

行政院國家科學委員會專題研究計畫 成果報告

蛋白激西每之細胞訊息傳遞路徑中 DARPP-32 蛋白所扮演的
角色：對大鼠學習記憶和抗細胞凋亡機制的影響(第3年)
研究成果報告(完整版)

計畫類別：個別型
計畫編號：NSC 98-2320-B-004-002-MY3
執行期間：100年08月01日至101年07月31日
執行單位：國立政治大學神經科學研究所

計畫主持人：趙知章

計畫參與人員：碩士班研究生-兼任助理人員：李曉怡
碩士班研究生-兼任助理人員：黃鉉豐
碩士班研究生-兼任助理人員：洪禎廷

公開資訊：本計畫涉及專利或其他智慧財產權，2年後可公開查詢

中華民國 101 年 11 月 27 日

中文摘要： 蛋白激酶 CK2 是一種具有多種功能的絲胺酸/蘇胺酸蛋白質激酶，其作用的受質眾多且普遍存在於哺乳類動物細胞中。從許多的研究結果顯示，蛋白激酶 CK2 參與調節許多的神經系統功能其中包括有神經保護作用，但是其分子層面的機制目前尚未釐清。DARPP-32 (Dopamine- and cAMP-regulated phosphoprotein, Mr 32 kDa) 主要表現在紋狀體中型多刺狀 GABA 神經元中的蛋白質，參與調控與藥物成癮相關的多巴胺訊息傳遞路徑，近年來的一些研究報告指出 DARPP-32 亦參與了細胞的抗凋亡作用。雖然先前已有研究發現 DARPP-32 Ser102 胺基酸是 CK2 的磷酸化作用受質，但是並沒有進一步的研究證實，該胺基酸的磷酸化作用是否參與 CK2 所調控的細胞機制。屬於抗細胞凋亡蛋白 Bcl-2 家族成員之一的 bcl-x 基因會經由 pre-mRNA 選擇性剪裁機制 (alternative splicing) 而產生兩種異構蛋白 Bcl-xL 和 Bcl-xS，其中 Bcl-xL 蛋白被證實會促進細胞存活；而 Bcl-xS 蛋白則會造成細胞死亡。研究結果發現，轉染野生型 CK2 α DNA 質體會增加 DARPP-32 Ser102 的磷酸化現象、Bcl-xL 的蛋白質表現以及 Bcl-xL/Bcl-xS mRNA 的比例；而處理 CK2 抑制劑 TBB 則會降低 DARPP-32 Ser102 的磷酸化現象、Bcl-xL 的蛋白質表現以及 Bcl-xL/Bcl-xS mRNA 的比例。此外，轉染 DARPP-32 siRNA 會降低 Bcl-xL 的蛋白質表現。轉染模擬之磷酸化構型的 DARPP-32 S102D DNA 質體會增加 Bcl-xL 的蛋白質表現以及 Bcl-xL/Bcl-xS mRNA 的比例；但是，轉染突變型 DARPP-32 S102A DNA 質體則會降低 Bcl-xL 的蛋白質表現以及 Bcl-xL/Bcl-xS mRNA 的比例。利用過氧過氫產生細胞氧化逆境下，CK2 α 或 DARPP-32 siRNA 處理可以顯著降低 DARPP-32 Ser102 的磷酸化現象、Bcl-xL 的蛋白質表現以及 Bcl-xL/Bcl-xS mRNA 的比例，同時會顯著造成細胞凋亡。

中文關鍵詞： 蛋白激酶 CK2、DARPP-32 蛋白、抗細胞凋亡 Bcl-xL 蛋白、促細胞凋亡 Bcl-xS 蛋白、抗細胞凋亡

英文摘要： Protein kinase CK2 is a multifunctional serine/threonine protein kinase with many protein substrates and is ubiquitously expressed in mammalian cells. Many studies have shown that CK2 is involved in many neuronal functions including neuroprotection, but its cellular mechanisms are not well-studied. DARPP-32 (Dopamine- and cAMP-regulated phosphoprotein, Mr 32 kDa) is highly enriched in striatal medium-size spiny GABA neurons and is a prominent mediator of dopamine signalling which

relates with drug abuse. Beside its well-known function in drug abuse, recent studies also reveal that DARPP-32 may be involved in the anti-apoptotic effects. Although the Ser102 residue of DARPP-32 is a phosphorylation site for CK2, this phosphorylation-mediated CK2 signaling has not been studied yet. The *bcl-x* gene, one member of the Bcl-2 family, encodes two isoform proteins Bcl-xL and Bcl-xS by the pre-mRNA alternative splicing. The former increases cell survival and the later enhances cell apoptosis. Our results revealed that DARPP-32 Ser102 phosphorylation, Bcl-xL protein level and Bcl-xL/Bcl-xS mRNA ratio were all increased by wild-type CK2 α plasmid DNA transfection. Meanwhile, CK2 inhibitor TBB treatment decreased DARPP-32 Ser102 phosphorylation, Bcl-xL protein level and Bcl-xL/Bcl-xS mRNA ratio. On the other hand, DARPP-32 siRNA transfection decreased Bcl-xL protein level. Furthermore, transfection of DARPP-32 S102D, which mimics the constitutive phosphorylation form, increased whereas transfection of mutant S102A decreased the Bcl-xL protein level and Bcl-xL/Bcl-xS mRNA ratio. From the results of H₂O₂-induced oxidative stress experiments, we also found that prior knock-down of CK2 α or DARPP-32 can aggravate the decrease in DARPP-32 Ser102 phosphorylation, Bcl-xL protein level and Bcl-xL/Bcl-xS mRNA ratio by H₂O₂ treatment.

英文關鍵詞： protein kinase CK2, DARPP-32, Bcl-xL, Bcl-xS, anti-apoptosis

行政院國家科學委員會補助專題研究計畫 成果報告
 期中進度報告

蛋白激酶 CK2 之細胞訊息傳遞路徑中 DARPP-32 蛋白所扮演的角色：對大鼠學習記憶和抗細胞凋亡機制的影響

計畫類別： 個別型計畫 整合型計畫

計畫編號：NSC 98-2320-B-004-002-MY3

執行期間：2009 年 08 月 01 日至 2012 年 07 月 31 日

執行機構及系所：國立政治大學神經科學研究所

計畫主持人：趙知章

共同主持人：

計畫參與人員：李曉怡、黃鉉豐、洪禎廷

成果報告類型(依經費核定清單規定繳交)： 精簡報告 完整報告

本計畫除繳交成果報告外，另須繳交以下出國心得報告：

赴國外出差或研習心得報告

赴大陸地區出差或研習心得報告

出席國際學術會議心得報告

國際合作研究計畫國外研究報告

處理方式：除列管計畫及下列情形者外，得立即公開查詢

涉及專利或其他智慧財產權， 一年 二年後可公開查詢

中 華 民 國 101 年 11 月 27 日

中文摘要

蛋白激酶 CK2 是一種具有多種功能的絲胺酸/蘇胺酸蛋白質激酶，其作用的受質眾多且普遍存在於哺乳類動物細胞中。從許多的研究結果顯示，蛋白激酶 CK2 參與調節許多的神經系統功能其中包括有神經保護作用，但是其分子層面的機制目前尚未釐清。DARPP-32 (Dopamine- and cAMP-regulated phosphoprotein, Mr 32 kDa) 主要表現在紋狀體中型多刺狀 GABA 神經元中的蛋白質，參與調控與藥物成癮相關的多巴胺訊息傳遞路徑，近年來的一些研究報告指出 DARPP-32 亦參與了細胞的抗凋亡作用。雖然先前已有研究發現 DARPP-32 Ser102 胺基酸是 CK2 的磷酸化作用受質，但是並沒有進一步的研究證實，該胺基酸的磷酸化作用是否參與 CK2 所調控的細胞機制。屬於抗細胞凋亡蛋白 Bcl-2 家族成員之一的 *bcl-x* 基因會經由 pre-mRNA 選擇性剪裁機制 (alternative splicing) 而產生兩種異構蛋白 Bcl-xL 和 Bcl-xS，其中 Bcl-xL 蛋白被證實會促進細胞存活；而 Bcl-xS 蛋白則會造成細胞死亡。研究結果發現，轉染野生型 CK2 α DNA 質體會增加 DARPP-32 Ser102 的磷酸化現象、Bcl-xL 的蛋白質表現以及 Bcl-xL/Bcl-xS mRNA 的比例；而處理 CK2 抑制劑 TBB 則會降低 DARPP-32 Ser102 的磷酸化現象、Bcl-xL 的蛋白質表現以及 Bcl-xL/Bcl-xS mRNA 的比例。此外，轉染 DARPP-32 siRNA 會降低 Bcl-xL 的蛋白質表現。轉染模擬之磷酸化構型的 DARPP-32 S102D DNA 質體會增加 Bcl-xL 的蛋白質表現以及 Bcl-xL/Bcl-xS mRNA 的比例；但是，轉染突變型 DARPP-32 S102A DNA 質體則會降低 Bcl-xL 的蛋白質表現以及 Bcl-xL/Bcl-xS mRNA 的比例。利用過氧過氫產生細胞氧化逆境下，CK2 α 或 DARPP-32 siRNA 處理可以顯著降低 DARPP-32 Ser102 的磷酸化現象、Bcl-xL 的蛋白質表現以及 Bcl-xL/Bcl-xS mRNA 的比例，同時會顯著造成細胞凋亡。

關鍵字：蛋白激酶 CK2、DARPP-32 蛋白、抗細胞凋亡 Bcl-xL 蛋白、促細胞凋亡 Bcl-xS 蛋白、抗細胞凋亡

Abstract

Protein kinase CK2 is a multifunctional serine/threonine protein kinase with many protein substrates and is ubiquitously expressed in mammalian cells. Many studies have shown that CK2 is involved in many neuronal functions including neuroprotection, but its cellular mechanisms are not well-studied. DARPP-32 (Dopamine- and cAMP-regulated phosphoprotein, Mr 32 kDa) is highly enriched in striatal medium-size spiny GABA neurons and is a prominent mediator of dopamine signalling which relates with drug abuse. Beside its well-known function in drug abuse, recent studies also reveal that DARPP-32 may be involved in the anti-apoptotic effects. Although the Ser102 residue of DARPP-32 is a phosphorylation site for CK2, this phosphorylation-mediated CK2 signaling has not been studied yet. The *bcl-x* gene, one member of the Bcl-2 family, encodes two isoform proteins Bcl-xL and Bcl-xS by the pre-mRNA alternative splicing. The former increases cell survival and the later enhances cell apoptosis. Our results revealed that DARPP-32 Ser102 phosphorylation, Bcl-xL protein level and Bcl-xL/Bcl-xS mRNA ratio were all increased by wild-type CK2 α plasmid DNA transfection. Meanwhile, CK2 inhibitor TBB treatment decreased DARPP-32 Ser102 phosphorylation, Bcl-xL protein level and Bcl-xL/Bcl-xS mRNA ratio. On the other hand, DARPP-32 siRNA transfection decreased Bcl-xL protein level. Furthermore, transfection of DARPP-32 S102D, which mimics the constitutive phosphorylation form, increased whereas transfection of mutant S102A decreased the Bcl-xL protein level and Bcl-xL/Bcl-xS mRNA ratio. From the results of H₂O₂-induced oxidative stress experiments, we also found that prior knock-down of CK2 α or DARPP-32 can aggravate the decrease in DARPP-32 Ser102 phosphorylation, Bcl-xL protein level and Bcl-xL/Bcl-xS mRNA ratio by H₂O₂ treatment.

