

東海大學生命科學系

碩士論文

指導教授：謝 明 麗

Mingli Hsieh

研究熱休克蛋白27在粒線體DNA突變疾病中扮  
演的角色

Study of the roles of HSP27 in mitochondrial DNA  
mutation diseases

研究生：陳 靜 怡

Chin-Yi Chen

中華民國 98 年 08 月 04 日

東海大學生命科學系碩士論文

研究熱休克蛋白27在粒線體DNA突變疾病中扮  
演的角色

Study of the roles of HSP27 in mitochondrial DNA  
mutation diseases

研究生：陳 靜 怡

Chin-Yi Chen

指導教授：謝 明 麗

Mingli Hsieh

中華民國 98 年 08 月 04 日

# 博碩士論文電子檔案上網授權書

(提供授權人裝訂於紙本論文書名頁之次頁用)

本授權書所授權之論文為授權人在東海大學生命科學系~~生物醫學~~組97學年度第二學期取得碩士學位之論文。

**論文題目：** 研究熱休克蛋白27在粒線體DNA突變疾病中扮演的角色  
**指導教授：** 謝明麗

茲同意將授權人擁有著作權之上列論文全文(含摘要)，非專屬、無償授權國家圖書館及本人畢業學校圖書館，不限地域、時間與次數，以微縮、光碟或其他各種數位化方式將上列論文重製，並得將數位化之上列論文及論文電子檔以上載網路方式，提供讀者基於個人非營利性質之線上檢索、閱覽、下載或列印。

- 讀者基非營利性質之線上檢索、閱覽、下載或列印上列論文，應依著作權法相關規定辦理。

**授權人：** 陳靜怡

**簽名：** 陳靜怡

中華民國98年08月01日

東海大學生命科學系  
碩士論文學位考試審定書

生命科學系碩士班研究生 陳靜怡 君所撰寫之論文

(中文)

研究熱休克蛋白 27 在粒線體 DNA 突變疾病中扮演的角色

(英文)

Study of the roles of HSP27 mitochondrial DNA mutation diseases

經本委員會審定通過，特此證明。

學位考試委員會

召集人

胡承波 (簽名)

委員

魏耀揮

蔡云真

陳光廷

謝明郁

中華民國 98 年 6 月 22 日

## 致謝

謝明麗老師是除了父母之外，幫助我最多的人。要是沒有謝老師讓我在大二進入實驗室學習相關知識及技能，我將無法在大學時期便瞭解自己。老師總是耐心教導，並且花費許多時間在和天馬行空的我討論。當我衝得太及時，是她緩住我的腳步；怠惰不前時，是她適時督導。她協助了我的認知及自我成長，讓我更確信自己的志向及未來。在實驗室中以及其它實驗室的學長姐和學弟妹，對於研究上的協助更是難以計數。除此之外，馬昶老師包容了我在研究上的嚴重錯誤；甚至給予鼓勵。馬老師對於我精神層面的開導更勝於課堂上的知識授予，是我無法不提及的老師。胡承波老師除了讓我頓時對讀書開竅，更是在千憂百慮之際協助我解答的人。當我對人事物感到困惑甚至懷疑自己時，她的分析及評估總是準確地協助我找到出路。在這大學四年加上研究所兩年，系上的老師的教導及協助無法估計。更不用說這六年中，曾經給與我協助的學長姐弟妹是有多少。雖未一一提及，但我已經將大家謹記在心。

本論文感謝

財團法人罕見疾病基金會

第十屆罕見疾病碩博士論文獎助

# 目錄

中文摘要	1-2
英文摘要	3-5
前言	6-23
材料與方法	24-30
結果	31-41
討論	42-51
文獻	52-78
圖目	79-95
附錄	96-102
個人資料	103-103

## 摘要

已知 HSP27 可調控經粒線體所引發的細胞凋亡。過去我們的研究發現 HSP27 在 MERRF 病人的淋巴母細胞中表現量下降。並且在 MERRF cybrid cells 中 HSP27 表現量也呈下降，特別顯著的是 phospho-HSP27。在 MERRF cybrid cells 穩定表現 HSP27，可顯著降低處理 staurosporine 後的細胞凋亡，顯示 HSP27 在帶有 MERRF mtDNA 突變的 cybrid cells 中扮演保護的角色。根據 MERRF cybrid cells 外加 ATP 結果分析，以及在存有 CPEO 疾病的 cybrid cells 中觀察到增加的內生性 phospho-HSP27 表現量，可排除缺少足夠 ATP 造成 phospho-HSP27 減少的可能性。我們更進一步得知，MERRF 細胞在壓力情況下可正常調控 phospho-HSP27 及 HSP27 的反應。為了瞭解在 MERRF cybrid cells 中降低 HSP27 表現的機制，我們研究 HSP27 的蛋白降解途徑。由 MG132、細胞飢餓或 rapamycin 處理的證據顯示，HSP27 可能藉由自噬作用降解。相反的，phospho-HSP27 可能為蛋白酶體路徑降解。活化的 LC3 II 及 ATG12 在 MERRF cybrid cells 中存在較高基礎表現量，顯示在 MERRF cybrid cells 中可能持續地活化自噬作用。這個觀察可部分解釋，為什麼 HSP27 表現量在 MERRF cybrid cells 中降低。由本論文研究可知，HSP27 經自噬作用途徑降解以及



HSP27 對 MERRF cybrid cells 扮演保護性的角色。HSP27 及自噬作用的調控可能為未來治療 MERRF 疾病的方向。

## Abstract

Heat shock protein 27 has been reported to regulate the mitochondria-mediated cell apoptosis. From our previous study, reduced HSP27 was found in lymphoblastoid cells from myoclonus epilepsy with ragged-red fibers patients. Protein level of HSP27 was decreased in MERRF cybrid cells, especially evident in the phospho-HSP27. Overexpression of HSP27 in MERRF significantly decreases cell death under staurosporine treatment, indicating that HSP27 plays protective roles in cells harboring MERRF mtDNA mutation. From exogenous ATP addition to MERRF cybrid cells and the increased level of phospho-HSP27 in CPEO cybrid cells, we ruled out the possibility that lacking enough ATP results in a decreased phospho-HSP27. Furthermore, MERRF cells showed normal regulation of phospho-HSP27 and HSP27 under stress. To understand the mechanism of decreased HSP27 in MERRF cybrid cells, we examined the protein degradation pathway of HSP27. Evidences from MG132, starvation and rapamycin treatments suggested that HSP27 may be degraded by the autophagic pathway. On the other hand, phospho-HSP27 may go through the proteasomal pathway.

The increased basal levels of LC3 II and ATG12 were found in MERRF cybrid cells, indicating a constitutively activated autophagic pathway. It may explain, at least partially, why HSP27 was decreased in MERRF cybrid cells. This thesis provided understandings that HSP27 is degraded through the autophagic pathway and its' protective role in MERRF cellular models. Regulation of HSP27 and the autophagic pathway might be therapeutic candidates for MERRF disease in the future.

**Abbreviations:** Heat shock protein 27, HSP27; phospho-serine78-heat shock protein 27, pSer78-HSP27; small heat shock protein, sHSP ; myoclonus epilepsy with ragged-red fibers, MERRF; lymphoblastoid cells, LCL; cytoplasmic hybrids, cybris cells; staurosporine, STS; adenosine triphosphate, ATP; Extracellular signal-regulated kinases, ERK; phospho- ERK, p-ERK; JUN NH<sub>2</sub>-terminal kinases, JNK; phospho- JNK, p-JNK; stress-activated protein kinase 2/ mitogen-activated protein kinases, SAPK2/p38 MAP kinase, p38; phospho- p38, p-p38; chronic progressive external ophthalmoplegia, CPEO; autophagy-specific gene, ATG; microtubule-associated protein light chain 3, LC3; mitochondrial DNA, mtDNA; leber hereditary optic neuropathy, LHON; kearns-sayre syndrome, KSS; mitochondrial encephalomyopathy, lactic acidosis, and strokelike episodes, MELAS; adenine, A; guanine, G; serine, Ser or S; asparagine, Asp or D; alanine, Ala or A; electron transport chain, ETC; reactive oxygen species, ROS; apoptosis inducing factor, AIF; heat shock element, HSE; heat shock factor, HSF; kilodaltons, kDa; distal hereditary motor neuropathies, dHMNs; Charcot-Marie-Tooth-inherited neuropathies type 2F, CMT 2F; real-time reverse transcriptase PCR, RT-PCR; earle's balanced salts solution, EBSS; not significant, NS ◦

# 前言

## 粒線體疾病 (Mitochondrial diseases)

粒線體 (mitochondria) 是普遍存在細胞中的胞器，並且擁有自己的遺傳物質。粒線體負責消耗氧氣 (oxygen) 並將自食物取得的物質轉換為能量。粒線體所產生的能量以ATP (adenosine triphosphate) 的方式呈現，並被傳送到細胞質 (cytoplasm)，可提供細胞百分之九十的能量來源。自1940年代起，一系列與代謝有關的疾病相繼被歸類出。在1959年，出現第一位被診斷出具有粒線體功能失調(Luft disease) 的病人 (Luft, 1994)。到了1963年，研究學者首次發現粒線體具有獨自的DNA (mitochondrial DNA, mtDNA)，是出現在細胞核DNA (nuclear DNA, nDNA) 之外的遺傳物質 (Nass and Nass, 1963)。mtDNA被認為是受修飾後的質體(plasmid) (Anderson et al., 1981)，因組織而異，平均每個粒線體含有二至十個mtDNA (Nass, 1968)。平均每個細胞可能含有的粒腺體數目可達數百至數千個 (Shmookler and Goldstein, 1983)。現今，粒線體細胞病症 (mitochondrial cytopathies) 用於泛指一群因遺傳或後天粒線體功能失調的疾病。mtDNA (mitochondrial dna, mtDNA) 的突變所造成的粒線體功能失常會導致人類神經肌肉的疾病(neuromuscular disease)，而突變率必須高達一定

比例才會有嚴重的症狀出現，會依照不同個體或組織而有不同閾值（Hammans et al., 1993; Chinnery et al., 1997）。mtDNA上的37基因分別表達2個核糖體RNA（ribosomal RNA, rRNA）、22個轉移RNA（transfer RNA, tRNA）以及13個多肽鏈（polypeptide）。粒線體中大多數的蛋白是由細胞核基因表現，調控粒線體的複製、電子傳遞鏈、粒線體內外膜通道蛋白及粒線體內蛋白合成等重要功能。因此當細胞核基因突變而影響到粒線體正常功能，也是導致粒線體疾病的原因。粒線體細胞病症約有一百二十種（Holt et al., 1988），其中常見的共同影響在於：粒線體無法正常地將食物或是氧氣完整的轉換為能量。一個完整的轉換過程約有幾百個化學反應參與其中，任何一個步驟失誤均可能導致毒性物質的堆積。雷伯氏遺傳性視神經萎縮症（leber hereditary optic neuropathy, LHON）、粒線體性肌肉病變（mitochondrial myopathy）及卡恩斯-沙耶症候群（kearns-sayre syndrome, KSS）是首先被報導為mtDNA突變所導致的人類疾病（Holt et al., 1988; Lestienne and Ponsot, 1988; Wallace et al., 1988; Zeviani et al., 1988）。mtDNA疾病通常為症候群，將相似臨床症狀分為同症候群，但是不同家族或病人之間的致病因素可能是多樣而具有差異的（Wallace, 1992; Zeviani et al., 1998; Simon and Johns, 1999）。mtDNA細胞病症尚包含肌陣攣癲癇（myoclonic epilepsy and ragged-red fiber disease,

MERRF)、慢性漸進性外眼肌麻痺 (chronic progressive external ophthalmoplegia syndrome, CPEO) 以及粒腺體腦肌肉病變、乳酸堆積性酸中毒、及類中風發作症候群 (mitochondrial encephalomyopathy, lactic acidosis, and strokelike episodes, MELAS) (Pavlakakis et al., 1984; Goto et al., 1990; Shoffner et al., 1990; Schon et al., 1997)。

### **肌陣攣癇 (Myoclonus Epilepsy associated with Ragged-Red Fibers, MERRF)**

肌陣攣癇症候群 (MERRF) 病人為mtDNA突變導致肌肉神經失調病徵，大多數為母系遺傳的粒線體腦肌病(encephalomyopathy)，在肌肉及神經系統皆呈現多樣化的病徵。在mtDNA中A8344G、T8356C、G8361A及G8363A的突變位置皆在粒線體轉移RNA (*mt-tRNA<sup>Lys</sup>* gene) 上，造成粒線體中蛋白合成過程的缺失，約有百分之八十至九十的MERRF病人是A8344G突變所導致 (Shoffner et al., 1990; Noer et al., 1991; Silvestri et al., 1992; Zeviani et al., 1993; Fabrizi et al., 1996; Ozawa et al., 1997)。已知mtDNA的第8344個 (A8344G) 核苷酸由腺嘌呤 (adenine, A) 突變成鳥糞嘌呤 (guanine, G) 與粒線體中蛋白質合成的嚴重缺陷有關，不論在細胞或是組織都可觀察到電子傳遞鏈 (Electron Transport Chain, ETC) 的氧氣消耗及呼吸鏈活性

(respiration rate) 下降 (Chomyn et al, 1991; Larsson et al., 1992; Yoneda et al., 1994; Arpa et al., 1997)。此外，文獻也指出在MERRF細胞的Complex I酵素活性顯著下降，而COX (cytochrome *c* oxidase) 只保留5-35 % 酵素活性；另外相對於正常細胞，MERRF細胞只能製造約50 % 的ATP；除此之外，當粒線體膜電位下降至6-78 %，可能影響細胞的存活；然而，在F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>-ATPase及complex III酵素活性則較不受影響；至於氧化自由基 (reactive oxygen species, ROS) 則是有增加趨勢 (Boulet et al., 1992; Larsson et al., 1992; Wei et al., 1996; Arpa et al., 1997; Schon et al., 1997; Antonicka et al., 1999; Lin and Beal, 2006)。

自1989年King及Attardi成功地在人類細胞中去除mtDNA後，表現不同mtDNA突變的細胞質融合細胞 (cytoplasmic hybrids或簡稱為cybrid) 大量地被篩選出來，用於mtDNA突變的相關研究，MERRF及MELAS是最先在細胞質融合細胞中探討細胞生理機制的疾病 (King et al., 1992; Chomyn et al., 1994; Masucci et al., 1995)。在MERRF細胞質融合細胞的研究顯示，當細胞攜帶A8344G突變時，並遭受外來氧化壓力及引發細胞凋亡的藥物處理下，相對於正常細胞質融合細胞有較顯著的細胞凋亡 (James et al., 1996; Liu et al., 2004; Schoeler et al., 2005)。

目前研究已知，粒線體為細胞凋亡 (apoptosis) 路徑重要的調控



者，細胞凋亡或稱為程序性細胞死亡（programmed cell death）主要受兩個路徑所調控（附圖一）（Liu et al., 1996; Kluck et al., 1997; Petit et al., 1997; Brookes et al., 2004）。一為來自細胞外部的(extrinsic)訊號活化細胞膜上的Fas受體蛋白(Fas receptor)；另一為細胞內部(intrinsic)訊號藉由粒線體所調控（Concannon et al., 2003; Mund et al., 2003）。Fas配體(Fas ligand)在細胞表面結合至Fas受體後，最終活化caspase-8（cysteine aspartate protease-8）以及其下游的層級反應（caspase cascade），使得細胞死亡（Charette et al., 2000; Sartorius et al., 2001; Concannon et al., 2003）。當細胞受損時，例如DNA毀壞(DNA damage)、局部缺血或再灌注（ischemia/ reperfusion）或是化學治療藥物，可能啟動內部路徑(intrinsic pathway)的進行，導致粒線體釋出調控凋亡分子到細胞質中。粒線體釋出的調控凋亡分子包含Smac/Diablo、細胞凋亡引發分子（apoptosis inducing factor, AIF）及細胞色素c（cytochrome c），最終活化凋亡骨牌反應（caspase cascade）進入細胞凋亡（Slee et al., 1999; Bruyea et al., 2000; Pandey et al., 2000; Concannon et al., 2001; Ashkenazi, 2002; Paul et al., 2002; Li et al., 2009）。

## 熱休克蛋白 (Heat shock protein)

Ritossa 在 1962 年發現熱刺激反應 (heat shock response)，觀察到呼吸作用去偶合劑 (respiration uncoupler) 二硝基酚 (dinitrophenol) 及熱刺激會改變果蠅 (*Drosophila buschi*) 唾腺組織染色體 (polytene chromosomes) 泡芙結構 (Ritossa, 1962)。1974 年，Schlesinger 進一步在果蠅細胞中發現 HSP (Heat shock protein) 是在刺激後選擇性被表現的蛋白 (Schlesinger, 1989)。

面對例如老化、高溫、酒精、重金屬、氧化壓力 (oxidative stress)、局部缺氧 (ischemia) 以及細菌內毒素 (bacterial endotoxins) 等環境變化產生的壓力，細胞藉由一群壓力蛋白作用機制協助細胞適應壓力並保護自身 (Ehrnsperger et al., 1997; Gabai et al., 1998; Clark and Muchowski, 2000; Concannon et al., 2003; Arya et al., 2007)。當細胞處在高溫之下，主要藉由合成 HSP 或壓力蛋白 (stress protein) 協助細胞恢復高溫所致的蛋白錯誤折疊，HSP 是細胞常見的壓力反應分子 (Welch, 1993; Schlesinger, 1994)。壓力刺激引發的 *HSP* 基因的轉錄 (transcription) 活化是由其基因上游 (upstream) 的熱刺激片段 (heat shock element, HSE) 與轉錄活化子 (transcription activating factor) 熱刺激因子 (heat shock factor, HSF) 之間的交互作用所調控 (Lindquist and Craig, 1988; Morano and Thiele, 1999; Pirkkala et al., 2001)。

HSP家族依據其分子量而區分為兩大家族：大分子量HSP（high molecular weight heat shock protein）及小分子HSP（small heat shock protein, sHSP）。大分子量HSP依分子量又區分為HSP100（Heat shock protein 100）、HSP90（Heat shock protein 90）、HSP70（Heat shock protein 70）及HSP60（Heat shock protein 60）四個小家族。大分子量HSP是依賴ATP（adenosine triphosphate）的伴侶分子（chaperone）。不需要ATP的sHSP家族包含單聚體（monomeric）的分子量範圍由9至42千道爾吞（kilodaltons, kDa）。sHSP在蛋白質羧端（C-terminal）共同享有保留的序列，在接近胺基酸端（N-terminal）則具有富含苯丙胺酸（phenylalanine-rich）的延伸（stretches）短片段，或稱為WD/EPF motif（Arrigo, 1998; Ehrnsperger et al., 1998; Lambert et al., 1999）。sHSP家族最為高度保留的胺基酸序列在C-terminal的 $\alpha$ -crystallin domain，由約80至100個胺基酸所構成，對於形成大分子聚合物執行chaperone功能極具重要性（Ehrnsperger et al., 1997; Leroux et al., 1997）。目前已知，人類sHSP包括：HspB1/Hsp27、HspB2/MKBP、HspB3/HspL27、 $\alpha$ AcrySTALLIN、 $\alpha$ Bcrystallin、Hsp20、HspB7/cvHsp27、HspB8/H11/Hsp22、HspB9及HspB10/Odf1（Kappe et al., 2003）。如同其他HSP家族，sHSP也具有chaperone功能，為不需要ATP的chaperone。sHSP與未折疊蛋白結合後，維持此目標蛋白在可溶性狀態，而讓其它依賴ATP的

chaperone恢復此目標蛋白重新折疊出正確結構 (Ehrnsperger et al., 1997; MacRae, 2000)。sHSP共有的特色是彼此之間藉由折板結構 ( $\beta$ -sheet) 形成不同組合及不同大小的聚合物，組合分子量大小從100至800千道爾吞不等，甚至鼠類Hsp25可與人類HSP27形成聚合物 (Bova et al., 2000; Mounier and Arrigo, 2002)。sHSP參與許多生物功能，包含調節氧化還原反應、細胞增生、細胞分化以及細胞骨架的聚合反應 (Arrigo, 1998; MacRae, 2000)。在各式不同的體外培養細胞中表現sHSP，皆可以增加對熱壓力的耐受性 (Arrigo, 1998)。sHSP的合成以及其突變與許多人類疾病相關，包含肌肉病變 (muscle myopathy)、多發性硬化症 (multiple sclerosis) 以及各種神經退化性疾病 (Ehrnsperger et al., 1997; Bova et al., 1999; Irobi et al., 2004)。因此，目前許多研究提出以HSP為標的分子，利用合成藥物調控其表現量或活性，達到治療各種疾病的可能性 (Westerheide and Morimoto, 2005)。

當哺乳類細胞面臨熱刺激引發的細胞死亡，可以藉由過度表現sHSP而增加細胞存活度，其它刺激所引發的細胞死亡，例如氧化壓力、抗癌藥物、腫瘤壞死因子 (tumor necrosis factor  $\alpha$ , TNF- $\alpha$ )、抗Fas的拮抗抗體及STS (staurosporine) 皆可因過度表現sHSP而降低細胞的死亡率。生化研究顯示sHSP具有保護作用，是藉由對非天然

的蛋白 (non-native proteins) 執行 chaperone 功能 (Landry et al., 1989; Jakob et al., 1993; Garrido et al., 1996; Garrido et al., 1997; Jaattela, 1999)。sHSP 可藉由與 cytochrome *c* 交互作用及抑制 caspase-9 活化，而避免細胞凋亡 (Garrido et al., 1999)。

### **熱休克蛋白 27(Heat shock protein 27, HSP27)**

在 sHSP 家族中 HSP27 可干擾細胞凋亡因子，且具有顯著的抗細胞凋亡特性 (Garrido, 2002; Concannon et al., 2003; Lanneau et al., 2008)。HSP27 在細胞遭受外在或內在生長壓力時，會短暫增加 HSP27 的表現量，並且促進蛋白的折疊、聚合體的結合、降低氧化壓力以及調控細胞骨架的能力 (Ellis and van der Vies, 1991; Concannon et al., 2003)。

在熱刺激之下，HSP27 會與 eIF4G 專一性的結合，使得 eIF4G 與 eIF4F(cap)-complex 分離，並使得 eIF4G 送至 heat shock granules 形成不可溶的結構，進而抑制細胞中與熱刺激無關的 mRNA 轉譯 (Cuesta et al., 2000)。聚合物的形成是依據細胞生理狀況，而呈現高度動態的變化，例如在飢餓的細胞中 HSP27 趨向於形成較小的聚合體 (aggregate)；當再給予血清後，則促使 HSP27 形成較大的聚合物 (Kato et al., 1994; Mehlen and Arrigo, 1994; Arrigo et al., 1998)。進

一步來說，HSP27 利用 C-terminal 的  $\alpha$ -crystallin domain 形成較為穩定的二聚體 (dimer) 及四聚體 (tetramer)，16 至 32 個 HSP27 形成的聚合物是處在較不穩定狀態(Gusev et al., 2002)。

對於心臟血管疾病，HSP27 參與重要的調控 (Delogu et al., 2002; Ferns et al., 2006)。在大鼠模型中，利用再灌流引發局部缺血 (ischemia/reperfusion) 造成心臟功能不全，然而，在 HSP27 的表現下，則有效地保護心肌及血管細胞減少死亡 (Kwon et al., 2007)。此外，HSP27 藉由結合並抑制 I $\kappa$ B 激酶 (I $\kappa$ B kinase, IKK) 的方式，抵抗核內因子 (nuclear factor  $\kappa$ B, NF- $\kappa$ B) 引發發炎的能力 (Voegeli et al., 2008)。在大鼠取出大動脈平滑肌細胞中，利用 RNA 干擾的方式降低 HSP27 的表現，使得血管收縮素 (angiotensin II) 引發的 NF- $\kappa$ B 磷酸化增加 (Voegeli et al., 2008)。

此外，在各種不同壓力所引發的神經細胞凋亡，皆能夠因 HSP27 表現而將低死亡 (Benjamin and McMillan, 1998)。自新生兒取得的感覺及突觸神經元 (sensory and sympathetic neurons)，在體外培養的情況若缺少神經生長因子 (nerve growth factor, NGF) 將導致細胞凋亡，HSP27 的表現則有助於抑制此現象 (Lewis et al., 1999)。在感覺及突觸神經元細胞的模型中，HSP27 可以抑制維他命 A 酸 (retinoic acid) 所引發的細胞凋亡 (Wagstaff et al., 1999)。

目前已知，HSP27 突變會導致遺傳性運動神經肌肉退化性疾病，包含 distal hereditary motor neuronopathies (dHMNs) 及恰克-馬利-杜斯氏症 (Charcot-Marie-Tooth, CMT, -inherited neuropathies 2F)，有關其致病機轉方面的研究，顯示了某些突變 HSP27 會導致神經絲 (neuron intermediate filament) 無法正常排列而堆積在細胞質，可能間接影響軸突結構及神經訊息傳導，而不良的訊息傳遞能力讓神經細胞逐漸退化並趨向死亡 (Ismailov et al., 2001; Norgren et al., 2003; Evgrafov et al., 2004; Ackerley et al., 2006; James et al., 2008)。然而，此機轉無法解釋所有的突變 HSP27 致病機制。HSP27 在細胞中，可能存在著尚未被瞭解的功能。

HSP27 對於細胞凋亡有抑制的能力。熱刺激會引發細胞凋亡，但在熱耐受性的細胞中，HSP27 可保護粒線體降低胞內氧化自由基含量而降低細胞死亡 (Lavoie et al., 1995; Samali et al., 2001; Gabai et al., 2002; Wyttenbach et al., 2002)。在非神經細胞中，HSP27 藉由直接與粒線體釋出的 cytochrome *c* 交互作用，而避免 caspase 活化進而抑制細胞凋亡。當細胞藉由 cytochrome *c* 活化 caspase-3 及 caspase-9 時，HSP27 皆扮演負向調控者抑制細胞凋亡 (Garrido et al., 1999; Bruet al., 2000; Pandey et al., 2000)。在非依靠 caspase 的 Fas 受體路徑細胞凋亡中，HSP27 與 Daxx 的交互作用，具有抑制細胞死亡的能力

