

國立台灣大學醫學院生物化學暨分子生物學研究所



碩士論文

Graduate Institute of Biochemistry and Molecular Biology,

College of Medicine,

National Taiwan University

Master Thesis

鑑定受幽門螺旋桿菌感染之胃腺癌上皮細胞內的激酶

Akt 受質

Identification of Akt Substrates Involved in *Helicobacter pylori* Infected Gastric Adenocarcinoma Epithelial Cells

林玫君

Mei-Chun Lin

指導教授：周綠蘋 博士

Adviser: Lu-Ping Chow, Ph.D.

中華民國 102 年 7 月

July, 2013



## 謝誌

一路走來跌跌撞撞，始終不變的是一顆對研究充滿熱忱及對身邊人們感謝的心。兩年前的炎炎夏日，懵懂的我穿起實驗衣，進入實驗室，對每件事物都充滿好奇心，東摸摸西看看，不知不覺身上潔白的實驗衣蛻變成一襲黑色的碩士袍，迎向兩年碩士生涯的尾聲。

謝謝我的指導教授周綠蘋老師，兩年來不論是課業或是實驗上的指導都令我受益良多。謝謝口試委員楊智欽老師、蔡孟勳老師及黃楓婷老師口試時提供許多建議，讓我從不同角度去思考問題，將眼界拓展地更寬廣。

謝謝相處兩年的實驗室夥伴，用無比的耐心及寬大的心包容我這小毛頭。當我對實驗方向茫然不知所措，成洲學長像盞明燈，指引我前進的道路，更不藏私地指導我許多實驗技巧，讓我能以最有效率的方式完成實驗。景光學長儘管忙碌，仍常撥空和我討論實驗，指導我質譜儀相關的概念，學長面對實驗的嚴謹態度更是讓我不禁肅然起敬。文雅學姊煮的熱騰騰元宵，讓當時剛進實驗室的我心暖暖，學姊很有耐心且仔細和我討論實驗，讓我將每個實驗都盡力做到好。看似兇狠但其實有善良心腸的昭圻學長，在我剛進實驗室時，花費許多時間指導我這新人，真是千萬分地感謝，請接受學妹深深一鞠躬！一直幫助我的好脾氣郁鈴學姊，不管什麼事都可以做得很好，令我超佩服。拼命三郎的經典代表治達學長，總是很仔細認真面對每件事和指導學弟妹實驗技術，並不時替我加油打氣。儘管當時忙著自己碩論的書宇學姊，仍仔細耐心地帶著我熟悉實驗室和指導我實驗技術。和善親切的芳瑩學姊，讓剛到新環境的我多一份安心感。隨性豁達的宗錡學長，其實心思細膩，會不時關心實驗失敗沮喪的我。和搞笑的翔鈴學姊聊天後，會充滿活力繼續埋首於實驗。一起奮鬥、一起瘋狂、相互打氣的玫瑰，後來進入實驗室和我一起在基因體奮鬥的聖為，我的電腦救星兼 *H.pylori* 夥伴子杰，有規劃有效率的靖雅，酷酷卻很搞笑的凱超學長，一起奮鬥的兩年時光感謝有這些好同學的陪伴讓我能不斷努力堅持下去。超可愛對我笑呵呵的竺陵學姊、成熟有大將之風的瑩竹學姊、做事有效率及調理的函君學姊、在 meeting 時總能侃侃而談的文麒學長、講話溫柔面帶微笑的家錚學姊、帥氣逼人的李豪學長、很有想法的瑞傑學長、認真的培芬學姊及身為明日之星的學弟妹靖慧、芳瑛及俊堯，謝謝大家的一路陪伴。

感謝認識快十年的 L.H.K. 成員包容我因實驗而耽誤我們的約會，分擔我被實驗壓得喘不過氣的憂慮不安，就算現在身處在不同國家的我們，還是像從前一樣，沒有顧忌、沒有猜疑，只有最深厚的友情。在不同地方奮鬥的 Bertha，兩年來我們留下的辛酸眼淚有沒有一公升那麼多、發洩壓力大吃美食有沒有一公噸那麼多，扮演著彼此的垃圾桶，擦乾眼淚、大啖美食後，我們依舊還是那兩個對研究充滿熱忱及美夢的小女孩。

謝謝我最心愛最可愛最重要的家人，可愛的外婆不時關心我吃飽穿暖沒。爸爸假日不辭辛勞地開車載我到實驗室，做實驗到太晚總會致電關心。媽媽每天準備豐盛早餐讓我吃飽飽，充滿活力地迎接每天的挑戰，晚上默默等門，和我分享一天發生有趣的事來分擔我的壓力。阿姨擔心我辛苦作實驗，常帶我去吃好料。哥哥儘管工作忙到半夜，還是會關心我的實驗和論文進度，提醒我要注意的地方。親愛的姐姐就是和我一起玩樂放鬆舒解壓力的最好夥伴，大吃大喝大玩少不了你！

我將帶著兩年來和大家相處滿滿的回憶，老師學長姊不吝惜給予我的指導和關懷，展翅高飛，迎向那片希望與夢想交疊的蔚藍未來！最後再說一聲「謝謝大家」！

## 摘要



關鍵字：胃癌、幽門螺旋桿菌、激酶 Akt、免疫共沈澱、蛋白質體學

胃癌是其中一種屬於高發生率及高死亡率的癌症類型，罹患胃癌的影響因子包含生活習慣、飲食習慣或是曾有胃部疾病史等。除此之外，在西元 1994 年被認定屬於一級致癌因子的幽門螺旋桿菌 (*Helicobacter pylori*) 也是與胃癌發生相關的病原體，根據先前的研究指出，感染幽門螺旋桿菌與胃癌發生之間具有高度的相關性。幽門螺旋桿菌其外形呈現螺旋狀，屬於革蘭氏陰性菌。在西元 1982 年，Barry J. Marshall 及 Robin J. Warren 成功從罹患胃炎及消化性潰瘍的病人胃部檢體分離出幽門螺旋桿菌，並且確立該細菌為誘發胃炎及消化性潰瘍發生的重要因子，然而幽門螺旋桿菌感染所引發的宿主反應及細胞內訊息傳遞機制仍不清楚。

Akt 屬於 Serine/Threonine 激酶，會去磷酸化各種參與在細胞週期、細胞存活及細胞生長等相關的蛋白質。PI3K/AKT 路徑的活化很常發生在人類惡性腫瘤內，其中胃癌也有同樣的現象，然而對於其切確的功能仍不清楚。現今認為激酶 Akt 對於腫瘤生成的過程扮演重要的角色。再者先前的研究發現在幽門螺旋桿菌感染的情况下，會促使 PI3K/AKT 路徑的活化。因此我們希望可藉由質譜蛋白質體學 (mass spectrometry-based proteomic approach) 的方法鑑定幽門螺旋桿菌感染時，激酶 Akt 會去磷酸化的下游受質有哪些，並探討這些分子對於胃癌致癌機轉的重要性。

為了鑑定激酶 Akt 的受質，我們使用液相層析串聯質譜儀 (liquid chromatography tandem mass spectrometry) 鑑定利用免疫共沈澱 (co-immunoprecipitation) 技術分離出來的激酶 Akt 複合物。藉由比較未感染幽門螺旋桿菌及有感染幽門螺旋桿菌激酶 Akt 免疫共沈澱複合物之間的差異性，我們鑑定到 37 個激酶 Akt 可能的交互作用個體。接著我們使用生物資訊統計軟體分析鑑定到的交互作用個體並以西方點墨法 (western blotting) 進行驗證。我們發現幽門螺旋桿菌感染時，EphA2 在 Ser 897 位置的磷酸化有增加的現象。此外，當抑制 EphA2 蛋白質表現量時，會減弱細胞移動的能力。

未來我們將會對其他鑑定到的蛋白質磷酸化程度進行驗證並且探討其生理作用，期望可以對 PI3K/AKT 路徑參與在幽門螺旋桿菌感染因而造成胃癌的致癌機轉有更深入的瞭解。

## Abstract

Keywords: Gastric cancer, *Helicobacter pylori*, Akt, Co-IP, Proteomics

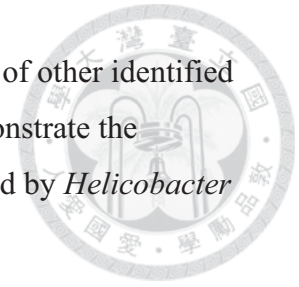


Gastric cancer, one of the high incidence rates and mortality types of cancer, results from lifestyle habits, dietary factors, or a history of disorders of stomach. Besides these factors, *Helicobacter pylori*, classified as a class I carcinogenic agent in 1994, is also an important pathogen related to gastric cancer. According to previous studies, the infection of *Helicobacter pylori* has a high correlation with the incidence of gastric cancer. *Helicobacter pylori* belongs to gram-negative bacterium having spiral shape. In 1982, Barry J. Marshall and Robin J. Warren isolated *Helicobacter pylori* from the stomach specimens of gastritis and peptic ulceration patients, and established that the infection of *Helicobacter pylori* is an important factor inducing the occurrence of gastritis and peptic ulceration. However, the host responses and regulation of signaling transduction during *Helicobacter pylori* infection are still not understood.

Akt, as a serine/threonine kinase, phosphorylates multiple substrates involved in cell cycle progression, cell survival, cell growth and so on. Activation of PI3K/AKT pathway is one of the most common molecular events in human malignancies including gastric cancer, although the precise function remains unclear. It seems that Akt may play an emerging role in tumorigenesis. Moreover, it has been reported that PI3K/AKT pathway is also activated during *Helicobacter pylori* infection. Therefore, we aim to identify the downstream targets of Akt that may be phosphorylated during *Helicobacter pylori* infection by proteomics approach to investigate the carcinogenesis of gastric cancer.

In order to identify Akt substrates, we analyzed Akt co-IP complex by LC-MS/MS (liquid chromatography tandem mass spectrometry). By comparing the differences of Akt co-IP complex between AGS cells and AGS cells infected with *Helicobacter pylori*, we identified 37 Akt interacting proteins. Then we analyzed these potential interacting proteins with bioinformatics software and validated the results with western blotting. Furthermore, among these proteins, we found that EphA2 Ser 897 phosphorylation was regulated in response to *Helicobacter pylori* infection. In addition, after knocking down EphA2, the ability of cell migration was decreased.

In the future, we will further validate the phosphorylation level of other identified possible Akt substrates and their physiological roles, hoping to demonstrate the involvement of PI3K/AKT pathway in gastric carcinogenesis induced by *Helicobacter pylori*.



## 縮寫



2-me	2-mercaptoethanol
4EBP1	4E-binding protein 1
ACN	Acetonitrile
APS	Ammonium persulfate
BAD	Bcl-2-associated death promoter
BCA	Bicinchoninic acid
CagA	Cytotoxin associated gene A
CAPS	3-[cyclohexylamino]-1-propane sulfonic acid
Co-IP	Co-immunoprecipitation
Csk	C-terminal Src kinase
DIGE	Difference gel electrophoresis
DMEM	Dulbecco's modified eagle medium
ECL	Enhanced chemiluminescence
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
eEF2	Eukaryotic elongation factor-2
eEF2K	Eukaryotic elongation factor-2 kinase
eIF4E	Eukaryotic initiation factor 4E
FBS	Fetal bovine serum
FOXO1	Forkhead box protein 1
FOXO3	Forkhead box protein 3
GAPDH	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
GSK3 $\beta$	Glycogen synthase kinase 3 $\beta$
<i>H.pylori</i>	<i>Helicobacter pylori</i>
HRP	Horseradish peroxidase
ICAT	Isotope-coded affinity tags
IgG	Immunoglobulin G
IP	Immunoprecipitation
IPA	Ingenuity systems pathway analysis
iTRAQ	Isobaric tags for relative and absolute quantitation

kDa	Kilo Dalton
LB	Luria broth
LC-MS/MS	Liquid chromatography tandem mass spectrometry
MAPK	Mitogen-activated protein kinase
MOI	Multiplicity of infection
OD	Optical density
PAGE	Polyacrylamide gel electrophoresis
PBS	Phosphate-buffered saline
PDK1	Phoinositide-dependent protein kinase-1
PI3K	Phosphoinositide-3 kinase
PIP2	Phosphatidylinositol 4,5-biphosphate
PIP3	Phosphatidylinositol 3,4,5-triphosphate
PRAS40	Proline-rich Akt substrate of 40 kDa
PTM	Post-translational modification
SDS	Sodium dodecylsulphate
SILAC	Stable isotope labeling by amino acids in cell culture
SHP2	SH2 domain-containing protein tyrosine phosphatase-2
shRNA	Short hairpin RNA
TEMED	N,N,N',N''-tetramethylene diamine
TFA	Trifluoroacetic acid
TN	Tris and NaCl buffer
TNT	Tris, NaCl and Tween buffer
Tris	Tris (hydroxymethyl)-aminomethane
UTR	Untranslated region



# 目錄



謝誌.....	I
摘要.....	II
Abstract.....	III
縮寫.....	V
第一章 導論.....	1
第一節 胃癌.....	1
第二節 幽門螺旋桿菌.....	3
第三節 激酶 Akt.....	8
第四節 蛋白質體學 (proteomics).....	10
第五節 研究動機.....	13
第六章 研究策略.....	14
第二章 實驗材料.....	15
第一節 胃腺癌上皮細胞.....	15
第二節 幽門螺旋桿菌菌株.....	15
第三節 儀器及裝置.....	15
第四節 大腸桿菌及質體.....	16
第五節 酵素.....	16
第六節 抗體.....	17
第七節 試劑組及藥品.....	18
第八節 軟體及資料庫.....	20
第三章 實驗方法.....	21
第一節 胃腺癌上皮細胞的培養.....	21
第二節 幽門螺旋桿菌的培養.....	21
第三節 幽門螺旋桿菌感染胃腺癌上皮細胞.....	22
第四節 質體轉染.....	23
第五節 免疫共沈澱.....	23
第六節 蛋白質分析法.....	24
第七節 銀染.....	27
第八節 膠體原位酵素切割及蛋白質鑑定.....	28
第九節 資料庫分析.....	29
第十節 小髮夾 RNA (shRNA) 建立.....	29



第十一節 細胞傷口癒合分析 (wound healing assay).....	30
第四章 實驗結果.....	31
第一節 受幽門螺旋桿菌感染的胃腺癌上皮細胞形態.....	31
第二節 使用西方點墨法確認幽門螺旋桿菌對胃腺癌上皮細胞內訊息傳遞的 調控.....	31
第三節 分析胃腺癌上皮細胞中激酶 Akt 的免疫共沈澱複合物.....	31
第四節 使用西方點墨法驗證液相層析串聯質譜儀及 IPA 生物醫學分析軟體暨 資料庫的分析結果.....	34
第五節 使用西方點墨法驗證幽門螺旋桿菌對 EphA2 的磷酸化後修飾作用.....	34
第六節 建立 EphA2 shRNA.....	35
第七節 EphA2 的功能分析.....	36
第五章 討論.....	37
第一節 結語.....	37
第二節 研究策略探討.....	38
第三節 激酶 Akt 免疫共沈澱複合物的分析.....	39
第四節 EphA2.....	43
第五節 未來展望.....	46
第六節 參考文獻.....	48
圖表與說明.....	53
附錄.....	78

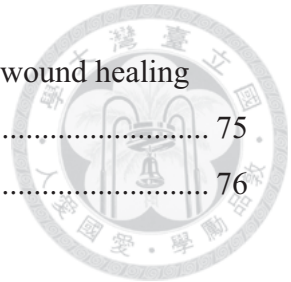
## 圖目錄



圖 A .....	3
圖 B .....	5
圖 C .....	7
圖 D .....	9
圖 E .....	11
圖 F .....	12
圖 G .....	13
圖 H .....	14
圖 I .....	35
圖 J .....	41
圖 K .....	44
圖 L .....	45

Figure 1. Infection of AGS cells with <i>H.pylori</i> resulted in the typical hummingbird phenotype. ....	64
Figure 2. <i>H.pylori</i> induced Akt phosphorylation in AGS cells in a time-dependent manner. ....	65
Figure 3. Efficiency of 3×Flag-Akt transfection and pCMV-3×Flag-Akt immunoprecipitation.....	66
Figure 4. Comparing the differences of Akt co-IP complex between AGS cells and AGS cells infected with <i>H.pylori</i> .. ....	67
Figure 5. Ingenuity Pathway Analysis (IPA) prediction and analysis of signal transduction for those proteins identified in Akt co-immunoprecipitate from <i>H.pylori</i> -infected AGS cells. ....	68
Figure 6. Bioinformatic ontology of identified Akt substrates.....	69
Figure 7. The association networks analysis of identified Akt substrates. ....	70
Figure 8. Using Ingenuity Pathway Analysis (IPA) to generate PI3K/AKT signaling... ..	71
Figure 9. Investigating the interaction between Akt and Akt associated proteins by co-immunoprecipitation. ....	72
Figure 10. Effects of <i>H.pylori</i> infection on phosphorylation of EphA2 in AGS cells. .	73
Figure 11. EphA2 knockdown in AGS cells.....	74

Figure 12. Effect of EphA2 knockdown on cell migration in vitro by wound healing assay.....	75
Figure 13. The summary and conclusion of this study.....	76
Supplementary Figure 1. Effects of <i>H.pylori</i> infection on phosphorylation of GSK3 $\beta$ and p27 in AGS cells.....	77



## 表目錄

Table 1. Top 5 list of canonical pathways activated by 3×Flag-Akt complex from Ingenuity Pathway Analysis. ....	54
Table 2. List of Akt substrates identified by LC-MS/MS in <i>H.pylori</i> -infected AGS cells. ....	56
Table 3. Biological process of identified Akt substrates categorized by Software Tool for Researching Annotation of Proteins (STRAP) .....	58
Table 4. Molecular functions of identified Akt substrates categorized by Software Tool for Researching Annotation of Proteins (STRAP) .....	62

# 第一章 導論



## 第一節 胃癌

### 1.1 胃癌流行病學及其分類

素有二十一世紀黑死病之稱的癌症，每年造成約 760 萬人死亡，其中胃癌發生率排行第二位，致死率排行第四位，每年約有 70 萬人死於胃癌 (1)。在亞洲地區，以台灣為例，胃癌在所有癌症死因中排行第六位，造成每年約 2 千人死亡 (2)。

近乎九成的胃癌屬於由胃上皮細胞 (gastric epithelial cell) 癌化所造成的胃腺癌 (gastric adenocarcinoma)，非何杰金氏淋巴瘤 (Non-Hodgkin's lymphoma) 及平滑肌肉瘤 (leiomyosarcoma) 則約莫占剩下的一成。胃腺癌 (gastric adenocarcinoma) 根據組織病理形態細分為腸型 (intestinal type of gastric carcinoma) 和瀰漫型 (diffuse type of gastric carcinoma)。前者經由淺表性胃炎 (superficial gastritis)、慢性胃炎 (chronic gastritis)、萎縮性胃炎 (atrophic gastritis)、腸上皮化生 (intestinal metaplasia) 及異生 (dysplasia) 等一連串階段逐漸演變至胃腺癌 (gastric adenocarcinoma)。後者則是由單獨的腫瘤細胞造成，細胞分化程度較低，不易有腺體形成，此種類型的病患預後相較於前者來的差 (3-5)。


### 1.2 胃癌危險因子 (risk factor)

截至目前為止的研究認為會造成胃癌發生機率增加的危險因子如下 (圖 A)：

#### a.) 吸煙

根據部分研究指出，抽煙可能會造成胃部細胞不正常增生，增加罹患胃癌的風險 (4)。

#### b.) 飲食習慣



目前研究認為若攝取高鹽分食物，容易對胃部造成刺激，進而損壞胃壁黏膜組織，造成萎縮性胃炎 (atrophic gastritis)。此外食用經由加工後含有亞硝酸鹽 (nitrite) 或硝酸鹽 (nitrate) 的食物，可能會在胃部形成具有致癌性的亞硝氨基化合物 (N-nitroso compounds) (6, 7)。

另外也有報導指出，食用大量新鮮蔬菜及水果，其所含的抗氧化物質，例如維他命 C (vitamin C) 及  $\beta$ -胡蘿蔔素 ( $\beta$ -carotene)，有助於降低罹患胃癌的機率 (7)。

c.) 胃部手術 (gastric surgery)

若曾經接受過胃部分切除手術 (partial gastrectomy)，可能會增加剩餘胃部在五到二十年後罹患胃癌的機率 (4)。

d.) 血型 (blood group)

A 型的人罹患胃癌機率相較於其它血型來的高 (8)。

e.) 遺傳 (heredity)

儘管大部分的胃癌為隨機性發生，但仍有約 8-10% 案例屬於遺傳性。對於家族中有胃癌病史的親屬，其罹患胃癌的風險相較於其他人來的高 (4)。

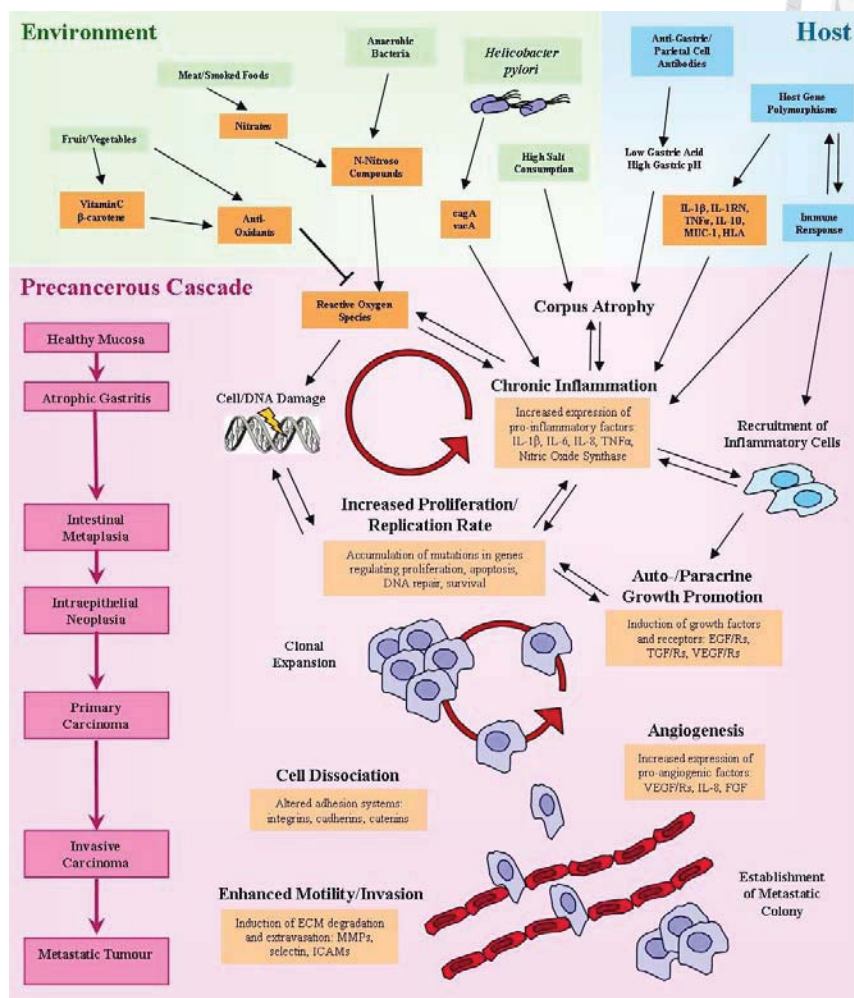
f.) EB 病毒感染 (Epstein-Barr virus infection)

目前研究顯示 EBV 感染可能與胃癌的發生有關 (4)。

g.) 幽門螺旋桿菌感染 (*Helicobacter pylori* infection)

西元 1994 年，國際癌症研究署 (International Agency for Research on Cancer, IARC) 將幽門螺旋桿菌 (*Helicobacter pylori*) 訂定為一級致癌因子 (Type I carcinogen) (9)。研究結果顯示，胃癌發生率與幽門螺旋桿菌感染率之間具有高度相關性，透過血清學研究指出，血清對幽門螺旋桿菌呈現陽性反應者，其日

後罹患胃癌的機率會比陰性者來的高，勝算比 (odds ratio) 可達 5.9 左右 (5)。



(圖 A：摘自 *Cancer Therapy* 5, 877-894 (2007).)