Key words: protein kinase CK2, DARPP-32, Bcl-xL, Bcl-xS, anti-apoptosis

前言

蛋白激酶 CK2 是一種普遍存在於細胞質、細胞核以及其他胞器中且具有調控細胞週期、細胞增生、細胞分化功能的絲胺酸/蘇胺酸的蛋白質激酶 (serine/threonine protein kinase)，具有一個四聚體蛋白質結構，其中兩個是具有酵素催化活性的 α 、 α' 次單元，其餘兩個則是具有調控功能的 β 次單元，因此可形成的異四聚體 (heterotetramers) 的形式有 $\alpha_2\beta_2$ 、 $\alpha'\beta_2$ 、 $\alpha\alpha'\beta_2$ (Chester et al., 1995)。研究發現剔除蛋白激酶 CK2 α 次單元基因，會造成小鼠的胚胎致死 (Lou et al., 2008)，而剔除 β 次單元基因的小鼠，則發現其胚胎體積比一般正常胚胎體積顯著較小，雖然沒有觀察到細胞凋亡的情形，但對細胞增生有抑制的現象 (Buchou et al., 2003, Lou et al., 2008)，顯示蛋白激酶 CK2 對個體胚胎發育扮演重要的調節功能。蛋白激酶 CK2 有超過 300 種的受質，這些受質涉及在訊息傳遞路徑、細胞骨架、蛋白質合成、轉錄因子以及核酸合成等等 (Meggio and Pinna, 2003)，舉例來說，在細胞骨架的相關研究發現，N2A 神經母細胞瘤中的 MAP-1B (microtubule-associated protein 1B) 磷酸化現象會因 CK2 的作用而增加，並且與細胞的分化過程有相關性 (Diaz-Nido et al., 1988)；此外，也有研究文獻指出，p53 蛋白在 CK2 磷酸化的作用下可持續維持其活化態不易被去磷酸化，進而影響細胞週期與促進細胞凋亡 (McKendrick et al., 1999)。由於 CK2 的受質種類繁多且在細胞內的分布非常廣泛，因此，CK2 所參與調控的細胞功用和機制亦相對眾多，蛋白激酶 CK2 被發現會促進癌細胞的抗細胞凋亡功能，在肝癌細胞的研究發現，給予 emodine 抑制蛋白激酶 CK2 會顯著增強與腫瘤壞死因子死亡配體 (Death ligand) 相關的細胞凋亡誘發配體 (Tumour necrosis factor related apoptosis inducing ligand, TRAIL) 所誘發的細胞凋亡和自然殺手細胞 (Natural killer cell) 所誘發的細胞凋亡 (Kim et al., 2008b)；在正常細胞中的 CK2 是均勻分布於細胞質和細胞核，但在前列腺癌病患的細胞中卻發現 CK2 在細胞核中的表現量顯著增加，且病患顯示有較高的不良預後因子 (Laramas et al., 2007)，此外，CK2 亦被發現會對屬於 Bcl-2 蛋白家族成員中促進細胞凋亡之 Bid 蛋白的 serine 胺基酸進行磷酸作用化，抑制 Bid 蛋白被 caspase-8 的裁切活化，進而促進 HeLa 細胞的存活 (Desagher et al., 2001)。這些研究結果均顯示蛋白激酶 CK2 會增加細胞的存活能力。在神經細胞方面，蛋白激酶 CK2 普遍存在於大腦，且發現在皮質、海馬迴、尾狀核-被殼 (caudate-putamen) 中有大量的表現 (Girault et al., 1990)，後續的研究亦發現在海馬迴 CA1 區域產生 long-term potentiation (LTP) 時會伴隨 CK2 的被高度活化現象 (Charriaut-Marlangue et al., 1991)，而在阿茲海默症和精神分裂症病人大腦皮質的蛋白激酶 CK2 表現量則發現會顯著的減少 (Aksenova et al., 1991)，這些研究結果顯示 CK2 參與了神經系統的功能運作。相關神經細胞中 CK2 酵素活性調節的研究文獻則指出，大腦衍生滋養因子 (brain-derived neurotrophic factor, BDNF) 和神經滋養因子 NT-4 (neurotrophin-4) 會增加在大鼠海馬迴腦區之 CK2 的酵素活性 (Blanquet, 1998)；而在與神經細胞保護機制的相關研究中亦發現，大腦衍生滋養因子會促進大鼠海馬迴腦區細胞的 CK2 酵素活性，進而增加 NF- κ B (Nuclear Factor Kappa B) 調節抗細胞凋亡蛋白 Bcl-xL 基因表現的效果 (Chao et al., 2011)；除此之外，在大鼠黑質 (Substantia nigra) 腦區的研究亦發現神經膠細胞

滋養因子 (Glial cell line-derived neurotrophic factor, GDNF) 會增加蛋白激酶 CK2 的活性進而保護多巴胺神經細胞 (Chao et al., 2006)。綜合上述的研究文獻可得知，蛋白激酶 CK2 對神經細胞的抗凋亡也具有促進的作用。

DARPP-32 主要表現在紋狀體 (Striatum) 之中型多刺狀 GABA 神經元 (medium-sized spiny GABA neurons) (Ouimet et al., 1984, Walaas and Greengard, 1984)。針對 DARPP-32 與基因表現的研究指出，活化多巴胺 D1 受體和 NMDA 麩氨酸 (glutamate) 受體，透過 DARPP-32 的調節可抑制第一型蛋白質磷酸水解酶 PP1 而增加 extracellular signal-regulated kinase (ERK) 磷酸化，進而影響基因轉錄 (Valjent et al., 2005)；多巴胺活化 D1 受體進而活化蛋白激酶 PKA 會增加轉錄因子 CREB (cAMP responsive element binding protein) Ser133 位置的磷酸化，而第一型蛋白質磷酸水解酶 PP1 作用會使得 CREB Ser133 位置去磷酸化 (Liu and Graybiel, 1996)，CREB 的磷酸化會調節一些早期即時表現基因 (immediate early genes) 的表現。因此，藉由 DARPP-32 抑制第一型蛋白質磷酸水解酶 PP1 可以增加轉錄因子、神經傳遞物質受體和離子通道的磷酸化進而增強突觸的功能和可塑性 (Greengard et al., 1999)。雖然 DARPP-32 被認為主要是廣泛表現在細胞質的蛋白質，但近期的研究亦發現，在小鼠濫用藥物 (如安非他命) 或食物增強式學習 (Food reinforcement learning) 過程中可觀察到在紋狀體 DARPP-32 顯著累積在細胞核，並且 Thr 34 位置磷酸化之 DARPP-32 也顯著累積在細胞核，發現是經由多巴胺 D1 受體的活化，進而活化蛋白質磷酸水解酶 PP2A (protein phosphatase-2A)，蛋白質磷酸水解酶 PP2A 作用使得 DARPP-32 Ser 97 位置去磷酸化，也發現 DARPP-32 S97A 位置突變小鼠會改變小鼠對濫用藥物的反應以及減少對食物酬賞的動機 (Stipanovich et al., 2008)。除了大量 DARPP-32 在藥物成癮、運動協調的研究外，在胃癌細胞發現到 DARPP-32 和 t-DARPP (truncated isoform of DARPP-32) 基因大量表現，t-DARPP 的磷酸化位置和 DARPP-32 相比為 Thr34 位置缺失 (El-Rifai et al., 2002)，而 DARPP-32 的大量表現會維持粒線體的膜電位 (mitochondrial transmembrane potential)、增加抗細胞凋亡蛋白 Bcl-2 的表現而抑制細胞凋亡 (Belkhiry et al., 2005)，顯示 DARPP-32 也具有抗細胞凋亡功用。

Bcl-x 是屬於 Bcl-2 蛋白家族的成員之一，其 mRNA 在 Exon 2 發生 alternative splicing 後，經轉譯作用產生具有抗細胞凋亡功能的 Bcl-xL 和促細胞凋亡功能的 Bcl-xS。在癌細胞發現有 Bcl-xL 大量表現，而大量表現 Bcl-xL 會抑制細胞凋亡並且增加腫瘤對化學療法的抗性 (Liu et al., 1999)，在神經母細胞瘤細胞株 (neuroblastoma cell line) 發現 Bcl-xS 會抑制細胞的存活增加細胞凋亡 (Dole et al., 1996)，給予初級培養大鼠皮質神經細胞安非他命發現會造成神經細胞的凋亡，並且可觀察到 Bcl-xL 的表現減少 Bcl-xS 表現增加 (Stumm et al., 1999)。在癌細胞的研究則發現 Bcl-x 的 alternative splicing 會受到 ceramide 調節，ceramide 會促使調節 alternative splicing 的因子 SR 蛋白質 (serine/arginine-rich protein) 去磷酸化，而 SR 蛋白質則被證實為第一型蛋白質磷酸水解酶 PP1 的受質。研究發現給予肺癌細胞 ceramide 處理或增加內生性的 ceramide，或對不同的癌細胞像是子宮頸癌、前列腺癌或乳癌細胞給予蛋白質合成抑制劑 emetine 後，皆發現 Bcl-xL 的表現減少並伴隨著 Bcl-xS 表現增加，若

再給予第一型蛋白質磷酸水解酶 PP1 和蛋白質磷酸水解酶 PP2A 的抑制劑 calyculin A 則會阻斷 ceramide 和 emetine 所誘發的 alternative splicing 變化，而給予蛋白質磷酸水解酶 PP2A 特定的抑制劑 okadaic acid 則不會影響 Bcl-x 的 alternative splicing，顯示 Bcl-x 的 alternative splicing 調控作用是透過第一型蛋白質磷酸水解酶 PP1 (Chalfant et al., 2002, Boon-Unge et al., 2007)。

早先許多的研究已指出神經退化性疾病像是阿茲海默症、巴金森氏症、亨丁頓舞蹈症，皆會有細胞凋亡之現象，且發現在阿茲海默症和精神分裂症病人其大腦皮質蛋白激酶 CK2 的表現顯著減少。由於 DARPP-32 已被證實是蛋白激酶 CK2 的受質，在癌細胞的研究也發現蛋白激酶 CK2 和 DARPP-32 皆有大量的表現，並且具有抗細胞凋亡功能，因此，研究目的欲進一步探討，蛋白激酶 CK2 的抗凋亡機制是否是透過調控 DARPP-32 的磷酸化作用，進而增加具有抗細胞凋亡功用之 Bcl-xL 的表現以及減少具有促進細胞凋亡功用之 Bcl-xS 的表現，以及此細胞訊息傳遞路徑是否參與在逆境環境中對細胞的保護機。

材料與方法

細胞培養

實驗所使用的細胞株為大鼠 PC12 細胞株，培養於含有 5% 胎牛血清 (Fetal bovine serum, FBS) 和 10% 馬血清 (Horse serum, HS) 的 DMEM 培養液中，此細胞株為貼附型的細胞，為使 PC12 細胞能貼附於培養盤。

