

2022 年臺灣國際科學展覽會 優勝作品專輯

作品編號 070001

參展科別 微生物學

作品名稱 探討 I 類與 II 類的 HDAC 基因調節細胞週期
之互補功能

得獎獎項

就讀學校 臺北市立第一女子高級中學

指導教師 高承福、陳怡旻

作者姓名 蔡霈蓉、簡千喬

關鍵詞 HDAC 基因、細胞週期、釀酒酵母

作者簡介



大家好！我們是北一女中科學班的蔡霈蓉和簡千喬，由於熱愛生物參與了相關的專題研究，因緣際會加入了現在的實驗室，研究 HDAC 基因和細胞週期之間的調節。過程中歷經許多波折與邏輯炸裂的時刻，抱著一顆感激的心參與這次的國際科展。感謝指導教授、老師與學長姐在這段時間給予我們的幫助，讓我們能擁有這樣的舞台。

摘要

組蛋白脫乙酰基酶 (HDAC) 會調節染色體結構，提升基因表現。除了調控基因表現以外，HDAC 基因家族中的 I 類已知有調節細胞週期的功能，但 II 類調節細胞週期之研究甚少。而癌症臨床用藥 HDAC 抑制劑會同時阻斷 I 和 II 類之功能而產生副作用。因此本研究以釀酒酵母為對象，分析 I 類的 *RPD3*、II 類的 *HDA1* 基因對細胞週期之影響，以及 HDAC 基因剔除菌株在面臨 DNA 複製壓力時的變化。結果顯示同時失去 *RPD3*、*HDA1* 基因的菌株 S 期檢查點功能損壞、細胞滯留於 G2/M 期，且在 DNA 複製壓力環境下死亡。為釐清此菌株死亡的原因，實驗剔除在 S 期和 G2/M 期皆具調節功能的 *MAD2* 基因。得知 HDAC 基因和 *MAD2* 在 S 期的 DNA 複製起步期分別調控不同路徑；在 DNA 複製衝刺期則調控同一路徑。也發現 *RPD3* 基因在維持細胞 S 期檢查點正常作用扮演較重之角色，而 *HDA1* 則扮輔助的功能。

Abstract

Protein acetylation is mediated by histone acetyltransferase (HAT) and histone deacetylases (HDACs) which influence chromatin dynamics, protein turnover and DNA damage response. HDACs can be classified into four classes on the basis of sequence similarity. Both class I and II HDACs use Zn^{2+} as a cofactor. Class I HDACs are known for their role in modulating cell cycle, but the involvements of Class II HDACs in cell cycle regulation are less known. HDAC inhibitors have been used clinically to treat cancer, but these inhibitors usually affect both Class I and Class II HDACs, and lead to various side effects, including deregulation of cell cycle. In this study, we ask whether Class I and Class II HDACs are linked to yield a robust cell cycle control system. To address this question, we used the budding yeast as a model organism to study the potential redundant role of Class I *RPD3* and Class II *HDA1* gene in modulating cell cycle and their effects in the cellular response to replication stress. We found that the deletion of *HDA1* and *RPD3* caused defects to the S phase checkpoint, impeded the progression of G2/M phase and led to cell death under DNA replication stress. To investigate the possible mechanisms, we included *MAD2* gene into our analysis, which is known to have functions in both initiation and G2/M phase. The results show that HDAC genes and *MAD2* gene work on redundant pathways in the regulation of the replication initiation. Furthermore, our analysis implied that HDAC genes and *MAD2* epistatically regulate DNA replication elongation. Our result also indicated that *RPD3* plays a more dominant role in maintaining S phase checkpoint, while *HDA1* has a more assisting function.

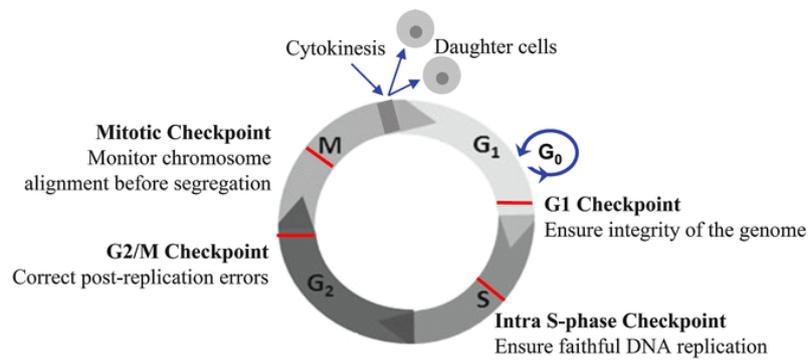
一、前言

表觀遺傳泛指不涉及 DNA 序列更動的基因表現。例如 DNA 和組蛋白的甲基化、乙醯化、磷酸化等修飾作用，均能在不改變 DNA 序列的前提下調節基因的表達。在眾多的表觀遺傳修飾中，組蛋白乙醯化(Histone acetylation)是最早也是被研究得最多的表觀遺傳修飾之一。組蛋白乙醯化會中和組織蛋白離胺酸所帶的正電荷，使其與帶負電的 DNA 結合力降低，因此可將原本纏繞較緊密的染色體結構轉成較疏鬆的型態，此現象有利於轉錄的進行而提升基因表現 (Struhl K,1998)。而組織蛋白去乙醯基酶(Histone deacetylase,HDAC)則會將乙醯基從組蛋白中的離胺酸上去除，導致染色體結構變得緊密，使轉錄因子無法接觸到調控基因進行轉錄的 DNA 序列 (promotor) 而降低基因表現 (Ruijter AJ et al.,2003)。

已知組蛋白去乙醯基酶 (HDAC)的受質除組蛋白外，還與多種蛋白質結合併，使其去乙醯化，其中包括轉錄因子和其他含量很高的細胞蛋白質，這些蛋白質會控制細胞生長、分化與凋亡。重要的是，許多癌細胞中 HDAC 的表現量會發生不正常的變化，此異常被證實與癌症發生或惡化有強烈關聯 (Glozak M A et al.,2007)。許多的 HDAC 抑制劑已被用於臨床試驗，其中一些已經獲得各國食品和藥物管理局的批准給藥和用作抗癌劑 (Suraweera A et al.,2018)。HDAC 可分為四類：Class I, II, III and IV。它們細胞生理作用、分子機制與受質各不相同，其中又以 Class I 的 HDAC1, HDAC2, HDAC3 與癌症發生相關性較強(Andrew J.Wilson et al.,2006)。但目前發展出來的 HDAC 抑制劑多為廣效型，會同時抑制 Class I 與 Class II HDAC，並常引起肝損傷、厭食、血小板減少、心律不整等副作用(Srividya Subramanian et al.,2010)。因此了解 Class I 和 Class II HDAC 基因在細胞週期調節的互動就顯得十分重要。

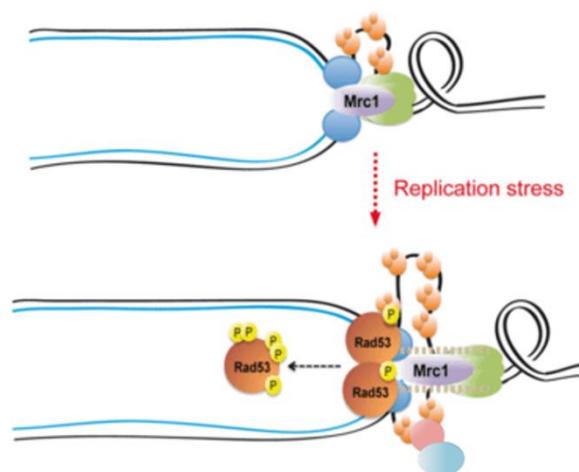
HDAC 是相當保守的基因，從釀酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)至人類的作用機制皆相似，因此許多 HDAC 作用機制的研究均以釀酒酵母作為研究模式。研究顯示酵母菌的 *RPD3* 和 *HDA1* 基因分別與人類 *HDAC I* 類和 *HDAC IIB* 類基因相關(W. Fischle et al.,2001)，具有調控細胞週期的功能。更有研究發現 Rpd3 和 Hda1 會作用於細胞週期檢查點，進而調控基因體的穩定性(Thomas Robert et al.,2014)。另一個最近的研究則是發現失去 *HDA1*、*RPD3* 基因的酵母菌會導致 DNA 複製過程的嚴重缺陷，而引起 DNA 斷裂並導致遺傳物質的不穩定 (Ortega P et al.,2019)。相對於基因表現的調控，人們對於 HDAC 在細胞週期中如何保護 DNA 複製免於遭受內在與外在因子的傷害了解甚少。因此本研究以釀酒酵母為研究模式生物，探討 I 類與 II 類的 HDAC 基因調節細胞週期之互補功能。

釀酒酵母的細胞週期與人類十分相似，皆分為第一間期(G1)，合成期(S)，第二間期(G2)以及有絲分裂期(M)(圖一)，檢查點存在於 G1 期、S 期、G2/M 期及有絲分裂期。不同之處在於酵母菌細胞週期的 G2 期和 M 期間未有明顯分割，被合併稱呼為 G2/M 期。釀酒酵母與人類皆為真核生物，兩者細胞週期調節機制相近 (Hannah Wilgar et al.,2016)，得到的實驗結果可以提供臨床參考。此外，人類細胞株多以基因沉默的方式瞭解基因功能，但酵母菌可直接藉由基因剔除，確切瞭解特定基因之功能。酵母菌檢查點已有較完整的研究，其中激酶的活化過程已有清楚的瞭解，利於作為實驗控制變因，為良好的模式生物。因此本研究使用釀酒酵母作為探討 I 類與 II 類的 HDAC 基因調節細胞週期之互補功能的對象。



圖一、釀酒酵母的細胞週期模式圖(Ma W,2014)。釀酒酵母之細胞週期分為 G1 期、S 期、G2/M 期，細胞週期檢查點存在於 G1 期、S 期、G2/M 期及有絲分裂期。

