

國立臺灣大學醫學院藥理學研究所

碩士論文

Graduate Institute of Pharmacology

College of Medicine

National Taiwan University

Master's thesis

探索 SLK 對黏著性細胞骨架的效應

Exploring SLK effects on adhesion cytoskeleton

林芸宇

Yun-Yu Lin

指導老師：蔡丰喬 博士

Advisor: Feng-Chiao Tsai, M.D. Ph.D.

中華民國 113 年 8 月

August, 2024



誌謝



在寫這段話的時候好像還是不知道自己能不能畢業，但是研究所生活到現在必須得感謝很多人。謝謝蔡丰喬老師覺得我可以做到很多事，在我覺得我什麼都不可以的時候發現我的優點，一直沒有放棄我，讓我就算一路上磕磕絆絆也依然生出了勉強稱得上結果的結果。在跟老師討論的過程中，每次都會被老師對於科學的認真與熱愛所折服，讓我非常敬佩。謝謝郭津岑老師、曾炳輝老師與林耿慧老師來參與我的進度報告與口試，對於整個實驗方向提出各種見解，讓我多了一些不同思考。

感謝實驗室的許多好夥伴，軒兆學長豐富的學術知識和實驗技巧讓我獲益良多，鈺喬對顯微鏡很了解，在影像或是機器操作方面都能解決我的問題，生活方面也帶我吃喝玩樂，非常感謝。感謝琪琳常常幫我檢查實驗設計上的缺點，聽我分享心事，偶爾還一起通勤很開心。感謝朱怡關心我生活的大小事，還會一直分享好吃的。感謝米蘭達和堂萌當我的好同學，在班級事務和實驗室的事情上都能互相幫忙，分享各種事情也有趣又好笑。感謝冠志和耀斌總是聽我說話，包容我各種奇特想法，也願意幫我的忙。感謝庭瑋常常來實驗室幫忙，還會跟我一起搞笑和炒氣氛。感謝彥萱耐心地帶我做實驗，還告訴我一些台北生活的小技巧。感謝實驗室裡的每個人，打理實驗室的各種事務，讓實驗能順利進行。也感謝所辦的青蓉和欣蓉會來問問我最近還好嗎，關心我的近況。

最後感謝我的家人供給我研究所的生活，還有我的朋友們給我很多支持和鼓勵，感謝陳醫生耐心地聽我講很多話，不管講了什麼都能給我一些回饋，也感謝我自己沒有真的休學轉身逃跑，雖然花了多點時間，但真的有得到些什麼吧。

摘要



SLK(Ste20-like kinase)是一種絲胺酸/蘇胺酸蛋白激酶，參與了細胞遷移、細胞凋亡和細胞增殖等許多生物過程。它被確定為我們最近的合成運動障礙篩選的候選者之一，是因為我們觀察到透過同時抑制肌球蛋白活化劑 ROCK 和肌動蛋白調節劑 SLK 便可以協同性地增加集體細胞遷移的速度。儘管先前的研究表明 SLK 可能直接抑制心肌細胞中的 RhoA-ROCK 活性，但我們的結果並未揭示細胞遷移過程中 SLK 和 ROCK 之間有直接訊號的相互作用。實驗結果還顯示，SLK knockdown 改善了頭頸癌 SAS 細胞和人類皮膚角質細胞 HaCaT 細胞的細胞排列整齊度和肌動蛋白結構。然後，就像之前文獻所報導的，我們證實 SLK 能夠透過 Ezrin 去改變肌動蛋白的結構。有趣的是，SLK knockdown 對肌動蛋白結構的影響與 Ezrin knockdown 是極為相似的，但卻無法透過抑制 Ezrin 的磷酸化重現相似結果，顯示 SLK 可能是透過非激酶的功能調節肌動蛋白。另外 SLK knockdown 可增加 Ezrin 從細胞質到細胞核的比例上升，但抑制 Ezrin 磷酸化則不會增加此現象，表示 SLK 是以非激酶依賴性方式調節 Ezrin。

因此，我們推測非激酶依賴性方式的 SLK-Ezrin 組合會去調節肌動蛋白的細胞骨架以重塑細胞-細胞和細胞-基質黏附，這兩者對於細胞排列完整性和集體細胞遷移非常重要。我們現在正在致力於釐清非激酶依賴性方式的 SLK-Ezrin 如何調節黏附細胞骨架，最終目標是了解其在集體細胞遷移過程中與 ROCK 的協同合作模式。 關鍵字：細胞遷移，SLK，Ezrin，肌動蛋白

Abstract



SLK (Ste20-like kinase) is a serine/threonine protein kinase involved in many biological processes including cell migration, apoptosis and cell proliferation. It was identified as one of the candidates from our recent screen of synthetic dysmobility, as collective cell migration could be synergistically increased by simultaneous suppression of myosin activator ROCK and actin modulator SLK. Although previous research suggested that SLK might directly suppress RhoA-ROCK activities in cardiomyocytes, our results did not reveal direct signaling interactions between SLK and ROCK during cell migration. Our data also showed that knockdown of SLK improved cell alignment and actin structure in head and neck cancer SAS cells and human keratinocytes HaCaT cells. Then, we confirmed that SLK altered actin structures through Ezrin as reported previously. Intriguingly, effects of SLK knockdown on actin could be repeated by Ezrin knockdown, but not by inhibitor of Ezrin phosphorylation, suggesting that SLK modulated actin by non-kinase function. Moreover, translocation of Ezrin from cytosol into nuclei was increased by SLK knockdown, but not by inhibitor of Ezrin phosphorylation, indicating that SLK regulated Ezrin in kinase-independent manners.

Therefore, we speculated that kinase-independent SLK-Ezrin regulates actin cytoskeletons to remodel cell-cell and cell-matrix adhesion, both of which are critical for cell sheet integrity and collective cell migration. We are now elucidating how kinase-independent SLK-Ezrin regulates adhesion cytoskeletons, with the ultimate goal of understanding its mode of synergistic collaboration with ROCK during collective cell migration.

Keywords: cell migration, SLK, Ezrin, actin

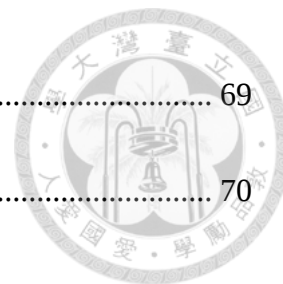
目次



誌謝	1
摘要	2
Abstract.....	3
目次	5
圖次	7
表次	9
第一章 介紹	10
1.1 細胞遷移的重要性及目前研究進展	10
1.2 篩選出細胞遷移相關基因與訊息傳遞路徑交互作用：Two-HIT SHRNA SCREENING	10
1.3 STE20-LIKE KINASE (SLK)	13
1.4 實驗室先前研究成果	14
1.5 近年文獻報告整理	16
1.6 研究目標	17
第二章 材料與方法	18
2.1 細胞培養與藥物處理	18
2.2 相關質體應用 PLASMIDS	19
2.3 病毒製備 LENTIVIRUS	19
2.4 KNOCKDOWN	20
2.5 免疫螢光染色 IMMUNOFLUORESCENCE	20
2.6 西方墨點法 WESTERN BLOTTING	21

2.7	CALCIUM DYNAMICS EGTA ASSAY	22
第三章	結果	23
3.1	SLK 與 MLC 的關係	23
3.2	SLK 影響細胞排列與形狀	28
3.3	SLK 是否經由 ERM 影響 ACTIN	30
3.4	SLK 是否影響 EZRIN 出入細胞核	48
3.5	SLK 是否會影響 ECADHERIN	54
3.6	SLK 是否會影響 PAXILLIN	57
第四章	討論	59
4.1	調控 SLK 在 SAS 和 HUVEC 上有不同表現的可能原因	59
4.2	SLK 以 EZRIN 調控 ACTIN, 但是與 SLK KINASE 功能較無相關	60
4.3	SLK 調控 EZRIN 出入核, 但是與 SLK KINASE 功能較無相關	60
4.4	確認 SLK NON-KINASE FUNCTION 對於 EZRIN 出入核的影響	61
4.5	確認不同磷酸化型態 EZRIN 對於 ACTIN 的影響：利用 EZRIN-P2A- MEMERALD MUTANT	61
4.6	維持細胞形狀的可能性	62
4.7	SLK 在不同細胞中的不同表現	63
4.8	假設圖	63
第五章	參考文獻	65
第六章	附錄	69
6.1	附圖	69

6.2	質體 MAPS	69
6.3	MATLAB 程式稿	70



圖次

圖一、	Two-hit shRNA screening: 同時 knockdown SLK 並給予 ROCK 抑制劑 Y27632 對細胞遷移速度有加成效果	11
圖二、	以 SAS 細胞探討 SLK 與 ROCK 的關聯	15
圖三、	推測 SLK 在 RhoA/ROCK/pMLC 訊息傳遞路徑的位置及影響	16
圖四、	Matlab 分析免疫螢光染色影像的示意圖	24
圖五、	在 SAS 細胞，SLK knockdown 後未能提升 pMLC 的表現量	26
圖六、	在 SAS 細胞，SLK knockdown 後不會影響 total MLC 的表現量 ...	27
圖七、	在 SAS 細胞，SLK knockdown 使細胞排列變整齊，細胞形狀較一致	28
圖八、	以 SAS 細胞觀察 SLK knockdown 並給予 Ezrin inhibitor 對 actin 的 影響	31
圖九、	以 HaCaT 細胞觀察 SLK knockdown 並給予 Ezrin inhibitor 對 actin 的 影響	34
圖十、	以 SAS 細胞觀察 SLK knockdown 並給予 Ezrin inhibitor 對 pERM/Ezrin 的影響	36
圖十一、	以 HaCaT 細胞觀察 SLK knockdown 並給予 Ezrin inhibitor 對 pERM/Ezrin 的影響	38

圖十二、	以 SAS 細胞觀察 SLK/Ezrin double knockdown 對 actin 的影響 ...	39
圖十三、	以 HaCaT 細胞觀察 SLK/Ezrin double knockdown 對 actin 的影響	41
圖十四、	Ezrin 的不同型態簡易示意圖	43
圖十五、	假設示意圖：是否 Ezrin 的磷酸化不同狀態會對 actin 有不同的影響	44
圖十六、	觀察過度表現 Ezrin-mEmerald mutant 對 actin 的影響	46
圖十七、	在 HaCaT 細胞上，SLK knockdown 後，Ezrin 的 N/C ratio 有明顯上升的現象	48
圖十八、	在 HaCaT 細胞上，給予 Ezrin inhibitor 後，Ezrin 的 N/C ratio 並沒有明顯變化	49
圖十九、	在 HaCaT 細胞上，SLK 影響 Ezrin 出入核的能力與 exportin 應該是較無關連的	51
圖二十、	在 HaCaT 細胞上觀察到 SLK 影響 Ezrin 出入核的能力與 importin 應該是存在著某種關連的	53
圖二十一、	以 HaCaT 細胞觀察 SLK knockdown 並給予 Ezrin inhibitor 對 ecadherin 的影響	55
圖二十二、	用 EGTA assay 觀察 Ezrin inhibitor 對 ecadherin 的影響	56
圖二十三、	以 HaCaT 細胞觀察 SLK knockdown 對 paxillin 的影響	57
圖二十四、	SLK-Ezrin 假設示意圖	64

表次

表一、	免疫螢光染色使用一級抗體列表	21
表二、	Western blot 使用一級抗體列表.....	22



第一章 介紹



1.1 細胞遷移的重要性及目前研究進展

細胞遷移指的是細胞會因應環境中的變化而做出適當的移動，像是從養分少到養分多、空間小移動到空間大，讓細胞能更易於生存。細胞遷移的能力在生物體中的各種生理過程中皆扮演著重要的角色，例如免疫反應過程中需要免疫細胞遷移至傷口處、皮膚傷口癒合需要表皮細胞移動、胚胎發育過程中也需要各種細胞移動到特定位置參與¹。因此細胞遷移一直是生物學中重要的研究課題。

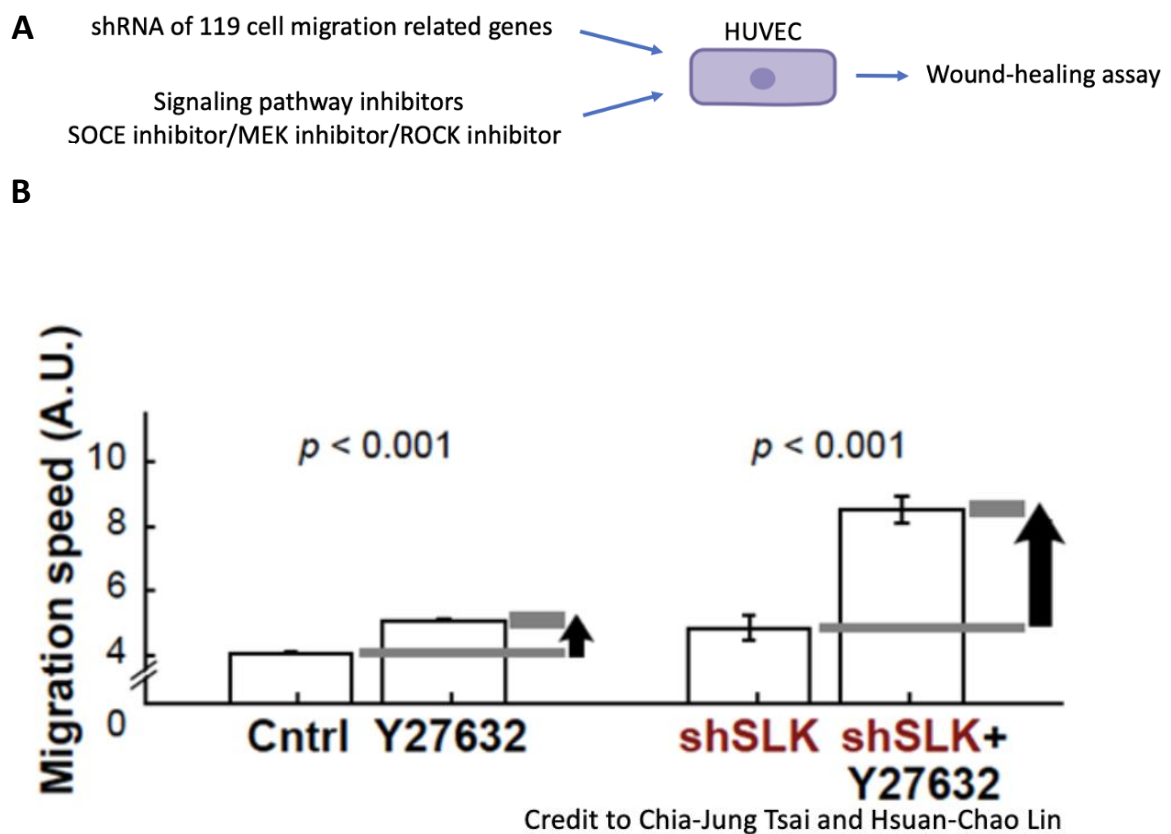
目前研究者們已找出各種與細胞遷移相關的重要因子，但未能知曉這些分子間會如何互相影響、進而產生什麼影響。我們了解的範圍仍相當有限。

1.2 篩選出細胞遷移相關基因與訊息傳遞路徑交互作用：Two-hit shRNA screening

以細胞遷移作為目標，實驗室學長姐參考了 Kaylene J. Simpson² 等人以及 Vitorino P 和 Meyer T³ 等人所發表的文獻進行 Two-hit shRNA screening 實驗。首先是選擇了兩篇文獻皆提到的 119 個重要細胞遷移相關基因，在人類臍靜脈內皮細胞 (HUVEC, human umbilical vein/vascular endothelial cell) 上單獨 knockdown 這些基因後，再分別給予三種訊息傳遞路徑抑制劑---SOCE (Store-operated calcium entry) 抑制劑 BTP2、MEK (MAP Kinase kinase) 抑制劑 PD98059 及 ROCK (Rho-associated protein kinase) 抑制劑 Y27632，接著進行 wound healing assay。在種滿細胞的 well 中央刮出一條傷口，使細胞往中央爬行，以此觀察細胞爬行狀

況，再利用相機紀錄初始時刻以及固定時間段後的中央傷口大小變化，便可計算出細胞遷移的速度，找出能夠最大程度改變細胞遷移速度的基因與抑制劑組合（圖一）。

學長姐分析結果後發現當只有單獨 knockdown SLK 或是單獨給予 ROCK 抑制劑時，細胞遷移速度皆只會各上升一些；但當同時 knockdown SLK 這個基因並給予 ROCK 抑制劑 Y27632 時，細胞遷移速度有明顯的上升變化（圖一）。這現象表示 SLK 與 ROCK 訊息傳遞路徑之間可能存在著交互作用，因此接下來針對 SLK 做更進一步的研究。



圖一、 Two-hit shRNA screening: 同時 knockdown SLK 並給予 ROCK 抑制劑 Y27632 對細胞遷移速度有加成效果。

(A) Two-hit shRNA screening 流程示意圖：在 HUVEC 細胞上，knockdown 細胞遷移相關的 119 個基因，再加上 SOCE/MEK/ROCK 抑制劑，進行 wound healing assay，再以顯微鏡與相機紀錄細胞爬行的狀況。

(B) 藉由計算傷口癒合速度，同時 knockdown SLK 並給予 ROCK 抑制劑 Y27632 對細胞遷移速度有加成效果。





1.3 Ste20-like kinase (SLK)

Ste20-like kinase (SLK) 是一個絲氨酸/蘇氨酸蛋白激酶 (serine/threonine protein kinase), 哺乳類動物像是豬、老鼠、人類的 SLK 都在 1999 年首次被分離出來⁴, 目前的文獻研究還並不充足。

文獻中將 SLK 的結構大致分為三個部分, 分別為 N 端的 kinase domain (amino acid 1-338)、中間的連接區域 (amino acid 339-788) 以及 C - terminal domain (amino acid 789-1202)⁵。一般情況下, SLK 的 C-terminal domain 會與 Ldb1/2 (LIM domain binding transcriptional cofactor proteins) dimer 連結, 使 SLK 的 N 端的 kinase domain 與 C - terminal domain 形成閉鎖構型, 因此 kinase activity 會受到抑制。當 Ldb proteins 離開 SLK, 或是 SLK 的 N 端區域中主要位點 T183、S189 被磷酸化活化後, 從閉鎖構型轉成開放構型, SLK 的 kinase activity 便能夠表現⁶。

目前的文獻已發現 SLK 會參與在許多生理過程中, 像是當胚胎發育的過程中 SLK 無法正常表現會使胚胎死亡⁷; 也有文獻指出, 缺乏 SLK 會使細胞週期(cell cycle) 在成長期 (G phase) 停下, 影響細胞正常生長⁸; 另外也有文獻指, SLK 能夠影響細胞凋亡 (apoptosis)⁵。但目前大部分的研究多為現象部分的觀察, 在機制上尚有許多不清楚的地方。

1.4 實驗室先前研究成果



在實驗室先前的 Two-hit shRNA screening 實驗結果表示同時 knockdown SLK 基因並給予 ROCK 抑制劑 Y27632 時，細胞遷移速度有明顯的上升變化，顯示 SLK 與 ROCK 訊息傳遞路徑之間可能存在著一定程度的交互作用。

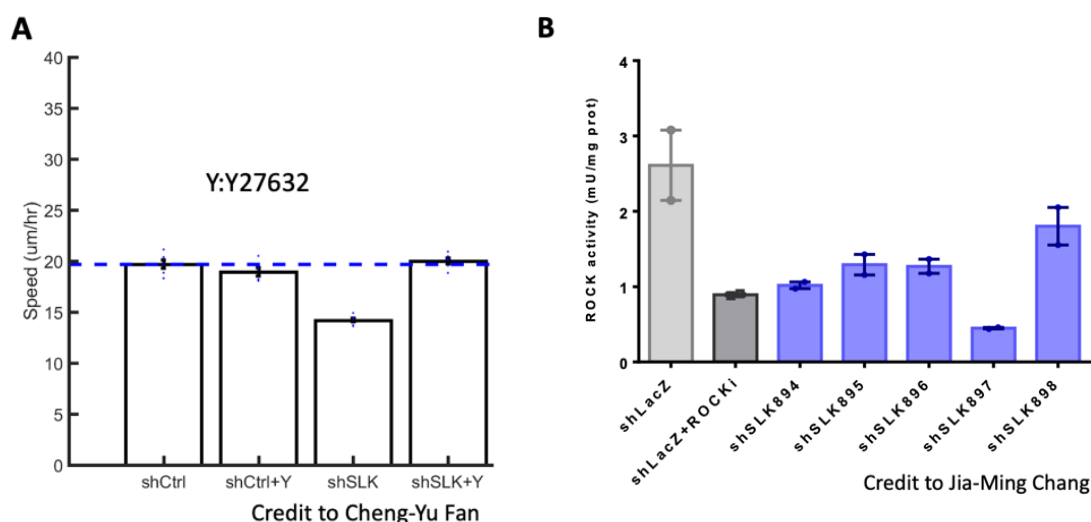
相較於 SLK，RhoA-ROCK 訊息傳遞路徑相關研究時間有數十年，研究數量非常多，相關結果也較為一致。RhoA 屬於 small GTPase family，存在著兩種型態，並且兩種型態之間能互相轉換：與 GTP 結合時呈現活化態，與 GDP 結合時呈現不活化態。當 RhoA 與 GTP 結合呈活化態時，再透過其他 effector protein 將訊息往下游傳遞⁹。而目前文獻公認 RhoA 下游最重要的 effector protein 為 ROCK。ROCK 也屬於 serine/threonine protein kinase，主要有兩個功能：第一，磷酸化 MLC (myosin light chain)，增加 pMLC 的表現量，與 stress fiber 合作，提供細胞收縮向前移動的能力；第二，抑制 cofilin 的活性，穩定 actin filament 的結構¹⁰。

