RRPG94030949 (29 .P)

計 畫 編 號：NHRI-EX94-9315BC

國家衛生研究院整合性醫藥衛生科技研究計畫

Notch1 受體訊號傳遞路徑在癌細胞所扮演角色之探討

計畫名稱

九十四年度成果報告

執 行 機 構： 台北醫學大學

計 畫 主 持 人： 葉添順 助教授

本年度執行期間： 94 年 1 月 1 日 至 94 年 12 月 31 日

＊＊本研究報告僅供參考用，不代表本院意見＊＊

壹、九十四年度計畫研究成果摘要

計 畫 名 稱：Notch1 受體訊號傳遞路徑在癌細胞所扮演角色之探討

計 畫 編 號：**NHRI-EX94-9315BC**

執 行 機 構：台北醫學大學

計畫主持人：葉添順

研 究 人 員：葉添順, 李紹珮, 蓋允芳, 陳艾佳

關 鍵 字：Notch 受體

成 果 分 類：☑ 癌症基礎與臨床研究(可複選，最多三項)

☑ 分子與基因醫學研究

☐ 臨床研究

☐ 生物技術與藥物研究

☐ 生物統計與生物資訊研究

☐ 醫療保健政策研究

☐ 環境衛生與職業醫學研究

☐ 醫學工程研究

☐ 老年醫學研究

☐ 精神醫學與藥物濫用研究

☐ 疫苗研究

☐ 幹細胞研究

☐ 奈米醫學研究

☐ 其他重要疾病或醫藥衛生問題研究

（1）中文摘要

大量表現 Notch1 接受體細胞內區域會抑制 K562 細胞的增生。

Notch 接受體訊息傳遞路徑除了扮演誘發腫瘤生成的角色外，愈來愈多證據顯示：Notch 訊息亦可作爲腫瘤的抑制者。截至目前為止，有關 Notch 接受體訊息傳遞路徑誘發或抑制腫瘤生成的控制之分子機制仍然模糊不清。爲了瞭解 Notch1 接受體訊息傳遞路徑在腫瘤生成中所扮演的角色，建立了會持續表現 HA-N1IC 融合蛋白的 K562 細胞株，並且評估其生長曲線。結果顯示：表現 HA-N1IC 融合蛋白的 K562 細胞株累積的細胞數量，低於控制組的細胞數量，因此 HA-N1IC 融合蛋白的表現會抑制 K562 細胞的增生。

Notch1 接受體細胞內區域增加 K562 細胞在 G_1 時期的比率，而且經由 Taxol 處理之後，細胞週期停止在 G_2/M 時期。

在之前的研究中，我們證明了給予 Taxol 之後，會增加細胞核中 β_{II}-tubulin 的量，並且起提昇 N1IC 的 CBF1-dependent 轉活化活性。爲了評估由 Taxol 所引起 Notch1 接受體訊息傳遞路徑的 CBF1-dependent 轉活化作用，是否會經由改變細胞週期的進行，進由調節細胞的生長，我們利用流氏細胞儀進行偵測。

結果顯示：N1IC 增加在 G_1 時期的細胞比率，從 37%增加到 44%，並且減少在 G_2/M 時期的細胞比例，從 63%降到 56%，因此，這些資料可以證明出的確可以輕微的將 K562 細胞停止在 G_1 時期。細胞數目會因爲 N1IC 的存在而受到抑制。而這樣的結果與上述的實驗所得到的結果有一致。除此之外，當給予 3.5 μM Taxol 之後，無論 N1IC 是否存在，大多數的 K562

細胞會停止在 G_2/M 時期。

在生物體內，Notch 接受體細胞內區域及 Taxol 會抑制 K562 腫瘤細胞的生長

本計劃也進一步加以證實：以皮下注射方式注射入表現 HA-N1IC 融合蛋白的 K562 細胞株或對照組細胞的裸鼠中，N1IC 與 Taxol 是否也可抑制細胞生長。

在接種腫瘤細胞後第 15 天，可以觀察到表現 HA-N1IC 融合蛋白之 K562 細胞株，其腫瘤大小跟對照組相較之下減少了 19%。在以 3.5 μM Taxol 處理 24 小時後，表現 HA-N1IC 融合蛋白之 K562 細胞株與對照組細胞皆不再生長。如同先前報導指出，Taxol 會使細胞核內的β_{II}-tubulin 的量增加，並驅使 N1IC 的 CBF1-dependent 之轉活化能力提高。然而，由 Taxol 所誘導核內 β_{II}-tubulin 量之增加，在此並不會驅使裸鼠的腫瘤形成。在相同濃度(3.5 μM)處理下，Taxol 也可使細胞停留在 G_2/M 時期並抑制腫瘤生長。這些結果顯示：在生物體內 N1IC 與 Taxol 均可制止 K562 細胞週期，並且抑制腫瘤細胞的生長。

