中華民國第 60 屆中小學科學展覽會

作品說明書

高級中等學校組　動物與醫學科

第二名

052008

探討組蛋白脫乙醯酶 HDAC7 對於癌細胞 DNA 損傷修復機制之影響

學校名稱：臺北市立第一女子高級中學

作者：	指導老師：
高二　崔立妤	李宏孝
高二　陳芷妤	許一懿

關鍵詞：DNA 損傷、細胞週期檢查點、癌症

摘要

DNA 損傷導致的基因體不穩定是癌症的共同特徵，而 DNA 損傷反應 (DDR) 負責維持基因體完整。DDR 的活化可阻滯細胞週期並啟動 DNA 修復，其過程受許多因素調控，包括多種轉譯後修飾如乙醯化、小泛素化等。HDAC7 是組蛋白脫乙醯酶，該家族成員有多個已被證實參與 DDR 且在多種癌細胞中常過量表現。最近研究發現 HDAC7 具小泛素蛋白 E3 連接酶活性，但相關研究甚少，因此欲探討 HDAC7 在 DDR 所扮演的角色。

本研究使用西方墨點法、免疫螢光染色、流式細胞儀分析、細胞活力檢測系統和細胞群落形成能力實驗，發現以 RNAi 技術將細胞的 HDAC7 基因沉默後會降低 DNA 損傷引起的 ATR-Chk1 及 ATM-Chk2 訊號強度，使不能有效率活化檢查點，並對 DNA 損傷藥物較敏感。由以上結果顯示，HDAC7 有潛力做為抗癌藥物研發的新目標。

壹、 研究動機

一、文獻探討

(一) DNA 損傷反應 (DNA damage response)

細胞內的 DNA 經常受到損傷，而損傷可能來自於外源性如游離輻射 (IR)、紫外線 (UV) 或內源性物質如細胞新陳代謝所產生之自由基的攻擊。此外，快速增生中的細胞其 DNA 複製也常會出現錯誤甚至造成複製壓力 (replication stress)，上述原因都會導致基因體異常及不穩定。而基因體的不穩定會對生物體造成嚴重後果，例如胚胎無法正常發育或造成細胞癌化及其他遺傳疾病的發生。為維持基因體穩定性，細胞利用嚴密且複雜的 DNA 損傷反應 (DNA damage response，DDR) 負責偵測與修復 DNA 損傷。當 DNA 發生損傷，一些損傷感知因子能夠聚集到損傷部位並活化上游的訊息傳遞機轉，包括兩條主要的訊息傳導路徑：ATR-Chk1 及 ATM-Chk2 pathway。當這兩條路徑被活化，細胞週期會被停止以避免 DNA 錯誤或損傷增多，同時啟動修復程序。不同的損傷通常有相對應的訊息傳導路徑會被活化，如圖一所示。

1. ATR-Chk1 pathway

當 DNA 發生單股斷裂(Single-Stranded DNA Breaks, SSBs)時，單股的 DNA 會被 RPA 蛋白複合體 (RPA70-32-14) 包覆上。RPA 結合單股 DNA 可做為一個平台，吸引 ATR-ATRIP 蛋白複合體結合上去，同時更多的 DNA 損傷修復蛋白也被吸引至此處，其中 TopBP1 與 ATR-ATRIP 複合體結合後促使 ATR 於 T1989 位點自體磷酸化進而完整活化 ATR。活化的 ATR 會藉由磷酸化下游的受質蛋白來活化整個 DNA 損傷反應，包含 Chk1 S317、S345 及

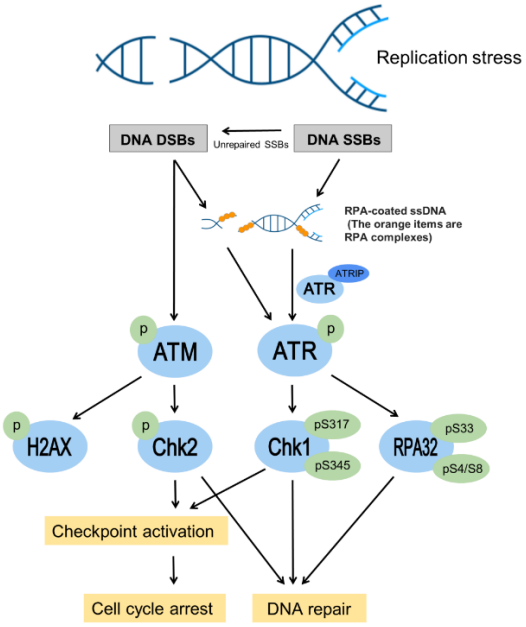
RPA32 S33 位點，磷酸化的 Chk1 會活化細胞週期檢查點，造成細胞週期阻滯，細胞得以進行 DNA 修復。而磷酸化的 RPA32 會讓其他激酶 (DNA-PKcs、ATM) 加入且磷酸化 RPA 的其他位點如 S4/S8，RPA 的高度磷酸化能促使更多 DNA 損傷修復蛋白加入。複製壓力是活化 ATR-Chk1 pathway 的主因，因此 ATR-Chk1 pathway 的活化主要發生在 S phase。

2. ATM-Chk2 pathway

在各式的 DNA 損害之中，雙股 DNA 的斷裂是最嚴重的基因體傷害。當 DNA 發生雙股斷裂時 (Double-Stranded DNA Breaks, DSBs)，MRN 複合體會使 ATM S1981 位點磷酸化。磷酸化的 ATM 會再使 H2AX 磷酸化成 γH2AX 以進行同源重組修復，同時也會磷酸化 Chk2 T68 位點。磷酸化的 Chk2 會活化細胞週期檢查點，造成細胞週期阻滯，且主要發生於 G1 phase 或 G2 phase。

3. 細胞週期檢查點 (Cell cycle checkpoints)

檢查點由一系列的蛋白組成，有些能直接與受損或異常的 DNA 結合，有些則為激酶 (kinase)，扮演訊息傳遞的功能。上游的激酶 (如 ATM、ATR) 透過蛋白質的磷酸化修飾將訊息傳遞給下游的激酶 (如 Chk1、Chk2)，最終的細胞反應則藉由一些磷酸化的功能性蛋白 (如 p53) 來執行。主要負責調控檢查點的激酶是 Chk1 及 Chk2，Chk1 主要由 ATR 活化，Chk2 則是由 ATM 活化。細胞週期檢查點是 DNA 受到損傷後會啟動的一項機制，Chk1 及 Chk2 會使細胞週期暫停並促使細胞將基因修復，修復成功後進入下一期，修復失敗則會凋亡。除了活化細胞週期檢查點外，ATR/ATM 也藉由磷酸化的方式激活數百個下游的受質蛋白，進而調控整個 DNA 損傷反應以及細胞內的各項生理運作。



圖一、DNA 損傷後訊息傳遞圖 (Weber and Ryan, 2015)

(二) 組蛋白脫乙醯酶（Histone deacetylase, HDAC）

1. 簡介

在染色體中，組蛋白(histones)乙醯化(acetylation)和脫乙醯化(deacetylation)是調控基因表現的關鍵因素之一，組蛋白的乙醯化可促使盤旋纏繞組蛋白的染色絲打開，以便 DNA 鬆開進行複製和表現;反之脫乙醯化則會使DNA和組蛋白綑綁緊密,造成DNA不易複製，進而影響並抑制基因表現，因此組蛋白乙醯化狀態為決定基因轉錄之重要因素，組蛋白的脫乙醯化作用即由 HDAC 負責執行。此外，HDACs 的脫乙醯化活性不僅只作用在組蛋白上，也能作用在其他的非組蛋白上，例如 p53、NF-κB 等，進而調節細胞的生理功能。

2. HDAC 與癌症

許多研究顯示，HDAC 家族的成員與癌症的形成高度相關，癌症細胞會表現較高的 HDAC 活性,例如在胃癌、前列腺癌、大腸癌和乳癌中都可以發現 HDAC1 的表現量增加，而在子宮頸癌和胃癌中，HDAC2 也會過量表現。HDACs 藉由增加染色體致密性而阻斷某些抑癌基因的表現，故利用脫乙醯酶抑制劑(histone deacetylase inhibitors, HDACi)，可抑制組蛋白脫乙醯酶的活性,使 DNA 鬆開以利於抑癌基因表現,有助於改變癌細胞生長周期、停滯及分化，並促進癌細胞凋亡，最終抑制腫瘤細胞生長，達到治療癌症效果。

3. HDAC7 與蛋白質的小泛素化修飾

HDAC7 是 HDAC 家族成員中較少被研究者，除了其脫乙醯酶活性外，HDAC7 最近也被證明具有 SUMO E3 連接酶活性,該酶可以增強 SUMO(small ubiquitin-related modifier)蛋白的結合能力。小泛素化 (SUMOylation) 與泛素化（ubiquitination）為細胞中重要的蛋白質轉譯後修飾機制，兩者的生化修飾過程類似但生理意義卻不同。小泛素蛋白可以透過激活酶 (E1)、結合酶 (E2) 以及連接酶 (E3) 的催化作用，將小泛素蛋白分子連接到目標蛋白上。不同於泛素化修飾會導致目標蛋白質的降解，蛋白質的小泛素化修飾則具有多種生理功能，例如維持基因組穩定性、介導蛋白質之間的交互作用、調節蛋白質在細胞內的定位、調控轉錄因子活性、參與訊息傳遞及 DNA 損傷修復等。SUMO pathway 已經顯示出可以直接調節 ATR-Chk1 pathway 以及 DNA 修復網絡。

二、研究動機

過往一直認為 ATM-Chk2 和 ATR-Chk1 的活化過程中僅是一系列蛋白的磷酸化。然而，越來越多的證據顯示在磷酸化之外，包含泛素化 (ubiquitination)、 小泛素化(SUMOylation)、乙醯化等的轉譯後修飾也扮演著相當重要的調控角色。至今為止，關於 HDAC7 的研究甚少，鑑於 HDAC7 具有雙重酵素活性(脫乙醯化和 SUMO 化)，我們好奇它是否參與在 DNA 損傷反應中並希望找出它的作用機制，更希望透過降低 HDAC7 的表現抑制腫瘤的生長，作為抗癌藥物研發的標的。

貳、研究目的

探討 HDAC7 在 DNA 損傷反應中的角色，分為以下四點：

一、探討 HDAC7 對於 ATR-Chk1 及 ATM-Chk2 訊息傳遞路徑的影響

二、觀察 HDAC7 對於 DNA 損傷修復蛋白聚集至損傷位點情形的影響

三、探討 HDAC7 對細胞週期進程的影響

四、探討在不同抗癌藥物處理下，HDAC7 基因沉默對癌細胞存活率的影響

參、研究設備及器材

一、 細胞株

人類子宮頸癌 HeLa 細胞株、人類骨肉瘤 U2OS 細胞株

二、 藥品及試劑

siRNA (small interfering RNA，小干擾核糖核酸)、 PBS (Phosphate buffered saline，清洗緩衝液)、DMEM Medium、FBS (Fetal bovine serum， 胎牛血清)、Penicillin/Streptomycin (青黴素/鏈黴素)、trypsin-EDTA、BSA (胎牛血清蛋白)、1.5M Tris (pH 8.8)、1M Tris (pH 6.8)、30% Acrylamide/Bis、10% SDS、TEMED、10% APS、95% EtOH、100% MeOH、1X Running Buffer、Transfer buffer、一級抗體 (如表一及表二)、二級抗體 (如表一及表二)、ECL substrate solution 、DMSO、TBST、Opti-MEM、異丙醇、 70% EtOH、RNase Inhibitor、4% PFA、Triton X-100、Tween 20、DAPI、Mounting medium、Camptothein (CPT)、Hydroxyurea (HU) 、Gemcitabine、結晶紫 (Cystal Violet)

表一、西方墨點法抗體名稱及實驗條件

標示蛋白	一級抗體 (稀釋比例)	二級抗體 (皆為1:5000稀釋)
HDAC7	Rabbit anti HDAC7 (1:1000)	goat anti-rabbit IgG (H+L), horseradish peroxidase conjugated
ATR pT1989	Rabbit anti ATR pT1989 (1:1000)	
ATR	Rabbit anti ATR (1:3000)	
Chk1 pS345	Rabbit anti Chk1 pS345 (1:500)	
Chk1	Mouse anti Chk1 (1:300)	goat anti-mouse IgG (H+L), horseradish peroxidase conjugated
RPA32 pS33	Rabbit anti RPA32 pS33 (1:3000)	goat anti-rabbit IgG (H+L), horseradish peroxidase conjugated
RPA32	Mouse anti RPA32 (1:2000)	goat anti-mouse IgG (H+L), horseradish peroxidase conjugated
GAPDH	Mouse anti GAPDH (1:2000)	
ATM pS1981	Rabbit anti ATM pS1981 (1:5000)	goat anti-rabbit IgG (H+L), horseradish peroxidase conjugated
ATM	Rabbit anti ATM (1:3000)	
Chk2 pT68	Rabbit anti Chk2 pT68 (1:1000)	
Chk2	Mouse anti Chk2 (1:1000)	goat anti-mouse IgG (H+L), horseradish peroxidase conjugated

表二、免疫螢光染色抗體名稱及實驗條件

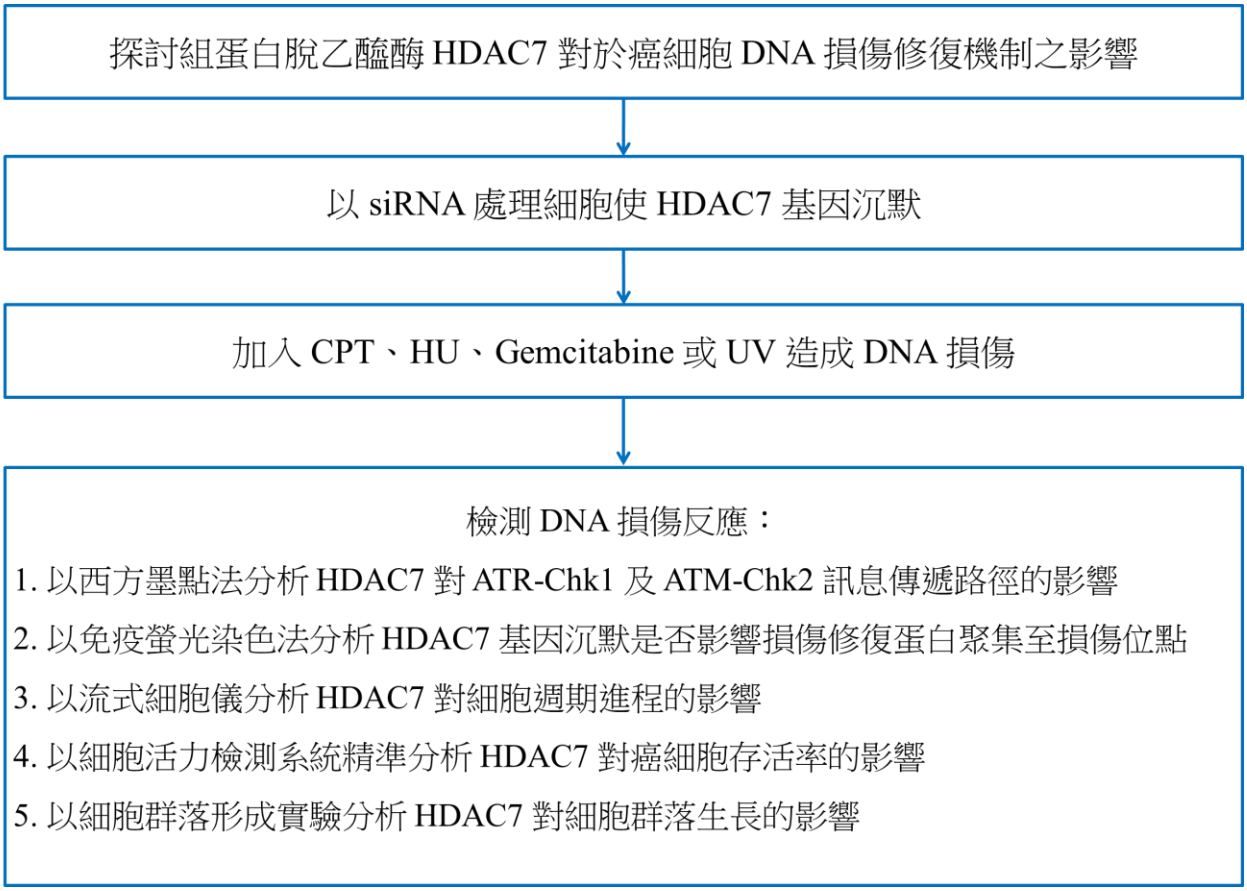
標示蛋白	一級抗體 (稀釋比例)	二級抗體 (皆為 1:400 稀釋) (顏色)
γ H2AX	Mouse anti γ H2AX (1:500)	goat anti-mouse IgG (555)
	Rabbit anti γ H2AX (1:500)	goat anti-rabbit IgG (555)
RPA32	Mouse anti RPA32 (1:800)	goat anti-mouse IgG (488)
RPA32 pS4/S8	Rabbit anti RPA32 pS4/S8 (1:500)	goat anti-rabbit IgG (488)
pATM	Rabbit anti pATM (1:500)	
pDNA-PK	Rabbit anti pDNA-PK (1:500)	

