

國立臺灣師範大學生命科學系碩士論文

*GAS7* 基因於肺癌之分子變異  
及臨床相關性研究

**Molecular Alteration Analysis of *GAS7* Gene  
and Its Clinical Significance in Lung Cancer**



研究生：陸一麟

(Yi-Lin Lu)

指導教授：王憶卿 博士、李桂楨 博士

(Dr. Yi-Ching Wang, Dr. Guey-Jen Lee-Chen)

中華民國九十七年七月

# ***GAS7* 基因於肺癌之分子變異 及臨床相關性研究**

## **Molecular Alteration Analysis of *GAS7* Gene and Its Clinical Significance in Lung Cancer**

壹、中文摘要 .....	1
貳、英文摘要 .....	3
參、文獻總論 .....	5
一、引言 .....	5
(一) 研究臺灣肺癌的重要性.....	5
(二) 研究 <i>GAS7</i> 基因的重要性 .....	6
二、研究背景 .....	8
(一) <i>GAS7</i> 基因發現過程.....	8
(二) <i>GAS7</i> 基因之結構與功能.....	11

(三) <i>GAS7</i> 基因在癌症之變異情形.....	12
肆、研究目標.....	15
伍、方法總論.....	16
一、研究材料 .....	16
1. 檢體來源及病歷資料.....	16
2. 肺癌細胞株 .....	16
二、 <i>GAS7</i> 蛋白在病人檢體中的表現分析.....	16
(一) 西方轉漬法分析 (Western blotting analysis)	
1. 蛋白質萃取.....	16
2. 西方轉漬法.....	17
3. 西方轉漬法之判讀標準.....	18
4. 膠體內水解.....	18
5. 質譜分析蛋白質身份.....	19
(二) 免疫組織染色分析 (Immunohistochemistry assay, IHC)	
1. 組織切片染色.....	20
2. 染色切片之判讀標準.....	20
三、 <i>GAS7</i> 基因 mRNA 在病人檢體中的表現分析.....	21
1. mRNA 萃取.....	21
2. 反轉錄-聚合酵素連鎖反應	

(Reverse-transcriptase polymerase chain reaction, RT-PCR)...	21
3. 判讀標準.....	22
四、 <i>GAS7</i> 基因在病人檢體中的啟動子過度甲基化分析.....	23
1. DNA 萃取.....	23
2. Bisulfite-sequencing PCR, BSP assay.....	23
3. 判讀標準.....	24
五、 <i>GAS7</i> 基因在病人檢體中的 LOH 分析.....	25
1. 微衛星序列 (microsatellite markers).....	25
2. LOH 分析.....	25
六、 <i>GAS7</i> 基因/蛋白在肺細胞株內的表現情形.....	26
(一) 細胞培養.....	26
(二) 肺細胞株 <i>GAS7</i> 基因/蛋白的表現.....	26
1. 細胞株蛋白質的抽取、定量及分析.....	26
2. 細胞株 mRNA 的抽取、定量及分析.....	27
(三) 細胞免疫染色 (Immunocytochemical analysis, ICC).....	27
七、統計分析.....	27
陸、結果.....	29
一、探討肺細胞株 <i>GAS7</i> 基因 mRNA/蛋白的表現情形.....	29
(一) <i>GAS7</i> 基因 mRNA/蛋白在各種不同肺細胞株內的 表現情形.....	29

(二) GAS7C 表達的確認.....	30
(三) GAS7 蛋白在肺細胞株 IMR90 及 A549 分佈的情形.....	30
二、探討臺灣地區肺癌病人 GAS7 基因/蛋白之變異情形.....	31
(一) GAS7 蛋白表達情形與病歷資料相關性.....	31
(二) GAS7 mRNA 表達情形與病歷資料相關性.....	32
(三) GAS7 基因啟動子過度甲基化情形與病歷資料相關性.....	32
(四) GAS7 基因的異質性喪失分析.....	33
(五) GAS7 mRNA、蛋白不表達與啟動子甲基化間之相關性...	33
柒、討論.....	35
捌、附表.....	41
玖、附圖.....	49
拾、參考文獻.....	65

## FIGURE CONTENT

<b>Figure 1</b>	Frequent chromosomal deletion regions in tumors from lung cancer patients.....	50
<b>Figure 2</b>	The functions of <i>GAS</i> gene family in controlling cell cycle.....	51
<b>Figure 3</b>	Representative figure of <i>GAS7</i> gene DNA and mRNA composition.....	52
<b>Figure 4</b>	Schematic representation of functional domain of <i>GAS7A</i> , <i>7B</i> , and <i>7C</i> .....	53
<b>Figure 5</b>	Schematic representation of primer design of <i>GAS7</i> gene...	54
<b>Figure 6</b>	<i>GAS7</i> mRNA and protein expressions in normal lung cells (IMR90 and Bes2B) and lung cancer cells (A549).....	55
<b>Figure 7</b>	<i>GAS7C</i> protein identified in IMR90 normal lung cell by Peptide MASS spectrum analysis.....	56
<b>Figure 8</b>	The localization of <i>GAS7</i> protein in A549 and IMR90 cell line.....	57
<b>Figure 9</b>	Representative figures of immunohistochemistry analysis of <i>GAS7</i> , in paraffin sections of lung tumors.....	58
<b>Figure 10</b>	Representative figures of Western blot analysis of <i>GAS7</i> protein in lung tumor tissues.....	59
<b>Figure 11</b>	Representative figure of <i>GAS7B</i> (A) and <i>GAS7C</i> (B) mRNA expression analysis in lung cancer.....	60
<b>Figure 12</b>	Representative figures of BSP assay for the <i>GAS7B</i> and <i>GAS7C</i> methylation status in lung cancer patients.....	61
<b>Figure 13</b>	Representative figures for the detection of LOH at the microsatellite marker, AFMA070....	63
<b>Figure 14</b>	Concordance analysis with (A) protein expression and mRNA expression, and (B) mRNA expression and promoter methylation of the <i>GAS7</i> gene.....	64

## TABLE CONTENT

<b>Table 1</b>	Summary of <i>GAS</i> gene functions.....	42
<b>Table 2</b>	List of antibodies used in the present study.....	43
<b>Table 3</b>	List of primer sequences used in the present study.....	44
<b>Table 4</b>	Alterations of <i>GAS7C</i> or <i>GAS7B</i> protein expression in relation to clinicopathological parameters of resected primary lung tumors.....	46
<b>Table 5</b>	Alterations of <i>GAS7C</i> or <i>GAS7B</i> mRNA expression in relation to clinicopathological parameters of resected primary lung tumors.....	47
<b>Table 6</b>	Alterations of <i>GAS7</i> promoter hypermethylation in relation to clinicopathological parameters of resected primary lung tumors.....	48

## ABBREVIATIONS

AcN	Acetonitrile
AD	Adenocarcinoma
BSA	Bovine serum albumin
BSP	Bisulfite sequencing PCR
CHCA	-cyano-4-hydroxycinnamic acid
DAPI	4,6-diamidino-2-phenylindole
DC	Detergent-Compatible
DEPC	Diethylpyrocarbonate
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylene diamine tetraacetic acid
ELISA	Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay
FCH	Fes/CIP4 homology domain
GAS7	Growth arrest-specific 7
ICC	Immunocytochemistry
IHC	Immunohistochemistry
LC	Large cell carcinoma
LOH	Loss of heterozygosity
NSCLC	Non-small cell lung cancer
PAGE	Polyacrylamide gel electrophoresis



PBS	Phosphate-buffered saline
PMSF	Phenylmethanesulphonyl fluoride
PVDF	Polyvinylidene fluoride
RPMI	Rosewell Park Memorial Institute
RT	Reverse transcriptase reaction
RT-PCR	reverse-transcriptase polymerase chain reaction
SCLC	Small cell lung cancer
SDS	Sodium dodecyl sulfate
SH3	Src homology 3 domain
SQ	Squamous carcinoma
TBE	Tris-Borate-EDTA
TBS-T	Tris Buffered saline- Tween-20
TFA	Trifluoroacetic acid
TNM system	T=primary Tumor ; N=Regional Lymph Node ; M=Distant Metastasis
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethane
TSG	Tumor suppressor gene
WHO	World Health Organization

## 壹、中文摘要

**研究背景：**自 1982 年起，癌症即為台灣地區十大死亡原因之第一位，其中肺癌不論在女性或男性都高居癌症死亡率的首位，儘管目前醫學已相當進步，但對於分子致癌機制仍未完全釐清。目前所知，癌症形成的原因，是由於多重基因發生變異所造成，其中大家所熟知和癌症有關的為抑癌基因 (tumor suppressor gene) 及致癌基因 (oncogene)。因此，抑癌基因變異的研究有助於了解癌症形成的機制。**研究目的：**Growth arrest-specific 7 (GAS7) 這個蛋白質為 GAS 這個基因家族的其中一個成員，主要功能可能與調控細胞週期有關；前人研究報導顯示，GAS7 可能在細胞中扮演一抑癌基因的角色。因此，本研究目的在探討 GAS7 基因在台灣地區非小細胞肺癌 (non-small cell lung cancer) 病人細胞中之變異情形：利用免疫組織化學染色法，觀察病人組織切片中 GAS7 蛋白表現情形，再以反轉錄—聚合酵素鏈反應分析組織細胞中 mRNA 轉錄是否異常，續以甲基化為基礎的定序反應以及微衛星基因座鑑定法分別偵測 GAS7 基因的促進子過度甲基化頻率和基因座缺失頻率。**結果：**本研究以免疫組織化學染色法發現 75 位 NSCLC 病人中 GAS7 蛋白低表達頻率為 57.3% (43/75)，以 31 位病人之組織進行西方轉漬法發現三種主要的蛋白形式，分別依分子量大至小為 GAS7C、7B 和 7A，其 GAS7C 蛋白低表現之比例為 48.4% (15/31)，GAS7B 蛋白低表現之比例為 40.7% (11/27)，而 GAS7A 蛋白幾乎不表現；GAS7 mRNA isoform: GAS7C 和 GAS7B 低表達頻率分別為 20.9% (19/91)和 32.6% (30/92)，而 GAS7C 和 7B 啟動子甲基化頻率分別為 16.7% (6/36) 和 65.6% (21/32)。GAS7 基因座缺失的頻率在位於基因上、下游兩微衛星序列取聯集後為 20.7% (18/87)。GAS7 蛋白質/mRNA、GAS7C 和 7B 之

mRNA/啟動子甲基化的數據彼此間都呈現統計上的顯著相關性 ( $P < 0.05$ )。利用西方轉漬膠片中相對於 GAS7C 分子量之蛋白進行膠體內水解、trypsin 反應及質譜分析，本研究證實其為 GAS7C 蛋白。同時，我們藉由不同肺細胞株一系列的基因及蛋白質實驗，我們發現 GAS7 蛋白不同 isoforms 如 GAS7C 和 7B，表達的量與細胞內的位置也都不同。**結論：**本研究證實 GAS7 基因在台灣地區肺癌形成過程中扮演一個類似抑癌基因的角色，其中 GAS7C 為主要的變異蛋白，其變異主要機制為啟動子過度甲基化及基因座缺失，而 GAS7C 蛋白則可以在生長較為緩慢之正常肺細胞表現，此研究也是首篇證實 GAS7C isoform 可以在人類細胞中表現之論文。

## 貳、英文摘要

**Purpose:** Lung cancer is the leading cause of cancer deaths in both male and female in Taiwan. Although the medical science makes rapid progress, the molecular mechanisms involved in lung tumorigenesis remain poorly defined. Alterations of oncogenes and tumor suppressor genes (TSGs) have been shown to involve in the multi-steps carcinogenesis of human cancer. Previous studies have shown that *growth arrest-specific 7 (GAS7)* gene encodes a protein involved in cell cycle regulation and cytoskeleton organization. Overexpression of *GAS7* induces cell cycle arrest and apoptosis in cell model, suggesting that *GAS7* may act as a putative TSG. Therefore, the present study is designed to further examine the alteration of protein expression, mRNA expression, promoter hypermethylation, and gene deletion of *GAS7* gene in primary lung tumors by immunohistochemistry (IHC) assay, reverse-transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) assay, bisulfite sequencing assay, and microsatellite allelotyping assay, respectively. **Results:** The frequencies of low protein expression of *GAS7* were 57.3% (43/75) using the IHC assay. Thirty-one patients had tissues available for Western blot assay and the data indicated that low protein expression for *GAS7C* and *GAS7B* were found in 48.4% (15/31) and 40.7% (11/27) in patients analyzed. Since *GAS7A* was rarely expressed in lung tumor samples, we only checked the mRNA expression for *GAS7C* and *GAS7B*. Low mRNA expression for *GAS7C* and *GAS7B* were found in 20.9% (19/91) and 32.6% (30/92) of lung tumors, respectively. The promoter hypermethylation of *GAS7C* and *GAS7B* were 16.7% (6/36) and 65.6% (21/32), respectively. High concordances were observed between low protein/mRNA expression and promoter hypermethylation for the *GAS7* gene of various isoforms

( $P < 0.05$ ). By examining mRNA and protein expressions in various lung cell lines, we found that different *GAS7* isoforms indeed expressed in different levels and at different cellular locations. For example, A549 (mainly expresses *GAS7B* protein) and IMR90 (mainly expresses *GAS7C* protein) have distinct protein localization between nucleus and cytoplasm, respectively. Since *GAS7C* had never been reported to be expressed in human cells, we performed mass spectrum analysis of trypsin digested proteins of the gel eluted from the Western blot. The protein database comparison demonstrated that the protein we identified was indeed a new isoform of GAS protein, i.e., *GAS7C*. **Conclusion:** Our data suggest that *GAS7* is a candidate TSG and its predominant inactivation mechanism is promoter hypermethylation and loss of heterozygosity of the *GAS7C* isoform. We also identify for the first time that the *GAS7C* isoform protein expresses dominantly in the growth arrest normal lung cells.