細胞核內之β_{II}-tubulin 並不經由核內定位訊號(nuclear localization signal, NLS)途徑而增加

如同先前報導指出：在 K562、SUP-T1，以及 HeLa 細胞中，β_{II}-tubulin 同時存在於細胞核及細胞質內。Taxol 會增加核內β_{II}-tubulin 的量並驅使 CBF1-dependent 之 N1IC 轉活化能力上升。然而，經由 Taxol 處理也可使

K562 細胞停留在 G_2/M 時期且不引發裸鼠的腫瘤形成。

首先建構蛋白 N 端帶有 FLAG 標籤以及核內定位訊號的β_{II}-tubulin 表現質體，並用來轉染細胞，以誘導核內β_{II}-tubulin 量的增加，探討β_{II}-tubulin 進入細胞核的機制。雖然在 HeLa 細胞之細胞核可偵測到外生性帶有 NLS 標籤的β_{II}-tubulin 之表現，但其主要分布位置仍位於細胞質中。實驗結果顯示：NLS 標籤似乎無法明顯增加β_{II}-tubulin 蛋白在細胞核內的量。這些結果顯示細胞核內β_{II}-tubulin 的分布並不因 NLS 途徑而增加。

使用 small interfering RNA (siRNA)方法，降低 β_{II}-tubulin 蛋白質的表現後，藉由 Notch1 細胞內區域所活化的 CBF1 dependent 報導基因活性會被抑制。

為了評估β_{II}-tubulin 蛋白對於 Notch 接受體訊息傳遞路徑調控的影響，本計劃利用 siRNA 的方法來降低 β_{II}-tubulin 蛋白的表現。並且建立了分別由 U6 啟動子以及 H1 啟動子所驅動的 siRNA 表現質體，同時將它們與 FLAG-NLS-β_{II}-tubulin 融合蛋白的表現質體轉染入 HeLa 細胞株。可以在轉染了β_{II}-tubulin 蛋白 siRNA 表現質體 (pSilencer 2.1-U6-1431) 的細胞萃取液中，觀察到 FLAG-NLS-β_{II}-tubulin 融合蛋白的表現量減少的情形，然而在同時轉染了另一個 siRNA 表現質體 (pSliencer 3.1-H1-105) 或是對照組質體 (pSliencer 2.1-U6 neo) 的情形下，皆不影響β_{II}-tubulin 蛋白的表現。由於細胞骨架相關蛋白質含量非常豐富，所以內生性的β_{II}-tubulin 蛋白的數量無法利用暫時性轉染β_{II}-tubulin 蛋白的 siRNA 表現質體 pSilencer 2.1-U6-1431 的方法，將內生性的β_{II}-tubulin 蛋白之表現全部抑制(data not shown)。

本計劃利用螢光酵素報導基因分析(luciferase reporter gene assay)的方

法試著闡述β_{II}-tubulin 蛋白在 Notch 接受體訊息傳遞路徑當中所扮演的角色。在 HeLa 細胞株中，共同轉染了β_{II}-tubulin 蛋白 siRNA 表現質體(pSilencer 2.1-U6-1431 與 pSliencer 3.1-H1-1431)後，觀察到由 N1IC 所活化的 CBF1-dependent 報導基因活性減少，但在共同轉移感染了 siRNA 表現質體 (pSliencer 3.1-H1-105) 或是對照組質體 (pSliencer 2.1-U6 neo) 卻無法觀察到此結果。除了在 HeLa 細胞之外，同樣在 K562 細胞株當中可以觀察到 CBF1-dependent 報導基因活性的抑制現象。根據上述的實驗結果推測，當β_{II}-tubulin 蛋白的表現受到 siRNA 的降低時，CBF1 所仲介的 N1IC 轉錄活性會受到抑制，這些結果與之前發表的研究 : Taxol 會藉由 N1IC 來增加 CBF1 dependent 導基因活性之結果是一致的。

在 K562 細胞株中，細胞週期相關蛋白的表現會受到活化型式 Notch1 接受體調控

過去文獻指出：在細胞週期的進行當中，細胞週期查核點的通過會被未磷酸化或低磷酸化的 Rb 蛋白所抑制。而 Rb 蛋白被去活化是經由 cyclin 和 cyclin-dependent kinase (CDK)複合物的磷酸化作用後，使細胞可以進入 S 時期。而由前述的實驗結果，抑制 K562 細胞之生長是由於 Notch1 接受體細胞內區域造成增加大量細胞於 G_1 時期所致。爲了證明因 N1IC 抑制細胞生長之分子機制，本計劃更進一步研究 Notch1 接受體造成細胞週期被停止時，Rb 蛋白所扮演之角色。