## 第二節 幽門螺旋桿菌

### 2.1 幽門螺旋桿菌的分離

早期醫學界普遍認為腸胃道疾病的發生多是由於外在壓力或生活習慣原因所造成，一直到西元 1982 年，醫生 Barry J. Marshall 及病理學家 Robin J. Warren 成功從罹患胃炎 (gastritis) 及消化性潰瘍 (peptic ulceration) 的病人胃部檢體分離出幽門螺旋桿菌，進行體外培養，並以人體試驗確立幽門螺旋桿菌為誘發胃炎 (gastritis) 及消化性潰瘍 (peptic ulceration) 發生的重要因子 (10)，這兩位科學家也因此於西元 2005 年獲得諾貝爾生理醫學獎的殊榮。



## 2.2 幽門螺旋桿菌形態及特徵

幽門螺旋桿菌屬於微嗜氧 (microaerophilic) 的革蘭氏陰性菌 (Gram-negative bacteria) ，其外形呈現螺旋狀，菌體長約 2.4-4.0  $\mu\text{m}$ ，寬約 0.5-1.0  $\mu\text{m}$ ，在尾端有 2-6 根鞭毛 (flagella) ，可協助幽門螺旋桿菌泳動至胃上皮細胞表面。幽門螺旋桿菌最合適的生長條件為 pH 6.9-8.0，但由於菌體本身可分泌尿素酶 (urease) 分解尿素 (urea) 產生氨 (ammonium) 以中和胃酸，使幽門螺旋桿菌可以在剛由食道進入胃部時，存活在 pH 值達 2 的極度酸性環境下 (11)，之後菌體會持續增生，寄生在胃黏膜的黏液層 (mucosal gel layer) 及胃黏膜的上表皮細胞 (superficial epithelium) ，引發發炎反應，造成胃部的病變 (10)。

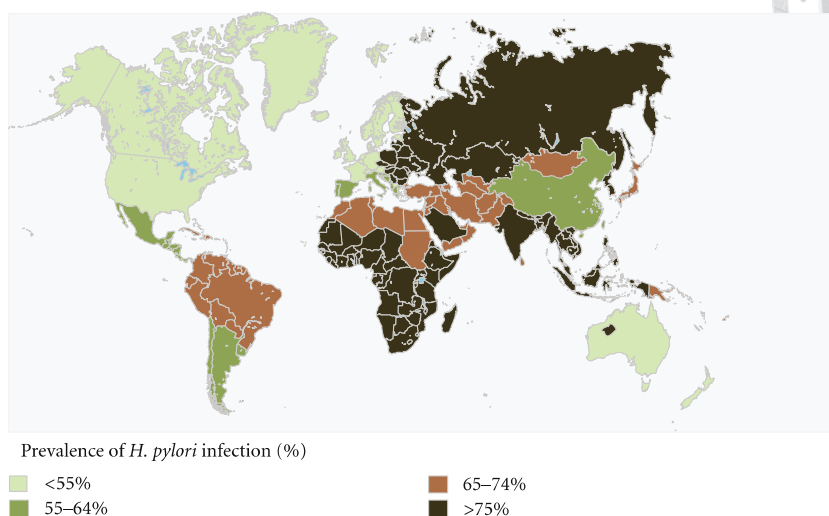
## 2.3 幽門螺旋桿菌於流行病學 (epidemiology) 上的角色

人類為幽門螺旋桿菌的主要宿主，全球超過半數以上的人口其胃部皆受到幽門螺旋桿菌感染 (圖 B) ，而其盛行率隨著各地區開發程度不同而有所差異，開發中國家的感染率 (如亞洲、中東地區、中南美洲及非洲) 一般而言多高於已開發國家 (12, 13)。多數幽門螺旋桿菌感染多是從幼兒時期發生，根據統計結果顯示，在開發中國家，五歲孩童已有 50% 以上的感染率，成人更是高達 90% (14)。

幽門螺旋桿菌主要藉由兩種途徑傳染，一種是口對口途徑 (oral-oral route) 傳染，像是接觸到嘔吐物或是唾液，常發生在孩童時期。另一種則是糞口途徑 (fetal-oral route) 傳染，可能是食用到被糞便污染的飲用水或是食物，在開發程度較低的國家較常見 (11)。開發中國家相較於已開發國家約高出 1-3% 的發病率，發病時間多在初期 (14, 15)，經由血液檢測發現這種急性感染為暫時且可恢復的，但若受到幽門螺旋桿菌長時間反覆感染，會使得人體長時間帶原菌體，而轉為慢性感染，可能會促使腸道細胞形態改變，造成慢性胃炎 (chronic gastritis) 或是消化性潰瘍



(peptic ulceration) 等胃部疾病，其中約有 1-3 % 的人最終罹患胃癌 (16, 17)。



(圖 B：摘自 *Ulcers 2011*, 1-23 (2011).)

## 2.4 幽門螺旋桿菌致病因子 (virulence factor)

幽門螺旋桿菌藉由菌體本身的結構或是自行分泌出的蛋白質等致病因子來幫助其存活或是移動，並且生長在胃部的黏膜層。致病因子會對宿主細胞內訊息傳遞路徑進行調控，可能會導致細胞走向癌化，因此透過對致病因子的研究，期望可幫助科學家對於幽門螺旋桿菌的致癌機轉有更進一步的瞭解。以下簡述較為主要的致病因子：

### 2.4.1 尿素酶 (urease)

當幽門螺旋桿菌由食道進入胃部時，必須要能存活在極度酸性的胃部環境，此時菌體可使用氫離子調控尿素通道 ( $H^+$ -gated urea channel, Ure I) 從外界獲取尿素。Ure I 位在菌體內層膜上，當環境 pH 值達 6.5 時，該通道會打開，使尿素酶得以分解尿素，產生氫離子及二氧化碳，鹼性的氫離子可中和胃酸，在菌體周圍產生一中性環境，使得幽門螺旋桿菌可暫時存活在胃部。此外透過動物實驗發現，尿素酶的活性對於幽門螺旋桿菌存活在胃部環境是一必要因子 (18)。



#### 2.4.2 鞭毛 (flagella)

幽門螺旋桿菌尾端有 2-6 根鞭毛，用來幫助菌體移動。當幽門螺旋桿菌進入胃部後，使用尿素酶製造出的中性環境可幫助其存活下來。在受到胃黏膜的黏液層 (mucus gel layer) 中高濃度的尿素和重碳酸根離子 (bicarbonate) 趨化下，幽門螺旋桿菌利用鞭毛及其螺旋狀結構幫助菌體穿透黏液層，穩定寄生在 pH 值接近中性的胃表皮和胃黏液層之間 (19, 20)。

#### 2.4.3 脂多醣體 (lipopolysaccharide, LPS)

研究發現，幽門螺旋桿菌的脂多醣體刺激 Interleukin-8 產生的能力遠低於大腸桿菌的脂多醣體一千倍。此外高達 85 % 幽門螺旋桿菌的脂多醣體上有 Lewis x 或 Lewis y 抗原構型，且這些 Lewis 抗原亦廣泛性分佈在人類細胞膜上，例如胃黏膜上皮細胞 (gastric mucosal epithelial cells)。由於分子構型上的相似性，宿主會產生自體免疫抗體 (autoantibody) 進而攻擊胃黏膜上皮細胞，造成胃壁受損 (21)。

#### 2.4.4 黏著因子 (adhesin)

胃上皮細胞和黏膜常有細胞新生或是胃酸分泌，再加上胃部蠕動，因此幽門螺旋桿菌須以黏著因子貼附在胃黏膜上皮細胞，以協助菌體持續存活在胃部 (21)。

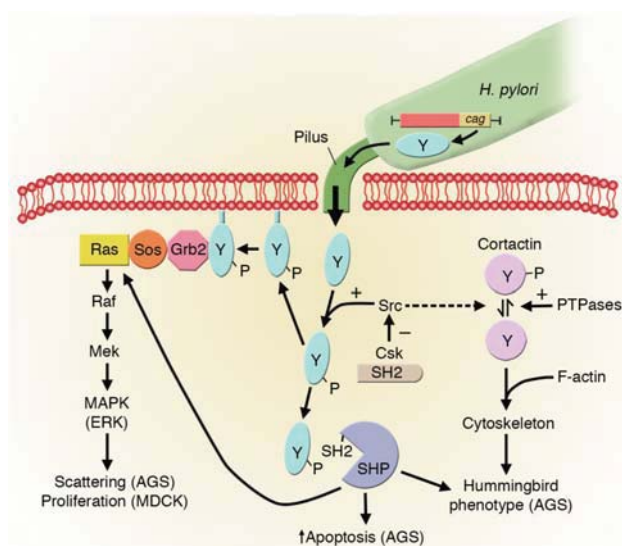
#### 2.4.5 Cytotoxin-associated gene A (CagA)

CagA 是幽門螺旋桿菌眾多致病因子中，最為被廣泛研究及討論的一個。CagA 蛋白質由基因 *cagA* 表現，*cagA* 位在幽門螺旋桿菌中的 cytotoxin-associated gene pathogenicity island (*cag* PAI)，然而並非每一種幽門螺旋桿菌菌株皆帶有基因 *cagA*。*cag* PAI 由 25 個以上的基因構成，大小約 40kDa，帶有 *cag* PAI 的幽門螺旋桿菌株得以表現第四型分泌系統 (Type IV secretion system, TFSS) (21)。當幽門螺旋桿菌黏附在胃上皮細胞時，可透過第四型分泌系統將 CagA 送入宿主細胞，並由細胞



內的激酶 Src 將其磷酸化，進而參與宿主細胞內訊息傳遞 (圖 C)。

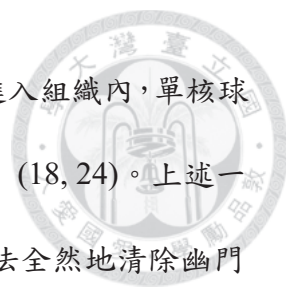
磷酸化的 CagA 會與磷解酶 SHP2 結合並不正常強化其活性，過度活化的磷解酶 SHP2 進而抑制焦黏著激酶 (focal adhesion kinase, FAK) 的活性，造成細胞形態拉長且移動能力增加。磷酸化的 CagA 若與細胞膜附近的 Grb2 產生交互作用，會引發下游 Ras/Raf/Mek/MAPK 訊息傳遞，最終造成細胞形態改變。另外當磷酸化的 CagA 和 Csk (C-terminal Src kinase) 結合時，進而會迴饋抑制激酶 Src 的活性，使其無法對 Cortactin 進行磷酸化。去磷酸化的 Cortactin 和 F-actin 結合後會使得細胞骨架構型發生變化，產生蜂鳥狀形態 (hummingbird phenotype) (22)。



(圖 C：摘自 *The Journal of Clinical Investation* **113**, 321-333 (2004).)

## 2.5 幽門螺旋桿菌引發的宿主反應 (host responses)

感染幽門螺旋桿菌後，其菌體與致病因子和宿主細胞交互作用的結果，會引發宿主細胞一連串的免疫反應。首先在感染初期，抗原呈現細胞 (antigen-presenting cells) 膜上的類 Toll 受體 (Toll-like receptors) 會辨認菌體上的病原相關分子模式 (pathogen-associated molecular patterns)，進而釋放出腫瘤壞死因子 (tumor necrosis factor- $\alpha$ )、Interleukin-1 $\beta$  及 Interleukin-8 等細胞激素 (cytokine) (18, 23)，作為趨化



因子 (chemoattractant) 吸引嗜中性白血球 (neutrophil) 由血管進入組織內，單核球 (monocyte) 分化為巨噬細胞 (macrophage) 以清除幽門螺旋桿菌 (18, 24)。上述一連串在感染初期引發的先天性免疫反應 (innate immunity) 並無法全然地清除幽門螺旋桿菌，感染後期啟動的後天性免疫反應 (adaptive immunity) 透過活化 Th1 細胞以釋放干擾素 (interferon- $\gamma$ ) 等細胞激素來強化巨噬細胞或 T 細胞毒殺幽門螺旋桿菌能力 (18, 23, 24)。

### 第三節 激酶 Akt

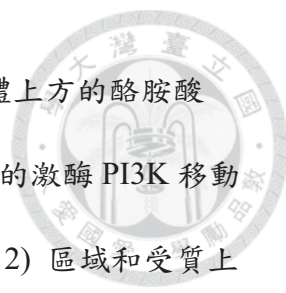
#### 3.1 激酶 Akt 生理角色

西元 1997 年，Stephen P. Staal、Janet W. Hartley 及 Wallace P. Rowe 在老鼠身上發現一具有轉形 (transformation) 能力的反轉錄病毒 (retrovirus)，將其所帶有的基因命名為 Akt 8 (25)。由於 Akt 8 被發現可在裸鼠 (nude mice) 身上造成腫瘤的形成，認為其具有致癌基因 (oncogene) 的特性，而稱之為 v-Akt (viral oncogene Akt) (26)。

激酶 Akt 又稱作 protein kinase B (PKB)，為普遍表現在哺乳類細胞中的 Serine/Threonine 激酶。激酶 Akt 由三個部分構成：催化區域 (catalytic domain)、N 端 PH 區域 (pleckstrin homology-containing N-terminal domain) 及 C 端疏水調節區域 (C-terminal hydrophobic domain) (27)。受到生長因子 (growth factor) 或是其他來自細胞外的刺激時，激酶 Akt 會透過對下游受質進行磷酸化後修飾以參與調控細胞內各種生理反應，包括營養代謝、細胞生長、細胞凋亡、細胞存活、轉錄作用、細胞增生及血管新生 (27-29)。

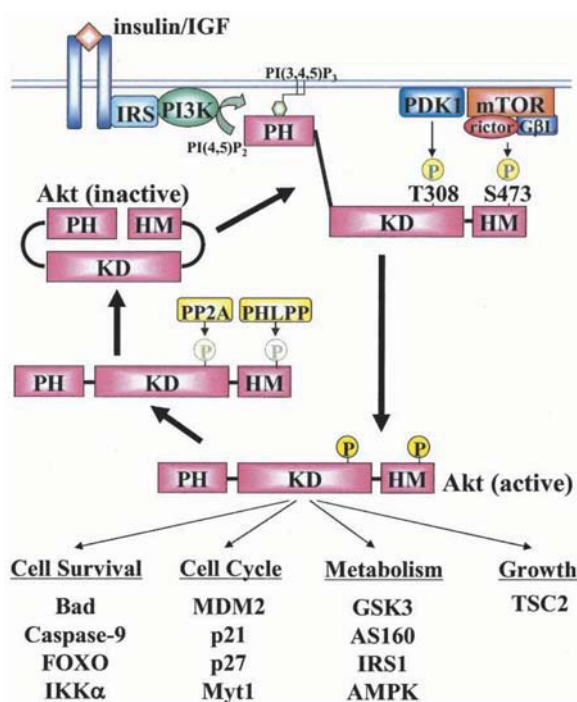
#### 3.2 激酶 Akt 的活化

激酶 Akt 的活化過程主要分為兩個階段 (圖 D)：



第一階段：當細胞外的生長因子接上細胞膜上的受體時，受體上方的酪胺酸 (Tyrosine) 會自體磷酸化 (autophosphorylation)。位在細胞質中的激酶 PI3K 移動到細胞膜附近，並以其 p85 次單元的 SH2 (Src homology domain 2) 區域和受質上磷酸化的酪胺酸結合，使得激酶 PI3K 發生結構上的改變進而活化，將細胞膜上的 PIP2 磷酸化成 PIP3，PIP3 會與在激酶 Akt N 端的 PH 區域結合，使得激酶 Akt 結構改變，後方 kinase 區域露出。

第二階段：激酶 Akt 由細胞質移動到細胞膜附近，並由激酶 PDK1 (3-phosphoinositide-dependent kinase 1) 在其 Thr 308 位置進行磷酸化後修飾，以增加激酶 Akt 一百倍左右的活性。另一方面，對於磷酸化激酶 Akt Ser 473 位置的激酶，透過一連串研究，終於在西元 2005 年確認是 mTORC2 (mammalian target of rapamycin complex 2)，當 mTORC2 磷酸化激酶 Akt Ser 473 位置後，會大幅增加激酶 Akt 的活性 (27, 30)。



(圖 D：摘自 *Genes & Development* **20**, 3347-3365 (2006).)



## 第四節 蛋白質體學 (proteomics)

### 4.1 蛋白質體學定義

西元 1994 年，Marc Wilkins 提出「蛋白質體」這一新名詞，意指生命體內某器官、組織或細胞內表現的蛋白質全體，而針對蛋白質體所做的研究，稱為「蛋白質體學」。傳統的蛋白質學著重研究某一特定蛋白質的序列、結構及功能等定性分析，蛋白質體學則是針對一群蛋白質進行系統性的研究，討論眾多蛋白質之間의 交互作用關係或是定量分析。

### 4.2 定量蛋白質體學

定量分析蛋白質在不同生理條件下的表現量有助於瞭解其功能或與病理機制的關係 (31)。由於樣品純化、質譜儀效能及生物資訊不斷進步，對於定量蛋白質體學的研究無疑是一大助力，現今多使用蛋白質相對定量分析：透過比較兩種不同條件的樣品，找出因受到調控而造成表現量發生改變的蛋白質，並且以質譜儀鑑定其身份。以下針對常用的相對定量蛋白質體學進行介紹：

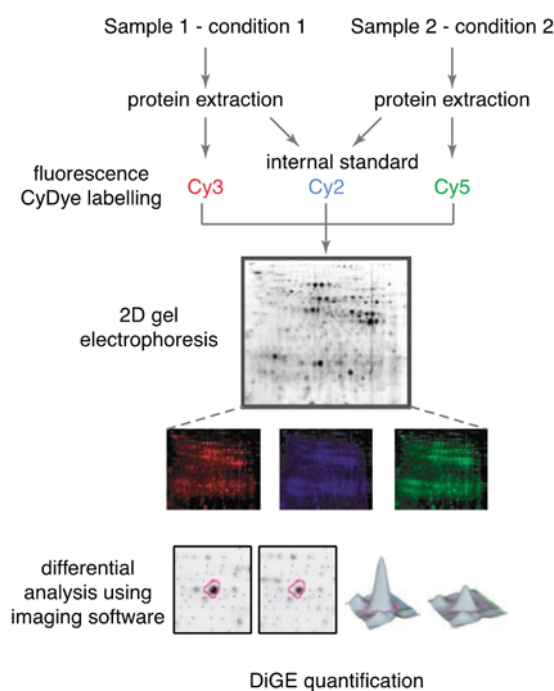
#### 4.2.1 二維膠體電泳

使用膠體電泳將蛋白質依照等電點及分子量作二維展開，染色後比較膠點顏色深淺，切割下顏色有變化的膠點，進行膠內水解並結合質譜儀鑑定，以得到有差異量變化的蛋白質身份。然而這樣的實驗方法被認為膠體及膠體之間的變異難以控制，使得膠點比對困難，且透過染色結果所能比對的範圍較窄，靈敏度低。

近年來利用 DIGE (Difference Gel Electrophoresis) 將不同樣品的蛋白質以不同螢光 (Cy3 及 Cy5) 標定蛋白質中的離胺酸 (Lysine) 後，再混和樣品使用二維膠體電泳展開，利用不同波長的光束激發螢光染劑，配合軟體分析找尋表現量有差異的膠點 (圖 E)。除了可增加偵測濃度範圍外，膠體間的誤差可透過內標準螢光標記



Cy2 將螢光強度均值化，以減少誤差的產生 (32)。



(圖 E：摘自 *Trends in Biotenology* **23**, 598-604 (2005).)

#### 4.2.2 蛋白質標定法 (圖 F)

##### 4.2.2.1 同位素親和標定 (isotope-coded affinity tags, ICAT)

西元 1999 年，Ruedi Aebersold 提出使用化學性標籤的標定法，即為 ICAT。利用同位素標定來修飾帶有半胱氨酸 (Cysteine) 的胜肽 (peptide)，將來自不同樣品的胜肽以不同質量的同位素標定，混合後利用質譜儀分析。利用同位素之間質量差異來比較不同樣品蛋白質表現量的差異 (33)。

##### 4.2.2.2 同量素標定相對及絕對定量法 (isobaric tags for relative and absolute quantitation, iTRAQ)

iTRAQ 的原理與 ICAT 相似，差別在於 iTRAQ 修飾位置在胜肽 N 端，改善了 ICAT 只能對半胱氨酸標定的不足。iTRAQ 的特色在於其標定經過特殊設計，可比較最多八組樣品間的蛋白質差異量。胜肽 N 端接上等質量的基團，在 MS1 中胜肽間質

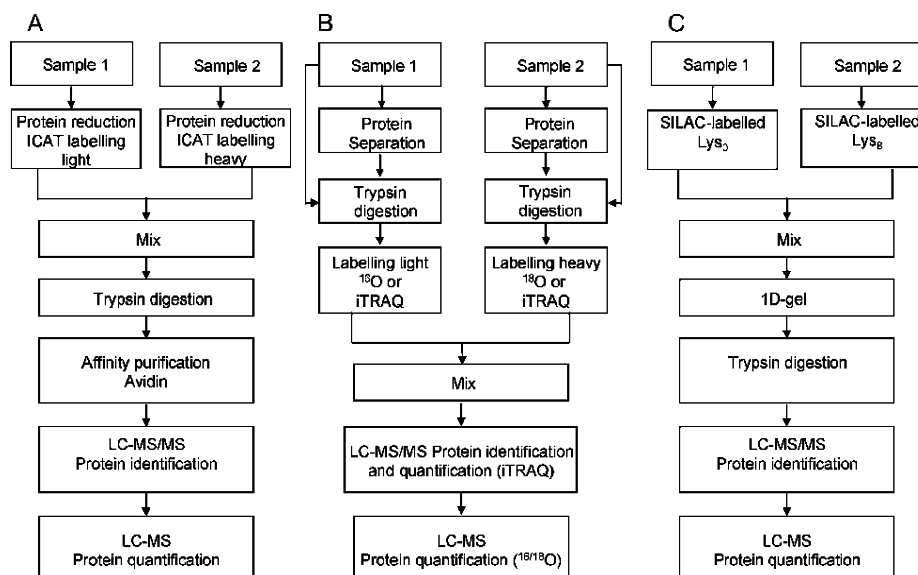


量並無差異，被視作相同的訊號，直到進入 MS2 時，胜肽會斷裂成不同質量的片段，作為樣品間相對定量的依據。此外，透過外加已知其量且已標定的胜肽到樣品內，一同進行分析，便可絕對定量樣品內特定蛋白質 (34)。

#### 4.2.2.3 細胞培養胺基酸穩定同位素標定 (stable isotope labeling by amino acids in cell culture, SILAC)

SILAC 透過在細胞培養基中加入有同位素標定的離胺酸 (Lysine) 及精胺酸 (Arginine) 來進行標定。當細胞經過數代培養後，使細胞內蛋白質上的離胺酸 (Lysine) 及精胺酸 (Arginine) 置換成有標定的比率達近乎百分之百後，便可進行後續實驗處理，最後將不同樣品混合一同進行質譜儀鑑定 (35)。

透過比較不同的同位素標定，便可進行不同樣品間的相對定量分析。然而這套建立在細胞培養的標定方法，在不同的細胞株間標定效率可能不同，且較難應用在無法自行合成某些特定胺基酸的細胞株上。



(圖 F：摘自 *Chemical Society Reviews* 38, 1882-1896 (2009).)

