

# 2021 年臺灣國際科學展覽會 優勝作品專輯

作品編號 080007  
參展科別 生物化學  
作品名稱 細胞核 CTEN 蛋白質對 Wnt 訊息傳導路徑  
之影響及細胞癌化之調控  
得獎獎項 大會獎 三等獎

就讀學校 臺北市立第一女子高級中學  
指導教師 吳淑芳、廖憶純  
作者姓名 吳婷貽、吳宥瑄

關鍵詞 CTEN、Wnt 訊息傳遞路徑、  
 $\beta$ -catenin/TCF/LEF

## 作者簡介



大家好，我們是吳婷貽和吳宥瑄，臺北市立第一女子高級中學高二學生。高一時有幸進入廖憶純老師實驗室進行專題研究，在這裡我們不僅學會如何操作相關儀器和 CTEN 這個有趣的蛋白質，更重要的是我們收穫了做研究的精神，在每一次遇到困難或阻礙時，學著不逃避，迎面而上動手解決問題。很謝謝教授、實驗室學姊和學校老師在這段時間給予我們的幫助，讓我們能來參加此次的國際科展，也期待藉由這次的盛會，認識更多和我們一樣熱愛科學的青年。

## 摘要

正常細胞的 C-terminal tensin-like (CTEN) 蛋白質位於細胞質且含量低，但研究發現 CTEN 在大腸癌細胞中會大量表現並累積於細胞核內，進而提升癌細胞遷移與侵襲的能力；而 Wnt 訊息傳遞路徑在癌細胞中常有過度活化的現象。因此本研究主要探討 CTEN 於細胞核內的累積和 Wnt 訊息傳遞路徑的互動關係，進而調控細胞癌化的機制。分析 CTEN 分布有差異之細胞株的轉錄體發現，在較多 CTEN 累積於細胞核的大腸癌細胞株中，其 Wnt6、Wnt11 兩基因的表現量上升，研究指出 Wnt6、Wnt11 皆會影響大腸癌細胞的遷移與侵襲。另外，CTEN 會與 Wnt 訊息傳遞路徑中的  $\beta$ -catenin 結合，因此本實驗利用啟動子帶有 Wnt 訊息下游轉錄因子結合位的質體，測定其下游  $\beta$ -catenin/TCF/LEF 轉錄因子的轉錄活性。結果顯示 CTEN 累積於細胞核中會提高  $\beta$ -catenin/TCF/LEF 之轉錄活性，進而增加 Wnt6、Wnt11 等下游基因的表現量，影響大腸癌細胞的遷移與侵襲。

## Abstract

The C-terminal tensin-like (CTEN) proteins in normal cells are most located in the cytoplasm with low content. However, some studies have found that CTEN is abundantly expressed in colorectal cancer cells and accumulates in the nucleus, which in turn enhance the ability of cancer cells to migrate and invade. And Wnt signaling pathway is often over-activated in cancer cells. Therefore, this study mainly explores the interaction between the accumulation of CTEN in the nucleus and the Wnt signaling pathway, and how to regulate the mechanism of cell canceration. After analyzing the transcripts of cell lines with different CTEN distributions, we found that in colorectal cancer cell lines, where more CTEN accumulates in the nucleus, the expression levels of the Wnt6 and Wnt11 genes increase. Studies have pointed out that both Wnt6 and Wnt11 will affect migration and invasion of colorectal cancer. In addition, CTEN binds to  $\beta$ -catenin which work in the Wnt signaling pathway. This experiment uses a plasmid with a transcription factor whose binding site is in the downstream of Wnt signaling pathway, to determine the transcriptional activity of its downstream to  $\beta$ -catenin/TCF/LEF transcription factor. The results show that the accumulation of CTEN in the nucleus will increase the transcriptional activity of  $\beta$ -catenin/TCF/LEF transcription factor, and increase the expression of downstream genes such as Wnt6, Wnt11, and also affect the migration and invasion of colorectal cancer cells.

# 壹、前言

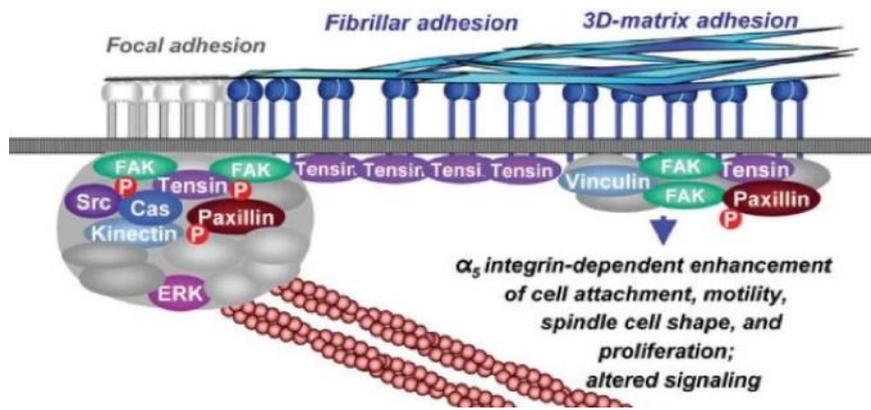
## 一、研究動機

癌症是當今世代困擾人類的一大問題，光是前年癌症死亡人數就占全部的 28.2%，因此許多科學家都持續找尋癌症的發生機制及治療方法。在翻閱文獻後，我們觀察到在 CTEN 累積於癌細胞核內時，癌細胞的遷移及侵襲能力會提升；Wnt 訊息傳導路徑也會參與調控細胞的移動 (Vlad-Fiegen et al., 2012)。此外，我們發現在癌細胞中 CTEN 蛋白質的表現量會增加；Wnt 訊息傳導路徑的異常會導致細胞癌化，且在癌細胞中參與 Wnt 訊息傳導路徑的 Wnt6、Wnt11 兩基因的 mRNA 量較正常細胞高。鑑於以上 CTEN 和 Wnt 訊息傳導路徑之共通點，我們想深入探討兩者之間的互動關係。相關文獻指出，CTEN 進入細胞核後會與 Wnt 訊息傳導路徑的  $\beta$ -catenin 蛋白質結合 (Liao et al., 2009)。其中  $\beta$ -catenin 是 Wnt 訊息傳導路徑中的調節蛋白，在癌細胞中 Wnt 訊息傳導路徑會過度活化，使  $\beta$ -catenin 在細胞核中累積，進而與 TCF/LEF 轉錄因子結合，而活化相關下游基因 (White et al., 2013)。因此我們想探討在癌細胞中大量表現且累積於細胞核內的 CTEN 和 Wnt6、Wnt11 兩基因表現量的關聯，並確認細胞核的 CTEN 對  $\beta$ -catenin/TCF/LEF 轉錄活性的影響，藉由找出三者間的互動關係，闡明 CTEN 調控癌細胞遷移及侵襲能力的機制。

## 二、研究背景

### (一) CTEN (C-terminal tensin-like) 蛋白質

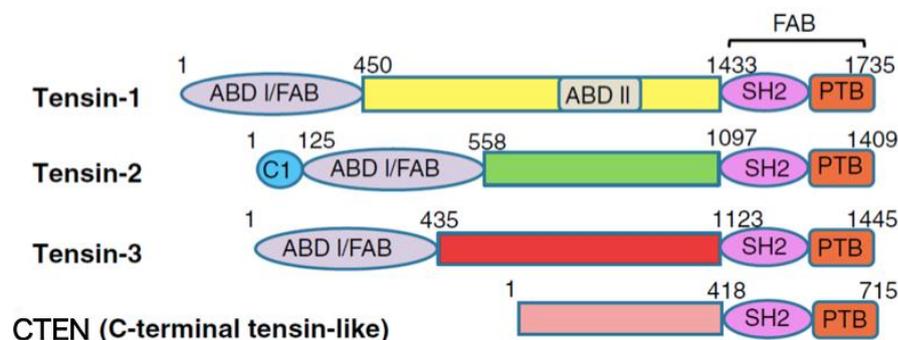
Focal adhesion 即黏著斑，是一種靠近細胞膜 (15 nm 以內) 之大型且動態變化的蛋白質複合體，作為細胞骨架與細胞外間質之物理性連結，當細胞移動時，Focal adhesion 會透過不斷新生和瓦解，以調控細胞的移動 (圖一)。近期研究發現，Focal adhesion 與癌症的進展有關，在多種癌細胞中過量表現並且促進細胞貼附、遷移與侵襲的能力 (Tilghman and Parsons, 2008; Xu et al., 2015)。



圖一、focal adhesion 示意圖 (Pai et al., 2017)