(Charette et al., 2000)。

HSP27 受轉譯後修飾 (post-translational modification) 調控，不同位點的 phospho-HSP27 被認為可能有不同的生理功能，形成的同質或異質聚合物也會有差異 (Garrido, 2002)。HSP27 磷酸化位點包含：胺基酸序列中第 15、78 及 82 個位置，三者皆為絲胺酸 (serine, Ser, S)，在絲胺酸的磷酸化 (phosphorylation) 讓 HSP27 形成較為酸性的異構物 (acidic isoforms) (Gusev et al., 2002)。已知壓力的產生，導致細胞內蛋白質激酶/絲裂素活化蛋白激酶 (Stress-activated protein kinase 2/ Mitogen-activated protein kinases, SAPK2/p38 MAP kinase) 路徑活化，使得下游的絲裂素活化蛋白激酶 2 及 3 (MAPKAP kinases 2 and 3) 層遞式的活化，MAPKAPK 2 再將 HSP27 直接磷酸化 (phosphorylation) (Ludwig et al., 1988; Stokoe et al., 1992; Lavoie et al., 1995; Kyriakis and Avruch, 1996; Gusev et al., 2002)。

過去研究發現，三個 serine 磷酸化位點被同時突變為天門冬胺酸 (asparagine, Asp, D)，用以模擬 HSP27 持續被磷酸化的狀態，會降低 HSP27 形成大聚合物 (約 600 至 800 kDa) 的能力，使其失去協助蛋白折疊的功能；突變的 HSP27 只能形成 tetramer 或 100 kDa 以下的 oligomer，並且對於在 TNF- $\alpha$  出現或 cytokine 引發細胞產生大量 ROS 時，HSP27 抗細胞凋亡能力也顯著降低；(Rogalla et al., 1999; Bruey et



al., 2000)。

另一方面，phospho-HSP27可與細胞骨架F-actin直接交互作用，將三個serine磷酸化位點突變成丙胺酸 (alanine, Ala, A) 雖然仍可形成大oligomer，卻會顯著降低細胞骨架的穩定性；以藥物SB203580專一的抑制p38活化，而減少phospho-HSP27，並且抑制F-actin的形成 (Lavoie et al., 1993; Lavoie et al., 1995; Piotrowicz and Levin, 1997; Schafer et al., 1998)。在胚胎著床前的2-cell時期，在藥物SB203580作用下，抑制了phospho-HSP27的產生，並且導致胚胎缺少穩定的F-actin結構並且無法重新再聚合 (reorganization)，使得胚胎無法正常發育至8-16-cell時期而影響著床 (Paliga et al., 2005)。此外過去在研究壓力引發p38活化，而增加磷phospho-HSP27的過程中，觀察到許多phospho-HSP27會由細胞質轉移至細胞核當中，甚至在沒有壓力的情況便有少數phospho-HSP27自發性地移至細胞核，phospho-HSP27在細胞核內可能調控mRNA的切割 (splicing) 及穩定性 (Arrigo et al., 1988; Rossi and Lindquist, 1989; McClaren and Isseroff, 1994; Loktionova et al., 1996; Leroux et al., 1997; Preville et al., 1998; Bryantsev et al., 2006)。

在非依靠 caspase 的 Fas receptor 細胞凋亡路徑中，phospho-HSP27可與 Daxx 及 Ask1 結合，進而抑制細胞死亡 (Charette et al., 2000)。

已知 phospho-HSP27 與 Akt/PKB 激酶直接交互作用促進細胞存活；此外，phospho-HSP27 也可以阻止 cytochrome *c* 自粒線體釋出，或是藉由抑制 caspase-9 的活化以抑制細胞凋亡（Konishi et al., 1997; Downward, 1998; Murashov et al., 2001; Zheng et al., 2006）。除此之外，phospho-HSP27 與 granzyme A 的直接交互作用，可以抑制細胞遭受 granule 調控的細胞裂解（cell lysis）（Benndorf et al., 1994; Beresford et al., 1998）。另一方面，HSP27 的轉錄轉譯及轉譯後修飾對於神經細胞的存活相當重要。利用 HSP27 反義（antisense）序列抑制神經細胞中 HSP27 的表現量，會導致神經細胞無法抵抗細胞凋亡；過度表現的熱 HSP27 可以促進神經細胞存活，但是，當過度表現的 HSP27 是突變 alanine 的無法磷酸化形式，則無法有保護的功能；phospho-HSP27 可抑制神經細胞凋亡，在粒線體釋出 cytochrome *c* 後，phospho-HSP27 可阻止 caspase-3 活化所引發的細胞凋亡（Benn et al., 2002）。

### **自噬作用 (autophagy)**

自噬作用 (autophagy) 普遍存在真核細胞中（Reggiori and Klionsky, 2002）。自噬作用包含三種主要形式：伴侶分子中介自噬作用（chaperone-mediated autophagy）、微自噬作用 (microautophagy) 及

巨自噬作用(macroautophagy)。細胞饑餓主要啟始微自噬作用(microautophagy)及巨自噬作用(macroautophagy)將目標分子轉移穿越溶酶體膜，而伴侶分子中介自噬作用則是間接發生反應(Massey et al., 2004)。巨自噬作用(macroautophagy)又可簡稱為自噬作用(autophagy)，是目前三種形式中研究較清楚的。自噬作用(autophagy)的命名衍伸自希臘字，代表‘食噬’(phagy)‘自身’(auto)。顧名思義，自噬作用利用形成的雙層膜與溶酶體(lysosome)融合後，稱之為自噬體(autophagosome)的結構，將 cargo 降解並回收再利用(Cuervo, 2004; Levine and Klionsky, 2004)。在目前的研究證據認為自噬作用有主要兩種生理目的。一為細胞在窮困環境中提供胺基酸以利生存；二為降解細胞中半衰期較長的蛋白及老化受損胞器(Elmore et al., 2001)。當酵母菌處在細胞飢餓環境中，自噬作用(autophagy)的活化有助於促進酵母菌的存活(Tsukada and Ohsumi, 1993)。在哺乳類研究中也是類似的情況，當減少或移除餵食可引發小鼠體內細胞提高自噬作用的活化(Mizushima et al., 2004)。當細胞中泛素蛋白酶體無法正常進行分解，導致大量摺疊不正常的蛋白堆積在細胞中，形成不可溶的聚集體(aggresome)，此時會藉由引發自噬作用活化清除堆積的蛋白(Fortun et al., 2003; Iwata et al., 2006; Kamimoto et al., 2006)。過去利用小鼠遺傳模式發現，抑制已分化而無法再細胞分裂的肝臟細胞(hepatocytes)

及神經細胞中的自噬作用活化，將產生更嚴重的肝臟受損及神經退化。在這小鼠研究中發現，缺乏自噬作用的肝臟細胞及神經細胞中，縱使沒有同時表現會導致疾病的蛋白，仍然累積了大量的泛素(ubiquitin)標記的蛋白內涵物 (inclusion) 並且伴隨著細胞死亡 (Komatsu et al., 2005; Komatsu et al., 2006; Mizushima and Hara, 2006)。外界壓力、缺氧、過度擁擠、高溫、細胞饑餓、細菌或病毒感染皆會導致自噬作用活化 (Dorn et al., 2002; Kirkegaard et al., 2004)。除此之外，自噬作用對於腫瘤生成、個體正常發育、生命週期、細胞生長調控及抗老化機制皆扮演重要的角色 (Bergamini et al., 2003; Longo and Finch, 2003; Melendez et al., 2003; Vellai et al., 2003; Levine and Klionsky, 2004)。

### **自噬作用 (autophagy) 及粒線體突變 (mitochondrial mutation)**

當細胞處在饑餓狀態，為了能夠提供細胞足夠的胺基酸，細胞中將形成雙層膜結構，此為起始自噬作用的第一步，自噬作用可代謝細胞中主要的胞器，例如粒線體及高基氏體 (Elmore et al., 2001)。藉由分解胞器及大分子蛋白，提供細胞合成必需分子，一般情況下，細胞只有少許自噬作用活化，是為了代謝老化或殘缺的胞器，此時自噬作用受到其上游分子 mTOR 所抑制；細胞飢餓使得 mTOR 被阻礙，進而活化自噬作用，此步驟可以利用藥物 Rapamycin 抑制 mTOR 而引

發 (Heitman et al., 1991; Hay and Sonenberg, 2004; Wullschleger et al., 2006)。活化的自噬作用形成雙層膜結構，在與帶許多酵素的溶酶體融合後，形成具有降解能力的自噬體。自噬體雙層膜的結構，是依靠 Atg8/LC3 分子活化後拉扯相近的膜而形成。因此，Atg8/LC3 分子的分佈位置及活化與否，是目前常用的自噬作用指標。在近期許多文獻指出，在神經退化性疾病中，類似自噬體的雙層膜結構有增加的趨勢。另外，mtDNA 突變所導致的能失常，很可能增加自噬作用活化的可能性。

過去文獻顯示 MERRF 突變細胞會有較高的氧化壓力 (Boulet et al., 1992; Larsson et al., 1992; Wei et al., 1996; Arpa et al., 1997; Schon et al., 1997; Antonicka et al., 1999; Lin and Beal, 2006)。已知在壓力增加的情況下，協助細胞的 HSP 會增加表現量 (Lindquist and Craig, 1988; Morano and Thiele, 1999; Pirkkala et al., 2001)。然而在本實驗室過去檢測 MERRF 病人淋巴母細胞株 (lymphoblastoid cell lines, LCLs) 中 HSP27 表現量卻是比正常人 LCLs 低(附圖一)。然而，LCLs 之間的差異，可能因取得自不同個體而有不同的遺傳背景。此外，MERRF 是在 mtDNA 發生突變，若突變比例未到達閥值是不會有疾病症狀產生的。為了更進一步減少個體之間的差異，以及提高 mtDNA 突變百分比，我們向陽明大學魏耀揮老師取得 cybrid cells，進行 HSP27 表達

研究。蛋白分析結果顯示，MERRF cybrid cells 中 HSP27 較正常 cybrid cells 為低(附圖二 A)；phospho-HSP27 更是比正常 cybrid cells 顯著降低(附圖二 B)。至於其它 HSP90、HSP70 及 HSP60 在 MERRF 與正常 cybrid cells 之間並無差異 (附圖三及 data not shown)，由此可知，壓力持續存在 MERRF cybrid cells 當中，雖然沒有觀察到其他壓力蛋白的增加表現，卻有著 HSP27 降低的情況。這樣的觀察暗示著 MERRF cybrid cells 中對於 HSP27 有著對壓力反應之外的調控。本論文主要為探討在 cybrid cells 中，HSP27 及 phospho-HSP27 和 MERRF 突變之間的調控。

# 材料與方法

## 細胞模型

MERRF 及 CPEO cybrid cells 皆由陽明大學魏耀揮老師提供。

MERRF cybrid cells (C5) 為 mtDNA 突變 (A8344G) 將近 100 % 的細胞株；細胞株 D5-1 是與細胞株 C5 具相同細胞核遺傳背景，但 mtDNA 正常的 cybrid cells。細胞株 51-10 為帶有 CPEO 突變細胞 (4977 bp-deletion) 約 80 % 的 cybrid cells；其相同細胞核遺傳背景的正常 cybrid cells 為 1-3-16。實驗室過去以抗生素篩選出 C5-C5、C6 及 C8 三株細胞，為 MERRF cybrid cells (C5) 穩定表現 HSP27 後的獨立細胞株。將細胞株培養在 25 cm<sup>2</sup> 的培養皿 (flask)，固定每兩天繼代培養細胞，每次保留六分之一的細胞數。培養皿置於恆溫 37 °C 的 5 % 二氧化碳培養箱。繼代培養過程皆使用含 pyruvate 及 uridine 的 DMEM (dulbecco's modified eagle's medium 包含 1 % non-essential amino acid、1 % penicillin-streptomycin、1 % L-glutamine、10 % fetal bovine serum、100 ug/ml pyruvate 及 50 ug/ml uridine，以 P<sup>+</sup>U<sup>+</sup> DMEM 縮寫代表)。

需要實驗分析時，將繼代培養細胞所剩餘的 cybrid cells 以缺乏 pyruvate 及 uridine 的 DMEM 打散 (以 P<sup>-</sup>U<sup>-</sup> DMEM 縮寫代表)，種植 1×10<sup>6</sup> 細胞數於含 P<sup>-</sup>U<sup>-</sup> DMEM 的六公分培養皿 (6 cm dish) 48 小時

後才可進行實驗處理。

### 細胞免疫螢光染色

玻片 (cover slide) 事先浸泡在95 %酒精中，將玻片過火置於三公  
公分培養皿 (3 cm dish) 後，種植 $2 \times 10^5$ 細胞數在PU DMEM中生長。  
在48小時後，將PU DMEM移除並用2 ml 1X PBS清洗三次。再以2 ml  
新鮮配製4 % PA (paraformaldehyde/1X PBS, pH=7.4) 室溫作用三十  
分鐘固定細胞後，PBST(含0.2 % TritonX-100的1X PBS)清洗四次。  
將25  $\mu$ l的5 % 胎牛血清置於三公分培養皿的上蓋後，將玻片含細胞的  
一面覆蓋在血清上，三公分培養皿保留PBST維持濕度，在室溫作用  
一小時進行非特異性抗體雜合 (blocking)。PBST清洗三次。使用20  $\mu$ l  
的一級抗體置於4 °C作用16至18小時。PBST清洗三次。加入20  $\mu$ l的  
二級螢光抗體置於室溫避光作用2小時。PBST清洗三次。封片後於共  
軛焦螢光顯微鏡下觀察。一級抗體使用1:200 goat-anti-HSP27及1:50  
rabbit-anti-pSer78-HSP27並且包含RNase。二級抗體1:200  
donkey-anti-goat-FITC及1:200 donkey-anti-rabbit-Cy5並含propidium  
iodide。



## 細胞凋亡分析

玻片 (cover slide) 事先浸泡在 95 % 酒精中，將玻片過火置於三公  
公分培養皿 (3 cm dish)。分別種植  $3 \times 10^5$  細胞數在含 P<sup>U</sup> DMEM 的  
三公分培養皿中生長 48 小時。移除舊的 P<sup>U</sup> DMEM，並利用新的 P<sup>U</sup>  
DMEM 清洗細胞。使用 2 ml 含 300 nM staurosporine 的 P<sup>U</sup> DMEM，  
於培養箱中作用三小時。自培養箱取出細胞後立即置於冰上。去除  
DMEM 後，以 2 ml 新鮮配製 4 % PA 室溫作用三十分鐘固定細胞。  
使用 PBST 清洗四次。用 25  $\mu$ l 的 RNase 室溫作用一小時，再以 25  $\mu$ l  
的 PI (propidium iodide) 室溫作用三十分鐘標定細胞核。PBST 清洗  
三次。封片後於共軛焦螢光顯微鏡下觀察。平均每張玻片拍攝六至八  
個隨機視野。

## 外加 ATP 分析

細胞生長在含 P<sup>U</sup> DMEM 的六公分培養皿 48 小時。移除舊的  
P<sup>U</sup> DMEM，並利用新的 P<sup>U</sup> DMEM 清洗細胞。再使用 4 ml 含 100  
 $\mu$ M、500  $\mu$ M 或 100 mM ATP 的 P<sup>U</sup> DMEM 培養兩個小時。收取細  
胞蛋白並利用西方點墨法分析。

## 熱刺激反應分析

細胞生長在含 P<sup>U</sup> DMEM 的六公分培養皿 48 小時。事先預熱培養箱達穩定 43°C 或 50°C 後，移除舊的 P<sup>U</sup> DMEM，並利用新的 P<sup>U</sup> DMEM 清洗細胞。置換 4 ml 新的 P<sup>U</sup> DMEM 後，將細胞移置 43°C 或 50°C 培養箱中各別培養 0、10、20 及 30 分鐘。收取細胞蛋白並利用西方點墨法分析。

## 蛋白酶體活性抑制作用

細胞生長在含 P<sup>U</sup> DMEM 的六公分培養皿 48 小時。移除舊的 P<sup>U</sup> DMEM，並利用新的 P<sup>U</sup> DMEM 清洗細胞。再使用 4 ml 含 10 μM MG132 的 P<sup>U</sup> DMEM 培養。再不同作用時間後，收取細胞蛋白並利用西方點墨法分析。

## 自噬作用溶酶體降解路徑

細胞生長在含 P<sup>U</sup> DMEM 的六公分培養皿 48 小時。移除舊的 P<sup>U</sup> DMEM，並利用新的 P<sup>U</sup> DMEM 清洗細胞。再使用 4 ml 細胞飢餓 (starvation, earle's balanced salts solution, EBSS) 或 4 ml 含 0、0.2、0.4 及 0.6 μg/ml rapamycin 的 P<sup>U</sup> DMEM 培養細胞。Rapamycin 處理

須每隔 24 小時更換一次含 rapamycin 的 P<sup>U</sup> DMEM。收取細胞蛋白後利用西方點墨法分析。

### 細胞蛋白質萃取

自培養箱取出細胞後立即置於冰上。去除 DMEM 後用 1X PBS 清洗。確實移除 1X PBS 後，將 100  $\mu$ l 現配製的細胞萃取液 (cell lysis buffer 包含 1 X PBS、15% glycerol、1 mM sodium EDTA、1 mM sodium EGTA、1 mM dithiothreitol、1 X protein inhibitor 及 0.5% Triton X-100) 加至六公分培養皿。在 4°C 冰箱振盪作用一分鐘後以刮勺取下細胞，至於事先預冷的離心管 (eppendorf) 中。利用超音波震盪後，以 4°C 低溫離心機 13000 rpm 離心三十分鐘後取上清液。蛋白質上清液保存在 -20°C 冰箱；分析磷酸化蛋白時必須直接進入西方點墨法步驟。

### 西方點墨法

利用 Bio-Rad Protein Assay 作蛋白定量，取 60  $\mu$ g 的蛋白進行 12 % SDS-聚丙稀醯板膠電泳分析。將 12 % SDS-聚丙稀醯板膠電泳分析之膠體、濾紙及硝化纖維紙 (nitrocellulose paper, NC) 或 PVDF，以三明治方式夾起，置於 Bio-Rad 轉漬裝置中，加入轉印緩衝液 (transfer buffer 為 25 mM Tris pH 8.3、192 mM glycine 及 20 % methanol) 以電壓

一百伏特進行九十分鐘轉漬。轉漬後的NC或PVDF浸泡於含5 % 脫脂牛奶或BSA (Albumin, bovine serum) 的TTBS (10 mM Tris-HCl Ph=7.5、150 mM NaCl及0.05 % Tween 20) 緩衝液進行阻隔 (blocking) 於室溫下振盪作用1小時。依照蛋白分子量標準液位置切割NC或PVDF，分別與不同抗體作用。以TTBS稍加清洗後，加入含有一級抗體的TTBS緩衝液4°C 冰箱搖晃16至18小時。倒出一級抗體後以TTBS緩衝液重覆洗五分鐘四次，然後加入含有二級抗體的TTBS 緩衝液室溫作用振盪一小時。倒出二級抗體，以TTBS緩衝液重覆洗五分鐘四次，將NC或PVDF置於富士照相系統中，然後加上1:1等比例混合好的冷光呈色劑 (Working solution, Luminol / Enhancer solution: stable peroxide solution, Pierce) 等待一分鐘。擷取訊號時，曝光時間依抗體訊號強弱調整。

同時需偵測磷酸化蛋白及其他蛋白，必須先待取得磷酸化蛋白訊號後，利用新鮮配製的 stripping buffer 室溫作用半小時去除已經雜合的抗體。並以含5 % 脫脂牛奶或BSA 的TTBS 緩衝液進行阻隔 (blocking) 於室溫下作用一小時，再以其它一級抗體偵測。

### **建構穩定性表達細胞株**

將 MERRF cybrid cells (C5) 種至三公分培養皿 (3 cm dish)，每

盤分別種有  $3 \times 10^5$  細胞數，待 P<sup>+</sup>U<sup>+</sup> DMEM( 不含 penicillin-streptomycin ) 中培養 24 小時後 ( 約 6 至 7 成滿細胞 )，進行短暫性轉染。移除舊有 DMEM，利用 P<sup>+</sup>U<sup>+</sup> DMEM ( 不含 P/S 及 FBS ) 清洗細胞三次後，放入 800  $\mu$ l P<sup>+</sup>U<sup>+</sup> DMEM ( 不含 P/S 及 FBS ) 靜置。將 2  $\mu$ g 質體 ( pcDNA3-HA-HSP27-S3D 及 pcDNA3-HA-HSP27-S3A ) 稀釋在 100  $\mu$ l P<sup>+</sup>U<sup>+</sup> DMEM ( 不含 P/S 及 FBS ) 中，並加入 8  $\mu$ l plus ( invitrogen ) 輕拍混合後，室溫靜置 20 分鐘。接著配製 lipofectamine ( invitrogen ) 5  $\mu$ l 至 100  $\mu$ l P<sup>+</sup>U<sup>+</sup> DMEM ( 不含 P/S 及 FBS ) 中，與質體稀釋溶液輕拍混合均勻，靜置於室溫 5 分鐘。將混合的 200  $\mu$ l P<sup>+</sup>U<sup>+</sup> DMEM 均勻加至含 800  $\mu$ l P<sup>+</sup>U<sup>+</sup> DMEM ( 不含 P/S 及 FBS ) 的三公分培養皿，放回培養箱作用。四小時培養後，各給予 1000  $\mu$ l P<sup>+</sup>U<sup>+</sup> DMEM ( 20% P/S 及 20% FBS )，放回培養箱作用 24 小時。將細胞轉移至九公分培養皿，並且將 DMEM 置換為 8 ml 正常 P<sup>+</sup>U<sup>+</sup> DMEM，放回培養箱作用 24 小時。改以硫酸新絲菌素 ( Neomycin, 650  $\mu$ g/ml G418 ) 的 P<sup>+</sup>U<sup>+</sup> DMEM 做細胞篩選動作，直到獨立細胞株生長約需 2-3 個月。

pcDNA3-HA-HSP27-WT 質體由 Dr. Garrido ( Faculty of Medicine and Pharmacy, 7, Boulevard Jeanne d'Arc, 21033, Dijon, France ) 提供，當作建立定點突變的模板。pcDNA3-HA-HSP27-S3D 及 pcDNA3-HA-HSP27-S3A 由實驗室構築。

# 結果

## HSP27 在 MERRF cybrid cells 中的分布

為了知道是否 MERRF (A8344G) mtDNA 突變會導致 HSP27 改變細胞中的細胞分佈位置，我們利用免疫螢光染色觀察在 MERRF 及正常 cybrid cells 中，HSP27 及 phospho-HSP27 分佈位置。綠色螢光代表 HSP27，而白色螢光為 phospho-HSP27，在合成影像中兩者互不重疊 (圖一)。兩者主要在細胞質當中，並且在 MERRF 及正常 cybrid cells 之間沒有分布差異；然而，HSP27 及 phospho-HSP27 在 MERRF cybrid cells 中螢光強度皆低於正常 cybrid cells (圖一)。因此 MERRF mtDNA 突變可能導致 HSP27 及 phospho-HSP27 螢光強度降低，但是不影響在 cybrid cells 中的分布。

## 細胞存活度分析

根據過去對 MERRF cybrid cells 分析結果，MERRF cybrid cells 會有氧化壓力較高及存活率下降等現象。MERRF 和正常 cybrid cells 比較，對於 UV 及 staurosporine 引發的細胞凋亡有較低的耐受性 (James et al., 1996; Liu et al., 2004; Schoeler et al., 2005)。為了瞭解 HSP27 減少是否降低 MERRF cybrid cells 面對壓力耐受性，藉由比較過度表現 HSP27

後是否能改善細胞狀態，將能有助於解釋HSP27在MERRF cybrid cells 中的重要性。因此，實驗室過去在MERRF cybrid cells (C5) 中穩定表現HSP27，並篩選出三株獨立細胞株C5-C5、C6及C8。但是，其中C8細胞株有相對不規律的細胞生長速率，並且在細胞核外型上明顯小於原始細胞株及其它穩定表現的細胞株。很可能在篩選過程中或是外送基因插入位點對細胞造成生理上的影響，因此只取用C5-C5及C6這兩個獨立細胞株進行分析。我們取正常cybrid cells (D5-1)、MERRF cybrid cells (C5) 與穩定表現HSP27的cybrid cells (C5-C5及C6)，分別處理300 nM staurosporine三個小時，利用PI (propidium iodide) 或DAPI (4'-diamidino-2-phenylindol) 染色觀察其細胞凋亡程度。實驗的結果與過去文獻相符，MERRF cybrid cells (C5) 相較於正常cybrid cells (D5-1) 有較高細胞凋亡現象；而在穩定表現HSP27的cybrid cells (C5-C5及C6) 中，皆能降低MERRF細胞的細胞凋亡現象 (圖二)，其中C6相對於C5的細胞凋亡為顯著降低 (mean  $\pm$  SEM, n=3, p=0.0155)。

