

國立臺灣大學醫學院免疫學研究所

碩士論文

Graduate Institute of Immunology

College of Medicine

National Taiwan University

Master Thesis

研究誘發 TRAIL 媒介的胃上皮細胞凋亡之胃幽門螺

旋桿菌因子

Study of *Helicobacter pylori* factors in

*H. pylori*-induced sensitivity to TRAIL-mediated

apoptosis in human gastric epithelial cells

研究生:唐承希

Graduated student: Chen-Hsi Tang

指導教授: 許秉寧 博士

Adviser: Ping-Ning Hsu, M.D./Ph.D.

中華民國 一百零三年 七月

July, 2014



## 致謝



碩士班生涯轉眼就過了，這段期間對於免疫學又更進一步地了解。由於研究所與大學實驗室學習的內容重疊較少，剛進實驗室的時候經歷一段時間才漸漸熟悉實驗技巧及研究題目，一路上要感謝許多人的幫助，讓我在這二年間成長不少。首先最感謝我的指導老師許秉寧教授，這段時間老師適時督促實驗上的進度，並提供研究的方向，讓我瞭解該如何設計實驗方式來解答未知的問題，並耐心指導口頭報告的呈現方式，使大家更能瞭解我的研究內容並提供寶貴的意見。此外，老師也培養我們對於做研究該有的嚴謹態度，並且在這段期間提供我們充足的資源進行實驗，這段期間的進步，都要非常感謝老師。另外也要感謝我的口試委員謝世良老師、徐立中老師和朱清良老師，在前幾次的 committee 老師們都提供了非常寶貴的意見，讓研究方向更清楚。

感謝林威成學長，在百忙中回到免疫所指導我新的實驗；感謝曾鴻泰學長提供實驗方式的建議；感謝秀蓉學姊在簡報製作方式的教學及建議；感謝莉苓學姊及穎超學長，雖然只短短相處了一個多月，但是這段時間學姊教了我許多實用的實驗方法，學長也警惕我學習的態度；感謝 Chris 經常熱心地為我們做小筆記，並且處理實驗室大大小小事務，辛苦了；感謝琮皓學長，尤其是在對環境和實驗都不太熟悉的碩一，學長在實驗或生活上都提供許多關照；感謝陳品軒和林琬瑜學妹，在壓力特別大的碩二陪我聊天紓解壓力；感謝我的同班同學們，感謝你們的關心，並且當我遇到各種實驗上的問題都能協助我。

最後要感謝我的家人，一路上支持我的選擇，讓我無虞的規畫自己的目標，感謝身邊所有關心我的人，讓我能順利完成碩士學位。

## 摘要



胃幽門螺旋桿菌(*Helicobacter pylori*, HP)為常見的人類病原菌，目前已知感染全球約 50%的人口，並增加感染者罹患十二指腸潰瘍、胃潰瘍、胃癌及黏膜相關淋巴瘤的機率。研究指出，胃幽門螺旋桿菌感染引起的胃部細胞凋亡是引起胃潰瘍的主因之一。在我們的研究顯示，從 HP 病患之胃部組織分離出的 T 淋巴球，其細胞表面表現 TRAIL 蛋白質，TRAIL 為能夠引起細胞凋亡的蛋白質之一。我們進一步發現，胃幽門螺旋桿菌調節 TRAIL 引起的人類胃上皮細胞凋亡訊息，HP 引發 TRAIL 的敏感性主要是依靠負調控 short form of FLICE-inhibitory protein (FLIPs)而增強 TRAIL 死亡誘導訊息複合物 (Death-Inducing Signaling Complex, DISC)的形成，並導致 caspase-8 及其下游路徑的活化而引起細胞凋亡。

在此論文中，我們進一步研究影響宿主細胞凋亡訊息的 HP 因子，我們使用 CAG pathogenic island(CAG PAI)基因剔除的菌株來篩選關鍵的因子，結果顯示 HP 依靠第四型分泌系統而引起細胞凋亡訊息。我們發現造成第四型分泌系統缺陷的基因突變菌株無法引起細胞對於 TRAIL 的敏感性。此外，這些突變菌株失去負調控細胞內 FLIPs 表現的能力，因此在 TRAIL 刺激時無法引起人類胃上皮細胞中 caspase-8 活化。相對地，CagA 缺陷不影響 HP 負調控 FLIPs 及引起細胞對 TRAIL 的感受性。這些結果顯示 HP 的第四型分泌系統在此現象中的重要性，並且非由 CagA 所引起。

此外，在宿主細胞方面，我們也探討可能受到 HP 干擾並影響 FLIPs 表現的訊息路徑。我們的結果顯示 HP 抑制 Akt (protein kinase B)活化，並且 Akt 的活性與 FLIPs 表現具有相關性。若抑制 Akt 的活性或增加 Akt 的表現，能使 FLIPs 表現量相對地減少及增加。因此我們進一步在胃上皮細胞中過度表現 Akt，研究 HP 是否透過干擾 Akt 訊息途徑而影響細胞對 TRAIL 感受性。

結果發現細胞表現過量 Akt 時，能減緩 HP 引起的細胞凋亡程度，因此這些結果顯示 HP 可透過干擾 Akt 訊息途徑而改變人類胃上皮細胞 FLIPs 表現，因此提升細胞對 TRAIL 感受性並造成細胞凋亡。此研究幫助我們了解 HP 引起細胞凋亡的機制，並提供關鍵的因子作為治療 HP 相關疾病的依據。



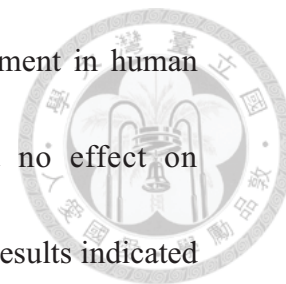
## Abstract



*Helicobacter pylori* (HP), a common human pathogen which infects about 50% of the world's population, is associated with duodenal ulcer, peptic ulcer diseases, gastric cancer and Mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma (MALToma). Gastric cells apoptosis induced by HP were reported to be involved in the pathogenesis of peptic ulcer. Our previous studies have demonstrated that T lymphocytes from gastric tissue of HP patients expressed TRAIL, which could induce apoptosis. Furthermore, HP regulates TRAIL apoptosis signaling in human gastric epithelial cells by down-regulation of cellular short form of FLICE-inhibitory protein (FLIPs), which leads to enhanced assembly of the TRAIL death-inducing signaling complex (DISC) and caspase-8 activation and eventually apoptosis.

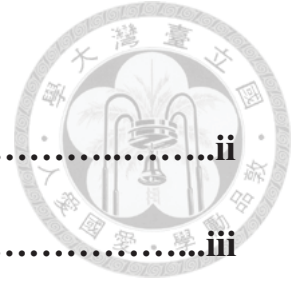
In this thesis, we further study the HP factors which regulated the apoptosis signaling in host cells, HP mutants with gene deficiency in the cytotoxin-associated gene pathogenicity island (CagPAI) were screened to identify the key factors in inducing apoptosis. Our data revealed that the induction of apoptosis signaling is dependent on the type IV secretory system of HP. We found that mutant strains with deficient type IV secretion system lost the ability to induce TRAIL sensitivity. Furthermore, these mutant strains were unable to

down-regulate FLIPs and caspase-8 activation upon TRAIL treatment in human gastric epithelial cells. In contrast, CagA mutation showed no effect on HP-induced FLIPs down-regulation and TRAIL sensitivity. These results indicated that type IV secretion system of HP, but not CagA, is critical.



In addition, in host cells aspect, we also explore the signaling pathway that HP may disturb to down-regulate FLIPs expression. Our results indicated that HP suppressed Akt (protein kinase B) activation, and there is a correlation between Akt activity and FLIPs expression in human gastric epithelial cell line. FLIPs expression was down- or up-regulated respectively by inhibiting Akt activity or over-expressing Akt. We further investigate whether HP disturbed Akt signaling pathway to induce TRAIL sensitivity by using Akt-overexpressing gastric epithelial cells. Over-expression of Akt mitigated HP-induced apoptosis, so these results indicated that HP modulated FLIPs expression to enhance TRAIL-mediated apoptosis partially by disturbing Akt signaling pathway. This study helps us to understand the mechanisms in inducing apoptosis by HP, and thereby to identify key factors which may help to design treatment of HP-associated diseases.

## 目錄



|  |     |
|--|-----|
| 致謝.....  | ii  |
| 摘要.....  | iii |
| Abstract.....  | v   |
| 研究背景.....  | 1   |
| 1. 胃幽門螺旋桿菌簡介.....  | 1   |
| 2. CagPAI 與第四型分泌系統.....  | 1   |
| 3. 胃幽門螺旋桿菌感染引起細胞凋亡.....  | 2   |
| 4. TRAIL 與細胞凋亡.....  | 3   |
| 5. 胃幽門螺旋桿菌促進 TRAIL 死亡誘導訊息複合物(DISC)之形成而引起<br>細胞凋亡.....                                | 4   |
| 6. Akt 調控 FLIP 並影響細胞凋亡啟動.....  | 4   |
| 研究動機與目的.....   | 6   |
| 實驗材料與方法.....   | 7   |
| 1. 實驗材料.....   | 7   |
| 2. 實驗方法.....   | 13  |
| 實驗結果.....  | 16  |
| 1. 胃幽門螺旋桿菌能增進胃上皮細胞對於 TRAIL 之感受性，然而當胃幽門<br>螺旋桿菌致病因子 CagPAI 及 CagE 基因有缺陷時，即失去此特性.....  | 16  |
| 2. 胃幽門螺旋桿菌致病因子 CagPAI 及 CagE 在負調控胃上皮細胞 FLIPs 表<br>現量並造成 Caspase-8 活化的現象中扮演重要的角色..... | 16  |
| 3. 胃幽門螺旋桿菌與空腸曲桿菌皆具有第四型分泌系統，然而空腸曲桿菌並<br>無法有效增加胃上皮細胞對於 TRAIL 之感受.....                  | 17  |

|  |    |
|--|----|
| 4. 在胃上皮細胞株 AGS 中，Akt 的活性調控 FLIPs 的表現，並且胃幽門螺旋桿菌降低胃上皮細胞中 Akt 活性..... | 17 |
| 5. 在人類胃上皮細胞株 AGS 中，過度表現 Akt 可抑制胃幽門螺旋桿菌引起之 TRAIL 敏感性及伴隨的細胞凋亡現象..... | 18 |

## 結果討論

|  |    |
|--|----|
| 1. 胃幽門螺旋桿菌致病因子 CagPAI 及 CagE 能增進胃上皮細胞對於 TRAIL 之感受性而造成細胞凋亡..... | 19 |
| 2. 第四型分泌系統在胃幽門螺旋桿菌造成的 TRAIL 敏感性現象中可能扮演的角色.....                 | 20 |
| 3. 胃幽門螺旋桿菌抑制 Akt 活性而負調控 FLIPs 表現，並影響胃上皮細胞對 TRAIL 之感受性.....     | 21 |
| 4. Akt 及其它調控 FLIP 表現之細胞訊息途徑.....                               | 22 |
| 5. 結論.....   | 22 |
| 參考文獻.....  | 23 |
| 圖表說明.....  | 29 |



## 研究背景



### 1. 胃幽門螺旋桿菌(*Helicobacter pylori*)簡介

胃幽門螺旋桿菌發現於 1982 年，由 Robin Warren 和 Barry Marshall 在患有慢性胃炎及胃潰瘍的病人中所分離出，二人因證實其導致胃部疾病而獲得諾貝爾醫學獎。胃幽門螺旋桿菌呈桿狀或螺旋狀，為格蘭氏陰性細菌，適合生長在攝氏 37 度、微厭氧環境中(Marshall and Warren, 1984)。胃幽門螺旋桿菌的螺旋構造及鞭毛有助於細菌在胃部的移動，甚至穿過胃部黏液層而與胃上皮細胞接觸，並且菌體還能分解尿素以中和胃酸，製造有利生存的環境(Eaton et al., 1996; Mobley, 1996)。一旦黏膜組織發生受損時，胃幽門螺旋桿菌就有機會在胃部增值並附著到宿主細胞上，若免疫系統無法有效清除和防禦，可能造成胃潰瘍、胃炎或胃癌等疾病，研究也顯示以抗生素治療後能有效改善病情(Morris et al., 1991)。胃幽門螺旋桿菌感染全世界超過百分之五十的人口(Brown, 2000)，其致病性隨菌株而有差異，大多數感染者並不表現病徵。

