

國立清華大學
博士論文

可溶性醣蛋白

Thrombospondin type I domain containing 7A

增加血管新生作用

**N-glycosylated soluble Thrombospondin type I
domain containing 7A promotes angiogenesis**

系所：生物資訊與結構生物研究所

學號：948223

姓名：郭孟薇 (Meng-Wei Kuo)

指導教授：莊永仁 教授 (Dr. Yung-Jen Chuang)

中華民國一百零一年一月

謝誌

這用無數個日以繼夜焚膏繼晷成就的論文，以及那用一去不復返的青春換取的文憑，都很薄，但是都很重。而一去不復返的何止是青春？稚氣的夢想被琢磨得踏實，思考的邏輯被填補得周密，抗壓性在無數次的實驗失敗中築成愈發堅強的城牆，而只要一次的成功，城牆裡就射發無限燦爛的火花，照亮興奮的臉龐。研究的路既孤獨又漫長。方向賭錯了，請自己承受；條件抓對了，下面還有更長的路要走。而研究的樂趣正是在於，你大膽假設小心求證後，射中紅心，於是你知道在那一刻，世界上沒有人比你更懂這個題目了。這種驕傲的，只屬於你一個人的快樂呀，足以讓心中的小宇宙燃燒好久。

謝謝我的指導教授莊永仁老師，用耐心與支持陪著我走過六年多的研究生涯，引導我型塑自己的研究風格，指點我的缺失，使我更加完整。謝謝我的口試委員：吳華林老師、楊瑞彬老師、裘正健老師與王學孝老師，您們對於我的論文的指教，都使我們的研究成果更縝密周全，並讓我們用更多角度來檢討自己的成果，非常感謝。

實驗室的各位呀，我真心的覺得各位都是好孩子；在懷孕的過程中，更覺得這是個“孕婦-friendly”的溫馨實驗室。雖然我是大學姐，但是常常受到大家的照顧與幫忙，深深的感謝說也說不完。聰慧獨立的芊蕙，細心開朗笑容可掬的曉鈞，仁心仁術令人尊敬的幸治學長，有你們的幫忙，我的論文才能順利完成，謝謝。作鄰居很久的濠先，祝福學富五車的你順利找到工作；體貼熱心的怡卉，謝謝妳一直以來的陪伴，祝福妳早日完成學業，往下個目標邁進；自信有主見的捷暉，祝福你未來的家庭生活與工作都繼續發光發熱；耿直令人信賴的俊傑，祝福你的國外生活一切順遂，並繼續追求你想要的生活；沈穩內斂的威彰，祝福你心中的科學夢能夠逐一實踐；能幹又有趣的姿吟，事情交辦給妳真的很放心，祝福妳也早日變成博士。有一顆善良柔軟的心的婉馨，認真打拼的譯慶，忠厚老實的復誠，很有女人緣的征原，祝福你們實驗運氣都更好，畢業加油喔。家豪與杰鵬，祝福你們在這實驗室有滿滿的收穫。肇浩與書豪，你們真是實驗室的好幫手，我代替所有魚兒謝謝你們。大學部的正妍、亞澤及張捷，祝福你們也能嚐到研究成功的甜蜜。還有太多的朋友，我真的都記得你們，謝謝。

爸媽，今年的鳳凰花，終於也為我而綻放了。我無法形容對您們有多麼的感謝，從我的誕生，教養，成長，茁壯，都有你們有形無形的陪伴。平常說不出口的，現在更要白紙黑字印出來：爸媽，謝謝您們，我很驕傲自己是您們的女兒！公公婆婆，謝謝您們一直以來對我的關懷與支持。能嫁到您們家，我真的很幸運。弟弟，你是我第一個好朋友，我完全無法想像沒有你參與的人生，會是多麼的無趣。讓我們繼續做一輩子的好朋友，我永遠以你為榮。

我的老公思恒，你是世界上最棒的老公，與你在一起的日子快樂又踏實，我下輩子還想要嫁給你！我的女兒澄夏，妳是世界上最可愛的女孩，有了妳之後，我才知道媽媽的心原來可以既柔軟又堅強。今年夏天，有一個穿著博士袍的媽媽，手牽疼愛她的老公，懷抱心愛的小女兒，昂首面對未來的挑戰，同時謙卑地瞭解生命的偉大與脆弱。有什麼會比抱在懷裡的更加真實？

鳳凰花呀，有一天，也會為我的女兒盛放吧。我心裡這麼想。

目錄

謝誌

英文摘要

中文摘要

中英名詞對照表

英文縮寫對照表

壹、 緒論

一、 血管新生緒論	1
二、 細胞移動之步驟	2
三、 Filopodia 與 focal adhesion	3
四、 細胞移動的相關分子機制	4
五、 神經血管交互作用	6
六、 研究方向	6

貳、 材料與方法

一、 斑馬魚實驗之倫理聲明 (Ethics Statement)	8
二、 斑馬魚種與飼育條件	8
三、 斑馬魚的 angiogenic assay	8
四、 HUVEC 之分離	9

五、	細胞株及其培養條件.....	9
六、	Human full-length <i>THSD7A</i> plasmid 的構築.....	10
七、	<i>THSD7A</i> -specific antibodies 的製備.....	10
八、	Cell transfection 與 soluble <i>THSD7A</i> 的收集.....	11
九、	Subcellular fractionation.....	12
十、	Tunicamycin treatment.....	12
十一、	Soluble <i>THSD7A</i> treatment.....	13
十二、	SDS-PAGE 與 Western blot.....	13
十三、	HUVEC adhesion, filopodia formation, 以及 vinculin/FAK pY397 distribution assays.....	14
十四、	Migration Assay.....	15
十五、	二維管柱形成 (two-dimensional tube formation assay).....	16
十六、	三維新芽生成 (three-dimensional sprout formation assay).....	16
十七、	抗體中和實驗.....	17
十八、	Protease inhibitor treatment.....	17
十九、	Statistical analysis.....	18
參、	結果	
一、	HUVEC 與 SH-SY5Y cells 會釋放 <i>THSD7A</i> soluble form.....	19
二、	Membrane-associated N-glycosylated <i>THSD7A</i> 釋放出 soluble	

THSD7A.....	19
三、Soluble THSD7A 促進內皮細胞的移動，二維管柱形成 (two-dimensional tube formation) 及三維新芽生成 (three-dimensional sprout formation)	22
四、Soluble THSD7A 增加斑馬魚胚胎中的血管分支與不正常血管網路生 成.....	23
五、Soluble THSD7A 經由 FAK 相關的調控機制，促進 filopodia formation 與 focal adhesion assembly.....	24
六、利用 anti-sTHSD7A 中和抗體，探討 soluble THSD7A 促進血管新生 功能之特異性.....	26
肆、 討論	
一、 THSD7A 的轉譯後修飾作用與 functional domain.....	28
二、 THSD7A 對內皮細胞移動的影響與機制.....	32
三、 THSD7A 受體.....	34
四、 THSD7A 與神經血管交互作用.....	35
伍、 未來展望.....	36
陸、 圖.....	30
柒、 參考文獻.....	58



英文摘要

A novel neural protein, thrombospondin type I domain containing 7A (THSD7A), is found to be expressed in neural tube and affect endothelial cell migration during developmental stage of zebrafish. To further study the effect THSD7A involved in endothelial cell migration, we focus on the post-translational modification and the underlying mechanisms. We constructed the full-length *THSD7A* with a FLAG-tag and overexpressed it in human embryonic kidney 293T (HEK293T) cells. We found that THSD7A is a membrane associated N-glycoprotein and can release a soluble THSD7A into the cultured medium. After harvested the soluble THSD7A in cultured medium and performed angiogenic assays, we found that soluble THSD7A promotes human umbilical vein endothelial cell (HUVEC) migration and tube formation. HUVEC sprouts in collagen matrix were increased in the presence of soluble THSD7A. The number of branching points of new vessels in zebrafish subintestinal vessel (SIV) was also increased after soluble THSD7A injection. Interestingly, the filopodia formation and the distribution patterns of vinculin and phosphorylated focal adhesion kinase (FAK) were affected in the presence of soluble THSD7A. These results implied that soluble THSD7A involved in the focal adhesion assembly. The phosphorylation level of FAK in HUVEC was also increased by addition of soluble

THSD7A. Taken together, THSD7A was demonstrated to be a membrane-associated N-glycoprotein that can be released a soluble form from cell surface. Soluble THSD7A promotes endothelial cell migration and tube formation during angiogenesis via a FAK-involved manner and may be a novel neuroangiogenic factor.



中文摘要

Thrombospondin type I domain containing 7A (THSD7A)，一個新穎蛋白質，被發現可大量表現於神經系統且影響內皮細胞的遷移及血管形成。在這篇研究中，我們研究其轉譯後修飾作用以及引發血管新生的下游機制，以探討 THSD7A 在血管新生過程中如何調控血管生長。我們以 Western blot 分析 Full-length THSD7A-transfected human embryonic kidney 293T cells (HEK293T) 發現 THSD7A 是一個 membrane associated N-glycoprotein；且在 cultured medium 中，發現一個 THSD7A 的 soluble form。我們收集了 soluble THSD7A 並進行 angiogenic assays 發現 soluble THSD7A 能促進 human umbilical vein endothelial cell (HUVEC) 的移動、管柱生成和新芽生成。而在斑馬魚動物實驗中，發現 soluble THSD7A 能夠有效的增加 subintestinal vessel (SIV) 新生血管的分支數目，形成不正常的血管網路。有趣的是，我們同時也觀察到有 soluble THSD7A 存在時，HUVEC 會有較多的 filopodia。vinculin 以及 phosphorylated focal adhesion kinase (FAK) 在 HUVEC 中的分佈同樣也受到 soluble THSD7A 的影響，表示 soluble THSD7A 與 focal adhesion assembly 有關。HUVEC 中 FAK 的磷酸化程度同樣也被 soluble THSD7A 調控，暗示 soluble THSD7A 可能影響細胞骨架的重組。綜合以上實驗結果，我們驗證了 THSD7A，一個 membrane associated N-glycoprotein，會釋放 soluble form 至細胞外。Soluble THSD7A 能

在血管新生的過程中，經由 FAK-dependent mechanism 促進內皮細胞移動，而可能扮演一個新穎的神經血管作用因子。



中英名詞對照表

血管新生 (Angiogenesis)

抗體 (antibody)

受體 (receptor)

神經血管新生因子 (neuroangiogenic factor)

血管形成 (Vasculogenesis)

中胚層細胞 (mesodermal cell)

成血管細胞 (hemangioblast)

促進血管新生因子 (pro-angiogenic factors)

抑制血管新生因子 (anti-angiogenic factors)

內皮層 (endothelium)

內皮細胞 (endothelial cell)

細胞外基質 (extracellular matrix, ECM)

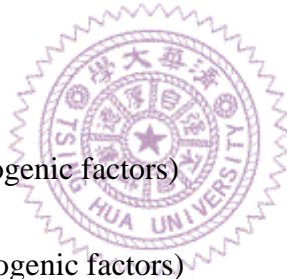
內吞作用 (endocytosis)

新芽 (sprouts)

環狀構造 (loop)

血管分支 (branch)

細胞命運 (cell fate)



尖端細胞 (tip cell)

絲狀偽足(filopodia)

聚集 (assembly)

轉譯後修飾作用 (post-translational modification)

膜相關蛋白 (membrane-associated protein)

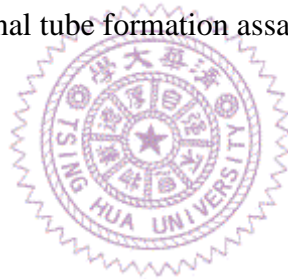
管柱形成 (tube formation)

新芽生成 (sprout formation)

力價 (titer)

二維管柱形成 (two-dimensional tube formation assay)

昆蟲細胞 (insect cell)



英文縮寫對照表

DMEM Dulbecco's Modified Eagle's Medium

ECM extracellular matrix

ECL enhanced chemiluminescent substrates

FAK focal adhesion kinase

FBS fetal bovine serum

HEK293T human embryonic kidney cell line 293T

HPf hours post fertilization

HRP horseradish peroxidase

HUVEC human umbilical vein endothelial cell

LSGS low serum growth supplement

MMP matrix metalloproteinase

PCR polymerase chain reaction

PVDF polyvinylidene difluoride

SIV subintestinal vessel

VEGF vascular endothelial growth factor



壹、緒論

一、血管新生緒論

血管系統-運送氧氣，養分，廢物至各個組織的綿密網路-負責動物體內營養的供給與廢棄物的排除。血管網路的形成共有兩大階段：血管形成 (Vasculogenesis) 是指血管從無到有的形成過程，通常發生於胚胎發育的早期；血管新生 (Angiogenesis) 則是在已存在的血管上增生新血管的過程，通常發生於胚胎發育成長時期，或是傷口癒合及腫瘤生成的階段。在血管系統發育初期，中胚層細胞 (mesodermal cell) 會先分化為成血管細胞(hemangioblast)，形成 blood island。位於 blood island 中間的 hemangioblast 會分化成 hematopoietic stem cell，為紅血球與淋巴球等的前趨細胞；位於 blood island 周圍的 hemangioblast 則會分化成 angioblast，為血管內皮細胞的前趨細胞。內皮細胞在經過一連串的移動與重組，會形成初步的血管網路，稱為 vascular plexus；vascular plexus 再重組成為大的血管，完成了血管形成的過程。在這些大血管上新生成血管的過程，則稱為血管新生 [1-2]。目前的研究顯示，血管新生是由促進血管新生因子 (pro-angiogenic factors) 與抑制血管新生因子 (anti-angiogenic factors) 之間的動態平衡來調控，當促進血管新生因子的分泌較多，例如在發生腫瘤的區域，就會啟動血管新生 (angiogenic switch)，促使新生成的血管深入腫瘤，提供腫瘤增大時所需的養分 [3]。