質體製備

所用之 Flag-tagged DARPP-32 質體的建構是使用 PC12 細胞之 cDNA 以聚合酶連鎖反應 (Polymerase chain reaction) 來選殖 DARPP-32 基因全長的核苷酸，所使用的引子為 5'-CGC GAA TTC ATG GAC CCC AAG GAC CGC-3' (底線標示的序列為 EcoRI 切位，ATG 為起始密碼子) 和 5'-GCT CTC GAG TTA TGT GCC GGA CTC AGG -3' (底線標示的序列為 XhoI 切位，TTA 為終止密碼子)。實驗使用 QuikChange II XL Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene) 將 DARPP-32 Ser102 位置的密碼子 TCG 突變為 Ala 密碼子 GCG 以下簡稱 DARPP-32 S102A 所使用的引子為 F: 5'-GTG AGA ACC AGG CCG CGG AGG AAG AGG ACG AG -3'，R: 5'-CTC GTC CTC TTC CTC CGC GGC CTG GTT CTC AC -3' 和 DARPP-32 Ser102 位置的密碼子 TCG 突變為 Asp 密碼子 GAC 以下簡稱 DARPP-32 S102D 所使用的引子為 F: 5'-CCT GAG TGA GAA CCA GGC CGA CGA GGA AGA GGA CGA G -3'，R: 5'-CTC GTC CTC TTC CTC GTC GGC CTG GTT CTC ACT CAG G -3'，接著將構築的 DNA 質體送交進行核苷酸定序分析，確認 DARPP-32 S102A 和 DARPP-32 S102D 確實為突變型的質體。

DARPP-32 S102 位置磷酸化抗體製備

根據 Hamada 等學者的研究文獻 (Hamada et al., 2005)，針對大鼠 DARPP-32 Ser102 位置磷酸化設計一段 Ser102 攜帶磷酸根的 peptide [SENQA(pS)EEE]，並委託濁水溪生物科技股份有限公司 (LTK BioLaboratories) 合成 peptide 及進行兔子免疫反應，所獲得之抗體再利用西方點墨法分析對 Ser102 位置磷酸化的辨識專一性。

藥物處理

實驗使用蛋白激酶 CK2 抑制劑 4,5,6,7- tetrabromobenzotriazole (TBB; Calbiochem)，TBB 的作用為對 CK2 造成 ATP/GTP 競爭的抑制劑 (Sarno et al., 2001)。TBB 先以 1 ml 的細胞等級 Dimethyl sulfoxide (DMSO, sigma) 溶解，再取部份稀釋至 10 mM，再以 10 mM TBB 與培養液稀釋為 50 μ M 加入細胞培養盤，作用 24 小時後再萃取蛋白質進行西方點墨法 (Western blot)。另外也使用 30% Hydrogen peroxide solution (sigma)，以培養液稀釋成 250 μ M，加入經轉染 CK2 α siRNA 或 DARPP-32 siRNA 之細胞培養盤，作用 24 小時後再萃取 RNA 進行即時定量聚合酶連鎖反應 (Quantitative real-time polymerase chain reaction)。

西方點墨法

PC12 細胞依實驗需求經藥物或轉染處理後，加入含有蛋白酶抑制劑 (Calbiochem) 以及磷酸酶抑制劑 (Calbiochem) 的裂解緩衝液，裂解緩衝液 (pH=8.0) 的成分為 50 mM Tris-HCl、150 mM NaCl、2 mM EDTA、1% NP40，在 4 °C 下以 14000 ×g 轉速離心 10 分鐘，離心後抽取上清液進行蛋白質電泳分離及轉漬 PVDF 膜 (Millipore)。以 0.05% TBST 緩衝液所配製的初級抗體於 4 °C 環境下反應 16-18 小時。初級抗體包含 mouse anti-actin antibody (1 : 100000, Chemicon)、mouse anti-CK2α antibody (1 : 4000, Abcam)、rabbit anti-DARPP-32 antibody (1 : 1000, Cell Signaling)、customized rabbit anti-phospho-DARPP-32 (Ser102) antibody (1 : 3000, LTK BioLaboratories)、mouse anti-Bcl-x antibody (1 : 1000, Chemicon)。使用影像系統 (AVEGENE) 進行冷光訊號擷取，所得結果使用 NIH Image J 軟體進行量化分析。

即時定量聚合酶連鎖反應

使用 Applied Biosystem 7300 Real-Time PCR System 進行即時定量聚合酶連鎖反應，並使用 Maxima SYBR Green /ROX qPCR master mix (Fermentas) 進行基因表現量分析。實驗反應條件為：50 °C 2 mins, 95 °C 10 mins, 95 °C 15 secs, 60 °C 1 min 共 40 cycles。反應完成後，利用儀器所附之軟體進行數據分析，測定出 Ct 值再帶入公式算出標的基因與 HPRT 的相對值，進行分析。Bcl-xL 和 Bcl-xS 引子的設計根據 Bcl-X 基因經 alternative splicing 後，Bcl-xS 和 Bcl-xL 相比在 Exon 2 靠近 3' 處缺失，因此 Bcl-xL 和 Bcl-xS 設計相同的 forward 引子，Bcl-xS 的 reverse 引子設計在跨 Exon 2a 和 Exon 3 的位置，Bcl-xL 的 reverse 引子則設計在 Exon 2b 的位置(Boon-Unge et al., 2007)。

TUNEL assay

實驗使用 Apoptag plus peroxidase *in situ* apoptosis detection kit (Chemicon) 偵測細胞凋亡。在顯微鏡明視野下以 20× 物鏡隨機取 10 個區域，每個區域再隨機取 3 個區域做細胞計數，實驗數值以 Apoptosis cells/ 100 cells 表示。

統計分析

實驗結果數據以 Sigmastat 軟體進行分析，當實驗組別為對照組和實驗組兩組時，要比較兩者之間的差異時以 Sigmastat 軟體中的 Student's t-test 統計方式進行分析，而當實驗組別為三組或三組以上時，則使用 Sigmastat 軟體中的單因子變異數分析 (One-way analysis of variance with repeated measure, one-way ANOVA) 進行統計分析，若欲比較任一實驗組與對照組的差異，使用 Dunnett's t-test 進行事後比較，若是比較實驗各組間的差異，則使用 Student Newman-kuel's method 進行事後比較。統計分析結果顯著差異表示方法：* 表示 $p < 0.05$ ，** 表示 $p < 0.01$ 。

實驗結果

細胞在接受野生型 CK2 α WT DNA 質體轉染後，以西方點墨法分析，結果顯示轉染野生型的 CK2 α WT DNA 質體確實會在細胞內進行基因表現，造成細胞內 CK2 α 蛋白質的表現量增加並且達到統計上顯著差異 ($p < 0.01$ by Student's t-test) (圖一)，同時也可以發現 DARPP-32 Ser102 位置的磷酸化現象有顯著性增加 ($p < 0.01$ by Student's t-test) (圖二 B)，而 DARPP-32 蛋白質則無顯著差異 ($p > 0.05$ by Student's t-test) (圖二 C)，並且也會顯著促進 Bcl-xL 蛋白質的含量 ($p < 0.01$ by Student's t-test) (圖二 D)。以 real-time PCR 進行定量分析實驗結果顯示，Bcl-xL/Bcl-xS mRNA 的比值有顯著性增加 ($p < 0.01$ by Student's t-test) (圖二 E)。

過度表現 (over-expression) CK2 α WT 可有效增加細胞內 DARPP-32 Ser102 磷酸化以及抗細胞凋亡蛋白 Bcl-xL 的蛋白質含量，但是抑制 CK2 活性是否也同樣可以造成 DARPP-32 Ser102 磷酸化以及 Bcl-xL 蛋白質含量的減少？因此實驗接著同樣使用西方點墨法來觀察 CK2 抑制劑 TBB 對細胞 DARPP-32 Ser102 磷酸化以及 Bcl-xL 蛋白質含量的影響，所選用的 TBB 濃度依據實驗室先前研究中處理 50 μ M TBB 可有效影響 CK2 作用的下游分子。實驗結果發現 50 μ M TBB 處理 24 小時後，可顯著降低 DARPP-32 Ser102 的磷酸化 ($p < 0.01$ by Student's t-test) (圖三 B)，而 DARPP-32 蛋白質含量無顯著差異 ($p > 0.05$ by Student's t-test) (圖三 C)，同時 Bcl-xL 的蛋白質含量會顯著減少 ($p < 0.05$ by Student's t-test) (圖三 D)。以 real-time PCR 進行定量分析結果則顯示 Bcl-xL/Bcl-xS mRNA 的比值有顯著性減少 ($p < 0.05$ by Student's t-test) (圖三 E)。因此，由實驗結果推論抑制 CK2 活性會顯著降低 DARPP-32 Ser102 位置的磷酸化、抗細胞凋亡蛋白 Bcl-xL 的蛋白質含量以及 Bcl-xL/Bcl-xS mRNA 表現。

從上述實驗的實驗結果可以確認調控 CK2 α 會影響 DARPP-32 Ser102 的磷酸化以及 Bcl-xL 蛋白質的含量和 Bcl-xL/Bcl-xS mRNA，但是 DARPP-32 是否參與 CK2 α 對 Bcl-xL 調控的細胞訊息傳遞路徑？因此，實驗設計首先是利用 DARPP-32 siRNA 觀察抑制內生性的 DARPP-32 是否會影響細胞內 Bcl-xL 蛋白質含量和 Bcl-xL/Bcl-xS mRNA 的表現。首先，將細胞分別轉染單獨一組及兩組合用的 DARPP-32 siRNA 後，使用西方點墨法分析，由圖四可以觀察到，轉染 DARPP-32 siRNA 可以顯著影響內生性 DARPP-32 蛋白質表現 ($p < 0.01$) 其中，轉染兩組合用的 DARPP-32 siRNA 和對照組相比，顯著減少內生性 DARPP-32 蛋白質表現 ($p < 0.01$ by Dunnett's t-test)。而在圖五的實驗結果顯示轉染 DARPP-32 siRNA 後會顯著影響 Bcl-xL 蛋白質含量 ($F_{3,28} = 12.115$, $p < 0.01$)，其中轉染兩組合用的 DARPP-32 siRNA 的組別和對照組相比顯著減少 Bcl-xL 蛋白質含量 ($p < 0.01$ by Dunnett's t-test) (圖五 A)；雖然以 real-time PCR 定量分析的結果則顯示 Bcl-xL/Bcl-xS mRNA 表現並無顯著差異 (圖五 B)，但是，從上述實驗結果可以證實 DARPP-32 確實參與 Bcl-xL 蛋白質含量的細胞調節機制。

由上述實驗可知，調控 DARPP-32 蛋白質含量確實會影響 Bcl-xL 的蛋白質表現，實驗欲進一步確認 DARPP-32 Ser102 的磷酸化現象是否參與 Bcl-xL 的調控作用？實驗首先以核苷酸定點突變 (site directed mutagenesis) 技術來構築模擬 Ser102 磷酸

化現象之突變型的 DARPP-32 S102D DNA 質體，將 DARPP-32 Ser102 位置的密碼子 TCG 突變為 Asp 密碼子 GAC，以及構築模擬 Ser102 無法被磷酸化之突變型的 DARPP-32 S102A DNA 質體，將 DARPP-32 Ser102 位置的密碼子 TCG 突變為 Ala 密碼子 GCG，並將此 DNA 質體送交定序分析，確認成功構築了 DARPP-32 S102D 和 DARPP-32 S102A DNA 質體。