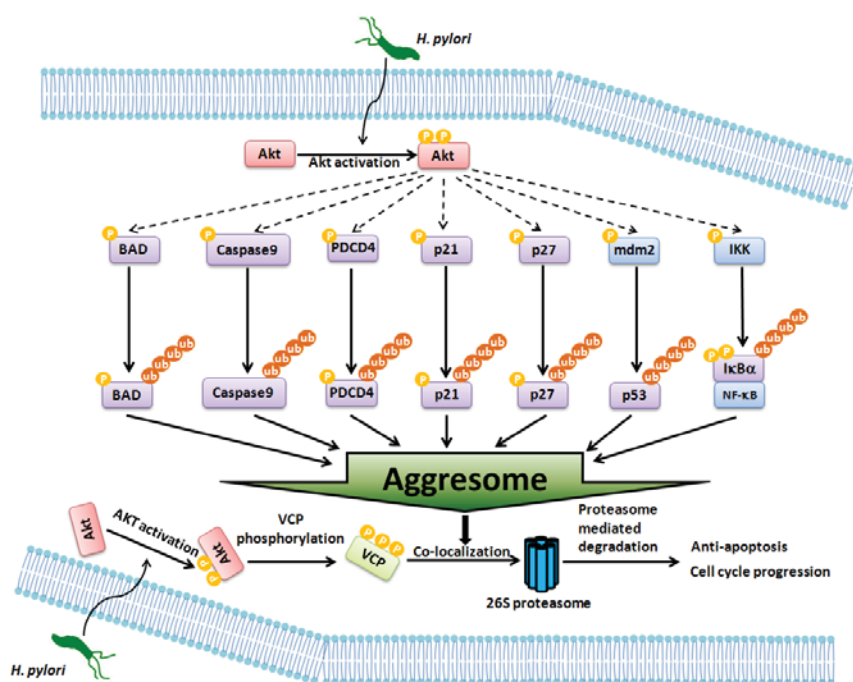




## 第五節 研究動機

在西元 1994 年幽門螺旋桿菌被國際癌症研究署 (IARC, International Agency for Research on Cancer) 訂定為一級致癌因子，其感染機制和引發的宿主反應至今已有為數不少的研究，然而幽門螺旋桿菌感染對於宿主細胞會引發的訊息傳遞及調控的相關分子仍不是很清楚，需要透過持續研究來釐清其中的機制。

先前實驗室學長的研究發現 (圖 G) ，當幽門螺旋桿菌感染胃腺癌上皮細胞時，細胞內的激酶 Akt 在 Thr 308 及 Ser 473 位置會被磷酸化，使其活性增加，進而去磷酸化下游受質 (36)。由於激酶 Akt 下游受質參與眾多生理功能的調節，包括營養代謝、細胞生長、細胞凋亡、細胞存活、轉錄作用、細胞增生及血管新生，若是激酶 Akt 受質因激酶 Akt 過度活化而發生調控異常的情形時，可能會使得正常細胞走向癌化，最終導致癌症的發生。因此我們對於這些會受到激酶 Akt 調控的受質具有高度的興趣，希望可以在本研究中利用蛋白質體學工具，針對在幽門螺旋桿菌感染下，會受到激酶 Akt 調控的下游受質進行研究。

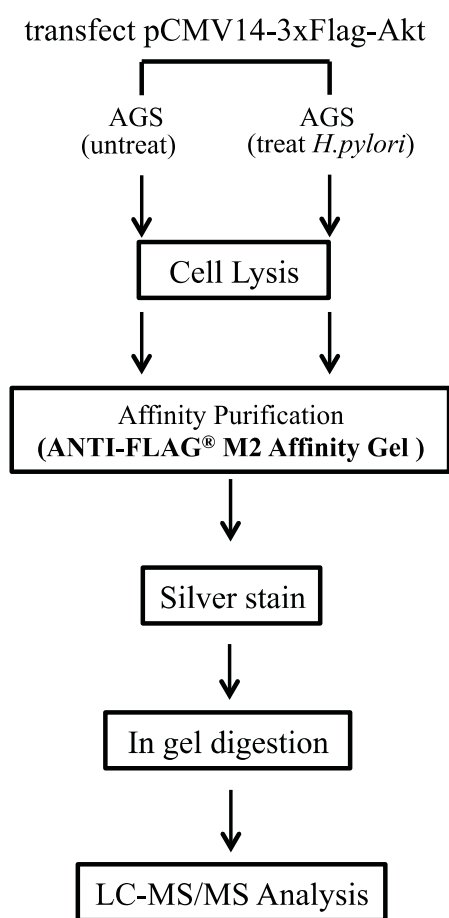


(圖 G：摘自 *PLOS ONE* 8, 1-13 (2013).)



## 第六章 研究策略

為了瞭解幽門螺旋桿菌感染後，胃腺癌上皮細胞內的激酶 Akt 活化之後會去調節的下游受質有哪些，首先我們將 pCMV-3×Flag-Akt (Appendix 1.) 質體以基因轉染的技術送入胃腺癌上皮細胞內，再分成未感染幽門螺旋桿菌的控制組及感染幽門螺旋桿菌的實驗組，這兩種樣品分別利用 ANTI-FLAG<sup>®</sup>M2 Affinity Gel 進行免疫共沈澱，分離出激酶 Akt 及與其有交互作用的蛋白質複合物，以一維電泳展開後進行銀染。比較控制組和實驗組在免疫共沈澱複合物內表現量有差異的蛋白質，將之切割下來進行膠內水解 (in-gel digestion) 並以質譜儀鑑定其身份 (圖 H)。希望可將鑑定結果結合生物資訊統計軟體的分析，進一步瞭解幽門螺旋桿菌活化宿主細胞內 PI3K/AKT 路徑對於胃癌致病機轉的重要性。



(圖 H)

## 第二章 實驗材料



### 第一節 胃腺癌上皮細胞

人類胃腺癌上皮細胞 (AGS cell line) 由台大醫學院陳青周教授實驗室提供，源自於 ATCC (American Type Culture Collection, CRL-1739) 。

### 第二節 幽門螺旋桿菌菌株

選自分離自臨床胃癌病人身上的幽門螺旋桿菌菌株 (編號 HC3) ，由台大醫院內科提供。

### 第三節 儀器及裝置

儀器	廠牌
1020 Centrifuge	Kubota
DMIL Inverted Microscope	Leica
DP72 CCD Camera	Olympus
Dry Bath Incubator	Major Science
DTX 880 Multimode Detector	Beckman Coulter
Electrophoresis Apparatus	NIHON EIDO
Electrophoresis Power Supply 301/1001	Amersham Pharmacia Biotech
Himac CF15R High Speed Micro Centrifuge	Hitachi
Hotplate Stirrer	Labteck
Hybridization Incubator	Conoco
Hybridization Oven	Firstec Scientific
Intelli Mixer RM-2M	ELMI



LTQ Orbitrap Velos	Thermo
Magnetic Stirrer	Fisher Scientific
Maxi Dry Plus (SpeedVac)	Heto Holten
Micro-centrifuge	Bertec
Microfuge R Centrifuge	Beckman Coulter
MP 220 pH Meter	Mettler Toledo
Nano LC System	Dionex
Pipetteman	Gilson
Rocking Shaker Model: S-101	Fisher Scientific
Sonics	Vibra Cell
TM-325 Autoclave	Tomin
Ultrospec 3100 pro UV/Visual Spectrophotometer	Amersham Biosciences
Vortex-2 Genie	Scientific Industries

#### 第四節 大腸桿菌及質體

品名	廠牌
<i>E.coli</i> host strain, JM109	Promega
pCMV-3×Flag	Sigma
pLKO.1-shRNA clone	中央研究院 RNAi 核心實驗室

#### 第五節 酵素

品名	廠牌
Sequencing Grade Modified Trypsin	Promega



Trypsin-EDTA

Gibso

## 第六節 抗體

### 初級抗體

### 廠牌

---

Anti-4EBP1	Cell Signaling
Anti-Akt	Santa Cruz
Anti-BAD	Genetex
Anti-EphA2	Cell Signaling
Anti-FLAG M2-HRP	Sigma
Anti-FOXO1	Cell Signaling
Anti-FOXO3	Cell Signaling
Anti-GAPDH	Santa Cruz
Anti-GSK3 $\beta$	Cell Signaling
Anti-Mtor	Cell Signaling
Anti-p27	Genetex
Anti-p70S6K	Cell Signaling
Anti-phospho-Akt Ser 473	Santa Cruz
Anti-phospho-Akt Thr 308	Cell Signaling
Anti-phospho-EphA2 Ser 897	Cell Signaling
Anti-phospho-GSK3 $\beta$ Ser 9	Cell Signaling
Anti-phospho-p27 Thr 157	Cell Signaling
Anti-PRAS40	Cell Signaling



Anti-RPS6 Cell Signaling

次級抗體 廠牌

HRP-conjugated IgG anti-rabbit Cell Signaling

HRP-conjugated IgG anti-mouse Jackson ImmunoResearch

### 第七節 試劑組及藥品

試劑組 廠牌

660 nm Protein Assay Reagent Pierce

High Speed Plasmid mini/midi Kit Geneaid

WESTERN LIGHTING™ *Plus-ECL* PerkinElmer

Maestofection™ Transfection Reagent Omics Biotechnology

PlusOne™ Silver Staining Kit Amersham Biosciences

Super-tips C18 Supelco

藥品 廠牌

2-mercaptoethanol Merck

Acetic acid Merck

Acetonitrile Merck

Acrylamide/N,N'-methylene-bis-acrylamide Bio-Rad

Ammonium persulfate Sigma

Bromophenol Blue Sigma

DMEM	Gibco
EDTA	Sigma
Ethanol	Sigma
Ethidium Bromide	Sigma
Fast Green	Sigma
Fetal Bovine Serum	Gibco
Formic acid	Merck
Glycerol	Merck
Glycine	Merck
Hydrogen chloride	Merck
Isopropanol	Sigma
Low Molecular Weight Standards	Amersham Biosciences
Methanol	Merck
PBS	Gibco
Penicillin/Streptomycin	Gibco
Phosphatase Inhibitor Cocktail	Merck
Potassium Chloride	Sigma
Protease Inhibitor Cocktail	Merck
SDS	Amersham Biosciences
Sodium Bicarbonate	Sigma
Sodium Chloride	Sigma



Sodium Hydride

Sigma

TAE Buffer

Amersham Biosciences

TEMED

Merck

TFA

Merck

Tris

Merck

TritonX-100

Amersham Biosciences

Tween-20

Sigma



#### 第八節 軟體及資料庫

a.) Thermo Scientific 公司之 Proteome Discoverer 軟體。

b.) Ingenuity Systems 公司之 Ingenuity Pathway Analysis (IPA) 資料庫系統。

c.) Cell Signaling Technology 公司之 PhosphoSitePlus<sup>®</sup> 資料庫系統

d.) Software Tool for Researching Annotation of Proteins (STRAP)

e.) STRING 9.05



## 第三章 實驗方法



### 第一節 胃腺癌上皮細胞的培養

#### 1.1 培養基 (medium) 配置

將 DMEM 粉末狀培養基以二次蒸餾水完全溶解，每公升培養基加入 1.5 克碳酸氫鈉 (sodium bicarbonate)，並將 pH 值調整至 7.1。之後將配製好的培養基通過 0.22  $\mu\text{m}$  細胞培養專用無菌過濾膜，分裝備用。使用前須加入 10 % 胎牛血清 (FBS) 及 1 % 青黴素與鏈黴素 (penicillin/streptomycin)，放置 4°C 儲存。

#### 1.2 細胞培養 (cell culture)

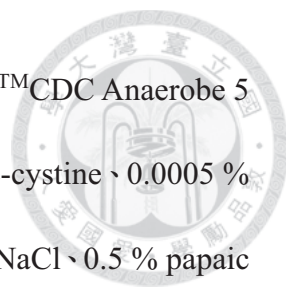
胃腺癌上皮細胞以底面積為 75  $\text{cm}^2$  的培養瓶 (T-75 flask, Corning®) 培養並置於 37°C，5 %  $\text{CO}_2$  的恆溫培養箱中。待細胞長至八到九成滿時，以 PBS 沖洗細胞一次，加入 1 mL 含 0.2 % EDTA 及 0.5 % 胰蛋白酶的緩衝液 (trypsin-EDTA)，放置於 37°C，5 %  $\text{CO}_2$  的恆溫培養箱處理 10 分鐘。待細胞剝落後 (trypsinization) 後，加入 5 mL 培養基停止胰蛋白酶對細胞的作用。以 1500 rpm 轉速離心 5 分鐘去除胰蛋白酶，小心吸除上清液後，用 5 mL 培養基將細胞沈澱均勻打散回溶。根據實驗需求重新分配適量細胞至培養瓶中繼代培養 (sub-culture)，或至細胞培養皿 (cell culture dish, Corning®) 以進行後續實驗。

#### 1.3 細胞計數

取等體積的細胞懸浮液和錐藍色液 (trypan blue) 均勻混合，接著以細胞計數盤 (hemocytometer) 在顯微鏡下計算細胞數目。

### 第二節 幽門螺旋桿菌的培養

菌株分離自胃癌病人的腸胃道，經由初期培養 (primary culture) 後，冷凍保存在



-80°C。取出適量的菌液均勻塗抹至 CDC 血液平板培養基 (BBL™CDC Anaerobe 5 % Sheep Blood Agar；含有 5 % defibrinated sheep blood、0.04 % L-cystine、0.0005 % hemin、0.001 % vitamin K、0.5 % agar、0.5 % yeast extract、0.5 % NaCl、0.5 % papaic digest of soybean meal 及 1.5 % pancreatic digest of casein)，放置在 37°C 微嗜氧環境 (5 % O<sub>2</sub>、10 % CO<sub>2</sub> 及 85 % N<sub>2</sub>) 作次級培養 (sub-culture) 約 2-3 天後，即可將細菌收下。為了避免因代數過多而造成細菌產生變異或是感染力降低，菌株培養以五代為限。

### 第三節 幽門螺旋桿菌感染胃腺癌上皮細胞

#### 3.1 細胞準備 (plating)

使用胰蛋白酶將培養瓶內的胃腺癌上皮細胞剝落下來，並均勻打散，取適量分配至 60 mm 或 100 mm 細胞培養皿中。待兩天後細胞長至八到九成滿，以 PBS 沖洗兩次，換成不含有胎牛血清及抗生素的培養基 (serum- and antibiotics-free medium) 後，再放回 37°C，5 % CO<sub>2</sub> 的恆溫培養箱培養 16 小時。

#### 3.2 收取及計數幽門螺旋桿菌

幽門螺旋桿菌解凍後，再繼代培養一代便可使用。收取細菌時，在每盤血液平板培養基上加 2 mL PBS，以三角玻棒刮下，均勻混合後，取 100 μL 菌液和 900 μL PBS 混合均勻 (十倍稀釋)，以 PBS 作空白液 (blank)，測量 600 nm 可見光吸收值 (OD 600)，將得到的吸光值 x 乘上 10<sup>9</sup>，即表示每 mL 菌液含有的細菌數。由於幽門螺旋桿菌屬於微嗜氧細菌，在室溫環境下只能存活約 2 小時，故收取下的細菌應儘速加入細胞中。

#### 3.3 幽門螺旋桿菌感染胃腺癌上皮細胞

將培養基換成不含有胎牛血清及抗生素的培養基，放置 16 小時後，即可收取幽



門螺旋桿菌對胃腺癌上皮細胞進行感染。在此之前需計算細胞及細菌數目，才能決定在特定 MOI (multiplicity of infection) 值所需要的菌液體積。均勻地將菌液加入細胞後，放置在 37°C，5 % CO<sub>2</sub> 的恆溫培養箱進行感染。

#### 第四節 質體轉染


待培養於 60 mm 培養皿中的胃腺癌上皮細胞約八成滿時，即可進行質體轉染實驗。在進行轉染前 30 分鐘至 1 小時更換新鮮含有胎牛血清及抗生素的培養基。

每個 60 mm 培養皿使用 3 µg 質體及 9 µL transfection reagent (質體與 transfection reagent 比例為質體 (µg) : transfection reagent (µL) = 1 : 3)，分別先以 100 µL 不含胎牛血清及抗生素的培養基在微量離心管中稀釋，再將稀釋好的 transfection reagent 加入稀釋好的質體中，均勻混合後放置室溫作用 15 分鐘，以形成質體-試劑複合體，將質體-試劑複合體加入細胞中，放置回 37°C，5 % CO<sub>2</sub> 的恆溫培養箱培養 12-18 小時後，更換新鮮含有胎牛血清及抗生素的培養基，轉染 24-48 小時後收取細胞。

#### 第五節 免疫共沈澱

將細胞以 PBS 沖洗兩次後，加入適量裂解液 (150 mM NaCl、1 mM EDTA、1 % TRITON X-100 及 50 mM Tris-HCl, pH 7.4)，刮下細胞後，使用超聲波 (probe sonicator) 處理 (5 seconds on, 10 seconds off, 30 % Amplitude, total 35 seconds)，在 4°C 下以 11500g 離心 20 分鐘後，取上清液至新的 1.5 mL 微量離心管。

取所需用量的 ANTI-FLAG®M2 Affinity Gel 放入 1.5 mL 微量離心管，加入 1 mL PBS 後，上下翻轉混合均勻以洗去甘油，接著再以 6500g 離心 30 秒，去除上清液，重複此清洗步驟兩次，接著改以 1 mL TBS (150 mM NaCl 及 50 mM Tris-HCl, pH 7.4) 清洗，離心去除上清液後，取適當裂解液重新懸浮 ANTI-FLAG®M2 Affinity Gel，



加到已處理好的蛋白質樣品中。將微量離心管放置在 Intelli-Mixer 上，並以 F2 program，25 rpm 在 4°C 翻轉混合溶液，使 ANTI-FLAG<sup>®</sup>M2 Affinity Gel 和 Flag 融合蛋白結合反應過夜。隔天以 6500g 離心 30 秒，使 ANTI-FLAG<sup>®</sup>M2 Affinity Gel 沉降下來，此上清液即為免疫共沈澱之上清液 (IP supernatant)，吸出置於新的離心管。加入 1 mL TBS 在沈澱中並上下翻轉混合均勻，洗去非專一性結合，以 6500g 離心 30 秒，去除上清液，重複此清洗步驟三次。最後加入 1 倍樣品緩衝液以 95 °C 加熱 15 分鐘，令結合在 ANTI-FLAG<sup>®</sup>M2 Affinity Gel 上的蛋白質被流洗 (elute) 下來。

## 第六節 蛋白質分析法

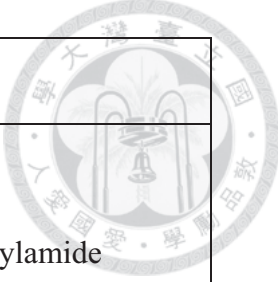
### 6.1 蛋白質濃度測定 (BCA protein assay)

首先將試劑 A 和試劑 B 以體積 50:1 混合成操作溶液 (working solution)，取 10  $\mu$ L 蛋白質溶液和 200  $\mu$ L 操作溶液 (1:20) 混合均勻，在 37°C 下反應 30 分鐘，接著使用分光光度計測量 595 nm 可見光吸收值。此測定系統以已知濃度的 BSA (0~20 mg/mL) 作為標準蛋白質溶液而建立一「吸光值-濃度」之標準曲線圖 (standard curve)。未知濃度的蛋白質樣品和操作溶液反應後，所得到的吸光值可透過標準曲線圖的換算求得其濃度。

### 6.2 十二烷基磺酸鈉-聚丙烯醯胺膠體電泳分析 (SDS-PAGE)

取兩片平面玻璃 (10×10.5 cm) 洗淨後以去離子水潤洗乾淨並放入烘箱，待其烘乾後，使用 U 形軟質橡膠條 (12×15×0.1 cm) 作間隔條 (spacer)，以鐵夾夾住玻璃的左右兩側，將此裝置直立放置。

將預先配置的 A 液、B 液和 C 液依照下表比例混合，進行分離膠體 (separating gel) 和焦集膠體 (stacking gel) 的製作：



試劑代號	成分
A 液	30 % Acrylamide 0.8 % N,N-methylenebisacrylamide
B 液	1.5 M Tris-HCl, pH 8.8 0.4 % (v/v) SDS
C 液	0.5 M Tris-HCl, pH 6.8 0.4 % (v/v) SDS

試劑	分離膠體					焦集膠體
	7.5 %	10 %	12.5 %	15 %	17.5 %	
A 液	2.0 mL	2.7 mL	3.4 mL	4.0 mL	4.9 mL	0.3 mL
B 液	2.0 mL	2.0 mL	2.0 mL	2.0 mL	2.1 mL	-
C 液	-	-	-	-	-	0.5 mL
二次水	4.0 mL	3.4 mL	2.7 mL	2.0 mL	1.4 mL	1.2 mL
TEMED	5 $\mu$ L					3 $\mu$ L
10 % APS	55 $\mu$ L					9 $\mu$ L

首先配製分離膠體：依照上表在燒杯中加入 A 液、B 液、二次水並於最後加入 TEMED 及 10 % APS，混和均勻後迅速將溶液注入玻璃裝置內至距頂端約 2 cm 處，並於凝膠溶液上方加入甲醇使膠體平整。在室溫下靜置待膠體凝固形成介面後，便可倒去甲醇，準備注入焦集膠體。

接著配置焦集膠體：依照上表在燒杯中加入 A 液、C 液、二次水並於最後加入 TEMED 及 10 % APS，混和均勻後迅速將溶液注入已凝固的分離膠體之上，並插入齒梳 (comb) 形成樣品槽。待焦集膠體凝固後拔下齒梳，準備注入蛋白質樣品。


將蛋白質樣品放入微量離心管並加入 2 倍樣品緩衝液 (0.5 M Tris-HCl pH 6.8、10 % SDS、50 % glycerol、 $\beta$ -mercaptoethanol、bromophenol blue 及 ddH<sub>2</sub>O)，於 100°C 加熱 10 分鐘。將鑄好膠的玻璃片周圍橡膠條拿掉，以鐵夾將玻璃片固定至電泳裝置上，使有凹槽的一面朝向電泳槽。上下電泳槽注滿電泳緩衝液 (25 mM Tris、250 mM glycine、0.1 % SDS，pH 8.3)，將加熱處理過的蛋白質樣品溶液注入樣品槽中，電泳槽上層接負極，下層接正極，每片膠固定以 15 mA 進行電泳，且限制電壓不得超過 150 V。待指示劑移至膠片底部後，完成電泳並停止通電。

### 6.3 西方點墨法 (western blotting)

剪裁與分離膠體大小相同的聚偏二氟乙烯膜 (PVDF membrane)，以 100 % 甲醇浸潤聚偏二氟乙烯膜，使其由原本疏水性轉成親水性的特質，再將之浸泡在轉印緩衝液 (10 mM CAPS、10 % MeOH，pH 11.0)。由下而上依序自下層石墨板鋪蓋：

- (1) 三張浸泡過轉印緩衝液的濾紙、
- (2) 聚偏二氟乙烯膜、
- (3) 分離膠體及
- (4) 三張浸泡過轉印緩衝液的濾紙，

鋪蓋過程注意不要產生氣泡，且保持聚偏二氟乙烯膜的溼潤。最後蓋壓上已接上負極的上層石墨板，並將下層石墨板接上正極。轉印時所需的電流大小依據分離膠體的面積決定：每平方公分膠體約 1 mA，通電時間為 4 小時。轉印完成後取出聚偏二氟乙烯膜，先以 Fast green (Fast green、Acetic acid、95 % Ethanol 及 ddH<sub>2</sub>O) 染劑進行染色確認蛋白質轉印的效率及位置，經裁切後進行抗體偵測。裁切好正確分子量的聚偏二氟乙烯膜以 100 % 甲醇浸潤使其恢復親水性後，將其泡在含有 5 % 脫脂奶粉的 TN 緩衝液 (20 mM Tris-HCl、0.15 M

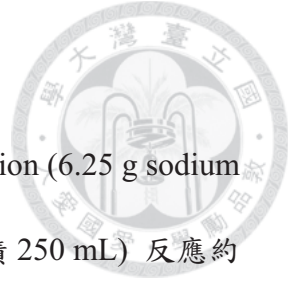


NaCl, pH 7.5), 於室溫搖晃 1 小時進行填塞作用 (blocking)。初級抗體 (primary antibody) 以含有 1 % 脫脂奶粉的 TNT 緩衝液 (20 mM Tris-HCl、0.15 M NaCl 及 0.5 % Tween 20 (v/v), pH 7.5) 作稀釋, 倒去填塞溶液後, 換成初級抗體溶液, 並於 4°C 下搖晃過夜, 使抗體與膜上目標蛋白質結合。隔天倒去初級抗體溶液, 以 TNT 緩衝液漂洗聚偏二氯乙烯膜 6 次, 每次 10 分鐘。接著進行次級抗體溶液 (secondary antibody) 的結合反應, 次級抗體以含有 4 % 脫脂奶粉的 TNT 緩衝液稀釋, 加入次級抗體溶液並於室溫下搖晃 1 小時, 之後倒去次級抗體溶液, 以 TNT 緩衝液漂洗聚偏二氯乙烯膜 5 次, 每次 10 分鐘, 最後以 TN 緩衝液漂洗 10 分鐘。