## 參、文獻總論

### 一、引言

#### (一) 研究臺灣肺癌的重要性

根據行政院衛生署最新統計資料 (中華民國九十六年臺灣地區死因統計結果) (1) 顯示：癌症一直是我國十大死因之首位，去年因癌症而死亡的人口總數為 40,306 人，占總死亡人口的 28.9%；其中肺癌又是國人主要癌症死因之首位，民國 96 年因肺癌而死亡的人數為 7,993 人，在癌症死亡率中占 19.8% 的比例。若將癌症致死的原因以性別區分來看，肺癌為男性主要癌症死因之第 2 位；但卻仍續居為女性主要癌症死因之首位。以上的資料都一再地告訴我們研究肺癌的重要性。

根據世界衛生組織 (World Health Organization) 的標準，肺癌通常分成兩大類型：小細胞肺癌 (Small cell lung cancer, SCLC) 與非小細胞肺癌 (Non-small cell lung cancer, NSCLC)。在臺灣地區，小細胞肺癌多發生於男性，且與抽菸息息相關，佔全部肺癌的 12% 到 25%；小細胞肺癌生長得很快，且容易快速的擴散到其它器官。然而非小細胞肺癌則比小細胞肺癌常見，佔全部肺癌的 75% 到 88%；非小細胞肺癌的生長較慢，其擴散轉移的發生也較慢。非小細胞肺癌根據腫瘤細胞的型態又可分成三種：肺腺癌 (Adenocarcinoma, AD)、鱗狀上皮細胞肺癌 (Squamous carcinoma, SQ) 及大細胞肺癌 (Large cell carcinoma, LC)。

非小細胞肺癌的分期可分為第一、二、三 A、三 B 和四期。第一、二其屬於局部早期發現的類別，可用外科手術開刀來做治療，此時的

治療效果最好，但手術後還是有發生轉移或復發的機率。第三、四期屬於肺癌末期，通常會很快的擴散到肺門、縱膈腔的淋巴結或胸腔附近的其它組織，也容易很快的擴散轉移到身體的其它器官，例如腦部、肝臟或骨頭、骨髓等。癌症末期無法用開刀的方式治療，必須依照病人的身體狀態和意願，接受化學治療或放射線治療，但這些末期病患對上述的治療方式大多不敏感。由於肺癌的早期症狀不明顯，因此當肺癌病人發現自己罹患肺癌時，往往肺腫瘤已經生長較大甚至發生癌細胞淋巴腺轉移或遠端轉移的現象，無法利用外科手術的方法切除治療肺部腫瘤。甚至肺癌病人治療的預後不佳，整體而言，五年的存活率僅約 13%~15%。

肺癌的成因不是單一因素，而是集合多因素造成的：如抽菸、二手菸、家族病史、曝露於環境中的致癌物質，環境中的致癌物質包括有空氣污染，吸入石棉、鎘、砷、放射性氬氣等，也都可能導致肺癌 (2-4)，近年來的研究發現，遺傳因子的改變也在肺癌形成過程中扮演重要角色，部分造成癌症的原因是由於基因變異所致，如致癌基因 (oncogene) 活性過度增加或抑癌基因 (Tumor suppressor genes, TSGs) 失去活性等原因也會導致肺癌的形成 (5-8)；但是，至於真正的分子致癌機制為何，至目前為止尚未真正明瞭。因此，研究台灣地區肺癌發生的原因，實為一項刻不容緩的工作。

## (二) 研究 GAS7 基因的重要性

目前所知，癌症形成的原因，和致癌基因活性過度增加、或是抑癌基因活性降低有關。本實驗室的先前研究結果發現許多致癌及抑癌基因都與台灣地區肺癌形成有關，包括了 *p53* 抑癌基因 (9)、*RB* 抑癌基因 (10)、*p16* 抑癌基因 (11)、*K-ras* 致癌基因 (12)、*hMSH2* 及 *hMLH1*

修補基因 (13) 等。

本研究室先前針對肺癌病人之全基因體缺失進行研究，使用了 177 個微衛星序列(Microsatellite Marker)偵測 71 位台灣非小細胞肺癌病人全基因體異質性喪失(Genome-wide LOH)，研究結果發現台灣地區非小細胞肺癌病人的基因座 17p13.1 發生 loss of heterozygosity (LOH) 的頻率為 55~60% (Fig. 1) (14)。我們搜尋位在此區域內的基因，發現了已知和癌症形成有關的基因，例如：*TP53*，證明了這個區域的缺失在癌症形成上的確扮演著重要的角色；但經過 *TP53* 基因座內微衛星分析發現其基因座的缺失比例並不高，暗示著是不是在這區域內還存在一些還沒被發現但卻重要的抑癌基因。因此我們就針對此區域作更進一步搜尋，找到了本研究所要探討的候選基因：*growth arrest-specific 7 (GAS7)*。

前人的研究結果發現，*GAS7* 基因可能與細胞週期的調控，引發細胞凋亡的現象有關 (15)。有鑒於 *GAS7* 基因對於肺癌形成的分子機轉可能相關，但是目前卻缺乏其功能上的研究，也沒有完整分析 *GAS7* 基因 DNA、mRNA 和 protein 完整資料的文獻。因此本研究冀望找出 *GAS7* 基因在細胞及肺癌病人族群之變異機制，確定 *GAS7* 變異是否為導致台灣肺癌形成之原因。



## 二、研究背景

### (一) GAS7 基因發現過程

細胞在生長的時候，DNA 的複製與細胞的分裂會按照一定的順序並且規律的進行，這樣的過程就稱為細胞週期。我們身體內所有的細胞都處於細胞週期的某個時期，例如：骨髓細胞或腸道黏膜細胞幾乎持續地處於周期性的過程，也就是說細胞不斷的進行分裂，以替代那些老化或死亡的細胞。而另一方面，完全分化的神經細胞或心肌細胞的合成前期 (G1 phase) 變得非常長，這段延長的合成前期稱為靜止期 (G0 phase, quiescent state)，也就是說它們已經離開細胞的分裂周期。處於靜止期的細胞可以開始進行終端分化 (terminal differentiation)，老化 (senescence)，或程序性細胞死亡 (programmed cell death, apoptosis)。正常的細胞經過一定次數的分裂完成分化後即已失去分裂增殖的能力，但是當細胞癌化後，使得細胞週期發生異常而失去控制；那些處於終端分化的細胞似乎又逆行回去，恢復分裂增殖的能力，因此在體內長成腫瘤。由此可知，細胞週期於體內的嚴密監控在癌症的研究與治療上是一個非常重要的課題。

*GAS* 這個基因家族最初是從小鼠的纖維母細胞 (fibroblasts)：NIH3T3 發現 (16)，其全名為：*Growth Arrest-Specific (GAS) gene*。當時利用人為的細胞培養方式，如：移除血清 (serum starvation) 或是細胞接觸抑制生長 (contact inhibition) 讓細胞進入靜止期，發現一系列的基因在停止生長的細胞中表現量上升，故將這同一時間表現的基因以 *GAS* 命名；目前 *GAS* 基因家族包括：*Gas1*、*Gas2*、*Gas3*、*Gas6*、*Gas7*、*Gas9*... 等等。*GAS* 基因家族的功能為促進神經細胞的生長或分化 (17-22)、控制細胞週期 (20, 23)、引發細胞凋亡 (24) 和調控微

絲 (microfilament) 的組織情形 (25)，GAS 基因家族分別的詳細功能如 Table 1 及 Fig. 2 所示。

GAS1 基因是從小鼠的纖維母細胞 NIH3T3 選殖出來。GAS1 基因可轉譯出一個連結在細胞膜上的蛋白質 (26)，能有效抑制癌細胞的生長 (27)，並且誘導細胞產生細胞凋亡的現象 (28-31)。將一個會在細胞內持續表現的 GAS1 質體，送入肺癌細胞株：A549 中，發現 A549 細胞無法在培養皿上形成完整的細胞群落，同時也能抑制腫瘤在新生的老鼠體內形成 (32)。由以上的實驗結果得之，GAS1 是一個典型的抑癌基因。

而 GAS2 所轉譯出來的蛋白，是微絲 (microfilament) 的組成分子。GAS2 蛋白在細胞由 G0 時期進入 G1 時期的時候，其生合成會降低、磷酸化會增加 (hyperphosphorylation)，這些現象與細胞受到 Platelet-derived growth factor 及 Para-methoxyamphetamine 刺激所產生的細胞皺摺時間一致，因此 GAS2 蛋白被認為參與在細胞由 G0 時期進入 G1 時期的微絲重組 (25)。其他研究也指出，GAS2 蛋白在細胞凋亡時，是 caspase-3 的受質。GAS2 蛋白被 caspase-3 切割後的產物能調節細胞的形狀和型態的改變 (33)。當細胞遭受 DNA 損壞的因子攻擊時，GAS2 蛋白促進由 p53 引發的細胞凋亡 (34)。以上的研究皆指出 GAS2 在細胞週期與細胞凋亡上的關鍵角色。

GAS3，又名 PMP22，可轉譯出分子量 22kDa 的穿膜 (transmembrane) 糖蛋白。神經細胞在受傷後會引發許旺細胞 (Schwann cell) 的增生，此時 GAS3 的表現量降低 (35)。將細胞中的 GAS3 基因突變後，引發許多周邊神經的遺傳疾病，而這些疾病都是許旺細胞有缺陷，造成細胞只進行增生卻不進行分化 (36, 37)。以反

轉錄病毒將 *GAS3* 送入許旺細胞中大量表現將抑制其生長 (19)。*GAS3* 除了在神經細胞表現外，同時也參與其他非神經組織的發育，如：肺臟和小腸的上皮細胞；研究指出 *GAS3* 的低表現將引發小鼠的肺癌形成 (38)。以上的研究均證實 *GAS3* 能調節細胞的生長與分化。

至於本研究所探討的 *GAS7* 基因是一種類似 *Pombe Cdc15* 蛋白質，前人以反轉錄病毒衍生基因捕捉法 (retrovirus-based gene trapping) 的技術從停止生長 (growth arrest) 的小鼠纖維母細胞 (fibroblasts)：NIH3T3 捕捉到此基因 (23, 39, 40)。它主要表現在進入終端分化的腦神經細胞，並且由小鼠多組織北方轉漬法 (multiple-tissue Northern blot) 發現，*GAS7* 基因的 mRNA 在成熟的小腦中表現特別多，且有兩段不同長度的 mRNA 產物：3kb 和 8kb。而用原位轉漬法 (*in situ* hybridization) 偵測 *GAS7* 在小鼠腦組織的表現程度，發現 *GAS7* 的 mRNA 在小腦的 Purkinje 細胞層內表現特別多；其次，在大腦皮層 (cerebral cortex) 與海馬迴 (hippocampus) 也都有 *GAS7* 的表現 (21)。

