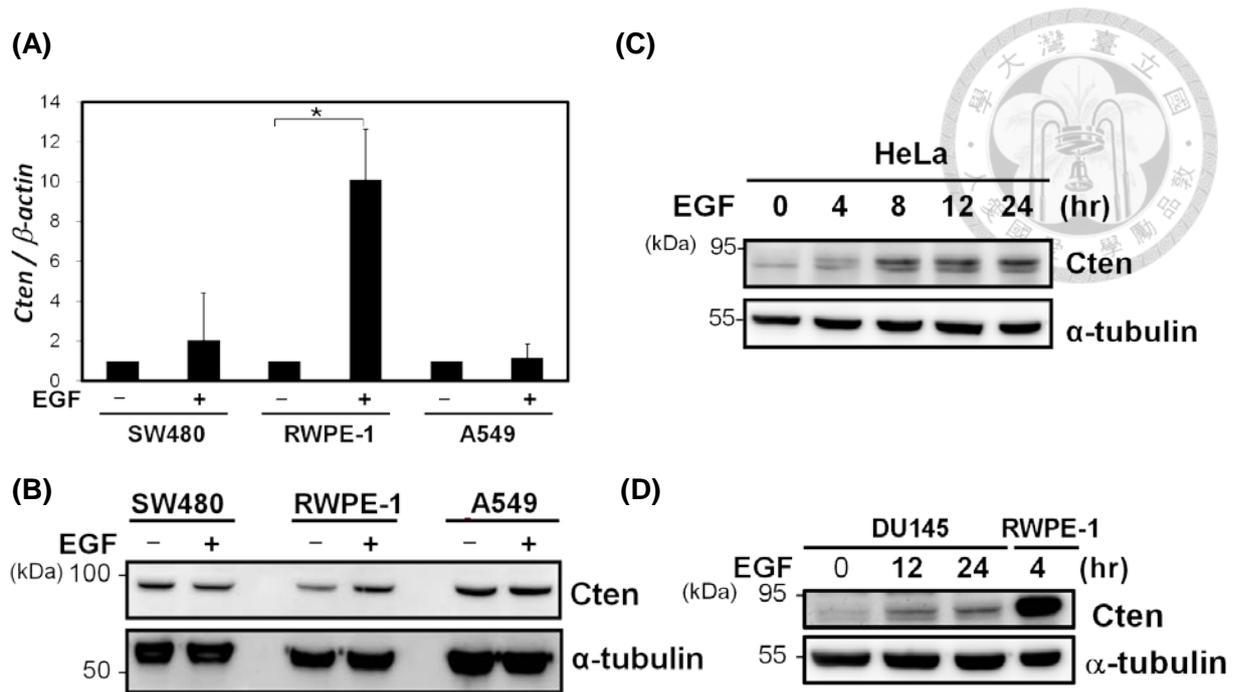


圖 3.1 不同細胞株中 Cten 表現量受 EGF 影響之分析

(A)、(B) 以含有 20 ng/mL EGF 之無血清細胞培養基 (serum free medium, SFM) 處理已於 SFM 培養一天之細胞 24 小時 (EGF+), 控制組則維持在 SFM 中 (EGF-)。 (A) 收取 total RNA 並反轉錄成 cDNA 後, 分別使用專一性偵測 *Cten* mRNA 及 β -actin mRNA 之引子進行 qPCR 分析, 以 β -actin 為 internal control, 以 $2^{(-\Delta\Delta Ct)}$ 法進行計算, 並以 EGF- 的表現量為 1 倍, 計算 EGF+ 的相對表現量。 (B) 收取 total protein 進行 western blotting 分析, 使用 anti-Cten antibody (R&D system) 與 anti- α -tubulin antibody 進行免疫染色。標準分子量標於左側。

(C)、(D) 以 100 ng/mL EGF 處理已於 SFM 培養一天之 HeLa (C) 及 DU145 (D) 細胞, 於不同時間點收取 total protein 進行 western blotting 分析, 使用 anti-Cten antibody (Springbioscience) 與 anti- α -tubulin antibody 進行免疫染色。並以 RWPE-1 細胞萃取液 (cell lysate) 做為 positive control。標準分子量標於左側。

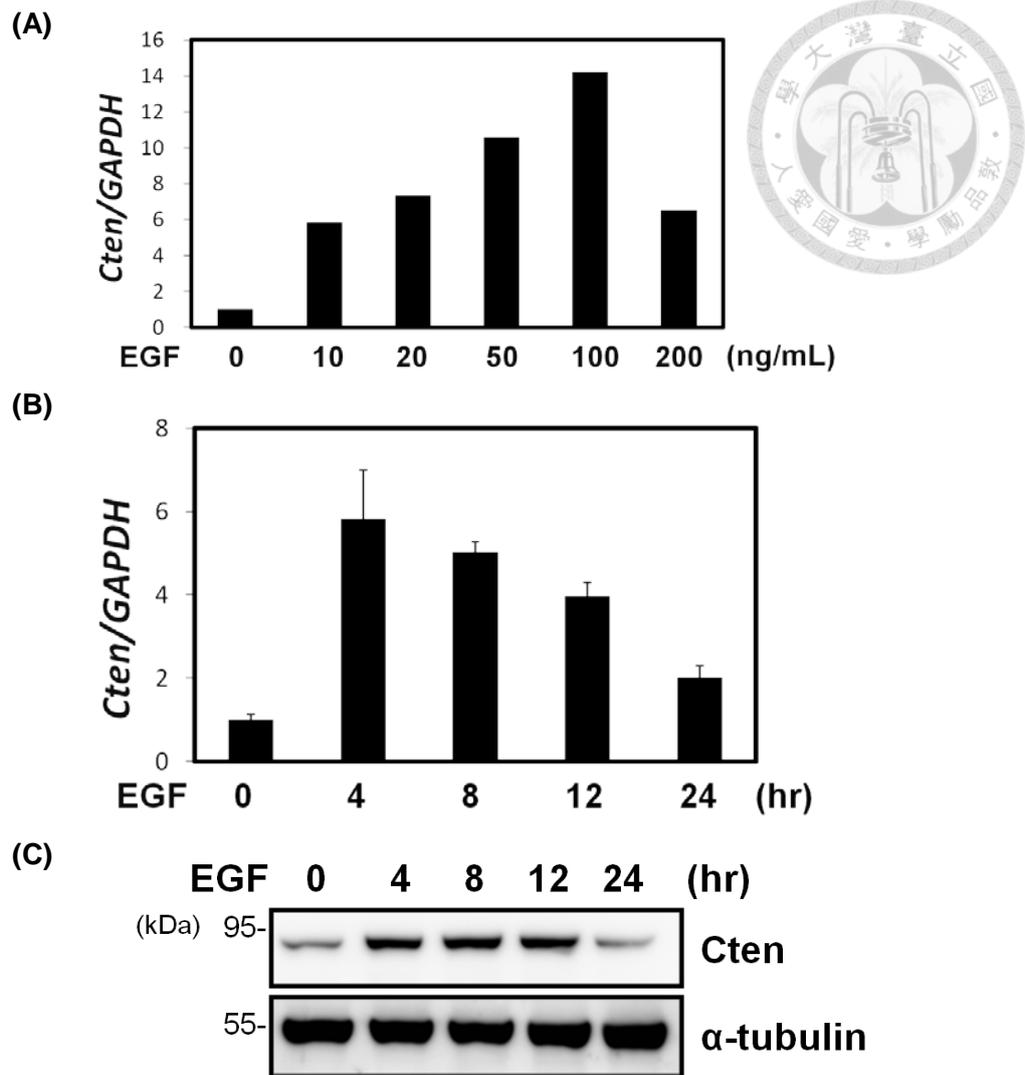


圖 3.2 不同 EGF 濃度及處理時間對 RWPE-1 細胞株中 Cten 表現量的影響

(A) 以不同濃度 EGF 處理已於 SFM 培養一天之 RWPE-1，收取 total RNA 進行 qRT-PCR 對 *Cten* 與 *GAPDH* 之基因進行偵測，*GAPDH* 為 internal control，利用 $2^{-(\Delta\Delta Ct)}$ 法進行計算，以 0 ng/mL EGF 組別的表现量為 1 倍，計算其它組的相對表現量。(B) 以 100 ng/mL EGF 刺激已於 SFM 培養一天之 RWPE-1，並於不同時間點收取 total RNA 進行 qRT-PCR 分析。計算方法同 (A) 但以時間點 0 hr 的表现量做為 1 倍，計算其它時間點的相對表現量。(C) 以 100 ng/mL EGF 刺激已於 SFM 培養一天之 RWPE-1，並於不同時間點收取 total protein 進行 western blotting 分析，使用 anti-Cten antibody (Springbioscience) 與 anti- α -tubulin antibody 進行免疫染色。標準分子量標於左側。