當結果顯示 SLK 與 ROCK 訊息傳遞路徑之間可能存在著交互作用，實驗室學長姐為了釐清他們之間的關係，便從 ROCK 訊息鏈的上下游做探討。首先學長先在人類口腔上皮癌細胞 SAS (squamous cell carcinoma cells) SLK knockdown 並同時給予 ROCK 抑制劑 Y27632，發現 Y27632 能倒轉 SLK knockdown 的效果，顯示 SLK 應位於 ROCK 訊息傳遞路徑的下游(圖二 A)。為了更直接探討 SLK 與 ROCK 之間的關係，學長利用 ROCK activity assay 發現 SLK knockdown 後，



ROCK activity 並沒有增加(圖二 B)。另外為了探討 SLK 與 ROCK 兩個蛋白之間是否有直接的連結，學長利用免疫共沉澱法 (Co-immunoprecipitation, Co-IP) 驗證，結果也顯示 SLK 與 ROCK 並無直接的連結。

除此之外，SLK knockdown 後，不管是利用西方墨點法 (Western blotting) 或是免疫螢光染色法 (Immunofluorescence, IF) 檢驗 ROCK 的主要下游 pMLC，pMLC 皆無明顯的上升。因此，開始懷疑 SLK 與 ROCK 訊息傳遞路徑的直接關聯。



圖二、以 SAS 細胞探討 SLK 與 ROCK 的關聯

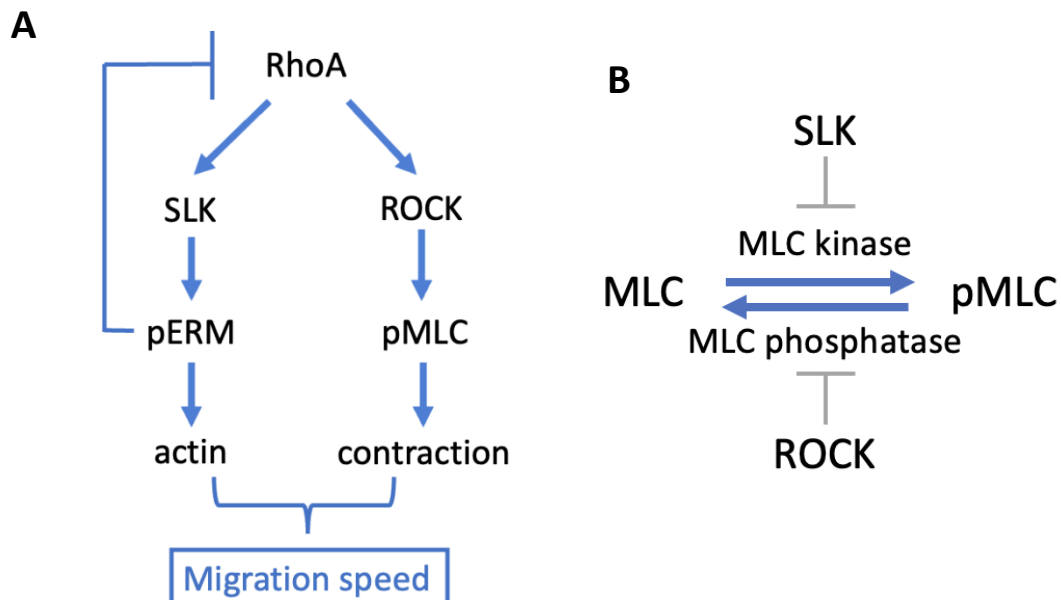
(A) 在 SAS 細胞，利用 wound healing assay 觀察 SLK knockdown 並給予 ROCK 抑制劑 Y27632 後對細胞爬行速度的變化。在 SLK knockdown 並同時給予 ROCK 抑制劑 Y27632 的組別，發現 Y27632 能倒轉 SLK knockdown 對於細胞遷移速度的影響。

(B) 在 SAS 細胞，利用 ROCK activity assay，觀察到 SLK knockdown 後，ROCK activity 並未上升



1.5 近年文獻報告整理

近年來開始有文獻指出，SLK 也是 RhoA 下游的 effector protein 之一，SLK 會被吸引到細胞膜附近，在 RhoA-GTP 活化 SLK 後，SLK 進而磷酸化 Ezrin/Radixin/Moesin (ERM) 蛋白，磷酸化的 ERM 能促使 actin filament 與細胞膜的連結。另外，SLK 與 ERM 皆具有負回饋抑制 GTP-RhoA 的活性^{9,11}。根據之前的實驗結果與文獻回顧，整理出以下的假設圖：SLK 與 ROCK 同為 RhoA 的下游，SLK 不是直接影響 ROCK，而是透過與 ROCK 競爭 active RhoA，或是 SLK/ERM 抑制 RhoA 的負回饋作用，進而對 ROCK pathway 造成影響。除此之外，還有一個新的假設是：SLK 可能是透過抑制 MLC kinase (MLCK)，對 pMLC 造成影響，進而對 ROCK pathway 造成影響。



圖三、推測 SLK 在 RhoA/ROCK/pMLC 訊息傳遞路徑的位置及影響

(A) SLK 不是直接影響 ROCK，而是透過與 ROCK 競爭 active RhoA，或是 SLK/ERM 抑制 RhoA 的負回饋作用，進而對 ROCK pathway 造成影響。

(B) SLK 可能是透過抑制 MLC kinase (MLCK)，對 pMLC 造成影響，進而對 ROCK pathway 造成影響。

1.6 研究目標

我們的研究目標主要是要探討 SLK 與 RhoA/ROCK/pMLC 訊息傳遞路徑的關係，驗證圖三的假設，探討 SLK 在 RhoA/ROCK/pMLC 訊息傳遞路徑的位置是否正確，以及透過何種途徑互相影響，最後反映了細胞遷移速度的變化。

第二章 材料與方法



2.1 細胞培養與藥物處理

實驗初期使用的細胞為人類口腔上皮癌細胞 SAS，後來則使用人類皮膚角質上皮細胞 HaCaT，皆以含有 10% fetal bovine serum(FBS)、1% penicillin/streptomycin 的 DMEM(Gibco)為培養液，並培養於 37 度、5% CO₂ 環境的培養箱。繼代方式：以 PBS 清洗，再分別加入 1x 0.5% Trypsin-EDTA、2x 0.5% Trypsin-EDTA 並放入培養箱反應 2~3、5~7 分鐘。以 DMEM 中和 trypsin 反應後，採用轉速 1000rpm、離心 3 分鐘使細胞沉澱。除去上清液後，加入 DMEM 混勻再取適當比例回種培養。

相關藥物使用包含 Y27632(Cayman, 10 μ M, 2 小時)，ML-9 (MedchemExpress, 10 μ M, 2 小時)，NSC668394(Sigma-Aldrich, 10 μ M, 2 小時)，Leptomycin B(100nM, 2 小時)，Ivermectin(0.75 μ M, 2 小時)。



2.2 相關質體應用 Plasmids

向中研院 RNAi core 購買帶有 shSLK894、shSLK896、shSLK897、shEzrin59460 以及 shEzrin59461-lentiviral plasmid 的菌液。其餘使用的質體包含 Emerald-Ezrin(emerald 接 N 端), Ezrin-emerald(emerald 接 C 端), Emerald-Ezrin(T567A), Emerald-Ezrin(T567D)等等來自實驗室軒兆學長製備。以上 plasmid 皆經由 Stbl3 細胞培養放大，再放大為 midi 等級抽取 plasmid 後，製備病毒應用於實驗中。

2.3 病毒製備 Lentivirus

利用人類胚胎腎細胞 HEK293T 作為培養病毒的載體，將 HEK293T 培養於 10 公分 dish 中至 1.4×10^6 顆細胞/dish 的密度，再依據中研院 RNAi core 的流程，以質量 9:1:10 的比例將 pCMV Δ 8.91: pMDG :我們欲使感染細胞表現的 plasmid 加至 Opti-MEM 混勻，再利用 TransIT-LT1(invitrogen)將混勻後的 plasmid 轉染至 HEK293T。接下來兩天皆以含有 1% BSA 的 DMEM 做替換，並將含有病毒的 1% BSA 的 DMEM 以 0.45 μ m filter 過濾後收集，再以病毒液：Lenti-X = 3:1 的體積比加入 Lenti-X concentrator (ClonTech)做濃縮後放入 4 度冰箱至隔夜。以 4 度轉速 1500xg、離心 45 分鐘後，除去上清液，再用含有 1% BSA 的 DMEM 回溶病毒 pellet，並分裝保存於-80 度冰箱。



2.4 Knockdown

以 1:100 的比例將 rat collagen 溶於 PBS 混勻，加 100 μ l/well 至 96 well plate，放入 37 度培養箱作用 2 小時～隔天，再以 PBS 沖洗且去除液體後備用。

將需要的細胞數，欲感染的 shRNA 和添加 polybrene (1:1000)並混勻再加至 96 well plate，放入培養箱至隔天。隔天，加入 puromycin (1:5000)並放入培養箱兩天去篩選出有 knockdown 成功的細胞以備後續實驗使用。

2.5 免疫螢光染色 Immunofluorescence

將細胞備於 96 well plate 中，進行實驗所需處理後，每 well 加入 66 μ l 的 10% Paraformaldehyde (PFA)放置室溫下 10-15 分鐘對細胞進行固定；再以 3% BSA、0.3% TritonX100 in 1X PBS 的溶液使細胞 blocking，室溫下震盪 30 分鐘；接下來換為以 blocking buffer 為底再加入一級抗體(表一)的溶液，置 4 度震盪至隔夜。

隔天以 PBS wash 三次後，換為以 blocking buffer 為底再加入 DAPI 染劑、phalloidin 染劑或螢光二級抗體的溶液，室溫下震盪 1 小時，再以 PBS wash 三次後，每 well 皆含有 100 μ l 的 PBS 後，放置顯微鏡下觀察。並拍照儲存影像後，以 ImageJ 軟體、Matlab 程式進行數據分析。

表一、 免疫螢光染色使用一級抗體列表

目標蛋白	來源	編號	稀釋倍率
MLC	Cell Signaling Technology	#3672	1:200
pMLC	Cell Signaling Technology	#3671	1:100
Ezrin	Cell Signaling Technology	#3145	1:200
pERM	Cell Signaling Technology	#3726	1:200
Ecadherin	Cell Signaling Technology	#3195	1:200
paxillin	BD bioscience	#BD612405	1:100

2.6 西方墨點法 Western blotting

以 PBS wash 細胞後，加入含有 protease/phosphatase inhibitor 的 lysis buffer，並以細胞刮勺刮下細胞收集至 eppendorf，在 4 度冷房震盪 30 分鐘後，再以 4 度 12000g 離心 10 分鐘並收取上清液。以 BCA assay 測量蛋白濃度，並根據結果將各組蛋白配製成相同濃度的 sample，以 95 度 8 分鐘加熱 sample 使蛋白變性，並保存於-20 度冰箱。

製作電泳所需膠體並待之凝固後，以電泳方式(上膠：60V 20min/下膠：100-120v 120min)將 sample 中的蛋白根據分子量大小分離，再從膠體轉漬(100v 120min)至 PVDF 膜上，並以目標蛋白大小不同分割。接下來，將膜浸泡在 5%

BSA TBST 溶液 blocking，室溫震盪 1 小時，再換成含有一級抗體(表二) 5% BSA TBST 溶液，置 4 度震盪至隔夜。隔天以 TBST wash 3 次後，換為含有二級抗體的 5% BSA TBST 溶液，室溫震盪 1 小時，再以 TBST wash 3 次。最後加入 ECL buffer 呈色、拍照儲存影像，並以 VisionWorks 軟體分析影像。

表二、 Western blot 使用一級抗體列表

目標蛋白	來源	編號	稀釋倍率
MLC	Cell Signaling Technology	#3672	1:1000
pMLC	Cell Signaling Technology	#3674	1:1000
Ezrin	Cell Signaling Technology	#3145	1:1000
pERM	Cell Signaling Technology	#3726	1:1000
GAPDH	Cell Signaling Technology	#2118	1:5000

2.7 Calcium dynamics EGTA assay

在不含血清之 serum-free medium 中，加入 EGTA，配成 3.6mM EGTA 的 Medium，並在不同時間點加入 100 μ l medium 至已備好細胞的 96 well plate 中，在一定時間後以 PBS wash，並加入 4% Paraformaldehyde (PFA) 放置室溫下 10-15 分鐘對細胞進行固定。並以免疫螢光染色的方法 blocking、一抗、二抗，最後上顯微鏡進行觀察。

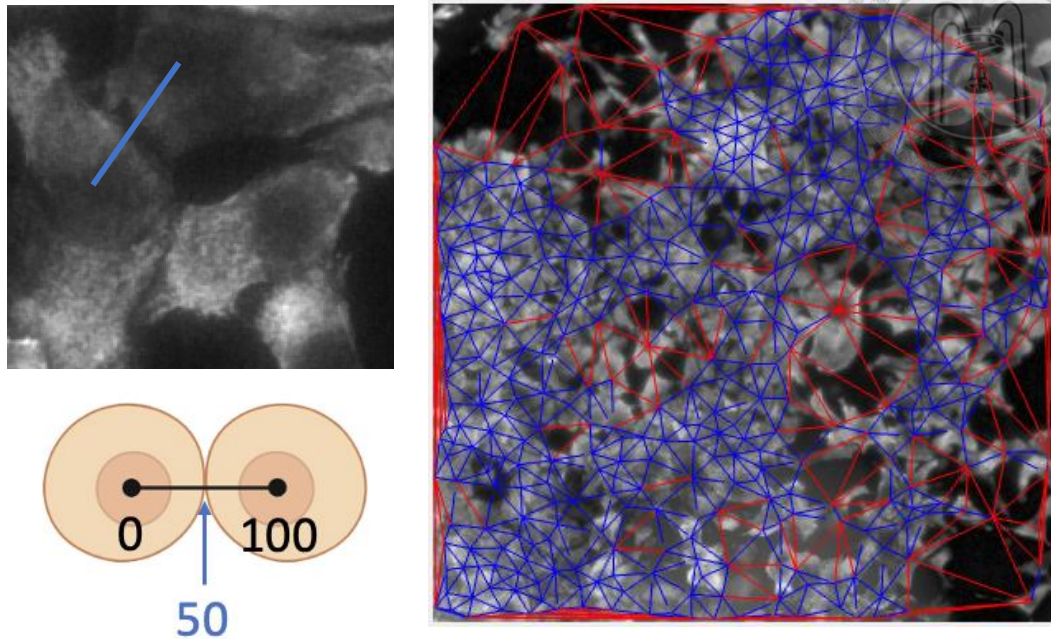
第三章 結果



3.1 SLK 與 MLC 的關係

根據圖三的假設表示：SLK 可能是透過與 ROCK 競爭 active RhoA，或是透過 SLK/ERM 抑制 RhoA 的負回饋作用，進而對 ROCK pathway 造成影響。除此之外，還有一個新的假設是：SLK 可能是透過抑制 MLC kinase (MLCK)，才對 pMLC 造成影響，進而對 ROCK pathway 造成影響。而不管是哪一種假設，如果假設要成立的話，在 knockdown SLK 的情況下，pMLC 的訊號應該要有增加的趨勢，而這樣的變化較屬於 subcellular 的層級，於是我們利用免疫螢光染色的方法，以影像觀察細胞內部的 pMLC 表現狀況是否受 SLK 調控影響。

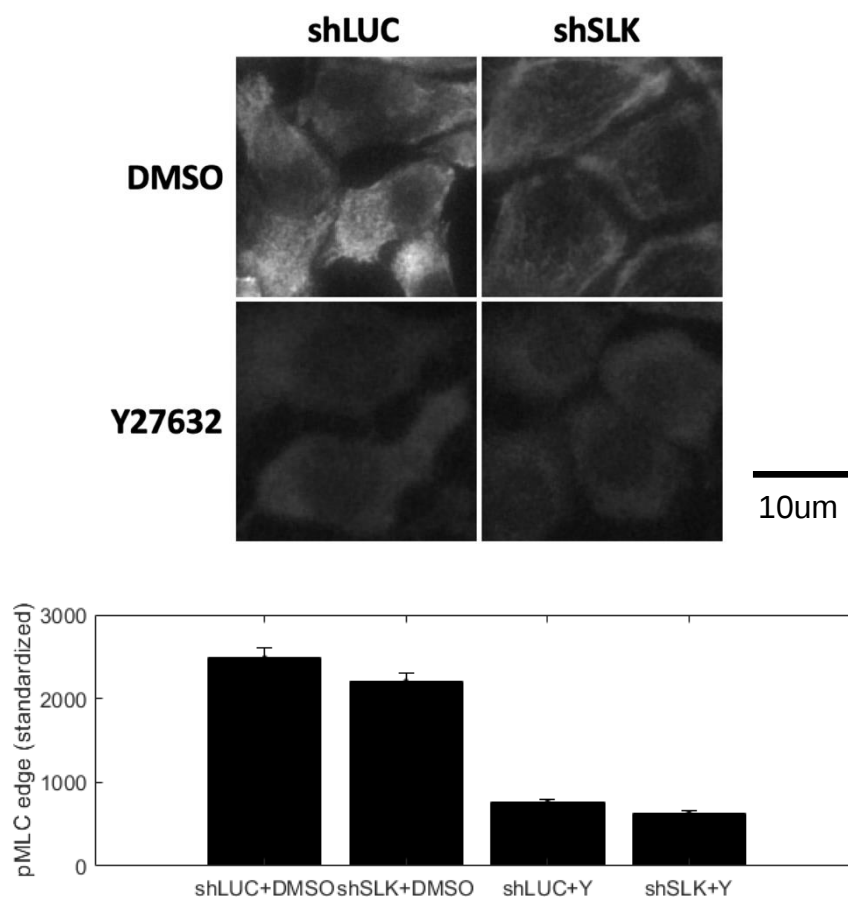
透過免疫螢光染色的結果，觀察到 SLK knockdown 時，pMLC 整體訊號有降低的現象，並且在給予 ROCK inhibitor(Y27632)時，pMLC 整體訊號都有確實的被抑制，能說明 Y27632 有確實抑制 pMLC 的訊號，免疫螢光染色的 pMLC 訊號也確實屬於 pMLC。除了用肉眼觀察影像的結果之外，我們利用 Matlab 程式進行影像分析，首先根據 DAPI 染色的結果標記細胞核抓出細胞中心的位置，再將影像中任兩顆相鄰的細胞的中心相連成一條線，連線的兩端分別為 0 和 100，連線中心的部分可看成細胞邊緣的位置，再將所有沿線的 pMLC 訊號統整觀察。



圖四、 Matlab 分析免疫螢光染色影像的示意圖

以 Matlab 軟體找出 DAPI 染色的細胞核，將相鄰兩細胞相連，再將連線的長度標準化為 100 個單位。左上圖為兩兩細胞連線實際圖，右圖為 Matlab 分析圖：藍線為兩兩細胞連線，紅線為未符合標準細胞，因此不納入統整。左下圖為標準化細胞連線示意圖。細胞核兩端為 0 和 100，中間 49-51 的部分當成細胞邊界的部分(edge)。

首先觀察 SLK knockdown 後的免疫螢光染色的結果，與對照組 shLUC 相比可以看出 pMLC 訊號在細胞邊緣的部分有下降的現象。並且在給予 ROCK inhibitor (Y27632)後，不管是 shLUC 組或是 shSLK 組，pMLC 整體訊號皆有下降的趨勢。以 Matlab 軟體去分析螢光影像結果，數據顯示在細胞邊緣的部分 shSLK 組的 pMLC 訊號較 shLUC 組減少，在給予 ROCK inhibitor (Y27632)後，兩組訊號皆明顯降低，符合肉眼觀察影像得到的結果。由此結果可看出 SLK knockdown 後，pMLC 無增加的趨勢，未能符合圖三：SLK 可能是透過與 ROCK 競爭 active RhoA，或是透過 SLK/ERM 抑制 RhoA 的負回饋作用，抑或是透過抑制 MLC kinase (MLCK)，對 pMLC 造成影響的假設。