血管新生的啟動，取決於血管周圍環境中的血管新生因子濃度。當未受到血管新生因子（如 vascular endothelial growth factor, VEGF）的刺激時，血管會維持靜止狀態（quiescent state），不會有新的變化產生。相反的，當血管新生因子在內皮細胞周圍形成足夠的濃度梯度，就會引起血管新生。在血管新生的過程中，可以分為以下幾個步驟：首先血管內皮細胞會受到血管新生因子刺激，篩選出變成 tip cell 的內皮細胞（tip cell selection），tip cell 會利用 Dll4-Notch pathway 抑制鄰近的內皮細胞形成 tip cell，於是在血管新生處的內皮細胞便會有 tip cell 與其連接的 stalk cell 兩種不同命運的細胞分化；此時 tip cell 周圍的 pericyte 會暫時停止對 tip cell 的吸附，並且細胞外基質（extracellular matrix, ECM）產生降解，使 tip cell 能用前端的 filopodia 探測周圍的環境，以決定移動的方向；tip cell 的延伸會受到血管新生因子以及許多 guidance molecular（例如 semaphorin 和 ephrin）引導，而此時連接 tip cell 與其周邊血管的特化細胞，stalk cell，則會伸長或複製以提供 tip cell 延長所需的距離；而當 tip cell 與另一條血管伸出的 tip cell 相接觸後，tip cell 的細胞特性就會消失，進而融合成一條具有 lumen 的新血管，並會釋放生長因子讓 pericyte 前往新形成的血管處提供支撐力，同時也會促進新接觸的內皮細胞間形成穩固的連結（junction），以及周圍的細胞外基質重組，完成血管新生的過程 [2,4-6]。

二、細胞移動之步驟

在血管新生的過程中，內皮細胞的移動扮演相當重要的角色。內皮細胞的移動可依機制上的不同區分為三大類：(1) Chemotaxis (趨化性)，指細胞往可溶性的促進細胞移動分子 (例如 VEGF 以及 basic fibroblast growth factor, bFGF) 濃度高的方向移動；(2) Haptotaxis，指細胞的移動是被固定住的分子影響 (例如 integrin 與 ECM 的結合)；(3) Mechanotaxis，指細胞的移動被機械性的力量影響 (例如液體流動的剪力) [1]。Chemotaxis 是一種具方向性的移動 (directional migration)，當內皮細胞被特定 cytokine 刺激，例如 VEGF, basic fibroblast growth factor (bFGF), angiopoietin, platelet-derived growth factor (PDGF), epidermal growth factor (EGF), transforming growth factor (TGF), ephrin 或是 soluble adhesion molecular 等，就會引發細胞的遷移。細胞的移動又可以分成以下幾個步驟：細胞伸出 filopodia 探測周圍環境中的 cytokine (例如 VEGF gradient)，形成 protruding lamellipodia 往決定移動的方向延伸，接著以 focal adhesion 與細胞外基質結合，穩固細胞延伸處，再於細胞內形成 stress fiber，牽引細胞往 cytokine 方向移動，然後回收細胞後方的 adhesion molecular 及 signal component [1,7]。

三、Filopodia 與 focal adhesion

在細胞移動的過程中，filopodia 的形成是關鍵性的起始步驟。Filopodia 是位於細胞前端的細長手指狀構造 (約 0.1-0.3 μm)，其內充滿平行且緊密連結的 actin filament，由 actin 聚合 (polarization) 及退縮 (retrograde flow) 的動態平衡

來調控 filopodia 的長短及延伸方向。當 filopodia 探測周圍環境並決定移動方向後，在 filopodia 的前端就會形成新的結合點與細胞外基質連結，使細胞往前移動 [7-8]。在新形成的結合點中，integrin 與細胞外基質結合成緊密的 “sticky fingers” 結構，形成 initial adhesion site，吸引 focal adhesion complexes 更進一步地聚集 (assembly) [9-13]。

Focal adhesion complexes 是組成 focal adhesion 的成員，包含許多的蛋白質 (通稱為 focal adhesion components)，例如 FAK (Focal adhesion kinase)，vinculin 和 paxillin 等。FAK 是 focal adhesion 中非常重要的一員，當 FAK 上的 FERM homology domain 與 integrin 或 growth factor 受體結合後，會使 FAK 產生自體磷酸化 (主要磷酸化位置為 Y397)，進而招募其他的 focal adhesion components (例如 vinculin 和 paxillin)，組成更穩定的 focal adhesions [14-17]。Vinculin 在細胞質中原本是 head domain 與 tail domain 相接的 inactive form，當聚集至 focal adhesion site 後，head domain 與 tail domain 會打開並轉變成 active form，露出更多結合位置，提供給 focal adhesion components (例如 talin，paxillin) 與 actin 連結，更加穩固 focal adhesion [18-19]。

四、細胞移動的相關分子機制

當內皮細胞上的受器收到促進細胞移動血管新生因子 (例如 VEGF，bFGF 和 PDGF 等 cytokine) 的刺激時，除了透過 FAK 的活化使更多 focal adhesion

components 聚集至 focal adhesion 來促進細胞移動，也可能透過 MAPK (例如 Erk1/2 及 P38) 相關的機制，調控細胞移動。而在細胞的移動的過程中，actin 是其中提供動力的要角，actin 與其他蛋白質的交互作用，則需要許多訊息傳遞途徑共同完成。Small GTPase 是 Rho family 中的成員，能調控 actin 的聚合；例如 CDC42 在細胞準備移動時參與 filopodia 的形成，Rac1 則促進 lamellipodia 的形成，細胞決定移動方向後，RhoA 則幫助 focal adhesion 重組及 stress fiber 形成 [7,20]。在細胞移動時，actin 會有兩種主要的聚合模式：一是利用 actin-related protein-2/3 (ARP2/3) 在已經存在的 actin filament 上形成分支點，使新形成的 actin filament 能往不同的方向延伸；另一則是利用結合在 actin filament plus end 上的 formins (一群 multiple domain proteins 的統稱) 形成無分支的 actin filament，並防止 plus-end capping protein 的結合，使 actin filament 能繼續延伸 [7]。

血管內皮細胞周圍原本覆蓋著 ECM，當內皮細胞進行血管新生時，matrix metalloproteinase (MMP) 就扮演著分解細胞外基質的角色。MMP 是一群 Zn-dependent protease，其中的 MMP-2、MMP-9、MMP-13 與 MMP-16 都能分解 type I collagen，MMP-2 同時也能分解 type IV collagen，幫助血管新生的進行 [21-22]。除了 MMP 之外，plasminogen activator、heparanase 以及 chymase 等分子，同樣也參與細胞外基質的降解 [21]。

五、神經血管交互作用

在胚胎發育的過程中，內皮細胞會因應周圍生長因子的變化，特化成 tip cell 並伸出 filopodia 探測環境並相互連結，產生血管新生作用以提供組織更多的氧氣與養分；神經系統中的 neuron 也會利用 growth cone 偵測環境中的生長因子，以決定其移動方向。在發育時期，血管與神經系統的發展有許多共同點，有許多生長因子更是能同時調控內皮細胞與神經細胞，這些生長因子被統稱為神經血管新生因子 (neuroangiogenic factor) [23]。目前已知的神經血管新生因子包含 VEGF, semaphorin, ephrin, netrin 及 slit 等，可經由 autocrine 或 paracrine 控制 neurovascular coordination [24-25]。目前的研究傾向於認為，在胚胎時期神經系統的發育早於血管系統 [26-27]。因此在神經血管交互作用中，先發育的神經系統為了獲取足夠的養分，會釋放神經血管新生因子誘使血管往神經的方向生長；而為了使血管新生作用能快速地提供神經系統養分，所以在解剖學的研究中，可發現許多血管與神經是平行生長的 [27-28]。

六、研究方向

在我們之前的研究中已經瞭解，THSD7A 是在胎盤血管內皮細胞中大量表現的新穎蛋白質。THSD7A 的 C 端片段 (carboxyl-terminal fragment) 會與 $\alpha V\beta 3$ integrin 及 paxillin 共位 (co-localize)，且 THSD7A 的 overexpression 和 knockdown 都會影響 human umbilical vein endothelial cell (HUVEC) 的 mobility

及 tube formation [29]。在我們另一份研究中，發現發育時期斑馬魚體內的 *thsd7a* mRNA 主要表現在 neural tube 的腹側邊緣 (ventral edge)，並且影響 intersegmental vessels (ISVs) 的正常生長 [30]。這些結果都顯示了 THSD7A 與血管新生的相關性，但 THSD7A 的轉譯後修飾作用及其調控血管新生的機制則尚未明朗。

在這篇論文裡，我們主要研究的有三大方向：(1) THSD7A 的轉譯後修飾作用 (post-translational modification)；(2) THSD7A 是否有不同的 isoform；(3) THSD7A 在血管新生中所扮演的角色與作用的機制。

在一連串的研究中，我們證明了全長的 THSD7A 會表現在 HUVEC 與 SH-SY5Y neuroblastoma cells，並且這兩種細胞都會釋出一段 210 kDa soluble form 至細胞外的環境中。我們除了發現 THSD7A 是 N-glycoprotein，經由 *in vitro* 與 *in vivo* angiogenic assays 也證實 soluble THSD7A 會促進 HUVEC 移動，管柱生成與新芽形成。這些促進血管新生的作用是經由增加 filopodia formation 及 focal adhesion assembly 來達成，並且可能與 FAK-dependent signaling pathway 相關。綜合以上的研究，我們推測 soluble THSD7A 是一個可能的促進血管新生因子，在結合我們之前於斑馬魚上的研究結果 [30]，推測 soluble THSD7A 可能扮演神經血管新生因子的角色。

貳、材料與方法

一、斑馬魚實驗之倫理聲明 (Ethics Statement)

在本研究中，所有的斑馬魚實驗方法都經由 the Institutional Animal Care and Use Committee of National Tsing Hua University (IRB Approval NO. 09507) 核可。

二、斑馬魚種與飼育條件

本研究使用的斑馬魚種為 Tg(kdr:EGFP)^{y1} transgenic strain，為血管發綠色螢光的魚種 [31]。胚胎與成魚皆飼養於 28.5°C，其發育階段的區分請參考 [32]。

三、斑馬魚的 angiogenic assay

實驗方法參考 [33-34]。我們先將 50 hours post fertilization (hpf) 的斑馬魚胚胎置於 65 mM tricaine 及 65 mM isoflurane 中麻醉 [35]，然後注射 9.2 nl soluble THSD7A (~ 0.69 ng) 或是 control medium 到斑馬魚的卵黃囊中。未經任何注射的斑馬魚當作實驗的對照組。在經過 24 小時的培養之後，我們使用倒立式螢光顯微鏡觀察斑馬魚卵黃囊兩側的 subintestinal vessel (SIV) network 中的血管分支數。

四、HUVEC 之分離

HUVEC 的分離方法經由 the Institutional Review Board of Human Subjects Research Ethics Committee of Mackay Memorial Hospital (10MMHIS135 and MMH-I-S-137), Taipei City, Taiwan 核可。首先，我們要取得新鮮且沒有針孔或止血鉗夾過的臍帶 [29]。以 10 ml PBS 緩慢沖洗掉臍靜脈內的殘留血液後，在臍靜脈注入空氣去掉 PBS，再注入 collagenase 並用止血鉗將臍帶兩端夾住，浸泡於 37°C PBS 中 7分鐘。此時片狀的 HUVEC sheets 會被 collagenase 切下。準備一個 50 ml 滅菌離心管，放在臍帶下方，在鬆開臍帶兩側止血鉗後，用含 10% Fetal Bovine Serum (FBS) 的 Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) 沖出臍靜脈中的 HUVEC 並中和 collagenase 的活性。將上述的沖出液以 200 ×g 的轉速離心 5 分鐘，再將 cell pellet 回溶於 supplemented M200 (M200 再額外加入 Low Serum Growth Supplement, LSGS，內含 2% FBS，3 ng/ml bFGF，10 µg/ml heparin，1 µg/ml hydrocortisone，10 ng/ml epidermal growth factor。M200 與 LSGS 皆購自 Invitrogen)，培養在 0.2% gelatin-coated flask。

五、細胞株及其培養條件

Human embryonic kidney cell line 293T (HEK293T, CRL-11268) 購自 GenDiscovery Biotechnology Inc.。SH-SY5Y human neuroblastoma cell line (CRL-2266) 購自 American Type Culture Collection, Manassas, VA, USA，由工業

技術研究院的 HH Shen 博士贈送。HEK293T cells 與 SH-SY5Y cells 皆培養於含有 10% FBS，100 µg/ml penicillin，100 µg/ml streptomycin 及 2.5 µg/ml amphotericin B 的 DMEM 中。當 HEK293T cells 被轉染 (transfect) *THSD7A* 或 empty vector plasmid 後，則改培養於 serum-free DMEM。

六、Human full-length *THSD7A* plasmid 的構築

Full-length *THSD7A* coding sequence 是由人類胎盤 cDNA 分離出來的。我們設計了兩段 cloning primers：5'-AAA CCG CGG ATG GGG CTG CAA GCC AGG-3' 與 5'-AAA CTC GAG TTT GTC GGC ATC TCC ATC ATA G-3'，底線部分分別為 SacII 與 XhoI 的切位。經由 polymerase chain reaction (PCR) 放大後，再將 PCR 產物接到 pCMVTag4 expression vector (Stratagene, La Jolla, CA) 上，得到會在 full-length *THSD7A* 的 C 端表現 FLAG-tag 的重組蛋白質 (圖 1)。