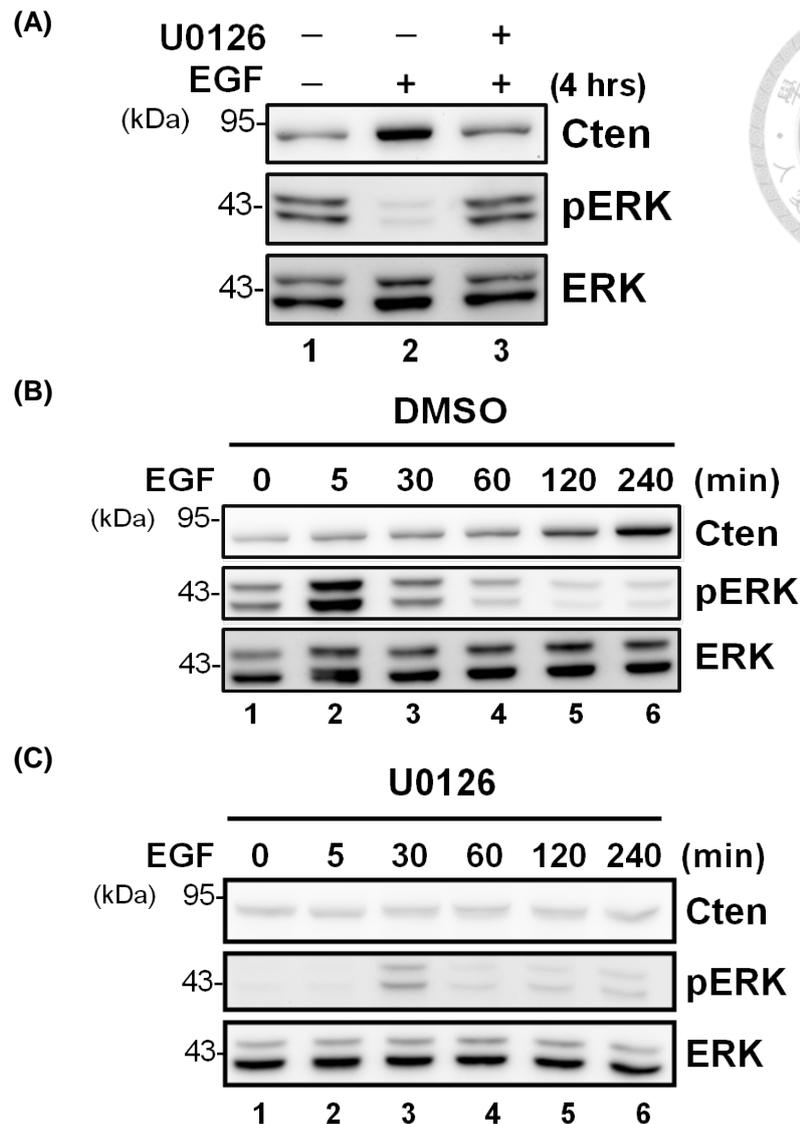


圖 3.3 MEK inhibitor U0126 對 RWPE-1 細胞株中 EGF 誘導之 Cten 蛋白質含量及 ERK 磷酸化之影響

(A) RWPE-1 以 SFM 培養一天後，分別以含有 0.1% DMSO 之 SFM (lane 1, 2) 或 10 μM U0126 (MEK inhibitor, lane 3) 進行前處理 2 小時後，再分別處理 0.1% DMSO (lane 1)、100 ng/mL EGF (lane 2) 或 100 ng/mL EGF 及 10 μM U0126 (lane 3) 4 小時，收取 total protein 進行 western blotting 分析。(B) 及 (C) RWPE-1 以 SFM 培養一天後，分別以含有 0.1% DMSO 之 SFM (B) 或 10 μM U0126 (C) 進行前處理 2 小時後，再同時添加 100 ng/mL EGF，於不同時間點收取 total protein 進行 western blotting 分析。使用 anti-Cten antibody、anti-phospho ERK antibody 及 anti-total ERK antibody 進行免疫染色。標準分子量標於左側。

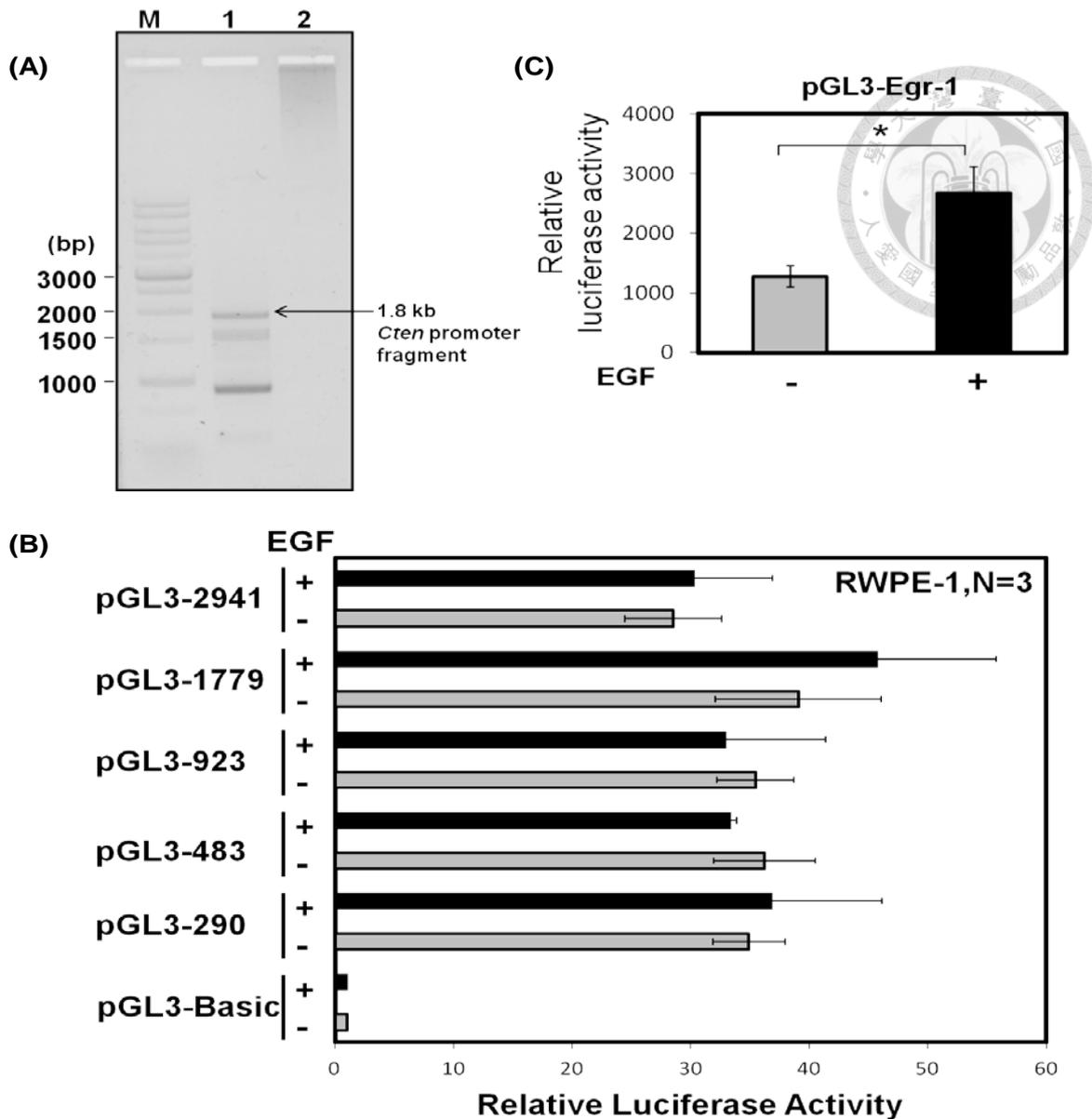


圖 3.4 *Cten* 啟動子活性受 EGF 影響之分析

(A) 以 PCR 法合成 *Cten* 基因轉錄起始點上遊約 1.8 kb 之啟動子片段，並進行 1.2% 瓊脂糖膠體電泳，標準分子量 (M) 標於左側。Lane 1 以 100 ng 之 RWPE-1 genomic DNA 做為模版進行 PCR，lane 2 不含模板進行 PCR。其餘不同長度的啟動子片段亦以 PCR 法合成，並以電泳分析、純化，並選殖於 pGL3-Basic 中。(B) 將含有不同長度 *Cten* 啟動子及 (C) 含有 *Egr-1* 啟動子之 pGL3 luciferase reporter plasmid 轉染進入 RWPE-1 中，4~6 小時後換成正常細胞培養液培養過夜，於 SFM 培養一天後，以含有 20 ng/mL EGF 之 SFM 培養 24 小時 (EGF+)，或處理不含 EGF 之 SFM (EGF-) 24 小時後，以 passive lysis buffer 收取 total protein，進行 dual luciferase assay 分析。Firefly luciferase activity (F) 以 *Renilla* luciferase activity (R) 做為 internal control 進行校正 (F/R)，再以 pGL3-Basic (EGF-) 之值做為 1 倍，計算其它組的相對表現量。*Egr-1* 啟動子含有 serum response elements 做為 positive control。(C,* 表示 $p=0.006$)