細胞週期的進行與細胞存亡密切相關，其中，DNA 複製期有許多內源性或外源性的傷害都可能導致複製進程停止，因此對細胞而言是相當危險的時期。酵母菌的 S 期檢查點具有幫助 DNA 修復的功能，如減緩去氧核糖核苷酸降解、促進修復蛋白靠近 DNA 等。在酵母菌中，Rad53 為 S 期檢查點的蛋白激酶，當 DNA 遭受複製壓力時，Rad53 會靠近 DNA 複製叉並被磷酸化(圖二)，被磷酸化的 Rad53 再激活 S 期檢查點，此時細胞停止複製過程並修復損傷的 DNA。因此磷酸化 Rad53 的出現，即代表 S 期檢查點的啟動。*RAD53* 基因在人類有同源基因 *CHEK2* (Matsuoka S et al.,1998)，可做為在人體中的對應。本研究以西方墨點法觀察菌株 Rad53 的磷酸化程度，以瞭解 *HDA1* 或 *RPD3* 剔除對 S 期檢查點的影響。



圖二、當 DNA 面臨複製壓力時，Rad53 會靠近 DNA 複製叉並被磷酸化，磷酸化的 Rad53 可激活 S 期檢查點，細胞停止 DNA 的複製，修復蛋白聚集在 DNA 複製叉修復損傷的 DNA。圖中 Mrc1 為 DNA 複製所需的 S 期檢查點蛋白，在面臨複製壓力時，負責穩定停滯的複製叉(Jossen Rachel,2021)。

在 DNA 損傷情況下，細胞週期檢查點會啟動以修復 DNA，因此在 DNA 複製壓力下較能觀察到細胞週期各階段的變化。Hydroxyurea(HU)為 DNA 複製抑制劑，透過清除酪氨酸自由基(tyrosyl free radicals)來抑制核糖核苷酸二磷酸還原酶(rNDP)，阻礙去氧核糖核苷酸(deoxyribonucleotide)的合成，造成細胞難以進行 DNA 複製，可對細胞造成 DNA 複製壓力 (Abdelghani Mazouzi et al.,2014)。因此本研究對細胞施加 HU 處理，以 spotting assay 細胞培養觀察細胞在 DNA 複製壓力下的生長狀況，並進行流式細胞分析瞭解細胞週期染色體套數分布之變化。

本研究也希望確認在 S 期不同階段 *HDA1*、*RPD3* 基因之互動情形，因此對細胞施加了 Methyl methanesulfonate (MMS) 和紫外光 (UV)。MMS 會誘導鹼基中的嘌呤甲基化，導致鹼基配對錯誤，造成 DNA 複製壓力並可能導致 DNA 雙股斷裂 (Cecilia Lundin et al., 2005)；UV 則會使胸腺嘧啶形成二聚體，導致 DNA 聚合酶無法作用，造成 DNA 複製壓力並也可能導致 DNA 雙股斷裂 (W G McGregor, 1999)。藉此得知 *HDA1*、*RPD3* 基因在 S 期作用的詳細機制。

實驗使用酵母菌 BY4741 菌株，以同源重組技術剔除 *HDA1*、*RPD3* 基因。同源重組 (homologous recombination) 是藉由酵母菌基因體之修復方式，以外來基因置換欲剔除的基因片段。實驗製作 *HDA1* 與 *RPD3* 雙基因剔除菌株作為研究對象，並以 *HDA1*、*RPD3* 單基因剔除菌株作為實驗控制。以基因剔除酵母菌株討論 *HDA1*、*RPD3* 於細胞週期所扮演的角色，提出關於 HDAC Class I 和 Class II 基因共同調控細胞週期的相關假說。

本研究從以下五點探討 HDAC Class I 和 Class II 基因共同調控細胞週期之作用機制：

- (一)、探討 HDAC Class I 和 Class II 基因對細胞週期之影響。
- (二)、探討 HDAC Class I 和 Class II 基因如何影響 DNA 損傷時細胞的反應。
- (三)、探討 HDAC Class I 和 Class II 基因協助細胞面臨 DNA 損傷之分子機制。
- (四)、探討 HDAC Class I 和 Class II 基因在 S 期中 DNA 複製起步期所扮演的角色。
- (五)、探討 HDAC Class I 和 Class II 基因在 S 期中 DNA 複製衝刺期所扮演的角色。

二、研究方法或過程

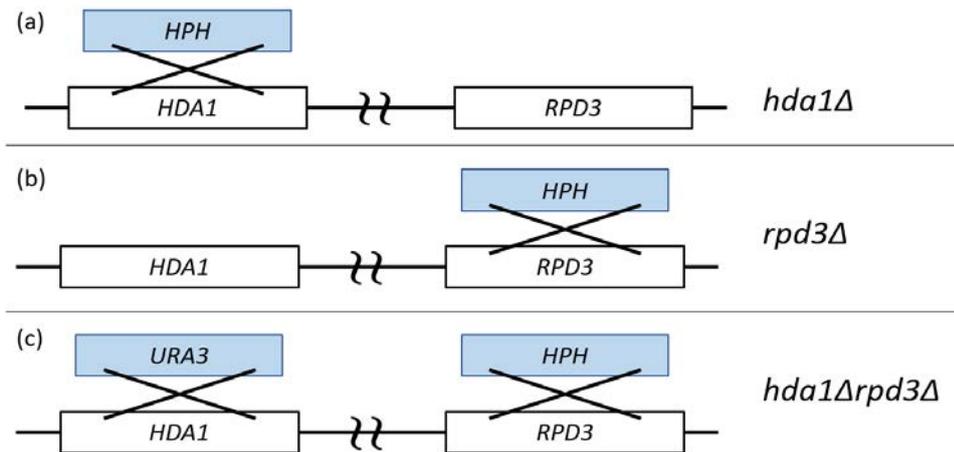
圖三、實驗流程圖。



研究中使用的菌株有：1.BY4741。為野生型菌株，以「WT」表示。2.BY4741 *hda1::HPH*。為 *HDA1* 單基因剔除的菌株，以「*hda1Δ*」表示。3.BY4741 *rpd3::HPH*。為 *RPD3* 單基因剔除的菌株，以「*rpd3Δ*」表示。4.BY4741 *hda1::URA3 rpd3::HPH*。為 *HDA1* 和 *RPD3* 雙基因剔除的菌株，以「*hda1Δ rpd3Δ*」表示。

(一)、以細胞轉型方法(Transformation)製作 *hda1Δ*、*rpd3Δ* 以及 *hda1Δ rpd3Δ* 菌株

將抗抗生素基因 *HPH* 及營養素基因 *URA3* 片段加入細胞，藉由同源重組機制使該片段插入染色體中特定的位置替代 HDAC 基因，達到基因剔除之目的。研究中使用 *URA3* 基因作為 *hda1Δ* 的 marker，*HPH* 基因作為 *rpd3Δ* 的 marker，製作同時剔除 *HDA1* 與 *RPD3* 的 *hda1Δ rpd3Δ* 菌株(圖四)。



圖四、以同源重組方式剔除酵母菌基因，製作 HDAC 基因剔除菌株。(a)使用同源重組以 *HPH* 基因替換 *HDA1* 基因，製作 *hda1Δ*。(b)使用同源重組以 *HPH* 基因替換 *RPD3* 基因，製作 *rpd3Δ*。(c)使用同源重組以 *URA3* 基因替換 *HDA1* 基因、以 *HPH* 基因替換 *RPD3* 基因，製作 *hda1Δ rpd3Δ*。

萃取含有 *HPH* 或 *URA3* 基因之酵母菌 DNA，進行聚合酶連鎖反應(PCR)得到含有 *HPH* 或 *URA3* 之基因片段作為實驗中的置換 DNA。進行同源重組之步驟，取約 1.2×10^8 個酵母菌，加入 0.1M LiOAc，離心，去除上清液。加入 240μl 50% PEG、36μl 1M LiOAc、30μl DNA、10μl ssDNA，補水至 360μl。於 30°C 培養細胞 30 分鐘，再培養細胞於 42°C 30 分鐘，離心，去除上清液後以 200μl 水回溶。將溶液塗於 YPD 培養基上，於 30°C 培養 1 天。再培養細胞於含有篩選物質 Hph 或 Ura3 的培養基中 30°C 3 天，以確認 *HPH* 基因或 *URA3* 基因確實插入菌株 DNA 中。萃取菌株 DNA，並使用 *HDA1* 引子、*RPD3* 引子進行 PCR 得到置換部分之基因片段。進行凝膠電泳，觀測其基因片段大小和原先含有 HDAC 基因時是否相同，以排除同源重組過程中未置換掉欲剔除基因之可能性，確認細胞轉型進行成功。

經由此方法製作出 *hda1Δ*、*rpd3Δ* 以及 *hda1Δ rpd3Δ* 菌株，進行後續實驗。

(二)、使用流式細胞儀觀察四種菌株的染色體套數分布

培養 50ml 細胞，拿取離心管並在各管中加入 10 μ l 10% sodium azide，讓細胞被固定於當下複製情況。收取初始細胞 1ml 作為細胞週期未被同步的

「ASYN(Asynchronous)」樣本，以瞭解細胞在正常狀況下 DNA 套數的分布情形，為實驗控制組。

加入能讓細胞保持在 G1 期的 α -factor，於 30°C 培養 2 小時，讓細胞皆處於 G1 期，收取 1ml 作為「G1」樣本。用水將 α -factor 洗掉，加入新的培養液，於 30°C 培養箱中培養。放入前培養箱前，先收取 1ml 作為「0」分鐘的起始樣本，接著每六分鐘將細胞從培養箱中取出，收取 1ml 細胞液放入對應的離心管中。之後加入 RNase 與 proteinase K 去除液體中的雜質，再加入 SyBr Green I buffer 於室溫作用 2 小時，讓染料嵌入 DNA 中以利流式細胞儀透過發光強度測定 DNA 含量。使用超聲波作用儀將細胞打散加入流式細胞管後，以流式細胞儀觀察觀察染色體套數的變化。