三、 器材

LUNA-II Automated Cell Counter (自動細胞計數器)、細胞培養箱、電動吸管、微量吸管分注器、真空吸取器、無菌操作台、恆溫水浴槽、10 公分培養皿、6 公分培養皿、冰塊、離心機、15mL 離心管、50mL 離心管、6 孔盤、12 孔盤、96 孔盤、乾浴器、電泳槽、電源供應器、轉漬槽、振盪機 (Shaker)、電腦、多功能微量盤檢測儀、Celleste 4.1 64-bit 軟體、Kaluza Analysis 軟體、M7000 軟體、Bio-Rad ChemiDoc

肆、研究過程或方法

一、研究架構圖



二、 細胞培養

體外培養的細胞株 HeLa 與 U2OS 是研究 DNA 損傷反應常使用的細胞模式。將人類子宮頸癌細胞 HeLa 及骨肉瘤細胞 U2OS 分別培養在含有 10%牛血清白蛋白 (BSA) 及 1.5% P/S (Penicillin/Streptomycin，青黴素/鏈黴素) 的 DMEM Medium 培養基 (DMEM-1.5%P/S) 的 10 公分培養皿中，並放置到 37℃、5%二氧化碳的培養箱 (incubator) 。視細胞生長速度，約 2-3 天更換培養基。

三、 細胞繼代

當細胞生長約九分滿時，將進行細胞繼代。先以 suction 移除舊的培養基，以 5mL PBS (Phosphate buffered saline，清洗緩衝液) 清洗一次，將 PBS 移除後再加入 1.5 mL trypsin-EDTA，放入培養箱 1 分鐘至 1.5 分鐘。取出後用手輕拍培養皿使細胞浮起。加入 5 mL 培養基沖刷細胞，裝入 15 c.c.離心管並將其離心 (1000 rpm、4 分鐘) 。等待離心同時取出新的培養皿，加入 9 mL 培養基，並標明細胞名與日期。使用 suction 將上清液移除，加入 4-8 mL 培養基回溶打散細胞 (HeLa 加入 8 mL 培養基，U2OS 則加入 4 mL)，再取適量細胞種回新的培養皿。

四、 使 HDAC7 基因沉默 (knock down)

為得知 HDAC7 對 DNA 損傷修復有無影響，我們利用 siRNA 基因沉默 HeLa 與 U2OS 細胞 HDAC7 蛋白的表現。將 RNAi 及 RNAiMAX 以 1:2 的比例混合配置於 Opti-MEM 中，在室溫下靜置 15 分鐘以上。將細胞種入六孔盤或十二孔盤後，均勻加入配好的 siRNA 混合物，放置到培養箱培養。64 小時後加藥處理或進行其他實驗。

五、 加藥

將基因沉默 HDAC7 後的細胞取出，每格均勻加入適當濃度及劑量的藥物 Camptothecin (CPT) 1 μM 或者細胞週期抑制劑 Hydroxyurea (HU) 1 mM，對照組則加入 DMSO。將細胞放回培養箱培養，1 小時後進行下一步實驗或收 Western Blot 的 sample。

六、 西方墨點法 (Western Blot)

將收下來的樣品進行十二烷機硫酸鈉聚丙烯醯胺凝膠電泳 (SDS-PAGE)，先製作適當濃度 (8-9%) 的凝膠，加入樣品後以電壓 90 伏特電泳直至上下膠交界處，改為以 100-120 伏特電泳約 1.5 小時。將海綿、濾紙、電泳完成的凝膠、PVDF Membrane、濾紙、海綿依序夾在 Gel Holder Cassette 中，放入轉漬槽，並加入 Transfer Buffer，以 100 毫安培轉漬過夜或以 250-270 毫安培轉漬 2 小時。接著使用 5%脫脂奶粉 in TBST 進行 Blocking 10 分鐘，在裁切後加入事先配好濃度的一級抗體在室溫下反應 2 小時或在冷房中過夜反應。在回收一級抗體後，使用 TBST 洗 Membrane 3 次，每次 8 分鐘。加入配好的二級抗體，在室溫下反應 50 分鐘後，亦使用 TBST 洗 3 次，每次 8 分鐘。最後加入 ECL 進行反應，並以 Bio-Rad ChemiDoc 拍攝電子影像。

七、 免疫螢光染色 (Immunofluorescence, IF)

將加藥處理後的六孔盤從培養箱取出，放置於冰上。移除培養基，加入 1 mL ice-cold PBS 潤洗一次，移除 PBS。再加入 1 mL PBS/0.5% Triton X-100，等待 5 分鐘。移除 PBS/0.5% Triton X-100，加入 1 mL ice-cold PBS 潤洗一次，再移除 PBS。將六孔盤從冰上移至桌面，加入 1 mL 4% PFA 固定，等待 15 分鐘，再移除 4% PFA，放回冰上。加入 1 mL ice-cold PBS 潤洗一次，移除 PBS。再加入 1mL PBS/0.5% Triton X-100，此次改為等待 2 分鐘。移除 PBS/0.5% Triton X-100，加入 1 mL ice-cold PBS 潤洗一次，再移除 PBS。接著將六孔盤移至桌上，加入 1 mL 3% BSA in PBS-T 進行 Blocking，等待 30 分鐘以上，同時配製要使用的兩種一級抗體。將 3% BSA in PBS/0.05% Tween 20 移除，加入 95μL 第一種一級抗體，室溫下等待 1.5 小時。加入 1 mL 0.05% Tween 20 in PBS 放至振盪器 (rpm55-60) 潤洗 5 分鐘，再移除 0.05% Tween 20 in PBS，加入 95μL 第二種一級抗體。在蓋玻片上蓋上石蠟 (Parafilm) 並在六孔盤外圍封上石蠟避免水氣蒸發，放入冷房過夜。

隔天從冷房取出六孔盤，加入 1 mL 0.05% Tween 20 in PBS，放至振盪器潤洗三次 (rpm55)，每次 7 分鐘，同時配製二級抗體。將 0.05% Tween 20 in PBS 移除，加入 95μL 二級抗體，蓋上鋁箔，室溫避光 1 小時。加入 0.05% Tween 20 in PBS 放至振盪器潤洗兩次 (rpm55)，每次 7 分鐘，需避光。加入 1 mL DAPI in 0.05% Tween 20 in PBS，放至振盪器避光潤洗 10 分鐘 (rpm55)。移除 DAPI-PBS-T，加入 PBS。取出載玻片並標明日期、細胞名、使用 siRNA、用藥處理與抗體。在載玻片兩側分別滴上適量 Mounting Solution，分別將沒有加藥處理與有加藥處理的細胞所黏附的蓋玻片小心蓋上，並放至黑暗處避光，等待一個晚上。隔天再使用指甲油塗抹蓋玻片四周，完成封片，放入 4℃ 冰箱保存。玻片製作完成後再使用螢光顯微鏡拍照紀錄實驗結果。

八、 雷射

在使細胞中的 HDAC7 基因沉默後，種入 4 chamber 中。48 小時後，避光並移除培養基，加入 PBS 清洗一次，將 PBS 移除後再加入含有 BrdU 的培養基。24 小時後避光移除並加入 PBS 清洗一次，接著移除 PBS 後，加入不含 Phenol Red 的培養基，並照射雷射以造成 DNA 損傷。照射完雷射後，放進培養箱 recovery 1 或 2 小時，接著使用免疫螢光染色。

九、 流式細胞儀 (Flow cytometry)

加入配好濃度的 EdU 及等量 DMEM，放入培養箱等待 30 分鐘。之後收集細胞並以 PBS 潤洗一次。接著移至冰上，加入 250 μL ice-cold PBS in 1 mM EDTA，隨即加入 750 μL ice-cold 99.8% EtOH 進行細胞固定。最後放入-30℃冰箱至少一個晚上，之後使用 Click-iT-Alexa-647 反應試劑與之反應，並以流式細胞儀檢測在對照組及 HDAC7 基因沉默的組別中，細胞進入 S phase 的比例。

十、 細胞活力檢測系統 (Cell Titer-Glo 2.0 Cell Viability Assay)

將細胞種入多功能微量盤，20 小時內加入抗癌藥物 HU 及 CPT。三至四天後加入 Cell Titer-Glo 2.0，避光 10 分鐘後使用多功能微量盤檢測儀測定。並分別將加入濃度 0.5 mM 、0.25 mM、0.125 mM、0.0625 mM 的 HU 及濃度 50 nM、25 nM、12.5 nM 的 CPT 藥物處理組別所得出的吸光值分別除以未加藥處理 (加入 DMSO) 組別的吸光值，其算出的比值即代表存活率。接著比較在加入不同濃度的藥物處理之下，對照組及 HDAC7 基因沉默的組別中細胞存活率的差異。

十一、細胞群落形成能力實驗 (Colony Formation Assay)

將細胞種入六孔盤(每孔 400 顆細胞)，在基因沉默 HDAC7 後放入培養箱培養。三天後取出分別加入濃度 200 nM、100 nM、50 nM 的抗癌藥物 Gemcitabine。放入培養箱培養，約二至三天更換一次培養基。根據細胞生長情況，十至十四天後將六孔盤取出，加入 100%冰甲醇 (MeOH) 固定細胞，並使用結晶紫 (Cystal Violet) 染色，風乾一天後再計算細胞群落的數量。接著將加入不同濃度藥物處理之下的細胞群落數量分別除以未加藥處理下的細胞群落數量。以觀察在加入不同濃度的藥物處理之下，對照組及 HDAC7 基因沉默的組別中細胞群落形成能力是否有差異。