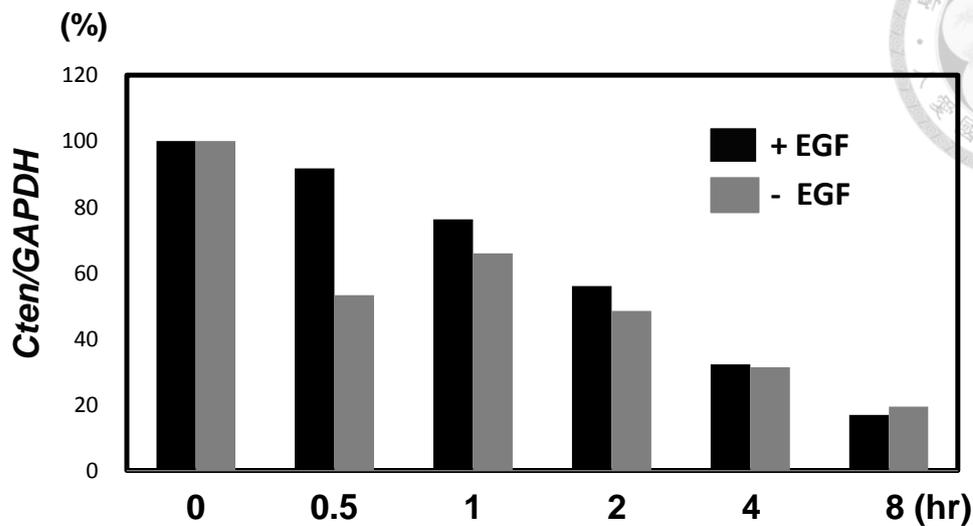
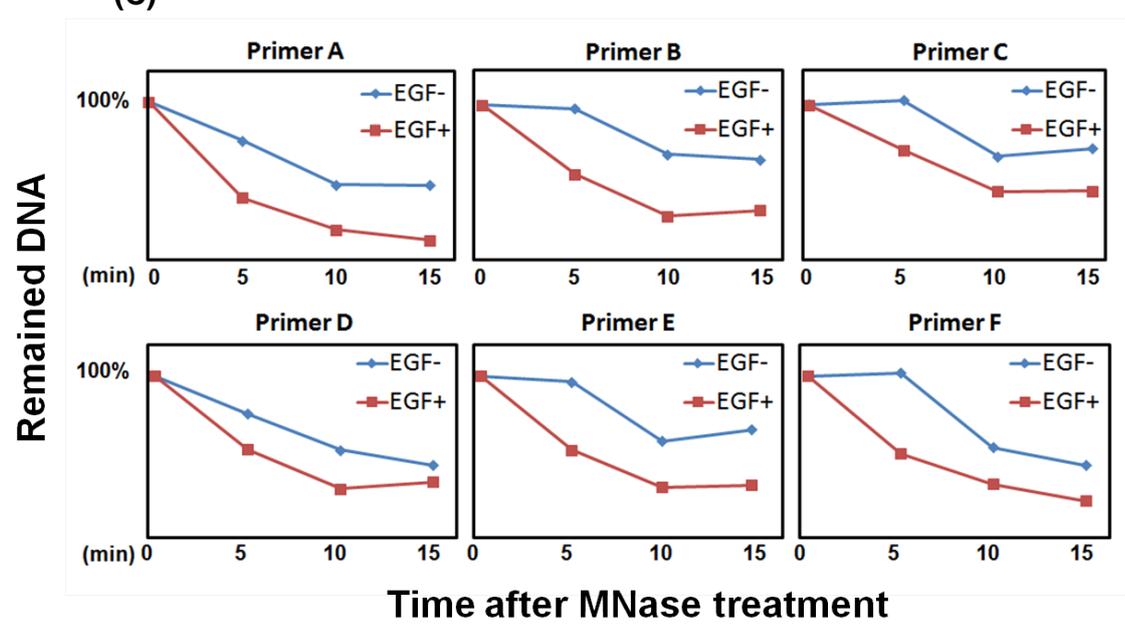
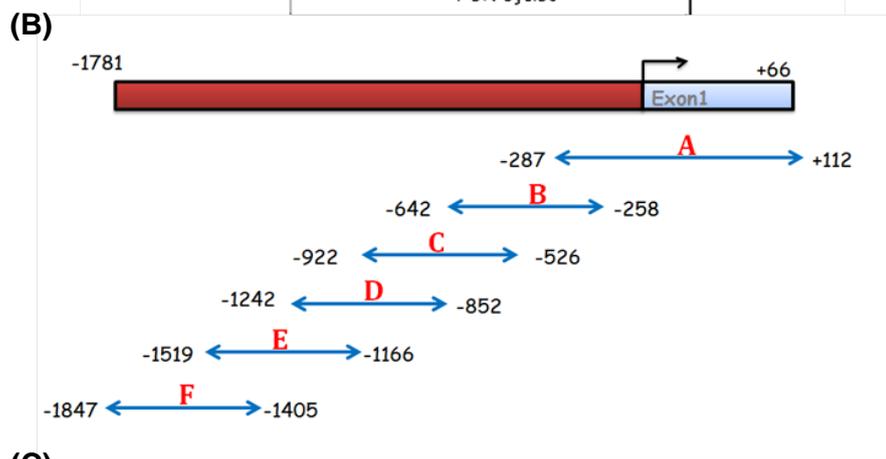
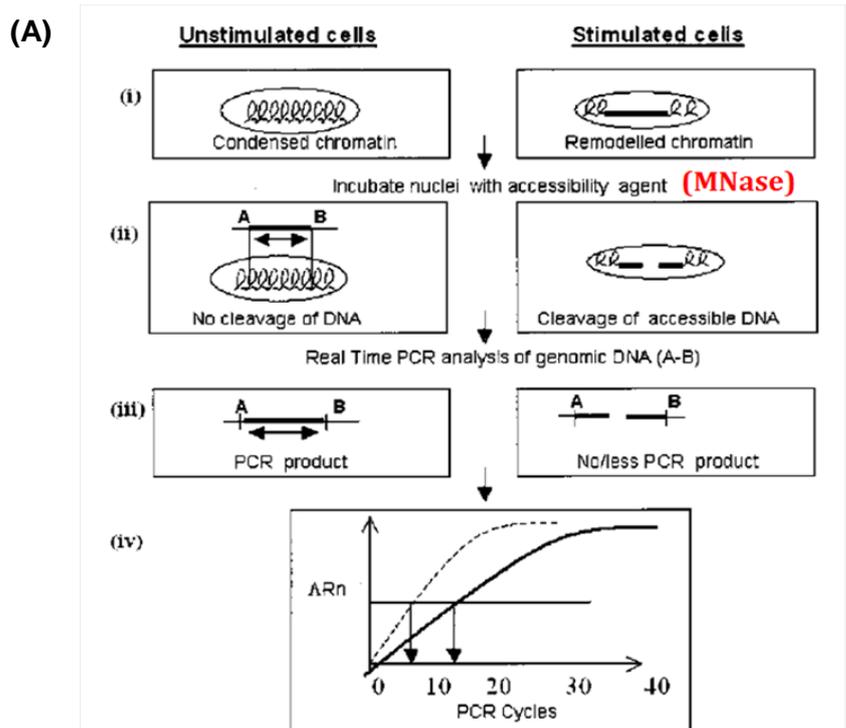


