

2014 年臺灣國際科學展覽會 優勝作品專輯

作品編號 090013

參展科別 醫學與健康科學

作品名稱 Cellular Effects of DNA Demethylation
Enzyme TET2 Knockdown

得獎獎項 大會獎：四等獎

就讀學校 臺北市立第一女子高級中學

指導教師 林玟娟、阮麗蓉

作者姓名 靖婕勛、凌卉芸

關鍵字 TET2、cancer、DKK1

作者簡介



我們是靖婕勛(左)和凌卉芸(右)，目前就讀於北一女中數理資優班三年級。高一時毫不猶豫地踏入了生物專研的大門，更有幸進入了阮麗蓉教授的實驗室，從一開始的懵懵懂懂經過教授、學長的拉拔提攜，手把手地教導實驗步驟並激起我們對實驗的熱情與好奇心，最後好不容易完成了這次科展，真的十分感激。

摘要

近年來許多研究指出TET家族應是抑癌基因，然其許多抑癌機制卻尚未明瞭。根據本實驗室未發表的實驗結果，TET2表現量在大多乳癌檢體內較低，且TET2表現量低之病患存活率較差。本研究以Western Blot發現H3k4甲基化量在TET2 knockdown後減少。實驗室microarray結果更發現重要乳癌抑癌基因DKK1在TET2 knockdown後表現量下降。本研究以real-time PCR進一步證實DKK1表現量下降；Western Blot與ELISA結果也顯示DKK1蛋白質在細胞內及培養液中減少。細胞實驗更發現TET2 knockdown及DKK1 knockdown皆導致細胞有更顯著的移行(migration)與增生(proliferation)特性，因此推測DKK1可能為受TET2調控的下游基因。已知DKK1轉譯出之蛋白質能拮抗抑制Wnt/ β -catenin傳遞路徑，因此本研究正在探討TET2是否也調控此Wnt路徑。如證實此假設，將可提出TET2操控DKK1，DKK1調控Wnt路徑，終而影響EMT、癌症轉移的路徑。

Abstract

TET family proteins have been demonstrated as tumor suppressors in the past few years; however the underlying mechanism is unclear. According to our laboratory's unpublished data, TET2 is downregulated in most of the breast cancer specimens observed, and the downregulation correlates with poor patient survival. In the report, we reported downregulation of H3k4 methylations in TET2 knockdown cells. In addition, our laboratory's microarray results indicate that the expression of DKK1, an important tumor suppressor in breast cancer, has changed upon the knockdown. In this report, we confirmed the downregulation of DKK1 gene expression by PCR. Western Blotting results indicate that the expression of DKK1, an important tumor suppressor in breast cancer, has changed upon the knockdown. Western Blotting and ELISA results also show that the secreted protein encoded by DKK1 is downregulated in both TET2 knockdown cell lysate and culture medium. We further discovered that TET2 knockdown and DKK1 knockdown promotes cell migration and proliferation. Therefore, we concluded that DKK1 is possibly a downstream gene of TET2. Since we know that DKK1 encodes a protein that is able to inhibit the Wnt/ β -catenin signaling pathway, we are currently working on whether TET regulates this Wnt pathway like DKK1. If our hypothesis is proved, a brand new pathway of TET2 regulating DKK1, which inhibits the Wnt pathway, and finally affects EMT and cancer metastasis can be confirmed.

壹、研究背景

一、乳癌

世界每年有超過四十萬人死於乳癌，根據行政院衛生福利部101年統計，在國內則是女性好發癌症第一名、死亡率第四名。零期乳癌臨床上分為三類：乳腺管原位癌(Ductal carcinoma in situ, DCIS)、乳小葉原位癌(Lobular carcinoma in situ, LCIS)及柏哲德氏症(Paget's Disease)。其中柏哲德氏症較為罕見；乳小葉原位癌惡性度低，轉變為侵襲性乳癌的機率每年只有1%；然而乳腺管原位癌具有侵襲性、多發性，因此治療需要較為積極。一至二期之乳癌則屬於侵犯性乳癌早期，尚未侵犯乳房附近的組織。第三期腫瘤大於5公分，且多有腋下淋巴結的轉移。第四期乳癌已轉移至遠端器官，如：肝臟(5~15%)、肺臟(15~20%)、骨骼(20~60%)及腦部(5~10%)(Kennecke et al., 2008)。乳癌的治療方法則有：手術、荷爾蒙治療、化學治療及標靶治療。手術一般為必要的治療，包括乳房及腋下淋巴結兩方面。雖然乳房切除手術對初期乳癌相當有療效，對於已有遠處轉移的病患化學治療仍是必要的。化學治療最常使用的藥物有小黃莓、小紅莓和紫杉醇，其效果依序遞增，但副作用也愈來愈強。根據雌激素受體的檢測結果，乳癌可簡單分類為五種亞型：管腔細胞A型(Luminal A)、管腔細胞B1型(Luminal B1)、管腔細胞B2型(Luminal B2)、Her/2neu過度表現型、類基底細胞型(Basal-like)又稱三陰性乳癌(Triple negative breast cancer, TNBR)。管腔細胞A型與B1型的動情激素受體(estrogen receptor, ER)、黃體激素受體(progesterone receptor, PR)呈陽性而第二型人類上皮細胞生長素受體(human epidermal growth factor receptor 2, HER2)呈陰性，佔了乳癌病患中的70%，能夠用荷爾蒙治療法，癒後較佳。管腔細胞B2型ER、PR、HER2皆呈陽性，約佔7.5%，也可使用荷爾蒙治療。Her/2neu過度表現型惡性較高，但是標靶治療的賀癌平(Herceptin)使其治療狀況有好轉。約有15%的病患屬於三陰性乳癌，其基因表現像基底上皮細胞，它的典型表現為ER、PR、HER2皆陰性，故得其名。此類亞型預後極差、容易轉移，必須用化學治療，且病患常帶有BRCA1的基因突變。除了術後所需面對的心理重建與治療所需的龐大費用，病人還需承受其中痛苦的過程。因此找出乳癌發生之導因與能夠有效預防的藥物及篩檢方式

乃是當務之急。

二、癌症轉移 (metastasis) 與上皮-間質轉化過程 (Epithelial-mesenchymal transition, EMT)

癌症轉移分為數個步驟：侵犯 (invasion)、內滲 (intravasation)、外滲 (extravasation) 以及在其他器官增殖 (proliferation)。在侵犯的階段中，癌細胞會鬆開與原位癌母細胞群的連結。內滲則是指癌細胞穿越血管或淋巴管的內皮進入循環系統，而外滲是這些經過循環系統移動的細胞再度穿過內皮達到其他組織的過程。癌症轉移肇因於癌細胞的大量不正常增生促進周遭微血管新生，使原位癌細胞得到充裕養分而得以改變並啟動促使其轉移的訊號途徑。轉移使癌細胞得以擴散至全身，是癌症病患最主要的死因。癌症病例中有 85% 屬於上皮癌，因此上皮細胞塑形 (epithelial plasticity) 的調控與癌症轉移十分相關。

正常的上皮細胞有相當穩定的排列與正常的上皮細胞塑性，當其受到基因失調影響而失去細胞極性 (cell polarity) 與細胞-細胞間附著力 (cell-cell adhesion)，並獲得侵犯及移行 (migration) 能力時，便可能發生癌症轉移，這個過程即稱為上皮-間質轉化 (EMT)。EMT 首先在胚胎發育被發現，與中胚層及神經管的形成有關。EMT 可藉由分子訊號的傳遞 (如 Wnt 路徑) 導致轉錄因子 (如 Snail, Twist) 活化而引起。在過程中，癌細胞會減少上皮細胞間的接觸蛋白 (如 E-cadherin, Claudin-3)，並且轉換成紡錘型的間質細胞型態 (mesenchymal type)，而間質標誌會增加 (如 N-cadherin, Vimentin, Fibronectin)。轉化過的癌細胞將表現大量基質金屬蛋白水解酶 (Matrix metalloproteinases, MMPs)，分解基底膜 (basement membrane)，再進一步穿越細胞外基質 (Extracellular matrix)，內滲進到體內循環系統。

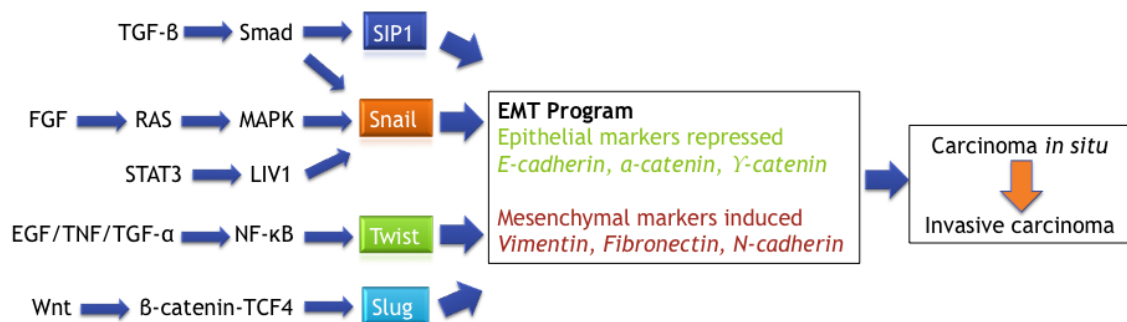
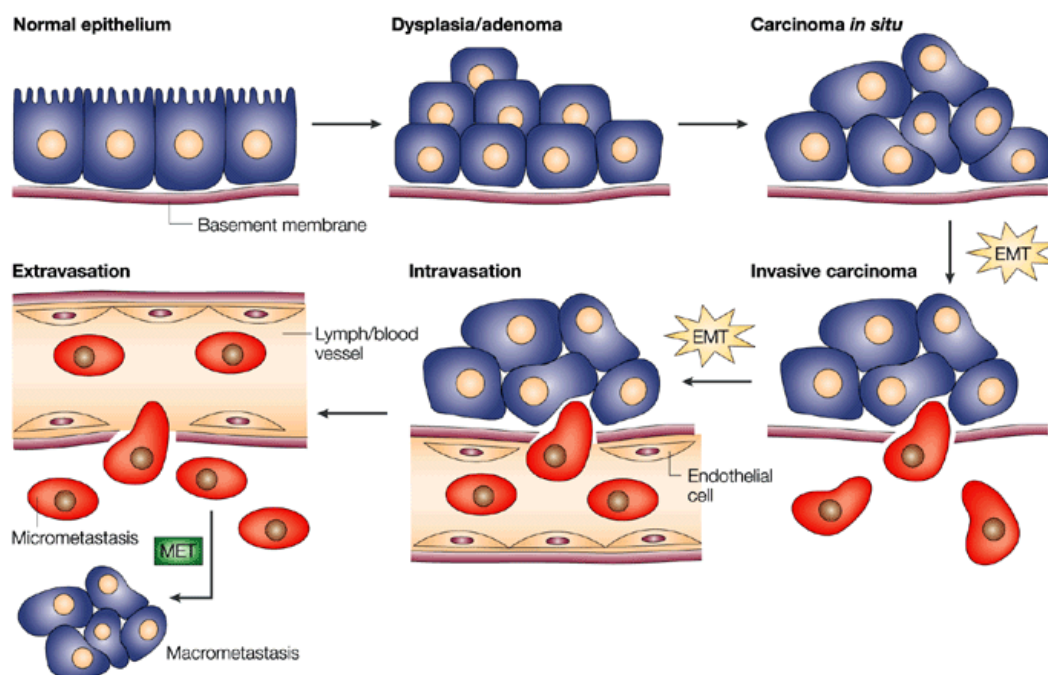


Fig. 1 引發 EMT 的機制



Nature Reviews | Cancer

Fig. 2 EMT 上皮細胞轉化為間質細胞過程示意圖

(Nature Reviews Cancer 2, 2002 June, 442-454)