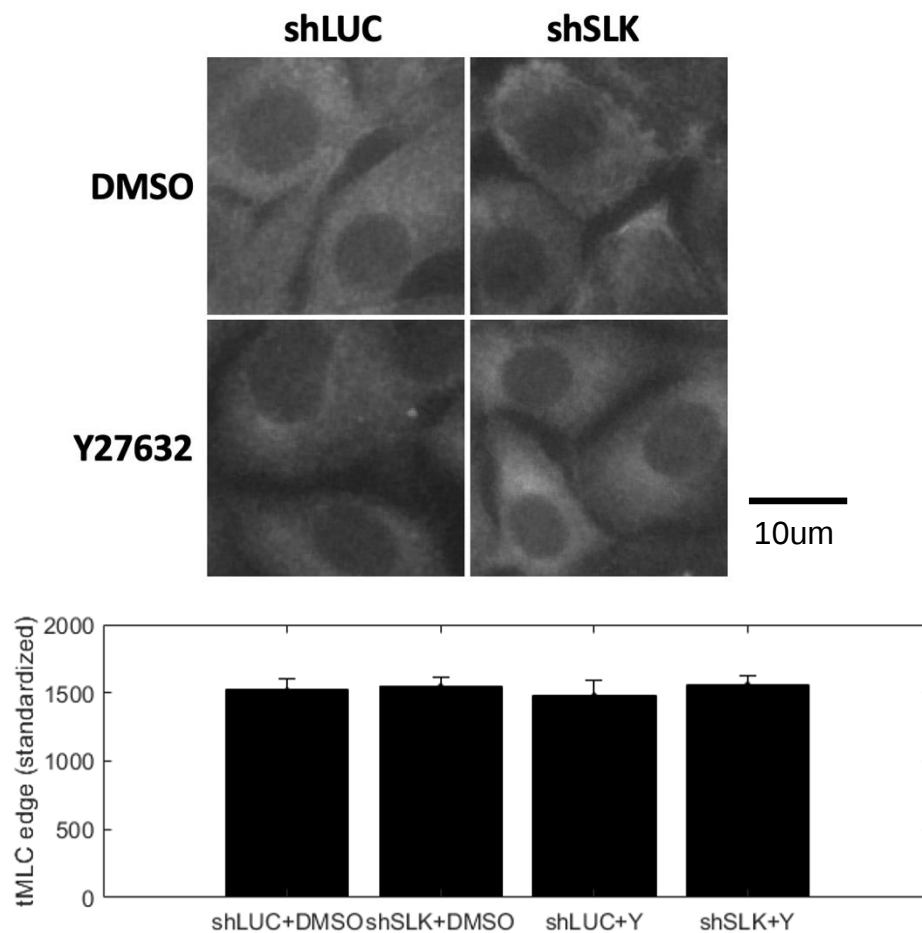


圖五、 SLK knockdown 後未能提升 pMLC 的表現量

在 SAS 細胞上，SLK knockdown 並給予 Y27632 後，以免疫螢光染色觀察 pMLC 表現量變化，並以 Matlab 軟體找出 DAPI 染色的細胞核，將相鄰兩細胞相連，再將連線長度標準化為 100 個單位，紀錄細胞邊緣（49-51）的訊號。可以觀察到 SLK knockdown 後未能提升 pMLC 的表現量。



除了觀察調控 SLK 對於 pMLC 的影響，同時也觀察調控 SLK 是否會影響到 total MLC。由肉眼觀察螢光染色的結果，可以看出 SLK knockdown 對於 total MLC 的訊號並沒有什麼影響，且給予 Y27632 的組別，對於 total MLC 的訊號也確實沒有影響，以 Matlab 分析的數據結果也符合肉眼觀察的結果。



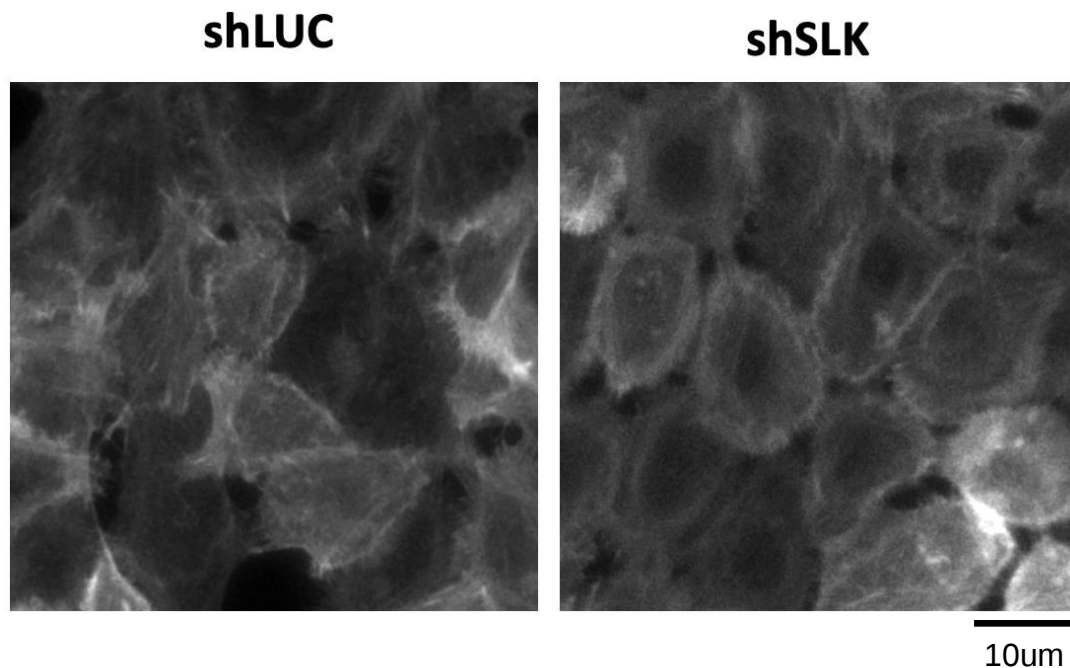
圖六、 SLK knockdown 後不會影響 total MLC 的表現量

在 SAS 細胞上，SLK knockdown 並給予 Y27632 後，以免疫螢光染色觀察 pMLC 表現量變化，並以 Matlab 軟體找出 DAPI 染色的細胞核，將相鄰兩細胞相連，再將連線長度標準化為 100 個單位，紀錄細胞邊緣（49-51）的訊號。可以觀察到 SLK knockdown 後不會影響 total MLC 的表現量。



3.2 SLK 影響細胞排列與形狀

由前面的實驗結果可看出，SLK 與 RhoA/ROCK 以及下游的 pMLC 並無實際的關聯。於是我們把目光放在圖三中 SLK 最下游的 actin filament，推測說是否 SLK 是經由調控 actin filament 變化，再經由 actin filament 與 myosin 的交互作用，最後才會對細胞遷移的速度產生影響。因此我們利用 phalloidin 將 actin filament 染色去觀察 SLK knockdown 會對 actin filament 產生什麼影響，發現與對照組 shLUC 組相比，SLK knockdown 後 actin filament 訊號會較集中於細胞的邊緣，並且細胞的排列與形狀會變得較為整齊。由結果可知，SLK knockdown 會使 actin filament 分佈發生改變且影響細胞整體的排列與形狀。SLK knockdown 後，細胞排列與形狀變的相對整齊，actin filament 分佈變的較集中於細胞邊緣。



圖七、 SLK knockdown 會使細胞排列變整齊，細胞形狀較一致

在 SAS 細胞上，SLK knockdown 後，以 phalloidin 將 actin filament 做螢光染色，用顯微鏡觀察細胞形態變化。可以觀察到 SLK knockdown 會使細胞排列變整齊，細胞形狀較一致。

觀察到 SLK knockdown 後，細胞排列與形狀變整齊的結果，我們開始把目光焦點放在是否 SLK 是藉由影響細胞的排列與形狀去造成細胞遷移速度的改變。目前在學界提到影響細胞整齊排列的幾個重要因子如下：一、Actin cytoskeleton: 可以界定並改變細胞的形狀，使細胞與細胞之間或是細胞與細胞外基質(extracellular matrix)之間形成 adhesion¹²。二、Cadherin: cadherin 家族主要位於細胞與細胞之間的邊界，調控細胞與細胞之間的界面張力(interface tension)去調控細胞的形狀，其中較為代表的蛋白為 Ecadherin¹³。三、Focal adhesion: 細胞能夠透過 focal adhesion 構造去感知細胞基質的剛性(stiffness)進而調控細胞的形態(morphology)，其中較為代表的蛋白為 paxillin¹⁴。由於我們是透過 phalloidin 將 actin filament 染色發現到 SLK knockdown 會使細胞的形狀與排列變整齊，因此我們主要將重心先放在 actin filament 上面。



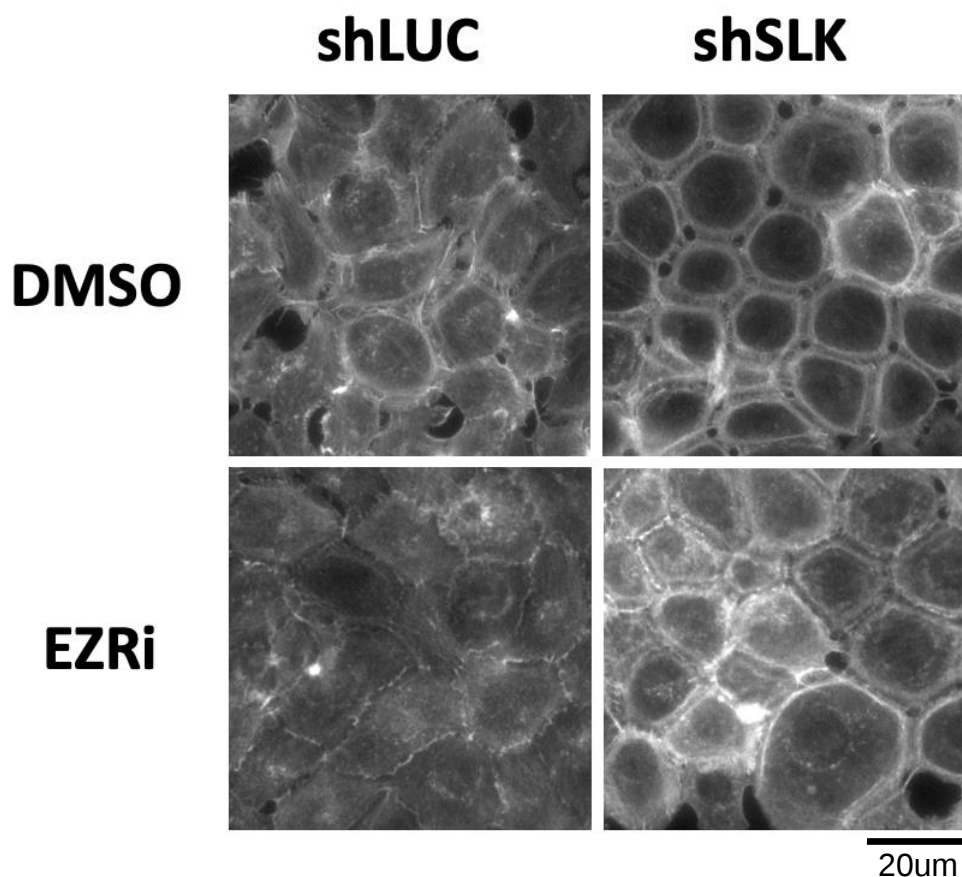
3.3 SLK 是否經由 ERM 影響 Actin

近期有些文獻指出 SLK 會透過磷酸化 ERM 蛋白去調控 actin filament 的分佈。ERM 蛋白在生物學領域中被研究的歷史比 SLK 悠久，主要為三個蛋白的合稱，分別是：Ezrin/Radixin/Moesin，這三個蛋白在結構上相似，N 端為 FERM domain、中間連接區域及 C 端的 ERM-association domain(C-ERMAD)，C 端的 ERM-association domain 用來連接 FERM domain 或是與 F-actin binding。一般情況下，ERM 蛋白的 C 端的 ERM-association domain(C-ERMAD)會與自身 N 端的 FERM domain binding 形成不活化的閉鎖構型，再經由磷酸化/與 PIP2 binding 活化，形成活化的開放構型。ERM 蛋白便可以連接 F-actin 與其他蛋白，將 actin cytoskeleton 連接到細胞膜，被視為 membrane cytoskeletal binding protein^{15,16}。

於是我們透過 SLK knockdown 並同時給予 Ezrin inhibitor(NSC668394:抑制 ERM 磷酸化)去觀察前面 SLK knockdown 後看到的 actin 變化是否是經由影響 ERM 蛋白而達成的。而在 ERM 蛋白中，選擇 Ezrin 作為 SLK 下游的主要目標的原因為，ERM 蛋白在不同組織中有著特異性，表皮細胞主要是表現 Ezrin，內皮細胞是 moesin，而 radixin 則是多表現在肝細胞內。

一樣也是透過 phalloidin 將 actin 染色觀察，並且著重觀察 actin 在細胞內部分佈的變化。在 SAS 細胞上，發現單純 SLK knockdown 後，相較於對照組 shLUC 組，細胞形狀較一致、排列變得相對整齊且 actin 訊號較集中於細胞邊

緣。單純給予 Ezrin inhibitor 的組別，相較於對照組 DMSO 組，細胞邊緣出現像鋸齒彎彎曲曲的現象，而 SLK knockdown 並同時給予 Ezrin inhibitor 的組別，細胞形狀變得相對整齊，但是 actin 的分佈不只像單純 SLK knockdown 的組別集中於細胞邊緣，較為鬆散，另外也出現像單純給予 Ezrin inhibitor 的組別，細胞邊緣出現像鋸齒彎彎曲曲的現象。觀察細胞形態後，發現 SLK knockdown 並同時給予 Ezrin inhibitor 的組別，同時擁有單獨 SLK knockdown/Ezrin inhibitor 的兩種形態，因此推測 SLK 並不完全透過影響 Ezrin 的磷酸化去影響 actin 的變化。



圖八、以 SAS 細胞觀察 SLK knockdown 並給予 Ezrin inhibitor 對 actin 的影響

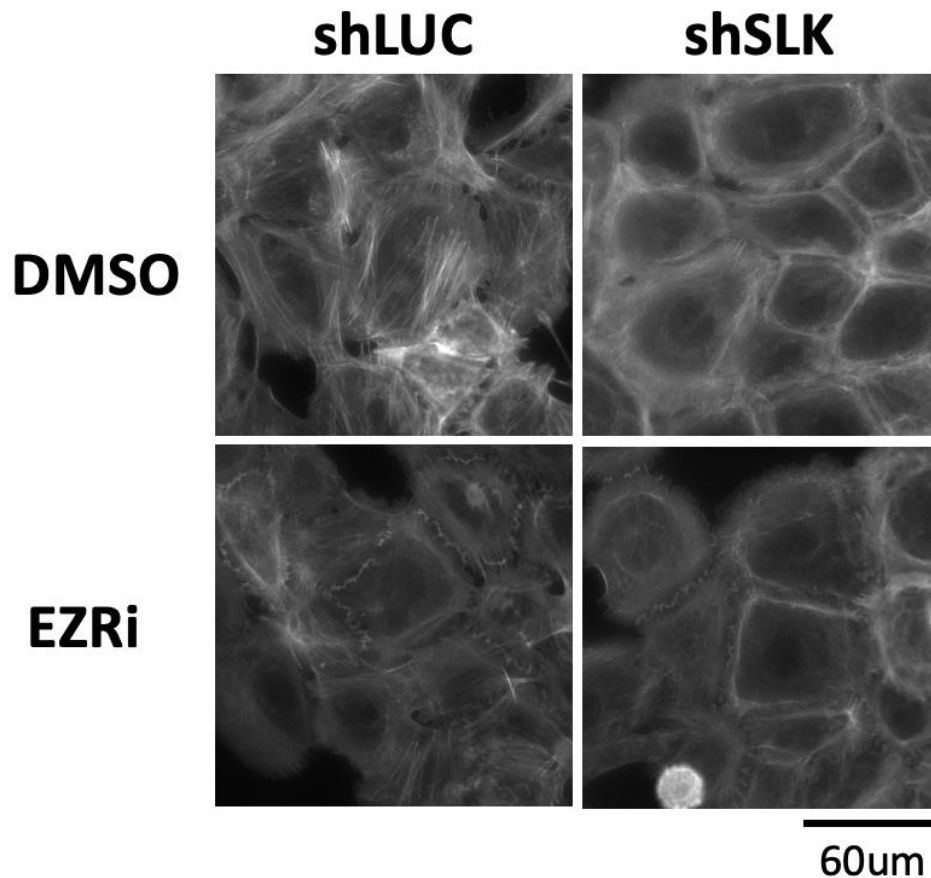
SAS 細胞上，SLK knockdown 並給予 Ezrin inhibitor 後，以 phalloidin 將 actin filament 做螢光染色，再用顯微鏡觀察細胞形態變化。可以觀察到 SLK knockdown 並給予 Ezrin inhibitor 的組別，會同時擁有單獨 SLK knockdown 與單純給予 Ezrin inhibitor 的兩種形態，因此推測 SLK 並不完全透過影響 Ezrin 的磷酸化去影響 actin 的變化。





除了利用 SAS 細胞之外，我們也利用了人類皮膚角質上皮細胞 HaCaT (human epidermal keratinocyte) 去觀察。HaCaT 為非癌細胞，在生理特性上較接近正常細胞，且細胞尺寸較大，在細胞骨架的觀察也很方便。在 HaCaT 細胞上，發現單純 SLK knockdown 後，相較於對照組 shLUC 組，細胞排列變得相對整齊且 actin 訊號在細胞質中較少。單純給予 Ezrin inhibitor 的組別，相較於對照組 DMSO 組，細胞邊緣出現像鋸齒彎彎曲曲的現象，而 SLK knockdown 並同時給予 Ezrin inhibitor 的組別，細胞排列變得相對整齊，另外也出現像單純給予 ERM inhibitor 的組別，細胞邊緣出現像鋸齒彎彎曲曲的現象。

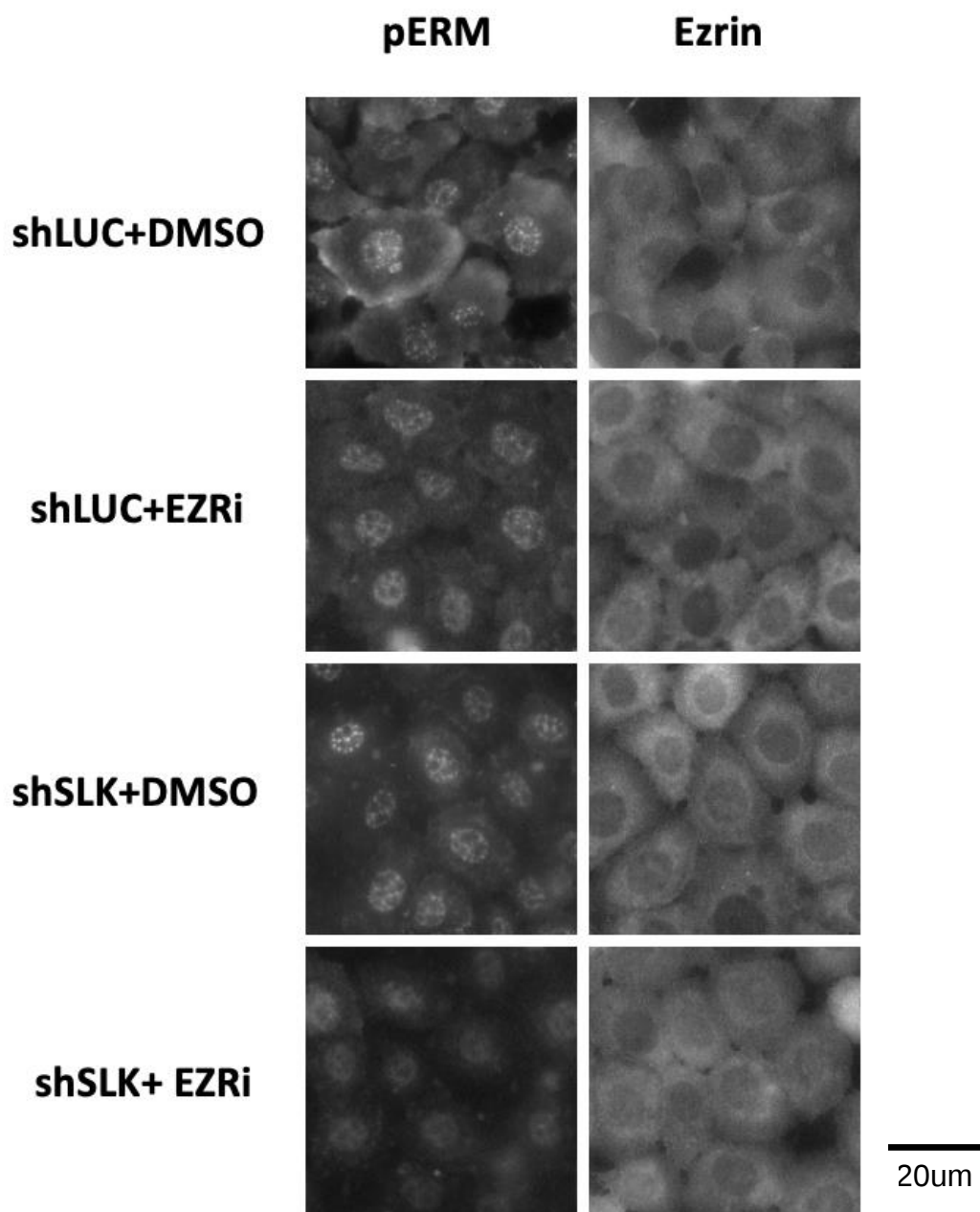
觀察細胞形態後，認為 SLK knockdown 並同時給予 Ezrin inhibitor 的組別，同時擁有單獨 SLK knockdown 與 Ezrin inhibitor 的兩種形態，因此推測 SLK 並不完全透過影響 ERM 的磷酸化去影響 actin 的變化。