前人對於 *GAS7* 在細胞生理的功能進行研究，發現在小鼠的小腦神經細胞中，利用能和 *GAS7* 的 mRNA 專一結合的反股核苷酸 (antisense oligonucleotide) 干擾 *GAS7* 正常表現之後，將會同時抑制神經發育時軸突的形成 (neurite outgrowth)。相反的，若在小鼠神經瘤細胞中過度表現 *GAS7*，將會促進神經軸突的形成 (21)，由以上結果可知 *GAS7* 參與在小腦神經細胞的發育與成熟。*GAS7* 也與細胞骨幹 (cytoskeleton) 的 F-actin 結合，可以促進其組合 (assembly) 而改變形狀，可能參與細胞骨幹的相關功能 (41)。此外 *GAS7* 基因在神經細胞中可表現 *GAS7-A/GAS7-B* 等不同形式的蛋白，細胞及動物體接受不同的刺激後可調節產生不同的 *GAS7* 表現程度 (22, 42)。*GAS7* 在軟骨細胞生合成的路徑上也扮演重要的角色，透過 ERK1/2 和 SOX9 此

訊息傳遞路徑的活化，刺激 *GAS7* 表現，進而促進人類間葉幹細胞 (human mesenchymal stem cell) 分化成軟骨細胞 (43)。

總結上述對 *GAS7* 功能上的研究，發現其可能參與了細胞的發育、細胞的分化及抑制細胞週期的進行。然而，針對 *GAS7* 在肺組織中不同形式的表現程度、分佈情形以及其確切的細胞功能仍然不清楚；甚至是 *GAS7* 這個基因是否和癌症的形成有關也都缺乏相關的研究探討。這些疑問都仍須進一步的以實驗來驗證說明！

## (二) *GAS7* 基因之結構與功能

*GAS7* 位於人類染色體 17p13.1 的區域 (21)，全長超過 110 kb，共有 14 個 exons 組成。經過選擇性剪接 (alternative splicing) 後的 *GAS7* 可表現出不同形式的產物 (Fig. 3)，分別是實驗證明之 *GAS7A*、*GAS7B* (15) 和網站預測之 *GAS7C* [[www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)]。*GAS7* 的 isoform 三者差異來自於 5' 端數個 exon 的組成不同：從第 6 個 exon 起一直到最末端的 exon 在三者 isoforms 中是一段共同保留 (conserved) 的區域。*GAS7A* 為最短的 isoform，mRNA 由 7,773 個核苷酸組成，轉譯出的蛋白共 336 個胺基酸，分子量大小為 39 kDa。居於中間的 *GAS7B*，由 8,181 個核苷酸組成，轉譯出 416 個胺基酸，分子量大小為 48 kDa。*GAS7C* 的 mRNA 長度最長，總共有 8,211 個核苷酸組成，轉譯出一段 476 個胺基酸之蛋白質，分子量大小為 54 kDa。

*GAS7* 蛋白分為許多不同功能性的區域，從 N 端至 C 端分別為：Src homology 3 domain (SH3)、WW domain 和 C 端的 Fes/CIP4 homology domain (FCH) 所構成 (Fig. 4)。其中最被人熟知，同時也是研究的最透徹的為 FCH domain，由許多  $\alpha$ -helix 組成，呈捲狀結

構，許多具有此區域的蛋白都參與了調節細胞骨架的重新分佈；此區域可與微絲結合 (44, 45) 而構成微絲 Amino-terminal 端的 actin-binding domain (46)。FCH domain 位於 GAS7 的 C 端，三種不同的 isoforms 皆存有此區域，更顯出此區域在細胞功能上扮演調控細胞骨架的重要，例如：促進神經軸突的形成。另外，在靠近 N 端具有一個可接收訊號而引發訊息傳遞 (signal transduction) 的 WW 區域 (46)，此區域僅存在 isoforms B 和 C，當細胞誘導具有 WW domain 的蛋白過度表現時，可產生不同型態的神經軸突 (15)。至於僅存在於 isoform C 的 SH3 區域，常和其他細胞內訊息傳導蛋白發生交互作用，並扮演中介者(mediator) 的角色，帶著從接收器接受到的訊號傳遞至下游。上述的三種區域在其它能引起 protein-protein interaction 的蛋白質中都有存在，因此推測它們具有蛋白質交互作用的功能，其中 WW domain 與 SH3 domain 更具有參與訊息傳遞的潛力，因此探討 GAS7B、7C 是否扮演訊息路徑的傳遞子(messenger) 為極重要的課題；尤其以網站預測之 GAS7C 是否真的會表達在各種組織細胞，也是非常值得探討。

除了各含有不同的功能性區域外，在不同組織中表現的情形也都不同，端看其所在的組織扮演的功能而定；例如在大腦中以 GAS7A 為主要表現的 isoform，位在細胞膜邊緣利用 Carboxyl-terminal 端的功能區和肌動蛋白纖維相互連接促進其組裝，並使細胞膜向外延伸。至於其他的組織像是胎盤、乳房以及頭頸部等非神經細胞都有發現 GAS7A 與 GAS7B 的存在 (15)，意味著 GAS7 尚有其他功能等待著我們去探索。

### (三) GAS7 基因在癌症之變異情形

其它癌症之前人研究結果：自從發現了*GAS7*基因具有抑癌基因特性後，一些文獻針對這個基因進行癌症相關性研究。前人的研究報導指出，癌症病人服用 DNA topoisomerase II inhibitor 這一類的抗癌藥物之後，將導致病人基因體不穩定並發生染色體易位 (chromosomal translocation)，進而引發急性白血病 (acute myeloid leukemia) 的形成；深入探討白血病的引發機轉，發現染色體互換的結果破壞了*GAS7*基因的正常功能 (47)。

另一篇研究報告指出，*GAS7*位在一個高頻率的染色體斷裂區附近，是一個可能引發LOH的原因，而這種染色體變異常常導致腫瘤的形成 (48, 49)。另一研究觀察到，將無分化能力的神經腫瘤細胞，使其過度表現*GAS7*基因，結果可促使細胞分化出類似神經軸突的結構，暗示著*GAS7*有著使細胞趨向成熟 (differentiation) 的抑癌基因功能 (21)。例如一篇報導指出黑色素腫瘤 (melanoma) 病人中，可篩檢出*GAS7*突變的情形，若將正常的*GAS7*利用免疫療法送入腫瘤細胞時，可觀察到腫瘤細胞完全的復原回正常細胞 (50)。但在早發性的成神經管細胞 (medulloblastoma) 病人中，檢測其臨床組織檢體中*GAS7*的表現程度與染色體斷裂間的關係進行分析比對，發現*GAS7*在檢體中並無如預期呈現低表達的結果，且即使染色體 17p 有斷裂的情形，大部分 *GAS7* mRNA 仍然有表現，結果顯示 *GAS7* 在 medulloblastoma 中沒有抑癌基因的功能 (48)。目前對於*GAS7*在致癌過程中的重要性還沒有一定的說法，仍等待更進一步的研究。

肺癌相關研究結果：在 *GAS7* 基因的研究中，完全沒有對於肺癌方面的文獻報導。本實驗室先前基因體缺失的研究中，分別使用二個鄰近 *GAS7* 基因的 microsatellite marker：*D17S938* 和 *D17S974*，

它們發生 LOH 的頻率分別為：55% 和 57% (14)，而 GAS7 就位在這兩個相距 4Mb 的 marker 間，因此推斷 GAS7 可能為一個候選抑癌基因。

## 肆、研究目標

1. 確認 *GAS7* 在肺組織中主要表達的 isoform 和其細胞功能意義。
2. 探討肺癌病人 *GAS7* 基因變異情形 (altered mRNA、protein expression、LOH、promoter hypermethylation)，並探討各種變異機制與癌症形成之間的相關性。
3. 探討 *GAS7* 變異狀況和肺癌病人臨床病歷資料 (如性別、年齡、抽煙習慣、癌症種類、癌症分期) 之間的相關性。

上述三項研究，將可建立 *GAS7* 抑癌基因參與肺癌形成之機制，並瞭解其作為肺癌分子偵測的可能性。



## 伍、方法總論

### 一、研究材料

#### 1. 檢體來源及病歷資料

92 個肺癌檢體來自臺北榮總胸腔外科，其中多是屬於非小細胞肺腫瘤 (non-small cell lung cancer, NSCLC)，檢體包括 58 個肺腺癌 (Adenocarcinoma, AD) 病人、22 個鱗狀上皮細胞癌 (Squamous carcinoma, SQ) 病人，少部分為 AD、SQ 混合型或大細胞肺癌 (Large cell carcinoma, LC)。肺癌種類以及期數是根據世界衛生組織 (World Health Organization, WHO) 分類方法及 TNM system (T=primary Tumor; N=Regional Lymph Node; M=Distant Metastasis) 所分類。病歷資料尚包括病人的抽煙狀態：分為吸煙及沒吸煙族群，前者包含目前仍吸煙及戒煙兩群人。

#### 2. 肺癌細胞株

肺細胞株 IMR90、Bes2B 和肺癌細胞株 A549 培養在 37°C、5% CO<sub>2</sub> 培養箱中；培養基 DMEM 與 RPMI 內包含 10% fetal bovine serum (GIBCO BRL, Life Technology, USA) 及 1% 抗生素 (penicillin-streptomycin, GIBCO)。

### 二、GAS7 蛋白在病人檢體中的表現分析

#### (一) 西方轉漬法分析 (Western blotting analysis)

##### 1. 肺癌病人檢體蛋白質萃取：

在所收集的樣本中，共計 31 個癌組織樣本萃取之高品質蛋白質來進行分析。蛋白質萃取時，則將組織塊由液態氮取出搗碎磨成粉之

後，加入 1ml TRIZOL 溶液 (GIBCO BRL, Life Technology, USA)，之後再加入 200 $\mu$ l 的 chloroform 混勻，離心之後，上清液取出用以抽取 mRNA (步驟見下方 mRNA 萃取過程)，下層則用以萃取蛋白質。使用 100% Ethanol、isopropanol 及 0.3M Guanidine HCl/95% Ethanol 萃取，最後以酒精沉澱的步驟純化出蛋白質，每管樣本以 1% SDS 溶解，進行蛋白質定量，存放在 -80 $^{\circ}$ C 冰箱中保存備用。

## 2. 西方轉漬法 (Western Blot)

### 2.1. 蛋白質定量

採用 Bio-Rad DC (Detergent-Compatible) Protein Assay 之方法定量蛋白質濃度。取 1  $\mu$ l 的 protein sample，加入 100  $\mu$ l 的 dye 並加水至 500  $\mu$ l 混和均勻。將每一 protein sample 的混和液分兩重複加至 96 well 培養盤中，放入 ELISA reader 中測試 595nm 的吸光值。並以 0、1、5、10、15 mg/ml 的胎牛血清蛋白 (bovine serum albumin standard) 作為標準蛋白求出標準曲線，回歸分析後求出直線方程式來換算未知樣品的蛋白濃度。

### 2.2. 電泳轉漬

取 50 $\mu$ g 蛋白質加入樣品緩衝液 (2 倍 sample buffer, 包括 350mM Tris-HCl pH 6.8, 12% SDS, 0.02% bromophenol blue, 35% glycerol, 30% mercaptoethanol) 於 95 $^{\circ}$ C 煮沸 5 分鐘後，開始進行 SDS-PAGE (4% stacking gel 及 10% running gel) 膠體電泳分析。先以電壓 80 伏特進行電泳 15 分鐘後，再將電壓調至 168 伏特進行電泳 70 分鐘。

### 2.3. 免疫呈色

將 SDS-PAGE 上的蛋白質轉漬到先前用甲醇浸潤過的 PVDF 膜

上，之後將膜取出並浸泡於blocking solution (5% skim milk in TBS-T)，室溫下作用1小時後，以TBS-T (Tris Buffered saline-0.1% Tween-20) 清洗3次，每次5分鐘。加入一級抗體 anti-GAS7 (1: 200, Proteintech) 和  $\beta$ -actin (1:2000, Novus Biologicals) (詳細分析濃度及廠牌見**Table 2**)，4°C下作用至隔夜，以TBS-T清洗3次，每次5分鐘，並加入二級抗體 anti-rabbit IgG (1:5000, NOVUS Biologicals)、anti-mouse (1:5000, NOVUS)，於室溫下作用1小時後，再以TBS-T清洗3次，每次5分鐘。最後用ECL Chemiluminescent Western System (Amersham, Arlington Height, IL, USA) 試劑組加在PVDF膜上呈色，利用LAS3000 (FUJIFILM) 冷光儀照相，並利用MultiGauge軟體定量分析蛋白表達量。

