

國立臺灣大學醫學院

微生物學研究所 微生物及免疫學組

碩士論文

Graduate Institute of Microbiology

College of Medicine

National Taiwan University

Master Thesis

BCL10 切割機制之探討

Investigation on the Mechanisms of BCL10 Cleavage



Su-Hsin Tsang

指導教授：董馨蓮 博士

Advisor : Shin-Lian Doong, Ph.D.

中華民國 98 年 7 月

July, 2009

國立臺灣大學碩士學位論文
口試委員會審定書

中文題目：BCL10 切割機制之探討

英文題目：Investigation on the Mechanisms of BCL10 Cleavage

本論文係臧素心君(學號r95445117)在國立臺灣大學微生物學所完成之碩士學位論文，於民國98年7月27日承下列考試委員審查通過及口試及格，特此證明

口試委員：

陳青 周 李財坤
(指導教授) (簽名)

系主任、所長

陳以群 (簽名)

中文摘要

轉錄因子 NF- κ B 是調控淋巴球的活化中最主要的角色，其作用包括促進淋巴球的增生、分化以及細胞激素的製造。近年來的研究陸續指出，CBM complex(CARMA1-BCL10-MALT1)參與調控抗原受體活化 NF- κ B 的路徑中。當抗原受體受到活化後，經由一系列的訊息傳遞活化 PKC，藉由 PKC 將 CARMA1 磷酸化而使其構型改變，CARMA1 的 CARD domain 可吸引 BCL10-MALT1 雙聚體的聚合而形成 CBM complex 三聚體，將訊息傳遞至 IKK complex，接而活化 NF- κ B，促進下游基因的表現。在實驗室先前的研究與 Rebeaud, F. *et al.* (2008) 的研究中，發現在淋巴球活化後，BCL10 有被誘導切割的現象，而這個動作可能是透過類似 caspase 的 para-caspase MALT1 所造成，BCL10 被切割後的功能可能與 T 細胞黏附 (adhesion) 有關。除了淋巴球之外，最近也有許多研究陸續證明 CBM complex 也參與在一些 ITAM (immunoreceptor tyrosine-based activation motif)-containing receptor、TLR (Toll-like receptor) 或 GPCR (G protein-coupled receptors) 所活化的 NF- κ B 路徑中，雖然越來越多的研究探討 BCL10 在 NF- κ B 活化路徑的調控，但對於 BCL10 切割的機制或者是否還有其他生理上的意義的研究則付之闕如。因此我們試圖建立不同細胞活化 NF- κ B 的模組，想要知道其他細胞活化 NF- κ B 的路徑是否也有 CBM complex 的參與，並且觀察 BCL10 是否有發生被誘導切割的現象，來找出 BCL10 切割的機制以及其在生物中意義。

我的研究方法是利用各種刺激物 (PMA/ionomycin、TNF- α 、LPS、zymosan、IL-1 β 、*Helicobacter pylori*) 來刺激不同細胞 (淋巴系細胞：Jurkat、Raji、Akata、NK，骨髓系細胞：Raw264.7、THP-1，非血球系細胞：HeLa、AGS、293T) 用以活化 NF- κ B。我們以 I κ B α 的降解以及冷光酵素測定法觀察 NF- κ B 活化的狀況，並以免疫沈澱法將 BCL10 沈澱下來再以磷酸水解酶處理，觀察 BCL10 切割的情形。當刺激物活化

NF- κ B 路徑，但不見 BCL10 的變化時，使用核酸干擾 BCL10 來驗證 BCL10 是否參與在活化路徑中。最後再以 NF- κ B 抑制劑(MG132、Bay11-7085)以及鈣離子螯合劑(BAPTA-AM)，在 Jurkat 細胞中觀察對 BCL10 切割的影響，找出調控 BCL10 切割的因子。

在我的研究結果發現 BCL10 的切割只發生在 T 細胞、B 細胞以及自然殺手細胞中，而 TNF- α 及 IL-1 β 所誘導的 NF- κ B 活化路徑中不需要 BCL10 的參與。雖然 BCL10-MALT1 存在於許多細胞中，但是 MALT1 在 NF- κ B 活化時所誘導 BCL10 的切割卻不是一個共通的現象，顯示此切割的行為還需要 MALT1 以外的因子參與，因此我們接著著手探討影響 BCL10 切割的因子。當我們將 Jurkat 細胞以 NF- κ B 抑制劑前處理後，再以 PMA/ionomycin 刺激，發現經 MG132(抑制 I κ B α 的降解)前處理之後並不影響 BCL10 的切割，但是經 Bay11-7085(抑制 I κ B α 的磷酸化)前處理過後的細胞，其 BCL10 的切割有被抑制的現象，顯示 IKK 的活性可能是造成 BCL10 切割的原因。最後我們以鈣離子螯合劑(BAPTA-AM)使細胞內鈣離子濃度降低，可以發現 NF- κ B 的活化以及 BCL10 的切割有被抑制的情況，顯示鈣離子可以幫助 BCL10 的切割以及 NF- κ B 的活化。

由於不同細胞以不同的 CARD-containing adaptor 組合成 CBM complex 來活化 NF- κ B 的路徑(例如 T 細胞、B 細胞以及 NK 細胞所使用的是 CARMA1，骨髓系細胞所使用的是 CARD9)，因此 BCL10 的切割可能與 CARMA1 的選用有關。CARMA1 與 CARD9 在蛋白質構造上的差異在於 CARD9 缺少了 linker 以及 MAGUK domain，這個差異性使 CARD-containing adaptor 在活化上的調控有很大的不同，而這個調控的不同可能就是造成 BCL10 切割與否的關鍵。先前在實驗室的研究顯示磷酸化的 BCL10 更容易被 MALT1 所誘導切割，在 Zeng, H. *et al.*(2007) 的研究也指出 IKK β 具有將 BCL10 磷酸化的能力，進而使之降解而抑制 NF- κ B 的

活化。因此我們推論，BCL10 切割的機制可能與調控 CARMA1-BCL10-MALT1 complex 的活化有關，透過 CBM complex 活化 IKK complex 後，以 IKK β 的活性將 BCL10 磷酸化而使之造成切割的結果，而鈣離子可能透過某種機制協助參與切割的調控當中，至於 BCL10 切割在生物中所扮演的角色仍是值得繼續探討的部分。

關鍵字：CARMA1、CARD9、BCL10、MALT1、NF- κ B 活化



英文摘要

The transcription factor NF- κ B has a key role in lymphocyte activation by regulating the lymphocyte proliferation, differentiation and cytokine production. Recent studies show that CBM complex (CARMA1-BCL10-MALT1) is involved in antigen-receptor mediated NF- κ B signaling. Antigen receptor triggering leads to a serious signaling cascades to activate PKC. The PKC can directly phosphorylate the CARMA1 to induce a conformational change that allows the formation of a signaling complex containing CARMA1, BCL10 and MALT1, together with CBM complex that orchestrate NF- κ B activation mediated by inhibitor of IKK complex. According to our previous study and the research of Rebeaud, F. *et al.* (2008), lymphocyte activation can lead to BCL10 cleavage, and the MALT1-dependent cleavage of BCL10 specifically controlled integrin-dependent T cell adhesion. CBM complex has an essential role in the activation of NF- κ B by antigen receptors of lymphocyte, but also in NF- κ B regulation downstream of other receptors with immunoreceptor tyrosine-based activation motifs (ITAMs) and some G-protein coupled receptors (GPCRs) expressed by both immune and non-immune cells. Although the BCL10 is well-known in NF- κ B regulation, but the mechanisms of BCL10 cleavage still remained un-clarified. Therefore the specific aim of this study is to investigate the mechanisms of BCL10 cleavage.

To set up the cell models of CBM complex-mediated NF- κ B activation, we treated the cell-lines(Jurkat、Raji、Akata、NK、Raw264.7、THP-1、HeLa、AGS、293T) with different stimuli(PMA/ionomycin、TNF- α 、LPS、zymosan、IL-1 β 、*Helicobacter pylori*) to activate NF- κ B signaling. the I κ B α degradation and NF- κ B luciferase reporter assay serve as an indicator NF- κ B activation. BCL10 cleavage is performed by Immunoprecipitation of BCL10 and phosphatase treatment.

In our findings, the BCL10 cleavage only occurs in T cell, B cell and NK cell. It reveals that MALT1 activity is essential but not sufficient for BCL10 cleavage. To further characterize the factors that regulate BCL10 cleavage, the two NF- κ B inhibitors(MG132 and Bay11-7085) are a method, as our MG132 pretreatment doesn't influence the BCL10 cleavage. Instead, the Bay11-7085 pretreatment down-regulate the BCL10 cleavage. In addition, ionomycin treatment can't induce BCL10 cleavage, and the cytosolic calcium chelator BAPTA also down-regulate the BCL10 cleavage when T cell activation. According to the findings, the IKK activity and calcium may play the roles in BCL10 cleavage.

In summary, we proposed that BCL10 cleavage is mediated by the regulation of CARMA1-BCL10-MALT1 usage, and phosphorylation of BCL10 by IKK β is a better

substrate for MALT1 to cleave. Finally, Calcium may provide an unknown role in the regulation of BCL10 cleavage.

Key words: CARMA1 、CARD9 、BCL10 、MALT1 、NF- κ B activation



目錄

口試委員審定書.....	I
中文摘要.....	II
英文摘要.....	V
第一章、序論.....	1
1.1 CBM complex 個論.....	1
1.2 CBM complex 在後天免疫訊息傳遞中的角色.....	8
1.3 CBM complex 在先天免疫以及非免疫的訊息傳遞.....	10
第二章、研究目的.....	11
第三章、材料與方法.....	12
第四章、結果.....	21
4.1 建立各種細胞活化 NF- κ B 路徑的模組.....	21
4.1.1 淋巴球系血球細胞.....	21
4.1.2 骨髓系血球細胞.....	22
4.1.3 非血球系細胞.....	23
4.1.4 自然殺手細胞.....	24
4.2 BCL10 切割的機制.....	24
4.2.1 IKK 的活性參與 BCL10 切割的機制.....	24
4.2.2 鈣離子(Calcium)參與 BCL10 切割的機制.....	25

第五章、 討論.....	27
5.1 BCL10 的切割需要 MALT1 以及額外因子的參與.....	27
5.2 CARMA1-BCL10-MALT1 的選用可能是造成切割的原因.....	27
5.3 CARD domain 的遮蔽造成選用的差異.....	30
5.4 CARMA1 與 CARD9 的功能性比較.....	30
5.5 IKK 對於 BCL10 切割的重要性.....	31
5.6 BCL10 切割的功能與意義.....	32
第六章、 參考文獻.....	33
圖表.....	41
附圖.....	56



第一章、序論

1.1 CBM complex 個論

1.1.1 BCL10 (B-cell Lymphoma 10)

發現史

1999 年，由 t(1;14)(p22;q32) 基因轉位的 low-grade MALT lymphoma (最常見的 extranodal B cell lymphoma) 病人組織中新發現一個蛋白質，因為是從 B cell lymphoma 中所發現，故命名為 BCL10 [1, 2]。同年，另外一群研究團隊找尋參與細胞凋亡過程的蛋白質，經由基因資料庫找到一些具有細胞凋亡特殊序列—CARD (caspase recruitment domain) 序列的 human EST clone，進行研究後分別將這些新發現的蛋白質命名為 CIPER (CED-3/ICH1 prodomain homologous, E10-like regulator)[3]、CLAP (CARD-like apoptosis proteins)[4]、mE10 (mammalian E10) [5] 等。後來經由序列比對後發現上述蛋白質均為同一蛋白質。

蛋白質組成與特性 (附圖一)

BCL10 蛋白質包含 233 個胺基酸，N 端具有一個 CARD domain (13-99 amino acid)，C 端則包含一段富含絲胺酸及酥胺酸的區域 (serine/threonine rich domain)。目前已知 BCL10 可藉由 CARD domain 與 CARD-containing adaptor (CARMA1、CARMA2、CARMA3、CARD9，稍後詳述) 上的 CARD domain 進行 CARD-CARD interaction；BCL10 利用在 CARD domain 之後的一小段序列 (107-119 amino acid) 可以與 MALT1 結合在一起。BCL10 的 Serine/threonine rich domain 被認為是具有多重磷酸化的位點 (multiple phosphorylation site)。

BCL10 之功能

BCL10 由於具有 CARD domain，一開始被認為與細胞凋亡(apoptosis)有關，事實上當 BCL10 大量表現於 293 細胞時，確實可以引起 apoptosis[6]，但是在 in vivo 的狀況下，BCL10 並不會引起 apoptosis，而是在調控的狀態下活化 NF- κ B[1]。BCL10 與 MALT1、CARMA1 形成 CBM complex 三聚體時可以活化 NF- κ B 路徑，在細胞處於休止狀態時(resting state)，BCL10 平時即與 MALT1 連結在一起，但是不會啟動 NF- κ B 的活化，當 T 細胞受到刺激時，使 CARMA1 可以透過 CARD domain 與 BCL10 聚合，進而使 MALT1 也得以聚合，透過 MALT1 的活性活化 NF- κ B 路徑[7]。

BCL10 的磷酸化修飾調控 NF- κ B 路徑

由於 BCL10 C 端有 Ser/Thr rich domain，因此推估有許多被磷酸化的位點。在 293T 細胞株表現完整的 BCL10 可觀察到不只一種分子量的 BCL10 蛋白質，利用磷酸水解酶(phosphatase)作用後只剩一種分子量的 BCL10，證實 Serine/threonine rich domain 區域具有磷酸化修飾[3, 4]。另外，大量表現 BCL10 或是與磷酸化 BCL10 的激酶(kinase)共同大量表現[8-11]、或以 PMA/ionomycin 刺激 T 細胞[12]、以及 UV 刺激 HeLa、M549、A549 細胞時[10]，亦可以觀察到 BCL10 被磷酸化的現象。

目前被報導過可以磷酸化 BCL10 的激酶有 Receptor Interacting Protein2 (RIP2)、Ca²⁺/Calmodulin-dependent Protein Kinase 2 (CaMK II)以及 The I κ B kinase β (IKK β)。BCL10 的磷酸化具有正向或負向調控 NF- κ B 的功能。T 細胞受體活化時，吸引一種 Ser/Thr kinase“RIP2”和 BCL10 結合並造成 BCL10 磷酸化，正向調控 NF- κ B 的活化[13]。相反的，T 細胞受體活化時，BCL10 在 Ser138 位置被 CaMK II 磷酸化後會負向調控 NF- κ B 的衰減(attenuation)[10]，但詳細機制不明。

IKK β 對於 BCL10 的磷酸化則同時具有正向及負向調控角色。在 Wegener, E. *et al.* 的研究中[8]，在 T 細胞活化的早期，IKK β 對於 BCL10 和 CARMA1 的結合是必要的，因此被認為是啟動 CBM complex 結合的關鍵，然而活化的後期 NEMO-IKK complex 可以造成 BCL10 C 端一系列 Serine residue 的磷酸化(包括 Ser134,136,138,141,144)因此干擾了 BCL10 和 MALT1 的結合，影響 MALT1 對 IKK γ 的 Ubiquitination 而使 IKK 無法活化，因而負向調控 NF- κ B 的活化。另一方面，在 Lobry, C.*et al.* 的研究中，BCL10 在 Thr81 以及 Ser85 的位置可以被 IKK 磷酸化(這段 IKK 的辨識序列也出現在 I κ B α 上)，BCL10 被磷酸化後可以吸引一種 E3 ubiquitin ligase "β-TrCP" 的結合，進而使 BCL10 經由 proteasome-mediated degradation 而降解，在 NF- κ B pathway 中扮演著負向調控的角色[11]。

BCL10 之切割 (BCL10 cleavage event)

先前在實驗室的研究(附圖二)以及在 Rebeau, F. *et al.* 的研究中[14]，觀察到在 T 細胞活化的後期，BCL10 有被切割(cleavage)的現象，這個切割的被認為是經由 paracaspase "MALT1" 的蛋白水解活性(proteolytic activity)所造成的。BCL10 的切割不影響 NF- κ B 的活化，但可以影響 T 細胞的黏附作用(adhesion)，關於 BCL10 切割的部分在 MALT 的 "caspase-like domain" 中再加以詳述。

1.1.2 MALT1

(Mucosa-associated-lymphoid-tissue lymphoma-translocation gene 1)

發現史

MALT1 是在 t(11;18)(q21;q21) MALT lymphoma 病例中發現[15-17]，此狀態下的 MALT1 失去其 N 端部分區域，而與失去 C 端部分片段的 cIAP2 (cellular

inhibitor of apoptosis protein 2)融合成 cIAP2-MALT1[15]。這種融合蛋白使 MALT1 不需透過 CBM complex 的聚合(oligomerization)就可以活化 NF- κ B，這種不受調控而可以持續活化 NF- κ B 的結果即是造成 lymphoma 的主要原因。

蛋白質組成與特性(附圖一)

MALT1 具有 824 個胺基酸。MALT1 的組成是由 N 端的一個 Death Domain(48-122 amino acid)，接續著兩個 Immunoglobulin-like domain(Ig-like domain)分別位在 128-194 以及 231-295 amino acid；接著是一個 Caspase-like Domain(CLD)(333-456 amino acid)以及位在 C 端的第三個 Ig-like domain[18-20]。

MALT1 的 Ig-like domain 被證明可與 BCL10(107-119 amino acid)有相互作用(interaction)，使 MALT1 與 BCL10 產生聚合反應(oligomerization)透過調控而可以活化 NF- κ B [7, 18]。Caspase-like domain 具有 proteolytic activity 可切割 A20 與 BCL10[14, 21](後詳述)。MALT1 的 C 端則有許多可以發生 ubiquitination 的賴胺酸(Lysine residue) 以及三個提供 TRAF6 結合的序列(P-X-E-X-X-aromatic/acidic) (第 309-319, 651-657, 804-809 amino acids)[20, 22]。death domain 的功能至今仍不清楚。

MALT1 之功能

MALT1 的 Death domain 則一度讓研究人員認為與細胞凋亡(apoptosis)有關，但研究結果顯示 MALT1 與細胞凋亡無關，相反的卻參與 NF- κ B 的活化，因此 death domain 的功能至今仍不清楚。在 T 細胞的活化路徑中，MALT1 可透過和一些蛋白質的相互作用來活化 NF- κ B，有些是平時就可以結合(Constitutive association，例如 BCL10)，有些則是經活化後才會結合(Inducible association，例如 TRAF6、CARMA1)。由先前實驗室的結果(附圖三)與許多研究都顯示在細胞內短暫表現

(transient transfection) BCL10 即可以活化 NF- κ B，但是單獨只有 MALT1 則無法，表示 MALT1 必須透過 BCL10 的聚合作用才具有活化 NF- κ B 的能力。MALT1 與 BCL10 以及 CARMA1 聚合後可以透過 TRAF6 的泛素化能力(The E3 ubiquitin ligase activity)將訊息傳遞至 IKK complex 進而活化 NF- κ B，促進 T 細胞分泌 Interleukin-2 (IL-2)[23]。

MALT1 之 Caspase-like Domain (CLD)活性研究

MALT1 經由生物資訊的方式比對後，因為和 caspase 的序列具有高度相似性，是一種類似 caspase 的蛋白質，為了區別 caspase 和 meta-caspase(另一種類似 caspase 的蛋白質，是一種植物和真菌的蛋白酶)，因此將之命名為 para-caspase[18]。MALT1 與 caspase 有許多相似性，(1)兩者同是屬於半胱氨酸依賴性蛋白酶(Cysteine-dependent protease)，在活性區具有高度保留的組氨酸/半胱氨酸二聚體(His-Cys dyad) (MALT 的胺基酸位置在 His 415/Cys464)。(2)皆需要透過 adaptor 形成聚合體(oligomer)才會活化等等。但兩者之間仍有一些相異處，例如：Caspase 承載受質的 pocket 是兩個帶正電的 basic 胺基酸，因此受質是帶負電的 acidic 胺基酸(例如天門冬胺酸 Aspartate)，而 Paracaspase 的 pocket 是白胺酸 Leucine 以及麩胺酸 Glutamate，因此受質是帶正電(basic)或是不帶電(uncharged)的胺基酸(例如精胺酸 Arginine) [18]。