### 2. CagPAI(cytotoxin-associated gene pathogenicity island)與第四型分泌系統 (Type IV secretion system)

胃幽門螺旋桿菌的致病性主要與染色體中稱為 cytotoxin-associated gene pathogenicity island(CagPAI)的一群基因有關，並且 CagPAI 對於胃幽門螺旋桿菌造成胃炎及胃潰瘍具有重要的相關性(Backert et al., 2004)。CagPAI 包含大約 30 個基因，隨菌株不同而有差異，其大部分蛋白質產物皆為潛在致病因子(Censini et al., 1996)。在 CagPAI 中包含一個大小約 120-145 kDa 的蛋白質 Cytotoxin-associated gene A (CagA)，目前認為 CagA 是胃幽門螺旋桿菌的主要致病蛋白質(Covacci et al., 1993)。

除了 CagA 以外，CagPAI 基因座中大部分的基因皆與第四型分泌系統 (type four secretion system)的組成有關。例如 CagL 與細胞膜上的組合蛋白質

(integrin  $\alpha 5\beta 1$ )作用，幫助胃幽門螺旋桿菌與宿主細胞連接(Kwok et al., 2007)；CagY、CagH 及 CagI 組成通道並輔助傳送 CagA(Pham et al., 2012; Shaffer et al., 2011)；而 CagE 除了是重要的結構成分，同時也是 ATPase，為物質的運輸提供能量(Censini et al., 1996)。

第四型分泌系統為數種分泌系統中的一種，在革蘭氏陰性及陽性的細菌中皆可發現，但在不同菌種中扮演的功能可能不同。第四型分泌系統的功能主要可分為三大類，第一類依賴細胞間的接觸，使 DNA 可以在細菌間傳遞(Abajy et al., 2007)；第二類使微生物從外在環境攝入 DNA，如胃幽門螺旋桿菌的 ComB 系統及空腸曲桿菌(*C. jejuni*)的 Cjp/VirB 系統(Bacon et al., 2000; Hofreuter et al., 2001; Karnholz et al., 2006)，或將 DNA 釋放到外在環境；第三類則用以傳輸蛋白質或其它毒素。利用第四型分泌系統與宿主細胞連接並形成通道，胃幽門螺旋桿菌將細胞中衍伸自肽聚糖(peptidoglycan)的游離 muropeptide 及 CagA 送入胃上皮細胞內，而是否仍有其它物質被送入目前尚無研究指出。Muropeptide 送入細胞後被 Nucleotide-binding oligomerization domain-containing protein 1 (NOD1)辨認而活化 NF- $\kappa$ B 反應(Viala et al., 2004)。CagA 蛋白質的羧基端有 EPIYA(Glu-Pro-Ile-Tyr-Ala)胺基酸序列，進入宿主細胞後被磷酸酶 Src family kinase(SFK)或 Abl kinase 磷酸化，形成 phospho-tyrosine-CagA(Asahi et al., 2000; Backert et al., 2001; Stein et al., 2002)，並且和 SHP-2 的 SH2 domain 結合而活化 SHP-2。另外 CagA-SHP-2 複合物也能活化 MAP kinase 的訊息傳導(Higashi et al., 2004; Higashi et al., 2002)。

### 3. 胃幽門螺旋桿菌感染引起細胞凋亡

目前認為胃幽門螺旋桿菌引起胃上皮細胞凋亡(apoptosis)是導致胃炎、胃潰瘍的主因，並可能與數種機制有關(Fan et al., 1998; Moss et al., 1996; Rudi et al., 1998)。研究指出在感染病患取出的胃部檢體中，可分離出膜上表現 tumor

necrosis factor (TNF)-related apoptosis inducing ligand(TRAIL)的 T 細胞(Wu et al., 2004)，TRAIL 為引起細胞凋亡的蛋白質之一。但各種細胞對於 TRAIL 的感受性可能不同。實驗室發表的研究也指出，胃幽門螺旋桿菌使 TRAIL 感受性低的胃上皮細胞對於 TRAIL 的敏感性增加，因此感染的細胞若受到 TRAIL 刺激便可能引發細胞凋亡(Wu et al., 2004)。

#### 4. TNF-related apoptosis inducing ligand(TRAIL)與細胞凋亡(Apoptosis)

TRAIL 於 1995 年被發現，序列與已知能引起細胞凋亡的 Fas ligand(FasL) 類似，二者皆屬於 TNF superfamily，T 細胞可利用 TRAIL 或 Fas ligand 引起細胞凋亡而毒殺細胞 (Wiley et al., 1995)。細胞凋亡一詞於 1972 年被提出，為程序性細胞死亡(programmed cell death)的方式之一(Kerr et al., 1972)，其特點是凋亡的細胞會形成凋亡小體(apoptotic body)、DNA 斷裂形成碎片(Liu et al., 1997)。

可誘發細胞凋亡的 TRAIL 受器包含 DR4(TRAIL-1)、DR5(TRAIL-2)(Pan et al., 1997; Schneider et al., 1997)，TRAIL 受器在細胞膜內以死亡區域(death domain)與接合蛋白質 Fas-Associated protein with Death Domain(FADD)連接 (Tibbetts et al., 2003)。當受到 TRAIL 刺激時，pro-Caspase-8 貼附到 FADD 上形成死亡誘導訊息複合物(Death-Inducing Signaling Complex, DISC)，並促使 pro-Caspase-8 被水解成活化態，並啟動第一型或第二型反應使細胞凋亡。第一型反應經由活化態 Caspase-8 水解 Caspase-3 而傳遞細胞凋亡訊息；第二型反應利用粒線體途徑(mitochondria pathway)活化 Caspase-9，最後再透過 Caspase-3 傳遞訊息(Rudner et al., 2005)。活化態的 Caspase-3 促使內切酶 caspase-activated deoxyribonuclease(CAD)進到細胞核中，造成 DNA 的降解 (Janicke et al., 1998; Sakahira et al., 1998)。

## 5. 胃幽門螺旋桿菌促進 TRAIL 死亡誘導訊息複合物(DISC)之形成而引起細胞凋亡

在 TRAIL 引起的細胞凋亡反應中，蛋白質 short isoform of FLICE-inhibitory protein (FLIPs)具有抑制凋亡訊息傳遞的功能。FLIPs 結構與 Caspase-8 類似，皆能以死亡效應器區域(death effector domain)結合到 FADD 上。然而，FLIPs 缺乏 Caspase-8 含有的酵素活性位，即使受到 TRAIL 刺激也無法導致下游 caspase 活化而引起凋亡反應(Krueger et al., 2001)。因此 FLIPs 可能抑制 DISC 的形成，而影響細胞對於 TRAIL 的感受性。實驗室最新的研究也指出，胃幽門螺旋桿菌引起胃上皮細胞凋亡，主要是藉由負調控細胞內 FLIPs 的表現，因此當感染的細胞受到 TRAIL 刺激時便容易形成死亡誘導訊息複合物(DISC)，促進 Caspase-8 以及下游訊息路徑的活化而引發細胞凋亡。(Lin et al., 2014)

## 6. Akt 調控 FLIP 並影響細胞凋亡啟動

Phosphoinositide 3-kinases(PI3Ks)-Akt(protein kinase B)訊息路徑調控著細胞存活、生長及增值等多種細胞生理反應(Brunet et al., 1999; Fruman et al., 1999; Kodaki et al., 1994)。第一型 PI3K 將細胞膜上的 phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate (PtdIns(4,5)P<sub>2</sub>)磷酸化成 phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate (PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub>)後，PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub> 能與 Akt 之 PH domain 結合，因此促使 Akt 接近細胞膜而被活化(Haslam et al., 1993; Hawkins et al., 1992; Mayer et al., 1993)。相反地，phosphatase and tensin homologue(PTEN)為 PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub> 之 3-phosphatase，因此 PTEN 負調控 Akt 的活化(Maehama and Dixon, 1998)。Akt 的活性主要由兩個磷酸化的胺基酸所決定，包含 Ser473 及 Thr308，其分別由 mammalian target of rapamycin complex 2(mTORC2)及 Phosphoinositide-dependent kinase-1(PDK1)所磷酸化(Sarbassov et al., 2005;


Stephens et al., 1998)。Ser473 及 Thr308 共同磷酸化可使 Akt 有最大活性(Alessi et al., 1996)。另外，去磷酸酶 PP2A phosphatase 可負調控 Akt 的 Ser473 及 Thr308 磷酸化程度而調控 Akt 活性(Liao and Hung, 2004)。

先前的研究指出在部分細胞株中，Akt 的活性控制著 FLIPs 的表現，是透過影響 Akt 的泛素化(ubiquitination)，或者是調控 Akt mRNA 的轉錄(Nam et al., 2003; Panner et al., 2010)。Akt 的活化能防止細胞受 TRAIL 刺激而引發細胞凋亡(Chen et al., 2001; Panka et al., 2001)，此外，研究也指出人類胃癌細胞可能藉由調控 Akt-FLIPs 訊息路徑使細胞免於 TRAIL 所誘發之細胞凋亡(Nam et al., 2003)。

實驗室發表的研究指出胃幽門螺旋桿菌能改變胃上皮細胞對於 TRAIL 的的感受性而引起細胞凋亡(Wu et al., 2004)，並且是透過負調控 FLIPs 而促進 DISC 的形成(Lin et al., 2014)。然而胃幽門螺旋桿菌如何影響細胞，其中參與的因子以及調控 FLIPs 的機制並不清楚。初步研究顯示胃幽門螺旋桿菌的重要致病因子 CagPAI 與負調控 FLIPs 及細胞凋亡相關，並且 Akt 可能影響胃上皮細胞 FLIPs 的表現。在此研究中，我們將進一步探討二者之間的相關性，幫助我們更瞭解胃幽門螺旋桿菌引起細胞凋亡的致病機制。



## 研究動機與目的



胃幽門螺旋桿菌能導致胃上皮細胞凋亡而引起胃炎、胃潰瘍。TRAIL 是引起細胞凋亡的蛋白質之一，先前實驗室發表的研究指出，胃幽門螺旋桿菌藉由負調控 FLIPs 並促進 DISC 的形成，而增加細胞對於 TRAIL 的感受性。因此當表現 TRAIL 的 T 細胞聚集到感染處時，便可能引起嚴重細胞凋亡而造成發炎、胃潰瘍等現象。然而胃幽門螺旋桿菌如何調控胃上皮細胞中的 FLIPs，其機制目前並不明瞭。實驗室初步結果顯示胃幽門螺旋桿菌的致病因子 CagPAI 在負調控 FLIPs 及引發細胞凋亡訊息的現象中扮演重要的角色。CagPAI 包含約三十個基因，因此我們將使用特定基因剔除的菌株或野生菌株與細胞感染後，進一步探討其中關鍵的因子為何。

另外，宿主細胞內 FLIPs 蛋白質表現是如何被負調節，也是我們的研究重點之一。根據初步的結果，胃上皮細胞株 AGS 中 FLIPs 的表現可能受 Akt 所調控，若是降低 Akt 的表現量可增加細胞對於 TRAIL 之敏感性。因此此研究將進一步探討胃幽門螺旋桿菌是否藉由影響 Akt 訊息路徑而影響 FLIPs 表現及細胞凋亡，我們將研究過度表現 Akt 是否能增加 AGS 細胞 FLIPs 的表現，以及過量的 Akt 是否能保護細胞不受細菌影響而造成 FLIPs 表現下降及細胞凋亡。這些結果將有助於更瞭解胃幽門螺旋桿菌造成細胞凋亡的致病機制。

## 實驗材料與方法

### 實驗材料



#### 細胞株

使用人類胃腺癌細胞株 AGS 及含有 10% fetal bovine serum 的 RPMI 1640 培養液，於含有 5% 二氧化碳、攝氏 37 度的培養箱中培養。

#### 菌株

胃幽門螺旋桿菌菌株 HM-9 培養於含綿羊血的 Difco Brain Heart Infusion agar，放置於含有 10% 二氧化碳、5% 氧氣、85% 氮氣、攝氏 37 度的厭氧箱中。在 agar 上經過二次 24 小時培養後，將細菌從血盤上刮下，轉移至含有 10% fetal bovine serum 的 Brucella broth 於厭氧箱中培養 16 小時，再取出與細胞共同培養。

空腸曲桿菌(C. jejuni, from Dr. Liaw SJ)培養於 BBL CAMPY CVA 培養盤中，放置於含有 10% 二氧化碳、5% 氧氣、85% 氮氣、攝氏 37 度的厭氧箱中。在 agar 上經過二次 24 小時培養後，將細菌從培養盤上刮下，轉移至含有 10% fetal bovine serum 的 Brucella broth 於厭氧箱中培養 16 小時，再取出與細胞共同培養。