### **MERRF 細胞中外加 ATP 分析**

由於以上的實驗皆是在增加細胞壓力的情況之下，分析在MERRF cybrid cells 中對 HSP27 的調控。然而在 MERRF cybrid cells

中，沒有外加的壓力便使得 phospho-HSP27 顯著下降。過去在 MERRF cybrid cells 研究得知，ATP 合成減少也是 MERRF 疾病常見的缺陷 (Wei et al., 1996; Liu et al., 2007)。因此我們想知道，ATP 合成缺失是否造成 HSP27 磷酸化降低。我們將突變及正常 cybrid cells 各別處理外加 100  $\mu$ M、500  $\mu$ M 或 1 mM ATP 兩個小時，觀察 phospho-HSP27 表達量是否產生變化。結果發現外加 100  $\mu$ M、500  $\mu$ M 或 1 mM ATP 處理兩個小時之後，不論在正常或是突變的 cybrid cells 中，皆無法讓 phospho-HSP27 增加 (圖三及 data not shown)。這個結果顯示 MERRF 及正常 cybrid cells 均無法對外加的 ATP 產生反應。

為了再次確定外加 ATP 無法增加 MERRF 及正常 cybrid cells 中磷酸化蛋白的表達量，我們利用過去已知會因外加 ATP 而增加 p-ERK 當作控制組 (Guido et al., 2001; Ahmad et al., 2004; Chang et al., 2008; Liu et al., 2008)。利用 1 mM 的外加 ATP 處理，並同時觀察 p-ERK 及 phospho-HSP27。結果如圖四所示，在 MERRF 及正常 cybrid cells 中，外加 1 mM 的 ATP 皆無法讓 p-ERK 或是 phospho-HSP27 增加。綜合上述實驗，phospho-HSP27 及 HSP27，雖然在 MERRF 及正常 cybrid cells 中可以對熱刺激產生反應。但是，外加 ATP 並無法影響 phospho-HSP27 的表現量。



## MERRF 細胞中磷酸化蛋白分析

由於外加 ATP 的分析中，並無法幫助我們解釋 HSP27 降低磷酸化的原因。因此我們回頭檢測在 MERRF 疾病中，其它磷酸化蛋白是否也受到影響。若是因為 MERRF cybrid cells 中的 ATP 合成減少，而使得 phospho-HSP27 減少，那麼細胞中其它需要磷酸化的蛋白也很可能因此而下降。因此我們利用西方點墨法，檢測細胞幾個主要的訊息傳遞路徑中磷酸化蛋白是否受到影響。在圖五的結果當中可以看到，在 MERRF cybrid cells 中 p-ERK 的表達量顯著高於正常 cybrid cells ( $p=0.037$ )；而 ERK 表現量相似 ( $p=0.194$ )。另外，p-JNK 及 p-p38 則無表現量差異 (data not shown)。這代表在 MERRF cybrid cells 中 phospho-HSP27 減少是特殊的現象，而非其它磷酸化蛋白也會有的情況。由此結果可以推知 MERRF cybrid cells 中 ATP 大量降低，並非是導致 HSP27 降低磷酸化的原因。

## phospho-HSP27在慢性漸進性外眼肌麻痺 (Chronic Progressive External Ophthalmoplegia Syndrome, CPEO) cybrid cells 中的表現

為了更進一步確定 ATP 大量降低，並非影響 HSP27 降低磷酸化的主要原因。我們同時也利用其它粒線體功能缺陷疾病細胞觀察，想知道在同樣 ATP 大量降低的疾病細胞中，HSP27 的磷酸化程度是否也呈

現下降。在其它mtDNA突變所導致的細胞病變中，例如CPEO，縱使臨床症狀差異甚大，卻也同樣伴隨著ATP合成有下降及粒線體功能缺損的情況 (Wei et al., 1996; Schon et al., 1997; Liu et al., 2007)。因此我們分析phospho-HSP27在CPEO cybrid cells中的表達，結果顯示在此CPEO cybrid cells中非但phospho-HSP27沒有減少；甚至還比起其相對的正常cybrid cells有較高的表現量 (圖六)。這代表在MERRF cybrid cells中phospho-HSP27減少是特殊的現象；而非其它ATP合成有下降及粒線體功能缺損的cybrid cells也會有的情況。

### **MERRF cybrid cells 中 HSP27 熱刺激反應分析**

已知當細胞面對熱刺激或氧化壓力等刺激時皆會引發熱刺激因子 (heat shock factor, HSF) 活化，進而讓 *HSP* 轉錄轉譯增加，被認為是細胞增加壓力耐受性的調控 (Wu, 1995; Lindquist and Craig, 1988; Morimoto, 1998; Morano and Thiele, 1999; Pirkkala et al., 2001)。因為MERRF cybrid cells 中 HSP27 下降，但是其它 HSP 沒有表現量差異，我們想知道MERRF cybrid cells 是否對HSP的調控能力已經出現缺失。過去實驗室分別對MERRF病人LCLs及MERRF cybrid cells 處理43°C熱刺激1個小時後，放回正常細胞培養箱分別繼續培養0、5、10及20小時，觀察到不論是哪一種細胞模型其HSP27或HSP70皆

可以正常對熱刺激產生反應，並且隨著熱刺激時間逐漸增加(附圖五)。暗示著 MERRF cybrid cells 對於壓力的反應是正常的，並不會因粒線體功能缺失而受影響。

細胞面對壓力反應時，不只產生蛋白合成的改變，訊息傳遞更是細胞面對環境變化時產生的及時改變。過去文獻已知，當細胞面對壓力時最先產生反應的是 HSP27 的磷酸化程度，會快速增加並隨壓力時間延長而下降；在幾個小時後 HSP27 的總量才會增加(Landry et al., 1991; Landry et al., 1992)。由於在 MERRF cybrid cells 中 phospho-HSP27 是比正常細胞降低許多(附圖二)，雖然 MERRF 細胞能夠在面對壓力時有效的合成 HSP27 及 HSP 70，但是我們並不瞭解 MERRF 細胞對 phospho-HSP27 的調控是否正常。因此，我們想藉由熱刺激處理了解，MERRF cybrid cells 中 phospho-HSP27 是否被正常調控。將 MERRF 及正常 cybrid cells 分別處理 43°C 或 50°C 熱刺激 0、10、20 及 30 分鐘之後，我們觀察到在這兩種溫度中不論是 MERRF cybrid cells 或是正常 cybrid cells，其 phospho-HSP27 皆在這短時間的熱刺激中快速上升並下降(圖七)，顯示著 MERRF 細胞對於壓力的短時間反應也是正常的，並不會因粒線體功能缺失而受影響。

## 蛋白酶體活性抑制作用

在 MERRF cybrid cells 中 HSP27 比正常 cybrid cells 降低，是否因為在細胞轉錄轉譯或是蛋白降解過程有缺損，也是我們必須深入了解的方向。過去實驗室成員致力於釐清轉錄轉譯問題，發現在 MERRF 與正常 cybrid cells 之間的 *HSP27* mRNA 表現量是相似的(附圖六)，顯示 *HSP27* 沒有轉錄調控上的差異。至於在 *HSP27* 的蛋白質合成速率上，由於重複次數的不足及放射線標定實驗上的限制而未能得到確定的結果。因此為了瞭解 MERRF cybrid cells 在 *HSP27* 的降解過程是否存在缺陷，而使得 *HSP27* 表現量下降，我們同時也對其降解路徑進行探討。

已知細胞中主要的兩個降解蛋白路徑，分別是泛素蛋白酶體及自噬作用途徑 (Ravikumar et al., 2004)。由於細胞內大部分的分子，是經由泛素蛋白酶體作用進行降解，因此我們先利用泛素蛋白酶體的抑制劑 (MG132) 處理細胞，以阻擋蛋白酶體的降解路徑。若是 *HSP27* 的降解作用是經由此路徑，我們預期將觀察到 *HSP27* 因蛋白酶體抑制劑的作用，而在 cybrid cells 中累積增加。然而圖八的結果顯示，*HSP27* 非但沒有累積增加，反而隨著蛋白酶體抑制劑處理時間延長而下降。在圖八中的正控制組 *HSP70* 則是符合預期的逐漸累積增加。這個結果指出 *HSP27* 並非經由泛素蛋白酶體的降解路徑。已有文獻

指出，當蛋白酶體功能缺失或是被抑制時，增加細胞中堆積的蛋白，而有引發自噬作用活化的情況（Ravikumar et al., 2004; Iwata et al., 2006; Boyault et al., 2007; Pandey et al., 2007）。因此我們推測 HSP27 很可能是經由自噬溶酶體作用。

然而，phospho-HSP27 通常只能夠形成分子量較小的 dimer。在這種情況下 phospho-HSP27，是否還是經由一般分子降解的泛素蛋白酶體來降解呢？因此，我們同樣地將細胞處理 MG132，阻擋蛋白酶體的降解路徑，在圖九觀察到 phospho-HSP27 如同 HSP70，是隨著泛素蛋白酶體的抑制劑處理時間增加，而有逐漸累積增加之現象。為了瞭解 MG132 是否引發壓力反應，促使 phospho-HSP27 增加，還是 phospho-HSP27 確實是因為降解路徑受抑制才產生增加的現象。我們觀察了短時間抑制蛋白酶體作用下，phospho-HSP27 的反應。從結果（圖十）中可以看到，不論是在 MERRF cybrid cells（圖十 A）或正常（圖十 B）cybrid cells 中，phospho-HSP27 都呈現短時間內上升並且在隨後快速下降。由此結果我們可以知道 phospho-HSP27 在 4 至 8 小時之間增加，是由於泛素蛋白酶體受抑制才產生增加的現象；另一方面，phospho-HSP27 對壓力的反應則是在一個小時內即反應結束。

## 自噬作用溶酶體降解路徑

已知 HSP27 經常自行或與其它小分子 HSP 形成穩定 oligomer，這種穩定聚合體，也與協助細胞骨架維持穩定性有關 (Kato et al., 1994; Mehlen and Arrigo, 1994; Arrigo et al., 1998; Concannon et al., 2003)。如此大分子量的聚合體，可能無法如同一般分子可以快速的經由蛋白酶體降解。因此我們推測 HSP27 的降解路徑可能是經由降解細胞內胞器及大分子聚合物的自噬作用 (Elmore et al., 2001)。為了瞭解 HSP27 是否經由細胞進行自噬溶酶體作用而降解，我們將 MERRF cybrid cells 利用細胞飢餓 (starvation) 或處理 rapamycin，促使自噬溶酶體路徑活化，觀察 HSP27 是否因此而下降。

在 starvation 的實驗結果中，我們觀察到 HSP27 有些許的下降，並且在 MERRF cybrid cells 比起正常 cybrid cells 下降得多 (圖十一 A)。然而在細胞飢餓的情況下，phospho-HSP27 (圖十一 B) 沒有任何的改變，暗示著 HSP27 的磷酸化程度不受自噬作用影響。

為了再進一步確定 HSP27 是因自噬作用而減少，我們將細胞處理 rapamycin 抑制自噬溶酶體作用的上游 kinase (mTOR)，以活化自噬溶酶體作用的進行 (Heitman et al., 1991; Hay and Sonenberg, 2004; Wullschleger et al., 2006)。在 0.4  $\mu\text{g/ml}$  rapamycin 的 P<sub>U</sub> DMEM 中培

養 48 小時後，可以觀察到 HSP27 在 MERRF cybrid cells 中呈現顯著降低的趨勢 ( $p < 0.05$ )；在正常 cybrid cells 中 HSP27 也有減少情況，但是未達顯著差異 (圖十二 A)。phospho-HSP27 (圖十二 B) 則沒有任何的改變，暗示著 HSP27 的磷酸化程度不受自噬作用影響。

### 自噬作用相關分子比較

由上述實驗尚無法瞭解，HSP27 表現量差異是否因自噬作用活化程度不同所導致。我們檢測一系列自噬作用相關分子，是否在 MERRF cybrid cells 之間有表現量差異。在圖十三中，MERRF 及正常 cybrid cells 在 0.4  $\mu\text{g/ml}$  rapamycin 的 PU DMEM 處理後，活化的 Atg8/LC3 比例皆因此顯著增加 ( $p < 0.05$ )。統計圖呈現的是 LC3 II/ total LC3 的百分比；其中 LC3 II 代表活化後的 LC3，total LC3 顯示 LC3 II 及 LC3 I 的加總值。並且以未經處理時 MERRF cybrid cells 的 LC3 II/ total LC3 當作百分之五十。圖十三結果中，MERRF cybrid cells 的 LC3 II/ total LC3 活化比例皆顯著高於正常 cybrid cells 的 LC3 II/ total LC3 比例 ( $p < 0.05$ )。

在處理 MG132 後，MERRF cybrid cells 的 Atg8/LC3 活化高於正常 cybrid cells (圖十四 A)。我們同時觀察到在 starvation 處理可增加 MERRF cybrid cells 的 Atg8/LC3 活化 (圖十四 B)。然而如圖十四 B

統計圖所示，在 PU<sup>-</sup> DMEM 中培養 48 小時後 MERRF cybrid cells 的 Atg8/LC3 活化已顯著高於正常 cybrid cells ( $p < 0.05$ )。經由以上實驗得知，MERRF cybrid cells 中的 HSP27 可能是藉由自噬溶酶體路徑活化而降解。同樣地，我們在 PU<sup>-</sup> DMEM 培養的 MERRF cybrid cells 中也觀察到 ATG12 已顯著高於正常 cybrid cells (圖十五 A)。然而，在 0.4  $\mu\text{g/ml}$  rapamycin 的 PU<sup>-</sup> DMEM 中培養 48 小時後，ATG12 在正常 cybrid cells 中表現量高於 MERRF cybrid cells (圖十五 B)。另一方面，PU<sup>-</sup> DMEM 中培養 48 小時後，ATG5、Beclin1 及 Bcl-2 則沒有表現差異 (圖十六)。



## 討論

在 MERRF 病人 LCLs 中，HSP27 表現量皆比正常 LCLs 顯著降低(附圖二)。然而 HSP27 降低，可能因 LCLs 之間存在差異，因取自不同個體而有不同的遺傳背景。由於 HSP27 的基因是位在細胞核，在不同個體之間對於 HSP27 表現量的調控可能相異。粒線體的功能是同時受細胞核及 mtDNA 所調控，因此粒線體疾病也可能因細胞核所表現的基因有缺陷而影響粒線體功能。此外 MERRF 是在 mtDNA (A8344G) 發生突變，突變率須達閾值才有病徵，突變率閾值又會因個體及組織型態相異 (King et al., 1992; Chomyn et al., 1994; Masucci et al., 1995)。為了減少個體之間的差異，及增加同質性 mtDNA 突變百分比，我們向陽明大學魏耀揮老師取得 cybrid cells (Wei et al., 1996; Liu et al., 2007)。

Cybrid cells 具有相同的細胞核背景，其中 MERRF 細胞中是 mtDNA (A8344G) 突變百分比接近百分之百。在 MERRF cybrid cells 中，HSP27 表現量皆比正常 cybrid cells 顯著降低(附圖三)，HSP27 表現量的差異也確實是 mtDNA (A8344G) 發生突變所造成。mtDNA 突變對細胞造成的壓力持續存在 MERRF cybrid cells 當中，然而 HSP90、HSP70 及 HSP60 在 MERRF 與正常 cybrid cells 之間並無差

異(附圖四及 data not shown), 暗示著 MERRF cybrid cells 對於 HSP27 的下降並非反應壓力的調控。此外, 對 LCLS 及 cybrid cells 施以熱刺激的反應結果可以推測, MERRF LCLS 及 MERRF cybrid cells 對於壓力調控熱刺激因子等反應是正常的, 並不會因粒線體功能缺失而受影響(附圖五)。在沒有額外給予 MERRF cybrid cells 壓力時, HSP70 表現量無差異, 但是 HSP27 卻有顯著的降低。由這些觀察得知, MERRF cybrid cells 中下降的 HSP27 不是壓力調控失常所造成的結果, 也非藉由 HSP 家族共同的調控方式。本論文主要利用 MERRF cybrid cells 探討 HSP27 下降的機制, 以及 HSP27 所扮演的角色。

為了得知 HSP27 下降是否影響 MERRF cybrid cells 細胞存活率, 我們在 MERRF cybrid cells 過度表現 HSP27。由細胞存活分析可知, 雖然過度表現 HSP27 能夠降低 MERRF cybrid cells 細胞死亡率, 卻無法使得 MERRF cybrid cells 死亡率降低至趨近於正常 cybrid cells; 然而過度表現 HSP27 得以顯著抑制藥物對 MERRF cybrid cells 造成的死亡(圖二), 仍顯示 HSP27 表現量對於 MERRF cybrid cells 細胞相當重要。因此, 在 MERRF cybrid cells 中探討 HSP27 表現量降低的調控, 可更瞭解 MERRF 疾病致病機制並提供可能的治療方向。

另一方面, MERRF cybrid cells 中 phospho-HSP27 更是比正常 cybrid cells 顯著降低(附圖三 B)。在 MERRF 疾病中由於粒線體功能

的缺失，使得 ATP 合成比起正常 cybrid cells 有下降的趨勢，因此我們早先認為 phospho-HSP27 在 MERRF 疾病中下降的原因，可能是因為疾病 cybrid cells 中無法提供足夠的 ATP 所導致。然而在處理外加 ATP 皆無法讓 phospho-HSP27 增加，結果並不符合此假說(圖三及四)。若是 ATP 合成下降是促使 MERRF cybrid cells 中 phospho-HSP27 降低的主因，那麼我們應該在同樣具有 ATP 合成下降，但不同的 mtDNA 突變 cybrid cells 中應該觀察到相似的情況。因此為了瞭解 mtDNA 突變導致的 ATP 合成缺損，是否引起 phospho-HSP27 表現量下降，我們利用 CPEO cybrid cells 觀察 phospho-HSP27 表現量。CPEO 疾病的突變是由於 mtDNA 大片段遺失(4977 bp deletion)所導致；在 CPEO cybrid cells 中，ATP 合成量較 MERRF cybrid cells 低(Wei et al., 1996; Schon et al., 1997; Liu et al., 2007)。然而在 CPEO cybrid cells 中，phospho-HSP27 表現量顯著高於正常 cybrid cells，結果再次不符合 ATP 缺失的假說(圖六)。另外 MERRF cybrid cells 中其它內生性磷酸化蛋白的表現量不造成影響或成相反的表現(圖五)。綜合這些結果我們相信，缺乏 ATP 並非 MERRF 疾病中 phospho-HSP27 降低的主要因素。

然而排除 ATP 的可能性後，我們尚未能確定 MERRF cybrid cells 是否具有 kinase 活性缺陷；或是 phosphatase 活性提高而導致

phospho-HSP27 減少。HSP27 的磷酸化是受 p38 MAPK pathway 所調控，HSP27 同時也調控細胞骨架的穩定性，HSP27 許多功能需藉由磷酸化修飾調控及形成大分子量聚合物才能執行 (Stokoe et al., 1992; Lavoie et al., 1995; Kyriakis and Avruch, 1996; Garrido, 2002; Gusev et al., 2002)。在 MERRF cybrid cells 中 phospho-HSP27 比正常 cybrid cells 顯著降低(附圖三)，導致這樣的差異有可能因素是 kinase 活性有缺陷；或是 phosphatase 活性提高所造成的結果。由短時間的熱刺激實驗可看出，phospho-HSP27 的 kinase 活性在 MERRF cybrid cells 中可能是正常的 (圖七)。但是短時間的熱刺激實驗存在變異性，並非每次刺激 cybrid cells 都能觀察到 phospho-HSP27 在相同時間上升。由於細胞對熱刺激是相當敏感，細胞培養狀態些微改變都可能影響到熱刺激反應時間。然而，MERRF cybrid cells 中 phospho-HSP27，仍然得以在短時間內對熱刺激反應，代表受 p38 MAPK pathway 所調控的路徑在 MERRF cybrid cells 應是正常的。在 cybrid cells 處理泛素蛋白酶體的抑制劑 (MG132) 實驗中也能得到相同的結論 (圖十)。由於阻擋了泛素蛋白酶體所產生的蛋白質累積，對細胞來說是一種壓力，當細胞處在壓力之下，已知會促使 HSP27 增加以及 phospho-HSP27 的增加 (Ellis and van der Vies, 1991; Stokoe et al., 1992; Lavoie et al., 1995; Kyriakis and Avruch, 1996; Gusev et al., 2002; Concannon et al., 2003)。

我們觀察到在熱刺激出現的短時間內，便會導致 HSP27 的磷酸化增加，但是隨後也很快地降低磷酸化；隨著暴露在壓力下的時間越久，phospho-HSP27 不會再增加，轉而增加的是細胞內 HSP27 的總量（附圖五及圖七）。MERRF cybrid cells 在面對壓力的過程中，phospho-HSP27 及 HSP27 的 dynamic 變化，與 Landry 等人的觀察是相似的（Landry et al., 1991; Landry et al., 1992）。此外我們同時觀察到，在利用 MG132 抑制蛋白酶體的短時間處理實驗中，當蛋白酶體尚未被抑制時 HSP70 不會產生堆積；而 phospho-HSP27 則是快速地上升並下降（圖十）。因此推測 phospho-HSP27 的 kinase 或是 phosphatase 活性，在 MERRF 疾病中活性很可能是正常的。綜合這些結果我們仍然無法解釋，MERRF cybrid cells 中的 phospho-HSP27 為何降低表現。因此，phospho-HSP27 的 kinase 或是 phosphatase，可能除了壓力反應之外尚存在其它調控未被了解，是需要未來被繼續深入探討的方向。

縱使尚未能夠得知 phospho-HSP27 下降的主要原因，HSP27 的表現量對於 MERRF 疾病來說也是相當重要的。從前面的藥物引發細胞凋亡的分析中我們知道，當在給予過度表現 HSP27 的 MERRF cybrid cells 能夠減緩藥物引發的細胞死亡。然而，究竟 phospho-HSP27 對 MERRF 細胞存活度影響如何，尚未得知。因此，在未來可以藉由在

MERRF cybrid cells 中穩定表現 HSP27-S3D 及 HSP27-S3A，分析 phospho-HSP27 對 cybrid cells 存活的重要性。S3D 代表在 HSP27 的第 15、78 及 82 個胺基酸 serine 被突變成 asparagine，模擬 HSP27 持續被磷酸化的狀態。S3A 代表在 HSP27 的第 15、78 及 82 個胺基酸 serine 被突變成 alanine 代表無法被磷酸化的 HSP27。藉由比較表現 HSP27 的 S3D 或 S3A 突變後能否改善細胞存活，將能有助於解釋 phospho-HSP27 在此 cybrid cells 中所扮演的功能。

過去文獻已知，HSP27 具有與泛素交互作用的能力，並且降低 HSP27 會使得細胞中整體的泛素標定蛋白堆積；相對的若是過度表現 HSP27 則能夠促進細胞分解經泛素標定的蛋白 (Parcellier et al., 2003; Parcellier et al., 2006)。在我們的實驗中，利用 MG132 抑制 cybrid cells 泛素蛋白酶體後，HSP27 的量並無堆積現象；相對的 HSP70 則呈現增加 (圖八)。雖然 HSP27 能夠與泛素直接交互作用，但是由我們的結果可知，HSP27 本身並非經由泛素蛋白酶體分解。因此，HSP27 很可能是扮演泛素標定蛋白的辨識者，協助蛋白酶體適當地分解蛋白。在蛋白質的降解路徑泛素蛋白酶體以及自噬體作用，兩者之間並非獨立進行而是相互調控。蛋白酶體功能缺失或被抑制時，會引發自噬作用的活化 (Iwata et al., 2006; Boyault et al., 2007; Pandey et al., 2007)。因此，在我們利用 MG132 抑制泛素蛋白酶體後，HSP27 的下降很可能是

因為引發自噬作用活化後的結果（圖八）。過去文獻已知，不正常的泛素標定蛋白堆積在細胞中會形成聚合體（aggresome），含泛素標定的聚合體被p62辨識後會經自噬作用分解，p62本身也會因此經自噬作用分解（Bjorkoy et al., 2005; Pankiv et al., 2007; Wong et al., 2008）。由於HSP27經常以大分子oligomer的方式存在細胞當中，可能會因而不易被泛素蛋白酶體分解，而經由自噬作用降解。除此之外，MERRF疾病含有缺陷的粒線體，很可能活化自噬作用路徑增加老化或缺陷胞器降解，此自噬作用的活化可能加速HSP27大oligomer的分解。

除了功能缺損的泛素蛋白酶體可以活化自噬作用之外，處理starvation以及利用rapamycin抑制mTOR激酶活性也常用於活化自噬途徑（Heitman et al., 1991; Hay and Sonenberg, 2004; Wullschleger et al., 2006）。因此我們讓cybrid cells處在rapamycin環境，觀察HSP27是否因而降解。結果如同我們預期，HSP27隨著細胞rapamycin處理時間增加，而有表現量下降的情況；並且在MERRF cybrid cells中HSP27降解速度較正常cybrid cells明顯（圖十二A）。由此可知HSP27可能經自噬作用分解。利用starvation以及rapamycin方式活化cybrid cells自噬作用的結果，皆與抑制cybrid cells泛素蛋白酶體路徑而活化自噬作用的結果相同（圖八及圖九）。綜合這些結果可以得知，活化自噬作用途徑會加快HSP27的降解速度。

然而，cybrid cells在starvation及rapamycin處理並不影響phospho-HSP27的表現量，也就是自噬作用可能不負責降解phospho-HSP27（圖十一B及圖十二B）。因此，綜合抑制cybrid cells泛素蛋白酶體路徑而增加phospho-HSP27的結果（圖八及圖九），可以推測phospho-HSP27可能是經泛素蛋白酶體路徑降解。

除此之外，我們也分析自噬途徑中幾個重要分子的活化程度，是否在MERRF cybrid cells中高於正常cybrid cells。在MERRF cybrid cells中LC3 II的活化，在不同處理下皆顯著高於正常cybrid cells（圖十三及圖十四）。可以用於解釋為什麼在MERRF cybrid cells中會觀察到HSP27的減少。但是，在MERRF cybrid cells中同樣有較高的自噬作用活化，而其它HSP為什麼卻不受影響？是否因為HSP27會形成較大的oligomer所致？自噬作用選擇降解HSP27表現量的機制為何？是在未來須被加以討論的方向。