圖九、以 HaCaT 細胞觀察 SLK knockdown 並給予 Ezrin inhibitor 對 actin 的影響

在 HaCaT 細胞上，SLK knockdown 後並同時給予 Ezrin inhibitor 後，再以 phalloidin 將 actin filament 做螢光染色，再用顯微鏡觀察細胞形態變化。可以觀察到 SLK knockdown 並給予 Ezrin inhibitor 的組別，會擁有單獨 SLK knockdown 和單純給予 Ezrin inhibitor 的兩種形態，因此推測 SLK 並不完全透過影響 ERM 的磷酸化去影響 actin 的變化。

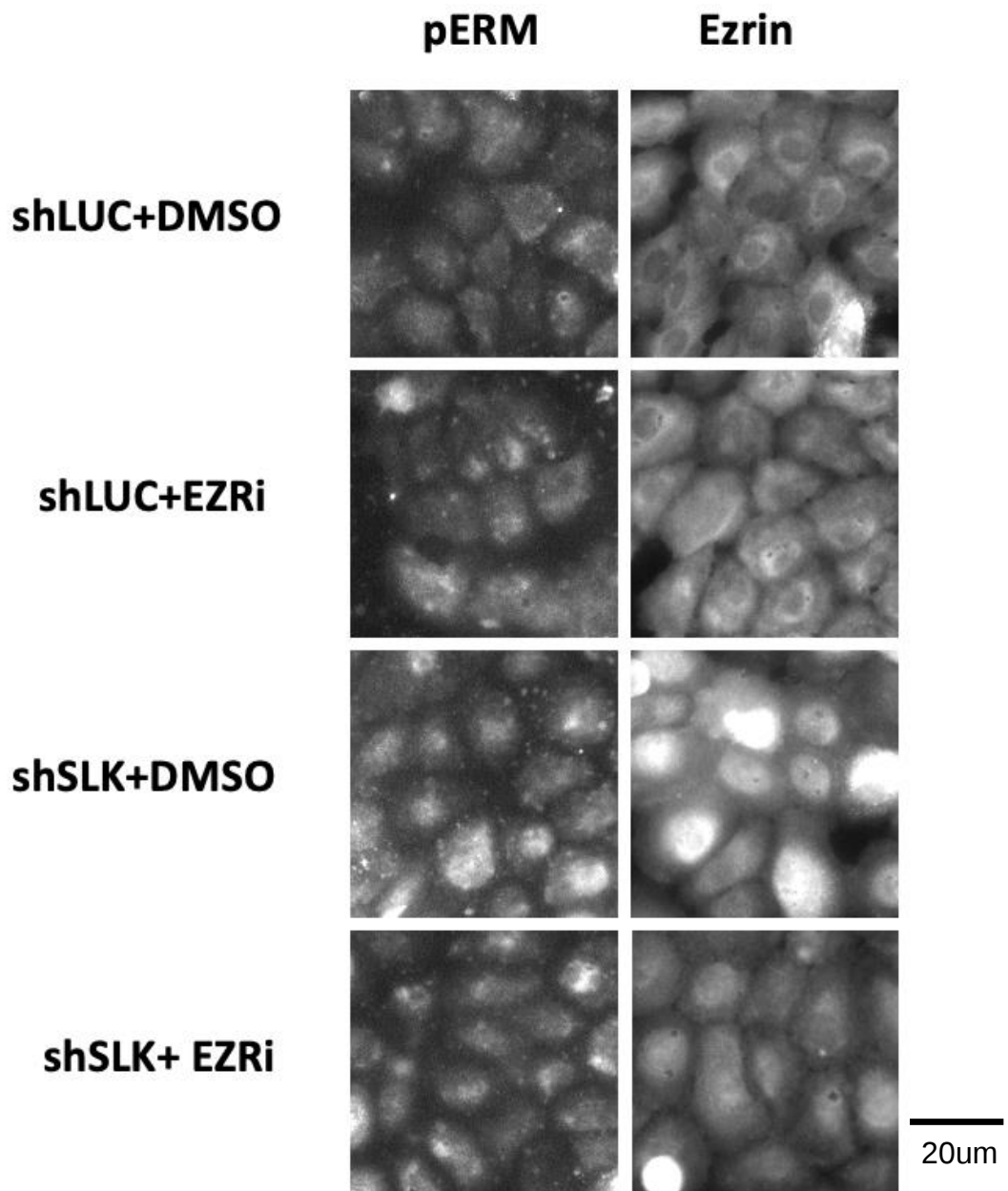
另外，雖然有看到 actin 在有無給予 Ezrin inhibitor 的組別中出現了表現上的差異，為了檢驗 Ezrin inhibitor 確實有發揮藥效，也以免疫螢光染色染了 pERM 和 total Ezrin。由影像可見，雖然再加入 Ezrin inhibitor 後，pERM 的表現確實有下降的結果，但 pERM 染色的效果並不明顯，可能是抗體的專一性不夠，或是尚未找到 pERM 染色的最佳條件。而 Ezrin 染色大致上看來並無差異。



圖十、以 SAS 細胞觀察 SLK knockdown 並給予 Ezrin inhibitor 對 pERM/Ezrin 的影響

在 SAS 細胞上，SLK knockdown 並給予 Ezrin inhibitor 後，以 Ezrin 和 pERM 一級抗體進行免疫螢光染色，再用顯微鏡觀察細胞形態變化。觀察到再加入 Ezrin inhibitor 後，pERM 的表現確實有下降的結果，但 pERM 染色的效果並不明顯，而 Ezrin 染色大致上看來並無差異。

在 HaCaT 細胞上，也以免疫螢光染色染了 pERM 以及 total Ezrin。由影像可見，雖然再加入 Ezrin inhibitor 後，pERM 的表現確實有下降的結果，但 pERM 染色的效果並不明顯，可能是抗體的專一性不夠，或是尚未找到 pERM 染色的最佳條件。而 Ezrin 染色卻出現了與 SAS 不同的結果，可以看到在 SLK knockdown 後，Ezrin 出現了集中在細胞核的現象，使我們開始有了 SLK 可能會影響 Ezrin 出入核的想法，在後面會更詳細說明。



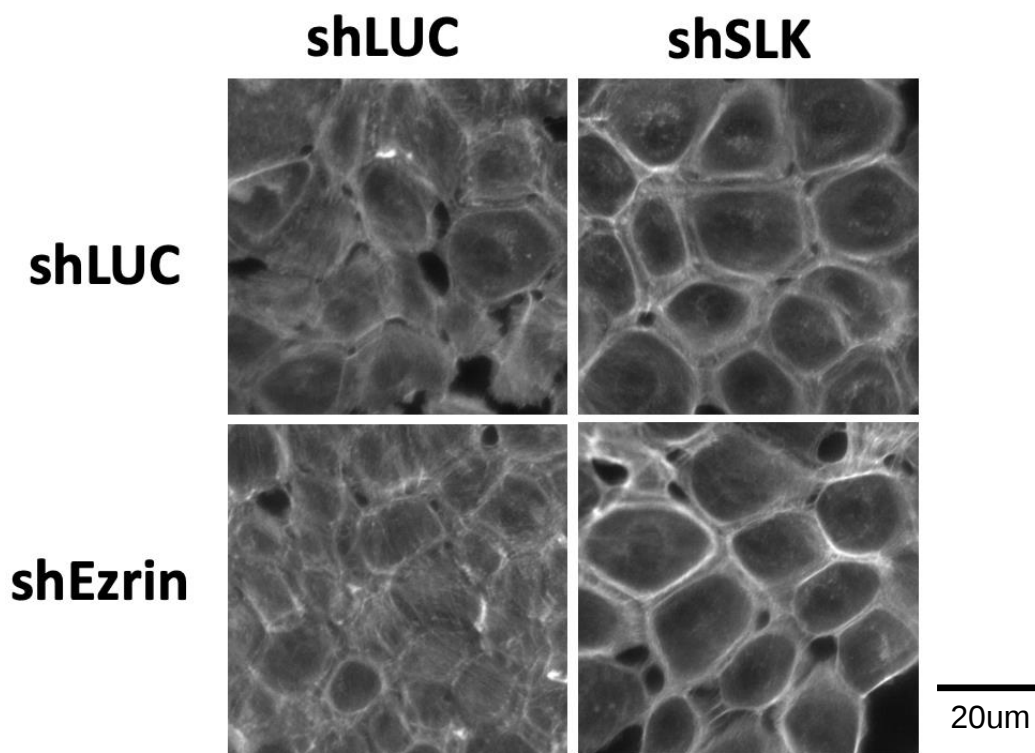
圖十一、以 HaCaT 細胞觀察 SLK knockdown 並給予 Ezrin inhibitor 對 pERM/Ezrin 的影響



在 HaCaT 細胞上，SLK knockdown 並給予 Ezrin inhibitor 後，以 Ezrin 和 pERM 一級抗體進行免疫螢光染色，再用顯微鏡觀察細胞形態變化。觀察到再加入 Ezrin inhibitor 後，pERM 的表現確實有下降的結果，但 pERM 染色的效果並不明顯，但是意外發現 SLK knockdown 出現了使 Ezrin 發生從細胞質轉移到細胞核的現象。

因為 pERM 染色的結果並不清楚，且也沒試出更好的染色手法，也怕 ERM inhibitor 藥物的專一性不夠，於是想利用 Ezrin knockdown 的方式更去除 Ezrin，來觀察 SLK 是否透過 Ezrin 來影響 actin 的變化。

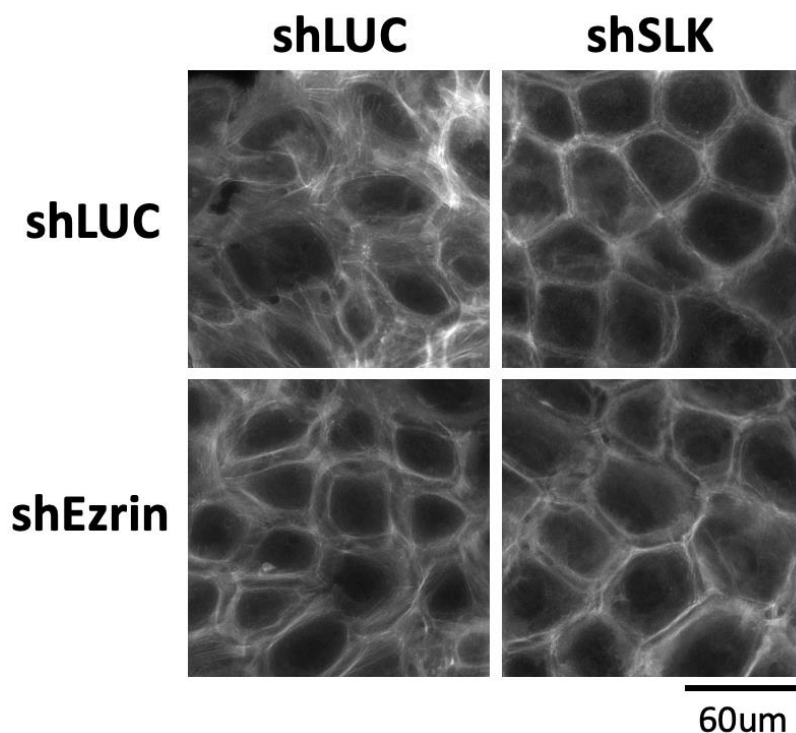
在 SAS 細胞上，發現單純 SLK knockdown 後，相較於對照組 shLUC 組，細胞排列變得相對整齊且 actin 訊號較集中於細胞邊緣。單純 Ezrin knockdown 的組別，細胞排列稍微整齊一些但不像純 SLK knockdown 組那麼整齊，而 SLK/Ezrin double knockdown 的組別，細胞形狀變得相對整齊，且 actin 的分佈像單純 SLK double knockdown 的組別集中於細胞邊緣。觀察細胞形態後，認為 SLK/Ezrin double knockdown 的組別，與單獨 SLK knockdown 的細胞形態較為相似，因此推測 SLK 是有可能透過影響 Ezrin 去影響 actin 的變化。



圖十二、以 SAS 細胞觀察 SLK/Ezrin double knockdown 對 actin 的影響

在 SAS 細胞上，SLK/Ezrin knockdown 後，以 phalloidin 將 actin filament 做螢光染色，再用顯微鏡觀察細胞形態變化。可以觀察到 SLK/Ezrin double knockdown 與單獨 SLK knockdown 的細胞形態較為相似，因此推測 SLK 是有可能透過影響 Ezrin 去影響 actin 的變化。

在 HaCaT 細胞上，發現單純 SLK knockdown 後，相較於對照組 shLUC 組，細胞形狀相似、排列變得相對整齊且 actin 訊號較集中於細胞邊緣。單純 Ezrin knockdown 的組別，細胞形狀相似、排列也變得相對整齊，而 SLK/Ezrin double knockdown 的組別，細胞形狀變得相對整齊，且 actin 的分佈像單純 SLK knockdown 的組別集中於細胞邊緣。觀察細胞形態後，認為 SLK/Ezrin double knockdown 的組別，與單獨 SLK knockdown 的細胞形態較為相似，因此推測 SLK 是有可能透過影響 Ezrin 去影響 actin 的變化。



圖十三、以 HaCaT 細胞觀察 SLK/Ezrin double knockdown 對 actin 的影響

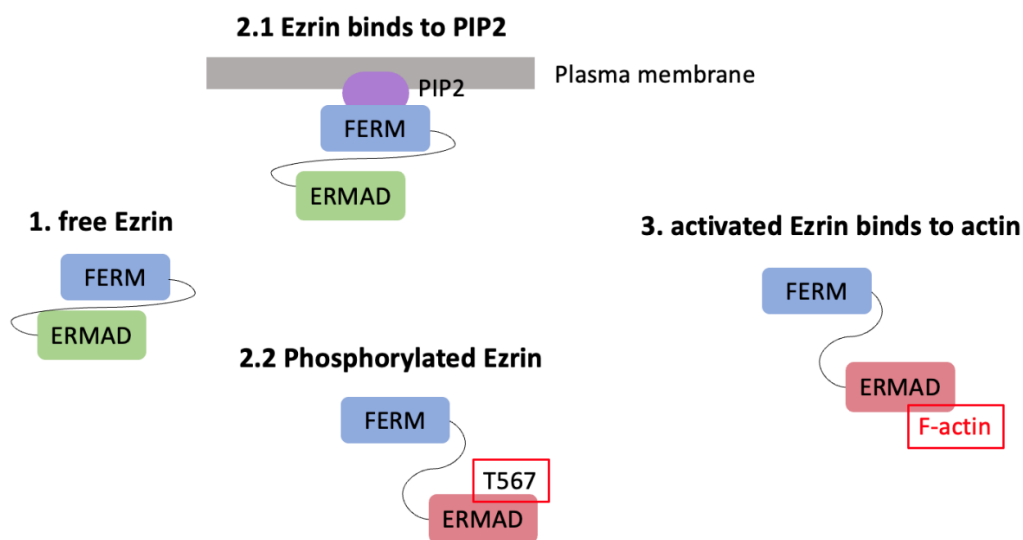
在 HaCaT 細胞上，SLK/Ezrin knockdown 後，以 phalloidin 將 actin filament 做螢光染色，再用顯微鏡觀察細胞形態變化。SLK/Ezrin double knockdown 與單獨 SLK

knockdown 的細胞形態較為相似，因此推測 SLK 是有可能透過影響 Ezrin 去影響 actin 的變化。



綜合以上實驗影像結果可觀察到，不管是在 SAS 細胞上或是在 HaCaT 細胞上，Ezrin knockdown 與給予 Ezrin inhibitor 後的細胞有不同的形態差異，代表一般情況下 Ezrin 和磷酸化的 Ezrin 可能具有不同的功能，對細胞有不同的影響，因此在兩者實驗手法下細胞才會有不同的形態差異。

而根據目前有的文獻指示，Ezrin 的活化有著不同形式：Ezrin 的關閉不活化態、磷酸化的 Ezrin (PIP2 binding/T567 磷酸化)、Ezrin 的開放活化態¹⁶⁻¹⁸。因此我們推測 Ezrin 和磷酸化的 Ezrin 可能會具有不同的功能，並將磷酸化的 Ezrin 區分不同型態(PIP2 binding/T567 磷酸化)。為了觀察 Ezrin 活化的不同型態對於 actin 有什麼影響，軒兆學長做了磷酸化 mutant 並接上 mEmerald 螢光蛋白的質體，以便後續實驗利用。



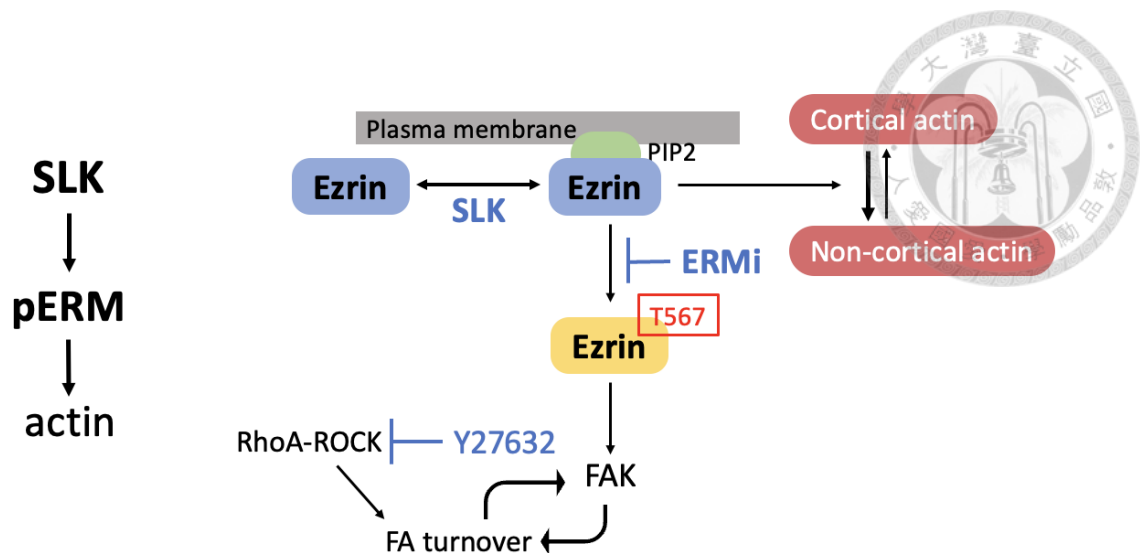
圖十四、 Ezrin 的不同型態簡易示意圖

1. Ezrin 的關閉不活化態 2. 1 PIP2 binding 的 Ezrin 2. 2 T567 磷酸化的 Ezrin
3. Ezrin 的開放活化態

*T567A: 無法磷酸化的 Ezrin(phosphorylation-dead)

T567D: 持續磷酸化的 Ezrin(phospho-mimetic)

Ezrin K4-N4: 無法 PIP2 binding 的 Ezrin



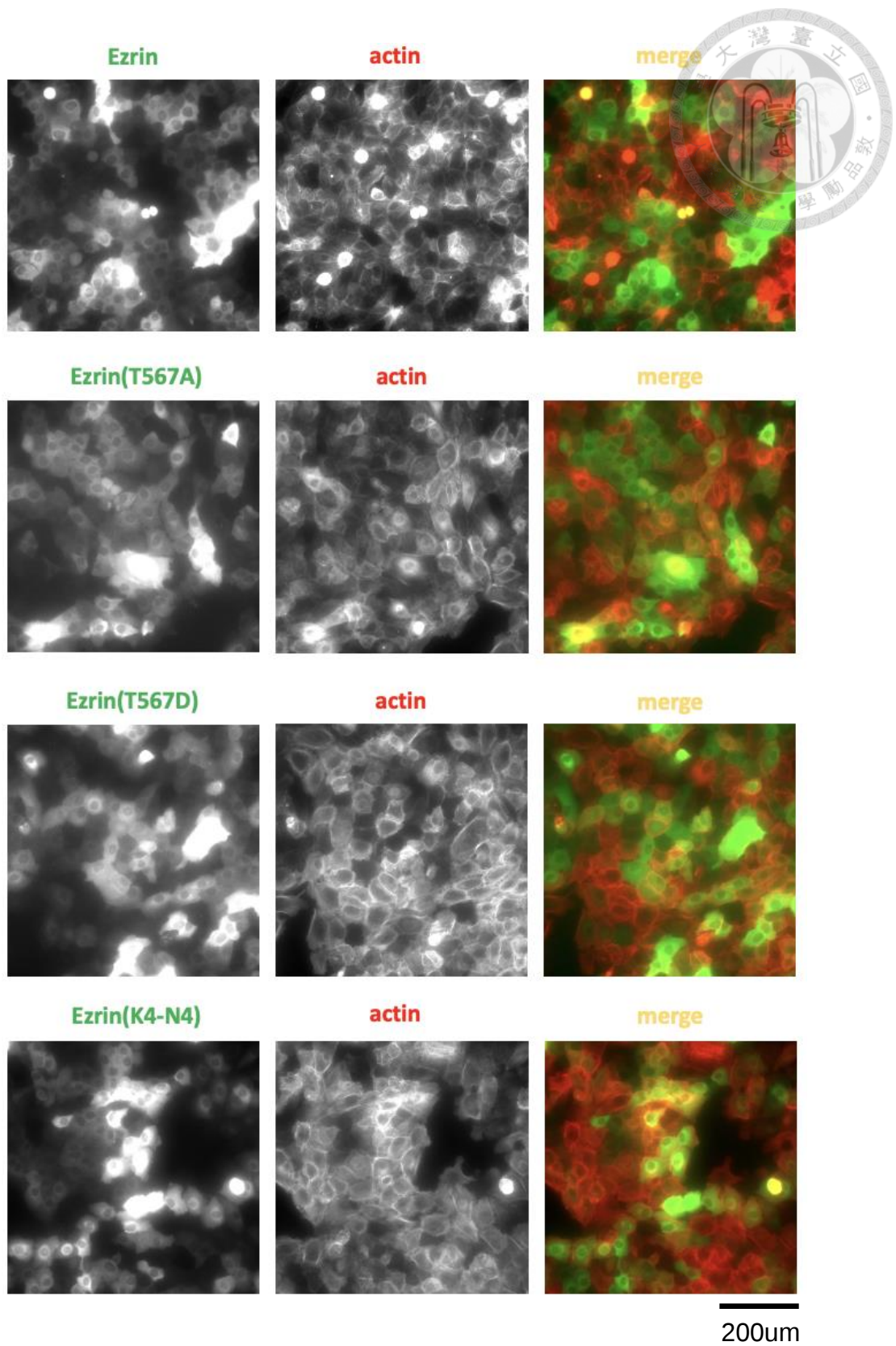
圖十五、 假設示意圖：是否 Ezrin 的磷酸化不同狀態會對 actin 有不同的影響