接著將細胞分別進行野生型 DARPP-32、突變型 DARPP-32 S102D 或 DARPP-32 S102A DNA 質體 48 小時後，以西方點墨法分析，由圖十一實驗結果顯示轉染野生型 DARPP-32 或突變型 DARPP-32 S102D DNA 質體，其細胞 DARPP-32 的表現量確實有增加的情形 (圖六 A)，且 Bcl-xL 蛋白質的含量有顯著變化 ($p < 0.05$)，其中，處理突變型 DARPP-32 S102D DNA 質體和對照組相比，Bcl-xL 蛋白質的含量有顯著性的增加 ($p < 0.05$ by Dunnett's t-test) (圖六 B)，以 real-time PCR 定量分析實驗結果則顯示 Bcl-xL/Bcl-xS mRNA 的比值有顯著增加 ($p < 0.05$ by Student's t-test) (圖六 C)。圖十二的實驗結果則顯示，轉染野生型 DARPP-32 或突變型 DARPP-32 S102A DNA 質體，其細胞 DARPP-32 的蛋白質含量確實有增加的情形 (圖七 A)，並且 Bcl-xL 蛋白質的含量有顯著變化 ($p < 0.01$)，其中處理突變型 DARPP-32 S102A DNA 質體和對照組相比，其 Bcl-xL 蛋白質的含量有顯著降低 ($p < 0.01$ by Dunnett's t-test) (圖七 B)，而且以 real-time PCR 定量分析實驗結果則顯示 Bcl-xL/Bcl-xS mRNA 的比值亦有顯著降低 ($p < 0.05$ by Student's t-test) (圖七 C)。從上述的實驗結果顯示細胞內 DARPP-32 S102 磷酸化確實與 Bcl-xL 基因表現的調控具有相關性。

實驗欲進一步確認蛋白激酶 CK2 和 DARPP-32 是否在遭受壓力下，扮演著更重要的保護角色？實驗首先對細胞轉染 CK2 α siRNA 或 DARPP-32 siRNA 後，再處理過氧化氫 (Hydrogen peroxide)，以西方點墨法進行分析，所選用的濃度依據 Jang and Surh, 2001; Cho et al., 2008 研究選擇處理 250 μ M 濃度進行實驗，實驗結果顯示 CK2 α siRNA 或 DARPP-32 siRNA 和過氧化氫共同處理對 CK2 α 、DARPP-32 Ser102 的磷酸化、DARPP-32、Bcl-xL 蛋白質表現之單因子變方統計分析皆有整體顯著差異 ($p < 0.01$) (圖八)。其中轉染 CK2 α siRNA 再處理過氧化氫和單獨處理過氧化氫相比可顯著降低 DARPP-32 Ser102 的磷酸化 ($p < 0.05$ by Newman-Keul's method, 圖八 C) 和 Bcl-xL 蛋白質表現 ($p < 0.01$ by Newman-Keul's method, 圖八 E)，轉染 DARPP-32 siRNA 再處理過氧化氫和對照組相比可顯著降低 DARPP-32 Ser102 的磷酸化 ($p < 0.01$ by Newman-Keul's method, 圖八 C) 和 Bcl-xL 蛋白質表現 ($p < 0.01$ by Newman-Keul's method, 圖八 E)。以 real-time PCR 進行定量分析的實驗結果則顯示，CK2 α siRNA 或 DARPP-32 siRNA 和過氧化氫共同處理對 Bcl-xL/Bcl-xS mRNA 表現有整體顯著差異 ($p < 0.01$) (圖八 F)。其中，轉染 CK2 α siRNA 再處理過氧化氫和單獨處理過氧化氫相比可以顯著降低 Bcl-xL/Bcl-xS mRNA 的比值 ($p < 0.05$ by Newman-Keul's method)。而單獨 DARPP-32 siRNA 轉染處理並無達到統計差異，但轉染 DARPP-32 siRNA 後再處理過氧化氫和對照組相比則可以顯著降低 Bcl-xL/Bcl-xS mRNA 的比值 ($p < 0.05$ by Newman-Keul's method)。綜合上述的實驗結果顯示，抑制細胞蛋白激酶 CK2 和 DARPP-32 表現會加劇細胞在氧化壓力逆境下 DARPP-32 Ser102 的磷酸化、Bcl-xL 蛋白質含量的減少以及 Bcl-xL /Bcl-xS mRNA

表現比值的下降。

實驗進一步確認是否會影響細胞存活？實驗首先對細胞轉染 CK2 α siRNA 或 DARPP-32 siRNA 後，再處理 250 μ M 過氧化氫 (Hydrogen peroxide)，以 TUNEL 方法觀察細胞凋亡。由實驗結果得知轉染 CK2 α siRNA 或 DARPP-32 siRNA 對過氧化氫處理之細胞凋亡程度整體達顯著差異($p < 0.01$ ，圖九 B)，過氧化氫處理和對照組相比顯著增加細胞的凋亡 ($p < 0.01$ by Newman-Keul's method)，轉染 CK2 α siRNA 或 DARPP-32 siRNA 再處理過氧化氫和單獨處理過氧化氫相比顯著增加細胞的凋亡 ($p < 0.01$ by Newman-Keul's method)。綜合上述的實驗結果顯示，抑制細胞蛋白激酶 CK2 和 DARPP-32 表現會加劇在氧化壓力逆境下細胞的凋亡。

討論

先前的研究文獻指出蛋白激酶 CK2 對癌細胞和神經細胞皆具有抗細胞凋亡的功能 (Desagher et al., 2001, Kim et al., 2008b)，而蛋白激酶 CK2 受質之一的 DARPP-32 蛋白主要表現於接收多巴胺訊息的神經細胞 (Girault et al., 1989)，雖然 DARPP-32 在先前研究著重於探討其與多巴胺訊息傳遞的調控、藥物濫用、抗精神病藥的相關性 (Greengard, 2001)，而後的研究亦發現在癌細胞中 DARPP-32 蛋白有大量表現的現象並可增進癌細胞的存活 (Belkhiri et al., 2005)，因此，CK2 磷酸化 DARPP-32 蛋白是否為 CK2 之抗細胞凋亡的機制之一是本研究探討的重點。

DARPP-32 蛋白的 Ser102 胺基酸已被證實是 CK2 磷酸化作用的位置 (Girault et al., 1989)，但此磷酸化的作用是否會受到細胞內 CK2 基因表現變化而調控則尚未被驗證，藉由轉染 CK2 α WT 質體、CK2 α siRNA 以及處理 CK2 抑制劑 TBB 操弄 CK2 的基因表現或抑制其酵素活性來觀察 CK2 活性的增加或減少對 DARPP-32 Ser102 磷酸化的影響。雖然 CK2 的蛋白激酶活性才是真正會影響其下游受質磷酸化的改變，而在論文的實驗中僅以西方點墨法證明，轉染 CK2 α WT 質體或 CK2 α siRNA 確實可以促進或抑制細胞內 CK2 α 蛋白質的表現，不過在先前所發表與 CK2 相關的研究中已經證實，轉染 CK2 α WT DNA 質體在活體動物之黑質 (Substantia nigra) 腦區的細胞中，確實可以顯著促進細胞內 CK2 的酵素激酶活性 (Chao et al., 2006)，因此在實驗中發現細胞內 CK2 α 蛋白質的含量會因轉染 CK2 α WT 質體而增加的現象應可推測反映在其酵素激酶活性的增加。此外，從轉染 CK2 α WT 質體會增加 DARPP-32 Ser102 磷酸化的實驗結果可以證實，調控細胞內 CK2 的基因表現會影響 DARPP-32 Ser102 磷酸化的變化，在給予 CK2 抑制劑 TBB 造成 DARPP-32 Ser102 磷酸化程度減少的實驗結果同樣可以支持此一結論。調控蛋白激酶 CK2 除了會影響 DARPP-32 Ser102 的磷酸化外，改變細胞內 CK2 α 基因表現的亦被證實也會影響其他蛋白質的磷酸化現象，例如：在大鼠海馬迴轉染 CK2 α WT 質體的研究也發現會增加轉錄因子 NF- κ B (Nuclear Factor Kappa B) Ser-529 的磷酸化和 Bcl-xL 的基因表現，處理 TBB 會阻斷 BDNF 對促進海馬迴腦區細胞之 NF- κ B 的磷酸化和 Bcl-xL 的作用 (Chao et al., 2011)；另外，針對 Jurkat 細胞處理 TBB 亦會發現可以抑制 Akt 的活性，對人類前列腺癌細胞 (LNCaP cell line) 轉染 CK2 α siRNA 也發現會抑制 Akt 的活性，而 Akt 的活化被認為具有抗細胞凋亡的功能 (Di Maira et al., 2005)。

DARPP-32 不同胺基酸的磷酸化已被證實對第一型蛋白質磷酸水解酶 PP1 的調控扮演相當的重要性。研究文獻指出 DARPP-32 Ser102 被 CK2 作用產生磷酸化後會增強蛋白激酶 PKA 對 Thr 34 的磷酸化作用 (Girault et al., 1989)，進而抑制第一型蛋白質磷酸水解酶 PP1 (Hemmings et al., 1984)，而 DARPP-32 Thr75 經細胞週期蛋白依賴性激酶 CDK5 磷酸化作用後則會抑制蛋白激酶 PKA，進而解除其對第一型蛋白質磷酸水解酶 PP1 的抑制作用 (Bibb et al., 1999)。此外，蛋白激酶 PKA 亦會經由活化蛋白質磷酸水解酶 PP2A 而導致 DARPP-32 Thr75 的去磷酸化 (Nishi et al., 2000, Ahn et al., 2007)。由於蛋白質磷酸水解酶 PP1 活性的增加會導致 Bcl-xL mRNA 的表現減少 (Yang et al., 2004)，綜合上述的文獻結果，在論文中發現調控 CK2 而影響

DARPP-32 Ser102 磷酸化的實驗結果可以推論對細胞內蛋白質磷酸水解酶 PP1 的活性具有一定程度調節作用。

屬於 Bcl-2 家族的 Bcl-x 基因經 mRNA alternative splicing 後產生具有抗細胞凋亡功能的 Bcl-xL 以及具有促進細胞凋亡功能的 Bcl-xS (Boise et al., 1993), Bcl-xL 作用維持粒線體外膜的完整性抑制粒線體外膜的通透性增加, 進而抑制細胞色素 C (Cytochrome c) 釋放到細胞質中防止細胞凋亡 (Green and Reed, 1998), 而 Bcl-xS 的促細胞凋亡機制目前尚未明確, 但研究指出 Bcl-xS 的表現會增加神經細胞和癌細胞的凋亡 (Dole et al., 1996, Chalfant et al., 2002)。細胞調控 Bcl-xL 的機制除了可以經由 IGF1 (Insulin-like growth factor 1) 透過 IGF1-R (Insulin-like growth factor 1 receptor) 作用活化 Akt 的訊息傳遞路徑 (Sekharam et al., 2003) 外, 先前研究也發現 BDNF/CK2/NF- κ B/Bcl-xL 的訊息傳遞路徑 (Chao et al., 2011), 共同轉染 CK2 α WT 和 DARPP-32 S102A 的實驗結果顯示蛋白激酶 CK2 也可以透過 DARPP-32 Ser102 位置調控 Bcl-xL 蛋白質含量, 確立了細胞內另外存在有一條 CK2/DARPP-32/Bcl-xL 的訊息傳遞路徑。