三、TET(Ten Eleven Translocation)家族蛋白質

TET 家族蛋白質首次被發現是在白血病中，當時尚未明確知道其功能。一直到 2009 年才確認這個蛋白質家族是 DNA 去甲基酶，能夠將 5-甲基胞嘧啶 (5-methylcytosine) 催化為 5-羥基胞嘧啶 (5-hydroxymethylcytosine) (Tahiliani et al., 2009)、5-羧基胞嘧啶 (5-formylcytosine) 以及 5-羧基胞嘧啶 (5-carboxylcytosine) (Ito et al., 2011)，最終驅使鹼基修復機制 (base excision repair reaction)，將整個胞嘧啶移除並換上一個沒有修飾的胞嘧啶。這些發現使得 TET 家族成為近兩年來表觀遺傳學 (epigenetics) 中重要的議題之一，因為在此之前學界只知道存在 DNA 甲基轉移酶 (DNA methyltransferase)，而不能確定 DNA 去甲基酶的存在。另外，近年來也有許多研究指出 TET 家族應是抑癌基因，TET1 已被證實能夠透過活化基質金屬蛋白水解抑制酶而抑制癌細胞的侵犯作用 (Hsu et al., 2012)，然而 TET2 與癌症間的關係尚未明瞭。

五、組蛋白修飾在基因表現調控所扮演之角色

核小體為組成真核生物染色質的基本單位(精子除外)，由 DNA 與 4 對組蛋白複合物組成。在真核細胞中，組蛋白(histone)為組成核小體(nucleosome)的蛋白質(Kornberg and Tomas, 1974)。其種類共有五種: H1, H2A, H2B, H3, H4。其中 2 個 H1 可固定 1 個核小體首尾兩端 DNA，以維持核小體的穩定性(Thoma F, Koller T, Klug A, 1979)。H2A, H2B, H3 和 H4 為構成核小體球形結構域(core histone)的主要原料，每個核小體包含 2 個 H3-H4 二聚體與 2 個 H2A-H2B 二聚體。DNA 雙股螺旋本身進一步纏繞稱為超螺旋。而左手超螺旋又稱正向超螺旋，即 DNA 以左旋方式纏繞組蛋白。147 對鹼基對能夠以左手超螺旋形，纏繞 1 個球形結構域 1.65 圈，不但可以有效減少 DNA 在細胞核中所佔的空間，亦可作為染色體的鷹架(scaffold)以固定 DNA。

由於組蛋白可在其胺基酸上進行轉譯後修飾(Post-translational modification)，進而影響 DNA 的轉錄。例如：賴氨酸(lysine, K)和精氨酸(arginine, R)可以被甲基化(methylated)或乙烯化(acetylated)。絲氨酸(serine, S) 可以被磷酸化(phosphorylated)。H2A 和 H2B 的 C 端尾巴(C-terminal tail，即蛋白質的羧基端)可以被泛素化(ubiquitinated)，其上的賴氨酸可以被 SUMO 蛋白質修飾化(SUMOylated)。在賴氨酸上可以接 1~3 個甲基，精氨酸上則可接 1 個甲基或 2 個對稱或不對稱的甲基。

其中最受廣泛研究的便是 H3 和 H4 賴氨酸上的乙烯化和甲基化。由於賴氨酸帶正電，DNA 帶負電，兩者會互相吸引。因此當賴氨酸被乙烯化後，其上的正電荷減弱，便失去了和 DNA 的吸引力(Hong et al., 1993; Clayton et al., 2006)。兩者纏繞的緊密程度降低，RNA 聚合酶(RNA polymerase)及其他轉錄因子便可進入其間空隙進行轉錄(Wang et al, 2008)。相對而言，由於甲基不帶電，因此無論帶幾個甲基或不帶甲基，賴氨酸皆帶正電。事實上，真正影響組蛋白甲基化與 DNA 轉錄功能之間關係的是某些特定的蛋白質。這些特定蛋白質針對不同甲基化數量的賴氨酸而接上不同種的蛋白質，進而造成同一個賴氨酸因甲基數量不同造成截然不同的功能(Li et al, 2006; Taverna et al, 2007)。例如：部分組蛋白甲基化會造成 DNA 轉錄功能被活化，另外一些則會抑制轉錄(見表一)。因此，組蛋白修飾被視為是表觀遺傳學上重要的研究項目。

表一 組蛋白修飾對DNA轉錄之影響

Type of modification	Histone						
	H3K4	H3K9	H3K14	H3K27	H3K79	H3K36	H4K20
me1	+	+		+	+		+
me2		-		-	+		
me3	+	-		-	+	+	
acetylation		+	+	+			

me1=mono-methylation; me2=di-methylation; me3=tri-methylation
+=activating modification; -=repressive modification

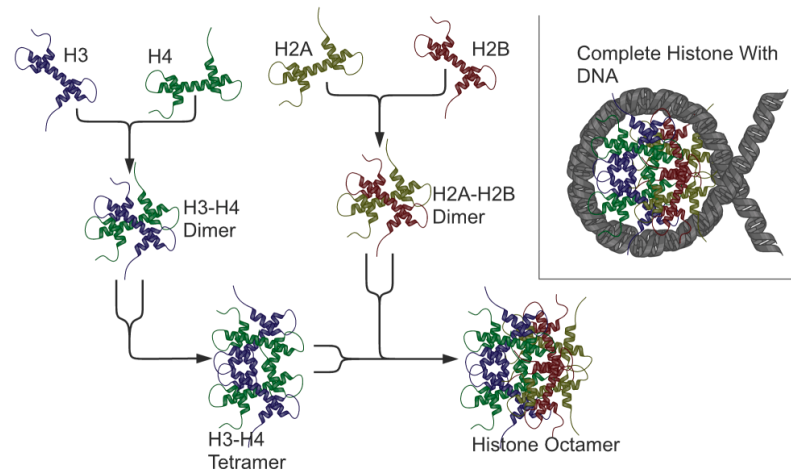


Fig. 5 核小體及超螺旋示意圖。

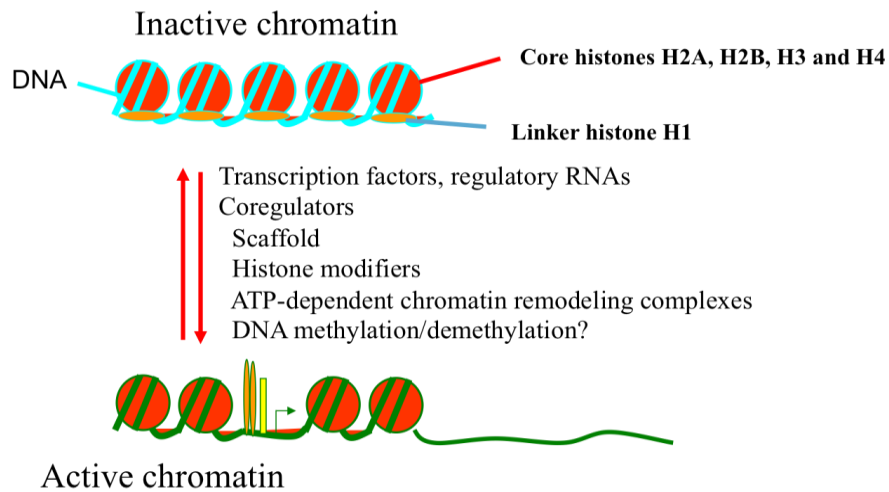
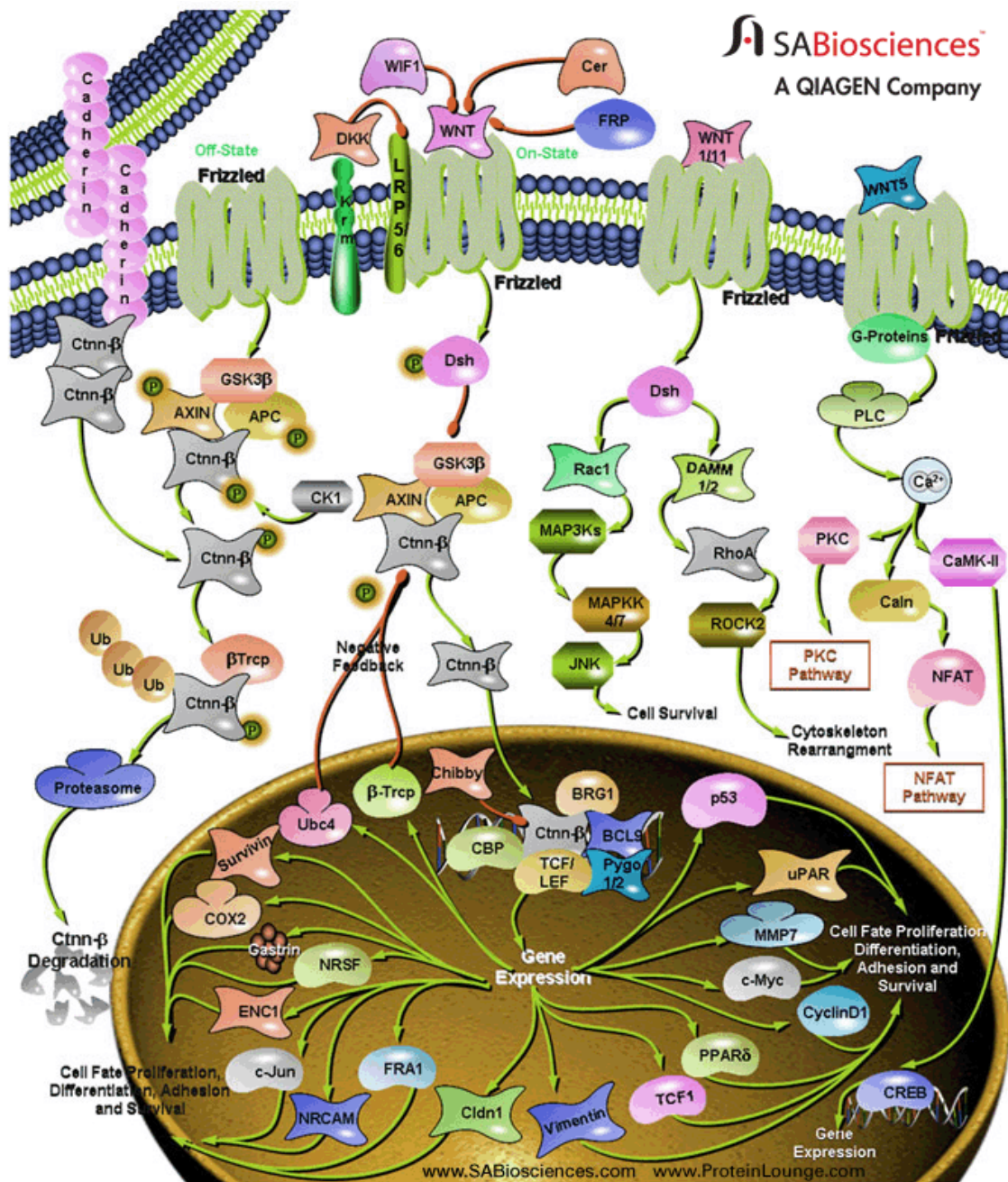


Fig. 6 DNA 與組蛋白之關係示意圖

六、抑癌基因 DKK1 與 Wnt/ β -catenin 訊息傳遞路徑(Wnt/ β -catenin signaling pathway)