(三)、使用 spotting assay 細胞培養測試細胞於 HU 環境下存活狀況

spotting assay 細胞培養用於檢查酵母菌在培養基上的生長情形，觀察其對特定環境的耐受度。菌點初始細胞數為 3*10⁵，以五倍序列稀釋，取各稀釋濃度的菌液培養於培養基上，待其生長 3 至 5 天，觀察各菌落密度以判斷生長情形，低濃度培養的菌點較能看出差異。

將突變菌株以及做為控制的 WT 以濃度遞減的方式培養於控制盤(不含 HU)、含 50mM HU、含 100mM HU、與 200mM HU 的盤上，透過細胞生長密度的多寡，判斷基因剔除後，細胞對於 HU 環境的耐受度的改變。

(四)、以流式細胞儀觀察酵母菌在 HU 作用下染色體套數的變化情形

培養 50ml 細胞，拿取離心管並在各管中加入 10 μ l 10% sodium azide，固定當下 DNA 的複製情況。收取初始細胞 1ml 作為細胞週期未被同步的

「ASYN(Asynchronous)」樣本，以瞭解細胞在正常狀況下 DNA 套數的分布情形，為實驗控制組。

加入能讓細胞保持在 G1 期的 α -factor，於 30°C 培養 2 小時，讓細胞皆處於 G1 期，收取 1ml 作為「G1」樣本。用水將 α -factor 洗掉，加入含有 200mM HU 的培養液，於 30°C 培養箱中培養 1 小時 30 分鐘後收取「HU」樣本。用水將 HU 洗掉，加入培養液，於 30°C 培養箱中培養。放入培養箱前，先收取 1ml 作為「0」分鐘的起始樣本。由於 HU 的施加會導致菌株細胞週期進行的速度相較正常狀況慢，於是以二十分鐘為區間，將細胞從培養箱中取出，收取 1ml 細胞液放入對應的離心管中。加入 RNase 與 proteinase K 去除液體中的雜質，加入 SyBr Green I buffer 於室溫作用 2 小時讓染料嵌入

DNA 中以流式細胞儀透過發光強度測定 DNA 含量。最後使用超聲波作用儀將細胞打散加入流式細胞管後，以流式細胞儀觀察細胞染色體套數分布。

(五)、以西方墨點法觀察 Rad53 磷酸化程度

細胞處理方法與實驗四相同，使用 α -factor 使細胞同步於 G1 期中，將 α -factor 洗掉後加入 200mM HU 處理 1 小時 30 分鐘，再將 HU 洗掉後繼續培養細胞，並定時收取。

取已定量的蛋白質，加入 5 倍 SDS protein loading dye，加熱至 95°C 10 分鐘使蛋白質變性後，將夾有 8% SDS-PAGE 的玻璃板固定於電泳槽內，並於槽內注滿 1x Running Buffer。以 80 伏特進行電泳 30 分鐘讓蛋白質對齊，接著再以 130 伏特進行電泳至蛋白質染劑達膠體底部。

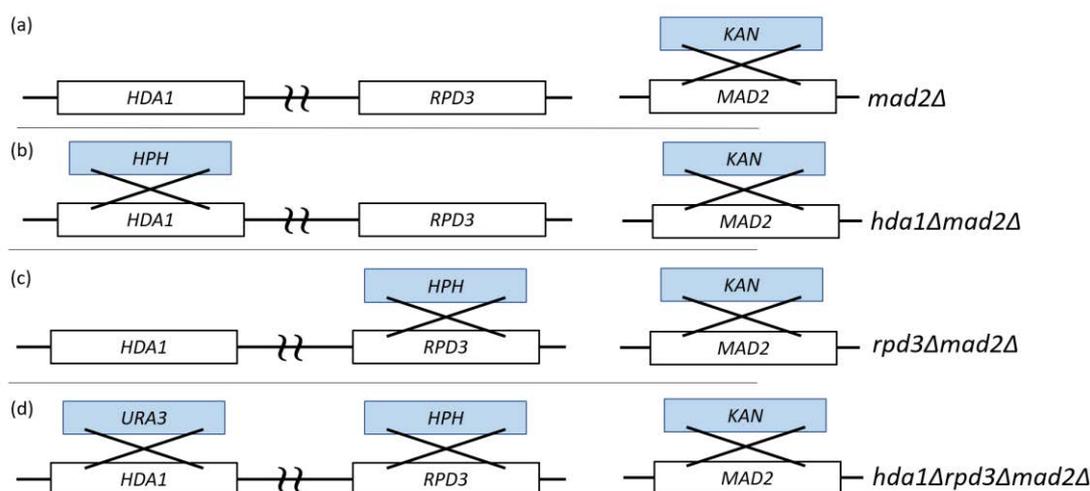
將 PVDF 轉印膜浸泡於 99% 甲醇中以活化，以負極到正的順序將海綿、3M 圖畫紙、蛋白質膠、PVDF 轉印膜、3M 圖畫紙、海綿放置於轉漬槽中，加入 1x Transfer buffer，以 200 毫安培轉漬 2 小時。接著將 PVDF 轉印膜用含 5% 脫脂牛奶的 TBST 浸泡，室溫作用 10 分鐘，避免蛋白質與抗體的非專一性結合。隨後加入一級抗體，在 4°C 搖晃作用隔夜。隔天以 TBST 清洗三次，每次 10 分鐘，加入二級抗體，室溫作用 2 小時，再以 TBST 清洗 3 次，每次 10 分鐘。清洗過後 PVDF 轉印膜加入 ECL substrate solution，顯影於底片上，使用 UVP 軟體進行拍攝。

表一、以西方墨點法觀察 Rad53 磷酸化程度所使用之抗體名稱與稀釋比例

抗體名稱	稀釋比例	廠牌
一級抗體		
Rad53	1:150	abcam
G6PDH	1:10000	abcam
二級抗體		
Mouse hrp	1:3000	abcam
Rabbit hrp	1:10000	abcam

(六)、以細胞轉型方法(Transformation)製作 *mad2Δ*、*hda1Δ mad2Δ*、*rpd3Δ mad2Δ* 以及 *hda1Δ rpd3Δmad2Δ* 菌株

將抗抗生素基因 *KAN* 片段加入 WT、*hda1Δ*、*rpd3Δ*、*hda1Δ rpd3Δ* 菌株，藉由同源重組機制使該片段插入染色體中特定的位置替代 *MAD2* 基因，達到基因剔除之目的。研究中使用 *KAN* 基因作為含 *MAD2* 基因剔除的 marker，製作 *mad2Δ*、*hda1Δ mad2Δ*、*rpd3Δ mad2Δ* 以及 *hda1Δ rpd3Δ mad2Δ* 菌株(圖五)。



圖五、以同源重組方式剔除酵母菌基因，製作 *mad2* 基因剔除菌株。(a)使用同源重組以 *KAN* 基因替換 *MAD2* 基因，製作 *mad2Δ*。(b)使用同源重組以 *KAN* 基因替換原 *hda1Δ* 菌株的 *MAD2* 基因，製作 *hda1Δ mad2Δ*。(c)使用同源重組以 *KAN* 基因替換原 *rpd3Δ* 菌株的 *MAD2* 基因，製作 *rpd3Δ mad2Δ*。(d)使用同源重組以 *KAN* 基因替換原 *hda1Δ rpd3Δ* 菌株的 *MAD2* 基因，製作 *hda1Δ rpd3Δmad2Δ*。

萃取含有 *KAN* 基因之酵母菌 DNA，進行聚合酶連鎖反應(PCR)得到含有 *KAN* 基因片段作為實驗中的置換 DNA。進行同源重組之步驟，取約 1.2×10^8 個酵母菌，加入 0.1M LiOAc，離心，去除上清液。加入 240μl 50% PEG、36μl 1M LiOAc、30μl DNA、10μl ssDNA，補水至 360μl。於 30°C 培養細胞 30 分鐘，再培養細胞於 42°C 30 分鐘，離心，去除上清液後以 200μl 水回溶。將溶液塗於 YPD 培養基上，於 30°C 培養 1 天。再培養細胞於含有篩選物質 *KAN* 的培養基中 30°C 3 天，以確認 *KAN* 基因確實插入菌株 DNA 中。萃取菌株 DNA，並使用 *MAD2* 引子進行 PCR 得到置換部分之基因片段。進行凝膠電泳，觀測其基因片段大小和原先含有 *MAD2* 基因時是否相同，以排除同源重組過程中未置換掉欲剔除基因之可能性，確認細胞轉型進行成功。

萃經由此方法製作出 *mad2*、*hda1Δmad2Δ*、*rpd3Δmad2Δ* 以及 *hda1Δ rpd3Δmad2Δ* 菌株，進行後續實驗。

(七)、進行 spotting assay 細胞培養，測試細胞於 HU 環境下存活狀況

進行 spotting assay 細胞培養，取 WT、*hda1Δ*、*rpd3Δ*、*hda1Δ rpd3Δ*、*mad2Δ*、*hda1Δ mad2Δ*、*rpd3Δ mad2Δ*、*hda1Δ rpd3Δ mad2Δ* 八種菌株的菌液。菌點初始細胞數為 3×10^5 ，以五倍序列稀釋，培養於含有 50mM HU、100mM HU、200mM HU 的培養基上，透過細胞生長密度的多寡，了解 *MAD2* 基因剔除後，細胞在 HU 環境生長狀況的的改變。