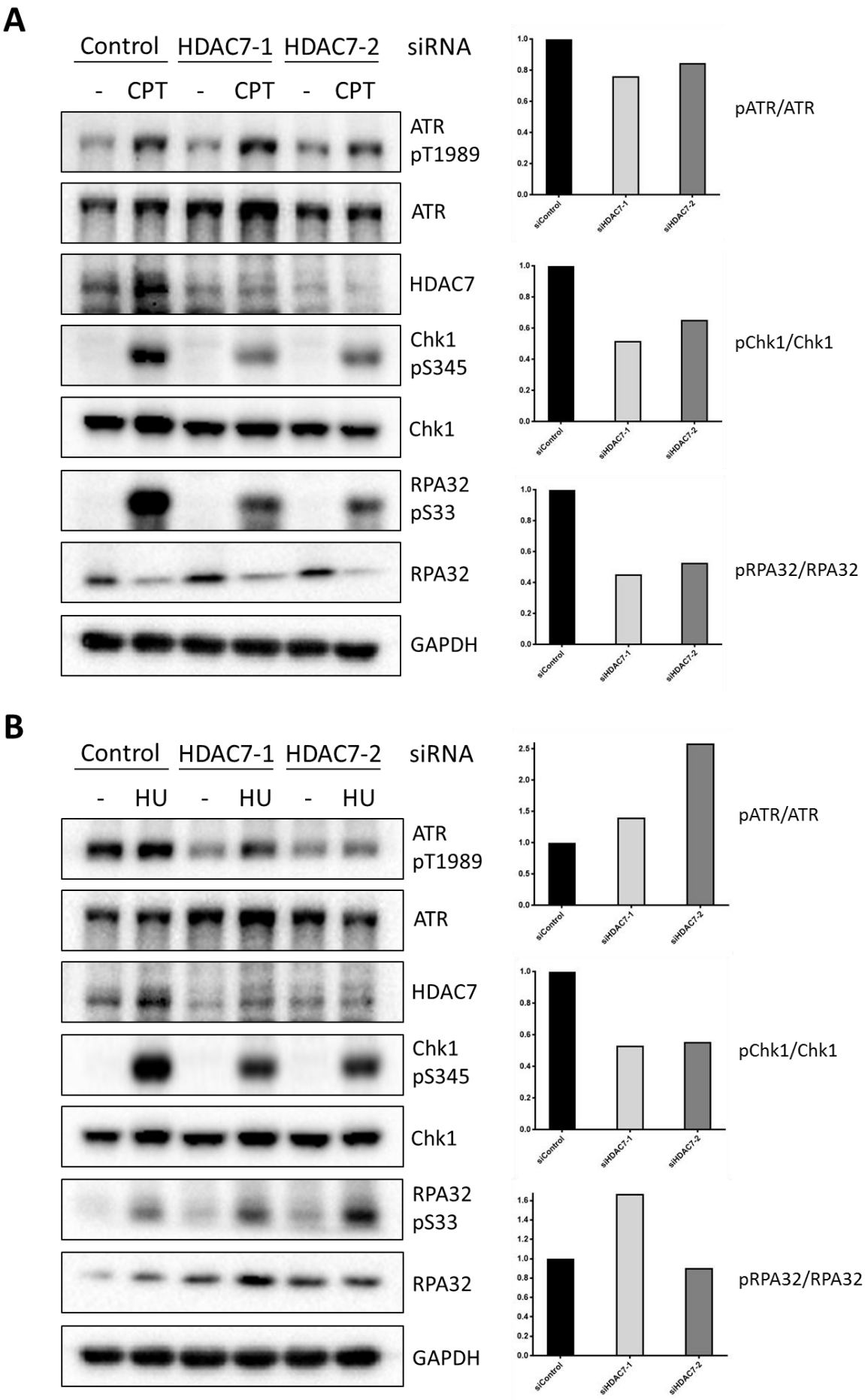
伍、研究結果

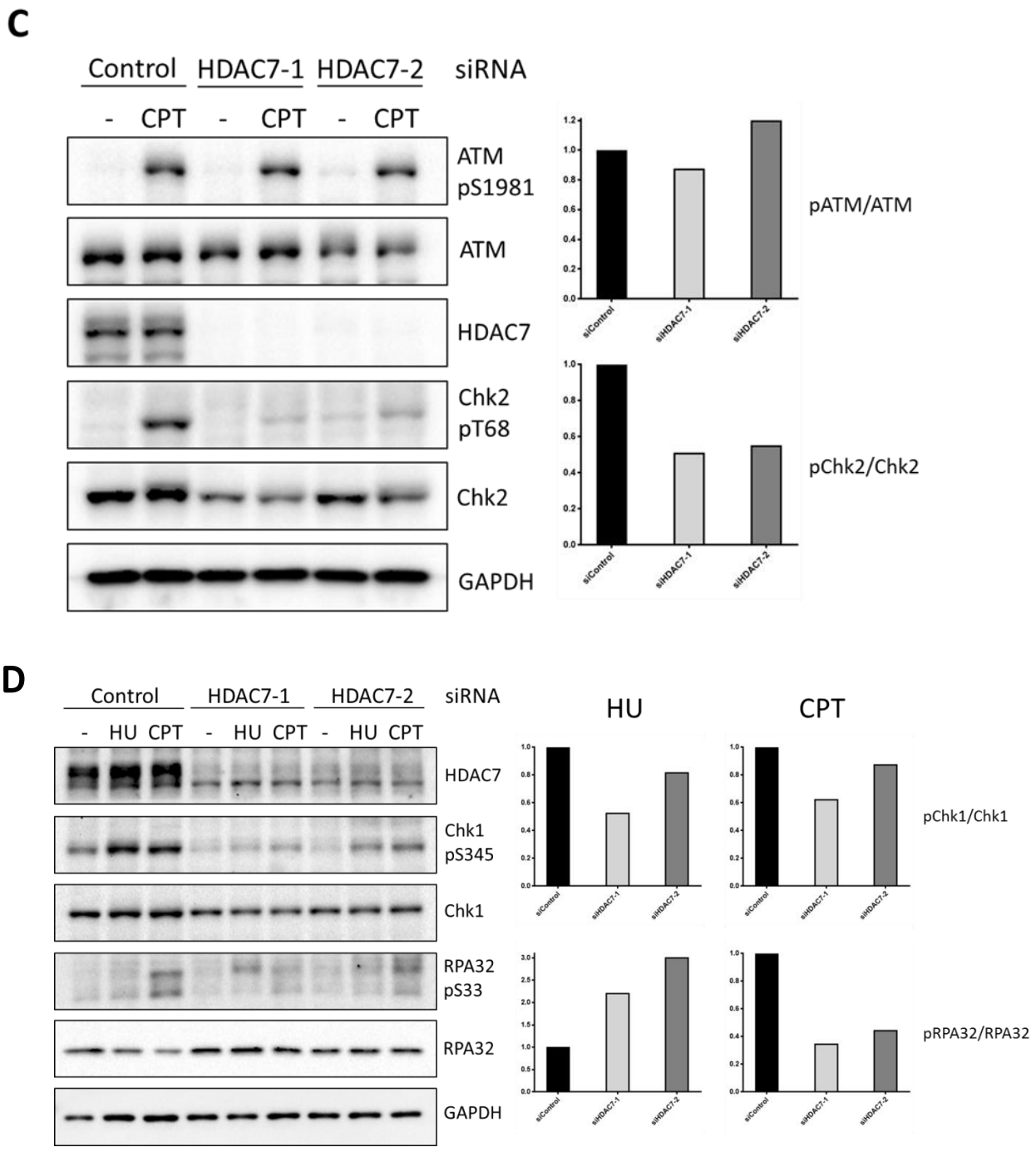
一、 利用西方墨點法 (Western Blot) 檢測 HDAC7 基因沉默對於 ATR、ATM、Chk1、Chk2 及 RPA 表現量及磷酸化的影響

HDAC7 被報導可能具有 SUMO E3 的功能，而 SUMO 已知可以調控 DNA 損傷反應。為進一步探討該蛋白於 DNA 損傷反應中的角色，首先利用 siRNA 沉默細胞中 HDAC7 基因的表現，64 小時後再給予細胞不同的藥物 CPT 及 HU。其中 CPT 可以抑制第一型拓樸異構酶，使複製叉停滯，最終導致 DNA 雙股斷裂; 而 HU 可以抑制 DNA 複製，造成 DNA 複製壓力。兩者造成的損傷不同，但均可誘發 DNA 損傷信號進而分別活化 ATM-Chk2 與 ATR-Chk1 路徑。磷酸化的 ATM 與 ATR 分別會磷酸化下游蛋白 Chk2 與 Chk1 以及其他 DNA 損傷反應的蛋白以進行訊息傳導。磷酸化的 Chk1 會磷酸化 Cdc25 A/C 蛋白，促使其被降解。Cdc25 家族可以調控細胞週期的重要 CDK (cyclin-dependent kinase) 複合物，當 Cdc25 A/C 被降解後，將使細胞週期發生阻滯。透過西方墨點法檢測 ATR、ATM、Chk1、Chk2、RPA 及其他 DNA 損傷反應蛋白磷酸化的量，由其磷酸化量的變化可以得知 HDAC7 在 DNA 損傷反應中的角色。

本實驗首先觀察的是 ATR-Chk1 pathway，使用 HeLa 細胞的結果如圖二 (A) 及 (B) ，使用 U2OS 細胞的結果如圖二 (D)，可得知使 HDAC7 基因沉默後，細胞中 HDAC7 蛋白幾乎消失殆盡顯示 siRNA 成功地干擾 HDAC7 蛋白的生成。接著觀察到 ATR pT1989 的量與對照組並無明顯差異。在對照組細胞中觀察到 Chk1 pS345 在加藥處理後有明顯增加，而在 HDAC7 基因沉默的細胞中 Chk1 S345 磷酸化的量與對照組比較則有顯著下降。RPA32 S33 也是 ATR 專一的磷酸化位點，則在 CPT 處理下有明顯增加這是因為 RPA32 最終會被數個激酶在不同位點磷酸化。相較於對照組，使 HDAC7 基因沉默後的 RPA32 pS33 同樣也有顯著減少。由此結果可知，HDAC7 在 DNA 損傷後可能參與在 ATR-Chk1 訊息傳遞的調控。

另外本實驗也使用 HeLa 細胞觀察了 ATM-Chk2 pathway，結果如圖二 (C)。一樣可以觀察到在使 HDAC7 基因沉默後，細胞中 HDAC7 蛋白幾乎消失殆盡，顯示 siRNA 成功地干擾 HDAC7 蛋白的生成。接著觀察到 ATM pS1981 的量與對照組並無明顯差異。在對照組細胞中觀察到 Chk2 pT68 在加藥處理後有明顯增加，而在 HDAC7 基因沉默的細胞中 Chk2 T68 磷酸化的量與對照組比較則有顯著下降。由此結果可知，HDAC7 在 DNA 損傷後可能參與在 ATM-Chk2 訊息傳遞的調控。


A
Control
HDAC7-1
HDAC7-2
siRNA
- CPT - CPT - CPT
ATR pT1989
ATR
HDAC7
Chk1 pS345
Chk1
RPA32 pS33
RPA32
GAPDH
pATR/ATR
pChk1/Chk1
pRPA32/RPA32
siControl
siHDAC7-1
siHDAC7-2
B
Control
HDAC7-1
HDAC7-2
siRNA
- HU - HU - HU
ATR pT1989
ATR
HDAC7
Chk1 pS345
Chk1
RPA32 pS33
RPA32
GAPDH
pATR/ATR
pChk1/Chk1
pRPA32/RPA32
siControl
siHDAC7-1
siHDAC7-2



圖二、DNA 損傷後細胞週期檢查點的活化需要 HDAC7

(A 和 B) 人類子宮頸癌細胞株 HeLa 分別在未加藥 (加入 DMSO) 以及加入抗癌藥物 CPT (A)、HU (B) 造成 DNA 損傷的處理下，比較有無使 HDAC7 基因沉默的細胞中，DNA 損傷修復蛋白 ATR、Chk1 及 RPA32 磷酸化的量

(C) 人類子宮頸癌細胞株 HeLa 分別在未加藥 (加入 DMSO) 以及加入抗癌藥物 CPT 造成 DNA 損傷的處理下，比較有無使 HDAC7 基因沉默的細胞中，DNA 損傷修復蛋白 ATM 及 Chk2 磷酸化的量

(D) 人類骨肉瘤細胞株 U2OS 分別在未加藥 (加入 DMSO) 以及加入抗癌藥物 HU、CPT 造成 DNA 損傷的處理下，比較有無使 HDAC7 基因沉默的細胞中，DNA 損傷修復蛋白 ATR、Chk1 及 RPA 磷酸化的量

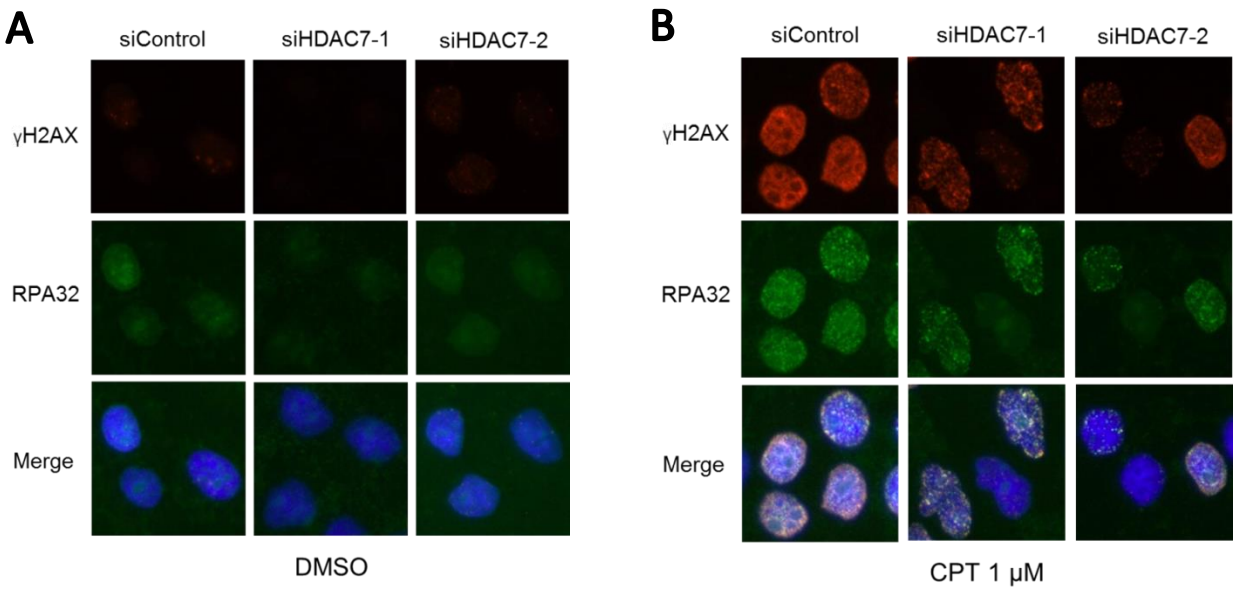
二、免疫螢光染色 (Immunofluorescence, IF) 檢測 HDAC7 對於 RPA 及 H2AX 磷酸化的影響

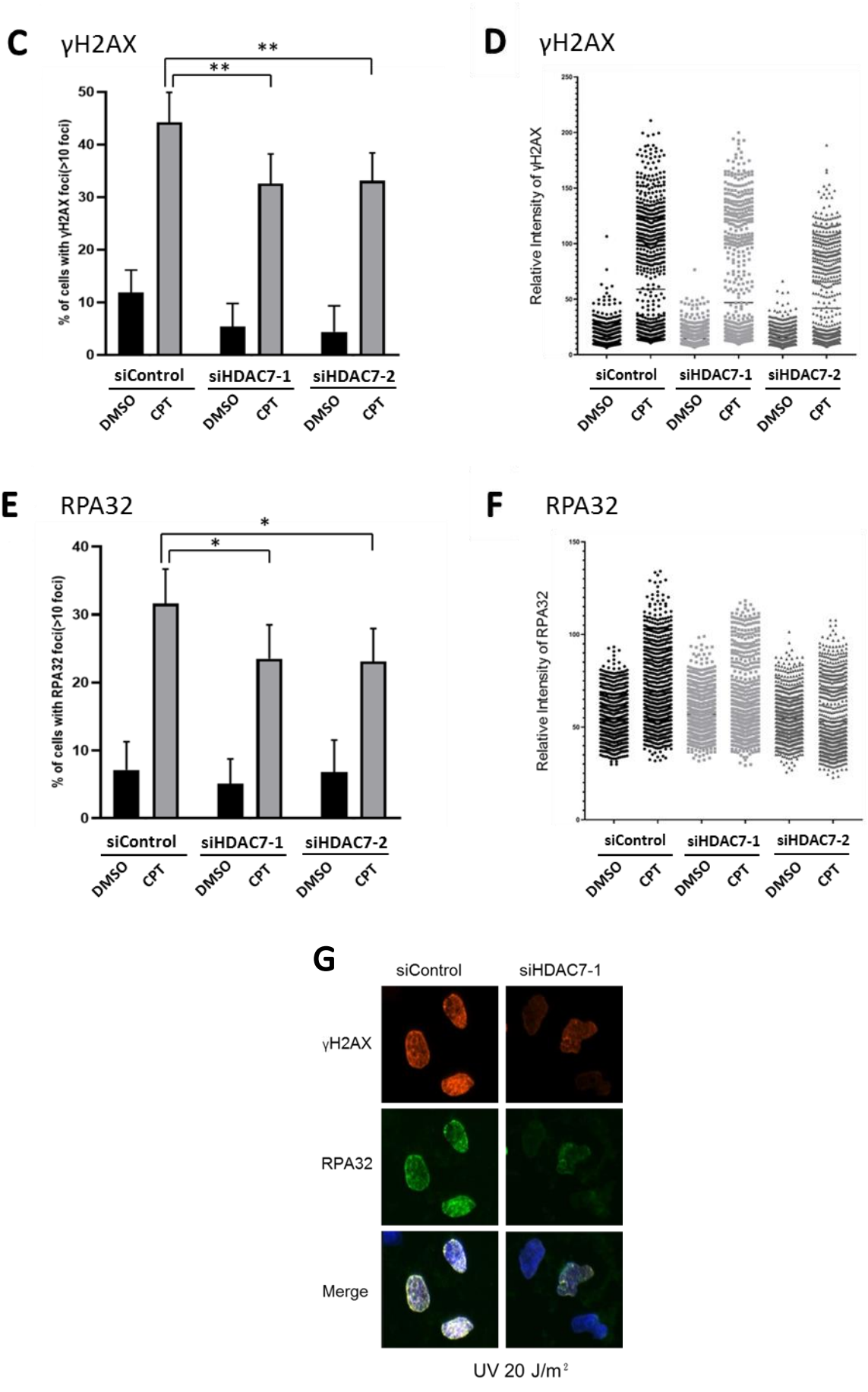
得知 HDAC7 可以調控 ATR-Chk1 訊息路徑，接下來希望知道 HDAC7 到底如何影響該路徑的活化。細胞免疫螢光染色可以觀察細胞在基因沉默 HDAC7 的表現後， DNA 損傷反應因子如 RPA32、γH2AX 及其他 DNA 損傷反應蛋白在 DNA 損傷位點的聚合先後順序，藉以釐清 HDAC7 參與的位置。