Tensin family 位於 Focal adhesion，由 Tensin1、Tensin2、Tensin3 以及 CTEN (Tensin 4) 組成 (圖二)。Tensin1, 2, 3 的 N 端具有 actin binding domain (ABD 域)，會與細胞骨架 actin filament 結合，且具有與 Focal adhesion 結合的區域 (Lo et al., 1994)；Tensin family 的 C 端皆具有 phosphotyrosine-binding domain (PTB 域) 與 Src Homology 2 domain (SH2 域)，分別能和 tyrosine phosphorylated proteins 及  $\beta$ -integrins 結合 (Davis et al., 1991； Auger et al., 1996； Calderwood et al., 2003)。

Tensin family 中的 CTEN 具有組織特異性。在正常細胞株中，大多數組織的 CTEN 表現量很低或幾乎偵測不到，只有在前列腺及胎盤組織之中有較高的表現量，且 CTEN 多分布於細胞質。然而在大腸癌細胞株中，CTEN 有較高的表現量並且會累積於細胞核內 (Hong et al., 2019; Liao et al., 2009)，而位於細胞核的 CTEN 會促進群落形成以及提升癌細胞遷移與侵襲的能力 (Liao et al., 2009)。

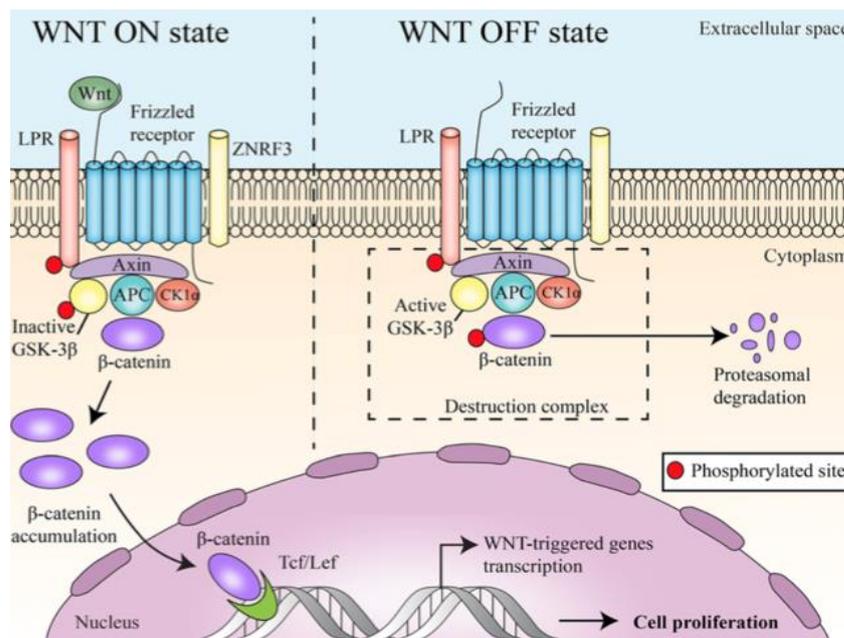


圖二、Tensin family 胺基酸功能示意圖 (Lo, 2017)

## (二) Wnt 訊息傳導路徑 (Wnt pathway)

Wnt 訊息傳導路徑會調控細胞分裂、分化、遷移等活動，可影響胚胎發育與一部分成年動物的生理活動，若 Wnt 訊息傳導路徑異常則可能導致細胞癌化。先前研究顯示，在癌細胞株中 Wnt 訊息傳導路徑會被過度活化。Wnt 訊息傳導路徑主要分為三種：一種經典 Wnt 訊息傳導路徑和兩種非經典 Wnt 訊息傳導路徑。

經典 Wnt 訊息傳導路徑 (canonical Wnt pathway) 中，配體 Wnt 蛋白質的傳導可以阻止  $\beta$ -catenin 蛋白質被降解，使  $\beta$ -catenin 蛋白質得以進入細胞核調控下游基因的轉錄 (圖三)。非經典 Wnt 平面細胞極化通路 (noncanonical Wnt/planar cell polarity pathway, PCP) 會藉由 GTP 酶 RhoA 和 Ras 激活 JNK 和 ROCK，幫助細胞骨架重新排列，進而改變細胞型態。在非經典 Wnt/鈣離子通路 (noncanonical Wnt/calcium pathway) 中，配體 Wnt 蛋白質可以促進甘油二酯 (DAG)、三磷酸肌醇 (IP3) 被活化，促使鈣離子的釋放並激活某些鈣離子依賴性酶。此通路對胚胎的發育過程有重要作用。但有研究指出，當經典 Wnt 訊息傳導路徑被過度活化時，會導致  $\beta$ -catenin 累積於細胞核 (Sebio et al., 2014)。此路徑中的部分調控會有異常， $\beta$ -catenin 蛋白質的表現量並不會隨配體多寡的調控而變化。



圖三、Wnt 訊息傳遞路徑 (Yamada et al., 2003)

### (三) 細胞核 CTEN 影響大腸癌細胞的遷移及侵襲能力

CTEN 在大腸癌細胞中會大量表現並累積於細胞核內 (Liao et al., 2009)，利用 nuclear localization signal (NLS) 將 CTEN 大量聚集於細胞核內後發現，相較於表現 wild-type CTEN (WT-CTEN) 的癌細胞，表現 NLS-CTEN 之癌細胞的遷移與侵襲能力皆顯著提升 (王，2017；涂，2019)。進一步分析表現 WT-CTEN 與 NLS-CTEN 之細胞株的轉錄體並翻閱參考文獻後，我們發現有許多 WT-CTEN 與 NLS-CTEN 之差異性表現基因轉譯出的蛋白質如 APC2、Wnt6、Wnt11、ACSL5、S100A14、ZNF350 的表現量會受細胞癌化程度影響，並且會促進或抑制細胞的遷移及侵襲能力。其中，APC2、Wnt6、Wnt11 基因皆在大腸癌細胞株中大量表現，而 ACSL5、S100A14、ZNF350 基因在大腸癌細胞株中的表現量皆會減少。

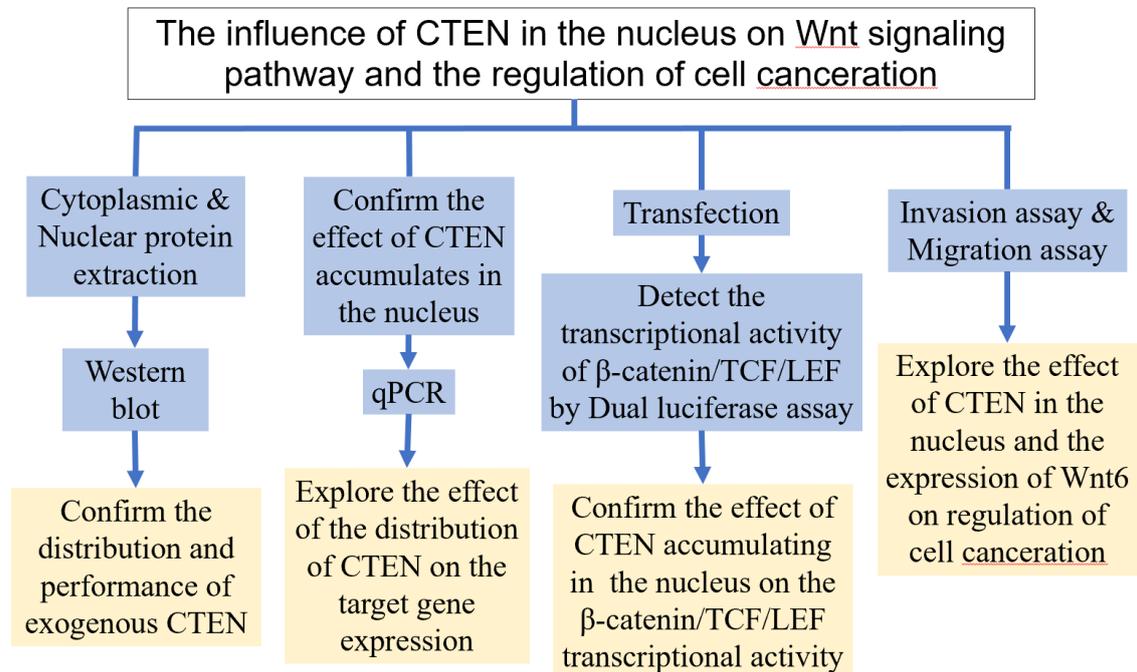
ACSL5 可以幫助脂質生合成以及幫助脂肪酸的分解；S100A14 和細胞的增生與分化有關，也可以抑制腫瘤的轉移。上述兩基因皆可能為潛在的抑癌基因 (Pérez-Núñez et al., 2019; Basnet et al., 2019; Sapkota et al., 2011)。ZNF350 是一抑癌基因，會調控大腸細胞的遷移能力 (Tanaka et al., 2018)。另外 CTEN、Wnt6、Wnt11、APC2 蛋白質皆會參與 Wnt 訊息傳遞路徑。缺少 APC2 蛋白質的癌細胞中，細胞的遷移能力會變低 (He et al., 2018)。而 Wnt 6、Wnt11 等蛋白質是經典 Wnt 訊息傳導路徑與非經典 Wnt 平面細胞極化通路的配體，也是  $\beta$ -catenin/TCF/LEF 轉錄因子所轉錄基因的下游產物。因此，當細胞癌化時，Wnt 6、Wnt11 兩基因的表現量會上升，進而提升大腸癌細胞的遷移及侵襲能力 (Zheng, 2018; Irantzu Gorroño-Etxebarria et al., 2019)。