七、*THSD7A*-specific antibodies 的製備

在此篇研究中，anti-IDS2，anti-IDS9 及 anti-CTE 抗體 都是本實驗室純化的抗體 (圖 1)。我們委託濁水溪生物科技股份有限公司合成我們選擇的 IDS2，IDS9 及 CTE 胜肽片段，再注射至兔子體內並收集免疫血清。我們接著將 IDS2，IDS9 及 CTE 的胜肽片段與 cyanogen bromide-activated sepharose (Sigma) 在 coupling buffer (0.2 M sodium carbonate，0.5 M sodium chloride，pH 8.3) 中作用

4°C 整晚，洗掉未結合的胜肽後，再將兔子的免疫血清與接上胜肽的 sepharose 作用 4°C 一整晚。用六倍 sepharose 體積的 coupling buffer 清洗 sepharose 後，在 4°C 以 elution buffer (0.1 M sodium acetate, 0.5 M sodium chloride, pH 4) 將結合在 sepharose 上的抗體洗下，並立刻以 1 M Tris-HCl (pH 7.5) 中和 pH 值。抗體的力價 (titer) 與專一性分別使用 enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) 與 Western blot 來測定。為了更確定本實驗室製備的 THSD7A-specific antibodies 的確專一性的辨認 THSD7A，我們另外使用了可辨認包含 IDS2 胜肽片段在內 116 個胺基酸的 anti-sTHSD7A 抗體 (HPA000923, 購自 Sigma)，來做進一步的佐證 (圖 1)。



八、Cell transfection 與 soluble THSD7A 的收集

我們使用 jetPEI reagent (Polyplus)，將構築好的 *THSD7A* expression vector 或 empty vector 暫時性地轉染到 HEK293T cells，方法參照 jetPEI reagent 的使用手冊。簡單說明，先將 2×10^6 HEK293T cells 種在 10 cm culture dish 上，37°C 培養過夜。Plasmid 與 jetPEI 混合後，與 serum-free DMEM 一起加入已培養好 HEK293T cells 的 10 cm culture dish 中，並於 8 小時後更換新鮮的 serum-free DMEM。在總共培養 48 小時後，收集 serum-free DMEM 並離心去掉懸浮的 HEK293T cells，然後將上清液以 100 kDa cutoff Amicon 濃縮管 (Millipore) 濃縮至約 100 倍，即可得到 soluble THSD7A 或是 vector control medium。經由

ELISA 測定，濃縮後的 soluble THSD7A 濃度約為 75.5 ng/ml。

九、Subcellular fractionation

我們利用 CNM compartment protein extraction kit (BioChain Institute Inc., Hayward, CA) 分別萃取出 THSD7A-transfected HEK293T cells 的 cytosolic (C), nuclear (N) 以及 membrane (M) fractions；簡單說明如下。首先收集 1×10^7 THSD7A-transfected HEK293T cells pellet，用 PBS 潤洗後加入 1 ml buffer C (含有 protease inhibitors)，以 27.5 gauge 的針頭抽吸使細胞破裂，在 4°C 輕輕搖晃 20 分鐘後，再以 $16000 \times g$ 的轉速在 4°C 離心 20 分鐘。取出上清液，此即為 cytosolic fraction。Pellet 繼續以 2 ml buffer W 潤洗，回溶於 500 μ l buffer N 並在 4°C 靜置 20 分鐘，經由 $16000 \times g$ 的轉速 4°C 離心 20 分鐘後，取出上清液，此即為 nuclear fraction。Pellet 再以 500 μ l buffer M 回溶，在 4°C 輕輕搖晃 20 分鐘後，再以 $16000 \times g$ 的轉速在 4°C 離心 20 分鐘。取出上清液，此即為 membrane fraction。在本實驗中，我們選用 calnexin 當作 plasma membrane marker，GAPDH 當作 cytoplasm marker，annexin V 則同時是 cytoplasm 及 plasma membrane marker。

十、Tunicamycin treatment

為了驗證 THSD7A 是否有被 N-glycosylation，我們在 transfected HEK293T cells

的培養液中加入 5 µg/ml tunicamycin (Sigma)；未加入 tunicamycin 的細胞則當作對照組。在 37°C 培養 48 小時後，收集 cell lysates 與 cultured medium 進行 Western blot 的分析。

十一、Soluble THSD7A treatment

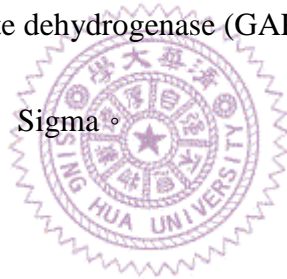
首先將 HUVEC 種在 type I collagen-coated flask 上，細胞滿度約 80-90%。3 小時後更換培養液為含 0.1% BSA 的 M200，繼續培養至隔夜，等待進行 soluble THSD7A treatment。在使用之前敘述的方法收集並濃縮好 soluble THSD7A 及 control medium 之後，將細胞培養液再換成 20% soluble THSD7A (~71.8 nM) 或 control medium (以含有 0.1% BSA 的 M200 配製)。等待 15 分鐘後，吸去培養液並以含有 Protease Inhibitor Cocktail (Roche)、Sodium Fluoride 及 Sodium Orthovanadate 的 RIPA buffer (Pierce) 溶解細胞，再進行 Western blot 的分析。

十二、SDS-PAGE 與 Western blot

我們使用 NuPAGE 電泳系統 (Invitrogen) 與 MES running buffer，用 4-12% Bis-Tris gradient gels 來分離 HEK293T cell lysate 和 cultured medium 中的蛋白質。Soluble THSD7A 和 control medium 處理過的 HUVEC lysates 則是使用 8% separation gel 來分離蛋白質。樣品在經過膠體電泳後，轉印至 polyvinylidene difluoride (PVDF) 上，先用含 3% BSA 的 TBST buffer (10 mM Tris-HCl, 50 mM

NaCl, 0.5% Tween-20, pH7.4) 在室溫下浸泡搖晃 1 小時，中和抗體可能產生非專一性結合之處，再加入一級抗體，在 4°C 搖晃一整晚。隔天以 TBST buffer 清洗 PVDF 4 次各 10 分鐘後，再將 PVDF 浸泡於加入 Horseradish Peroxidase (HRP)-conjugated 二級抗體的 3% BSA/TBST buffer，在室溫下浸泡搖晃 1 小時。在 TBST buffer 清洗 PVDF 4 次各 10 分鐘後，進入暗房以 enhanced chemiluminescent substrates (ECL) 使 PVDF 的訊號發出冷光，再以底片感光。

使用的一級抗體廠牌如下：anti-FAK pY397 抗體 購自 Invitrogen；anti-Akt pS473, P38 pT180/R182, Erk1/2 pT202/Y204 抗體購自 Cell Signaling；anti-glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) 抗體 購自 Santa Cruz；anti-FLAG-tag M2 抗體 購自 Sigma。



十三、HUVEC adhesion, filopodia formation, 以及 vinculin/FAK pY397 distribution assays

在 37°C 用 type I collagen (10 µg/ml) 覆蓋玻璃蓋玻片 1 小時，作為實驗時內皮細胞的 ECM；Poly-L-lysine (PLL, 30 µg/ml) 則是當作非細胞外基質的對照組。

在以 PBS 潤洗 collagen 或 PLL 處理過的蓋玻片後，將 3000個 HUVEC 與 20% soluble THSD7A (~71.8 nM) 或 control medium (以含有 0.1% BSA 的 M200 配製) 混合，加在蓋玻片上。在 37°C 培養 50 分鐘，吸去未貼附的 HUVEC 後再加入 4% paraformaldehyde，把貼附的 HUVEC 固定在蓋玻片上。

我們使用細胞免疫螢光染色的技術，將細胞染上 Hoechst 和 phalloidin 來分別觀察貼附的 HUVEC 數量與其伸出 filopodia 的數量；anti-vinculin 抗體 (Sigma) 以及 anti-FAK pY397 抗體 (Invitrogen) 則用來觀察 vinculin 與phospho-FAK 在 HUVEC 中的分佈情形。HUVEC 貼附的數量是在 100x 放大倍率的視野下以倒立式螢光顯微鏡 (Nikon TE2000E) 觀察。Filopodia數量，vinculin 與phospho-FAK 在 HUVEC 中的分佈情形是使用共軛焦顯微鏡 (LSM510 Meta, Zeiss) 在 630x 放大倍率的視野下觀察。以上實驗皆重複三次以上。

十四、Migration Assay

我們用 Transwell polycarbonate filter inserts (8 μ m pore size, BD Biosciences) 來檢測 HUVEC 的移動性。首先在 filter surface 兩面以 10 μ g/ml type I collagen 覆蓋，在 37°C 中放置 1 小時後，再以 PBS 潤洗。在 lower well 中分別含有 3% (~10.8 nM) 及 15% (~53.9 nM) soluble THSD7A 或 control medium (以含有 0.1% BSA 的 M200 配製) 500 μ l, upper well 則加入 5×10^4 HUVEC (回溶於 200 μ l 含有 0.1% BSA 的 M200)。在 37°C 培養 4 小時後，以 methanol 固定細胞，用棉花棒刮除 filter 上側的細胞，只留下移動到 filter 下側的 HUVEC。使用 Hoechst 將細胞核染上螢光，在 100x 放大倍率的視野下以倒立式螢光顯微鏡 (Nikon TE2000E) 觀察。每個 filter 都隨機擷取三到五個視野做計算，以上實驗重複至少三次。

十五、二維管柱形成 (two-dimensional tube formation assay)

將 Basement membrane matrix (Matrigel, BD Biosciences) 置於 4°C 解凍後，取 200 μ l 加入預冷過的 48-well plate，再放入 37°C 使 Matrigel 形成膠狀固態。等待 30 分鐘 Matrigel 凝膠後，在 Matrigel 上加入含 25% soluble THSD7A (~89.8 nM) 或 control medium 的 HUVEC 混合液 (5.5×10^4 cells/100 μ l，以 supplemented M200 配製)。在 37°C 中培養 3 小時後，在 40x 放大倍率的視野下以倒立式螢光顯微鏡 (Nikon TE2000E) 觀察，並以 Image-pro plus AMS software (MediaCybernetics, Bethesda, MD) 分析管柱長度。以上實驗重複至少三次。



十六、三維新芽生成 (three-dimensional sprout formation assay)

在材料的準備上，feeding media 及 2.5 mg/ml type I collagen matrices 皆參照之前的文獻 [36]。首先，把 HUVEC pellet 回溶於 feeding media 中，取 1×10^5 個 HUVEC 加入 96 well plates，37°C 中培養 3 小時。待細胞貼好後，移除原本的 feeding media，迅速在各個 well 加入 58 μ l 的 2.5 mg/ml type I collagen 溶液，再放回 37°C 中培養 30 分鐘，使 type I collagen 形成膠狀固態。接著加入 200 μ l 的 25% soluble THSD7A 或 control medium (以 feeding media 配製)，再放回 37°C 中培養 24 小時。HUVEC 與長好的 sprouts 以 4% paraformaldehyde 固

定至少 4 小時後，使用 1% toluidine blue 染色，再以滅菌過的去離子水反覆退染。我們在 100x 放大倍率的視野下以倒立式螢光顯微鏡 (Nikon TE2000E) 觀察 sprouts 數量，每個 well 皆隨機擷取三到五個視野做計算，以上實驗重複至少三次。

十七、抗體中和實驗

為了驗證 soluble THSD7A 對促進血管新生的專一性，我們使用 anti-sTHSD7A 抗體來中和 soluble THSD7A 的效果，實驗條件與上述方法相同。在抗體中和的部分，首先我們將 soluble THSD7A 與 80 ng/ml anti-sTHSD7A 抗體混合，置於 37 °C；1 小時後，用 soluble THSD7A 與抗體的混合物進行 migration assay, filopodia formation 以及 vinculin distribution assay，實驗方法如前面敘述。未加入抗體的 soluble THSD7A 與 control medium 也一樣置於 37 °C，1 小時後再進行實驗。

十八、Protease inhibitor treatment

為了找出可能截切 full-length THSD7A 而使 soluble THSD7A 釋出的 protease，我們在 THSD7A-transfected HEK293T cells 的培養液中分別加入 1x complete protease inhibitor (購自 Roche，含有 EDTA，可同時抑制 serine、cysteine、metallo-protease)，1 µg/ml leupeptin (抑制 serine and cysteine proteases)，

1 $\mu\text{g/ml}$ pepstatin A (抑制 aspartic proteases), 1 mM benzamidine (抑制 trypsin, trypsin-like enzymes 與 serine proteases), 20 μM hirudin (抑制 thrombin) 或是 20 μM caspase 1 inhibitor I。處理過後的細胞培養於 37 $^{\circ}\text{C}$ 中, 每 12 小時分別補加各種 protease inhibitor 一次, 共培養 24 小時。Cultured medium 用 3 kDa cutoff Amicon 濃縮管濃縮約 100 倍後, 再與 cell lysates 一起進行 Western blot 的分析。本實驗設計中可能截切 full-length THSD7A 的 protease, 是由 ExPASy 網站中的 “PeptideCutter” 所預測。

十九、Statistical analysis

本研究中顯著差異的計算, 是由 student's t-test 所統計。所有的 P values 皆由三次以上的獨立實驗計算而來。 $P < 0.05$ 即可被接受為具有統計上的顯著差異。實驗數據以 $\text{mean} \pm \text{SD}$ 表示。