為了觀察 Ezrin 活化的不同型態對於 actin 有什麼影響，利用了不同磷酸化 mutant 的質體去做實驗。在 HaCaT 細胞上，過度表現不同活化態的 Ezrin，再利用 phalloidin 觀察 actin 的表現情況。

從過度表現 wild-type Ezrin 的重疊影像圖可以觀察到在 Ezrin 整體表現量比較多的地方，actin 整體表現量較少，顯示 Ezrin 的存在可能會降低 actin 的總表現量。當過度表現 Ezrin-T567A (phosphorylation-dead) mutant 時，觀察到在 Ezrin-T567A 整體表現量比較多的地方，actin 整體表現量較少，顯示無法磷酸化的 Ezrin 的存在可能會降低 actin 的總表現量。從過度表現 Ezrin-T567D(phospho-mimetic) 時，觀察到在 Ezrin-T567D 整體表現量比較多的地方，actin 整體表現量較少，顯示無法磷酸化的 Ezrin 的存在可能會降低 actin 的總表現量。當過度表現 Ezrin-K4-N4 (無法 PIP2 binding) 時，觀察到在 Ezrin-K4-N4 整體表現量比較多

的地方，actin 整體表現量較少，顯示無法磷酸化的 Ezrin 的存在可能會降低 actin 的總表現量。

過度表現這四種 Ezrin，呈現的 actin 結果看起來相似，與前面實驗結果推測的不同磷酸化型態的 Ezrin 有不同功能並不相符。但是這個實驗尚未經過多次驗證，且過度表現外來的蛋白可能不會完整行使原本蛋白的功能，因此之後會將 mutant 改成在 Ezrin 和 mEmerald 螢光蛋白之間接 P2A 蛋白的形式，利用 P2A 會自我剪切的功能，確保能利用 mEmerald 螢光蛋白確認蛋白有正常表現，且降低前方的 Ezrin 蛋白受 mEmerald 螢光蛋白影響的機會。



圖十六、觀察過度表現 Ezrin-mEmerald mutant 對 actin 的影響

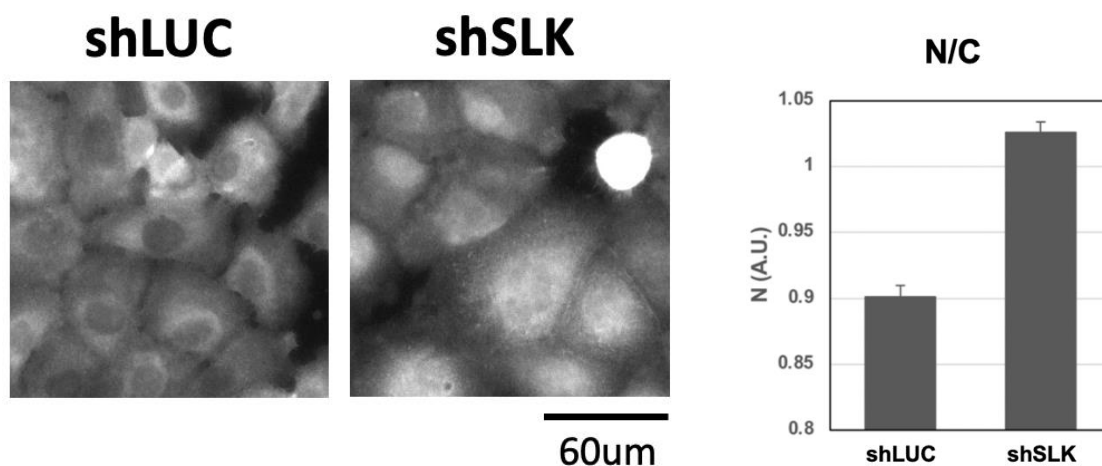
以 transfection 的方式將不同磷酸化型態的 Ezrin-mEmerald mutant 送進 HaCaT 細胞裡，再以 phalloidin 將 actin filament 做螢光染色（紅），利用顯微鏡觀察細胞形態變化。呈現的 actin 結果看起來相似，與前面實驗結果推測的不同磷酸化型態的 Ezrin 有不同功能並不相符。





3.4 SLK 是否影響 Ezrin 出入細胞核

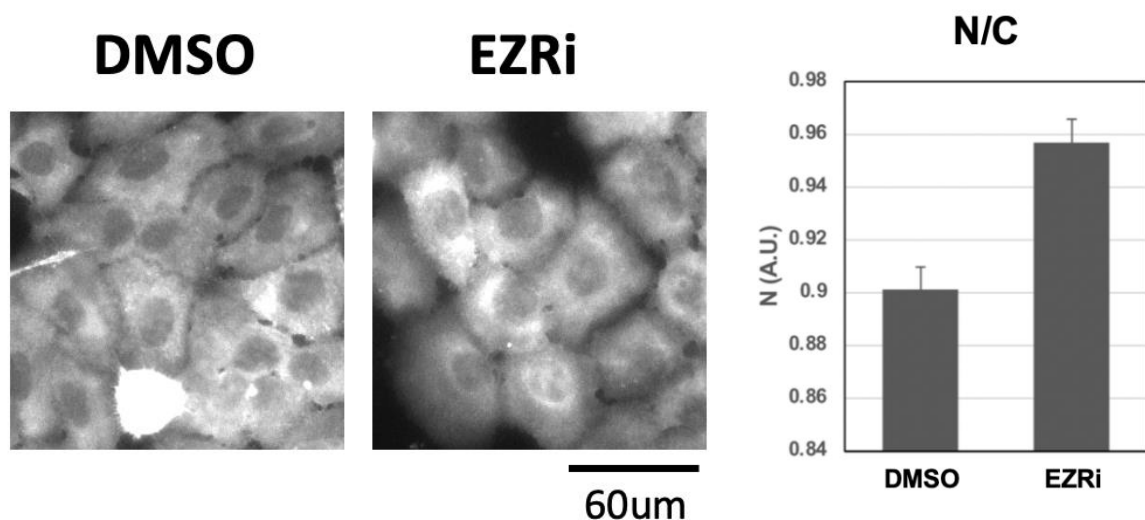
在 HaCaT 細胞上，SLK knockdown 後，利用免疫螢光染色染 Ezrin 影像可觀察到 Ezrin 有進入細胞核的現象(圖十一)。利用 Matlab 程式進行影像分析，首先根據 DAPI 染色的結果標記細胞核(nucleus)，細胞其餘部分即為細胞質(cytosol)，藉由細胞核(N)/細胞質(C)的比值去比較 Ezrin 蛋白入核的變化。由圖下可以觀察到相較於對照組 shLUC 組別，SLK knockdown 後，N/C ratio 有明顯的上升趨勢，顯示說 SLK 可能有使 Ezrin 進入細胞核的功能。



圖十七、在 HaCaT 細胞上，SLK knockdown 後，Ezrin 的 N/C ratio 有明顯上升的現象

在 HaCaT 細胞上，SLK knockdown 後，以 Ezrin 一級抗體進行免疫螢光染色，再用顯微鏡觀察細胞形態變化。可以觀察到 SLK knockdown 後，N/C ratio 有明顯的上升趨勢，顯示說 SLK 可能有使 Ezrin 進入細胞核的功能。

另外，因為 SLK knockdown 能夠觀察到 Ezrin 有入核的現象，那是否給予 Ezrin inhibitor 也有可能觀察到 Ezrin 蛋白入核的現象呢？因為目前文獻顯示，在蛋白質層級上，Ezrin 位於 SLK 的下游，是能夠磷酸化 Ezrin，所以當 SLK knockdown 能夠觀察到 Ezrin 有入核的現象的話，給予 Ezrin inhibitor 的話，應該也可以觀察到 Ezrin 蛋白入核的現象。利用免疫螢光染色染 Ezrin 影像可看出給予 Ezrin inhibitor 後，相較於對照組 shLUC 組別，N/C ratio 並沒有明顯的區別，顯示著 SLK 可能是用 non-kinase function 來調控 Ezrin 出入核的現象。



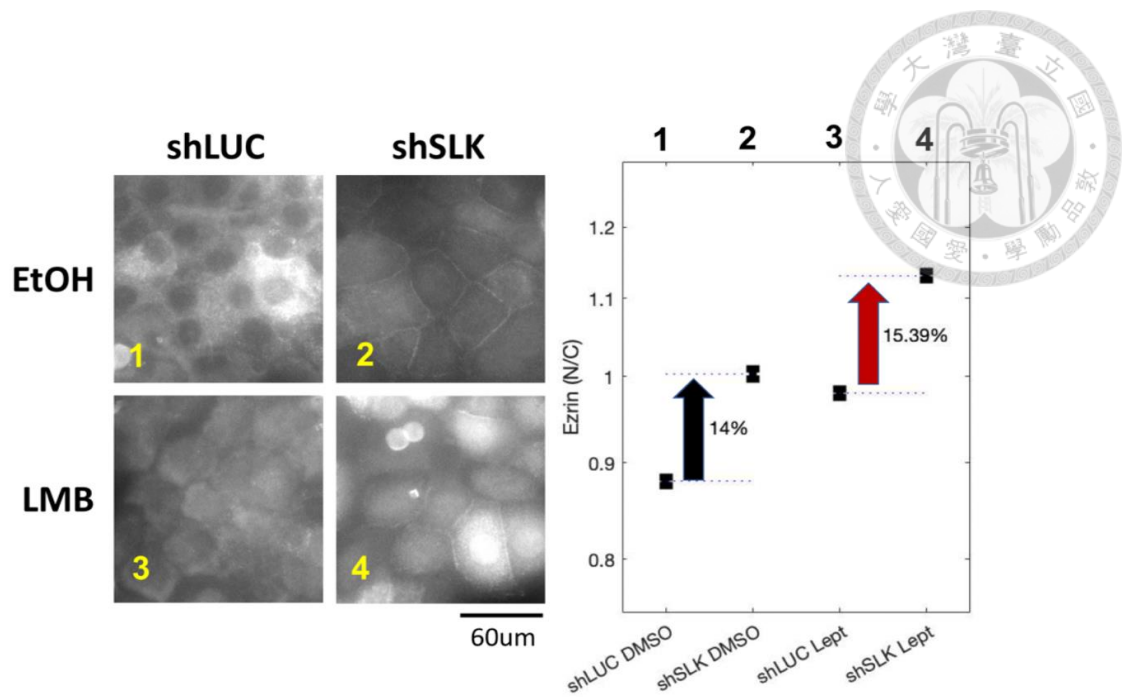
圖十八、在 HaCaT 細胞上，給予 Ezrin inhibitor 後，Ezrin 的 N/C ratio 並沒有明顯變化

在 HaCaT 細胞上，給予 Ezrin inhibitor 後，以 Ezrin 一級抗體進行免疫螢光染色，再用顯微鏡觀察細胞形態變化。可以觀察到給予 Ezrin inhibitor 後，N/C ratio 並沒有明顯的區別，顯示著 SLK 可能是用 non-kinase function 來調控 Ezrin 出入核的現象。



為了瞭解 SLK 是如何影響 Ezrin 進出細胞核，先從與細胞核進出相關的蛋白質 importin/exportin 入手。Exportin family 能夠調控蛋白質從細胞核去到細胞質，Leptomycin(LMB) 作為 exportin inhibitor，可以透過與 exportin 1 結合使要運送的蛋白無法跟 exportin 結合並抑制該蛋白從細胞核運送至細胞質¹⁹，去觀察 SLK 是否是透過 exportin 影響 Ezrin 進出核。

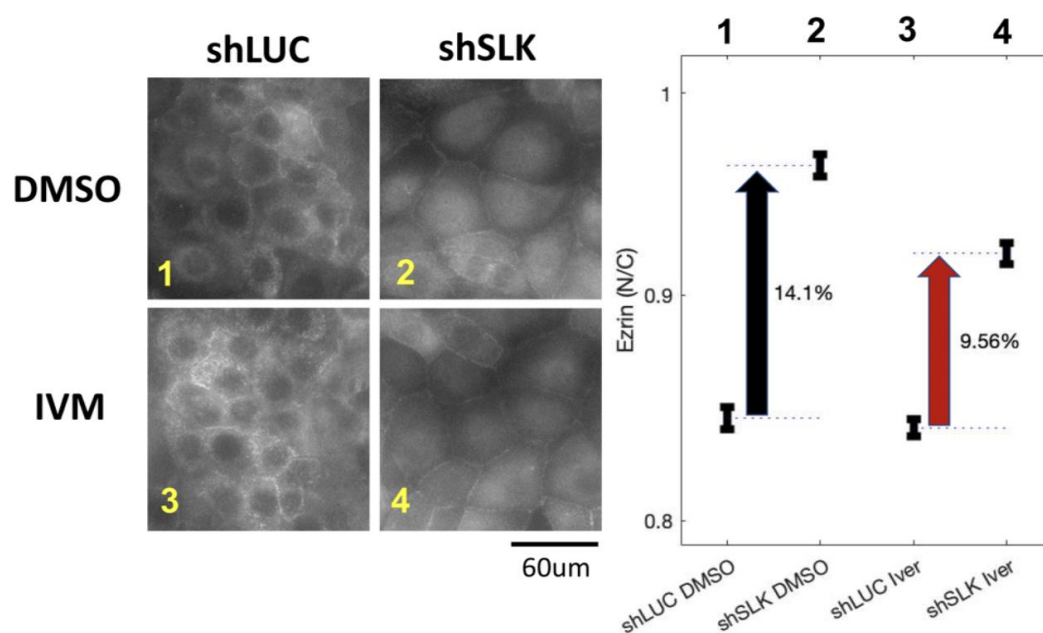
利用免疫螢光染色染 Ezrin 的影像可觀察到，單純 SLK knockdown 後，相較於對照組，Ezrin 的 N/C ratio 有上升的現象。單純給予 Leptomycin 後，相較於對照組，Ezrin 的 N/C ratio 有上升的趨勢。SLK knockdown 並同時給予 Leptomycin 的組別，Ezrin 的 N/C ratio 也有上升的趨勢。但是利用 Matlab 程式進行影像分析後，可看到 SLK knockdown 或是給予 Leptomycin 對於 Ezrin 的 N/C ratio 上升現象的貢獻是差不多的，SLK knockdown 且同時給予 Leptomycin 並沒有對 Ezrin 的 N/C ratio 有加乘的效果，代表 SLK 影響 Ezrin 出入核的能力與 exportin 應該是較無關連的。



圖十九、在 HaCaT 細胞上，SLK 影響 Ezrin 出入核的能力與 exportin 應該是較無關連的

在 HaCaT 細胞上，SLK knockdown 後，再給予 Leptomycin，並以 Ezrin 一級抗體進行免疫螢光染色，去觀察 Ezrin 在細胞質/細胞核的變化。可看出 SLK knockdown 且同時給予 Leptomycin 並沒有對 Ezrin 的 N/C ratio 有加乘的效果，代表 SLK 影響 Ezrin 出入核的能力與 exportin 應該是較無關連的。

Importin family 能夠調控蛋白質從細胞質去到細胞核，Ivermectin(IVM) 作為 importin inhibitor，可以透過 importin 結合使要運送的蛋白無法跟 importin 結合並抑制該蛋白從細胞質運送至細胞核²⁰。觀察 SLK 是否是透過 importin 影響 Ezrin 進出核，利用免疫螢光染色染 Ezrin 的影像可觀察到，單純 SLK knockdown 後，相較於對照組，Ezrin 的 N/C ratio 有上升的現象。單純給予 Ivermectin 後，相較於對照組，Ezrin 的 N/C ratio 並無明顯分別，且 Ezrin 本來就多位於細胞質，所以藥效可能較難觀察到。SLK knockdown 並同時給予 Ivermectin 的組別，Ezrin 的 N/C ratio 也有上升的趨勢。利用 Matlab 程式進行影像分析後，可看出 SLK knockdown 且同時給予 Ivermectin 後，Ivermectin 可部分抵銷 SLK 對於 Ezrin 的 N/C ratio 上升現象的貢獻，顯示著 SLK 影響 Ezrin 出入核的能力與 importin 可能存在著一定的關連性。



圖二十、 在 HaCaT 細胞上觀察到 SLK 影響 Ezrin 出入核的能力與 importin 應該是存在著某種關連的

在 HaCaT 細胞上，SLK knockdown 後，再給予 Ivermectin，並以 Ezrin 一級抗體

進行免疫螢光染色，去觀察 Ezrin 在細胞質/細胞核的變化。可看出 SLK

knockdown 且同時給予 Ivermectin 後，Ivermectin 可部分抵銷 SLK 對於 Ezrin 的

N/C ratio 上升現象的貢獻，顯示著 SLK 影響 Ezrin 出入核的能力與 importin 可能

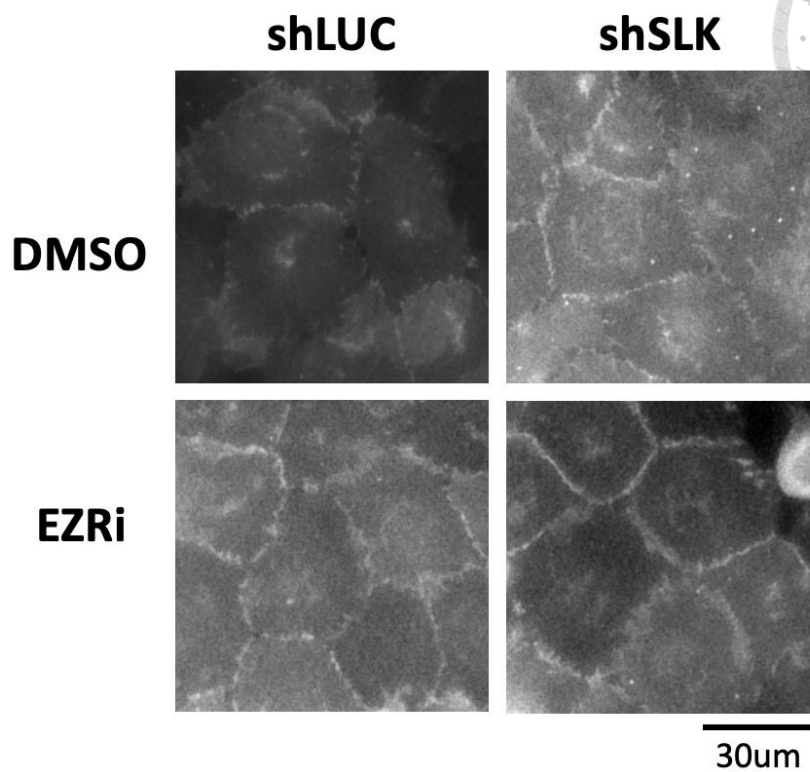
存在著一定的關連性。



3.5 SLK 是否會影響 Ecadherin



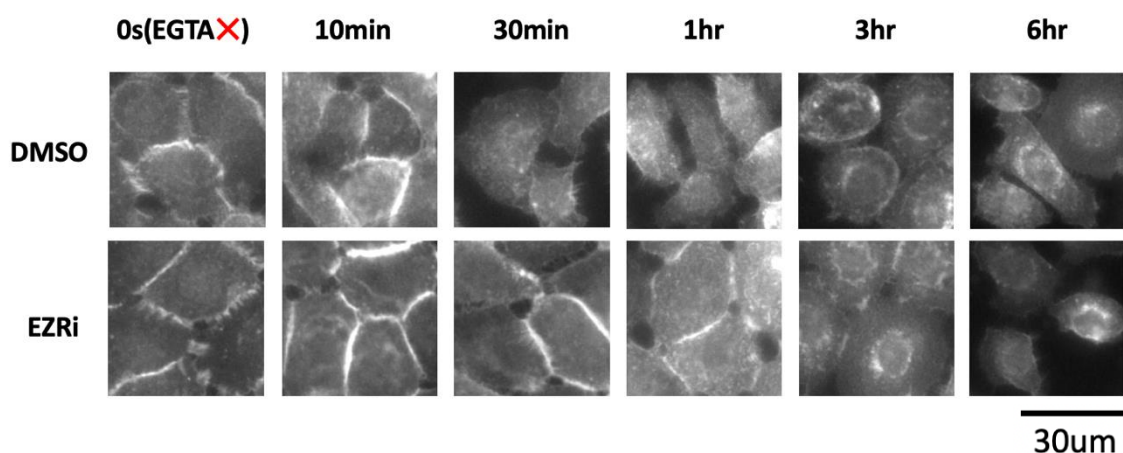
前文有提到細胞排列與形狀除了與 actin structure 有關之外，與 cadherin 和 focal adhesion 也有關係。表皮細胞的 cadherin 中以 ecadherin 較具有代表性。我們以免疫螢光染色染 ecadherin 去觀察表現量的變化。在 HaCaT 細胞上，單純 SLK knockdown 後，相較於對照組 shLUC 組，ecadherin 表現量似乎有上升的變化。單純給予 Ezrin inhibitor 的組別，相較於對照組 DMSO 組，ecadherin 表現量似乎也有上升的變化，而 SLK knockdown 並同時給予 Ezrin inhibitor 的組別，ecadherin 表現量似乎也是有上升的變化，但是 SLK knockdown 組與 Ezrin inhibitor 組的背景值較高，影像呈現會有霧霧的現象，使實驗結果可能較有誤差且難以判斷。