Wnt 信息路徑由能將細胞外訊息轉導入細胞內的蛋白質配體(protein ligands)所構成，所有路徑能被分成：典型 Wnt/ β -catenin 路徑(canonical Wnt/ β -catenin pathway)、非典型 Wnt/鈣離子路徑(noncanonical Wnt/calcium pathway)以及非典型平面細胞極性路徑(noncanonical planar cell polarity (PCP) pathway)三種。決定是否為典型路徑的因素在於轉導時是否涉及 β -catenin 蛋白質。Wnt 路徑被發現與胚胎發育以及癌症的發生有關，受其影響的生理機制有：體軸的形成(axis patterning)、細胞分化(cell fate specification)、細胞增生(cell proliferation)、細胞移行(cell migration)等。其中，Wnt/ β -catenin 路徑一般在體內不被活化，當其被活化時常引發腫瘤生成與 EMT 而導致癌症惡化及轉移。Wnt/ β -catenin 路徑在不被活化的情況下， β -catenin、APC (adenomatous polyposis coli)、鷹架蛋白(scaffold protein) Axin1、Axin2 會被磷酸化(phosphorylated)，而 β -catenin、GSK3 β (glycogen synthase kinase 3 β)、CK1 (casein kinase 1)、APC 會組合到 Axin 上，形成複合體。 β -catenin 此時會被 β -TrCP(β -transducin repeat containing protein)辨認，並被其泛素化，最後被蛋白酶 26S proteasome 降解。當 Wnt/ β -catenin 路徑被活化時，Wnt 蛋白質配體會與細胞膜上蛋白質受體 Frizzled 及 LRP(lipoprotein-related protein)結合，使其活化而被 GSK3 β 與 CKI 磷酸化而穩定 β -catenin。此時， β -catenin 在細胞質穩定的累積，並和 TCF(T-cell factor)/LEF(Lymphoid Enhancer Factor)家族轉錄因子結合，進入細胞核啟動多個目標基因：Slug、c-myc、MMP7 等。

抑癌基因 DKK1 全名為 dickkopf 1 homolog，其轉譯出的分泌性蛋白質會抑制 Wnt/ β -catenin 路徑(Niida et al, 2004)。已知在 Wnt/ β -catenin 路徑中，Wnt 蛋白質配體會與細胞膜上蛋白質受體 Frizzled 及 LRP 結合，而使路徑活化。DKK1 會與 LRP5/6、另一個蛋白質受體 Kremen 結合，而促使細胞發生內吞作用(endocytosis)，將 LRP5/6 從細胞膜上移除。此一步驟使得 Wnt 蛋白質配體無法與 LRP5/6 結合，進而達到抑制 Wnt/ β -catenin 路徑與其所引發的細胞癌化、EMT 發生過程。



(http://www.sabiosciences.com/pathway.php?sn=WNT_Signaling)

Fig.7 Wnt 訊息傳遞路徑示意圖(左至右依序為：不被活化的 Wnt/ β -catenin 路徑、不被活化的 Wnt/ β -catenin 路徑、非典型平面細胞極性路徑、非典型 Wnt/鈣離子路徑)

貳、研究動機及目的

根據實驗室先前的結果，TET2 在乳癌樣本內的表現量大幅降低，而且其降低幅度與病患存活率有負相關。為了模擬乳癌樣本中 TET2 的低表現量，我們採用 knockdown 的技術使正常乳房上皮細胞 M10 之 TET2 表現量降低，並觀察其是否有癌化的表現。實驗室 cDNA 微陣列(microarray)有效結果(P value<0.05, log base 2 fold change>2 or <-2)顯示有已知乳癌抑制基因 DKK1 的表現量下降與許多新基因(novel gene)的表現量改變。實驗室尚未發表之結果也顯示 TET2 knockdown 使細胞的侵犯(invasion)與遷徙(migration)能力增強。因此，我們的目標為確認 TET2 knockdown 所導致表現量改變之基因是否為促使 TET2 knockdown 細胞癌化的下游基因。

本研究的主要目的可分為兩大部分：

一、觀察 TET2 knockdown 是否導致：

1.組蛋白修飾改變

組蛋白修飾是表觀遺傳學中調控基因表現的方法之一，因此我們以西方墨點法(Western Blotting)的技術了解 TET2 是否可能透過影響組蛋白修飾的方式改變基因表現。

2.基因表現改變

由於 cDNA 微陣列的結果較為粗略而不盡可信，以即時聚合酶鏈式反應(real time PCR)再次確認表現量改變的基因是必要的。

3.細胞內或分泌性蛋白質改變

除了基因的層級，我們也以西方墨點法確認表現量改變之基因所轉譯的蛋白質量在細胞總蛋白質萃取液(total cell lysate)或培養液中是否隨之改變。

二、了解 TET2 knockdown 所導致表現量改變之基因 knockdown 是否造成細胞癌化

選取與乳癌可能相關且 knockdown 後變化量大的基因、TET2 本身和對照組一同進行細胞癌化之實驗，如：侵犯(invasion)、遷徙(migration)與增殖(proliferation)。

參、實驗材料及方法

一、細胞株與細胞培養

(一) 細胞株

本研究所採用的細胞株為 M10 人類正常乳房上皮細胞，購自生物資源保存中心(Bioresource Collection and Research Center, BCRC)。M10 是由經過輻射與曾經苯并蒽(Benzo[a]pyrene)處理而存活下來的母細胞株 H184B5 培養而來，因此得以無限複製而不死亡，卻又不具其他癌細胞特性。M10 屬於貼附型細胞株，培養於 90%基本培養液(alpha-Minimum essential medium)加上 10% 胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)中。

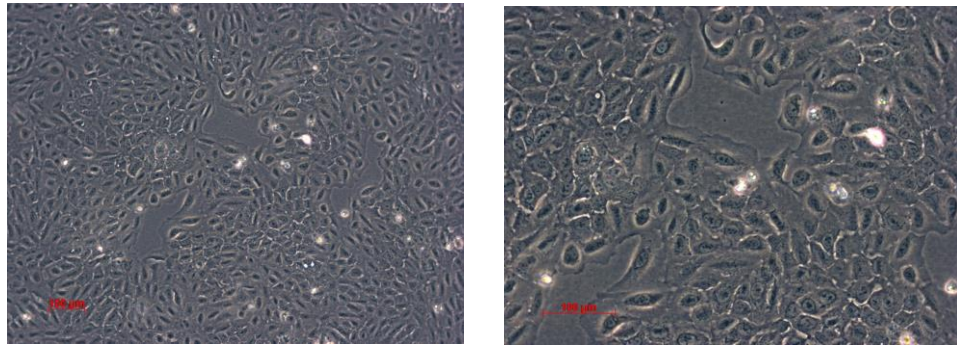


Fig. 8 人類乳房上皮細胞 M10。

(二) 細胞培養

1. 將細胞培養於 10 公分培養皿(10 cm dish)中，待其長至八分滿。
2. 吸掉培養液，並加入 10ml 的 1X PBS 緩衝液輕微搖晃洗淨殘餘的培養液。
3. 吸乾 PBS 緩衝液後，加入 1ml 的 trypsin-EDTA 並放入培養箱約 5 至 10 分鐘，使細胞懸浮。
4. 加入 9ml 的培養液中和 trypsin-EDTA，視細胞密集度而彈性取 0.5ml 的細胞稀釋液至另一已裝有 4.5ml 培養液的培養皿。
5. 自剩餘的細胞稀釋液抽取 12 μ l，由載玻片凹槽加至四宮格蓋玻片與載玻片間，並拿到顯微鏡底下以計數器計算平均細胞數目。
6. 根據所數細胞數計算細胞稀釋液的濃度，若符合所需則拿回 5%二氧化碳、37°C 的培養箱中培養。

7. 若細胞濃度有需調整，則以離心機在 300 重力加速度(g)離心 5 分鐘後 酌量調整上層培養液的量，再以微量分注器(pipette)將細胞與培養液均勻混合，使細胞重新懸浮。

二、Knockdown 與 siRNA(small interfering RNA)

(一)細胞培養

1. 同第一大點之第(二)小點細胞培養步驟 1.到 4.，並於前一天先將適量 M10 細胞種於培養皿中。
2. 隔天以顯微鏡確認使用時細胞密度約 30%~50%。

(二)加入 siRNA

1. 充分混合適量的磷脂質轉染試劑(liposome transfection reagent)及目標基因之 siRNA，於室溫反應約 20~30 分鐘。
2. 將步驟 1.的混合液加入細胞培養皿中，使 siRNA 最後濃度為 40nM。
3. 將培養皿放回培養箱中培養 48 小時，使 siRNA 與目標基因之 mRNA 結合，而抑制基因轉譯。

(三) 確認轉染(transfection)效率

1. 萃取細胞的 mRNA，並反轉錄成 cDNA(此步驟於第四大點第(一)、(二)小點會詳細介紹)。
2. 以即時聚合酶鏈式反應(real time PCR)結果計算其 scramble 組與 knockdown 組的表現量，進而確認其轉染效率(此步驟於第四大點第(三)小點會詳細介紹)。

三、蛋白質凝膠電泳分析(SDS-PAGE, SDS-polyacrylamide gel electrophoresis)及西方墨點法(Western Blot)

(一)蛋白質定量

1. 將濃度為 1 μ g / μ l 的 BSA 溶液各取 0,2,4,8,10 μ l，加入 1 ml 稀釋液(水: Bio-Rad Dye Reagent=4:1)中，製成 BSA 濃度為 0,2,4,8,10 μ g /ml 的蛋白質標準溶液。

2. 取待測濃度的經 TET2 knockdown 處理以及經 scramble siRNA(後文皆稱 "scramble 組")處理之 M10 細胞總蛋白質萃取液或經濃縮之培養液 1 μ l 加入 1 ml 稀釋液中，製成待測溶液。(本實驗所使用之總蛋白質萃取液由中研院基因體研究中心阮麗容實驗室所提供)
3. 將步驟 1.之蛋白質標準溶液及步驟 2.之待測溶液逐一放入感光容器，並以核酸暨蛋白質分光測定儀測定各溶液吸光值的相對值。
4. 使用 Excel 計算 BSA 濃度與吸光值之間的最適直線公式，再將待測溶液之吸光值帶入以求其濃度。
5. 以膠體電泳染劑(lysis buffer: sample buffer=5:1)將各管蛋白質溶液稀釋至 2 μ g/30 μ l 待電泳時使用。

(二) SDS-PAGE 凝膠製備

1. 固定兩片製膠用玻璃板，並於其間注入解析凝膠(resolving gel) 至八分滿(濃度視欲觀察蛋白質大小而定)，並注入乙醇使膠體的上部平整，並待其凝固。
2. 倒掉乙醇，並將 5%的積層凝膠(stack gel) 注入玻璃板至全滿，接著插上齒梳，待其凝固。

(三) 電泳

1. 經定量後的蛋白質溶液加熱至 95 $^{\circ}$ C，10 分鐘，使蛋白質變性。
2. 將夾有 SDS-PAGE 的玻璃板固定於電泳槽內，並於槽內注滿 1x Running buffer。
3. 拔掉齒梳。於兩側 well 內注入 marker，剩餘各 well 內加入步驟 1.之蛋白質溶液 30 μ l。
4. 於電泳槽內通入電流，將電壓設為 80V。待蛋白質皆通過集焦凝膠後，可將電壓增至 120V。待兩側 marker 完全分離即可停止電泳。