雖然 MALT1 在 1999 年就發現，但是關於 MALT1 的蛋白水解能力(Proteolytic activity)直到 2008 年才被證實[14, 21]。在 Coornaert, B. *et al.* 的研究中，A20 利用 C 端的 zing-finger 與 IKK γ 結合後，透過 N 端的 OTU domain 將 K63-mediated poly Ubiquitin chain 進行去泛素作用(de-Ubiquitination)，而抑制了 IKK complex 的活化，因此 A20 可以抑制 NF- κ B 的活化[24]，而 MALT1 切割 A20 去除 OTU domain，會使 A20 的抑制功能消失，因而可以活化 NF- κ B；事實上，在淋巴球細胞中確實

比其他細胞表現更多的 A20 蛋白質。

Rebeaud, F. *et al.* 對 MALT1 蛋白水解能力的研究著重在 BCL10，BCL10 的切割發生在靠近 C 端的五個胺基酸(R228 之後)，不同於 A20，當他們用 R228G 模擬一個無法被切割的 BCL10 時，抑制 BCL10 的切割並不會對 NF- κ B 的活化有太大的影響，但是他們用 v-VRPR 抑制 MALT1 的活性後，可以觀察到 NF- κ B 活化的下降，呼應上述 MALT1 切割 A20 可以促進 NF- κ B 的活化。雖然 BCL10 的切割並不是造成 NF- κ B 活化主因，但是切割的結果可以促進 T 細胞活化後透過 β 1-integrin 黏附 fibronectin，有助於 T 細胞與 APC 的接合以及 T 細胞的移行 (migration)[25]。

1.1.3 具有 CARD domain 之銜接蛋白質 (CARD-Containing Adaptor)

發現史

在 BCL10 被發現後，一開始對 BCL10 如何活化 NF- κ B 的機制仍然不清楚，但是 BCL10 在 N 端的 CARD domain 被認為是可以與其他含有 CARD domain 的 NF- κ B 活化蛋白質(NF- κ B activator)進行 homophilic interactions。因此 Bertin 等人開始利用 Mammalian Two Hybrid 的方式尋找可以與 BCL10 結合的蛋白質，首先發現的是 "CARD9"[26]。他們在細胞中送入外生性的 CARD9 與 BCL10 表現時，確實可以活化 NF- κ B，內源性的 CARD9 也可以和 BCL10 結合在一起，因此推測在細胞中 CARD9 可能與 BCL10 形成一個 pre-existing signaling complex，受刺激而活化 NF- κ B。隔年同一個研究團隊利用相同的方法找到 CARD11、CARD14 以及 CARD10 也是可以與 BCL10 CARD domain 結合後而活化 NF- κ B 蛋白質[27, 28]。

蛋白質組成與特性 (附圖一)

CARD9、CARD11、CARD14、CARD10 都是帶有 CARD (caspase-associated recruitment domain)的蛋白質，他們在 N 端的 CARD domain 可以與 BCL10 的 CARD domain 結合，Coiled Coil domain 有助於 self-oligomerization 以及與 MALT1 結合[29]，CARD11、CARD14、CARD10 在 C 端還有一個由 PDZ-SH3-GUK 三個 tripartite domain 所組成的 MAGUK domain(membrane-associated guanylate kinase) 三聚體，因此又可歸屬於 CARMA 家族(CARD-containing MAGUK protein)，因此 CARD11/14/10 又稱為 CARD11(CARMA1)、CARD14(CARMA2)、CARD10(CARMA3)。MAGUK domain 具有可以使 signal complex 聚集到細胞膜上的特定位置的功能[30]。

CARD-Containing Adaptor 在組織中之分佈

不同於 BCL10 在組織的分佈是到處存在的，CARD-Containing Adaptor 在不同組織的分佈具有程度上的特異性。CARMA1(CARD11)、CARMA2(CARD14)、CARMA3(CARD10)雖然在序列以及結構上具有高度的相似性，但是卻有不同的分佈趨勢[27, 28]。CARMA1(又叫做 CARD11 或 Bimp3)主要存在於血球細胞中(hematopoietic cell，例如：spleen、thymus、PBLs)。CARMA2 (又叫做 CARD14 或 Bimp2)只有在胎盤中發現；CARMA3(又叫做 CARD10 或 Bimp1)則是廣為出現在非血球細胞中(Non-hematopoietic cells)；表示在不同的 CARD-Containing Adaptor 可能在不同的細胞中，執行相同或類似的功能。CARD9 與其他 CARMA family 差別在於其只有 N 端 CARD domain 與 Coiled Coil domain，而沒有 linker 以及 C 端的 MAGUK domain。CARD9 主要是分佈在骨髓系細胞中(Myeloid-lineage，例：Macrophage, DC, Neutrophil, Mast cell)。在不同的細胞中會選用不同的 CARD-Containing adaptor protein 組成 CBM complex 來傳遞 NF- κ B 活化路徑[31]。

1.2 CBM complex 在後天免疫訊息傳遞中的角色

(The Role of CBM Complex in Adaptive Immunity)

1.2.1 T 細胞受體之訊息傳遞(T-Cell Receptor signaling)

目前 CBM complex 參與在調控 NF- κ B 活化的角色之研究主要是在 T 細胞的活化。在人體免疫系統中。T 細胞的活化會造成 T 細胞的大量增生(clonal expansion)、分化成功能性 T 細胞以毒殺目標物或是藉由分泌激素(cytokine)以活化其他免疫細胞。這些活化過程如果失去調控，可能會導致免疫缺陷(immunodeficiency)、自體免疫(autoimmunity)或是白血病及淋巴瘤(Leukemia/Lymphoma)

T 細胞受體在接受抗原刺激後，經由一系列的訊息層遞(signaling cascade)引發許多 tyrosine kinase 的磷酸化而活化下游分子，例如 PLC- γ (phospholipase C- γ)，活化的 PLC- γ 可將 PIP₂ (inositol phospholipids)水解成 IP₃ (inositol triphosphates)和 DAG (1,2-Diacylglycerol)。IP₃ 會促使細胞質中的 Ca²⁺濃度升高，協助 DAG 活化 PKC，活化後的 PKC 經由一系列的訊息傳遞活化 IKK complex，再傳遞到轉錄因子(NF- κ B、AP-1、NFAT)[32, 33]，這些轉錄因子即可以啟動下游基因的表現以達到 T 細胞增生(proliferation)、分化(differentiation)以及細胞激素分泌的目的[33, 34]。

NF- κ B 對於 T 細胞的完整活化以及相關的免疫反應而言是必需的[33]。NF- κ B 平時與 I κ B 結合，當細胞活化時，I κ B 會被降解(degradation)而使 NF- κ B 可以進入細胞核，這個機制是由於 I κ B 會遮蓋住 NF- κ B 的入核序列(nuclear localization signal, NLS)；當 T 細胞活化時，一系列的訊息傳遞造成 IKK complex 的活化，IKK complex 包括兩個 catalytic subunit (IKK α 和 IKK β)以及一個 regulatory subunit (IKK γ /NEMO)[35]。IKK 可以被一種 E3 ligase"TRAF6"將 IKK γ /NEMO 接上

K63-linked poly-ubiquitin chain，接著藉由 TAK1 將 IKK β 的兩個絲胺酸(Serine residue)磷酸化，因此活化了 IKK complex[36, 37]。活化的 IKK 可以使 I κ B N 端的絲胺酸(Serine residue)磷酸化(phosphorylation)，導致 I κ B 被泛素化(ubiquitination)接而被一種蛋白質降解酶”proteasome”所降解(proteasome-mediated degradation)。因此 I κ B 的降解使 NF- κ B 原本被遮蔽的 NLS 顯露出來，而能夠從細胞質移位(translocation)至細胞核內，啟動相關的基因轉錄[35]。

1.2.2 CBM complex 參與在 T 細胞受體訊息傳遞

最先對於如何調控 IKK 活化的機制仍不清楚，近年來研究學者在 T 細胞發現了一個由 CARMA1-BCL10-MALT1 所組成的 complex(CBM complex)可能在 NF- κ B pathway 中扮演著中心調控的角色，事實上，由各個實驗結果顯示，CBM complex 缺少任何一個分子都會抑制由 antigen-receptor-mediated NF- κ B 的活化[23, 38-44]。CBM 在 TCR signaling 中扮演著承接 TCR-proximal kinases 到 IKK complex 的角色，是 NF- κ B signaling 的調控中心。

CARMA1 平時透過中間的 linker 而折疊在一起，藉由 MAGUK domain (PDZ-SH3-GUK) 與細胞膜聯繫在一起，而 BCL10-MALT1 則是平時在細胞質內就結合在一起。當 T 細胞活化時，CARMA1 的 linker 經由 PKC 磷酸化後，磷酸化後的 CARMA1 由於構型改變，使折疊的部分攤開而露出 CARD domain 吸引 BCL10 的結合，因此將 BCL10-MALT1 也吸引到細胞膜上抗原受體附近的脂筏(lipid raft)聚合，形成 CBM complex。根據 Yeast two Hybrid 實驗也證明 MALT1 上(在 333 amino acid 之後的區域)也有與 CARMA1 的 coiled-coil domain 有結合的區域，可能藉以穩定 CBM complex[45]。

CBM 聚合後的結果會造成 IKK γ 的 ubiquitination(先前們提過 IKK complex 的活化是透過 IKK γ 的 ubiquitination 與 IKK β 的 phosphorylation)。一部份的研究

人員認為 CBM complex 可以吸引 TRAF6 將 IKK γ 接上 ubiquitin chain，再由 TRAF6 自我 ubiquitination 後，吸引 TAB2/TAK1，TAK 將 IKK β 磷酸化而活化 IKK complex，訊息因而由 CBM complex 傳至 IKK complex [22]，但也有另一個說法認為 TRAF6 將 MALT1 以及 BCL10 進行 ubiquitination 後，可吸引 IKK γ 。雖然 MALT1 有內生性泛素化的能力 (intrinsic Ub ligase activity) [19]，但是較多的研究指出 MALT1 的 C 端被 TRAF6 接上 ubiquitin chain 後可做為 IKK γ docking site [46]，因此可以吸引 IKK complex。

雖然 BCL10 與 MALT1 是 TCR 到 NF- κ B 活化路徑中必要的訊息傳導分子，但是從 *BCL10* 基因剔除小鼠及 *MALT1* 基因剔除小鼠實驗中均證明，在 TNF- α 或 IL-1 受體至 NF- κ B 的活化路徑中，BCL10 與 MALT1 並非必要的參與者 [43, 44]。

1.3 CBM complex 在先天免疫以及非免疫的訊息傳遞

(The Role of CBM Complex in Innate Immunity & Non-Immune signaling)

除了在 lymphocyte [47]，越來越多研究陸續指出 CBM complex 可能也參與在一些 ITAM-containing receptors 的 NF- κ B 訊息傳遞中 (包括 NK cell [48-50]、myeloid cell [51, 52]、mast cell [53, 54]、) 以及 GPCR signaling [55-58]。還有一些研究指出 CARD9-B-M 可能參與在 LPS-TLR4-mediated signaling [59-61]。也有一些研究認為 CBM 是參與在 non-TLR-mediated innate immune response 中 [52]，對於 CBM 是否有參與在 TLR-signaling 仍具有高度的爭議性。目前比較肯定的是 CARMA1-B-M 參與在 TCR/BCR mediated NF- κ B signaling，以及 CARMA3 參與 GPCR-mediated NF- κ B signaling [55]。

第二章、研究目的

根據先前在實驗室(附圖二)以及 Rebeaud, F. *et al.* 的研究中觀察到，BCL10 的切割發生在 T 細胞以及 B 細胞的活化過程中，但是在以 zymosan 刺激 THP-1(monocyte)的 NF- κ B 活化過程中，則沒有看到 BCL10 有發生切割的現象。因此，雖然 BCL10 廣泛存在於各個細胞中，但是 BCL10 的切割卻不是一個共通的現象。雖然已有許多研究專注在 BCL10 參與在 NF- κ B 活化路徑的機制，但是對於 BCL10 切割機制的研究卻付之闕如。根據這個想法，我想要藉由建立各個細胞株模式(Cell-line models)來觀察 BCL10 在 NF- κ B 活化過程中 BCL10 切割發生的情形，藉以探討 BCL10 切割的機制。



第三章、材料與方法

3.1 實驗試劑

3.1.1 Stimuli

PMA(TPA) ----- 50 ng/ml (sigma)

Ionomycin ----- 1 μ M (sigma)

TNF- α ----- 10 ng/ml (Peprotech)

LPS ----- 100 ng/ml (Dr.王錦堂實驗室)

IL-1 β ----- 10 ng/ml (Peprotech)

Zymosan ----- 200 μ g/ml (sigma)

Helicobacter pylori --- 100 M.O.I. (王錦堂實驗室)

3.1.2 Inhibitors

MG132 ----- 10 μ M (Dr.葉秀慧實驗室)

Bay11-7085 ----- 20 μ M (Dr.李財坤實驗室)

BAPTA-AM ----- 40 μ M (Dr.李財坤實驗室)

3.1.3 其他

Complete protease inhibitor cocktail tablet (Roche)

DMEM、RPMI-1640 (Gibco)

Protein G sepharose (GE)

Alkaline phosphatase, calf intestinal (CIAP) (NEB)

Hybond-P membrane (GE)

3.2 抗體

3.2.1 一級抗體(primary antibodies)

BCL10(331.3):mouse monoclonal antibody (Santa Cruz)

MALT1(H-300) : rabbit polyclonal antibody (Santa Cruz)

I κ B α (C15) : rabbit polyclonal antibody (Santa Cruz)

CARMA1 : rabbit polyclonal antibody (AnaSpec)

α -tublin(DM1A) : mouse monoclonal antibody (Abcam)

3.2.2 二級抗體(secondary antibodies)

sheep anti-mouse IgG antibody (Amersham)

donkey anti-rabbit IgG antibody (Amersham)

goat anti-mouse IgG antibody (Jackson)

3.3 溶液配製

3.3.1 **Lysis buffer**: 50 mM Tris-HCl PH 7.4, 150 mM NaCl, 1mM EDTA PH 8.0, 1% NP-40, 0.25% Sodium deoxycholate; 使用前添加 1 mM Na₃VO₄, 1 mM NaF 以及 Protease inhibitor(Roche)

3.3.2 **SDS sample buffer**(gel loading buffer) : glycerol , 9.4 ml 1M Tris pH 6.8 , 7.5 ml β -mercaptoethanol , 15 ml 20% SDS , 37.5 mg bromophenol blue)

3.3.3 **Running buffer** : 0.25M Tris-HCl, 1.92M Glycine, 0.1% SDS)

3.3.4 **Transfer buffer** : 0.25M Tris-HCl, 1.92M Glycine, 20% v/v methanol

3.3.5 **Blocking buffer** : 5% milk in TBST

3.3.6 **TBST** : 0.2M Tris, 1.5M NaCl 以 HCl 調整 PH 值至 7.2-7.4

3.3.7 **2 \times HBS** : 0.28M NaCl , 1.5 mM sodium phosphate , 50 mM HEPES , pH 7.0

3.4 細胞培養 Cell Lines

所有細胞株皆培養於 5% CO₂，37°C 培養箱中。除了 NK92MI，其餘細胞的培養液(RPMI-1640、DMEM)中均添加 10% 胎牛血清(fetal bovine serum)、100 unit/ml penicillin G、50μg/ml streptomycin、1.25μg/ml fungizone 或 amphotericin B 及 100 mM NEAA (non-essential amino acid)，稱為 complete medium。

3.4.1 人類淋巴球細胞株(Jurkat T cell、Raji B cell、Akata B cell)

懸浮型細胞，細胞培養液 RPMI-1640，細胞培養濃度約為 1×10^5 - 1×10^6 cells/ml(不可超過 3×10^6 cells/ml)，每 2-3 天進行繼代培養，繼代培養可直接添加新鮮培養液，或先將細胞低速離心再以新鮮的培養液將細胞重新懸浮，懸浮後以適當比例稀釋後，繼續進行培養。

3.4.2 Raw264.7 為老鼠巨噬細胞株

貼附型細胞，細胞培養液為 DMEM，細胞在 10 公分盤，以 5-10ml 的培養液進行培養，待 8 成滿時，在培養液中以刮棒刮起細胞，再以 1:8 稀釋後每 2-3 天進行繼代培養。(Dr. 伍安怡老師實驗室)

3.4.3 THP-1 為人類單核球細胞株，

細胞培養液為添加 0.05mM β-mercaptoethanol 的 RPMI-1640，平時培養狀態為懸浮細胞，在受到 PMA 長時間(>24 hrs)刺激後，會分化成貼附型的巨噬細胞。細胞培養濃度約為 4×10^4 - 8×10^5 ，不可超過 1×10^6 。繼代方式同上。(Dr. 張智芬老師實驗室)

3.4.4 AGS 為人類胃癌細胞株

貼附型細胞，細胞培養液為 RPMI-1640，細胞在 10 公分盤，以 5-10ml 的培養液進行培養，待 8 成滿時，以 0.25% trypsin 於 37°C 下作用 5 分鐘，再以 1:6 稀釋後每 2-3 天進行繼代培養。(Dr. 王錦堂老師實驗室)

3.4.5 HeLa 為人類子宮頸癌細胞株

貼附型細胞，細胞培養液為 DMEM，細胞在 10 公分盤，以 5-10ml 的培養液進行培養，待 8 成滿時，以 0.25% trypsin 於 37°C 下作用 5 分鐘，再以 1:6 稀釋後每 2-3 天進行繼代培養。(Dr. 呂勝春老師實驗室)

3.4.6 NK92MI

NK92MI 為一種可以快速生長且可以自行分泌 IL-2 而不需額外補充的人類自然殺手細胞株，其細胞培養液為不含核糖核酸以及去氧核糖核酸的，但含有 2 mM L-glutamine 以及 1.5 g/L sodium bicarbonate 的 α -MEM；此培養液需添加 0.2 mM inositol (sigma); 0.1 mM 2-mercaptoethanol; 0.02 mM folic acid (sigma); 12.5% 馬血清 and 12.5% 胎牛血清。細胞培養濃度為 $2-3 \times 10^5$ cells/ml，注意細胞濃度不可過高或培養液過黃，每 2-3 天進行繼代培養，繼代培養可直接添加新鮮培養液，或先將細胞低速離心再以新鮮的培養液將細胞重新懸浮，懸浮後以適當比例稀釋後，繼續進行培養。(新光醫院血液腫瘤科)

3.5 蛋白質樣品處理

不同的細胞施以不同的刺激活化後，收集不同的時間點(time course experiment)，以 modified RIPA Lysis buffer 裂解細胞之後，以 13,000 rpm 高速離心 15 分鐘，收集上清液(supernatant)即為細胞蛋白質(total lysate)，以 OD 595nm 測定蛋白質濃度後，Total lysate 或 IP，SDS-PAGE，實驗結果以 western blot 呈現。

3.6 SDS-PAGE

(Sodium dodecylsulfate-polyacrylamide gel electrophoresis)

蛋白質加入 SDS sample buffer (gel loading buffer) 後，利用 100°C 加熱 10 分鐘，使蛋白質 denature，迅速置於冰上避免其 renature。Sample loading 後，以 80 伏特進行電泳 30 min，待樣品進行 stacking 膠層後，再以 120 伏特進行蛋白質分離。

3.7 西方墨點法 (Western blot)

電泳後，先將 gel 泡在 transfer buffer 中 30 分鐘，接著將 gel 轉漬至 PVDF 上，固定電流 300 mA 進行 1-2 小時。接著以 5% non-fat milk 的 TBS-T buffer (0.1% Tween-20 in TBS buffer) 進行 blocking 1 小時。置於一級抗體 (in blocking buffer) 中，於 4°C 反應 12 小時以上。隔日在室溫以 TBS-T 清洗三次，每次 10 分鐘；二級抗體 (in blocking buffer) 室溫作用 1 小時，以 TBS-T 清洗三次，每次 10 分鐘，將 membrane 淋上 ECL substrate (GE) 後，以 X-ray film 顯影。