### 3. 西方轉漬法之判讀標準

**GAS7C**：將 GAS7C 蛋白質色帶 (band) 表現強度和其  $\beta$ -actin 做半定量分析，若比值 $<0.5$  則判定為低表達，若比值 $\geq 0.5$  則判定為有表達。

**GAS7B**：將 GAS7B 蛋白質色帶 (band) 表現強度和其  $\beta$ -actin 做半定量分析，若比值 $< 0.5$  則判定為低表達，若比值 $\geq 0.5$  則判定為有表達。

**GAS7A**：其蛋白質色帶 (band) 與 GASC、GAS7B 及 $\beta$ -actin 比較，在肺組織幾乎無表現。

### 4. 膠體內水解 (In-gel digestion)

將電泳過後的膠體以 7% acetic acid 和 10% methanol 的固定液 (fixation solution) 浸泡 30 分鐘。固定完成後吸乾固定液，以

ddH<sub>2</sub>O 清洗一次。以 SYPRO<sup>®</sup> Ruby Protein Gel Stain (Bio-Rad) 進行染色 (需要避光) 1 小時。回收染劑，再以 7% acetic acid 和 10% methanol 的溶液來退染。將退染溶液倒去，用水取代並放入 4°C 冰箱保存。

使用事先以甲醇清洗過的 tip，在欲求知的蛋白位置上挖下蛋白質點，把膠體放入用甲醇洗淨的 1.5 ml 的 eppendorf 內。

利用 NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>/ACN 震動清洗膠粒 15 分鐘，去除所有液體後加入適量的 ACN 使膠體皺縮成白色顆粒。去除 ACN 後，加入 NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> 使膠體復水，五分鐘後加入等量的 ACN。重複此步驟三次，待膠體變白縮小後馬上去除所有液體並置入真空離心機中離心 10 分鐘，使膠體乾燥。

將還原溶液 (25mM NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> + 10mM DTT) 加入離心抽乾的膠體中，在 56°C 下靜置 45 分鐘，待冷卻至室溫後加入烷基化溶液 (25mM NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> and 55mM iodoacetamide)，避光至於室溫下 30 分鐘，去除所有溶液後以 NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>/ACN 震動清洗膠粒 15 分鐘共兩次，接著加入適量的 ACN 使膠體皺縮成白色後真空離心 10 分鐘。

膠體以真空離心機抽乾後，加入 trypsin (25mM NH<sub>4</sub>CO<sub>3</sub> with 5 ng/ml of trypsin) 溶液置於 37 °C 作用 16 小時，進行膠體內水解。

將經過 trypsin 反應的樣品離心後，加入用 100% ACN/2% TFA 配置的萃取液 100 μl。超音波震盪 10 分鐘後，取出上清液放入新的 eppendorf 中。再加入 50% ACN/1% TFA 配置的萃取液 100 μl，超音波震盪 10 分鐘後取出上清液，放入相同的 eppendorf 中。最後，將所得的樣品進行質譜分析。

## 5. 質譜分析蛋白質身份

將分析樣品與基質溶液 (  $\alpha$ -cyano-4-hydroxycinnamic acid, CHCA) 混和均勻，點於樣品探針 (sample target) 上，在室溫下以自然乾燥方式使分析物與基質形成結晶，再送入 MALDI-Q-TOF 中進行質譜分析。

將上一步驟所得之胺基酸序列，利用網站的免費生物資訊軟體 Mascot ([http://www.matrixscience.com/search\\_form\\_select.html](http://www.matrixscience.com/search_form_select.html)) 針對 NCBI 的資料庫進行 MS 比對搜尋，以鑑定出蛋白質身份。

## (二) 免疫組織染色分析 (Immunohistochemistry assay, IHC)

### 1. 組織切片染色

75 個病人樣本經福馬林浸潤，包埋在石蠟的 5 $\mu$ m 的肺癌組織切片，經 xylene 脫蠟及酒精復水後，用 primary antibody (1:200, Ab-cam, Cambridge, USA) 偵測蛋白表現，再使用 Biotinylated secondary antibody (DAKO LSAB kit K0675, DAKO, Carpinteria, CA, USA) 和 primary antibody 結合，再接以 streptavidin-horseradish peroxidase，此過氧化氫酵素會與 3-amino-9-ethylcarbazole containing hydrogen peroxide, AEC+Substrate-Chromogen 受質反應而呈色，使染色具有放大的效果，最後切片再經 hematoxylin (DAKO) 染色，使背景呈色，即以 mounting solution (ZYMED, San Francisco, CA, USA) 進行封片。所使用之抗體、廠牌、濃度列於 **Table 2**。

### 2. 染色切片之判讀標準

染色後的判讀標準：(a) 在癌組織中，細胞核和細胞質沒有紅褐色反應，但其周圍之正常細胞有，則稱為 negative expression；(b) 在癌組織中，細胞核和細胞質有紅褐色反應，則為 positive expression。

經由與實驗資料做一比對，所訂定出的判讀標準為：由於 GAS7B、GAS7C 為細胞質和細胞核蛋白。若 <50% 癌細胞質與核有紅褐色反應，則歸為 GAS7 低表達病人； $\geq 50\%$  癌細胞質與核有紅褐色反應，則歸為正常表達病人。

### 三、GAS7 基因 mRNA 在病人檢體中的表現分析

#### 1. mRNA 萃取

92 個癌組織樣本經外科手術切除癌組織塊及鄰近正常組織塊之後，以液態氮急速冷凍。mRNA 萃取時，則將組織塊由液態氮取出搗碎磨成粉之後，加入 1ml TRIZOL 溶液 (GIBCO)，之後再加入 200 $\mu$ l 的 chloroform 及 500 $\mu$ l 的 isopropanol 萃取，以酒精沉澱的步驟純化出 RNA，每管樣本以 50 $\mu$ l 的 DEPC 水溶解，存放在 -80 $^{\circ}$ C 冰箱中保存備用；而 RNA 的濃度及純度則分別以吸光值  $A_{260}$  及  $A_{260/280}$  的比值 (1.8-2.0) 推算出來。

#### 2. 反轉錄-聚合酵素連鎖反應 (Reverse-transcriptase polymerase chain reaction, RT-PCR)

由病人之正常肺組織與肺癌組織塊所萃取出之 mRNA，經反轉錄酵素反應 (Reverse transcriptase reaction, RT) 後製成 cDNA，其過程為：總反應體積為 20 $\mu$ l，包括 200 unit 之 SuperSCRIPT<sup>TM</sup> 反轉錄酵素 (GIBCO)、40 unit 之 RNaseOUT RNA 水解酶抑制酵素、2 l 的 0.1M DTT、4 $\mu$ l 的 5 倍緩衝溶液、5 $\mu$ g 之 RNA、3 $\mu$ g 之 Random primers 和 0.5mM 之 dNTP。反應物於 42 $^{\circ}$ C 加熱 2 分鐘後，加入反轉錄酵素。先在 25 $^{\circ}$ C 反應 10 分鐘後，再置於 42 $^{\circ}$ C 反應 60 分鐘。最後以 70 $^{\circ}$ C

加熱 15 分鐘中止反應。反應完成後的產物以 80 $\mu$ l 的 DEPC 水稀釋，保存於 -20 $^{\circ}$ C 備用。GAS7 基因 mRNA 表現程度即是以 cDNA 進行 PCR，並佐以  $\beta$ -actin 基因之 mRNA 表現程度做為 internal control，其值當作此檢體基因表現的基準值，來計算所欲偵測基因片段的基因表現相對值，再利用電腦之轉換程式，算出所欲偵測之基因其 cDNA 表現量，藉此偵測 GAS7 基因 mRNA 表現情形。GAS7 PCR 產物總體積為 25 $\mu$ l，其中包含 2 $\mu$ l cDNA，Gold 10XPCR buffer，2.5mM 的 Mgcl<sub>2</sub>，2.5mM dNTP，10 $\mu$ mol PCR 引子和 0.2 $\mu$ l 的 AmpliTaq polymerase (Perkin Elmer, Branchburg, NJ)；另外， $\beta$ -actin PCR 產物總體積為 25 $\mu$ l，其中包含 1 $\mu$ l cDNA、10XPCR buffer(Takara)、0.2mM dNTP、10 $\mu$ mol PCR 引子和 0.2 $\mu$ l Taq(Takara)，PCR 引子設計 (**Table 3** 及 **Fig. 5**) 和反應條件如下：

**GAS7C-cDNA**：95 $^{\circ}$ C、10 分鐘將雙股 DNA 打開，並讓酵素開始作用，接下來做下列步驟 33 個循環：Denature 溫度 95 $^{\circ}$ C、30 秒，引子黏合溫度 (T<sub>m</sub> 值) 61 $^{\circ}$ C、30 秒，Extension 溫度 72 $^{\circ}$ C、1 分鐘，最後 72 $^{\circ}$ C、5 分鐘結束反應。

**GAS7B-cDNA**：95 $^{\circ}$ C、10 分鐘將雙股 DNA 打開，並讓酵素開始作用，接下來做下列步驟 38 個循環：Denature 溫度 95 $^{\circ}$ C、30 秒，引子黏合溫度 (T<sub>m</sub> 值) 61 $^{\circ}$ C、30 秒，Extension 溫度 72 $^{\circ}$ C、1 分鐘，最後 72 $^{\circ}$ C、5 分鐘結束反應。

**$\beta$ -actin-cDNA**：95 $^{\circ}$ C、5 分鐘，再經 30 個循環：95 $^{\circ}$ C、30 秒，T<sub>m</sub> 值 58 $^{\circ}$ C、30 秒，72 $^{\circ}$ C、30 秒，最後 72 $^{\circ}$ C、5 分鐘結束反應。

### 3. 判讀標準

每個檢體之正常細胞和肺癌細胞的 *GAS7* cDNA 強度，以  $\beta$ -actin cDNA 強度校正後，再將肺癌細胞與正常細胞相比。

*GAS7C*：相比之後，肺癌細胞/正常細胞之值小於 0.5，則判定 *GAS7C* mRNA 為低表達。

*GAS7B*：相比之後，肺癌細胞/正常細胞之值小於 0.5，則判定 *GAS7B* mRNA 為低表達。

#### 四、*GAS7* 基因在病人檢體中的啟動子過度甲基化分析

##### 1. DNA 萃取

36 個肺癌組織樣本之組織塊及鄰近正常組織，在液態氮中分別搗碎磨成粉後，加入 800 $\mu$ l lysis buffer (10mM Tris-HCl pH8.0, 1mM EDTA, 0.1M NaCl, 0.4%SDS and 0.4mg/ml proteinase K)，水浴 56 $^{\circ}$ C，2-3 小時後，以 phenol-chloroform 萃取出上清液。再加入 RNase (40 $\mu$ g/ml)，56 $^{\circ}$ C，45 分鐘；proteinase K (0.2 mg/ml) 及 SDS (0.1%)，56 $^{\circ}$ C，45 分鐘後，利用 phenol-chloroform 以及酒精沉澱的步驟純化出 DNA，每管樣本以 50 $\mu$ l 的無菌水溶解，存放在-80 $^{\circ}$ C 冰箱中保存備用。

##### 2. Bisulfite-sequencing PCR, BSP assay

將 DNA 用 sodium bisulfite 處理之後，若此 DNA 之 CpG islands 沒有甲基化，則 cytosines 便會轉變為 uracil；反之，若此 DNA 之 CpG island 有甲基化的話，則 cytosines 便不會轉變為 uracil；因此，經過 sodium bisulfite 處理的甲基化與沒有甲基化之 DNA 序列是不同的。設計不同之引子 (**Table 3**) 在 *GAS7* 基因啟動子內不含 CpG islands 的位置，將可能被甲基化的 CpG islands 夾出，最後把 PCR



產物定序以判讀啟動子是否有過度甲基化的情形。PCR 產物總體積為 25 $\mu$ l，其中包含 3 $\mu$ l DNA，Gold 10XPCR buffer，2.5mM 的 MgCl<sub>2</sub>，2.5mM dNTP，10 $\mu$ mol PCR 引子和 0.2 $\mu$ l 的 TitaniumTaq polymerase (Perkin Elmer, Branchburg, NJ)；第二次 PCR 反應是取前一次的 PCR 產物 0.5  $\mu$ l 當作反應物來進行。PCR 反應條件如下：