(四) 轉漬

1. 割除聚焦凝膠，將解析凝膠製成轉漬用「三明治」(sandwich)夾板，如下圖所示。

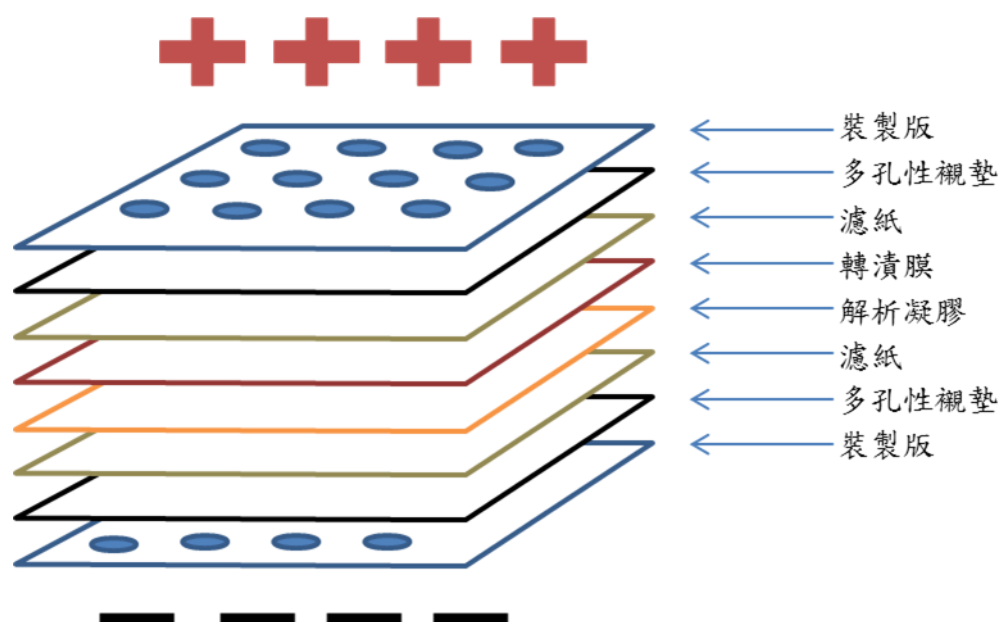


Fig. 9 轉漬「三明治」排列示意圖

2. 將「三明治」放入轉漬槽，並注滿 Transfer buffer，置於冰桶內。
3. 通入 200mA 電流 2.5 個小時
4. 將轉漬膜取出，以 TBS-T (20 mM Tris-base、137 mM Sodium chloride、1M Hydrochloric acid、0.01 % Tween-20)洗淨轉漬膜(membrane)。
5. 將轉漬膜浸泡於blocking buffer(5%脫脂牛奶，溶劑為TBS-T)中，至於搖擺震盪器(shaker)上1小時。
6. 取出轉漬膜，放於資料夾內，並以blocking buffer將欲觀察組蛋白修飾的一級抗體稀釋1000倍，並滴於轉漬膜上後靜置1小時。
7. 取出轉漬膜，浸於 TBS-T 溶液內，並放置在數位顯示迴旋式震盪混合器(orbital shaker)上 5 分鐘。重複此步驟三次。
8. 將與一級抗體相對應的二級抗體以 blocking buffer 為溶劑稀釋 5000 倍，並將轉漬膜浸於其中 1 小時。
9. 同步驟 7.，但沖洗五次。

10. 以 1:1 的比例混合 HRP Substrate Peroxide Solution 和 HRP Substrate Luminol Solution 滴於轉漬膜上後，用生物分子成像儀 LAS 4000 拍攝轉漬膜上欲觀測之蛋白質所發出的冷光影像。

(五) 確認欲觀測蛋白質的原始量

1. 以自來水洗淨轉漬膜後，將轉漬膜浸於一抗二抗去除液(stripping buffer)，放入 65°C 恆溫箱中 15 分鐘。
2. 取出恆溫箱後，於數位顯示迴旋式震盪混合器上搖晃 15 分鐘
3. 重複上一點(5)~(10)步驟，所使用的一級抗體改為欲觀測組蛋白或 GAPDH 的抗體(例:若上個步驟所染的一級抗體為 H3 上的修飾，則此步驟所染的一級抗體便為 H3 本身；若上步驟染的一級抗體為一般細胞內蛋白質，此步驟便染 GAPDH)

(六) 定量及數據標準化

1. 將所得的冷光影像利用軟體 ImageJ 定量，得到各組樣本的發光量數值。
2. 把組蛋白修飾量(如 H3k4me1)除以組蛋白原始量(如 H3)或目標蛋白質(如 DKK1)除上 GAPDH 後，將已經隨機排列(scramble)siRNA 處理的樣本訂為 1，便可算出經 knockdown TET2 的樣本之組蛋白修飾量相對於未 knockdown TET2 樣本之組蛋白修飾量的倍數，得到標準化之數據。

四、即時聚合酶鏈式反應(Real-time PCR, Real-time polymerase chain reaction)

(一) mRNA 萃取

1. 自培養箱取出 M10 細胞，並吸去培養液，加入 PBS 緩衝液輕晃，以洗淨殘餘培養液。
2. 抽乾 PBS 緩衝液後，Buffer RLT、B-me 以 100:1 所組成的溶液每盤取 350µl 加入，使細胞破裂。
3. 加入 lysis buffer 後刮下已破裂的細胞，加至 QIA Shredder mini column 離心 1 分鐘，轉速 1200rpm。

4. 將離心完的細胞液加至 gDNA Eliminator spin column 離心 30 秒，轉速相同。
5. 將離心後澄清液加 70%酒精 350 μ l，並混合均勻
6. 將細胞液連著酒精全部加入 RNeasy spin column，再離心 30 秒，轉速相同。
7. 去除濾液，並加入 buffer RW1 700 μ l，離心相同的時間與轉速。
8. 加入 buffer RPE 500 μ l 後，離心 2 分鐘
9. 加入 25 μ l RNase-free water，離心 1 分鐘後取出濾液

(二) 計算濃度

1. 使用 nanodrop1000 測出濾液的 RNA 濃度
2. 將 4 μ g 的 RNA 加入 PCR 用試管，並補入 RNase Free dH₂O 至 12 μ l

(三) 反轉錄

1. 於試管中加入 1 μ l 核苷三磷酸(deoxyribonucleotide;dNTPs)(每種 10mM),1 μ l 濃度為 500 μ g/ml 的 T 重複寡核苷酸(Oligo(dT))
2. 放入聚合酶反應器(PCR thermocycler)加熱至 60 $^{\circ}$ C 5 分鐘後，取出試管放至冰上
3. 於試管中加入1 μ l二硫蘇糖醇(dithiothreitol；DTT)，1 μ l SuperScript III反轉錄酶，4 μ l 5X First-Strand Buffer (250 mM Tris-HCl，室溫pH 8.3；375 mM KCl；15 mM MgCl₂)
4. 放入聚合酶反應器加熱至 42 $^{\circ}$ C 45 分鐘、99 $^{\circ}$ C 5 分鐘、4 $^{\circ}$ C 5 分鐘後，拿出放至冰上。

(四) 定量聚合酶鏈鎖反應(Real-time PCR)

1. 將每個 well 加入目標基因的 forward primer 及 reverse primer 各 0.1 μ l，10 μ l Fast SYBR[®] Green Master Mix，7.8 μ l RNase Free dH₂O
2. 將 scramble 組的 cDNA 分裝成濃度為 100%、10%、1%的三管溶液

3. 如 Fig.將上述 100% scramble 組的 cDNA 各加 2 μ l 至 2-B、C、D；10 倍稀釋液各加 2 μ l 至 3-B、C、D；100 倍稀釋液各加 2 μ l 至 4-B、C、D；knockdown TET2-1 的 cDNA 各加 2 μ l 至 5-B、C、D；knockdown TET2-2 的 cDNA 各加 2 μ l 至 6-B、C、D
4. 加完後，以透明膠封口，並以轉速 2000rpm，室溫離心 3 分鐘
5. 將 multiwell plate 放入 Real-time PCR thermal cycler 加熱(pre-incubation 95 $^{\circ}$ C 10 分鐘、amplification 95 $^{\circ}$ C 10 秒，60 $^{\circ}$ C 10 秒，72 $^{\circ}$ C 7 秒，重複 43 次、melting curve 95 $^{\circ}$ C 5 秒，70 $^{\circ}$ C 15 秒，再以 95 $^{\circ}$ C 持續加溫、cooling 40 $^{\circ}$ C 30 秒)
6. 以其 cp 值換算出此基因在 scramble 組與 TET2 knockdown 組之間 cDNA 量的相對值。

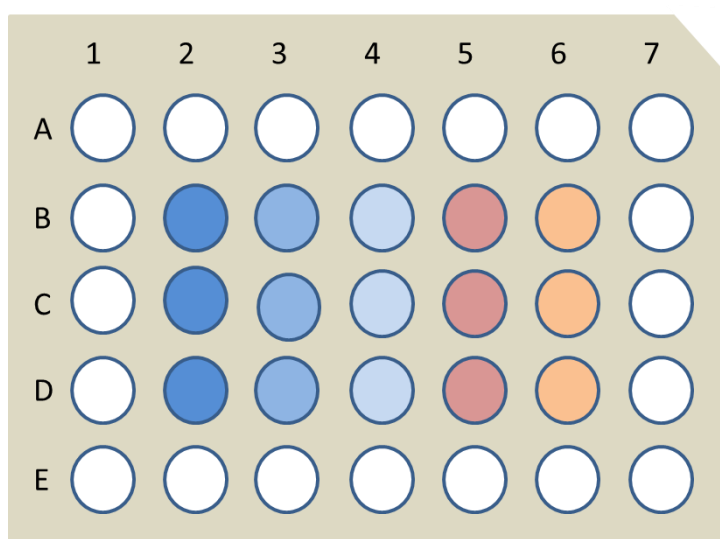


Fig. 10 Real-time PCR multiwell plate 示意圖

Gene Name	Primer Sequence (5' to 3')
NEK3 Forward	GAC ATC TGG TCC TTG GGT TGC A
NEK3 Reverse	ATG AGA CGG CAG TGG ACT GAT G
GRB10 Forward	AGG ACA CAG CAC TGG TTT CAC G
GRB10 Reverse	TCT GGC TGT CAC GGA GGA GAAA
DKK1 Forward	GGT ATT CCA GAA GAA CCA CCT TG
DKK1 Reverse	CTT GGA CCA GAA GTG TCT AGC AC
MAL Forward	CCA TCA CGA TGC AAG ACG GCT A
MAL Reverse	AGA ACA CCG CAT GGA CCA CGT A
TMEFF1 Forward	CTC CAA GTG TGG ACC CTG CAAA
TMEFF1 Reverse	GGA ACT CCC ATC AGA AGC ACA C
DHTKD1 Forward	GGA CGG AAT CAA GCT AGA CTG G
DHTKD1 Reverse	CCT CTG ACT GAA AGT TCC ACG AC
ANKRD2 Forward	GAT CCA GAA CCT CAT CGA GCT G
ANKRD2 Reverse	TCA GGA AGG TCT CCT CAT CCA C
CORO1C Forward	AGA GAA CTG CAC GGT CAT GGT A
CORO1C Reverse	CCT GCA CTA AGA AGC ACA TTG CG
HSDL2 Forward	AGT GCT GCA GTG GAG AAA GCC A
HSDL2 Reverse	TAG GTG CCT CTG GTG TTC ACG T
HEXB Forward	GAT CCA TTG TCT GGC AGG AGG T
HEXB Reverse	GGA AGC CAG ATG CTG TGA CTC T

Fig. 11 實驗使用之引子(primers)序列

五、酵素免疫分析法(Enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)

(一)收取細胞培養液

1. 自培養箱中取出細胞培養皿，並將上層培養液吸取至試管中。
2. 將試管以 300g 離心 5 鐘。
3. 將上層澄清培養液吸取至另一試管中保存在-20℃冰箱中，待要實驗時取用。

(二)濃度配製及蛋白質貼附

1. 將收取的 scramble 組與 TET2 knockdown 組細胞培養液配置成原濃度，以及以乾淨細胞培養液稀釋 2、4、8、16、32 倍的溶液分別加入 96 孔盤中各 50μl (如 Fig. 12 所示)。並再於三格加入各 50μl 乾淨細胞培養液當作對照組。
2. 將孔盤放入 37℃ 培養箱中 2~3 小時，待其蛋白質貼於孔盤底部。

(三)酵素免疫分析法

3. 吸乾上層培養液，以 TBS-T 加入孔盤清洗後立即吸乾。
4. 以適量乾淨細胞培養液稀釋欲觀測蛋白質的一級抗體(濃度視蛋白質種類而異)，每格加入 100μl 後於室溫靜置 2 小時。

5. 重複三次以 TBS-T 清洗孔盤並立即吸乾之動作。
6. 以乾淨細胞培養液稀釋相對應的二級抗體 5000 倍，每格加入 100 μ l 後於室溫靜置 1 小時。
7. 重複三次以 TBS-T 清洗孔盤並立即吸乾之動作。
8. 加入 TMB 顯色液(Tetramethylbenzidine)每格 100 μ l 後，以多功能光度計 (Multilabel Counter)測其吸光值。