進行呈色反應時, 首先將聚偏二氯乙烯膜上多餘的 TN 緩衝液吸去, 並在其上方均勻滴加適量受質溶液 (WESTERN LIGHTING™ *Plus-ECL*, 使用前等體積混合 *Enhanced Luminol Reagent Plus* 及 *Oxidizing Reagent Plus*)。反應 2 分鐘後, 將多餘的受質溶液吸去, 把聚偏二氯乙烯膜置入暗盒 (cassette), 剪裁適當大小的 X 光底片進行壓片並計時。之後將底片放入顯影液 (developer) 中直到可見陽性反應, 以水漂洗後再放入定影液 (fixer) 直到底片背景透明, 最後以水洗淨底片, 自然風乾或烘乾保存。

## 第七節 銀染

將跑完電泳的膠片放置在 Fixation Solution (100 mL ethanol 及 25 mL acetic acid glacial, 補 ddH<sub>2</sub>O 至總體積 250 mL) 內反應 30 分鐘, 接著改置在 Sensitizing Solution (75 mL ethanol、1.25 mL 25 % w/v glutaraldehyde、10 mL 5 % w/v sodium thiosulphate 及 17 g sodium acetate, 補 ddH<sub>2</sub>O 至總體積 250 mL) 反應 30 分鐘。以 ddH<sub>2</sub>O 漂洗膠片 3 次, 每次 5 分鐘, 再放入 Silver Reaction Solution (25 mL 2.5 % w/v silver nitrate solution 及 0.1 mL 37 % w/v formaldehyde, 補 ddH<sub>2</sub>O 至總體積 250 mL) 反應 20 分



鐘。

以 ddH<sub>2</sub>O 漂洗膠片 2 次，每次 1 分鐘，放入 Developing Solution (6.25 g sodium carbonate 及 0.05 mL 37 % w/v formaldehyde，補 ddH<sub>2</sub>O 至總體積 250 mL) 反應約 2-5 分鐘，待其呈色後，加入 Stopping Solution (3.65 g EDTA-Na<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O，補 ddH<sub>2</sub>O 至總體積 250 mL) 放置 10 分鐘以終止反應。

#### 第八節 膠體原位酵素切割及蛋白質鑑定

將一維電泳膠體完成銀染後，比對出具有差異表現的蛋白質，自膠片上利用手術刀將蛋白質挖下並切成約 1 mm<sup>2</sup> 的塊狀放入微量離心管中，以 ddH<sub>2</sub>O 清洗數次，吸除 ddH<sub>2</sub>O 後加入 50 μL 褪染試劑 (100 mM sodium thiosulfate 及 30 mM potassium ferricyanide，使用前等體積混合)，於室溫下震盪 15 分鐘以褪除銀染。吸除褪染試劑後，加入 ddH<sub>2</sub>O 於室溫下震盪 10 分鐘後再吸去，重複此步驟直到膠體呈現透明狀。

之後加入 100 % ACN 使膠體脫水，並利用真空離心蒸發濃縮器將液體完全抽乾，以 50 μL 50 mM ammonium bicarbonate (pH 7.8) 作緩衝液，加入適量胰蛋白酶，置於冰上 15 分鐘，待膠體充分吸收溶液後，將溶液置換成酵素緩衝液並置於 37°C 反應過夜。收集反應液於新的微量離心管內，加入 100 μL 1 % TFA，以超聲波震盪 30 分鐘，收集萃取液於同一微量離心管，膠體再加入 100 μL 0.1 % TFA/60 % ACN，以超聲波震盪 30 分鐘，收集萃取液後，將微量離心管置於真空離心蒸發濃縮器並抽乾液體。

在微量分注器接上 C18 ZipTip 後，以 10 μL 90 % ACN/0.1 % FA 活化 C18 ZipTip，重複十次後，改以 10 μL 0.1 % FA 平衡 C18 ZipTip。接著取 10 μL 0.1 % FA 回溶樣品，用已活化的 C18 ZipTip 內填充的 C18 材質和樣品內的胜肽進行結合。將 C18





ZipTip 以 10  $\mu$ L 0.1 % FA 潤洗十次，去除非專一性結合，最後以 10  $\mu$ L 60 % ACN/0.1 % FA 流洗十次收集於新的微量離心管，將微量離心管置於真空離心蒸發濃縮器並抽乾液體，再進行後續質譜儀的鑑定。

## 第九節 資料庫分析

將液相層析串聯質譜儀鑑定到的蛋白質列表透過 Proteome Discoverer (PD) 、Ingenuity Pathway Analysis (IPA) 、STRING 、PhosphoSitePlus<sup>®</sup> 資料庫系統及 Software Tool for Research Annotation of Proteins (STRAP) 的分析與整理，探討蛋白質在細胞內參與調控的生理功能、分子間的交互作用及訊息傳遞路徑的活化。

## 第十節 小髮夾 RNA (shRNA) 建立

向中央研究院 RNAi 核心實驗室購買抑制目標蛋白質的 shRNA，其質體圖及序列詳見 Appendix 2. 和 Appendix 3.。我們將質體純化出來後，利用慢病毒 (lentivirus) 載體攜帶 shRNA 感染胃腺癌上皮細胞，期望能提升抑制 EphA2 表現量的效率。

### 10.1 慢病毒 (lentivirus) 的製備

使用 envelope plasmid (pMD2.G) 、 packaging plasmid (psPAX2) 及 shRNA 來生產帶有 shRNA 的慢病毒。

培養於 100 mm 培養皿中的 293T 細胞約八成滿時，即可進行慢病毒生產實驗。在進行轉染前 30 分鐘至 1 小時更換新鮮含有胎牛血清及抗生素的培養基。每個 100 mm 培養皿使用 0.2  $\mu$ g pMD2.G 、 1.8  $\mu$ g psPAX2 、 2  $\mu$ g shRNA 及 12  $\mu$ L transfection reagent (質體與 transfection reagent 比例為質體 ( $\mu$ g) : transfection reagent ( $\mu$ L) = 1 : 3) ，分別先以 250  $\mu$ L 不含胎牛血清及抗生素的培養基在微量離心管中稀釋，再將稀釋好的 transfection reagent 加入稀釋好的質體中，均勻混合後放置室溫作用 15 分鐘，以形成質體-試劑複合體，將質體-試劑複合體加入細胞中，放置回 37 $^{\circ}$ C ， 5

% CO<sub>2</sub> 的恆溫培養箱培養 12-18 小時後，更換新鮮含有胎牛血清及抗生素的培養基。放置 24 小時後，收集病毒培養液並用 0.22 μm 孔洞大小的濾膜過濾，分裝在 1.5 mL 微量離心管，保存在 -20°C。

## **10.2 慢病毒 (lentivirus) 的感染**

培養於 60 mm 培養皿中的胃腺癌上皮細胞約八成滿時，即可進行慢病毒感染實驗。將 1 mL 病毒液加入含有 1 mL 培養基 (內含最終濃度為 0.01 μg/μL 的 polybrene) 的 60 mm 培養皿，放置 48 小時後，使用西方點墨法確認抑制蛋白質表現的效率。

### **第十一節 細胞傷口癒合分析 (wound healing assay)**

將 insert 放入 6 孔盤 (6-well plate) 內，並於其中種入適量的細胞數。待細胞貼附後，將 insert 拔除，並開始計時，分別在 0、2、4、6 及 8 小時後拍照，以觀察細胞將裂縫填補的能力。

## 第四章 實驗結果



### 第一節 受幽門螺旋桿菌感染的胃腺癌上皮細胞形態

先前的研究指出，當幽門螺旋桿菌感染胃上皮細胞時，會促使細胞變長，稱作蜂鳥狀形態 (hummingbird phenotype) (22)，因此我們為了要確認本實驗所使用的幽門螺旋桿菌確實有成功感染胃腺癌上皮細胞，便使用光學顯微鏡觀察胃腺癌上皮細胞在感染幽門螺旋桿菌 4、8 及 24 小時後的形態變化。結果顯示隨著幽門螺旋桿菌感染的時間越久，細胞有逐漸變得細長的趨勢 (Figure 1)。


### 第二節 使用西方點墨法確認幽門螺旋桿菌對胃腺癌上皮細胞內訊息傳遞的調控

從形態觀察確認幽門螺旋桿菌對胃腺癌上皮細胞的影響後，我們接著使用西方點墨法來確認先前實驗室學長發現幽門螺旋桿菌對於胃腺癌上皮細胞內訊息傳遞的調控是否確實有被活化：收取七個時間點的幽門螺旋桿菌感染細胞樣品，使用一維電泳展開樣品，並轉印至聚偏二氟乙烯膜上，以 phospho-Akt 及 Akt 抗體確認宿主細胞內激酶 Akt 在 Thr 308 及 Ser 473 位置的磷酸化是否受到幽門螺旋桿菌給調控。

實驗結果顯示隨著幽門螺旋桿菌感染的時間增加，細胞內激酶 Akt 在 Thr 308 及 Ser 473 位置的磷酸化程度確實有隨之增加的趨勢 (Figure 2.)，顯示幽門螺旋桿菌的感染的確會去調控細胞內激酶 Akt 的磷酸化，並活化激酶 Akt 去參與調控下游的訊息傳遞路徑。

### 第三節 分析胃腺癌上皮細胞中激酶 Akt 的免疫共沈澱複合物

透過上述實驗結果，我們得以確認幽門螺旋桿菌的感染確實會造成細胞形態上的改變及細胞內激酶 Akt 的活化。接下來先在胃腺癌上皮細胞內大量表現激酶 Akt，



再加入幽門螺旋桿菌感染細胞，以 ANTI-FLAG<sup>®</sup>M2 Affinity Gel 分離出激酶 Akt 及與其有交互作用的蛋白質複合物，一維電泳展開並染色比較未感染及有感染樣品之間具有差異性的亮帶，將之挖下並以液相層析串聯質譜儀鑑定其身份，希望能夠藉此瞭解幽門螺旋桿菌對於宿主細胞內激酶 Akt 下游受質的調控。

### 3.1 使用西方點墨法及螢光確認激酶 Akt 的轉染及免疫共沈澱效率

首先為了確認 Maestofection<sup>™</sup> Transfection Reagent 基因轉染的效率，分別將 pCMV-3×Flag 及 pCMV-3×Flag-Akt 質體以基因轉染的技術送入胃腺癌上皮細胞內，使其大量表現蛋白質，並使用西方點墨法確認是否有轉染及表現成功 (Figure 3A.)。此外我們也送入 pEGFP-N1 質體，利用螢光顯微鏡確認轉染的效率 (Figure 3B.)。

確認有成功將質體送入細胞後，接著使用免疫共沈澱技術以 ANTI-FLAG<sup>®</sup>M2 Affinity Gel 分別分離出 3×Flag 和 3×Flag-Akt 及與其交互作用的蛋白質複合物，並使用西方點墨法確認免疫共沈澱的效率 (Figure 3C.)。

### 3.2 比較未感染和感染幽門螺旋桿菌的激酶 Akt 的免疫共沈澱複合物之間的差異性

在確認過基因轉染及免疫共沈澱的效率後，我們將 pCMV-3×Flag-Akt 質體以基因轉染的技術送入胃腺癌上皮細胞內且以未感染幽門螺旋桿菌的 3×Flag-Akt 免疫共沈澱複合物作控制組，有感染幽門螺旋桿菌的 3×Flag-Akt 免疫共沈澱複合物作實驗組，並將兩個樣品一同以一維電泳展開，從銀染結果發現兩個樣品間的蛋白質分佈有些許的不同 (Figure 4.)。

### 3.3 使用液相層析串聯質譜儀鑑定激酶 Akt 的免疫共沈澱複合物

比較染色結果後，發現兩個樣品間有些許蛋白質分佈的差異，我們分別將這些具有差異性的樣品膠片切割下來，進行膠內水解。膠體內蛋白質經由胰蛋白酶

(trypsin) 作用後，被降解成較小的胜肽片段。將胜肽片段送入液相層析串聯質譜儀鑑定其身份，並以 PD 軟體進行分析，結果顯示一共鑑定到 1893 個蛋白質。

### 3.4 使用 IPA 生物醫學分析軟體暨資料庫探討激酶 Akt 的免疫共沈澱複合物所參與的訊息傳遞路徑

將這些鑑定到與激酶 Akt 可能有交互作用的蛋白質透過 IPA 資料庫系統分析後，列出這些蛋白質參與調控的訊息傳遞路徑，其中 PI3K/AKT 路徑位居第五名 (Figure 5.)，顯示此實驗方法確實有助於我們探討 PI3K/AKT 路徑，另外我們亦列出參與前五名路徑的蛋白質 (Table 1.)。


接著將這些鑑定到的蛋白質與 Cell Signaling Technology 公司之 PhosphoSitePlus<sup>®</sup> 資料庫系統內曾被報導過可被激酶 Akt 磷酸化的受質清單進行交互比對後，發現我們一共鑑定到 37 個曾被報導過的激酶 Akt 受質 (Table 2.)。

### 3.5 針對液相層析串聯質譜儀鑑定到的激酶 Akt 受質進行分析

我們將 37 個鑑定到的激酶 Akt 受質送入 Software Tool for Research Annotation of Proteins (STRAP)，對蛋白質的分子功能及其參與的生理反應進行分析，以圓餅圖表示鑑定到的蛋白質在每個項目內的個數及百分比 (Figure 6.)，此外我們也以表格列出分析結果的詳細清單 (Table 3.、Table 4.)。

除了功能分類外，我們亦將 37 個激酶 Akt 受質送入線上軟體 STRING 進行分析。透過線上軟體 STRING 的分析，得以瞭解各個蛋白質之間交互作用的關係。分析結果顯示激酶 Akt 與這些受質之間多存有轉譯後修飾 (post-translational modifications, PTMs) 的關係 (Figure 7.)。

### 3.6 將鑑定到的激酶 Akt 受質結合 IPA 生物醫學分析軟體暨資料庫探討幽門螺旋桿菌對 PI3K/AKT 路徑的影響



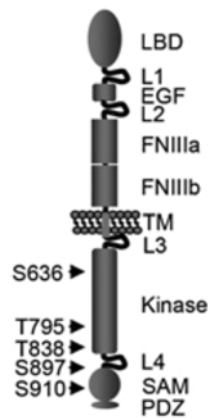
我們將鑑定到的蛋白質結合 IPA 資料庫系統內的 PI3K/AKT 路徑，並且加上文獻的搜尋，來推衍幽門螺旋桿菌對細胞內 PI3K/AKT 路徑的調控情形。訊息傳遞路徑中以紅色標示者為我們鑑定到可能參與在 PI3K/AKT 路徑中的蛋白質；黃色標示者為會受激酶 Akt 磷酸化的受質或進一步被激酶 Akt 受質調控的下游蛋白質。此外我們也利用軟體分析將蛋白質透過組合或分群，得到其參與調控的生理功能 (Figure 8.)。

#### **第四節 使用西方點墨法驗證液相層析串聯質譜儀及 IPA 生物醫學分析軟體暨資料庫的分析結果**

我們將液相層析串聯質譜儀鑑定的結果結合各種資訊軟體的分析，選擇部分參與在 PI3K/AKT 路徑中的蛋白質，確認其與激酶 Akt 之間的交互作用是否會受到幽門螺旋桿菌感染的影響。結果顯示 mTOR、PRAS40、p70S6K、4EBP1、p27、GSK3 $\beta$ 、BAD、FOXO1 及 EphA2 與激酶 Akt 之間的交互作用在幽門螺旋桿菌感染後變強 (Figure 9.)，顯示這些蛋白質可能會受到激酶 Akt 的調控，進而引發下游的訊息傳遞路徑。

#### **第五節 使用西方點墨法驗證幽門螺旋桿菌對 EphA2 的磷酸化後修飾作用**

從液相層析串聯質譜儀鑑定的結果及綜合資訊軟體的分析，我們鎖定其中一個激酶 Akt 受質 EphA2 (Ephrin type-A receptor 2) 進行更深入的研究。Eph 屬於 Receptor tyrosine kinase (RTK) 且是其中最大的一科，共有 16 種激酶，EphA2 是當中最常在人類癌細胞表現異常的分子。透過先前研究中序列分析及實驗驗證，發現 EphA2 在 Ser 897 位置可被激酶 Akt 磷酸化 (圖 I)，且有助於增加細胞移動的能力 (37)。



(圖 I：摘自 *Cancer Cell* **16**, 9-20 (2009).)

利用線上軟體 STRING 分析的結果顯示 Akt 及 EphA2 之間確實存有轉譯後修飾的關係，因此我們使用西方點墨法確認 EphA2 在 Ser 897 位置的磷酸化程度是否會受到幽門螺旋桿菌感染所影響。實驗結果顯示隨著幽門螺旋桿菌感染的時間增加，細胞內 EphA2 在 Ser 897 位置的磷酸化程度確實有隨之增加的趨勢 (Figure 10.)。

## 第六節 建立 EphA2 shRNA

確認在幽門螺旋桿菌感染下，EphA2 在 Ser 897 位置的磷酸化會受到激酶 Akt 的調控後，我們首先探討 EphA2 在胃腺癌上皮細胞內參與的生理功能。根據先前的研究指出，Eph 路徑會參與調控細胞形態、黏附、移動及侵襲的能力，此外 EphA2 在 AGS 這種胃腺癌上皮細胞內為過度表現 (38)，因此我們向中央研究院 RNAi 核心實驗室購買抑制目標蛋白質的 shRNA，藉以觀察抑制 EphA2 表現的胃腺癌上皮細胞其生理功能產生的變化。

在進行功能性分析之前，我們首先要確認購買的 shRNA 抑制 EphA2 的效率如何。以慢病毒 (Lentivirus) 載體攜帶純化出來的 shRNA 質體對胃腺癌上皮細胞進行感染，從西方點墨法的結果得知，該 shRNA 確實可有效地抑制 EphA2 的表現量 (Figure 11.)。



## 第七節 EphA2 的功能分析

在眾多 EphA2 調節的生理功能中，我們首先探討 EphA2 表現量對於胃腺癌上皮細胞移動能力的影響。分別將控制組細胞及抑制 EphA2 表現量的實驗組細胞種入 insert 中，待其貼附後。再將 insert 拔起，於 0、2、4、6 及 8 小時拍照觀察細胞將裂縫填補的能力。實驗結果發現抑制 EphA2 表現量的實驗組細胞移動能力相較於控制組細胞來的弱，顯示 EphA2 在胃腺癌上皮細胞中有助於增加細胞移動的能力 (Figure 12.)。



## 第五章 討論



### 第一節 結語

先前研究指出激酶 Akt 在許多癌細胞株內多有高度表現或是過度活化情形，且激酶 Akt 也是目前被認為會造成正常細胞走向癌化的重要調控蛋白質之一 (27)。此外先前實驗室學長的研究發現，當以幽門螺旋桿菌感染胃腺癌上皮細胞時，會活化細胞內的激酶 Akt，並進一步開啓下游的訊息傳遞路徑。為了要深入探討受到幽門螺旋桿菌感染因而活化的 PI3K/AKT 路徑對於幽門螺旋桿菌致癌機轉的重要性，我們希望可以藉由瞭解活化的激酶 Akt 其下游會去磷酸化的受質身份及參與的生理功能調控做一個整合性的分析。

在實驗設計中，選擇轉染 pCMV-3×Flag-Akt 質體入胃腺癌上皮細胞，以未感染幽門螺旋桿菌的細胞作控制組，有感染幽門螺旋桿菌的細胞做實驗組，分別以 ANTI-FLAG<sup>®</sup>M2 Affinity Gel 分離出 3×Flag-Akt 及與其交互作用的蛋白質複合物，經一維電泳展開後，由染色結果比對控制組和實驗組之間具有差異性的亮帶，進行膠內水解並使用液相層析串聯質譜儀鑑定其身份。將鑑定結果結合生物資訊統計軟體的分析發現共鑑定到 37 個激酶 Akt 的受質，我們針對其中參與在 PI3K/AKT 路徑的蛋白質進行研究，使用西方點墨法驗證其與激酶 Akt 之間的交互作用是否會受到幽門螺旋桿菌感染而增強。

在我們鑑定到的分子中，EphA2 位在細胞膜上屬於 Receptor tyrosine kinase 的一員，透過生物資訊統計軟體的分析及文獻搜尋，發現激酶 Akt 可對 EphA2 Ser 897 位置進行磷酸化後修飾，因此我們使用西方點墨法觀察在幽門螺旋桿菌感染下，EphA2 Ser 897 磷酸化程度的改變，結果顯示該位置的磷酸化的確會受到幽門螺旋



桿菌感染而增加。因此我們接著以 shRNA 來研究 EphA2 對於胃腺癌上皮細胞移動能力的調控，發現抑制 EphA2 表現量後，能有效地降低細胞移動的能力 (Figure 13.)。

## 第二節 研究策略探討

### 2.1 定量質譜學

實驗設計中，我們比較有轉染 pCMV-3×Flag-Akt 質體的胃腺癌上皮細胞分別不感染或是感染幽門螺旋桿菌，並以 ANTI-FLAG<sup>®</sup>M2 Affinity Gel 分離出 3×Flag-Akt 及與其交互作用的蛋白質複合物，一維電泳展開並染色，用肉眼挑選兩個樣品間顏色深淺有差異的亮帶將之挖下進行膠內水解，藉以比較控制組和實驗組間的蛋白質差異。

然而這樣的實驗方法可能會造成技術性的實驗誤差：在免疫共沈澱的實驗操作過程，控制組和實驗組樣品是分開操作，經過一連串沖洗的過程，最終得到的蛋白質含量可能會與真實情況有誤差；此外，我們選擇用肉眼去比對兩個樣品間顏色深淺差異性的方式也較不精確。

若是把樣品展開後的膠體分割成數十個膠片，再分別以液相層析串聯質譜儀鑑定及軟體分析，用「扣除法」將有在感染幽門螺旋桿菌樣品內鑑定到的蛋白質，扣除沒有感染幽門螺旋桿菌樣品內的蛋白質。然而這樣的實驗設計只能定性，無法定量，表現量發生變化的蛋白質會一併被扣除，因而可能會遺漏部分重要的蛋白質。

因此在未來實驗設計改良的部分，也許可考慮進行細胞培養胺基酸穩定同位素標定 (SILAC)，如此便可將控制組及實驗組的細胞混合一起進行後續免疫共沈澱的步驟，以減少實驗操作的誤差。此外由於以同位素標定的緣故，除了定性之外，



還可進行不同樣品間的相對定量分析，藉以比較幽門螺旋桿菌感染後，和激酶 Akt 之間交互作用變強的蛋白質有哪些。

## 2.2 軟體分析及預測

透過現今各式各樣的生物資訊統計軟體，使得過往前人的研究得以整理成系統性的資料庫。在本研究中，透過 Proteome Discoverer (PD) 、Ingenuity Pathway Analysis (IPA) 、STRING、PhosphoSitePlus<sup>®</sup> 資料庫系統及 Software Tool for Research Annotation of Proteins (STRAP) 的分析與整理，使我們得以短時間內將眾多資料進行系統性的整理，瞭解分子間的交互作用網路，並從中判定與激酶 Akt 的關聯性，節省許多個別搜尋資料及分析的時間。

然而這樣的軟體分析方式得到的結果，仍須經由實驗證明在自己的實驗模型中會成立。

### **第三節 激酶 Akt 免疫共沈澱複合物的分析**

將質譜儀鑑定結果經分析後，發現共鑑定到 37 個曾被報導過的激酶 Akt 受質，此外，配合 IPA 資料庫系統中的 PI3K/AKT 路徑，發現我們鑑定到符合其中的激酶 Akt 受質偏少，一方面可能因為在質譜儀鑑定時，我們選擇性地切割有差異性的膠片來鑑定，因此遺漏其它分子量的受質。另一方面，可能受限於現今技術及儀器靈敏度，使得含量較少的激酶 Akt 受質無法被鑑定到。

因此在後續的實驗設計，可選擇使用定量質譜學，以同位素標定廣泛性探討免疫共沈澱複合物。此外，我們可嘗試使用 anti-RxRxxS\*/T\* 抗體來進行免疫共沈澱的實驗 (39)。本研究透過分離出激酶 Akt 的方式一同將與其有交互作用的蛋白質鑑定出來，然而其中可能會有部分交互作用屬於間接性，這麼一來在質譜儀鑑定上可能會遮蔽屬於直接交互作用但表現量稀少的激酶 Akt 受質。RxRxxS\*/T\* 為激