圖二十一、以 HaCaT 細胞觀察 SLK knockdown 並給予 Ezrin inhibitor 對 E-cadherin 的影響

在 HaCaT 細胞上，SLK knockdown 後，再給予 Ezrin inhibitor，並以 E-cadherin 一級抗體進行免疫螢光染色，去觀察 E-cadherin 的變化。SLK knockdown 組與 Ezrin inhibitor 組的背景值較高，影像呈現會有霧霧的現象，使實驗結果可能較有誤差且難以判斷。

因此我們改利用 Ecadherin-EGTA assay 去觀察 ecadherin 的變化。此方法會將含有 EGTA 的 medium，在不同時間點加至已用藥物或是 knockdown 處理過的細胞，再一起固定染色。EGTA 會去螯合鈣離子，而 ecadherin 需要鈣離子才能形成，利用加入 EGTA 觀察在缺乏鈣離子的情況下，不同處理對於細胞的 cadherin 的影響。因為有文獻表示 Ezrin 與 ecadherin 的表現量呈現負相關，我們於是先利用 Ezrin inhibitor 去觀察 ecadherin 的變化，可以看到在不加 EGTA 時，對照組與 Ezrin inhibitor 組的 ecadherin 表現是相似的，隨著加 EGTA 時間拉長，觀察到 Ezrin inhibitor 組保留 ecadherin 效果比對照組好，代表磷酸化的 Ezrin 越少有利於 ecadherin 的保持，有利於 cell-cell junction 維持。



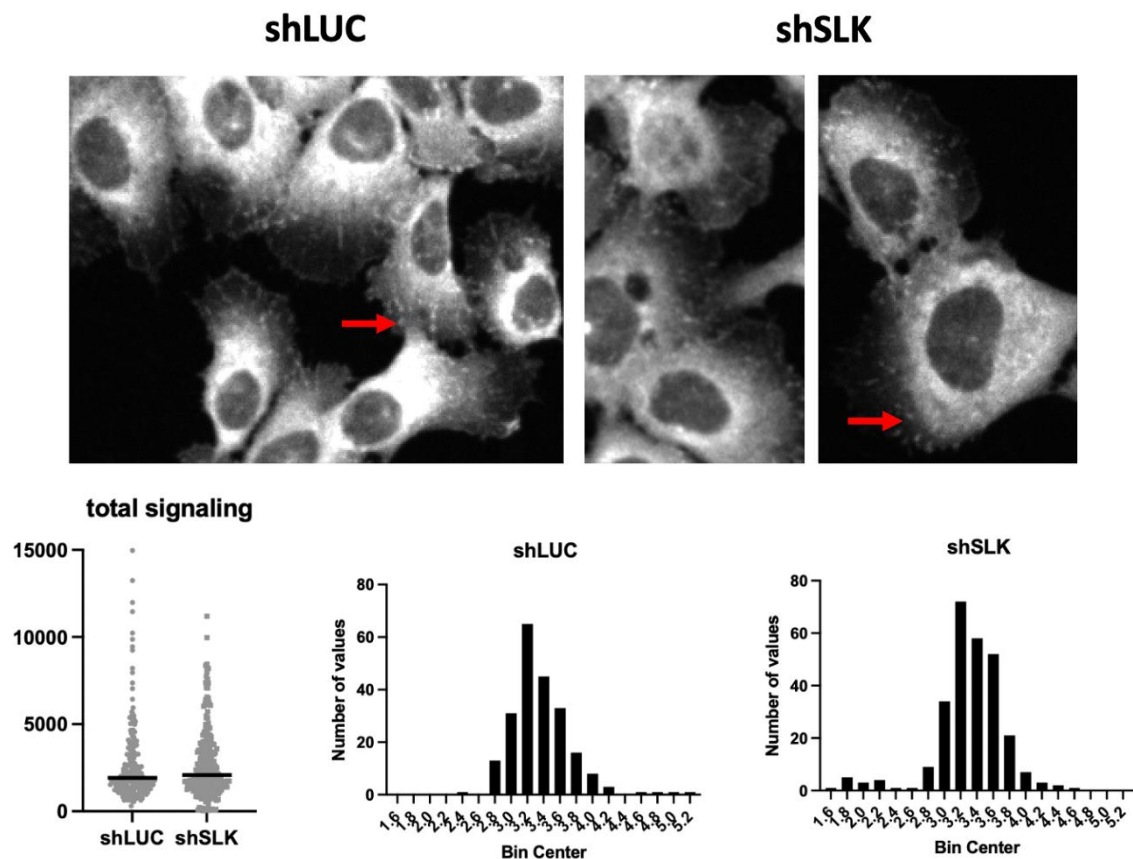
圖二十二、 用 EGTA assay 觀察 Ezrin inhibitor 對 ecadherin 的影響

在 HaCaT 細胞上，SLK knockdown 後，再不同時間點加入 EGTA，再同時固定。並以 ecadherin 一級抗體進行免疫螢光染色，去觀察 ecadherin 的變化。隨著加 EGTA 時間拉長，觀察到 Ezrin inhibitor 組保留 ecadherin 效果比對照組好，代表磷酸化的 Ezrin 越少有利於 ecadherin 的保持，有利於 cell-cell junction 維持。



3.6 SLK 是否會影響 paxillin

前文有提到細胞排列與形狀除了與 actin structure 有關之外，與 cadherin 和 focal adhesion 也有關係。表皮細胞的 cadherin 中以 ecadherin 較具有代表性，而 focal adhesion 中以 paxillin 較具有代表性。在 HaCaT 細胞上，SLK knockdown 後，相較於對照組 shLUC 組，paxillin 的數量相差不多，以 Matlab 程式定量過後，顯示 paxillin 的表現量與數量在 SLK knockdown 處理過後並無明顯差異。



圖二十三、以 HaCaT 細胞觀察 SLK knockdown 對 paxillin 的影響

在 HaCaT 細胞上，SLK knockdown 後，再以 paxillin 一級抗體進行免疫螢光染色，去觀察 paxillin 的變化。紅色箭頭指向 paxillin(白色小點)，以 Matlab 程式定量過後，在 total signaling 平均無差異，在數量分布也相似。



第四章 討論



4.1 調控 SLK 在 SAS 和 HUVEC 上有不同表現的可能原因

在 HUVEC 細胞，SLK knockdown 會稍微提高細胞遷移的速度(圖一)；在 SAS 細胞，SLK knockdown 反而會降低細胞移動的速度(圖二)，有可能是因為細胞移動的速度主要與三個因素相關：motility(移動性)、coordination(協調性)和 polarity(方向性)²¹，而每種細胞中影響速度的因素參與比例各不相同，採取的策略不同所導致的。

根據實驗室學長姐的成果，猜測目前 SLK 可能會同時影響方向性與協調性，SAS 上 SLK knockdown 會提高協調性，但細胞移動的速度卻減緩，推測 SLK 以方向性為主體，SLK knockdown 降低方向性，協調性彌補性上升，但最終細胞速度是減少的。但是在 HUVEC 上，SLK knockdown 細胞移動速度變化並不明顯，顯示較不依賴方向性，而加入 ROCK inhibitor Y27632 會提高細胞協調性，所以同時 SLK knockdown 並給予 ROCK inhibitor Y27632 會大幅提升細胞移動速度。後來便以好觀察、好養活的 SAS 和 HaCaT 細胞先作為實驗觀察對象。

4.2 SLK 以 Ezrin 調控 actin，但是與 SLK kinase 功能較無相關



不管是在 SAS 或是 HaCaT 細胞上，可以看到 Ezrin knockdown 與 SLK knockdown 的 actin 多位於細胞邊緣、型態較為相似，代表 SLK knockdown 和 Ezrin knockdown 在 actin modulation 方面是走相同路徑的。而給予 Ezrin inhibitor 後，actin 除了位於細胞邊緣，也存在於細胞質，與 Ezrin/SLK knockdown 的結果並不同，代表 SLK 在 actin modulation 方面與 Ezrin 磷酸化較無相關，意指 SLK 以 Ezrin 調控 actin，但是與 SLK kinase 功能可能較無關聯。

4.3 SLK 調控 Ezrin 出入核，但是與 SLK kinase 功能較無相關

在 HaCaT 細胞，SLK knockdown 後可以看到 Ezrin 蛋白的 N/C ratio 上升，Ezrin 入核的比例提高，但是在給予 Ezrin inhibitor 後，Ezrin 蛋白的 N/C ratio 並無明顯上升。代表 SLK 能夠調控 Ezrin localization，但是與 SLK kinase 功能較無關連。



4.4 確認 SLK non-kinase function 對於 Ezrin 出入核的影響

為了確認 SLK non-kinase function 對於調控 actin structure 和 Ezrin localization 的現象，未來想利用 overexpression wild-type SLK 以及不同的 SLK mutant 去觀察對 actin structure 和 Ezrin localization 的影響。SLK 有許多重要的活化位置：像是 K63 和 E79 對於 SLK 保持在開放的活化構型很重要；T183 和 S189 則是重要的磷酸化位點，會針對這幾個位點去做變化²²。

4.5 確認不同磷酸化型態 Ezrin 對於 actin 的影響：利用 Ezrin-P2A-mEmerald mutant

目前只利用 overexpress mEmerald-Ezrin 和 mEmerald-Ezrin-mutant 去觀察對 actin 的影響，但是為了避免外來性的蛋白對細胞產生影響，於是之後會 overexpress 接有 P2A 的版本去避免外來性的蛋白對細胞產生影響。並且表現不同磷酸化的 mutant(T567A/T5A7D 等等) 去觀察對 actin 的影響，另外也會染 Ezrin 觀察是否會產生任何變化。



4.6 維持細胞形狀的可能性

從上述結果中可看到 SLK knockdown 後，Ezrin 在細胞核的量相較於細胞質是較多的，但是 acitn 有集中於細胞邊緣的現象出現且細胞形狀變得較整齊。這與先前文獻提到的 Ezrin 在細胞邊緣與 acitn binding 維持細胞形狀的情況相違背。但是有文獻提到磷酸化的 Ezrin 會負回饋抑制上游的 RhoA¹¹，那是否在 SLK 與磷酸化的 Ezrin 都減少的情況下，RhoA 不被抑制並通過磷酸化其他分子以維持細胞形狀？抑或是在 Ezrin 從細胞質轉移到細胞核後，有其他的 actin regulator 與 actin binding 產生 function？而且若是 SLK kinase 功能對 Ezrin 的出入核影響較相關，那又是誰去主要磷酸化 Ezrin 讓它去影響 actin 呢？

有一篇文獻提到，相較 SLK，對 Ezrin 磷酸化的成功較有影響的是 LOK(lymphocyte-oriented kinase)²³。LOK 與 SLK 為同源蛋白，演化過程中皆來自果蠅的 Silk 基因，因此兩者在結構上有相當高的相似度。並且有文獻也提到 SLK/LOK 同為 RhoA 下游的蛋白，也皆具有能磷酸化 ERM 的 kinase 功能¹¹。

那麼會不會 SLK 影響的是 Ezrin localization，而 LOK 影響的是 Ezrin 的磷酸化，再共同影響 actin？當 SLK knockdown，Ezrin 入核，細胞質裡能磷酸化的 Ezrin 減少，無法抑制 RhoA，使共同下游的 LOK 增強，磷酸化的 Ezrin 其實變多？但這都還是很粗淺的想法，還需要更多的實驗去嘗試和更多的文獻參考。



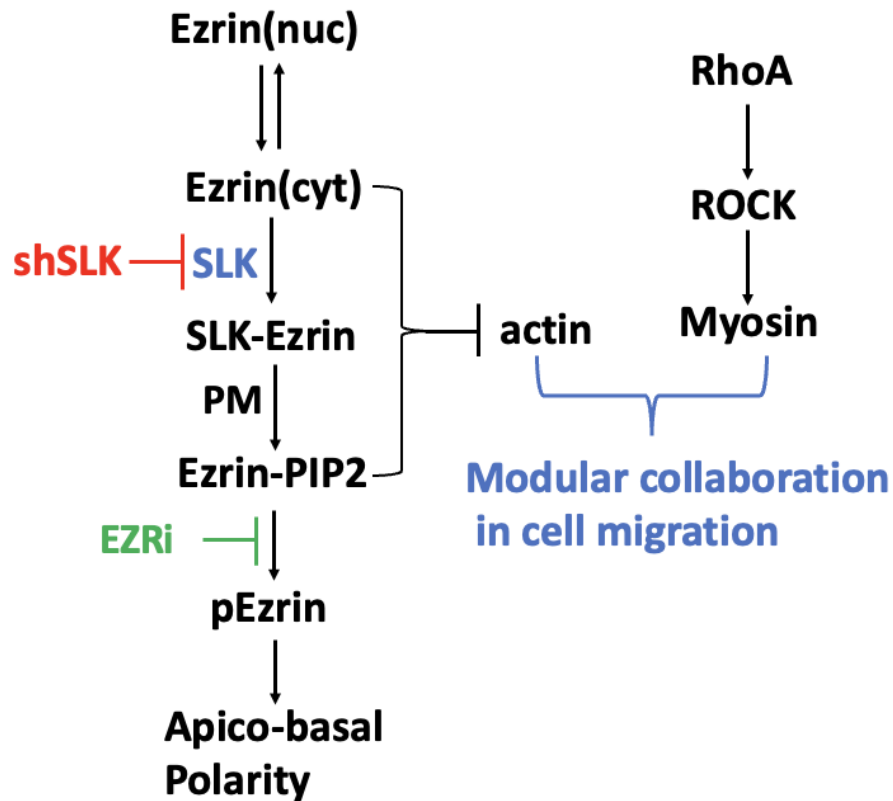
4.7 SLK 在不同細胞中的不同表現

在 SAS 細胞和 HUVEC 細胞上，可以看到 SLK knockdown 後對於細胞遷移速度影響有不同結果。在 SAS 細胞和 HaCaT 細胞上，SLK 影響 Ezrin 的出入核程度也出現不同結果。很難把一個細胞出現的現象直接套用在其他細胞上。像是在 HaCaT 上看到的 SLK knockdown 後，出現 Ezrin 在細胞核的比例變高，便再去觀察其他細胞是否會有如此現象，只能這樣去做嘗試與整理。

4.8 假設圖

結合上面種種的實驗結果，觀察到 SLK knockdown 後會使細胞排列變整齊，且 actin 會較集中於細胞邊緣。Ezrin knockdown 與 SLK knockdown 的結果較為相似，但是 Ezrin knockdown/SLK knockdown 與 Ezrin inhibitor 對 actin 的影響並不相同，推測 SLK 可能透過 Ezrin 去調控 actin 的分佈，進而影響細胞形狀與排列的改變，並不透過 Ezrin 的磷酸化去影響 actin。於是接下來想透過調控 Ezrin 的不同磷酸化型態去觀察是否會對 actin 造成影響。除此之外，還觀察到 SLK 能夠影響 Ezrin 的出入核，並且影響 Ezrin 的出入核的能力與 importin 存在著一定的關連性。

綜合來說，SLK 可能透過影響 Ezrin localization 去調控 actin structure，也可能透過影響不同磷酸化型態的 Ezrin 去調控 actin structure，再進一步與 ROCK pathway 的下游 myosin 有 interaction，最後才對細胞遷移速度有所影響。

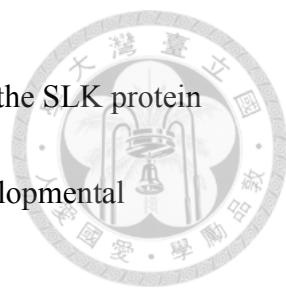


圖二十四、 SLK-Ezrin 假設示意圖

第五章 參考文獻



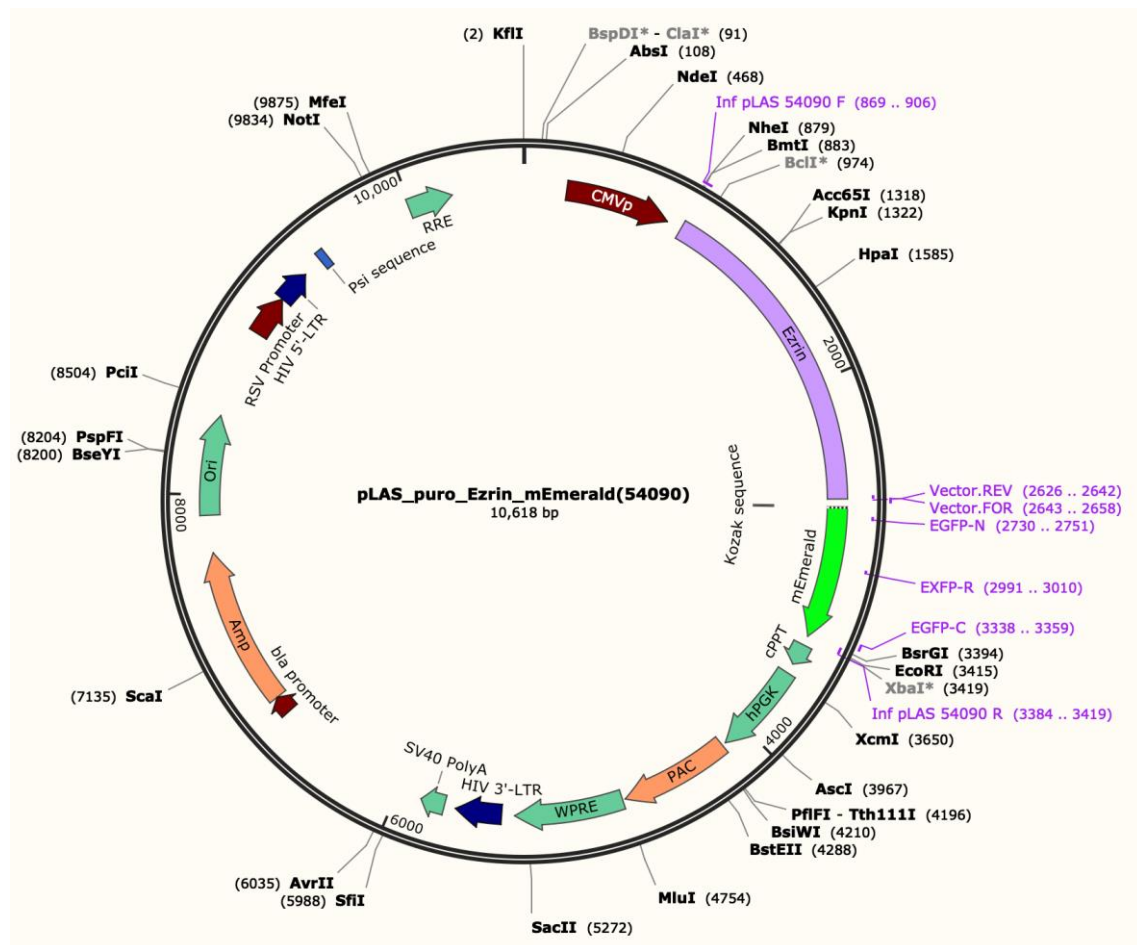
1. Worbs T, Hammerschmidt SI, Förster R. Dendritic cell migration in health and disease. *Nat Rev Immunol*. 2017;17(1):30-48. doi:10.1038/nri.2016.116
2. Simpson KJ, Selfors LM, Bui J, et al. Identification of genes that regulate epithelial cell migration using an siRNA screening approach. 2008;10(9).
3. Vitorino P, Meyer T. Modular control of endothelial sheet migration. *Genes Dev*. 2008;22(23):3268-3281. doi:10.1101/gad.1725808
4. Yamada E, Tsujikawa K, Itoh S, Kameda Y ichiro, Kohama Y, Yamamoto H. Molecular cloning and characterization of a novel human STE20-like kinase, hSLK. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*. 2000;1495(3):250-262. doi:10.1016/S0167-4889(99)00164-0
5. Garland B, Delisle S, Al-Zahrani KN, Pryce BR, Sabourin LA. The Ste20-like kinase – a Jack of all trades? *Journal of Cell Science*. Published online 2021.
6. Al-Zahrani KN, Baron KD, Sabourin LA. Ste20-like kinase SLK, at the crossroads: A matter of life and death. *Cell Adhesion & Migration*. 2013;7(1):1-10. doi:10.4161/cam.22495