在未經處理時MERRF cybrid cells中ATG12顯著高於正常cybrid cells。但是在處理rapamycin後，正常cybrid cells的ATG12表現量反而顯著高於MERRF cybrid cells（圖十五）。正常cybrid cells處理rapamycin後的ATG12表現量增加，雖然在相同處理下也觀察到LC3 II增加（圖十三），但是ATG12所活化的自噬作用程度可能尚無法高於MERRF cybrid cells已經活化的自噬作用。另外，ATG5、ATG7、Beclin1及Bcl-2



的蛋白表現量在細胞之間沒有差異（圖十六及data not shown）。由這些結果尚無法得知，受損的粒線體是否直接引發自噬作用的活化。

為了進一步瞭解，HSP27降解和MERRF cybrid cells中自噬作用活性的關係。在未來我們將在活化自噬作用的同時，利用3-MA處理阻擋自噬作用活化，或處理pepstain或leupatin抑制溶酶體的蛋白分解酵素作用，觀察HSP27在正常或MERRF cybrid cells中的降解速度（Qin et al., 2003; Boland et al., 2008）。除此之外，未來將利用穿透式電子顯微鏡以及免疫螢光染色的方式觀察代表自噬體的Atg8/LC3，在細胞中的分佈位置，活化狀態與粒線體突變的關係。我們也將設計引子利用real-time Reverse Transcriptase PCR（RT-PCR）反應，偵測在正常或MERRF cybrid cells中自噬作用相關轉譯物（ATGs-related transcripts）的表現量。未來藉由分析自噬作用是否過度活化或是具有缺失，都將有助於HSP27在MERRF疾病中的了解。

過去文獻中對於HSP27大多著重在對壓力刺激的反應，對於壓力可引發HSP27蛋白合成的研究已有相當程度的了解（Ellis and van der Vies, 1991; Stokoe et al., 1992; Lavoie et al., 1995; Kyriakis and Avruch, 1996; Gusev et al., 2002; Concannon et al., 2003）。雖然在許多神經退化性疾病或是肌肉、心肌及血管的研究中，都認為HSP27扮演不可或缺的角色（Arrigo and Landry, 1994; Konishi et al., 1997; Benjamin and

McMillan, 1998; Downward, 1998; Lewis et al., 1999; Wagstaff et al., 1999; Murashov et al., 2001; Benn et al., 2002; Delogu et al., 2002; Ferns et al., 2006; Zheng et al., 2006; Kwon et al., 2007; Voegeli et al., 2008)。但是，對於HSP27的蛋白降解與疾病的相關性卻很少被討論。在我們的研究中，MERRF mtDNA突變所導致的細胞病變，卻使得由細胞核所表現的HSP27有表現量的差異，並且改變HSP27的磷酸化程度，因此深入探討MERRF mtDNA突變如何與細胞質及細胞核之間相互協調，對於疾病機制的探討相當重要。

最後由圖十七總結本論文的研究可以得知，HSP27在MERRF cybrid cells的細胞凋亡過程中具有保護性作用。phospho-HSP27在MERRF cybrid cells中減少的原因並非因缺乏ATP所造成；並且當MERRF cybrid cells處在壓力之下依然能夠正常調控phospho-HSP27的表現量。在MERRF cybrid cells中仍有未知的機制，調控phospho-HSP27的降低。另外，我們推測HSP27的蛋白降解途徑並非藉由泛素蛋白酶體途徑；相反的phospho-HSP27則因泛素蛋白酶體受抑制作用而增加。HSP27的蛋白降解途徑可能是藉由自噬作用的活化。因此MERRF疾病中HSP27的減少，可能是在MERRF cybrid cells的自噬作用活化程度較高所致。對於自噬作用活化與MERRF疾病致病機制的關係，未來將進行更深入的探討。

## 参考文献

- Ackerley S, James PA, Kalli A, French S, Davies KE and Talbot K. (2006) A mutation in the small heat-shock protein HSPB1 leading to distal hereditary motor neuronopathy disrupts neurofilament assembly and the axonal transport of specific cellular cargoes. *Hum Mol Genet.* 15, 347-354.
- Ahmad S, Ahmad A, Ghosh M, Leslie CC and White CW. (2004) Extracellular ATP-mediated signaling for survival in hyperoxia-induced oxidative stress. *J. Biol. Chem.* 279, 16317-16325.
- Alemi M, Prigione A, Wong A, Schoenfeld R, DiMauro S, Hirano M, Taroni F and Cortopassi G. (2007) Mitochondrial DNA deletions inhibit proteasomal activity and stimulate an autophagic transcript. *Free Radic. Biol. Med.* 42, 32-43.
- Anderson WM, Fowler WT, Pennington RM, and Fisher RR. (1981) Immunochemical characterization and purification of bovine heart mitochondrial pyridine dinucleotide transhydrogenase. *J Biol Chem.* 256, 1888-1895.
- Antonická H, Floryk D, Klement P, Stratilová L, Hermanská J, Houstková H, Kalous M, Drahotka Z, Zeman J, and Houstek J. (1999) Defective kinetics of cytochrome c oxidase and alteration of mitochondrial membrane potential in fibroblasts and cytoplasmic hybrid cells with the mutation for myoclonus epilepsy with ragged-red fibres ('MERRF') at position 8344 nt. *Biochem J.* 342, 537-544.
- Arakawa M, Yasutake M, Miyamoto M, Takano T, Asoh S and Ohta S.

- (2007). Transduction of anti-cell death protein FNK protects isolated rat hearts from myocardial infarction induced by ischemia/reperfusion. *Life Sci.* 80, 2076-2084.
- Arnaud P, Elise S, Sandeep G, Daphné SB, Alena P, Aurélie C, Stéphanie Pl, Saadi K, Eric S, and Carmen G (2003) HSP27 Is a Ubiquitin-Binding Protein Involved in I- $\kappa$ B $\alpha$  Proteasomal Degradation *Molecular and Cellular Biology* 23, 5790-5802.
- Arnaud P, Mathilde B, Elise S, Edwige C, Céline D, Arlette Ha, Keiko N, Keiichi I. N, Saadi K, Eric S and Carmen G (2006) HSP27 favors ubiquitination and proteasomal degradation of p27<sup>Kip1</sup> and helps S-phase re-entry in stressed cells. *The FASEB Journal.* 20, 1179-1181.
- Arpa J, Campos Y, Gutiérrez MM, Martin-Casanueva MA, Cruz-Martínez A, Pérez-Conde MC, López-Pajares R, Morales MC, Tatay J, Lacasa T, Barreiro P, and Arenas J. (1997) Gene dosage effect in one family with myoclonic epilepsy and ragged-red fibers (MERRF). *Acta Neurol Scand.* 96, 65-71.
- Arrigo AP, Suhan JP, and Welch WJ. (1988) Dynamic changes in the structure and intracellular locale of the mammalian low-molecular-weight heat shock protein. *Mol Cell Biol.* 8, 5059-5071.
- Arrigo AP. (1998) Small stress proteins: chaperones that act as regulators of intracellular redox state and programmed cell death. *Biol Chem.* 379, 19-26.
- Arrigoa A, Simona S, Giberta B, Kretz-Remya C, Nivona M, Czekallaa A, Guilleta D, Moulina M, Diaz-Latouda C and Vicart P. (2007) Hsp27 (HspB1) and  $\alpha$ B-crystallin (HspB5) as therapeutic targets. *FEBS J.* 581, 3665-3674.
- Arya R, Mallik M and Lakhotia SC. (2007). Heat shock genes-integrating

- cell survival and death. *J. Biosci.* 32, 595-610.
- Ashkenazi, A. (2002). Targeting death and decoy receptors of the tumour-necrosis factor superfamily. *Nat. Rev. Cancer* 2, 420-430.
- Barry B, Asok K, Sooyeon L, Frances M. Platt, Jerzy WW. Haung Y, and Ralph AN. (2008) Autophagy induction and autophagosome clearance in neurons: relationship to autophagic pathology in alzheimer's disease. *The Journal of Neuroscience* 28, 6926-6937;
- Benjamin IJ, and McMillan DR. (1998) Stress (heat shock) proteins: molecular chaperones in cardiovascular biology and disease. *Circ Res. J* 83, 117-132.
- Benn SC, Perrelet D, Kato AC, Scholz J, Decosterd I, Mannion RJ, Bakowska JC and Woolf CJ. (2002) Hsp27 Upregulation and phosphorylation is required for injured sensory and motor neuron survival. *Neuron* 36, 45-56.
- Benndorf R and Welsh MJ. (2004) Shocking degeneration. *Nat Genet.*36, 597-601.
- Benndorf R, Hayess K, Ryazantsev S, Wieske M, Behlke J, and Lutsch G. (1994) Phosphorylation and supramolecular organization of murine small heat shock protein HSP25 abolish its actin polymerization-inhibiting activity. *J Biol Chem.* 269, 20780-20784.
- Beresford PJ, Jaju M, Friedman RS, Yoon MJ, and Lieberman J. (1998) A role for heat shock protein 27 in CTL-mediated cell death. *J Immunol.* 161, 161-167.
- Bergamini E, Cavallini G, Donati A, and Gori Z. (2003) The anti-ageing effects of caloric restriction may involve stimulation of macroautophagy and lysosomal degradation, and can be intensified pharmacologically. *Biomed Pharmacother* 57, 203-208.
- Bjorkoy G and Johansen T. (2007) p62/SQSTM1 binds directly to Atg8/LC3 to facilitate degradation of ubiquitinated protein

- aggregates by autophagy. *J. Biol. Chem.* 282, 24131-24145.
- Boland B, Kumar A, Lee S, Platt FM, Wegiel J, Yu WH and Nixon RA. (2008) Autophagy induction and autophagosome clearance in neurons: relationship to autophagic pathology in Alzheimer's disease. *The Journal of Neuroscience* 28, 6926-6937.
- Boulet L, Karpati G, and Shoubridge EA. (1992) Distribution and threshold expression of the tRNA(Lys) mutation in skeletal muscle of patients with myoclonic epilepsy and ragged-red fibers (MERRF). *Am J Hum Genet.* 51, 1187-1200.
- Bova MP, McHaourab HS, Han Y, and Fung BK. (2000) Subunit exchange of small heat shock proteins. Analysis of oligomer formation of alphaA-crystallin and Hsp27 by fluorescence resonance energy transfer and site-directed truncations. *J Biol Chem.* 275, 1035-1042.
- Bova MP, Yaron O, Huang Q, Ding L, Haley DA, Stewart PL, and Horwitz J. (1999) Mutation R120G in alphaB-crystallin, which is linked to a desmin-related myopathy, results in an irregular structure and defective chaperone-like function. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 96, 6137-6142.
- Boyault C, Sadoul K, Pabion M and Khochbin S. (2007) HDAC6, at the crossroads between cytoskeleton and cell signaling by acetylation and ubiquitination. *Oncogene* 26, 5468-5476.
- Brookes PS, Yoon Y, Robotham JL, Anders MW, and Sheu SS. (2004) Calcium, ATP, and ROS: a mitochondrial love-hate triangle. *Am J Physiol Cell Physiol.* 287, 817-833.
- Bruey J, Paul C, Fromentin A, Hilpert S, Arrigo A, Solary E and Garrido C. (2000) Differential regulation of HSP27 oligomerization in tumor cells grown in vitro and in vivo. *Oncogene* 19, 4855-4863.
- Bruey JM, Ducasse C, Bonniaud P, Ravagnan L, Susin SA, Diaz-Latoud

- C, Gurbuxani S, Arrigo AP, Kroemer G and Solary E. (2000) Hsp27 negatively regulates cell death by interacting with cytochrome c. *Nat. Cell Biol.* 2, 645-652.
- Bryantsev AL, Chechenova MB and Shelden EA. (2007) Recruitment of phosphorylated small heat shock protein Hsp27 to nuclear speckles without stress. *Experimental Cell Research* 313, 195-209.
- Cairns J, Qin S, Philp R, Tan YH and Guy GR. (1994) Dephosphorylation of the small heat shock protein Hsp27 in vivo by protein phosphatase 2A. *J. Biol. Chem.* 269, 9176-9183.
- Chandel NS, Maltepe E, Goldwasser E, Mathieu CE, Simon MC and Schumacker PT. (1998) Mitochondrial reactive oxygen species trigger hypoxia-induced transcription. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 95, 11715-11720.
- Chang SJ, Tzeng CR, Lee YH and Tai CJ. (2008) Extracellular ATP activates the PLC/PKC/ERK signaling pathway through the P2Y2 purinergic receptor leading to the induction of early growth response expression and the inhibition of viability in human endometrial stromal cells. *Cellular Signalling* 20, 1248-1255.
- Charette SJ, Lavoie JN, Lambert H and Landry J. (2000) Inhibition of Daxx-mediated apoptosis by heat shock protein 27. *Mol. Cell. Biol.* 20, 7602-7612.
- Chinnery PF, Howell N, Lightowlers RN, and Turnbull DM. (1997) Molecular pathology of MELAS and MERRF. The relationship between mutation load and clinical phenotypes. *Brain.* 120, 1713-1721.
- Chomyn A, Lai ST, Shakeley R, Bresolin N, Scarlato G, and Attardi G. (1994) Platelet-mediated transformation of mtDNA-less human cells: analysis of phenotypic variability among clones from normal individuals--and complementation behavior of the tRNA<sup>Lys</sup>

- mutation causing myoclonic epilepsy and ragged red fibers. *Am J Hum Genet.* 54, 966-974.
- Chomyn A, Meola G, Bresolin N, Lai ST, Scarlato G, and Attardi G. (1991) In vitro genetic transfer of protein synthesis and respiration defects to mitochondrial DNA-less cells with myopathy-patient mitochondria. *Mol Cell Biol.* 11, 2236-2244.
- Clark JI and Muchowski PJ. (2000) Small Heat-Shock Proteins and their potential role in human disease. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 10, 52-59.
- Columbaro M, Mattioli E, Lattanzi G, Rutigliano C, Ognibene A, Maraldi NM and Squarzoni S. (2001) Staurosporine treatment and serum starvation promote the cleavage of emerin in cultured mouse myoblasts: involvement of a caspase-dependent mechanism. *FEBS Lett.* 509, 423-429.
- Concannon CG, Gorman AM and Samali A. (2003). On the role of Hsp27 in regulating apoptosis. *Apoptosis* 8, 61-70.
- Concannon CG, Orrenius S and Samali A. (2001) Hsp27 inhibits cytochrome c-mediated caspase activation by sequestering both pro-caspase-3 and cytochrome c. *Gene Exp.* 9, 195-201.
- Concannon, C.G., Orrenius, S., and Samali, A. (2001). Hsp27 inhibits cytochrome c-mediated caspase activation by sequestering both pro-caspase-3 and cytochrome c. *Gene Exp.* 9, 195–201.
- Cuervo AM, Stefanis L, Fredenburg R, Lansbury PT, and Sulzer D. (2004) Impaired degradation of mutant alpha-synuclein by chaperone-mediated autophagy. *Science* 305, 1292-1295.
- Cuesta R, Laroia G, and Schneider RJ. (2000) Chaperone hsp27 inhibits translation during heat shock by binding eIF4G and facilitating dissociation of cap-initiation complexes. *Genes Dev.* 14, 1460-1470.



- Delogu G, Signore M, Mechelli A, and Famularo, G. (2002). Heat shock proteins and their role in heart injury. *Curr. Opin. Crit. Care* 8, 411–416.
- Dorn BR, Dunn WA Jr, and Progulske-Fox A. (2002) Bacterial interactions with the autophagic pathway. *Cell Microbiol.* 4, 1-10.
- Downward J. (1998) Mechanisms and consequences of activation of protein kinase B/Akt. *Curr Opin Cell Biol.* 10, 262-267.
- Downward J. (1998) Ras signalling and apoptosis. *Curr Opin Genet Dev.* 8(1):49-54.
- Ehrnsperger M, Gräber S, Gaestel M, and Buchner J. (1997) Binding of non-native protein to Hsp25 during heat shock creates a reservoir of folding intermediates for reactivation. *EMBO J.* 16, 221-229.
- Ehrnsperger M, Graber S, Gaestel M, and Buchner, J. (1997). Binding of non-native protein to Hsp25 during heat shock creates a reservoir of folding intermediates for reactivation. *EMBO J.* 16, 221-229.
- Ehrnsperger M, Hergersberg C, Wienhues U, Nichtl A, and Buchner J. (1998) Stabilization of proteins and peptides in diagnostic immunological assays by the molecular chaperone Hsp25. *Anal Biochem.* 259, 218-25.
- Ellis RJ, and van der Vies SM. (1991) Molecular chaperones. *Annu Rev Biochem.* 60, 321-347.
- Elmore SP, Qian T, Grissom SF, and Lemasters JJ. (2001) The mitochondrial permeability transition initiates autophagy in rat hepatocytes. *FASEB J.* 15, 2286-2287.
- Esposito LA, Melov S, Panov A, Cottrell BA and Wallace DC. (1999) Mitochondrial disease in mouse results in increased oxidative stress. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 96, 4820-4825.
- Evgrafov OV, Mersiyanova I, Irobi J, Bosch LVD, Dierick I, Leung CL, Schagina O, Verpoorten N, Impe KV, Fedotov V, Dadali E,

- Auer-Grumbach M, Windpassinger C, Wagner K, Mitrovic Z, Hilton-Jones D, Talbot K, Jean-Jacques M, Vasserman N, Tverskaya S, Polyakov A, Liem RKH, Gettemans J, Robberecht W, Jonghe PD and Timmerman V. (2004) Mutant small heat-shock protein 27 causes axonal Charcot-Marie-Tooth disease and distal hereditary motor neuropathy. *Nature Genetics* 36, 602-606.
- Fabrizi GM, Cardaioli E, Grieco GS, Cavallaro T, Malandrini A, Manneschi L, Dotti MT, Federico A, and Guazzi G. (1996) The A to G transition at nt 3243 of the mitochondrial tRNA<sup>Leu</sup>(UUR) may cause an MERRF syndrome. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 61, 47-51.
- Fabrizi GM, Lodi R, D'Ettorre M, Malandrini A, Cavallaro T, Rimoldi M, Zaniol P, Barbiroli B, and Guazzi G. (1996) Autosomal dominant limb girdle myopathy with ragged-red fibers and cardiomyopathy. A pedigree study by in vivo 31P-MR spectroscopy indicating a multisystem mitochondrial defect. *J Neurol Sci*. 137, 20-27.
- Ferns G, Shams S and Shafi S. (2006) Heat shock protein 27: its potential role in vascular disease. *Int. J. Exp. Path.* 87, 253-274.
- Filosto M, Tomelleri G, Tonin P, Scarpelli M, Vattei G, Rizzuto N, Padovani A and Simonati A. (2007) Neuropathology of mitochondrial diseases. *Biosci. Rep.* 27, 23-30.
- Fortun J, Dunn WA Jr, Joy S, Li J, and Notterpek L. (2003) Emerging role for autophagy in the removal of aggregates in Schwann cells. *J Neurosci*. 23, 10672-10680.
- Gabai VL, and Sherman MY. (2002) Invited review: Interplay between molecular chaperones and signaling pathways in survival of heat shock. *J Appl Physiol*. 92, 1743-1748.

- Gabai VL, Meriin AB, Yaglom JA, Volloch VZ, and Sherman MY. (1998) Role of Hsp70 in regulation of stress-kinase JNK: implications in apoptosis and aging. *FEBS Lett.* 438, 1-4.
- Garrido C, Bruey, JM, Fromentin A, Hammann A, Arrigo AP, and Solary E. (1999). HSP27 inhibits cytochrome c-dependent activation of procaspase-9. *FASEB J.* 13, 2061–2070.
- Garrido C, Brunet M, Didelot C, Zermati Y, Schmitt E and Kroemer G. (2006) Heat shock proteins 27 and 70 anti-apoptotic proteins with tumorigenic properties. *Cell Cycle* 5, 2592-2601.
- Garrido C, Mehlen P, Fromentin A, Hammann A, Assem M, Arrigo AP, and Chauffert B. (1996) Inconstant association between 27-kDa heat-shock protein (Hsp27) content and doxorubicin resistance in human colon cancer cells. The doxorubicin-protecting effect of Hsp27. *Eur J Biochem.* 237, 653-659.
- Garrido C, Ottavi P, Fromentin A, Hammann A, Arrigo AP, Chauffert B, and Mehlen P. (1997) HSP27 as a mediator of confluence-dependent resistance to cell death induced by anticancer drugs. *Cancer Res.* 57, 2661-2667.
- Garrido C. (2002). Size matters: of the small HSP27 and its large oligomers. *Cell Death Differ.* 9, 483–485.
- Gi SJ and Hsieh M. (2007) Study of heat shock protein 27 expression in MERRF cellular model. Master thesis.
- Goto Y, Koga Y, Horai S, and Nonaka I. (1990) Chronic progressive external ophthalmoplegia: a correlative study of mitochondrial DNA deletions and their phenotypic expression in muscle biopsies. *J Neurol Sci.* 100, 63-69.
- Goto Y, Nonaka I, and Horai S. (1990) A mutation in the tRNA<sup>(Leu)</sup>(UUR) gene associated with the MELAS subgroup of mitochondrial encephalomyopathies. *Nature.* 348, 651-653.

- Guido L, Daniela G, Zhijun L, Joseph A, Richard R, and Joseph NT. (2001) Extracellular ATP stimulates an inhibitory pathway towards growth factor-induced cRaf-1 and MEKK activation in astrocyte cultures. *Journal of Neurochemistry* 77, 1001-1009.
- Gusev NB, Bogatcheva NV, and Marston SB. (2002) Structure and properties of small heat shock proteins (sHsp) and their interaction with cytoskeleton proteins. *Biochemistry* 67,511-519.
- Ha H, Kim J, Cho I, Joo H, Kim K, Lee K, Sunwoo H, Im J, Lee J, Hong J and Han P. (2008) Morphogenetic lung defects of JSAP1-deficient embryos proceeds via the disruptions of the normal expressions of cytoskeletal and chaperone proteins. *Proteomics* 8, 1071-1080.
- Hammans SR, Sweeney MG, Brockington M, Lennox GG, Lawton NF, Kennedy CR, Morgan-Hughes JA, and Harding AE. (1993) The mitochondrial DNA transfer RNA(Lys)A-->G(8344) mutation and the syndrome of myoclonic epilepsy with ragged red fibres (MERRF). Relationship of clinical phenotype to proportion of mutant mitochondrial DNA. *Brain*. 116, 617-632.
- Havasi A, Li Z, Wang Z, Martin JL, Botla V, Ruchalski K, Schwartz JH and Borkan SC. (2008) Hsp27 Inhibits Bax activation and apoptosis via a PI<sub>3</sub> kinase-dependent mechanism. *J. Biol. Chem.* 283, 12305-12313.
- Hay N, and Sonenberg N. (2004) Upstream and downstream of mTOR. *Genes Dev.* 18, 1926-1945.
- Heitman J, Movva NR, and Hall MN. (1991) Targets for cell cycle arrest by the immunosuppressant rapamycin in yeast. *Science* 253, 905-909.
- Holt I.J, AE Harding and JA Morgan-Hughes. (1988) Deletions of muscle mitochondrial DNA in patients with mitochondrial myopathies. *Nature* 331, 717-719.

- Indo HP, Davidson M, Yen H, Suenaga S, Tomita K, Nishii T, Higuchi M, Koga Y, Ozawa TH and Majima J. (2007) Evidence of ROS generation by mitochondria in cells with impaired electron transport chain and mitochondrial DNA damage. *Mitochondrion* 7, 106-118.
- Irobi J, De Jonghe P, and Timmerman V. (2004) Molecular genetics of distal hereditary motor neuropathies. *Hum Mol Genet.* 13 , 195-202.
- Ismailov SM, Fedotov VP, Dadali EL, Polyakov AV, Van Broeckhoven C, Ivanov VI, De Jonghe P, Timmerman V, and Evgrafov OV. (2001) A new locus for autosomal dominant Charcot-Marie-Tooth disease type 2 (CMT2F) maps to chromosome 7q11-q21. *Eur J Hum Genet.* 9, 646-650.
- Iwata A, Riley BE, Johnston JA and Kopito RR. (2005) HDAC6 and Microtubules Are Required for Autophagic Degradation of Aggregated Huntingtin. *J. Biol. Chem.* 280, 40282-40292.
- Jäättelä, M. (1999) Escaping cell death: survival proteins in cancer. *Exp. Cell Res.* 248, 30-43.
- Jacques-Silva MC, Bernardi A, Rodnight R and Lenz G. (2004) ERK, PKC and PI3K/Akt Pathways Mediate Extracellular ATP and Adenosine-Induced Proliferation of U138-MG Human Glioma Cell Line. *Oncology* 67, 450-459.
- Jakob U, Gaestel M, Engel K, and Buchner J. (1993) Small heat shock proteins are molecular chaperones. *J Biol Chem.* 268, 1517-1520.
- James AM, Wei YH, Pang CY and Murphy MP. (1996) Altered mitochondrial function in fibroblasts containing MELAS or MERRF mitochondrial DNA. *Biochem. J.* 318, 401-407.
- James PA, Rankin J, and Talbot K. (2008) Asymmetrical late onset motor neuropathy associated with a novel mutation in the small heat shock protein HSPB1 (HSP27). *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 79, 461-463.