結果發現：相對於對照組細胞，於表現 HA-N1IC 的融合蛋白之 K562 細胞中，有較高的 ppRb 及 Rb 蛋白表現量。此外，在有 N1IC 存在下，E2F1 蛋白之表現量有減少的現象。過去認為 Rb 蛋白之磷酸化可被 cyclin D/CDK4

及 cyclin E/CDK2 所調控，進而使細胞由 G_1 時期進入 S 時期，本計劃接著更進一步去探討在 N1IC 存在之下，是否可調控 CDK4 及 CDK2 之表現。與對照組細胞相比較，於表現 HA-N1IC 的融合蛋白之 K562 細胞中，CDK4 及 CDK2 之表現會被抑制，同時 CDK4 及 CDK2 之活性也有被抑制的情況。這些結果指出：經由 Rb、E2F1、CDK4 及 CDK2 等蛋白的作用，Notch 接受體訊息傳遞路徑對於由 G_1 時期進入 S 時期的調控，扮演舉足輕重的角色。

（2）英文摘要

Overexpression of the Notch1 receptor intracellular domain inhibits the proliferation of K562 cells.

In addition to its oncogenic role, there is mounting evidence that Notch signaling functions as a tumor suppressor. To date, the molecular mechanism controlling the Notch signal pathway, which serves as an oncogene or a tumor suppressor in tumorigenesis, remains obscure. To understand the role of the Notch1 signaling pathway in tumorigenesis, stable K562 cell lines constitutively expressing the HA-N1IC fusion protein were established in order to evaluate their growth curves. Four pools of the HA-N1IC fusion protein-expressing K562 stable cell lines (K562/HA-N1IC pool-1~4) and the K562/HA-N1IC stable cell line derived from a single cell (Yeh et al., 2003) were used in this study. All of the cumulative cell numbers of the HA-N1IC fusion protein-expressing K562 stable cell lines were lower than their control cells (K562/pcDNA3). These results suggest that the expression of the HA-N1IC fusion protein suppressed the proliferation of K562 cells.

Notch1 receptor intracellular domain increases the proportion of K562 cells in the G_1 phase, while Taxol arrests cells in the G_2/M phase.

In a previous study, we demonstrated that treatment with Taxol increased the amount of nuclear β_{II}-tubulin in cells and promoted CBF1-dependent

transactivation activity of N1IC (Yeh et al., 2004). To assess whether Taxol-induced activation of CBF1-dependent Notch signaling can regulate cell growth *via* alternation of cell cycle progression, a flow cytometric analysis was performed. Results showed that N1IC increased the proportion of cells in the G_1 phase of the cell cycle from 37% to 44%, and decreased the proportion of S-G_2/M-phase cells from 63% to 56%. Therefore, these data demonstrate that N1IC slightly arrested K562 cells in the G_1 phase. This is consistent with the results of the growth curves, in which cumulative cell numbers were suppressed in the presence of N1IC. Additionally, most of the K562 cells were arrested in the G_2/M phase after treatment with 3.5 μM Taxol regardless of whether or not N1IC was present.

Notch1 receptor intracellular domain and Taxol suppress tumor growth of K562 cells in vivo.

We further investigated whether N1IC and Taxol also suppress cell growth in the case of subcutaneously implanted HA-N1IC fusion protein-expressing cells or their control cells in nude mice. Tumors of HA-N1IC fusion protein-expressing K562/HA-N1IC cells were reduced to 19% of the sizes observed in the control K562/pcDNA3 cells on day 15 after tumor inoculation. After treatment with 3.5 μM Taxol for 24 hours, tumors of neither K562/HA-N1IC nor K562/pcDNA3 cells exhibited any growth. As described previously (Yeh et al., 2004), Taxol increased the nuclear content of β_{II}-tubulin to promote the CBF1-dependent transactivation of N1IC. However, this

enhancement of nuclear β_{II}-tubulin induced by Taxol did not promote the tumorigenesis in nude mice here. At the same concentration (3.5 μM), Taxol also arrested the cells in G_2/M phase to inhibit the tumor growth. These results suggest that N1IC and Taxol can arrest K562 cells, thus suppressing tumor growth *in vivo*.