#### 抗體

|                           |                |
|---------------------------|----------------|
| Anti-rabbit IgG-HRP       | Cell signaling |
| Anti-mouse IgG-HRP        | Cell signaling |
| Anti-Akt                  | Cell signaling |
| Anti-phospho-Akt (Ser473) | Cell signaling |

Anti-beta actin

Anti-Caspase 8

Anti-CagA

Anti-FLIP

Anti-mTOR

Anti-PTEN

Anti-phospho-PTEN

Anti-PP2A

Anti-Rictor

Anti-Src

Anti-phospho-Src(Y418)

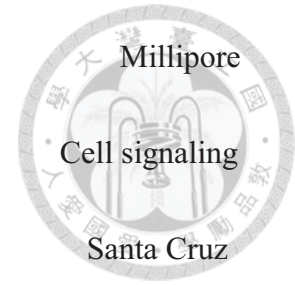
**重組蛋白質**

Recombinant TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL)

**載體**

EGFP-N2

EGFP-N2 with inserted human Akt cDNA



Enzo Life Sciences

GeneTex

Cell signaling

Cell signaling

Cell signaling

Cell signaling

Cell signaling

Cell signaling

PeproTech

By Shih-Chia Huang



## 轉染試劑

GenJet™ Plus DNA In Vitro Transfection Reagent

SignaGen Laboratories



## 培養液與試劑

### **RPMI1640 培養液**

RPMI1640 culture medium containing 10% fetal bovine serum

### **Difco Brain Heart Infusion-based blood agar plate**

5.2% Difco Brain Heart Infusion agar with 10% sheep blood, 6 µg/ml

Vancomycin, 2 µg/ml Amphotericin B, 2.5 U/ml polymyxin B and 10 µg/ml

nalidixic acid

### **BBL Brucella broth**

2.8 % Brucella broth with 10% fetal bovine serum, 6 µg/ml Vancomycin, 2 µg/ml

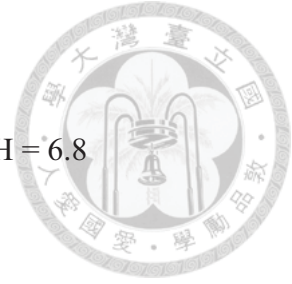
Amphotericin B, 2.5 U/ml polymyxin B and 10 µg/ml nalidixic acid

### **Triton X-100 lysis buffer**

1 % Triton-X, 50 mM Tris-HCl, 5 mM EDTA in ddH<sub>2</sub>O

### **DNA staining buffer**

0.3 % Triton-100, 3.4 mM sodium citrate, 100 µg/ml RNase, pH = 6.8



### **1X PBS**

100 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 18 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.8 % NaCl, 0.02 % KCl, pH = 7.4

### **5X SDS sample buffer (Western blotting)**

250 mM Tris-HCl (pH 6.8), 5% β-mercaptoethanol, 0.02 % Bromophenol blue,

30% Glycerol, 10% SDS

### **10X running buffer (Western blotting)**

192 mM Glycine, 25 mM Tris-HCl, 1 % SDS, pH=8.3

### **10X transfer buffer (Western blotting)**

195 mM Glycine, 240 mM Tris-HCl, 1.185 % SDS, pH = 8.4. Dilute to 1X

transfer buffer with 20 % Methanol before use

### **10X washing buffer (Western blotting)**

100 mM Tris-HCl (pH = 7.4), 9 % NaCl, 2 % Tween-20

化學藥品

|  |                       |
|--|-----------------------|
| Ammonium persulfate (APS)                  | Fluka Biochemica      |
| Amphotericin B                             | Sigma-Aldrich         |
| Acrylamide                                 | SERVA                 |
| $\beta$ -mercaptoethanol (2-ME)            | Sigma-Aldrich         |
| Bovine serum albumin (BSA)                 | BioShop               |
| Brain Heart Infusion agar (BHI agar)       | Becton Dickinson      |
| Brucella broth                             | Becton Dickinson      |
| Dimethyl sulfoxide                         | Sigma-Aldrich         |
| Dulbecco's phosphate-buffered saline (10X) | GIBCO                 |
| Fatal bovine serum (FBS)                   | Biological Industries |
| Glycerol                                   | Sigma-Aldrich         |
| Glycine                                    | USB                   |
| Magnesium chloride (MgCl <sub>2</sub> )    | BioShop               |
| Methanol                                   | Merck                 |
| Miller's LB broth                          | Becton Dickinson      |
| Nalidixic Acid                             | Sigma-Aldrich         |
| Poly-L-lysine                              | Sigma-Aldrich         |
| Phosphatase Inhibitor Cocktail 2           | Sigma-Aldrich         |



Phosphatase Inhibitor Cocktail 3

Protease Inhibitor Cocktail

Propidium iodide

Polymyxin B

Sheep Blood

Sodium bicarbonate (NaHCO<sub>3</sub>)

Sodium chloride (NaCl)

Sodium dodecyl sulfate (SDS)

Tris-base

Triton-X

Trypan blue

Tween-20

TEMED

Vancomycin

Wortmannin



生工有限公司

銳誠企業股份有限公司

USB

USB

SERVA

USB

USB

Sigma-Aldrich

USB

USB

Sigma-Aldrich

Cell signaling

## 實驗方法



### 1. 收集細胞萃取液(Isolation of cell extracts)

$1.5 \times 10^6$  個 AGS 細胞與胃幽門螺旋桿菌共同培養在含有 10% fetal bovine serum 的 RPMI 1640 培養液中。12 小時後，將原培養液吸除，再以 PBS 清洗一次並吸除乾淨。加入新的 PBS 並將細胞從培養皿上刮下，將含有細胞之 PBS 溶液轉移至 eppendorf，以 5000 rpm、5 分鐘收集細胞。離心後去除 PBS，加入適量的 lysis buffer 打破細胞。打破細胞後，於  $4^{\circ}\text{C}$ 、13000 rpm 離心 10 分鐘，取上清液保存在  $-80^{\circ}\text{C}$  冰箱。

### 2. 西方墨點法(Western blotting)

將 SDS-PAGE sample buffer 加入至細胞萃取液中，並加熱至攝氏 100 度 5 分鐘使蛋白質完全變性。以 SDS-PAGE 分離細胞萃取液中蛋白質後，將其轉印至 PVDF 膜。轉印後的 PVDF 膜再泡入含有 5% 脫脂牛奶的 TBST 緩衝液中進行 blocking 一小時。根據要觀察的蛋白質，將 PVDF 膜於含有不同一級抗體的 TBST 緩衝液(含 5 % 脫脂牛奶)中反應一小時或  $4^{\circ}\text{C}$  至隔天。用 TBST 緩衝液清洗十分鐘共三次後，於含二級抗體的 TBST 緩衝液(含 5 % 脫脂牛奶)中室溫反應 1 小時。以 TBST 緩衝液清洗十分鐘共三次，加入 ECL 試劑至 PVDF 膜，以 X 光片偵測。

### 3. 細胞凋亡檢測(Propidium Iodide staining)

$1.5 \times 10^6$  個 AGS 細胞分別與胃幽門螺旋桿菌、TRAIL 或二者培養後，將原培養液吸除，再以 PBS 清洗一次並吸除乾淨。加入 Trypsin 反應十分鐘，使細胞從培養皿底部分離。加入 RPMI 1640 培養液至培養皿中將細胞沖下，收集至離心管離心 5000 rpm，五分後後去除培養液。以 1 ml 預冷在攝氏-20 度的 70 % methanol 打散離心後的細胞，反應至少 30 分鐘以上進行固定。取

出  $10^5$ ~ $10^6$  個細胞離心後，去除 ethanol。加入 100  $\mu$ L 的 DNA staining buffer 打散細胞，再加入 10  $\mu$ L 的 Propidium Iodide(0.5 mg/ml)並混勻，於室溫反應三十分鐘後離心。去除上清液，以 500  $\mu$ L 的 PBS 打散細胞，並以 Flow Cytometry 分析細胞 sub-G1 的比例。



#### 4. 細胞凋亡檢測(ELISA)

根據 Cell Death Detection EILSA (Roche)提供之方法，測量細胞質中連接組蛋白的 DNA 片段。取  $10^4$  個 AGS 細胞於 100  $\mu$ L RPMI 1640 培養液，加到 96-well 細胞培養皿，根據不同實驗分別與胃幽門螺旋桿菌或 Wortmannin 培養 12 小時後加入 TRAIL。反應結束後離心 200 g，10 分鐘後去除上清液，再以 200  $\mu$ L lysis buffer 打破細胞，於室溫反應 30 分鐘。再次離心 200 g，10 分鐘後取出 20  $\mu$ L 上清液至 streptavidin coated plate。加入 80  $\mu$ L immunoreagent(含 anti-DNA-POD、anti-Histone-Biotin 二種 antibodies)於室溫反應 2 小時。去除反應溶液，並以 incubation buffer 清洗三次後。加入 100  $\mu$ L ABTS substrate solution，反應 10 分鐘後加入 100  $\mu$ L ABTS Stop solution，偵測波長 405 nm 的吸光值。

#### 5. 質體轉染

將  $1 \times 10^6$  個 AGS 細胞於 10% fetal bovine serum 的 RPMI 1640 培養液中培養。二十四小時後，去除舊的培養液並加入新鮮的培養液，一小時後，分別取 2.5  $\mu$ g 攜帶有人類 EGFP-Akt 的質體及 7.5  $\mu$ L 轉染試劑至 0.1 ml DMEM 中，稍微震盪將二者混合。十五分鐘後，將形成之轉染試劑及質體複合物加入細胞培養皿中，六小時後更換新的培養液。轉染二十四小時後，以螢光顯微鏡檢查轉染效率，並根據實驗目的不同，收集細胞萃取液進行 Western blot，或者將轉染後的細胞與胃幽門螺旋桿菌共培養進行細胞凋亡檢測(ELISA)。

## 6. 統計方法

接受不同刺激的各組實驗結果間皆以 student t. test 計算是否具顯著差異，本文中\*定義為  $P < 0.05$ ，各組結果皆進行三次，結果以平均值±標準差表示。



## 實驗結果



### 1. 胃幽門螺旋桿菌能增進胃上皮細胞對於 TRAIL 之感受性，然而當胃幽門螺旋桿菌致病因子 CagPAI 及 CagE 基因有缺陷時，即失去此特性

先前的結果指出受感染之 AGS 細胞對於 TRAIL 較為敏感而引起細胞凋亡，然而參與此致病機制的細菌分子並不清楚，在初步的結果中顯示 CagPAI 可能是一個重要的因子。CagPAI 為胃幽門螺旋桿菌之重要致病因子，組成 CagPAI 的基因座中包含 CagA 及 CagE，二者皆與胃幽門螺旋桿菌的致病性有關，前者可經由第四型分泌系統(T4SS)送到人類細胞干擾細胞正常生長，後者為 ATPase，在第四型分泌系統中負責提供能量，且為第四型分泌系統的重要結構。因此實驗使用不同基因缺陷的菌株與野生菌株比較，研究可能參與致病機制的因子。將 AGS 細胞與 CagPAI/CagA/CagE 基因缺陷之胃幽門螺旋桿菌共同培養十二小時後，加入 TRAIL(40ng/ml)與細胞反應三小時，並以流式細胞儀(Fig.1(A)、(B))和 ELISA 的方式(Fig.1(C))觀察細胞凋亡的狀況。結果顯示當 CagPAI 及 CagE 基因缺陷時，胃幽門螺旋桿菌失去提升細胞對 TRAIL 感受性的特性，而 CagA 則沒有影響，這些結果顯示第四型分泌系統在細菌引起細胞凋亡的過程中扮演重要的角色。

### 2. 胃幽門螺旋桿菌致病因子 CagPAI 及 CagE 在負調控胃上皮細胞 FLIPs 表現量並造成 Caspase-8 活化的現象中扮演重要的角色

已發表的研究指出，胃幽門螺旋桿菌透過負調控 FLIPs 而促使細胞凋亡 (Lin et al., 2014)。FLIPs 結構與 Caspase-8 類似，但缺乏 Caspase-8 傳遞訊息所需之酵素活性位，因此具有抑制細胞凋亡的作用。當 FLIPs 表現降低並受到 TRAIL 刺激時，並能增進 DISC 的形成而促使 Caspase-8 的活化並引發細胞凋亡。依據實驗室初步的結果，CagPAI 可能參與調控 DISC 形成的過程，為了進一步瞭解調控 DISC 形成的細菌因子，實驗將 CagPAI/CagA/CagE 基因缺