- Johnson GL and Lapadat R. (2002) Mitogen-activated protein kinase pathways mediated by ERK, JNK, and p38 protein kinases. *Science* 298, 1911-1912.
- Kamimoto T, Shoji S, Hidvegi T, Mizushima N, Umebayashi K, Perlmutter DH, and Yoshimori T. (2006) Intracellular inclusions containing mutant alpha1-antitrypsin Z are propagated in the absence of autophagic activity. *J Biol Chem.* 281, 4467-4476.
- Kappé G, Franck E, Verschuure P, Boelens WC, Leunissen JA, and de Jong WW. (2003) The human genome encodes 10 alpha-crystallin-related small heat shock proteins: HspB1-10. *Cell Stress Chaperones.* 8, 53-61.
- Kato K, Hasegawa K, Goto S, and Inaguma Y. (1994) Dissociation as a result of phosphorylation of an aggregated form of the small stress protein, hsp27. *J Biol Chem.* 269, 11274-11278.
- King MP, and Attardi G. (1989) Human cells lacking mtDNA: repopulation with exogenous mitochondria by complementation. *Science.* Oct 27; 246, 500-503.
- King MP, Koga Y, Davidson M, and Schon EA. (1992) Defects in mitochondrial protein synthesis and respiratory chain activity segregate with the tRNA(Leu(UUR)) mutation associated with mitochondrial myopathy, encephalopathy, lactic acidosis, and strokelike episodes. *Mol Cell Biol.* 12, 480-490.
- Kirkegaard K, Taylor MP, and Jackson WT. (2004) Cellular autophagy: surrender, avoidance and subversion by microorganisms. *Nat Rev Microbiol.* 2, 301-314.
- Kiššová I, Deffieu M, Samokhvalov V, Velours G, Bessoule J, Manon S and Camougrand N. (2006) Lipid oxidation and autophagy in yeast. *Free Radic. Biol. Med.* 41, 1655-1661.
- Kissova I, Plamondon L, Brisson L, Priault M, Renouf V, Schaeffer J,

- Camougrand N and Manon S. (2006) Evaluation of the Roles of Apoptosis, Autophagy, and Mitophagy in the Loss of Plating Efficiency Induced by Bax Expression in Yeast. *J. Biol. Chem.* 281, 36187-36197.
- Klionsky DJ and Emr SD. (2000) Autophagy as a regulated pathway of cellular degradation. *Science* 290, 1717-1721.
- Klionsky DJ, Cuervo AM and Seglen PO. (2007) Methods for monitoring autophagy from yeast to human. *Autophagy* 3, 181-206.
- Kluck RM, Bossy-Wetzell E, and Green DR, Newmeyer DD. (1997) The release of cytochrome c from mitochondria: a primary site for Bcl-2 regulation of apoptosis. *Science* 275,1132-1136.
- Kokotasa H, Petersena MB and Willemse PJ. (2007) Mitochondrial deafness. *Clin. Genet.* 71, 379-391.
- Komatsu M, Kominami E, and Tanaka K. (2006) Autophagy and neurodegeneration. *Autophagy.* 2, 315-317.
- Komatsu M, Waguri S, Ueno T, Iwata J, Murata S, Tanida I, Ezaki J, Mizushima N, Ohsumi Y, Uchiyama Y, Kominami E, Tanaka K, and Chiba T. (2005) Impairment of starvation-induced and constitutive autophagy in Atg7-deficient mice. *J Cell Biol.* 169, 425-434.
- Konishi H, Matsuzaki H, Tanaka M, Takemura Y, Kuroda S, Ono Y, and Kikkawa U. (1997) Activation of protein kinase B (Akt/RAC-protein kinase) by cellular stress and its association with heat shock protein Hsp27. *FEBS Lett.* 410, 493-498.
- Kwon, J.H., Kim, J.B., Lee, K.H., Kang, S.M., Chung, N., Jang, Y., and Chung, J.H. (2007). Protective effect of heat shock protein 27 using protein transduction domain-mediated delivery on ischemia/reperfusion heart injury. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 363, 399-404.

- Kyriakis JM, and Avruch J. (1996) Sounding the alarm: protein kinase cascades activated by stress and inflammation. *J Biol Chem.* 271, 24313-24316.
- Lambert H, Charette SJ, Bernier AF, Guimond A and Landry J. (1999) HSP27 Multimerization Mediated by Phosphorylation-sensitive Intermolecular Interactions at the Amino Terminus. *J Biol Chem* 274, 9378-9385.
- Landry J, Chrétien P, Lambert H, Hickey E, and Weber LA. (1989) Heat shock resistance conferred by expression of the human HSP27 gene in rodent cells. *J Cell Biol.* 109, 7-15.
- Lanneau D, Brunet M, Frisan E, Solary E, Fontenay M, and Garrido C. (2008) Heat shock proteins: essential proteins for apoptosis regulation. *J Cell Mol Med.* 12, 743-761.
- Larsson NG, Tulinius MH, Holme E, Oldfors A, Andersen O, Wahlström J, and Aasly J. (1992) Segregation and manifestations of the mtDNA tRNA(Lys) A-->G(8344) mutation of myoclonus epilepsy and ragged-red fibers (MERRF) syndrome. *Am J Hum Genet.* 1992, 51, 1201-1212.
- Lavoie JN, Gingras-Breton G, Tanguay RM, and Landry J. (1993) Induction of Chinese hamster HSP27 gene expression in mouse cells confers resistance to heat shock. HSP27 stabilization of the microfilament organization. *J Biol Chem.* 268, 3420-3429.
- Lavoie JN, Hickey E, Weber LA, and Landry J. (1993) Modulation of actin microfilament dynamics and fluid phase pinocytosis by phosphorylation of heat shock protein 27. *J Biol Chem.* 268, 24210-24214.
- Lavoie, J. N., Lambert, H., Hickey, E., Weber, L. A., and Landry, J. (1995) *Mol Cell Biol* 15, 505-516.
- Lenz G, Gonclves D, Luo Z, Avruch J, Rodnight R and Neary JT.



- (2001) Extracellular ATP stimulates an inhibitory pathway towards growth factor-induced cRaf-1 and MEKK activation in astrocyte cultures. *J.Neuro.* 77, 1001-1009.
- Leroux MR, Melki R, Gordon B, Batelier G, and Candido EP. (1997) Structure-function studies on small heat shock protein oligomeric assembly and interaction with unfolded polypeptides. *J Biol Chem.* 272, 24646-24656.
- Lestienne P, and Ponsot G. (1988) Kearns-Sayre syndrome with muscle mitochondrial DNA deletion. *Lancet.* 1, 885.
- Levine B and Kroemer G. (2008) Autophagy in the pathogenesis of disease. *Cell* 132, 27-42.
- Levine B, and Klionsky DJ. (2004) Development by self-digestion: molecular mechanisms and biological functions of autophagy. *Dev Cell.* 6, 463-477.
- Lewis SE, Mannion RJ, White FA, Coggeshall RE, Beggs S, Costigan M, Martin JL, Dillmann WH, and Woolf CJ. (1999) A role for HSP27 in sensory neuron survival. *J Neurosci.* 19, 8945-8953.
- Li JQ, Qi HZ, He ZJ, Hu W, Si ZZ, Li YN, and Li DB. (2009) Cytoprotective effects of human interleukin-10 gene transfer against necrosis and apoptosis induced by hepatic cold ischemia/reperfusion injury. *J Surg Res.* Epub ahead of print.
- Li, Z.X, Ouyang K.Q, Jiang X, Wang D, and Hu Y. (2009). Curcumin induces apoptosis and inhibits growth of human Burkitt's lymphoma in xenograft mouse model. *Mol. Cells* 27, 283–289.
- Lin MT, and Beal MF. (2006) Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in neurodegenerative diseases. *Nature.* 443, 787-95.
- Lindquist S, and Craig EA. (1988) The heat-shock proteins. *Annu Rev Genet.* 22, 631-677.
- Ling J, Roy H, Qin D, Rubio MAT, Alfonzo JD, Fredrick K and Ibba M.

- (2007) Pathogenic mechanism of a human mitochondrial tRNA<sup>Phe</sup> mutation associated with myoclonic epilepsy with ragged red fibers syndrome. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 39, 15299-15304.
- Liu CY, Lee CF and Wei YH. (2007) Quantitative effect of 4977 bp deletion of mitochondrial DNA on the susceptibility of human cells to UV-induced apoptosis. *Mitochondrion* 7, 289-295.
- Liu CY, Lee CF, Hong CH and Wei YH. (2004) Mitochondrial DNA mutation and depletion increase the susceptibility of human cells to apoptosis. *Ann N Y Acad Sci.* 1011, 133-45.
- Liu D, Genetos DC, Shao Y, Geist DJ, Li J, Ke HZ, Turner CH and Duncan RL. (2008) Activation of extracellular-signal regulated kinase (ERK1/2) by fluid shear is Ca<sup>2+</sup>- and ATP-dependent in MC3T3-E1 osteoblasts. *Bone* 42, 644-652.
- Liu YJ, Arpin C, de Bouteiller O, Guret C, Banchereau J, Martinez-Valdez H, and Lebecque S. (1996) Sequential triggering of apoptosis, somatic mutation and isotype switch during germinal center development. *Semin Immunol.* 8, 169-177.
- Loktionova SA, Ilyinskaya OP, Gabai VL, and Kabakov AE. (1996) Distinct effects of heat shock and ATP depletion on distribution and isoform patterns of human Hsp27 in endothelial cells. *FEBS Lett.* 392, 100-104.
- Longo VD, and Finch CE. (2003) Evolutionary medicine: from dwarf model systems to healthy centenarians? *Science.* 299, 1342-1346
- Ludwig S, Hoffmeyer A, Goebeler M, Kilian K, Häfner H, Neufeld B, Han J, and Rapp UR. (1998) The stress inducer arsenite activates mitogen-activated protein kinases extracellular signal-regulated kinases 1 and 2 via a MAPK kinase 6/p38-dependent pathway. *J Biol Chem.* 273, 1917-1922.

- Luft R. (1994) The development of mitochondrial medicine. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 91, 8731-8738.
- MacRae TH. (2000) Structure and function of small heat shock/alpha-crystallin proteins: established concepts and emerging ideas. *Cell Mol Life Sci.* 57, 899-913.
- Margit MK, Nass and Sylvan Nass. (1963) Intramitochondrial fibers with DNA characteristics. I. Fixation and Electron Staining Reactions. *J Cell Biol.* 19, 593–611.
- Massey A, Kiffin R, and Cuervo AM. (2004) Pathophysiology of chaperone-mediated autophagy. *Int J Biochem Cell Biol.* 2420-2434.
- Masucci JP, Davidson M, Koga Y, Schon EA, and King MP. (1995) In vitro analysis of mutations causing myoclonus epilepsy with ragged-red fibers in the mitochondrial tRNA(Lys) gene: two genotypes produce similar phenotypes. *Mol Cell Biol.* 15, 2872-2881.
- McClaren M, and Isseroff RR. (1994) Dynamic changes in intracellular localization and isoforms of the 27-kD stress protein in human keratinocytes. *J Invest Dermatol.* 102, 375-381.
- Mehlen P, and Arrigo AP. (1994) The serum-induced phosphorylation of mammalian hsp27 correlates with changes in its intracellular localization and levels of oligomerization. *Eur J Biochem.* 221, 327-334.
- Meléndez A, Tallóczy Z, Seaman M, Eskelinen EL, Hall DH, and Levine B. (2003) Autophagy genes are essential for dauer development and life-span extension in *C. elegans*. *Science.* 301,1387-1391.
- Mizushima N and Yoshimori T. (2007) How to Interpret LC3 Immunoblotting. *Autophagy* 3, 542-545.

- Mizushima N, and Hara T. (2006) Intracellular quality control by autophagy: how does autophagy prevent neurodegeneration? *Autophagy*. 2,302-304.
- Mizushima N, Levine B, Cuervo AM and Klionsky DJ. (2008) Autophagy fights disease through cellular self-digestion. *Nature* 451, 1069-75.
- Mizushima N. (2004) Methods for monitoring autophagy. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 36, 2491-2502.
- Morano KA, and Thiele DJ. (1999) Heat shock factor function and regulation in response to cellular stress, growth, and differentiation signals. *Gene Expr.* 7, 271-282.
- Morano KA, and Thiele DJ. (1999) Heat shock factor function and regulation in response to cellular stress, growth, and differentiation signals. *Gene Expr.* 7, 271-82.
- Mounier N, and Arrigo AP. (2002) Actin cytoskeleton and small heat shock proteins: how do they interact? *Cell Stress Chaperones*. 7, 167-176.
- Mund T, Gewies A, Schoenfeld N, Bauer MK, and Grimm S. (2003) Spike, a novel BH3-only protein, regulates apoptosis at the endoplasmic reticulum. *FASEB J.* 17, 696-698.
- Murashov AK, Ul Haq I, Hill C, Park E, Smith M, Wang X, Wang X, Goldberg DJ, and Wolgemuth DJ. (2001) Crosstalk between p38, Hsp25 and Akt in spinal motor neurons after sciatic nerve injury. *Brain Res Mol Brain Res*. 93, 199-208.
- Nakatogawa H, Ichimura Y and Ohsumi Y. (2008) Atg8, a ubiquitin-like protein required for autophagosome formation, mediates membrane tethering and hemifusion. *Cell* 130, 165-178.

- Nass MM and Nass S. (1963) Intramitochondrial fibers with DNA characteristics. I. Fixation and electron staining reactions. *J Cell Biol.* 19, 593-611.
- Nass MM. (1968) Mitochondrial DNA: advances, problems, and goals. *Science.* Jul 4;165, 25-35.
- Nass S and Nass MM. (1963) Intramitochondrial fibers with DNA characteristics. Ii. Enzymatic and other hydrolytic treatments. *J Cell Biol.* 19, 613-629.
- Noer AS, Sudoyo H, Lertrit P, Thyagarajan D, Utthanaphol P, Kapsa R, Byrne E, and Marzuki S. (1991) A tRNA(Lys) mutation in the mtDNA is the causal genetic lesion underlying myoclonic epilepsy and ragged-red fiber (MERRF) syndrome. *Am J Hum Genet.* 49, 715-22.
- Norgren N, Rosengren L, and Stigbrand T. (2003) Elevated neurofilament levels in neurological diseases. *Brain Res.* 987, 25-31.
- Orrenius S, Zhivotovsky B and Nicotera P. (2003) Regulation of cell death: the calcium-apoptosis link. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 4, 552-565.
- Ozawa M, Nishino I, Horai S, Nonaka I, and Goto YI. (1997) Myoclonus epilepsy associated with ragged-red fibers: a G-to-A mutation at nucleotide pair 8363 in mitochondrial tRNA(Lys) in two families. *Muscle Nerve.* 20, 271-8.
- Paliga AJ, Natale DR, and Watson AJ. (2005) p38 mitogen-activated protein kinase (MAPK) first regulates filamentous actin at the 8-16-cell stage during preimplantation development. *Biol Cell.* 97, 629-40.
- Pandey P, Farber R, Nakazawa A, Kumar S, Bharti A, Nalin C, Weichselbaum R, Kufe D, and Kharbanda S. (2000). Hsp27

- functions as a negative regulator of cytochrome c-dependent activation of procaspase-3. *Oncogene* 19, 1975–1981.
- Pandey P, Nakazawa A, Ito Y, Datta R, Kharbanda S, and Kufe D. (2000) Requirement for caspase activation in monocytic differentiation of myeloid leukemia cells. *Oncogene*. 19, 3941-3947.
- Pandey UB, Nie Z, McCray BA, Ritson GP, Nedelsky NB, Schwartz SL, DiProspero NA, Knight MA, Schuldiner O, Padmanabhan R, Hild M, Berry DL, Garza D, Hubbert CC, Yao T, Baehrecke EH and Taylor JP. (2007) HDAC6 rescues neurodegeneration and provides an essential link between autophagy and the UPS. *Nature* 447, 860-864.
- Pankiv S, Clausen TH, Lamark T, Brech A, Bruun JA, Outzen H, Øvervatn A, Peart JN, Gross ER, Headrick JP and Gross GJ. (2007) Impaired p38 MAPK/HSP27 signaling underlies aging-related failure in opioid-mediated cardioprotection. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 42, 972-980.
- Pankiv S, Clausen TH, Lamark T, Brech A, Bruun JA, Outzen H, Øvervatn A, Bjørkøy G, and Johansen T. (2007) p62/SQSTM1 binds directly to Atg8/LC3 to facilitate degradation of ubiquitinated protein aggregates by autophagy. *J Biol Chem*. 282, 24131-24145.
- Parcellier A, Brunet M, Schmitt E, Col E, Didelot C, Hammann A, Nakayama K, Nakayama KI, Khochbin S, Solary E and Garrido C. (2006) HSP27 favors ubiquitination and proteasomal degradation of p27<sup>Kip1</sup> and helps S-phase re-entry in stressed cells. *The FASEB Journal*. 20, 1179-1181.
- Parcellier A, Schmitt E, Gurbuxani S, Seigneurin-Berny D, Pance A, Chantôme A, Plenchette S, Khochbin S, Solary E, Garrido C. (2003) HSP27 is a ubiquitin-binding protein involved in I-kappaBalpha proteasomal degradation. *Mol Cell Biol*. 23, 5790-802.
- Parcellier A, Schmitt E, Gurbuxani S, Seigneurin-Berny D, Pance A,

- Chantôme A, Plenchette S, Khochbin S, Solary E and Garrido C. (2003) HSP27 is a ubiquitin-binding protein involved in I-kappaB $\alpha$  proteasomal degradation. *Molecular and Cellular Biology* 23, 5790-5802.
- Paul C, Manero F, Gonin S, Kretz-Remy C, Viot S, and Arrigo AP. (2002) Hsp27 as a negative regulator of cytochrome c release. *Mol Cell Biol.* 22, 816-834.
- Pavlakakis SG, Phillips PC, DiMauro S, De Vivo DC, and Rowland LP. (1984) Mitochondrial myopathy, encephalopathy, lactic acidosis, and strokelike episodes: a distinctive clinical syndrome. *Ann Neurol.* 16, 481-488.
- Pearl JN, Gross ER, Headrick JP and Gross GJ. (2007) Impaired p38 MAPK/HSP27 signaling underlies aging-related failure in opioid-mediated cardioprotection. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 42, 972-980.
- Petit PX, Zamzami N, Vayssière JL, Mignotte B, Kroemer G, and Castedo M. (1997) Implication of mitochondria in apoptosis. *Mol Cell Biochem.* 174, 185-188.
- Piotrowicz RS, and Levin EG. (1997) Basolateral membrane-associated 27-kDa heat shock protein and microfilament polymerization. *J Biol Chem.* 272, 25920-25927.
- Pirkkala L, Nykänen P, and Sistonen L. (2001) Roles of the heat shock transcription factors in regulation of the heat shock response and beyond. *FASEB J.* 15, 1118-1131.
- Pitkänen S and Robinson BH. (1996) Mitochondrial Complex I Deficiency Leads to Increased Production of Superoxide Radicals and Induction of Superoxide Dismutase. *J. Clin. Invest.* 98, 345-351.
- Pivovarova AV, Chebotareva NA, Chernik IS, Gusev NB and Levitsky DI. (2007) Small heat shock protein Hsp27 prevents heat-induced

- aggregation of F-actin by forming soluble complexes with denatured actin. *FEBS J.* 274,
- Préville X, Gaestel M, and Arrigo AP. (1998) Phosphorylation is not essential for protection of L929 cells by Hsp25 against H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-mediated disruption actin cytoskeleton, a protection which appears related to the redox change mediated by Hsp25. *Cell Stress Chaperones.* 3, 177-187.
- Préville X, Schultz H, Knauf U, Gaestel M, and Arrigo AP. (1998) Analysis of the role of Hsp25 phosphorylation reveals the importance of the oligomerization state of this small heat shock protein in its protective function against TNF $\alpha$ - and hydrogen peroxide-induced cell death. *J Cell Biochem.* 69, 436-452.
- Proud CG. (2007) mTOR, unleashed. *Science* 318, 926-927.
- Qin ZH, Wang Y, Kegel KB, Kazantsev A, Apostol BL, Thompson LM, Yoder J, Aronin N and DiFiglia M. (2003) Autophagy regulates the processing of amino terminal huntingtin fragments. *Human Molecular Genetics* 12, 3231-3244.
- Ravikumar B and Rubinsztein DC. (2006) Role of autophagy in the clearance of mutant huntingtin: A step towards therapy? *Mol Aspects Med* 27, 520-527.
- Reggiori F, and Klionsky DJ. (2002) Autophagy in the eukaryotic cell. *Eukaryot Cell.* 1, 11-21.
- Ritossa P. (1962) Problems of prophylactic vaccinations of infants. *Riv Ist Sieroter Ital.* 37, 79-108.
- Ritossa, F. (1962) A new puffing pattern induced by temperature shock and DNP in *Drosophila*. *Experientia* 18,571-573
- Rogalla T, Ehrnsperger M, Preville X, Kotlyarov A, Lutsch G, Ducasse C, Paul C, Wieske M, Arrigo AP and Buchner J.(1999) Regulation of Hsp27 Oligomerization, Chaperone Function, and Protective



- Activity against Oxidative Stress/Tumor Necrosis Factor alpha Phosphorylation. *J. Biol. Chem.* 274, 18947-18956.
- Rolf Luft. (1994) The development of mitochondrial medicine. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 91, 8731–8738.
- Rossi JM, and Lindquist S. (1989) The intracellular location of yeast heat-shock protein 26 varies with metabolism. *J Cell Biol.* 108, 425-39.
- Rubinsztein DC. (2006) The roles of intracellular protein-degradation pathways in neurodegeneration. *Nature* 443, 780-786.
- Samali A, Robertson JD, Peterson E, Manero F, van Zeijl L, Paul C, Cotgreave IA, Arrigo AP, and Orrenius S. (2001) Hsp27 protects mitochondria of thermotolerant cells against apoptotic stimuli. *Cell Stress Chaperones.* 6, 49-58.
- Sartorius U, Schmitz I, and Krammer PH. (2001) Molecular mechanisms of death-receptor-mediated apoptosis. *Chembiochem.* 2, 20-29.
- Scalaisa E, Nuttina C, Senecab S, Smetc J, Paepec BD, Martind JJ, Stevense R, Pierarte F, Battistie O, Lissensb W, Meirleirb LD and Costerc RV. (2007) Infantile presentation of the mitochondrial A8344G mutation. *Eur. J. Neurol.* 14, 1468-1331.
- Scharf KD, Heider H, Hohfeld I, Lyck R, Schmidt E, and Nover L. (1998). The tomato Hsf system: HsfA2 needs interaction with HsfA1 for efficient nuclear import and may be localized in cytoplasmic heat stress granules. *Mol Cell Biol* 18, 2240-2251.
- Scherz-Shouval R and Elazar Z. (2007) ROS, mitochondria and the regulation of autophagy. *TRENDS in Cell Biology* 17, 422-427.
- Schlesinger MJ. (1989) The cellular response to stress. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 1,87-88.
- Schlesinger MJ. (1994) How the cell copes with stress and the function of heat shock proteins. *Pediatr Res.* 36, 1-6.