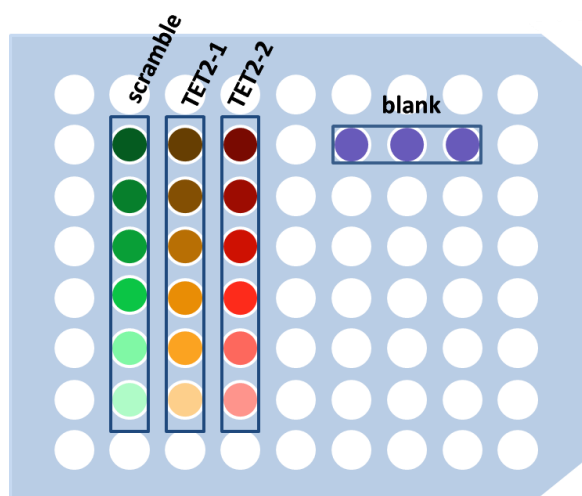


Fig. 12 ELISA 96 孔盤配置示意圖。

六、Migration Assay

(一) 計算細胞濃度

1. 將細胞培養於 10 公分培養皿(10 cm dish)中，待其長至八分滿。
2. 吸掉培養液，並加入 10ml 的 1X PBS 緩衝液輕微搖晃洗淨殘餘的培養液。
3. 吸乾 PBS 緩衝液後，加入 1ml 的 trypsin-EDTA 並放入培養箱約 5 至 10 分鐘，使細胞懸浮。
4. 加入 4ml 的培養液中和 trypsin-EDTA。
5. 自細胞稀釋液抽取 12 μ l，由載玻片凹槽加至四宮格蓋玻片與載玻片間，並拿到顯微鏡底下以計數器計算平均細胞數目(1 格 0.1 μ l)。
6. 計算細胞濃度，並配製每 80 μ l 含 40000 個細胞的溶液 400 μ l。

7. 若細胞濃度不夠，則以 300g、5 分鐘離心，吸掉上層液體再加入適量培養液

(二) 細胞培養

1. 將 stoppers 放在 well 上，每格加入 80 μ l 的細胞稀釋液，使其鋪滿底部。
2. 將培養皿拿回培養箱放隔夜，使細胞貼附於盤底。

(三) 觀察細胞遷徙量

1. 確認細胞貼附完成後，取下 stoppers，每格加入 1.5ml 的培養液，再放回培養箱培養兩小時
2. 自培養箱取出培養皿，將 stoppers 所造成之「傷口」(wound)拿於顯微鏡下拍照，再把細胞放回培養箱中培養。
3. 每隔三小時，視情況連續一至兩天，於顯微鏡下拍照記錄細胞遷徙量。

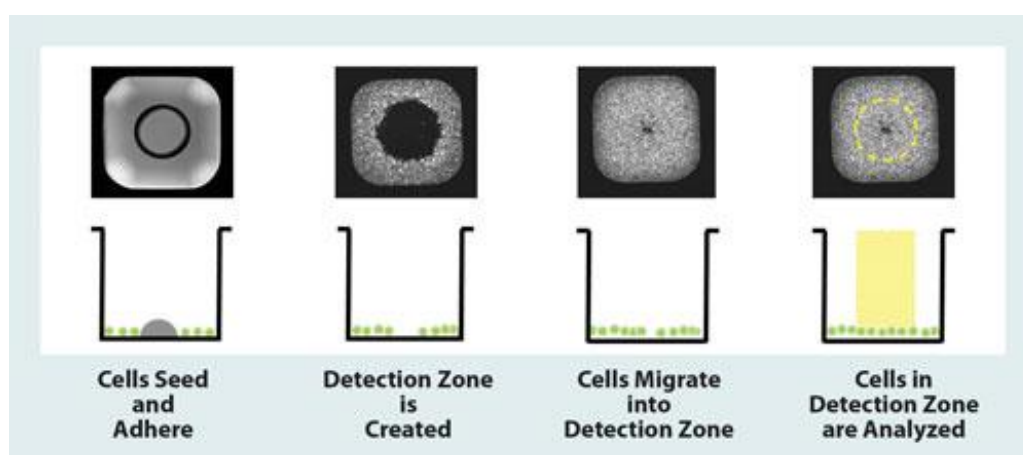


Fig. 13 Migration assay 示意圖

(<http://www.genengnews.com/gen-articles/cell-migration-assay-for-hts-and-hca/3585/>)

七、MTS Assay

(一) 計算細胞濃度

1. 同第六大點 Migration Assay 第(一)小點步驟(1)~(5)
2. 計算細胞濃度，並配製每 100 μ l 含 5000 個細胞的稀釋液 2 ml

(二) 細胞培養

1. 於 MTS assay 96 孔盤加入細胞稀釋液每格 100 μ l，共做 4 盤
2. 將 96 孔盤放回培養箱中培養 6~8 小時

(三) 計算細胞增生量

1. 配製培養液、MTS tetrazolium salt (5:1)的溶液
2. 拿出一盤培養皿，並抽乾細胞培養液，每格加入步驟(1)之溶液 100 μ l
3. 將 96 孔盤拿回培養箱中培養 2 小時後，以 490nm 測試波長測定細胞吸光值(Optical density, O.D)。
4. 每天固定時間取一盤、連續四天，重複步驟(1)~(3)觀察細胞增生率

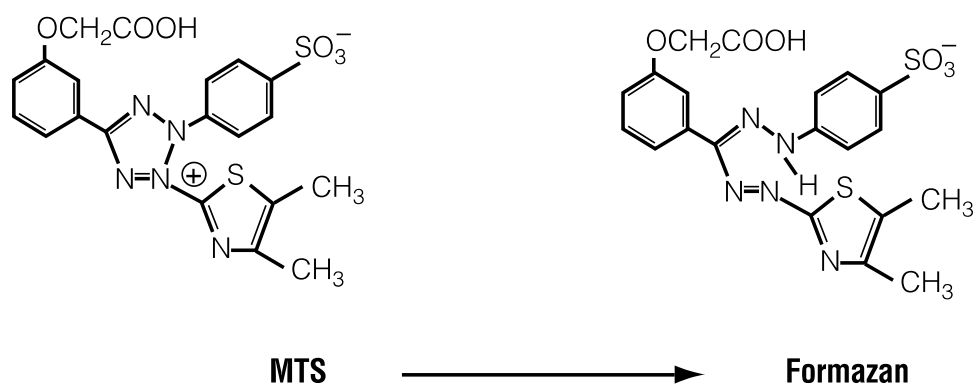


Fig. 14 MTS tetrazolium salt 與其 formazan 產物。

肆、研究結果

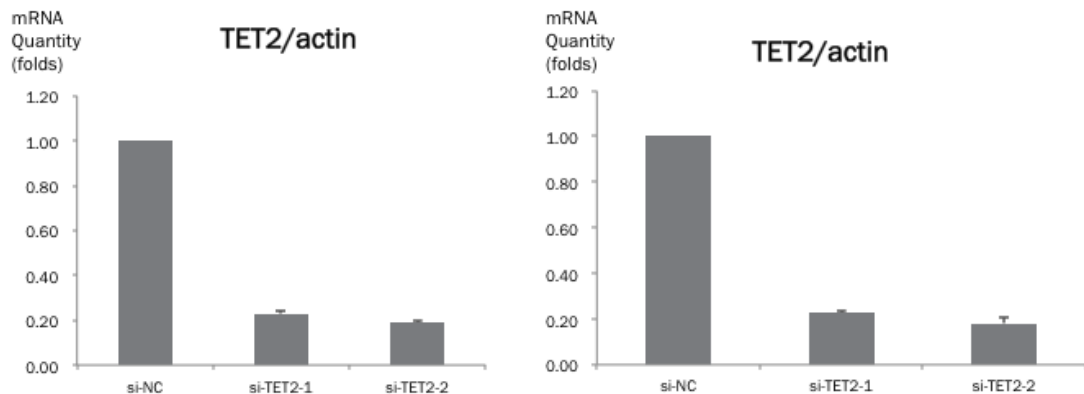


Fig. 15 一切實驗結果以 TET2 knockdown 為根據。此圖顯示非細胞實驗中使用的兩批 M10 細胞之 TET2 基因確實在 knockdown 後表現量下降。

一、TET2 knockdown 導致 H3k4 組蛋白修飾量下降

首先以西方墨點法觀測 TET2 knockdown 後 M10 細胞組蛋白萃取液之修飾改變。Scramble 為加入非編碼之隨機排列 siRNA 的對照組。TET2-1 與 2-2 分別為加入 TET2 基因不同片段 siRNA 的實驗組。H3 internal control 為誤差控制組，顯示所有 histone 3 的量。經由吸光度測定軟體 ImageJ 定量分析後，再將對照及 TET2 knockdown 實驗組的吸光度數值除上誤差控制組的數值，以消弭最初的濃度誤差，得到下表的結果。我們發現 TET2 knockdown 後 H3K4me1、H3K4me2、H3K4me3 均有量減少的趨勢。

由於 H3K4 的甲基化已知屬於活化基因的組蛋白修飾 (activating modification)，當其表現降低時，多意味著大部份基因的表現量將降低。這項發現符合實驗室先前的 DNA 微陣列結果 (microarray)，其中表現量明顯 (即 P-Value < 0.05，fold change < 2) 上升的基因 (3 個) 約只有表現量明顯下降的基因 (25 個) 的八分之一。因此我們推論 H3k4 甲基化修飾量的減少可能為 TET2 knockdown 後影響基因表現的管道之一。

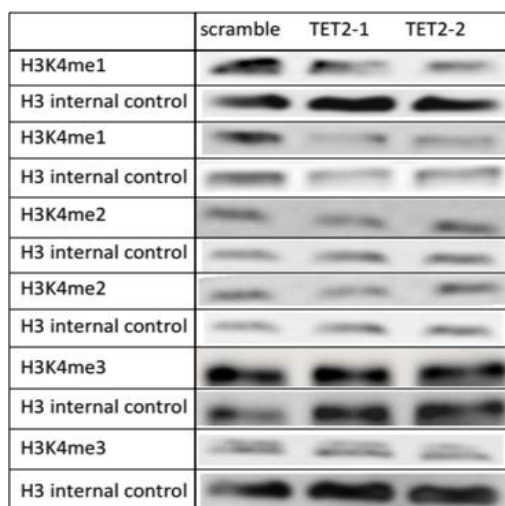


Fig. 16 以西方墨點法探討 TET2 knockdown 對 H3K4 組蛋白修飾之影響。「H3」指第三號組蛋白(histone 3)，「K」指修飾所接在的胺基酸離胺酸(lysine)，「4」指胺基酸的位置，「me」指甲基化(methylation)，最後的數字則是甲基的個數。

表二 軟體 ImageJ 定量顯示 H3K4 的組蛋白修飾於 TET2 knockdown 後量減少。

	Scramble	TET2-1	TET2-2
H3K4me1	1	0.3712	0.3170
H3K4me1	1	0.7008	0.6970
H3K4me2	1	0.5504	0.8484
H3K4me2	1	0.5381	0.8615
H3K4me3	1	0.7327	0.5611
H3K4me3	1	0.5280	0.4623

二、TET2 knockdown 影響抑癌基因 DKK1 表現

實驗室先前 DNA 微陣列(microarray)結果(P-Value<0.05，fold change<-2)已指出 DKK1 基因在 TET2 knockdown 之後表現量大幅下降(見表)。此一結果我們於 knockdown 後兩天半取細胞的 mRNA 以即時聚合酶鏈式反應(real time PCR)分析 DKK1 之 mRNA 加以證實(見 Fig. 17)。DKK1 已確定為乳癌中的抑癌基因，能夠透過抑制 Wnt/ β -catenin 訊息傳遞路徑(Wnt/ β -catenin signaling pathway)而抑制細胞癌化的發生。由於 TET2 被發現在乳癌腫瘤檢體當中表現量大都較低，此結果顯示了 TET2 表現量減少而使 DKK1 表現量也降低，可能為 TET2 影響乳癌發生的機制之一。