圖 3.5 EGF對 *Cten* mRNA 穩定性的影響

RWPE-1 於 SFM 培養一天後，以含有 100 ng/mL EGF 之 SFM 處理 4 小時，再以 10 nM actinomycin D 進行前處理 2 小時，接著處理含有 100 ng/mL EGF 及 Actinomycin D (10 nM) 之 SFM (+EGF)，或處理只含有 actinomycin D 之 SFM (-EGF)，於不同時間點收取 total RNA，以 qRT-PCR 對 *Cten* 與 *GAPDH* 之基因進行偵測，*GAPDH* 為 internal control，以 $2^{-(\Delta\Delta Ct)}$ 法進行計算，將時間點 0 hr 的 *Cten* mRNA 表現量當作 100%，計算不同時間點的 *Cten* mRNA 相對表現量。



圖



3.6 EGF 於 RWPE-1 細胞株中對 *Cten* 啟動子受 MNase 之 accessibility 的影響。

(A) Chromatin accessibility by real-time PCR (CHART PCR) 示意圖 (Rao *et al.*, 2001)。(B) 引子設計。(C) RWPE-1 以 SFM 培養一天後，以含有 100 ng/mL EGF 之 SFM 處理 4 小時 (EGF+)，或繼續維持在 SFM 中 (EGF-)。收取細胞後，以 NP-40 lysis buffer 懸浮細胞並沉澱細胞核，再進行 MNase 作用，並純化 genomic DNA 進行 qPCR 分析。各組 primers 先以序列稀釋之 RWPE-1 genomic DNA 為模版進行 qPCR，以 Ct 值及 log (ng of genomic DNA) 作圖，得到標準曲線。將 Ct 值與各組 primer 的標準曲線進行比較，換算成相對量，並將 MNase 作用 0 min 的 *Cten* 啟動子片段含量作為 100%，計算其它時間點的 *Cten* 啟動子片段相對含量。

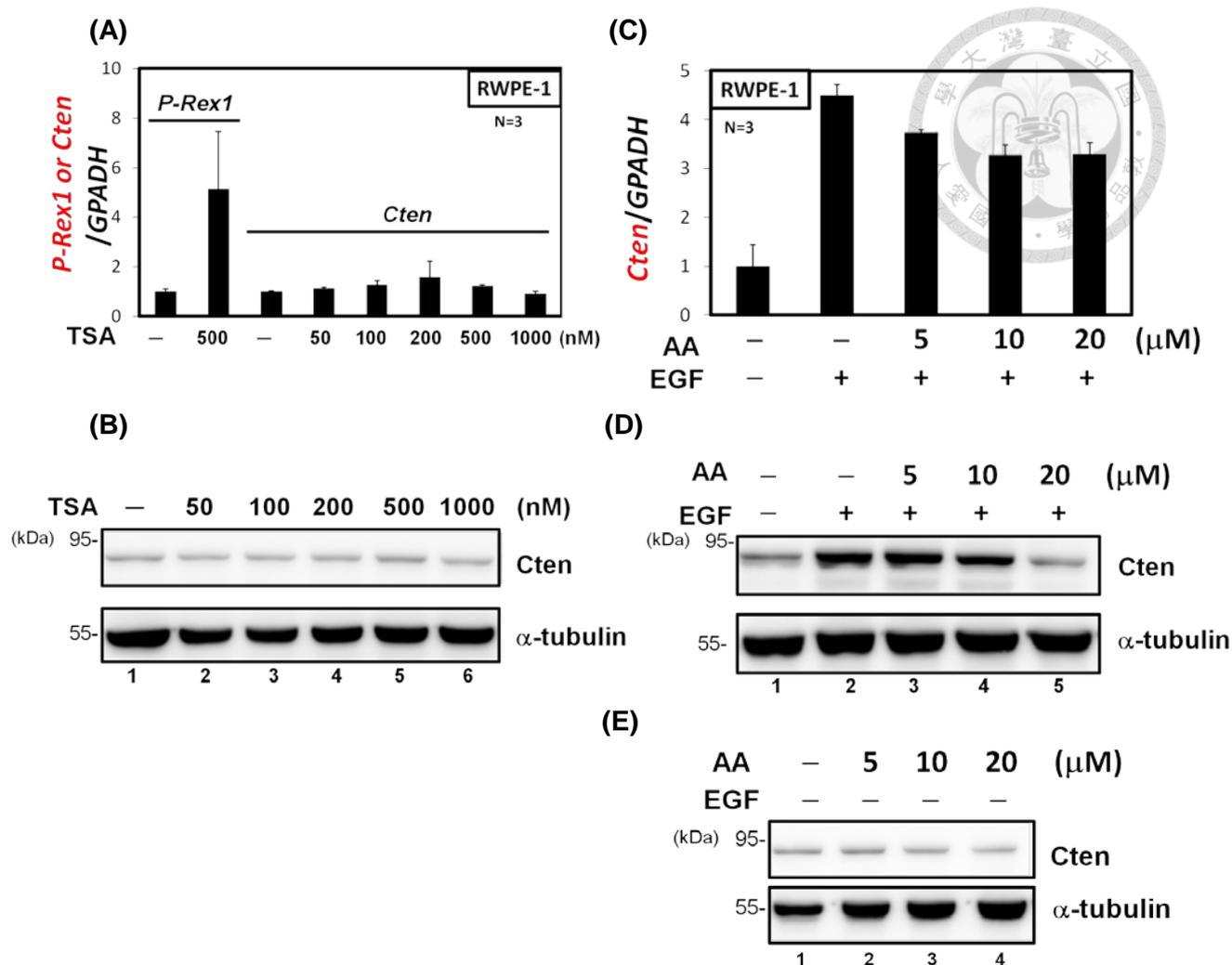


圖 3.7 HAT P300 inhibitor anacardic acid (AA) 及 HDAC inhibitor TSA 對 EGF 誘導之 Cten 表現量的影響

(A) 及 (B) RWPE-1 以 SFM 培養一天後，以含有 0.1% DMSO 之 SFM (圖 A lane 1 及 3; 圖 B lane 1) 或含有不同 TSA 濃度之 SFM 處理 24 小時，收取 total RNA (A) 及 total protein (B) 分別進行 qRT-PCR 及 western blotting 分析。(C) 及 (D) RWPE-1 以 SFM 培養一天後，分別以含有 0.1% DMSO 之 SFM (lane 1、2) 或含有 5、10、20 μ M AA (lanes 3~5) 進行前處理 1 小時，再分別處理 0.1% DMSO (lane 1)、0.1% DMSO 及 100 ng/mL EGF (lane 2) 或 100 ng/mL EGF 及不同濃度之 AA (lanes 3~5) 4 小時。收取 total RNA (C) 及 total protein (D) 分別進行 qRT-PCR 及 western blotting 分析。(E) RWPE-1 以 SFM 培養一天後，以含有 0.1% DMSO 之 SFM (lane 1) 或含有 5、10、20 μ M AA 之 SFM (lane 3~5) 進行前處理 1 小時，再以不含 EGF 但仍含有 0.1% DMSO 之 SFM (lane 1) 或含有 anacardic acid 之 SFM 處理 (lanes 3~5) 4 小時。收取 total protein 進行 western blotting 分析。使用 anti-Cten antibody 與 anti- α -tubulin antibody 進行免疫染色。標準分子量標於左側。