### 三、研究目的

- (一) 探究 CTEN 在細胞核中累積對 Wnt6、Wnt11 基因表現量之影響。
- (二) 探討 CTEN 表現量對  $\beta$ -catenin/TCF/LEF 轉錄活性的影響。
- (三) 探討影響  $\beta$ -catenin/TCF/LEF 轉錄活性的因子。

## 貳、研究方法或過程

### 一、研究架構圖



圖四、研究架構圖

### 二、實驗器材及藥品

(一) 細胞株：人類大腸癌細胞株 HCT116。

(二) 質體 DNA (於細胞株外源表現 CTEN)

1. pcDNA3-myc：帶有 myc-tag，以下簡稱 EV (empty vector)。
2. pcDNA3-myc-CTEN：帶有 wild-type CTEN 基因於 pcDNA3-myc 表現載體上，以下簡稱 WT-CTEN。
3. pcDNA3-myc-NLS-CTEN：帶有 nuclear localization sequence (NLS) 之 CTEN 序列，使 CTEN 能夠累積於細胞核，以下簡稱 NLS-CTEN。

(三) qPCR 引子

表一、qPCR primer sequence

Genes	Primer sequence	Product sizes (bp)
18S rRNA	F: 5' - CTTAGAGGGACAAGTGGCG -3' R: 5' - ACGCTGAGCCAGTCAGTGTA -3'	107
TNS4	F: 5' - GGACCCCAGAGGACCTTGACTCCTA -3' R: 5' - GGGAAAGCAGCTGGAAGGTGGGGT -3'	95
ACSL5	F: 5' - TTCCTGTCTCTTGCATAAAGGTT -3' R: 5' - CCAATTCGGAGATGATCCAC -3'	95
S100A14	F: 5' - TCACCAAAGGACCAGACACA -3' R: 5' - GCCCTCTCCACATCACTGAA -3'	91
APC2	F: 5' - GCATGAAGGAGGTCCTGAAGC -3' R: 5' - GATGTCCATCTGTAGGGCCTTC -3'	116
ZNF350	F: 5' - CAGTTGGTGGGAAAGGGCTAATAC -3' R: 5' - TTAATCCTCCACACTGGCACTGG -3'	96
WNT6	F: 5' - TGGCCTCTAGGAGGAAACAGT -3' R: 5' - ATTGATACTAACCTCACCCACC -3'	115
WNT11	F: 5' - CCAAGCCAATAAACTGATGCG -3' R: 5' - GCACTTACACTTCATTTCCAGAG -3'	85

(四) siRNA 小分子干擾核糖核酸

表二、siRNA 序列

	Gene	Sequence
siCtrl	Negative Control	5' -GAUCAUACGUGCGAUCAGA[dT][dT]-3' 5' - UCUGAUCGCACGUAUGAUC[dT][dT]-3'
siCTEN	CTEN (TNS4)	5' -CCCAGAGGACCUUGACUCCUACAUU-3' 5' - AAUGUAGGAGUCAAGGUCCUCUGGG-3'

(五) Western blotting 使用之抗體

表三、Western blotting 抗體列表

一次抗體	物種	反應條件
Anti-CTEN antibody (Spring Bioscience, clone SP83)	Rabbit	1:1000、4°C、overnight
Anti-Myc antibody (Cell signaling, #2276)	Mouse	1:1000、4°C、overnight
Anti- $\alpha$ -tubulin antibody (Sigma, T6074)	Mouse	1:5000、RT、1 hr
Anti-PARP antibody (Cell signaling, #9532)	Rabbit	1:2000、RT、1 hr
二次抗體	物種	反應條件
<i>Peroxidase</i> -labeled affinity purified antibody to rabbit IgG (H+L) (KPL, 474-1516)	Goat	1:10000、RT、1 hr
<i>Peroxidase</i> -labeled affinity purified antibody to mouse IgG (H+L) (KPL, 474-1806)	Goat	1:10000、RT、1 hr

(六) 細胞培養相關：DMEM、penicillin/streptomycin、trypsin、培養皿、細胞培養箱、37 度水浴槽、生物安全櫃、離心機、顯微鏡。

(七) 其他：1.5 ml tube、p1000/p200/p20/p2 pipet、tip、滅菌釜、定量 nanodrop (超微量分光光度計)、電泳槽、qPCR machine、iScript cDNA Synthesis Kit (反轉錄 cDNA 試劑)、Lipofectamine™ 3000 transfection reagent (轉染)、Transwell。

### 三、DNA 分析

#### (一) 聚和酶連鎖反應 (PCR)

1. 取 0.2 mL 微量離心管，加入 100 ng 模板 DNA、0.4  $\mu$ M 引子、250  $\mu$ M dNTP、5 $\times$  Herculase II Reaction Buffer、1  $\mu$ L Herculase II Fusion DNA Polymerase。
2. 用無菌水調整體積至 50  $\mu$ L，放入 PCR machine 進行反應。
3. 接下來先以 95 度 30 秒，再將 95 度 30 秒、68 度 30 秒、72 度以速度 20sec/kb 幾個重複 30 次，最後再以 72 度 10 分鐘。

#### (二) DNA 片段純化

1. 將 PCR 產物或限制酶切之片段以 Gel/PCR DNA Isolation System 參照廠商提供之建議流程進行純化。

#### (三) 限制酶切質體與 PCR 產物

1. 取 1  $\mu$ g 質體或 PCR 產物加入 10 $\times$  NEBuffer、1  $\mu$ L 限制酶。
2. 以無菌水調整體積至 50  $\mu$ L，於 37 $^{\circ}$ C 下反應一小時後，升溫至 65 $^{\circ}$ C 加熱 20 分鐘終止反應。
3. 進行 DNA 電泳分析。

#### (四) DNA 接合

1. 取出限制酶作用後之質體片段和欲插入片段。
2. 使 (質體片段：欲插入片段) 莫耳數比為 (1:3)，並控制質體片段和欲插入之 DNA 片段總重為 100 ng。
3. 加入 10 $\times$  T4 DNA ligase buffer、1  $\mu$ L T4 ligase，以無菌水調整體積至 20  $\mu$ L，於 16 $^{\circ}$ C 反應過夜。

#### (五) 重組質體轉型與篩選

1. 於冰上解凍大腸桿菌勝任細胞 E. coli DH5 (100  $\mu$ L/管) 2 分鐘。
2. 取出 50  $\mu$ L 加入 ligation 產物，以手指輕彈管壁使之混合均勻後置於冰上 30 分鐘。
3. 於 42 $^{\circ}$ C 水浴下反應 45 秒，立即冰浴 2 分鐘。
4. 加入 1mLLB 培養液 (1% tryptone, 0.5% yeast extract, 1% NaCl) 混合均勻，於 37 $^{\circ}$ C

震盪培養箱中培養 1 小時。

5. 將菌液以 6000 g 離心 10 分鐘後去除上清液。

6. 懸浮菌塊塗抹於含有 50 g/ mL ampicillin 之 LB 固態培養基 (1% tryptone, 0.5% yeast extract, 1% NaCl, 1.5% agar)，於 37°C 倒置培養 16-18 小時。

7. 挑選數顆單一菌落分別接種至含有 ampicillin 之 LB 培養液，於 37°C 培養 16-18 小時。

#### (六) 質體純化

1. 以 MiniPlusPlasmidDNAExtractionSystem 參照廠商提供之建議流程進行質體純化。

#### (七) DNA 瓊脂糖膠體電泳

1. 根據欲分離的 DNA 片段分子量大小選擇瓊脂糖膠體濃度，取適量之瓊脂糖粉末加入 1× TAE buffer (40 mM Tris-acetate, 1 mM EDTA, pH=8.0)，利用微波爐加熱溶解，靜置數分鐘待冷卻。