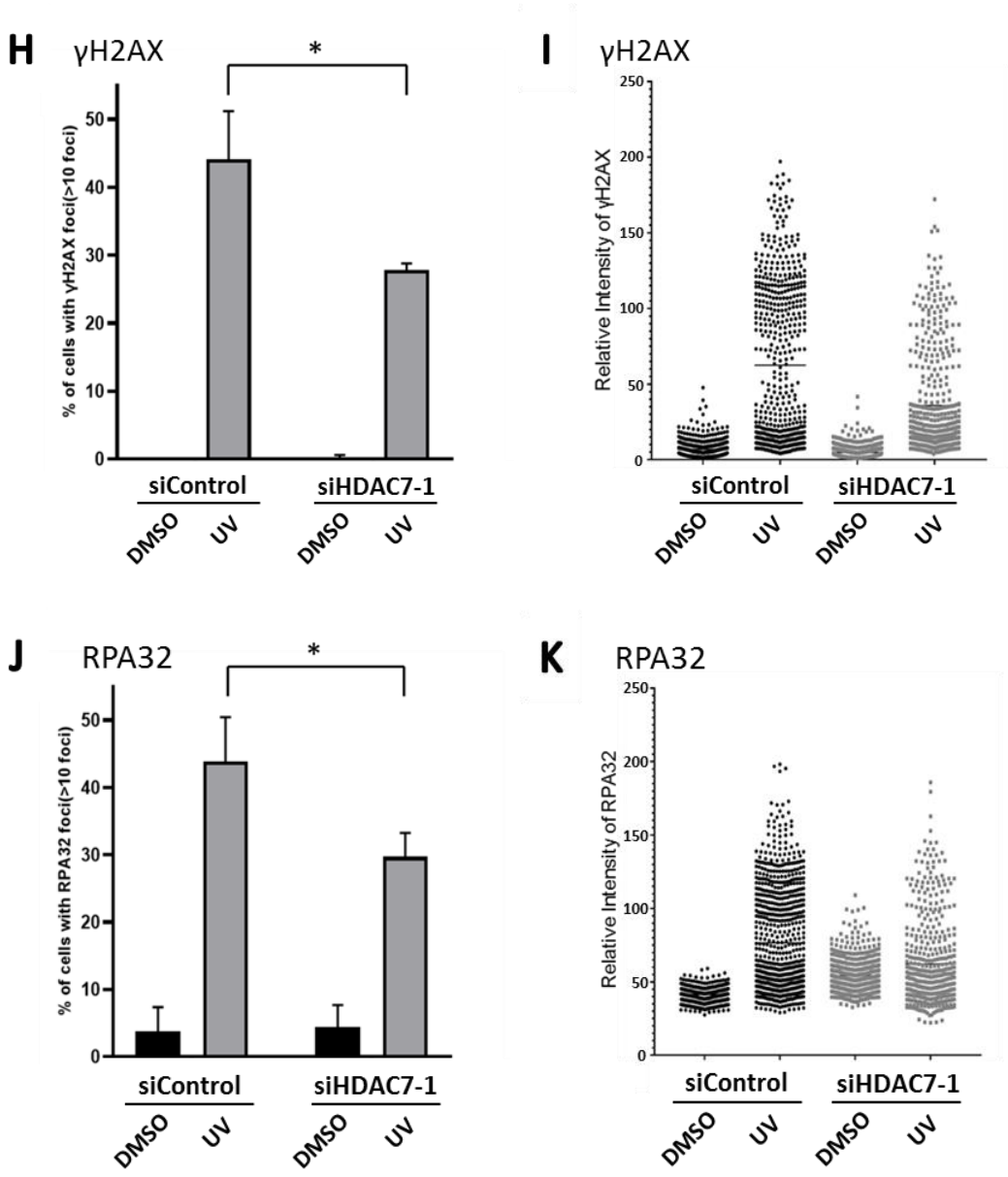
γH2AX 可由 ATM、ATR 磷酸化 H2AX 所產生，是 DNA 雙股斷裂的標記，也是 CPT 處理後首先要觀察到的。由圖三 (B) 及 (C) 可以看出，HeLa 細胞加入 CPT 1 μM 處理 1 小時後，與對照組相比在 HDAC7 基因沉默的組別中，出現 γH2AX 的細胞的數量約略下降了 12~14%，具顯著差異。另一方面，DNA 雙股斷裂後若進行同源重組修復，斷裂處的 DNA 會被核酸外切酶切割產生單股 DNA 末端，單股 DNA 會再被 RPA 蛋白結合。由圖三 (B) 及 (E) 可知，在 HDAC7 基因沉默的組別中，出現 RPA32 的細胞數量亦下降了約 8~10%。根據此結果，推論 HDAC7 對於 DNA 雙股斷裂的損傷修復反應至關重要。

另外本實驗也將 HeLa 細胞用 UV 20 J /m²照射後 recovery 1 小時，結果如圖三 (G) 及 (H)-(K)。可以觀察到在 UV 處理下損傷蛋白 γH2AX 及 RPA32 活化的比例與 CPT 處理下的組別的結果相似。

而由圖四可以看出，加入 CPT 1 μM 處理 1 小時後，在 HDAC7 基因沉默的細胞中 RPA32 S4/S8 的磷酸化明顯下降，而 RPA32 S4/S8 的下降會造成複製壓力與有絲分裂的缺陷。過去研究已知 DNA-PK 是負責 RPA32 S4/S8 磷酸化的激酶，此結果暗示 HDAC7 除了影響 ATR-Chk1 pathway 外，亦可能影響 DNA-PK 的活性。




C
γH2AX
**
**
% of cells with γH2AX foci(>10 foci)
siControl
siHDAC7-1
siHDAC7-2
DMSO
CPT
D
γH2AX
Relative Intensity of γH2AX
E
RPA32
*
*
% of cells with RPA32 foci(>10 foci)
F
RPA32
Relative Intensity of RPA32
G
siControl
siHDAC7-1
γH2AX
RPA32
Merge
UV 20 J/m²



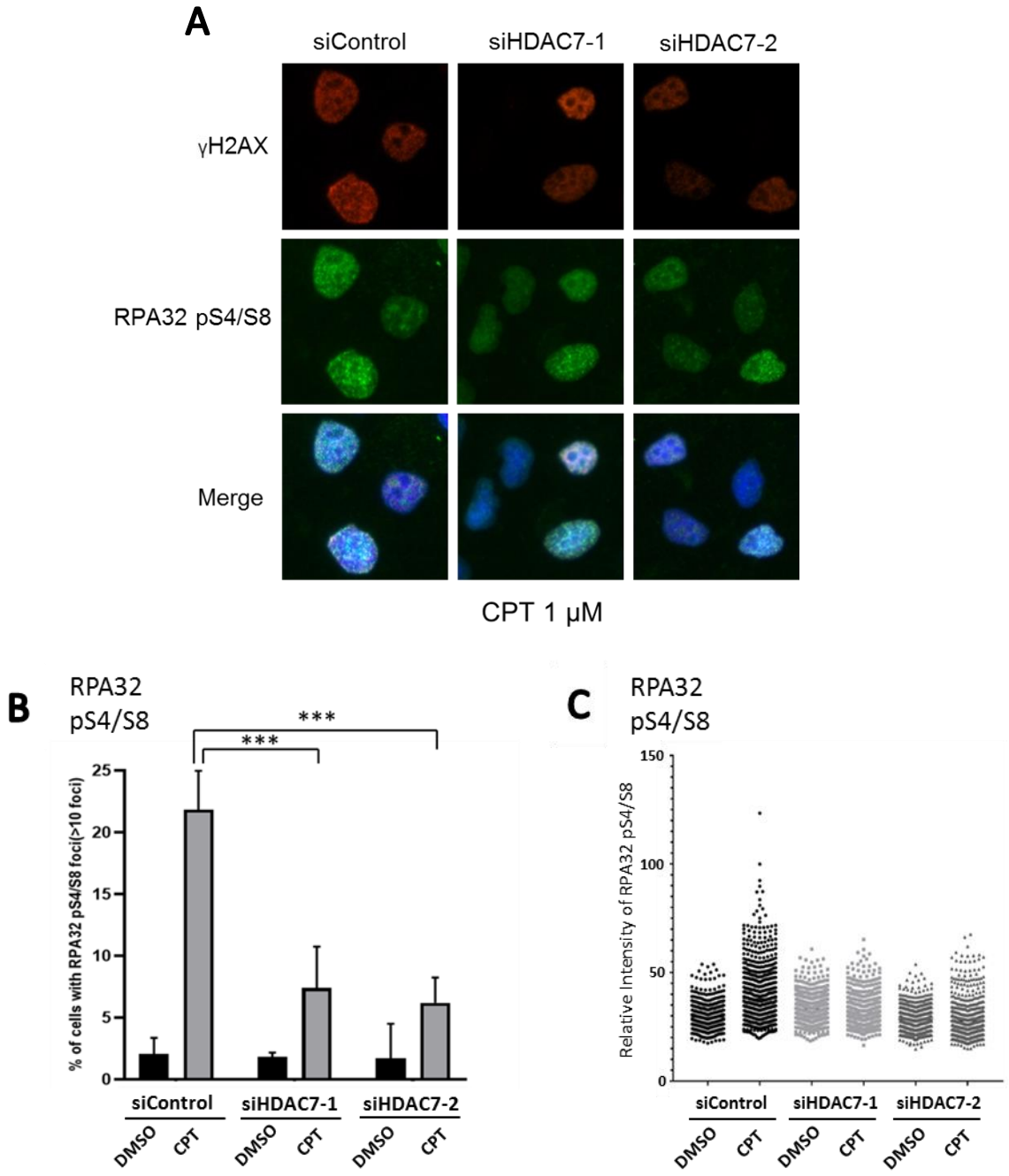
圖三、HDAC7 對 DNA 雙股斷裂 (DSBs) 的損傷修反應很重要

人類子宮頸癌細胞株 HeLa 在轉染 control 與 HDAC7 siRNA 後，使用 1 μM CPT 處理 1 小時，或用 UV 20 J /m²照射後 recovery 1 小時，然後進行免疫螢光染色。

(A，B 和 G) 基因沉默 HDAC7 的細胞與對照組 (siControl) 分別在未加藥 (A) 、加入 CPT (B) 處理及照射 UV (G) 後，損傷蛋白 γH2AX 與 RPA32 活化及聚集的情形

(C，D，E 和 F) 是對 (A) 和 (B) 進行 CPT 處理的樣品的分析。在 (C) 和 (E) 中定量了具有 γH2AX 和 RPA32 foci 的細胞比例。 在 (D) 和 (F) 中定量了 γH2AX 和 RPA32 免疫螢光的強度。圖表為兩次實驗平均值，每組分別計數超過 800 顆細胞

(H，I，J 和 K) 是對 (G) 的 UV 照射的樣品的分析。在 (H) 和 (J) 中定量了具有 γH2AX 和 RPA32 foci 的細胞比例。 在 (I) 和 (K) 中定量了 γH2AX 和 RPA32 免疫螢光的強度。每組分別計數超過 800 顆細胞



圖四、DNA 損傷修復蛋白 RPA32 Ser4/8 的磷酸化需要 HDAC7

人類子宮頸癌細胞株 HeLa 在轉染 control 與 HDAC7 siRNA 後，使用 1 μM CPT 處理 1 小時，然後進行免疫螢光染色。

(A) 基因沉默 HDAC7 的細胞與對照組 (siControl) 在 CPT 處理下，損傷蛋白 γH2AX 與 RPA32 pS4/S8 活化及聚集的情形

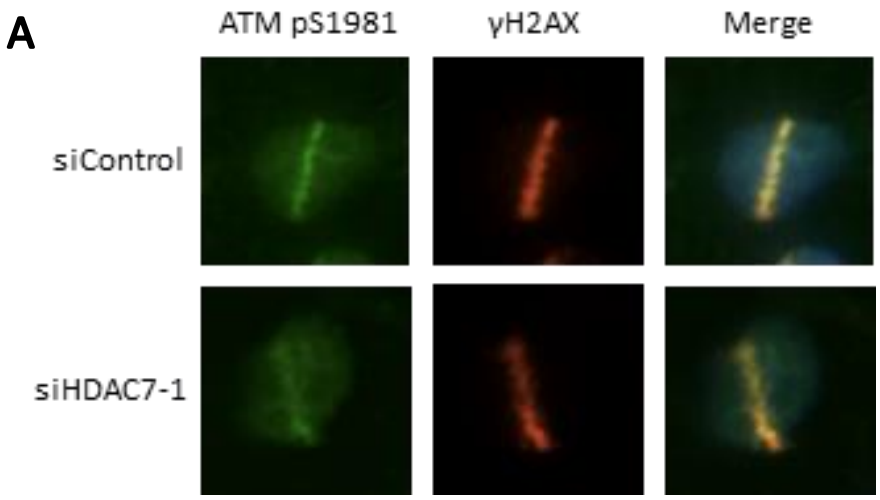
(B) 是對 (A) 和 (B) 進行 CPT 處理的樣品的分析。定量具有 RPA32 pS4/S8 foci 的細胞的比例。每組分別計數超過 800 顆細胞

(C) 定量 RPA32 pS4/S8 免疫螢光的強度。每組分別計數超過 800 顆細胞

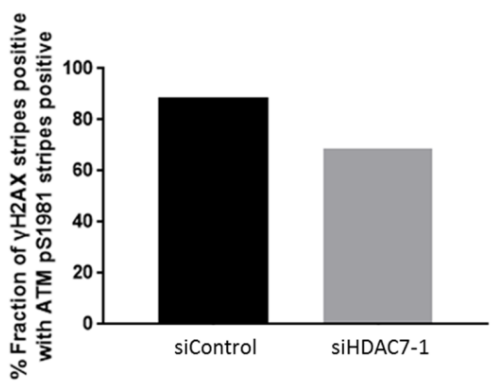
由圖三及圖四的免疫螢光染色實驗分別了解到基因沉默 HDAC7 會影響 γH2AX 的聚集

以及 RPA32 S4/S8 磷酸化，接下來我們改用雷射造成 DNA 損傷，以更精確觀察在雷射處理的路徑上，DNA 損傷反應因子如 ATM、DNA-PK、γH2AX 在損傷位點的聚合情形。

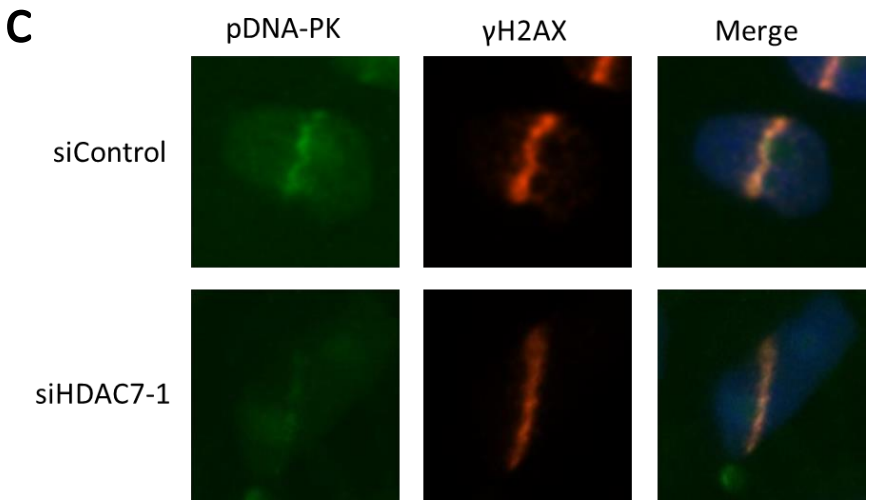
由圖五 (A) 及 (B) 可以看出，HeLa 細胞在雷射 power 60%照射後 recovery 1 小時，與對照組相比在 HDAC7 基因沉默的組別中，磷酸化 ATM 疊合至 γH2AX 的細胞的比例下降了約 20%，但在基因沉默 HDAC7 組別與對照組相比仍有 77%的疊合比例。根據此結果，推論 HDAC7 會微幅影響磷酸化 ATM 聚集至損傷位點。由於 DNA-PK 是負責 RPA32 S4/S8 磷酸化的激酶，而在圖五 (C) 及 (D) 可以看出，在基因沉默 HDAC7 的組別中磷酸化 DNA-PK 疊合至 γH2AX 的細胞的比例則下降了約 30%，且與對照組相比只剩下 39%的疊合比例，減少幅度較磷酸化 ATM 大。因此推論 HDAC7 明顯影響 DNA-PK 的磷酸化和其至損傷位點的聚集。