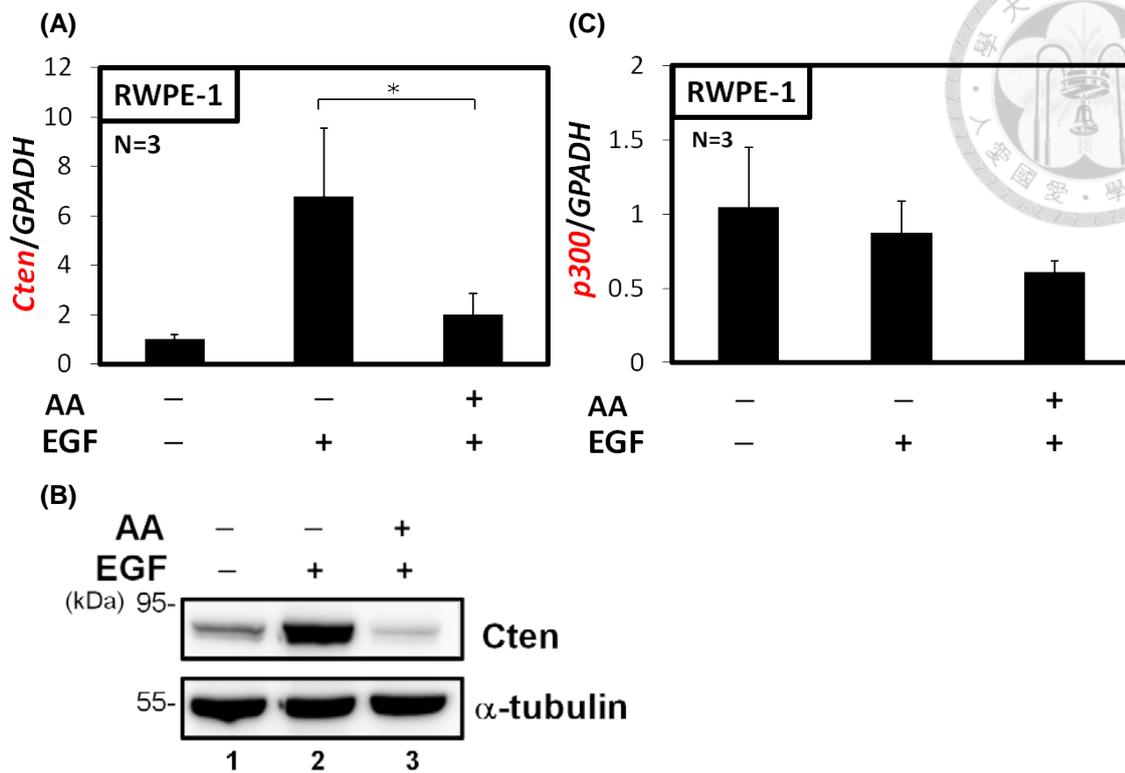


圖 3.8 Anacardic acid 可抑制 EGF 所誘導之 *Cten* mRNA 轉錄而不影響 *p300* mRNA

RWPE-1 以 SFM 處理一天後，分別以含有 0.1% DMSO 之 SFM (AA-) 或含有 20 μ M AA 之 SFM (AA+) 進行前處理 1 小時，再分別處理 0.1% DMSO (AA-, EGF-)、0.1% DMSO 及 100 ng/mL EGF (AA-, EGF+) 或 100 ng/mL EGF 及 20 μ M anacardic acid (AA+, EGF+) 4 小時，(A)、(C) 收取 total RNA 以 qRT-PCR 對 *Cten* (A)、*p300* (C) 及 *GAPDH* 基因進行偵測，以 *GAPDH* 為 internal control，利用 $2^{-(\Delta\Delta Ct)}$ 法進行計算，將沒有處理 AA 及 EGF 組別 (AA-, EGF-) 的基因表現量當作 1 倍，計算其它組別之基因相對表現量。(B) 收取 total protein 進行 western blotting 分析，使用 anti-*Cten* antibody 與 anti- α -tubulin antibody 進行免疫染色。標準分子量標於左側。(A, * 表示 $p=0.044$)

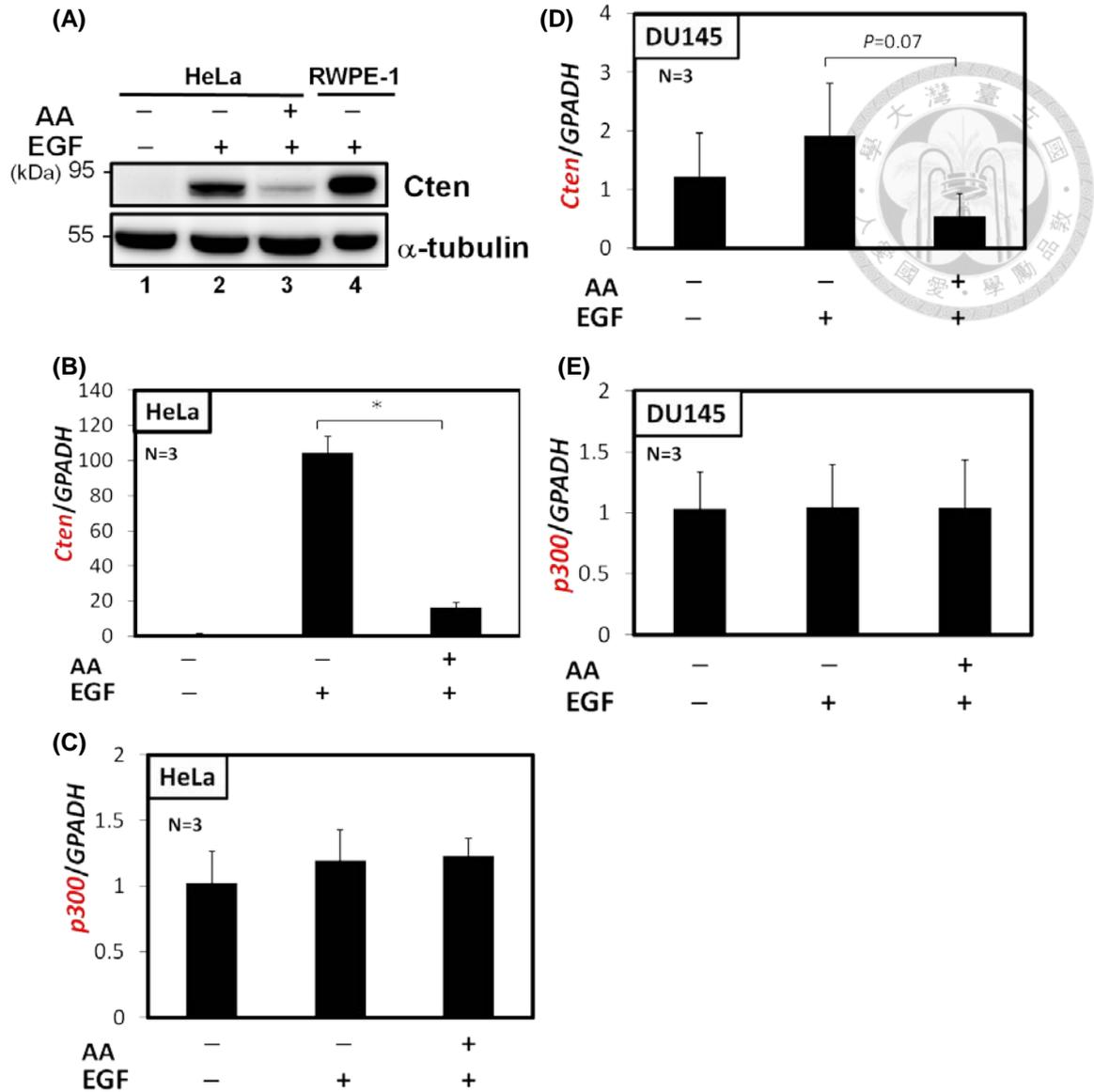


圖 3.9 Anacardic acid 可抑制癌症細胞株 HeLa 及 DU145 cells 中 EGF 所誘導之 Cten 表現

HeLa 及 DU145 細胞以 SFM 處理一天後，分別以含有 0.1% DMSO 之 SFM (lanes 1~2) 或含有 20 μ M AA 之 SFM (lane 3) 進行前處理 1 小時，再分別處理 0.1% DMSO (lane 1)、0.1% DMSO 及 100 ng/mL EGF (lane 2) 或 100 ng/mL EGF 及 20 μ M AA (lane 3) 12 小時 (HeLa) 或 24 (DU145) 小時。(A) 收取 total protein 進行 western blotting 分析。使用 anti-Cten antibody 與 anti- α -tubulin antibody 進行免疫染色。標準分子量標於左側。(B~E) 收取 total RNA 以 qRT-PCR 對 *Cten* (B and D)、*p300* (C and E) 及 *GAPDH* 基因進行偵測，以 *GAPDH* 為 internal control，利用 $2^{(-\Delta\Delta Ct)}$ 法進行計算，將沒有處理 AA 及 EGF 組別 (AA-, EGF-) 的基因表現量當作 1 倍，計算其它組別之基因相對表現量。(B,* 表示 $p=0.0001$)