2. 加入 10000×SYBR® Safe DNA Gel Stain (Invitrogen) 混勻，倒入鑄膠器等待凝固後，移置含有 1× TAE buffer 之電泳槽。

3. 將 DNA 樣品加入 6× Loading Dye (NEB) 混勻後注入樣品槽，以電壓 100 V 進行電泳。

4. 觀察追蹤染劑移動於膠體三分之二位置時停止電泳，以 UVP DNA 影像系統呈像。

### 四、RNA 分析

#### (一) RNA 純化

1. 以 NucleoSpin RNA (MACHEREY-NAGEL) 進行純化，再參照廠商提供之建議流程進行 RNA 純化。

#### (二) 次世代定序及差異表現基因分析

1. 本實驗委託基龍米克斯生物科技股份有限公司進行，將純化好的 RNA 樣品經由 Agilent 2100 Bioanalyzer 進行 QC 檢測，確認符合建庫需求。

2. 以 Illumina NextSeq 平台進行雙端定序，兩端各定 150 bp。定序結果利用軟體

bowtie2 進行序列比對，再經由 RSEM 定量基因表現以及 EBSeq 進行差異表現基因分析。

### (三) 設計 qPCR primer

1. 在 NCBI 網站上，找出目標基因 mRNA 的共同 variant 序列，標出兩 exon 間的邊界。
2. 在兩 exon 交界處找出一段序列，使其符合：primer 長度介於 18 至 35 mer 之間、產物長度約 100 bp、GC content 介於 40% 至 60%之間、TM 值 55 至 65 °C 間，並確保 primer 沒有自我黏合的情形。

### (四) 製備 cDNA

1. 將純化好的 RNA 以 iScript cDNA Synthesis Kit 進行反轉錄成 cDNA，再依照廠商提供之建議流程進行反轉錄。

### (五) 定量 PCR (qPCR)

1. 取 0.5  $\mu$ L 的 cDNA，加入 10  $\mu$ L 的 2 $\times$  iQ SYBR Green Supermix、0.2  $\mu$ M 引子，以無菌水調整體積至 20  $\mu$ L，以 CFX connect 機器進行定量 PCR。

表四、qPCR 反應條件

1	95°C, 3 min	
2	95°C, 10 sec	39 more times
3	60°C, 30 sec	
4	Plate reads, go step 2	
5	Melting Curve	

## 五、細胞相關實驗

### (一) 細胞培養

1. 細胞株：人類大腸癌細胞株 HCT116。
2. 細胞培養液：含有 10% 的 fetal bovine serum (FBS)、100units/mL penicillin 以及 100g/mL streptomycin 之 high glucose (4.5g/L) Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM)
3. 培養環境：培養於 5% CO<sub>2</sub>、37°C 之細胞培養箱。

### (二) 細胞繼代

1. 吸除細胞培養液，以 8 mL 無菌 PBS 緩衝溶液潤洗細胞。
2. 吸除 PBS 後加入 1 mL 0.05% trypsin-EDTA，於 37°C 培養箱反應 5 分鐘。
3. 加入 7 mL 含 10% FBS 之 DMEM 細胞培養液懸浮並打散細胞，取 1 mL 細胞液於 7 mL DMEM 細胞培養液中。

### (三) 細胞轉染 Transfection

1. 使用 Lipofectamine<sup>TM</sup> 3000 transfection reagent (Invitrogen) 於 HCT116 細胞株滿度約 70-90% 時進行轉染。
2. 取 5  $\mu$ L lipofectamine 3000 reagent，加入 125  $\mu$ L 之 serum-free EMEM 細胞培養液。
3. 另取 2.5  $\mu$ g 之 plasmid DNA 加入 125  $\mu$ L 之 serum-free EMEM 細胞培養液及 5  $\mu$ L P3000 reagent。
4. 分別混合均勻後，將兩種溶液 1:1 進行混合，置於室溫 10 分鐘。
5. 以滴狀方式緩慢滴入六孔培養盤，於 5% CO<sub>2</sub>、37°C 之細胞培養箱培養。

### (四) si-RNA knockdown 基因表現

1. 使用 Lipofectamine<sup>TM</sup> 3000 transfection reagent (Invitrogen) 轉染 siRNA 進行 knockdown HCT116 細胞株的 CTEN 基因表現，siRNA 列於表二。
2. 取 5  $\mu$ L lipofectamine 3000 reagent 以及 50 pmole siRNA 分別加入 150  $\mu$ L 之 serum-free 細胞培養液，並均勻混合。
3. 將兩種溶液以 1:1 的比例進行混合，置於室溫 10 分鐘。
4. 以滴狀方式緩慢滴入六孔培養盤後，於 5% CO<sub>2</sub>、37°C 之細胞培養箱培養。

## 六、蛋白質分析

### (一) 全細胞蛋白質萃取

1. 吸除細胞培養液後，加入 1 mL 無菌 PBS 潤洗細胞。
2. 吸除 PBS 再加入 0.5 mL 0.05% trypsin-EDTA 作用細胞，於 37°C 培養箱反應 5 分鐘。
3. 加入 1 mL 含 10% FBS 之細胞培養液懸浮並打散細胞，於室溫下以 300 g 離心 5 分鐘後吸除上清液。
4. 加入 1 mL PBS 打散、潤洗細胞，以 300g 離心 5 分鐘後去除上清液。
5. 加入 60 L Cell lysis buffer (50 mM Tris pH 7.9, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 1% v/v Triton X-100, 1 mM DTT, protease inhibitor cocktail [Calbiochem, 1:200])，均勻懸浮細胞後，插在冰上 30 分鐘。
6. 以 4°C、12000 g 離心 10 分鐘，上清液為全細胞蛋白質。

### (二) 細胞核、細胞質蛋白質之分離

1. 吸除細胞培養液後，加入 1 mL 無菌 PBS 潤洗細胞。
2. 吸除 PBS 再加入 0.5 mL 0.05% trypsin-EDTA 作用細胞，於 37°C 培養箱反應 5 分鐘。
3. 加入 1 mL 含 10% FBS 之細胞培養液懸浮並打散細胞，於室溫下以 300 g 離心 5 分鐘後吸除上清液。
4. 加入 1 mL PBS 打散、潤洗細胞，以 300g 離心 5 分鐘後去除上清液。
5. 加入 400 L Buffer A (10 mM HEPES pH 7.9, 10 mM KCl, 0.1 mM EDTA, 1 mM DTT, protease inhibitor cocktail [Calbiochem, 1:200]) 懸浮細胞，插在冰上 15 分鐘。
6. 加入 25 L 10% (v/v) NP-40 震盪 10 秒鐘，插冰上兩分鐘，再震盪 10 秒鐘後，以 4°C、400 g 離心 5 分鐘，上清液為細胞質蛋白質，轉移至新微量離心管保存。
7. 半透明沉澱則為細胞核，加入 1 mL Buffer A 以 4°C、1200 rpm 離心 5 分鐘去除上清液，總共潤洗三次。
8. 加入 100 L bufferB (20 mM HEPES pH 7.9, 400 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM DTT, protease inhibitor cocktail) 插在冰上 15 分鐘。

9. 使用超音波細胞破碎儀 (Hielscher, UP200ST) 10 watts 震盪 5 秒鐘打破細胞核，以 4°C、12000 g 離心 10 分鐘，上清液則為細胞核蛋白質。

### (三) 蛋白質膠體電泳

1. 以 10%SDS-PAGE 進行蛋白質電泳，鑄膠方法與配方依照生物科技核心實驗之實驗講義 (Center for Biotechnology 2016, National Taiwan University) 製備與操作。
2. 將蛋白質樣本加入等體積之 2× sample buffer (100 mM Tris pH 6.8, 4% SDS, 20% glycerol, 10% -mercaptoethanol, 0.2% bromophenol blue) 混合均勻，以 95°C 好的膠片裝至電泳槽中。
3. 加入適量電泳緩衝液 (25 mM Tris pH 8.3, 192 mM glycine, 0.1% SDS)，取 20 g 蛋白質樣本注入樣品槽，以 135V、80 分鐘進行電泳。