(八)、進行 spotting assay 細胞培養，測試細胞於 MMS 環境下存活狀況

進行 spotting assay 細胞培養，取 WT、*hda1Δ*、*rpd3Δ*、*hda1Δ rpd3Δ*、*mad2Δ*、*hda1Δ mad2Δ*、*rpd3Δ mad2Δ*、*hda1Δ rpd3Δ mad2Δ* 八種菌株的菌液。菌點初始細胞數為 3×10^5 ，以五倍序列稀釋，分別培養於 0.005% MMS、0.01% MMS、0.02% MMS 的培養基中。透過細胞生長密度的多寡，了解 *HDA1*、*RPD3*、*MAD2* 基因剔除後，細胞在 MMS 環境生長狀況的的改變。

(九)、進行 spotting assay 細胞培養，測試細胞於 UV 環境下存活狀況

進行 spotting assay 細胞培養，將 WT、*hda1Δ*、*rpd3Δ*、*hda1Δ rpd3Δ*、*mad2Δ*、*hda1Δ mad2Δ*、*rpd3Δ mad2Δ*、*hda1Δ rpd3Δ mad2Δ* 八種菌株的菌液以序列稀釋的方式，分別培養於 YPD 培養基上，並分別以 $50\text{W}/\text{cm}^2$ 、 $100\text{W}/\text{cm}^2$ 、 $200\text{W}/\text{cm}^2$ 的 UV 照射。透過細胞生長密度的多寡，了解 *HDA1*、*RPD3*、*MAD2* 基因剔除後，細胞在 UV 環境生長狀況的的改變。

三、研究結果與討論

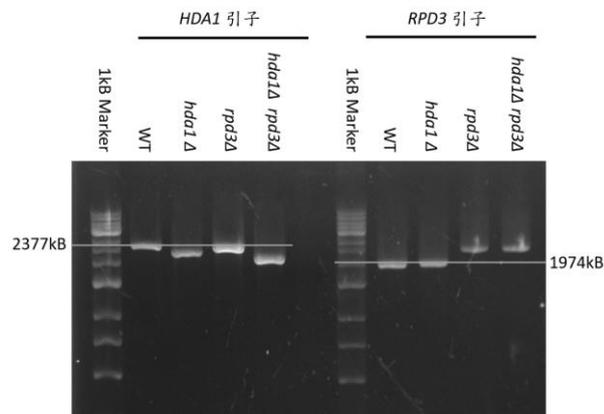
(一)、研究結果

1、使用同源重組技術製造出 *hda1Δ*、*rpd3Δ* 以及 *hda1Δ rpd3Δ* 菌株

進行細胞轉型並培養後，萃取酵母菌 DNA，使用 *HDA1* 或 *RPD3* 引子進行 PCR。進行基因片段的凝膠電泳，以確認酵母菌的 HDAC 基因片段已被抗抗生素基因 *HPH* 或營養素基因 *URA3* 取代。使用 *HDA1* 引子進行 PCR 後，細胞若內含 *HDA1*，基因片段大小為 2377kB，當 *HDA1* 被剔除後基因片段大小會改變。使用 *RPD3* 引子進行 PCR，若內含 *RPD3* 基因大小為 1974kB，當 *RPD3* 被剔除，基因片段大小會改變。

圖六左半部使用 *HDA1* 引子進行 *HDA1* 基因片段大小確認。可以看到 WT 以及 *rpd3Δ* 的基因片段大小為 2377kB，與細胞內含 *HDA1* 基因時大小一致。*hda1Δ* 經由 *HDA1* 引子 PCR 過後的片段較 WT 大，顯示其 *HDA1* 基因的成功剔除。*hda1Δ rpd3Δ* 經由 *HDA1* 引子 PCR 後的片段較 WT 大，顯示了其 *HDA1* 基因的成功剔除，且因置換入的基因片段與 *hda1Δ* 不同，PCR 片段大小也與 *hda1Δ* 不同。

圖六右半部使用 *RPD3* 引子進行 *RPD3* 基因片段大小確認。WT 以及 *hda1Δ* 的基因片段大小為 1974kB，與細胞內含 *RPD3* 基因時大小一致。*rpd3Δ* 與 *hda1Δ rpd3Δ* 經由 *RPD3* 引子 PCR 過後的基因片段較 WT 小，顯示了其 *RPD3* 基因的成功剔除。

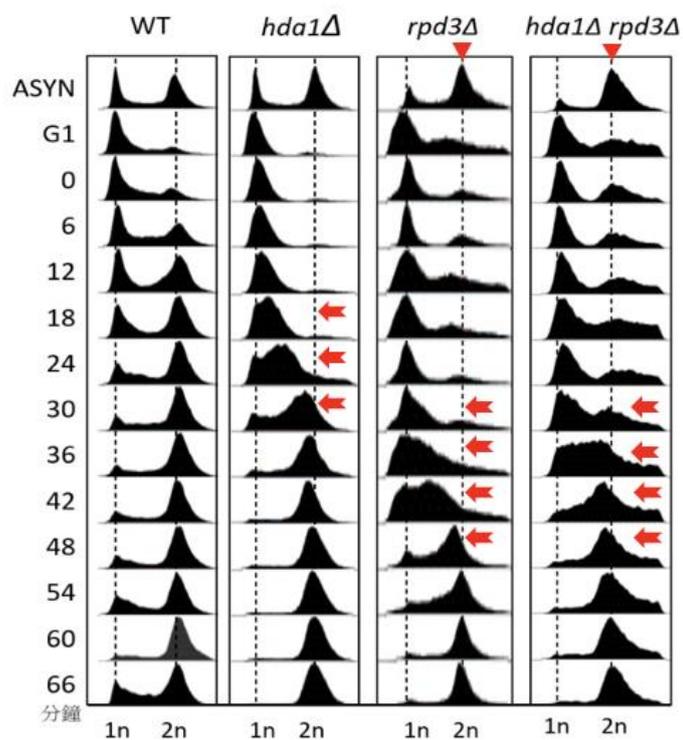


圖六、進行凝膠電泳確認菌株基因型。*hda1Δ* 與 *hda1Δ rpd3Δ* 在 2377kB 時沒有條帶，顯示 *HDA1* 基因的成功剔除。*rpd3Δ* 以及 *hda1Δ rpd3Δ* 菌株在 1974kB 時沒有條帶，顯示 *RPD3* 基因的成功剔除。

2、由流式細胞儀測定得知正常環境下 HDAC 基因剔除使細胞週期變緩慢

以流式細胞儀分析 WT、*hda1Δ*、*rpd3Δ*、*hda1Δ rpd3Δ* 四種菌株的細胞週期進程。圖七的縱虛線代表染色體套數，1n 可視為 G1 期，2n 可視為 G2 期，兩條虛線間為 S 期。每張圖的總細胞數為固定，黑色區域的高低起伏所代表的是相對細胞數。“ASYN”是整個實驗的對照組，為正常的、未被滯留在 G1 期的細胞。而細胞週期自圖中的“G1”開始隨時間推進，黑色的波峰逐漸前行，顯示細胞週期的進程在朝 G2 期前行。

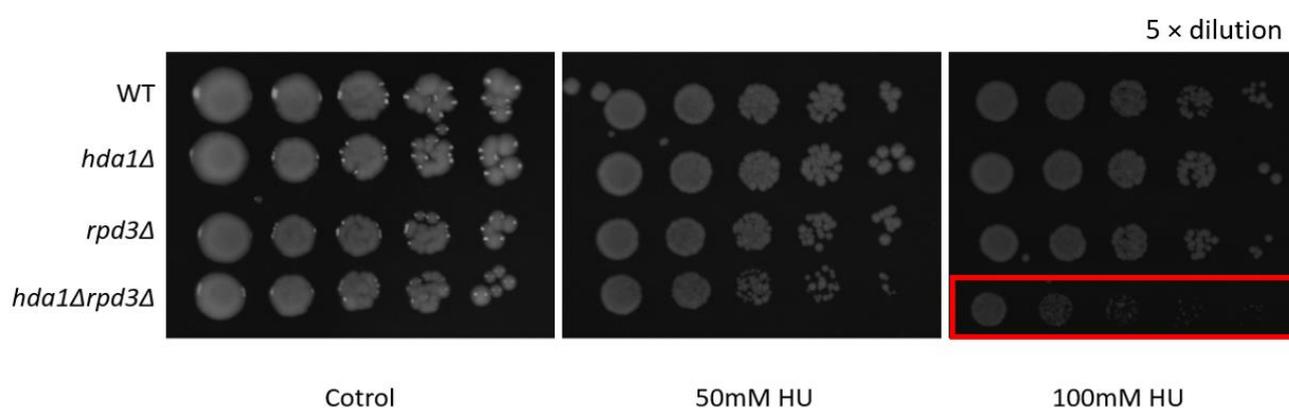
圖七中可看到 WT 菌株於 G1 開始進行細胞週期後，第 6 分鐘開始可明顯看到少許的 DNA 訊號出現在 1n 與 2n 之間。這些訊號代表細胞正在進行 DNA 合成。接著 1n 的細胞逐漸消失，同時 2n 的細胞逐漸累積，1n 與 2n 之間的訊號一直都不顯著，顯示 DNA 合成的速度快且順暢，約 30 分鐘完成此過程，之後波峰位置保持穩定。但 *hda1Δ*、*rpd3Δ*、*hda1Δ rpd3Δ* 的 DNA 合成波峰移動相較 WT 緩慢。*hda1Δ* 於 G1 釋放之後的第 18 與 24 分鐘皆可觀察到細胞大量 DNA 累積於 1n 與 2n 之間，顯示 DNA 的合成速度明顯比 WT 來的慢。而 *rpd3Δ*、*hda1Δ rpd3Δ* 細胞 DNA 累積於 1n 與 2n 更是拖延到第 30 分鐘才出現，比 *hda1Δ* 的細胞週期進程再慢，顯示這兩株突變菌細胞週期的 S 期可能存在問題。“ASYN”可觀察出細胞在未被滯留的正常狀態下，*rpd3Δ*、*hda1Δ rpd3Δ* 細胞大量累積於 2n 虛線上，顯示他們在 S 期到 G2/M 期之間應具有異常。