**GAS7C-BSP (outer)**：95°C、10 分鐘，再經 40 個循環：95°C、30 秒，Tm 值 61°C、30 秒，72°C、1 分鐘，最後 72°C、5 分鐘結束反應。

**GAS7C-BSP (inner)**：95°C、10 分鐘，再經 40 個循環：95°C、30 秒，Tm 值 65°C、30 秒，72°C、30 秒，最後 72°C、5 分鐘結束反應。

**GAS7B-BSP (outer)**：95°C、10 分鐘，再經 40 個循環：95°C、1 分鐘，Tm 值 61°C、1 分鐘，72°C、1 分鐘 30 秒，最後 72°C、5 分鐘結束反應。

**GAS7B-BSP (inner)**：95°C、10 分鐘，再經 40 個循環：95°C、1 分鐘，Tm 值 61°C、1 分鐘，72°C、30 秒，最後 72°C、5 分鐘結束反應。

### 3. 判讀標準：

**3.1 GAS7C**：比較 CpG island 中，C peak 和 T peak 高度的比值。當  $T/C > 1/2$ ，則計算為 1 個 unmethylation。當  $T/C \leq 1/2$  時，則計算為 1 個 methylation。此段檢查的區域共有 3 個 CpG island，當 methylation sites /3  $\geq$  2/3，則判斷此病人的 promoter 為甲基化狀態。

**3.2 GAS7B**：比較 CpG island 中，C peak 和 T peak 高度的比值。當  $T/C \geq 1/2$ ，則計算為 1 個 unmethylation。當  $T/C < 1/2$  時，則計算為 1 個 methylation。此段檢查的區域共有 5 個 CpG island，當 methylation sites /5  $\geq$  3/5，則判斷此病人的 promoter 為甲基化狀態。

## 五、GAS7 基因在病人檢體中的 LOH 分析

### 1. 微衛星序列 (microsatellite markers)

本實驗室之前的研究，利用微衛星序列針對非小細胞肺癌病人進行廣泛性的 LOH 分析，發現在染色體上有許多微衛星序列發生了相當高頻率的 LOH( $\geq 50\%$ )，這些區域中也包含了 GAS7 基因所在的位置 (Fig. 1)。於是本研究更進一步的挑選了 GAS7 基因內的微衛星序列：AFMA070WD1 和 D17S945 (Table 3)，來分析是否在 GAS7 基因的區域內也會發生異質性缺失的現象。

### 2. LOH 分析

用來分析 LOH 區域的微衛星序列先進行 PCR 放大反應，所使用的引子 (primer) 在其 5'端有螢光標定物。過程如下：總反應體積為 20  $\mu$ l，包含 100 ng DNA，5 pmol PCR 引子，2.5mM dNTP，10 倍緩衝溶液，以及 0.5 unit AmpliTaq polymerase。PCR 反應條件為：95°C、10 分鐘，再經 30 個循環：95°C、30 秒，Tm 值 61°C、30 秒，72°C、30 秒，最後 72°C、5 分鐘結束反應。

Genetic profiler 所呈現的圖形，橫軸代表 PCR 產物的片段長度，縱軸代表所偵測到的螢光強度，亦即 PCR 產物的量。在肺癌病人的正常肺組織 DNA 若可以明確區分出兩個對偶基因 (allele) (N1,N2)，則此檢體稱為 informative case，如果該病人的肺癌組織 DNA 在該處沒有發生缺失，則同樣可看見兩個對偶基因 (T1,T2)。但在 informative case 的例子中，肺癌組織的其中一個對偶基因明顯發生了缺失，這樣的情形稱為 LOH。LOH 發生與否的判讀公式為： $(N1 \text{ 面積}/N2 \text{ 面積})/(T1 \text{ 面積}/T2 \text{ 面積})$ ，當計算結果大於等於 2 或小於等於 0.5，也就

是 T1 或 T2 的面積減少 50% 以上，則判定此病人的肺癌細胞 DNA 在此微衛星序列區域發生了 LOH (14)。

LOH 發生頻率的計算方式如下：以單一微衛星序列為單位，將有發生 LOH 的肺癌病人數目除以可提供資訊 (informative) 的肺癌病人數目，所得之比例即為 LOH 頻率，LOH 頻率高的微衛星序列，表示該區域在肺癌組織中經常發生染色體缺失的情形。

## 六、GAS7 基因/蛋白在肺細胞株內的表現情形

### (一) 細胞培養

細胞株 IMR90 和 A549 以培養基 DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) 培養，Bes2B 以培養基 RPMI (Rosewell Park Memorial Institute) 培養。培養箱的條件設定在 37°C、5% CO<sub>2</sub>；細胞株以倒立式顯微鏡觀察，當細胞長滿為單層 (monolayer) 時，即可進行繼代培養 (subculture)。在無菌操作台 (laminar flow) 內，以抽氣機吸去上層液，再以 5 ml phosphate-buffered saline (PBS) 洗細胞兩次，吸去 PBS 並加 1 倍 trypsin-EDTA 1ml，前後左右搖晃培養皿使 trypsin 均勻分散於細胞層，並置於培養箱中約 2~3 分鐘後，搖晃培養皿同時以倒立式顯微鏡觀察，待細胞層脫落並浮起時，取適當比例的細胞於新的培養基中 (total value 8ml)，以十字型搖散細胞，培養在培養箱中；約 2-3 天細胞株長滿，即可再行繼代培養。

### (二) 肺細胞株 GAS7 基因/蛋白的表現

#### 1. 細胞株蛋白質的抽取、定量及分析

將取下的細胞加入適量RIPA [50mM Tris pH8.0, 150mM NaCl, 0.5% sodium deoxycholate, 0.1% SDS, 1% Triton X-100, 5mM phenylmethylsulphonyl fluoride (PMSF), 10mg/ml leupeptin, 20mM sodium phosphate pH7.0] 溶解後，使用細胞刮取器 (scraper) 取下所有細胞，在4°C 旋轉混勻10分鐘後，於4°C 離心13,000rpm 10分鐘；取上清液 400μl，進行蛋白質定量，剩餘蛋白質分裝後保存於-20°C。蛋白質的定量及分析分法和癌組織蛋白的分析法相同。

## 2. 細胞株mRNA的抽取、定量及分析

細胞株 mRNA 的抽取、定量及 RT-PCR 方法同方法三中 GAS7 基因 mRNA 分析。

### (三) 細胞免疫染色 (Immunocytochemical analysis, ICC)

將細胞種於 6-cm 培養基上操作以下步驟。移除培養液以 1x PBS 沖洗兩次，利用冰甲醇於 -20°C 固定 20 分鐘，移除甲醇並放於室溫下讓甲醇完全揮發乾燥。接著於室溫下利用 PBS-T (1x PBS, 0.1% tween-20) 復水 10 分鐘兩次，移除 PBS-T，用油性色筆 (Dacopan) 圈選適當的區域。以一級抗體，GAS7 (1:100, Ab-cam) 於37°C 下作用 1 小時，再以 PBS-T 沖洗兩次，每次 5 分鐘。之後以二級抗體 anti-rabbit (1:200, Chemicon) 於 37°C 下避光作用 30 分鐘。染二級抗體的同時可加入 DAPI 染細胞核。以 PBS-T 沖洗兩次，每次 5 分鐘。利用螢光顯微鏡觀察結果並拍照。

## 七、統計分析

以分析的結果將病人區分為變異組與正常組，利用 Pearson  $\chi^2$

test，分析 92 個肺癌病人其 *GAS7* 啟動子過度甲基化、mRNA 之表現情形及蛋白異常表現與各種病理分類（包含性別、癌症種類、癌症分期、抽煙狀況）關係的統計分析；其中癌症分期之 Stage I、II 定義為較早期的病人族群，Stage III、IV 定義為較晚期的病人族群；而抽煙狀況則分為有抽煙和沒抽煙兩個族群，有抽煙者包含目前仍在抽煙和已戒煙者，所有分析作業均以 SPSS (11.0 版) 軟體進行。

## 陸、結果

### 一、探討肺細胞株 GAS7 基因 mRNA/蛋白的表現情形

#### (一) GAS7 基因 mRNA/蛋白在各種不同肺細胞株內的表現情形

在 NCBI 網站上搜尋到的資料顯示，GAS7 基因經過選擇性剪接形成三種 mRNA 的產物，分別是 GAS7A、GAS7B 和 GAS7C；因此使用相對於各種 isoform 之引子 (Table 3) 來偵測細胞株 GAS7A、GAS7B 和 GAS7C mRNA 的表現情形，其代表圖見 Fig. 6A。GAS7C 的 mRNA 在 A549 的表現量微弱，其他的細胞株都能看到明顯的 PCR 產物。GAS7B 的 mRNA 在每個細胞株都可偵測到 GAS7B 的 mRNA。至於 GAS7A 的 mRNA 在 IMR90 和 A549 細胞株可看到 PCR 產物，然而 Bes2B 卻沒有偵測到 GAS7A 的 mRNA。

GAS7 蛋白在細胞株的表現方面，不同的細胞株以相同的 GAS7 抗體 (1:200, proteintech group, inc.) 來偵測細胞內 GAS7 的蛋白含量，其代表圖見 Fig. 6B。在 NCBI 網站上搜尋到的 GAS7 基因顯示，其蛋白產物有三種不同分子量的 isoform，分別是 GAS7A：38 kDa，GAS7B：48 kDa 和 GAS7C：54 kDa；我們可以發現：的確在蛋白質的層級上，我們也可以看到細胞能夠表現 GAS7B 和 GAS7C 的 isoform；並且在不同細胞株內，GAS7 蛋白的 isoform 表現量也都不同。值得一提的是，正常肺細胞株 IMR90 與類似正常的肺細胞株 Bes2B，GAS7 蛋白的表現都以 GAS7C 為主；至於肺癌細胞株：A549，它的 GAS7 蛋白表現則以 GAS7B 為主。而 GAS7A 的蛋白在肺臟中表現量不多，甚至不表現。

## (二) GAS7C 表達的確認

GAS7 蛋白產物有三種不同分子量的 isoform，分別是 GAS7A：38 kDa，GAS7B：48 kDa 和 GAS7C：54 kDa；在前面細胞株的西方轉漬膠圖結果顯示，IMR90 在大約 54 kDa 和 48 kDa 的位置的確看到有蛋白質的色帶。由於 GAS7C 的蛋白在人類細胞的表現，僅有 NCBI 的預測，並無相關的實驗證明。為了確定在西方轉漬法使用的抗體在 GAS7C 相對位置呈色的蛋白色帶真的是 GAS7C，我們進一步挑選 GAS7C 蛋白表現最多之 IMR90 細胞，在相對應的位置 (54 kDa) 作膠體內水解 (in-gel digestion) (Figs. 7 A, B)，並將 trypsin 水解後的蛋白進行質譜分析 (MALDI-Q-TOF)，所得到的分析結果利用 Mascot 網站作蛋白質鑑定。我們鑑定了 IMR90 細胞株在相同位置的蛋白點作兩重複，所得的結果代表圖見 Fig. 7C。在 IMR90 的蛋白點裡面，的確比對到 GAS7C 的蛋白存在。由此可確定 GAS7C 蛋白的確會表現在人類正常肺細胞。

## (三) GAS7 蛋白在肺細胞株 IMR90 及 A549 分佈的情形

利用細胞免疫染色的方法來觀察細胞內 GAS7 蛋白的分佈情形，其代表圖見 Fig. 8。兩個細胞株皆使用相同的 GAS7 抗體 (1:200, Abcam, Cambridge, USA) 處理，再以有接紅螢光的 anti-GAS7 二級抗體加以染色，因此用螢光顯微鏡觀察細胞內的 GAS7 蛋白會呈現紅色的反應。至於細胞核的部分，我們使用 DAPI 染劑使之呈現藍色的反應。經過染色後，我們可以發現：A549 細胞內紅色的地方分佈在細胞核外 (與 DAPI 的染色比對)，細胞核看起來有中空的感覺 (綠色箭頭所指)，因此推論 A549 內生性的 GAS7 蛋白 (以 GAS7B 為主) 大多分佈在細胞質中。而 IMR90 細胞內紅色的地方遍佈整個細胞內，因

此推論 IMR90 內生性的 GAS7 蛋白質 (以 GAS7C 為主) 不僅分佈在細胞質，同時也分佈在細胞核中。

## 二、探討臺灣地區肺癌病人 GAS7 基因/蛋白之變異情形

### (一) GAS7 蛋白表達情形與病歷資料相關性

我們使用 GAS7 的抗體 (1:200, Abcam, Cambridge, USA)，用免疫組織染色的方法，分析 75 位有病理切片的非小細胞肺癌病人的癌組織切片之 GAS7 蛋白表現，染色代表圖見 **Fig. 9 A-D**。實驗結果顯示：在分析的 75 個檢體中，有 57.3% (43/75) 的病人，其癌組織切片之癌細胞的細胞核和質的褐色反應小於 50%，判定為 GAS7 蛋白低表達或不表達的病人。GAS7 蛋白的表現量的結果與病歷資料作統計分析之後，發現 GAS7 蛋白低表達或不表達的情形，與病人之性別、年齡、抽煙狀況、癌症種類、癌症分期間並無明顯相關性 (**Table 4**)。