- 
7. Al - Zahrani KN, Sekhon P, Tessier DR, et al. Essential role for the SLK protein kinase in embryogenesis and placental tissue development. *Developmental Dynamics*. 2014;243(5):640-651. doi:10.1002/dvdy.24106
8. O'Reilly PG, Wagner S, Franks DJ, et al. The Ste20-like Kinase SLK Is Required for Cell Cycle Progression through G2. *Journal of Biological Chemistry*. 2005;280(51):42383-42390. doi:10.1074/jbc.M510763200
9. Bagci H, Sriskandarajah N, Robert A, et al. Mapping the proximity interaction network of the Rho-family GTPases reveals signalling pathways and regulatory mechanisms. *Nature Cell Biology*. 2020;22.
10. Raftopoulou M, Hall A. Cell migration: Rho GTPases lead the way. *Developmental Biology*. 2004;265(1):23-32. doi:10.1016/j.ydbio.2003.06.003
11. Zaman R, Lombardo A, Sauvanet C, et al. Effector-mediated ERM activation locally inhibits RhoA activity to shape the apical cell domain. *Journal of Cell Biology*. 2021;220(6):e202007146. doi:10.1083/jcb.202007146
12. Svitkina T. The Actin Cytoskeleton and Actin-Based Motility. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2018;10(1):a018267. doi:10.1101/cshperspect.a018267

- 
13. Maître JL, Heisenberg CP. Three Functions of Cadherins in Cell Adhesion. *Current Biology*. 2013;23(14):R626-R633. doi:10.1016/j.cub.2013.06.019
14. Wells RG. The role of matrix stiffness in regulating cell behavior. *Hepatology*. 2008;47(4):1394-1400. doi:10.1002/hep.22193
15. Song Y, Ma X, Zhang M, et al. Ezrin Mediates Invasion and Metastasis in Tumorigenesis: A Review. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*. 2020;8.
16. Fehon RG, McClatchey AI, Bretscher A. Organizing the cell cortex: the role of ERM proteins. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2010;11(4):276-287. doi:10.1038/nrm2866
17. Shabardina V, Kramer C, Gerdes B, et al. Mode of Ezrin-Membrane Interaction as a Function of PIP 2 Binding and Pseudophosphorylation. *Biophysical Journal*. 2016;110(12):2710-2719. doi:10.1016/j.bpj.2016.05.009
18. Barret C, Roy C, Montcourrier P, Mangeat P, Niggli V. Mutagenesis of the Phosphatidylinositol 4,5-Bisphosphate (Pip2) Binding Site in the Nh2-Terminal Domain of Ezrin Correlates with Its Altered Cellular Distribution. *The Journal of Cell Biology*. 2000;151(5):1067-1080. doi:10.1083/jcb.151.5.1067
19. Mathew C, Ghildyal R. CRM1 Inhibitors for Antiviral Therapy. *Front Microbiol*. 2017;8:1171. doi:10.3389/fmicb.2017.01171

- 
20. Mudatsir M, Yufika A, Nainu F, et al. Antiviral Activity of Ivermectin Against SARS-CoV-2: An Old-Fashioned Dog with a New Trick—A Literature Review. *Sci Pharm*. 2020;88(3):36. doi:10.3390/scipharm88030036
21. Yu LY, Tseng TJ, Lin HC, et al. Synthetic dysmobility screen unveils an integrated STK40-YAP-MAPK system driving cell migration. *Sci Adv*. 2021;7:31. doi:0.1126/sciadv.abg2106
22. Luhovy AY, Jaber A, Papillon J, Guillemette J, Cybulsky AV. Regulation of the Ste20-like Kinase, SLK. *Journal of Biological Chemistry*. 2012;287(8):5446-5458. doi:10.1074/jbc.M111.302018
23. Pelaseyed T, Viswanatha R, Sauvanet C, Filter JJ, Goldberg ML, Bretscher A. Ezrin activation by LOK phosphorylation involves a PIP2-dependent wedge mechanism. *eLife*. 2017;6:e22759. doi:10.7554/eLife.22759

6.2 質體 Maps





6.3 Matlab 程式稿

6.3.1 螢光版校正

save_fluoref_cor_img_2channels_2023

%%

close all;clc;clear mex

cwd='/Volumes/Coco/2023_1024_HACAT_shSLK_LEPB_YAP_EZRIN/Export/';

cd(cwd)

cfolder='';

%% fluo reference

c1_off=single(imresize(imread([cwd,'20230705fluo_reference/DAPI_off.tif']),1));

c1_on=single(imresize(imread([cwd,'20230705fluo_reference/DAPI_on.tif']),1));

c2_off=single(imresize(imread([cwd,'20230705fluo_reference/TxRed_off.tif']),1));

c2_on=single(imresize(imread([cwd,'20230705fluo_reference/TxRed_on.tif']),1));

%c3_off=single(imresize(imread([cwd,'2023fluo_reference\TxRed_off.tif']),1));

%c3_on=single(imresize(imread([cwd,'2023fluo_reference\TxRed_on.tif']),1));

c1_ref=c1_on-c1_off;c2_ref=c2_on-c2_off;

c1_mean=mean(c1_ref(:));c2_mean=mean(c2_ref(:));

%% correct image

chname={'c1','c2','c3'};chnum=size(chname,2);



```
cfile1=dir([cwd,'\','cfolder','\','*','chname{1}','.tif']);

cfile2=dir([cwd,'\','cfolder','\','*','chname{2}','.tif']);

%cfile3=dir([cwd,'\','cfolder','\','*','chname{3}','.tif']);

%% correct c1img

filenum=size(cfile1,1);

for f=1:filenum

    %

    c1image=single(imread([cwd,'\','cfolder','\','cfile1(f).name']));

    c1image_cr=(c1image-c1_off)./c1_ref*c1_mean+c1_off;

    c2image=single(imresize(imread([cwd,cfolder,'\','cfile2(f).name']),1));

    c2image_cr=(c2image-c2_off)./c2_ref*c2_mean+c2_off;

    %c3image=single(imread([cwd,cfolder,'\','cfile3(f).name']));

    %c3image_cr=(c3image-c3_off)./c3_ref*c3_mean+c3_off;

    %

    if f==1

        mkdir([cwd,cfolder,'\','fluo_corrected/'])

        c1scale=prctile(c1image_cr(:),[0.1 99.9]);

        c2scale=prctile(c2image_cr(:),[0.1 99.9]);

        %c3scale=prctile(c3image_cr(:),[0.1 99.9]);
```



```
end

%% demo fluo_corrected image

figure(11);set(gcf,'position',get(0,'ScreenSize'))

figure(11);hold

off;subplot(2,3,1);imagesc(c1image);title(['Frame',num2str(f)]);ylabel('non-corrected')

hold

off;subplot(2,3,4);imagesc(c1image_cr,c1scale);title('ch1');ylabel('corrected')

figure(11);hold off;subplot(2,3,2);imagesc(c2image);title(f);

hold off;subplot(2,3,5);imagesc(c2image_cr);title('ch2');

%figure(11);hold off;subplot(2,3,3);imagesc(c3image);title(f);

%hold off;subplot(2,3,6);imagesc(c3image_cr,c3scale);title('ch3');

%% save image

imwrite(uint16(c1image_cr),[cwd,cfolder,'/','fluo_corrected/',cfile1(f).name]);

imwrite(uint16(c2image_cr),[cwd,cfolder,'/','fluo_corrected/',cfile2(f).name]);

%imwrite(uint16(c3image_cr),[cwd,cfolder,'/','fluo_corrected/',cfile3(f).name]);

end

save_fluoref_cor_img_3channels_2023

%%
```



```
close all;clc;clear mex
```

```
cwd='G:\2023_0815_HaCaT_shSLK+ERMi\';cd(cwd)
```

```
cfolder="";
```

```
%% fluo reference
```

```
c1_off=single(imresize(imread([cwd,'20230705fluo_reference/DAPI_off.tif']),1));
```

```
c1_on=single(imresize(imread([cwd,'20230705fluo_reference/DAPI_on.tif']),1));
```

```
c2_off=single(imresize(imread([cwd,'20230705fluo_reference/FITC_off.tif']),1));
```

```
c2_on=single(imresize(imread([cwd,'20230705fluo_reference/FITC_on.tif']),1));
```

```
c3_off=single(imresize(imread([cwd,'20230705fluo_reference/TxRed_off.tif']),1));
```

```
c3_on=single(imresize(imread([cwd,'20230705fluo_reference/TxRed_on.tif']),1));
```

```
c1_ref=c1_on-c1_off;c2_ref=c2_on-c2_off;c3_ref=c3_on-c3_off;
```

```
c1_mean=mean(c1_ref(:));c2_mean=mean(c2_ref(:));c3_mean=mean(c3_ref(:));
```

```
%% correct image
```

```
chname={'c1','c2','c3'};chnum=size(chname,2);
```

```
cfile1=dir([cwd,'\cfolder','\','*',[chname{1},'.tif']]);
```

```
cfile2=dir([cwd,'\cfolder','\','*',[chname{2},'.tif']]);
```

```
cfile3=dir([cwd,'\cfolder','\','*',[chname{3},'.tif']]);
```

```
%% correct c1img
```

```
filenum=size(cfile1,1);
```

```

for f=1:filenum

    %

    c1image=single(imread([cwd,'/',cfolder,'/',cfile1(f).name]));

    c1image_cr=(c1image-c1_off)./c1_ref*c1_mean+c1_off;

    c2image=single(imresize(imread([cwd,cfolder,'/',cfile2(f).name]),1));

    c2image_cr=(c2image-c2_off)./c2_ref*c2_mean+c2_off;

    c3image=single(imread([cwd,cfolder,'/',cfile3(f).name]));

    c3image_cr=(c3image-c3_off)./c3_ref*c3_mean+c3_off;

    %

    if f==1

        mkdir([cwd,cfolder,'/','fluo_corrected/'])

        c1scale=prctile(c1image_cr(:),[0.1 99.9]);

        c2scale=prctile(c2image_cr(:),[0.1 99.9]);

        c3scale=prctile(c3image_cr(:),[0.1 99.9]);

    end

    %% demo fluo_corrected image

    figure(11);set(gcf,'position',get(0,'ScreenSize'))

    figure(11);hold

    off;subplot(2,3,1);imagesc(c1image);title(['Frame',num2str(f)]);ylabel('non-corrected')

```



```

hold
off;subplot(2,3,4);imagesc(c1image_cr,c1scale);title('ch1');ylabel('corrected')

figure(11);hold off;subplot(2,3,2);imagesc(c2image);title(f);

hold off;subplot(2,3,5);imagesc(c2image_cr);title('ch2');

figure(11);hold off;subplot(2,3,3);imagesc(c3image);title(f);

hold off;subplot(2,3,6);imagesc(c3image_cr,c3scale);title('ch3');

%% save image

imwrite(uint16(c1image_cr),[cwd,cfolder,'','fluo_corrected/',cfile1(f).name]);

imwrite(uint16(c2image_cr),[cwd,cfolder,'','fluo_corrected/',cfile2(f).name]);

imwrite(uint16(c3image_cr),[cwd,cfolder,'','fluo_corrected/',cfile3(f).name]);

end

```

6.3.2 兩點連線沿線分析

```

NC_calculation_3channel_0413

%%

%save AA_cellinfomtx & AA_linemtx

%%

```

```

clear all;clear mex;clc;close all

cwd='/Volumes/Coco/2023_0815_HaCaT_shSLK+ERMi/';

nucr=16;

gpname='shluc+ermi_Ezrin';

sitename='D03_02';

%foframe=6;%手動挑最清楚的 z-stack

%% images

pERKdir=dir([cwd,'/',gpname,'*',sitename,'*c2*.tif']);

EYFPdir=dir([cwd,'/',gpname,'*',sitename,'*c3*.tif']);

DAPIIdir=dir([cwd,'/',gpname,'*',sitename,'*c1*.tif']);

fignum=100;

% ERK

stacksz=size(pERKdir,1);

for sss=1:stacksz

    tempERK=single(imread([cwd,'/fluo_corrected/',pERKdir(sss).name]));

    if sss==1

        ERKimgsum=zeros([size(tempERK),stacksz]);

    end

```





```
ERKimgsum(:,:,sss)=tempERK;

end

ERKimg_sort=sort(ERKimgsum,3,'descend');

ERKimgmean=mean(ERKimg_sort(:,:,1:3),3);

% ERKimgmean=mean(ERKimgsum(:,:,foframe-1:foframe+1),3);

figure(fignum);subplot(1,3,1);imshow(imadjust(mat2gray(ERKimgmean)));xlabel(

'pAKT')

% DAPI

for sss=1:stacksz

    tempDAPI=single(imread([cwd,'/fluo_corrected/',DAPIdir(sss).name]));

    if sss==1

        DAPIimgsum=zeros([size(tempDAPI),stacksz]);

    end

    DAPIimgsum(:,:,sss)=tempDAPI;

end

DAPIimg_sort=sort(DAPIimgsum,3,'descend');

DAPIimgmean=mean(DAPIimg_sort(:,:,1:3),3);

figure(fignum);subplot(1,3,2);imshow(imadjust(mat2gray(DAPIimgmean)));xlabel

('DAPI')
```



```

% EYFP

for sss=1:stacksz

    tempEYFP=single(imread([cwd,'/fluo_corrected/',EYFPdir(sss).name]));

    if sss==1

        EYFPimgsum=zeros([size(tempEYFP),stacksz]);

    end

    EYFPimgsum(:, :, sss)=tempEYFP;

end

EYFPimg_sort=sort(EYFPimgsum,3,'descend');

EYFPimgmean=mean(EYFPimg_sort(:, :, 1:3),3);

figure(fignum);subplot(1,3,3);imshow(imadjust(mat2gray(EYFPimgmean)));xlabel

('EYFP')

%% reassign extreme values in tempimg_bs

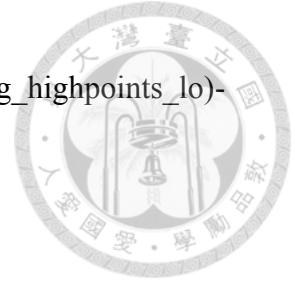
tempimg_75=prctile(DAPlimgmean(:),75);

tempimg_15iqr=1.0*iqr(DAPlimgmean(:));

outlierth=tempimg_75+tempimg_15iqr;

tempimg_highpoints_lo=DAPlimgmean>outlierth;

```



```
tempimg_highpoints_reassign=(DAPIimgmean(tempimg_highpoints_lo)-
outlierth)/2+outlierth;

%

tempimg_highpoints_reassign=0.5*(randn(sum(tempimg_highpoints_lo(:)),1))*tempim
g_15iqr+outlierth;

%

tempimg_bs_highpoints=tempimg_bs(tempimg_bs_highpoints_lo);

%

tempimg_bs_highpointsrange=diff(prctile(tempimg_bs_highpoints,[0,100]));

%      tempimg_bs_highpoints_reassign=(tempimg_bs_highpoints-
tempimg_bs_75)/tempimg_bs_highpointsrange*tempimg_bs_15iqr+tempimg_bs_75;

%

tempimg_reassign=DAPIimgmean;

tempimg_reassign(tempimg_highpoints_lo)=tempimg_highpoints_reassign;

%% get dapi mask

DAPIimg_bl=imfilter(single(tempimg_reassign),fspecial('disk',2),'replicate');

DAPIimg_bs0=bgsub(DAPIimg_bl,4*nucr,0);
```



```
DAPIimg_bs=DAPIimg_bs0-min(DAPIimg_bs0:)+100;

figure(fignum+20);subplot(1,2,1);imshow(DAPIimg_bs,[]);title('DAPI')

DAPIimg_mk1=bwlabel(imfill(getdapimask(sqrt(abs(DAPIimg_bs)),nucr),'holes'))

;

dapi_bg=GetSeris_bg_bin(DAPIimg_bs,200);

dapi_min=prctile(DAPIimg_bs(DAPIimg_bs<dapi_bg),1);

dapi_th=dapi_bg+4*(dapi_bg-dapi_min);

DAPIimg_mk2=DAPIimg_bs>dapi_th;

DAPIimg_mk=bwlabel(bwareaopen(DAPIimg_mk1 & DAPIimg_mk2,nucr^2));

figure(fignum+20);subplot(1,2,2);imshow(DAPIimg_mk>0,[]);title('Mask')

nucsz=max(DAPIimg_mk(:));

tempnucen=regionprops(DAPIimg_mk,'centroid','pixelidxlist');

%% determine background signal in ERK channel & background subtraction

ERKimg_bl=imfilter(ERKimgmean,fspecial('disk',2),'replicate');

%

figure(fignum+21);imshow(((sqrt(ERKimg_bl))),[])

title('Click background, and then hit enter.')

[xbg,ybg]=getpts(gcf);
```



```
bgmtx=ERKimg_bl(round(ybg),round(xbg));

bgvec=diag(bgmtx);bgvecmean=trimmean(bgvec,25);

ERKimg_bg=bgvecmean;

ERKimg_bl_sort=sort(ERKimg_bl(:),'ascend');

bgmin=mean(ERKimg_bl_sort(5:8,1));

ERKimg_th=bgvecmean+(bgvecmean-bgmin);

figure(10000);subplot(2,1,1);hist(ERKimg_bl(:),1000)

hold on;plot([ERKimg_th,ERKimg_th],[0,200000], 'r')

%

ERKimg_bgarea=ERKimg_bl<ERKimg_th;

binnum=round(1000*sum(ERKimg_bgarea(:))/length(ERKimg_bgarea(:)));

% ERKimg_bg=GetSeris_bg_bin(ERKimg_bl(ERKimg_bgarea),binnum);

% binwidth=(ERKimg_th-min(ERKimg_bl(:)))/binnum;

% [f,xi] =

ksdensity(ERKimg_bl(ERKimg_bgarea),min(ERKimg_bl(:)):binwidth:ERKimg_th);

% [B,I]=max(f);ERKimg_bg=xi(I);

figure(10000);subplot(2,1,2);hist(ERKimg_bl(ERKimg_bgarea),binnum)

hold on;plot([ERKimg_bg,ERKimg_bg],[0,10000], 'r')

%
```



```
ERKimg_bs=ERKimg_bl-ERKimg_bg;

%% background subtraction in EYFP channel

EYFPimg_bl=imfilter(EYFPimgmean,fspecial('disk',2),'replicate');

EYFPimg_bs=bgsb(EYFPimg_bl,16*nucr,0.01);

%%

nucx=zeros(nucsz,1);nucy=zeros(nucsz,1);

for nnn=1:nucsz

    nucvec=tempnucen(nnn).Centroid;

    nucx(nnn)=nucvec(1);nucy(nnn)=nucvec(2);

end

TRI=delaunay(nucx,nucy);

figure(fignum+22);

subplot(1,2,1);imshow(DAPIimg_bs,[]);hold on;triplot(TRI,nucx,nucy,'--')

subplot(1,2,2);imshow(sqrt(abs(ERKimg_bs)),[]);hold on;triplot(TRI,nucx,nucy,'--

')

neighborcell=cell(nucsz,1);neighborlinecell0=cell(nucsz,1);

neighbordistcell=cell(nucsz,1);neighbordistvec=[];
```



```
for nnn=1:nucsz

    %%

    TRIllogic=sum(TRI==nnn,2);

    neighbormtx=TRI(logical(TRIllogic),:);

    neighborvec=unique(neighbormtx(:));neighborvec(neighborvec==nnn)=[];

    neighborcell{nnn}=neighborvec;

    %%

    neighborx=nucx(neighborvec);neighbory=nucy(neighborvec);

    targetx=nucx(nnn);targety=nucy(nnn);

    neighborsz=size(neighborvec,1);

    for lll=1:neighborsz

        linexvec=targetx:(neighborx(lll)-targetx)/100:neighborx(lll);

        lineyvec=targety:(neighbory(lll)-targety)/100:neighbory(lll);

        linevaluevec=zeros(1,101);

        for ppp=1:101

            tempx=round(linexvec(ppp));tempy=round(lineyvec(ppp));

            linevaluevec(ppp)=mean(mean(ERKimg_bs(tempy-1:tempy+1,tempx-
1:tempx+1))));

        end

    end
```



```

neighborlinecell0{nnn}=[neighborlinecell0{nnn};linevaluevec];

end

tempdistvec=pdist2([targetx,targety],[neighborx,neighbory]);

neighbordistcell{nnn}=[tempdistvec,neighborx,neighbory];

neighbordistvec=[neighbordistvec;tempdistvec];

% neighborlinevec(nnn,:)=mean(neighborlinecell{nnn},1);

end

%%

AA_cellinfomtx=[];AA_linemtx=[];

dist_th=2*GetSeris_bg_bin(neighbordistvec,100);

signal_th=-1*prctile(EKimg_bs(EKimg_bs<=0),1);

%

neighborlinevec=zeros(nucsz,101);

neighborlinecell=neighborlinecell0;

figure(fignum+23);

subplot(1,2,1);imshow(sqrt(abs(EKimg_bs)),[]);hold on;triplot(TRI,nucx,nucy,'b-

-')