圖七、四種菌株在正常環境中的染色體套數分布圖。*hda1Δ*、*rpd3Δ*、*hda1Δ rpd3Δ* 的波峰移動得相較 WT 緩慢，顯示其細胞週期進行速度變慢。*rpd3Δ*、*hda1Δ rpd3Δ* 細胞 DNA 累積於 1n 與 2n 之現象則是拖延到第 30 分鐘才出現，比 *hda1Δ* 的細胞週期慢。

3、由 spotting assay 細胞培養結果得知 *hda1Δ rpd3Δ* 在含有 HU 環境中難以生長

HU 會抑制脫氧核糖核酸的生合成，使 DNA 複製停滯，造成 DNA 複製壓力，本研究期許能透過施加 HU 觀察 HDAC 基因在 DNA 複製壓力或損傷反應中扮演的角色。200mM HU 的培養基上菌株的生長狀況極差，spotting assay 結果無法比較，推測為藥物濃度過高，細胞無法長期在此環境中生長。圖八可以看出 *hda1Δ* 以及 *rp3Δ* 的生長情形與 WT 沒有太大差異。而 *hda1Δ rpd3Δ* 在 50mM HU 和 100mM HU 的培養基上，菌落明顯較 WT、*hda1Δ* 以及 *rp3Δ* 稀疏，生長情形不佳，判斷此突變株在含有 HU 的環境中難以生長。鑑於實驗中單基因剔除以及雙基因剔除菌株之間的生長差異，推測 *RPD3* 與 *HDA1* 兩基因之間有彼此重疊的作用機制，共同協助細胞面對 DNA 複製壓力。

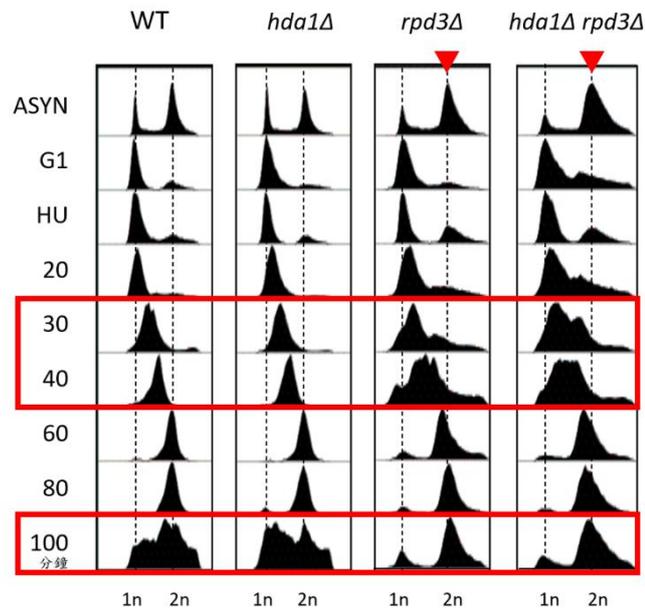


圖八、四種菌株在 50mM、100mM HU 下菌落生長情形。橫向可比較單一菌株在不同環境下的生長情形、縱向可比較不同種類細胞於相同環境的生長情形，由此圖可看出菌株之間對於同一環境耐受度的差異。HU 100mM 的右方可看到 *hda1Δ*、*rp3Δ* 菌株及 WT 的細胞數量為 2.4×10^2 時仍有細胞生長，但 *hda1Δ rpd3Δ* 菌株在細胞數量為 6×10^3 時就已幾乎無法生長。*hda1Δ rpd3Δ* 塗盤細胞數較多但生長情形仍不佳，顯示 *hda1Δ rpd3Δ* 菌株對於 HU 耐受度相較 *hda1Δ* 菌株和 *rp3Δ* 菌株低。

4、由流式細胞儀的測定得知 *rpd3Δ* 與 *hda1Δ rpd3Δ* 經過 HU 處理後，細胞週期變快且滯留在 2n 狀態

為瞭解 *hda1Δ rpd3Δ* 菌株對 HU 敏感之原因，本實驗以流式細胞儀分析 WT、*hda1Δ*、*rpd3Δ*、*hda1Δ rpd3Δ* 四種菌株處理 HU 後染色體套數分布狀況，觀察細胞週期各階段有無異常，以做分析對應。圖中的「HU」意指經 200mM HU 作用 90 分鐘後的細胞。

從圖九的 30、40 分鐘可觀察到 *rpd3Δ* 與 *hda1Δ rpd3Δ* 細胞週期相較 WT 和 *hda1Δ*，到達 S 期的速度較快。而在 100 分鐘的部分可以觀察到 WT 和 *hda1Δ* 完成一次細胞週期，即將從 2n 回到 1n，但 *rpd3Δ* 與 *hda1Δ rpd3Δ* 卻有大量細胞滯留於 2n 期而無法回到 1n 期。推測 *rpd3Δ* 與 *hda1Δ rpd3Δ* 菌株於 S 期至 G2/M 期之間可能存在問題。

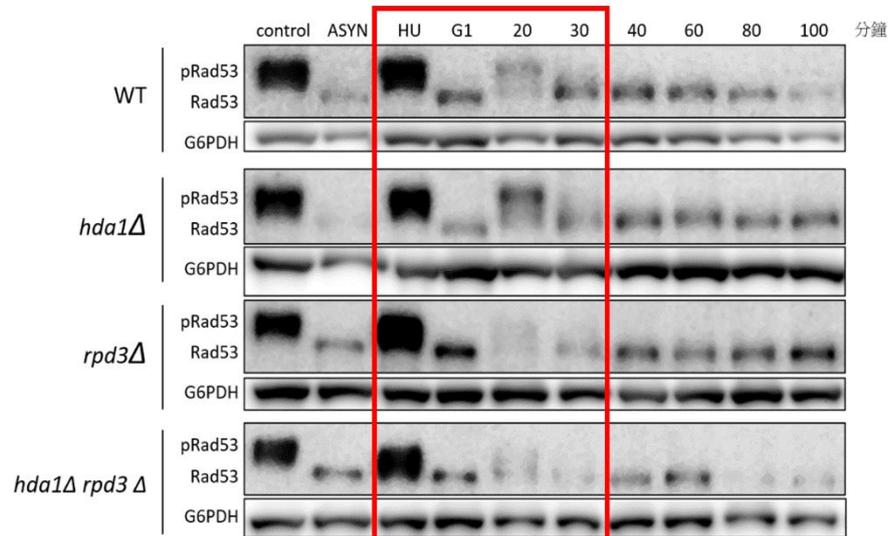


圖九、四種菌株在經 HU 處理後的染色體套數分布圖。在 30、40 分鐘，*rpd3Δ* 與 *hda1Δ rpd3Δ* 細胞週期較 WT 和 *hda1Δ*，到達 S 期的速度較快。在 100 分鐘的部分則可以觀察到 WT 和 *hda1Δ* 已完成一次細胞週期，即將從 2n 回到 1n，但 *rpd3Δ* 與 *hda1Δ rpd3Δ* 卻有大量細胞滯留於 2n 而無法回到 1n。*rpd3Δ* 與 *hda1Δ rpd3Δ* 的細胞快速進入 S 期，且停滯於 2n 階段。

5、西方墨點法結果顯示 *rad3Δ* 與 *hda1Δ rad3Δ* 經過 HU 處理，Rad53 被降解，S 期檢查點關閉

從圖九的分析已知 *rad3Δ* 與 *hda1Δ rad3Δ* 的細胞週期在 S 期進行快速，為釐清此現象是否與 S 期檢查點有關，以西方墨點法分析 HU 處理的 WT、*hda1Δ*、*rad3Δ*、*hda1Δ rad3Δ* 四種菌株 S 期檢查點激酶 Rad53 之活化現象。

圖十結果看出四種菌株在 HU 的環境下大量磷酸化，啟動檢查點的路徑被活化，代表 S 期檢查點的作用。將 HU 洗去後的 20 分鐘，WT 與 *hda1Δ* 的 Rad53 仍有活性；在 30 分鐘時磷酸化消失，推測為 DNA 修復完畢，S 期檢查點去活化，細胞週期繼續進行。但 *rad3Δ* 和 *hda1Δ rad3Δ* 菌株的 Rad53 於 20 分鐘時直接消失，推測有可能被降解，造成檢查點迅速關閉，HU 所造成的異常細胞得以不被檢查點攔下順暢通過 S 期，可以解釋 *rad3Δ* 與 *hda1Δ rad3Δ* 快速通過 S 期之原因。



圖十、四種菌株經 HU 處理後之西方墨點法結果。Rad53 為本次觀察的目標，蛋白條帶向上移且變長變糊，顯示 S 期檢查點的活化，只有一條條帶則代表檢查點未啟動。於 20 分鐘時 *rad3Δ* 與 *hda1Δ rad3Δ* 菌株的 Rad53 被降解，顯示其 S 期檢查點的關閉。橫軸「control」為 WT 的 HU 樣本，可確認四片有相同品質。G6PDH 為實驗控制組。

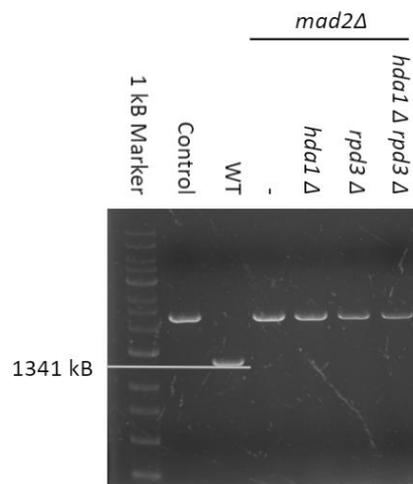
6、以同源重組技術製作 *mad2Δ*、*hda1Δ mad2Δ*、*rpd3Δ mad2Δ* 以及 *hda1Δ rpd3Δ mad2Δ* 菌株