參、結果

一、HUVEC 與 SH-SY5Y cells 會釋放 THSD7A soluble form

為了研究 THSD7A 的轉譯後修飾及相關功能，我們純化了客製化的 THSD7A-specific antibodies (anti-IDS2, anti-IDS9 and anti-CTE)，並與向 Sigma 購買的 anti-sTHSD7A 抗體及 anti-FLAG-tag 抗體做結果的確認 (圖 1)。根據 NCBI dbEST database 內 human *THSD7A* expression profile (UniGene number Hs. 120855) 的預測，除了在胎盤血管，THSD7A 也會大量表現在腦及神經系統中。我們收集了 HUVEC 及 SH-SY5Y neuroblastoma cells 的 cell lysates 與 cultured medium 進行 Western blot 的分析後發現，兩種細胞的 cell lysates 都能被 anti-sTHSD7A 抗體偵測到一個 260 kDa 的蛋白質，但在 cultured medium 中，anti-sTHSD7A 抗體偵測到的蛋白質卻是 210 kDa (圖 2)。這結果說明了細胞會釋放一個 210 kDa THSD7A soluble form 至細胞外環境。

二、Membrane-associated N-glycosylated THSD7A 釋放出 soluble THSD7A

在發現了 soluble THSD7A 的存在後，接著探討其轉譯後修飾作用。首先，我們將 recombinant FLAG-tagged full-length *THSD7A* 轉染到 HEK293T cell，再用 Western blot 分析其 subcellular distribution (圖 3)。實驗結果顯示，所有的

THSD7A-specific antibodies 以及 anti-FLAG-tag 抗體都會在 membrane fraction 辨識到一個 260 kDa 的蛋白質，可以猜測這是 THSD7A 的 full-length form，並且 full-length THSD7A 是膜相關蛋白 (membrane-associated protein) (圖 3，M lanes)。在 subcellular distribution 的分析中，我們選用了 calnexin 當作 plasma membrane marker，GAPDH 當作 cytoplasmic marker，而 annexin V 則是 cytoplasmic 與 plasma membrane marker (圖 3，right panel)。

除了 260 kDa 的 full-length THSD7A，anti-CTE and anti-FLAG-tag antibodies 也同時在 membrane fraction 辨認到一個 ~17 kDa 的蛋白質 (圖 3，M lanes 箭號處)，但是 anti-IDS2 and anti-IDS9 antibodies 並沒有辨認到這個蛋白質。因為 anti-CTE and anti-FLAG-tag antibodies 結合的位置是 THSD7A 的 carboxyl-terminal region，且若以 ~17 kD 分子量來計算，此片段包含了 THSD7A 的 transmembrane domain，於是我們推測 full-length THSD7A 會在細胞膜外被截切，釋放出 soluble THSD7A，並遺留下一個 17 kDa 的小片段在細胞膜上。我們收集了 THSD7A-transfected HEK293T cells 的 cultured medium，進行 Western blot 後發現一個 ~210 kDa 的蛋白質 (圖 4A)。這與我們的推論相同，也符合圖 2 的結果。

在 ExPASy 網站的預測中，未經任何轉譯後修飾的 THSD7A 分子量約為 186 kDa，這明顯比我們實際實驗所得的 260 kDa 要更小，於是我們猜測 THSD7A 在細胞中可能經由 N-glycosylation 修飾。為了驗證這個假設，我們在

THSD7A-transfected HEK293T cells 的培養液中加入 tunicamycin (一種針對 N-glycosylation 過程中重要酵素 GlcNAc phosphotransferase 的抑制劑)，觀察 THSD7A 分子量的變化 (圖 4B, upper panel)。在未加入 tunicamycin 的組別裡，我們可以在 Western blot 中偵測到 cell lysates 中的 260 kDa full-length THSD7A 與 cultured medium 中的 210 kDa soluble THSD7A；然而加入 tunicamycin 後，cell lysates 中的 full-length THSD7A 分子量下降至 ~190 kDa，cultured medium 中的 soluble THSD7A 則幾乎偵測不到。在 PNGase 的實驗中也得到相同的結果 (圖 4B, lower panel)，證實 THSD7A 上的確有 N-glycosylation 修飾。

除了 210 kDa soluble THSD7A，我們還發現在 cultured medium 中有另一個 ~33 kDa 的 THSD7A 的 N 端小片段，也可以被 anti-sTHSD7A 抗體辨認 (圖 4C, left panel 箭頭處)。這個 33 kDa 的 N 端小片段會被 3 kDa cutoff Amicon 濃縮管保留下來，被 100 kDa cutoff Amicon 濃縮管過濾掉 (圖 4C, right panel)。綜合以上結果，我們推測 full-length THSD7A 會在兩處被截切，然後釋出 soluble THSD7A：一是在 CTE 和 IDS9 epitopes 之間，另一是在 anti-sTHSD7A 抗體辨認位置上。各個抗體辨認位置請見圖 1。

我們之前的研究顯示，THSD7A 與血管新生有關 [30]，在這篇研究中我們針對會釋放到胞外環境的 210 kDa soluble THSD7A 對於內皮細胞的作用為研究對象。於是我們使用 100 kDa cutoff Amicon 濃縮管把 cultured medium 中的

210 kDa soluble THSD7A 濃縮，並且濾去 33 kDa 的 N 端小片段，用 210 kDa soluble THSD7A 進行後續的實驗 (圖 4C， right panel 箭號處)。

三、Soluble THSD7A 促進內皮細胞的移動，二維管柱形成 (two-dimensional tube formation) 及三維新芽生成 (three-dimensional sprout formation)

之前的研究 [29] 及圖 2 顯示，HUVEC 會合成 THSD7A。為了釐清 endogenous soluble THSD7A 會否影響後續的實驗，我們使用 enzyme-linked immunosorbent assay 來偵測 HUVEC 釋放到 cultured medium 中的 endogenous soluble THSD7A 濃度。在 HUVEC 培養 48 小時後，cultured medium 中的 endogenous soluble THSD7A 濃度小於 0.1 ng/ml，低於偵測的極限。我們同時檢測了 vector-transfected HEK293T cells 的 cultured medium 在濃縮後，endogenous soluble THSD7A 的濃度，同樣也低於 0.1 ng/ml。然而，THSD7A-transfected HEK293T cells 的 cultured medium 在濃縮後，soluble THSD7A 濃度則高達 ~75.5 ng/ml (~360 nM)。所以在我們設計的實驗條件中，endogenous soluble THSD7A 幾乎不會造成影響，主要看到的現象會是外加的 soluble THSD7A 所造成，而非 endogenous soluble THSD7A 所引起的干擾或副作用。

我們用 transwell assay 來觀察 soluble THSD7A 是否會影響 HUVEC 的移動。當實驗環境中含有 3% soluble THSD7A (在系統中最終濃度~10.8 nM)，

HUVEC 的移動性與加入 vector-only medium 的對照組並無差異。但當 soluble THSD7A 濃度增加至 15% (在系統中最終濃度 ~53.9 nM)，HUVEC 的移動性會比加入 vector-only medium 的對照組增加 59% (圖 5A)。

我們接著研究 soluble THSD7A 對 HUVEC 管柱形成的影響。我們在 Matrigel 上加入 25% soluble THSD7A (在系統中最終濃度 ~89.8 nM) 後發現，相較於 vector-only medium 的對照組，soluble THSD7A 增加管柱形成的長度達到 57% (圖 5B)。

為了更加確定 soluble THSD7A 對血管新生的影響，我們也在 collagen matrix 中進行了三維新芽生成的實驗 [37-38]。當 soluble THSD7A 存在時，新芽生成的密度會比 vector-only medium 的對照組高出 50% (圖 6A，collagen matrices 俯瞰圖)。由側面圖可以觀察到在加入 soluble THSD7A 的組別中，新芽的長度與數目都比 vector-only medium 的對照組更多 (圖 6B-C)。綜合以上結果得知，soluble THSD7A 能促進內皮細胞的移動，管柱形成及新芽生成，是一個 angiogenic factor。

四、Soluble THSD7A 增加斑馬魚胚胎中的血管分支與不正常血管網路生成

為進一步研究 soluble THSD7A 對血管新生的影響，我們選用 Tg(KDR:EGFP) 斑馬魚胚胎 (血管系統會發綠色螢光的斑馬魚) 來作為活體研究的模式生物 [33-34,39]。我們將 9.2 nl soluble THSD7A (~0.69 ng) 或

vector-only medium 注射到 50 hpf 斑馬魚卵黃囊內，再於 24 小時後觀察 SIV network 的發育狀況 (圖 7A，紅框標示處即為 SIV network)。未經任何注射的斑馬魚 (normal) 與注射 vector-only medium 的對照組結果相同，SIV 分支的中位數皆為 1 (圖 7B；圖 7C，left and middle panels)，而注射 soluble THSD7A 的斑馬魚 SIV 分支的中位數則增加至 3 (圖 7B；圖 7C，right panel)。這些 soluble THSD7A 所造成增加的 SIV 分支使 SIV network 異於正常的斑馬魚(圖 7C)。在斑馬魚活體實驗的結果支持我們在細胞實驗上看到的結果，soluble THSD7A 的確促進血管新生。

五、Soluble THSD7A 經由 FAK 相關的調控機制，促進 filopodia formation 與 focal adhesion assembly

血管新生包含許多環環相扣的反應 [9-10]。為了更進一步瞭解 soluble THSD7A 對內皮細胞影響的層面，我們設計了 adhesion assay 來探討 soluble THSD7A 是否影響內皮細胞的貼附。我們使用 type I collagen 來作 HUVEC 貼附的細胞外基質，poly-L-lysine (PLL) 則是當作非 ECM 的對照組。細胞貼附的實驗結果發現，在種下 HUVEC 50 分鐘後，soluble THSD7A 並不影響 HUVEC 的貼附，而且與基質為 type I collagen 或 PLL 無關 (圖 8A)。在我們的研究中，已知 soluble THSD7A 會增加內皮細胞的移動性、管柱生成與新芽形成的能力；於是我們推測，soluble THSD7A 對 HUVEC 的影響可能是在細胞移動的起始步

驟。

於是我們先針對 HUVEC 的 filopodia formation 進行實驗。當 HUVEC 周圍存在 20% soluble THSD7A (在系統中最終濃度 ~ 71.8 nM) 50 分鐘，filopodia 的數目會比 vector-only medium 的對照組多出將近一倍 (圖 8B)。除了 filopodia formation，focal adhesion assembly 也是影響細胞移動的重要步驟，而 focal adhesion 的數目和大小則取決於其 assembly，disassembly 及 turnover rates [1,7]，於是我們接著觀察 soluble THSD7A 對 vinculin (一個存在於 focal adhesion site 的重要 adapter protein，能幫助穩定 filopodia [40]) 的影響。當加入 20% soluble THSD7A 50 分鐘後，在 HUVEC 周圍的 well-distributed vinculin plaques (在細胞周圍呈現橢圓型或指甲的形狀 [40]) 數量會比 vector-only medium 的對照組增加近一倍 (圖 8C)。另一個重要的 focal adhesion protein，FAK，是藉由磷酸化來調控細胞移動時的 focal adhesion assembly [1,41]。在我們的實驗結果中也發現，soluble THSD7A 會使 HUVEC 周圍的 well-distributed FAK pY397 plaques 數目增加兩倍 (圖 8D)。

接下來我們想要探討 soluble THSD7A 在細胞移動的過程中所參與的訊號傳遞途徑。在 Western blot 的分析中，如同我們的預期，在加入 20% soluble THSD7A 15 分鐘後，FAK (pY397) 的磷酸化程度比 vector-only medium 的對照組增加了 93%；Erk1/2 (pT202/R204) 與 P38 (pT180/R182) 的磷酸化程度也比 vector-only medium 的對照組分別增加了 35% 與 33%。至於 Akt (pS473) 的磷

酸化程度則不受 soluble THSD7A 的影響。GAPDH 在本實驗中則是當作 loading control (圖 9)。綜合以上實驗結果，證實了 soluble THSD7A 會經由 FAK 相關的訊號傳遞途徑，來調控細胞移動過程中的 filopodia formation 及 focal adhesion assembly。

六、利用 anti-sTHSD7A 抗體的中和，探討 soluble THSD7A 對促進血管新生功能之特異性

因為本實驗中使用的 soluble THSD7A 與 vector-only medium 中，含有 HEK293T cell 所分泌的其他蛋白質，為了驗證之前實驗中所看到的 angiogenic effects 的確是由 soluble THSD7A 所引起，於是我們在實驗條件中另外加入抗體中和 soluble THSD7A 的活性，以證明 soluble THSD7A 對促進血管新生的特異性。如圖一所示，我們可選用的抗體包含購自 Sigma 的 anti-sTHSD7A 抗體，以及本實驗室設計並純化的 anti-IDS2、anti-IDS9 及 anti-CTE 抗體。Anti-sTHSD7A 抗體的辨認位置位於靠近 THSD7A N 端的 116 個胺基酸，而 anti-IDS2、anti-IDS9 及 anti-CTE 抗體的辨認位置則各只包含約 20 個胺基酸；以中和機率 functional domain 的機率而言，我們選擇 anti-sTHSD7A 抗體，來進行以下的抗體中和實驗。

首先，我們以加入 anti-sTHSD7A 抗體與否的 transwell assay 來觀察其是否對 soluble THSD7A 引起的促進細胞移動特性造成影響。我們發現，當 soluble

THSD7A 與 anti-sTHSD7A 抗體同時存在，HUVEC 的移動性會比只有 soluble THSD7A 的組別下降 39% (圖 10A，soluble THSD7A 在系統中最終濃度 ~71.8 nM)。這個實驗證實了 soluble THSD7A 對於促進 HUVEC 的移動具有特異性。我們接著測試 filopodia formation 是否也會受到 anti-sTHSD7A 抗體的存在影響。相較於只有 soluble THSD7A 的組別，同時含有 soluble THSD7A 與 anti-sTHSD7A 抗體的組別，其 HUVEC 伸出的 filopodia 數目從 soluble THSD7A 的組別的 17 根下降為 12 根 (圖 10B)。而加入 anti-sTHSD7A 抗體後，也會使 HUVEC 周圍的 well-distributed vinculin plaques 數目減少 (圖 10C)。結合以上的實驗結果，我們證實了 soluble THSD7A 對促進血管新生的功能的確具有特異性。