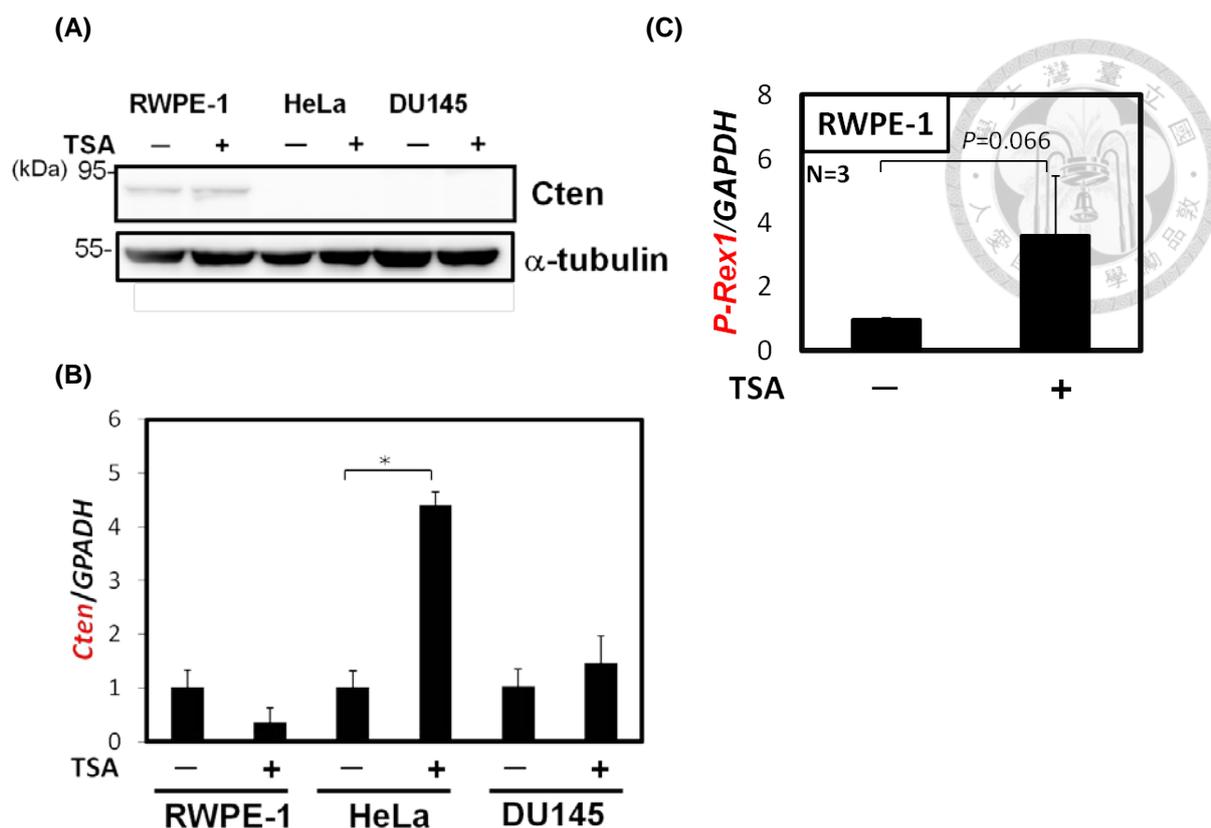


圖 3.10 TSA 可促進 HeLa cells 中 *Cten* mRNA 之表現量

SFM 培養一天之 RWPE-1、HeLa、DU145 cells 以含有 500 nM TSA 之 SFM 處理 24 小時 (TSA+) 或處理含有 0.1% DMSO 之 SFM (TSA-), (A) 收取 total protein 進行 western blotting 分析。使用 anti-Cten antibody 與 anti- α -tubulin antibody 進行免疫染色。標準分子量標於左側。(B)、(C) 收取 total RNA 進行 qRT-PCR 分析, 使用專一性偵測 *Cten* mRNA (B) 及 *p-Rex1* mRNA (C) 之引子進行偵測, 以 $2^{(-\Delta\Delta Ct)}$ 法進行計算, 將 TSA- 組別之基因表現量當作 1 倍, 計算 TSA+ 組別之基因相對表現量。*P-Rex1* 基因為已知在 RWPE-1 中會被 TSA 誘導之基因, 當作 TSA 處理的 positive control。(B, * 表示 $p=0.004$)

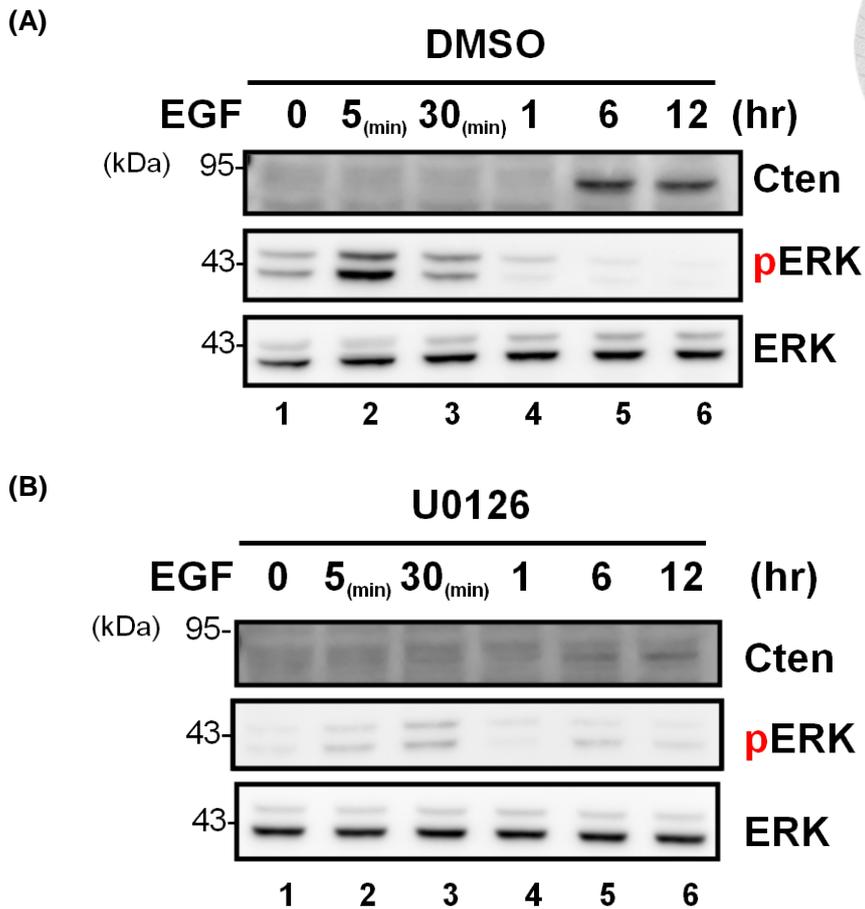


圖 3.11 MEK inhibitor U0126 對 HeLa 細胞株中 EGF 誘導之 Cten 蛋白質含量及 ERK 磷酸化之影響

HeLa 以 SFM 培養一天後，以含有 0.1% DMSO (A) 或 10 μ M U0126 之 SFM (B) 進行前處理 2 小時後，再分別處理含有 0.1% DMSO 及 100 ng/mL EGF 之 SFM (A) 或含有 10 μ M U0126 及 100 ng/mL EGF 之 SFM (B)，於不同時間點收取 total protein 進行 western blotting 分析。使用 anti-Cten antibody、anti-phospho ERK antibody 及 anti-total ERK antibody 進行免疫染色。標準分子量標於左側。