表三 DNA 微陣列(microarray)結果顯示，TET2 knockdown 後 DKK1 的表現量下降。

Gene	Full name	Fold Change (log2)
DKK1	dickkopf 1 homolog	-2.269

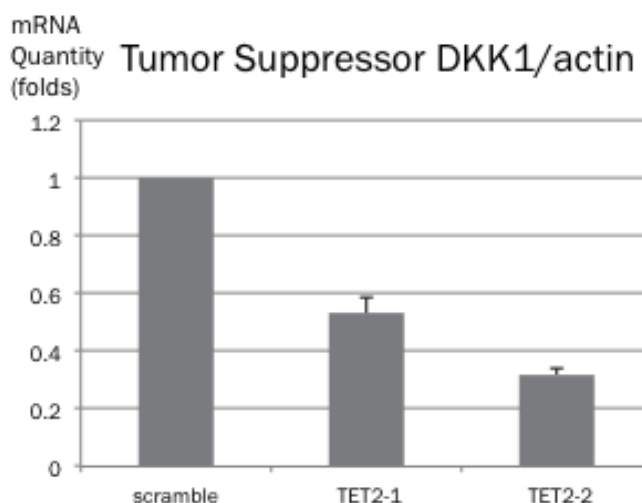


Fig. 17 Real time PCR 結果進一步證實 DKK1 在 TET2 knockdown 後表現量下降。

三、TET2 knockdown 減少細胞蛋白質 DKK1 之表現

根據西方墨點法(Western Blot)與酵素免疫分析法(ELISA)的結果，我們證實 DKK1 在 TET2 knockdown 後不只在細胞內 mRNA 的層級表現量降低，在細胞內及細胞培養液內的表現量也降低。然而，ELISA 的實驗並非購買廠商出產的 ELISA kit，因此只有高濃度的濃縮培養液才有較精準的數據。

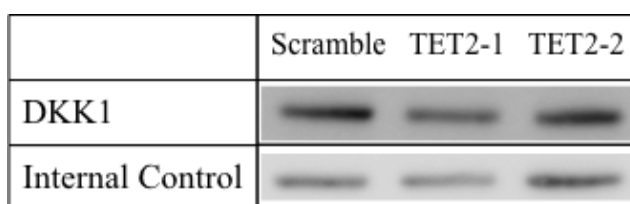


Fig. 18 由西方墨點法可看出，TET2 knockdown 後 DKK1 在細胞內表現量降低。

表四 此為 Fig. 以 ImageJ 定量分析再扣除原始濃度誤差後的結果。

Scramble	TET2-1	TET2-2
1	0.7722	0.5764

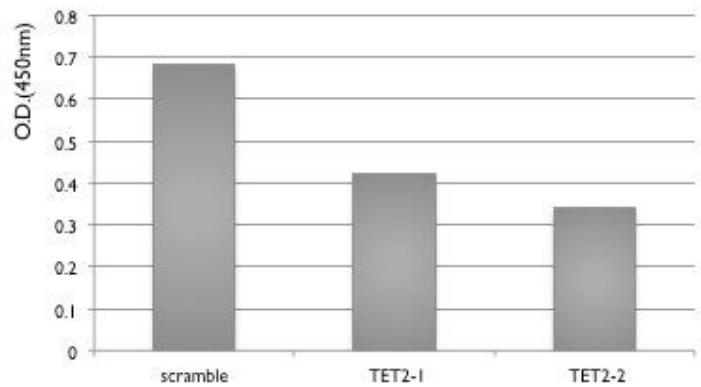


Fig. 19 以濃縮培養液進行 ELISA 實驗，結果得知 DKK1 蛋白質在細胞培養液中表現量降低。

四、TET2 knockdown 以及 DKK1 knockdown 促進細胞移行 (migration)

我們比較加入 Scramble siRNA、TET2 siRNA 以及 DKK1 siRNA 進行 knockdown 的三組細胞移行速度。如 Fig. 20 所示，將 TET2 knockdown 之後細胞移行速度明顯增快，符合 TET2 為乳癌中的抑癌基因之推論。DKK1 knockdown 組也有顯著的細胞移行，與 TET2 knockdown 組同樣在十小時之內「傷口」(wound)便已愈合。相對的，Scramble 組的細胞移行速度較慢，十小時之內「傷口」兩邊的細胞皆未接壤。

此結果顯示 TET2 knockdown 與 DKK1 knockdown 的細胞在移行皆有增快的趨勢，是細胞癌化的特徵。這意味著 TET2 和 DKK1 表現量低的細胞較表現量正常之細胞有可能發生轉移。根據此結果以及先前述及之即時聚合酶鏈式反應(real time PCR)、西方墨點法(Western Blot)與酵素免疫分析法(ELISA)的結果，我們推論 TET2 有可能為 DKK1 之上游基因，透過抑制其表現而導致細胞的癌化與上皮-間質轉化過程(EMT)。

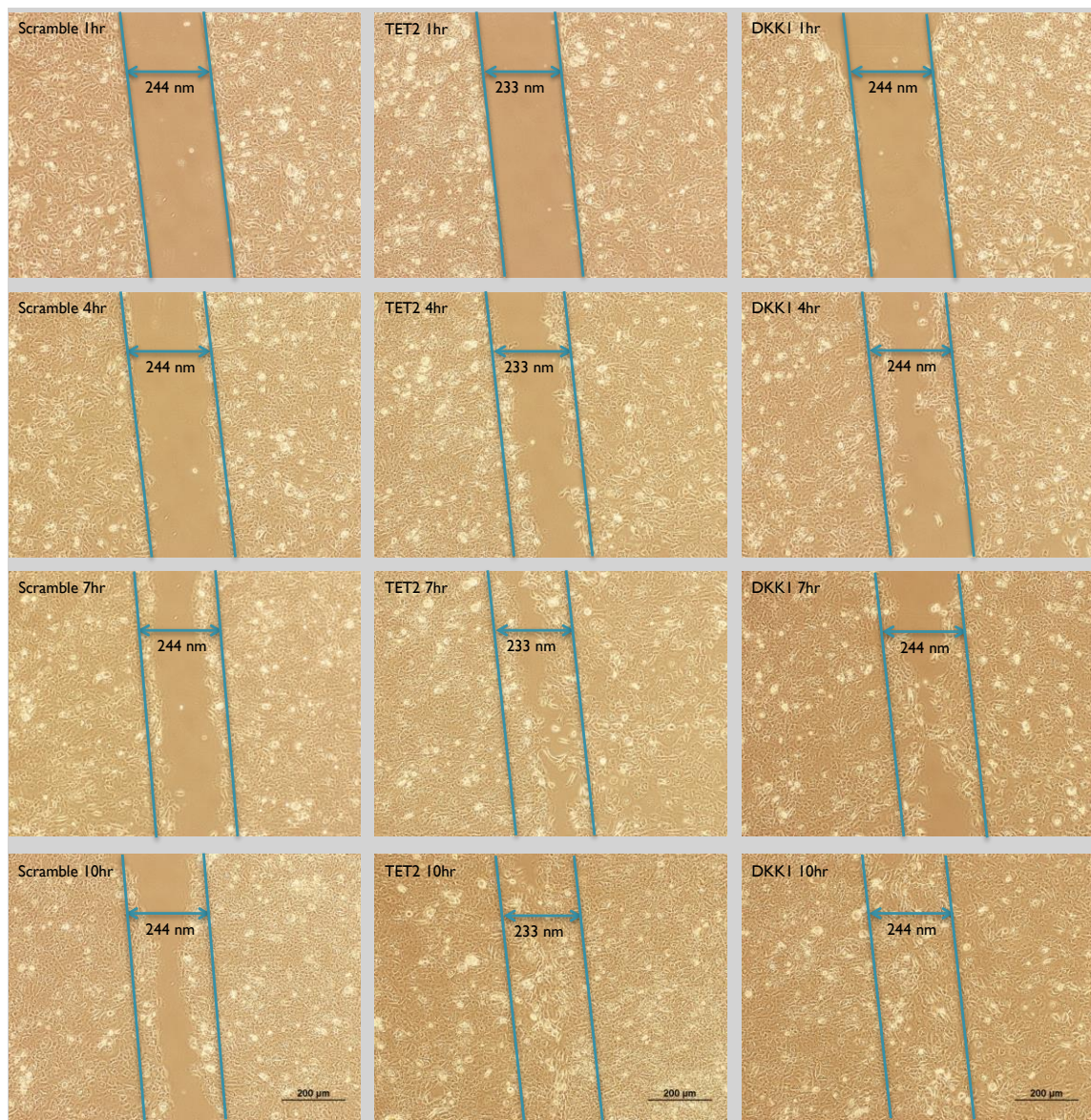


Fig. 20 Scramble 組經過十小時培養，中央「傷口」(wound)尚未愈合，TET2 knockdown 組與 DKK1 knockdown 組卻在培養七小時後兩邊細胞已接壤。

五、TET2 knockdown 以及 DKK1 knockdown 影響細胞增生(Cell Proliferation)

由 MTS assay 的結果，我們可以看出在 TET2 knockdown 後，有細胞增生較為顯著的現象。而 DKK1 knockdown 後，細胞增生量較 TET2 knockdown 稍為明顯。此數據支持 DKK1 受 TET2 調控之假設。

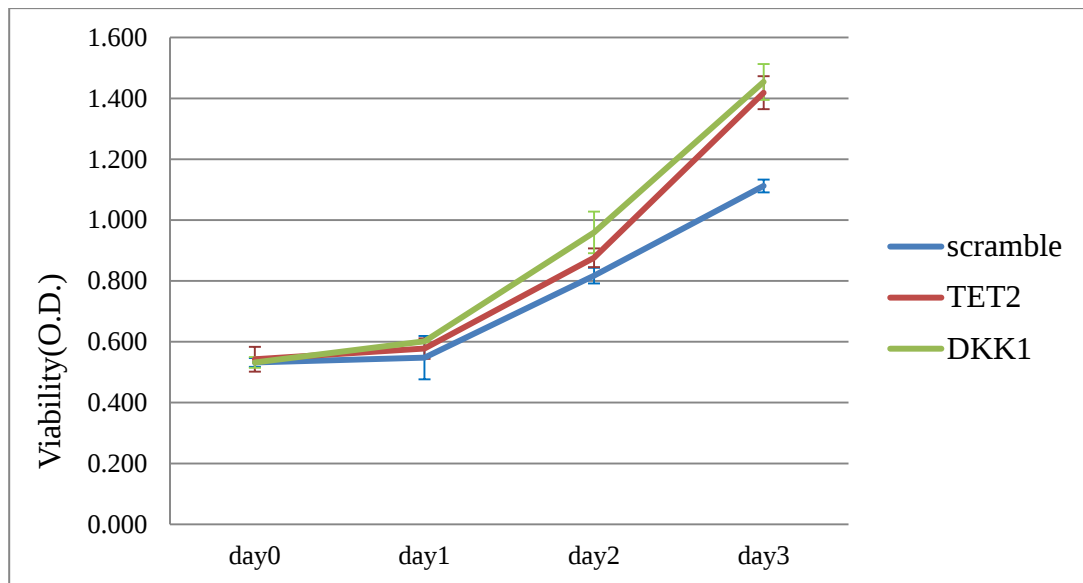


Fig. 21 MTS assay 結果顯示 TET2 knockdown 以及 DKK1 knockdown 後細胞增生較 scramble siRNA 組為明顯

伍、討論

近年來才有研究指出 TET 家族為抑癌基因，其中我們實驗室已在期刊發表了 TET1 活化基質金屬蛋白水解抑制酶而抑制癌細胞的侵犯作用的論文，至於 TET2 則是被證實在血癌中為抑癌基因(Mercher et al., 2012)。然而，TET2 表現量下降與乳癌的關係卻是本實驗室首先統計發現的，且 TET2 與癌症間的機制仍未明瞭，因此我們以找出 TET2 影響乳癌發生的可能方式為目標。

