

出國報告(出國類別：進修)

英國博士學位進修心得報告
利用蛋白質體學及基因調控技術探討蛋白質泛
素化在發炎性疾病之角色和應用

服務機關：國防醫學院三軍總醫院血液腫瘤科

姓名、職稱：陳昱光、少校主治醫師

派赴國家/地區：英國/倫敦

出國期間：106 年 9 月 22 日至 111 年 3 月 4 日

報告日期：111 年 5 月 9 日

摘要

泛素化(ubiquitination)為細胞內進行轉錄後修飾(Post-translational modification)的一個常見手段。蛋白質泛素化修飾過程在調節各種細胞生物學功能的過程中發揮了非常重要的作用,如細胞週期進程、DNA 損傷修復、信號轉導和各種蛋白質膜定位等。為了研究泛素化在發炎疾病的角色,職相關研究特別針對線性泛素化組裝複合體(LUBAC, the linear ubiquitin chain assembly complex)做一系列的探討。LUBAC 為線性泛素化修飾的 E3 連結酶,於 2006 年日本 kyoto 大學 Kazuhiro Iwai 教授實驗室首次發現了其的存在。LUBAC 的重要性在於其參與多個重要的發炎受器和其下游之訊息傳遞路徑的啟動和活化。根據我們團隊和其他實驗室的相關研究指出,針對 LUBAC 所調控之發炎反應相關訊息路徑,LUBAC 可以特异性啟動 NF- κ B 信號通路,在 MAPK 磷酸化啟動過程也發揮著重要的作用;當 LUBAC 蛋白缺失或是突變導致其功能下降時,會引起相對應的發炎及免疫受器(如 TCR 或是 BCR)的蛋白質複合體的不穩定,進而導致細胞凋亡複合體的產生,最終導致細胞死亡。。然而,儘管相當多實驗室和團隊已針對此蛋白質複合體其功能性做了相當多的探討,針對此蛋白複合體在不同類型發炎性疾病和對於其他發炎受器的調控仍有需多未知的部分。本研究藉由台灣健保資料庫,TCGA 癌症資料庫,分子生物以及轉殖基因鼠實驗探討 LUBAC 在不同發炎受器和疾病的相關角色。

目次

摘要	2
目的	4
過程	5
成果發表.....	9
心得與建議	10
致謝	12
附錄	13

目的

線性泛素化組裝複合體(LUBAC, the linear ubiquitin chain assembly complex)為一重要的 E3 連結酶。結構上，LUBAC 複合體是由 HOIL-1L,HOIP,Sharpin 組成。其生理上的功能為維持不同免疫及發炎受器(如 TNFR，TRAIL，CD95 等)的蛋白質訊息傳遞複合體的穩定性，並協助其下游訊息傳遞路徑的完整性以便維持正常的細胞功能，當 LUBAC 其功能上出現異常或是出現變異時，會影響其對應之免疫或是發炎受器及其下游蛋白質複合體結構發生改變，進而造成相對應的變化。以 TNFR 受器為例，當 LUBAC 缺失時，會造成 TNF/TNFR 的引起之 NF- κ B 訊息路徑的不穩定，進而導致 TNFR 蛋白質複合體發生改變而引起細胞凋亡複合體的產生，最終導致細胞死亡。臨床上，HOIP 或 HOIL-1 mutant 的病人會呈現多器官發炎，免疫系統失調以及不正常的類澱粉沉積在心臟及肌肉部分，有趣的是，病人出現的部分臨床症狀，無法完全以目前文獻內所呈現的分子機轉來作完整解釋。因此，本研究著重於探討(1)LUBAC 所調控之發炎反應受器其詳細之分子機轉(2)因 HOIP 或是 HOIL-1 病患出現心臟及肌肉部分的類澱粉沉積，進而導致心臟及肌肉病變，其可能的機轉和原因為何?(3)根據我們實驗室之前的研究發現 HOIP 肝臟剔除鼠呈現脂肪肝的相關表現，根據這些發現，探討 LUBAC 在該發炎性疾病中的角色，根據這些問題，我們設計了不同的研究來測試我們提出的假設