### (四) 西方墨點法

#### 1. 蛋白質轉印

- (1) 將欲轉印的 PVDF 膜浸泡於 100% methanol，在轉印槽倒入轉印緩衝液 (25 mM Tris pH 8.3, 192 mM glycine, 10% methanol)。
- (2) 組裝轉印夾，由負極往正極之方向，依序放置海綿、濾紙、電泳後膠片、PVDF 轉印膜、濾紙、海綿，注意不要有氣泡。
- (3) 確認夾緊後放入轉印槽，以 0.4 mA、1 小時進行轉印。

#### 2. 免疫呈色法

- (1) 從轉印夾取出轉印完成的 PVDF 膜，加入適量的 Gelatin-NET (50 mM Tris, 0.25% gelatin, 0.15 M NaCl, 5 mM EDTA, 0.05% tween-20, pH8.0) 於室溫下反應 1 小時。
- (2) 倒除後加入以 Gelatin-NET 稀釋之一級抗體反應 (反應條件列於表三)。反應結束後，以適量 PBST 潤洗三次，每次 10 分鐘，潤洗後加入以 Gelatin-NET 稀釋之二級抗體於室溫反應 1 小時後。
- (3) 以適量 PBST 潤洗三次，每次 10 分鐘。
- (4) 將 18 ECL 呈色劑 (Millipore) 以比例 1:1 混合 A 劑與 B 劑。
- (5) 取適量均勻加在 PVDF 膜上，以 UVP 影像系統分析。

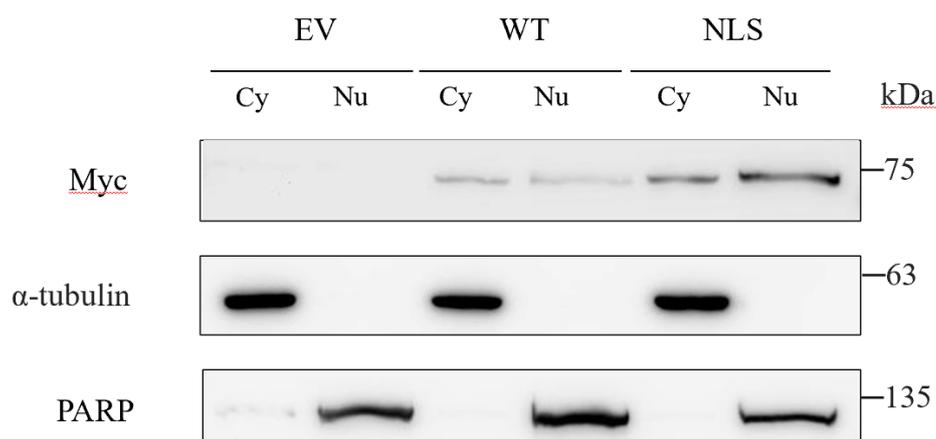
## 七、Dual luciferase assay

- (一) 利用 Dual Luciferase Reporter Assay System (Promega, E1910) 進行實驗。
- (二) 將轉染後的細胞以無菌 PBS 潤洗過後，吸除液體，並加入以無菌水稀釋適量之 1X Passive Lysis Buffer，在 4°C 中搖晃反應 15 分鐘。
- (三) 收集細胞樣本液體，於 96 孔不透明白盤中，每孔加入 20  $\mu\text{L}$  之樣本，並加入 50  $\mu\text{L}$  溶於 Luciferase Assay Buffer II 之 Luciferase Assay Substrate。
- (四) 立即以微盤式螢光冷光偵測儀 (Luminescent image analyzer, LS-304) 測冷光，讀值代表細胞中螢火蟲冷光酶 (firefly luciferase) 的活性。
- (五) 接著加入 50  $\mu\text{L}$  之 1X Stop & Glo® Substrate，再次測量冷光，讀值代表細胞中作為控制組的水母冷光酶 (Renilla luciferase) 之活性，其餘操作依照廠商建議之操作程序。

## 參、研究結果與討論

### 一、確認 HCT116 細胞中外源性 CTEN 在 EV、WT、NLS 細胞中的分布與表現量

將穩定表現 empty vector (EV), WT-CTEN (WT), NLS-CTEN (NLS) 的 HCT116 細胞株進行細胞核、細胞質分離，每個樣品各取 20  $\mu$ g 進行蛋白質電泳，並以 western blotting 分析 (圖五)。由結果可以看到 WT-CTEN 及 NLS-CTEN 蛋白質皆有大量表現，其中 WT-CTEN 蛋白質大部分分布於細胞質，NLS-CTEN 則相對有較多的量累積於細胞核中。



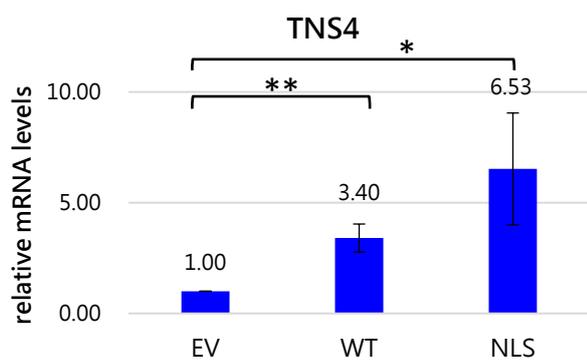
圖五、HCT116 細胞株中穩定表現外源性 CTEN 之細胞分布

分別使用 anti-MYC、anti- $\alpha$ -tubulin 及 anti-PARP 抗體進行免疫染色，其中 Nu 代表細胞核，Cy 代表細胞質， $\alpha$ -tubulin 為細胞質的 marker，PARP 為細胞核的 marker，標準分子量 (kDa) 標示於圖右側。

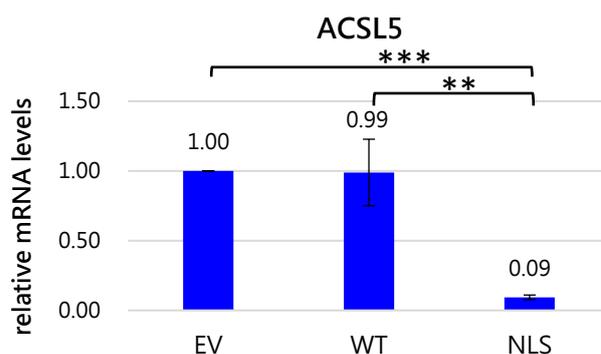
### 二、確認 CTEN 進入細胞核對目標基因表現產生的影響

#### (一) 挑選會影響大腸癌遷移能力的基因，探討 CTEN 進入細胞核對基因表現量之影響

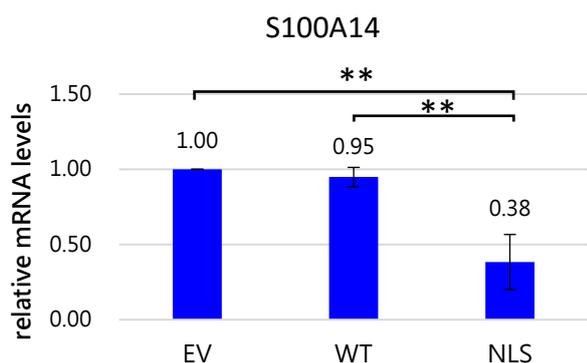
根據比較 HCT116 WT-CTEN 與 NLS-CTEN 轉錄體的結果，我們挑選出一群與癌症發展相關的差異性表現基因，主要是在癌細胞遷移及侵襲方面扮演重要的角色，包括：ACSL5、S100A14、ZNF350、APC2、WNT6 及 WNT11。接著以 qPCR 分析 EV、WT 及 NLS 細胞中，這些目標基因、CTEN 基因的 mRNA 表現量，以及 18s rRNA 表現量 (internal control)。以 EV 細胞中的表現量為基準，比較 WT 及 NLS 細胞中的 mRNA 相對表現量 (圖六至圖十二)，我們確認這些基因在 WT-CTEN 與 NLS-CTEN 細胞間的表現差異，皆符合 RNA-seq 轉錄體分析的結果。