由於免疫組織染色的方法只能觀察到 GAS7 蛋白的整體表現，而無法觀察各種 isoform 的表現情形。因此，在所收集的 75 個非小細胞肺癌病人樣本中，挑選 31 個癌組織樣本萃取高品質之蛋白質。利用西方轉漬法，分析此 31 位病人的癌組織的 GAS7 isoform 蛋白表現，蛋白分析代表圖見 **Fig. 10A**。實驗結果顯示：我們可以在圖上看到二條不同大小的蛋白，按分子量排序，由大到小分別是 GAS7C 和 GAS7B。然而，我們在病人的正常組織和癌組織內都沒有發現 GAS7A 蛋白的表現。在 GAS7C 蛋白表現的部分，有 48.4% (15/31) 的病人其 GAS7C 的蛋白呈現低表達的情形；在 GAS7B 蛋白表現的部分，有 40.7% (11/27) 的病人，其 GAS7B 蛋白呈現低表達



的情形。將 GAS7C 與 GAS7B protein 低表現的情形取聯集，則低表現頻率可達 46.2% (12/26)。

將 GAS7C 或 GAS7B 蛋白低表現的結果與病歷資料作統計分析之後 (**Table 4**)，發現 GAS7C 或 GAS7B 蛋白低表達或不表達的情形，容易發生在鱗狀上皮細胞癌的病人族群中，在統計上達顯著的相關性 ( $P=0.045$ )。利用卡方方法分析 GAS7B 及 GAS7C 西方轉漬法偵測蛋白質表現與免疫組織染色的方法之差異度。統計結果顯示，GAS7B 及 GAS7C 西方轉漬法判讀為蛋白質低表現者，免疫組織染色的方法亦判讀為低表現之蛋白分佈，且統計上達顯著相關 ( $P=0.007$  及  $P=0.01$ ) (**Fig 10B**)。由此結果推測 GAS7C 或 GAS7B 蛋白低表達，可能影響 GAS7 isoform 蛋白的整體表現。

## (二) GAS7 mRNA 表達情形與病歷資料相關性

利用 RT-PCR 方法，分析 92 位 NSCLC 病人癌組織及其鄰近正常組織 GAS7 mRNA 表達情形。引子設計在 GAS7 mRNA 的 5'端，來區分二種主要的 mRNA isoforms GAS7C 及 GAS7B；詳細的引子位置和 PCR 產物片段大小，如 **Fig. 5** 所示，RT-PCR 之代表圖見 **Fig. 11**。實驗結果顯示：在 92 位病人中，GAS7C 和 GAS7B 的 mRNA 低表達或不表達的頻率分別為 20.9% (19/91) 和 32.6% (30/92)；若將 GAS7C 與 GAS7B mRNA 低表現的情形取聯集，則低表現頻率可達 45.1% (41/91)。另外，將 GAS7C 或 GAS7B 的 mRNA 低表現結果與病歷資料作統計分析之後 (**Table 5**)，發現 GAS7C 或 GAS7B mRNA 低表達或不表達的情形，容易發生在年紀較大 (>65 歲) 的病人族群中，在統計上接近顯著的相關性 ( $P=0.051$ )；並且和抽煙的病人及鱗狀上皮細胞癌有接近統計顯著性的相關性存在 ( $P=0.055$ )。

### (三) *GAS7* 基因啟動子過度甲基化情形與病歷資料相關性

由於 mRNA 低表現常是因為基因之啟動子過度甲基化所致，所以本研究以 bisulfite sequencing PCR (BSP) 的方法來鑑定較不表現之 *GAS7C* 與 *GAS7B* 之啟動子甲基化狀態。設計不同之引子，分別來增量 *GAS7C* 和 *GAS7B* 的啟動子內包含 CpG islands 之 DNA 區域後，所得的 PCR 產物，經過定序後加以分析 CpG islands 之甲基化狀態。BSP 代表圖見 **Fig. 12**。實驗結果顯示：經過挑選並分析的 36 位病人中，16.7% (6/36) 病人的 *GAS7C* 基因啟動子有過度甲基化的情形；65.6% (21/32) 病人的 *GAS7B* 基因啟動子有過度甲基化的情形。另外與病人的病歷資料作統計分析之後，發現 *GAS7* 基因啟動子過度甲基化情形，與病人的年齡、性別、抽煙狀況、癌症分期間並無明顯相關性存在 (**Table 6**)。

### (四) *GAS7* 基因的異質性喪失分析 (loss of heterozygosity, LOH)

由於 *GAS7* 基因位在一個染色體不穩定的區域，並且 mRNA 低表現也有可能是因為與基因座缺失有關，因此本研究進一步以 LOH 方法分析 *GAS7* 基因座缺失的情形。在 LOH 分析實驗中，使用分別為在 *GAS7* 基因座內 5' 及 3' 端的兩個微衛星序列 (AFMA070WD1、D17S945)，針對 92 個 NSCLC 病人的 *GAS7* 基因區域進行分析 (**Fig. 13**)。結果顯示，這兩個微衛星序列 AFMA070WD1、D17S945 在 92 個病人中的 LOH 頻率分別是：5.5% (4/73) 和 16.3% (14/86)，若以 AFMA070WD1 或 D17S945 任一缺失判定 *GAS7* 基因座缺失，則缺失的頻率可達 20.7% (18/87)。

### (五) *GAS7* mRNA、蛋白不表達與啟動子甲基化間之相關性

利用 Pearson  $\chi^2$  test 分析 GAS7 mRNA、蛋白不表達與啟動子甲基化之間之相關性研究，代表圖見 **Fig. 14**。首先分析 GAS7B 或 GAS7C mRNA 的表現情形與 GAS7 蛋白表達之間的相關性：在 GAS7B 或 GAS7C mRNA 有表達/GAS7 蛋白亦有表達，和 GAS7B 或 GAS7C mRNA 低表達/GAS7 蛋白亦低表達的病人佔全部之 65.3% (49/75)，二者間達顯著相關性 (**Fig. 14A**,  $P=0.004$ )，顯示 GAS7 mRNA 與蛋白表達情形有相當大的一致性。而在 GAS7C、7B 啟動子過度甲基化與否和 mRNA 表達情形的一致性方面：發現 GAS7C 啟動子過度甲基化/mRNA 低表達，與啟動子沒有過度甲基化/mRNA 有表達的病人佔全部之 80.6% (29/36)，二者間達顯著相關性 (**Fig. 14B**,  $P=0.038$ )；GAS7B 啟動子過度甲基化/mRNA 低表達，與啟動子沒有過度甲基化/mRNA 有表達的病人佔全部之 71.9% (23/32)，二者間達顯著相關性 (**Fig. 14B**,  $P=0.004$ )，這顯示了 GAS7 mRNA 的表達情形和啟動子甲基化的情形有相當大的一致性。

## 柒、討論

癌症，一直是國人十大死因的首要原因；在這麼多癌症當中，又以肺癌的致死比例最高，並且有逐年增加的趨勢。根據衛生署最新統計，肺癌在國人癌症排行中，男性居第二，女性居首位 (1)。肺部是一個與空氣直接接觸的臟器，空氣污染物容易進入肺臟，再加上許多肺癌患者有抽煙或接觸環境中致癌因子的情形，長期受到致癌因子的刺激，而造成細胞無限制的增生與擴散，就可能導致癌細胞的形成。

由於肺癌難以早期偵測，開刀成功率或化療效果皆不理想，而預後情況差，通常診斷發現時已屆末期，導致死亡率偏高。因此，越來越多科學家致力於癌症致病機轉的研究，相關的發現也越來越多，其中又以抑癌基因與致癌基因的發現最為重要。這些基因在正常的情況下運作，能適當的調控細胞的生長、分化與死亡。但在許多的癌症病人中，發現這些基因產生變異，包括了致癌基因的蛋白過度表現，或是抑癌基因的功能喪失。其中，抑癌基因變異的原因包含了突變、基因大片段缺失、以及屬於表遺傳(epigenetic)變異的啟動子過度甲基化。因此，癌症變異的分子機轉成為相當值得研究的課題。

有鑑於此，本實驗室針對了台灣地區肺癌病人之全基因體缺失進行研究，使用了 177 個微衛星序列偵測 71 位台灣非小細胞肺癌病人全基因體異質性喪失。研究結果發現有 11 個區域的微衛星序列具有很高的 LOH 頻率( $\geq 50\%$ )，我們認為在這些區域中可能存在和肺癌發生有關的基因。而 *growth arrest-specific 7 (GAS7)* 所在的基因座

17p13.1 剛好就位在這些區域中，二個鄰近 *GAS7* 基因的 microsatellite marker：*D17S938* 和 *D17S974*，它們發生 LOH 的頻率分別為：55% 和 57% (14)，*GAS7* 就位在這兩個相距 4Mb 的 marker 間，因此推斷 *GAS7* 可能為一個候選抑癌基因。因此，此篇研究主要針對臺灣地區肺癌病人進行 *GAS7* 基因變異的研究，我們針對 92 位台灣 NSCLC 病人的 *GAS7* 基因之蛋白質、mRNA 表現情形、啟動子甲基化和 *GAS7* 基因內異質性缺失等，做一完整的探討，並且與病人病歷資料做統計分析。

在 *GAS7* 的基因的蛋白質層級方面，我們首先在 92 位病人中挑選了 31 個病人的肺癌組織，萃取其蛋白質後執行西方轉漬法分析。我們發現了肺癌病人的組織中的確有 *GAS7* 的蛋白表現，並且可看到許多大小、粗細不一的 bands，按照網站上預測的分子量大小，我們可以比對出 *GAS7* 相對應的兩種 isoforms，由大而小分別是：*GAS7C* 和 *GAS7B*；同時，按照 bands 的粗細可以大略知道它們在組織內含量的多寡。在肺癌組織內，*GAS7C* 和 *7B* 的蛋白為主要表現的形式，而 *GAS7A* 表現量都不多，因此不足以分析其表現的高低。肺癌組織西方轉漬分析的結果顯示 *GAS7C* 不表達率高達 48.4%，而 *GAS7B* 不表達率則也有 40.7%。本研究接著針對 75 位有病理切片的 NSCLC 病人的癌組織切片，進行免疫組織染色分析 *GAS7* (*7B* and *7C*) 蛋白表現，也發現有 57.3% (43/75) 的人 *GAS7* 蛋白有低表達的情形。肺癌組織西方轉漬與免疫組織染色二種分析結果雖然呈現一些不表達比例上的差異，推測是因分析族群大小及樣本選樣差異所致。但這兩個結果建議：*GAS7* 蛋白的變異在肺癌病人中可能扮演重要的角色：因為失去了 *GAS7* 的表現，在組織細胞中無法發揮其正常生理功能，使得細胞的生長失去控制而無限制的

增生。因此，GAS7 在細胞中可能扮演一抑癌基因的角色。

接著，我們檢查病人組織中 GAS7 mRNA 的變異情形，的確，我們發現了 GAS7 的 mRNA 有低表達的情形：*GAS7C*:20.9% (19/91)，*GAS7B*：32.6% (30/92)。和免疫組織染色的結果做相關性的統計分析，顯示 *GAS7C*、*GAS7B* 的 mRNA 表達情形和 GAS7 蛋白的表達情形一致，*P* 值達到顯著相關性 ( $P=0.004$ )，也證明了 GAS7 蛋白的低表達是因為其 mRNA 的低表達所致。因此本研究繼續探討 mRNA 低表達的原因。

許多基因的不活化 (mRNA 低表現) 常是因為基因之啟動子過度甲基化所致。因此，我們針對了可能被甲基化的啟動子區域，做了 bisulfite-sequencing (BSP) 分析。經過隨機挑選所分析的 36 位病人中，16.7% (6/36) 病人的 *GAS7C* 基因有啟動子甲基化情形；65.6% (21/32) 病人的 *GAS7B* 基因有啟動子甲基化的情形。同樣的，此結果與 GAS7 基因 mRNA 的表達情形做了相關性統計分析之後，顯示高度的正相關性 ( $P=0.038$  for *GAS7C* ;  $P=0.004$  for *GAS7B*)。 *GAS7C* 其啟動子過度甲基化之比例僅佔 *GAS7C* 蛋白不表達數目的一半，推測造成 *GAS7C* 蛋白的低表現，應該還有其他的原因。我們推測，會不會有一部份 *GAS7C* 蛋白的低表達是因為染色體大片段缺失所造成。分析 *GAS7C* mRNA 變異情形，與異質性喪失的研究結果作統計相關性分析之後，發現 *GAS7C* mRNA 低表現的病人族群中有 25.0% (4/16) 的病人有異質性缺失的現象，推測這些低表現的病人是因為染色體大片段的缺失所造成，也間接的解釋了啟動子甲基化以外的 mRNA 低表現原因可能是 GAS7 基因座異質性喪失。