過程

第一年

1. 剛到英國時，除了語言溝通和生活適應外(主要熟悉環境、安排好住宿及銀行開戶)，最大的挑戰是面對西方國家對於科學本質和研究認知上的問題，西方國家體系(英，美，德)主要以問題導向之學習為主，教授傾向於讓學生自己去發現問題，和進行相關討論，最後再針對這些問題加以延伸和調整，最終形成有意義且可以科學手段解決之科學性問題。後續研究則針對這類問題加以延伸和探討，這種方式和台灣現行的教育和科學研究上本質較為不同，台灣的教育方式多數仍是以授課導向，研究方面傾向於教授直接指導學生進行相關學習，以後者來說，會減少學生摸索和走錯研究方向所導致時間上的浪費。
2. 針對指導教授所提出的可能方向開始做文獻閱讀和實驗設計，針對蛋白質修飾及泛素化，和轉譯後修飾部分的知識背景進行加強；因自身背景關係，到生化學系修習幾門相關課程(1) 有機化學及高等有機化學 (2) 分子生物學 (3) 生物技術課程 (4) 動物執照訓練；其中不足部分，以函授教學及線上課程方式，進行有機化學等課程及背景知識補強
3. 自 2017 年 10 月於實驗室會議上提出研究計畫，並針對研究計畫須執行之內容和指導教授及博士後研究員做相關討論，並針對所設計之實驗做優化和調整。
4. 自 2017 年 12 月起進入實驗室學習(1)高階免疫沉澱技術 immunoprecipitation(2)重組蛋白(recombinant protein)之設計、表現及純化(3)原核及真核蛋白質表現技術(4) Crispr/Cas 9 基因剔除技術 (5)基因剔除鼠之純化和雜交準備

第二年

1. 進行初步實驗，並定期於實驗室會議中匯報相關結果；指導教授針對相關內容作相關建議並做改善。
2. 相關進行試驗內容如下
 - (1)進行重組蛋白的設計並改良其表現方式。
 - (2)針對原先所使用的純化方式作改良，以提高蛋白質的產出量。
 - (3)利用 Crispr/Cas9 方式來建立 LUBAC 相關之剔除細胞株(KO Clones)
 - (4)利用免疫沉澱方式探討蛋白質複合物之相關實驗，並針對已得到之結果進行進一步分析並設計未來相關實驗。
 - (5)動物相關實驗方式
 - (a)因全身性 LUBAC 相關蛋白之老鼠有死胎之問題，這邊利用選擇性剔除方式建立器官專一性剔除鼠。
 - (b)同時以該老鼠做下游傳遞路徑相關蛋白之雜交，以探討在阻斷 LUBAC 原本功能後，其可能之生理變化。
3. 於 2019 年 2 月進行博士班的資格考，順利獲得博士候選人資格，並在公開演講及口試的流程中，獲得聽眾及口試委員許多的指導與建議。
4. 因學生的指導教授 Prof. Walczak Henning 受國家衛生研究院和中央研究院邀請參加第三屆國際發炎疾病研討會，於 2019 年 10 月學生和指導教授一起參加本次研討會，並在研討會上和相關團隊有諸多建設性質的討論。

第三年

1. 和指導教授討論並確立研究項目分成兩個方向分別為研究 LUBAC 蛋白在脂肪肝引起之肝癌內的角色和 LUBAC 蛋白在相關發炎受器之影響：

- 1) 研究 LUBAC 蛋白在脂肪肝致病機轉內的影響：針對這部分的實驗，我們比較了不同基因型(包含 LUBAC condition deletion, LUBAC and death associated protein co-deletion)之老鼠在脂肪肝模型下，研究這些老鼠之(a)肝臟病理變化(b)血液生化變化(c)蒐集其肝臟內之蛋白質/RNA，並做相關訊息傳遞之研究(d)建立脂肪肝模型後，未來發生肝癌之機會。
- 2) 為配合動物模型之結果，職和三軍總醫院醫學研究室簡戊鑑教授利用健保資料庫大數據資料，研究台灣脂肪肝病患在不同疾病狀況之下，其發生肝癌的機率。
- 3) 另一個研究方向為探討 LUBAC 蛋白在發炎反應受器的相關影響和角色，這部分結合之前利用免疫沉澱和相關基因剔除細胞株所得到之結果。進一步利用蛋白質質譜儀來做分析，再利用所得到之結果。

第四年及延長半年

1. 將完成的相關實驗部分做整理，並作發表國際期刊之準備
2. 進行畢業論文的撰寫，已於 2022 年 2 月 28 日畢業口試。
3. 經博士口試及畢業論文書面審查後，相關畢業論文資料分別發表於國際期刊。

返國後

已於 111 年 4 月 7 日於血液腫瘤科科務會議進行心得分享報告。

成果發表

1. **Chen YG**, Yang CW, Chung CH, Ho CL, Chen WL, Chien WC. The association between metabolic risk factors, nonalcoholic fatty liver disease, and the incidence of liver cancer: a nationwide population-based cohort study. *Hepatol Int.* 2022 Jan 22. doi: 10.1007/s12072-021-10281-9.
2. **Chen YG**, de Miguel D, Surinova S, Bhamra A, Chen YC, Tsai WC, Walczak H. This manuscript is under review