The nuclear content of β_{II}-tubulin was not increased by the nuclear localization signal (NLS) pathway.

As described previously (Yeh et al., 2004), β_{II}-tubulin is present in both the nuclei and cytoplasms of K562, SUP-T1, and HeLa cells. Taxol increased the nuclear content of β_{II}-tubulin and thus promoted the CBF1-dependent transactivation of N1IC. However, Taxol treatment arrested K562 cells in the G_2/M phase, but did not affect tumorigenesis in nude mice.

To induce the nuclear content of β_{II}-tubulin and to gain further insights into the mechanism of nuclear localization of β_{II}-tubulin, the expression plasmid of β_{II}-tubulin tagged with an N-terminal FLAG tag and nuclear localization signal was constructed for transfection. Although the exogenous NLS-tagged β_{II}-tubulin was detected in nuclei of HeLa cells, its major localization was still in the cytosol. The NLS tag did not seem not to significantly increase the content of nuclear β_{II}-tubulin. These results show that the nuclear localization of β_{II}-tubulin was not enhanced by the NLS pathway.

The CBF1-dependent luciferase reporter activity transactivated by the Notch1 receptor intracellular domain is suppressed by small interfering RNAs (siRNAs) targeting β_{II}-tubulin.

To evaluate the effect of β_{II}-tubulin on the regulation of Notch signaling, the method of siRNA targeting of β_{II}-tubulin was used to knock down its expression. Both the U6 and H1 promoter-driven siRNA expression plasmids were constructed and co-transfected with the FLAG-NLS-β_{II}-tubulin fusion protein expression plasmid into the HeLa cells. A decrease in the expression of the FLAG-NLS-β_{II}-tubulin fusion protein was observed in the lysates of cells transfected with the β_{II}-tubulin siRNA expression construct (pSilencer 2.1-U6-1431), whereas neither another siRNA expression construct (pSilencer 3.1-H1-105) nor the control vector (pSilencer 2.1-U6 neo) affected β_{II}-tubulin expression. Owing to the abundance of cytoskeletal proteins, the amount of endogenous β_{II}-tubulin was not knocked down by the transient transfection of the β_{II}-tubulin siRNA expression construct pSilencer 2.1-U6-1431 (data not shown).

To elucidate the role of β_{II}-tubulin in regulation of the Notch signaling pathway, a luciferase reporter gene assay was performed. A decrease in the CBF1-dependent luciferase reporter activity transactivated by N1IC was shown in HeLa cells co-transfected with β_{II}-tubulin siRNA expression constructs (pSilencer 2.1-U6-1431 and pSilencer 3.1-H1-1431), but not in those co-transfected with another siRNA expression constructs (pSilencer 3.1-H1-105) or the control vector (pSilencer 2.1-U6 neo). In addition to HeLa cells, this suppression of CBF1-dependent luciferase reporter activity was also observed in

K562 cells. The above data suggest that CBF1-mediated transactivation activity of N1IC was inhibited when β_{II}-tubulin was knocked down by siRNA. These results are consistent with a previous study in which Taxol augmented the CBF1-dependent luciferase reporter activity transactivated by N1IC (Yeh et al., 2004).

Expressions of cell cycle-related proteins in K562 cells are regulated by the activated Notch1 receptor.

It was reported that the transition through the restriction point is blocked by unphosphorylated or hypophosphorylated Rb during cell cycle progression (Sherr, 2000). Rb is inactivated through phosphorylation by cyclin and cyclin-dependent kinase (CDK) complexes which allows the cell to enter S phase (Sherr, 2000). Based on the findings described above, the growth suppression of K562 cells is due to an increase in the proportion of cells in the G_1 phase by the Notch1 receptor intracellular domain. To clarify the molecular mechanism of cell growth suppression by N1IC, we further investigated the role of Rb in Notch-mediated cell cycle arrest.

In HA-N1IC fusion protein-expressing K562 cells, the expressions of phospho-RB (ppRB) and Rb were higher than those of the control cells, whereas E2F1 expression was decreased in the presence of N1IC. Since phosphorylation of the Rb protein is regulated by both cyclin D/CDK4 and cyclin E/CDK2 which allows cells to progress from the G_1 to the S phase, we next investigated whether modulation of CDK4 and CDK2 expressions occurs in

the presence of N1IC. The expressions of both CDK4 and CDK2 were suppressed in HA-N1IC fusion protein-expressing K562 cells, compared to control cells. The activities of both CDK4 and CDK2 were also suppressed in K562/HA-N1IC cells as compared with K562/pcDNA3 cells. These data indicate that the Notch signal pathway plays a critical role in the control of the G_1-S transition through cellular factors such as Rb, E2F1, CDK4, and CDK2.