我們根據網站的資料，知道 GAS7 蛋白每一種 isoform 所具有的 functional domains 都不盡相同，這暗示了不同 isoform 在細胞內具有不同的生理功能，可能其組織特異性也不同。例如在人類的大腦中以 GAS7A 為主要表現的 isoform；至於其他的組織像是胎盤、乳房以及頭頸部等非神經細胞有發現 GAS7A 與 GAS7B 的存在 (15)。本研究所發現之 GAS7C 則為文獻首次報導確實會在人類組織中表現，並轉譯成蛋白質的 isoform (此 isoform 以往僅是網站預測之蛋白)。值得注意的是，GAS7C 在正常肺細胞株 IMR90 是主要的 isoform，推測蛋白轉譯的特異因子在肺正常細胞或組織較其他組織為高；但 GAS7C 在肺癌組織雖可表現出相當多量的 mRNA，在蛋白層級的表現量卻很少，推測可能其蛋白表現特異因子在肺癌組織較缺乏，或是其蛋白半衰期較短，GAS7 蛋白之穩定性調控與 Ubiquitination-proteosome 之相關機制都是未來值得研究的課題。

為了瞭解 GAS7C 的生理意義，我們使用免疫細胞染色法分析一肺癌細胞株 A549 (其表現以 GAS7B 為主) 與正常肺細胞株 IMR90 (其表現以 GAS7C 為主) 分析其 GAS7 蛋白在細胞的分佈。我們發現：A549 細胞株內紅色螢光的訊號主要分佈在細胞核外，因此推論 A549 內生性的 GAS7 蛋白 (也就是 GAS7B) 大多分佈在細胞質中。而 IMR90 細胞株內紅色螢光的訊號遍佈整個細胞內，因此推論 IMR90 內生性的 GAS7 蛋白質 (也就是 GAS7C) 不僅分佈在細胞質，同時也分佈在細胞核中。由於 GAS 基因家族的功能與控制細胞週期有關 (20, 23)，未來將針對其在細胞各週期，及刺激細胞進行細胞週期停滯時各個 isoforms 表現消長情形進行更深入的探討。例如：將帶有 GAS7C 和 GAS7B 完整 cDNA 序列的表現載體送入不同的細胞株內表現，觀察細胞的生長情形及細胞週期分佈的狀態有何

改變；反之，將帶有 *GAS7C* 及 *GAS7B* mRNA 序列的 siRNA 送入細胞阻斷基因表現之後，是否讓正常細胞不用附著在培養盤上也可以生長？或是增加了細胞的轉移能力？這些有關細胞株生長特性改變等相關檢測都是我們日後研究的重點。

我們未來也想在動物模式中驗證 *GAS7* 對於肺癌形成的重要性。可能的方法為：將小鼠的 *GAS7* 基因剔除 (knock out) 之後，分為兩組進行以下實驗；實驗組餵食香菸致癌物 (cigarette carcinogen)，而控制組不經任何處理。比較兩組小鼠的肺組織，在缺少 *GAS7* 正常功能的小鼠中，是否處理致癌物後的小鼠比未經處理的小鼠更容易形成腫瘤？或是形成的腫瘤更具有轉移能力？以進一步說明 *GAS7* 的抑癌功能。

由我們的實驗結果證實，*GAS7* 變異情形（尤其是 *GAS7C*）確實在肺癌形成過程中扮演一個很重要的角色。本研究也做了一個推論：有 48.4% 的肺癌病人其 *GAS7C* 蛋白不表現，而有 16.7% *GAS7C* 啟動子過度甲基化，使得一些轉錄因子 (transcription factor)、RNA 聚合酶 (RNA polymerase) 沒有辦法結合在 *GAS7C* 啟動子上，因而造成 *GAS7C* 無法進行正常的轉錄作用，使 *GAS7C* 基因 mRNA 表達量降低；而另外 25.0% 的肺癌病人其 *GAS7* 基因座則由於基因座缺失而導致基因表現異常。至於 *GAS7B* 啟動子過度甲基化高達 65.6%，但 mRNA 低表達僅為 32.6%，可能的原因是高頻率的甲基化是因為 CpG 部分甲基化，以致於 mRNA 仍能表現。未來將設計 *GAS7C*、*GAS7B* 及 *GAS7A* 之啟動子載體，分別分析其啟動子活性，以鑑定肺細胞之主要啟動子是否為 *GAS7C*。總之，我們的研究，不僅證明 *GAS7* 基因在臺灣肺癌形成過程的重要性，同時也是第一篇



在癌組織樣本中，同時探討 GAS7 各種 isoforms 彼此之間分子調控關係參與癌症形成的研究。

# 捌、附表

**Table 1. Summary of GAS gene functions.**

<b>GAS gene family</b>	<b>Functions of GAS genes</b>	<b>References</b>
GAS1	GAS1 inhibits cell growth in specific developmental stages.	Lee, K.-K., <i>et. al.</i> Dev. Biol. (2001)
GAS2	GAS2 is a microfilament-associated protein whose cleavage coincides with the apoptotic rearrangement of microfilaments.	Sgorbissa, A., <i>et. al.</i> J. Cell Sci. (1999)
GAS3(PMP22)	GAS3, a component of the myelin sheath in peripheral nerves, inhibits the growth of Schwann cells.	Suter, U. A., <i>et. al.</i> J. Neurosci. Res. (1995)
GAS6	Gas6, which is a ligand for the receptor tyrosine kinases Axl, Rse, and Mer, protects cells from apoptosis in the absence of growth stimulation.	Goruppi, S., <i>et. al.</i> . Oncogene (1999)
GAS7	The Gas7 protein is expressed predominantly in the adult mouse brain and testis, and is essential for neurite outgrowth in cultured cerebellar neurons.	Ju, Y. T., <i>et. al.</i> . Proc. Natl. Acad. Sci. (1998)
GAS9	Gas9 is a PDGF receptor that functions upon cell cycle reentry.	Lih, C.-J., <i>et. al.</i> . Proc. Natl. Acad. Sci. (1996)

**Table 2. List of antibodies used in the present study.**

<b>Protein</b>	<b>Final conc.</b>	<b>Source</b>
GAS7 for immunocytochemistry and immunohistochemistry analyses	1:200	Abcam, Cambridge, USA
GAS7 for Cell line & tissue western analyses	1:200	Proteintech Group, Inc. Chicago, USA
$\beta$ -actin	1:2000	Novus Biologicals, Littleton, USA

**Table 3. List of primer sequences used in the present study.**

Gene	primer	5'→3' sequences	PCR size (bp)	T <sub>m</sub>	Cycle number
GAS7A-cDNA	Forward	CTGGCCCAGAATATGGTGACTTAGG	555	65°C	38
	Reverse	CTTGGCAGAGAACTTGAGGTGAACTTC			
GAS7B-cDNA	Forward	ACTGGAGCGGATTTGGAAGGAACT	321	61°C	38
	Reverse	GGTGGAAAGGATGACCGTCTGGCT			
GAS7C-cDNA	Forward	CGAGCTACGTGCAGTTGCT	281	61°C	36
	Reverse	CATGTGGGCAGTCTCTGGAG			
β-actin	Forward	GGCGGCACCACCATGTACCCT	201	58°C	30
	Reverse	AGGGGCCGGACTCGTCATACT			
GAS7B-BSP (outer)	Forward	TTGTGATTTTTAGGTTTTTTTTTAGTG	729	61 °C	40
	Reverse	CCTAAAACCCTCAAACCTCAACACCA			
GAS7B-BSP (inner)	Forward	TTGTGATTTTTAGGTTTTTTTTTAGTG	282	61°C	35
	Reverse	AAAAATATTTTAACCAACTTCCTCC			
GAS7C-BSP (outer)	Forward	TTTATGGAGTAGATTAGTAAAGAAATTAAG	658	61 °C	40
	Reverse	CAAAAAAACCTATCACTAAAAAAA			

GAS7C-BSP (inner)	Forward	TGGAGAGTAGGGATTGGTTTAAATGAT	316	65 °C	38
	Reverse	CCTAAACCCAACAACCTAATAACAAC			
GAS7-LOH (AFMA070WD1)	Forward	AGCTGTGATTGCACCAC	139	56 °C	35
	Reverse	CATGCGGAAGTTTGTTG			
GAS7-LOH (D17S945)	Forward	AACCAATCTGGACTCCCC	186-208	56 °C	35
	Reverse	CCTGAAGCCTGACCCC			

**Table 4. Alterations of GAS7C or GAS7B protein expression in relation to clinicopathological parameters of resected primary lung tumors<sup>a</sup>.**

Characteristics		<u>GAS7-immunohistochemistry</u>				<u>GAS7C or GAS7B low expression</u>			
		total	+	-- (%)	P value	total	+	-- (%) <sup>c</sup>	P value
Overall <sup>b</sup>		75	32	43 (57.3)		26	14	12 (46.2)	
age	<65	28	12	16 (57.1)	0.979	6	3	3 (50.0)	0.829
	>65	47	20	27 (57.4)		20	11	9 (45.0)	
gender	male	58	25	33 (56.9)	0.888	5	3	2 (40.0)	0.759
	female	17	7	10 (58.8)		21	11	10 (47.6)	
Smoking habit	smoker	44	20	24 (54.5)	0.965	18	8	10 (55.6)	0.136
	Nonsmoker	13	6	7 (53.8)		2	2	0 (0.0)	
Tumor type	AD	48	23	25 (52.1)	0.244	13	10	3 (23.1)	<b>0.045</b>
	SQ	16	5	11 (68.8)		11	4	7 (63.6)	
Tumor stage	I+II	44	19	25 (56.8)	0.914	14	8	6 (42.9)	0.716
	III+IV	31	13	18 (58.1)		12	6	6 (50.0)	

<sup>a</sup> These results were analyzed by Pearson  $\chi^2$  test.

<sup>b</sup> Total number of Western blot sample in GAS7C and GAS7B is less than the overall number analyzed because only 26 patients were available for tissue Western analysis of both GAS7C and GAS7B.

<sup>c</sup> The alteration frequency in the parentheses include the patients with GAS7C or GAS7B low expression.

**Table 5. Alterations of *GAS7C* or *GAS7B* mRNA expression in relation to clinicopathological parameters of resected primary lung tumors<sup>a</sup>.**

Characteristics	GAS7C or GAS7B low expression			P value	
	total	+	-- (%) <sup>c</sup>		
Overall <sup>b</sup>	91	50	41 (45.1)		
age	<65	32	22	10 (31.3)	<b>0.051</b>
	>65	59	28	31 (52.5)	
gender	male	69	37	32 (46.4)	0.654
	female	22	13	9 (40.9)	
Smoking habit	smoker	53	28	25 (47.2)	0.150
	Nonsmoker	18	13	5 (27.8)	
Tumor type	AD	57	35	22 (38.6)	0.199
	SQ	22	10	12 (54.5)	
Smokers	AD	27	19	8 (40.0)	<b>0.055</b>
	SQ	21	9	12(60.0)	
Tumor stage	I+II	49	27	22 (44.9)	0.974
	III+IV	42	23	19 (45.2)	

<sup>a</sup> These results were analyzed by Pearson  $\chi^2$  test.

<sup>b</sup> Total number of sample in some categories is less than the overall number analyzed because some patients do not have clinical information for analysis.

<sup>c</sup> The alteration frequency in the parentheses include the patients with GAS7C or GAS7B low expression.



**Table 6. Alterations of *GAS7* promoter hypermethylation in relation to clinicopathological parameters of resected primary lung tumors<sup>a</sup>.**

Characteristics	total	<u>GAS7C</u>			P value	total	<u>GAS7B</u>			
		+	(%)	--			+	(%)	--	P value
Overall <sup>b</sup>	36	6	(16.7)	30		32	21	(65.6)	11	
age	<65	11	1	(9.1)	0.418	11	7	(63.6)	4	0.864
	>65	25	5	(20.0)		21	14	(66.7)	7	
gender	male	28	5	(17.9)	0.720	23	16	(69.6)	7	0.453
	female	8	1	(12.5)		9	5	(55.6)	4	
Smoking habit	smoker	22	4	(18.2)	0.195	20	13	(65.0)	7	0.901
	Nonsmoker	8	0	(0.0)		8	5	(62.5)	3	
Tumor type	AD	21	2	(9.5)	0.482	23	15	(65.2)	8	0.494
	SQ	11	2	(18.2)		6	3	(50.0)	3	
Tumor stage	I+II	21	3	(14.3)	0.650	20	14	(70.0)	6	0.501
	III+IV	15	3	(20.0)		12	7	(58.3)	5	

<sup>a</sup> These results were analyzed by Pearson  $\chi^2$  test.