酶 Akt 受質會被激酶 Akt 磷酸化的片段，透過辨認此段胜肽的抗體，也許可在降低其他蛋白質干擾的情況下，分離並鑑定到更多的激酶 Akt 受質。

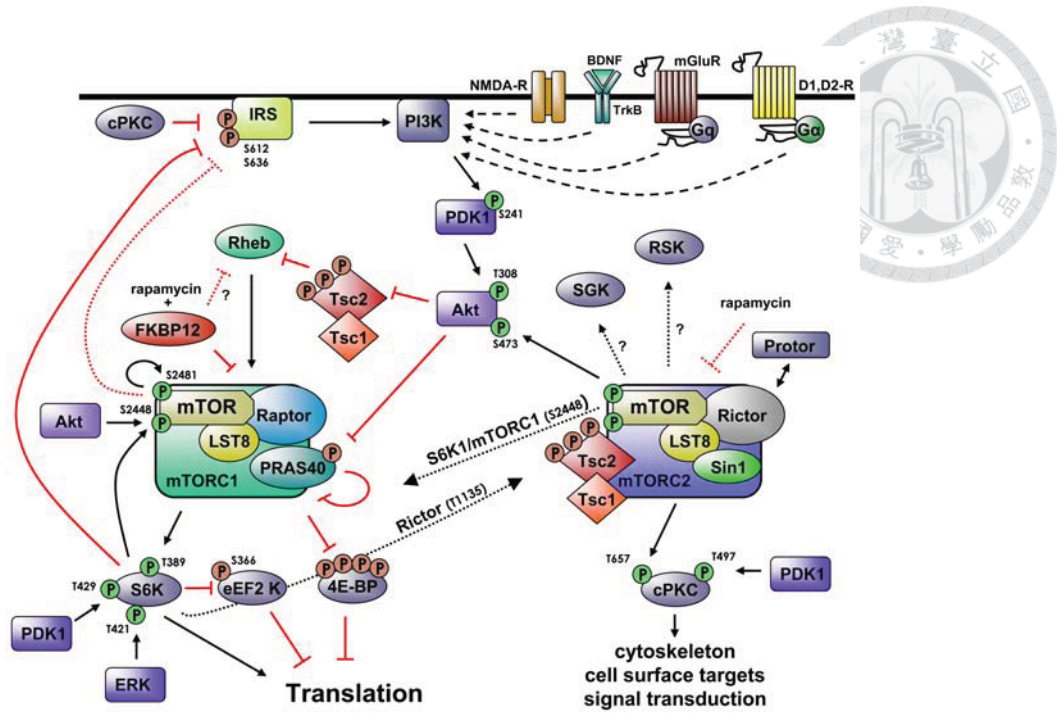
在本研究中，從質譜儀鑑定的結果，我們從中選擇三個激酶 Akt 受質：GSK3 $\beta$ 、EphA2 及 RPS6 並結合 IPA 資料庫系統分析參與在 PI3K/AKT 路徑的 mTOR、PRAS40、p70S6K、4EBP1、p27、BAD、FOXO1 及 FOXO3，進行免疫共沈澱的結果驗證。發現除了 RPS6 及 FOXO3 外，其他蛋白質和激酶 Akt 之間的交互作用的確會受到幽門螺旋桿菌感染而增強，顯示這些蛋白質很有可能受到活化的激酶 Akt 調控進而啓動下游訊息傳遞引發細胞生理功能異常，使細胞走向癌化，然而其詳細的調控仍須透過進一步研究才可確定，以下分別介紹這些蛋白質受激酶 Akt 調控後所引發的訊息傳遞路徑，EphA2 則獨立於第四節介紹。

### **3.1 mTOR** (圖 J)

根據研究顯示，激酶 Akt 可透過磷酸化 mTOR 在 Ser 2448 的位置，藉以開啓下游的訊息傳遞路徑 (40)：位在 mTOR 下游的 4EBP1 被磷酸化後，會與 eIF4E 分開，使 eIF4E 與其它分子構成 eIF4F 複合物，接上 mRNA 5 端 cap 結構，以啟動轉譯作用。另一個下游蛋白質 p70S6K 被磷酸化後，一方面會去磷酸化 RPS6，另外會透過磷酸化 eEF2K 抑制其活性，使得 eEF2 得以促使胜肽持續合成 (40, 41)。

另一個激酶 Akt 受質 PRAS40 會與 mTORC1 結合並抑制其活性，當 PRAS40 在 Thr 246 位置被激酶 Akt 磷酸化後，會與 mTORC1 分開，進而開啓 mTORC1 下游對 4EBP1 及 p70S6K 的訊息傳遞調控 (42)。

當幽門螺旋桿菌感染時，若激酶 Akt 確實會去透過磷酸化來調控 mTORC1 及 PRAS40 的活性時，可促使訊息傳遞路徑活化，蛋白質轉譯作用被啓動，合成大量蛋白質。



(圖 J：摘自 *Trends in Neurosciences* 33, 67-75 (2009).)

### 3.2 FOXO1

Forkhead box (FOX) 科內的蛋白質多具有高度保留性的 DNA-binding domain，包含 100 多個以上的蛋白質，根據他們序列的相似性分成 FOXA 到 FOXR 不同屬，每個屬內蛋白質多參與不同細胞生理功能的調控。其中 FOXO 內的 FOXO1 可進入細胞核調控下游基因的表現，包含活化 FasL 及 Bim-1 以啟動細胞凋亡；增加 p27 及 GADD45 表現量來暫緩細胞週期進行或是透過表現 GADD45 及 DDB1 來協助修復受損的 DNA 等功能 (43)。

根據先前的研究發現，當外界刺激產生時，FOXO1 在 Thr 24、Ser 256 及 Ser 319 位置可能會被激酶 Akt 磷酸化，進而被送出細胞核無法調控下游基因的表現 (43)。當幽門螺旋桿菌感染時，會使得 FOXO1 在 Thr 24 位置被磷酸化，且若使用 siRNA 抑制 FOXO1 表現量時，會影響胃腺癌上皮細胞受幽門螺旋桿菌感染後釋出 Interleukin-8 的含量 (43)，然而對於其他可能會被激酶 Akt 磷酸化的位置並未仔細討論，同時 FOXO1 被磷酸化後，其下游調控的基因表現須透過進一步研究瞭解對



於胃上皮細胞的癌化是否具有關聯性。


### **3.3 GSK3 $\beta$**

當哺乳動物細胞欲進行複製時，促進有絲分裂的訊號傳入後，使細胞由 G0 (quiescence) 進入 G1，並需要生長因子等分子來推動後續細胞週期的進行。在這過程中，主要有兩個細胞週期檢查點 (cell cycle checkpoint)：G1/S 及 G2/M。Cyclin D1 在 G1/S1 的部分會受到週期素激酶 (cyclin-dependent kinase) 的調控進而推動細胞週期的進行。然而 Cyclin D1 屬於存活時間較短的蛋白質，其表現量會受到 PI3K/AKT 路徑的調控而被降解。當 GSK3 $\beta$  在 Cyclin D1 Thr 286 的位置進行磷酸化時，會促使 Cyclin D1 與 CRM1 結合，被送出細胞核，且經由泛素介導蛋白質水解途徑 (ubiquitin-mediated proteolytic pathway) 水解 Cyclin D1 以停止細胞週期的進行。而當 GSK3 $\beta$  在 Ser 9 位置被激酶 Akt 磷酸化時，其激酶活性會被抑制而無法磷酸化 Cyclin D1，Cyclin D1 得以穩定存在而不被降解 (44)。

先前研究指出，當幽門螺旋桿菌感染時，激酶 Akt 會磷酸化 GSK3 $\beta$  在 Ser 9 的位置，以抑制其激酶活性 (45)。而在我們的實驗結果中，的確有觀察到 Ser 9 位置的磷酸化會受到幽門螺旋桿菌感染的影響 (Supplementary Figure 1.)。關於 GSK3 $\beta$  磷酸化程度的增加對於 Cyclin D1 的調控是否造成細胞週期不正常進行，細胞進而走向癌化階段仍需進一步實驗驗證。

### **3.4 p27<sup>kip1</sup>**

p27<sup>kip1</sup> 為調控細胞週期的週期素激酶抑制蛋白質，可透過抑制週期素激酶以暫緩細胞週期的進行，故在 G0 (quiescence) 其蛋白質表現量很高，若是由 G1 進入 S 時，p27 表現量則會大幅減少 (46)。先前研究指出激酶 Akt 可透過磷酸化修飾 p27 來影響其功能。當激酶 Akt 磷酸化 p27 Thr 157 位置後，由於 Thr 157 位在 p27



Nuclear localization signal 區域內，磷酸化後會使得 p27 被滯留細胞質內而無法進入細胞核抑制細胞週期的進行，導致細胞不斷增生 (47)。在我們的實驗結果中，的確有觀察到 Thr 157 位置的磷酸化會受到幽門螺旋桿菌感染的影響 (Supplementary Figure 1.)，不過對於細胞週期的異常調控，仍須經由進一步實驗驗證。

### **3.5 BAD**

BAD 屬於 Bcl-2 家族蛋白質中的一員，具有促進細胞凋亡的能力。當 BAD 與抑制細胞凋亡的相關蛋白質：Bcl-XL 或 Bcl-2 形成異源雙體 (heterodimer) 時，會使 Bcl-XL 或 Bcl-2 失去其功能，細胞因而走向凋亡。而當細胞接收到生存訊號刺激時，激酶 Akt 磷酸化 BAD Ser 136 的位置，使磷酸化的 BAD 和 14-3-3 蛋白質結合被滯留在細胞質內，無法進入細胞核與 Bcl-XL 或 Bcl-2 結合，使得細胞凋亡的能力被抑制而可持續存活 (48)。

當幽門螺旋桿菌感染時，若激酶 Akt 確實會透過磷酸化來調控 BAD，可抑制細胞凋亡的發生，細胞持續存活後可能會走向癌化。

## **第四節 EphA2**

### **4.1 EphA2 於癌症進展中所扮演的角色**

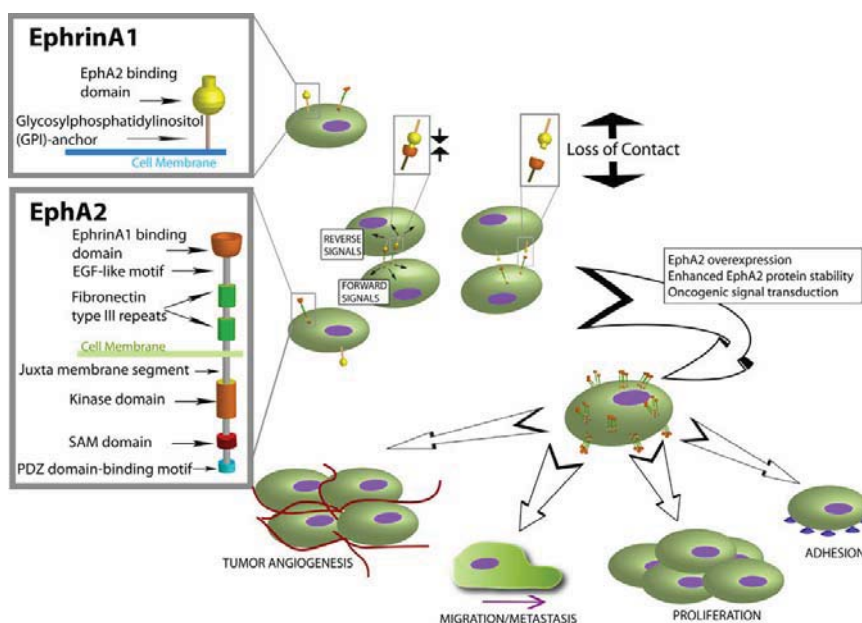
Eph 屬於 Receptor tyrosine kinase (RTK) 中最大的一科，西元 1990 年以探針 (probe) 在 HeLa 細胞株 cDNA 資料庫內鑑定出的 tyrosine kinase, EphA2, 由 976 個胺基酸組成，分子量約 130 kDa，與老鼠 EphA2 序列相比之下，發現具有高達 90 % 相似性，且和其他 Eph 受體也有 25-35 % 序列相似性。

EphA2 除了表現在胚胎期及一般成人組織外，發現在許多的癌症有過度表現的情形，包括乳癌、黑色素癌、卵巢癌、肺癌、胃癌、膀胱癌及前列腺癌等。透過



對癌細胞株內 EphA2 的研究，可協助作為臨床上癌症治療效果的判定，亦可能作為癌症治療的目標蛋白質。以胃腺癌為例，發現 EphA2 的表現量和腫瘤轉移程度具有關聯性，此外也可作為判定預後的指標之一 (49)。

位在細胞膜上的 EphA2 受體與其鄰近細胞的細胞膜上方之配體 (ligand) Ephrin-A1 結合後所引發的下游訊息傳遞可促使 EphA2 磷酸化，進而被降解，使細胞得以處在正常的生理狀態。然而由於癌細胞間的細胞接觸消失 (圖 K)，使得 Ephrin-A1 無法順利結上 EphA2，造成大量未磷酸化的 EphA2 堆積而過度表現，因而導致細胞骨架重整、細胞黏附、細胞增生、細胞侵襲、血管新生等生理反應異常，造成細胞走向癌化 (50)。



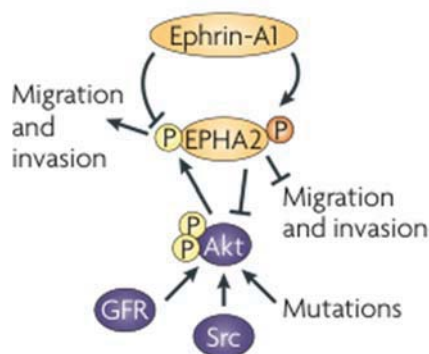
(圖 K：摘自 *Expert Opin Ther Targets* **15**, 31-51 (2011).)

除了探討 Ephrin-A1 對細胞內 EphA2 生理功能的調控外，在 EphA2 轉譯後修飾的研究發現另一條 EphA2 參與的訊息傳遞路徑 (圖 L)，此種路徑不需配體參與，當細胞內 PI3K/AKT 路徑活化時，激酶 Akt 會磷酸化 EphA2 在 Ser 897 的位置，透過調控下游黏著激酶 (focal adhesion kinase, FAK) 等與細胞連接 (junction) 相





關的蛋白質以增加細胞移動及侵襲的能力 (38)。

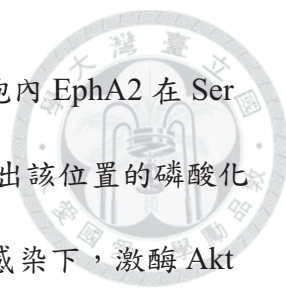


(圖 L：摘自 *Nature Reviews Cancer* **10**, 165-180 (2010).)

EphA2 在細胞內可作為激酶 Akt 的受質，Ser 897 的位置因而被磷酸化，以增加細胞移動的能力，然而 Ephrin-A1 接上 EphA2 後能抑制該 Ser 897 磷酸化，進一步影響到 PI3K/AKT 路徑，抑制細胞移動，形成回饋作用。因此目前對於 EphA2 屬於致癌基因 (oncogene) 或是抑癌基因 (tumor suppressor gene) 仍無法斷言之。部分研究推測在正常細胞中透過 Ephrin-A1 對 EphA2 的調控來抑制細胞增生及移動的能力，維持生理恆定，避免細胞走向癌化。然而當細胞內激酶 Akt 被不正常活化時，便可磷酸化 EphA2 Ser 897 的位置，增加細胞移動的能力，使得細胞傾向癌化 (37)。不過對於 EphA2 在細胞內所扮演的切確功能及角色，仍需更多研究及實驗作進一步探討。

在本研究中，我們首先針對 EphA2 與激酶 Akt 之間的轉譯後修飾進行探討，發現在幽門螺旋桿菌感染下，EphA2 在 Ser 897 位置的磷酸化會增加，另外使用 shRNA 抑制 EphA2 表現量後，可有效地抑制細胞移動的能力，顯示 EphA2 在胃腺癌細胞和幽門螺旋桿菌感染之間可能參與調控細胞走向癌化，值得我們做更深入的研究來釐清之間的關聯性。

#### 4.2 驗證激酶 Akt 對其受質的修飾及調控



我們的實驗結果發現隨著幽門螺旋桿菌感染的時間增加，細胞內 EphA2 在 Ser 897 位置的磷酸化程度有隨之增加的趨勢，儘管先前已有研究指出該位置的磷酸化是受到激酶 Akt 的調控 (37)，但仍舊不能確定在幽門螺旋桿菌感染下，激酶 Akt 會直接磷酸化 EphA2 Ser 897 的位置。

因此為了要確認激酶 Akt 及 EphA2 之間的磷酸化後修飾為直接或是間接，可使用 PI3K 抑制劑如 LY294002 或 Wortmannin 來抑制激酶 Akt 磷酸化的發生，同時觀察 EphA2 在 Ser 897 位置的磷酸化是否有受到影響，以確認激酶 Akt 及 EphA2 之間調控的關係。


#### **4.3 置換絲胺酸 (Serine) 成丙胺酸 (Alanine) 的突變型 (mutant form)**

在探討 EphA2 於胃腺癌上皮細胞內參與的生理功能時，我們使用 shRNA 來抑制 EphA2 的表現量，發現胃腺癌上皮細胞的移動能力因而減弱。此外本研究亦發現幽門螺旋桿菌會調控 EphA2 在 Ser 897 位置磷酸化的程度，因此後續可轉染 S897A 突變型的 EphA2 進入胃腺癌上皮細胞，以探討該磷酸化位置對於感染幽門螺旋桿菌後，胃腺癌上皮細胞內生理功能調控的影響為何。

#### **第五節 未來展望**

在本研究中，以蛋白質體學的技术探討當幽門螺旋桿菌感染時，活化的激酶 Akt 對其下游蛋白質及訊息傳遞的調控。隨著現今科學技術的演進，質譜儀效能及靈敏度不斷提升，對於鑑定含量較少的蛋白質無非是一大助力，此外透過結合同位素標定，更能減少實驗操作誤差，並得到相對定量的結果。未來可使用定量蛋白質體學的方式，全面性探討幽門螺旋桿菌活化 PI3K/AKT 路徑下游參與的生理反應及訊息傳遞的調控，藉以對幽門螺旋桿菌致癌機轉有更深入地瞭解。

另外在本實驗中發現與激酶 Akt 間交互作用會受到幽門螺旋桿菌感染而增強的



蛋白質：mTOR、PRAS40、p70S6K、4EBP1、p27、GSK3 $\beta$ 、BAD 及 FOXO1，其中某些蛋白質曾被報導是激酶 Akt 的受質，值得我們作進一步實驗分析，探討其磷酸化是否會受到激酶 Akt 的調控。若這些蛋白質受到激酶 Akt 磷酸化時，其各自參與的生理功能便可能受到影響：當 mTOR 被激酶 Akt 磷酸化後，會透過活化 p70S6K 及抑制 4EBP1 來促進蛋白質的合成，PRAS40 的磷酸化一樣可幫助 mTORC1 活化，啓動下游訊息傳遞；p27 和 GSK3 $\beta$  若是被磷酸化，便無法適當地調控細胞週期，可能會造成細胞不正常增生；BAD 被激酶 Akt 磷酸化後，會影響到細胞凋亡的能力，使得細胞可能持續存活；屬於轉錄因子 (transcription factor) 的 FOXO1 調控許多基因的轉錄，若是受到激酶 Akt 磷酸化後，便無法正常地調控，可能會使細胞生理功能產生異常。目前為止我們透過免疫共沈澱的方式發現這些蛋白質和激酶 Akt 之間的交互作用可能會受到幽門螺旋桿菌感染而增強，對於實際磷酸化後修飾的調控及影響生理功能的程度仍需再以實驗確認，希望可以透過系統性的分析及整理，研究當這些蛋白質受激酶 Akt 調控時，對於生理功能的異常調控是否可能參與在幽門螺旋桿菌感染而致癌的過程中。

本實驗中我們首先選取 EphA2 作驗證，發現在 Ser 897 位置的磷酸化程度的確是會受到幽門螺旋桿菌感染所調控，接著進行的細胞移動實驗結果顯示 EphA2 在胃腺癌上皮細胞內的確參與細胞生理功能的調控。在未來可望繼續探討 EphA2 磷酸化的程度是否有參與在幽門螺旋桿菌致癌機轉內並與其他蛋白質一同作系統性整合。

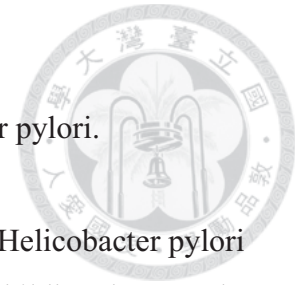
## 第六節 參考文獻



1. International Agency for Research on cancer. The Globocan Project [online]. 2008; Available from: <http://globocan.iarc.fr>
2. Department of Health, Executive Yuan, R.O.C. (TAIWAN). Cause of Death Statics [Online]. 2012; Available from: <http://www.doh.gov.tw>.
3. Correa P. Human gastric carcinogenesis- a multistep and multifactorial process--First American Cancer Society Award Lecture on Cancer Epidemiology and Prevention. *Cancer Research*. 1992;52:6735-40.
4. Carl-McGrath S, Ebert M, Rocken C. Gastric adenocarcinoma- epidemiology, pathology and pathogenesis. *Cancer Therapy*. 2007;5:877-94.
5. Axon A. Review article: gastric cancer and Helicobacter pylori. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*. 2002;16:83-8.
6. Joossens JV, Hill MJ, Elliott P, Stamler R, Stamler J, Lesaffre E, et al. Dietary Salt, Nitrate and Stomach Cancer Mortality in 24 Countries. *International Journal of Epidemiology*. 1996;25:494-504.
7. Kono S, Hirohata T. Nutrition and stomach cancer. *Cancer causes and Control*. 1996;7:41-55.
8. Sharara AI, Abdul-Baki H, ElHajj I, Kreidieh N, Kfoury Baz EM. Association of gastroduodenal disease phenotype with ABO blood group and Helicobacter pylori virulence-specific serotypes. *Digestive and liver disease : official journal of the Italian Society of Gastroenterology and the Italian Association for the Study of the Liver*. 2006;38(11):829-33. Epub 2006/08/26.
9. IARC working group on the evaluation of carcinogenic risks to humans: some industrial chemicals. Lyon, 15-22 February 1994. *IARC Monogr Eval Carcinog Risks Hum*. 1994;60:1-560.
10. Marshall BJ, Warren JR. Unidentified curved bacilli in the stomach of patients with gastritis and peptic ulceration. *The Lancet*. 1984;1311-4.
11. Brown LM. Helicobacter pylori- epidemiology and routes of transmission. *Epidemiologic Reviews*. 2000;22:283-97.
12. Ernst PB, Gold BD. The disease spectrum of Helicobacter pylori: The immunopathogenesis of gastroduodenal ulcer and gastric cancer. *Annual Review of*

Microbiology. 2000;54:615-40.

13. JE E. Recent developments in the epidemiology of *Helicobacter pylori*. *Gastroenterol Clin North Am*. 2000;29:559-78.
14. Miyaji H, Azuma T, Ito S, Abe Y, Gejyo F, Hashimoto N, et al. *Helicobacter pylori* infection occurs via close contact with infected individuals in early childhood. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*. 2000;15:257-62.
15. French RW, Clemens J. *Helicobacter* in the developing world. *Microbes and Infection*. 2003;5(8):705-13.
16. Jr. RMP. IV. *Helicobacter pylori* strain-specific activation of signal transduction cascades related to gastric inflammation. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2001;280:525-30.
17. Konturek PC, Konturek SJ, Pierzchalski P, Bielanski W, Duda A, Marlicz K, et al. Cancerogenesis in *Helicobacter pylori* infected stomach – role of growth factors, apoptosis and cyclooxygenases. *Medical Science Monitor*. 2001;7:1092-107.
18. Prinz C, Hafsi N, Volland P. *Helicobacter pylori* virulence factors and the host immune response: implications for therapeutic vaccination. *Trends in Microbiology*. 2003;11(3):134-8.
19. Yoshiyama H, Makazawa T. Unique mechanism of *Helicobacter pylori* for colonizing the gastric mucus. *Microbes and Infection*. 2000;2:55-60.
20. Montecucco C, Rappuoli R. Living dangerously- how *Helicobacter pylori* survives in the human stomach. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2001;2:457-66.
21. Mcgee DJ, Mobley HLT. Mechanisms of *Helicobacter pylori* infection- bacterial factors. *Gastrointestinal Disease and Helicobacter pylori*. 1999:156-80.
22. Blaser MJ, Atherton JC. *Helicobacter pylori* persistence: biology and disease. *Journal of Clinical Investigation*. 2004;113(3):321-33.
23. Robinson K, Argent RH, Atherton JC. The inflammatory and immune response to *Helicobacter pylori* infection. *Best practice & research Clinical gastroenterology*. 2007;21(2):237-59. Epub 2007/03/27.
24. Wilson KT, Crabtree JE. Immunology of *Helicobacter pylori*: insights into the failure of the immune response and perspectives on vaccine studies. *Gastroenterology*. 2007;133(1):288-308. Epub 2007/07/17.
25. Staal SP, Hartley JW, P. Rowe W. Isolation of transforming murine leukemia viruses from mice with a high incidence of spontaneous lymphoma. *PNAS*.