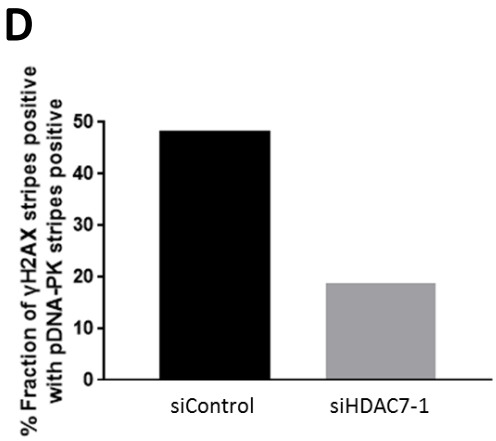


B



	siControl	siHDAC7-1
γH2AX positive	411	428
ATM pS1981 positive	391	293
pATM+/γH2AX+	0.887	0.685





	siControl	siHDAC7-1
γH2AX positive	536	437
pDNA-PK positive	259	83
pDNA-PK+/γH2AX+	0.483	0.189

圖五、HDAC7 基因沉默會抑制磷酸化 ATM 以及磷酸化 DNA-PK 聚集至損傷位點

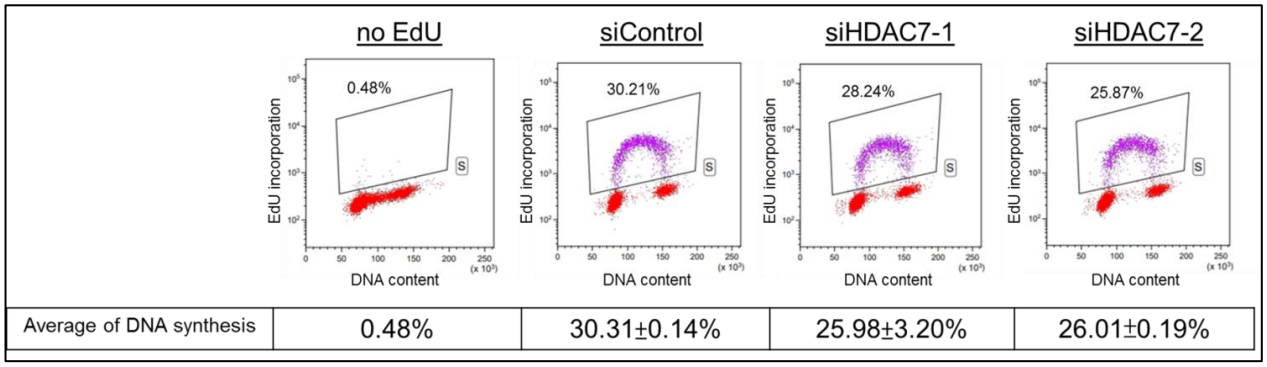
(A 和 C) 使 HDAC7 基因沉默後，照射雷射並觀察 γH2AX 與磷酸化 ATM (A) 以及磷酸化 DNA-PK (C) 在損傷位點的疊合情形。

(B 和 D) 定量具有 γH2AX 及磷酸化 ATM (B) 以及磷酸化 DNA-PK (D) 的細胞的比例，每組分別計數超過 500 顆細胞。再計算出疊合比例，轉為柱狀圖表示。

三、流式細胞儀 (Flow cytometry) 檢測 HDAC7 對於細胞週期進程的影響

在細胞週期中，DNA 含量會發生週期性的變化。使用螢光染劑對待測細胞進行染色，再操作流式細胞儀檢測訊號強度，可得知染色細胞之細胞週期各時期 DNA 表現量。藉由分析各時期的百分比，觀察細胞週期是否發生阻滯或改變。

本實驗進行了三次，得出的結果非常接近，故而使用第一次實驗的圖像作為代表，並附上三次實驗的平均值，如圖六。由圖中細胞進入 S phase 的比例可以看出，與對照組 (siControl) 相比，在使 HDAC7-1 位置基因沉默後對於原本的細胞週期幾乎沒有影響，而在使 HDAC7-2 位置基因沉默後進入 S phase 的細胞的比例微幅下降，與對照組相比約略減少 4~5%，推測 siHDAC7-2 可能有其他脫靶效應導致進入 S phase 的細胞比例降低。整體而言，HDAC7 基因沉默後對細胞進入 S phase 沒有顯著影響。



Average of DNA synthesis	0.48%	30.31±0.14%	25.98±3.20%	26.01±0.19%

圖六、HDAC7 基因沉默不會顯著影響 DNA 的合成和細胞週期進程

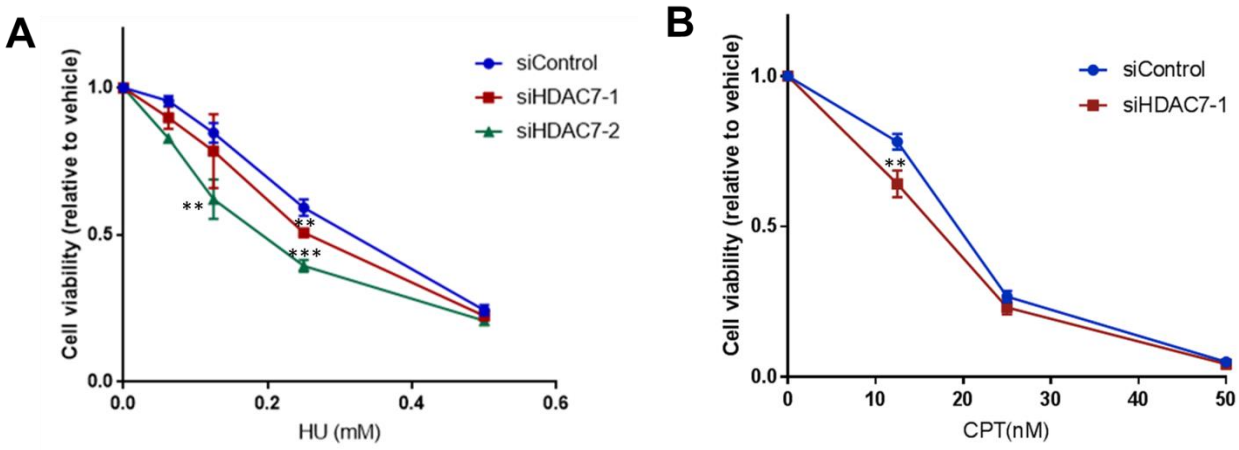
將 HeLa 細胞轉染 control 或 HDAC7 siRNA，並使用 10 μM EdU incubate 30 分鐘。根據製造商的 protocol，使用 Click-iT Plus EdU Alexa Fluor 647 Flow Cytometry Assay Kit 處理細胞。使用 EdU incorporation 分析 DNA 合成，並使用 PI 染色分析 DNA 含量。DNA 合成的平均值來自 3 個獨立的實驗。

四、細胞活力檢測系統 (Cell Titer-Glo 2.0 Cell Viability Assay) 檢測使 HDAC7 基因沉默的癌細胞對 DNA 損傷的敏感度

利用多功能微量盤檢測儀測定，分別實驗比較對照組及使 HDAC7 基因沉默的細胞在加入不同濃度的 HU 及 CPT 藥物後，細胞存活率的差異。由此觀察使 HDAC7 基因沉默的癌細胞是否會在 DNA 損傷後存活率下降，進而提供抗癌藥物發展的基礎。

由圖七 (A) 可以看出，在加入高濃度的 HU 後，有無基因沉默 HDAC7 的細胞存活率並無差異，推測是因為藥物的劑量已高於含有 HDAC7 基因的細胞所能承受的量。而在中間濃度的 HU 處理下，可看出使 HDAC7 基因沉默的細胞的存活率下降約 20%，具顯著差異，故推測使 HDAC7 基因沉默的細胞有可能在 HU 造成的複製壓力下更不易存活。

由圖七 (B) 可以看出，在加入高濃度的 CPT 後，有無基因沉默 HDAC7 的細胞的存活率並無差異，推測是因為藥物的劑量已高於含有 HDAC7 基因的細胞所能承受的量。但在中間濃度的 CPT 處理下，可看出在使 HDAC7 基因沉默的細胞存活率有下降。



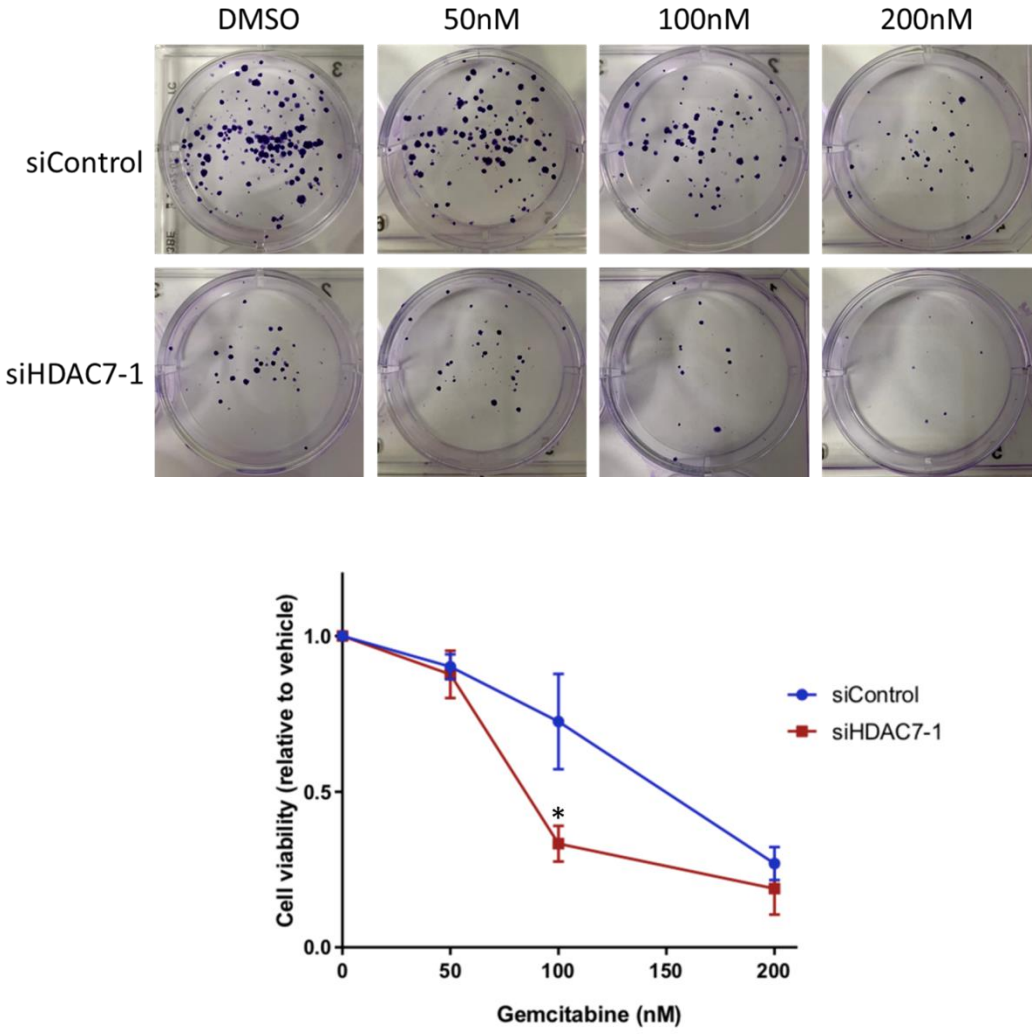
圖七、基因沉默 HDAC7 會造成 HeLa 細胞對於 genotoxic agents 更加敏感

將使用 control 或 HDAC7 siRNA 轉染的 HeLa 細胞種在 96 孔盤中，並分別加入不同濃度的 HU (A) 或 CPT (B) 處理 4 天。使用 CellTilter-Glo 2.0 分析細胞活力，比較細胞存活率。

五、細胞群落形成能力實驗 (Colony Formation Assay) 檢測使 HDAC7 基因沉默的癌細胞在 DNA 損傷後細胞群落形成是否受到影響

等待細胞群落約成長至 1 mm 時，則使用 100%冰甲醇固定並使用結晶紫染色，觀察在不同濃度 Gemcitabine 處理下，對照組以及基因沉默 HDAC7 的組別中，細胞群落形成的差異。

由圖八可以觀察到，在加入抗癌藥物 Gemcitabine 100nM 處理下，基因沉默 HDAC7 的組別與對照組相比，細胞群落形成的比例下降了約 30~40%，具顯著差異。可知基因沉默 HDAC7 會使細胞群落形成能力下降。



圖八、HDAC7 基因沉默配合抗癌藥物 Gemcitabine 處理會使細胞群落形成能力下降

使 HDAC7 基因沉默後，加入不同濃度的 Gemcitabine 處理並比較細胞群落形成能力。照片為細胞群落實際生長情形，將不同濃度 Gemcitabine 處理的組別中細胞群落數量定量為折線圖。

陸、討論

HDAC 家族成員已被證實與癌症形成高度相關，例如 HDAC1、HDAC2 在胃癌中有過量表現(Choi et al., 2001; Song et al., 2005)，而在大腸癌和乳癌中 HDAC1、HDAC3 以及 HDAC6 也會過量表現(Wilson et al., 2006; Zhang et al., 2004)。除了影響組蛋白，HDACs 也會影響其他非組蛋白如 p53，乙醯化的 p53 較穩定且具有活性，可活化細胞週期檢查點，造成細胞週期停滯或死亡。這些由 HDAC 所調控的蛋白皆是調節基因表達、分化、發育以及維持細胞穩定的重要因子。而這些特性使 HDACs 在癌症中發揮重要的功能，成為有潛力的抗癌標靶(Ropero, Esteller, 2007)。

本研究中，我們首次發現 HDAC7 參與在 DNA 損傷修復反應中，影響 ATR-Chk1 及 ATM-Chk2 兩條訊息傳遞路徑。根據西方墨點法的結果，推測 HDAC7 不影響 ATR 及 ATM 的磷酸化，而是造成下游 Chk1 S345、Chk2 T68 及 RPA32 S33 的磷酸化。其中，RPA32 pS33 在 CPT 處理下有大量表現，而 CPT 主要是造成 DNA 雙股斷裂， DNA 雙股斷裂出現時外切酶會從斷裂處的 5’ 端開始分解 DNA，進而出現單股 DNA。此時，RPA 會接合上去，並吸引其他損傷修復蛋白結合，經過一系列的活化使 RPA32 磷酸化成 RPA32 pS33。磷酸化的 RPA32 S33 作為 ATR-Chk1 pathway 的下游蛋白會再吸引其他損傷修復因子以修復受損 DNA。雖然 HU 所造成的單股斷裂理應使 RPA32 S33 磷酸化，但根據實驗結果，推測是 HU 造成單股斷裂的損傷程度較 CPT 所造成雙股斷裂的損傷程度小，故而使 RPA32 S33 磷酸化較少。

根據免疫螢光染色的結果，發現在使 HDAC7 基因沉默的組別中，γH2AX 的比例下降，是造成 Chk1、Chk2、RPA32 磷酸化減少的部份原因。然而，當 DNA 產生雙股斷裂，RPA32 磷酸化下降的幅度小於 γH2AX，其原因可能有二，其一是 RPA 仍能正常運作，但外切酶所分解而露出的單股 DNA 長度變短，使 RPA 能接合上去的空間減少，故而 RPA 的量減少。另一則是 RPA 本身接合至單股 DNA 的能力受到影響，造成 RPA 接合至單股 DNA 的速率變慢，或是使 RPA 接合在單股 DNA 上的時間縮短。