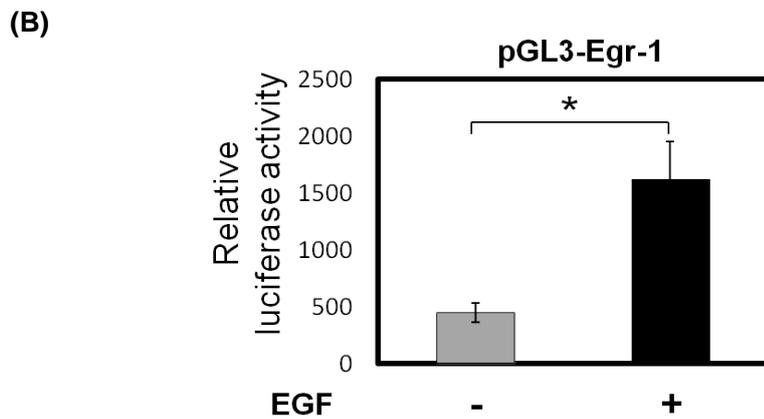
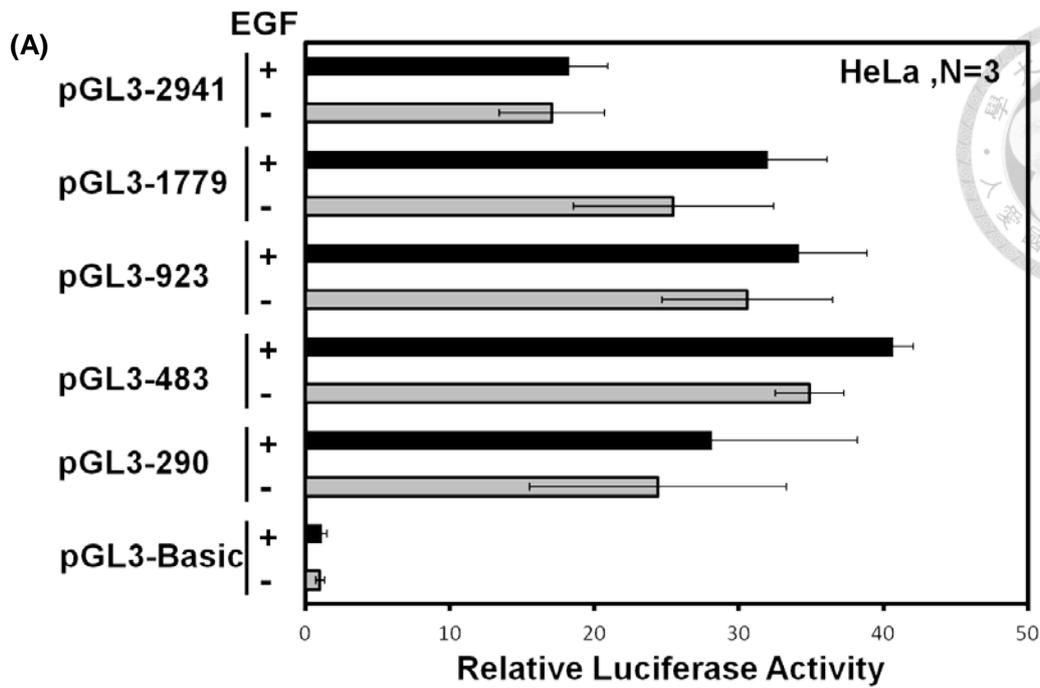


圖 3.12 HeLa 細胞株中 *Cten* 啟動子活性受 EGF 影響之分析

(A) 將含有不同長度 *Cten* promoter 及 (B) 含有 *Egr-1* promoter 之 pGL3 luciferase reporter plasmid 轉染進入 HeLa 中，4~6 小時後換成 SFM 培養 24 小時，再以含有 20 ng/mL EGF 之 SFM 培養 24 小時 (EGF+)，或處理不含 EGF 之 SFM (EGF-) 24 小時後，以 passive lysis buffer 收取 total protein，進行 dual luciferase assay 分析。Firefly luciferase activity 以 *Renilla* luciferase activity 做為 internal control 進行校正 (F/R)，再以 pGL3-Basic 之值做為 1 倍，計算其它組的相對表現量。*Egr-1* promoter 含有 serum response elements 做為 positive control。

(B,* 表示 $p=0.0039$)