1977;74:3065-7.

26. Staal SP, Hartley JW. Thymic lymphoma induction by the AKT8 murine retrovirus. *Journal of Experimental Medicine*. 1988;167:1259-64.

27. Vivanco I, Sawyers CL. The phosphatidylinositol 3-Kinase AKT pathway in human cancer. *Nature reviews Cancer*. 2002;2(7):489-501. Epub 2002/07/03.

28. Shiojima I, Walsh K. Regulation of cardiac growth and coronary angiogenesis by the Akt/PKB signaling pathway. *Genes & Development*. 2006;20:3347-65.

29. Manning BD, Cantley LC. AKT/PKB Signaling: Navigating Downstream. *Cell*. 2007;129:1261-74.

30. Hers I, Vincent EE, Tavare JM. Akt signalling in health and disease. *Cellular signalling*. 2011;23(10):1515-27. Epub 2011/05/31.

31. Picott P, Aebersold R, Domon B. The implications of proteolytic background for shotgun proteomics. *Molecular & Cellular Proteomics*. 2007;6:1589-98.

32. Gorg A, Weiss W, Dunn MJ. Current two-dimensional electrophoresis technology for proteomics. *Proteomics*. 2004;4(12):3665-85. Epub 2004/11/16.

33. Gygi SP, Rist B, Gerber SA, Turecek F, Gelb MH, Aebersold R. Quantitative analysis of complex protein mixtures using isotope-coded affinity tags. *Nature Biotechnology*. 1999;17:994-9.

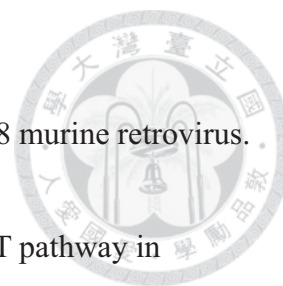
34. Ross PL, Huang YN, Marchese JN, Williamson B, Parker K, Hattan S, et al. Multiplexed protein quantitation in *Saccharomyces cerevisiae* using amine-reactive isobaric tagging reagents. *Molecular & cellular proteomics : MCP*. 2004;3(12):1154-69. Epub 2004/09/24.

35. Ong S-E, Blagoev B, Kratchmarova I, Kristensen DB, Steen H, Pandey A, et al. Stable isotope labeling by amino acids in cell culture, SILAC, as a simple and accurate approach to expression proteomics. *Molecular & Cellular Proteomics*. 2002;1:376-86.

36. Yu CC, Yang JC, Chang YC, Chuang JG, Lin CW, Wu MS, et al. VCP phosphorylation-dependent interaction partners prevent apoptosis in *Helicobacter pylori*-infected gastric epithelial cells. *PloS one*. 2013;8(1):e55724. Epub 2013/02/06.

37. Miao H, Li DQ, Mukherjee A, Guo H, Petty A, Cutter J, et al. EphA2 mediates ligand-dependent inhibition and ligand-independent promotion of cell migration and invasion via a reciprocal regulatory loop with Akt. *Cancer cell*. 2009;16(1):9-20. Epub 2009/07/04.

38. Pasquale EB. Eph receptors and ephrins in cancer: bidirectional signalling and



beyond. *Nature reviews Cancer*. 2010;10(3):165-80. Epub 2010/02/25.

39. Moritz A, Li Y, Guo A, Villen J, Wang Y, MacNeill J, et al. Akt-RSK-S6 kinase signaling networks activated by oncogenic receptor tyrosine kinases. *Science signaling*. 2010;3(136):ra64. Epub 2010/08/26.

40. Nave BT, Ouwens DM, Withers DJ, Aless DR, Shepherd PR. Mammalian target of rapamycin is a direct target for protein kinase B- identification of a convergence point for opposing effects of insulin and amino-acid deficiency on protein translation. *Biochemical Journal*. 1999;344:427-31.

41. Proud CG, Denton RM. Molecular mechanisms for the control of translation by insulin. *Biochemical Journal*. 1997;328:329-41.

42. Wang H, Zhang Q, Wen Q, Zheng Y, Philip L, Jiang H, et al. Proline-rich Akt substrate of 40 kDa (PRAS40): A novel downstream target of PI3K/Akt signaling pathway. *Cellular signalling*. 2012;24:17-24.

43. Tabassam FH, Graham DY, Yamaoka Y. Helicobacter pylori-associated regulation of forkhead transcription factors FoxO1/3a in Human Gastric Cells. *Helicobacter*. 2012;17:193-202.

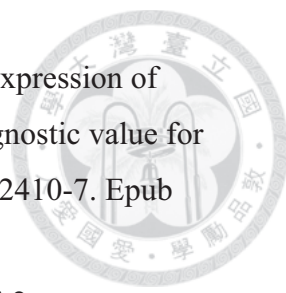
44. Liang J, Slingerland JM. Multiple roles of the PI3K/PKB (Akt) pathway in cell cycle progression. *Cell Cycle*. 2003;2:339-45.

45. Tabassam FH, Graham DY, Yamaoka Y. Helicobacter pylori activate epidermal growth factor receptor- and phosphatidylinositol 3-OH kinase-dependent Akt and glycogen synthase kinase 3beta phosphorylation. *Cellular microbiology*. 2009;11(1):70-82. Epub 2008/09/11.

46. Shin I, Yakes FM, Rojo F, Shin N-Y, Bakin AV, Baselga J, et al. PKB/Akt mediates cell-cycle progression by phosphorylation of p27Kip1 at threonine 157 and modulation of its cellular localization. *Nature Medicine*. 2002;8:1145-52.

47. Viglietto G, Motti ML, Bruni P, Melillo RM, D'Alessio A, Califano D, et al. Cytoplasmic relocation and inhibition of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27kip1 by PKB/Akt-mediated phosphorylation in breast cancer. *Nature Medicine*. 2002;8:1136-44.

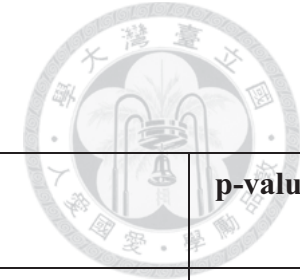
48. Hayakawa J, Ohmichi M, Kurachi H, Kanda Y, Hisamoto K, Nishio Y, et al. Inhibition of BAD Phosphorylation Either at Serine 112 via Extracellular Signal-regulated Protein Kinase Cascade or at Serine 136 via Akt Cascade Sensitizes Human Ovarian Cancer Cells to Cisplatin. *Cancer Research*. 2000;60:5988-94.

- 
49. Yuan WJ, Ge J, Chen ZK, Wu SB, Shen H, Yang P, et al. Over-expression of EphA2 and EphrinA-1 in human gastric adenocarcinoma and its prognostic value for postoperative patients. *Digestive diseases and sciences*. 2009;54(11):2410-7. Epub 2008/12/23.
50. Tandon M, Vemula SV, Mittal SK. Emerging strategies for EphA2 receptor targeting for cancer therapeutics. *Expert opinion on therapeutic targets*. 2011;15(1):31-51. Epub 2010/12/15.





## 圖表與說明



**Table 1. Top 5 list of canonical pathways activated by 3×Flag-Akt complex from Ingenuity Pathway Analysis.**

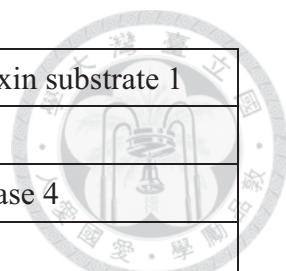
Ingenuity Canonical Pathways	number of genes	Molecules	p-value
Regulation of eIF4 and p70S6K Signaling	51	AKT1, EIF2A, EIF2B1, EIF2S1, EIF2S3, EIF3C/EIF3CL, EIF3E,EIF3F, EIF3G, EIF3H, EIF3I, EIF3J, EIF3K,EIF3M, EIF4A1, EIF4A2, EIF4A3,EIF4E, EIF4G1, EIF4G2, FAU, MAP2K1, MAP2K2, MAPK1, MAPK3, MAPK13, MAPK14, PABPC1, PAIP1, PIK3R2, PPP2CB, PPP2R4, PPP2R1A, PPP2RA2, PPP2R5E, RPS2, RPS3, RPS5, RPS6, RPS8, RPS9 RPS11, RPS14, RPS16, RPS18, RPS24, RPS26, RPS3A, RPS4X, RPSA,RRAS2	4.19E-16
Protein Ubiquitination Pathway	67	BAG1, CDC34, CUL1, DNAJA1, DNAJB2, DNAJB6, DNAJB11, DNAJB14, DNAJC9, DNAJC17, HLA-A, HSP90AA1, HSP90AB1, HSP90B1, HSPA5, HSPA8, HSPB1, HSPD1, MED20, PSMA1, PSMA3, PSMA4, PSMA5, PSMA6, PSMA7, PSMB1, PSMB2, PSMB3, PSMB4, PSMB5, PSMB6, PSMB7, PSMC1, PSMC2, PSMC3, PSMC4, PSMC5, PSMC6, PSMD2, PSMD3, PSMD4, PSMD6, PSMD8, PSMD9, PSMD11, PSMD13, PSMD14, PSME1, PSME2, STUB1, SUGT1, UBA1, UBE2E3, UBE2J1, UBE2M, UBE2N, UBE2R2, UBE2S, UCHL3, UCHL5, USO1, USP5, USP14, USP15, USP28, USP37, USP46	4.28E-13

Remodeling of Epithelial Adherens Junctions	27	ACTC1, ACTG1, ACTN1, ACTN4, ACTR2, ACTR3, ARPC2, ARPC1A, ARPC1B, CTNNA1, CTNNB1, CTNND1, HGS, IQGAP1, MAPRE1, MAPRE2, RAB5A, RAB5C, RAB7A, TUBA1C, TUBB3, TUBB, TUBB2A, TUBB4B, TUBG1, VCL, ZYX	1.13E-10
mTOR Signaling	47	AKT1, EIF3C/EIF3CL, EIF3E, EIF3F, EIF3G, EIF3H, EIF3I, EIF3J, EIF3K, EIF3M, EIF4A1, EIF4A2, EIF4A3, EIF4E, EIF4G1, EIF4G2, FAU, GNB1L, HMOX1, MAPK1, MAPK3, PIK3R2, PPP2CB, PPP2R4, PPP2R1A, PPP2R2A, PPP2R5E, PRKAB2, PRKAG1, RAC1, RHOC, RPS2, RPS3, RPS5, RPS6, RPS8, RPS9, RPS11, RPS14, RPS16, RPS18, RPS24, RPS26, RPS3A, RPS4X, RPSA, RRAS2	2.86E-09
PI3K/AKT Signaling	35	AKT1, BCL2L1, CDC37, CTNNB1, EIF4E, GDF15, GSK3A, GSK3B, HSP90AA1, HSP90AB1, HSP90B1, IKBKG, JAK2, LIMS1, MAP2K1, MAP2K2, MAPK1, MAPK3, NFKB1, NFKBIB, PIK3R2, PPP2CB, PPP2R4, PPP2R1A, PPP2R2A, PPP2R5E, RRAS2, SFN, THEM4, YWHAB, YWHAE, YWHAG, YWHAH, YWHAQ, YWHAZ	1.32E-08

**Table 2. List of Akt substrates identified by LC-MS/MS in *H.pylori*-infected AGS cells.**



No	Accession	Gene name	Description
1	P23396	RPS3	40S ribosomal protein S3
2	P63104	YWHAZ	14-3-3 protein zeta/delta
3	P04792	HSPB1	Heat shock protein beta-1
4	P24941	CDK2	Cyclin-dependent kinase 2
5	P67809	YBX1	Nuclease-sensitive element-binding protein 1
6	P78371	CCT2	T-complex protein 1 subunit beta
7	Q15365	PCBP1	Poly(rC)-binding protein 1
8	P49841	GSK3B	Glycogen synthase kinase-3 beta
9	P53365	ARFIP2	Arfaptin-2
10	P62753	RPS6	40S ribosomal protein S6
11	P09651	HNRNPA1	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1
12	P62136	PPP1CA	Serine/threonine-protein phosphatase PP1-alpha catalytic subunit
13	Q9UBP6	METTL1	tRNA (guanine-N(7)-)-methyltransferase
14	Q7L5N1	COPS6	COP9 signalosome complex subunit 6
15	P31749	AKT1	RAC-alpha serine/threonine-protein kinase
16	P02545	LMNA	Prelamin-A/C
17	Q96S44	TP53RK	TP53-regulating kinase
18	O43464	HTRA2	Serine protease HTRA2, mitochondrial
19	P49840	GSK3A	Glycogen synthase kinase-3 alpha
20	O95999	BCL10	B-cell lymphoma/leukemia 10
21	P48730	CSNK1D	Casein kinase I isoform delta
22	P18031	PTPN1	Tyrosine-protein phosphatase non-receptor type 1
23	P45985	MAP2K4	Dual specificity mitogen-activated protein kinase kinase 4
24	P55211	CASP9	Caspase-9
25	Q07817	BCL2L1	Bcl-2-like protein 1



26	P63000	RAC1	Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1
27	Q15942	ZYX	Zyxin
28	Q13043	STK4	Serine/threonine-protein kinase 4
29	P09601	HMOX1	Heme oxygenase 1
30	Q12906	ILF3	Interleukin enhancer-binding factor 3
31	Q9H6Z4	RANBP3	Ran-binding protein 3
32	P29317	EPHA2	Ephrin type-A receptor 2
33	Q9UMS4	PRPF19	Pre-mRNA-processing factor 19
34	P55072	VCP	Transitional endoplasmic reticulum ATPase
35	Q9P0V3	SH3BP4	SH3 domain-binding protein 4
36	P35222	CTNNB1	Catenin beta-1
37	Q9H4A3	WNK1	Serine/threonine-protein kinase WNK1

**Table 3. Biological process of identified Akt substrates categorized by Software Tool for Researching Annotation of Proteins (STRAP)**



**A.**

<b>Cellular process</b>	
RPS3	YWHAZ
HSPB1	CDK2
YBX1	CCT2
PCBP1	GSK3B
ARFIP2	RPS6
HNRNPA1	PPP1CA
COPS6	AKT1
LMNA	TP53RK
HTRA2	GSK3A
BCL10	CSNK1D
MAP2K4	CASP9
BCL2L1	RAC1
ZYX	STK4
HMOX1	ILF3
RANBP3	EPHA2
WNK1	PRPF19
VCP	SH3BP4
CTNNB1	

**B.**

<b>Developmental process</b>	
YBX1	GSK3B
PPP1CA	AKT1
LMNA	HTRA2
GSK3A	BCL10
BCL2L1	RAC1
STK4	HMOX1
EPHA2	PRPF19

CTNNB1	
--------	--

C.

Growth	
BCL2L1	

D.

Immune system process	
GSK3B	AKT1
GSK3A	BCL10
MAP2K4	CASP9
BCL2L1	RAC1
ILF3	

E.

Interaction with cells and organisms	
HSPB1	GSK3B
HTRA2	BCL10
BCL2L1	RAC1
ZYX	HMOX1
EPHA2	CTNNB1

F.

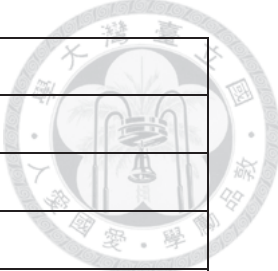
Localization	
CDK2	HNRNPA1
AKT1	RANBP3
WNK1	SH3BP4

G.

Metabolic process	
YWHAZ	HSPB1
PPP1CA	AKT1
BCL10	CASP9
HMOX1	PRPF19

H.

Regulation	
RPS3	YWHAZ



HSPB1	CDK2
YBX1	GSK3B
ARFIP2	RPS6
PPP1CA	AKT1
LMNA	HTRA2
GSK3A	BCL10
CSNK1D	PTPN1
MAP2K4	CASP9
BCL2L1	RAC1
ZYX	STK4
HMOX1	ILF3
EPHA2	WNK1
PRPF19	VCP
SH3BP4	CTNNB1

**I.**

<b>Reproduction</b>	
BCL2L1	

**J.**

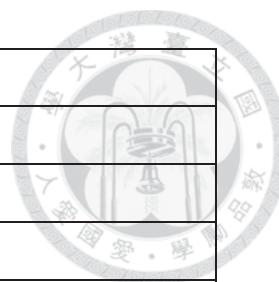
<b>Response to stimulus</b>	
HSPB1	GSK3B
AKT1	HTRA2
BCL10	BCL2L1
RAC1	HMOX1
EPHA2	CTNNB1

**K.**

<b>Other</b>	
RPS3	YWHAZ
CDK2	CCT2
GSK3B	ARFIP2
RPS6	AKT1
LMNA	HTRA2
BCL10	CSNK1D



PTPN1	BCL2L1
RAC1	STK4
HMOX1	EPHA2
PRPF19	VCP
CTNNB1	



**Table 4. Molecular functions of identified Akt substrates categorized by Software Tool for Researching Annotation of Proteins (STRAP)**



**A.**

<b>Protein/DNA binding</b>	
RPS3	HSPB1
CDK2	YBX1
CCT2	PCBP1
GSK3B	ARFIP2
HNRNPA1	PPP1CA
METTL1	AKT1
TP53RK	HTRA2
GSK3A	BCL10
CSNK1D	PTPN1
MAP2K4	CASP9
RAC1	ZYX
STK4	HMOX1
ILF3	RANBP3
EPHA2	WNK1
PRPF19	VCP
CTNNB1	

**B.**

<b>Catalytic activity</b>	
RPS3	CDK2
GSK3B	PPP1CA
METTL1	AKT1
TP53RK	HTRA2
GSK3A	CSNK1D
PTPN1	MAP2K4
CASP9	RAC1
STK4	HMOX1

EPHA2	WNK1
PRPF19	VCP

**C.**

<b>Enzyme regulator activity</b>	
HSPB1	AKT1
CASP9	STK4
WNK1	SH3BP4

**D.**

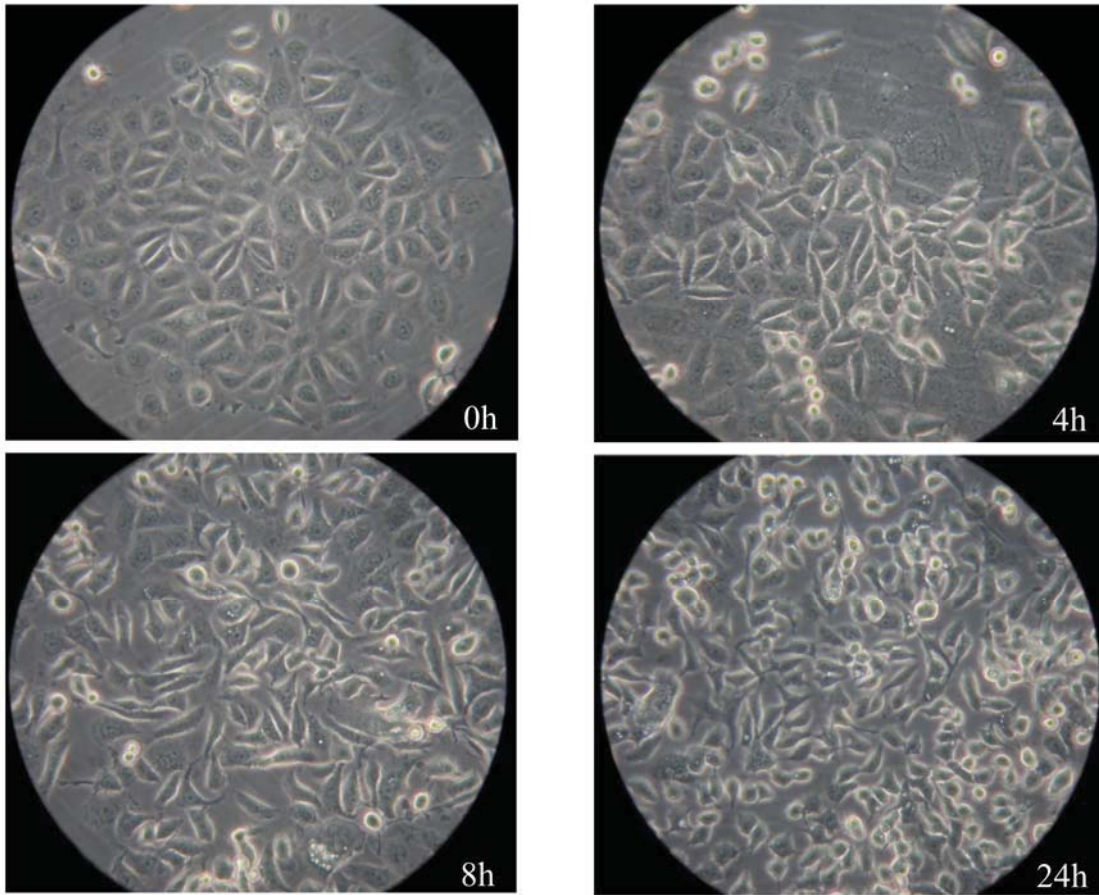
<b>Molecular transducer activity</b>	
HMOX1	CTNNB1