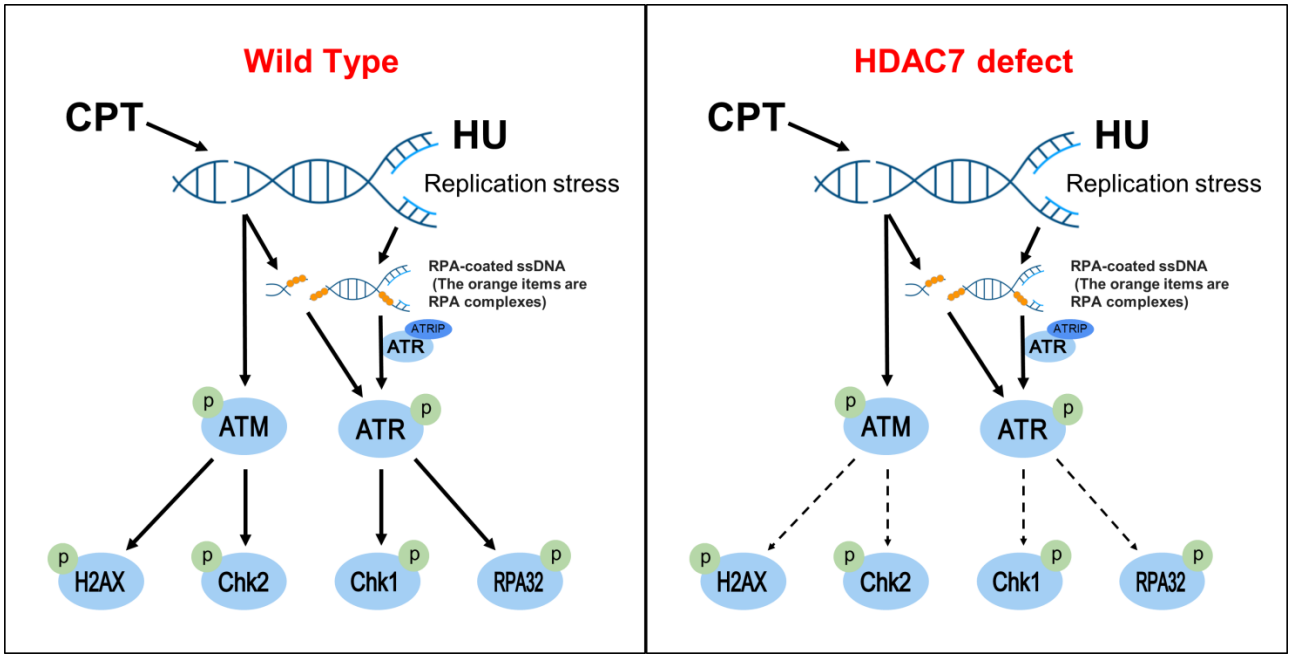
在西方墨點法中，基因沉默 HDAC7 後，磷酸化 ATM 並無差異，然而在雷射後免疫螢光染色中，磷酸化 ATM 聚集至損傷位點的比例卻有微幅下降。推測是細胞中的磷酸化 ATM 總量不變，然而其聚集至 DNA 損傷位點的能力有受到影響。

根據流式細胞儀實驗的結果，基因沉默 HDAC7 並不會影響細胞進入 S phase。因此可以得知 HDAC7 基因沉默導致的細胞週期檢查點不活化並非發生在 G1/S phase，未來還需要檢測其他的細胞週期檢查點，以釐清 HDAC7 的作用時機。

在細胞存活率的實驗當中，加入最高濃度的藥劑對細胞存活率及細胞群落形成的能力沒有明顯差別，推測是因為藥物的劑量已高於細胞所能承受的量而導致細胞皆死亡，進而也使細胞群落無法形成。而無論在中間劑量的 HU 或 CPT 處理下，HDAC7 基因沉默的組別的細胞存活率下降；在 Gemcitabine 處理下，細胞群落形成比例也降低，代表基因沉默 HDAC7 的癌細胞對於 DNA 損傷藥物會更加敏感，也減弱其形成細胞群落的能力。

柒、結論

本研究探討在 HeLa 或 U2OS 細胞株中，HDAC7 於 DNA 損傷修復反應中所扮演的角色，我們將實驗結果整理如圖九並條列重點如下：



圖九、HDAC7 在 DNA 損傷反應中的作用示意圖

HDAC7 對於細胞週期檢查點的活化以及因應複製壓力形成 DNA DSBs 至關重要。在基因沉默 HDAC7 的情況下，細胞無法活化 ATR-Chk1 和 ATM-Chk2 路徑，並且在 DNA 損傷藥物處理下更容易死亡。虛線代表該路徑受到抑制。

一、使 HDAC7 基因沉默後，Chk1、Chk2、RPA32 及 H2AX 等損傷修復蛋白磷酸化的量下降，進而抑制細胞週期檢查點的活化，使 DNA 無法進行修復，導致基因體不穩定，促使細胞凋亡。

二、使 HDAC7 基因沉默後，RPA32 Ser4/8 聚集至損傷位點的情形明顯下降，故 HDAC7 對於 RPA32 Ser4 / 8 的磷酸化至關重要。

三、使 HDAC7 基因沉默後，磷酸化 ATM 以及磷酸化 DNA-PK 的聚集皆受到影響，且磷酸化 DNA-PK 與 γH2AX 的疊合比例下降程度高。

四、使 HDAC7 基因沉默的癌細胞在 DNA 損傷藥物 (CPT 和 HU) 造成的 DNA 損傷下存活率降低。

五、在抗癌藥物 Gemcitabine 造成 DNA 損傷後，基因沉默 HDAC7 的癌細胞的細胞群落形成能力下降。

六、未來希望將能使 HDAC7 作為生物分子標的，並使用現有的 HDAC 抑制劑或者 siRNA 來減少 HDAC7 的活性或含量，同時搭配造成 DNA 損傷的藥物或放射治療以達到更有效毒殺癌細胞的目標，並用於相關探討及癌症治療，如標靶藥物的開發等實際應用層面。

捌、參考資料及其他

朱虹，繆澤鴻，丁健 (2012)。ATM、ATR 和 DNA 損傷介導的細胞週期阻滯。生命科學 Chinese Bulletin of Life Sciences，19(2)。取自 http://www.lifescience.net.cn/news/upload/20072139.pdf

吳青錫 (2017)。淺談 DNA 損傷反應與人類相關疾病。景福醫訊，34(7)，13-16。

張梅，王淼，伍會健 (2015)。SUMO 化修飾系統及其在腫瘤發展中的作用。中國細胞生物學學報 Chinese Journal of Cell Biology 2015，37(10)。取自 http://www.cjcb.org/news/upload/201510221009337340.pdf (2020)

臺大醫院醫學研究部，共同研究室電子報第二十八期 (2016)。取自 https://ntuhmc.ntuh.gov.tw/epaper-28th.htm (2019)

Robert T. Abraham (2001) Cell cycle checkpoint signaling through the ATM and ATR kinases. Genes&Devs. 15: 2177-2196. Retrieved from http://genesdev.cshlp.org/content/15/17/2177.full (2020)

Poorwa Awasthi, Marco Foiani, Amit Kumar (2015) ATM and ATR signaling at a glance. Journal of Cell Science 2015. 128: 4255-4262. Retrieved from https://jcs.biologists.org/content/128/23/4255.figures-only (2020)

Choi, J.H., Kwon, H.J., Yoon, B.I., Kim, J.H., Han, S.U., Joo, H.J., Kim, D.Y. (2001) Expression profile of histone deacetylase 1 in gastric cancer tissues. Jpn. J. Cancer Res. 92:1300–1304. Retrieved from https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11749695/ (2020)

I. Hoffmann (2000) The role of Cdc25 phosphatases in cell cycle checkpoints. 211:8–11. Retrieved from https://translate.google.com/translate?hl=zh-TW&sl=en&tl=zh-TW&u=https%3A%2F%2Flink.springer.com%2Farticle%2F10.1007%2FBF01279894&anno=2 (2019)

H. Liaw, D. Lee, K. Myung (2011) DNA-PK-Dependent RPA2 Hyperphosphorylation Facilitates DNA Repair and Suppresses Sister Chromatid Exchange. PLoS One. 6(6)

Tsu-Wei Lin (2019) PIAS3 deficiency sensitizes gastric and hepatic cancers to PARP (poly ADP-ribose polymerase) inhibition. Master dissertation, National Taiwan University, College of Medicine, No.1 Jen Ai road section 1 Taipei 100 Taiwan R.O.C.

Santiago Ropero, Manel Esteller (2007) The role of histone deacetylases (HDACs) in human cancer. Molecular Oncology. 1(1): 19-25. Retrieved from https://febs.onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1016/j.molonc.2007.01.001 (2020)

Yi Sang, Longhua Sun, Yuanzhong Wu, Wenxin Yuan, Yanyan Liu, Si-Wei Li (2019) Histone deacetylase 7 inhibits plakoglobin expression to promote lung cancer cell growth and metastasis. 54(3):1112-1122

Jaehwi Song, Ji Heon Noh, Jong Heun Lee, Jung Woo Eun, Young Min Ahn, Su Young Kim, Sug

Hyung Lee, Won Sang Park, Nam Jin Yoo, Jung Young Lee, Suk Woo Nam (2005) Increased Expression of Histone Deacetylase 2 Is Found in Human Gastric Cancer. APMIS. 113(4):264-8. Retrieved from https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15865607/ (2020)

Jyy-Shiuan Tu (2019) The role of SUMO E3 ligase RanBP2 in the DNA damage response. Master dissertation, National Taiwan University, College of Medicine, No.1 Jen Ai road section 1 Taipei 100 Taiwan R.O.C

L.I. Toledo, M. Altmeyer, M.B. Rask, C. Lukas, D.H. Larsen, L.K. Povlsen, S.Bekker-Jensen, N. Mailand, J. Bartek, J. Lukas (2013) ATR prohibits replication catastrophe by preventing global exhaustion of RPA. Cell. 155(5):1088-1103

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. J. Biol. Chem. 281:13548–13558. Retrieved from https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16533812/ (2020)

Anika Maria Weber, Anderson Joseph Ryan (2015) ATM and ATR as therapeutic targets in cancer. Pharmacology & Therapeutics. 149:124-138. Retrieved from https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0163725814002307 (2020)

Yonggang Wang, Mary Dasso (2009) SUMOylation and deSUMOylation at a glance. Journal of Cell Science 2009. 122: 4249-4252. Retrieved from https://jcs.biologists.org/content/122/23/4249#sec-5 (2020)

Stephanie A Yazinski, Lee Zou (2016) Functions, Regulation, and Therapeutic Implications of the ATR Checkpoint Pathway. 50:155-173. Retrieved from https://www.annualreviews.org/doi/abs/10.1146/annurev-genet-121415-121658 (2016)

Zhenhuan Zhang, Hiroko Yamashita, Tatsuya Toyama, Hiroshi Sugiura, Yoko Omoto, Yoshiaki Ando, Keiko Mita, Maho Hamaguchi, Shin-Ichi Hayashi, Hirotaka Iwase (2004) HDAC6 expression is correlated with better survival in breast cancer. Clin. Cancer Res. 10:6962–6968. Retrieved from https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15501975/ (2020)

【評語】052008

本研究目的在於探討 HDAC7 在 DNA 損傷反應中的角色，使用西方墨點法、免疫螢光染色、流式細胞儀分析、細胞活力檢測系統和細胞群落形成能力實驗，發現以 RNAi 技術將細胞的 HDAC7 基因沉默後會降低 DNA 損傷引起的 ATR-Chk1 及 ATM-Chk2 訊號強度，使不能有效率活化檢查點，並對 DNA 損傷藥物較敏感。由以上結果顯示，HDAC7 有潛力做為抗癌藥物研發的新目標。數據跟結果非常的豐富，統計分析可以再加強，siRNA 控制實驗及免疫螢光染色實驗可以再清楚呈現，整體而言研究結果應用性可期待。

作品海報

研究背景

一、DNA損傷反應

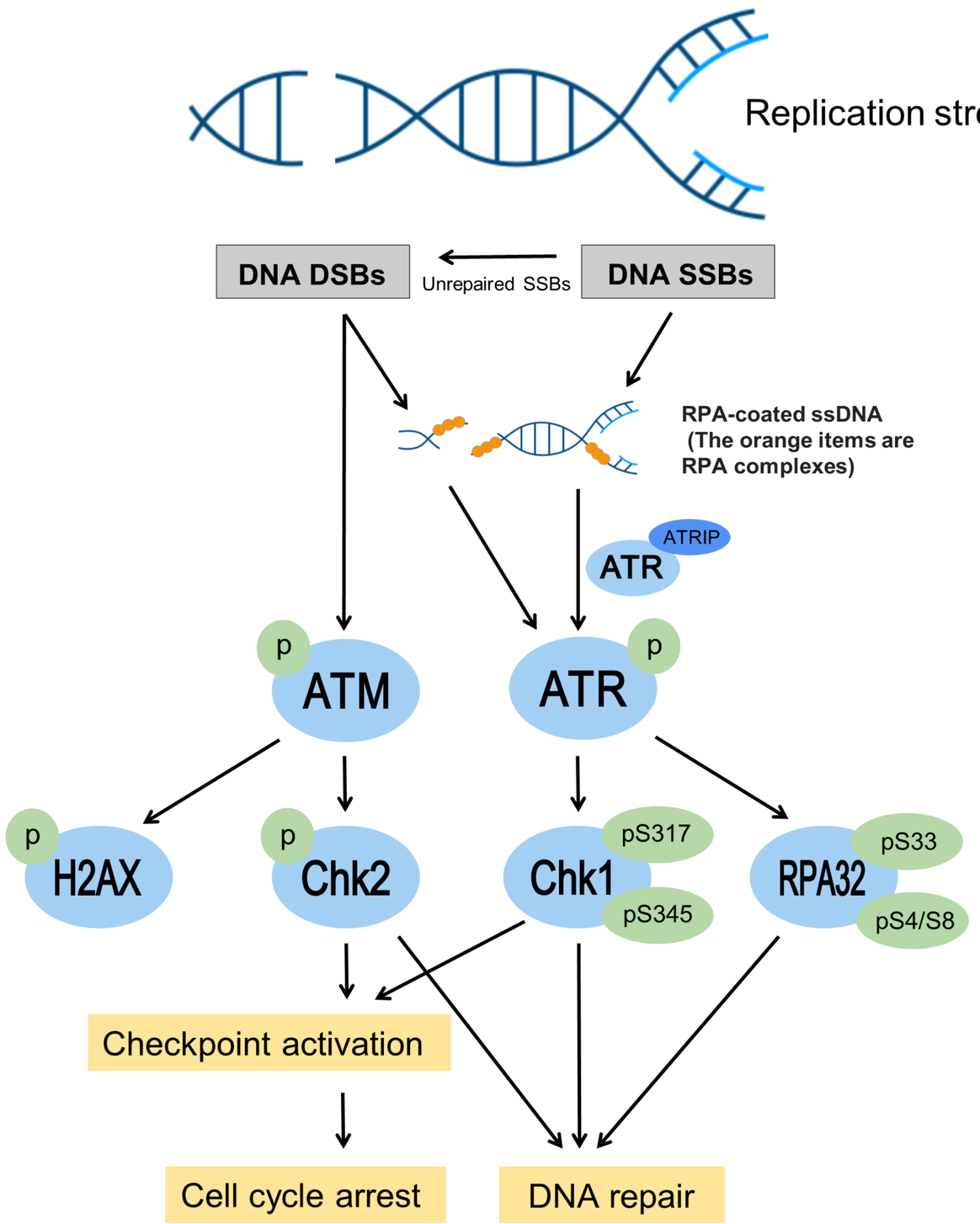
DNA帶有重要遺傳信息，且容易受到不同類型的損傷。積累的DNA損傷會導致基因體不穩定，進而導致癌症發生。為了維持基因體穩定性，細胞利用DNA損傷反應偵測與修復DNA損傷，包含兩個主要的訊息傳遞路徑：