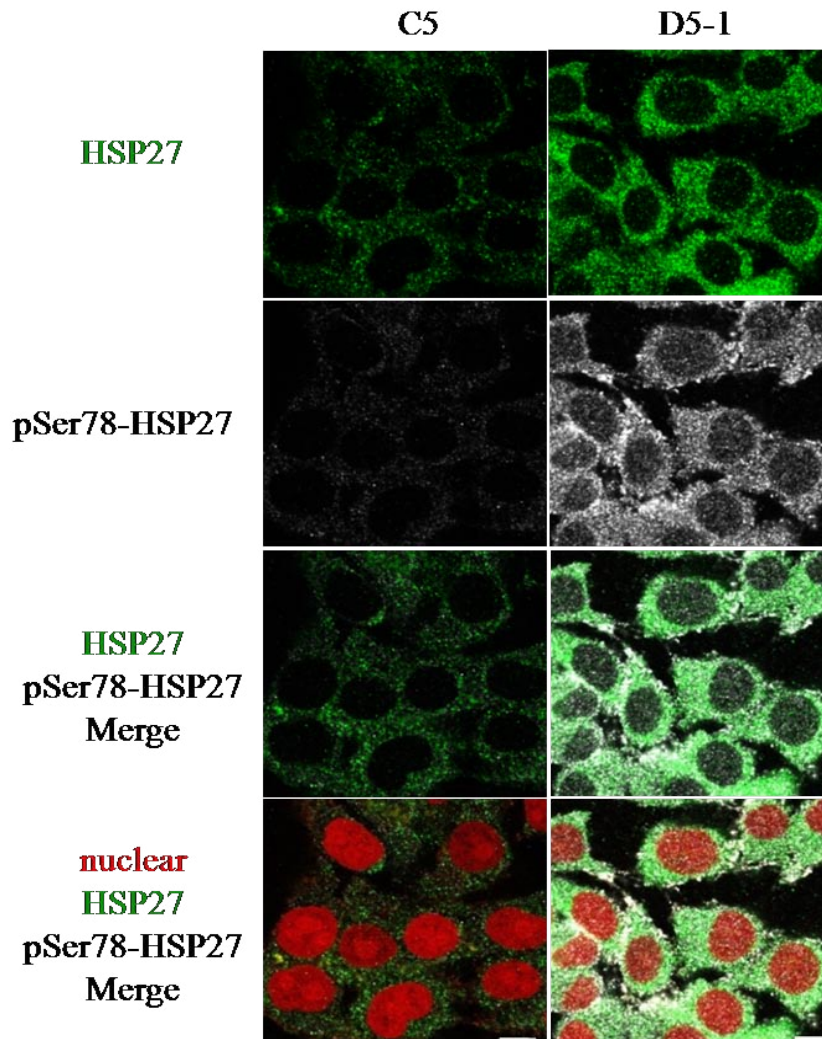
- Schlesinger, MJ (1990-07-25). "Heat shock proteins". *The Journal of Biological Chemistry* 265 (21): 12111–12114. PMID 2197269
- Schoeler S, Szibor R, Gellerich FN, Wartmann T, Mawrin C, Dietzmann K and Kirches E. (2005) Mitochondrial DNA deletions sensitize cells to apoptosis at low heteroplasmy levels. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 24, 43-49.
- Schon EA, Bonilla E, and DiMauro S. (1997) Mitochondrial DNA mutations and pathogenesis. *J Bioenerg Biomembr.* 29, 131-149.
- Sharp PS, Akbar MT, Bouri S, Senda A, Joshi K, Chen H, Latchman DS, Wells DJ and Bellerochea JD. (2008) Protective effects of heat shock protein 27 in a model of ALS occur in the early stages of disease progression. *Neurobiol. Dis.*30, 42-55.
- Shmookler Reis RJ and S Goldstein. (1983) Mitochondrial DNA in mortal and immortal human cells. Genome number, integrity, and methylation. *J. Biol. Chem.*, 15, 9078-9085.
- Shoffner JM, Lott MT, Lezza AM, Seibel P, Ballinger SW, and Wallace DC. (1990) Myoclonic epilepsy and ragged-red fiber disease (MERRF) is associated with a mitochondrial DNA tRNA(Lys) mutation. *Cell.* 61, 931-937.
- Silvestri G, Moraes CT, Shanske S, Oh SJ, and DiMauro S. (1992) A new mtDNA mutation in the tRNA(Lys) gene associated with myoclonic epilepsy and ragged-red fibers (MERRF). *Am J Hum Genet.* 51, 1213-1217.
- Simon DK, and Johns DR. (1999) Mitochondrial disorders: clinical and genetic features. *Annu Rev Med.*50, 111-127.
- Slee EA, Adrain C, and Martin SJ. (1999) Serial killers: ordering caspase activation events in apoptosis. *Cell Death Differ.* 6, 1067-1074.
- Slee EA, Harte MT, Kluck RM, Wolf BB, Casiano CA, Newmeyer DD, Wang HG, Reed JC, Nicholson DW, Alnemri ES, Green DR, and

- Martin SJ. (1999) Ordering the cytochrome c-initiated caspase cascade: hierarchical activation of caspases-2, -3, -6, -7, -8, and -10 in a caspase-9-dependent manner. *J Cell Biol.*, 144, 281-292.
- Stokoe D, Engel K, Campbell DG, Cohen P, and Gaestel M. (1992) *FEBS Lett* 313, 307-313
- Taylor DM, Kabashi E, Agar JN, Minotti S and Durham HD. (2005) Proteasome activity or expression is not altered by activation of the heat shock transcription factor Hsf1 in cultured fibroblasts or myoblasts. *Cell Stress Chaperones* 10, 230-241.
- Thériault JR, Lambert H, Chávez-Zobel AT, Charest G, Lavigne P and Landry J. (2004) Essential Role of the NH<sub>2</sub>-terminal WD/EPF Motif in the Phosphorylation-activated Protective Function of Mammalian Hsp27. *J. Biol. Chem.* 279, 23463-23471.
- Tsukada M, and Ohsumi Y. (1993) Isolation and characterization of autophagy-defective mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett.* 333, 169-174.
- Ueki I, Koga Y, Povalko N, Akita Y, Nishioka J, Yatsuga S, Fukiyama R and Matsuishi T. (2006) Mitochondrial tRNA gene mutations in patients having mitochondrial disease with lactic acidosis. *Mitochondrion* 6, 29-36.
- Vellai T, Takacs-Vellai K, Zhang Y, Kovacs AL, Orosz L, and Müller F. (2003) Genetics: influence of TOR kinase on lifespan in *C. elegans*. *Nature.* 426, 620.
- Voegeli TS, Wintink AJ, Chen Y, and Currie RW. (2008) Heat shock proteins 27 and 70 regulating angiotensin II-induced NF- $\kappa$ B: a possible connection to blood pressure control? *Appl Physiol Nutr Metab.* 33, 1042-1049.
- Wada T and Penninger JM. (2004) Mitogen-activated protein kinases in apoptosis regulation. *Oncogene* 23, 2838-2849.

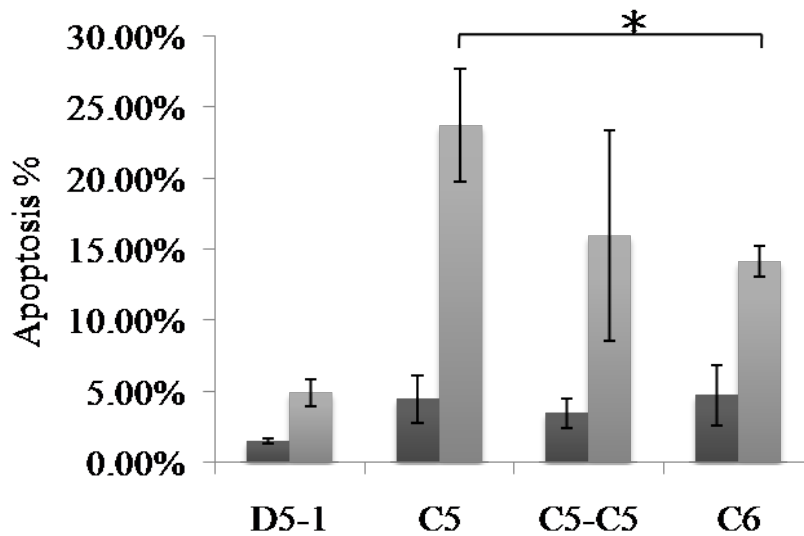
- Wagstaff MJ, Collaço-Moraes Y, Smith J, de Belleruche JS, Coffin RS, and Latchman DS. (1999) Protection of neuronal cells from apoptosis by Hsp27 delivered with a herpes simplex virus-based vector. *J Biol Chem.* 274, 5061-5069.
- Wallace DC, G Singh, MT Lott, JA Hodge, TG Schurr, AM Lezza, LJ Elsas 2nd, and EK Nikoskelainen. (1988) Mitochondrial DNA mutation associated with Leber's hereditary optic neuropathy. *Science*, 4884, 1427-1430
- Wallace DC. (1992) Mitochondrial genetics: a paradigm for aging and degenerative diseases? *Science.* 256, 628-632.
- Wei YH, Kao SH, and Lee HC. (1996) Simultaneous increase of mitochondrial DNA deletions and lipid peroxidation in human aging. *Ann N Y Acad Sci.* 786, 24-43.
- Welch WJ. (1993) Heat shock proteins functioning as molecular chaperones: their roles in normal and stressed cells. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 339, 327-333.
- Westerheide SD, and Morimoto RI. (2005) *J. Biol. Chem.* 280, 33097–33100
- Wong ESP, Tan JMM, Soong WE, Hussein K, Nukina N, Dawson VL, Dawson TM, Cuervo AM and Lim KL. (2008) Autophagy-mediated clearance of aggresomes is not a universal phenomenon. *Hum. Mol. Genet.* 17, 2570-2582.
- Wullschleger S, Loewith R, and Hall MN. (2006) TOR signaling in growth and metabolism. *Cell.* 124, 471-484.
- Wytenbach A, Sauvageot O, Carmichael J, Diaz-Latoud C, Arrigo AP, and Rubinsztein DC. (2002) Heat shock protein 27 prevents cellular polyglutamine toxicity and suppresses the increase of reactive oxygen species caused by huntingtin. *Hum Mol Genet.* 11, 1137-1151.

- Yoneda M, Miyatake T, and Attardi G. (1994) Complementation of mutant and wild-type human mitochondrial DNAs coexisting since the mutation event and lack of complementation of DNAs introduced separately into a cell within distinct organelles. *Mol Cell Biol.* 14, 2699-2712.
- Zeviani M, Moraes CT, DiMauro S, Nakase H, Bonilla E, Schon EA, and Rowland LP. (1988) Deletions of mitochondrial DNA in Kearns-Sayre syndrome. *Neurology.* 38, 1339-1346.
- Zeviani M, Muntoni F, Savarese N, Serra G, Tiranti V, Carrara F, Mariotti C, and DiDonato S. (1993) A MERRF/MELAS overlap syndrome associated with a new point mutation in the mitochondrial DNA tRNA(Lys) gene. *Eur J Hum Genet.* 1, 80-87.
- Zeviani M, Tiranti V, and Piantadosi C. (1998) Mitochondrial disorders. *Medicine (Baltimore).* 77, 59-72.
- Zheng C, Lin Z, Zhao ZJ, Yang Y, Niu H, and Shen X. (2006) MAPK-activated protein kinase-2 (MK2)-mediated formation and phosphorylation-regulated dissociation of the signal complex consisting of p38, MK2, Akt, and Hsp27. *J Biol Chem.* 281, 37215-37226.

## 圖目

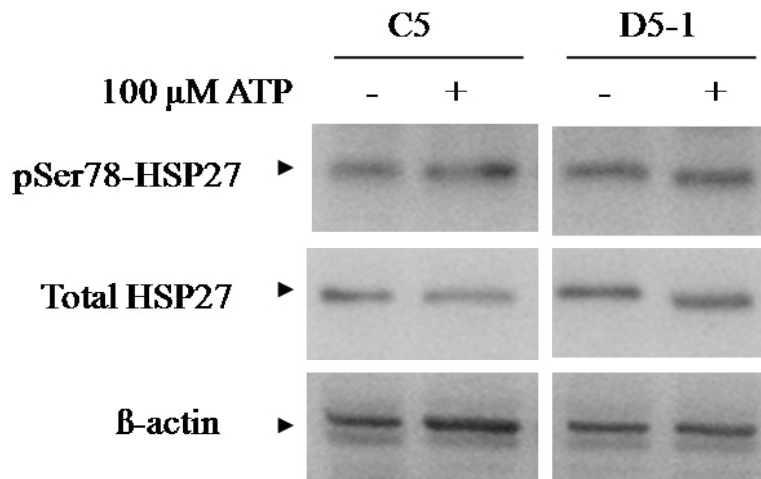


圖一、HSP27 及 phospho-HSP27 在正常及 MERRF cybrid cells 中不影響其分布位置。MERRF cybrid cells(C5)與正常 cybrid cells(D5-1)在 PU<sup>-</sup> DMEM 培養 48 小時後，固定細胞進行螢光免疫染色，以共軛焦螢光顯微鏡掃描影像。利用 PI (propidium iodide) 標定細胞核 (紅色)，一級抗體使用 anti-HSP27 (綠色) 偵測 HSP27；phospho-HSP27 以 anti-pSer78-HSP27 偵測 (以白色顯示)。比例尺=10  $\mu\text{m}$ 。



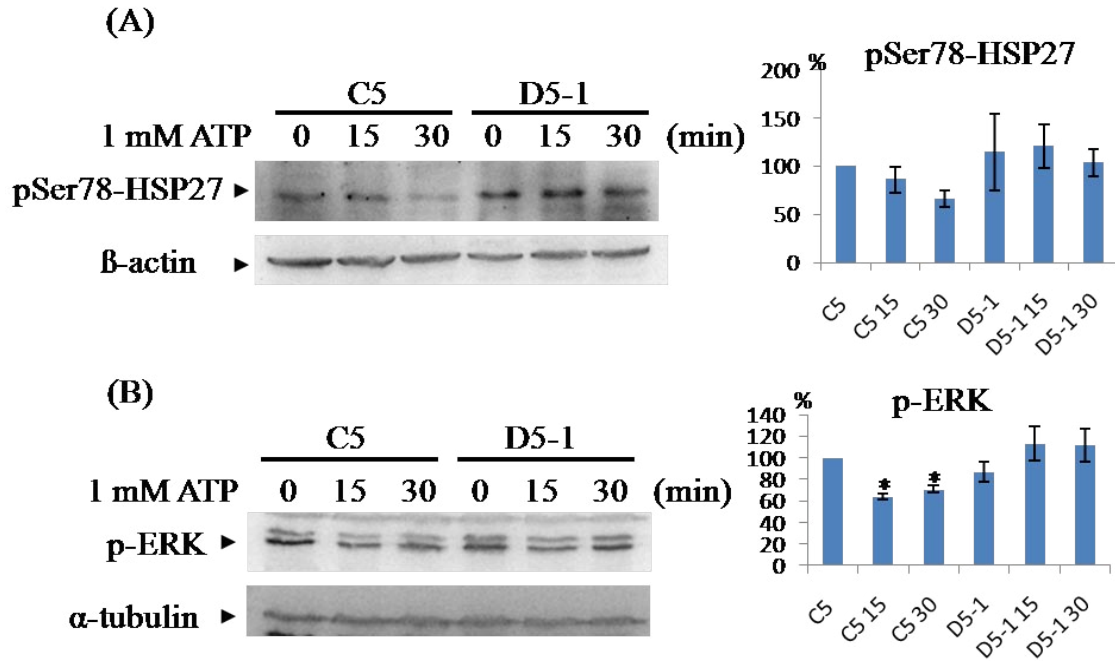
**圖二、穩定表現外送 HSP27 於 MERRF cybrid cells 可降低細胞凋亡。**

MERRF cybrid cells (C5)、正常 cybrid cells (D5-1) 與 MERRF cybrid cells (C5) 穩定表現 HSP27 後的兩個獨立細胞株 (C5-C5 及 C6) 在 PU DMEM 中培養 48 小時，接著以含 300 nM STS (staurosporine) 的 PU DMEM 培養 0 (■) 或 3 小時 (▨) 後固定細胞染色。以 PI (propidium iodide) 標定細胞核，利用共軛焦螢光顯微鏡掃描影像計算細胞死亡數；獨立實驗中每個細胞株計量大於六百顆細胞。統計圖為三次獨立實驗的 means±SEM，\*代表達到顯著差異 ( $P < 0.05$ )。

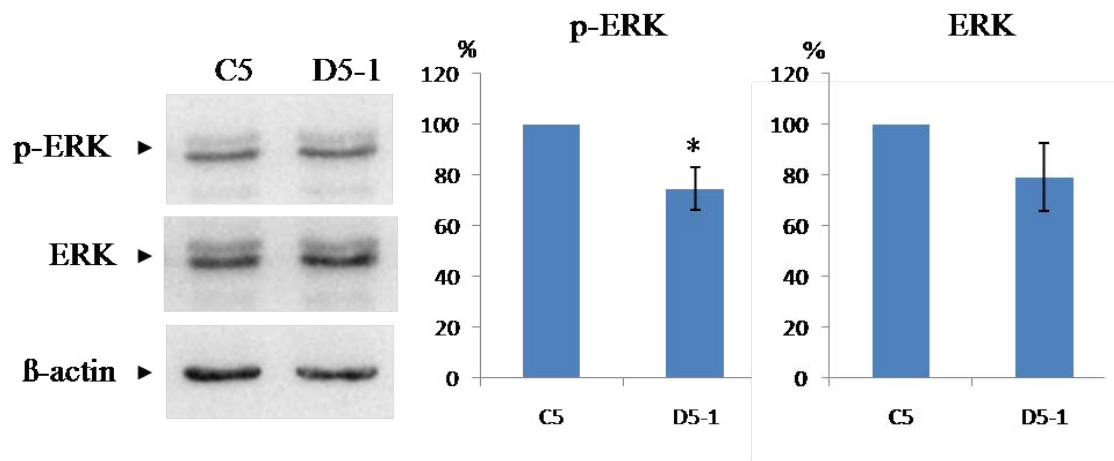


圖三、MERRF 及正常 cybrid cells 中 phospho-HSP27 皆對外加 ATP 沒有反應。MERRF cybrid cells (C5) 與正常 cybrid cells (D5-1) 在 PU DMEM 培養 48 小時後，將細胞處理 100  $\mu$ M ATP 培養 2 小時，收取細胞蛋白並利用西方點墨法分析。(+) 代表處理 100  $\mu$ M ATP 的實驗組。一級抗體使用 anti-pSer78-HSP27、anti-HSP27 偵測；及  $\beta$ -actin 作為內控制組。

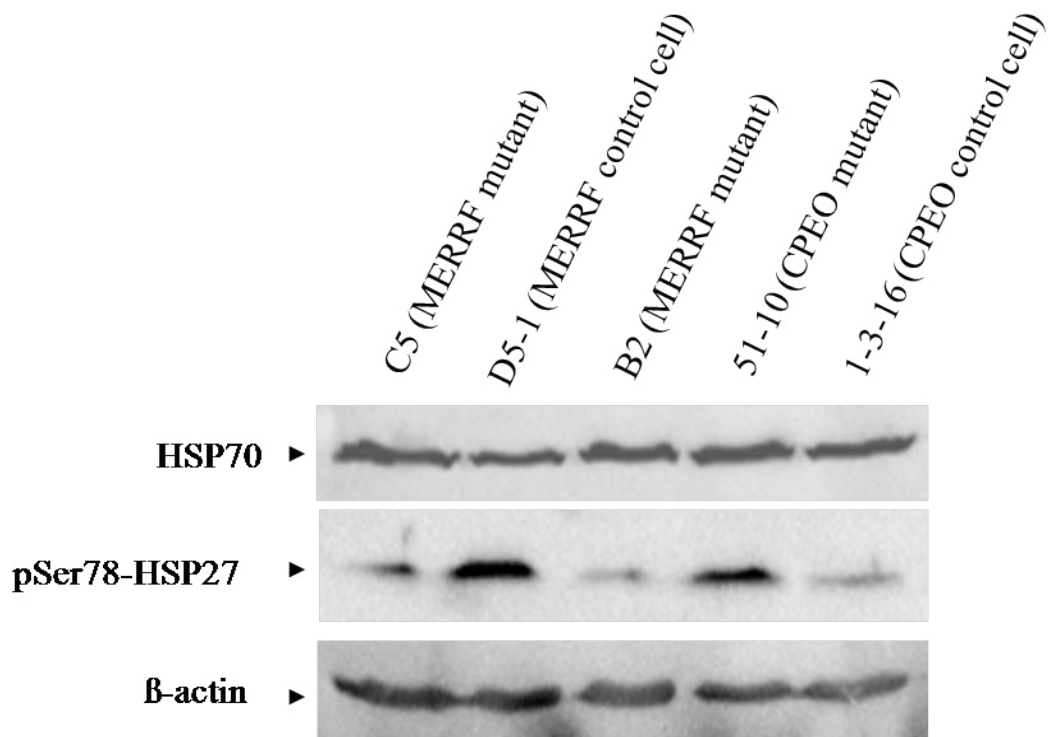




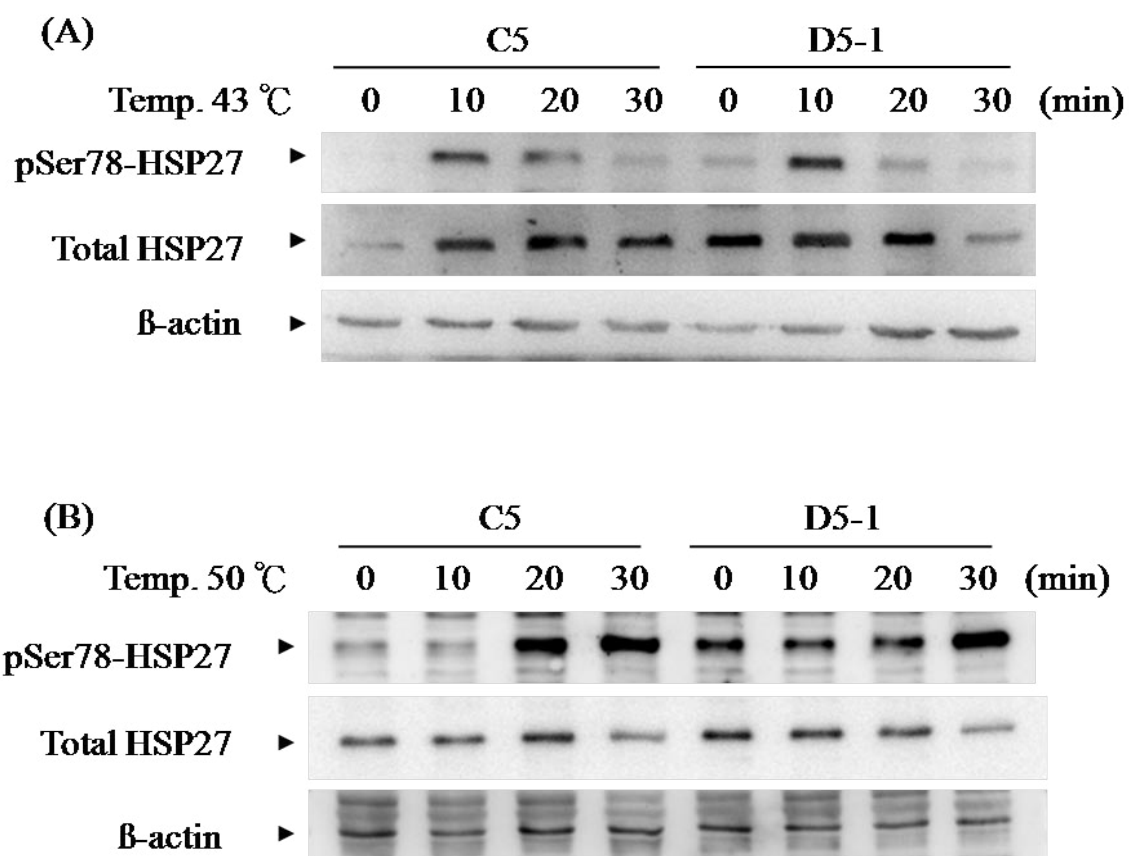
圖四、外加高濃度 ATP 無法增加 phospho-HSP27 及 phospho-ERK 在 MERRF 及正常 cybrid cells 中的表現量。MERRF cybrid cells (C5) 與正常 cybrid cells (D5-1) 在 PU DMEM 培養 48 小時後，將細胞處理 1 mM ATP 各培養 0、15 及 30 分鐘，收取細胞蛋白並利用西方點墨法分析。一級抗體使用 anti-pSer78-HSP27 (A) 以及 anti-phospho-ERK (B)； $\alpha$ -tubulin 及  $\beta$ -actin 作為內控制組。以未經處理的 C5 當作百分之百統計。統計圖為四次獨立實驗的 means $\pm$ SEM，\*代表與未處理的相同細胞比較後達到顯著差異 ( $P < 0.05$ )。



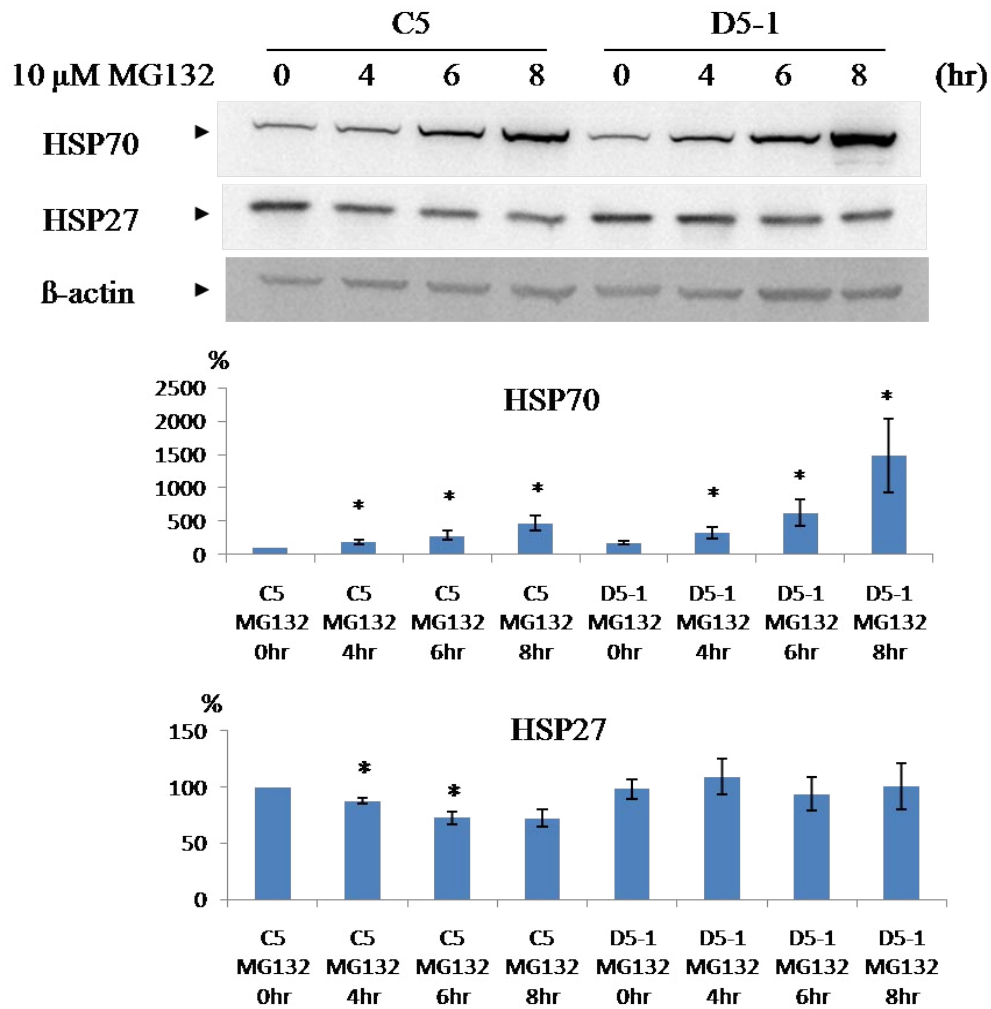
**圖五、在 MERRF 及正常 cybrid cells 之間 ERK 沒有表現量差異；**  
**而 MERRF cybrid cells 中 p-ERK 顯著增加。**MERRF cybrid cells(C5) 與正常 cybrid cells (D5-1) 在含 PU DMEM 培養 48 小時後，收取細胞蛋白並利用西方點墨法分析。一級抗體使用 anti-phospho-ERK、anti-ERK (A)；β-actin 作為內控制組。以未經處理的 C5 當作百分之百統計，統計圖為三次獨立實驗的 means±SEM，\*代表達到顯著差異 ( $P<0.05$ )。