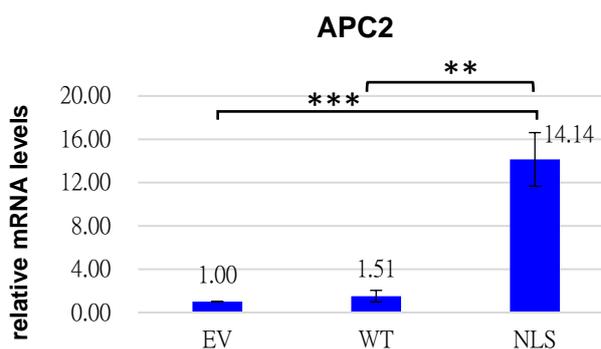
圖六、TNS4 在 EV、WT、NLS 的表現量



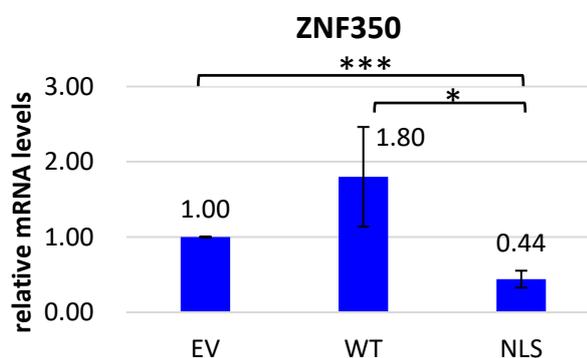
圖七、ACSL5 在 EV、WT、NLS 的表現量



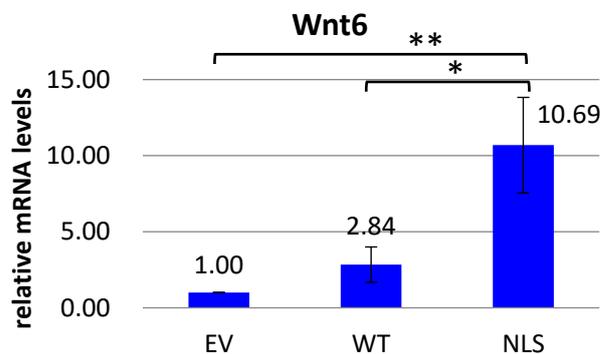
圖八、S100A14 在 EV、WT、NLS 的表現量



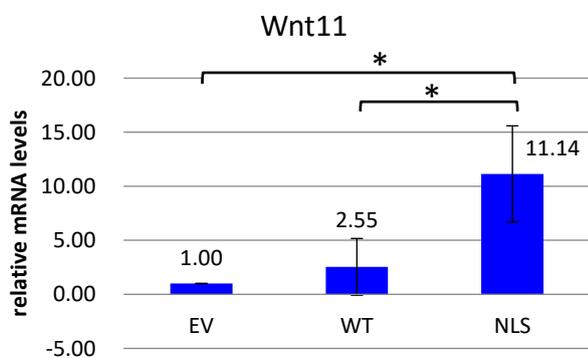
圖九、APC2 在 EV、WT、NLS 的表現量



圖十、ZNF350 在 EV、WT、NLS 的表現量



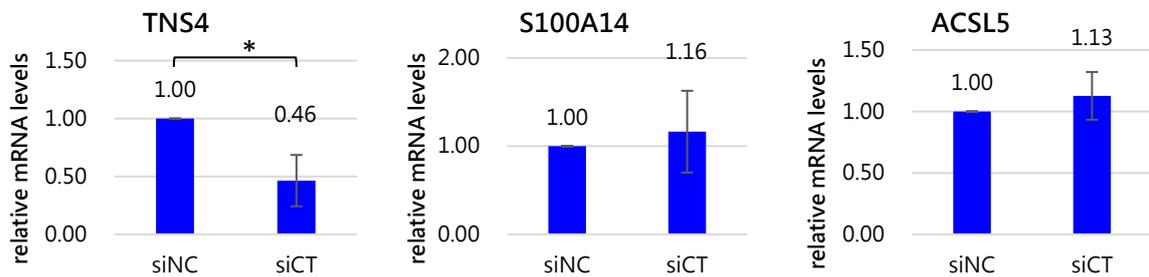
圖十一、Wnt6 在 EV、WT、NLS 的表現量



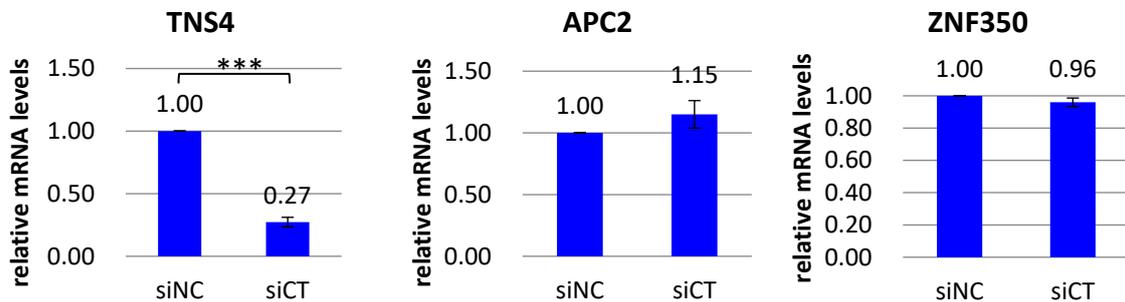
圖十二、Wnt11 在 EV、WT、NLS 的表現量

先前研究指出細胞核 CTEN 會促進細胞遷移與侵襲的能力 (王, 2017; 涂, 2019)。實驗結果顯示, 在 NLS-CTEN 中, 抑癌基因 ACSL5 (圖七)、S100A14 (圖八) 及 ZNF350 (圖十) 表現量均明顯下降, 而致癌基因 APC2 (圖九)、WNT6 (圖十一) 及 WNT11 (圖十二) 表現量均明顯上升。故我們推測 CTEN 累積於細胞核, 會降低前三者抑癌基因之表現量, 並提高後三者致癌基因的表現量, 進而促進細胞遷移與侵襲能力。

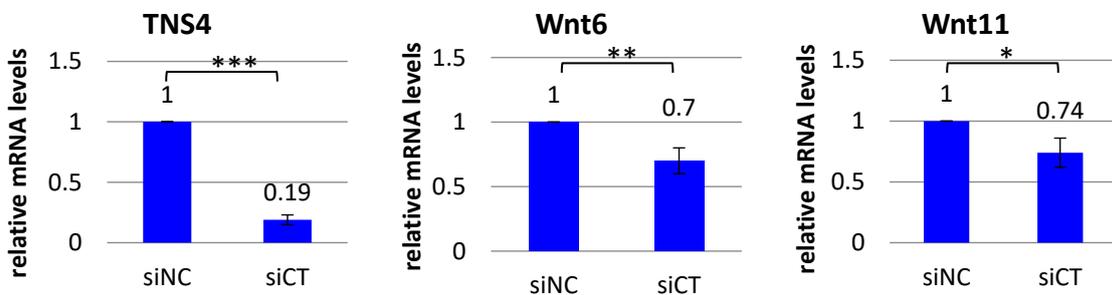
(二) 在 NLS 細胞中沈默 CTEN, 觀察基因表現量差異



圖十三、沉默 NLS 細胞中的 CTEN 對 S100A14、ACSL5 mRNA 表現量之影響



圖十四、沉默 NLS 細胞中的 CTEN 對 APC2、ZNF350 mRNA 表現量之影響



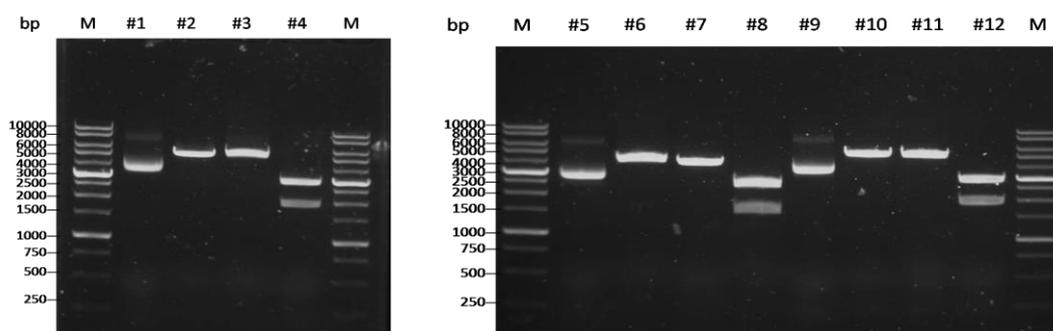
圖十五、沉默 NLS 細胞中的 CTEN 對 Wnt6、Wnt11 mRNA 表現量之影響

接著，我們以 siRNA 沉默 NLS-CTEN 細胞中的 CTEN，若上述這些基因表現的差異是由 CTEN 蛋白質不同分佈所造成的，當沉默了 NLS-CTEN 細胞中的 CTEN 後，原先在 NLS 細胞中 mRNA 表現量較高的 APC2、Wnt6 及 Wnt11，mRNA 表現量應當下降；而在 NLS 細胞中 mRNA 表現量較低的 ACSL5、S100A14 及 ZNF350，mRNA 表現量應當上升。但結果顯示，在 CTEN mRNA 表現量下降後，只有 Wnt6 及 Wnt11 的表現量符合預期，其餘基因表現量皆沒有明顯差異。故我們推測 CTEN 對 ACSL5、S100A14、APC2 及 ZNF350 沒有直接影響，並利用 Wnt6 及 Wnt11 兩基因進行接下來的實驗。