**E.**

<b>Structural molecule activity</b>	
RPS3	RPS6
LMNA	CTNNB1

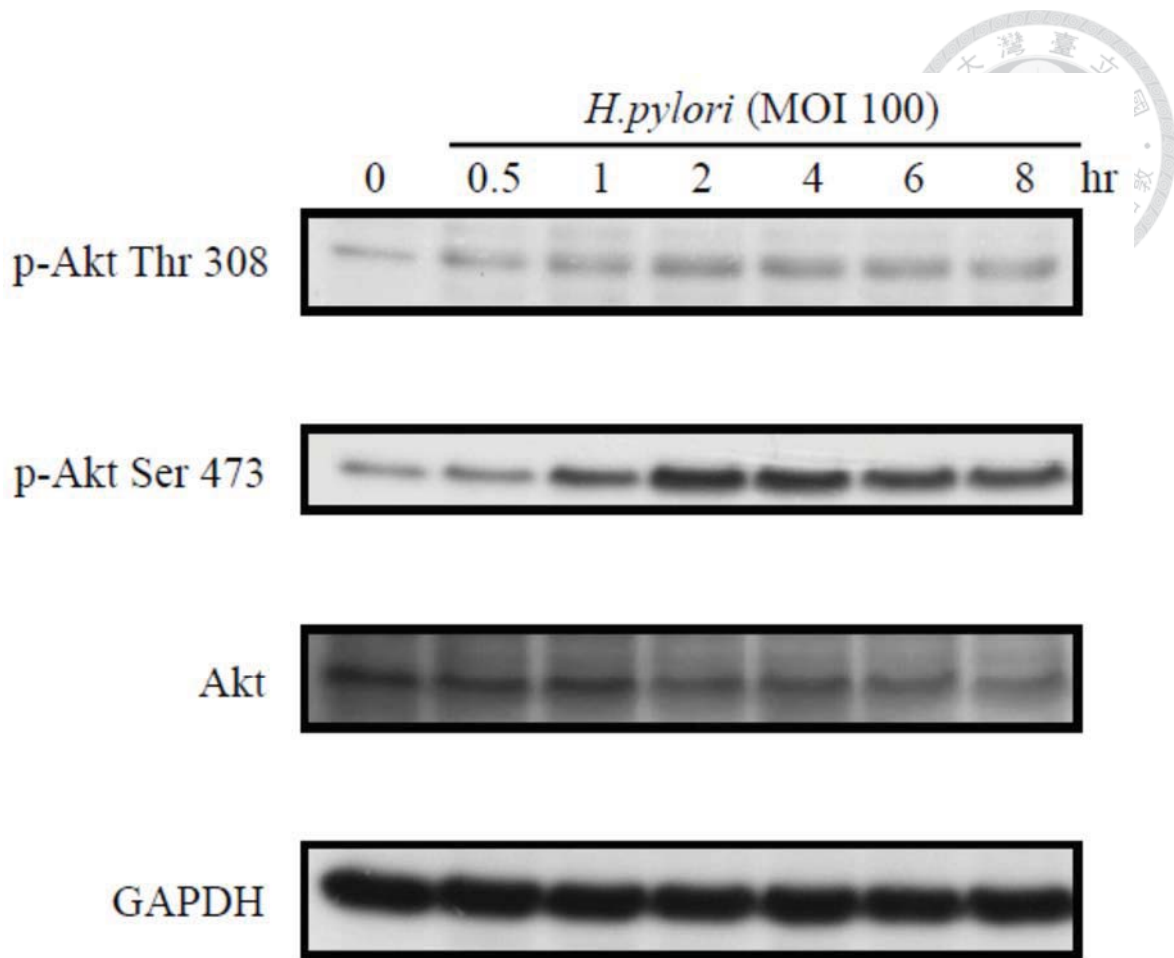
**F.**

<b>Other</b>	
YBX1	BCL10
CTNNB1	



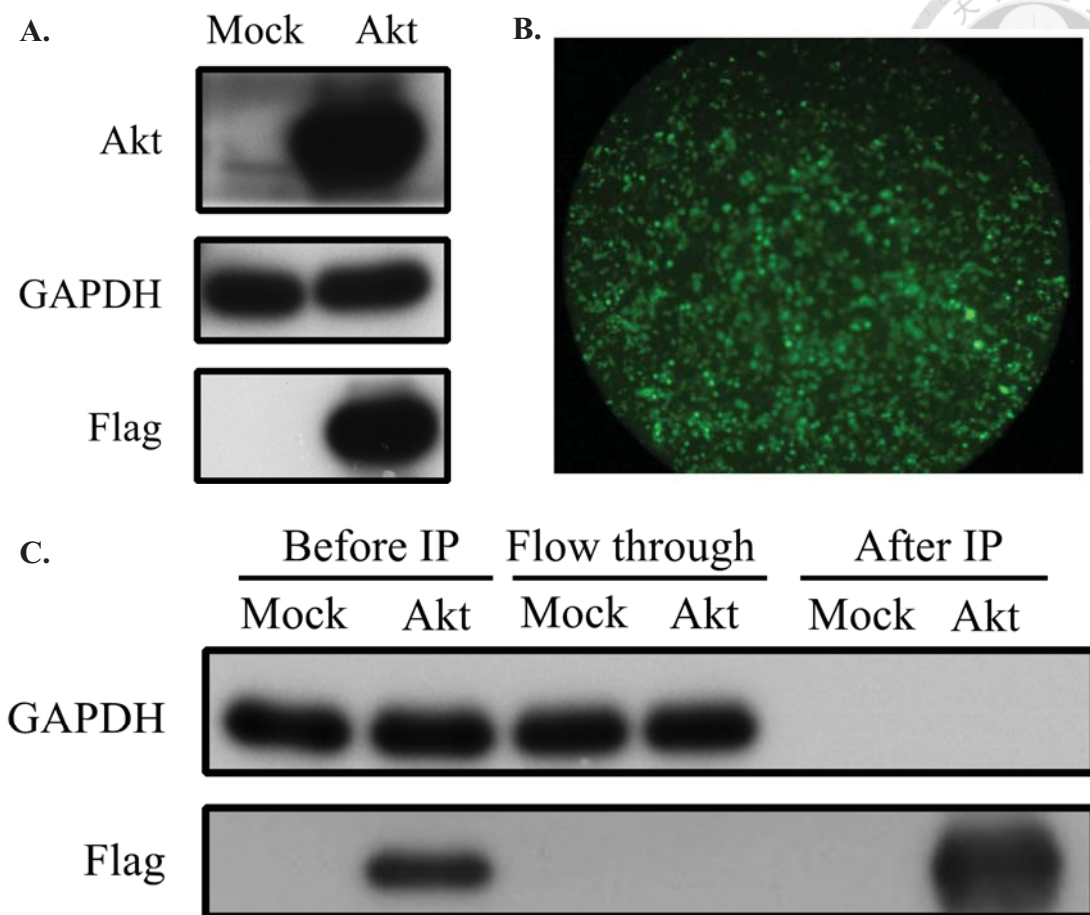
**Figure 1. Infection of AGS cells with *H.pylori* resulted in the typical hummingbird phenotype.**

AGS cells were infected with an MOI of 100 *H.pylori* and imaged within 24h. The morphology of cells become elongated and scattered. (40×magnification)



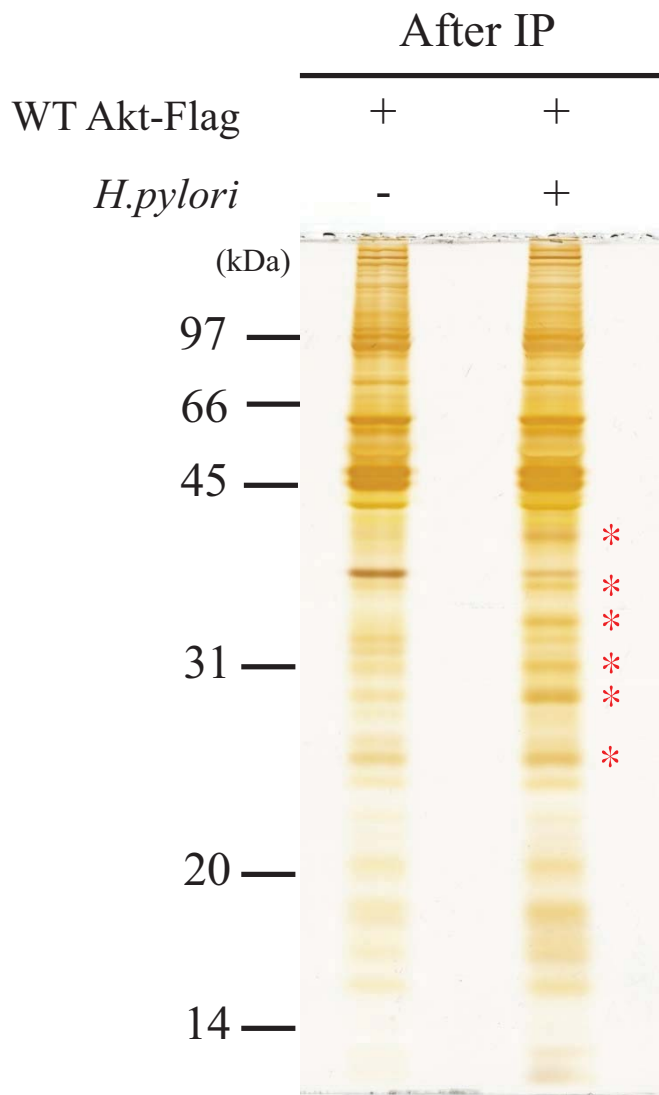
**Figure 2. *H. pylori* induced Akt phosphorylation in AGS cells in a time-dependent manner.**

Cell lysates from *H. pylori*-infected cells for 0-8h at an MOI of 100 were separated by 10 % SDS-PAGE and transferred onto PVDF membranes. Phosphorylated Thr 308 of Akt, phosphorylated Ser 473 of Akt, Akt, and GAPDH were detected by specific antibodies.



**Figure 3. Efficiency of 3×Flag-Akt transfection and pCMV-3×Flag-Akt immunoprecipitation.**

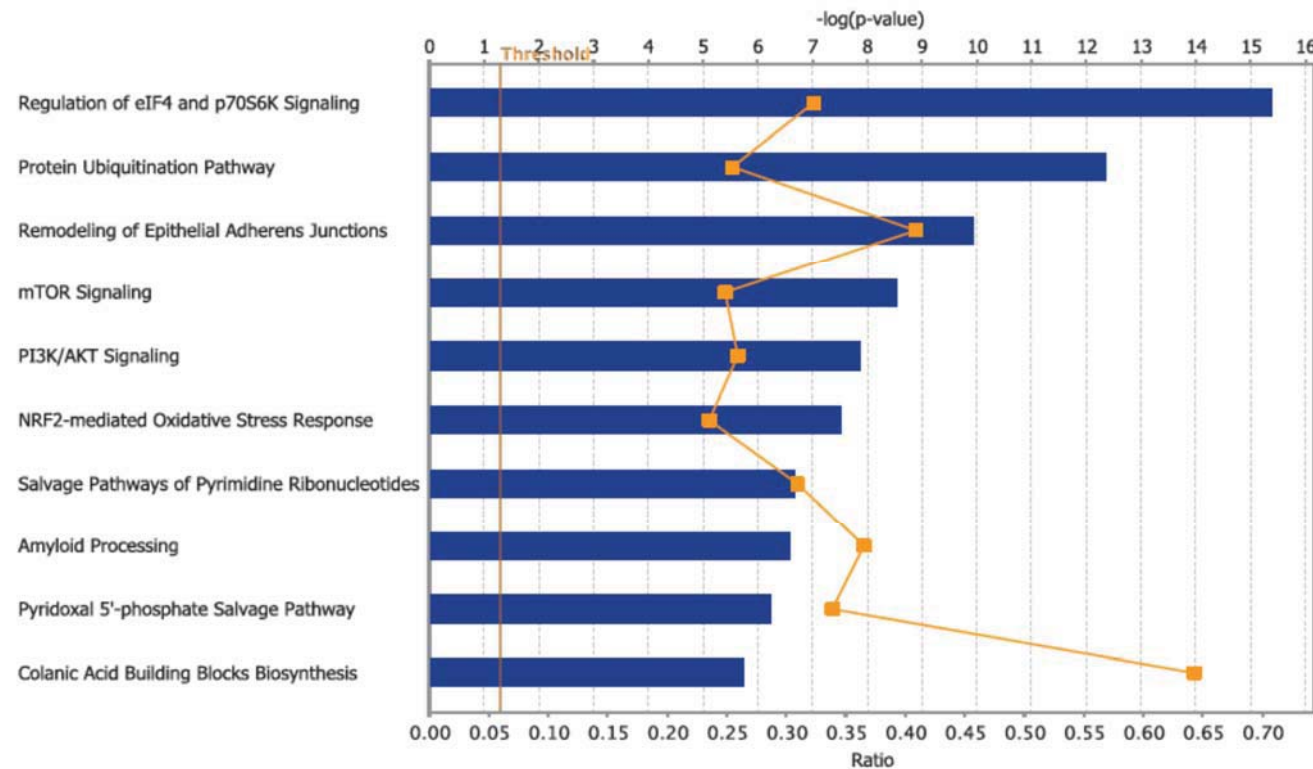
(A) AGS cells were transfected with pCMV-3×Flag or pCMV-3×Flag-Akt, and cell lysates were separated by 10 % SDS-PAGE and transferred onto PVDF membranes. Akt, GAPDH, and Flag were detected by specific antibodies. (B) AGS cells were transfected with pEGFP-N1 and imaged by fluorescence microscopy. (40×magnification) (C) AGS cells were transfected with pCMV-3×Flag or pCMV-3×Flag-Akt, and the ANTI-FLAG<sup>®</sup> M2 affinity gel was used to immunoprecipitate 3×Flag or 3×Flag-Akt complex. Cell lysates were separated by 10 % SDS-PAGE and transferred onto PVDF membranes. GAPDH and Flag were detected by specific antibodies. Mock, indicates the pCMV-3×Flag-transfected cells. Akt, indicates the pCMV-3×Flag-Akt-transfected cells.



**Figure 4. Comparing the differences of Akt co-IP complex between AGS cells and AGS cells infected with *H.pylori*.**

AGS cells were transfected with pCMV-3×Flag-Akt and infected with *H.pylori* or mock control. The ANTI-FLAG<sup>®</sup> M2 affinity gel was used to immunoprecipitate 3×Flag-Akt complex. Cell lysates were separated by 12.5 % SDS-PAGE and stained with silver staining.

The red asterisk indicates the differential protein expressions between these two samples.

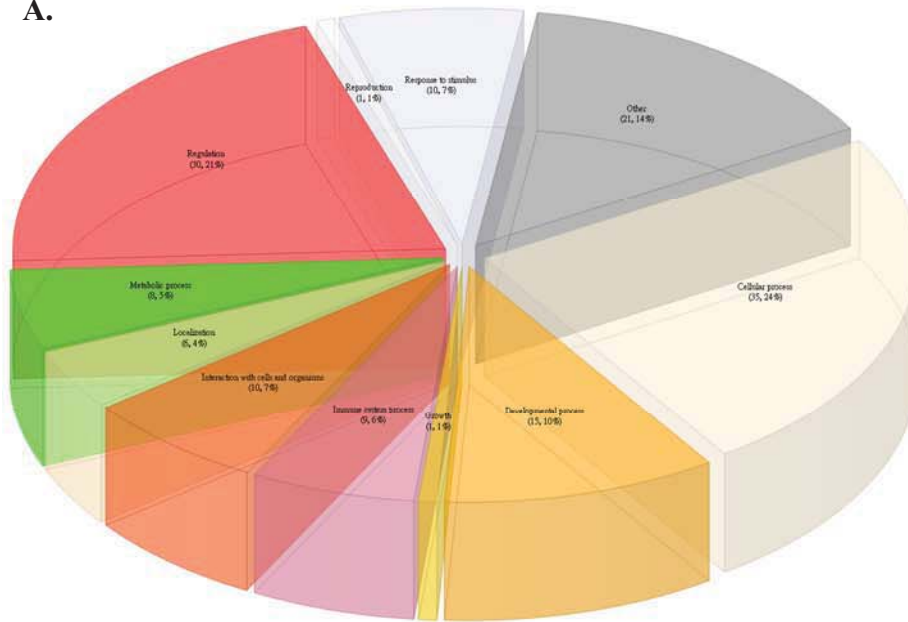


**Figure 5. Ingenuity Pathway Analysis (IPA) prediction and analysis of signal transduction for those proteins identified in Akt co-immunoprecipitate from *H.pylori*-infected AGS cells.**

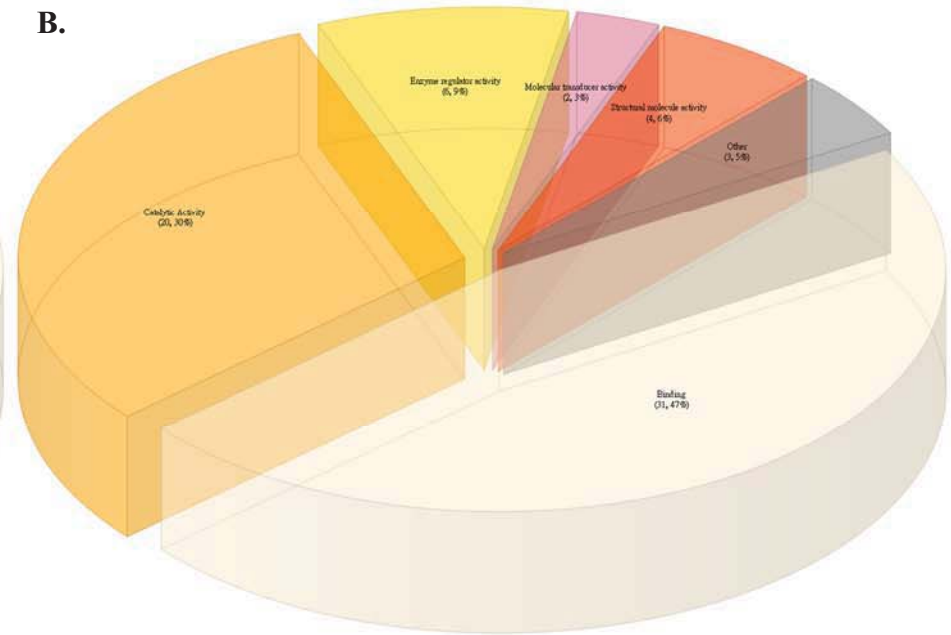
Ingenuity Pathway Analysis (IPA) was used to reveal canonical pathways significantly enriched among the proteins in Akt co-immunoprecipitate. The ratio for the number of proteins identified as belonging to a pathway divided by the total number of proteins in the pathway is plotted as an orange line, whereas the lengths of the blue bars are the significance scores for each pathway with the significance threshold marked by the vertical yellow line.



A.



B.

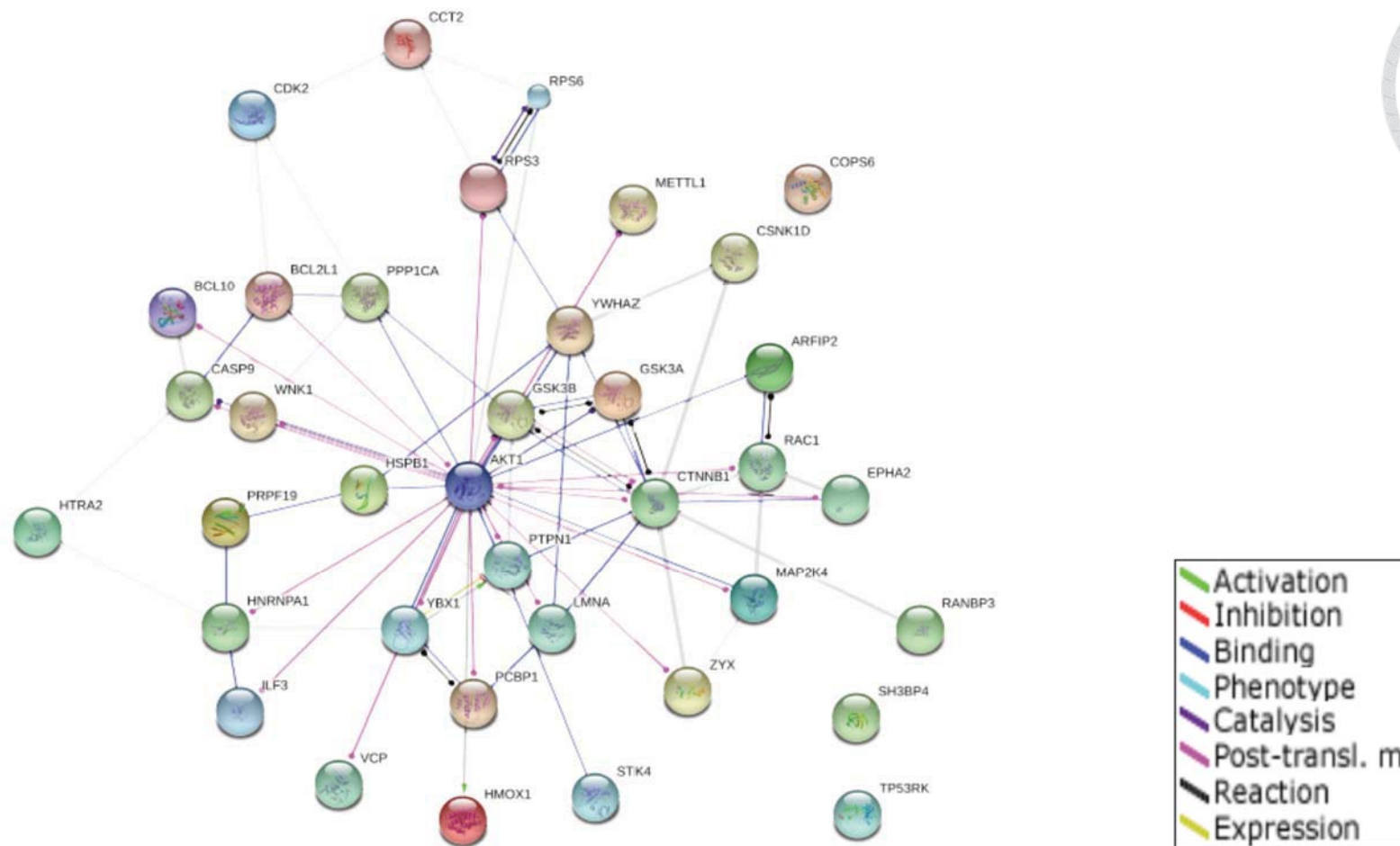


**Figure 6. Bioinformatic ontology of identified Akt substrates.**

(A) Pie chart represents numbers and percentages of identified Akt substrates according to their biological processes. List of proteins and biological processes were shown in Table 2.

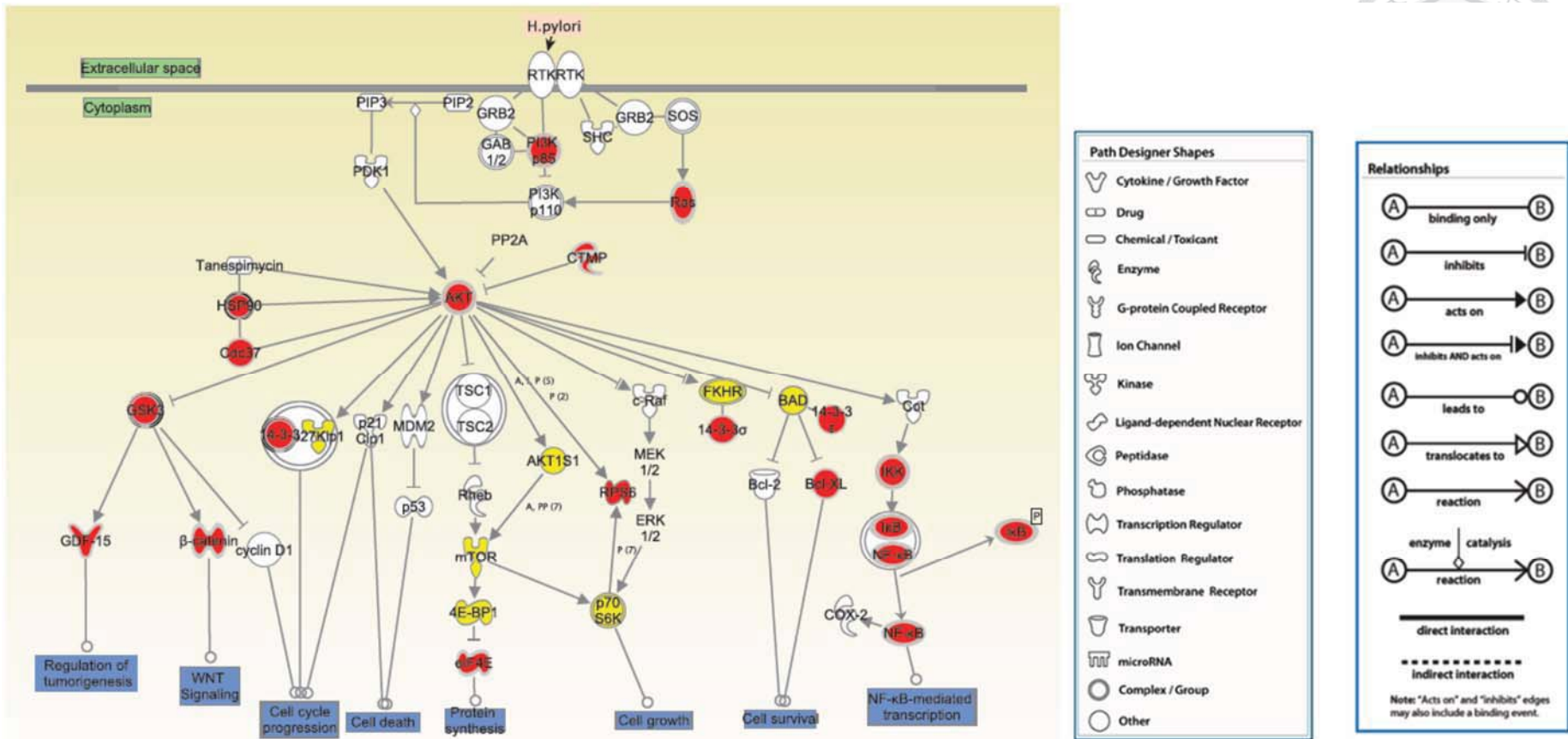
(B) Pie chart represents numbers and percentages of identified Akt substrates according to their molecular functions. List of proteins and molecular functions were shown in Table 3.

Categorizations were based on the information provided by the Software Tool for Researching Annotation of Proteins (STRAP).