貳、九十四年度計畫著作一覽表

Journal

序號	計畫產出名稱	產出型式	Impact factor	致謝對象
	無			

Patent

序號	計畫產出名稱
	無

Book

序號	計畫產出名稱
	無

Conference Paper

序號	計畫產出名稱
	無

Technical Report

序號	計畫產出名稱
	無

參、九十四年度計畫重要研究成果產出統計表

註：群體計畫(PPG)者，不論是否提出各子計畫資料，都必須提出總計畫整合之資料

(係指執行九十四年度計畫之所有研究產出結果)

科技論文篇數			技術		
	國　內	國　外	類　型	經　費	項　數
期　刊 論　文	0篇	0篇	技　術 輸　入	0千元	0項
研討會 論　文	0篇	0篇	技　術 輸　出	0千元	0項
專　著	0篇	0篇	技　術 擴　散	0千元	0項
專　利	0項	0項	技　術 報　告	0千元	0項
			技　術 創　新	0千元	0項

〔註〕：

期刊論文：指在學術性期刊上刊登之文章，其本文部份一般包含引言、方法、結果、及討論，並且一定有參考文獻部份，未在學術性期刊上刊登之文章（研究報告等）與博士或碩士論文，則不包括在內。

研討會論文：指參加學術性會議所發表之論文，且尚未在學術性期刊上發表者。

專　　著：為對某項學術進行專門性探討之純學術性作品。

技術報告：指從事某項技術之創新、設計及製程等研究發展活動所獲致的技術性報告且未公開發表者。

技術移轉：指技術由某個單位被另一個單位所擁有的過程。我國目前之技術轉移包括下列三項：一、技術輸入。二、技術輸出。三、技術擴散。

技術輸入：藉僑外投資、與外國技術合作、投資國外高科技事業等方式取得先進之技術引進國內者。

技術輸出：指直接供應國外買主具生產能力之應用技術、設計、顧問服務及專利等。我國技術輸出方包括整廠輸出、對外投資、對外技術合作及顧問服務等四種。

技術擴散：指政府引導式的技術移轉方式，即由財團法人、國營事業或政府研究機構將其開發之技術擴散至民間企業之一種單向移轉（政府移轉民間）。

技術創新：指研究執行中產生的技術，且有詳實技術資料文件者。

肆、九十四年度計畫重要研究成果

註：群體計畫(PPG)者，不論是否提出各子計畫資料，都必須提出總計畫整合之資料

計畫之新發現、新發明或對學術界、產業界具衝擊性(impact)之研究成果，請依性質勾選下列項目。

☐1. 研發或改良國人重要疾病及癌症的早期診斷方式及治療技術

☐2. 發展新的臨床治療方式

☐3. 發展新生物製劑、篩檢試劑及新藥品

☑4. 瞭解常見疾病及癌症之分子遺傳機轉

☐5. 瞭解抗癌藥劑對癌細胞之作用機制

☐6. 提供有效的疾病預防策略

☐7. 利用生物統計與生物資訊研究，推動台灣生技醫藥研究，促進生物技術與基因體醫學之發展

☐8. 醫療保健政策相關研究

☐9. 瞭解環境毒理機制及重金屬對人體健康的影響

☐10. 研發適合臨床使用的人造器官及生醫材料

☐11. 縮短復健流程並增加復健效果的醫療輔助方式或器材之研究應用

☐12. 改進現有醫療器材的功能或增加檢驗影像的解析能力

☐13. 其他重要疾病或醫藥衛生問題研究

一、 計畫之新發現、新發明或對學術界、產業界具衝擊性（impact）之研究成果，請敘述其執行情形。

本計畫的研究工作，主要的內容為探討 Notch1 receptor 對於癌細胞的形成所扮演的角色及功能。本計畫相關的這些研究成果，將有助於瞭解癌細胞的形成之作用機制，對於癌症形成之分子機轉的瞭解，將能夠提供未來抗癌藥物開發的參考及依據。

二、 計畫對民眾具教育宣導之研究成果（此部份將為規劃對一般民眾教育或宣導研究成果之依據，請以淺顯易懂之文字簡述研究成果，內容以不超過 300 字為原則）

在細胞中，可能藉由對於影響細胞生長的蛋白質之作用，調控細胞的生長速度，進而促成癌細胞的形成。癌細胞形成的作用機制相當複雜，因此有關癌症的預防及治療工作，至今仍相當困難，有待進一步努力。