陷之胃幽門螺旋桿菌與胃上皮細胞株 AGS 共同培養十二小時後，收集細胞萃取液，以 Western blot 觀察 FLIPs 的表現量。結果顯示胃幽門螺旋桿菌依靠 CagE 及 CagPAI 負調節 FLIPs 的表現量(Fig.2(A))，並且如果在感染後加入 TRAIL 反應三小時，便能有效引起 Caspase-8 的活化(Fig.2(B))。另外我們也發現胃幽門螺旋桿菌的重要致病因子 CagA 不影響在 FLIPs 的表現及 TRAIL 的敏感性，因此第四型分泌系統在致病過程中可能有關鍵的功能。

### 3. 胃幽門螺旋桿菌與空腸曲桿菌皆具有第四型分泌系統，然而空腸曲桿菌並無法有效增加胃上皮細胞對於 TRAIL 之感受性

根據上述的實驗結果，我們推測胃幽門螺旋桿菌依賴第四型分泌系統而造成細胞凋亡。為了進一步證實第四型分泌系統的重要性，我們使用同樣具有第四型分泌系統的空腸曲桿菌(*C. jejuni*)與胃幽門螺旋桿菌做比較，結果顯示空腸曲桿菌並無明顯提升細胞對 TRAIL 的感受性(Fig.3)，表示並非所有微生物的第四型分泌系統皆能引起細胞對 TRAIL 之感受性。目前已知空腸曲桿菌第四型分泌系統的功能為攝入外在環境的 DNA，而非與宿主接觸傳遞毒性物質，因此此結果暗示著胃幽門螺旋桿菌之第四型分泌系統與細胞接觸的能力在致病過程中的重要性，

### 4. 在胃上皮細胞株 AGS 中，Akt 的活性調控 FLIPs 的表現，並且胃幽門螺旋桿菌降低胃上皮細胞中 Akt 活性

在觀察到胃幽門螺旋桿菌負調控細胞 FLIPs 後，我們進一步想瞭解可能的機制為何。在實驗室初步的結果顯示胃上皮細胞 Akt 的表現可能與 FLIPs 的表現具有相關性，因此我們首先研究胃幽門螺旋桿菌是否影響 Akt 的活化，結果顯示細胞中 Akt 的活化隨感染時間增加而減少(Fig.5)，並且與 FLIPs 的表現量有相關性(Fig.4(A))。為了瞭解胃幽門螺旋桿菌是否藉由影響 Akt 活性，



而調控胃上皮細胞中 FLIPs 的表現，首先須確認 AGS 細胞中 Akt 是否控制著 FLIPs 表現。實驗使用 Akt 上游分子 PI3K 的抑制劑 Wortmannin 抑制 Akt 活性，結果顯示當 Akt 活性受到限制時，FLIPs 的表現量確實下降(Fig.4(B))。相反地，當我們轉染 EGFP-Akt 質體使 AGS 細胞過量表現 Akt 時，FLIPs 的表現則增加(Fig.4(C))。這些結果顯示在人類胃上皮細胞株中，Akt 為調控 FLIPs 表現的因子之一。我們進一步將胃幽門螺旋桿菌與細胞培養 12 小時 (MOI = 50, 100) 並收集細胞萃取液進行西方墨點法。類似的結果顯示，胃幽門螺旋桿菌確實影響了 AGS 細胞內 Akt 的活化，且同樣依賴細菌 CagE 及 CagPAI 因子，Akt 的活化與 FLIPs 的表現也具有相關性(Fig.6)。然而，目前仍未瞭解胃幽門螺旋桿菌如何抑制 Akt，我們發現胃幽門螺旋桿菌感染造成 Src 表現的下降(Fig.6)，但此現象依賴 CagA 的作用，因此與我們觀察到的現象可能較不相關。我們將繼續探討胃幽門螺旋桿菌是否藉由影響 Akt 而負調控 FLIPs 並改變細胞對 TRAIL 的感受性。

#### 5. 在人類胃上皮細胞株 AGS 中，過度表現 Akt 可抑制胃幽門螺旋桿菌引起之 TRAIL 敏感性及伴隨的細胞凋亡現象

為了進一步探討 Akt 在胃幽門螺旋桿菌引起 TRAIL 感受性的現象中扮演的角色，我們將過量表現 Akt 的胃上皮細胞株 AGS 與胃幽門螺旋桿菌共培養 12 小時後，加入 TRAIL 反應以觀察 Akt 對於細胞凋亡的影響。由先前的結果我們推測，若 Akt 與 FLIPs 的表現為正相關，過量表現 Akt 應該能抑制胃幽門螺旋桿菌引起的 TRAIL 敏感性。結果顯示轉染 Akt 的細胞確實較控制組有較低的細胞凋亡程度(Fig.7(B))，然而差異並不非常明顯。根據西方墨點法的結果，我們推測可能的原因為即使過量表現 Akt，當細胞受到感染時 Akt 磷酸化程度依然大幅下降，因此 Akt 活性仍然較低(Fig.7(A))。

## 結果討論



### 1. 胃幽門螺旋桿菌致病因子 CagPAI 及 CagE 能增進胃上皮細胞對於 TRAIL 之感受性而造成細胞凋亡

胃幽門螺旋桿菌引起細胞凋亡是造成胃炎、胃潰瘍的主因之一，且可能有數種機制參與，但詳細的致病機轉目前並不清楚，並可能隨不同菌株而有差異。先前的研究指出，胃幽門螺旋桿菌可能增加胃上皮細胞 Fas 受器的表現，因此 Fas 媒介的細胞凋亡訊號可能是造成死亡的原因之一(Jones et al., 1999)。另外，若將胃幽門螺旋桿菌的萃取物與胃癌細胞株反應也可能造成 caspase-3 的活化而造成細胞凋亡(Chen et al., 2005)，然而在正常感染下，這些細菌的毒素是如何被傳送到宿主細胞，以及是在細胞表面或內部刺激，詳細的機制仍不清楚。在實驗室先前發表的研究中指出，TRAIL 媒介的訊號也是引起胃上皮細胞凋亡的原因之一，並且 TRAIL 的來源可能來自受胃幽門螺旋桿菌感染的胃部組織中聚集之 TRAIL 陽性 T 細胞。在感染的胃部組織中 CCL20 的表現量增加，並可能吸引 CCR6 陽性的 T 淋巴球聚集到胃黏膜。胃幽門螺旋桿菌並未引誘胃上皮細胞 TRAIL 受器的表現，而是負調控細胞內 FLIPs 表現，因此 TRAIL 刺激時便能促進 DISC 的形成而導致細胞凋亡(Lin et al., 2014; Wu et al., 2004)。

初步的結果也顯示，與胃幽門螺旋桿菌致病性相關的 CagPAI 基因在此現象中具有重要的功能。CagPAI 大約包含三十個基因，其組成因不同菌株而異。為了進一步了解詳細的機制，我們製作了 CagPAI 中兩個重要基因的剔除菌株，分別為 CagA 及 CagE。CagA 目前認為是胃幽門螺旋桿菌最重要的致病蛋白質，其經由第四型分泌系統送到宿主細胞後會影響 SHP-2、MAPK 激酶等蛋白質的功能(Higashi et al., 2004; Higashi et al., 2002)。結果顯示 CagA 似乎不是造成細胞凋亡的主因，相反地，當 CagE 基因剔除後細菌則失去致病特性。除了 CagA 之外，CagPAI 的其它基因大多與形成第四型分泌系統相關，CagE 除了是重要的組成結構外，本身也是 ATPase 為物質運輸提供能量(Censini et al., 1996)。因此，根據圖

一及圖二的結果，我們推測第四型分泌系統在胃幽門螺旋桿菌造成細胞凋亡的致病過程具關鍵的角色。



## 2. 第四型分泌系統在胃幽門螺旋桿菌造成的 TRAIL 敏感性現象中可能扮演的角色

目前已知胃幽門螺旋桿菌可藉第四型分泌系統將 CagA 及 muropeptide 從細菌送到宿主細胞，然而我們的結果顯示 TRAIL 引起的細胞凋亡並非由 CagA 所引起。Muropeptide 由 peptidoglycan 水解而來，然而目前對於 peptidoglycan 是否能造成胃上皮細胞的細胞凋亡並不清楚，即使在其它的研究中指出 peptidoglycan 在不同情況下可能有促進或抑制細胞凋亡的效果(Towhid et al., 2012; Vazquez-Sanchez et al., 2014)。Muropeptide 在胃幽門螺旋桿菌引起的細胞凋亡中是否重要，可藉由製作 soluble lytic transglycosylase(slt)基因剔除的菌株來測試，soluble lytic transglycosylase 水解 peptidoglycan 成游離的 muropeptide 片段。是否可能有未知的物質被送入宿主細胞而影響 TRAIL 的感受性則有待進一步的研究。

此外，胃幽門螺旋桿菌也可能在與胃上皮細胞接觸時便影響細胞內的訊息傳遞而影響 Akt 或 FLIPs 的活性及表現。目前已知胃幽門螺旋桿菌之 CagL 可與細胞膜上  $\alpha 5\beta 1$ 、 $\alpha v\beta 3$  integrin 結合，並促進第四型分泌系統在二者間形成通道 (Conradi et al., 2012; Kwok et al., 2007)。由於整個第四型分泌系統約有三十個蛋白質組成，因此也有可能是在細菌與細胞接觸的過程中，有其它的 CagPAI 蛋白質與膜上的蛋白質作用而影響細胞的生理狀況。圖三的結果顯示同樣具有第四型分泌系統的空腸曲桿菌無法引起細胞的 TRAIL 敏感性，而二種菌的系統差異在於空腸曲桿菌的第四型分泌系統功能為攝入外在環境的 DNA，而胃幽門螺旋桿菌的系統則能連結到人類胃上皮細胞，因此圖三的結果也暗示著胃幽門螺旋桿菌之第四型分泌系統與宿主細胞接觸的能力對於引起細胞凋亡的重要性。



### 3. 胃幽門螺旋桿菌抑制 Akt 活性而負調控 FLIPs 表現，並影響胃上皮細胞對 TRAIL 之感受性

PI3K-Akt 訊息路徑調控多種細胞生理反應，包含細胞的存活、生長及增值等(Brunet et al., 1999; Fruman et al., 1999; Kodaki et al., 1994)。在其它發表的研究中也可看到病原菌影響 Akt 活性的例子，如嗜肺性退伍軍人菌(*L. pneumophila*)可抑制 Akt 的訊息途徑(Ivanov and Roy, 2013)。嗜肺性退伍軍人菌與胃幽門螺旋桿菌皆具有第四型分泌系統，且兩者皆可藉此系統與宿主細胞連結並分泌毒性物質(Vogel et al., 1998)。然而二種細菌影響 Akt 的機制是否可能有相似之處，則有需進一步的研究。

先前的研究指出在部分細胞株中，Akt 的活性控制著 FLIPs 的表現 (Nam et al., 2003; Panner et al., 2010)，在圖四的部分我們也觀察到胃上皮細胞株 AGS 的 FLIPs 表現也受 Akt 所調控，並且胃幽門螺旋桿菌抑制 Akt 的活性(Fig.5, Fig.6)。先前發表的研究中也指出在某些細胞中，Akt 的活性確實調控細胞對 TRAIL 的敏感性(Chen et al., 2001; Panka et al., 2001)，並可能是透過 Akt-FLIPs 訊息路徑(Nam et al., 2003)。圖七的結果顯示，過量表現 Akt 確實能降低胃幽門螺旋桿菌引起的細胞凋亡，但由西方墨點法的結果可看出感染後的細胞 Akt 活性依然受到嚴重抑制，這可能是抑制細胞凋亡效果不明顯的原因之一。目前已知將 Akt 的 Ser473 及 Thr308 皆置換成 aspartic acids(Asp)可成為持續活化的 Akt，為了確認 Akt 在本實驗中的重要性，未來可利用此 mutant Akt 進一步研究。最後，胃幽門螺旋桿菌在此現象中是如何抑制 Akt 的活性，仍待後續實驗的釐清，目前以西方墨點法觀察到能影響 Akt 活化的蛋白質包含 PP2A、mTORC2、PI3K，在感染時表現量並無明顯變化。然而蛋白激酶(kinase)及去磷酸酶(phosphatase)之活性可能受許多因素調控，因此未來可進行 kinase assay 來確認如 PI3K 或 mTORC2 之活性是否受胃幽門螺旋桿菌所影響。