**Figure 7. The association networks analysis of identified Akt substrates.**

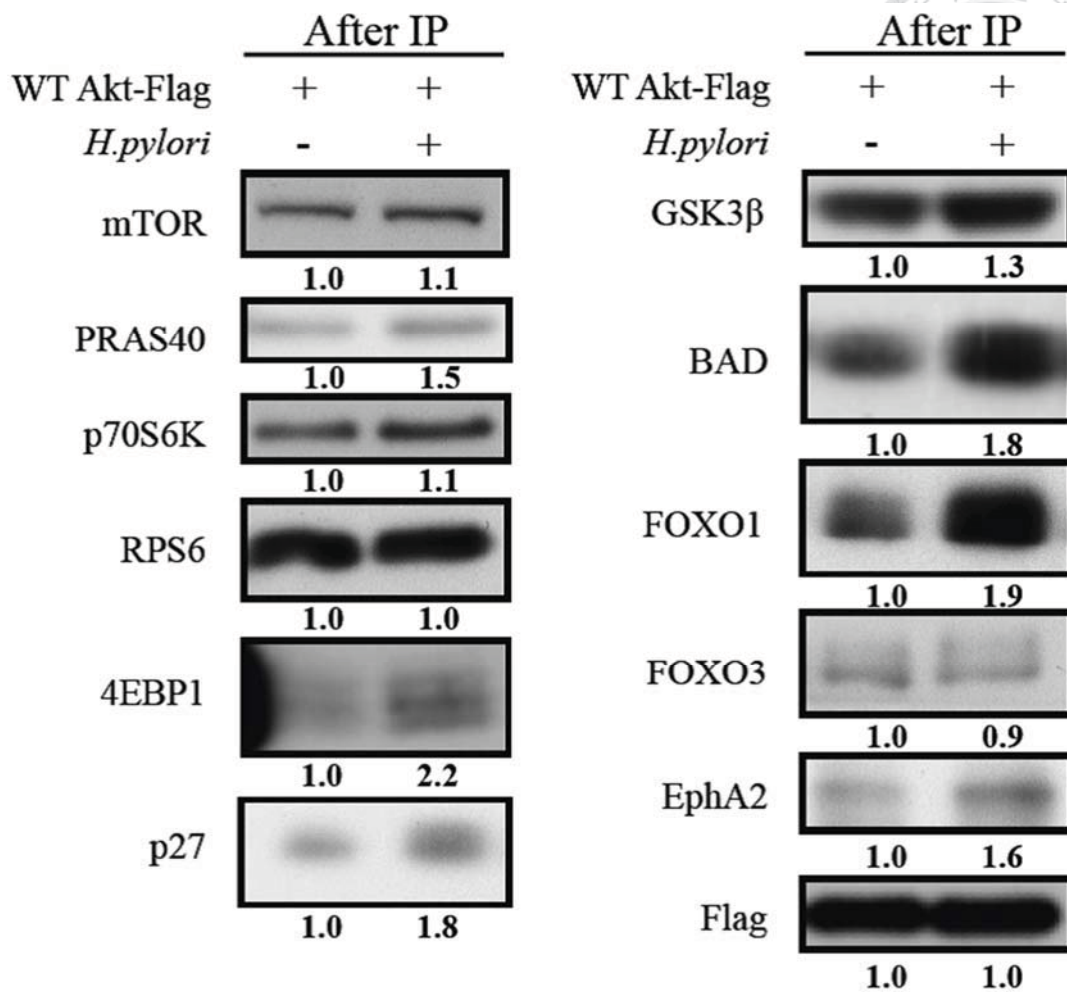
The network was generated by online software, STRING, using 37 Akt substrates in Akt co-immunoprecipitate from *H.pylori*-infected AGS cells identified by LC-MS/MS.



**Figure 8. Using Ingenuity Pathway Analysis (IPA) to generate PI3K/AKT signaling.**

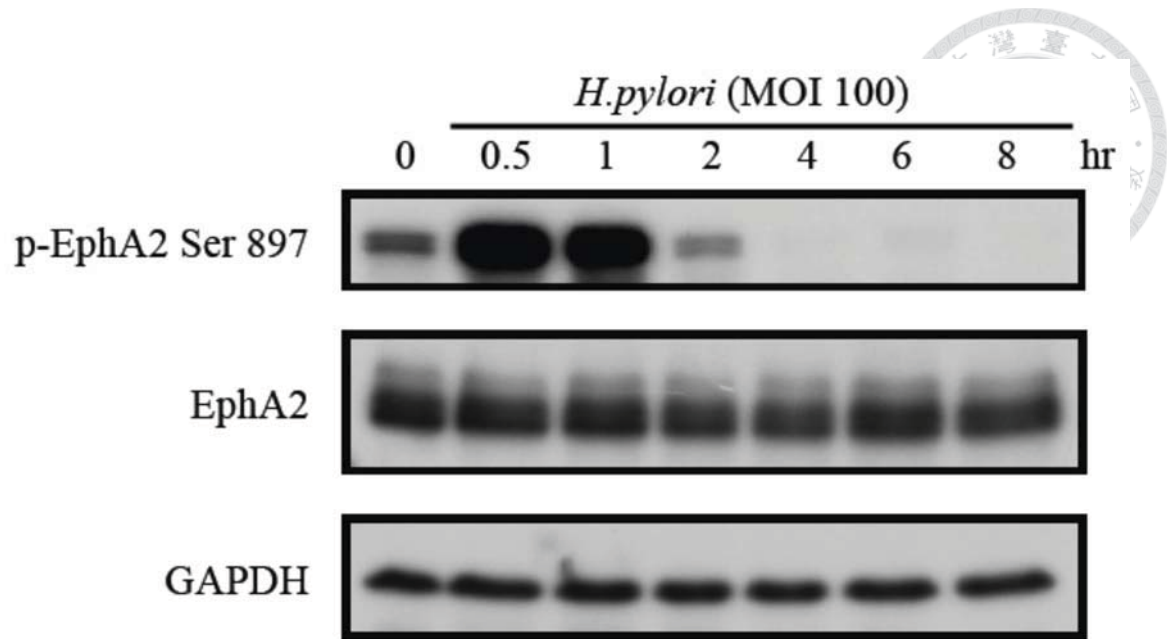
Proteins are represented as *nodes*; different *shapes* of nodes represent the functional class of proteins; *edges* define the relationships of nodes.

*Red nodes* indicate potential Akt interacting proteins identified by LC-MS/MS; *Yellow nodes* indicate possible Akt downstream proteins.

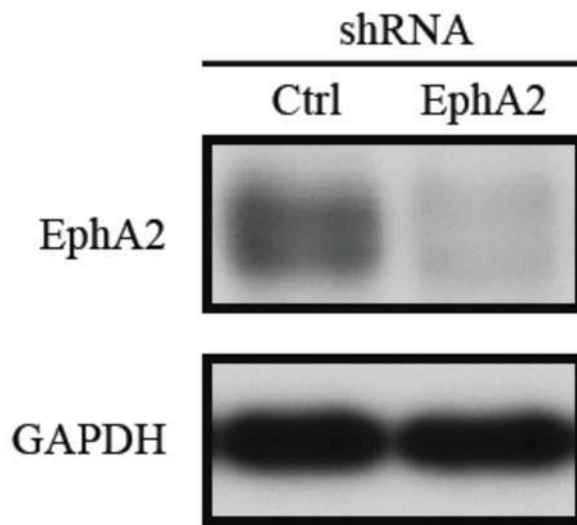


**Figure 9. Investigating the interaction between Akt and Akt associated proteins by co-immunoprecipitation.**

AGS cells were transfected with pCMV-3×Flag-Akt and infected with *H.pylori* or mock control. The ANTI-FLAG<sup>®</sup> M2 affinity gel was used to immunoprecipitate 3×Flag-Akt complex. Cell lysates were separated by 12.5 % SDS-PAGE and transferred onto PVDF membranes. mTOR, PRAS40, p70S6K, RPS6, 4EBP1, p27, GSK3β, BAD, FOXO1, FOXO3, EphA2, and Flag were detected by specific antibodies.

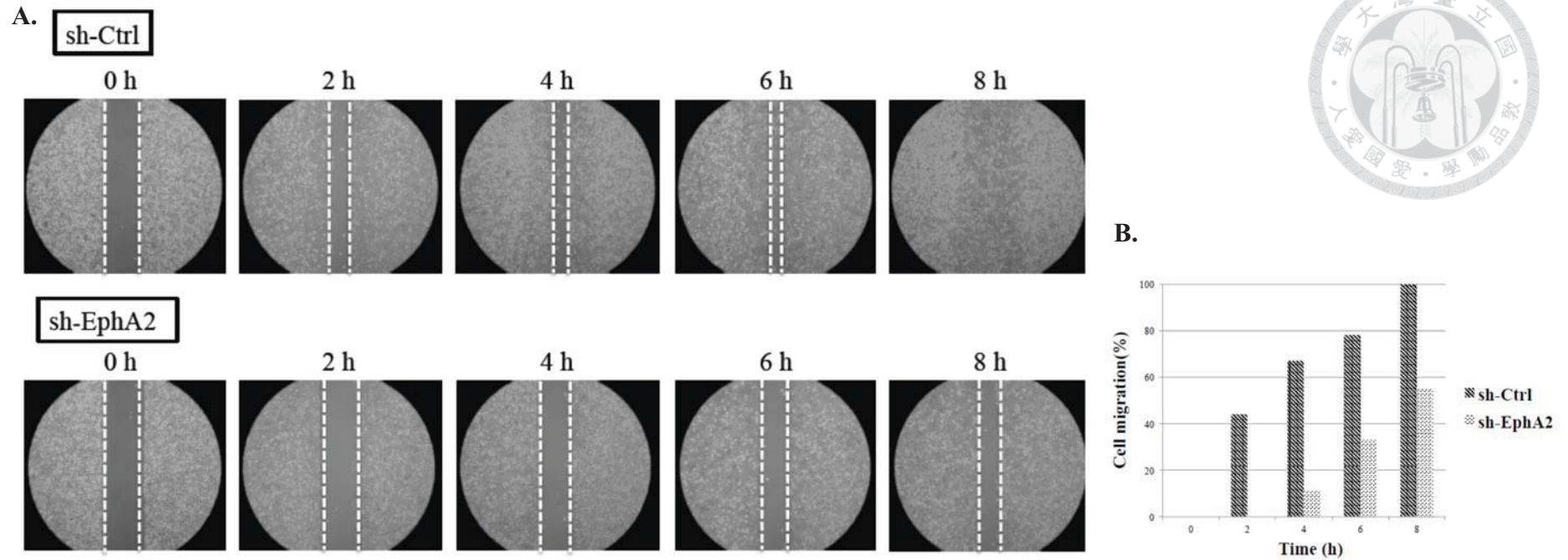


**Figure 10. Effects of *H. pylori* infection on phosphorylation of EphA2 in AGS cells.** Cell lysates from *H. pylori*-infected cells for 0-8h at an MOI of 100 were separated by 10 % SDS-PAGE and transferred onto PVDF membranes. Phosphorylated Ser 897 of EphA2, EphA2, and GAPDH were detected by specific antibodies.



**Figure 11. EphA2 knockdown in AGS cells.**

Cell lysates from AGS cells with EphA2 knockdown or control knockdown were separated by 10 % SDS-PAGE and transferred onto PVDF membranes. EphA2 and GAPDH were detected by specific antibodies.



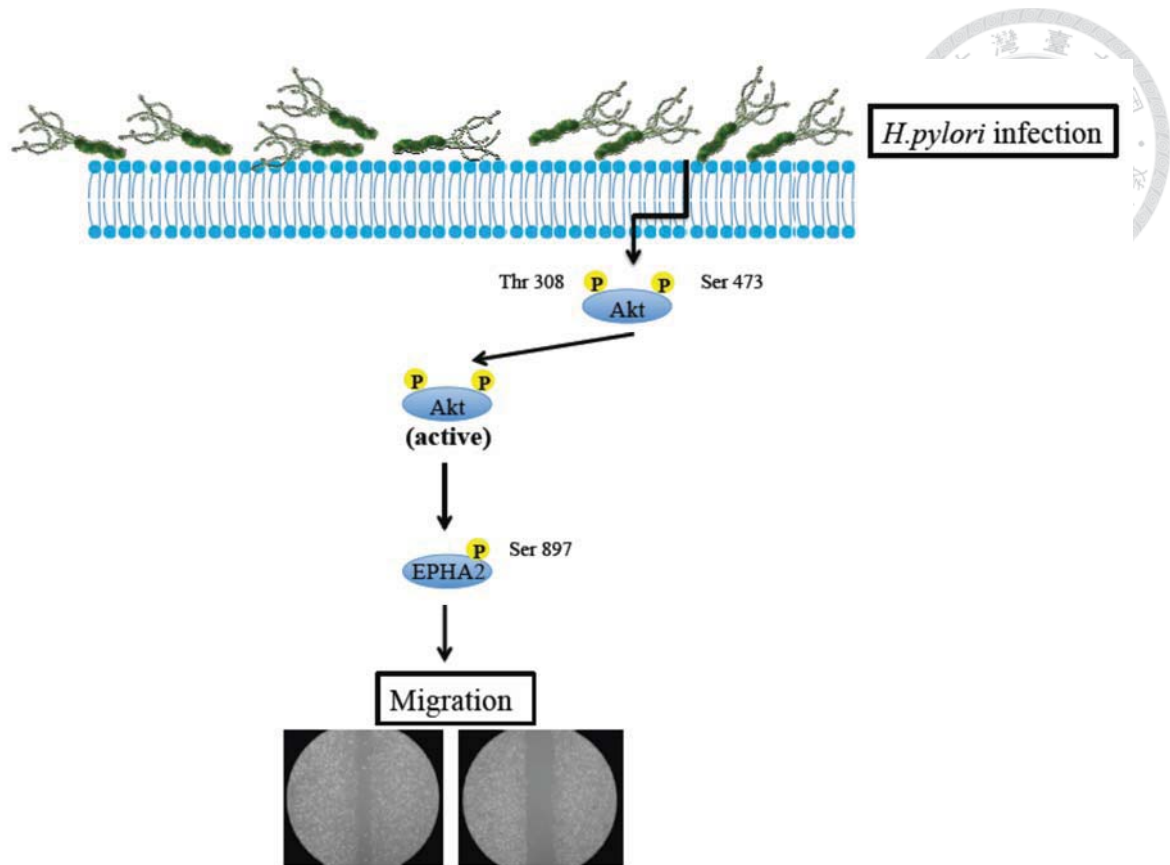
**Figure 12. Effect of EphA2 knockdown on cell migration in vitro by wound healing assay.**

(A) AGS cells were seeded in 6-well plate. After the cells were attached, the insert was removed. Pictures were taken after 0, 2, 4, 6, and 8h.

sh-Ctrl, indicates AGS cells transfected with pLKO.1-puro. sh-EphA2, indicates AGS cells transfected with pLKO.1-shRNA-EphA2.

(100×magnification)

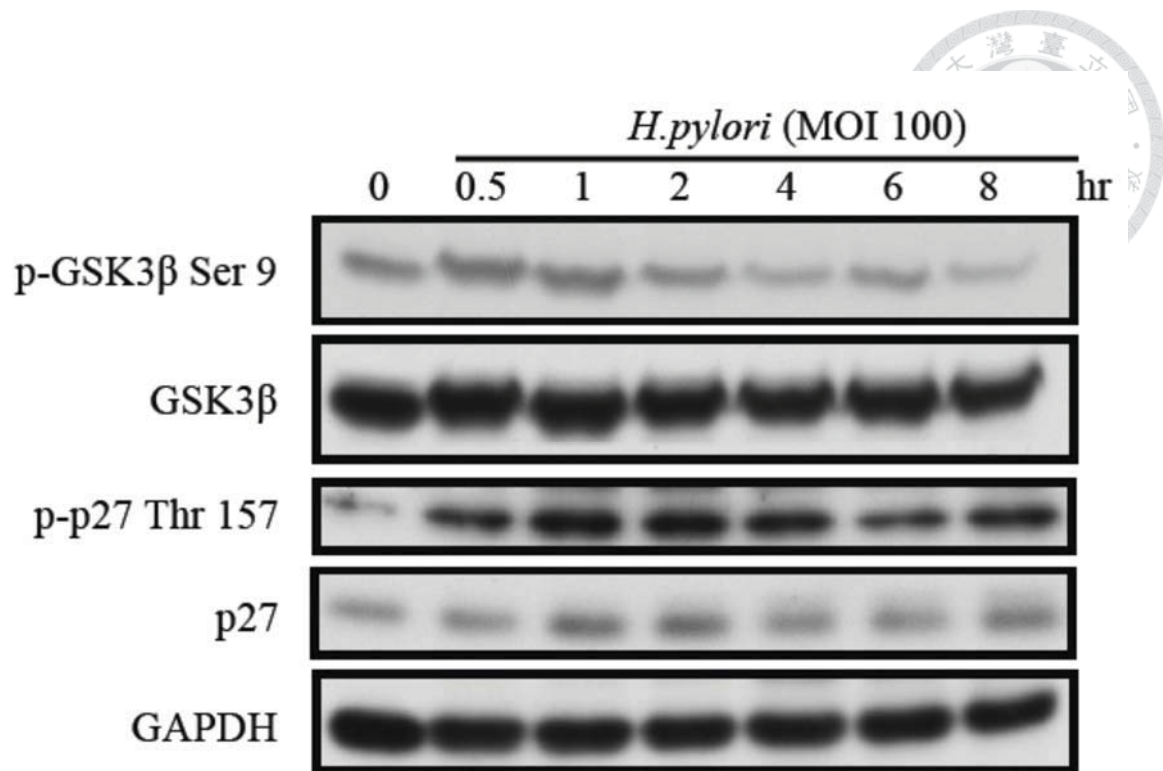
(B) Graphical presentation of the percentage of the wound healing assay.



**Figure 13. The summary and conclusion of this study.**

We identified a Akt substrate, EphA2 involved in *H. pylori* infection.





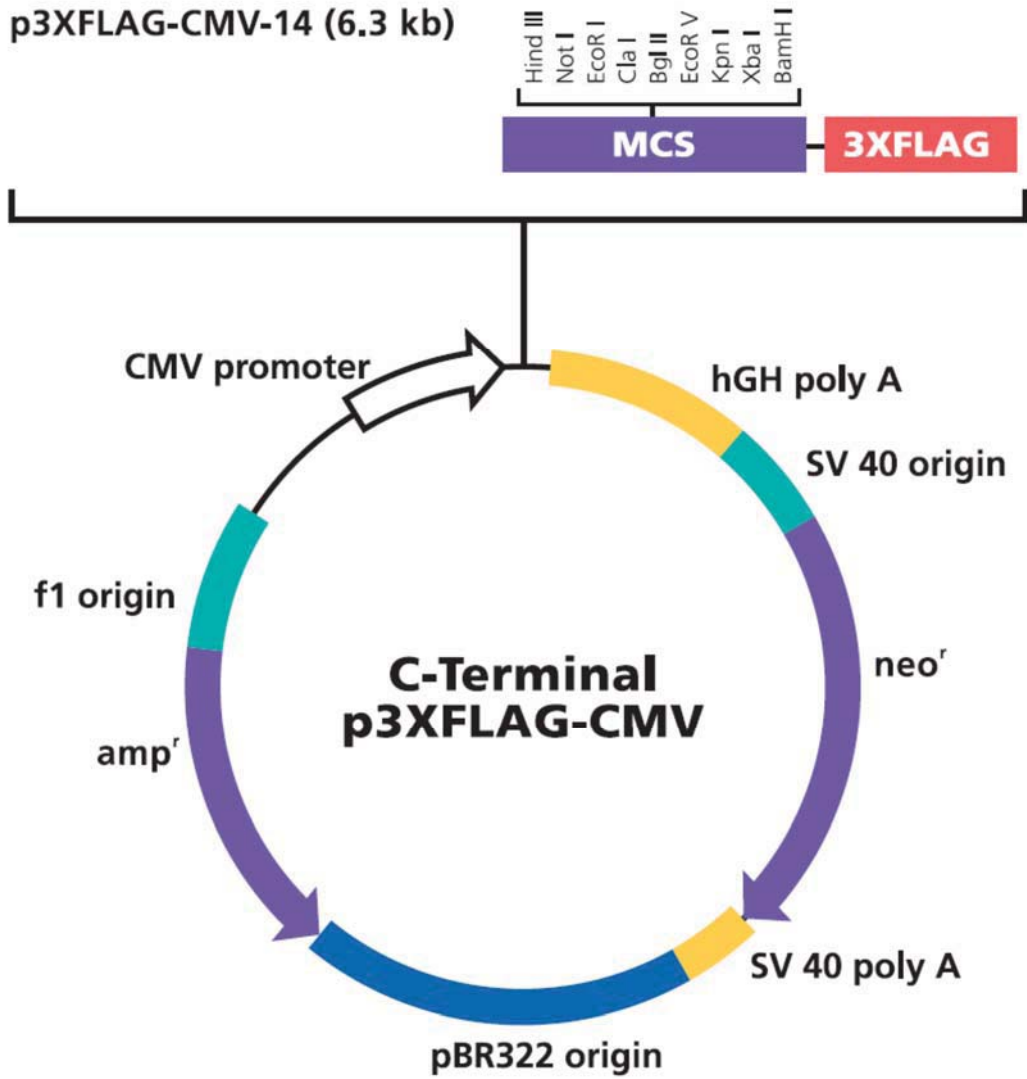
**Supplementary Figure 1. Effects of *H.pylori* infection on phosphorylation of GSK3β and p27 in AGS cells.**

Cell lysates from *H.pylori*-infected cells for 0-8h at an MOI of 100 were separated by 10 % SDS-PAGE and transferred onto PVDF membranes. Phosphorylated Ser 9 of GSK3β, GSK3β, phosphorylated Thr 157 of p27, p27, and GAPDH were detected by specific antibodies.

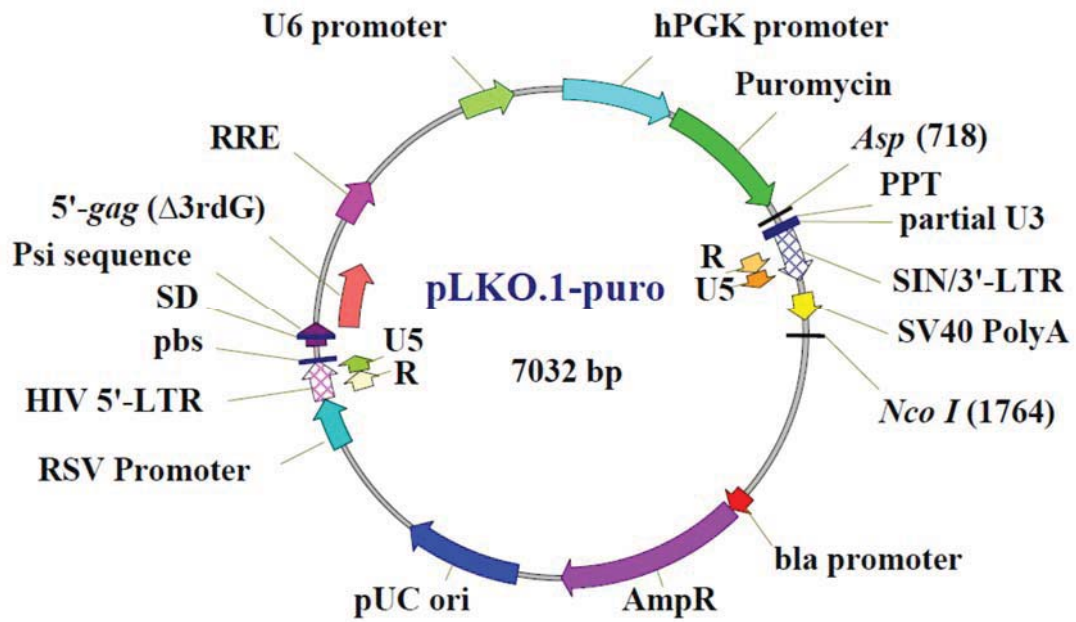


## 附錄

Appendix 1. Map of p3×FLAG-CMV-14 (6300bp)



Appendix 2. Map of pLKO.1-puro (7032 bp)



### Appendix 3. List of pLKO.1-shRNA clone



Clone ID	Target sequence	Target region
TRCN0000006403	CGGACAGACATATAGGATATT	3'-UTR

3'-UTR: Three prime untranslated region