肆、討論

在這份研究中，我們證實了內皮細胞與神經細胞都可以釋放出 soluble THSD7A。在細胞實驗中，soluble THSD7A 是一個促進內皮細胞移動，管柱形成及新芽生成的 N-glycoprotein。在動物實驗中，soluble THSD7A 增加斑馬魚胚胎中 SIV network 的分支與不正常血管網路生成。而這些 soluble THSD7A 促進血管新生的作用，可能是透過 FAK-dependent signaling pathways，來增加內皮細胞 filopodia formation 及 focal adhesion assembly。為了進一步驗證 soluble THSD7A 對促進血管新生的特異性 (specificity)，我們另外在實驗環境中加入 anti-sTHSD7A antibody，證明 soluble THSD7A 促進 HUVEC 移動、filopodia formation 及 focal adhesion assembly 的能力，會被 anti-sTHSD7A 抗體 (Sigma) 所中和。綜合以上的實驗結果，我們整合了 soluble THSD7A 在血管新生過程中所參與的機制之假說卡通圖，如圖 11 所示。

一、 THSD7A 的轉譯後修飾作用與 functional domain

在生物資訊的預測中，THSD7A 的序列中包含了許多可能調控血管新生的 domains 和 motifs。例如，THSD7A 具有至少十個 thrombospondin type 1 repeats (TSRs)，而像是 thrombospondin-1, thrombospondin-2, semaphorins, UNC-5 與

F-spondin 這些具有 TSR 的蛋白質，大多都會表現在發育中的神經系統，並參與神經細胞之方向引導或 growth cone 的移動 [42]。另外，THSD7A 含有六個 WSXW，這些 WSXW 都位於 TSR 中，且被報導能結合並活化 latent TGF- β [43-44]，以及調控與 fibronectin [45] 或是 heparin 和 heparin sulfate [46] 之結合相關的途徑，而影響細胞貼附；WSXW 同時也是促進細胞貼附後擴張 (spreading) 與 FAK 磷酸化的重要 domain [47]。這些 THSD7A 內的 domains/motifs 都有可能是其能調控血管新生的原因。

Full-length THSD7A 被預測是 membrane protein，我們的實驗結果證實了這一點 (圖 3)。我們更進一步提出證明，full-length THSD7A 會被截切並釋放一段 soluble THSD7A 到細胞外的環境 (圖 4A)。在加入 tunicamycin 抑制 N-glycosylation 後，cultured medium 中的 soluble THSD7A 明顯減少 (圖 4B，upper panel)，這可能是因為 THSD7A 上的 N-glycosylation 與 soluble THSD7A 的正常運送或可溶性相關。

我們曾經使用 baculovirus expression system 在昆蟲細胞 (insect cell; 本實驗使用 High Five cell) 中表現 THSD7A，試著純化出 THSD7A 蛋白質。我們將研究的重點放在 THSD7A 從 amino-terminus 至 transmembrane domain 的部分；由於這個部分的分子量太大而難以表現，所以我們將之分為三個片段 (truncated fragment, TF)，分別命名為 TF1、TF2 及 TF3 (圖 13A)。我負責 TF1 及 TF3 的表現、純化與功能探討，TF2 則由吳曉鈞同學負責。

在以昆蟲細胞表現與純化 TF1 及 TF3 蛋白質時，發現其產量都相當低；在 multiplicity of infection (MOI) 為 5 的條件下，每公升的昆蟲細胞約只能生產純化出 μg 等級的蛋白質，當 MOI 提升至 10 也不會顯著增加蛋白質的產量。以純化出的 TF1 及 TF3 蛋白質進行管柱形成的實驗後發現，當 TF1 的濃度達到 $2.5 \mu\text{g/ml}$ ($\sim 34 \mu\text{M}$) 時，與 PBS 組別相比，可以增加約 43% 的 HUVEC 管柱生成作用，而濃度低時則影響不大 (圖 13B)。至於當 TF3 的濃度達到 $2.5 \mu\text{g/ml}$ ($\sim 53 \mu\text{M}$) 時，雖然與 PBS 組相比有些微的促進血管新生作用，但是並沒有顯著差異 (圖 13C)。

用昆蟲細胞表現 THSD7A 的 truncated fragment 並進行管柱形成實驗後的結果，與 THSD7A-transfected HEK293T cell 所釋放的 soluble THSD7A 的實驗結果相比較，我們得到一些有趣的結論：(1)不論是在 HEK293T cell 中表現的 THSD7A，或是在昆蟲細胞中表現的 THSD7A truncated fragment，其蛋白質表現量都很低，可能因為 THSD7A 在生理環境中會被嚴密調控，不易被大量表現；(2) 昆蟲細胞所表現的蛋白質，其醣化種類與程度與 mammalian cell 是不同的 (例如 N-glycosylation 過程中的 sialic acid modification) [48-49]，實驗已證實 THSD7A 是 N-glycoprotein，所以使用昆蟲細胞表現的 THSD7A truncated fragment，很可能會因為醣化的不同而影響 THSD7A 的促進血管新生作用；(3) HEK293T cell 釋放的 soluble THSD7A 僅需 nM 等級，即可促進血管新生作用 (圖 5-9)，而昆蟲細胞表現的 TF1 則需使用到 μM 等級才有促進管柱生成的效

果，TF3 更是使用到 μM 等級仍無顯著影響（圖 13B-C）；這表示截切後的 THSD7A truncated fragment 促進血管新生的效果並不好，且昆蟲細胞與 HEK293T cell 的糖化差異也可能是造成 TF1 與 TF3 促進血管新生活性不高的原因。

在我們的研究中，THSD7A 共以四種形式出現：除了 full-length THSD7A (260 kDa；圖 3)，還有 functional soluble THSD7A (210 kDa；圖 4C 箭號處)，amino-terminal form (33 kDa；圖 4C 箭頭處)，以及 membrane-anchored form (17 kDa；圖 3 箭號處)。我們推測 full-length THSD7A 在經過 N-glycosylation 的修飾後，利用 transmembrane domain 鑲嵌至細胞膜上，而外露在細胞膜外的 THSD7A amino-terminal region 則在兩個地方被截切：一是在 CTE 和 IDS9 epitopes 之間，另一是在 anti-sTHSD7A 抗體辨認位置上；於是 functional soluble THSD7A (210 kDa) 與 amino-terminal form (33 kDa) 被釋放到細胞外環境中（圖 11）。有趣的是，amino-terminal form 的分子量大於我們使用生物資訊軟體預測後得知的 THSD7A signal peptide 分子量（位於 amino-terminus 前 47 個胺基酸，約 13 kDa），且 amino-terminal form 與 functional soluble THSD7A 都同時在細胞外環境中被偵測到，表示 amino-terminal form 與 soluble THSD7A 之間的截切，很可能發生在細胞外環境中。於是我們推測 amino-terminal form 的截切也許和 soluble THSD7A 的活化有關，也就是說在細胞外環境裡，soluble THSD7A 也許有 pro-form 與 mature functional form 之分。

在自然界中，有許多蛋白質是藉由蛋白質截切 (proteolysis) 來調控其活性與功能。舉例來說，VEGF-C precursor 必須經由截切後成為 mature VEGF-C，才能促進內皮細胞的移動 [50]。Latent TGF- β 也需要經由截切形成 TGF- β ，進而調節免疫及細胞增生等功能 [51]。我們目前已有實驗證明 soluble THSD7A 的釋放是 protease-dependent (圖 12)，但其詳細機制仍未釐清。

二、 THSD7A 對內皮細胞移動的影響與機制

內皮細胞的移動是重要且複雜的過程，其中包含了：用 filopodia 探測細胞周圍的刺激，往刺激方向延伸 protrusions，利用 focal adhesion assembly 將 protrusions 固定在細胞外基質上，在細胞內形成 stress fibers，並回收移動後不需要的 adhesive 和 signaling components [1,6-7,10]。在這些過程中，主要是由 tip cell 來擔任探測刺激的角色 [10]，而 tip cell 前端的新芽 (sprouts) 正是富含 filopodia 的部分 [10,52]。在我們的研究中，證實了 soluble THSD7A 能增加內皮細胞的移動、管柱形成、新芽生成 (圖 5-6) 及 filopodia 的生成 (圖 8B)；在斑馬魚胚胎中，soluble THSD7A 也同樣能增加血管網的分支 (圖 7)。這些結果都共同指出在細胞移動的過程中，soluble THSD7A 能藉由增加 filopodia 的生成而扮演 pro-angiogenic protein 的角色。

Soluble THSD7A 對內皮細胞的影響是在細胞移動的起始步驟，例如增加 filopodia formation (圖 8B)，而許多 angiogenic proteins (包含 VEGF-A 及

VEGF-C 等) 也有同樣的功能 [52-53]。Soluble THSD7A 也促進 FAK/vinculin assembly (圖8C-D), 這些 focal adhesion complex (包含 FAK, vinculin, paxillin 等) 的 assembly 對於將 filopodia 固定在細胞外基質上十分重要, 並且也能將 integrins 與 cytoskeleton 連結, 提供細胞移動時的動力 [1]。除了 FAK assembly, soluble THSD7A 同時也增加了內皮細胞中 FAK 磷酸化的程度 (圖9), 這對下游的訊號傳遞是很重要的 [41]。當 FAK 被磷酸化活化後, vinculin 就會結合至 FAK carboxyl-terminal focal adhesion targeting site (FAT) 並調節細胞移動, actin 的聚合以及下游的 mitogen-activated protein kinase (MAPK, 包含 Erk1/2 與 P38) [15]。MAPK 會被 VEGF, FGF, epidermal growth factor 及 platelet-derived growth factor 等生長因子刺激而引發後續的訊號傳遞途徑 [54-56]。這些生長因子透過 Ras-Raf-MEK1/2-Erk signaling module 來活化 Erk, 然後磷酸化 myosin light chain kinase (MLCK) 及 FAK 去調節 membrane protrusion 與 focal adhesion dynamics [54,57]。而 P38 這個被認為與 inflammation, apoptosis 和 cell differentiation 相關的 MAPK 成員 [58], 也被發現能經由調控 heat shock protein 27 (HSP27) 的磷酸化 [59-60] 與 MAPK-activated protein kinase 2/3 的活化 [61] 來影響細胞遷移。我們的研究發現, 在加入 soluble THSD7A 的 HUVEC 中, 除了 FAK 磷酸化的程度顯著增加之外, P38 與 Erk1/2 的磷酸化程度也有些微上升 (圖9), 這暗示著 P38 與 Erk1/2 可能參與了部分 soluble THSD7A 所調控的細胞移動的下游途徑。

三、 THSD7A 受體

我們的研究證明了 soluble THSD7A 促進血管新生的功能，但是其可能的受體則尚待釐清。在我們的推測中，integrins 有可能就是 soluble THSD7A 受體，因為 soluble THSD7A 對內皮細胞造成的影響，與 integrins 引發的血管新生效果，有很高的相似度。Integrins 是一個龐大的糖蛋白家族，能聚集 focal adhesion components 並連結到細胞骨架上來調控細胞移動 [62-63]。Collagen，fibronectin，vitronectin，thrombospondin-1，thrombin 和 angiostatin 都被指出是透過 integrins 來調控細胞移動與血管新生 [63-64]。在 THSD7A 位於細胞外環境的序列上具有一段 Arg-Gly-Asp (RGD) motif (圖1)，這也是 integrins 用來辨認其他 adhesion proteins (包含 fibronectin，vitronectin，thrombospondin，laminin 以及 fibrinogen 等) 的位置 [65]；我們推測 THSD7A 可能就是以 RGD 與 integrins (尤其可能是 endothelial-specific $\alpha v \beta 3$ integrin) 結合。除了 integrins 之外，VEGFR2 所引起的內皮細胞反應也與 soluble THSD7A 很相近 [66-67]，所以 VEGFR2 也同樣是我們預測的 soluble THSD7A 受體。要試驗 integrins 與 VEGFR2 是否的確是 soluble THSD7A 受體，可以在 soluble THSD7A 進行 angiogenic assay 時，加入 integrins 或 VEGFR2 的中和抗體，觀察 soluble THSD7A 對血管新生的促進是否因此消失；也可以合成 THSD7A 上包含 RGD 附近的 peptide，觀察當 RGD-containing THSD7A specific peptide 存在時，

soluble THSD7A 增進血管新生作用是否降低。

四、 THSD7A 與神經血管交互作用

在我們之前的研究中發現，THSD7A 在人類會表現於胎盤血管，在發育中的斑馬魚體內則主要表現在 neural tube [29-30]。THSD7A 在不同物種中分佈的差異，暗示著這個蛋白質也許在不同物種或組織中，扮演不同的角色。不只如此，因為 THSD7A 已被發現會被截切成不同的片段（圖 2-3），這些片段對於內皮細胞的影響及之間的相互作用，都尚待進一步的釐清 [29-30]。在我們之前的研究中提出了一個假說：THSD7A 對促進內皮細胞的移動功能是透過神經系統釋放到細胞外環境的 soluble THSD7A 來達成 [30]；而本篇研究無論是在細胞層面或是斑馬魚的活體實驗，都支持這樣的論點。在自然界中，也存在許多由神經系統分泌或釋放的 axon guidance molecules（包含 netrins，slits，semaphorins 與 ephrins）能夠同時調控內皮細胞的遷移及管柱生成。這些蛋白質又被統稱為 neuroangiogenic factors [23]。舉例來說，netrin-1 是一種從中樞神經系統的 ventral midline 被分泌出來，用來引導 axon 的蛋白質 [24]，但另一方面 netrin-1 也會造成內皮細胞的 filopodia 退縮，而扮演抑制血管新生的角色 [68]。Slit-2 是另一種表現在神經系統 midline 的蛋白質，會使 axon 退縮 [24]，但是卻會刺激內皮細胞移動以及腫瘤中的血管新生 [69]。結合我們的研究，我們預期 THSD7A 可能是一個新的 neuroangiogenic factor。