#### 4. Akt 及其它調控 FLIP 表現之細胞訊息途徑

在已發表的研究中指出 Akt 調控 FLIPs 表現可能是透過 mRNA 途徑或泛素 (ubiquitin) 途徑。在部分的細胞株中使用 PI3K 的抑制劑可造成 FLIPs mRNA 表現下降 (Nam et al., 2003)。另外，Akt-USP8-AIP4-FLIPs 為目前所知 Akt 調控 FLIPs 的途徑之一，AIP4 為 FLIPs 之 E3 ubiquitin ligase，而 USP8 為 AIP4 之 E3 ubiquitin ligase，因此 USP8 表現量下降可能使 AIP4 表現增加並造成 FLIPs 泛素化而被降解。ligase (Panner et al., 2010)。根據我們初步的結果，胃幽門螺旋桿菌感染確實造成 FLIPs 的泛素化，但我們並未觀察到 USP8 之表現受到影響。這些結果顯示胃幽門螺旋桿菌可能經由影響其它訊息途徑而造成 FLIPs 的泛素化，並且 FLIPs 可能有其它 E3 ubiquitin ligase。除了 Akt 之外，c-myc 也被指出會抑制 FLIP 之表現，並且 c-myc 調控著細胞對 TRAIL 之感受性 (Ricci et al., 2004)。但我們初步的結果顯示在細胞感染時，c-myc 表現反而下降，因此 c-myc 可能未參與我們觀察到的現象。另外 ERK、MEK-1 kinase 之活性也可能與 FLIP 表現具相關性，胃幽門螺旋桿菌是否透過其它途徑影響 FLIPs 表現有待進一步研究。

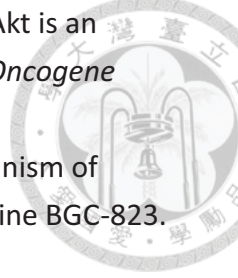
#### 5. 結論

在此篇研究中，藉由 CagPAI、CagE 及 CagA 基因剔除的菌株所得的研究結果，我們推測胃幽門螺旋桿菌依賴第四型分泌系統而負調控人類胃上皮細胞 FLIPs 的表現，繼而促進 TRAIL 死亡誘導複合物 DISC 而造成細胞凋亡，並且此現象非由重要的致病因子 CagA 所造成。另外，人類胃上皮細胞中 FLIPs 表現受 Akt 活性所調控，胃幽門螺旋桿菌感染時抑制 Akt 的活性而使細胞 FLIPs 表現降低，因此增加細胞對 TRAIL 的感受性而引起細胞凋亡。

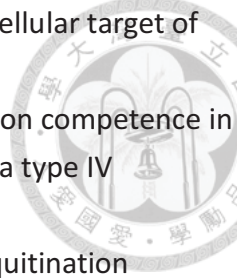
## 參考文獻



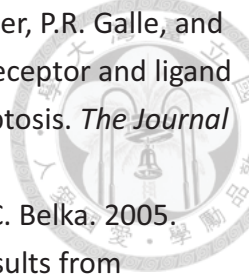
- Abajy, M.Y., J. Kopec, K. Schiwon, M. Burzynski, M. Doring, C. Bohn, and E. Grohmann. 2007. A type IV-secretion-like system is required for conjugative DNA transport of broad-host-range plasmid pIP501 in gram-positive bacteria. *Journal of bacteriology* 189:2487-2496.
- Alessi, D.R., M. Andjelkovic, B. Caudwell, P. Cron, N. Morrice, P. Cohen, and B.A. Hemmings. 1996. Mechanism of activation of protein kinase B by insulin and IGF-1. *The EMBO journal* 15:6541-6551.
- Asahi, M., T. Azuma, S. Ito, Y. Ito, H. Suto, Y. Nagai, M. Tsubokawa, Y. Tohyama, S. Maeda, M. Omata, T. Suzuki, and C. Sasakawa. 2000. Helicobacter pylori CagA protein can be tyrosine phosphorylated in gastric epithelial cells. *The Journal of experimental medicine* 191:593-602.
- Backert, S., S. Moese, M. Selbach, V. Brinkmann, and T.F. Meyer. 2001. Phosphorylation of tyrosine 972 of the Helicobacter pylori CagA protein is essential for induction of a scattering phenotype in gastric epithelial cells. *Molecular microbiology* 42:631-644.
- Backert, S., T. Schwarz, S. Miehle, C. Kirsch, C. Sommer, T. Kwok, M. Gerhard, U.B. Goebel, N. Lehn, W. Koenig, and T.F. Meyer. 2004. Functional analysis of the cag pathogenicity island in Helicobacter pylori isolates from patients with gastritis, peptic ulcer, and gastric cancer. *Infection and immunity* 72:1043-1056.
- Bacon, D.J., R.A. Alm, D.H. Burr, L. Hu, D.J. Kopecko, C.P. Ewing, T.J. Trust, and P. Guerry. 2000. Involvement of a plasmid in virulence of Campylobacter jejuni 81-176. *Infection and immunity* 68:4384-4390.
- Brown, L.M. 2000. Helicobacter pylori: epidemiology and routes of transmission. *Epidemiologic reviews* 22:283-297.
- Brunet, A., A. Bonni, M.J. Zigmond, M.Z. Lin, P. Juo, L.S. Hu, M.J. Anderson, K.C. Arden, J. Blenis, and M.E. Greenberg. 1999. Akt promotes cell survival by phosphorylating and inhibiting a Forkhead transcription factor. *Cell* 96:857-868.
- Censini, S., C. Lange, Z. Xiang, J.E. Crabtree, P. Ghiara, M. Borodovsky, R. Rappuoli, and A. Covacci. 1996. cag, a pathogenicity island of Helicobacter pylori, encodes type I-specific and disease-associated virulence factors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93:14648-14653.
- Chen, X., H. Thakkar, F. Tyan, S. Gim, H. Robinson, C. Lee, S.K. Pandey, C. Nwokorie, N.

- 
- Onwudiwe, and R.K. Srivastava. 2001. Constitutively active Akt is an important regulator of TRAIL sensitivity in prostate cancer. *Oncogene* 20:6073-6083.
- Chen, Y., Y. Wang, W. Xu, and Z. Zhang. 2005. Analysis on the mechanism of Helicobacter pylori-induced apoptosis in gastric cancer cell line BGC-823. *International journal of molecular medicine* 16:741-745.
- Conradi, J., S. Huber, K. Gaus, F. Mertink, S. Royo Gracia, U. Strijowski, S. Backert, and N. Sewald. 2012. Cyclic RGD peptides interfere with binding of the Helicobacter pylori protein CagL to integrins alphaVbeta3 and alpha5beta1. *Amino acids* 43:219-232.
- Covacci, A., S. Censini, M. Bugnoli, R. Petracca, D. Burroni, G. Macchia, A. Massone, E. Papini, Z. Xiang, N. Figura, and et al. 1993. Molecular characterization of the 128-kDa immunodominant antigen of Helicobacter pylori associated with cytotoxicity and duodenal ulcer. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 90:5791-5795.
- Eaton, K.A., S. Suerbaum, C. Josenhans, and S. Krakowka. 1996. Colonization of gnotobiotic piglets by Helicobacter pylori deficient in two flagellin genes. *Infection and immunity* 64:2445-2448.
- Fan, X., S.E. Crowe, S. Behar, H. Gunasena, G. Ye, H. Haeberle, N. Van Houten, W.K. Gourley, P.B. Ernst, and V.E. Reyes. 1998. The effect of class II major histocompatibility complex expression on adherence of Helicobacter pylori and induction of apoptosis in gastric epithelial cells: a mechanism for T helper cell type 1-mediated damage. *The Journal of experimental medicine* 187:1659-1669.
- Fruman, D.A., S.B. Snapper, C.M. Yballe, L. Davidson, J.Y. Yu, F.W. Alt, and L.C. Cantley. 1999. Impaired B cell development and proliferation in absence of phosphoinositide 3-kinase p85alpha. *Science* 283:393-397.
- Haslam, R.J., H.B. Koide, and B.A. Hemmings. 1993. Pleckstrin domain homology. *Nature* 363:309-310.
- Hawkins, P.T., T.R. Jackson, and L.R. Stephens. 1992. Platelet-derived growth factor stimulates synthesis of PtdIns(3,4,5)P3 by activating a PtdIns(4,5)P2 3-OH kinase. *Nature* 358:157-159.
- Higashi, H., A. Nakaya, R. Tsutsumi, K. Yokoyama, Y. Fujii, S. Ishikawa, M. Higuchi, A. Takahashi, Y. Kurashima, Y. Teishikata, S. Tanaka, T. Azuma, and M. Hatakeyama. 2004. Helicobacter pylori CagA induces Ras-independent morphogenetic response through SHP-2 recruitment and activation. *The Journal of biological chemistry* 279:17205-17216.
- Higashi, H., R. Tsutsumi, S. Muto, T. Sugiyama, T. Azuma, M. Asaka, and M.



- 
- Hatakeyama. 2002. SHP-2 tyrosine phosphatase as an intracellular target of *Helicobacter pylori* CagA protein. *Science* 295:683-686.
- Hofreuter, D., S. Odenbreit, and R. Haas. 2001. Natural transformation competence in *Helicobacter pylori* is mediated by the basic components of a type IV secretion system. *Molecular microbiology* 41:379-391.
- Ivanov, S.S., and C.R. Roy. 2013. Pathogen signatures activate a ubiquitination pathway that modulates the function of the metabolic checkpoint kinase mTOR. *Nature immunology* 14:1219-1228.
- Janicke, R.U., M.L. Sprengart, M.R. Wati, and A.G. Porter. 1998. Caspase-3 is required for DNA fragmentation and morphological changes associated with apoptosis. *The Journal of biological chemistry* 273:9357-9360.
- Jones, N.L., A.S. Day, H.A. Jennings, and P.M. Sherman. 1999. *Helicobacter pylori* induces gastric epithelial cell apoptosis in association with increased Fas receptor expression. *Infection and immunity* 67:4237-4242.
- Karnholz, A., C. Hoefler, S. Odenbreit, W. Fischer, D. Hofreuter, and R. Haas. 2006. Functional and topological characterization of novel components of the comB DNA transformation competence system in *Helicobacter pylori*. *Journal of bacteriology* 188:882-893.
- Kerr, J.F., A.H. Wyllie, and A.R. Currie. 1972. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *British journal of cancer* 26:239-257.
- Kodaki, T., R. Woscholski, B. Hallberg, P. Rodriguez-Viciana, J. Downward, and P.J. Parker. 1994. The activation of phosphatidylinositol 3-kinase by Ras. *Current biology : CB* 4:798-806.
- Krueger, A., I. Schmitz, S. Baumann, P.H. Krammer, and S. Kirchhoff. 2001. Cellular FLICE-inhibitory protein splice variants inhibit different steps of caspase-8 activation at the CD95 death-inducing signaling complex. *The Journal of biological chemistry* 276:20633-20640.
- Kwok, T., D. Zabler, S. Urman, M. Rohde, R. Hartig, S. Wessler, R. Misselwitz, J. Berger, N. Sewald, W. Konig, and S. Backert. 2007. *Helicobacter* exploits integrin for type IV secretion and kinase activation. *Nature* 449:862-866.
- Liao, Y., and M.C. Hung. 2004. A new role of protein phosphatase 2a in adenoviral E1A protein-mediated sensitization to anticancer drug-induced apoptosis in human breast cancer cells. *Cancer research* 64:5938-5942.
- Lin, W.C., H.F. Tsai, H.J. Liao, C.H. Tang, Y.Y. Wu, P.I. Hsu, A.L. Cheng, and P.N. Hsu. 2014. *Helicobacter pylori* sensitizes TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL)-mediated apoptosis in human gastric epithelial cells through regulation of FLIP. *Cell death & disease* 5:e1109.