3.8 免疫沈澱法 (Immunoprecipitation) 和磷酸水解酶 (CIAP) 處理

Total lysate 得到方式如前所述，取 500 μ g 的 total lysate 與 2 μ l anti-BCL10 Ab 在 4°C 作用 overnight 後，加入 Protein G (GE) 20 μ l 4 小時，3,000 rpm 離心 3 分鐘 (Heraeus Biofuge fresco)，除去上清液，以 lysis buffer 200 μ l 清洗 2 次，以 1X NEB buffer No.3 100 μ l 清洗 2 次，分成兩等份，一份加入 1 μ l Alkaline phosphatase, calf intestinal (CIP) (NEB) 在 37°C 水浴中作用 1-2 小時進行去磷酸化作用；另一份直接離心除去上清液後，加入 15 μ l 2X sample buffer 後，在 100°C 煮 10 分鐘，進行西方墨點法。

3.9 磷酸鈣轉染法(Calcium Phosphate Transfection)

將 2 到 3 成的細胞到 6 well 中，(以 293T 為例，每個 well 中含 $2-4 \times 10^5/2\text{ml}$ 的細胞)，隔日將欲轉染的 DNA $2.5\mu\text{g}$ 加入 $125\mu\text{l}$ 的 0.5M CaCl_2 ，補水至 $250\mu\text{l}$ ，混合均勻後，將 CaCl_2/DNA 混合液以打氣泡的方式緩慢加到 $250\mu\text{l}$ 的 2X HBS 溶液中，再 vortex 20 秒，於室溫下靜置 20 分鐘後，均勻加入每個 dish 中(每個 6 well 加入 $250\mu\text{l}$ DNA-calcium phosphate complex 溶液)，培養 16 小時後，以 warm PBS 清洗兩次，添加新鮮培養液，培養 24-48 小時後可進行分析。

註：使用不同尺寸的細胞培養盤，應根據相對底面積調整實驗所需的細胞數、質體量等。

3.10 核酸干擾(RNA interference)

3.10.1 Lentiviral production

使用生長十代以內的 293T 細胞，利用磷酸鈣轉染法，以 10 公分培養盤為例， 5ml 的培養液中含有 1.2×10^6 的細胞，將 $5\mu\text{g}$ package plasmid (pCMV- $\Delta\text{R8.91}$: pMD.G : pLKO.1-shRNA vector 比例為 9 : 1 : 10) 加入 $125\mu\text{l}$ 的 0.5M CaCl_2 ，補水至 $250\mu\text{l}$ ，混合均勻後，緩慢加到 $250\mu\text{l}$ 的 2X HBS 溶液中，每個 10 cm plate 加入 $500\mu\text{l}$ DNA-calcium phosphate complex 溶液，置於 $37^\circ\text{C}/5\%\text{CO}_2$ 培養箱中，16 小時後，清洗以及置換含 1% BSA 的新鮮培養液 5ml ，medium 置換培養 24 小時後收集 medium(5ml) 放在 4°C 保存，再添加含 1% BSA 的新鮮培養液 5ml ，繼續培養 24 小時後收集 medium(5ml)，將兩次 medium 收集在一起(10ml)於 4°C ， 3000 rpm 離心 10 分鐘除去細胞殘渣，此上清液含有 lentivirus 病毒顆粒，可直接進行感染細胞，或分裝儲存在 -80°C 。

3.10.2 Lentivirus infection

將含有病毒顆粒的細胞培養液加入欲感染的細胞，以 6 well 為例，用 2ml 含病毒的培養液(1ml virus+1ml DMEM containing 8 μ g/ml polybrene) 感染 5X10⁵ 的 HeLa，24 小時後置換新鮮的培養液，感染後 48 小時可進行 puromycin selection(HeLa cell 的 M.I.C. 為 1 μ g/ml)，感染後至少 4 天方能達到 protein knockdown 效果。

註：詳細步驟請參考中研院 RNAi core

3.11 冷光酵素測定法(Luciferase assay)

將 HeLa cell seedling 於 24 well 中，每個 well 含 2x10⁴ cell/500 μ l。第二天用磷酸鈣轉染法，將(pNF- κ B-Luc 0.5 μ g、pCMV-Renilla-Luc0.25 μ g 以及 DNA 2 μ g) 加入 125 μ l 的 0.5M CaCl₂，補水至 250 μ l，混合均勻後，緩慢加到 250 μ l 的 2X HBS 溶液中，每個 24 well 加入 50 μ l DNA-calcium phosphate complex 溶液)，培養 16 小時後，清洗以及置換新鮮培養液，培養 48 小時後進行分析。

以 IL-1 β 刺激 HeLa 不同時間後，統一除去培養液，以 PBS 清洗一次後，每個 well 加入 30 μ l 含 0.2% 血清的 DMEM。以及 30 μ l Dual-GloTM Luciferase Assay Buffer I，室溫作用 10 分鐘後，1 小時以內以冷光測定 NF- κ B(DG1)，再加入 60 μ l Dual-GloTM Luciferase Assay Buffer II 室溫反應 10 分鐘，1 小時以內以冷光測定 Renilla(DG2)。將實驗組之 DG1/DG2 數值除以控制組(空質體)之 DG1/DG2 數值，所得之數值即為相對 NF- κ B 活化能力。

3.12 *Helicobacter pylori* 感染

H. pylori 處理：養在 10 公分的 blood agar plate 中，在微需氧環境下培養，使用的

時候，以 PBS 2ml 將 HP 收集至 eppendorf，離心 7,000 rpm/1 分鐘(Heraeus Biofuge fresco)，去除上清後以 1ml PBS resuspension，離心 7,000 rpm/1 分鐘(Heraeus Biofuge fresco)，除去上清液後以不含抗生素的 RPMI resuspension，以 O.D.600nm 測定吸光值(1 OD 600nm 相當於 1×10^9 CFU/ml)。

AGS 細胞在感染之前，置換成不含抗生素的 RPMI，以 M.O.I.=100 的 HP 進行感染，以十公分盤為例，約有 5×10^6 個細胞，M.O.I.=100 表示有 5×10^5 CFU。

3.13 小量質體製備 (Mini-plasmid preparation)

用無菌牙籤挑出含有質體的單株大腸桿菌 DH5 α F'，置於含有 50 μ g/ml ampicillin 的 3ml LB 培養液中，於 37 $^{\circ}$ C、150rpm 的培養箱中培養 16 小時。第二天取出 1.5ml 菌液以 13,000 rpm(Heraeus Biofuge fresco)、5 分鐘離心 (Heraeus Biofuge fresco)，去除上清液，加入 100 μ l solution I (50 mM glucose, 10 mM EDTA, RNAase A 10 μ g/ml, 25 mM Tris-Cl pH8.0) 將菌體打散，再加入 100 μ l solution II (0.2M NaOH, 1%SDS) 並輕微的翻轉數次，接著加入 100 μ l solution III (3M potassium acetate pH 4.8, 12% glacial acetic acid) 輕微的翻轉數次，以 13,000 rpm (Heraeus Biofuge fresco)、4 $^{\circ}$ C、離心 10 分鐘，吸取上清液至另一個新的 1.5 ml 微量離心管，加入 2.5 倍體積 100% 冰酒精，置於 -20 $^{\circ}$ C 沉澱 1 小時，再以 13,000 rpm (Heraeus Biofuge fresco)、4 $^{\circ}$ C、10 分鐘離心，棄上清液，此時可見 DNA (白色沈澱物質) 於管底，再以 200 μ l 70% 酒精洗沈澱物，以 13,000 rpm (Heraeus Biofuge fresco)、4 $^{\circ}$ C、5 分鐘離心，棄上清液，真空乾燥 DNA，最後用 30~50 μ l 的 TE (10 mM Tris pH 8.0, 1 mM EDTA pH 8.0) 回溶，保存於 4 $^{\circ}$ C 冰箱。

3.14 大量質體製備 (Maxi-plasmid preparation)

用無菌牙籤挑出含有質體的單株大腸桿菌 DH5 α F'，置於 5 ml LB 且含 50 μ g/ml

ampicillin 培養液中，於 37°C、150 rpm 的培養箱 16 小時。第二天將此菌液倒入 500 ml LB 含 50µg/ml ampicillin 培養液中繼續培養約 5~8 小時，待菌液的 OD₆₀₀ 約 0.8~1.0，再加入 2.5 ml chloramphenicol (34 mg/ml)，再繼續培養至隔天。第三天用 Beckman JA-10 rotor，6000 rpm、4°C、離心 15 分鐘收集菌體，以 18 ml solution A (0.9% glucose, 25 mM Tris pH 8.0, 1 mM EDTA pH 8.0) 徹底打散菌液，再加入 2 ml solution B (4% lysozyme in solution A) 輕輕搖晃並靜置室溫 10 分鐘，之後加 40 ml solution C (0.8% NaOH, 1% SDS) 輕輕搖晃至溶液呈透明黏稠狀，加 20 ml solution D (3 M potassium acetate, 12% glacial acetic acid) 輕輕搖晃，此時可見白色棉絮狀物質產生，以 Beckman JA-10 rotor 9,000 rpm、4°C、20 分鐘離心，再用 4~5 層紗布過濾上清液，加 0.6 倍體積的 isopropanol，-20°C 沈澱 1 小時，以 Beckman JA-10 rotor 9,000 rpm、4°C、20 分鐘離心，棄上清液，以 10 ml solution E (200 mM Tris pH 8.0, 70% EtOH) 沖散 DNA，轉移至 50ml corning tube 以 12,000 rpm、4°C、20 分鐘離心(KUBOTA 1920 離心機)，棄上清液，真空乾燥 DNA，再以 4 ml TE8.0 回溶。加入 4.6 克 CsCl 及 350µl EtBr (10 mg/ml)，混合均勻後再轉移至 Beckman quick seal 的離心管中，開口處加熱封管，平衡需精確至小數點以下第二位，在 25°C 下以 55,000 rpm (Beckman VTi 80)、離心 16~20 小時，離心完成後，在 UV 照射下，約在離心管中央可見超螺旋質體 (supercoiled form)，於管頂以針頭戳入破真空，再以 18 號針頭抽出質體，置於 15ml corning tube，以等體積的 isopropanol (saturated with 5 M NaCl) 萃取 7~8 次，直到水層沒有 EtBr，再移至 50ml corning tube，加 3 倍體積 TE8.0 混合均勻，再加入 2 倍體積 100% 酒精，-20°C 作用 1 小時，以 12,000 rpm、4°C、離心 20 分鐘(KUBOTA 1920 離心機)，用 2 ml 70% 酒精洗 DNA，最後真空乾燥之，以 300~500µl TE8.0 回溶，再用光度比色計 (Beckman DU-64 spectrophotometer) 測定 OD_{260/280} 吸光度，1 OD₂₆₀ = 50µg/ml 之 DNA，可求得 DNA 濃度。

第四章、結果

4.1 建立各種細胞活化 NF- κ B 路徑的模組

先前在實驗室的結果(附圖二)以及在 Rebeaud, F. *et al.*的實驗中觀察到，BCL10 的切割發生在 T 細胞以及 B 細胞的活化過程中，但是在以 zymosan(酵母菌細胞壁的成分)刺激 THP-1(monocyte)的 NF- κ B 活化過程中，則沒有看到 BCL10 有發生切割的現象[14]。因此，雖然 BCL10 廣泛存在於各種細胞中，但是 BCL10 的切割卻不是一個共通的現象。於是本研究著手建立各個細胞由 BCL10 所媒介的 NF- κ B 路徑的活化模組，觀察 BCL10 的切割是否只存在於特定的細胞中。

4.1.1 淋巴球系血球細胞 (Hematopoietic cells : Lymphoid-lineage)

目前 BCL10 的角色在 T 細胞的研究中最為透徹，因此一開始我們先以 T 細胞模組做為實驗條件環境的建立。當 T 細胞受體(T-cell receptor, TCR)啟動活化時，活化的磷脂酶 C- γ (Phospholipase C- γ)可將 PIP₂ (Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate)水解成 IP₃ (inositol triphosphates)和 DAG (1,2-Diacylglycerol)。IP₃ 會促使細胞質中的 Ca²⁺濃度升高，協助 DAG 活化 PKC，再將訊息傳至 CBM complex 後，活化 NF- κ B 路徑，促進 T 細胞分泌 IL-2。在本實驗研究中，我們以 PMA/ionomycin (以下簡稱 P/I) 的刺激來模擬 PKC 的活化，PMA (phorbol myristyl acetate)或稱做(12-O-tetradecanoyl-phorbol-13-Acetate, TPA)在本實驗中作為 DAG 的 agonist，其結構類似 DAG 可結合到 PKC 上；ionomycin 則是鈣離子的離子載體(ionophore)用以提高細胞質中 Ca²⁺濃度。

在(圖一 A)中，可以看到在施以 P/I 刺激 15-30 分鐘時，IkB α 有發生降解的情形，這是因為 NF- κ B 活化過程中，IkB α 經由磷酸化(phosphorylation)，而後泛素

化(ubiquitination)，接著被 proteasome 所降解後，釋放 NF- κ B 進入核中啟動轉錄作用，因此在這邊我們以 I κ B α 的降解用來表示 NF- κ B 路徑的活化。利用免疫沈澱法(Immunoprecipitation, IP)將細胞內的 BCL10 沈澱出來，在 P/I 處理 15 分鐘後，在 BCL10 的上方開始出現一個分子量較大的蛋白質，這個較大分子量的蛋白質在經由磷酸水解酶(Calf Intestinal Alkaline Phosphatase, CIP)的處理後即消失，證實為磷酸化的 BCL10，如同之前的研究結果[3, 4](圖一 A, Lanes 7-12)。除此之外，在 P/I 刺激後的 60 分鐘後，BCL10 的下方開始出現一個分子量較小的蛋白質，如同本實驗室先前的實驗結果和 Rebeaud, F. *et al.* 的研究，這是 BCL10 被切割後的片段，在 P/I 處理後的 2-4 小時後，BCL10 幾乎只剩下切割後的蛋白質。在 Rebeaud, F. *et al.* 的觀察中，BCL10 的切割可持續至 6 小時以上，這個切割的情形在 CIP 處理之後更加顯而易見。

TNF- α 傳遞的 NF- κ B 活化路徑不需要透過 CBM complex 的調控，因此在 Jurkat T 細胞處以 TNF- α 刺激後，可以看到 NF- κ B 的活化，但是 BCL10 則沒有磷酸或切割的變化(圖一 B)，因此 TNF- α 可做為一個 BCL10 切割的控制組(Negative control)。接著我們選用了兩個 B 細胞株 RaJi 以及 Akata(圖二 A、B)，在 P/I 刺激後，也可以觀察到相類似的模式(pattern)，因此如同 Rebeaud, F. *et al.* 的實驗，我們在淋巴球中確實觀察到 BCL10 切割的現象。

4.1.2 骨髓系血球細胞 (Hematopoietic cells : myeloid- lineage)

我們選用老鼠的巨噬細胞株"Raw264.7"以及人類單核球細胞株"THP-1"做為模組，觀察在非淋巴系的血球細胞株是否也可以發生 BCL10 的切割。在這套模組中，我們以脂多醣(Lipopolysaccharide, LPS)以及酵母多醣(zymosan)做為活化 NF- κ B 的刺激物。LPS 為革藍氏陰性細菌(Gram negative bacterium)細胞壁的成分，可以透過 TLR4 的訊息傳遞活化免疫細胞(例如：巨噬細胞、白血球等)，經由 NF- κ B

活化路徑釋放細胞激素等免疫反應[62]。Zymosan 是酵母菌細胞壁多醣體的衍生物，由 β -glucan、mannans、chitins 所組成，其中 β -glucan 佔了組成成份的 50%-60%，zymosan 經由細胞的型態辨識受體(pattern recognition receptor, PRR) "Dectin-1"，使細胞經由 NF- κ B 活化路徑啟動免疫反應[63-65]。

由我們的實驗可以看見，用 LPS 刺激 Raw264.7 細胞株後(圖三 A)，可以看到 IkB 的降解，顯示 NF- κ B 有活化，可是卻不見 BCL10 的變化。在 THP-1 cell 的模組中，以 LPS 的刺激後，亦可以看見 IkB α 的降解，而 BCL10 也是沒有變化(圖三 B)，而以 zymosan 刺激 THP-1 細胞後可以看見 IkB α 的降解，但是 BCL10 亦不見切割的現象(圖三 c)。

4.1.3 非血球系細胞(Non-Hematopoietic cells)

接下來我們選用了人類子宮頸癌細胞株"HeLa cell"以及人類胃癌細胞株"AGS cell"做為非血球細胞株的模組。

在 HeLa cell 的模組中(圖四)，我們使用 IL-1 β 刺激 HeLa 細胞活化 NF- κ B[66, 67]，當 HeLa cell 經由 IL-1 β 的刺激後確實有造成 IkB α 的降解(NF- κ B 的活化)，但是 BCL10 並沒有切割的變化(圖四 A)，為了釐清 BCL10 無切割的變化是否因為 BCL10 沒有參與在這條活化路徑中，因此我們利用核酸干擾技術(si-RNA)，減少細胞中 BCL10 mRNA 的含量，使 BCL10 蛋白質的表現量減少(圖四 B)，觀察在 IL-1 β 刺激後，核酸干擾 BCL10(si-BCL10)後的 HeLa cell 中 NF- κ B 的活化是否有受到影響。如圖所示，si-BCL10 不影響 IkB α 的降解(圖四 C)，同時我們也利用了冷光酵素測定法(Luciferase reporter assay)再次驗證 siBCL10 不影響 NF- κ B 的活化(圖四 D)。因此得知 BCL10 並沒有參與在 IL-1 β 在 HeLa 細胞中所誘導的 NF- κ B 活化路徑中。

在 AGS 的模組中(圖五)我們使用胃幽門桿菌(*Helicobacter pylori*, *H. pylori*)對 AGS 細胞進行感染來活化 NF- κ B 路徑。當 AGS 受到 *H.Pylorori* 感染後，細胞產生型態上改變[68, 69]，細胞會逐漸分散以及拉長成細條狀(因為狀似蜂鳥的嘴巴，稱為 humming-bird phenotype)，做為感染成功的指標(圖五 A)。AGS 細胞經 *H.Pylorori* 感染後，可以活化 NF- κ B，BCL10 在 1 小時的時候也有明顯的磷酸化現象，但是並沒有切割的情形發生(圖五 B)。

4.1.4 自然殺手細胞(NK cell)

活化的 NK cell 可以透過 NF- κ B 活化路徑釋放細胞激素(例如：TNF- α 、GM-CSF、IFN- γ [70-72])或是進行細胞毒殺(cytotoxicity)。最近幾篇研究指出 NK cell 可以透過 CARMA1-BCL10-MALT1 complex 參與在 NK cell 活化 NF- κ B 的路徑中，造成細胞激素的分泌，但是 CBM complex 不參與在細胞毒殺的訊息傳遞路徑中[48, 49]。在這裡我們也試著用 P/I 活化 NK cell 觀察 BCL10 切割的情形。當我們以 P/I 刺激後，發現 NK 細胞的結果與 T 細胞以及 B 細胞一樣，在 I κ B α 的降解之後會出現 BCL10 切割的現象(圖六)。

4.2 BCL10 切割的機制

4.2.1 IKK 的活性參與 BCL10 切割的機制

由許多研究指出 BCL10 可以參與活化 NF- κ B 的路徑中[7, 43, 73, 74]，在本研究中可以看出切割的時間是發生在 NF- κ B 活化之後(圖一、二)，因此我們想知道 NF- κ B 的活化路徑中是否存在可以調控 BCL10 切割的因子。在這個部分我們選用了兩個 NF- κ B 活化路徑的抑制劑(inhibitor)“MG132”以及”Bay 11-7085”來探討