伍、未來展望

THSD7A，一個功能與作用機制尚待更進一步釐清的新穎蛋白質，是本實驗室的研究重點。THSD7A 最初被發現在胎盤血管內皮細胞中大量表現，而被認為是一個與血管新生相關的內皮細胞蛋白質 [29]。另一方面，在發育時期的斑馬魚中，我們卻發現 THSD7A 主要表現於 neural tube 的腹側邊緣，且依然影響血管的生長 [30]。而在本篇研究中，進一步證實了人類的神經母細胞瘤之細胞株 (SH-SY5Y neuroblastoma cells) 與內皮細胞 (HUVEC) 同樣可以表現 THSD7A，並且以 soluble form 的形式促進血管新生。綜合本實驗室目前的發現，soluble THSD7A 很可能扮演著調控神經血管交互作用的角色，而這也是我們之後的研究方向之一。在本篇研究中，THSD7A 被發現能夠以四種狀態存在：full-length form (260 kDa)，soluble form (210 kDa)，amino-terminal form (33 kDa)，以及 membrane-anchored form (17 kDa)。目前已經知道 soluble form 能促進血管新生，但截切 full-length THSD7A 的 protease 尚未明朗，其他的片段功能也同樣需要之後的研究繼續釐清。

我們之前的研究為 neural tube 表現的 THSD7A 如何調控血管新生，提出兩種假設：(1) neural tube 上的 membrane-anchored full-length THSD7A 直接與血管內皮細胞上的受體結合；(2) neural tube 上的 full-length THSD7A 釋放出

soluble fragment，形成濃度梯度來影響血管內皮細胞 [30]。本研究支持第二種假設，並且在細胞實驗中對 soluble THSD7A 的有效作用量進行量化，發現約 53.9-89.8 nM soluble THSD7A 即可對內皮細胞造成顯著的增加血管新生現象；而在斑馬魚動物實驗中，注射於 yolk 中的 soluble THSD7A，僅需 0.69 ng 即可影響 SIV network 的排列。這些結果說明了 soluble THSD7A 只需要微量就能有生物活性，因此更有可能在生物的發育過程中，扮演調控神經血管交互作用的角色。

神經血管交互作用是生物在發育過程中的重要步驟。除了許多部位的神經與血管都是相伴平行生長之外，很多影響神經生長的蛋白質，也同時扮演影響血管生長的角色 [24-25,28]。THSD7A 最初被認為是內皮細胞所表現的 membrane-anchored glycoprotein，而本實驗室發現發育時期的斑馬魚 [30] 及小鼠 (data not shown) 的中樞神經系統，以及人類的神經母細胞瘤細胞，也都有 THSD7A 的表現，表示神經系統中具有能調控 *THSD7A* promoter 表現的轉錄因子 (transcription factors)。找出調控 *THSD7A* 表現的轉錄因子以及其在 promoter 上的結合位置，將是一個有趣的課題。

現在我們已經知道 soluble THSD7A 能夠刺激內皮細胞中 FAK 相關的訊號傳遞途徑，進而促進血管新生，但是接受 soluble THSD7A 的受體則尚未明朗。根據 soluble THSD7A 所引起的反應，我們猜測其訊號傳遞可能是經由 integrin [62-64] 或是與 VEGFR2 [66-67] 的協同作用。之後對於 soluble

THSD7A 受體的研究，將有助於更加確認其作用機制以及在生物體內的影響。

當我們仔細區分血管新生的過程，會發現刺激 tip cell sprout 生成的 tip cell selection molecular，與引導新生血管生長方向的 guidance molecular，可以是不同的族群 [5,70]。當血管的內皮細胞附近有高濃度的 exogenous angiogenic factor gradient (例如 VEGFA, VEGFC 以及 angiopoietin 2)，內皮細胞間會進行 “tip cell selection”，被挑選出的內皮細胞除了會特化成 tip cell 之外，也會表現出高量的 Dll4，去抑制周邊的內皮細胞形成新的 tip cell，以確保只有接收到最高濃度 angiogenic factor 的內皮細胞會進行血管新生。Tip cell 接著會以 sprout 上的 filopodia 探測周圍的環境，包括 angiogenic factor gradient，和 guidance molecular (例如 semaphorins 以及 ephrins)，來決定 tip cell 延伸的方向 [5,11,52]。也就是說，guidance molecular 主要負責指引 tip cell 方向，而 angiogenic factor 除了可以指引方向，同時也會影響內皮細胞的特化，刺激其成為 tip cell 或是維持為 stalk cell。以我們的實驗結果看來，soluble THSD7A 的存在會增加內皮細胞形成 sprouts (圖 6A-C) 及 filopodia (圖 8B)，而這些 sprouts 若互相以 filopodia 連結，則會比正常情況更容易形成 irregular vessel network (圖 5B；圖 7)。所以我們推測 soluble THSD7A 是一個新穎的 angiogenic factor，更可能是一個從神經系統表現出來的 neuroangiogenic factor。而我們最新的實驗結果顯示，以 morpholino 抑制發育中的斑馬魚的 Thsd7a 表現，不僅影響 ISV 的正常生長，同時也造成 motor neuron 的 projection 發育延遲與型態改變 (data not

shown)；這對 soluble THSD7A 扮演神經血管新生因子的可能性提出了更具體的證據，也將讓 THSD7A 的研究有更多有趣的未來發展。



陸、圖

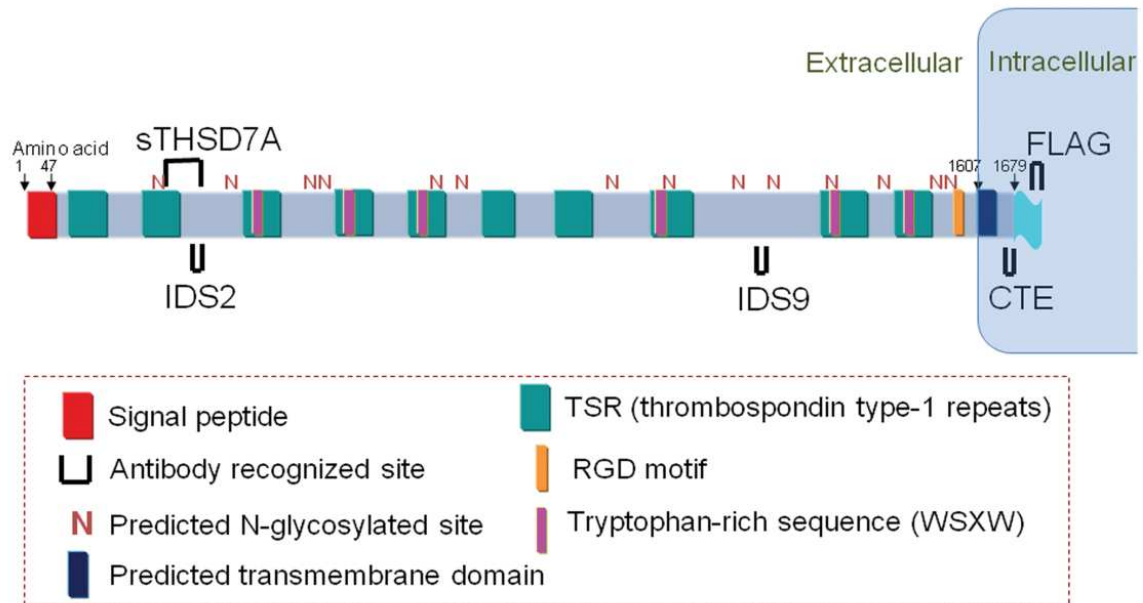


圖 1. Full-length THSD7A 序列上的 domain/motif 以及抗體辨認位置。

在 domain/motif 的預測中，full-length THSD7A 的 amino terminus 上有一段可帶領 THSD7A 送出細胞膜的 signal peptide，十個 thrombospondin type 1 repeats，六個 WSXW motifs，一個 RGD motif，一個靠近 carboxyl terminus 的 transmembrane domain，以及十四個 N-glycosylated sites。我們另外在 THSD7A 的 carboxyl terminus 構築了一個 FLAG-tag。THSD7A-specific antibodies (sTHSD7A，IDS2，IDS9 和 CTE) 以及 FLAG-tag 的位置皆以 U 表示。

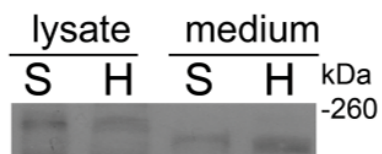


圖 2. HUVEC 與 SH-SY5Y 中 THSD7A 的表現。

用 Western blot 來分析 HUVEC (H) 與 SH-SY5Y (S) 的 cell lysates 和 cultured medium 中，THSD7A 的表現。使用的抗體是 anti-sTHSD7A antibody。



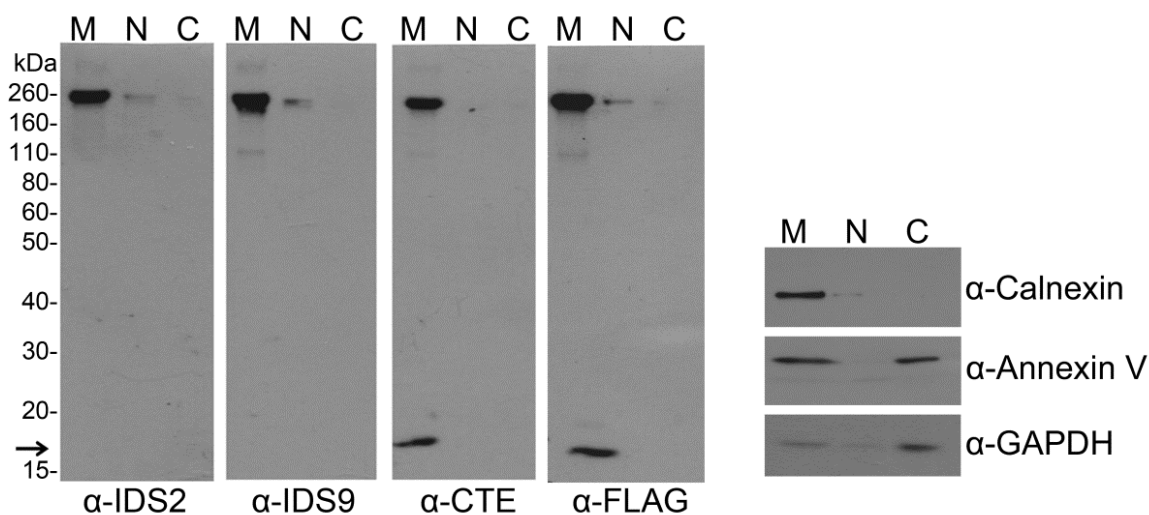


圖 3. THSD7A 是一個 membrane-associated protein。

我們用 subcellular fractionation 的方法，將 *THSD7A*-transfected HEK293T cell lysates 分成 cytosolic (C)，nuclear (N) 和 membrane (M) fractions。在 Western blot 的分析中所使用的抗體有 anti-THSD7A (IDS2，IDS9，CTE)，anti-FLAG-tag，anti-calnexin (plasma membrane marker)，anti-annexin V (cytoplasm 與 plasma membrane marker) 以及 anti-GAPDH (cytoplasm marker) antibodies。箭號標示出 THSD7A 留在細胞膜上的一小段 carboxyl-terminal fragment。

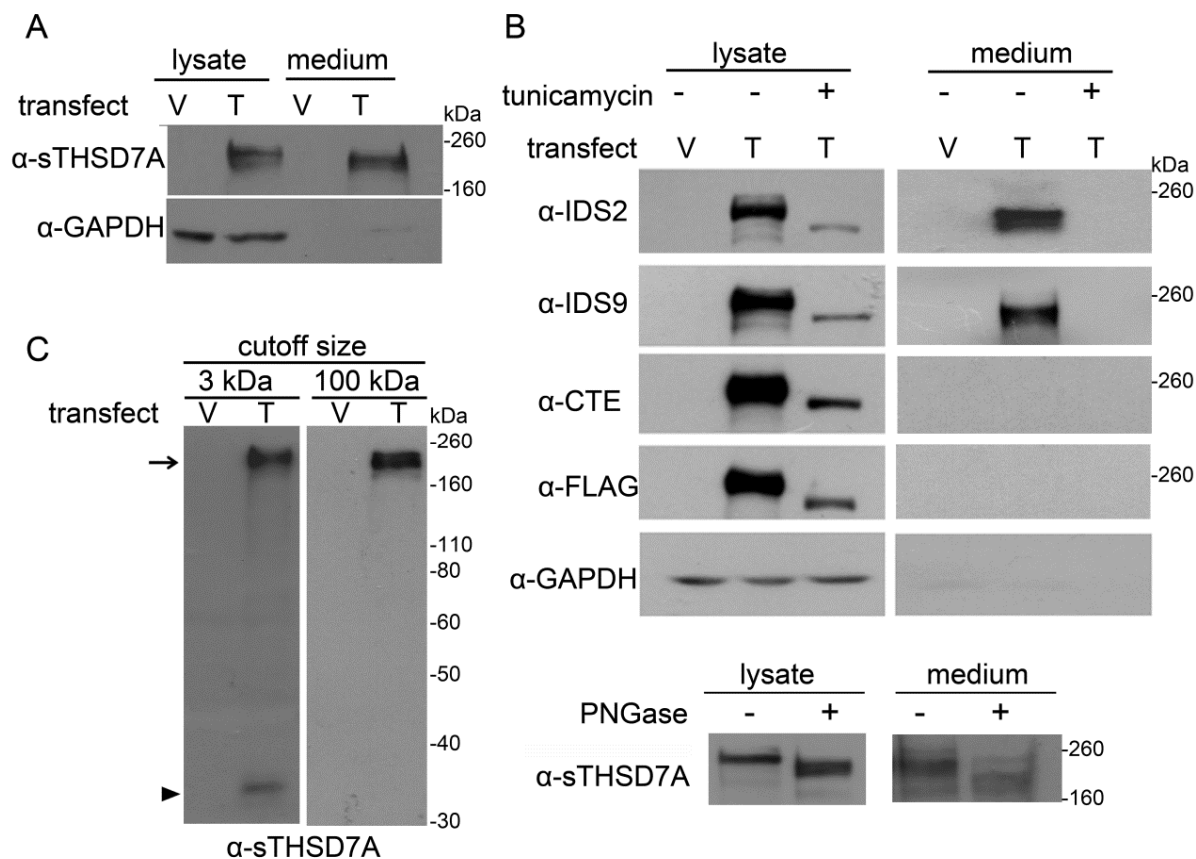


圖 4. THSD7A 是一個能釋放一段 soluble form 到細胞外環境的 N-glycoprotein。

A.用 Western blot 來分析 Empty vector (V)- and *THSD7A* (T)-transfected HEK293T cell lysates 以及 cultured medium。GAPDH 用來當作 cytoplasm marker。**B.** (Upper panel) 在 Transfected HEK293T cell 培養環境中加入 (+) 或未加入 (-) tunicamycin 後，以 Western blot 分析 cell lysates 以及 cultured medium 的結果。(Lower panel) 將 transfected HEK293T cell lysates 與 cultured medium 以 PNGase 處理 (+) 或是不處理 (-) 之後的 Western blot 結果。**C.** 收集 transfected HEK293T cell cultured medium 後，以 3 kDa 或 100 kDa cutoff