其他相關發表文章

1. Wu YY, Lai HF, Huang TC, **Chen YG**, Ye RH, Chang PY, Lai SW, Chen YC, Lee CH, Liu WN, Dai MS, Chen JH, Ho CL, Chiu YL. Aberrantly reduced expression of miR-342-5p contributes to CCND1-associated chronic myeloid leukemia progression and imatinib resistance. *Cell Death Dis.* 2021 Oct 5;12(10):908
2. Liu PY, Chen CC, Chin CY, Liu TJ, Tsai WC, Chou JL, Huang CY, **Chen YG**, Chen YC. E3 ubiquitin ligase Grail promotes hepatic steatosis through Sirt1 inhibition. *Cell Death Dis.* 2021 Mar 26;12(4):323.
3. . Chiang YJ, Liao WT, Ho KC, Wang SH, **Chen YG**, Ho CL, Huang SF, Shih LY, Yang Yen HF, Yen JJ. CBAP modulates Akt-dependent TSC2 phosphorylation to promote Rheb-mTORC1 signaling and growth of T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Oncogene.* 2019 Feb;38(9):1432-1447
4. **Chen YG**, Lu CS, Lin TY, Lin CL, Tzeng HE, Tsai CH. Risk of fracture in transfusion-naïve thalassemia population: A nationwide population-based retrospective cohort study. *Bone.* 2018 Jan;106:121-12

心得與建議

1. 語言隔閡和文化差異：語言問題是所有國外進修學員會面臨到的第一個問題，不論在英文檢定時分數有多高(英文程度已經達到標準)，初至國外仍會有相當程度語言之隔閡，在生活上這類問題常會造成諸多生活的不便，例如銀行開戶，和安排日常生活瑣事；在學術上也會造成相當程度的影響，例如和指導教授及同儕進行科學性質討論時，語言的隔閡常會造成提問或是回答問題時雙方認知上的差異。
2. 科學性的思考方式：在西方國家中，會希望以訓練學生能提出科學性問題為導向之訓練方式為主。所謂科學性問題的定義是指該問題為目前未知並且有意義性的問題，重要的是能以科學性的方式去解決，這種方式讓職剛到英國時受到相當大的衝擊，因為本身知識和背景能力的不足，常常會遇到不知道如何提問或是提出的問題太空泛而無法執行和回答。這部分也是一直到博士班進入第三年後，以對相關領域有一定程度的熟悉後才得到改善。
3. 批判性思考的能力：國外的科學訓練上，非常講求批判性思考，其本質是希望能就批判的過程中發現問題，提出有建設性的新問題，進而對該領域的知識和技術做階段性的改善。職所前往之實驗室每周都會在該周的雜誌討論會上，針對該周在 *cell*, *science* and *nature* 上的相關文章做討論，進行方式是以這類批判性討論為主，每人都需要針對該篇文章之數據做建設性的批判(包含相關實驗改進，控制組修正等)，這個過程學習到非常多重要的實驗設計方式。
4. 實驗設計和研究規劃：在英國進修博士學位，由於英國學校多無修課要求，需要自己主

動去學習，和指導教授討論及自行安排想學習的課程，自主學習能力非常重要。對未來有意要進修之同仁，可以多和國內相關實驗室專家討論實驗設計和規劃，同時中來了解學校提供的各項課程，同時可以擔任相關課程助教，這對於往後回到教育單位服務會有很大的幫助。

5. 工作及生活態度：工作時專心工作，下班後就有各自的生活，對於時間的安排有一定的規則。這種時間上妥善的安排是必須學習的。

建議事項：

語言的隔閡常會造成科學討論和溝通的障礙，建議除了加強自身英文能力外，可以於未出國前多參加國際學術會議，多提出問題來加強自身以外文做學術提問及討論之能力。

致謝

非常感謝國防醫學院，軍醫局及國防部各位師長及長官的支持與幫助，也感謝三軍總醫院余志誠院長、林石化院長的提攜，讓職有幸於國外知名大學接受博士學位的訓練。此外血液腫瘤科何景良主任、戴明燊主任以及全體同仁的協助，在學生出國進修時給予多方面的支持和協助，也感謝我的指導老師 Prof. Walczak Henning 和其團隊在研究上的協助，同時也感謝指導我的兩位博士後研究員 Dr. Nieves Peltzer 和 Dr. de Miguel Diego 指導我非常多分子生物，蛋白質體學和基因轉殖動物的處理和技術。在這四年除了讓我學習到了許多研究方法及技術外，針對科學性的討論，思考方式也有了許多全新的啟發和提升。最後，在此非常感謝國防部、國防醫學院及駐外武官以及我的妻子張孝瑛，在進修期間的關心與照顧，讓我在國外進修的過程中能專心在學習新知上並期待將所學貢獻給國家。

附錄

Prof. Walczak Henning 於 UCL Cancer institute 內的實驗室及研究人員合影



Prof. Walczak Henning 於 University of Cologne, CECAD 內的實驗室及研究人員合影



Prof. Walczak Henning 於 2019 年受國家衛生研究院及中央研究院之邀請參與第三屆國際發