### 三、確認 CTEN 進入細胞核對 Wnt 訊息下游 $\beta$ -catenin/TCF/LEF 轉錄活性的影響

#### (一) 純化 luciferase reporter 質體並以 DNA 電泳確認

本實驗使用啟動子帶有 Wnt 訊息下游轉錄因子結合位的 luciferase 質體 TOP、FOP、pRL-TK 的 luciferase reporter 質體。TOP 質體是在內含可表現 Firefly luciferase 蛋白質之 pTA-Luc 載體上，加入可與  $\beta$ -catenin/TCF/LEF 轉錄因子結合的 TCF / LEF 結合位點於啟動子中；FOP 質體則是在同樣的載體上加入不可與  $\beta$ -catenin/TCF/LEF 轉錄因子結合的 TCF / LEF 突變結合位點；pRL-TK 質體是含有 Renilla luciferase 的載體，當作 DNA 轉染的 internal control。本實驗先純化這三種質體，並利用各自適合的切位及限制酶，藉由限制酶作用後的片段大小，確認各 luciferase 質體符合實驗設計。

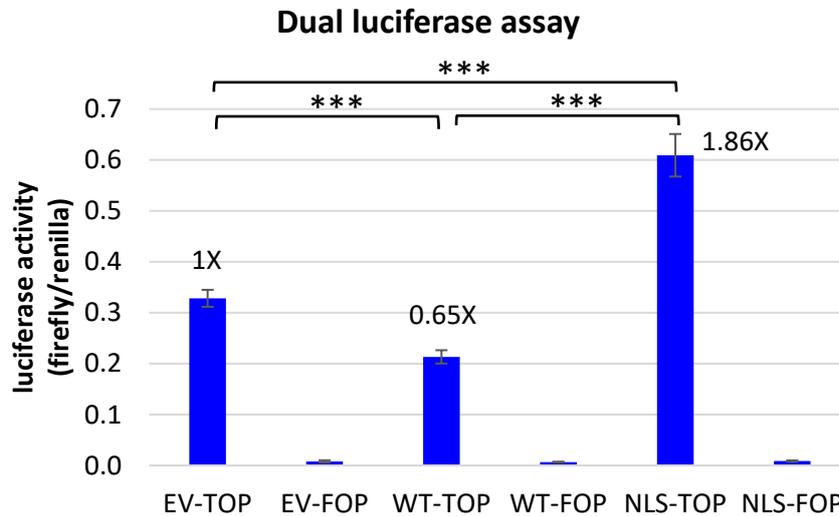


圖十六、以電泳確認 luciferase 質體

如電泳圖結果所示，#1 至#4、#5 至 #8、#9 至 #12 分別為 TOP 質體、FOP 質體、pRL-TK 質體未剪切、使用一剪切酶、使用兩剪切酶得到的片段大小結果。圖中的片段大小皆符合該質體切位應有的片段大小。

(二) 以 Dual luciferase assay 檢測 CTEN 入細胞核對  $\beta$ -catenin/TCF/LEF 轉錄活性之影響

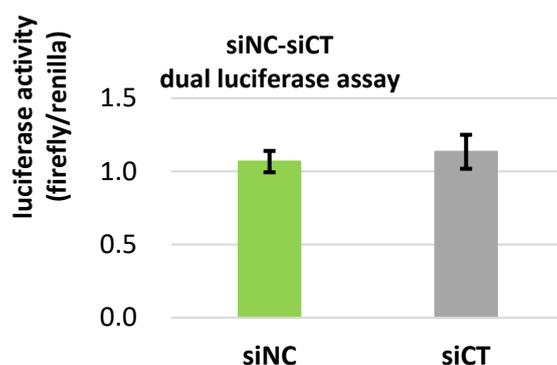
將 TOP 或 FOP 分別轉染至 EV-CTEN、WT-CTEN、NLS-CTEN 細胞中，並同時轉染 pRL-TK 質體作為 internal control，以標準化各組細胞之數據，以避免不同細胞轉染效率差異影響實驗結果，最後定量冷光強度。



圖十七、EV-CTEN、WT-CTEN、NLS-CTEN 中 luciferase 的螢光強度

結果顯示，帶有  $\beta$ -catenin/TCF/LEF 轉錄因子不能結合之啟動子的 EV-FOP、WT-FOP、NLS-FOP 的冷光強度很低，且無明顯差異，可見 CTEN 不同的分佈不能活化也不影響轉錄活性。另一方面，帶有  $\beta$ -catenin/TCF/LEF 轉錄因子可以結合之啟動子的 NLS-TOP 中的冷光強度高於 WT-TOP，可見當 CTEN 累積於細胞核內時， $\beta$ -catenin/TCF/LEF 轉錄因子的轉錄活性會比較高，顯示 CTEN 進入細胞核會活化 Wnt 訊息傳導路徑，提高其下游  $\beta$ -catenin/TCF/LEF 轉錄因子的轉錄活性。

為了進一步確認 CTEN 進入細胞核能提升  $\beta$ -catenin/TCF/LEF 的轉錄活性，我們沉默了 NLS-CTEN 細胞中的 CTEN 表現量，測定兩種細胞中的冷光強度，並預期 CTEN 沉默後冷光強度會下降。以此證明 CTEN 是透過進入細胞核，提升  $\beta$ -catenin/TCF/LEF 轉錄因子的轉錄活性，進而使下游基因 Wnt6 及 Wnt11 的表現量上升。



圖十八、si-NC 與 si-CT 細胞中 luciferase 的螢光強度

結果顯示，si-CT 細胞的冷光定量數值與 si-NC 細胞的差不多，不符合原先預期。我們推測，CTEN 的沉默並不會對轉錄活性有直接的影響（圖十八）。

## 肆、結論與應用

根據比較 HCT116 WT-CTEN 與 NLS-CTEN 轉錄體的結果，我們挑選出一群與癌症發展相關的差異性表現基因，發現在 NLS-CTEN 細胞中 APC2、Wnt6、Wnt11 基因的表現量上升，而 ACSL5、S100A14、ZNF350 基因的表現量下降。我們首先以 qPCR 實驗檢測 Wnt6、Wnt11、ACSL5、S100A14、APC2、ZNF350 的 mRNA 表現量，證實這些基因在 WT-CTEN 與 NLS-CTEN 細胞間的表現差異，皆符合 RNA-seq 轉錄體分析的結果。接著，我們以 siRNA 沉默 NLS-CTEN 細胞中的 CTEN，若這些基因表現的差異是由 CTEN 蛋白質不同分佈造成的，則我們預期 APC2、Wnt6、Wnt11 的表現量會下降，而 ZNF350、ACSL5、S100A14 的表現量會上升。結果只有 Wnt6、Wnt11 兩基因表現會因為 NLS-CTEN 細胞中 CTEN 量的減少而降低，其餘基因的 mRNA 表現量皆沒有顯著差異，顯示參與 Wnt 訊息傳導路徑的 Wnt6 與 Wnt11 的基因表現確實會受到 NLS-CTEN 的影響。我們進一步利用啟動子帶有 Wnt 訊息下游轉錄因子結合位的 luciferase reporter 質體 TOP，分別轉染至 WT-CTEN 與 NLS-CTEN 細胞中，結果發現 NLS-CTEN 細胞中的  $\beta$ -catenin/TCF/LEF 轉錄活性比 WT-CTEN 中的高，但沉默 CTEN 對此轉錄活性並無直接影響。

癌症是一個深深困擾人類的大問題，目前醫學界都還沒有完整的治療方法。我們希望可以藉由探討 Wnt6、Wnt11 基因是否會和 CTEN 互相影響來確認 Wnt 訊息傳導路徑中的分子和 CTEN 的關聯。未來我們將進一步確認 Wnt 訊息傳導路徑的表現狀態，並深入探討目標基

因對癌化轉移特性的影響。藉此，可以找出抑制 Wnt6、Wnt11 表現量上升或減少  $\beta$ -catenin/TCF/LEF 轉錄活性的方法，減緩癌症性質的發生。或許可以找出一些治療癌症的拼圖，為這困擾學界已久的問題盡一份小心力。

## 伍、參考文獻

王乙暄 (2017) CTEN 於細胞核中累積對腫瘤形成特性的影響，碩士論文，國立臺灣大學生化科技學系，臺北市。

涂淑芬 (2019) 細胞核中 CTEN 影響腫瘤形成特性與調控 NF-kB 訊息路徑之分子機制，碩士論文，國立臺灣大學生化科技學系，臺北市。

Auger, K. R., Z. Songyang, S. H. Lo, T. M. Roberts and L. B. Chen (1996). Platelet-derived growth factor-induced formation of tensin and phosphoinositide 3-kinase complexes. *Journal of Biological Chemistry*, 271(38), 23452-23457.