```



```

subplot(1,2,2);imshow(sqrt(abs(ERKimg_bs)),[]);hold on;triplot(TRI,nucx,nucy,'b-
-')

for nnn=1:nucsz

    distlogic=neighbordistcell{nnn}(:,1)<dist_th;

    signallogic=min(neighborlinecell0{nnn},[],2)>signal_th;

    templogic=distlogic & signallogic;

    figure(fignum+23);subplot(1,2,2);hold on

    if sum(~templogic)>0

        for ttt=find(~templogic)'

            plot([nucx(nnn),neighbordistcell{nnn}(ttt,2)],[nucy(nnn),neighbordistcell{nnn}(ttt,3)],'-
r')

        end

    end

    neighborlinecell{nnn}=neighborlinecell{nnn}(templogic,:);

    neighborlinevec(nnn,:)=mean(neighborlinecell{nnn},1);

    %%

    tempinfo0=neighbordistcell{nnn};

```



```
tempinfo0(:,4)=tempnuccen(nnn).Centroid(1);tempinfo0(:,5)=tempnuccen(nnn).Centroid(2);
```

```
d(2);
```

```
tempinfo=tempinfo0(templogic,[4,5,2,3,1]);
```

```
tempinfo(:,6)=trimmean(EYFPimg_bs(tempnuccen(nnn).PixelIdxList),50);
```

```
AA_cellinfomtx=[AA_cellinfomtx;tempinfo];% 1cen-x 2cen-y 3neighbor-x
```

```
4neighbor-y 5distance 6EYFP
```

```
AA_linemtx=[AA_linemtx;neighborlinecell{nnn}]; %0-100
```

```
end
```

```
%%
```

```
figure(fignum+25);hold off;plot(1:101,nanmean(neighborlinevec,1),'-k')
```

```
figure(fignum+25);hold on;errorbar(1:101,nanmean(neighborlinevec,1),...
```

```
nanstd(neighborlinevec,[],1)/sqrt(sum(isfinite(neighborlinevec(:,1)))),'k')
```

```
%
```

```
normlinevec=neighborlinevec./(mean(neighborlinevec(:,1:3),2)*ones(1,101));
```

```
figure(fignum+27);hold off;plot(1:101,nanmean(normlinevec,1),'-k')
```

```
figure(fignum+27);hold on;errorbar(1:101,nanmean(normlinevec,1),...
```

```
nanstd(normlinevec,[],1)/sqrt(sum(isfinite(normlinevec(:,1)))),'k')
```



```
%%  
  
DAPIimg_nuc=imerode(DAPIimg_mk,strel('disk',4),0);  
  
figure(fignum+30);subplot(1,2,1);imshowc(ERKingmean,DAPIimg_nuc,1);title('Nucleus')  
  
tempnucidx=regionprops(DAPIimg_nuc,'pixelidxlist','area');  
  
DAPIimg_cyt=imdilate(DAPIimg_mk,strel('disk',6),0)-  
imdilate(DAPIimg_mk,strel('disk',4),0);  
  
figure(fignum+30);subplot(1,2,2);imshowc(ERKingmean,DAPIimg_cyt,1);title('Cytosol ring')  
  
tempcytidx=regionprops(DAPIimg_cyt,'pixelidxlist','area');  
  
%  
  
tempmtx=zeros(nucsz,5);% 1x 2y 3nuc 4cyt 5nucsize 6cytringsize  
  
for nnn=1:nucsz  
  
    tempmtx(nnn,1:2)=tempnucen(nnn).Centroid;  
  
    tempmtx(nnn,3)=mean(ERKing_bs(tempnucidx(nnn).PixelIdxList));  
  
    tempmtx(nnn,4)=mean(ERKing_bs(tempcytidx(nnn).PixelIdxList));  
  
    tempmtx(nnn,5)=tempnucidx(nnn).Area;
```



```

tempmtx(nnn,6)=tempcytidx(nnn).Area;

%tempmtx(nnn,7)=mean(EYFPimg_bs(tempnucidx(nnn).PixelIdxList));

end

mkdir([cwd,'/resultsMTX0406/'])

save([cwd,'/resultsMTX0406/',gpname,'_',sitename,'.mat'],'AA_cellinfomtx',
'AA_linemtx','tempmtx')

%% demo

% figure(1000);plot(tempmtx(:,4),tempmtx(:,3),'k','markersize',16);...

%   xlabel('cyt');ylabel('nuc')

%

figure(2000);subplot(2,2,1);plot(log10(tempmtx(:,4)),log10(tempmtx(:,4)./tempmtx(:,3)
),...

%   'k','markersize',16);xlabel('log10(cyt)');ylabel('log10(cyt/nuc)')

% figure(2000);subplot(2,2,2);histogram(log10(tempmtx(:,4)./tempmtx(:,3)));...

%   xlabel('log10(cyt/nuc)');ylabel('#');title('histogram')

% figure(2000);subplot(2,2,3);histogram(log10(tempmtx(:,4)));...

%   xlabel('log10(cyt)');ylabel('#');title('histogram')

% figure(2000);subplot(2,2,4);histogram(log10(tempmtx(:,3)));...

```



```
% xlabel('log10(nuc)');ylabel('#');title('histogram')
```

6.3.3 N/C ratio 核質比分析

ORO_lipid_droplet_script_20230914

```
%%
```

```
clear;clc;close all
```

```
cwd='/Volumes/Coco/2023_1105_HACAT_ivermectin/Export/';
```

```
%%
```

```
for rows=2 %%B=2C=3D=4E=5F=6G=7
```

```
    rowname=char(rows+64);
```

```
    for cols=2
```

```
        colname=['0',num2str(cols)];colname=colname(end-1:end);
```

```
        wellname=[rowname, colname];
```

```
        imgfolder=[cwd,'/fluo_corrected/'];
```

```
        % cd(imgfolder)
```



nucr=24; % radius of nucleus 給一個細胞核半徑參考值。最好先自己量過，or 偷懶先跑完再看分布較集中在哪然後再跑一次

yapr=150 % radius of cell 這個也是給細胞半徑參考值，最好數值可以偏大，但是比核的數值不重要一點

```
toplength=nucr*4;
```

```
%%
```

```
for sitenum=1:3
```

```
    dispname=[wellname,' ',num2str(sitenum)];disp(dispname)
```

```
    dapidir=dir([imgfolder,wellname,'*XY',num2str(sitenum),'*C1*.tif']); %這
```

個 site 有幾個 dapi 的影像，打開看應該會抓到上述的 well and site C1

```
    yapdir=dir([imgfolder,wellname,'*XY',num2str(sitenum),'*C2*.tif']);
```

%FITC (YAP) 這個 site 有幾個 yap 的影像，打開看應該會抓到上述的 well and site

C2

```
    zstacknum=size(dapidir,1); %it's Z stack number
```

```
    %% image stack processing 把所有 z stack 擠成一張最清楚的
```

```
    for zzz=1:zstacknum
```

```
        tempdapi=single(imread([imgfolder,dapidir(zzz).name]));
```



```
tempyap=single(imread([imgfolder,yapdir(zzz).name]));

if zzz==1

    dapistack=zeros([size(tempdapi),zstacknum]);

    yapstack=zeros([size(tempyap),zstacknum]);

end

dapistack(:,:,zzz)=tempdapi;

yapstack(:,:,zzz)=tempyap;

end

dapistack_sort=sort(dapistack,3,'descend'); %把所有 dapi 影像疊起來,
最好的在最上依次遞減到最下面

yapstack_sort=sort(yapstack,3,'descend'); %把所有 yap 影像疊起來, 最
好的在最上依次遞減到最下面

dapiimg=single(mean(dapistack_sort(:,:,1:3),3)); %dapi 疊完, 找最上面
三張並且平均, 得到的較為客觀

yapimg=single(mean(yapstack_sort(:,:,1:3),3)); %yap 疊完, 找最上面三
張並且平均, 得到的較為客觀

% demo original images
```



```
figure(100);subplot(1,3,1);imshow(dapiimg,[]);title(dispname);xlabel('DAPI') %最終三
```

張平均後所得到的 dapi

```
figure(100);subplot(1,3,2);imshow(yapimg,[]);xlabel('YAP') %最終三張平
```

均後所得到的 YAP

```
figure(100);subplot(1,3,3);imshowc(yapimg,0,dapiimg,1);title('original
```

image') %YAP 和 dapi 的疊圖

```
%% background subtraction 這邊就是扣除背景， 因此可以看到 dapi.yap
```

數值都降到接近 0， 背景是從剛剛在圈選細胞半徑所去找到的數值去扣除

```
%%
```

```
dapiimg_bs=bgsub(dapiimg,4*nucr,0);
```

```
yapimg_bg0=prctile(yapimg(:),0.1);...
```

```
yapimg_bg=mean(yapimg(yapimg<=yapimg_bg0));...
```

```
yapimg_bs=yapimg-yapimg_bg;
```

```
% yapimg_bs=bgsub(yapimg,32*yapr,0.001);
```



%% 以該次拍照的所有圖，找出所有背景，從 determine image bg 得到的數值帶入

```
%load([imgfolder,'C1bgC2bg.mat'])
```

```
%dapiimg_bs=dapiimg-C1bg;
```

```
%yapimg_bs=yapimg-C2bg;
```

%% 秀出 fig200 代表剪過背景の dapi.yap

```
figure(200);subplot(1,3,1);imshow(dapiimg_bs,[]);title(dispname);xlabel('DAPI')
```

```
figure(200);subplot(1,3,2);imshow(yapimg_bs,[]);xlabel('YAP')
```

```
figure(200);subplot(1,3,3);imshowc(yapimg_bs,0,dapiimg_bs,1);title('background-subtracted')
```

%% 秀出減背景前後的訊號，通常應該要越來越趨近於 0 且 peak 更高

```
figure(220);subplot(2,2,1);hist(dapiimg(:),1000)
```

```
figure(220);subplot(2,2,2);hist(yapimg(:),1000)
```

```
figure(220);subplot(2,2,3);hist(dapiimg_bs(:),1000)
```

```
figure(220);subplot(2,2,4);hist(yapimg_bs(:),1000)
```



```
%% oil red image correction
```

```
% yapbg=GetSeris_bg_bin(yapimg_bs,200); % correct bg to 0
```

```
yapbg=0; % bg correction not performed
```

```
yapimg_c=yapimg_bs-yapbg;
```

```
%% use dapi to get masks 先從圖上看到 mask 代表找到核
```

```
dapiimg_mk0=getdapimask(sqrt(mat2gray(dapiimg_bs)),nucr);
```

```
dapiimg_gr=sqrt(mat2gray(dapiimg_bs));
```

```
gth=graythresh(dapiimg_gr);
```

```
dapiimg_mk2=imbinarize(dapiimg_gr,gth);
```

```
dapiimg_mk=bwareaopen(dapiimg_mk0 & dapiimg_mk2,1*nucr^2);
```

```
figure(240);subplot(1,3,1);imshow(dapiimg_bs,[]);title(dispname);xlabel('DAPI')
```

```
figure(240);subplot(1,3,2);imshow(dapiimg_mk,[]);xlabel('Mask')
```

```
figure(240);subplot(1,3,3);imshowc(dapiimg_mk,0,dapiimg_bs,1);title('Mask-DAPI') %
```

秀出 fig240 代表剪過背景後，電腦和原本圖的



```
%% rink mask

dapiimg_label=bwlabel(dapiimg_mk);

dapiimg_label_dilate1=imdilate(dapiimg_label,strel('disk',round(nucr/2),0));

dapiimg_label_dilate2=imdilate(dapiimg_label,strel('disk',nucr,0));

%      dapiimg_ring=dapiimg_label_dilate-dapiimg_label;

dapiimg_ring=dapiimg_label_dilate2-dapiimg_label_dilate1;

figure(270);subplot(1,3,1);imshow(dapiimg_bs,[]);title(dispname);xlabel('DAPI')

figure(270);subplot(1,3,2);imshowc(yapimg_bs,0,dapiimg_bs,1);xlabel('DAPI-YAP')

figure(270);subplot(1,3,3);imshowc(yapimg_bs,dapiimg_ring>0,dapiimg_bs,1);title('rin
g mask')

%% watershed mask 框起來該細胞

dapiimg_bwdist=bwdist(dapiimg_mk);

dapiimg_watershed=watershed(dapiimg_bwdist);
```



```
figure(300);subplot(1,2,1);imshowc(yapimg_c,0,dapiimg_mk,1);title(dispname)
```

```
figure(300);subplot(1,2,2);imshowc(yapimg_c,dapiimg_watershed==0,dapiimg_mk,1);t
```

```
itle('+ watershed')
```

```
%% prepare for data retrieval by regionprops
```

```
dapi_nuc=regionprops(dapiimg_mk,'centroid','area','pixelidxlist');
```

```
dapi_ring=regionprops(dapiimg_ring,'area','pixelidxlist');
```

```
dapi_watershed=regionprops(dapiimg_watershed,'area','pixelidxlist');
```

```
nuc_num=size(dapi_nuc,1);
```

```
nucmtx=zeros(nuc_num,12);
```

```
%%
```

```
% 1x 2y 3nuc_area 4nuc_DAPI_avg_intensity
```

```
% 5nuc_YAP_avg_intensity 6nuc_YAP_top_intensity
```

```
% 7ring_area 8ring_avg_intensity 9ring_top_intensity
```

```
% 10watershed_area 11watershed_all_intensity 12watershed_top_intensity
```



```
%% get information, cell by cell

for nnn=1:nuc_num

    if dapi_nuc(nnn).Area>2*toplength &&

dapi_ring(nnn).Area>2*toplength

        %% nuc info

        nucmtx(nnn,1:2)=dapi_nuc(nnn).Centroid;

        nucmtx(nnn,3)=dapi_nuc(nnn).Area;

        nucmtx(nnn,4)=mean(dapiimg_bs(dapi_nuc(nnn).PixelIdxList));

        %% nuc YAP signals

        tempnuc_list=sort(yapimg_c(dapi_nuc(nnn).PixelIdxList),'descend');

        nucmtx(nnn,5)=mean(tempnuc_list);

        nucmtx(nnn,6)=trimmean(tempnuc_list(1:toplength),50);

        %% ring info & ring YAP signals

        nucmtx(nnn,7)=dapi_ring(nnn).Area;

        tempring_list=sort(yapimg_c(dapi_ring(nnn).PixelIdxList),'descend');

        nucmtx(nnn,8)=mean(tempring_list);

        nucmtx(nnn,9)=trimmean(tempring_list(1:toplength),50);

        %% watershed info
```



```
nucmtx(nnn,10)=dapi_watershed(nnn).Area;

tempwatershed_list=sort(yapimg_c(dapi_watershed(nnn).PixelIdxList),'descend');

nucmtx(nnn,11)=sum(tempwatershed_list);

nucmtx(nnn,12)=trimmean(tempwatershed_list(1:toplenth),50);

end

end

nucmtx=nucmtx(nucmtx(:,1)>0 & nucmtx(:,2)>0,:);

%% demo nuc avg

figure(360);imshowc(yapimg_bs,0,sqrt(abs(dapiimg_bs)),1);xlabel('DAPI-
YAP')

hold on;plot(nucmtx(:,1),nucmtx(:,2),'.w')

text(nucmtx(:,1),nucmtx(:,2),num2str(round(nucmtx(:,5))), 'color','w')

title([dispname,' YAP nuc avg'])

%% demo nuc top

figure(380);imshowc(yapimg_bs,0,sqrt(abs(dapiimg_bs)),1);xlabel('DAPI-
YAP')

hold on;plot(nucmtx(:,1),nucmtx(:,2),'.w')
```



```
text(nucmtx(:,1),nucmtx(:,2),num2str(round(nucmtx(:,6))), 'color','w')
```

```
title([dispname,' YAP nuc top'])
```

```
%% demo ring avg
```

```
figure(400);imshowc(yapimg_bs,0,sqrt(abs(dapiimg_bs)),1);xlabel('DAPI-
```

```
YAP')
```

```
hold on;plot(nucmtx(:,1),nucmtx(:,2),'.w')
```

```
text(nucmtx(:,1),nucmtx(:,2),num2str(round(nucmtx(:,8))), 'color','w')
```

```
title([dispname,' YAP ring avg'])
```

```
%% demo ring top
```

```
figure(420);imshowc(yapimg_bs,0,sqrt(abs(dapiimg_bs)),1);xlabel('DAPI-
```

```
YAP')
```

```
hold on;plot(nucmtx(:,1),nucmtx(:,2),'.w')
```

```
text(nucmtx(:,1),nucmtx(:,2),num2str(round(nucmtx(:,9))), 'color','w')
```

```
title([dispname,' YAP ring top'])
```

```
%% demo watershed all
```

```
figure(440);imshowc(yapimg_bs,dapiimg_watershed==0,sqrt(abs(dapiimg_bs)),1);xlab
```

```
el('DAPI-YAP')
```



```
hold on;plot(nucmtx(:,1),nucmtx(:,2),'.w')
```

```
text(nucmtx(:,1),nucmtx(:,2),num2str(round(nucmtx(:,11))), 'color','w')
```

```
title([dispname,' YAP watershed all'])
```

```
%% demo watershed top
```

```
figure(460);imshowc(yaping_bs,dapiimg_watershed==0,sqrt(abs(dapiimg_bs)),1);xlab  
el('DAPI-YAP')
```

```
hold on;plot(nucmtx(:,1),nucmtx(:,2),'.w')
```

```
text(nucmtx(:,1),nucmtx(:,2),num2str(round(nucmtx(:,12))), 'color','w')
```

```
title([dispname,' YAP watershed top'])
```

```
%
```

```
bigmax=max([nucmtx(:,5);nucmtx(:,8)]);
```

```
figure(480);
```

```
subplot(2,2,1);plot(nucmtx(:,8),nucmtx(:,5),'.');axis([0,bigmax,0,bigmax])
```

```
hold on;plot([0,bigmax],[0,bigmax],':k');hold off
```

```
xlabel('Cytosol');ylabel('Nucleus');title(['YAP ',dispname])
```

```
subplot(2,2,2);plot(nucmtx(:,8),nucmtx(:,5),'.');axis([0,5000,0,5000])
```



```
hold on;plot([0,5000],[0,5000],':k');hold off
```

```
xlabel('Cytosol');ylabel('Nucleus');title(['YAP ',dispname])
```

```
subplot(2,2,3);plot(nucmtx(:,8),nucmtx(:,5)./nucmtx(:,8),'.');axis([0,bigmax,0,5])
```

```
hold on;plot([0,bigmax],[1,1],':k');hold off
```

```
xlabel('Cytosol');ylabel('Nuc / Cyt ratio');title(['YAP ',dispname])
```

```
subplot(2,2,4);plot(nucmtx(:,8),nucmtx(:,5)./nucmtx(:,8),'.');axis([0,5000,0,5])
```

```
hold on;plot([0,5000],[1,1],':k');hold off
```

```
xlabel('Cytosol');ylabel('Nuc / Cyt ratio');title(['YAP ',dispname])
```

```
%%
```

```
%      % curve fitting
```

```
%      % choose area for fitting
```

```
%      figure(500);
```

```
%
```

```
subplot(2,2,1);plot(nucmtx(:,8),nucmtx(:,5),'.');axis([0,bigmax+100,0,bigmax+100])
```

```
%      hold on;plot([0,bigmax],[0,bigmax],':k');hold off
```

```
%      title('Circle the region for curve fitting')
```



```
% [xi,yi]=getpts(gcf);

% hold on;plot([xi;xi(1)],[yi;yi(1)],'r--');hold off

% BW=roipoly(zeros(ceil(bigmax),ceil(bigmax)),xi,yi);

% nuc_num=size(nucmtx,1);

% roiidx=zeros(nuc_num,1);

% for nnn=1:nuc_num

%     roiidx(nnn)=BW(round(nucmtx(nnn,5)),round(nucmtx(nnn,8)));

% end

% subplot(2,2,1);hold on;

plot(nucmtx(roiidx==1,8),nucmtx(roiidx==1,5),'or');hold off

%     %

%

robust_para=robustfit(nucmtx(roiidx==1,8),nucmtx(roiidx==1,5),'talwar');

%     new_bg=robust_para(1)/(1-robust_para(2));

%     fit_nuc=polyval(flipud(robust_para),nucmtx(:,8));

%

figure(500);subplot(2,2,2);plot(nucmtx(:,8),nucmtx(:,5),'.');axis([0,bigmax,0,bigmax]);

%     hold on;plot([0,bigmax],[0,bigmax],':k');hold off

%     hold on;plot(nucmtx(:,8),fit_nuc,'-r');hold off
```

```

%      subplot(2,2,3);plot(nucmtx(:,8)-new_bg,nucmtx(:,5)-
new_bg, '.');axis([0,bigmax-new_bg,0,bigmax-new_bg])

%      hold on;plot([0,bigmax-new_bg],[0,bigmax-new_bg],':k');hold off

%      xlabel('Cytosol');ylabel('Nuc / Cyt ratio');title(['YAP ',dispname])

%      figure(500);subplot(2,2,4);plot(nucmtx(:,8)-new_bg,(nucmtx(:,5)-
new_bg)./(nucmtx(:,8)-new_bg), '.');axis([0,bigmax-new_bg,0,5])

%      hold on;plot([0,bigmax-new_bg],[1,1],':k');hold off

%      xlabel('Corrected cytosol');ylabel('Corrected ratio');title(['YAP
',dispname])

%%%

save([imgfolder,wellname,'_XY',num2str(sitenum)],'nucmtx')

end

end

end

```