- 
- Liu, X., H. Zou, C. Slaughter, and X. Wang. 1997. DFF, a heterodimeric protein that functions downstream of caspase-3 to trigger DNA fragmentation during apoptosis. *Cell* 89:175-184.
- Maehama, T., and J.E. Dixon. 1998. The tumor suppressor, PTEN/MMAC1, dephosphorylates the lipid second messenger, phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate. *The Journal of biological chemistry* 273:13375-13378.
- Marshall, B.J., and J.R. Warren. 1984. Unidentified curved bacilli in the stomach of patients with gastritis and peptic ulceration. *Lancet* 1:1311-1315.
- Mayer, B.J., R. Ren, K.L. Clark, and D. Baltimore. 1993. A putative modular domain present in diverse signaling proteins. *Cell* 73:629-630.
- Mobley, H.L. 1996. The role of *Helicobacter pylori* urease in the pathogenesis of gastritis and peptic ulceration. *Alimentary pharmacology & therapeutics* 10 Suppl 1:57-64.
- Morris, A.J., M.R. Ali, G.I. Nicholson, G.I. Perez-Perez, and M.J. Blaser. 1991. Long-term follow-up of voluntary ingestion of *Helicobacter pylori*. *Annals of internal medicine* 114:662-663.
- Moss, S.F., J. Calam, B. Agarwal, S. Wang, and P.R. Holt. 1996. Induction of gastric epithelial apoptosis by *Helicobacter pylori*. *Gut* 38:498-501.
- Nam, S.Y., G.A. Jung, G.C. Hur, H.Y. Chung, W.H. Kim, D.W. Seol, and B.L. Lee. 2003. Upregulation of FLIP(S) by Akt, a possible inhibition mechanism of TRAIL-induced apoptosis in human gastric cancers. *Cancer science* 94:1066-1073.
- Pan, G., K. O'Rourke, A.M. Chinnaiyan, R. Gentz, R. Ebner, J. Ni, and V.M. Dixit. 1997. The receptor for the cytotoxic ligand TRAIL. *Science* 276:111-113.
- Panka, D.J., T. Mano, T. Suhara, K. Walsh, and J.W. Mier. 2001. Phosphatidylinositol 3-kinase/Akt activity regulates c-FLIP expression in tumor cells. *The Journal of biological chemistry* 276:6893-6896.
- Panner, A., C.A. Crane, C. Weng, A. Feletti, S. Fang, A.T. Parsa, and R.O. Pieper. 2010. Ubiquitin-specific protease 8 links the PTEN-Akt-AIP4 pathway to the control of FLIPS stability and TRAIL sensitivity in glioblastoma multiforme. *Cancer research* 70:5046-5053.
- Pham, K.T., E. Weiss, L.F. Jimenez Soto, U. Breithaupt, R. Haas, and W. Fischer. 2012. CagI is an essential component of the *Helicobacter pylori* Cag type IV secretion system and forms a complex with CagL. *PloS one* 7:e35341.
- Ricci, M.S., Z. Jin, M. Dews, D. Yu, A. Thomas-Tikhonenko, D.T. Dicker, and W.S. El-Deiry. 2004. Direct repression of FLIP expression by c-myc is a major determinant of TRAIL sensitivity. *Molecular and cellular biology* 24:8541-8555.

- 
- Rudi, J., D. Kuck, S. Strand, A. von Herbay, S.M. Mariani, P.H. Krammer, P.R. Galle, and W. Stremmel. 1998. Involvement of the CD95 (APO-1/Fas) receptor and ligand system in *Helicobacter pylori*-induced gastric epithelial apoptosis. *The Journal of clinical investigation* 102:1506-1514.
- Rudner, J., V. Jendrossek, K. Lauber, P.T. Daniel, S. Wesselborg, and C. Belka. 2005. Type I and type II reactions in TRAIL-induced apoptosis -- results from dose-response studies. *Oncogene* 24:130-140.
- Sakahira, H., M. Enari, and S. Nagata. 1998. Cleavage of CAD inhibitor in CAD activation and DNA degradation during apoptosis. *Nature* 391:96-99.
- Sarbassov, D.D., D.A. Guertin, S.M. Ali, and D.M. Sabatini. 2005. Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex. *Science* 307:1098-1101.
- Schneider, P., M. Thome, K. Burns, J.L. Bodmer, K. Hofmann, T. Kataoka, N. Holler, and J. Tschopp. 1997. TRAIL receptors 1 (DR4) and 2 (DR5) signal FADD-dependent apoptosis and activate NF-kappaB. *Immunity* 7:831-836.
- Shaffer, C.L., J.A. Gaddy, J.T. Loh, E.M. Johnson, S. Hill, E.E. Hennig, M.S. McClain, W.H. McDonald, and T.L. Cover. 2011. *Helicobacter pylori* exploits a unique repertoire of type IV secretion system components for pilus assembly at the bacteria-host cell interface. *PLoS pathogens* 7:e1002237.
- Stein, M., F. Bagnoli, R. Halenbeck, R. Rappuoli, W.J. Fantl, and A. Covacci. 2002. c-Src/Lyn kinases activate *Helicobacter pylori* CagA through tyrosine phosphorylation of the EPIYA motifs. *Molecular microbiology* 43:971-980.
- Stephens, L., K. Anderson, D. Stokoe, H. Erdjument-Bromage, G.F. Painter, A.B. Holmes, P.R. Gaffney, C.B. Reese, F. McCormick, P. Tempst, J. Coadwell, and P.T. Hawkins. 1998. Protein kinase B kinases that mediate phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate-dependent activation of protein kinase B. *Science* 279:710-714.
- Tibbetts, M.D., L. Zheng, and M.J. Lenardo. 2003. The death effector domain protein family: regulators of cellular homeostasis. *Nature immunology* 4:404-409.
- Towhid, S.T., M. Nega, E.M. Schmidt, E. Schmid, T. Albrecht, P. Munzer, O. Borst, F. Gotz, and F. Lang. 2012. Stimulation of platelet apoptosis by peptidoglycan from *Staphylococcus aureus* 113. *Apoptosis : an international journal on programmed cell death* 17:998-1008.
- Vazquez-Sanchez, E.A., M. Rodriguez-Romero, L.E. Sanchez-Torres, S. Rodriguez-Martinez, J.C. Cancino-Diaz, O. Rodriguez-Cortes, E.S. Garcia-Lopez, and M.E. Cancino-Diaz. 2014. Peptidoglycan from *Staphylococcus aureus* has an anti-apoptotic effect in HaCaT keratinocytes mediated by the production of the cellular inhibitor of apoptosis protein-2. *Microbiology and immunology* 58:87-95.

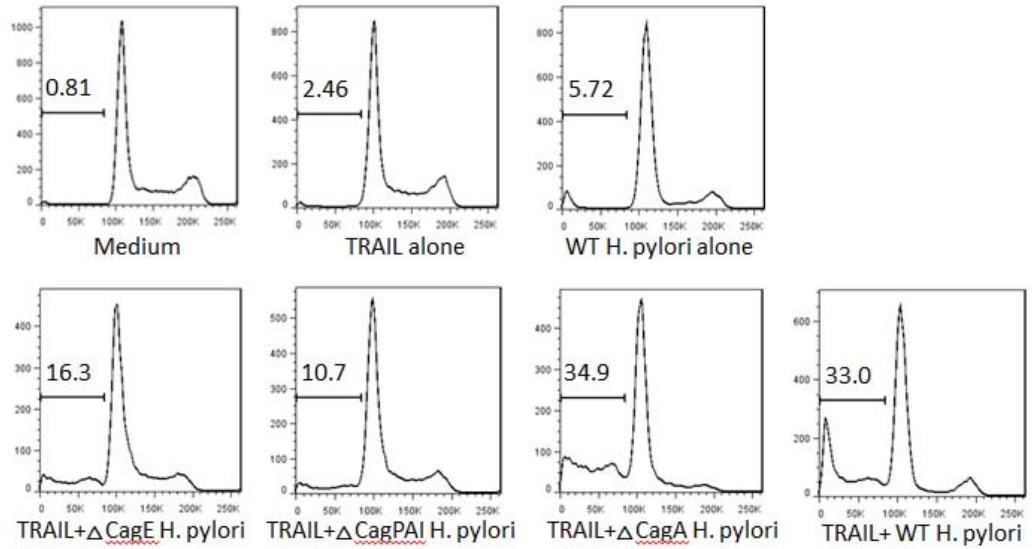
- 
- Viala, J., C. Chaput, I.G. Boneca, A. Cardona, S.E. Girardin, A.P. Moran, R. Athman, S. Memet, M.R. Huerre, A.J. Coyle, P.S. DiStefano, P.J. Sansonetti, A. Labigne, J. Bertin, D.J. Philpott, and R.L. Ferrero. 2004. Nod1 responds to peptidoglycan delivered by the *Helicobacter pylori* cag pathogenicity island. *Nature immunology* 5:1166-1174.
- Vogel, J.P., H.L. Andrews, S.K. Wong, and R.R. Isberg. 1998. Conjugative transfer by the virulence system of *Legionella pneumophila*. *Science* 279:873-876.
- Wiley, S.R., K. Schooley, P.J. Smolak, W.S. Din, C.P. Huang, J.K. Nicholl, G.R. Sutherland, T.D. Smith, C. Rauch, C.A. Smith, and et al. 1995. Identification and characterization of a new member of the TNF family that induces apoptosis. *Immunity* 3:673-682.
- Wu, Y.Y., H.F. Tsai, W.C. Lin, A.H. Chou, H.T. Chen, J.C. Yang, P.I. Hsu, and P.N. Hsu. 2004. *Helicobacter pylori* enhances tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-mediated apoptosis in human gastric epithelial cells. *World journal of gastroenterology : WJG* 10:2334-2339.

圖表說明

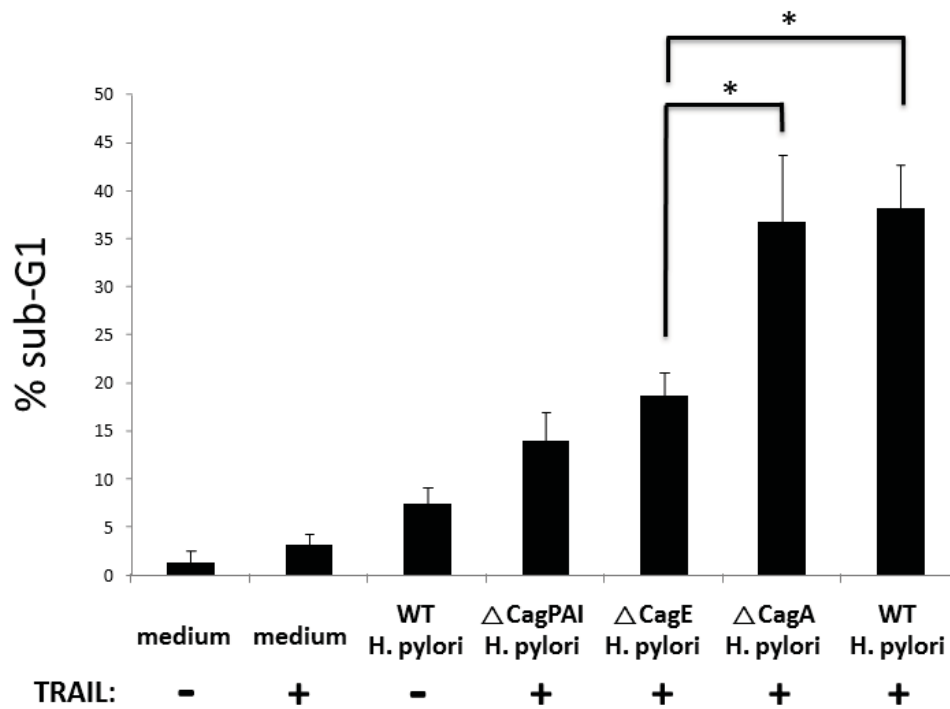


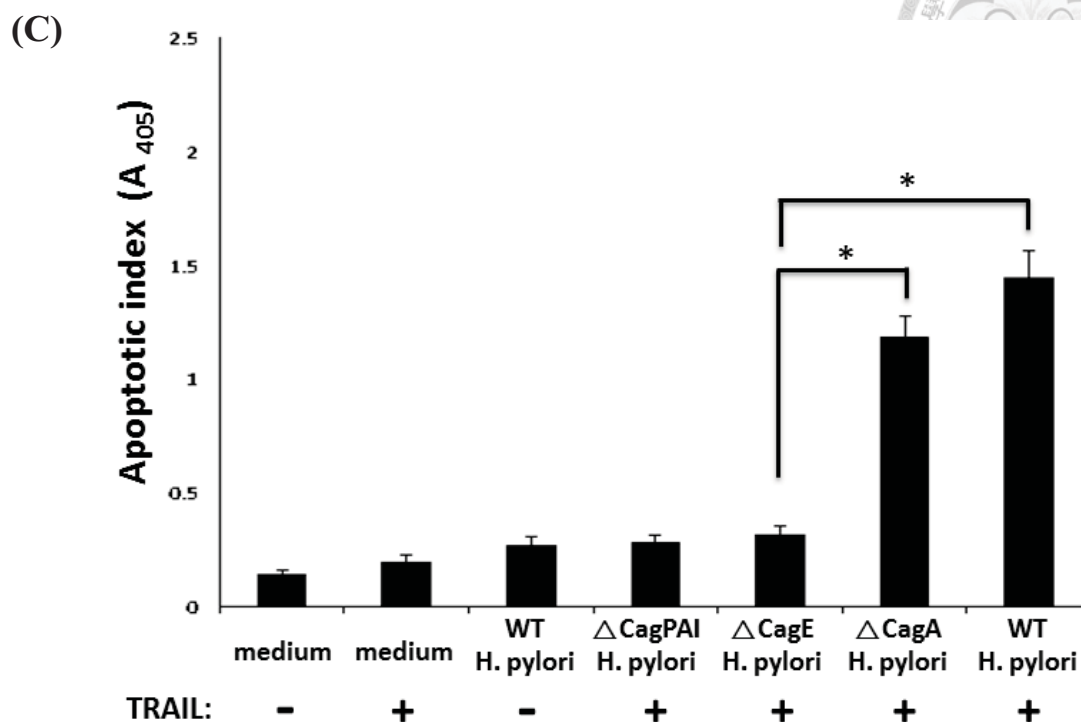
Fig.1

(A)