Bcl-x 是經由蛋白質磷酸水解酶 PP1 參與的 alternative splicing 機制而生成具有抗細胞凋亡功能的 Bcl-xL 以及具有促進細胞凋亡功能的 Bcl-xS (Chalfant et al., 2002, Boon-Unge et al., 2007), 研究文獻指出, 甲硫胺酸 (methionine) 代謝產物 S-adenosylmethionine (S-AdoMet) 和 5-methylthioadenosine (MTA) 處理促使肝癌細胞凋亡的細胞機制即是增加蛋白質磷酸水解酶 PP1 的表現, 進而使調節 alternative splicing 的 SR (serine/arginine-rich protein) 蛋白產生去磷酸化作用而導致 Bcl-xL 的表現的減少和 Bcl-xS 表現的增加 (Yang et al., 2004)。雖然, 先前的研究也發現在大鼠 CA1 區域轉染 CK2 α WT DNA 質體會顯著增加 Bcl-xL mRNA 表現而轉染 CK2 α siRNA 會顯著減少 Bcl-xL mRNA 表現是透過活化轉錄因子 NF- κ B 的細胞機制 (Chao et al., 2011), 但是並未觀察 Bcl-xS mRNA 表現的變化。從 CK2 α WT 和模擬磷酸化現象的 DARPP-32 S102D DNA 質體轉染顯著增加 Bcl-xL 蛋白質表現和 Bcl-xL/Bcl-xS mRNA 比例, 以及 CK2 α siRNA 和突變型 DARPP-32 S102A DNA 質體轉染會減少 Bcl-xL 蛋白質表現和 Bcl-xL/Bcl-xS mRNA 比例的實驗結果顯示, CK2 除了可以透過 NF- κ B 調控 Bcl-x 基因轉錄作用外, 同時也可以透過 DARPP-32 蛋白調控 Bcl-x mRNA 的 alternative splicing 作用來促進細胞內 Bcl-xL 蛋白質含量。而轉染 CK2 α siRNA 的實驗結果顯示對 Bcl-xL 蛋白質減少的效果大於 Bcl-xL/Bcl-xS mRNA 比例的減少, 在其他研究發現 CK2 會作用磷酸化轉譯起始的分子 Eukaryotic translation initiation factor (eIF) 5 和 eIF2 (Meggio and Pinna, 2003, Homma et al., 2005), 推論可能是因為 CK2 除了調控基因的轉錄外, 還會作用調控轉譯過程而使得此結果的不同。

實驗中單獨處理 CK2 α siRNA、DARPP-32 siRNA 雖然有效減少抗細胞凋亡蛋白質 Bcl-xL 的表現, 但轉染 DARPP-32 siRNA 並不會顯著減少 Bcl-xL/Bcl-xS mRNA 的比值, 雖然兩者 siRNA 對促進細胞凋亡也有統計上顯著性的差異, 但是卻不會造成細胞大量的死亡 (圖十四)。但是在轉染 CK2 α siRNA、DARPP-32 siRNA 後再利用過氧化氫產生氧化逆境的實驗結果可以發現, 處理過氧化氫會降低 DARPP-32 Ser102 的磷酸化、Bcl-xL 蛋白質表現以及 Bcl-xL/Bcl-xS mRNA 比值, 其中轉染 CK2 α siRNA 再

處理過氧化氫和單獨處理過氧化氫相比更為顯著降低 DARPP-32 Ser102 的磷酸化和 Bcl-xL 蛋白質表現以及 Bcl-xL/Bcl-xS mRNA 比值，而轉染 DARPP-32 siRNA 再處理過氧化氫和對照組相比可顯著降低 DARPP-32 Ser102 的磷酸化、Bcl-xL 蛋白質表現以及 Bcl-xL/Bcl-xS mRNA 比值，並且實驗結果也顯示兩者 siRNA 處理後再處理過氧化氫會顯著造成細胞凋亡，推論在細胞遭逢氧化逆境時，細胞內若 CK2 或 DARPP-32 的減少將會加劇氧化自由基對細胞的傷害，在其它研究發現處理 CK2 的抑制劑 DMAT 會增加活性氧化物 (reactive oxygen species, ROS) 的產生和 DNA 雙股斷裂造成細胞凋亡 (Schneider et al., 2009)。活性氧化物(reactive oxygen species, ROS) 的傷害是造成阿茲海默症的危險因子之一 (Gorman et al., 1996, Deigner et al., 2000)，先前研究曾指出給予細胞處理過氧化氫後會顯著造成細胞死亡 (Jang and Surh, 2001, Cho et al., 2008, Kim et al., 2008a)，相關的研究則指出過氧化氫所造成的細胞凋亡傷害是透過增加 caspase3 和 caspase 8 的活性以及抑制 JNK (c-Jun-N-terminal kinase) 的磷酸化，進而促進細胞凋亡 (Matsura et al., 1999; Kim et al., 2008a)。綜合上述的實驗結果，證實 CK2/ DARPP-32/ Bcl-xL 的訊息傳遞路徑存在於細胞中，進一步利用過氧化氫製造細胞氧化逆境的實驗結果則可以推論，此條細胞訊息傳遞路徑對於細胞對抗氧化逆境扮演相當程度的重要性。

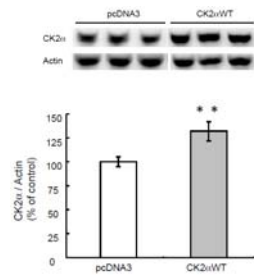
參考文獻

- Ahn JH, McAvoy T, Rakhilin SV, Nishi A, Greengard P, Nairn AC (2007) Protein kinase A activates protein phosphatase 2A by phosphorylation of the B56delta subunit. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:2979-2984.
- Aksenova MV, Burbaeva GS, Kandror KV, Kapkov DV, Stepanov AS (1991) The decreased level of casein kinase 2 in brain cortex of schizophrenic and Alzheimer's disease patients. *FEBS Lett* 279:55-57.
- Apostol BL, Illes K, Pallos J, Bodai L, Wu J, Strand A, Schweitzer ES, Olson JM, Kazantsev A, Marsh JL, Thompson LM (2006) Mutant huntingtin alters MAPK signaling pathways in PC12 and striatal cells: ERK1/2 protects against mutant huntingtin-associated toxicity. *Hum Mol Genet* 15:273-285.
- Bateup HS, Santini E, Shen W, Birnbaum S, Valjent E, Surmeier DJ, Fisone G, Nestler EJ, Greengard P (2010) Distinct subclasses of medium spiny neurons differentially regulate striatal motor behaviors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107:14845-14850.
- Bateup HS, Svenningsson P, Kuroiwa M, Gong S, Nishi A, Heintz N, Greengard P (2008) Cell type-specific regulation of DARPP-32 phosphorylation by psychostimulant and antipsychotic drugs. *Nat Neurosci* 11:932-939.
- Belkhir A, Zaika A, Pidkovka N, Knuutila S, Moskaluk C, El-Rifai W (2005) Darpp-32: a novel antiapoptotic gene in upper gastrointestinal carcinomas. *Cancer Res* 65:6583-6592.
- Bibb JA, Snyder GL, Nishi A, Yan Z, Meijer L, Fienberg AA, Tsai LH, Kwon YT, Girault JA, Czernik AJ, Huganir RL, Hemmings HC, Jr., Nairn AC, Greengard P (1999) Phosphorylation of DARPP-32 by Cdk5 modulates dopamine signalling in neurons. *Nature* 402:669-671.
- Bibb JA, Yan Z, Svenningsson P, Snyder GL, Pieribone VA, Horiuchi A, Nairn AC, Messer A, Greengard P (2000) Severe deficiencies in dopamine signaling in presymptomatic Huntington's disease mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:6809-6814.
- Blanquet PR (1998) Neurotrophin-induced activation of casein kinase 2 in rat hippocampal slices. *Neuroscience* 86:739-749.
- Boise LH, Gonzalez-Garcia M, Postema CE, Ding L, Lindsten T, Turka LA, Mao X, Nunez G, Thompson CB (1993) bcl-x, a bcl-2-related gene that functions as a dominant regulator of apoptotic cell death. *Cell* 74:597-608.
- Bonoiu AC, Mahajan SD, Ding H, Roy I, Yong KT, Kumar R, Hu R, Bergey EJ, Schwartz SA, Prasad PN (2009) Nanotechnology approach for drug addiction therapy: gene silencing using delivery of gold nanorod-siRNA nanoplex in dopaminergic neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106:5546-5550.
- Boon-Unge K, Yu Q, Zou T, Zhou A, Govitrapong P, Zhou J (2007) Emetine Regulates the Alternative Splicing of Bcl-x through a Protein Phosphatase 1-Dependent Mechanism. *Chem Biol* 14:1386-1392.
- Bredesen DE, Rao RV, Mehlen P (2006) Cell death in the nervous system. *Nature* 443:796-802.
- Buchou T, Vernet M, Blond O, Jensen HH, Pointu H, Olsen BB, Cochet C, Issinger OG, Boldyreff B (2003) Disruption of the regulatory beta subunit of protein kinase CK2 in mice leads to a cell-autonomous defect and early embryonic lethality. *Mol Cell Biol* 23:908-915.
- Burnett G, Kennedy EP (1954) The enzymatic phosphorylation of proteins. *J Biol Chem* 211:969-980.
- Cash R, Raisman R, Ploska A, Agid Y (1987) Dopamine D-1 receptor and cyclic AMP-dependent phosphorylation in Parkinson's disease. *J Neurochem* 49:1075-1083.
- Chalfant CE, Rathman K, Pinkerman RL, Wood RE, Obeid LM, Ogretmen B, Hannun YA (2002) De novo ceramide regulates the alternative splicing of caspase 9 and Bcl-x in A549 lung adenocarcinoma cells. Dependence on protein phosphatase-1. *J Biol Chem* 277:12587-12595.
- Chao CC, Chiang CH, Ma YL, Lee EH (2006) Molecular mechanism of the neurotrophic effect of GDNF on DA neurons: role of protein kinase CK2. *Neurobiol Aging* 27:105-118.
- Chao CC, Ma YL, Lee EH (2011) Brain-derived neurotrophic factor enhances Bcl-xL expression through protein kinase casein kinase 2-activated and nuclear factor kappa B-mediated pathway in rat hippocampus. *Brain Pathol* 21:150-162.
- Charriaut-Marlangue C, Otani S, Creuzet C, Ben-Ari Y, Loeb J (1991) Rapid activation of hippocampal casein kinase II during long-term potentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88:10232-10236.
- Chester N, Yu IJ, Marshak DR (1995) Identification and characterization of protein kinase CKII isoforms in HeLa cells. Isoform-specific differences in rates of assembly from catalytic and regulatory subunits. *J Biol Chem* 270:7501-7514.
- Cho ES, Lee KW, Lee HJ (2008) Cocoa procyanidins protect PC12 cells from hydrogen-peroxide-induced apoptosis by inhibiting activation of p38 MAPK and JNK. *Mutat Res* 640:123-130.
- Deigner HP, Haberkorn U, Kinscherf R (2000) Apoptosis modulators in the therapy of neurodegenerative diseases. *Expert Opin Investig Drugs* 9:747-764.