本研究發現以 TET2 knockdown 模擬乳癌檢體內 TET2 表現量下降，會導致已知為乳癌當中為抑癌基因的細胞分泌性蛋白質 DKK1 表現量下降，連帶影響此分泌性蛋白質在細胞內與細胞培養液中含量減少。細胞實驗也證實 TET2 knockdown 以及 DKK1 knockdown 皆會促進細胞的移行(migration)與增生(proliferation)能力。因此，以目前的結果我們推測 DKK1 極有可能為受 TET2 調控的下游基因。

TET 家族在 2002 年首度被發現，然而到了 2009 年才證實其為 DNA 去甲基酶，並且一直到了近幾年才發現 TET2 家族可能為抑癌基因。陸續有研究發表 TET 家族基因在各種癌症中所扮演之角色，如我們實驗室在 2012 年發表的論文即指出 TET1 能夠透過活化基質金屬蛋白水解抑制酶(tissue inhibitors of metalloproteinases)而抑制癌細胞的侵犯作用。另外也有研究指出 TET1 與受其調控的下游基因 HOXA7、HOXA9 皆能抑制乳癌腫瘤生長與轉移(Miao et al., 2013)。至於 TET2 也被發現在抑制其表現時會造成老鼠多效性造血功能異常，而且也影響人類的白血病(Quivoron et al., 2011)。

TET2 於近兩年來被發現有抑制乳癌發生的作用，然而其中的機制多未明瞭。本實驗室去年便已經有未公開之數據支持 TET2 基因表現在乳癌病患檢體中表現量大都降低，但一直到今年才有研究探討 TET2 與乳癌間的細部關係，發現 TET2 受到非編碼 RNA miR-22 的調控而影響非編碼 RNA miR-200 的表現，而 miR-200 又進一步影響癌症的發生及擴散(Su et al, 2013)，提出了首種 TET2 影響乳癌發生

的管道。本研究則發現 TET2 可能能夠調控抑癌基因 DKK1，進而影響乳癌的發生。由於 DKK1 是 Wnt/ β -catenin 路徑的抑制基因，我們目前仍在進行的實驗為證明 TET2 knockdown 是否也會促進 Wnt/ β -catenin 路徑的發生，首先要以西方墨點法檢視細胞核與細胞質中 β -catenin 蛋白質的表現量。如有證實 TET2 也會影響 Wnt/ β -catenin 訊息傳遞路徑，這將會是確定發現 TET2 影響乳癌發生及轉移的完全不同管道。

陸、結論及應用

本研究提出調控 Wnt/ β -catenin 路徑的抑癌基因 DKK1 可能為 TET2 之下游基因，是 TET2 表現量影響乳癌的發生及轉移之可能原因。如進一步證實這條基因路徑，並對其充分了解，則可針對我們對 Wnt/ β -catenin 路徑現有的認識而開發新種對抗乳癌之藥物。本研究目前結果可簡略分為下列四大點：

1. 在組蛋白修飾的實驗中，可得知 TET2 knockdown 後造成具活化基因作用的 H3k4 上的甲基修飾量減少，一般導致大多數基因不被活化，符合 DNA 微陣列 (microarray) 大部分基因表現量降低之結果。此結果也與我們進行 TET2 基因 knock down 後 real time PCR 所得多數基因表現量降低的結果相符。
2. 透過 DNA 微陣列 (microarray) 的結果以及 real time PCR 的進一步證實，可得知 TET2 knockdown 後，抑制乳癌的 DKK1 基因表現量也會下降。由於已知 DKK1 是能夠透過拮抗抑制 Wnt/ β -catenin 訊息傳遞路徑而抑制乳癌的基因，TET2 極有可能經由調控 DKK1 表現而影響乳癌的發生。
3. 透過西方墨點法與酵素免疫分析法的結果，可得知 TET2 knockdown 後，上述 DKK1 的蛋白質量在細胞內及細胞培養液中皆減少，與其基因表現量在 TET2 knockdown 後下降的結果相符，再次證實了 TET2 表現量減少會導致 DKK1 表現量降低的事實。
4. 在細胞移行 (migration) 實驗中可得知 TET2 knockdown 及 DKK1 knockdown 後，細胞移行的速率皆提高；而 MTS assay 則顯示 TET2 knockdown 及 DKK1 knockdown 的細胞皆有較佳的細胞增生能力。此兩結果支持 DKK1 受 TET2 調控之假說。

柒、參考資料

1. 行政院衛生福利部網站。 (www.mohw.gov.tw/CHT/Ministry/Index.aspx)
2. H. F. Kennecke, D. Voduc, S. Leung, V. L. Cryns, C. M. Perou, T. O. Nielsen and M. Cheang. α -basic-crystallin expression in basal-like breast cancer and its association with brain metastasis. *Journal of Clinical Oncology*. 2009, May; 27(15):1025.
3. J. P. Thiery . Epithelial–mesenchymal transitions in tumour progression. *Nature Reviews Cancer* 2. 2002, June; 442-454.
4. Tahiliani M, Koh KP, Shen Y, Pastor WA, Bandukwala H, Brudno Y, Agarwal S, Iyer LM, Liu DR, Aravind L, Rao A. Conversion of 5-Methylcytosine to 5-Hydroxymethylcytosine in Mammalian DNA by MLL Partner TET1. *Science*. 2009, May; 324(5929): 930-5.
5. Shinsuke Ito, Li Shen, Qing Dai, Susan C. Wu, Leonard B. Collins, James A. Swenberg, Chuan He, Yi Zhang. TET Proteins Can Convert 5-Methylcytosine to 5-Formylcytosine and 5-Carboxylcytosine. *Science*. 2011, Sep; (6047): 1300-1303.
6. Hsu CH, Peng KL, Kang ML, Chen YR, Yang YC, Tsai CH, Chu CS, Jeng YM, Chen YT, Lin FM, Huang HD, Lu YY, Teng YC, Lin ST, Lin RK, Tang FM, Lee SB, Hsu HM, Yu JC, Hsiao PW, Juan LJ. TET1 suppresses cancer invasion by activating the tissue inhibitors of metalloproteinases. *Cell Rep*. 2012, Sep; 2(3):568-79.
7. Bhutani N, Burns DM, Blau HM. DNA demethylation dynamics. *Cell*. 2011, Sep; 146(6):866-72.
8. Adelene Y. Tan and James L. Manley. The TET Family of Proteins: Functions and Roles in Disease. *J Mol Cell Biol*. 2009 Dec; 1(2): 82–92.
9. Kornberg R.D. and Tomas J.O. Chromatin Structure: Oligomers of the Histones. 1974, *Science* 184(4139): 865-868
10. Thoma F, Koller T, Klug A. Involvement of histone H1 in the organization of the nucleosome and of the salt-dependent superstructures of chromatin. *J Cell Biol*. 1979 Nov; 83(2 Pt 1):403-27
11. Hong L., Schroth G.P., Matthews H.R., Yau P., and Bradbury E.M. Studies of the DNA binding properties of histone H4 amino terminus. Thermal denaturation studies

- reveal that acetylation markedly reduces the binding constant of the H4 “tail” to DNA. 1993, *Journal of Biological Chemistry* 268(1): 305-314
12. Clayton A.L., Hazzalin C.A., and Mahadevan L.C. Enhanced Histone Acetylation and Transcription: A Dynamic Perspective. 2006, *Molecular Cell* 23(3):289-296
 13. Wang Z., Zang C., Rosenfeld J.A., Schones D.E., Barski A., Cuddapah S., Cui K., Roh T.Y., Peng W., Zang M.Q. et al. 2008. Combinatorial patterns of histone acetylations and methylations in the human genome. *Nature Genetics* 40(7): 897-903
 14. Li H., Ilin S., Wang W., Duncan E.M., Wysocka J., Allis C.D., and Patal D.J. Molecular basis for site-specific read-out of histone H3K4me3 by the BPTF PHD finger of NURF. 442(7098): 91-95, 2006
 15. Taverna S.D., Li H., Ruthenburg A.J., Allis C.D., and Patel D.J. 2007. How chromatin-binding modules interpret histone modifications: lessons from professional pocket pickers. *Nat Struct Mol Biol* 14(11): 1025-1040
 16. Benevolenskaya E.V. Histone H3K4 demethylases are essential in development and differentiation. August 2007. *Biochem. Cell Biol.* 85 (4): 435–43
 17. Barski A., Cuddapah S., Cui K., Roh T.Y., Schones D.E., Wang Z., Wei G., Chepelev I., Zhao K. High-resolution profiling of histone methylations in the human genome. May 2007. *Cell* 129 (4): 823–37
 18. Steger D.J., Lefterova M.I., Ying L., Stonestrom A.J., Schupp M., Zhuo D., Vakoc A.L., Kim J.E., Chen J., Lazar M.A., Blobel G.A., Vakoc C.R. DOT1L/KMT4 Recruitment and H3K79 Methylation Are Ubiquitously Coupled with Gene Transcription in Mammalian Cells. April 2008. *Mol. Cell. Biol.* 28 (8): 2825–39
 19. Rosenfeld J.A., Wang Z., Schones D.E., Zhao K., DeSalle R., Zhang M.Q. Determination of enriched histone modifications in non-genic portions of the human genome. 2009. *BMC Genomics* 10: 143
 20. Koch C.M., Andrews R.M., Flicek P., Dillon S.C., Karaöz U., Clelland G.K., Wilcox S., Beare D.M., Fowler J.C., Couttet P., James K.D., Lefebvre G.C., Bruce A.W., Dovey O.M., Ellis P.D., Dhami P., Langford C.F., Weng Z., Birney E., Carter N.P., Vetric D., Dunham I. The landscape of histone modifications across 1% of the human genome in five human cell lines. June 2007. *Genome Res.* 17 (6): 691–707

21. Creighton M.P., Cheng A.W., Welstead G.G., Kooistra T., Carey B.W., Steine E.J., Hanna J., Lodato M.A., Frampton G.M., Sharp P.A., Boyer L.A., Young R.A., Jaenisch R. Histone H3K27ac separates active from poised enhancers and predicts developmental state. 2010. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 107: 21931-21936
22. Atsushi Niida, Takatoshi Hiroko, Mana Kasai, Yoichi Furukawa, Yusuke Nakamura, Yutaka Suzuki, Sumio Sugano, Tetsu Akiyama. DKK1, a negative regulator of Wnt signaling, is a target of the β -catenin/TCK pathway. *Oncogene*. 2004, Sep; 8520-8526.
23. Thomas Mercher, Cyril Quivoron, Lucile Couronné, Christian Bastard, William Vainchenker, Olivier A. Bernard. TET2, a tumor suppressor in hematological disorders. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)*. 2012, Apr; Volume 1825 Issue 2
24. Miao Sun, Chun-Kiao Song, Hao Huang, Casey A. Frankengerger, Devipriya Sankarashama, Suzana Gomes, Ping Chen, Jianjun Chen, Kiran K. Chada, Chuan He, Marsha R. Rosner. HMGA2/TET1/HOXA9 signaling pathway regulates breast cancer growth and metastasis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America (PNAS)*. 2013, May; doi: 10.1073/pnas.1305172110.
25. Cyril Quivoron, Lucile Couronné, Véronique Della Valle, Cécile K. Lopez, Isabelle Plo, Orianne Wagner-Ballon, Marcio Do Cruzeiro, Francois Delhommeau, Bertrand Arnulf, Marc-Henri Stern, Lucy Godley, Paule Opolon, Hervé Tilly, Eric Solary, Yannis Khac, Michaëla Fontenay, William Vainchenker, Christian Bastard, Thomas Mercher, Oliver A. Bernard. TET2 Inactivation Results in Pleotropic Hematopoietic Abnormalities in Mouse and is a Recurrent Event during Human Lymphomagenesis. *Cancer Cell*. 2011, June; Volume 20, Issue 1, 25-38.
26. Su Jung Song, Laura Poliseno, Min Sup Song, Ugo Ala, Kaitlyn Webster, Christopher Ng, Gary Beringer, Nicolai J. Brikbak, Poer Paolo Pandolfi. MicroRNA-Antagonism Regulates Breast Cancer Stemness and Metastasis via TET-Family-Dependent Chromatin Remodeling. *Cell*. 2013, July; Volume 154, Issue 2, 311-324.