這方面的機制。

MG132 是一種 proteasome inhibitor，其抑制 NF- κ B 的機制在於抑制 I κ B α 的降解，因此 NF- κ B 無法自 I κ B α 上被釋放以進入核中進行轉錄作用。本研究以 Jurkat T 細胞為實驗模組，在事先處理 MG132 的實驗組(圖七 A, Lanes 5-8)，可以觀察到經由 P/I 刺激後 I κ B α 可以被磷酸化，但無法被降解，用以確認 MG132 的效果，事先處理 MG132 的實驗組並沒有影響 BCL10 切割的現象(圖七 B)。另一個抑制劑”Bay11-7085”抑制 NF- κ B 的機制在於抑制 IKK 的活性，因此影響了 I κ B α 的磷酸化而使 I κ B α 無法降解而影響 NF- κ B 的活化，在事先處理 Bay11-7085 的實驗組(圖八 A, Lanes 5-8)，I κ B α 的量沒有被降解，但是事先處理 Bay11-7085 的實驗組相較於 DMSO 處理的控制組(圖八 B)，可以看出 BCL10 的切割有被抑制的現象。

由這兩個結果可知抑制 I κ B α 的降解並不會影響 BCL10 的切割，但是抑制 I κ B α 的磷酸化會造成 BCL10 切割的抑制，因此我們推論 IKK 的活性可能是影響 BCL10 切割的關鍵。

4.4.2 鈣離子(Calcium)參與 BCL10 切割的機制

在本研究中，我們以 PMA/Ionomycin 刺激細胞活化 NF- κ B，其中 ionomycin 會增加細胞中鈣離子的濃度，可能活化一些鈣依賴性的蛋白酶(Ca²⁺ dependent protease)，因此我們想釐清 BCL10 的切割是否有可能是由 Ca²⁺ dependent protease 所造成的。我們分別將細胞處以 PMA/Ionomycin、只有 PMA 以及只有 ionomycin 三個實驗組(圖九)，我們可以看到在 P/I(圖九, Lanes 2-5)以及只有 PMA 處理的實驗組(圖九, Lanes 6-9)中，細胞依然可以活化 NF- κ B，但是只有 ionomycin 處理的實驗組中則無法活化(圖九, Lanes 10-13)，顯示只有鈣離子並不足以活化 NF- κ B。在只有 ionomycin 處理的實驗組中可以看到 BCL10 沒有切割的現象，因此可以初步排除 Ca²⁺ dependent protease 是造成 BCL10 切割的因子(圖九, Lanes 10-13)。另

一方面，只有 PMA 處理的實驗組雖然 NF- κ B 可以被活化，但程度不及 P/I；另外，只有處理 PMA 的實驗組在 BCL10 的切割程度不如 P/I 的實驗組，由上述結果可以顯示鈣離子可以幫助細胞 NF- κ B 的活化，並且 BCL10 的切割可能需要鈣離子的參與。

為了進一步探討鈣離子在 BCL10 切割機制的重要性，我們利用一種類似 EGTA 的細胞內鈣離子螯合劑 BAPTA-AM 來做測試(圖十)。P/I 處理下，可以觀察到 NF- κ B 活化以及 BCL10 的切割(圖十, Lanes 1-4)，但是在沒有鈣離子(圖十, Lanes 5-8)或是抑制細胞內鈣離子濃度(BAPTA-AM 前處理的實驗組)(圖十, Lanes 9-12)的情況下，可以看到 BCL10 的切割的程度有減少的趨勢，因此我們推論鈣離子可能參與在 BCL10 的機制中。

總和以上所述，在 T 細胞、B 細胞以及 NK 細胞以 P/I 的刺激下透過 CARMA1-BCL10-MAL1 complex 活化 NF- κ B 之後，可以觀察到 BCL10 的切割，而這個切割的機制可能與 IKK 的活性以及鈣離子的參與有關。

第五章、討論

CBM complex 在 NF- κ B 活化路徑中扮演一個中心調控的角色，在 T 細胞以及 B 細胞的研究，對於這方面的訊息傳遞路徑已漸趨明朗，但 CBM complex 在其他細胞的機制仍有許多的未知。先前在實驗室以及 Rebeaud, F. *et al.*(2008)的研究中都可發現 BCL10 在 T 細胞活化之後有被切割的現象，但是對於廣泛存在於各組織的 BCL10，是否在其他細胞也有發生相同的情形則不得而知。因此，本研究建立 BCL10 參與在各種細胞 NF- κ B 活化路徑的模組，觀察 BCL10 發生切割與否，利用細胞的差異性，試圖探討 BCL10 切割的機制。

5.1 BCL10 的切割需要 MALT1 以及額外因子的參與

BCL10 的切割現象需要 MALT1 的活性[14]。雖然各種細胞都有 BCL10-MALT1 雙聚體，但是根據我們實驗的結果，我們在淋巴系、骨髓系以及非血球細胞的模組中，BCL10 的切割卻只出現在淋巴球(T 細胞與 B 細胞)以及 NK 細胞的模組中(圖一、二、六)，因此可以得知雖然 MALT1 對 BCL10 的切割是必需的，但是卻不足以完成切割的動作，表示這個切割的機制可能還需要別的因子參與。

5.2 CARMA1-BCL10-MALT1 的選用可能是造成切割的原因

根據上述描述，目前我們觀察到結果是 BCL10 的切割只發生在淋巴球細胞以及 NK 細胞，而沒有出現在非淋巴系的血球細胞(Raw264.7、THP-1)以及非血球細胞(HeLa、AGS)中。因此我們開始思考這些細胞間訊息傳遞路徑的差異性 既然各個細胞都含有 BCL10-MALT1，那麼差異點之一就在於淋巴球與其他細胞對於 CARD adaptor 的選用。由序論所提及的，CARD-containing adaptor 在不同組織具

有不同程度的特異性，細胞會選用不同的 adaptor protein 組成 CBM complex 來傳遞 NF- κ B 活化路徑[31]，例如淋巴系 (Lymphoid-lineage) 血球細胞的 CBM complex 組合為 CARMA1-BCL10-MALT1，而非淋巴系血球細胞(Myeloid-lineage)的組合則為 CARD9-BCL10-MALT1。為了釐清是否為 CARMA1(淋巴系細胞)與 CARD9(骨髓系細胞)選用的差異造成是否切割的關鍵，因此選用了自然殺手細胞株(NK92MI)為模組來進行實驗(圖六)。自然殺手細胞(Nature Killer Cell)的特性介於淋巴系與骨髓系血球細胞之間，NK 細胞辨識目標物後可毒殺細胞或分泌細胞激素活化其他免疫反應，因為辨識目標物的受體屬於非抗原性的受體(non-antigen specific receptors)，因此跟骨髓系細胞一樣歸類為先天性免疫反應(innate immunity)，但是 NK 細胞在發育上的過程以及訊息傳遞的路徑都比較類似 T 細胞。在 NF- κ B 活化的路徑中，NK 細胞的受體與骨髓系細胞的受體皆是透過 ITAM-containing adaptor” DAP12”或是”FcR”傳遞訊息，但是 NK 細胞的 CBM complex 的組合則是跟淋巴系細胞相同，是為 CARMA1-BCL10-MALT1[49, 75, 76]。當我們以 P/I 刺激後，發現 NK 細胞也可以出現 BCL10 切割的現象。因此可以顯示 BCL10 的切割可能與 CARMA1 的使用有關係。

在這裡有個爭議點，由於在我們使用的細胞模組中，根據不同的細胞是施以不同的刺激去誘導 NF- κ B 活化路徑，例如淋巴球以及 NK 細胞是直接以 P/I 處理，不經由抗原受體直接模擬 PKC 的活化，可以觀察到 BCL10 的切割。而骨髓系的細胞則是以 LPS(透過受體 TLR4)[59-61]與 zymosan(透過受體 dectin1)[52, 64, 65]，*H. Pylori* (透過細菌的 cagA 蛋白質)[68, 69, 77]來活化 NF- κ B，並沒有觀察到 BCL10 的切割。因此是否因為不同刺激所以訊息傳遞的有所不同，因此造成徵召的 adaptor 有所差異。

NK 細胞的受體與骨髓系細胞的受體皆是透過 ITAM-containing adaptor” DAP12”或是”FcR”傳遞訊息，因此 NK 細胞其切割的原因是因為透過 P/I 活化 PKC

而活化 CARMA1，還是可以經由 DAP12 或 FcR 傳遞到 CARMA1 而活化訊息導致切割?因此在這個部分應該同時比較 NK 細胞以 DAP12 或 FcR 之 agonist 為刺激來源以及骨髓系細胞施以刺激 P/I，釐清是否因為不同刺激(或 ligand)傳遞不同的訊息影響 CARMA1 的選用而造成切割。

事實上，Hara, H. *et al.*(2008)的研究中，利用 P/I 刺激樹狀細胞(Dc)可以透過活化 NF- κ B[78]，但他們並沒有觀察 BCL10。在我們的研究也將 Raw264.7(macrophage)與 THP-1(monocyte)處理 P/I(圖十一)，很遺憾的是我們並沒有觀察到 NF- κ B 的活化，因此無法釐清 BCL10 的無法切割是否因為刺激不同的關係。關於我們與 Hara, H. *et al.*(2008)結果相異可能是因為細胞的不同而造成的差異。但是我們在 HeLa 與 293T 細胞中以 P/I 刺激時(圖十二)，在有活化 NF- κ B 的情況下，也沒有觀察到 BCL10 的切割，因此可以初步了解切割的與否並非因為刺激的來源不同，而是與細胞的特質比較有關係。

若想要瞭解為什麼 CARMA1 的使用可以造成切割而 CARD9 不行，應該著手探討 CARMA1 與 CARD9 的差異性，這兩個 CARD-containing adaptor 最主要的差異點在於 CARD9 缺少 Linker 以及 MAGUK 三聚體的部分。為了探討是否 MAGUK 是否為影響切割的主因，未來我們的研究重點將放在同樣也具有 MAGUK 三聚體的 CARMA3 是否也有相同切割的現象。CARMA3 存在於 GPCR signaling 中[55-58]，因此本實驗室已開始建立兩個內皮細胞株(分別為人類臍帶血內皮細胞：Human Umbilical Vein Endothelial Cells，HUVEC 以及人類微血管內皮細胞：Human Microvascular Endothelial Cells，HMEC)做為 GPCR 傳遞路徑的模組的模組。接下來我們將利用 IL-8 的刺激活化 NF- κ B [79]，觀察 BCL10 切割的現象，來釐清是否 CARMA family 與 CARD9 的選用造成切割的差異。

5.3 CARD domain 的遮蔽造成選用的差異

由 Hara, H. *et al.* 以及我們的實驗中，可知道 CARMA1 在其他骨髓系細胞中也有表現[78] (圖十三)，這些骨髓系的細胞選用 CARD9 而非 CARMA1 的原因可能是因為 CARMA1 平時靠著 linker 折疊在一起，抑制其活性，直到活化狀態時，才由 PKC 將 linker 磷酸化，造成構型改變而使 CARD domain 不受遮蔽而可以與 BCL10 形成聚合體。但是 CARD9 缺乏 Linker 的抑制效果，因此 CARD9 平時就可以與 BCL10 結合在一起[26]，這種競爭的優勢可能就是為什麼骨髓系細胞雖然有 CARMA1 但還是選用 CARD9 的原因。至於骨髓系有 CARMA1，但不用於作為 CBM complex 傳遞 NF- κ B 的活化路徑，因此 CARMA1 存在於骨髓系細胞的意義及角色仍不清楚。

5.4 CARMA1 與 CARD9 的功能性比較

根據文獻指出，在缺乏 CARMA1 的 T 細胞中大量表現 CARMA3，可以有效挽回原本 NF- κ B 活化路徑的缺陷[80]。但是還不知道是否 CARMA1 是 GPCR-mediated NF- κ B signaling (透過 CARMA3) 所必需的。在 P/I 刺激後，在 CARMA1 缺乏的 T 細胞大量表現 CARD9 的並無法挽救 PKC 所媒介的 NF- κ B 活化路徑[78]。在 CARD9 缺陷的 NK 細胞 (NK 透過 CARMA1-B-M complex 活化) 中不影響 NF- κ B 的活化。可見 CARMA1 與 CARMA3 可能在不同的細胞中表現相同的功能，而與 CARD9 的功能不同。在我們的實驗中也推論 BCL10 的切割可能與 CARMA1 的選用有關，因此我們未來想在 Jurkat T 細胞中大量表現 CARD9，觀察是否 CARD9 平時是否與 BCL10 連結在一起，因此競爭了 CARMA1 與 BCL10 的連結，而抑制了 BCL10 的切割。

除此之外，CARMA1 具有 MAGUK 三聚體 (PDZ-SH3-GUK)，因此 CARMA1

平時可與細胞膜連結在一起，在 T 細胞活化時，PKC 將 CARMA1 的 linker 磷酸化使 CARMA1 具有活性並且會被徵召到脂筏(lipid raft)當中[38, 40, 51, 80-82]，是否脂筏當中也有徵召一些可以切割的因子造成 BCL10 的切割？而 CARD9 不具有 MAGUK 三聚體，因此無法與細胞膜在一起，加上 CARD9 平時則不受 linker 折疊抑制，因此 CARD9 是否有被徵召到脂筏或是如何被徵召到脂筏的機制目前仍然不清楚。想要釐清這個部分，就要進行分離細胞的脂筏(lipid raft isolation)的實驗，我們知道 Jurkat T 細胞的 CARMA1 會被徵召到脂筏並且有發生 BCL10 的切割。若將 CARD9 外送至 Jurkat T 細胞，觀察 BCL10 是否平時即與 CARD9 結合在一起，脂筏所徵召的是 CARD9 或是 CARMA1？以及 P/I 刺激後 BCL10 是否有發生切割的現象都是未來可去觀察及探討的。

5.5 IKK 對於 BCL10 切割的重要性

在本研究中，為了探討 NF- κ B 的活化路徑是否有可以調控切割的因子，因此我們選用了 MG132 以及 Bay11-7085 兩種 NF- κ B 抑制劑(圖七、八)，在我們的結果使用 MG132(抑制 I κ B α 的降解，不影響 IKK 的活性)並沒有觀察到 BCL10 的抑制，但是在 Bay11-7085(透過抑制 IKK 的活性影響 I κ B α 的磷酸化)卻觀察到 BCL10 的切割有減少的現象。另外，之前的文獻指出 IKK 可以對 BCL10 進行磷酸化，使 BCL10 接上 Ubiquitin chain 而送入 proteosome 降解[74]；在本實驗室先前的研究成果也發現，磷酸化的 BCL10 是較好的 MALT1 誘導切割受質(附圖四)；許多研究指出 IKK 在 T 細胞活化後也可以被徵召到脂筏中[81, 83]。在本研究中，我們發現 IKK 的活性可以影響 BCL10 的切割，因此我們推論 T 細胞活化後，CARMA1 將 IKK 以及 BCL10 等許多訊息傳遞相關的蛋白質徵召到脂筏當中，在此 IKK 將 BCL10 磷酸化而使 BCL10 較容易被 MALT1 切割。在這個部分，我們還需要更多的證據來印證這個假說，因此接下來我們想要將 Jurkat T 細胞中以核酸干擾 BCL10 蛋白質的含量，再外送 BCL10 被 IKK 磷酸化位點突變的 BCL10

突變種，再觀察是否 BCL10 的切割是否有受到影響。至於在骨髓系細胞當中，CARD9 以及 IKK 有無被徵召到脂筏中，又是否因此影響到 BCL10 的切割，都是值得去探討的。

5.6 BCL10 切割的功能與意義

在 Rebeaud *et al.* 的實驗中推論 BCL10 的切割與 T 細胞的黏附作用有關[14]，這對於 T 細胞與抗原呈現細胞(APC)或目標細胞的接觸以及 T 細胞的移行(migration)以及外滲至血管外(extravasation)的功能有關。Rebeaud, F. *et al.* 利用核酸干擾 si-BCL10 以及 si-MALT1、無法被切割的 BCL10(BCL10 切割位置的突變 R228G)或是利用 MALT1 抑制劑(z-VRPR)來抑制 BCL10 的切割時，可以觀察到 T 細胞的黏附作用有受到抑制，但是差異性只有不到兩倍。在我們的實驗當中我們除了在 T 細胞之外，我們也在 B 細胞與 NK 細胞也有觀察到 BCL10 有切割的現象。然而 B 細胞不需與抗原呈現細胞或目標細胞接觸，而是以抗體進行免疫反應，那麼 BCL10 的切割對於 B 細胞的功能又是什麼呢？再者，NK 細胞雖然與毒殺目標細胞有關，但是 NK 細胞的 CBM complex 傳遞路徑是參與在細胞激素的分泌，而與細胞毒殺的功能無關[50]。因此關於 BCL10 切割的功能與意義，還需要更多的研究來證明。

第六章、參考文獻

1. Willis, T.G., Jadayel, D.M., Du, M.Q., Peng, H., Perry, A.R., Abdul-Rauf, M., Price, H., Karran, L., Majekodunmi, O., Wlodarska, I., Pan, L., Crook, T., Hamoudi, R., Isaacson, P.G., Dyer, M.J. (1999) BCL10 is involved in t(1;14)(p22;q32) of MALT B cell lymphoma and mutated in multiple tumor types. *Cell* **96**, 35-45.
2. Zhang, Q., Siebert, R., Yan, M., Hinzmann, B., Cui, X., Xue, L., Rakestraw, K.M., Naeve, C.W., Beckmann, G., Weisenburger, D.D., Sanger, W.G., Nowotny, H., Vesely, M., Callet-Bauchu, E., Salles, G., Dixit, V.M., Rosenthal, A., Schlegelberger, B., Morris, S.W. (1999) Inactivating mutations and overexpression of BCL10, a caspase recruitment domain-containing gene, in MALT lymphoma with t(1;14)(p22;q32). *Nat Genet* **22**, 63-8.
3. Koseki, T., Inohara, N., Chen, S., Carrio, R., Merino, J., Hottiger, M.O., Nabel, G.J., Nunez, G. (1999) CIPER, a novel NF- κ B-activating protein containing a caspase recruitment domain with homology to Herpesvirus-2 protein E10. *J Biol Chem* **274**, 9955-61.
4. Srinivasula, S.M., Ahmad, M., Lin, J.H., Poyet, J.L., Fernandes-Alnemri, T., Tsichlis, P.N., Alnemri, E.S. (1999) CLAP, a novel caspase recruitment domain-containing protein in the tumor necrosis factor receptor pathway, regulates NF- κ B activation and apoptosis. *J Biol Chem* **274**, 17946-54.
5. Yan, M., Lee, J., Schilbach, S., Goddard, A., Dixit, V. (1999) mE10, a novel caspase recruitment domain-containing proapoptotic molecule. *J Biol Chem* **274**, 10287-92.
6. Thome, M., Martinon, F., Hofmann, K., Rubio, V., Steiner, V., Schneider, P., Mattmann, C., Tschopp, J. (1999) Equine herpesvirus-2 E10 gene product, but not its cellular homologue, activates NF- κ B transcription factor and c-Jun N-terminal kinase. *J Biol Chem* **274**, 9962-8.
7. Lucas, P.C., Yonezumi, M., Inohara, N., McAllister-Lucas, L.M., Abazeed, M.E., Chen, F.F., Yamaoka, S., Seto, M., Nunez, G. (2001) BCL10 and MALT1, independent targets of chromosomal translocation in malt lymphoma, cooperate in a novel NF- κ B signaling pathway. *J Biol Chem* **276**, 19012-9.
8. Wegener, E., Oeckinghaus, A., Papadopoulou, N., Lavitas, L., Schmidt-Supprian, M., Ferch, U., Mak, T.W., Ruland, J., Heissmeyer, V., Krappmann, D. (2006) Essential role for I κ B kinase beta in remodeling CARMA1-BCL10-MALT1 complexes upon T cell activation. *Mol Cell* **23**, 13-23.
9. Gaide, O., Martinon, F., Micheau, O., Bonnet, D., Thome, M., Tschopp, J. (2001) CARMA1, a CARD-containing binding partner of BCL10, induces BCL10