- Desagher S, Osen-Sand A, Montessuit S, Magnenat E, Vilbois F, Hochmann A, Journot L, Antonsson B, Martinou JC (2001) Phosphorylation of bid by casein kinases I and II regulates its cleavage by caspase 8. *Mol Cell* 8:601-611.
- Desdoutis F, Siciliano JC, Nairn AC, Greengard P, Girault JA (1998) Dephosphorylation of Ser-137 in DARPP-32 by protein phosphatases 2A and 2C: different roles in vitro and in striatonigral neurons. *Biochem J* 330 211-216.
- Di Maira G, Salvi M, Arrigoni G, Marin O, Sarno S, Brustolon F, Pinna LA, Ruzzene M (2005) Protein kinase CK2 phosphorylates and upregulates Akt/PKB. *Cell Death Differ* 12:668-677.
- Diaz-Nido J, Serrano L, Mendez E, Avila J (1988) A casein kinase II-related activity is involved in phosphorylation of microtubule-associated protein MAP-1B during neuroblastoma cell differentiation. *J Cell Biol* 106:2057-2065.
- Doepfner TR, El Aanbouri M, Dietz GP, Weise J, Schwarting S, Bahr M (2010) Transplantation of TAT-Bcl-xL-transduced neural precursor cells: long-term neuroprotection after stroke. *Neurobiol Dis* 40:265-276.
- Dole MG, Clarke MF, Holman P, Benedict M, Lu J, Jasty R, Eipers P, Thompson CB, Rode C, Bloch C, Nunez, Castle VP (1996) Bcl-xS enhances adenoviral vector-induced apoptosis in neuroblastoma cells. *Cancer Res* 56:5734-5740.
- El-Rifai W, Smith MF, Jr., Li G, Beckler A, Carl VS, Montgomery E, Knuutila S, Moskaluk CA, Frierson HF, Jr., Powell SM (2002) Gastric cancers overexpress DARPP-32 and a novel isoform, t-DARPP. *Cancer Res* 62:4061-4064.
- Fienberg AA, Greengard P (2000) The DARPP-32 knockout mouse. *Brain Res Brain Res Rev* 31:313-319.
- Fienberg AA, Hiroi N, Mermelstein PG, Song W, Snyder GL, Nishi A, Cheramy A, O'Callaghan JP, Miller DB, Cole DG, Corbett R, Haile CN, Cooper DC, Onn SP, Grace AA, Ouimet CC, White FJ, Hyman SE, Surmeier DJ, Girault J, Nestler EJ, Greengard P (1998) DARPP-32: Regulator of the Efficacy of Dopaminergic Neurotransmission. *Science* 281:838-842.
- Garcia-Jimenez C, Zaballos MA, Santisteban P (2005) DARPP-32 (Dopamine and 3',5'-Cyclic Adenosine Monophosphate-Regulated Neuronal Phosphoprotein) Is Essential for the Maintenance of Thyroid Differentiation. *Mol Endocrinol* 19:3060-3072.
- Gerfen CR, Engber TM, Mahan LC, Susel Z, Chase TN, Monsma FJ, Jr., Sibley DR (1990) D1 and D2 dopamine receptor-regulated gene expression of striatonigral and striatopallidal neurons. *Science* 250:1429-1432.
- Girault JA, Hemmings HC, Jr, Williams KR, Nairn AC, Greengard P (1989) Phosphorylation of DARPP-32, a dopamine- and cAMP-regulated phosphoprotein, by casein kinase II. *J Biol Chem* 264:21748--21759.
- Girault JA, Hemmings HC, Jr., Zorn SH, Gustafson EL, Greengard P (1990) Characterization in mammalian brain of a DARPP-32 serine kinase identical to casein kinase II. *J Neurochem* 55:1772-1783.
- Goldstein JC, Waterhouse NJ, Juin P, Evan GI, Green DR (2000) The coordinate release of cytochrome c during apoptosis is rapid, complete and kinetically invariant. *Nat Cell Biol* 2:156-162.
- Gorman AM, McGowan A, O'Neill C, Cotter T (1996) Oxidative stress and apoptosis in neurodegeneration. *J Neurol Sci* 139 Suppl:45-52.
- Green DR (2005) Apoptotic pathways: ten minutes to dead. *Cell* 121:671-674.
- Green DR, Reed JC (1998) Mitochondria and apoptosis. *Science* 281:1309-1312.
- Greene LA, Tischler AS (1976) Establishment of a noradrenergic clonal line of rat adrenal pheochromocytoma cells which respond to nerve growth factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 73:2424-2428.
- Greengard P (2001) The Neurobiology of Slow Synaptic Transmission. *Science* 294:1024-1030.
- Greengard P, Allen PB, Nairn AC (1999) Beyond the dopamine receptor: the DARPP-32/protein phosphatase-1 cascade. *Neuron* 23:435-447.
- Hakansson K, Galdi S, Hendrick J, Snyder G, Greengard P, Fisone G (2006) Regulation of phosphorylation of the GluR1 AMPA receptor by dopamine D2 receptors. *J Neurochem* 96:482-488.
- Hamada M, Hendrick JP, Ryan GR, Kuroiwa M, Higashi H, Tanaka M, Nairn AC, Greengard P, Nishi A (2005) Nicotine Regulates DARPP-32 (Dopamine- and cAMP-Regulated Phosphoprotein of 32 kDa) Phosphorylation at Multiple Sites in Neostriatal Neurons. *J Pharmacol Exp Ther* 315:872-878.
- Hemmings HC, Jr., Nairn AC, Elliott JI, Greengard P (1990) Synthetic peptide analogs of DARPP-32 (Mr 32,000 dopamine- and cAMP-regulated phosphoprotein), an inhibitor of protein phosphatase-1. Phosphorylation, dephosphorylation, and inhibitory activity. *J Biol Chem* 265:20369-20376.
- Homma MK, Wada I, Suzuki T, Yamaki J, Krebs EG, Homma Y (2005) CK2 phosphorylation of eukaryotic translation initiation factor 5 potentiates cell cycle progression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:15688-15693.

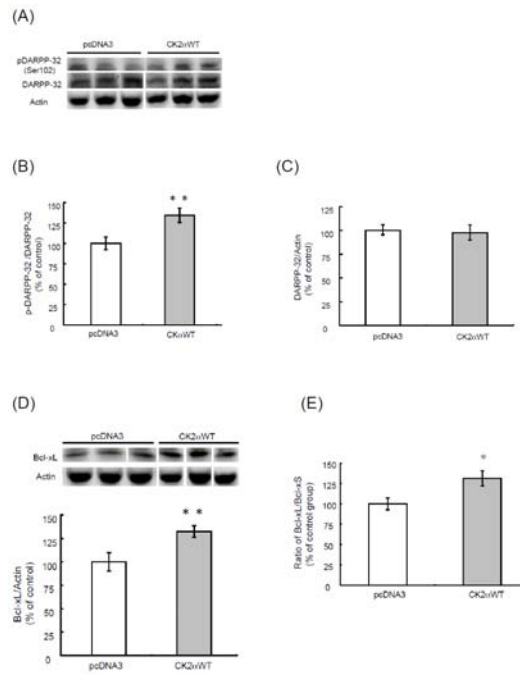
- Izeradjene K, Douglas L, Delaney A, Houghton JA (2005) Casein kinase II (CK2) enhances death-inducing signaling complex (DISC) activity in TRAIL-induced apoptosis in human colon carcinoma cell lines. *Oncogene* 24:2050-2058.
- Jang JH, Surh YJ (2001) Protective effects of resveratrol on hydrogen peroxide-induced apoptosis in rat pheochromocytoma (PC12) cells. *Mutat Res* 496:181-190.
- Kim HJ, Lee KW, Kim MS, Lee HJ (2008a) Piceatannol attenuates hydrogen-peroxide- and peroxynitrite-induced apoptosis of PC12 cells by blocking down-regulation of Bcl-XL and activation of JNK. *J Nutr Biochem* 19:459-466.
- Kim HR, Kim K, Lee KH, Kim SJ, Kim J (2008b) Inhibition of casein kinase 2 enhances the death ligand- and natural killer cell-induced hepatocellular carcinoma cell death. *Clin Exp Immunol* 152:336-344.
- Kluck RM, Bossy-Wetzel E, 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.
- Kuwana T, Bouchier-Hayes L, Chipuk JE, Bonzon C, Sullivan BA, Green DR, Newmeyer DD (2005) BH3 domains of BH3-only proteins differentially regulate Bax-mediated mitochondrial membrane permeabilization both directly and indirectly. *Mol Cell* 17:525-535.
- Laramas M, Pasquier D, Filhol O, Ringeisen F, Descotes JL, Cochet C (2007) Nuclear localization of protein kinase CK2 catalytic subunit (CK2 α) is associated with poor prognostic factors in human prostate cancer. *Eur J Cancer* 43:928-934.
- Letai A, Bassik MC, Walensky LD, Sorcinelli MD, Weiler S, Korsmeyer SJ (2002) Distinct BH3 domains either sensitize or activate mitochondrial apoptosis, serving as prototype cancer therapeutics. *Cancer Cell* 2:183-192.
- Liu FC, Graybiel AM (1996) Spatiotemporal dynamics of CREB phosphorylation: transient versus sustained phosphorylation in the developing striatum. *Neuron* 17:1133-1144.
- Liu R, Page C, Beidler DR, Wicha MS, Nunez G (1999) Overexpression of Bcl-x(L) promotes chemotherapy resistance of mammary tumors in a syngeneic mouse model. *Am J Pathol* 155:1861-1867.
- Lou DY, Dominguez I, Toselli P, Landesman-Bollag E, O'Brien C, Seldin DC (2008) The alpha catalytic subunit of protein kinase CK2 is required for mouse embryonic development. *Mol Cell Biol* 28:131-139.
- Mahajan SD, Aalinkeel R, Reynolds JL, Nair BB, Sykes DE, Hu Z, Bonoiu A, Ding H, Prasad PN, Schwartz SA (2009a) Therapeutic targeting of "DARPP-32": a key signaling molecule in the dopaminergic pathway for the treatment of opiate addiction. *Int Rev Neurobiol* 88:199-222.
- Mahajan SD, Aalinkeel R, Reynolds JL, Nair BB, Sykes DE, Hu Z, Bonoiu A, Ding H, Prasad PN, Schwartz SA (2009b) Therapeutic Targeting of "DARPP-32" A Key Signaling Molecule in the Dopaminergic Pathway for the Treatment of Opiate Addiction. *Int Rev Neurobiol* 88:199-222.
- Matsura T, Kai M, Fujii Y, Ito H, Yamada K (1999) Hydrogen peroxide-induced apoptosis in HL-60 cells requires caspase-3 activation. *Free Radic Res* 30:73-83.
- McKendrick L, Milne D, Meek D (1999) Protein kinase CK2-dependent regulation of p53 function: evidence that the phosphorylation status of the serine 386 (CK2) site of p53 is constitutive and stable. *Mol Cell Biochem* 191:187-199.
- Meggio F, Pinna LA (2003) One-thousand-and-one substrates of protein kinase CK2? *FASEB J* 17:349-368.
- Murnion ME, Adams RR, Callister DM, Allis CD, Earnshaw WC, Swedlow JR (2001) Chromatin-associated Protein Phosphatase 1 Regulates Aurora-B and Histone H3 Phosphorylation. *J Biol Chem* 276:26656-26665.
- Nishi A, Bibb JA, Snyder GL, Higashi H, Nairn AC, Greengard P (2000) Amplification of dopaminergic signaling by a positive feedback loop. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:12840-12845.
- Nishi A, Snyder GL, Nairn AC, Greengard P (1999) Role of calcineurin and protein phosphatase-2A in the regulation of DARPP-32 dephosphorylation in neostriatal neurons. *J Neurochem* 72:2015-2021.
- Ouimet CC, Miller PE, Hemmings HC, Walaas SI, Greengard P (1984) DARPP-32, a dopamine- and adenosine 3':5'-monophosphate-regulated phosphoprotein enriched in dopamine-innervated brain regions. III. Immunocytochemical localization. *J Neurosci* 4:111-124.
- Salvesen GS, Dixit VM (1997) Caspases: intracellular signaling by proteolysis. *Cell* 91:443-446.
- Sarno S, Reddy H, Meggio F, Ruzzene M, Davies SP, Donella-Deana A, Shugar D, Pinna LA (2001) Selectivity of 4,5,6,7-tetrabromobenzotriazole, an ATP site-directed inhibitor of protein kinase CK2 ('casein kinase-2'). *FEBS Lett* 496:44-48.
- Schneider CC, Hessenauer A, Gotz C, Montenarh M (2009) DMAT, an inhibitor of protein kinase CK2 induces reactive oxygen species and DNA double strand breaks. *Oncol Rep* 21:1593-1597.
- Sekharam M, Zhao H, Sun M, Fang Q, Zhang Q, Yuan Z, Dan HC, Boulware D, Cheng JQ, Coppola D (2003) Insulin-like growth factor 1 receptor enhances invasion and induces resistance to apoptosis of