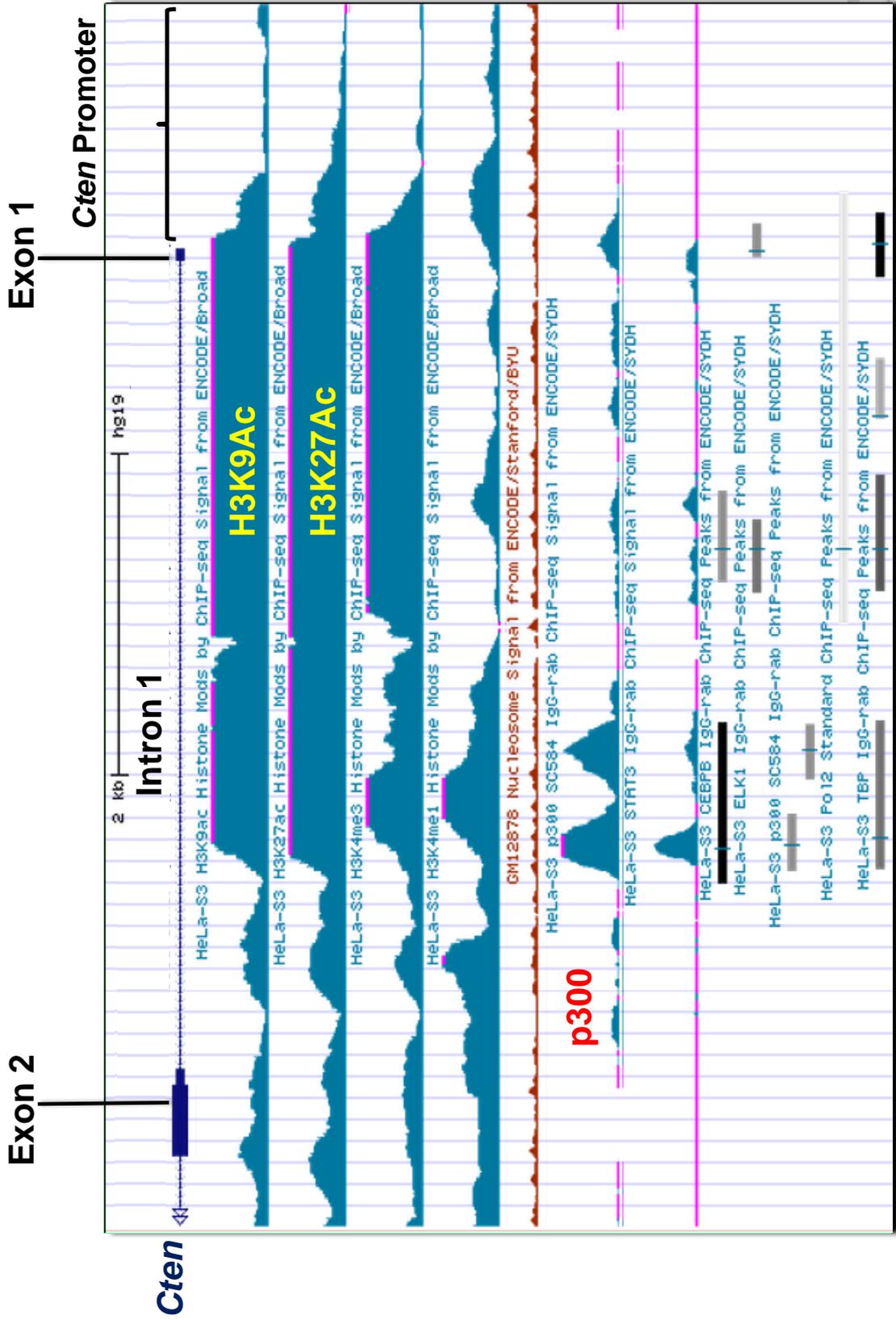


圖 3.13 利用 ENCODE 資料庫分析 *Cten* 基因中具有 histone acetylation 位置及轉錄因子結

合位。

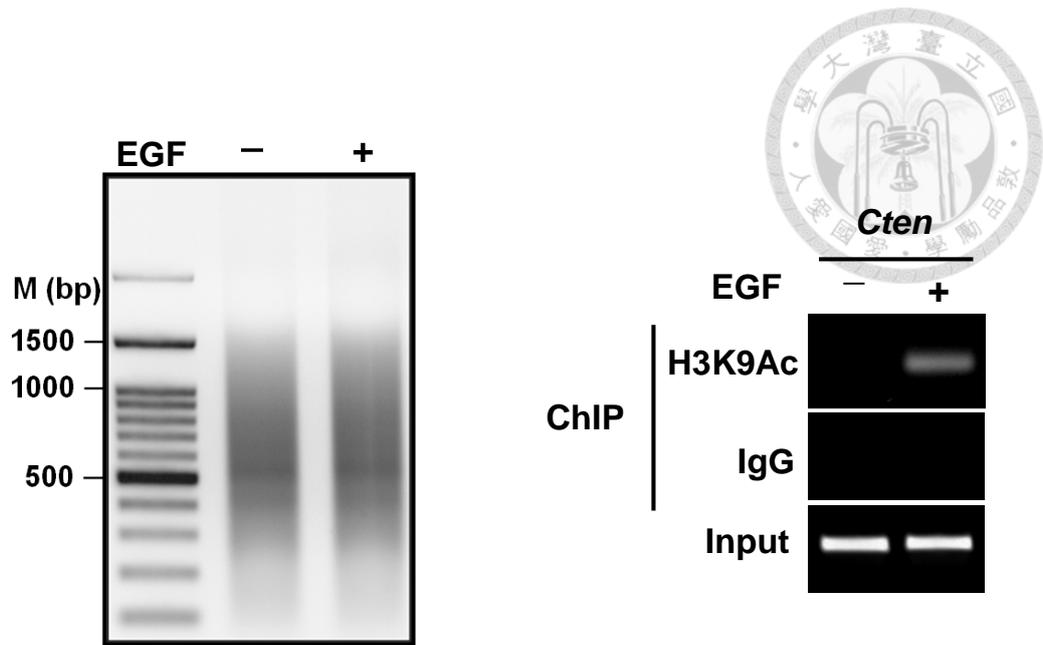


圖 3.14 以 ChIP assay 分析 *Cten* 啟動子之 histone acetylation 受 EGF 之影響

HeLa 細胞株以 SFM 培養一天後，以 100 ng/mL EGF 處理 12 小時 (EGF+) 或繼續持續處理 SFM (EGF-)，收取細胞後以 1% formaldehyde 進行蛋白質-DNA cross-link，(A) 以超音波震盪將 chromatin 震碎成約 200-1000 bp 之 DNA 片段，利用 1.5% 瓊脂糖膠體電泳分析，標準分子量 (M) 列於左側。(B) 利用抗體 anti-H3K9Ac 進行免疫沉澱，以抗體 anti-IgG 做為負控制組，純化 DNA 後以專一性偵測 *Cten* 啟動子之引子進行 PCR，並以 1.5% 瓊脂糖膠體電泳分析 PCR 產物。



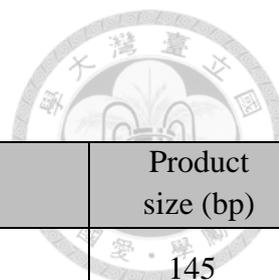
表一、建構用於 dual luciferase assay 之質體的引子序列及增殖區域

Plasmid	Amplified Region	Primers (限制酶切位以粗體加底線表示)
pGL3-290	<i>Cten</i> promoter -290/+40	(Chen et al., 2013)
pGL3-483	<i>Cten</i> promoter -483/+44	Construct by KuanYang
pGL3-923	<i>Cten</i> promoter -923/+69	F:5'- <u>CTCGAG</u> ACCCACCCCTGAGATTAG-3' R:5'- <u>AAGCTT</u> CTGGTGTCCACAGGTGGGC-3'
pGL3-1779	<i>Cten</i> promoter -1779/+69	F:5'-TCA <u>CTCGAGT</u> TCCGGGAGGTTGAGAC-3' R:5'- <u>AAGCTT</u> CTGGTGTCCACAGGTGGGC-3'
pGL3-2941	<i>Cten</i> promoter -2941/+69	F:5'- <u>CTCGAG</u> CCACCTCCCAGGTTTCAGGA-3' R:5'- <u>AAGCTT</u> CTGGTGTCCACAGGTGGGC-3'
pGL3-Egr-1	<i>Egr-1</i> promoter -771/+35	F:5'- <u>CTCGAG</u> AGACACCGTGCCATAGATCGA-3' R:5'- <u>AAGCTT</u> AAGCTGGCTGCGGCGGC-3'
pGL3-intron1021	<i>Cten</i> promoter and 1 kb Intron1 -1779/+1021	F:5'-TCA <u>CTCGAGT</u> TCCGGGAGGTTGAGAC-3' R:5'- <u>AAGCTT</u> CTCTGGGGAGTCCTGGTGC-3'
pGL3-intron1962	<i>Cten</i> promoter and 2 kb Intron1 -1779/+1962	F:5'-TCA <u>CTCGAGT</u> TCCGGGAGGTTGAGAC-3' R:5'-CATCCCGGGCACGGGA <u>AAGCTT</u> TCTA-3'
pGL3-intron5168	<i>Cten</i> promoter and 5 kb Intron1 -1779/+5168	將 pGL3-intron3.5kb 之 +1962/+5168 以 HindIII 作用後選殖於 pGL3-intron1962 中。
pGL3-intron1.5kb	<i>Cten</i> intron1 +3602/+5168	F:5'- <u>CTCGAGT</u> TACCTCCTTACCAAGCCCCAAGAA-3' R:5'- <u>AAGCTT</u> TGGTGACCTCTGCAGTTTACCTCTG-3'
pGL3-intron3.5kb	<i>Cten</i> intron1 +1630/+5168	F:5'-GGTCTGCCAGAGAGGAAAGGACGCT-3' R:5'- <u>AAGCTT</u> TGGTGACCTCTGCAGTTTACCTCTG-3'



表二、抗體列表

Western blotting (一次抗體)	Species	Condition
Anti-Cten antibody (R&D systems, MAB6925)	Mouse	1:2000, 室溫 1hr
Anti-Cten antibody (Springbioscience, clone SP83, M383RUO)	Rabbit	1:500, 4°C 過夜
Anti- α -tubulin antibody (Sigma, clone B-5-1-2, T 6074)	Mouse	1:4000, 室溫 1hr
Anti-phospho ERK antibody (Cell Signaling, #4370)	Rabbit	1:5000, 4°C 過夜
Anti-total ERK antibody (Cell Signaling, #4695)	Rabbit	1:5000, 4°C 過夜
Western blotting (二次抗體)	Species	Condition
<i>Peroxidase</i> -Labeled affinity purified antibody to rabbit IgG (H+L) (KPL, 474-1516)	Goat	1:10000, 室溫 1hr
<i>Peroxidase</i> -Labeled affinity purified antibody to mouse IgG (H+L) (KPL, 474-1806)	Goat	1:10000, 室溫 1hr
ChIP	Species	Condition
Anti-H3K9Ac antibody (Sigma)	Rabbit	1 μ g, 室溫 1hr



表三、用於定量 PCR 之基因名稱、引子序列及增殖片段大小

Genes	Primers	Product size (bp)
<i>TNS4/Cten</i>	F:5'- CCA GGAGCC AGT AGT GAA GGC AA -3' R: 5'- ATG GTG GGG GTG GTG ACC TCT-3'	145
β -actin	F:5'- CAG CCA TGT ACG TTG CTA TCC AGG-3' R: 5'- AGG TCC AGA CGC AGG ATG GCA TG-3'	151
<i>GAPDH</i>	F:5'- GGG CGA TGC TGG CGC TGA GT-3' R: 5'-GGG GCA TCA GCA GAG GGG G-3'	126
<i>P300</i>	F:5'- CAG CAG CGA CTC CTT CAG CAA CAG-3' R: 5'- GCT ACC AGT CCA GGA TGT GGG GAA-3'	278
<i>P-Rex1</i>	F:5'- GGG CCT TCT TCC TCT TCG ACA ACC-3' R: 5'- CCC ATC TTC CAC ATT CTC CAC CTC C-3'	167

表四、用於 CHART PCR 之引子序列、增殖片段大小及增殖區域

CHART PCR Primer set (<i>Cten</i> promoter)	Primer sequence	Product size (bp)
Primer A (-287/+112)	F:5'- GCT ATG CCC TGT CCA AGC AAG G-3' R: 5'-GGT GCT CCG TGT TCC TCT CTT C-3'	399
Primer B (-642/-258)	F:5'- GAC CAG ACG AGG GAC AGA GAT AGC-3' R: 5'-CAG GGA GTC CTT GCT TGG ACA G-3'	385
Primer C (-922/-526)	F:5'-CCC ACC CCT GAG ATT AGC CTA C-3' R: 5'-CTA GCT TGG GAT GGG GCC TCT AAC-3'	397
Primer D (-1242/-852)	F:5'-CCC TCC CAC TCT CCC ACA ATC A-3' R: 5'-AGT GAG GGA GCT GGC GAA GTC T-3'	391
Primer E (-1519/-1166)	F:5'-AGG CAG CTG GGG CTG AAA TCA C-3' R: 5'-AGG CAG CTG GGG CTG AAA TCA C-3'	354
Primer F (-1847/-1405)	F:5'-AGG CAG CTG GGG CTG AAA TCA C-3' R: 5'-GAT CCA TAC CTG GGG GTT ATG GTC-3'	443

表五、用於 ChIP 之引子序列、增殖片段大小及增殖目標

ChIP primer	Primer sequence	Product size (bp)
<i>Cten</i> promoter	F:5'- ATT CTA GCT ATG CCC TGT CC-3' R: 5'-ACC TCC AGA CCT GCC TTA AA-3'	264
<i>GAPDH</i> promoter	F:5'- CAA TTC CCC ATC TCA GTC GT-3' R: 5'-TAG TAG CCG GGC CCT ACT T-3'	246