- phosphorylation and NF- κ B activation. *FEBS Lett* **496**, 121-7.
10. Ishiguro, K., Ando, T., Goto, H., Xavier, R. (2007) BCL10 is phosphorylated on Ser138 by Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II. *Mol Immunol* **44**, 2095-100.
 11. Lobry, C., Lopez, T., Israel, A., Weil, R. (2007) Negative feedback loop in T cell activation through I κ B kinase-induced phosphorylation and degradation of BCL10. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 908-13.
 12. Scharschmidt, E., Wegener, E., Heissmeyer, V., Rao, A., Krappmann, D. (2004) Degradation of BCL10 induced by T-cell activation negatively regulates NF- κ B signaling. *Mol Cell Biol* **24**, 3860-73.
 13. Ruefli-Brasse, A.A., Lee, W.P., Hurst, S., Dixit, V.M. (2004) Rip2 participates in BCL10 signaling and T-cell receptor-mediated NF- κ B activation. *J Biol Chem* **279**, 1570-4.
 14. Rebeaud, F., Hailfinger, S., Posevitz-Fejfar, A., Tapernoux, M., Moser, R., Rueda, D., Gaide, O., Guzzardi, M., Iancu, E.M., Rufer, N., Fasel, N., Thome, M. (2008) The proteolytic activity of the paracaspase MALT1 is key in T cell activation. *Nat Immunol* **9**, 272-81.
 15. Dierlamm, J., Baens, M., Wlodarska, I., Stefanova-Ouzounova, M., Hernandez, J.M., Hossfeld, D.K., De Wolf-Peeters, C., Hagemeijer, A., Van den Berghe, H., Marynen, P. (1999) The apoptosis inhibitor gene API2 and a novel 18q gene, MLT, are recurrently rearranged in the t(11;18)(q21;q21) associated with mucosa-associated lymphoid tissue lymphomas. *Blood* **93**, 3601-9.
 16. Akagi, T., Motegi, M., Tamura, A., Suzuki, R., Hosokawa, Y., Suzuki, H., Ota, H., Nakamura, S., Morishima, Y., Taniwaki, M., Seto, M. (1999) A novel gene, MALT1 at 18q21, is involved in t(11;18)(q21;q21) found in low-grade B-cell lymphoma of mucosa-associated lymphoid tissue. *Oncogene* **18**, 5785-94.
 17. Morgan, J.A., Yin, Y., Borowsky, A.D., Kuo, F., Nourmand, N., Koontz, J.I., Reynolds, C., Soreng, L., Griffin, C.A., Graeme-Cook, F., Harris, N.L., Weisenburger, D., Pinkus, G.S., Fletcher, J.A., Sklar, J. (1999) Breakpoints of the t(11;18)(q21;q21) in mucosa-associated lymphoid tissue (MALT) lymphoma lie within or near the previously undescribed gene MALT1 in chromosome 18. *Cancer Res* **59**, 6205-13.
 18. Uren, A.G., O'Rourke, K., Aravind, L.A., Pisabarro, M.T., Seshagiri, S., Koonin, E.V., Dixit, V.M. (2000) Identification of paracaspases and metacaspases: two ancient families of caspase-like proteins, one of which plays a key role in MALT lymphoma. *Mol Cell* **6**, 961-7.
 19. Zhou, H., Du, M.Q., Dixit, V.M. (2005) Constitutive NF- κ B activation by the t(11;18)(q21;q21) product in MALT lymphoma is linked to deregulated ubiquitin

- ligase activity. *Cancer Cell* **7**, 425-31.
20. Noels, H., van Loo, G., Hagens, S., Broeckx, V., Beyaert, R., Marynen, P., Baens, M. (2007) A Novel TRAF6 binding site in MALT1 defines distinct mechanisms of NF- κ B activation by API2middle dotMALT1 fusions. *J Biol Chem* **282**, 10180-9.
 21. Coornaert, B., Baens, M., Heyninck, K., Bekaert, T., Haegman, M., Staal, J., Sun, L., Chen, Z.J., Marynen, P., Beyaert, R. (2008) T cell antigen receptor stimulation induces MALT1 paracaspase-mediated cleavage of the NF- κ B inhibitor A20. *Nat Immunol* **9**, 263-71.
 22. Sun, L., Deng, L., Ea, C.K., Xia, Z.P., Chen, Z.J. (2004) The TRAF6 ubiquitin ligase and TAK1 kinase mediate IKK activation by BCL10 and MALT1 in T lymphocytes. *Mol Cell* **14**, 289-301.
 23. Ruefli-Brasse, A.A., French, D.M., Dixit, V.M. (2003) Regulation of NF- κ B-dependent lymphocyte activation and development by paracaspase. *Science* **302**, 1581-4.
 24. Heyninck, K., Beyaert, R. (2005) A20 inhibits NF- κ B activation by dual ubiquitin-editing functions. *Trends Biochem Sci* **30**, 1-4.
 25. Kinashi, T. (2005) Intracellular signalling controlling integrin activation in lymphocytes. *Nat Rev Immunol* **5**, 546-59.
 26. Bertin, J., Guo, Y., Wang, L., Srinivasula, S.M., Jacobson, M.D., Poyet, J.L., Merriam, S., Du, M.Q., Dyer, M.J., Robison, K.E., DiStefano, P.S., Alnemri, E.S. (2000) CARD9 is a novel caspase recruitment domain-containing protein that interacts with BCL10/CLAP and activates NF- κ B. *J Biol Chem* **275**, 41082-6.
 27. Bertin, J., Wang, L., Guo, Y., Jacobson, M.D., Poyet, J.L., Srinivasula, S.M., Merriam, S., DiStefano, P.S., Alnemri, E.S. (2001) CARD11 and CARD14 are novel caspase recruitment domain (CARD)/membrane-associated guanylate kinase (MAGUK) family members that interact with BCL10 and activate NF- κ B. *J Biol Chem* **276**, 11877-82.
 28. Wang, L., Guo, Y., Huang, W.J., Ke, X., Poyet, J.L., Manji, G.A., Merriam, S., Glucksmann, M.A., DiStefano, P.S., Alnemri, E.S., Bertin, J. (2001) CARD10 is a novel caspase recruitment domain/membrane-associated guanylate kinase family member that interacts with BCL10 and activates NF- κ B. *J Biol Chem* **276**, 21405-9.
 29. Lupas, A. (1996) Coiled coils: new structures and new functions. *Trends Biochem Sci* **21**, 375-82.
 30. Fanning, A.S., Anderson, J.M. (1999) Protein modules as organizers of membrane structure. *Curr Opin Cell Biol* **11**, 432-9.
 31. Wegener, E., Krappmann, D. (2007) CARD-BCL10-MALT1 signalosomes: missing link to NF- κ B. *Sci STKE* **2007**, pe21.

32. Clements, J.L., Boerth, N.J., Lee, J.R., Koretzky, G.A. (1999) Integration of T cell receptor-dependent signaling pathways by adapter proteins. *Annu Rev Immunol* **17**, 89-108.
33. Schulze-Luehrmann, J., Ghosh, S. (2006) Antigen-receptor signaling to nuclear factor κ B. *Immunity* **25**, 701-15.
34. Karin, M., Lin, A. (2002) NF- κ B at the crossroads of life and death. *Nat Immunol* **3**, 221-7.
35. Karin, M., Ben-Neriah, Y. (2000) Phosphorylation meets ubiquitination: the control of NF- κ B activity. *Annu Rev Immunol* **18**, 621-63.
36. Deng, L., Wang, C., Spencer, E., Yang, L., Braun, A., You, J., Slaughter, C., Pickart, C., Chen, Z.J. (2000) Activation of the I κ B kinase complex by TRAF6 requires a dimeric ubiquitin-conjugating enzyme complex and a unique polyubiquitin chain. *Cell* **103**, 351-61.
37. Wang, C., Deng, L., Hong, M., Akkaraju, G.R., Inoue, J., Chen, Z.J. (2001) TAK1 is a ubiquitin-dependent kinase of MKK and IKK. *Nature* **412**, 346-51.
38. Gaide, O., Favier, B., Legler, D.F., Bonnet, D., Brissoni, B., Valitutti, S., Bron, C., Tschopp, J., Thome, M. (2002) CARMA1 is a critical lipid raft-associated regulator of TCR-induced NF- κ B activation. *Nat Immunol* **3**, 836-43.
39. Pomerantz, J.L., Denny, E.M., Baltimore, D. (2002) CARD11 mediates factor-specific activation of NF- κ B by the T cell receptor complex. *EMBO J* **21**, 5184-94.
40. Egawa, T., Albrecht, B., Favier, B., Sunshine, M.J., Mirchandani, K., O'Brien, W., Thome, M., Littman, D.R. (2003) Requirement for CARMA1 in antigen receptor-induced NF- κ B activation and lymphocyte proliferation. *Curr Biol* **13**, 1252-8.
41. Newton, K., Dixit, V.M. (2003) Mice lacking the CARD of CARMA1 exhibit defective B lymphocyte development and impaired proliferation of their B and T lymphocytes. *Curr Biol* **13**, 1247-51.
42. Hara, H., Wada, T., Bakal, C., Koziaradzki, I., Suzuki, S., Suzuki, N., Nghiem, M., Griffiths, E.K., Krawczyk, C., Bauer, B., D'Acquisto, F., Ghosh, S., Yeh, W.C., Baier, G., Rottapel, R., Penninger, J.M. (2003) The MAGUK family protein CARD11 is essential for lymphocyte activation. *Immunity* **18**, 763-75.
43. Ruland, J., Duncan, G.S., Elia, A., del Barco Barrantes, I., Nguyen, L., Plyte, S., Millar, D.G., Bouchard, D., Wakeham, A., Ohashi, P.S., Mak, T.W. (2001) BCL10 is a positive regulator of antigen receptor-induced activation of NF- κ B and neural tube closure. *Cell* **104**, 33-42.
44. Ruland, J., Duncan, G.S., Wakeham, A., Mak, T.W. (2003) Differential requirement for MALT1 in T and B cell antigen receptor signaling. *Immunity* **19**,

- 749-58.
45. Che, T., You, Y., Wang, D., Tanner, M.J., Dixit, V.M., Lin, X. (2004) MALT1/paracaspase is a signaling component downstream of CARMA1 and mediates T cell receptor-induced NF- κ B activation. *J Biol Chem* **279**, 15870-6.
 46. Oeckinghaus, A., Wegener, E., Welteke, V., Ferch, U., Arslan, S.C., Ruland, J., Scheidereit, C., Krappmann, D. (2007) MALT1 ubiquitination triggers NF- κ B signaling upon T-cell activation. *EMBO J* **26**, 4634-45.
 47. Thome, M. (2004) CARMA1, BCL-10 and MALT1 in lymphocyte development and activation. *Nat Rev Immunol* **4**, 348-59.
 48. Gross, O., Grupp, C., Steinberg, C., Zimmermann, S., Strasser, D., Hanneschlager, N., Reindl, W., Jonsson, H., Huo, H.R., Littman, D.R., Peschel, C., Yokoyama, W.M., Krug, A., Ruland, J. (2008) Multiple ITAM-coupled NK-cell receptors engage the BCL10/MALT1 complex via CARMA1 for NF- κ B and MAPK activation to selectively control cytokine production. *Blood* **112**, 2421-2428.
 49. Hara, H., Ishihara, C., Takeuchi, A., Xue, L.Q., Morris, S.W., Penninger, J.M., Yoshida, H., Saito, T. (2008) Cell type-specific regulation of ITAM-mediated NF- κ B activation by the adaptors, CARMA1 and CARD9. *J Immunol* **181**, 918-930.
 50. Malarkannan, S., Regunathan, J., Chu, H., Kutlesa, S., Chen, Y., Zeng, H., Wen, R., Wang, D. (2007) BCL10 plays a divergent role in NK cell-mediated cytotoxicity and cytokine generation. *J Immunol* **179**, 3752-62.
 51. Hara, H., Ishihara, C., Takeuchi, A., Imanishi, T., Xue, L., Morris, S.W., Inui, M., Takai, T., Shibuya, A., Saijo, S., Iwakura, Y., Ohno, N., Koseki, H., Yoshida, H., Penninger, J.M., Saito, T. (2007) The adaptor protein CARD9 is essential for the activation of myeloid cells through ITAM-associated and Toll-like receptors. *Nat Immunol* **8**, 619-29.
 52. Gross, O., Gewies, A., Finger, K., Schafer, M., Sparwasser, T., Peschel, C., Forster, I., Ruland, J. (2006) CARD9 controls a non-TLR signalling pathway for innate anti-fungal immunity. *Nature* **442**, 651-6.
 53. Klemm, S., Gutermuth, J., Hultner, L., Sparwasser, T., Behrendt, H., Peschel, C., Mak, T.W., Jakob, T., Ruland, J. (2006) The BCL10-MALT1 complex segregates Fc epsilon RI-mediated nuclear factor κ B activation and cytokine production from mast cell degranulation. *J Exp Med* **203**, 337-47.
 54. Chen, Y., Pappu, B.P., Zeng, H., Xue, L., Morris, S.W., Lin, X., Wen, R., Wang, D. (2007) B cell lymphoma 10 is essential for FcepsilonR-mediated degranulation and IL-6 production in mast cells. *J Immunol* **178**, 49-57.
 55. Grabiner, B.C., Blonska, M., Lin, P.C., You, Y., Wang, D., Sun, J., Darnay, B.G., Dong, C., Lin, X. (2007) CARMA3 deficiency abrogates G protein-coupled receptor-induced NF- κ B activation. *Genes Dev* **21**, 984-96.

56. Wang, D., You, Y., Lin, P.C., Xue, L., Morris, S.W., Zeng, H., Wen, R., Lin, X. (2007) BCL10 plays a critical role in NF- κ B activation induced by G protein-coupled receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 145-50.
57. McAllister-Lucas, L.M., Ruland, J., Siu, K., Jin, X., Gu, S., Kim, D.S., Kuffa, P., Kohrt, D., Mak, T.W., Nunez, G., Lucas, P.C. (2007) CARMA3/BCL10/MALT1-dependent NF- κ B activation mediates angiotensin II-responsive inflammatory signaling in nonimmune cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 139-44.
58. Klemm, S., Zimmermann, S., Peschel, C., Mak, T.W., Ruland, J. (2007) BCL10 and MALT1 control lysophosphatidic acid-induced NF- κ B activation and cytokine production. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 134-8.
59. Bhattacharyya, S., Borthakur, A., Pant, N., Dudeja, P.K., Tobacman, J.K. (2007) BCL10 mediates LPS-induced activation of NF- κ B and IL-8 in human intestinal epithelial cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **293**, G429-37.
60. Dong, W., Liu, Y., Peng, J., Chen, L., Zou, T., Xiao, H., Liu, Z., Li, W., Bu, Y., Qi, Y. (2006) The IRAK-1-BCL10-MALT1-TRAF6-TAK1 cascade mediates signaling to NF- κ B from Toll-like receptor 4. *J Biol Chem* **281**, 26029-40.
61. Liu, Y., Dong, W., Chen, L., Xiang, R., Xiao, H., De, G., Wang, Z., Qi, Y. (2004) BCL10 mediates lipopolysaccharide/toll-like receptor-4 signaling through interaction with Pellino2. *J Biol Chem* **279**, 37436-44.
62. Wright, S.D., Ramos, R.A., Tobias, P.S., Ulevitch, R.J., Mathison, J.C. (1990) CD14, a receptor for complexes of lipopolysaccharide (LPS) and LPS binding protein. *Science* **249**, 1431-3.
63. Brown, G.D., Gordon, S. (2001) Immune recognition. A new receptor for beta-glucans. *Nature* **413**, 36-7.
64. Rogers, N.C., Slack, E.C., Edwards, A.D., Nolte, M.A., Schulz, O., Schweighoffer, E., Williams, D.L., Gordon, S., Tybulewicz, V.L., Brown, G.D., Reis e Sousa, C. (2005) Syk-dependent cytokine induction by Dectin-1 reveals a novel pattern recognition pathway for C type lectins. *Immunity* **22**, 507-17.
65. Brown, G.D., Herre, J., Williams, D.L., Willment, J.A., Marshall, A.S., Gordon, S. (2003) Dectin-1 mediates the biological effects of beta-glucans. *J Exp Med* **197**, 1119-24.
66. Bartels, M., Schweda, A.T., Dreikhausen, U., Frank, R., Resch, K., Beil, W., Nourbakhsh, M. (2007) Peptide-mediated disruption of NF κ B/NRF interaction inhibits IL-8 gene activation by IL-1 or *Helicobacter pylori*. *J Immunol* **179**, 7605-13.
67. Nourbakhsh, M., Kalble, S., Dorrie, A., Hauser, H., Resch, K., Kracht, M. (2001) The NF- κ B repressing factor is involved in basal repression and interleukin (IL)-1-induced activation of IL-8 transcription by binding to a conserved NF- κ

- b-flanking sequence element. *J Biol Chem* **276**, 4501-8.
68. Backert, S., Moese, S., Selbach, M., Brinkmann, V., Meyer, T.F. (2001) Phosphorylation of tyrosine 972 of the *Helicobacter pylori* CagA protein is essential for induction of a scattering phenotype in gastric epithelial cells. *Mol Microbiol* **42**, 631-44.
69. Segal, E.D., Cha, J., Lo, J., Falkow, S., Tompkins, L.S. (1999) Altered states: involvement of phosphorylated CagA in the induction of host cellular growth changes by *Helicobacter pylori*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 14559-64.
70. Hayden, M.S., Ghosh, S. (2004) Signaling to NF- κ B. *Genes Dev* **18**, 2195-224.
71. Holloway, A.F., Rao, S., Chen, X., Shannon, M.F. (2003) Changes in chromatin accessibility across the GM-CSF promoter upon T cell activation are dependent on nuclear factor κ B proteins. *J Exp Med* **197**, 413-23.
72. Tato, C.M., Mason, N., Artis, D., Shapira, S., Caamano, J.C., Bream, J.H., Liou, H.C., Hunter, C.A. (2006) Opposing roles of NF- κ B family members in the regulation of NK cell proliferation and production of IFN- γ . *Int Immunol* **18**, 505-13.
73. Zhou, H., Wertz, I., O'Rourke, K., Ultsch, M., Seshagiri, S., Eby, M., Xiao, W., Dixit, V.M. (2004) BCL10 activates the NF- κ B pathway through ubiquitination of NEMO. *Nature* **427**, 167-71.
74. Zeng, H., Di, L., Fu, G., Chen, Y., Gao, X., Xu, L., Lin, X., Wen, R. (2007) Phosphorylation of BCL10 negatively regulates T-cell receptor-mediated NF- κ B activation. *Mol Cell Biol* **27**, 5235-45.
75. Gross, O., Grupp, C., Steinberg, C., Zimmermann, S., Strasser, D., Hanneschlager, N., Reindl, W., Jonsson, H., Huo, H., Littman, D.R., Peschel, C., Yokoyama, W.M., Krug, A., Ruland, J. (2008) Multiple ITAM-coupled NK-cell receptors engage the BCL10/MALT1 complex via CARMA1 for NF- κ B and MAPK activation to selectively control cytokine production. *Blood* **112**, 2421-8.
76. Gross, O., Grupp, C., Steinberg, C., Zimmermann, S., Strasser, D., Hanneschlager, N., Reindl, W., Peschel, C., Krug, A., Ruland, J. (2008) CARMA1/BCL10/MALT1 complexes transmit ITAM-coupled NK cell receptor signals for NF- κ B and MAPK activation. *Wiener Klinische Wochenschrift* **120**, 21-21.
77. Amieva, M.R., Vogelmann, R., Covacci, A., Tompkins, L.S., Nelson, W.J., Falkow, S. (2003) Disruption of the epithelial apical-junctional complex by *Helicobacter pylori* CagA. *Science* **300**, 1430-4.
78. Hara, H., Ishihara, C., Takeuchi, A., Xue, L., Morris, S.W., Penninger, J.M., Yoshida, H., Saito, T. (2008) Cell type-specific regulation of ITAM-mediated NF- κ B activation by the adaptors, CARMA1 and CARD9. *J Immunol* **181**, 918-30.
79. Martin, D., Galisteo, R., Gutkind, J.S. (2009) CXCL8/IL8 stimulates vascular

- endothelial growth factor (VEGF) expression and the autocrine activation of VEGFR2 in endothelial cells by activating NF- κ B through the CBM (CARMA3/BCL10/MALT1) complex. *J Biol Chem* **284**, 6038-42.
80. Matsumoto, R., Wang, D., Blonska, M., Li, H., Kobayashi, M., Pappu, B., Chen, Y., Lin, X. (2005) Phosphorylation of CARMA1 plays a critical role in T Cell receptor-mediated NF- κ B activation. *Immunity* **23**, 575-85.
81. Sommer, K., Guo, B., Pomerantz, J.L., Bandaranayake, A.D., Moreno-Garcia, M.E., Ovechkina, Y.L., Rawlings, D.J. (2005) Phosphorylation of the CARMA1 linker controls NF- κ B activation. *Immunity* **23**, 561-74.
82. Wang, D., You, Y., Case, S.M., McAllister-Lucas, L.M., Wang, L., DiStefano, P.S., Nunez, G., Bertin, J., Lin, X. (2002) A requirement for CARMA1 in TCR-induced NF- κ B activation. *Nat Immunol* **3**, 830-5.
83. Khoshnan, A., Bae, D., Tindell, C.A., Nel, A.E. (2000) The physical association of protein kinase C theta with a lipid raft-associated inhibitor of κ B factor kinase (IKK) complex plays a role in the activation of the NF- κ B cascade by TCR and CD28. *J Immunol* **165**, 6933-40.