- colon cancer cells through the Akt/Bcl-x(L) pathway. *Cancer Res* 63:7708-7716.
- Stipanovich A, Valjent E, Matamales M, Nishi A, Ahn JH, Maroteaux M, Bertran-Gonzalez J, Brami-Cherrier K, Enslen H, Corbillé AG, Filhol O, Nairn AC, Greengard P, Hervé D, Girault JA (2008) A phosphatase cascade by which rewarding stimuli control nucleosomal response. *Nature* 453:879-884.
- Stoof JC, Keibarian JW (1981) Opposing roles for D-1 and D-2 dopamine receptors in efflux of cyclic AMP from rat neostriatum. *Nature* 294:366-368.
- Stumm G, Schlegel J, Schafer T, Wurz C, Mennel HD, Krieg JC, Vedder H (1999) Amphetamines induce apoptosis and regulation of bcl-x splice variants in neocortical neurons. *FASEB J* 13:1065-1072.
- Svenningsson P, Nishi A, Fisone G, Girault J-A, Nairn AC, Greengard P (2004) DARPP-32: An Integrator of Neurotransmission. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 44:269-296.
- Ulery PG, Rudenko G, Nestler EJ (2006) Regulation of FosB Stability by Phosphorylation. *J Neurosci* 26:5131-5142.
- Valjent E, Pascoli V, Svenningsson P, Paul S, Enslen H, Corvol JC, Stipanovich A, Caboche J, Lombroso PJ, Nairn AC, Greengard P, Hervé D, Girault JA (2005) Regulation of a protein phosphatase cascade allows convergent dopamine and glutamate signals to activate ERK in the striatum. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 102:491-496.
- Walaas SI, Aswad DW, Greengard P (1983) A dopamine- and cyclic AMP-regulated phosphoprotein enriched in dopamine-innervated brain regions. *Nature* 301:69-71.
- Walaas SI, Greengard P (1984) DARPP-32, a dopamine- and adenosine 3':5'-monophosphate-regulated phosphoprotein enriched in dopamine-innervated brain regions. I. Regional and cellular distribution in the rat brain. *J Neurosci* 4:84-98.
- Wei MC, Lindsten T, Mootha VK, Weiler S, Gross A, Ashiya M, Thompson CB, Korsmeyer SJ (2000) tBID, a membrane-targeted death ligand, oligomerizes BAK to release cytochrome c. *Genes Dev* 14:2060-2071.
- Wei MC, Zong WX, Cheng EH, Lindsten T, Panoutsakopoulou V, Ross AJ, Roth KA, MacGregor GR, Thompson CB, Korsmeyer SJ (2001) Proapoptotic BAX and BAK: a requisite gateway to mitochondrial dysfunction and death. *Science* 292:727-730.
- Yang H, Sada MR, Li M, Zeng Y, Chen L, Bae W, Ou X, Runnegar MT, Mato JM, Lu SC (2004) S-adenosylmethionine and its metabolite induce apoptosis in HepG2 cells: Role of protein phosphatase 1 and Bcl-x(S). *Hepatology* 40:221-231.
- Zachariou V, Sgambato-Faure V, Sasaki T, Svenningsson P, Berton O, Fienberg AA, Nairn AC, Greengard P, Nestler EJ (2006) Phosphorylation of DARPP-32 at Threonine-34 is required for cocaine action. *Neuropsychopharmacology* 31:555-562.
- Zhang Y, Svenningsson P, Picetti R, Schlussman SD, Nairn AC, Ho A, Greengard P, Kreek MJ (2006) Cocaine self-administration in mice is inversely related to phosphorylation at Thr34 (protein kinase A site) and Ser130 (kinase CK1 site) of DARPP-32. *J Neurosci* 26:2645-2651.
- Zhu S, Belkhir A, El-Rifai W (2011) DARPP-32 Increases Interactions Between Epidermal Growth Factor Receptor and ERBB3 to Promote Tumor Resistance to Gefitinib. *Gastroenterology*.



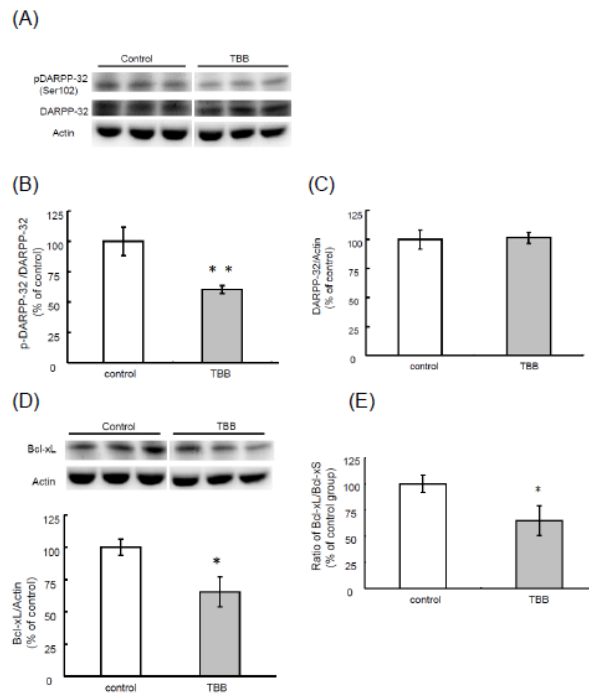
圖一、轉染野生型的 CK2 α WT DNA 質體對 CK2 α 蛋白質表現的影響

細胞轉染 pcDNA3 或野生型的 CK2 α WT DNA 質體後，以西方點墨法分析 CK2 α 蛋白質含量。實驗數值以 $\text{mean} \pm \text{SEM}$ 表示，並以 Student's t-test 方法進行統計分析；其中**表示 $p < 0.01$ 。



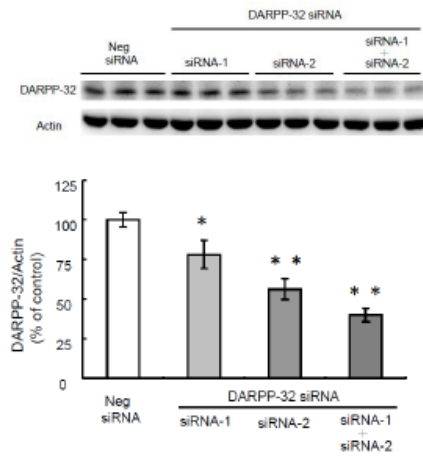
圖二、轉染 CK2 α WT DNA 質體對 DARPP-32 Ser102 位置的磷酸化、DARPP-32 和 Bcl-xL 蛋白質含量以及 Bcl-xL/Bcl-xS mRNA 表現的影響

細胞轉染 pcDNA3 或野生型的 CK2 α WT DNA 質體後，以西方點墨法分析，圖 (A) 為蛋白質電泳圖譜，(B) DARPP-32 Ser102 位置的磷酸化 (各實驗組別 n=8-9)、(C) DARPP-32 蛋白質含量和 (D) Bcl-xL 蛋白質的含量；以及利用 real-time PCR 分析 (E) Bcl-xL/Bcl-xS mRNA 的表現。實驗數值以 mean \pm SEM 表示，並以 Student's t-test 方法進行統計分析；其中 * 表示 $p < 0.05$ ，** 表示 $p < 0.01$ 。



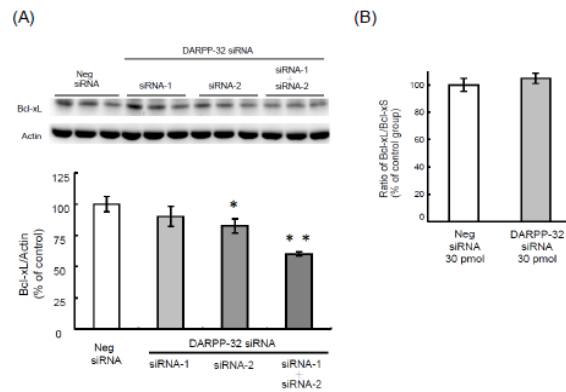
圖三、CK2 抑制劑 TBB 對細胞中 DARPP-32 Ser102 位置的磷酸化、DARPP-32、Bcl-xL 蛋白質含量以及 Bcl-xL/Bcl-xS mRNA 表現的影響

給予細胞處理 50 μ M TBB 24 小時後，以西方點墨法分析，圖(A) 蛋白質電泳圖譜，(B) DARPP-32 Ser102 的磷酸化 (各實驗組別 n=6)，(C) DARPP-32 蛋白質含量，(D) Bcl-xL 的蛋白質含量以及以 real-time PCR 定量分析 (E) Bcl-xL /Bcl-xS mRNA 的表現。實驗數值以 mean \pm SEM 表示，並以 Student's t-test 方法進行分析統計；其中 *表示 $p<0.05$ ，**表示 $p<0.01$ 。



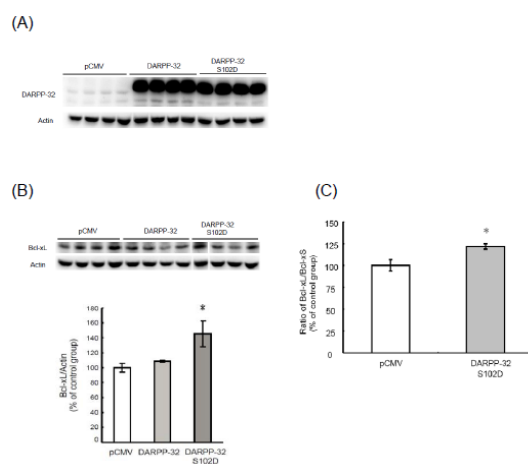
圖四、轉染 DARPP-32 siRNA 對細胞 DARPP-32 蛋白質表現的影響

分別對細胞轉染 Negative control siRNA、單獨一組及兩組合用 (的 DARPP-32 siRNA 後，以西方點墨法分析 DARPP-32 蛋白質表現。n=8-9，實驗數值以 mean±SEM 表示，並以 One way ANOVA 與 Dunnett's t-test 方法進行統計分析；其中 * 表示 $p < 0.05$ ，** 表示 $p < 0.01$ 。



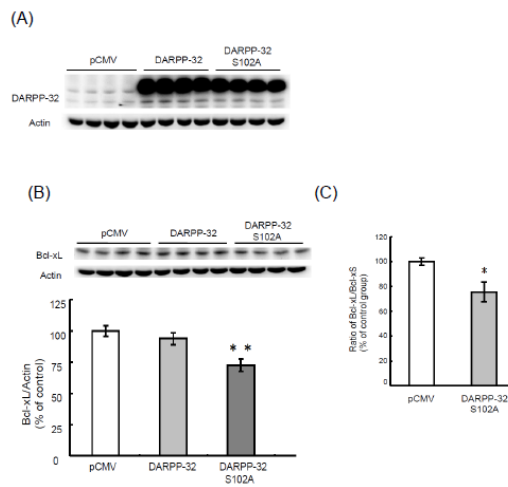
圖五、轉染 DARPP-32 siRNA 對細胞 Bcl-xL 蛋白質含量以及 Bcl-xL/Bcl-xS mRNA 表現的影響