三、 簡述年度計畫成果之討論與結論，如有技術移轉、技術推廣或業界合作，請概述情形及成效

本計畫為期三年，執行至今共兩年，已經有些初步成果，這些研究結果已經撰寫成論文，同時發表在去年的十一月十五日出刊的 *Cancer Research* 期刊。這些研究是連續性的，今年的研究結果尚未發表，但是這些研究結果也正在撰寫論文當中，預計明年一月時投稿。

四、 成效評估（技術面、經濟面、社會面、整合綜效）

截至目前為止，本計畫最主要的成果為論文的發表，在去年的十一月十五日出刊的 *Cancer Research* 期刊發表一篇論文。雖然在論文的發表數量上並不多，但是此期刊是相當好的期刊，在論文的品質上應可獲得肯定。這些研究是連續性的，今年的研究結果也正在撰寫論文當中，預計明年一月時投稿。

五、 下年度工作構想及重點之妥適性

依照所提的研究計畫書內容，本計畫的下年度工作重點，將繼續研究與轉錄因子 YY1 結合成的 Notch complex，探討這個大的 Notch complex 在細胞核中所扮演的角色、對於癌細胞形成的過程中，所具有的功能。因為轉錄因子 CBF1 及 YY1 均可結合到 DNA 上，參與相關基因表現的調控，大的 Notch complex 可能分別藉由轉錄因子 CBF1 或 YY1 結合到不同的 DNA 上，調控不同的標的基因。因此下年度的研究工作，也將繼續篩選在細胞內經由此大的 Notch complex 結合所調控的基因。此外，本計畫也將同時評估大的 Notch complex 對於這些所篩選到標的基因表現之作用，以及對於癌細胞形成所扮演的角色。

六、 檢討與展望

本計畫為期三年，執行至今共兩年，本計畫的研究成果，已在去年的十一月十五日出刊的 *Cancer Research* 期刊發表一篇論文。本計

畫的研究成果豐碩，目前也正積極撰寫第二篇論文當中，預計於明年一月時再度投稿。同時仍繼續著手進行研究，希望藉由本計畫的研究成果，期待將來能夠解開在細胞核中，包含轉錄因子 YY1、β_{II}-tubulin 蛋白的這個大的 Notch complex 之組成及其生物功能，另一方面，藉由對於大的 Notch complex 之標的基因的篩選，以及對於癌細胞形成所扮演角色的探討，這些研究成果將有助於對癌細胞調控的了解，希望也能有助於對抗癌細胞。

伍、九十四年度計畫所培訓之研究人員

註：群體計畫(PPG)者，不論是否提出各子計畫資料，都必須提出總計畫整合之資料

種類				人數	備註
專任人員	1.	博士後研究人員	訓練中		
			已結訓		
	2.	碩士級研究人員	訓練中	1	
			已結訓		
	3.	學士級研究人員	訓練中		
			已結訓		
	4.	其他	訓練中		
			已結訓		
兼任人員	1.	博士班研究生	訓練中	1	
			已結訓		
	2.	碩士班研究生	訓練中	2	
			已結訓	2	
醫師			訓練中		
			已結訓		
特殊訓練課程					

陸、九十四年度計畫所有人力之職級分析

註：群體計畫(PPG)者，不論是否提出各子計畫資料，都必須提出總計畫整合之資料

職級	所含職級類別	參與人次
第一級	研究員、教授、主治醫師	0 人
第二級	副研究員、副教授、總醫師、助教授	1 人
第三級	助理研究員、講師、住院醫師	0 人
第四級	研究助理、助教、實習醫師	1 人
第五級	技術人員	0 人
第六級	支援人員	0 人
合計		2 人

〔註〕：

第一級：研究員、教授、主治醫師、簡任技正，若非以上職稱則相當於博士滿三年、碩士滿六年、或學士滿九年之研究經驗者。

第二級：副研究員、副教授、助研究員、助教授、總醫師、薦任技正，若非以上職稱則相當於博士、碩士滿三年、學士滿六年以上之研究經驗者。

第三級：助理研究員、講師、住院醫師、技士，若非以上職稱則相當於碩士、或學士滿三年以上之研究經驗者。

第四級：研究助理、助教、實習醫師，若非以上職稱則相當於學士、或專科滿三年以上之研究經驗者。

第五級：指目前在研究人員之監督下從事與研究發展有關之技術性工作，且具備下列資格之一者屬之：具初（國）中、高中（職）、大專以上畢業者，或專科畢業目前從事研究發展，經驗未滿三年者。