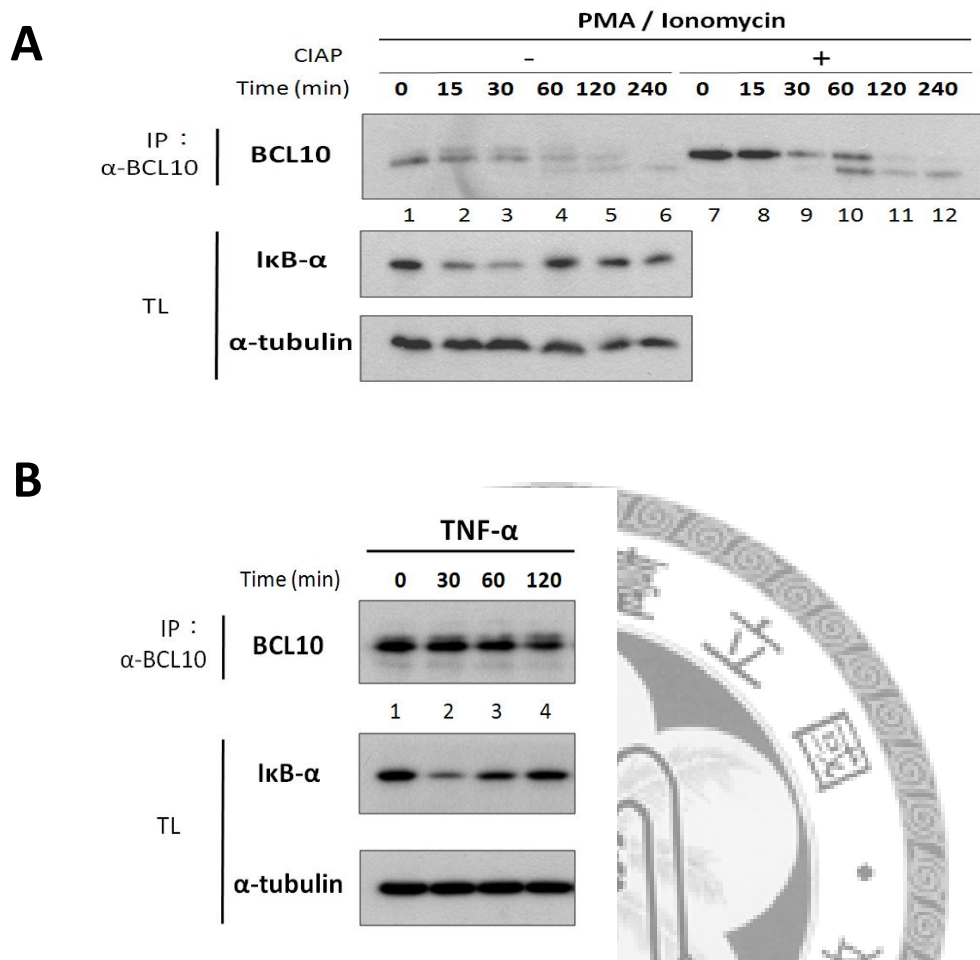


圖附錄

表一、各細胞實驗結果整理

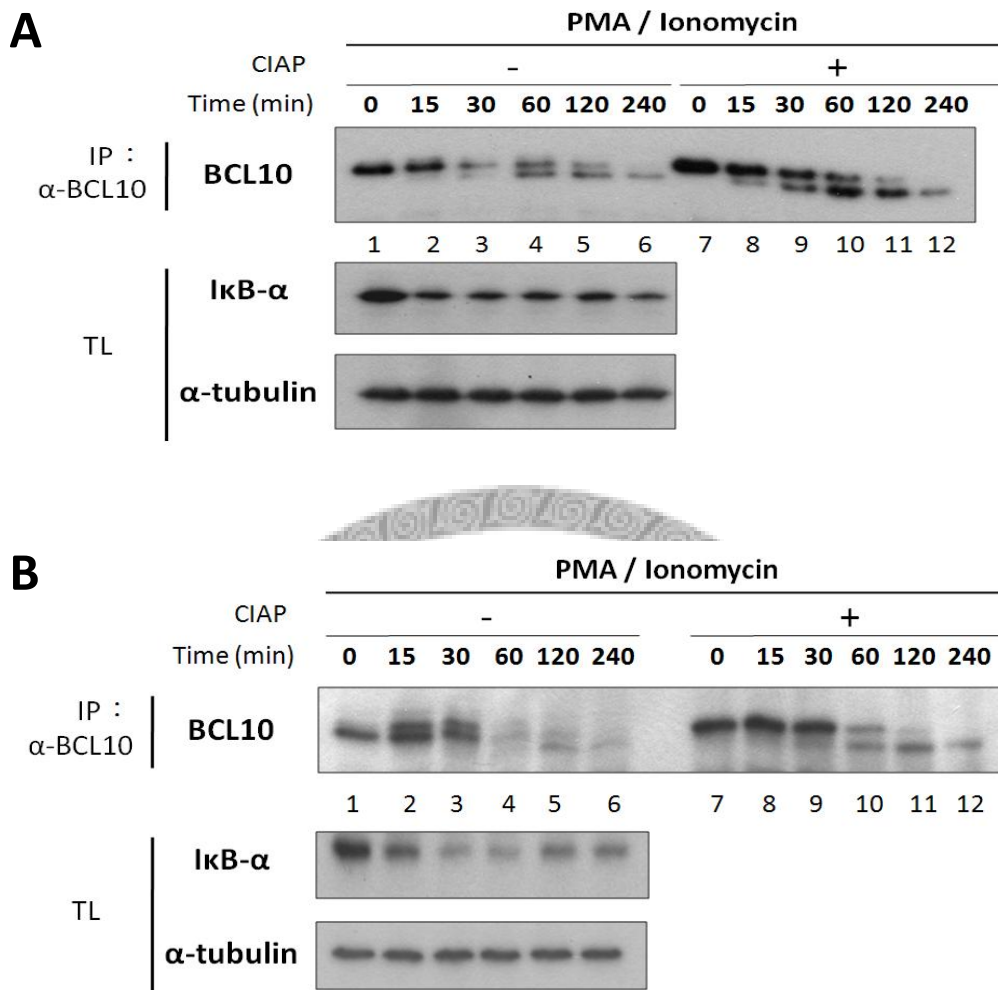
Cell	Stimuli	NF- κ B activation	BCL10 involvement	BCL10 cleavage
淋巴系細胞				
Jurkat	P/I	O	O	O
	TNF- α	O	X	X
	PMA	O	O	Less
	ionomycin	X	N.D.	X
Raji	P/I	O	O	O
Akata	P/I	O	O	O
NK	P/I	O	O	O
骨髓系細胞				
Raw264.7	LPS	O	N.D.	X
	P/I	X	N.D.	X
THP-1	LPS	O	N.D.	X
	Zymosan	O	N.D.	X
	P/I	X	N.D.	X
非血液細胞				
HeLa	IL-1 β	O	X	X
	P/I	O	N.D.	X
AGS	<i>H. pylori</i>	O	N.D.	X
293T	P/I	O	N.D.	X

註：P/I(PMA/ionomycin)；N.D.(Not determined)



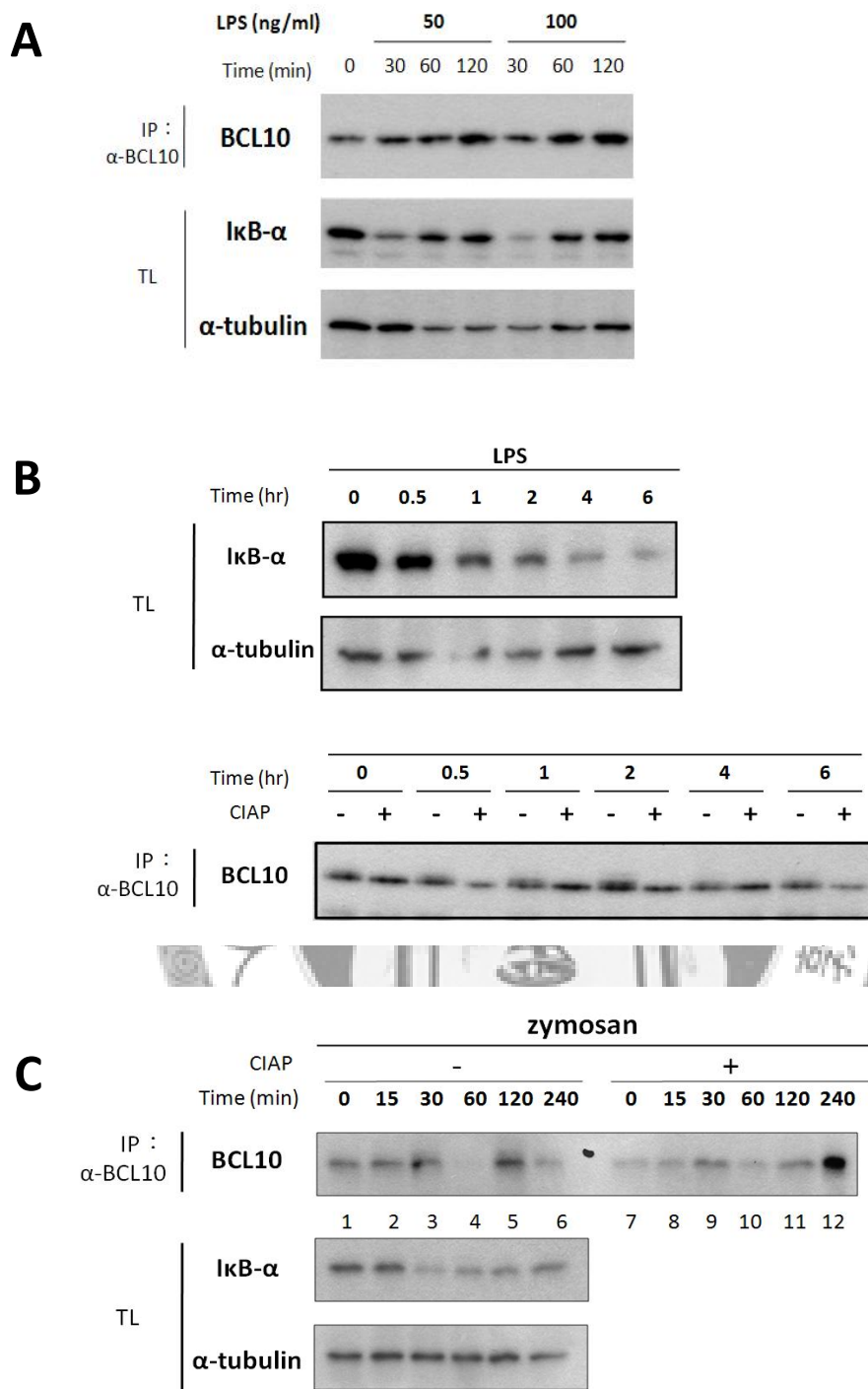
圖一、以 P/I 刺激 Jurkat T 細胞的活化可造成 BCL10 的切割。

將 Jurkat T 細胞，以 PMA(50ng/ml)與 ionomycin(1 μ M) (圖 A)或 TNF- α (10ng/ml) (圖 B)刺激後，在加入刺激後的 0、15、30、60、120、240 分鐘，收取細胞蛋白質，取 30 μ g 進行 SDS-PAGE 電泳後，以 anti-IkB α 抗體進行西方墨點法。另一方面取 600 μ g 的細胞蛋白質，以 anti-BCL10 抗體進行免疫沈澱 12-16 小時後，經 PBS 清洗後從中取 1/2 蛋白質以 CIAP 在 37 $^{\circ}$ C 處理一小時(圖 A, Lanes 7-12)，經 SDS-PAGE 電泳後，以 anti-BCL10 抗體進行西方墨點法。 α -tubulin 作為蛋白質質量指標(loading control)。IP：immunoprecipitation(免疫沈澱)。TL：total lysate(細胞蛋白質)。CIAP：Calf Intestine Alkaline Phosphatase(磷酸水解酶)。



圖二、以 P/I 刺激 B 細胞的活化可造成 BCL10 的切割。

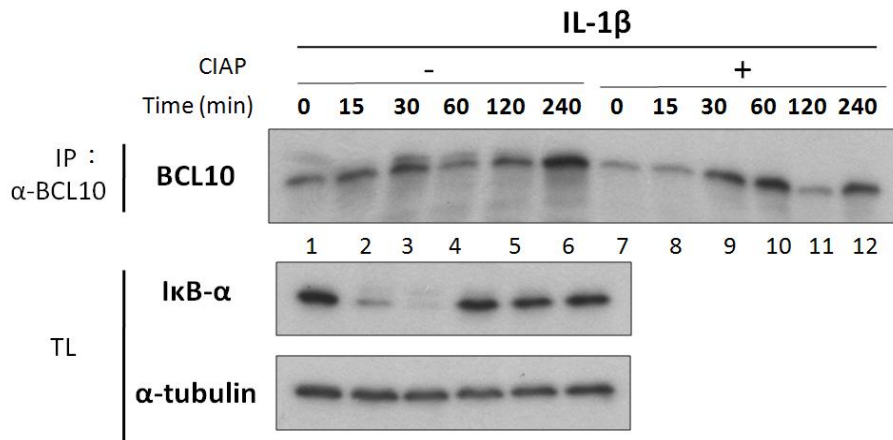
將 Raji B 細胞(圖 A)以及 Akata B 細胞(圖 B)，使以 PMA(50ng/ml)與 ionomycin(1 μ M)刺激後，在加入刺激後的 0、15、30、60、120、240 分鐘，收取細胞蛋白質，取 30 μ g 進行 SDS-PAGE 電泳後，以 anti-I κ B α 抗體進行西方墨點法。另一方面取 600 μ g 的細胞蛋白質，以 anti-BCL10 抗體進行免疫沈澱 12-16 小時後，經 PBS 清洗後從中取 1/2 蛋白質以 CIAP 在 37 $^{\circ}$ C 處理一小時(圖 A、B, Lanes 7-12)，經 SDS-PAGE 電泳後，以 anti-BCL10 抗體進行西方墨點法。 α -tubulin 作為蛋白質量指標(loading control)。IP：immunoprecipitation(免疫沈澱)。TL：total lysate(細胞蛋白質)。CIAP：Calf Intestine Alkaline Phosphatase(磷酸水解酶)。



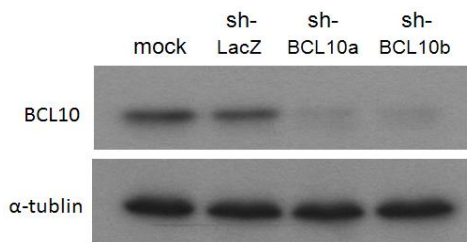
圖三、骨髓系細胞經 LPS 與 zymosan 刺激後 BCL10 表現的情形。

將骨髓系細胞使以不同的刺激[Raw264.7: LPS(50 & 100 ng/ml)(圖 A); THP-1 : LPS(100ng/ml)(圖 B); THP-1 : zymosan(200μg/ml)(圖 C)]，在接受刺激後，依圖所示之時間點收取細胞蛋白質，後續處理如同圖一。

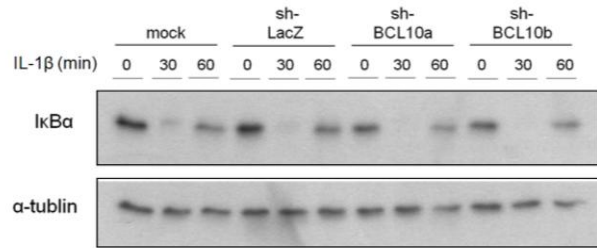
A



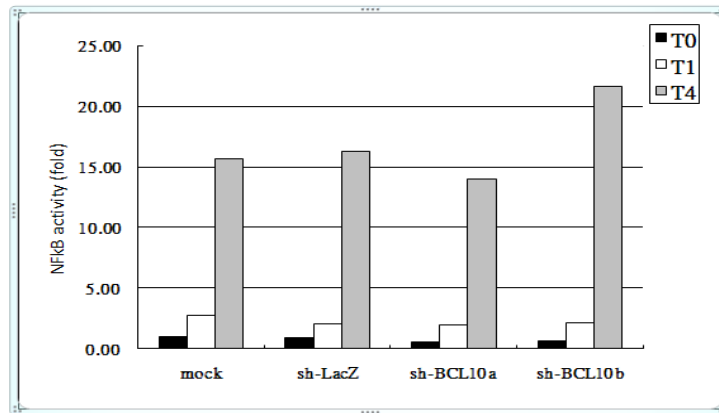
B



C



D



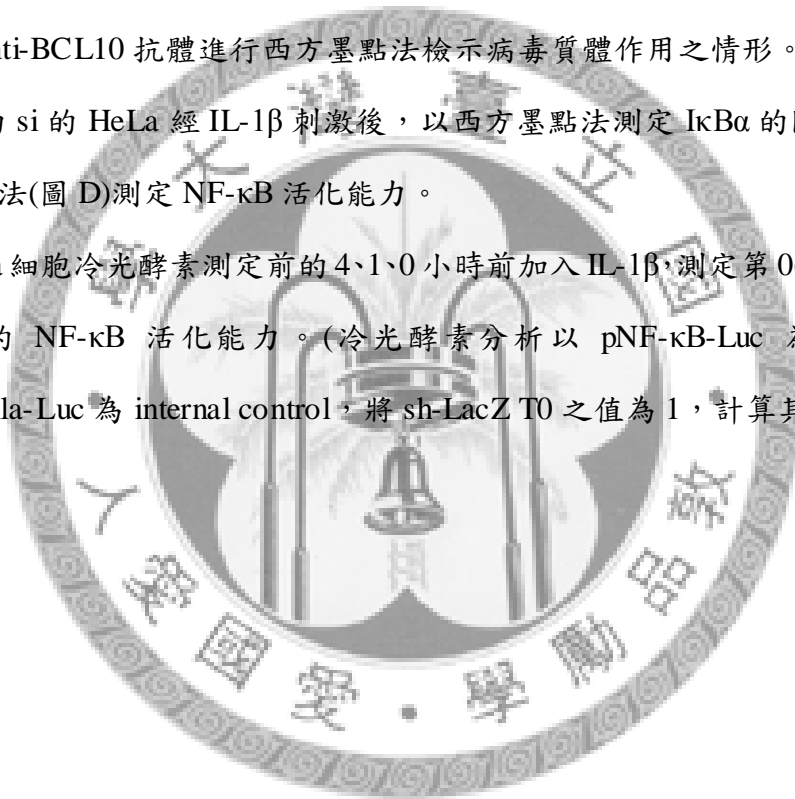
圖四、在 HeLa 細胞中，BCL10 不參與 IL-1 β -mediated NF- κ B signaling。