透過前述實驗，已知在複製壓力環境下 *rpd3Δ* 與 *hda1Δ rpd3Δ* 有大量細胞滯留於 2n 期而無法回到 1n 期，且 *hda1Δ rpd3Δ* 在此環境下存活率低。為了解此現象的發生是因 S 期的異常或是 G2/M 期的異常，我們對各菌株進行 *MAD2* 基因剔除。*Mad2* 具有調控有絲分裂期檢查點的路徑蛋白的功能(David Barford, 2019)。若細胞是在有絲分裂檢查點被攔下導致細胞凋亡，那麼在剔除 *MAD2* 基因，也就是有絲分裂檢查點不作用的情況下，有損傷的細胞不會被攔下，細胞將得以繼續生長。

因此本研究製作出 *HDA1*、*RPD3*、*MAD2* 的基因剔除菌株，搭配過去製作的菌株，共有 WT、*hda1Δ*、*rpd3Δ*、*hda1Δ rpd3Δ*、*mad2Δ*、*hda1Δ mad2Δ*、*rpd3Δ mad2Δ* 以及 *hda1Δ rpd3Δ mad2Δ* 八種菌株。

進行細胞轉型並培養後，萃取酵母菌 DNA，使用 *MAD2* 引子進行 PCR。進行基因片段的凝膠電泳，以確認酵母菌的 *MAD2* 基因片段已被抗抗生素基因 *KAN* 取代。細胞若內含 *MAD2*，基因片段大小為 1341kB，當 *MAD2* 被剔除後基因片段大小會改變。

進行細胞轉型並培養後，萃取酵母菌 DNA，使用 *MAD2* 引子進行 PCR。進行基因片段的凝膠電泳，以確認酵母菌的 *MAD2* 基因片段已被抗抗生素基因 *KAN* 取代。細胞若內含 *MAD2*，基因片段大小為 1341kB，當 *MAD2* 被剔除後基因片段大小會改變。



圖十一、進行凝膠電泳確認菌株基因型。*mad2Δ*、*hda1Δ mad2Δ*、*rpd3Δ mad2Δ*、*hda1Δ rpd3Δ mad2Δ* 的基因片段與 WT 之 1341kB 不同，且和 positive control *mad::kan* 基因片段大小相同，顯示 *MAD2* 基因的成功剔除。

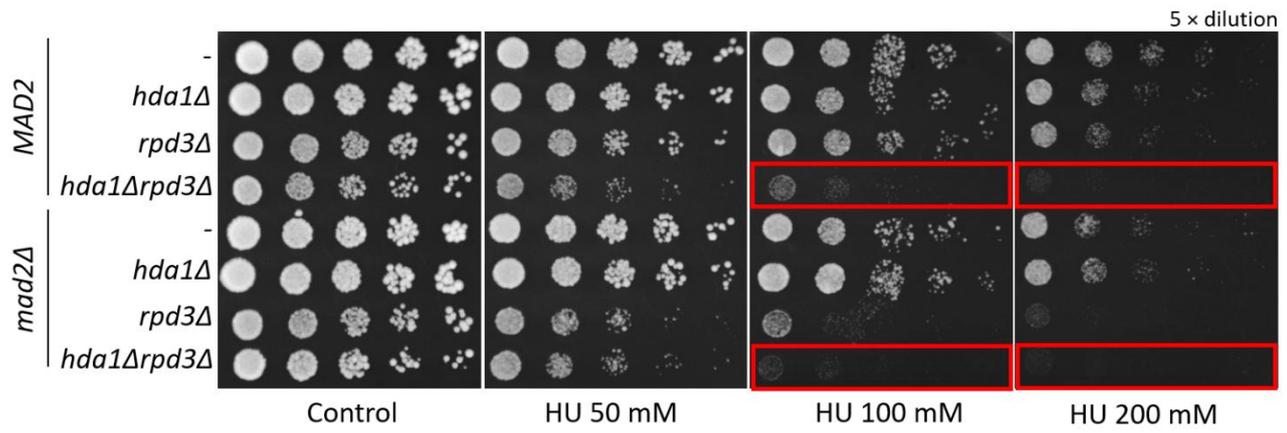
7、由 *MAD2* 基因剔除菌株的 spotting assay 細胞培養結果得知 *hda1Δ rpd3Δ mad2Δ* 在 HU 難以生長

為了解 *HDA1*、*RPD3* 基因剔除菌株是否有絲分裂檢查點被攔下導致細胞凋亡，本研究將 WT、*hda1Δ*、*rpd3Δ*、*hda1Δ rpd3Δ*、*mad2Δ*、*hda1Δ mad2Δ*、*rpd3Δ mad2Δ*、*hda1Δ rpd3Δ mad2Δ* 八種菌株進行 HU 環境下的 spotting assay 細胞培養。

對各菌株在 HU 下的生長情形進行比較，結果顯示 *hda1Δ rpd3Δ mad2Δ* 三基因剔除菌株相較於 *hda1Δ rpd3Δ* 生長狀況更差（圖十二）。據此猜測 *hda1Δ rpd3Δ* 雙突變菌株發生細胞凋亡的時期應不是在有絲分裂檢查點。

由於 *MAD2* 基因功能與 DNA 複製起步期相關(Sophie Gay et al., 2018)，且 HU 造成之 DNA 複製壓力也發生在此時期，我們從 *hda1Δ rpd3Δ mad2Δ* 生長情形最差之現象，推論剔除 *HDA1* 和 *RPD3* 基因後，會使細胞 DNA 複製起步期的進展更加困難，造成細胞對 HU 敏感度的提升。顯示 *HDA1* 和 *RPD3* 在 DNA 複製起步期有扮演角色。

為進一步了解 *HDA1*、*RPD3*、*MAD2* 基因之間的關連與調控，我們進行 *hda1Δ rpd3Δ*、*hda1Δ mad2Δ*、*rpd3Δ mad2Δ* 和 *hda1Δ rpd3Δ mad2Δ* 生長情形比較。根據 *hda1Δ rpd3Δ*、*hda1Δ mad2Δ*、*rpd3Δ mad2Δ* 生長情形比 *hda1Δ rpd3Δ mad2Δ* 佳的結果，再結合實驗三中 *RPD3* 與 *HDA1* 共同協助細胞面對 DNA 複製壓力之觀察，猜測 *MAD2* 和 *HDA1*、*RPD3* 調控 DNA 複製起步期之方式分屬不同路徑：*hda1Δ rpd3Δ* 中，仍有 *MAD2* 基因可調控 S 期且不受 *HDA1*、*RPD3* 剔除之影響，因此生長情形較好；*hda1Δ mad2Δ* 中，仍有 *RPD3* 基因可調控 S 期且不受 *MAD2* 剔除之影響，且覆蓋了被剔除的 *HDA1* 之功能，因此生長情形較好；*rpd3Δ mad2Δ* 中，仍有 *HDA1* 基因可調控 S 期且不受 *MAD2* 剔除之影響，且覆蓋了被剔除的 *RPD3* 之功能，因此生長情形也較好；*hda1Δ rpd3Δ mad2Δ* 中，調控 S 期之兩條路徑皆被阻斷，導致細胞生長情形最差。



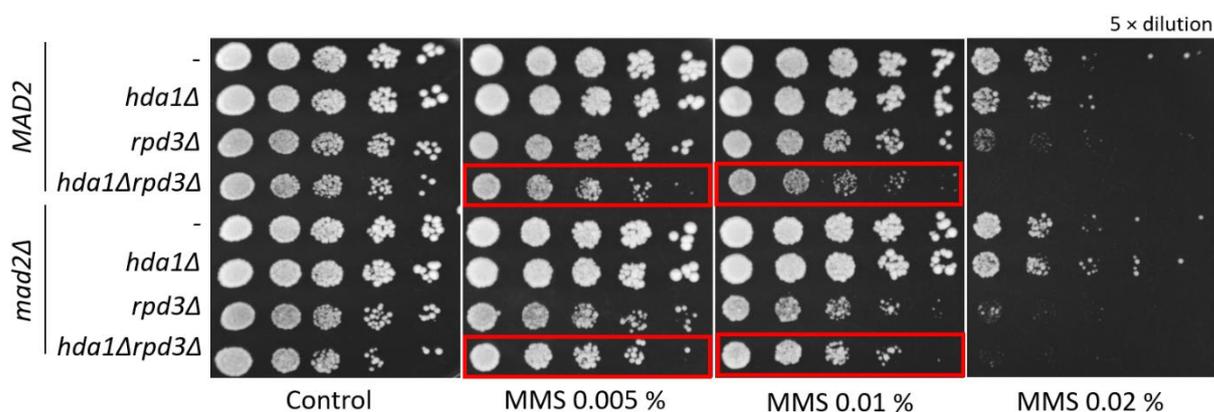
圖十二、八種菌株在 50mM、100mM、200mM HU 下菌落生長情形。橫向可比較單一菌株在不同環境下的生長情形、縱向可比較不同種類細胞於相同環境的生長情形。HU 50mM 與 100mM 之圖顯示 *hda1Δ rpd3Δ mad2Δ* 生長情形較 *hda1Δ rpd3Δ* 菌株差。

8、由 spotting assay 細胞培養結果得知在 MMS 環境下 *hda1Δ rpd3Δ mad2Δ* 生長情形良好

為了解 HDAC 基因是否對 HU 造成之複製壓力具有專一性、是否在 DNA 複製期之其他時期也有扮演角色，本研究對八種菌株進行不同劑量藥物 Methyl methanesulfonate (MMS) 的 spotting assay 細胞培養。MMS 會導致鹼基配對錯誤，造成 DNA 複製壓力並可能導致 DNA 雙股斷裂，造成之損傷發生在 S 期 DNA 複製衝刺期 (replication elongation)。*rad5Δ* 為實驗中的負控制組，在 MMS 環境下無法生長。