Amicon 濃縮管濃縮，再用 Western blot 分析。箭號標示處顯示 210 kDa soluble THSD7A 會被 3 kDa 與 100 kDa cutoff 濃縮管留住，而箭頭處的 33 kDa THSD7A amino-terminal fragment 只會出現在 3 kDa cutoff 濃縮管中。後續的 angiogenic assay 皆使用 100 kDa cutoff 濃縮管濃縮後的 210 kDa soluble THSD7A。



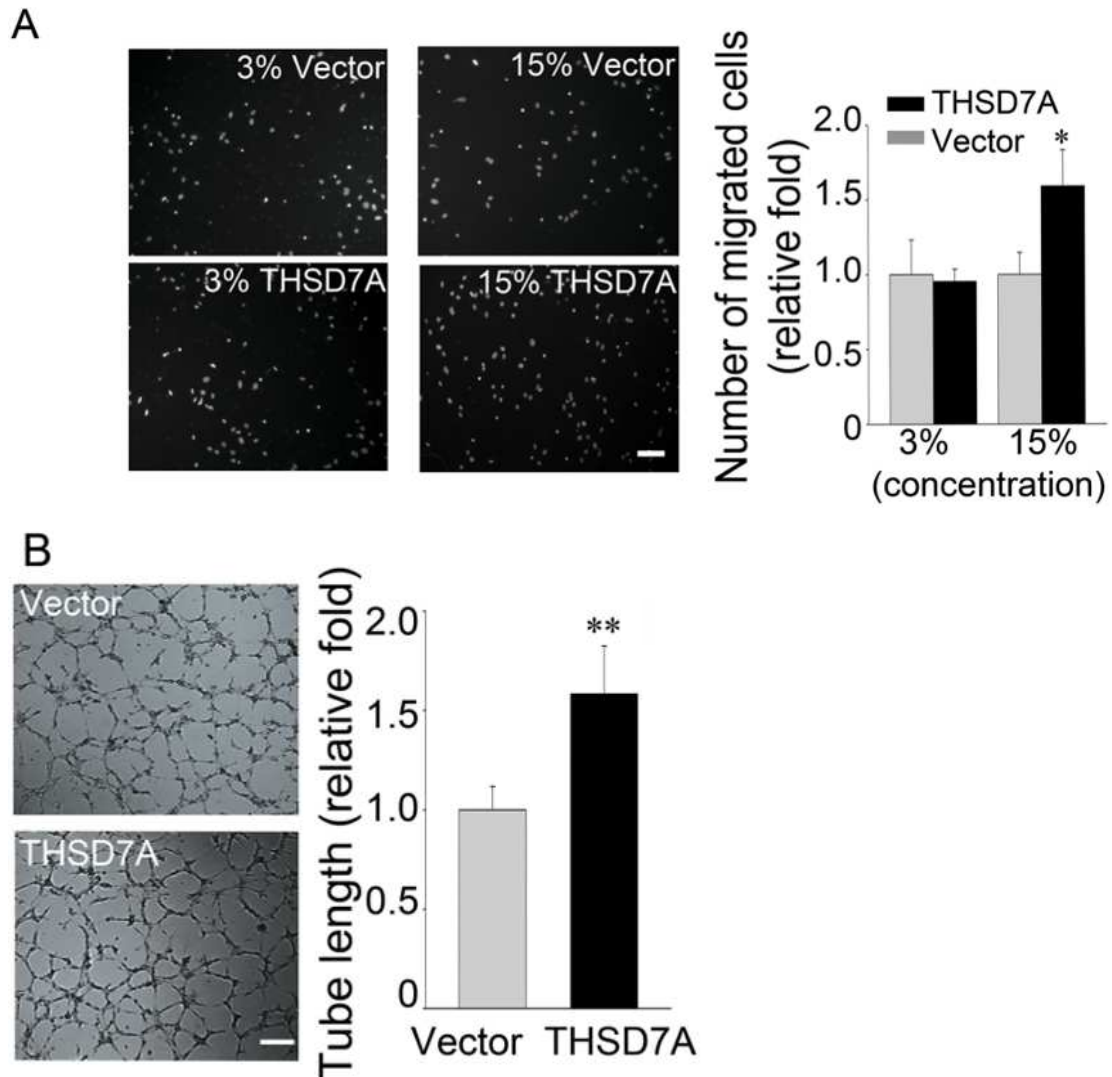


圖 5. Soluble THSD7A 促進內皮細胞的移動以及管柱形成。

A. 使用 transwell 來檢驗 lower well 中 3% 或 15% soluble THSD7A 對於 upper well 中 HUVEC 移動能力的影響。**B.** 使用 Matrigel 來檢驗 HUVEC 在 soluble THSD7A 存在與否的環境中，形成管柱的能力。以上實驗比例尺皆為 10 μm 。 $*P<0.05$ vs. vector。

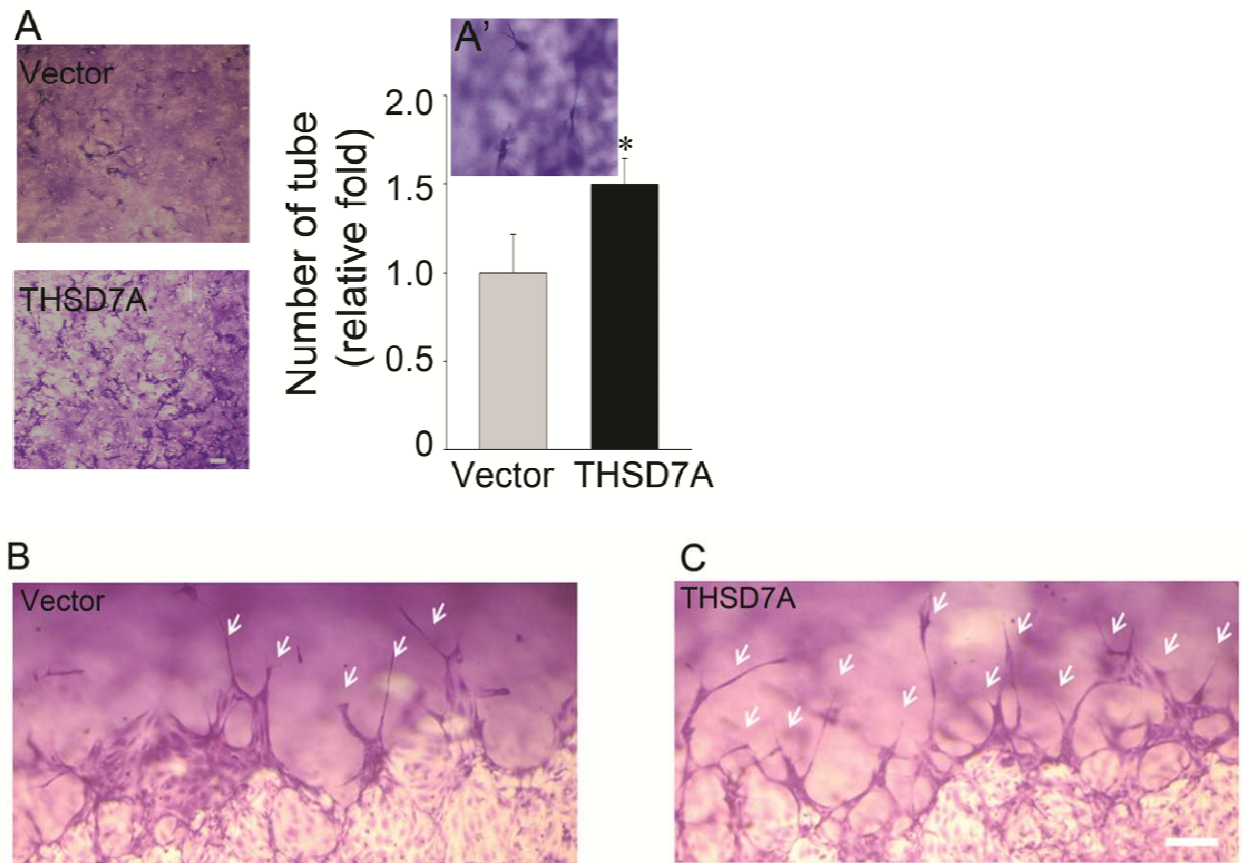


圖 6. Soluble THSD7A 促進內皮細胞的新芽生成。(此實驗結果由王芊蕙提供)

A. 三維的管柱形成實驗的俯瞰圖 (從上而下觀察膠體)。此實驗可以觀察管柱前端的新芽數量，作為 soluble THSD7A 對 HUVEC 新芽生成影響的檢定。A'. 管柱前端，新芽的俯瞰放大圖。比例尺為 10 μm 。* $P < 0.05$ vs. vector。B-C. 新芽生成的側面圖 (從側面觀察膠體)。箭號顯示新芽生成處。比例尺為 100 μm 。

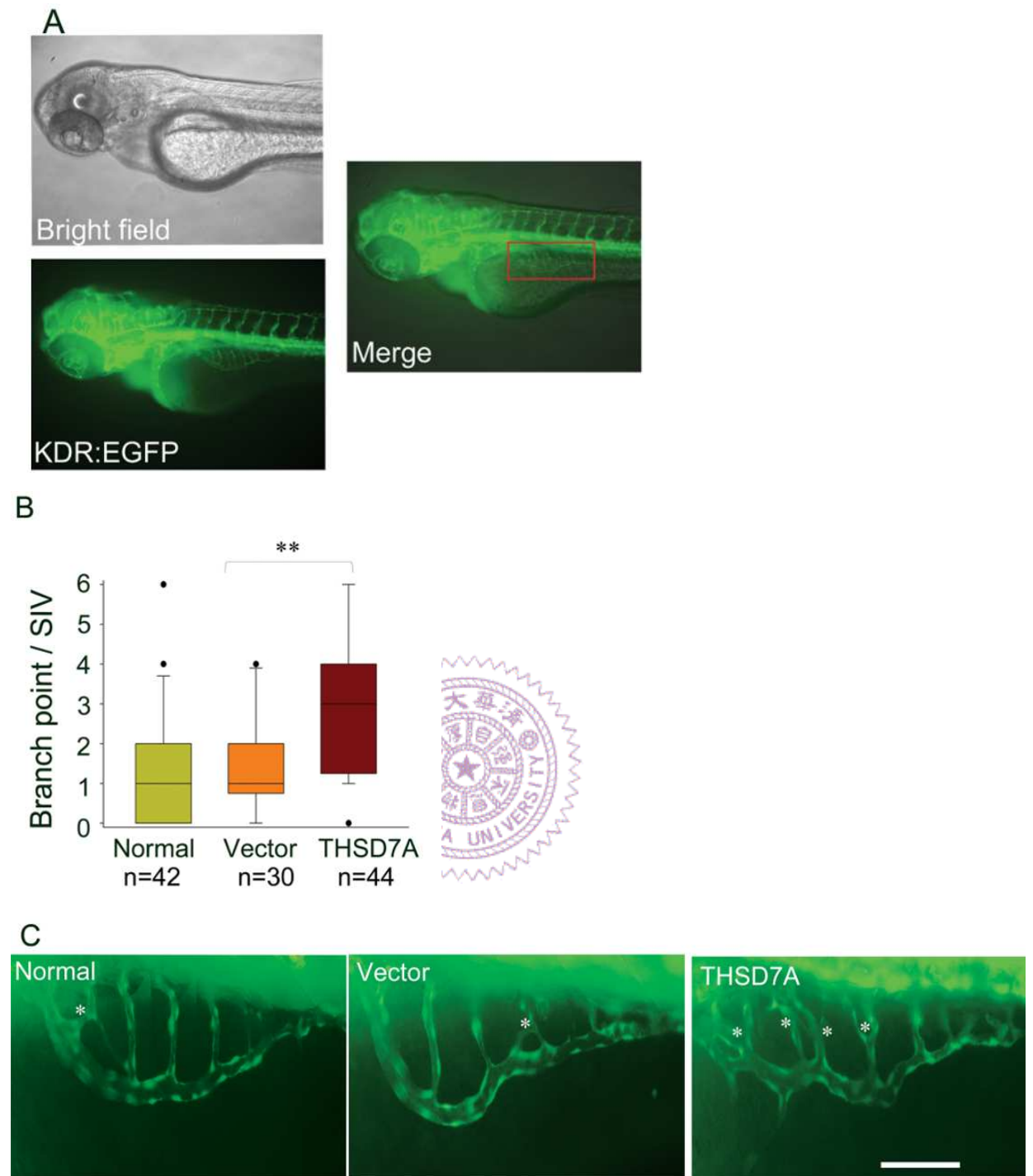


圖 7. Soluble THSD7A 促進斑馬魚體內 SIV networks 分支與不規則血管網路

形成。

A. 74 hpf Tg(KDR:EGFP) zebrafish 的 SIV network 生長情形。紅框標示出 SIV network 的區域。B. 注射 soluble THSD7A, control medium 或是未經注射的 74