(B)





**Fig.1** CagE 及 CagPAI 基因剔除後，胃幽門螺旋桿菌失去了增加胃上皮細胞對 TRAIL 感受性的特性，顯示第四型分泌系統在此現象中的重要性。

(A) 細胞與 *H. pylori* 感染 12 小時 (MOI = 100)，加入 TRAIL (40 ng/ml) 反應三小時。收集細胞，以 70% 酒精在攝氏負 20 度進行固定 30 分鐘以上。固定完取出細胞離心 5000 rpm、5 分鐘，去除上清液。加入含有 RNase 的 DNA staining buffer 打散細胞，再加入 Propidium Iodide 輕微混勻，於室溫反應 30 分鐘。反應完成後離心 5000 rpm、5 分鐘，去掉上清液後以 PBS 打散細胞，以流式細胞儀分析 sub-G1 百分比。

(B) Fig.1(A) 之量化圖表 (n = 3, \*P < 0.05)。

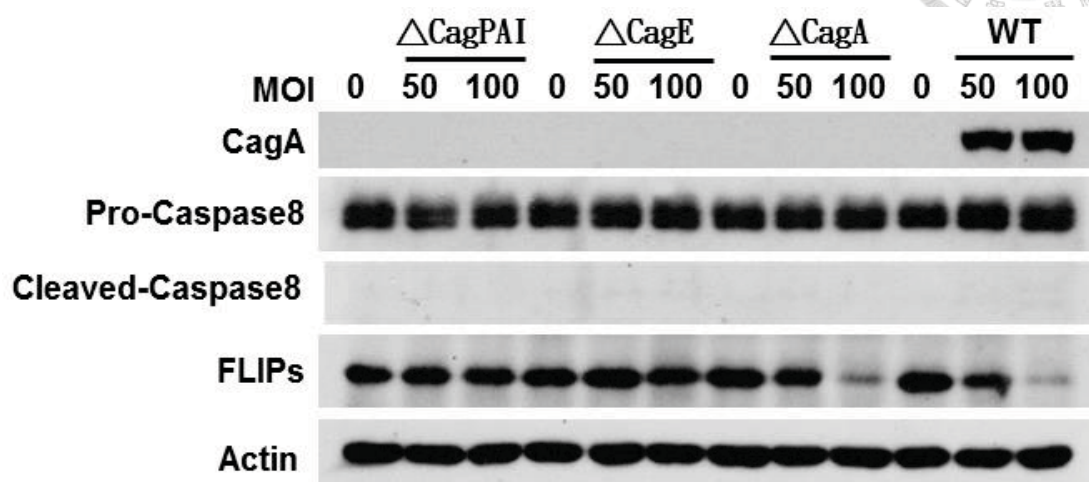
(C) 細胞與 *H. pylori* 感染 12 小時 (MOI = 100)，加入 TRAIL 反應三小時。以 Cell Death Detection EILSA (Roche) 提供之方法，以 anti-DNA-POD、anti-Histone 二種抗體分析細胞中斷裂的 DNA-組蛋白數量，作為細胞凋亡程度的根據 (n = 3, \*P < 0.05)。





Fig.2

(A)



(B)

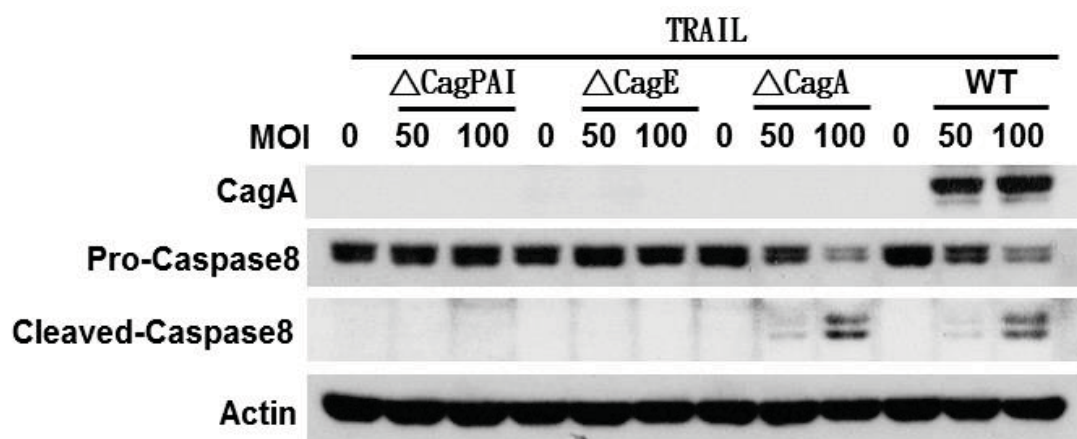


Fig.2 CagE 及 CagPAI 基因在胃幽門螺旋桿菌負調控胃上皮細胞中 FLIPs

表現的現象中扮演重要的角色，顯示細菌的第四型分泌系統對於負調控 FLIPs 的重要性，並藉此影響細胞對 TRAIL 之感受性。

胃幽門螺旋桿菌與 AGS 細胞以 MOI=50, 100 的方式共同培養 12 小時後，直接收集細胞萃取液(A)，或者再加入 TRAIL(40 ng/ml)反應 3 小時後收集細胞萃取液(B)，並以西方墨點法觀察 FLIPs 表現量及 Caspase-8 活化之差異。



Fig.3

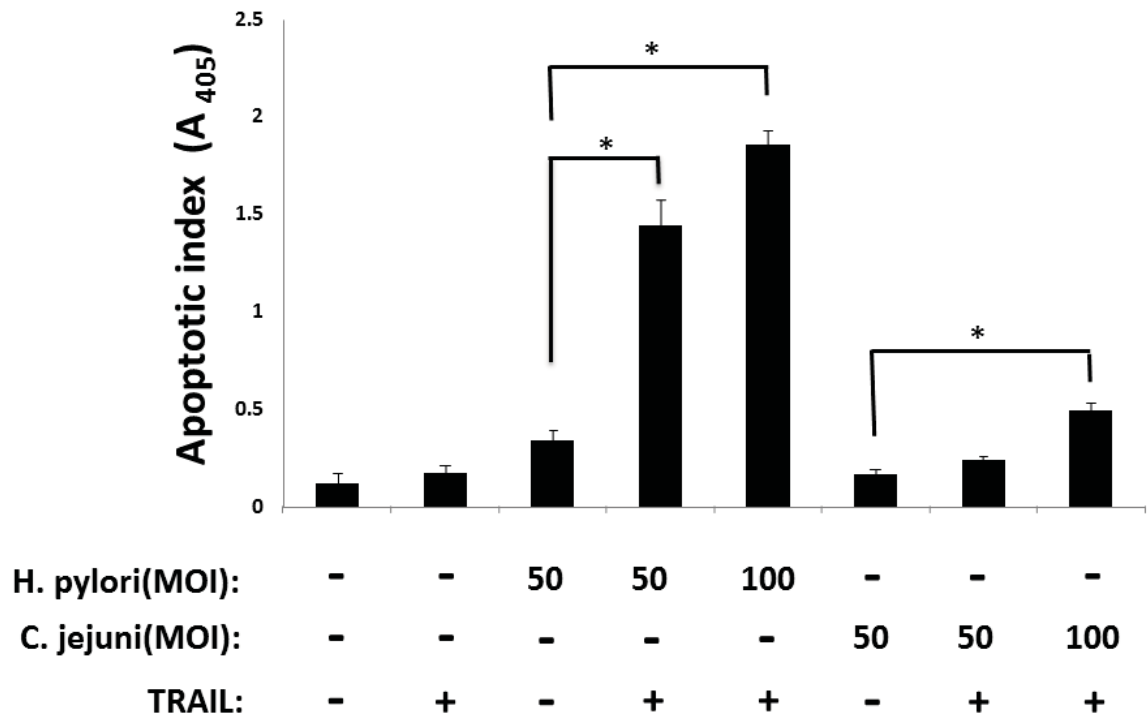


Fig.3 胃幽門螺旋桿菌與空腸曲桿菌皆具有第四型分泌系統，然而空腸曲桿菌並無法有效提升 AGS 細胞對 TRAIL 的敏感性。

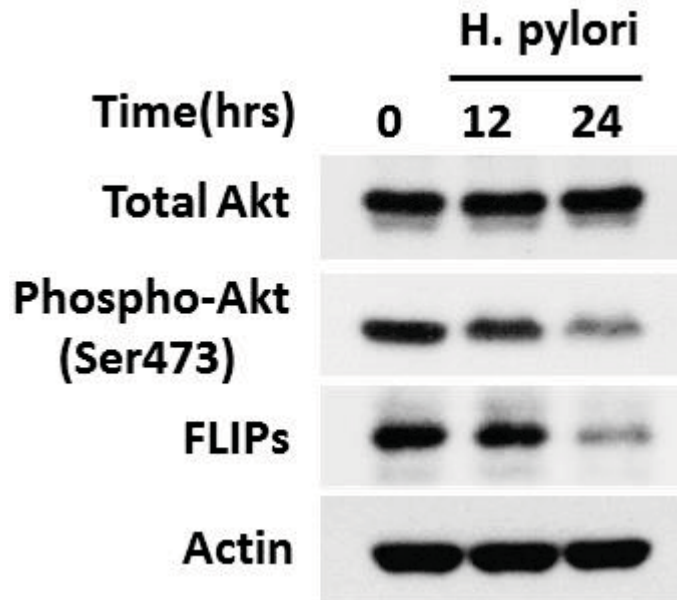
將胃幽門螺旋桿菌及空腸曲桿菌分別與 AGS 細胞以 MOI=50, 100 的方式共同培養 12 小時，並加入 TRAIL(40ng/ml)反應三小時，以 Cell Death Detection EILSA 測量二種細菌是否影響細胞對 TRAIL 的感受性(n = 3, \*P < 0.05)。



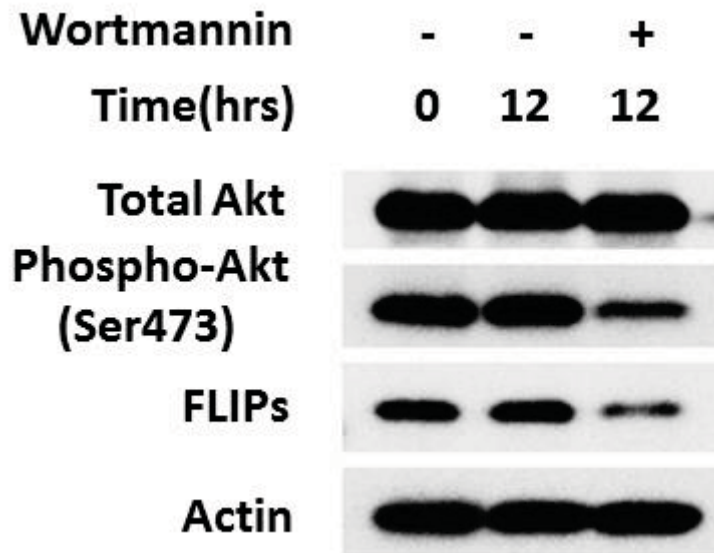


**Fig.4**

**(A)**

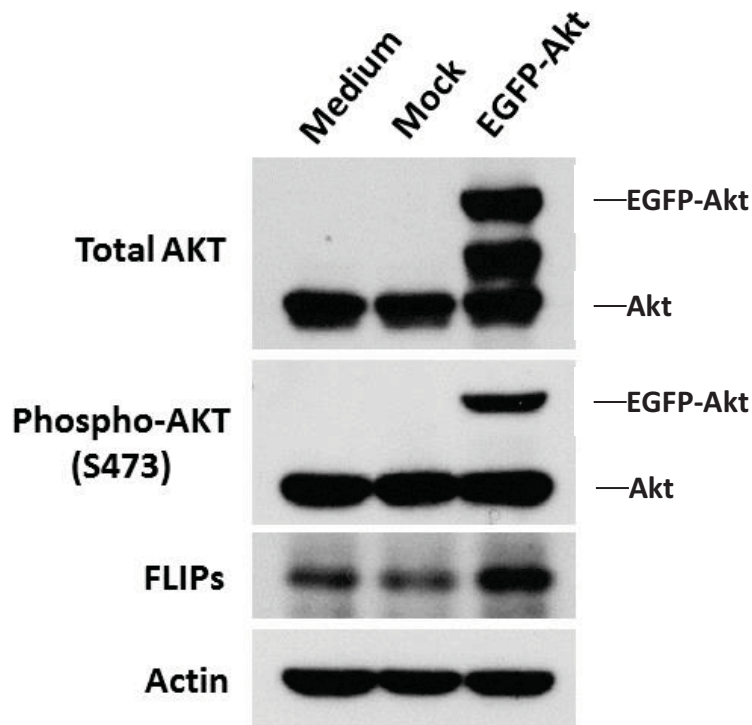


**(B)**





(C)