1. ATR-Chk1 pathway

當DNA單股斷裂，RPA會接合至單股DNA並使ATR磷酸化。活化的ATR會磷酸化Chk1、RPA32等蛋白，磷酸化的Chk1會活化細胞週期檢查點，使細胞進行DNA修復。而磷酸化的RPA32會讓其他激酶加入且磷酸化RPA的其他位點如S4/S8，使更多DNA損傷修復蛋白加入。

2. ATM-Chk2 pathway

當DNA雙股斷裂時，ATM會磷酸化。磷酸化的ATM再使H2AX磷酸化成γH2AX以進行同源重組修復，同時也磷酸化Chk2 T68位點。



圖一、DNA損傷後訊息傳遞圖

二、組蛋白脫乙醯酶 (Histone deacetylase, HDAC)

許多研究顯示HDAC家族成員與癌症形成高度相關，HDACs可將組織蛋白或其他非組織蛋白上的乙醯基移除，影響基因的表現及蛋白質的穩定性與功能。已知使用HDAC抑制劑會降低DNA損傷修復反應，使癌細胞對DNA損傷藥物更為敏感。

三、DNA損傷藥物處理

本研究欲探討HDAC7在DNA損傷反應中所扮演的角色，利用不同方法造成細胞的DNA損傷，整理如表一：

表一、DNA損傷藥物與功能

DNA損傷藥物	功能
CPT (Camptothecin)	造成DNA雙股斷裂
HU (Hydroxyurea)	造成DNA單股斷裂
Gemcitabine	抑制DNA複製
UV (ultraviolet)	造成DNA雙股斷裂
雷射	造成DNA雙股斷裂

研究動機與目的

過往一直認為 ATR-Chk1 和 ATM-Chk2 的活化過程中僅是一系列蛋白的磷酸化。然而越來越多的證據顯示在磷酸化之外，包含小泛素化、乙醯化等轉譯後修飾也扮演著相當重要的調控角色。至今為止，關於HDAC7的研究甚少，鑑於HDAC7具有雙重酵素活性，本研究欲了解它是否參與在DNA損傷反應中並希望找出它的作用機制，更希望透過降低HDAC7的表現抑制腫瘤生長，作為抗癌藥物研發的標的。

研究架構

探討組蛋白脫乙醯酶 HDAC7 對於癌細胞 DNA 損傷修復機制之影響

↓

以 siRNA 處理細胞使 HDAC7 基因沉默

↓

加入 CPT、HU、Gemcitabine 或照射 UV、雷射以造成 DNA 損傷

↓

檢測 DNA 損傷反應：

1. 以西方墨點法分析 HDAC7 對 ATR-Chk1 及 ATM-Chk2 訊息傳遞路徑的影響
2. 以免疫螢光染色法分析 HDAC7 基因沉默是否影響損傷修復蛋白聚集至損傷位點
3. 以細胞活力檢測系統精準分析 HDAC7 對癌細胞存活率的影響
4. 以細胞群落形成實驗分析 HDAC7 對細胞群落生長的影響

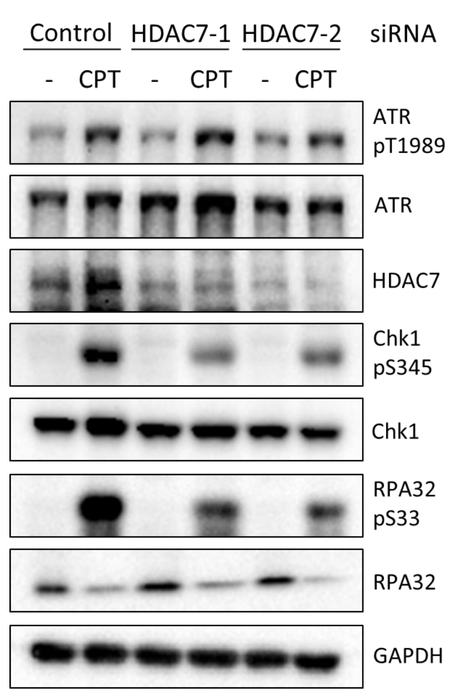
圖二、研究架構及方法

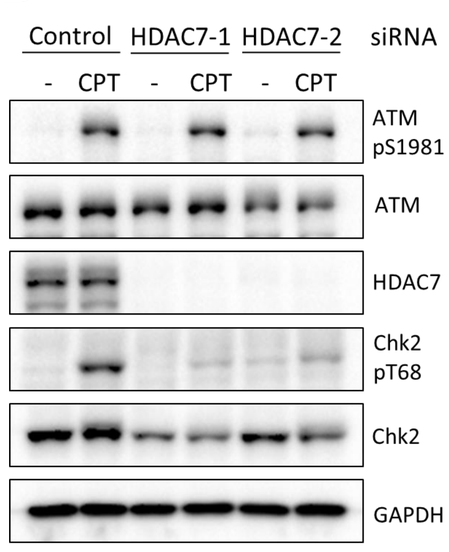
研究結果

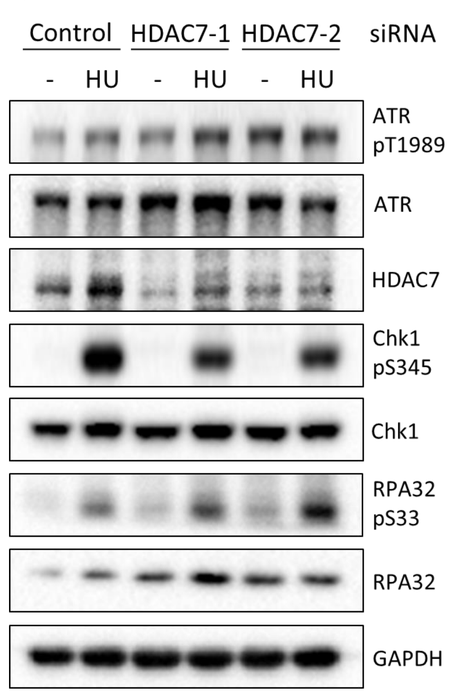
一、HDAC7基因沉默會抑制ATR-Chk1及ATM-Chk2 兩條訊息傳遞路徑

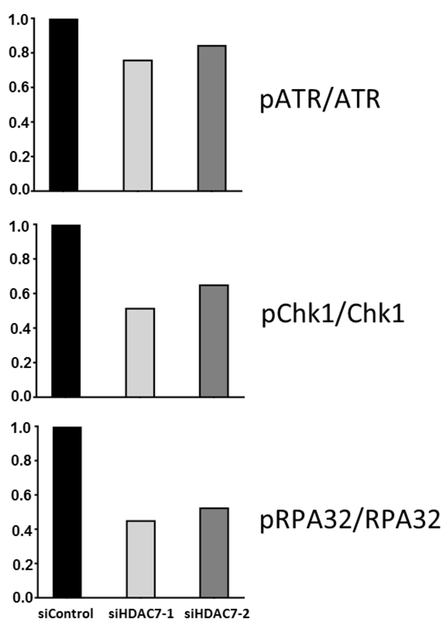
- HDAC7基因沉默不影響ATM、ATR的磷酸化，但會抑制Chk1、Chk2及RPA32的磷酸化

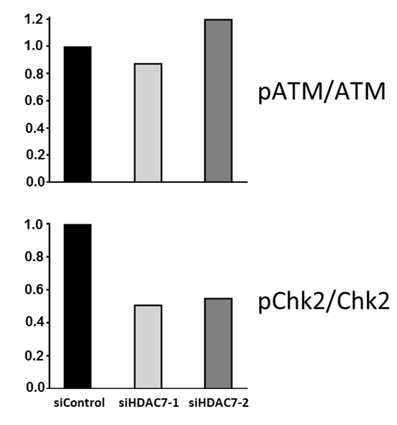
HeLa cell

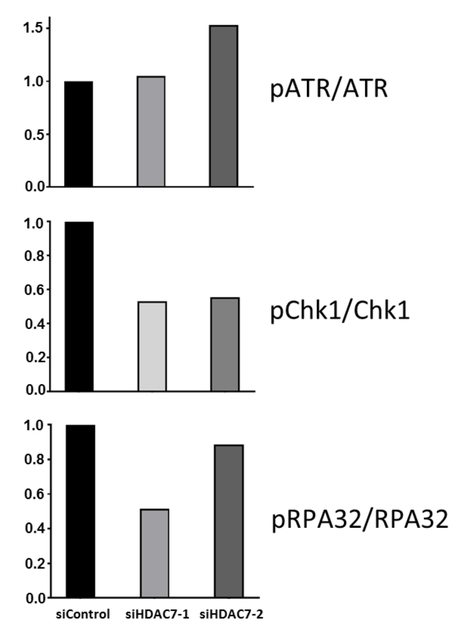




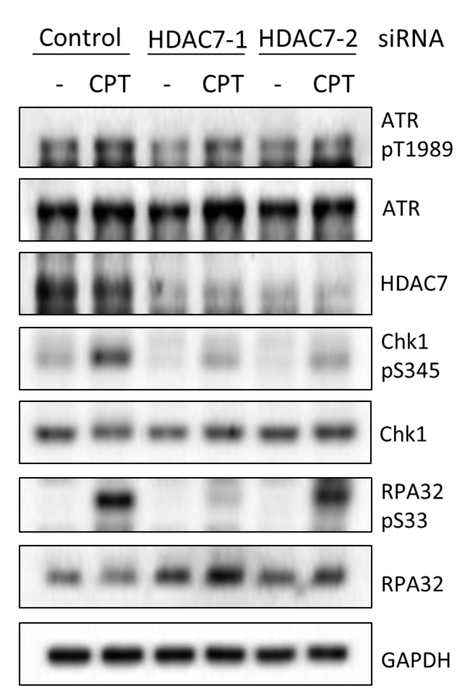


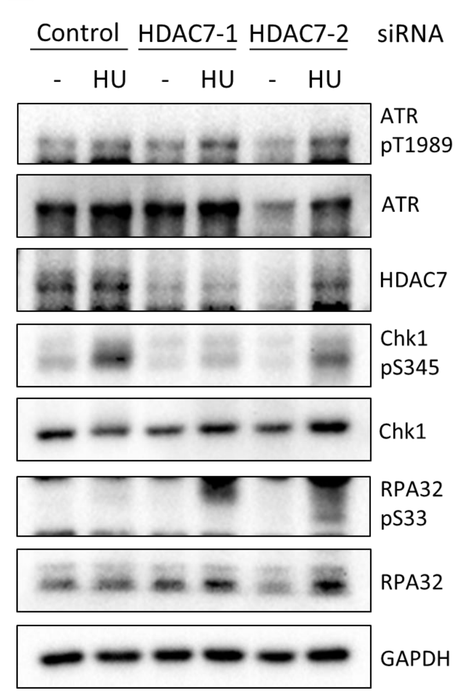


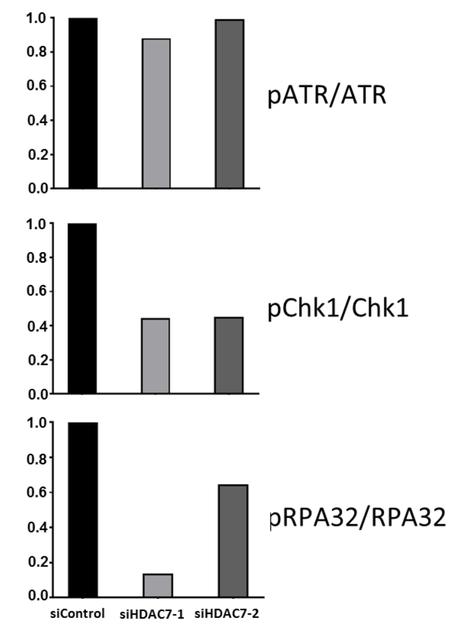


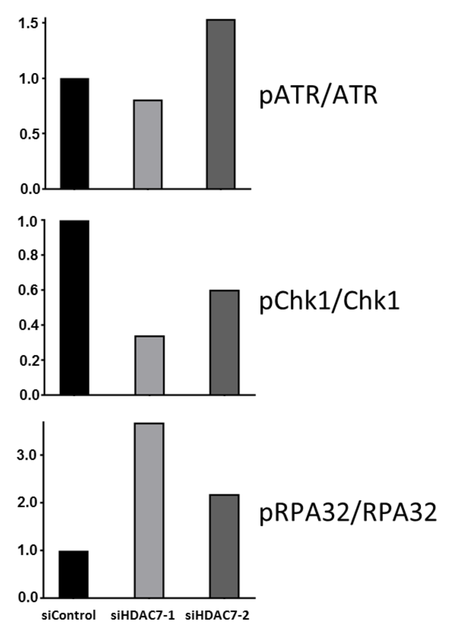


U2OS cell



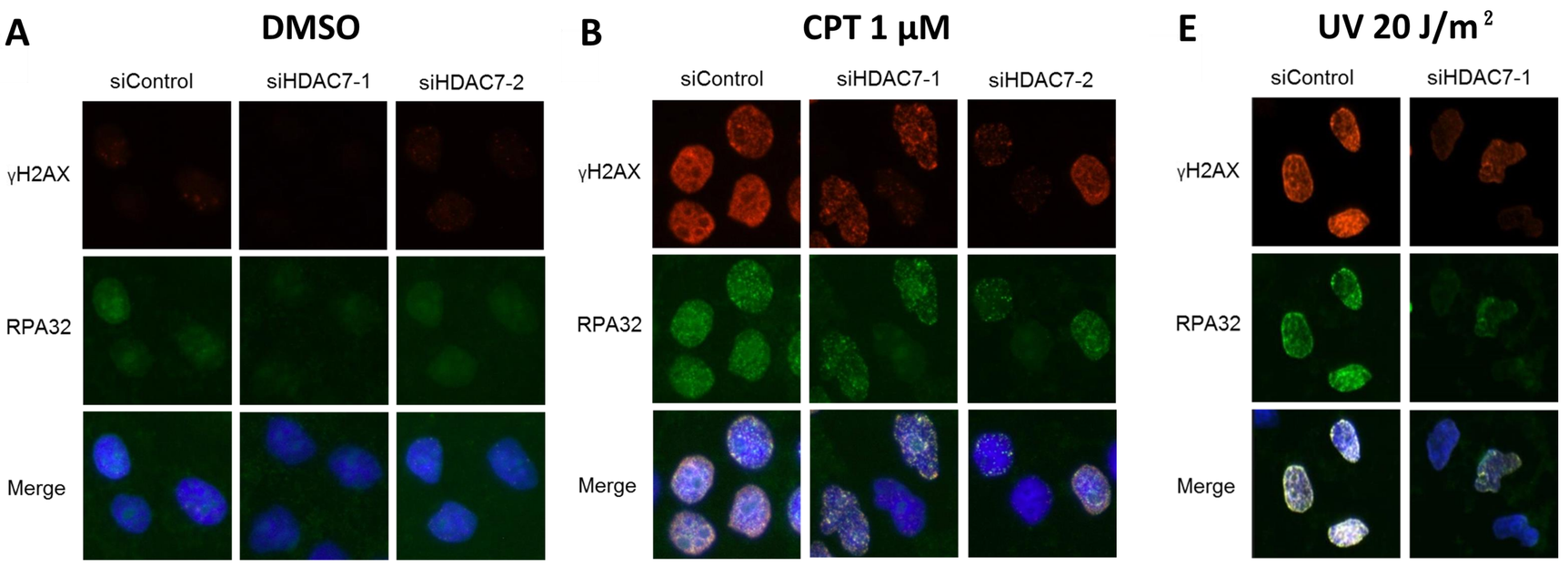






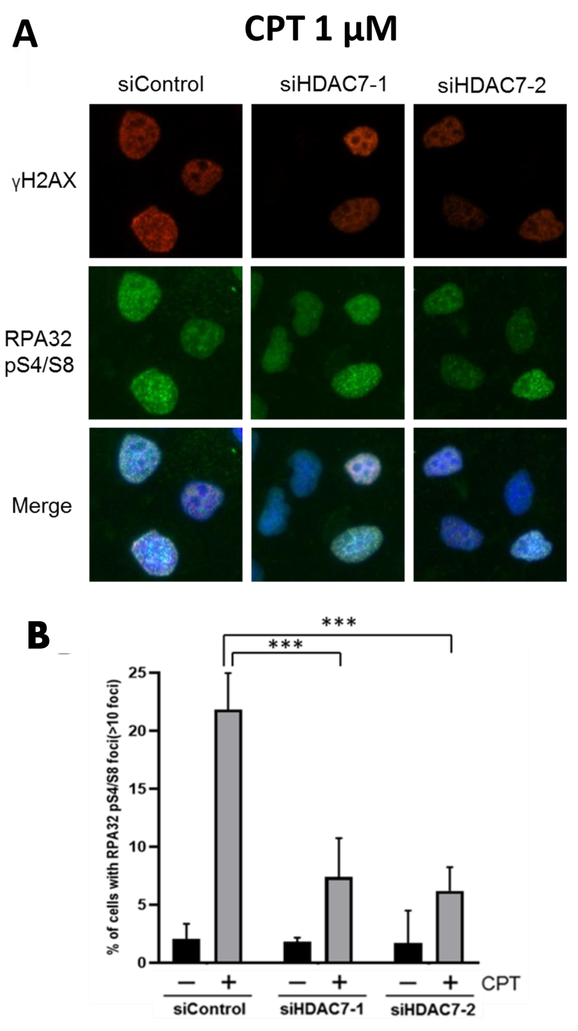
圖三、使HeLa cell (A) (B) (C) 與U2OS cell (D) (E) 的HDAC7基因沉默後，加入DNA損傷藥物1 mM的HU 、 1 μM的CPT 1小時，以西方墨點法分析DNA損傷修復蛋白的表現情形。