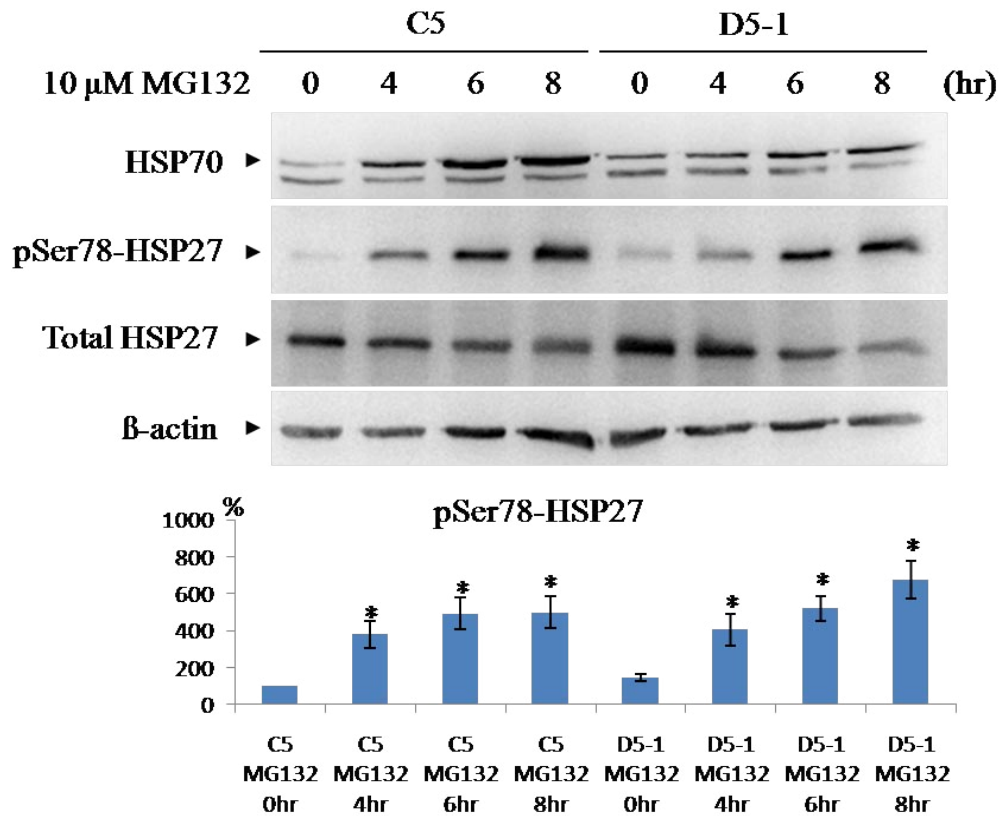
**圖六、CPEO cybrid cells 中 phospho-HSP27 表現量顯著高於正常 cybrid cells。** MERRF 突變細胞 (C5 及 B2)、MERRF 控制組正常細胞 (D5-1)、CPEO 細胞 (51-10) 與 CPEO 控制組正常細胞 (1-3-16) 在 PU DMEM 培養 48 小時後，收取細胞蛋白並利用西方點墨法分析。一級抗體使用 anti-pSer78-HSP27；及 β-actin 作為內控制組。



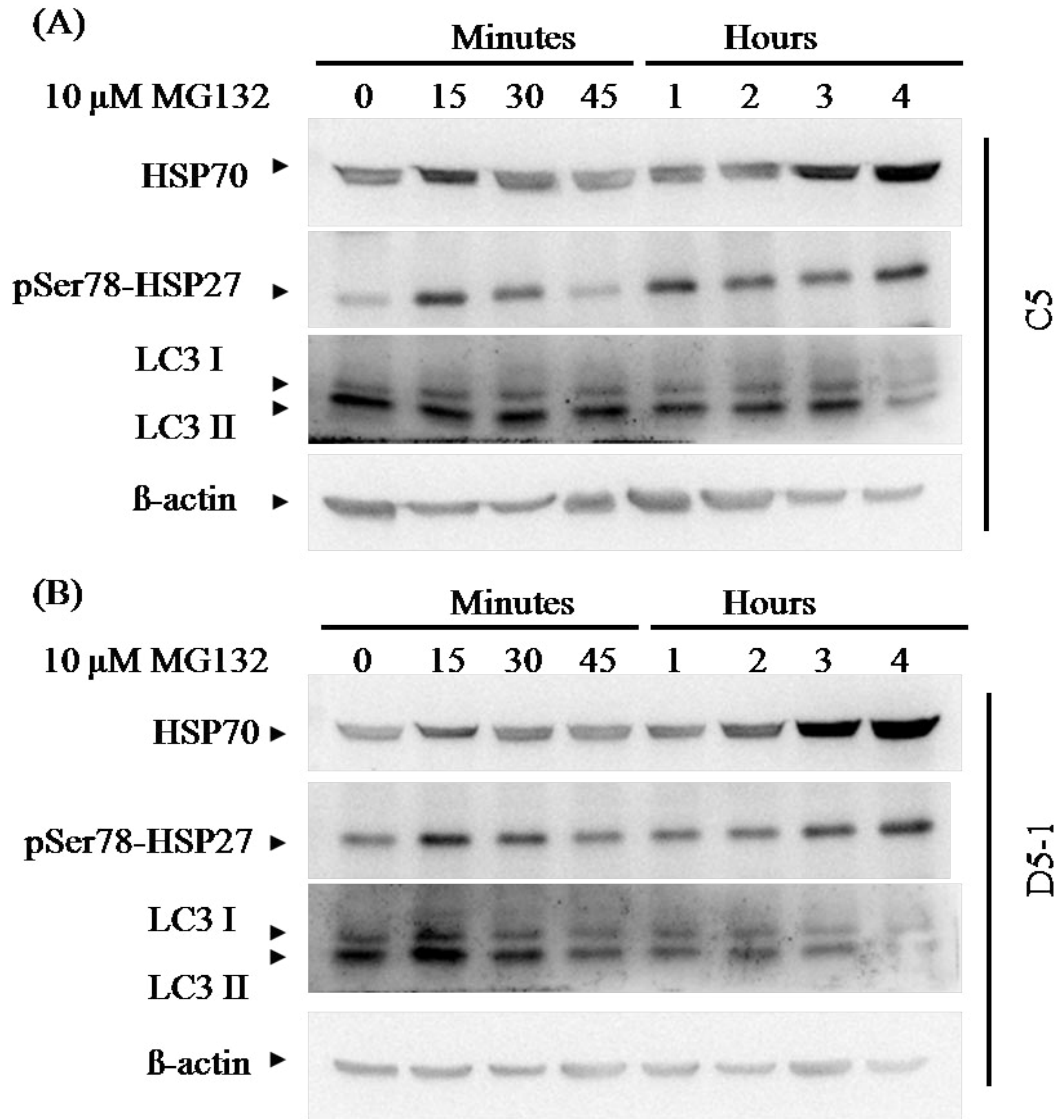
圖七、MERRF cybrid cells 及正常 cybrid cells 在 43°C 及 50°C 短時間刺激皆可使 HSP27 磷酸化程度增加。MERRF cybrid cells (C5) 與正常 cybrid cells (D5-1) 在含 P<sup>32</sup>U<sup>32</sup> DMEM 培養 48 小時後，於 43°C 或 50°C 中各別培養 0、10、20 及 30 分鐘後，收取細胞蛋白並利用西方點墨法分析。處理 43°C (A) 及 50°C (B) 短時間熱刺激後，使用一級抗體 anti-pSer78-HSP27 及 anti-HSP27；而 β-actin 作為內控制組。



圖八、MERRF cybrid cells 及正常 cybrid cells 處理泛素蛋白酶體抑制劑 (MG132) 導致 HSP27 下降。MERRF cybrid cells (C5) 與正常 cybrid cells (D5-1) 在含 P<sup>U</sup> DMEM 培養 48 小時後，處理 10 μM MG132 各 0、4、6 及 8 小時後收取細胞蛋白，並利用西方點墨法分析。一級抗體使用 anti-HSP27，正控制組為 anti-HSP70 以及作為內控制組的 anti-β-actin。以未經處理的 C5 當作百分之百統計。統計圖為十次 (HSP70) 或七次 (HSP27) 獨立實驗的 means±SEM，\*代表與未處理的相同細胞比較後達到顯著差異 ( $P<0.05$ )。

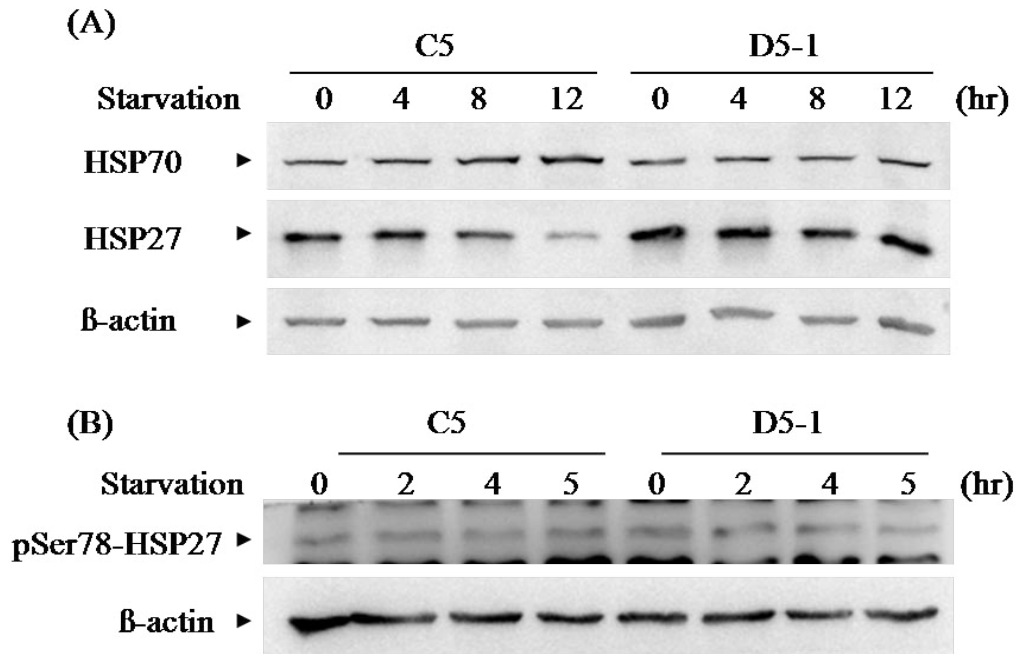


圖九、MERRF 及正常 cybrid cells 處理泛素蛋白酶體抑制劑(MG132)導致 phospho-HSP27 增加。MERRF cybrid cells (C5) 與正常 cybrid cells (D5-1) 在 P<sub>U</sub> DMEM 培養 48 小時後，處理含 10  $\mu$ M MG132 各 0、4、6 及 8 小時後收取細胞蛋白，並利用西方點墨法分析。一級抗體使用 anti-pSer78-HSP27、anti-HSP27，正控制組為 anti-HSP70 以及作為內控制組的 anti- $\beta$ -actin。以未經處理的 C5 當作百分之百統計。統計圖為八次獨立實驗的 means $\pm$ SEM，\*代表與未處理的相同細胞比較後達到顯著差異 ( $P < 0.05$ )。



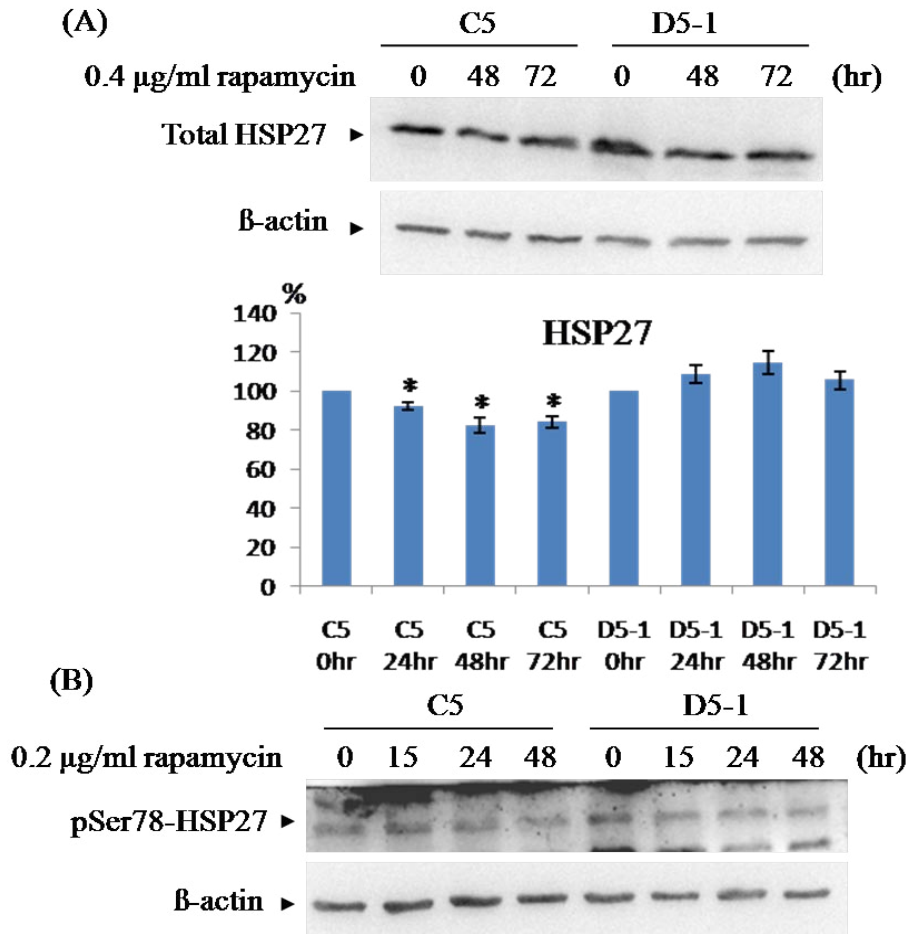
圖十、MERRF 及正常 cybrid cells 處理泛素蛋白酶體抑制劑導致

HSP27 磷酸化程度隨時間改變。MERRF cybrid cells (C5, 圖 A) 與正常 cybrid cells (D5-1, 圖 B) 在 P<sup>U</sup> DMEM 培養 48 小時後，處理含 10 μM MG132 各 0、15、30、45 分鐘、1、2、3 及 4 小時後收取細胞蛋白，並利用西方點墨法分析。一級抗體使用 anti-pSer78-HSP27、anti-LC3，正控制組為 anti-HSP70 以及作為內控制組的 anti-β-actin。

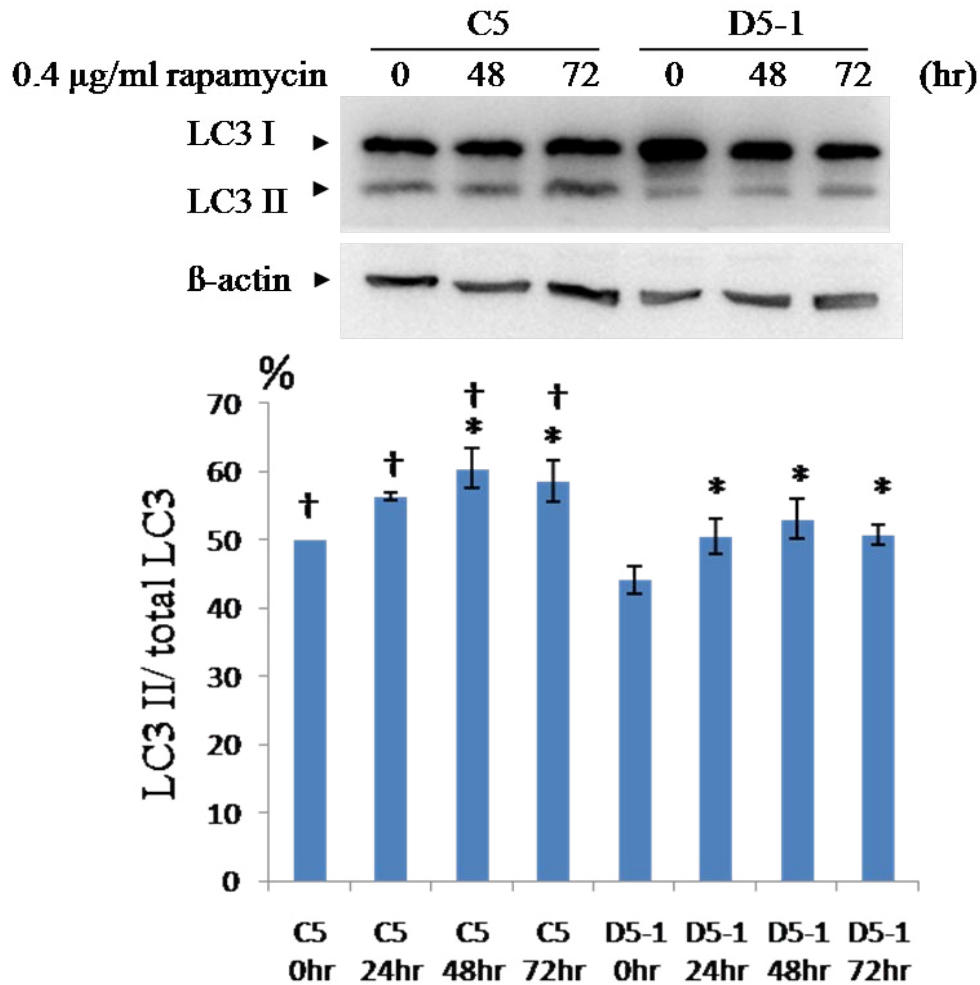


圖十一、MERRF cybrid cells 及正常 cybrid cells 處理 starvation 活化自噬作用，導致 HSP27 下降而 phospho-HSP27 沒有改變。MERRF cybrid cells (C5) 與正常 cybrid cells (D5-1) 在 P<sup>U</sup> DMEM 培養 48 小時後，將 P<sup>U</sup> DMEM 置換為 EBSS (starvation) 各培養 0、4、8 及 12 小時後 (A)，或各培養 0、2、4 及 5 小時後 (B) 收取細胞蛋白，並利用西方點墨法分析。一級抗體使用 anti-HSP27、anti-HSP70 以及內控制組 anti- $\beta$ -actin。

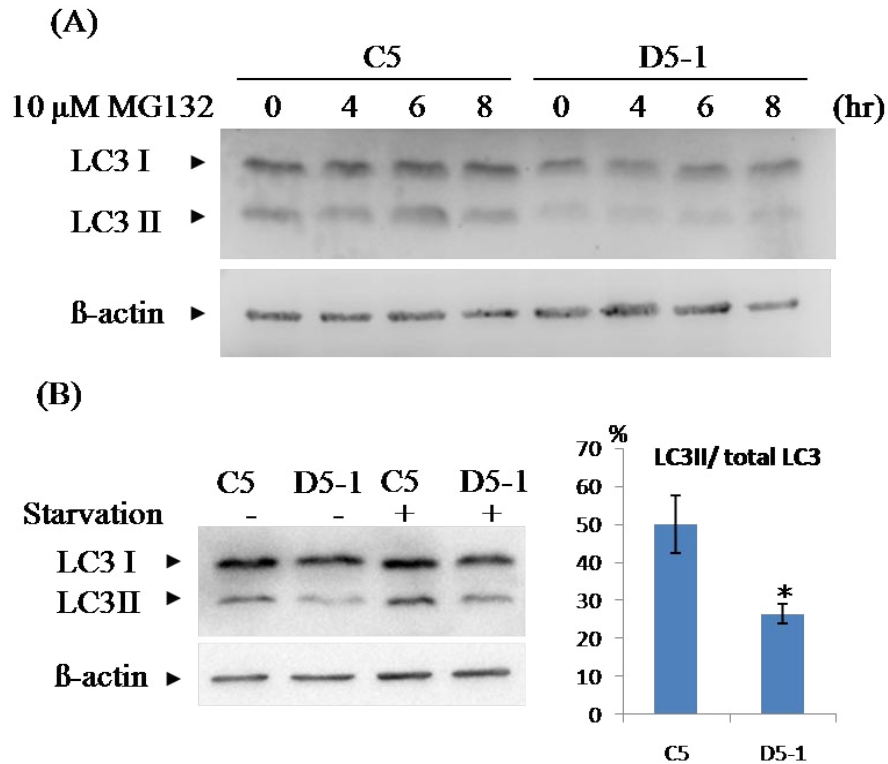




圖十二、MERRF 及正常 cybrid cells 處理 rapamycin 後，導致 HSP27 下降而 phospho-HSP27 沒有改變。MERRF cybrid cells (C5) 與正常 cybrid cells (D5-1) 在 PU DMEM 培養 48 小時後，處理含 0.4  $\mu\text{g/ml}$  rapamycin 的 PU DMEM 各 0、48 及 72 小時 (A)；或處理 0.2  $\mu\text{g/ml}$  rapamycin 的 PU DMEM 各 0、15、24 及 48 小時 (B)。一級抗體使用 anti-HSP27(A)、anti-pSer78-HSP27(B) 以及內控制組 anti- $\beta$ -actin。以未經處理的 C5 當作百分之百統計。統計圖為七次獨立實驗的 means $\pm$ SEM，\* 代表與未處理的相同細胞比較後達到顯著差異 ( $P < 0.05$ )。

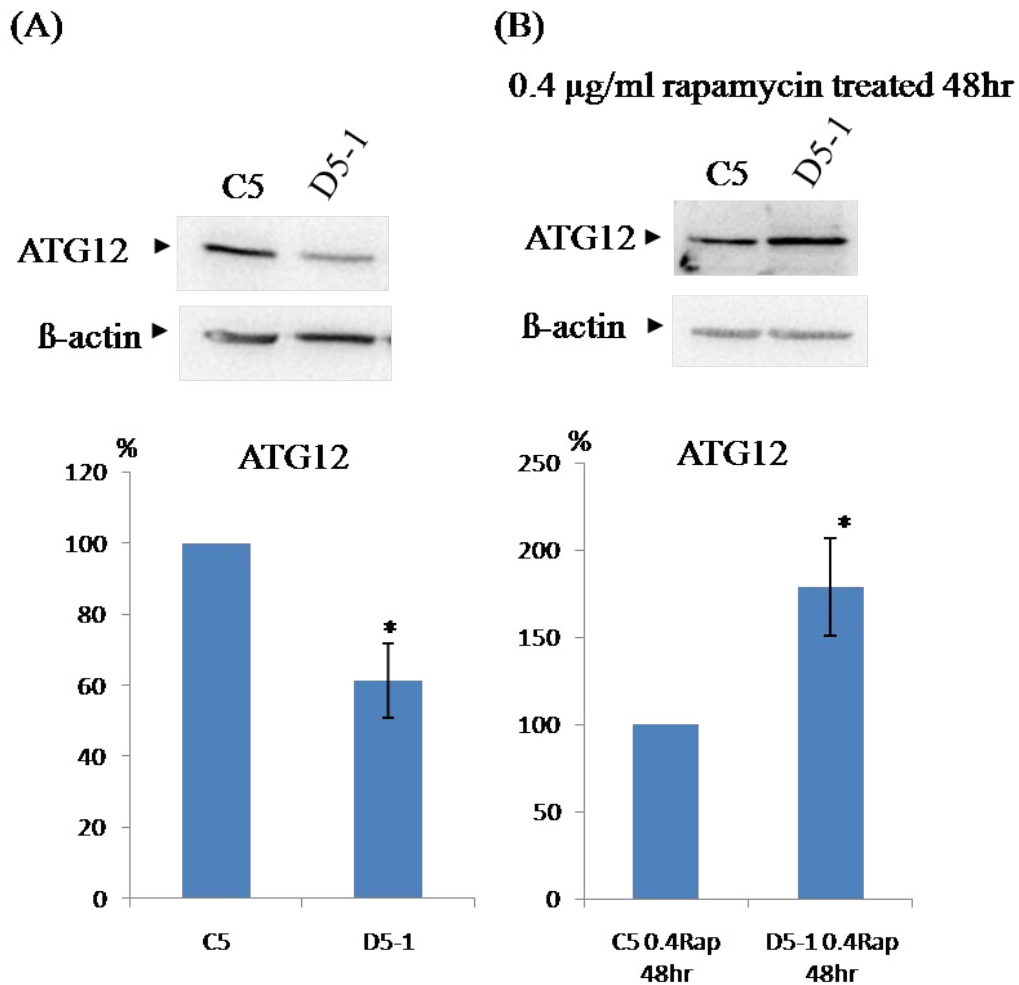


圖十三、MERRF 及正常 cybrid cells 處理 rapamycin 後，導致代表自噬作用活化的 LC3 II 增加。MERRF cybrid cells (C5) 與正常 cybrid cells (D5-1) 在 PU DMEM 培養 48 小時後，處理 0.4  $\mu$ g/ml rapamycin 的 PU DMEM 各 0、24、48 及 72 小時。利用西方點墨法分析，一級抗體使用 anti-LC3 以及內控制組 anti- $\beta$ -actin。將 LC3 II 相對於 LC3 I 加上 LC3 II 的總合比例為百分之五十。統計圖為十次獨立實驗的 means $\pm$ SEM，\*代表與未處理的相同細胞比較後達到顯著差異 ( $P<0.05$ )；†表示相同處理的不同細胞之間達顯著差異 ( $P<0.05$ )。