<sup>b</sup> Total number of sample in GAS7B is less than 38 because some samples showing problems during bisulfite sequencing assay.

## 玖、附圖

## 拾、參考文獻

1. Department of Health, The executive Yuan, Republic of China. General Health Statistics, 2008. In: Health and Vital Statistics, Republic of China. R. O. C. Press, Taipei, <http://www.doh.gov.tw/statistic/index.htm>
2. Lee CS Cooper WA. Asbestos exposure and lung cancer. *Pathology*, 36:513-514, 2004.
3. De Vuyst P, Dumortier P, Jacobovitz D, Emri S, Coplu L, Baris YI. Environmental asbestosis complicated by lung cancer. *Chest*, 105:1593-1595, 1994.
4. Samet JM. Environmental causes of lung cancer: what do we know in 2003? *Chest*, 125:80S-83S, 2004.
5. Sun JL, He XS, Yu YH, Chen ZC. Expression and structure of BNIP3L in lung cancer. *Ai Zheng*, 23:8-14, 2004.
6. Sasaki M, Sugio K, Kuwabara Y, Koga H, Nakagawa M, Chen T, Kaneko K, Hayashi K, Shioyama Y, Sakai S, Honda H. Alterations of tumor suppressor genes (Rb, p16, p27 and p53) and an increased FDG uptake in lung cancer. *Ann Nucl Med*, 17:189-196, 2003.
7. Sozzi G, Pastorino U, Moiraghi L, Tagliabue E, Pezzella F, Ghirelli C, Torielli S, Sard L, Huebner K, Pierotti MA, Croce CM, Pilotti S. Loss of FHIT function in lung cancer and preinvasive bronchial lesions. *Cancer Res*, 58:5032-5037, 1998.
8. Wang YC, Lu YP, Tseng RC, Lin RK, Chang JW, Chen JT, Shih CM, Chen CY. Inactivation of hMLH1 and hMSH2 by promoter methylation in primary non-small cell lung tumors and matched sputum samples. *J Clin Invest*, 111:887-895, 2003.
9. Wang YC, Chen CY, Chen SK, Cherng SH, Ho WL, Lee H. High frequency of deletion mutations in p53 gene from squamous-cell lung cancer patients in Taiwan. *Cancer Res*, 58:328-333, 1998.
10. Chen JT, Chen YC, Chen CY, Wang YC. Loss of p16 and/or pRb protein expression in lung cancer: an immunohistochemical and prognostic study. *Lung Cancer*, 31:163-170, 2001.
11. Chen JT, Chen YC, Wang YC, Chen CY, Wang YC. Alterations of the p16ink4a gene in resected non-small cell lung tumors and exfoliated cells within sputum. *Int J Cancer*, 98:724-731, 2002.
12. Wang YC, Lee HS, Chen SK, Yang SC, Chen CY. Analysis of K-ras gene mutations in lung carcinomas in Taiwan—Correlation with histological subtype and clinical outcome. *J Cancer Res Clin Oncol*, 124:517-522, 1998.

13. Wang YC, Lu YP, Tseng RC, Lin RK, Chang JW, Chen JT, Shih CM, Chang GC, Chen CY. Inactivation of hMLH1 and hMSH2 by promoter methylation in primary non-small cell lung tumors and matched sputum samples. *J Clin Invest*, 111: 887-895, 2003.
14. Tseng RC, Chang JW, Hsien FJ, Chang YH, Hsiao CF, Chen JT, Chen CY, Jou YS, Wang YC. Genome-wide loss of heterozygosity and its clinical associations in non-small cell lung cancer. *Int J Cancer*, 117:241-247, 2005.
15. Chao CC, Chang PY, Lu HH. Human Gas7 Isoforms Homologous to Mouse Transcripts Differentially Induce Neurite Outgrowth. *J Neurosci Res*, 81:153-162, 2005.
16. Schneider C, King RM, Philipson L. Genes specifically expressed at growth arrest of mammalian cells. *Cell*, 54:787-793, 1988.
17. Manfioletti G, Ruaro ME, Del Sal G, Philipson L, Schneider C. A growth arrest-specific (gas) gene codes for a membrane protein. *Mol Cell Biol*, 10:2924-2930, 1990.
18. Adlkofer K, Martini R, Aguzzi A, Zielasek J, Toyka KV, Suter U. Hypermyelination and demyelinating peripheral neuropathy in Pmp22-deficient mice. *Nat Genet*, 11:274-280, 1995.
19. Zoidl G, Blass-Kampmann S, D'Urso D, Schmalenbach C, Muller HW. Retroviral-mediated gene transfer of the peripheral myelin protein PMP22 in Schwann cells: modulation of cell growth. *EMBO J*, 14:1122-1128, 1995.
20. Li R, Chen J, Hammonds G, Phillips H, Armanini M, Wood P, Bunge R, Godowski PJ, Sliwkowski MX, Mather JP. Identification of Gas6 as a growth factor for human Schwann cells. *J Neurosci*, 16:2012-2019, 1996.
21. Ju YT, Chang AC, She BR, Tsaor ML, Hwang HM, Chao CC, Cohen SN, Lin-Chao S. gas7: A gene expressed preferentially in growth-arrested fibroblasts and terminally differentiated Purkinje neurons affects neurite formation. *Proc Natl Acad Sci USA*, 95:11423-11428, 1998.
22. Chao CC, Su LJ, Sun NK, Ju YT, Lih JC, Lin-Chao S. Involvement of Gas7 in nerve growth factor-independent and dependent cell processes in PC12 cells. *J Neurosci Res*, 74:248-254, 2003.
23. Lih CJ, Cohen SN, Wang C, Lin-Chao S. The platelet-derived growth factor alpha-receptor is encoded by a growth-arrest-specific (gas) gene. *Proc Natl Acad Sci USA*, 93:4617-4622, 1996.
24. Fabbretti E, Edomi P, Brancolini C, Schneider C. Apoptotic phenotype induced by overexpression of wild-type gas3/PMP22: its relation to the demyelinating peripheral neuropathy CMT1A. *Genes Dev*, 9:1846-1856, 1995.
25. Brancolini C, Bottega S, Schneider C. Gas2, a growth arrest specific protein, is a

- component of the microfilament network system. *J Cell Biol*, 117:1251–1261, 1992.
26. Stebel M, Vatta P, Ruaro ME, Del Sal G, Parton RG, Schneider C. The growth suppressing gas1 product is a GPI-linked protein. *FEBS Lett*, 481:152–158, 2000.
  27. Del Sal G, Ruaro ME, Philipson L, Schneider C. The growth arrest-specific gene, gas1, is involved in growth suppression. *Cell*, 70:595–607, 1992.
  28. Mellström B, Cena V, Lamas M, Perales C, Gonzalez C, Naranjo JR. Gas1 is induced during and participates in excitotoxic neuronal death. *Mol. Cell Neurosci*, 19:417–429, 2002.
  29. Zamorano A, Lamas M, Vergara P, Naranjo JR, Segovia J. Transcriptionally mediated gene targeting of gas1 to glioma cells elicits growth arrest and apoptosis. *J. Neurosci. Res*, 71:256–263, 2003.
  30. Zamorano A, Mellström B, Vergara P, Naranjo JR, Segovia J. Glial-specific retrovirally mediated gas1 gene expression induces glioma cell apoptosis and inhibits tumor growth *in vivo*. *Neurobiol. Dis*, 15:483–491, 2004.
  31. Benitez JA, Arregui L, Vergara P, Segovia J. Targeted-simultaneous expression of Gas1 and p53 using a bicistronic adenoviral vector in gliomas. *Cancer Gene Ther*, 14:836–846, 2007.
  32. Evdokiou A, Cowled PA. Tumor-suppressive activity of the growth arrest-specific gene GAS1 in human tumor cell lines. *Int. J. Cancer*, 75:568–577, 1998.
  33. Brancolini C, Benedetti M, Schneider C. Microfilament reorganization during apoptosis: the role of Gas2, a possible substrate for ICE-like protease. *EMBO J*, 14:5179-5190, 1995.
  34. Benetti R, Del Sal G, Monte M, Paroni G, Brancolini C, Schneider C. The death substrate Gas2 binds m-calpain and increases susceptibility to p53-dependent apoptosis. *EMBO J*, 20:2702-2714, 2001.
  35. Snipes GJ, Suter U, Welcher AA, Shooter EM. Characterization of a novel peripheral nervous system myelin protein (PMP-22/SR13). *J Cell Biol*, 117:225–238, 1992.
  36. Joo IS, Ki CS, Joo SY, Huh K, Kim JW. A novel point mutation in PMP22 gene associated with a familial case of Charcot-Marie-Tooth disease type 1A with sensorineural deafness. *Neuromuscul Disord*, 14:325–328, 2004.
  37. Suter U, Snipes GJ, Schoener-Scott R, Welcher AA, Pareek S, Lupski JR, Murphy RA, Shooter EM, Patel PI. Regulation of tissue-specific expression of alternative peripheral myelin protein-22 (PMP22) gene transcripts by two promoters. *J. Cell Biol*, 269:25795-25808, 1994.

38. Re FC, Manenti G, Borrello MG, Colombo MP, Fisher JH, Pierotti MA, Della Porta G. Multiple molecular alterations in mouse lung tumors. *Mol Carcinog*, 5:155–160, 1992.
39. Brenner DG, Lin-Chao S, Cohen SN. Analysis of mammalian cell genetic regulation in situ by using retrovirus-derived "portable exons" carrying the *Escherichia coli lacZ* gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 86:5517-5521, 1989.
40. Lih CJ, Wu SM, Lin-Chao S. Rapid identification and isolation of transcriptionally active regions from mouse genomes. *Gene*, 164:289-294, 1996.
41. She BR, Liou GG, Lin-Chao S. Association of the growth-arrest-specific protein Gas7 with F-actin induces reorganization of microfilaments and promotes membrane outgrowth. *Exp. Cell Res*, 273:34-44, 2002.
42. Chang PY, Kuo JT, Lin-Chao S, Chao CC. Identification of rat Gas7 isoforms differentially expressed in brain and regulated following kainate-induced neuronal injury. *J. Neurosci. Res*, 79:788-797, 2005.
43. Chang Y, Ueng SW, Lin-Chao S, Chao CC. Involvement of Gas7 along the ERK1/2 MAP kinase and SOX9 pathway in chondrogenesis of human marrow-derived mesenchymal stem cells. *Osteoarthritis Cartilage*, 2008 Apr 30 [E-publication ahead].
44. Tian L, Nelson DL, Stewart DM. Cdc42-interacting protein 4 mediates binding of the Wiskott-Aldrich syndrome protein to microtubules. *J Biol Chem*, 275:7854–7861, 2000.
45. Fujita H, Katoh H, Ishikawa Y, Mori K, Negishi M. Rapostlin is a novel effector of Rnd2 GTPase inducing neurite branching. *J Biol Chem*, 277:45428–45434, 2002.
46. Ilsley JL, Sudol M, Winder SJ. The WW domain: linking cell signaling to the membrane cytoskeleton. *Cell Signal*, 14:183–189, 2002.
47. Megonigal MD, Cheung NK, Rappaport EF, Nowell PC, Wilson RB, Jones DH, Addya K, Leonard DG, Kushner BH, Williams TM, Lange BJ, Felix CA. Detection of leukemia-associated MLL-GAS7 translocation early during chemotherapy with DNA topoisomerase II inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 97:2814-2819, 2000.
48. Ebinger M, Senf L, Wachowski O, Scheurlen W. Expression of GAS7 in childhood CNS tumors. *Pediatr Blood Cancer*, 46:325-328, 2006.
49. Scheurlen WG, Schwabe GC, Seranski P, Joos S, Harbott J, Metzke S, Dohner H, Poustka A, Wilgenbus K, Haas OA. Mapping of the breakpoints on the short arm of chromosome 17 in neoplasms with an i(17q). *Genes Chromosomes Cancer*, 25:230–240, 1999.
50. Zhou J, Dudley ME, Rosenberg SA, Robbins PF. Persistence of multiple

tumor-specific T-cell clones is associated with complete tumor regression in a melanoma patient receiving adoptive cell transfer therapy. *J Immunother*, 28:53-62, 2005.