二、HDAC7基因沉默會抑制DNA損傷修復蛋白聚集至損傷位點



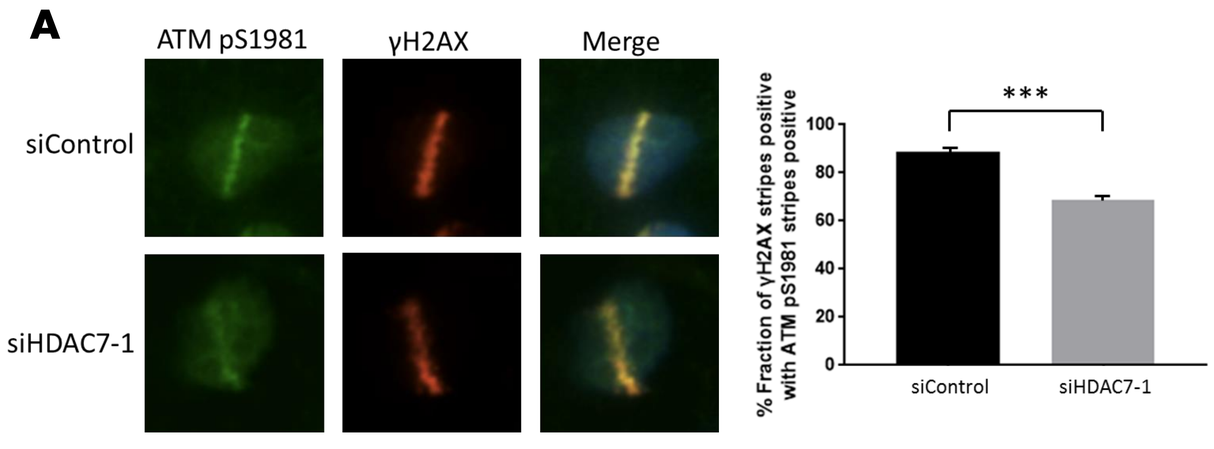
圖四、HDAC7基因沉默後，未加藥處理 (A) 及加入CPT處理 (B) 之免疫螢光染色結果，(C) 和 (D) 分別定量了 (B)中具有γH2AX和RPA32 foci的細胞比例。照射UV的結果 (E)，γH2AX和 RPA32分別定量為 (F) 和 (G)。

三、 HDAC7基因沉默會抑制RPA32 Ser4/8的磷酸化



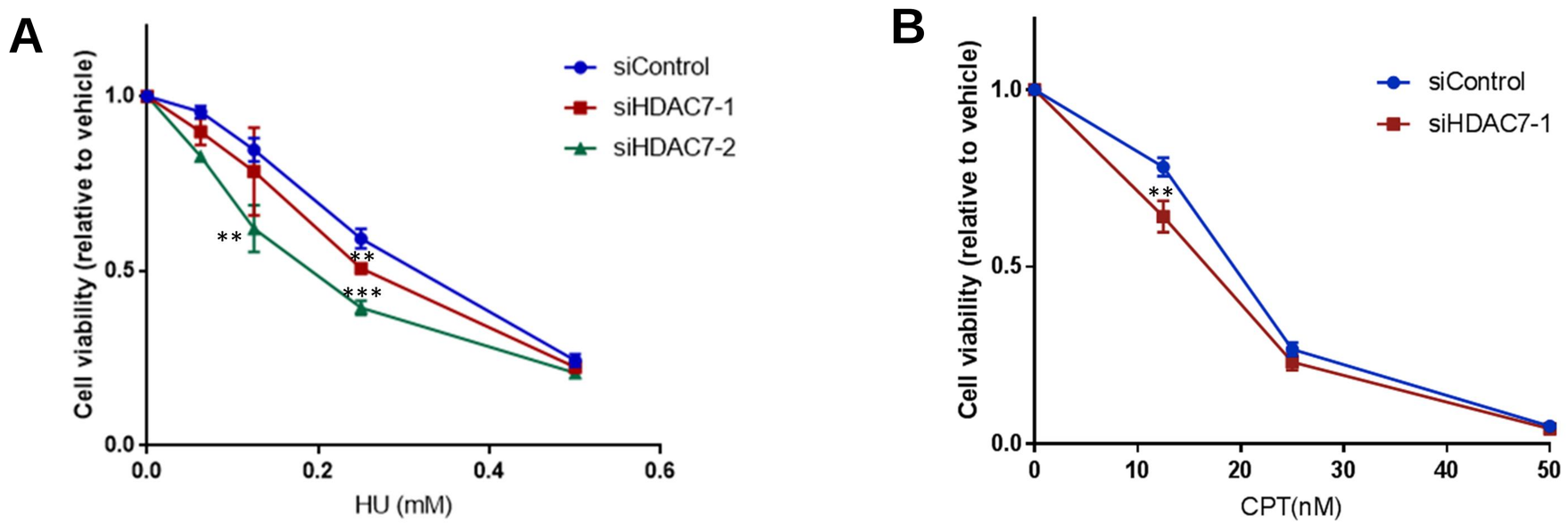
圖五、使HDAC7基因沉默後，(A) 為經過CPT處理後之免疫螢光染色結果，(B) 為 (A) 具RPA32 pS4/S8 foci的細胞比例定量圖。

四、HDAC7基因沉默會抑制 pATM及pDNA-PK聚集至損傷位點



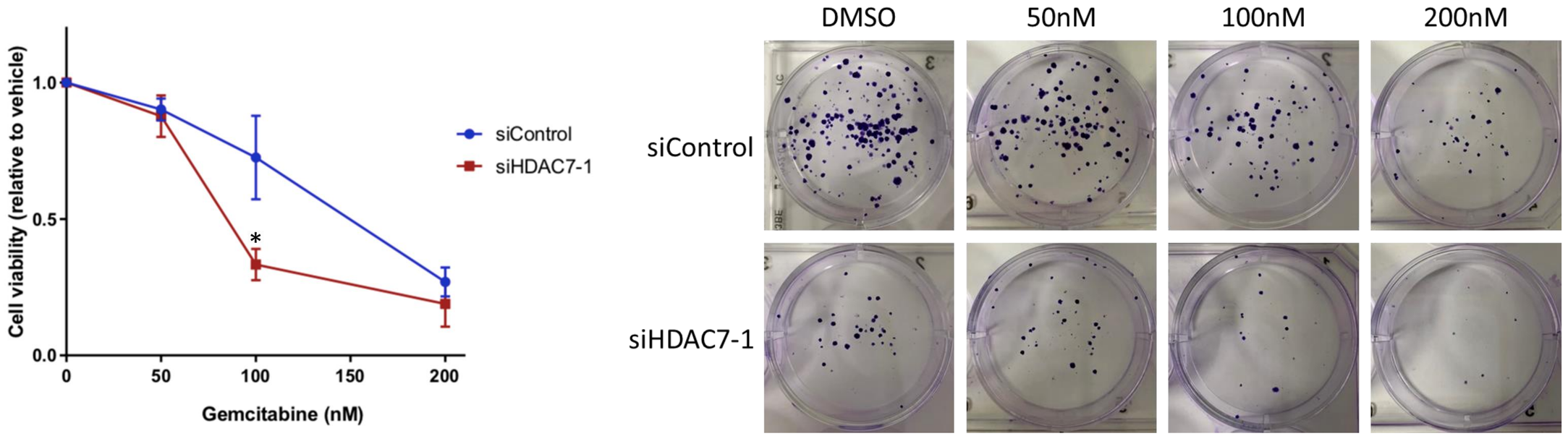
圖六、使HDAC7基因沉默後，照射雷射並觀察 γH2AX 與pATM (A) 及pDNA-PK (B) 在損傷位點的疊合情形。

五、HDAC7基因沉默使癌細胞對於抗癌藥物 HU、 CPT 更加敏感



圖七、使HDAC7基因沉默後，比較分別加入不同濃度的 HU (A) 或 CPT (B) 處理後的細胞存活率。

六、HDAC7基因沉默配合抗癌藥物 Gemcitabine 處理會使細胞群落形成能力下降更明顯



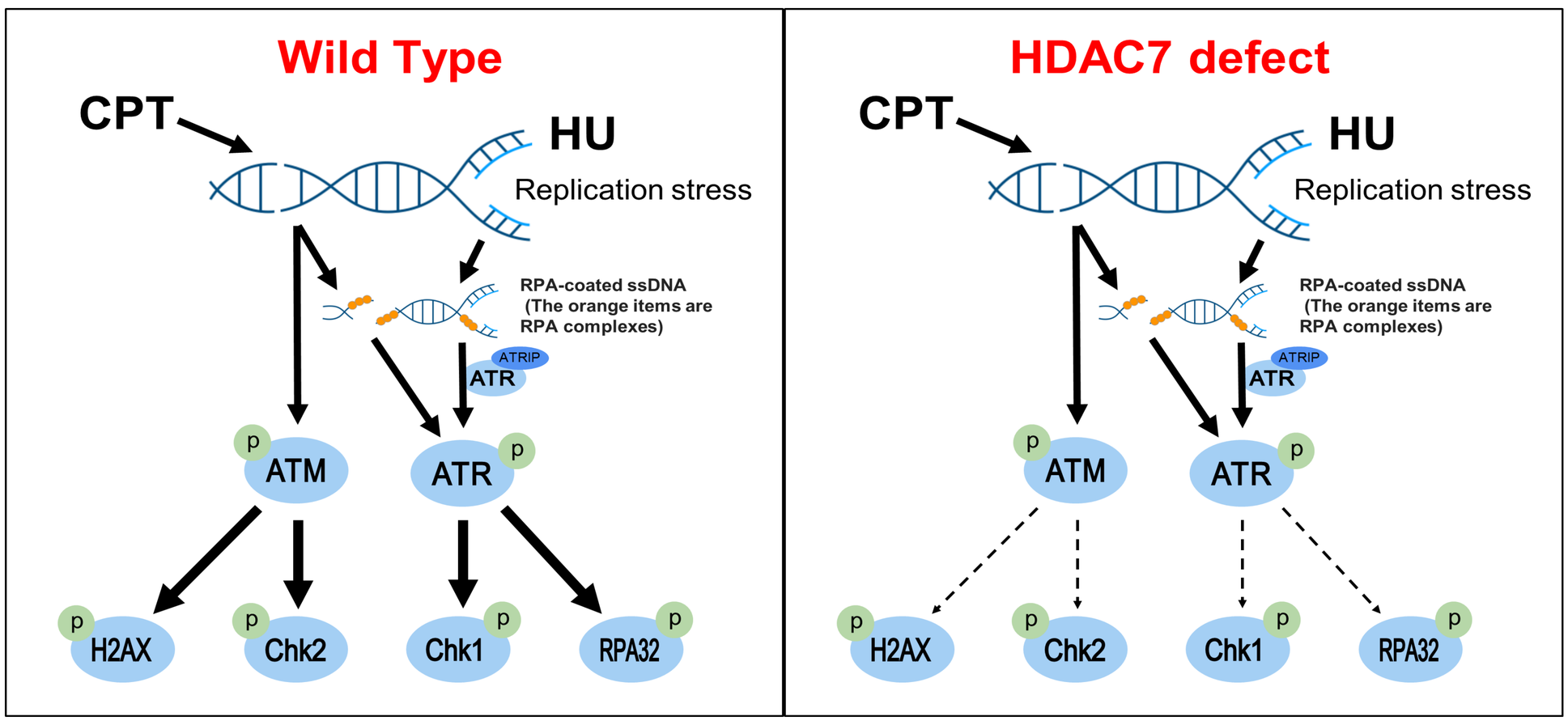
圖八、使HDAC7基因沉默後，加入不同濃度的 Gemcitabine 處理，並比較細胞群落形成能力。

討論

一、在免疫螢光染色中，RPA32下降約10%，推測其下降是因為γH2AX的下降所造成。

二、在西方墨點法中，基因沉默HDAC7後，pATM並無差異，然而在免疫螢光染色中，pATM聚集至損傷位點的比例卻有下降，推測是細胞中的pATM總量不變，然而聚集至DNA損傷位點的能力受到影響。

結論



圖九、HDAC7在DNA損傷反應中的作用示意圖 (虛線表示該路徑受到抑制)

一、HDAC7基因沉默後，Chk1、Chk2、RPA及H2AX等損傷修復蛋白磷酸化表現量下降，進而抑制細胞週期檢查點的活化，使DNA無法進行修復，導致基因體不穩定，促使細胞凋亡。

二、HDAC7對於RPA32 Ser4/8的磷酸化至關重要，並且也會抑制磷酸化ATM與磷酸化DNA-PK聚集至損傷位點。

三、HDAC7基因沉默使癌細胞對造成DNA損傷之抗癌藥物更加敏感，可以降低化療藥物使用量，進而減少抗藥性及副作用、提高患者生活品質。

四、希望以HDAC7作為生物分子標的，利用HDAC抑制劑或siRNA減少HDAC7的表現，並搭配造成DNA損傷的藥物或放射治療以達到更有效毒殺癌細胞的目標。

參考資料

一、吳青錫。淺談DNA損傷反應與人類相關疾病。景福醫訊，34：13-16，2017

二、朱虹，繆澤鴻，丁健。ATM、ATR 和 DNA 損傷介導的細胞週期阻滯。Chinese Bulletin of Life Sciences，19：139-148，2012

三、Yi Sang, et al. Histone deacetylase 7 inhibits plakoglobin expression to promote lung cancer cell growth and metastasis. 54：1112-1122, 2019

四、Functions, Regulation, and Therapeutic Implications of the ATR Checkpoint Pathway. Retrieved from https://www.annualreviews.org/doi/abs/10.1146/annurev-genet-121415-121658. 50：155-173, 2016