第六級：指在研究發展執行部門參與研究發展有關之事務性及雜項工作者，如人事、會計、秘書、事務人員及維修、機電人員等。

柒、參與九十四年度計畫所有人力之學歷分析

註：群體計畫(PPG)者，不論是否提出各子計畫資料，都必須提出總計畫整合之資料

類別	學　　歷　　別	參與人次
1	博士	1 人
2	碩士	1 人
3	學士	0 人
4	專科	0 人
5	博士班研究生	1 人
6	碩士班研究生	4 人
7	其他	0 人
合計		7 人

捌、參與九十四年度計畫所有協同合作之研究室

註：群體計畫(PPG)者，不論是否提出各子計畫資料，都必須提出總計畫整合之資料

機構	研究室名稱	研究室負責人
中正大學	分子生物研究所	曾銘仁
台北醫學大學	醫學研究所	劉興璟

玖、九十四年度計畫執行情形

註：群體計畫(PPG)者，不論是否提出各子計畫資料，都必須提出總計畫整合之資料

一、請簡述原計畫書中，九十四年預計達成之研究內容

本計畫原計畫書的工作重點為：研究大的 Notch complex 在細胞核中所扮演的角色。為了探討細胞核中，包含轉錄因子 YY1、β_{II}-tubulin 蛋白的這個大的 Notch complex 之組成，藉由了解結合在此大的 Notch1 complex 的細胞因子，探討這些細胞因子所扮演的角色及其生物功能。同時也將藉由 chromatin immunoprecipitation (ChIP) 的分析方法，篩選細胞內經由此大的 Notch complex 結合所調控的基因。也將檢視此大的 Notch complex 對這些所篩選到的基因之基因表現、生物功能的影響。

二、請詳述九十四年度計畫執行情形，並評估是否已達到原預期目標（請註明達成率）

本年度的研究工作執行情形如下： 證實於 in vitro 實驗中及 in vivo 動物實驗中，表現活化型式的 Notch1 receptor 會抑制 K562 細胞的生長，此生長的抑制作用是因為活化型式的 Notch1 receptor 造成細胞停留在 G_1 phase。檢視細胞內調控細胞生長的相關蛋白之表現，結果顯示活化型式的 Notch1 receptor 影響細胞內 Rb、E2F1、CDK2、CDK4 蛋白的表現，這些調控細胞生長的因子受到影響，促使細胞停留在 G_1 phase，因而抑制 K562 細胞的生長。

自行評估本年度的研究工作已達到原預期目標，達成率自行評估約為

90%。

拾、附錄

References:

Artavanis-Tsakonas S, Rand MD, Lake RJ. Notch signaling: cell fate control and signal integration in development. *Science* 1999; 284(5415): 770-6.

Baron M. An overview of the Notch signalling pathway. *Semin Cell Dev Biol* 2003; 14(2): 113-9.

Carlesso, N., J. C. Aster, J. Sklar, and D. T. Scadden. 1999. Notch1-induced delay of human hematopoietic progenitor cell differentiation is associated with altered cell cycle kinetics. Blood 93:838-848.

Ellisen LW, Bird J, West DC, et al. TAN-1, the human homolog of the *Drosophila* Notch gene, is broken by chromosomal translocation in T lymphoblastic neoplasms. *Cell* 1991; 66(4): 649-61.

Fortini, M. E., and Artavanis-Tsakonas, S. (1994) *Cell* 79, 273-282

He, T. C., Sparks, A. B., Rago, C., Hermeking, H., Zawel, L., da Costa, L. T., Morin, P. J., Vogelstein, B., and Kinzler, K. W. 1998. Identification of c-MYC as a target of the APC pathway. Science 281:1509-1512.

Hermeking, H., Rago, C., Schuhmacher, M., Li, Q., Barrett, J. F., Obaya, A. J., O'Connell B. C., Mateyak, M. K., Tam, W., Kohlhuber, F., Dang, C. V., Sedivy, J. M., Eick, D., Vogelstein, B., and Kinzler, K. W. Identification of CDK4 as a target of c-MYC. Proc Natl Acad Sci U S A. 97: 2229-2234, 2000

Hsieh JJ, Henkel T, Salmon P, Robey E, Peterson MG, Hayward SD. Truncated mammalian Notch1 activates CBF1/RBPJk-repressed genes by a mechanism resembling that of Epstein-Barr virus EBNA2. *Mol Cell Biol* 1996; 16(3): 952-9.

Jundt, F., I. Anagnostopoulos, R. Forster, S. Mathas, H. Stein, and B. Dorken. 2002. Activated Notch1 signaling promotes tumor cell proliferation and survival in Hodgkin and anaplastic large cell lymphoma. Blood 99:3398-3403.