(A) 將 HeLa 細胞使以刺激 IL-1 β (10ng/ml)在接受刺激後，依圖所示之時間點收取細胞蛋白質，後續處理如同圖一。

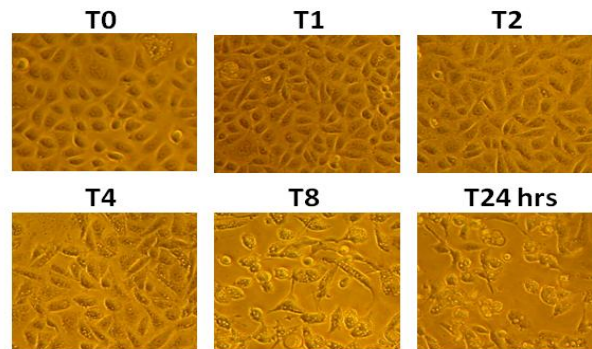
(B)將 5×10^5 的 HeLa 細胞以 lenti-si-BCL10 的病毒培養液(DMEM containing 8 μ g/ml polybrene) 2ml 在 6-well 中進行感染，24 小時後置換新鮮的培養液。感染後四天後收取細胞蛋白質， anti-BCL10 抗體進行免疫沈澱 12-16 小時後，經 SDS-PAGE 電泳後，以 anti-BCL10 抗體進行西方墨點法檢示病毒質體作用之情形。

(C-D)將經由 si 的 HeLa 經 IL-1 β 刺激後，以西方墨點法測定 I κ B α 的降解(圖 C)以及冷光酵素法(圖 D)測定 NF- κ B 活化能力。

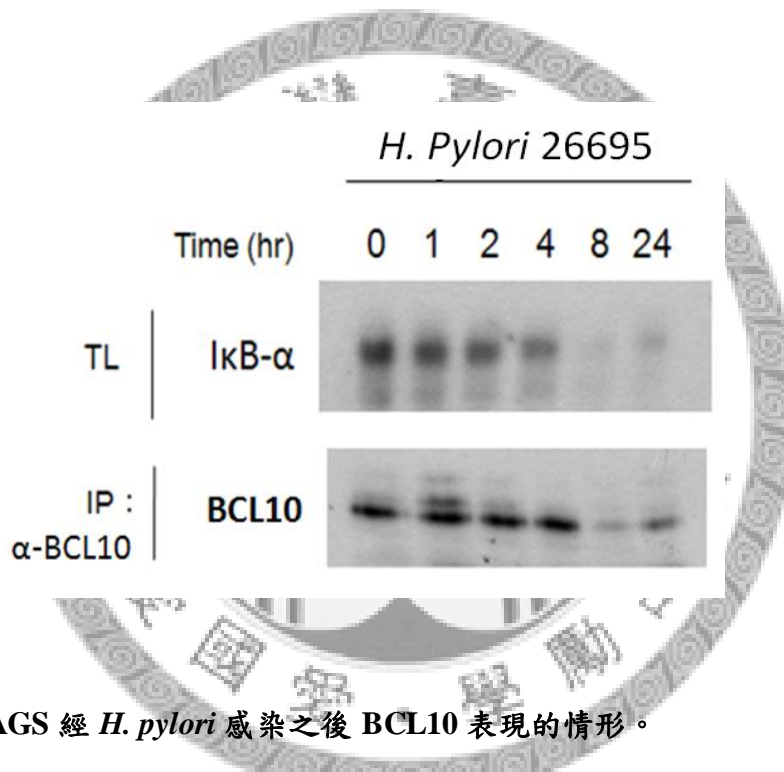
(D) 將 HeLa 細胞冷光酵素測定前的 4、1、0 小時前加入 IL-1 β ，測定第 0(T0)、1(T1)、4(T4)小時的 NF- κ B 活化能力。(冷光酵素分析以 pNF- κ B-Luc 為 reporter、pCMV-Renilla-Luc 為 internal control，將 sh-LacZ T0 之值為 1，計算其他數值的相對倍數)



A

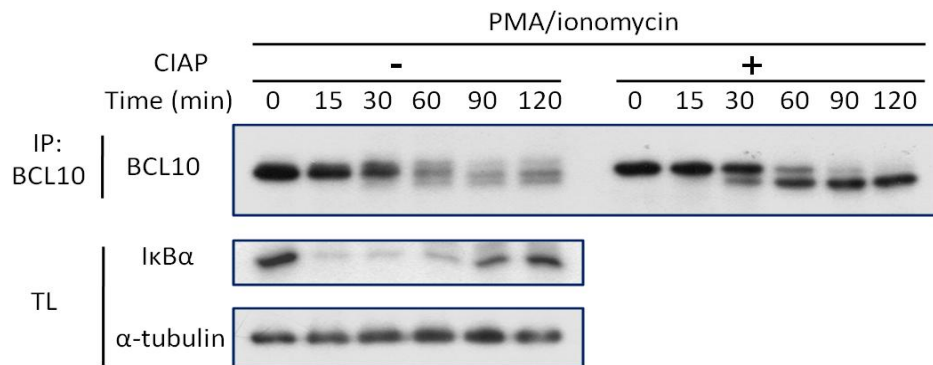


B



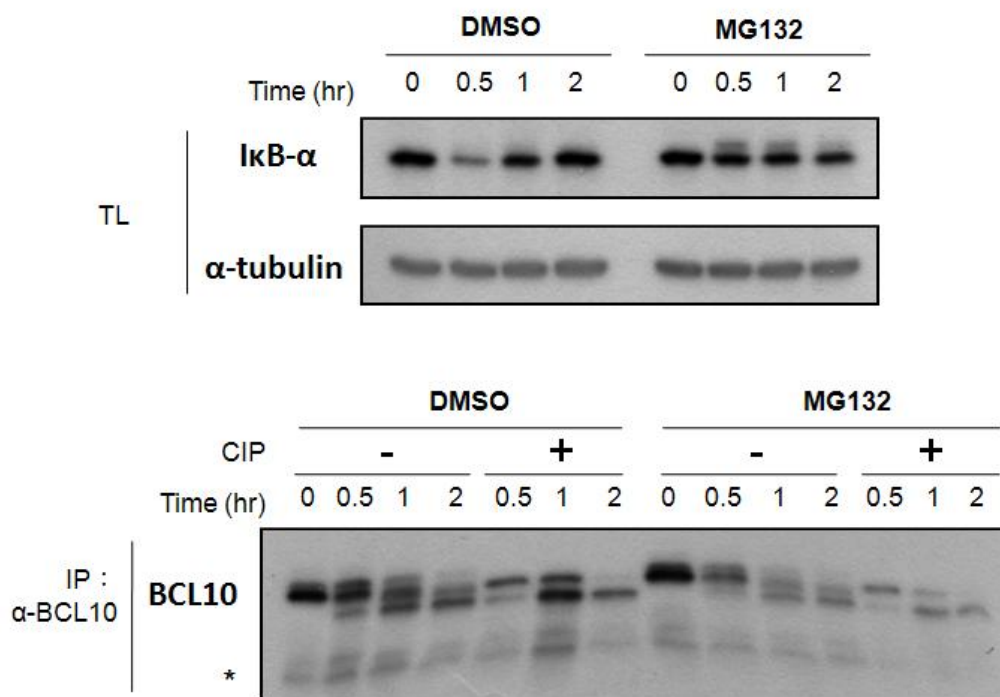
圖五、在 AGS 經 *H. pylori* 感染之後 BCL10 表現的情形。

將 *H. pylori* 養在 10 公分的血液培養基中，在微需氧環境下培養，使用的時候，以 PBS 2ml 將 *H. pylori* 收集至 eppendorf，離心去除上清後以 PBS 清洗一次後，以不含抗生素的 RPMI 使 *H. pylori* 成懸浮狀態，一方面 AGS 在感染前置換成不含抗生素的 RPMI。(A)AGS 在經由 *H. pylori* (M.O.I.=100)感染之後，細胞逐漸分散以及拉長成細條狀等型態上的改變，做為感染成功的指標。(本實驗所使用的 *H. pylori* 為 26695 strain)。(B)將 AGS 細胞使以 *H. pylori* (M.O.I.=100)感染之後，依圖所示之時間點收取細胞蛋白質，後續處理如同圖一。



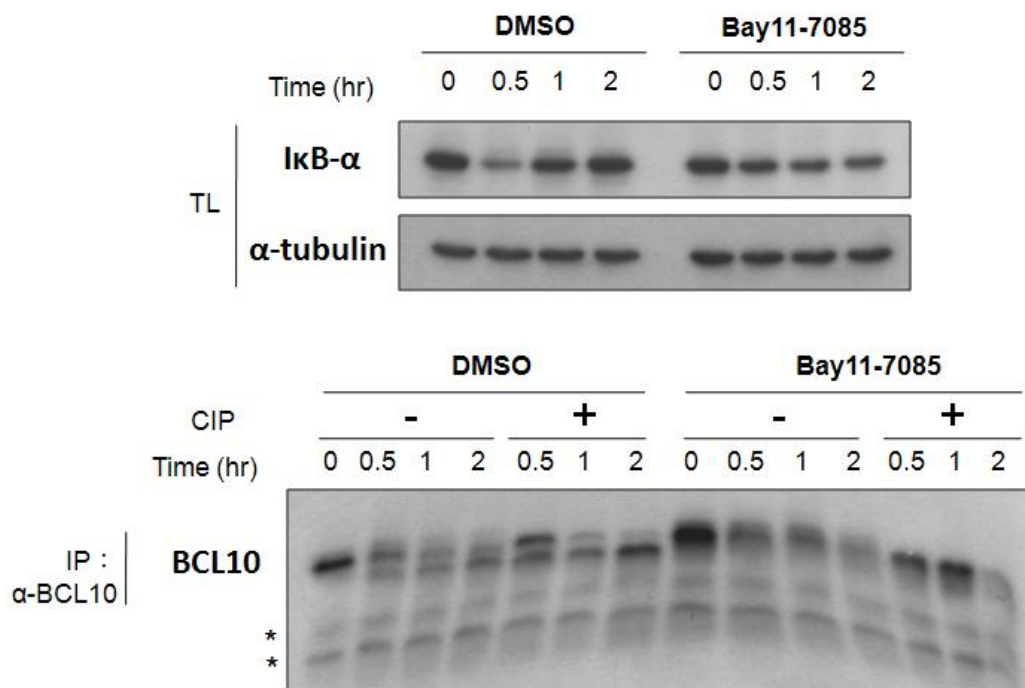
圖六、以 P/I 刺激 NK 細胞的活化可造成 BCL10 的切割。

將 NK 細胞，以 PMA(50ng/ml)與 ionomycin(1 μ M)刺激後，在加入刺激後的 0、15、30、60、120、240 分鐘，收取細胞蛋白質，取 30 μ g 進行 SDS-PAGE 電泳後，以 anti-IkB α 抗體進行西方墨點法。另一方面取 600 μ g 的細胞蛋白質，以 anti-BCL10 抗體進行免疫沈澱 12-16 小時後，經 PBS 清洗後從中取 1/2 蛋白質以 CIAP 在 37 $^{\circ}$ C 處理一小時，經 SDS-PAGE 電泳後，以 anti-BCL10 抗體進行西方墨點法。 α -tubulin 作為蛋白質質量指標(loading control)。IP：immunoprecipitation(免疫沈澱)。TL：total lysate(細胞蛋白質)。CIAP：Calf Intestine Alkaline Phosphatase(磷酸水解酶)。



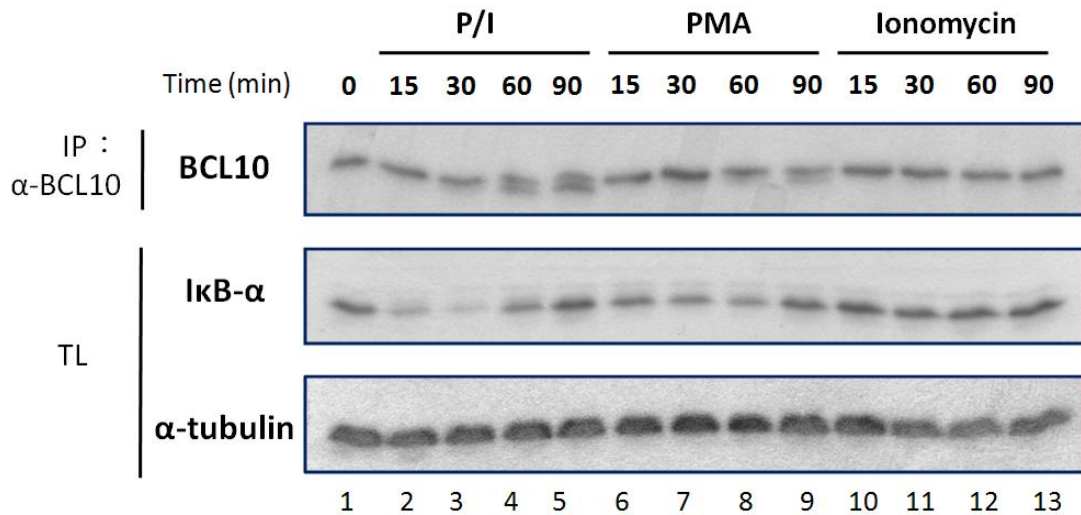
圖七、MG132 的前處理並不影響 BCL10 的切割

將 Jurkat T 細胞以 MG132(10 μ M) 或 DMSO 前處理 30 分鐘後，再以 PMA(50ng/ml)與 ionomycin(1 μ M)刺激 Jurkat T 細胞活化，在加入刺激後的 0、0.5、1、2 小時後，收取細胞蛋白質，取 30 μ g 進行 SDS-PAGE 電泳後，以 anti-IkB α 抗體進行西方墨點法。另一方面取 600 μ g 的細胞蛋白質，以 anti-BCL10 抗體進行免疫沈澱 12-16 小時後，經清洗後從中取 1/2 蛋白質以 CIAP 在 37 $^{\circ}$ C 處理一小時，經 SDS-PAGE 電泳後，以 anti-BCL10 抗體進行西方墨點法。 α -tubulin 作為蛋白質質量指標(loading control)。IP：immunoprecipitation(免疫沈澱)。TL：total lysate(細胞蛋白質)。CIP(CIAP)：Calf Intestine Alkaline Phosphatase(磷酸水解酶)。* 為 Immunoglobulin light-chain。



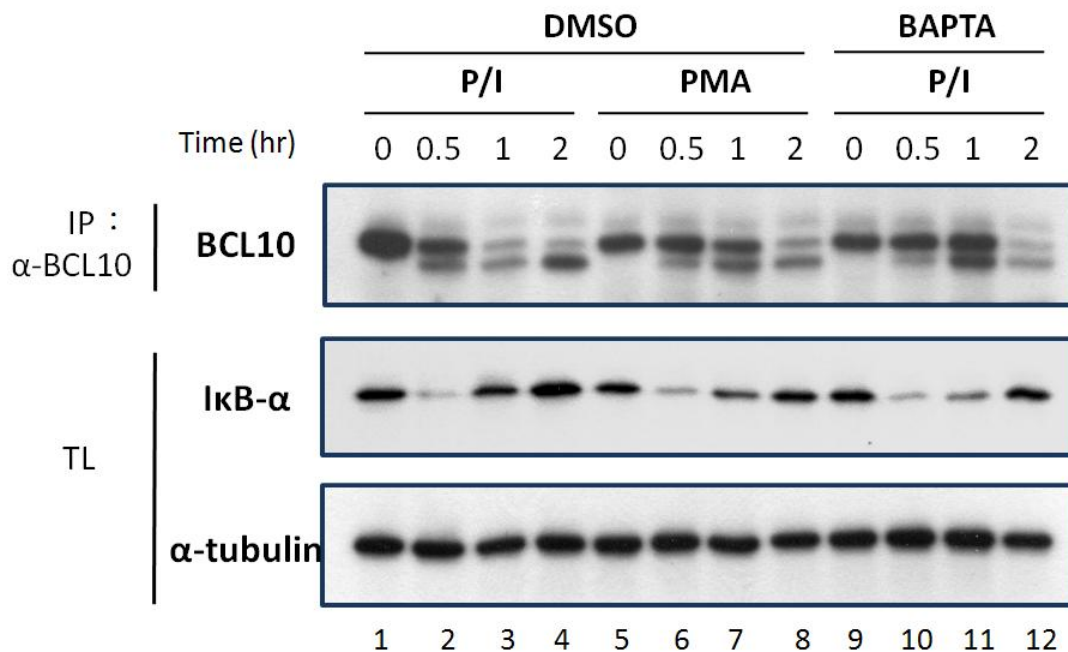
圖八、Bay11-7085 前處理可以抑制 BCL10 的切割

將 Jurkat T 細胞以 Bay11-7085(20 μ M)或 DMSO 前處理 30 分鐘後，再以 PMA(50ng/ml)與 ionomycin(1 μ M)刺激 Jurkat T 細胞活化，在加入刺激後的 0、0.5、1、2 小時後，收取細胞蛋白質，取 30 μ g 進行 SDS-PAGE 電泳後，以 anti-IkB α 抗體進行西方墨點法。另一方面取 600 μ g 的細胞蛋白質，以 anti-BCL10 抗體進行免疫沈澱 12-16 小時後，經清洗後從中取 1/2 蛋白質以 CIAP 在 37 $^{\circ}$ C 處理一小時，經 SDS-PAGE 電泳後，以 anti-BCL10 抗體進行西方墨點法。 α -tubulin 作為蛋白質量指標(loading control)。IP：immunoprecipitation(免疫沈澱)。TL：total lysate(細胞蛋白質)。CIAP：Calf Intestine Alkaline Phosphatase(磷酸水解酶)。*為 Immunoglobulin light-chain



圖九、鈣離子不足以活化 NF-κB，但可以有助於 BCL10 的切割

將 Jurkat T 細胞，以 PMA(50ng/ml)與 ionomycin(1μM) (Lanes 2-4) 或 PMA(50ng/ml)(Lanes 6-9)或 ionomycin(1μM)(Lanes 10-13)刺激後，在加入刺激後的 0、15、30、60、90 分鐘，收取細胞蛋白質，取 30μg 進行 SDS-PAGE 電泳後，以 anti-IκBα 抗體進行西方墨點法。另一方面取 300μg 的細胞蛋白質，以 anti-BCL10 抗體進行免疫沈澱 12-16 小時後，經 PBS 清洗後以 CIAP 在 37°C 處理一小時，經 SDS-PAGE 電泳後，以 anti-BCL10 抗體進行西方墨點法。α-tubulin 作為蛋白質量指標(loading control)。IP：immunoprecipitation(免疫沈澱)。TL：total lysate(細胞蛋白質)。CIAP：Calf Intestine Alkaline Phosphatase(磷酸水解酶)。P/I：PMA/ionomycin。