分別對細胞轉染 Negative control siRNA、單獨一組及兩組合用的 DARPP-32 siRNA 後，以 (A) 西方點墨法分析 Bcl-xL 蛋白質含量 (各實驗組別 $n=6-9$)，(B) real-time PCR 定量分析 Bcl-xL/Bcl-xS mRNA 的表現 (各實驗組別 $n=5$)。實驗數值以 $\text{mean} \pm \text{SEM}$ 表示，實驗結果先以 One way ANOVA 再以 Dunnett's t-test 方法進行統計分析；其中 * 表示 $p < 0.05$ ，** 表示 $p < 0.01$ 。



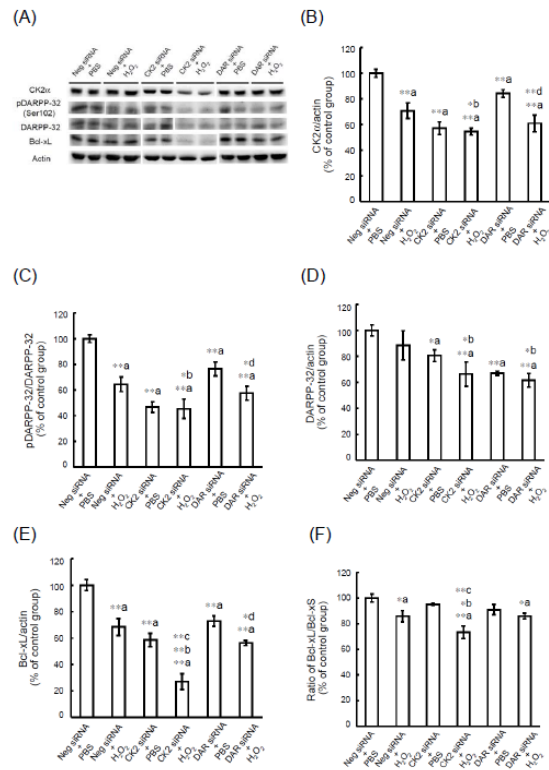
圖六、轉染突變型 DARPP-32 S102D DNA 質體對細胞 Bcl-xL 蛋白質含量和 Bcl-xL/Bcl-xS mRNA 的表現的影響

分別對細胞轉染 pCMV、野生型 DARPP-32、突變型 DARPP-32 S102D DNA 質體後，以西方點墨法分析 (A) DARPP-32 和 (B) Bcl-xL 蛋白質的含量(各實驗組別 n=5) 以及用 real-time PCR 定量分析 (C) Bcl-xL/Bcl-xS mRNA 的表現 (各實驗組別 n=3)。實驗數值以 mean±SEM 表示，(A) 和 (B) 實驗結果先以 One way ANOVA 再以 Dunnett's t-test 方法進行統計分析；(C) 實驗結果以 Student's t-test 方法進行統計分析；其中 * 表示 $p < 0.05$ 。



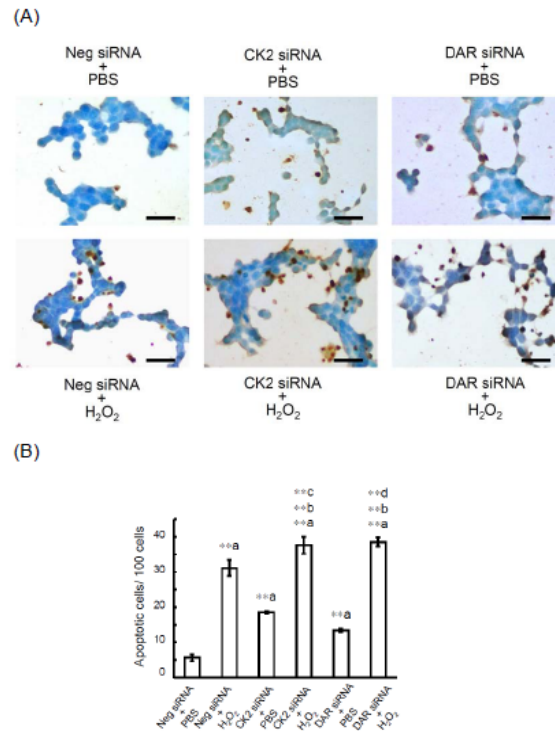
圖七、轉染突變型 DARPP-32 S102A DNA 質體對細胞 Bcl-xL 蛋白質含量和 Bcl-xL/Bcl-xS mRNA 的表現的影響

分別對細胞轉染 pCMV、野生型 DARPP-32、突變型 DARPP-32 S102A DNA 質體後，以西方點墨法分析 (A) DARPP-32 和 (B) Bcl-xL 蛋白質的含量，以及用 real-time PCR 定量分析 (C) Bcl-xL/Bcl-xS mRNA 的表現。實驗數值以 $\text{mean} \pm \text{SEM}$ 表示，(A) 和 (B) 實驗結果先以 One way ANOVA 再以 Dunnett's t-test 方法進行統計分析；(C) 實驗結果以 Student's t-test 方法進行統計分析；其中 * 表示 $p < 0.05$ ，** 表示 $p < 0.01$ 。



圖八、轉染 CK2 α siRNA 或 DARPP-32 siRNA 對過氧化氫 (Hydrogen peroxide) 處理之細胞 CK2 α 、DARPP-32、DARPP-32 Ser102 的磷酸化、Bcl-xL 蛋白質含量以及 Bcl-xL/Bcl-xS mRNA 表現的影響

對細胞轉染 CK2 α siRNA 或 DARPP-32 siRNA 後，再處理 250 μ M H₂O₂，以西方點墨法分析進行分析，圖 (A) 蛋白質電泳圖譜，(B) CK2 α 蛋白質含量、(C) DARPP-32 Ser102 的磷酸化、(D) DARPP-32 蛋白質含量 和 (E) Bcl-xL 蛋白質含量。圖 (F) 以 real-time PCR 進行 Bcl-xL/Bcl-xS mRNA 表現的定量分析。實驗數值以 mean \pm SEM 表示，實驗結果先以 One way ANOVA 再以 Newman-Keul's 方法進行統計分析；* 表示 $p < 0.05$ ，** 表示 $p < 0.01$ ，其中：a 表示與對照組 Neg siRNA+PBS 相比之結果，b 表示與 Neg siRNA+H₂O₂ 相比之結果，c 表示與 CK2 siRNA+PBS 相比之結果，d 表示與 DAR siRNA+PBS 相比之結果。



圖九、轉染 CK2 α siRNA 和 DARPP-32 siRNA 對過氧化氫處理之細胞凋亡的影響

分別對細胞轉染 CK2 α siRNA 或 DARPP-32 siRNA 後，再處理 250 μ M H₂O₂ 後，使用 TUNEL 方法觀察細胞凋亡。圖 (A) 因 methyl green 染色呈現藍色反應的細胞代表健康的細胞，而 DAB 染色呈現褐棕色反應的細胞則為處在細胞凋亡狀態下的細胞，scale bar 為 25 μ m。圖 (B) 則為各個處理的細胞凋亡定量柱狀圖。實驗數值以 mean \pm SEM 表示，實驗結果先以 One way ANOVA 再以 Newman-Keul's 方法進行統計分析；* 表示 $p < 0.05$ ，** 表示 $p < 0.01$ ，其中：a 表示與對照組 Neg siRNA+PBS 相比之結果，b 表示與 Neg siRNA+H₂O₂ 相比之結果，c 表示與 CK2 siRNA+PBS 相比之結果，d 表示與 DAR siRNA+PBS 相比之結果。

國科會補助計畫衍生研發成果推廣資料表

日期:2012/11/27

國科會補助計畫	計畫名稱: 蛋白激西每之細胞訊息傳遞路徑中DARPP-32蛋白所扮演的角色: 對大鼠學習記憶和抗細胞凋亡機制的影響
	計畫主持人: 趙知章
	計畫編號: 98-2320-B-004-002-MY3 學門領域: 生理
無研發成果推廣資料	

98 年度專題研究計畫研究成果彙整表

計畫主持人：趙知章		計畫編號：98-2320-B-004-002-MY3				計畫名稱：蛋白激西每之細胞訊息傳遞路徑中 DARPP-32 蛋白所扮演的角色：對大鼠學習記憶和抗細胞凋亡機制的影響	
成果項目		量化			單位	備註（質化說明：如數個計畫共同成果、成果列為該期刊之封面故事...等）	
		實際已達成數（被接受或已發表）	預期總達成數（含實際已達成數）	本計畫實際貢獻百分比			
國內	論文著作	期刊論文	0	0	100%	篇	
		研究報告/技術報告	0	0	100%		
		研討會論文	0	0	100%		
		專書	0	0	100%		
	專利	申請中件數	0	0	100%	件	
		已獲得件數	0	0	100%		
	技術移轉	件數	0	0	100%	件	
		權利金	0	0	100%	千元	
	參與計畫人力（本國籍）	碩士生	1	3	100%	人次	
		博士生	0	0	100%		
		博士後研究員	0	0	100%		
		專任助理	0	0	100%		
國外	論文著作	期刊論文	0	1	100%	篇	
		研究報告/技術報告	0	0	100%		
		研討會論文	0	0	100%		
		專書	0	0	100%	章/本	
	專利	申請中件數	0	0	100%	件	
		已獲得件數	0	0	100%		
	技術移轉	件數	0	0	100%	件	
		權利金	0	0	100%	千元	
	參與計畫人力（外國籍）	碩士生	0	0	100%	人次	
		博士生	0	0	100%		
		博士後研究員	0	0	100%		
		專任助理	0	0	100%		

<p>其他成果 (無法以量化表達之成果如辦理學術活動、獲得獎項、重要國際合作、研究成果國際影響力及其他協助產業技術發展之具體效益事項等，請以文字敘述填列。)</p>	<p>無</p>
--	----------

	成果項目	量化	名稱或內容性質簡述
科 教 處 計 畫 加 填 項 目	測驗工具(含質性與量性)	0	
	課程/模組	0	
	電腦及網路系統或工具	0	
	教材	0	
	舉辦之活動/競賽	0	
	研討會/工作坊	0	
	電子報、網站	0	
	計畫成果推廣之參與(閱聽)人數	0	

國科會補助專題研究計畫成果報告自評表

請就研究內容與原計畫相符程度、達成預期目標情況、研究成果之學術或應用價值（簡要敘述成果所代表之意義、價值、影響或進一步發展之可能性）、是否適合在學術期刊發表或申請專利、主要發現或其他有關價值等，作一綜合評估。

1. 請就研究內容與原計畫相符程度、達成預期目標情況作一綜合評估

達成目標

未達成目標（請說明，以 100 字為限）

實驗失敗

因故實驗中斷

其他原因

說明：

2. 研究成果在學術期刊發表或申請專利等情形：

論文： 已發表 未發表之文稿 撰寫中 無

專利： 已獲得 申請中 無

技轉： 已技轉 洽談中 無

其他：（以 100 字為限）

3. 請依學術成就、技術創新、社會影響等方面，評估研究成果之學術或應用價值（簡要敘述成果所代表之意義、價值、影響或進一步發展之可能性）（以 500 字為限）

DARPP-32 蛋白主要表現在大腦紋狀體 medium spiny neuron 中，此種神經細胞參與了運動起始和協調的功能，相關的退化性神經疾病如：巴金森氏症和亨丁頓氏症與此種神經細胞的死亡皆有相關性，本研究成果證實蛋白激酶 CK2 調控於 DARPP-32 蛋白所參與的細胞訊息傳遞路徑確實與抗細胞凋亡有關，對於藥物開發治療相關疾病提供了另一可行性的選擇。