由圖十三上半部可見 *hda1Δ rpd3Δ* 在 MMS 中的生長情形相較 *hda1Δ*、*rp3Δ* 單基因剔除菌株差。考慮藥物 MMS 對細胞的影響是在 S 期中的 DNA 複製衝刺期，推論 *HDA1*、*RPD3* 基因可能會協助 DNA 複製衝刺期的進行，且彼此有重疊的功能，使 *HDA1*、*RPD3* 基因同時剔除後出現生長不佳的結果。

圖中顯示 *hda1Δ rpd3Δ mad2Δ* 的生長情形得較 *hda1Δ rpd3Δ* 好。根據基因的上位效應(epistatic)，推測 *HDA1*、*RPD3*、*MAD2* 基因在 DNA 複製衝刺期調控相同的路徑，因此剔除 *MAD2* 基因後，所累積對細胞的有害物質反而變少，使細胞被



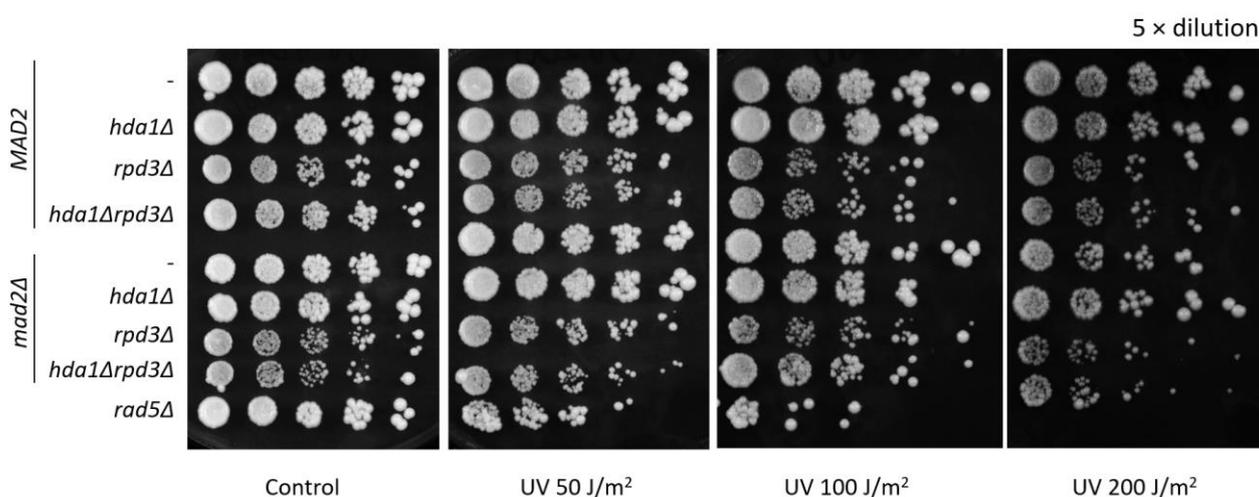
rescue。綜合上述結果，推論 *MAD2* 具有與 *HDA1*、*RPD3* 共同調控 DNA 複製衝刺期的功能。

圖十三、八種菌株在 0.005%、0.01%、0.02% MMS 下菌落生長情形。橫向可比較單一菌株在不同環境下的生長情形、縱向可比較不同種類細胞於相同環境的生長情形。*rad5Δ* 為實驗負控制組，在 MMS 環境下無法生長。0.005%以及 0.01% MMS 之圖中可比較 *hda1Δ rpd3Δ* 與 *hda1Δ rpd3Δ mad2Δ*，*hda1Δ rpd3Δ mad2Δ* 顯示生長情形較 *hda1Δ rpd3Δ* 好。

9、由 spotting assay 細胞培養結果得知在 UV 環境下各菌株生長情況沒有明顯差異

為了解 HDAC 基因是否對 HU 造成之複製壓力具有專一性、是否在 DNA 複製期之其他時期也有扮演角色，本研究也對八種菌株紫外光 Ultraviolet (UV) 的 spotting assay 細胞培養。UV 會使胸腺嘧啶形成二聚體，導致 DNA 聚合酶無法作用，可能導致 DNA 雙股斷裂，此種損傷也發生在 S 期 DNA 複製衝刺期(replication elongation)。rad5Δ 為實驗中的負控制組，在 UV 的環境下無法生長。

在 UV 的環境下，除了作為控制的 rad5Δ 無法生長外，各菌株間的生長差異並不明顯（圖十四）。

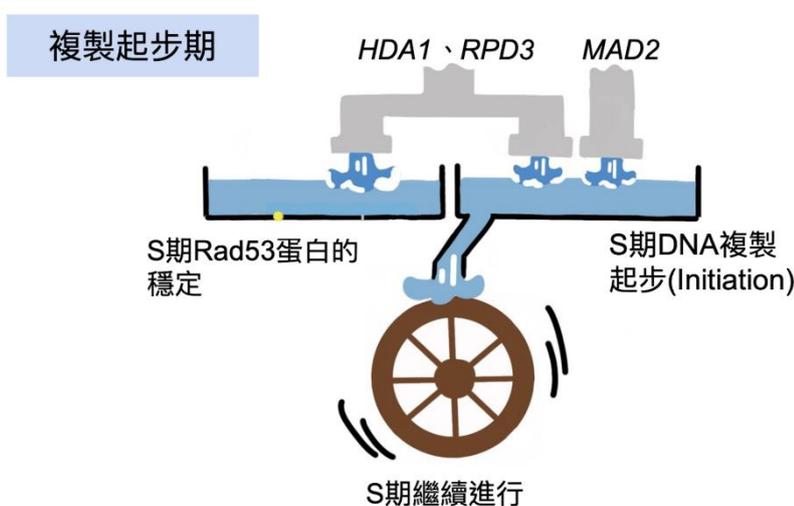


圖十四、八種菌株在 50J/m²、100J/m²、200J/m²UV 下菌落生長情形。橫向可比較單一菌株在不同環境下的生長情形、縱向可比較不同種類細胞於相同環境的生長情形。rad5Δ 為實驗負控制組，在 UV 環境中無法生長。上圖可看出各菌株間沒有明顯的生長差異。

(二)、討論

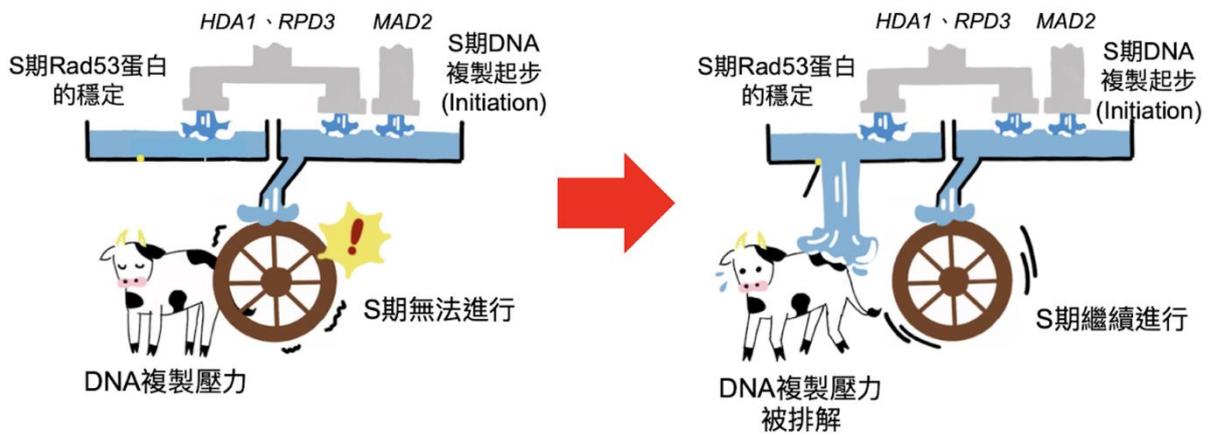
從 HU spotting assay、流式細胞儀測定、Rad53 磷酸化西方墨點法的實驗結果，我們得知 *HDA1*、*RPD3* 基因具有共同協助細胞面臨 DNA 複製壓力，使 DNA 不至於因複製壓力直接斷裂，在壓力解除後可以繼續進行複製的功能，顯示 HDAC class I 和 classII 基因在功能上的相互輔助。HDAC 基因也會維持 S 期 Rad53 蛋白的穩定，使細胞 S 檢查點正常作用，修復損傷的 DNA。利用 *MAD2* 基因具有雙重功能的特性，我們的遺傳分析 顯示 *HDA1*、*RPD3*、*MAD2* 可能共同調控 DNA 複製起步期。後續也藉由突變株對 MMS、UV 敏感度實驗，得知 *HDA1*、*RPD3*、*MAD2* 基因共同協助調控 DNA 複製衝刺期。藉由上述實驗，本研究對 HDAC 基因調控 S 期的機制了解如下：

HDA1、*RPD3*、*MAD2* 三個基因在 DNA 複製起步期的機制如圖十五，可將 *HDA1*、*RPD3* 和 *MAD2* 分別視為路徑上的水閘，調控兩條不同的路徑，只要其中一條有作用，就能順利推動 DNA 複製起步期的進行。同時 *HDA1*、*RPD3* 具有穩定 Rad53 蛋白，讓 S 期檢查點能正常作用的功能，使細胞週期在遭遇 DNA 複製壓力時停止，待 DNA 複製壓力解除後，再繼續進行細胞週期，如圖十六。