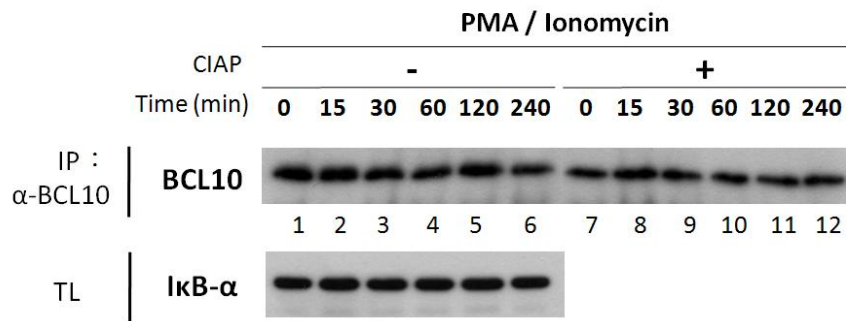


圖十、以 BAPTA 螯合細胞內的鈣離子觀察 NF-κB 的活化以及 BCL10 的切割

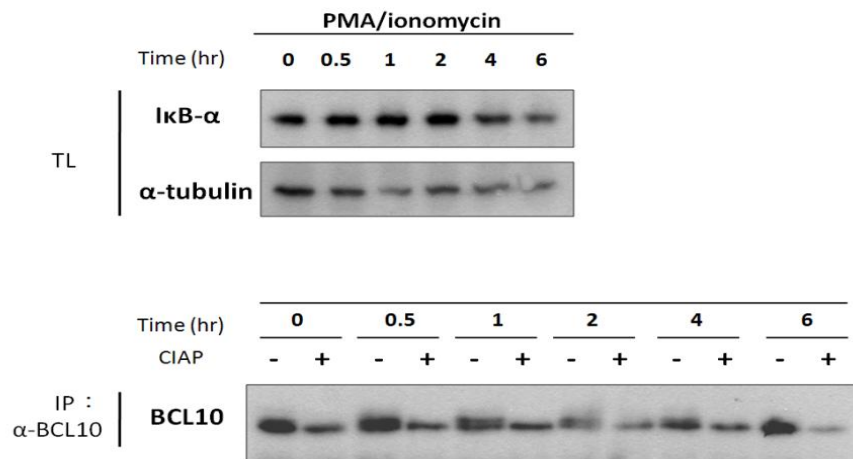
將 Jurkat T 細胞以 BAPTA(40μM)或 DMSO 前處理 30 分鐘後，以 PMA(50ng/ml) 與 ionomycin(1μM) (Lanes 1-4)或 PMA(50ng/ml) (Lanes 5-8)或 ionomycin(1μM) (Lanes 9-12)刺激 Jurkat T 細胞活化，在加入刺激後的 0、0.5、1、2 小時，收取細胞蛋白質，取 30μg 進行 SDS-PAGE 電泳後，以 anti-IκBα 抗體進行西方墨點法。另一方面取 300μg 的細胞蛋白質，以 anti-BCL10 抗體進行免疫沈澱 12-16 小時後，經清洗後從中取 1/2 蛋白質以 CIAP 在 37°C 處理一小時，經 SDS-PAGE 電泳後，以 anti-BCL10 抗體進行西方墨點法。α-tubulin 作為蛋白質質量指標(loading control)。

IP : immunoprecipitation(免疫沈澱)。TL : total lysate(細胞蛋白質)。CIP(CIAP) : Calf Intestine Alkaline Phosphatase(磷酸水解酶)。

A

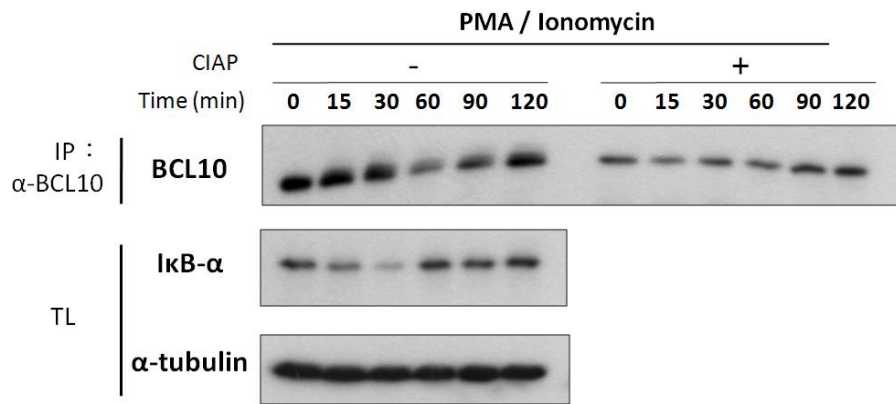
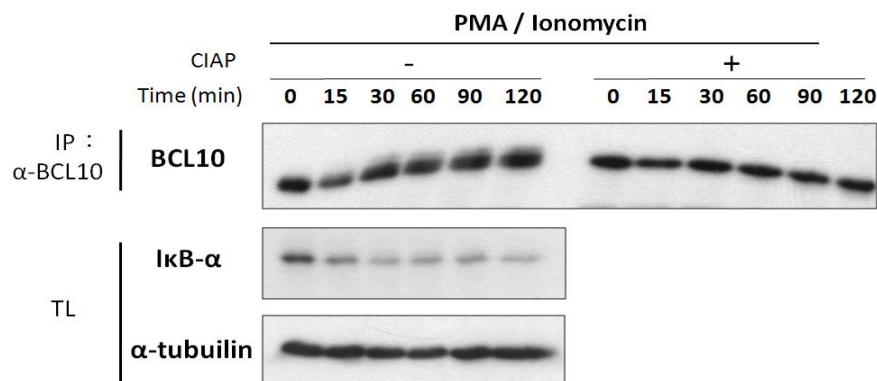


B



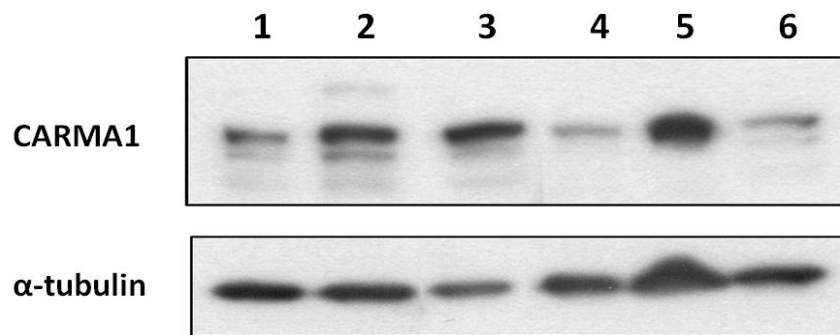
圖十一、骨髓系細胞經 PMA/ionomycin 刺激後 BCL10 表現的情形。

將 Raw264.7 細胞(圖 A)或 THP-1 細胞(圖 B)，以 PMA(50ng/ml)與 ionomycin(1μM)刺激後，在加入刺激後的 0、15、30、60、120、240 分鐘(圖 A)或加入刺激後的 0、0.5、1、2、4 小時(圖 B)，收取細胞蛋白質，取 30μg 進行 SDS-PAGE 電泳後，以 anti-IκBα 抗體進行西方墨點法。另一方面取 600μg 的細胞蛋白質，以 anti-BCL10 抗體進行免疫沈澱 12-16 小時後，經 PBS 清洗後從中取 1/2 蛋白質以 CIAP 在 37°C 處理一小時，經 SDS-PAGE 電泳後，以 anti-BCL10 抗體進行西方墨點法。α-tubulin 作為蛋白質量指標(loading control)。IP：immunoprecipitation(免疫沈澱)。TL：total lysate(細胞蛋白質)。CIAP：Calf Intestine Alkaline Phosphatase(磷酸水解酶)。

A**B**

圖十二、非血液細胞經 PMA/ionomycin 刺激後 BCL10 表現的情形。

將 HeLa 細胞(圖 A)或 293T 細胞(圖 B)，以 PMA(50ng/ml)與 ionomycin(1 μ M)刺激後，在加入刺激後的 0、15、30、60、90、120 分鐘後，收取細胞蛋白質，取 30 μ g 進行 SDS-PAGE 電泳後，以 anti-I κ B α 抗體進行西方墨點法。另一方面取 600 μ g 的細胞蛋白質，以 anti-BCL10 抗體進行免疫沈澱 12-16 小時後，經 PBS 清洗後從中取 1/2 蛋白質以 CIAP 在 37 $^{\circ}$ C 處理一小時，經 SDS-PAGE 電泳後，以 anti-BCL10 抗體進行西方墨點法。 α -tubulin 作為蛋白質量指標(loading control)。IP：immunoprecipitation(免疫沈澱)。TL：total lysate(細胞蛋白質)。CIAP：Calf Intestine Alkaline Phosphatase(磷酸水解酶)。



圖十三、CARMA1 蛋白質在不同細胞皆有表現

在不經任何刺激的情況下，取 30 μ g 的細胞蛋白質進行 SDS-PAGE 電泳後，以 anti-CARMA1 抗體進行西方墨點法。 α -tubulin 作為蛋白質量指標 (loading control)

Lane1 : Jurkat T 細胞

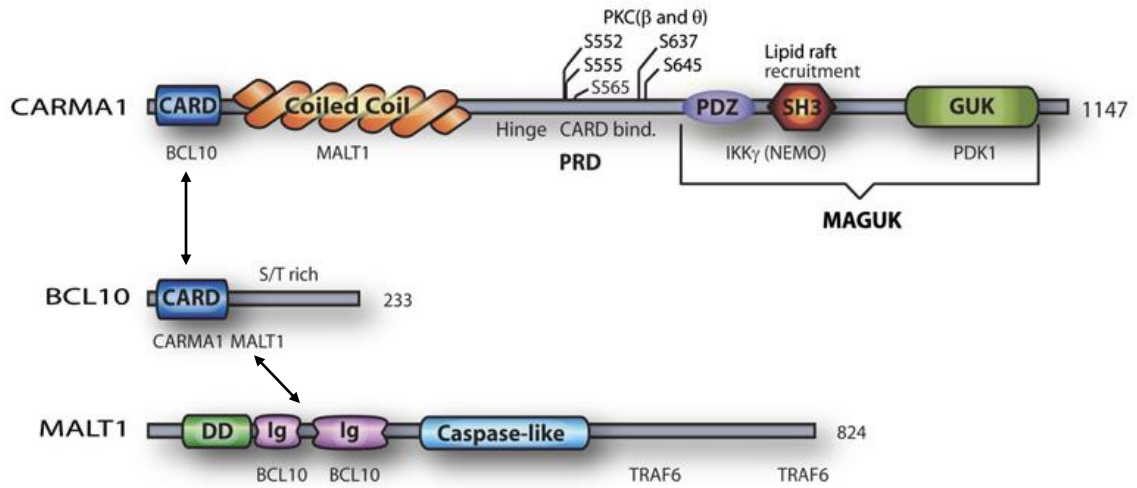
Lane2 : Raji B 細胞

Lane3 : Raw264.7 細胞

Lane4 : 293T 細胞

Lane5 : HeLa 細胞

Lane6 : HMEC-1 細胞

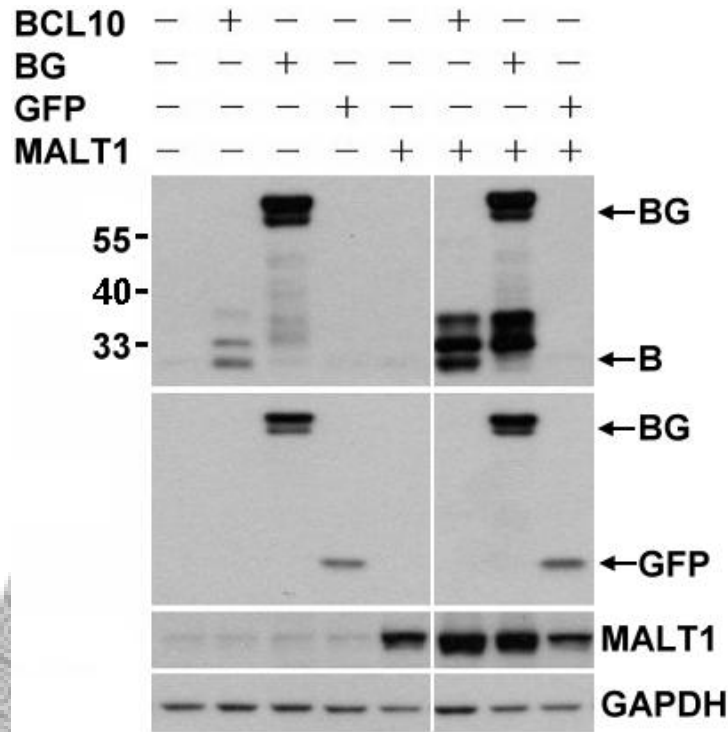


附圖一、CBM complex 之蛋白質結構

修改自 Schulze-Luehrmann, J. *et al.* (2006)review 之圖二 [33]

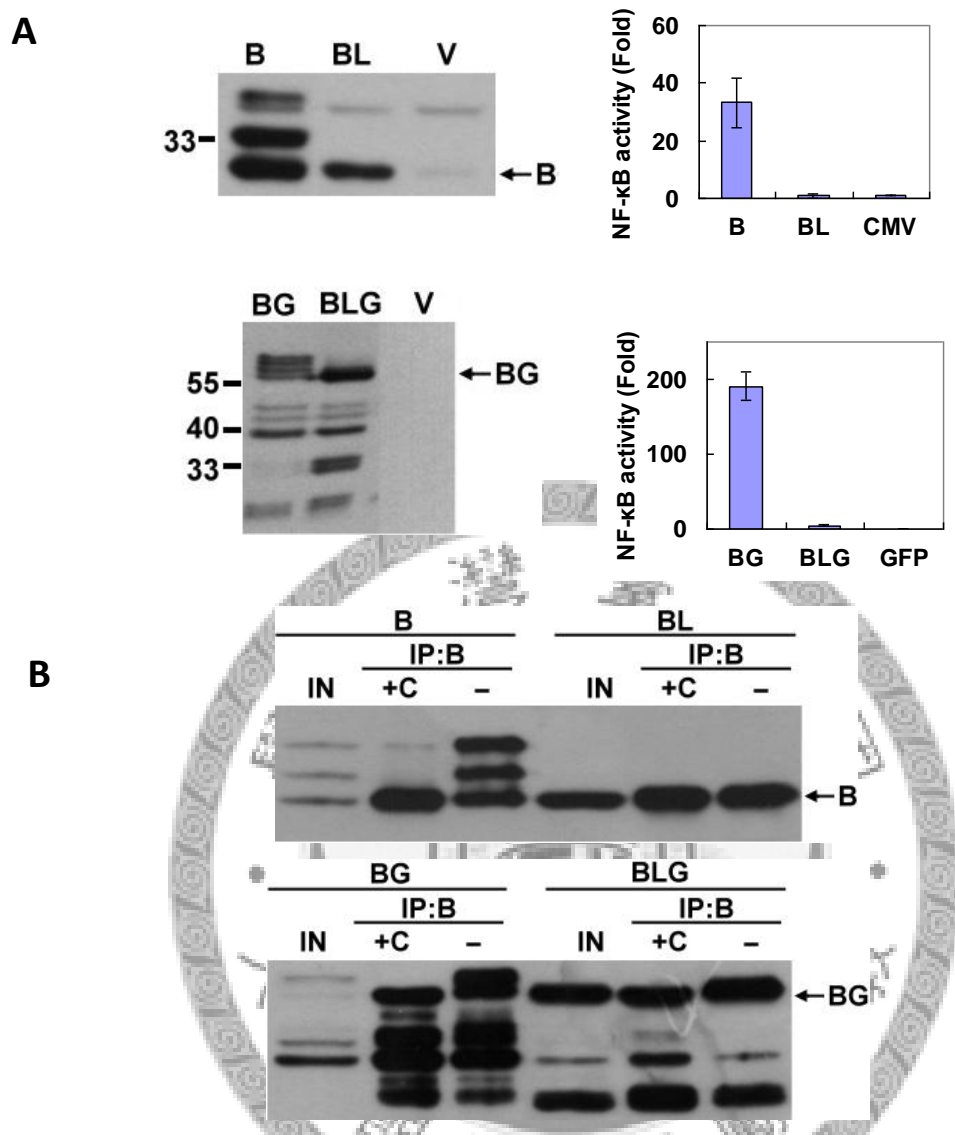
雙箭號用以表示蛋白質之間的交互作用。





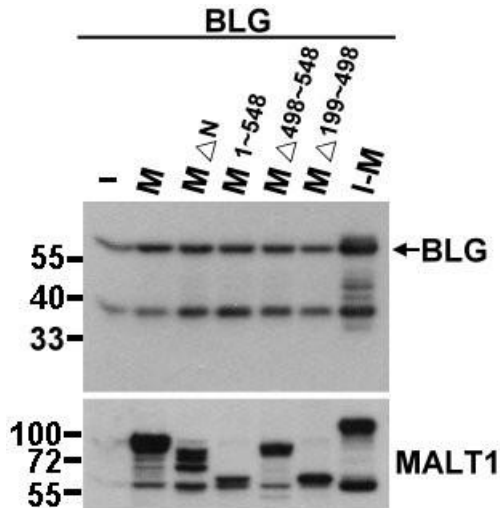
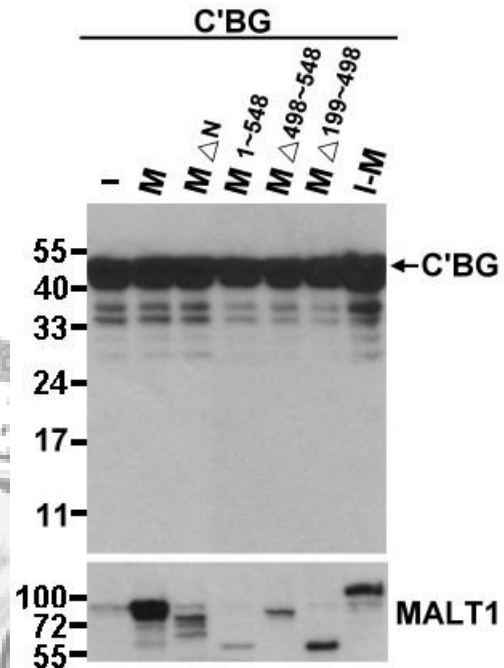
附圖二、BCL10 受 MALT1 誘導而產生切割現象。

MALT 1(2.25 μ g)與 BCL10(0.25 μ g)或 BCL10GFP(0.25 μ g)共轉染至 293T 細胞，蛋白質表現以西方墨點法分析，分別用 BCL10 一級抗體(上方圖示)或 rabbit-GFP 一級抗體辨識(中間圖示)。摘錄自周欣儀碩士論文(95 年 6 月)圖十三。



附圖三、BCL10 大量表現可引發磷酸化修飾及 NF-κB 活化。

轉染 2 μ g 表現質體於 293T 細胞，48 小時後收取蛋白質以西方墨點法分析或進行 Luciferase Assay 偵測 NF-κB 活化能力。(A)B 與 BG 可表現多種分子量之蛋白質並可活化 NF-κB，但 BL 與 BLG 無相同能力。(B)表現之蛋白質以 BCL10 一級抗體進行免疫沉澱反應，免疫沉澱產物以去磷酸酵素作用，利用西方墨點法分析。IN：total cell lysate input。C：CIAP (Calf Intestine Alkaline Phosphatase)去磷酸酵素作用。B：BCL10、BG：BCL10GFP、BL：BCL10L41R、BLG：BCL10L41RGFP。NF-κB 活化能力以 p-NF-κB-Luc (0.5 μ g)為 reporter、pCMV-Renilla-Luc (0.25 μ g)為 internal control。摘錄自周欣儀碩士論文(95 年 6 月)圖五。

A**B**

附圖四、磷酸化的 BCL10 是較好的 MALT1 誘導切割受質。

(A)分別將 MALT1 constructs 與 BLG 共同轉染至 293T 細胞。(B)分別將 MALT1 constructs 與 C'BG 共同轉染至 293T 細胞。西方墨點法分析切割情形，以 BCL10 一級抗體辨識。M：MALT1。M Δ N：MALT1 Δ N (具有 127~824 a.a.，缺少 Death domain)。M 1~548：MALT1 1~548 a.a. (缺少 C 端區域)。M Δ 498~548：MALT1 Δ 498~548 a.a. (缺少 caspase like domain CLD)。M Δ 199~498：MALT1 Δ 199~498 a.a. (缺少第二個 Ig domain 及 CLD)。I-M：IAP2-MALT1 (包含 IAP2 三個 BIR domain 及 MALT1 兩個 Ig domain、CLD 及 C 端區域)。摘錄自周欣儀碩士論文(95 年 6 月)圖十九。