Kopan R. Notch: a membrane-bound transcription factor. *J Cell Sci* 2002; 115(Pt 6): 1095-7.

Mateyak, M. K., Obaya, A. J. & Sedivy, J. M. (1999) c-Myc regulates cyclin D-Cdk4 and -Cdk6 activity but affects cell cycle progression at multiple independent points. *Mol. Cell. Biol.* 19, 4672-4683

Miele L, Osborne B. Arbiter of differentiation and death: Notch signaling meets apoptosis. *J Cell Physiol* 1999; 181(3): 393-409.

Noseda, M., L. Chang, G. McLean, J. E. Grim, B. E. Clurman, L. L. Smith, and A. Karsan. 2004 Notch activation induces endothelial cell cycle arrest and participates in contact inhibition: role of $p21^{Cip1}$ repression. Mol. Cell. Biol.24: 8813-8822.

Pear WS, Aster JC, Scott ML, Hasserjian RP, Soffer B, Sklar J, Baltimore D. Exclusive development of T cell neoplasms in mice transplanted with bone marrow expressing activated Notch alleles. *J Exp Med* 1996; 183(5): 2283-91.

Radtke F, Raj K. The role of Notch in tumorigenesis: oncogene or tumour

suppressor? *Nat Rev Cancer* 2003; 3(10): 756-67.

Rangarajan, A., Talora, C., Okuyama, R., Nicolas, M., Mammucari, C., Oh, H., Aster, J. C., Krishna, S., Metzger, D., Chambon, P., Miele, L., Aguet, M., Radtke, F., and Dotto, G. P. 2001. Notch signaling is a direct determinant of keratinocyte growth arrest and entry into differentiation. EMBO J. 20:3427-3436.

Rao P, Kadesch T. The intracellular form of notch blocks transforming growth factor beta-mediated growth arrest in Mv1Lu epithelial cells. *Mol Cell Biol* 2003; 23(18): 6694-701.

Ronchini, C., and A. J. Capobianco. 2001. Induction of cyclin D1 transcription and CDK2 activity by Notch^{ic}: implication for cell cycle disruption in transformation by Notch^{ic}. Mol. Cell. Biol. 21:5925-5934.

Sarmento, L,M., Huang, H., Limon, A., Gordon, W., Fernandes J, Tavares MJ, Miele L, Cardoso AA, Classon M, Carlesso N. 2005. Notch1 modulates timing of G1-S progression by inducing SKP2 transcription and p27Kip1 degradation. J. Exp. Med. 202: 157-68.

Sherr, C. J. 1996. Cancer Cell Cycles. *Science* 274, 1672-1677.

Sherr, C. J. 2000. Cancer cell cycles revisited. Cancer Res. 60:3689-3695.

Sriuranpong, V., M. W. Borges, R. K. Ravi, D. R. Arnold, B. D. Nelkin, S. B. Baylin, and D. W. Ball. 2001. Notch signaling induces cell cycle arrest in small cell lung cancer cells. Cancer Res. 61:3200-3205.

Sriuranpong, V., M. W. Borges, R. K. Ravi, D. R. Arnold, B. D. Nelkin, S. B. Baylin, and D. W. Ball. 2001. Notch signaling induces cell cycle arrest in small cell lung cancer cells. Cancer Res. 61:3200-3205.

Tamura, K., Taniguchi, Y., Minoguchi, S., Sakai, T., Tun, T., Furukawa, T., and Honjo, T. (1995) *Curr. Biol.* 5, 1416-1423

Weng, A. P., Y. Nam, M. S. Wolfe, W. S. Pear, J. D. Griffin, S. C. Blacklow, and J. C. Aster. 2003. Growth suppression of pre-T acute lymphoblastic leukemia cells by inhibition of notch signaling. Mol. Cell. Biol. 23:655-664.

Yeh TS, Hsieh RH, Shen SC, Wang SH, Tseng MJ, Shih CM, Lin JJ. Nuclear β_{II}–tubulin associates with the activated Notch receptor to modulate Notch signaling. *Cancer Res* 2004; 64: 8334-40.

Yeh TS, Lin YM, Hsieh RH, Tseng MJ. Association of transcription factor YY1 with the high molecular weight Notch complex suppresses the transactivation activity of Notch. *J Biol Chem* 2003; 278(43): 41963-9.

Yoo AS, Bais C, Greenwald I. Crosstalk between the EGFR and LIN-12/Notch pathways in *C. elegans* vulval development. *Science* 2004; 303(5658): 663-6.

拾壹、著作抽印本或手稿

無