捌、附錄

一、TET2 表現量高低與乳癌病患臨床病理特點之關係

本實驗室先前未發表的數據顯示 TET2 在大多乳癌檢體內表現量較低，且 TET2 表現量低之病患存活率較差。另外，實驗室也觀察了 TET2 表現量高低與乳癌病患臨床病理特點的關係。其中，可看出 TET2 表現量低的病患，腫瘤大小平均較 TET2 表現量高之患者大。並且 TET2 表現量低之病患，多處於較後期的轉移性癌症。

Clinical pathological characteristics of breast cancer patients with associated TET2 expression			
	TET2 high (44/132)	TET2 low (44/132)	<i>p</i> value
Age	51.02 ± 11.62	51.91 ± 13.21	0.74 ¹
Tumor size (cm)	1.97 ± 1.17	2.85 ± 1.62	0.0043 ¹
Stage (no. of patients)			0.19 ²
is-I	20 (45%)	15 (34%)	
II-IV	24 (55%)	29 (66%)	
Tumor status (no. of patients)			0.0085 ²
Tis-T1	32 (73%)	20 (45%)	
T2-T4	12 (27%)	24 (55%)	
Node status (no. of patients)			0.47 ²
N0	28 (64%)	26 (60%)	
N1-N2	16 (36%)	17 (40%)	

¹*p* value was measured with student's *t* test.

²significance of association was determined using a χ^2 test.

Fig. 22 實驗室先前結果統計 TET2 表現量高與表現量低之病患腫瘤大小、乳癌期數、以及腫瘤內淋巴結數。

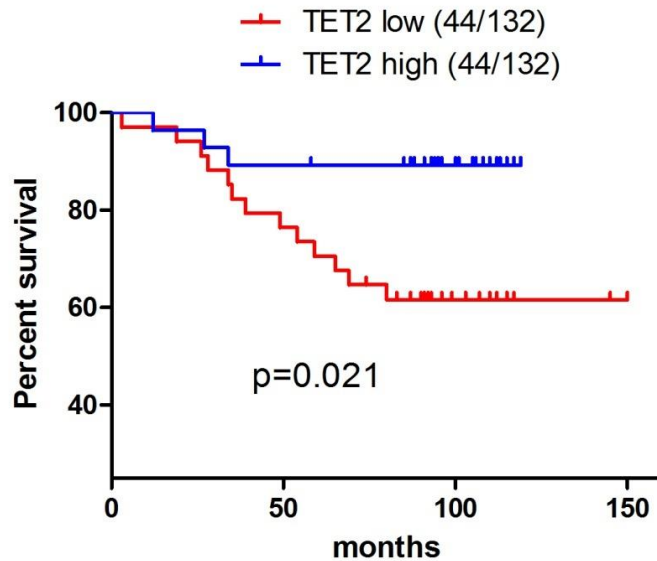


Fig. 23 上圖所使用之數據中病患十年內生存百分比 TET2 表現量高者較低。

二、TET2 knockdown 影響基因表現

我們經由 DNA 微陣列(microarray)的結果挑出已知的致癌和抑癌基因各兩個，加上未知與癌症關係的基因(novel gene)六個(均 P value<0.05 且 log base 2 fold change>2 or <-2)，共十個基因進行即時聚合酶鏈式反應(real time PCR)。其中致癌基因 GRB10 表現量有明顯的上升，抑癌基因 DKK1 與 MAL 也有表現量下降的趨勢。另外，未知基因中 TMEFF1 表現量上升，DHTKD1、ANKRD2、CORO1C、HSDL2 及 HEXB 表現量下降，其中以 CORO1C 的改變最為明顯。由於已知 DKK1 為乳癌中著名的抑癌基因，我們將研究專注於 TET2 與 DKK1 之間的關聯。

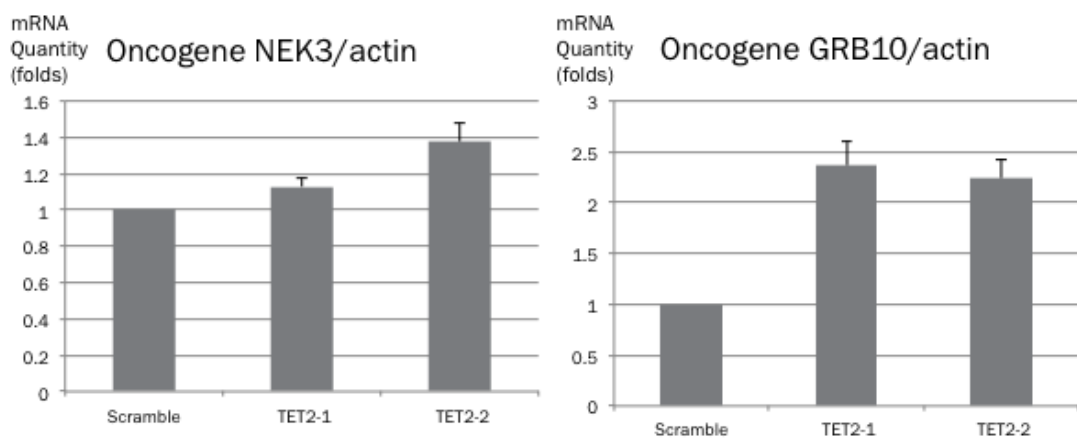


Fig. 致癌基因 NEK3、GRB10 於 TET2 knockdown 後表現量上升，但 NEK3 僅有些微的改變。

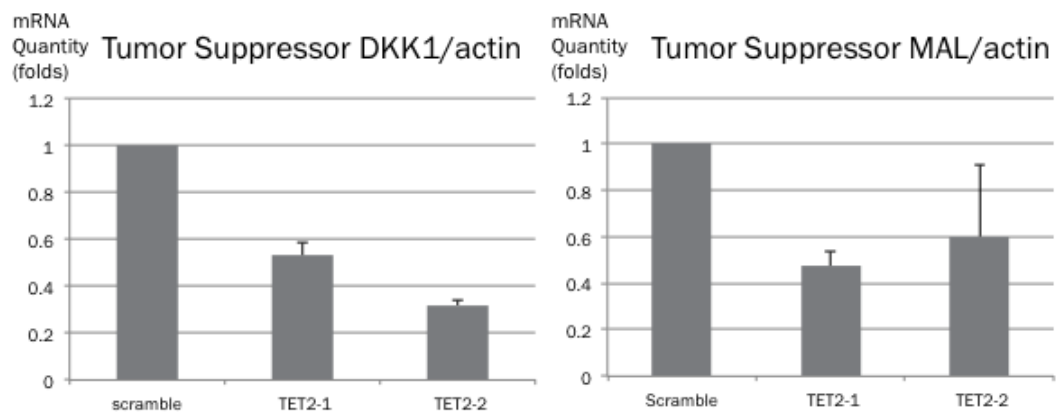


Fig. 抑癌基因 DKK1、MAL 於 TET2 knockdown 後表現量下降

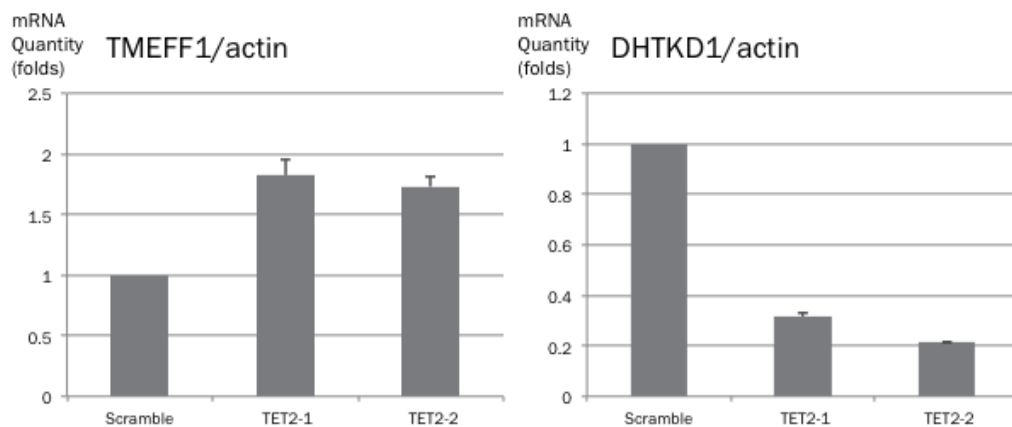


Fig. 未知基因 TMEFF1 於 TET2 knockdown 後表現量上升，
DHTKD1、表現量下降

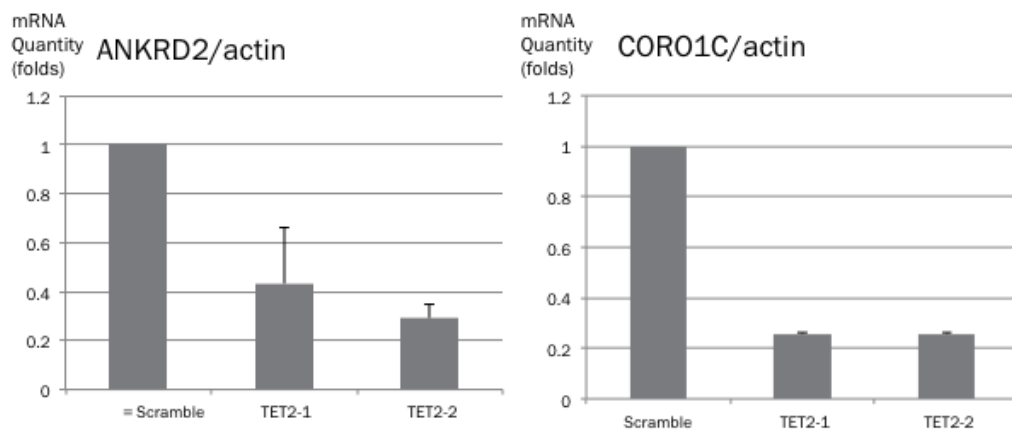


Fig. 未知基因 ANKRD2、CORO1C 於 TET2 knockdown 後下降。

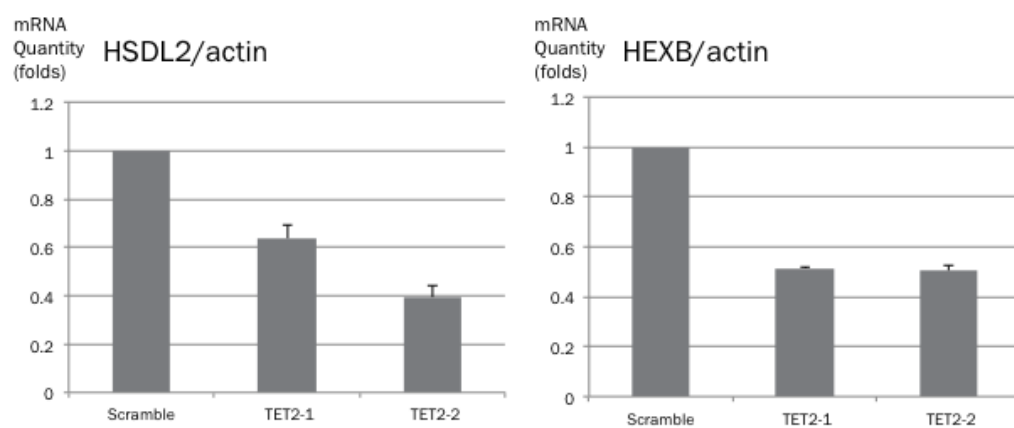


Fig. 未知基因 HSDL2、HEXB 於 TET2 knockdown 後下降。

評語

TET 家族是一種 tumor suppressor，但其作用機制並未清楚，Knockdown TET 之後 H3K4 之 methylation 降低，DKK1 之表現也降低，但是之間的關係並未進一步之探討是其美中不足之處，DKK1 下游已研究很多了。