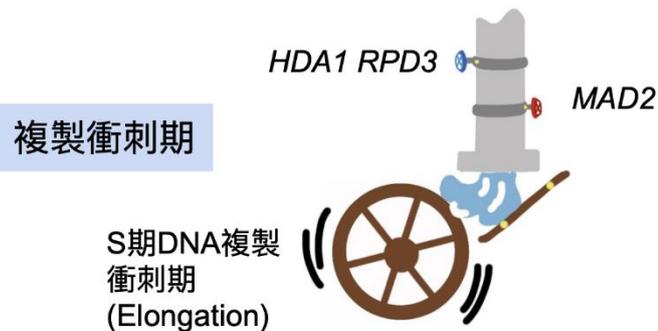
圖十五、*HDA1* 和 *RPD3* 會同時調控左右兩邊「S 期 Rad53 蛋白的穩定」「S 期 DNA 複製起步」的水槽，而 *MAD2* 則只負責左邊「S 期 DNA 複製起步」的水槽。只要 *HDA1* 和 *RPD3* 或 *MAD2* 其中一條路徑有作用，就能協助 S 期 DNA 複製起步，S 期便能繼續進行。

複製起步期



圖十六、當 DNA 複製壓力發生時，需要 *HDA1* 和 *RPD3* 調控左邊「S 期 Rad53 蛋白的穩定」的水槽之作用，於是 Rad53 蛋白使 S 期檢查點開啟，DNA 複製過程得以停止，損傷的 DNA 被修復，最終 DNA 複製壓力排解，S 期繼續進行。

HDA1、*RPD3*、*MAD2* 三個基因調控 DNA 複製衝刺期的機制如圖十七，*HDA1*、*RPD3*、*MAD2* 三基因共同調控同一路徑，維持 DNA 複製衝刺期的進行。



圖十七、*HDA1* 與 *RPD3*、*MAD2* 三基因共同調控 DNA 複製衝刺期的進行。可將 *HDA1* 與 *RPD3* 和 *MAD2* 分別視為路徑上的水閘，兩者在同時正常開啟的情況下，才能順利推動 DNA 複製衝刺期進行。

四、結論與應用

經由上述實驗以及討論，本研究得知 HDAC Class I 和 Class II 基因共同調控細胞週期之作用機制如下：

- (一)、HDAC 基因剔除菌株，細胞週期進行速度變慢。
- (二)、HDAC Class I 與 Class II 基因共同輔助細胞面臨 DNA 複製壓力時正常生長。
- (三)、在 DNA 複製壓力環境下，HDAC Class I 與 Class II 基因可共同維持 Rad53 蛋白的穩定，使 S 期檢查點得以正常作用，修復損傷的 DNA。
- (四)、HDAC Class I 與 Class II 基因會共同作用，並與 *MAD2* 基因以不同路徑共同調控 S 期中的 DNA 複製起步期，使細胞得以正常進行複製。
- (五)、HDAC Class I 基因、Class II 基因和 *MAD2* 基因在 S 期中的 DNA 複製衝刺期調控同一路徑，維持 DNA 複製衝刺期的進行。

表觀遺傳在癌症治療上的應用是迅速發展、具有前景的領域。組蛋白脫乙酰基酶抑制劑 (HDACi) 可抑制 HDAC 的功能，調節組蛋白和非組蛋白的活性。這些化合物在表觀遺傳或非表觀遺傳調控中都發揮重要作用。這些抑制劑已被顯示出可誘導癌細胞分化、細胞週期停滯和細胞凋亡的能力，因此是一個相當好的治療選擇，特別是對於那些不適合用強化化療的患者。

儘管 HDACi 的臨床前結果具有前景，但是 HDACi 確切的作用機制仍不清楚。因此需要更多的基礎研究，來深入了解 HDAC 的分子作用機制，以及缺乏 HDAC 對細胞的影響，才能了解 HDACi 對抗疾病的潛在作用。以 HDAC 作用機制為基礎，在設計下一代 HDACi 時改善治療反應，並避免副作用。透過我們的研究，一步一步將分子機制找出來，就有可能會實現 HDACi 的臨床的全面應用，這將是癌症治療是非常關鍵的一步。

五、參考文獻

- Abdelghani Mazouzi, Georgia Velimez, Joanna I. Loizou. (2014). DNA replication stress: Causes, resolution and disease. *Experimental Cell Research*, Volume 329, Issue 1, Pages 85-93.
- Andrew J. Wilson, Do-Sun Byun, Natalia Popova, Lucas B. Murray, Kaitlin L'Italien, Yoshihiro Sowa, Diego Arango, Anna Velcich, Leonard H. Augenlicht, John M. Mariadason. (2006). Histone Deacetylase 3 (HDAC3) and Other Class I HDACs Regulate Colon Cell Maturation and p21 Expression and Are Deregulated in Human Colon Cancer. *Journal of Biological Chemistry* Volume 281, Issue 19, 12 May 2006, Pages 13548-13558.
- Cecilia Lundin, Matthew North, Klaus Erixon, Kevin Walters, Dag Jenssen, Alastair S. H. Goldman, Thomas Helleday. (2005). Methyl methanesulfonate (MMS) produces heat-labile DNA damage but no detectable in vivo DNA double-strand breaks. *Nucleic Acids Research*, Volume 33, Issue 12, 1 July 2005, Pages 3799–3811
- de Ruijter AJ, van Gennip AH, Caron HN, Kemp S, van Kuilenburg AB. (2003). Histone deacetylases (HDACs): characterization of the classical HDAC family. *The Biochemical Journal* 370 (Pt 3): 737–49. PMC 1223209. PMID 12429021. doi:10.1042/BJ2002132
- David Barford. (2019). A MAD way to regulate mitosis. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* volume 20, 135 page Gjaever G, et al. (2002) Functional profiling of the *Saccharomyces cerevisiae* genome. *Nature* 418(6896):387-91.
- Glozak M A and Seto E. (2007). *Oncogene*. Aug 13;26(37):5420-32. doi:10.1038/sj.onc.1210610.
- Hannah Wilgar, Steve Scott. (2016). Using yeast in biology. Yourgenome. <https://www.yourgenome.org/stories/using-yeast-in-biology>.
- Jossen Rachel, Bermejo Rodrigo. (2021). The DNA damage checkpoint response to replication stress: A Game of Forks - Scientific Figure on ResearchGate.

- Kha, N. T., Mun, S.-H., Lee, C.-S., & Hwang, C.-S.(2018). Control of protein degradation by N-terminal acetylation and the N-end rule pathway. *Exp. Mol. Med.* 50, pages 1–8
- OH Kra mer, SK Knauer, D Zimmermann, RH Stauber ,T Heinzl.(2008).Histone deacetylase Inhibitors and hydroxyurea modulate the cell cycle and cooperatively induce apoptosis. *Oncogene*27, 732–740.
- Ortega P, Gomez-Gonzalez B, Aguilera A.(2019).Rpd3L and Hda1 histone deacetylases facilitate repair of broken forks by promoting sister chromatid cohesion. *Nat Commun.*2019;10:5178.doi:10.1038/s41467-019-13210-5.
- Ma W.(2014).Cell Cycle Checkpoint. In: Schwab M. *Encyclopedia of Cancer*. Springer, Berlin, Heidelberg.
- Matsuoka S, et al. (1998) Linkage of ATM to cell cycle regulation by the Chk2 protein kinase. *Science* 282(5395):1893-7.
- Matsuoka S, et al. (1998) Linkage of ATM to cell cycle regulation by the Chk2 protein kinase. *Science* 282(5395):1893-7
- Srividya Subramanian,Susan E. Bates, John J. Wright, Igor Espinoza-Delgado, Richard L. Piekarz.(2010).Clinical Toxicities of Histone Deacetylase InhibitorsPublished online 2010 Aug 26.3(9): 2751–2767.
- Struhl K. Histone acetylation and transcriptional regulatory mechanisms.(1998) *Genes & Development.*12 (5): 599–606. PMID 9499396.doi:10.1101/gad.12.5.599
- Suraweera A, O’Byrne KJ, Richard DJ.(2018).Combination therapy with Histone Deacetylase Inhibitors (HDACi) for the treatment of cancer: achieving the full therapeutic potential of HDACi. *Front Oncol.* 2018;8:92. doi:10.3389/fonc.2018.00092.
- Sophie Gay, Daniele Piccini, Christopher Bruhn, Walter Carotenuto, Stefano Biffo, Marco Foiani.(2018).A Mad2-Mediated Translational Regulatory Mechanism Promoting S-Phase

Cyclin Synthesis Controls Origin Firing and Survival to Replication Stress. *Molecular Cell* 70, 628–638 May 17, 2018 a 2018 The Author(s). Published by Elsevier Inc.

Thomas Robert, Fabio Vanoli, Irene Chiolo, Ghadeer Shubassi, Kara A. Bernstein, Rodney Rothstein, Oronza A. Botrugno, Dario Parazzoli, Amanda Oldani, Saverio Minucci, Marco Foiani. (2014). HDACs link the DNA damage response, processing of double-strand breaks and autophagy. *Nature*. 2011 Mar 3; 471(7336): 74–79.

W. Fischle, V. Kiermer, F. Dequiedt, E. Verdin *Biochem.* (2001), The emerging role of class II histone deacetylases. *Cell Biol.*, 79, pp. 337-348

W G McGregor. (1999). DNA repair, DNA replication, and UV mutagenesis. *National Library of Medicine* 10.1038/sj.jidsp.5640172

Xujun Ma, Hany H Ezzeldin, Robert B Diasio. (2009). Histone deacetylase inhibitors: current status and overview of recent clinical trials. *National Library of Medicine*

【評語】 070001

In this study of “ The redundant role of Class I and II HDACs in modulating cell cycle” , the students investigated the role of two HDACs in the budding yeast. Over all, this is a very thorough study for high school students. The students presented their work in fluent English. However, when asked about general questions such as the background information, the logics of the experimental designs, or the interpretation about the results, the students did not handle very well. Although they have a lot of data, they do not seem to have very concrete grasp on their project.