Basnet, S., S. Sharma, D. E. Costea and D. Sapkota (2019). Expression profile and functional role of S100A14 in human cancer. *Oncotarget*, 10(31), 2996-3012.

Calderwood, D. A., Y. Fujioka, J. M. de Pereda, B. García-Alvarez, T. Nakamoto, B.

Margolis, C. J. McGlade, R. C. Liddington and M. H. Ginsberg (2003). Integrin  $\beta$  cytoplasmic domain interactions with phosphotyrosine-binding domains: a structural prototype for diversity in integrin signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(5), 2272-2277.

Davis, S., M. L. Lu, S. H. Lo, S. Lin, J. A. Butler, B. J. Druker, T. M. Roberts, Q. An and L. B. Chen (1991). Presence of an SH2 domain in the actin-binding protein tensin. *Science*, 252(5006), 712-715.

Gorroño-Etxebarria, I., Aguirre, U., Sanchez, S., González, N., Escobar, A., Zabalza, I., ...Kypta, R.M. (2019). Wnt-11 as a Potential Prognostic Biomarker and Therapeutic Target in Colorectal Cancer. *Cancers (Basel)*, 11(7), 908. doi: 10.3390/cancers11070908.

He, Y., Sun, L.Y., Wang, J., Gong, R., Shao, Q., Zhang, Z.C. ···Shao, J.Y. (2018). Hypermethylation of APC2 Is a Predictive Epigenetic Biomarker for Chinese Colorectal Cancer. [Supplemental material]. Hindawi Journal, 2018:, 8619462 doi: 10.1155/2018/8619462

Hong, S.Y., Shih Y.P., Lo A., Lo, S.H. (2019). Identification of subcellular targeting sequences of Cten reveals its role in cell proliferation. BBA - Molecular Cell Research, 1866, 450 – 458

Inke S. Niithke, Brooke M. McCartney, APC proteins, Volume 649, 233 Spring Street, New York, New York 10013, USA, Landes Bioscience and Springer Science+Business Media, LLC, p. 8, 2009

K. Yamada, R. Pankov, E. Cukierman. (2003). Dimensions and dynamics in integrin function. Semantic Scholar, doi:10.1590/S0100-879X2003000800001

Liao, Y.C., Chen, N.T., Shih, Y.P., Dong, Y., Lo, S.H. (2009). Up-regulation of C-Terminal Tensin-like Molecule Promotes the Tumorigenicity of Colon Cancer through B-Catenin. Cancer Research, 69, 4563-4566, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-09-0117.

Lo, S.H. (2017). Tensins. Current Biology, 27, R331-R332.

Lo, S. H., P. A. Janmey, J. H. Hartwig and L. B. Chen (1994). Interactions of tensin with actin and identification of its three distinct actin-binding domains. The Journal of cell biology, 125(5), 1067-1075. doi:10.1083/jcb.125.5.1067

Pérez-Núñez, I., M. Karky, M. Fedetz, C. Barrionuevo, G. Izquierdo, F. Matesanz and A. Alcina (2019). Splice-site variant in ACSL5: a marker promoting opposing effect on cell viability and protein expression. European Journal of Human Genetics. 27, 1836 – 1844

Sachin Gopalkrishna Pai, Benedito A. Carneiro, Jose Mauricio Mota, Ricardo Costa, Caio Abner Leite, Romualdo Barroso-Sousa, Jason Benjamin Kaplan, Young Kwang Chae & Francis Joseph Giles.(2017)Wnt/beta-catenin pathway: modulating anticancer immune response.Journal of Hematology & Oncology ,101.

Sapkota, D., Bruland, O., Costea, D. E., Haugen ... S. O. (2011). S100A14 regulates the invasive potential of oral squamous cell carcinoma derived cell-lines in vitro by modulating expression of matrix metalloproteinases, MMP1 and MMP9. European journal of cancer. Advance online publication. 47(4), 600-10.doi: 10.1016/j.ejca.2010.10.012

Sebio, A., M. Kahn and H.-J. Lenz (2014). The potential of targeting Wnt/  $\beta$ -catenin in colon cancer. *Expert Opinion on Therapeutic Targets*, 18(6), 611-615.

Tanaka, H., Kuwano, Y., Nishikawa, T., Rokutan, K., Nishida, K. (2018). ZNF350 promoter methylation accelerates colon cancer cell migration. [Supplemental material]. *Oncotarget*, 9, 36750-36769. doi:10.18632/oncotarget.26353

Tilghman, R. W. and J. T. Parsons (2008). Focal adhesion kinase as a regulator of cell tension in the progression of cancer. *Semin Cancer Biol*, 18(1), 45-52. doi: 10.1016/j.semcancer.2007.08.002.

Vlad-Fiegen, A., Langerak, A., Eberth, S., Müller, O. (2012). The Wnt pathway destabilizes adherens junctions and promotes cell migration via  $\beta$ -catenin and its target gene cyclin D1. *Science Direct*, 2 (2012) 2211-5463, doi:10.1016/j.fob.2012.02.004, Pages 26-31

White BD, Chien AJ, Dawson DW (2013). Dysregulation of Wnt/beta-catenin signaling in gastrointestinal cancers. *Gastroenterology*. 2012; 142, 219 – 232. doi:10.1053/j.gastro.2011.12.001

Xu, Y. F., X. Y. Ren, Y. Q. Li, Q. M. He, X. R. Tang, ... J. Ma (2015). High expression of Talin-1 is associated with poor prognosis in patients with nasopharyngeal carcinoma. *BMC Cancer*, 15, 332. doi: 10.1186/s12885-015-1351-5

Zheng, X.L. (2018). Wnt6 contributes tumorigenesis and development of colon cancer via its effects on cell proliferation, apoptosis, cell-cycle and migration. *Oncology Letters*, 2018.8729

## 【評語】 080007

正常細胞的 C-terminal tensin-like (CTEN) 蛋白質位於細胞質且含量低，但在大腸癌細胞中會大量表現並累積於細胞核內，進而提升癌細胞遷移與侵襲的能力；本研究主要探討分析 CTEN 分布有差異之細胞株的轉錄體發現，在較多 CTEN 累積於細胞核的大腸癌細胞株中，其 Wnt6、Wnt11 兩基因的表現量上升，研究指出 Wnt6、Wnt11 皆會影響大腸癌細胞的遷移與侵襲。另外，CTEN 會與 Wnt 訊息傳遞路徑中的  $\beta$ -catenin 結合，因此本實驗利用啟動子帶有 Wnt 訊息下游轉錄因子結合位的質體，測定其下游  $\beta$ -catenin/TCF/LEF 轉錄因子的轉錄活性。

優點：研究 CTEN 於細胞核內的累積和 Wnt 訊息傳遞路徑的互動關係，進而調控細胞癌化的機制。本路徑對癌症惡化是很重要的，證明了 CTEN 累積於細胞核內，讓 Wnt6、Wnt11 兩基因的表現量上升，而影響大腸癌細胞的遷移與侵襲。另外，CTEN 會與 Wnt 訊息傳遞路徑中的  $\beta$ -catenin 結合。研究主題明確，研究步驟與方法適切，作者勢必花費一番苦功方得研究成果，值得嘉勉鼓勵。

缺點：WT-CTEN 是否會進到細胞核中？還是需要磷酸化才能進核並無交代。實驗使用可入核的 NLS-CTEN 是加上一段 nucleic

localization sequence 才可入核，跟 WT-CTEN 情況不同，所以是否會如同結論所言 CTEN 累積於細胞核內，讓 Wnt6、Wnt11 兩基因的表現量上升，而影響大腸癌細胞的遷移與侵襲？又其影響 Wnt6, Wnt11 基因是否影響其蛋白質的量，可用西方點墨法確認。其影響表現量的機制為何？

研究建議：書面報告文中第 15 頁(二)第 8 步驟「加入 100L buffer B」、(三)第 2 步驟「以 95oC 好的膠片」、第 16 頁(五)「接著加入 50L 之 1X」應有誤。圖十六的 DNA 電泳實際上無法區分 TOP、FOP、pRL-TK 三者質體 DNA 的差異。