**Fig.4 胃幽門螺旋桿菌抑制在人類胃上皮細胞株中 Akt 的活化，並且 Akt 之活性與 FLIPs 的表現具有相關性**

(A) 將 AGS 細胞與野生種胃幽門螺旋桿菌感染十二或二十四小時(MOI = 50)，收集細胞萃取液，以西方墨點法觀察野生種胃幽門螺旋桿菌是否影響 AGS 細胞 Akt 的活性及 FLIPs 表現。

(B) 將 AGS 細胞在含有 Wortmannin(1  $\mu$ M)的 10% FBS RPMI 1640 中培養十二小時，收集細胞萃取液，以西方墨點法觀察 AGS 細胞中 Akt 的活性與 FLIPs 表現量之相關性。

(C) 將攜帶人類 EGFP-Akt 序列之 plasmids 轉染至 AGS 細胞中，二十四小時後收集細胞萃取液，以西方墨點法觀察 AGS 細胞中 Akt 的活性與 FLIPs 表現量之相關性。



Fig.5

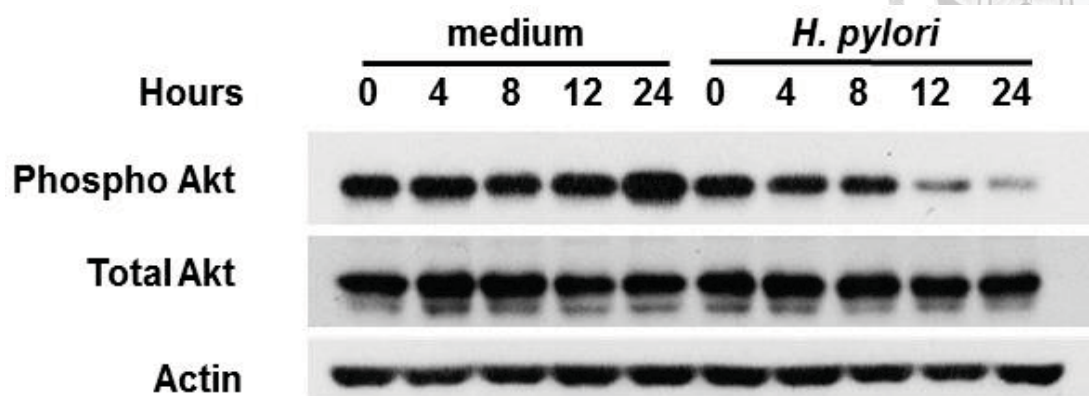


Fig.5 胃幽門螺旋桿菌抑制人類胃上皮細胞株中 Akt 之活化

將 AGS 細胞與野生種胃幽門螺旋桿菌共同培養，在不同時間點收及細胞萃取液。以西方墨點法觀察野生種胃幽門螺旋桿菌在不同時間點對於 AGS 細胞中 Akt 活性的影響。



Fig.6

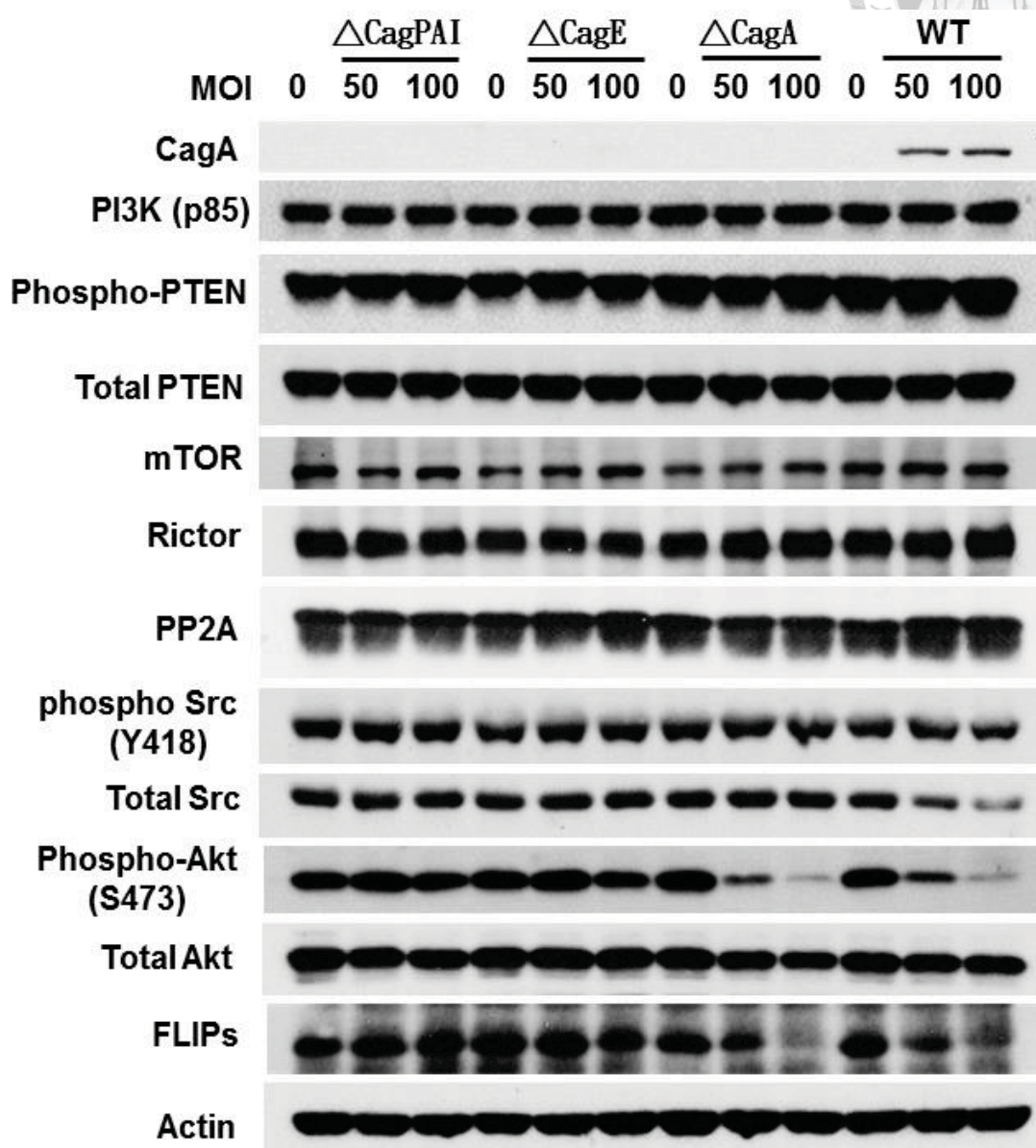


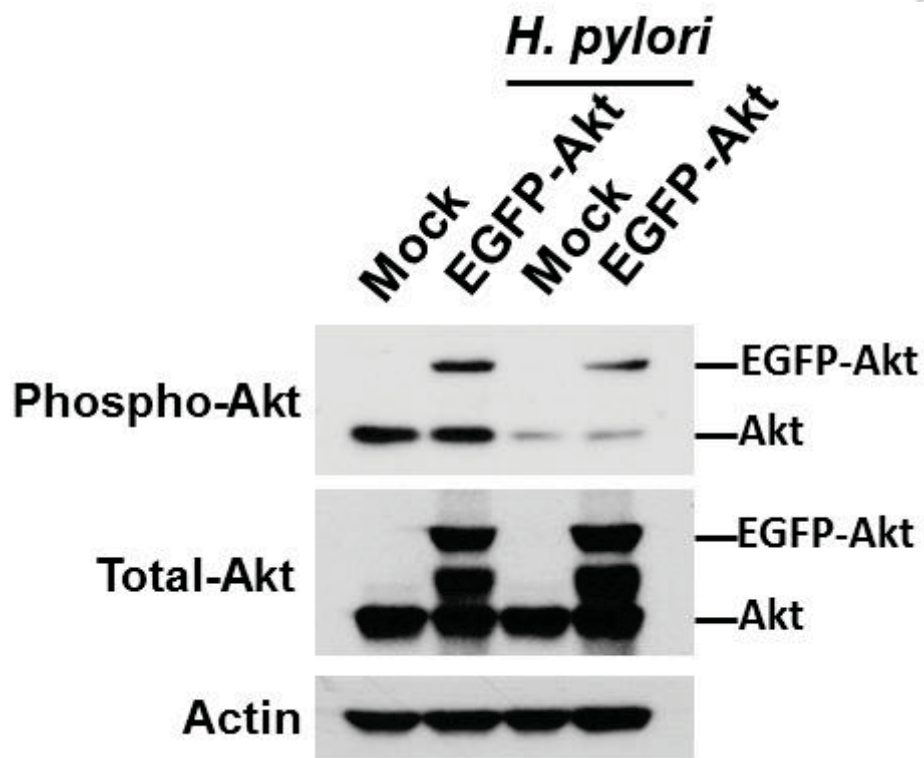
Fig.6 胃幽門螺旋桿菌負調控 Akt 活性及 FLIPs 表現，且與細菌的 CagPAI 及 CagE 因子有關。

將不同基因剔除之胃幽門螺旋桿菌分別與 AGS 細胞以 MOI=50, 100 的方式共同培養 12 小時後，收集細胞萃取液，並以西方墨點法觀察胃幽門螺旋桿菌是否影響 Akt 活化，以及 Akt 活性與 FLIPs 表現量之相關性。

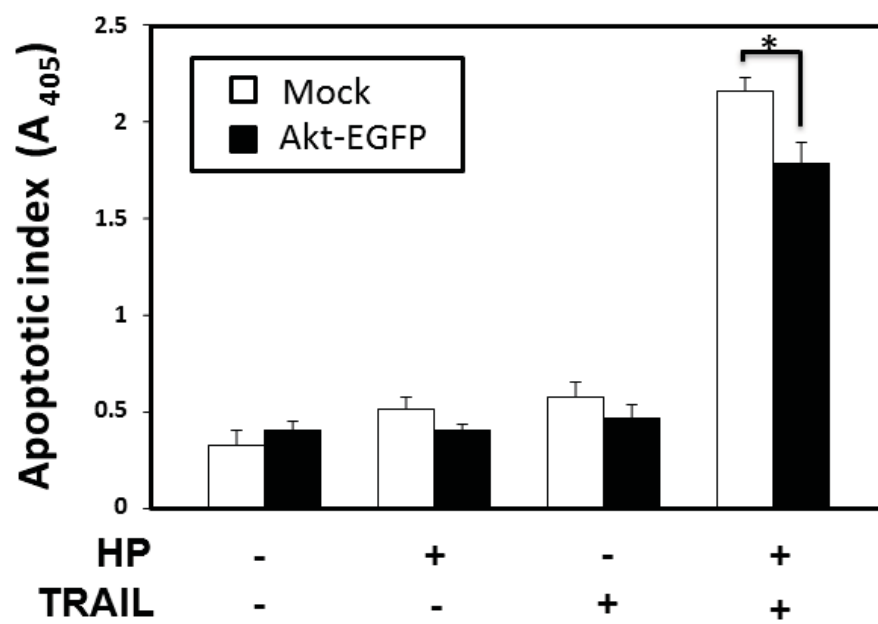


Fig.7

(A)



(B)



**Fig.7 在 AGS 細胞株中過量表現 Akt 可抑制胃幽門螺旋桿菌引起的 TRAIL 敏感性。**

將攜帶人類 Akt DNA 序列或空的載體轉染至胃上皮細胞株 AGS，24 小時後再與胃幽門螺旋桿菌在 MOI = 50 共培養 12 小時，最後加入 TRAIL(40ng/ml)反應三小時。分別將樣品進行 Western blot 確認轉染狀況(A)，或以 Cell Death Detection EILSA 測量細胞凋亡程度(B) (n = 3, \*P < 0.05)。