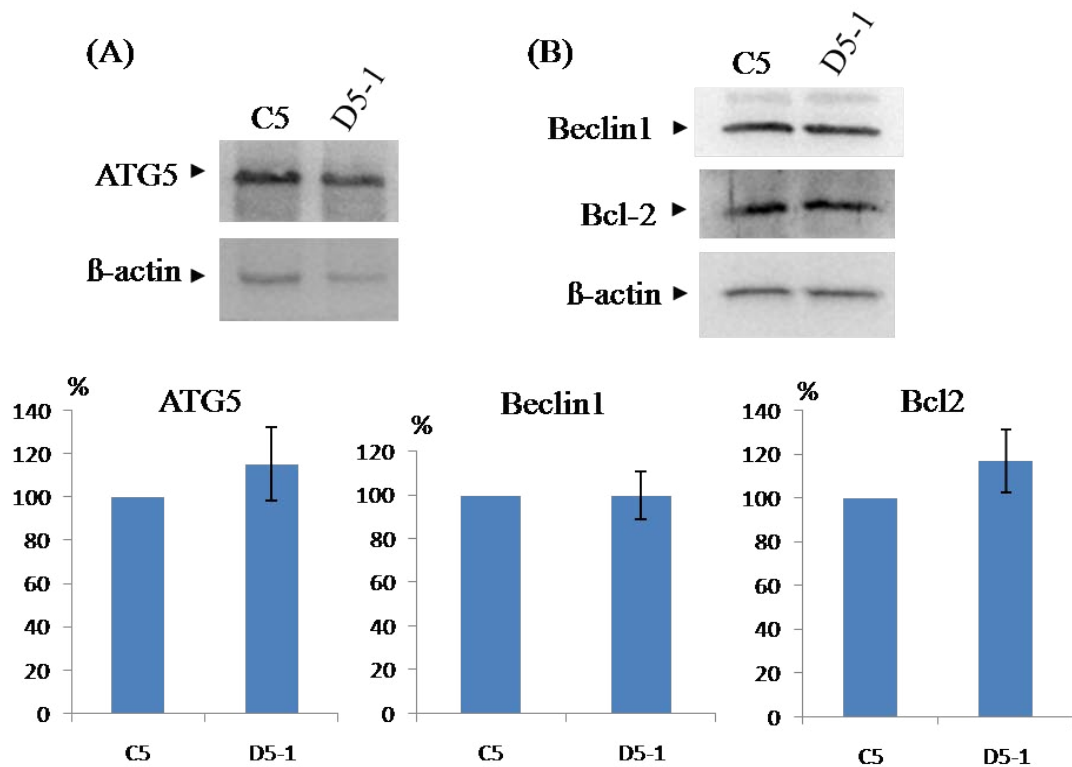


圖十四、MERRF cybrid cells 內生性 LC3 表現量高於正常 cybrid cells。

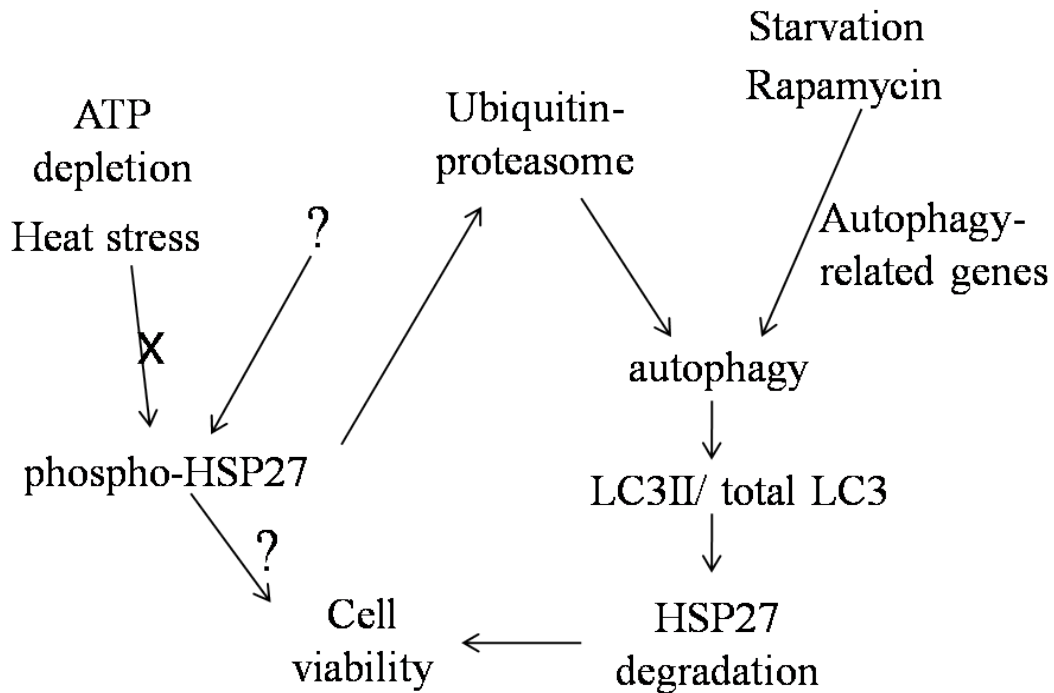
MERRF cybrid cells (C5) 與正常 cybrid cells (D5-1) 在 P<sup>-</sup>U<sup>-</sup> DMEM 培養 48 小時後，處理含 10  $\mu$ M MG132 各 0、4、6 及 8 小時後 (A)；或將 P<sup>-</sup>U<sup>-</sup> DMEM 置換為 EBSS 各培養 4 小時後 (B)，收取細胞蛋白後利用西方點墨法分析。一級抗體使用 anti-LC3 以及內控制組 anti- $\beta$ -actin。統計在 P<sup>-</sup>U<sup>-</sup> DMEM 培養 48 小時後，未經處理的內生性 LC3 表現量平均值。將尚未利用未經處理 C5 的 LC3 以  $\beta$ -actin 標準化後，統計圖中顯示 LC3 II 相對於 LC3 I 加上 LC3 II 的總合比例為百分之五十。統計圖為四次獨立實驗的 means $\pm$ SEM，\*代表與未處理的相同細胞比較後達到顯著差異 ( $P < 0.05$ )。



**圖十五、MERRF cybrid cells 內生性 ATG12 表現量高於正常 cybrid cells；處理 rapamycin 後正常 cybrid cells 的 ATG12 表現量高於 MERRF cybrid cells。** MERRF cybrid cells (C5) 與正常 cybrid cells (D5-1) 在 PU DMEM 培養 48 小時後 (A)，及處理 0.4 μg/ml rapamycin 達 48 小時後 (B)，收取細胞蛋白後利用西方點墨法分析。一級抗體使用 anti-ATG12 以及內控制組 anti-β-actin。以未經處理的 C5 當作百分之百統計。統計圖為四次獨立實驗的 means±SEM，\*代表與未處理的相同細胞比較後達到顯著差異 ( $P < 0.05$ )。

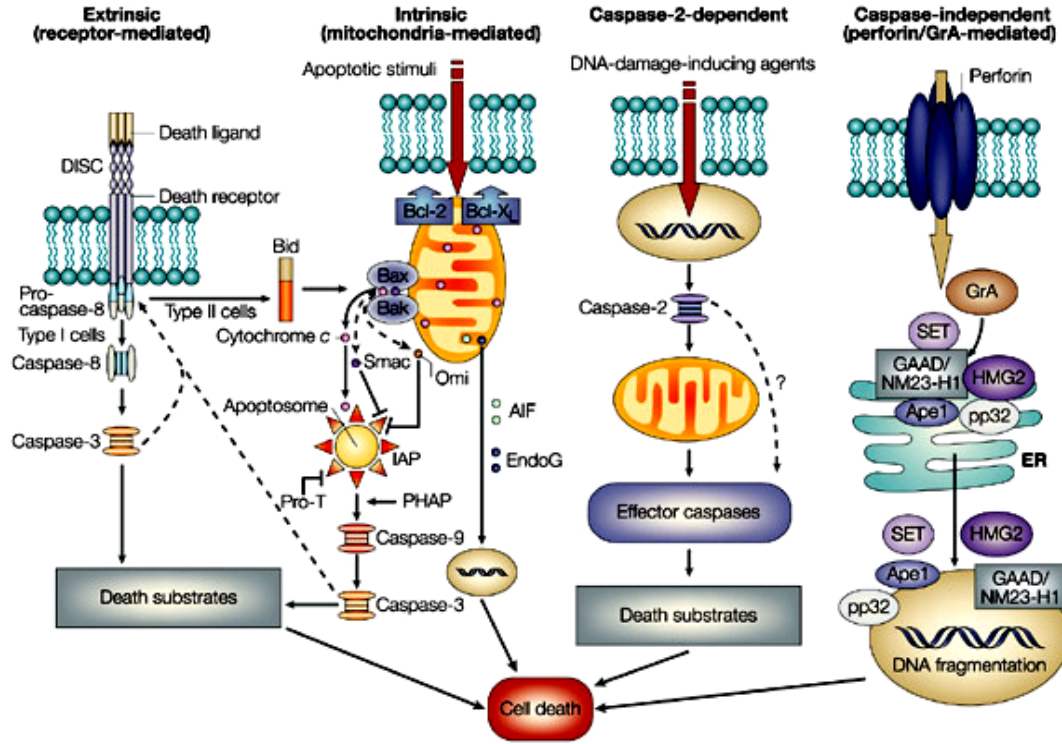


圖十六、MERRF 及正常 cybrid cells 之間內生性自噬作用分子 ATG5、Beclin1 及 Bcl-2 表現量相似。MERRF cybrid cells (C5) 與正常 cybrid cells (D5-1) 在 PU DMEM 培養 48 小時後，收取細胞蛋白後利用西方點墨法分析。一級抗體使用 anti-ATG5 (A)、anti-Beclin1 及 anti-Bcl-2 (B)；並以 anti- $\beta$ -actin 為內控制組。以未經處理的 C5 當作百分之百統計。統計八次 (ATG5)、七次 (Beclin1) 及九次 (Bcl-2) 獨立實驗的 means $\pm$ SEM，與未處理的相同細胞比較後皆未達到顯著差異 ( $P>0.05$ )。



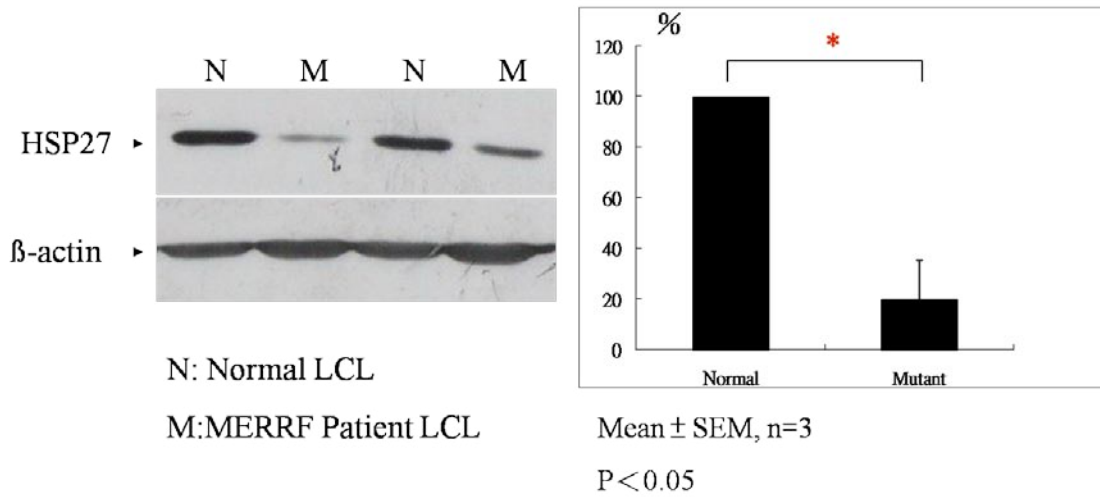
圖十七、本論文的研究總結示意圖。HSP27 對 MERRF cybrid cells 具有保護性作用。phospho-HSP27 在 MERRF cybrid cells 中減少的原因並非因缺乏 ATP 所造成；並且當 MERRF cybrid cells 處在壓力之下依然能夠正常調控 phospho-HSP27 的表現量。在 MERRF cybrid cells 中仍有未知的機制調控 phospho-HSP27 的降低。另外，我們推測 phospho-HSP27 的蛋白降解途徑可能藉由泛素蛋白酶體途徑；相反的 HSP27 的蛋白降解途徑可能是藉由自噬作用的活化。因此 MERRF 疾病中 HSP27 的減少，可能是在 MERRF cybrid cells 的自噬作用活化程度較高所致。

## 附錄



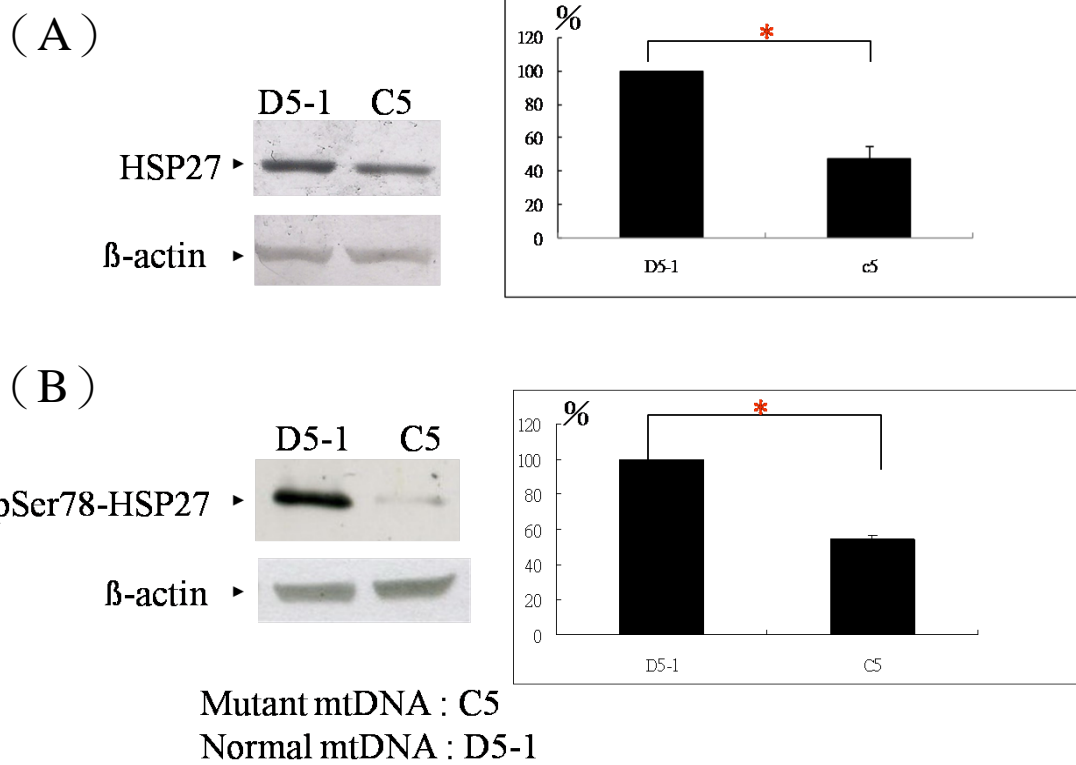
Nature Reviews | Molecular Cell Biology

附圖一、細胞凋亡途徑。細胞凋亡調控路徑包含外部的(extrinsic)訊號活化細胞膜上的 Fas 受體蛋白 (Fas receptor) 及細胞內部(intrinsic)訊號藉由粒線體所調控。Fas 配體 (ligand Fas) 在細胞表面結合至 Fas 受體後活化 caspase-8 以及其下游的層級反應 (caspase cascade)。內部路徑(intrinsic pathway)的進行，導致粒線體釋出調控分子到細胞質中，活化層級反應 (caspase cascade) 進入細胞凋亡 (Orrenius et al., 2003)。

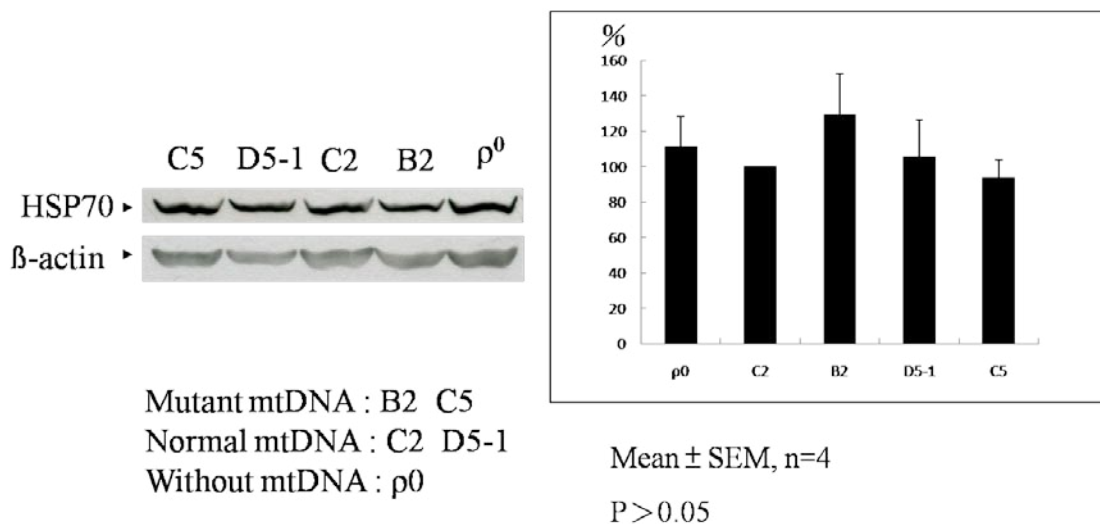


**附圖二、MERRF 病人 LCLs 中 HSP27 表現量顯著地較正常人 LCLs 低。**將 MERRF 突變細胞 (C5) 與正常的細胞 (D5-1) 收取蛋白質，並利用西方點墨法分析後，一級抗體使用 anti-HSP27 偵測；以及 β-actin 作為內控制組 (Gi, 2007, thesis)。



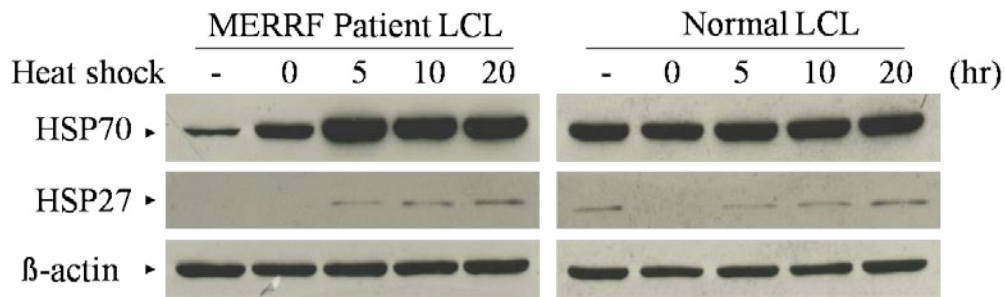


附圖三、MERRF 細胞中 HSP27 及 phospho-HSP27 表現量顯著低於正常細胞。MERRF 突變細胞 (C5) 與正常的細胞 (D5-1) 收取細胞蛋白並利用西方點墨法分析。一級抗體使用 anti-HSP27 (A)、anti-pSer78-HSP27 (B) 偵測；以及  $\beta$ -actin 作為內控制組 (Gi, 2007, thesis)。

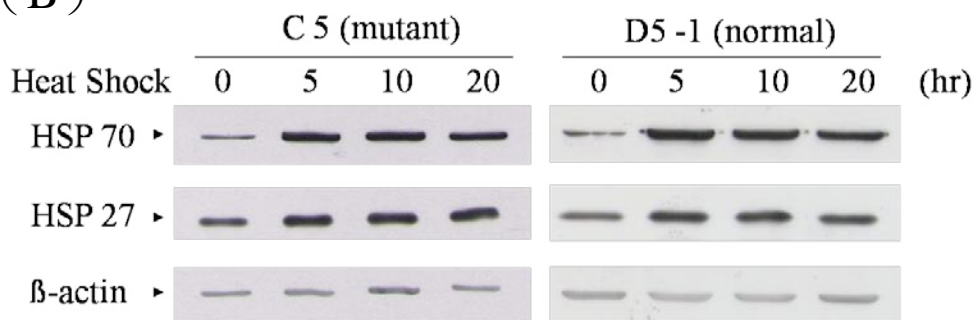


**附圖四、HSP70 在 MERRF 及正常細胞之間沒有表現量差異。**MERRF 突變細胞（C5 及 B2）與正常的細胞（D5-1 及 C2）收取細胞蛋白並利用西方點墨法分析。一級抗體使用 anti-HSP70 偵測，以  $\beta$ -actin 作為內控制組（Gi, 2007, master thesis）。

(A)



(B)



附圖五、MERRF 病人、正常人 LCLs、MERRF 及正常細胞在 43°C

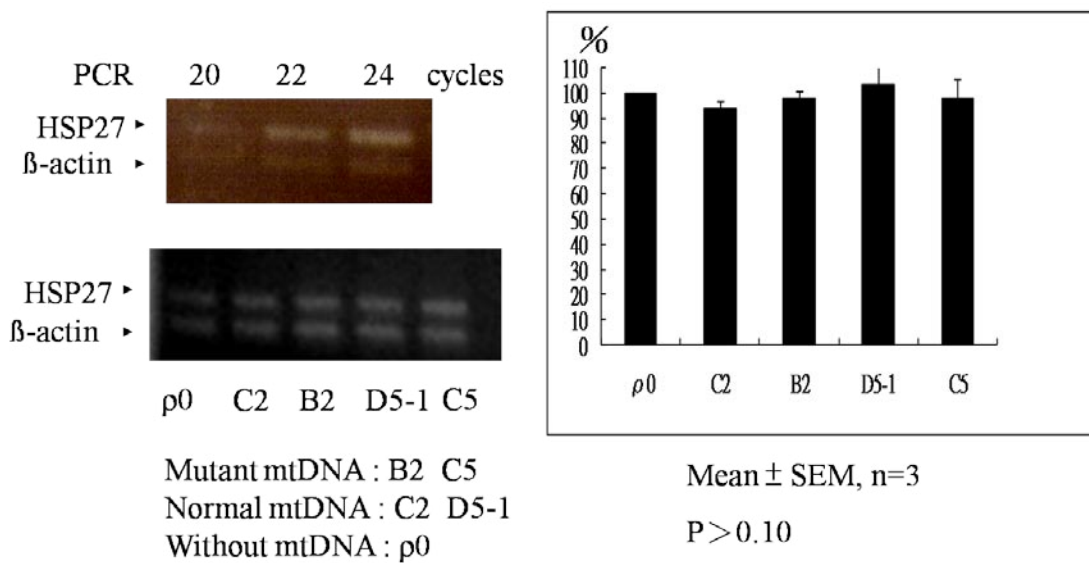
刺激皆可使 HSP27 表現量正常地增加。細胞在處理 43°C 熱刺激 1 個

小時後，放回正常細胞培養箱分別繼續培養 0、5、10 及 20 小時，

收取細胞蛋白並利用西方點墨法分析。MERRF 病人、正常人 LCLs

(A) 及 MERRF、正常細胞 (B)，使用一級抗體 anti- HSP70 及

anti-HSP27；而  $\beta$ -actin 作為內控制組 (Gi, 2007, master thesis)。



**附圖六、HSP27 半定量 PCR 表現量在 MERRF 及正常細胞之間沒有表現量差異。**收取 MERRF 突變細胞 (C5 及 B2) 與正常的細胞 (D5-1 及 C2) mRNA 並利用半定量 PCR 分析。primer 使用 HSP27 偵測；β-actin 作為內控制組 (Gi, 2007, master thesis)。

附表一、西方點墨法使用抗體來源及比例

antibody	dilution	blocking	manufacture
rabbit-anti-pSer78-HSP27	1:500	BSA	Santa Cruze
rabbit-anti-phospho-ERK	1:1000	BSA	Cell signalling
rabbit-anti-phospho-JNK	1:1000	BSA	Cell signalling
rabbit-anti-phospho-p38	1:1000	BSA	Cell signalling
rabbit-anti-ERK	1:1000	BSA	Cell signalling
rabbit-anti-JNK	1:1000	BSA	Cell signalling
rabbit-anti-p38	1:1000	BSA	Cell signalling
rabbit-anti-LC3	1:1000	BSA	Cell signalling
rabbit-anti-ATG5	1:1000	BSA	Cell signalling
rabbit-anti-ATG7	1:1000	Non-fat milk	Cell signalling
rabbit-anti-ATG12	1:1000	Non-fat milk	Cell signalling
rabbit-anti-Beclin1	1:1000	BSA	Cell signalling
mouse-anti-Bcl-2	1:500	Non-fat milk	BD
goat-anti-HSP27	1:1000	Non-fat milk	Santa Cruze
mouse -anti-HSP70	1:1000	Non-fat milk	Santa Cruze
mouse-anti- $\beta$ -actin	1:10,000	Non-fat milk	Novus
mouse-anti- $\alpha$ -tubulin	1:10,000	Non-fat milk	Sigma
donkey-anti-rabbit-HRP,	1:10,000	Jackson immune research	
donkey-anti-mouse-HRP	1:10,000	Jackson immune research	
donkey-anti-goat-HRP	1:10,000	Jackson immune research	

註：Bcl-2 及來源為 rabbit 的一級抗體皆在 4°C 下作用 16 至 18 小時，

其餘一級抗體及二級抗體皆室溫作用一小時。

個人基本資料

姓名：陳靜怡

戶籍地：台中縣

生日：1985/02/15

電子郵件：naiviv5120@hotmail.com

vi215@yahoo.com.tw

學歷：

1991-1997 縣立潭子國小

1997-2000 縣立潭秀國中

2000-2003 私立華盛頓高級中學

2003-2007 私立東海大學生命科學系

2007-2009 私立東海大學生命科學所生物醫學組

經歷：

私立東海大學勞作教育小組長

私立東海大學生命科學系遺傳學助教

私立東海大學生命科學系解剖學助教