hpf 斑馬魚 SIV network 中，分支點的中位數統計。^{**} $P < 0.01$ vs. vector° C. 74 hpf

斑馬魚 SIV network 的放大圖。* 標示出分支點。比例尺為 100 μm 。



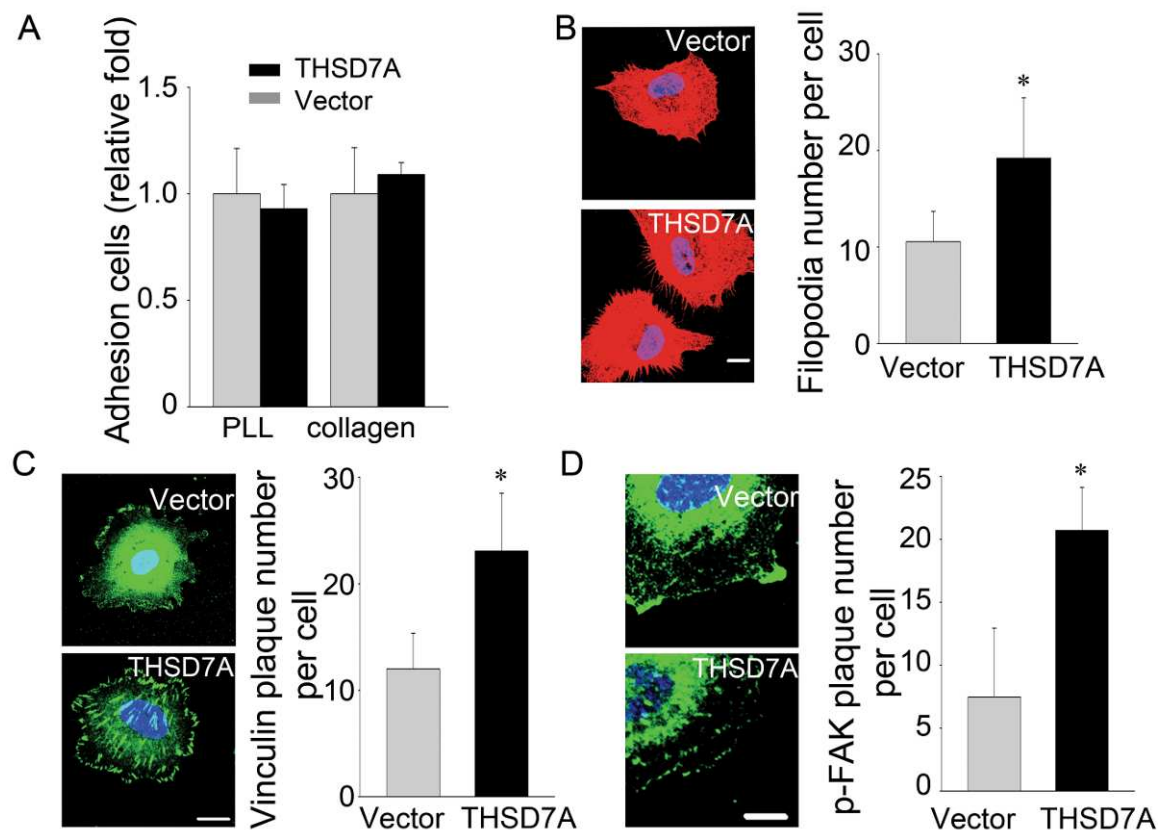


圖 8. Soluble THSD7A 透過促進 filopodia formation 與 focal adhesion assembly 來增加細胞的移動性，

A. 在 type I collagen 或是 PLL 上測試 soluble THSD7A 是否影響 HUVEC 貼附。B. 使用細胞免疫螢光染色觀察 HUVEC 的 actin filaments (紅色)。藍色為細胞核。柱狀圖為每個細胞平均伸出的 filopodia 數量統計。C. 使用細胞免疫螢光染色觀察 HUVEC 邊緣的 vinculin plaque (綠色) 分佈情形。藍色為細胞核。柱狀圖為每個細胞周圍的 vinculin plaque 數量統計。D. 使用細胞免疫螢光染色觀察 HUVEC 邊緣的 p-FAK plaque (綠色) 分佈情形。藍色為細胞核。柱狀圖為每個細胞周圍的 p-FAK plaque 數量統計。以上比例尺皆為 10 μ m。* P <0.05 vs.

vector \circ





圖 9. Soluble THSD7A 增加內皮細胞中 FAK 的磷酸化。

以 Western blot 分析 HUVEC 在 soluble THSD7A 或是 control medium 處理後，cell lysates 中，p-FAK，p-Erk1/2，p-P38 與 p-Akt 相對表現量的變化。GAPDH 為 loading control。數值以 mean ± SD 表示。未磷酸化的 FAK，Erk1/2，P38 和 Akt 總表現量並未受到影響。

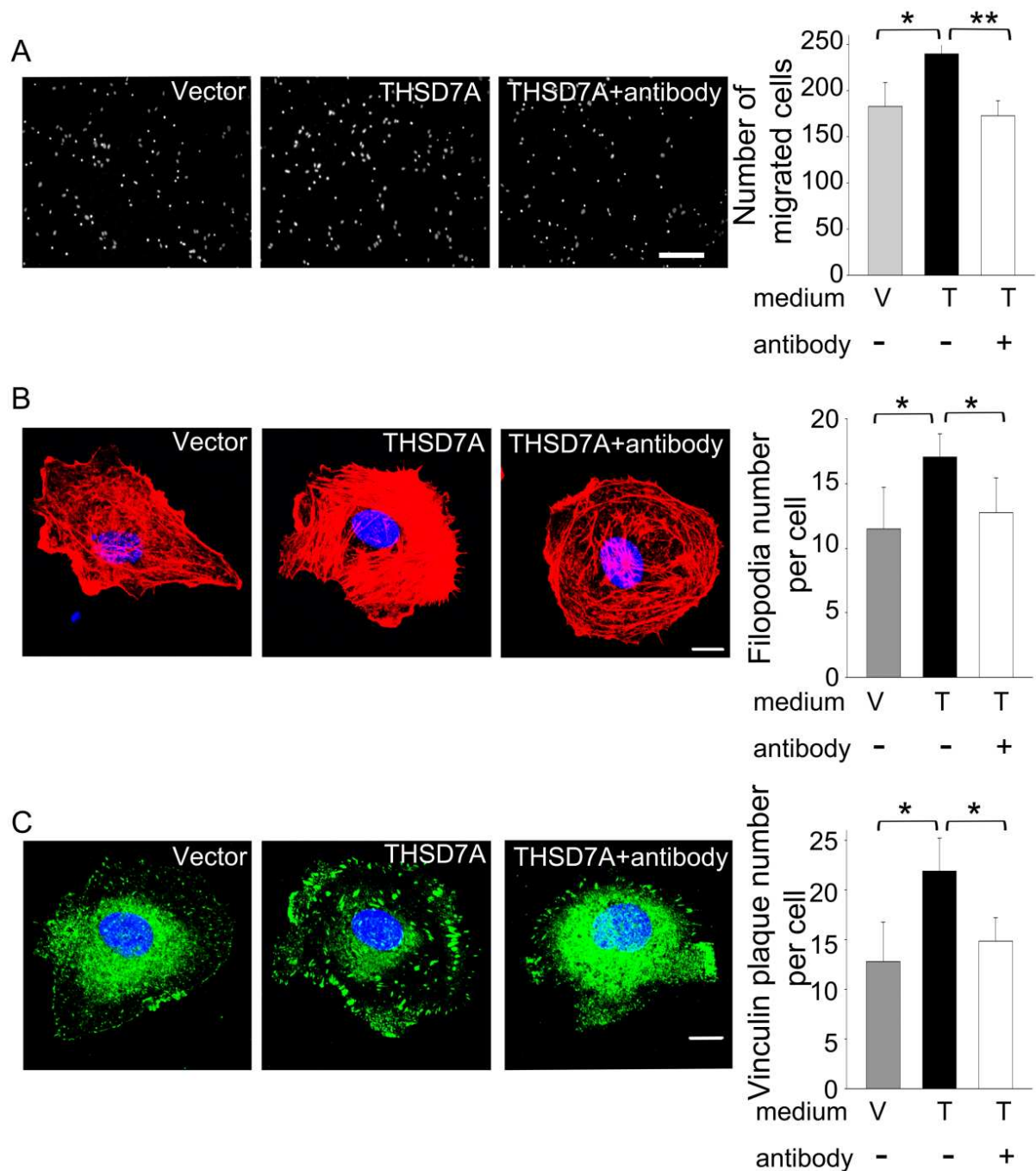


圖 10. Soluble THSD7A 對血管新生作用的促進，可被 anti-sTHSD7A 抗體中和。

A. 使用 transwell 來檢驗加於 lower well 中的 soluble THSD7A (T)，在外加 anti-sTHSD7A 抗體(+) 與否 (-) 的狀況下，對於 upper well 中 HUVEC 移動能力的促進是否有影響。Control medium (V) 為對照組。比例尺為 100 μ m。 **B.** 使用細胞免疫螢光染色觀察 HUVEC 的 filopodia 伸出數量是否被

anti-sTHSD7A 抗體的加入中和。紅色為 actin filaments，藍色為細胞核。柱狀圖為每個細胞平均伸出的 filopodia 數量統計。C. 使用細胞免疫螢光染色觀察 HUVEC 的 vinculin plaque (綠色) 分佈情形是否被 anti-sTHSD7A 抗體的加入影響。藍色為細胞核。柱狀圖為每個細胞周圍的 vinculin plaque 數量統計。比例尺為 10 μm 。* $P < 0.05$ vs. vector。** $P < 0.01$ vs. vector。



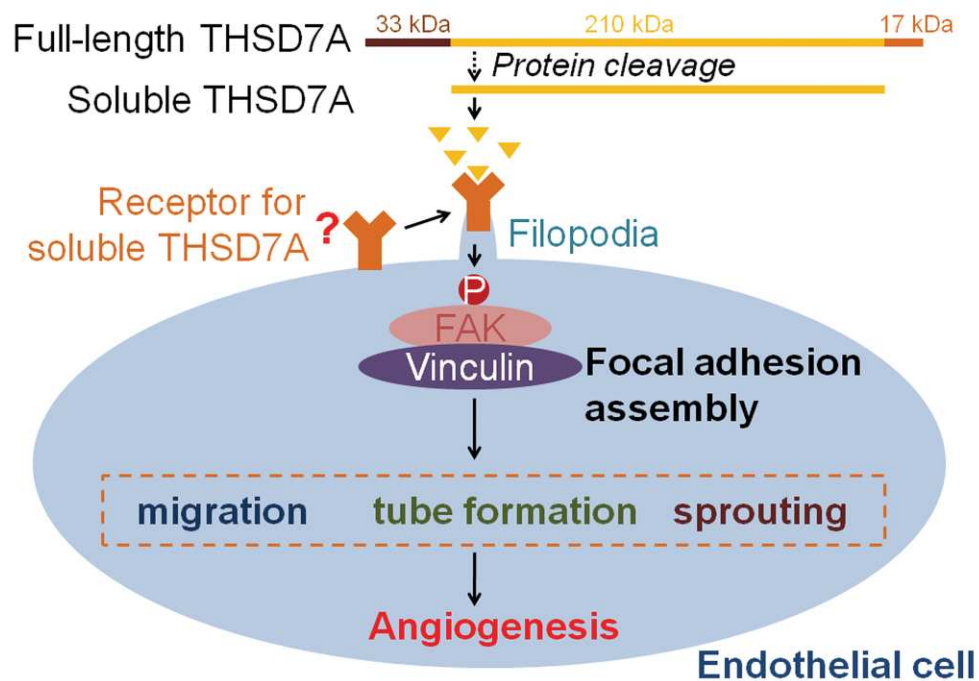


圖 11. Soluble THSD7A 在血管新生過程中所參與的機制假說圖。

細胞表現 full-length THSD7A 後，full-length THSD7A 會鑲嵌至細胞膜上，並被截切而釋放出 soluble THSD7A。Soluble THSD7A 會與內皮細胞上的受器結合，啟動 filopodia formation 及 focal adhesion assembly，進而藉由 FAK-involved manner 來促進細胞移動，管柱生成和新芽合成。

。

A. *THSD7A*-transfected HEK293T cell 培養液中加入 complete protease inhibitor (C), Benzamidine (B), Leupeptin (L) 以及 Pepstatin A (P) 後, 收集 cell lysates 與 cultured medium, 並用 Western blot 分析 soluble THSD7A 表現狀態。未加入任何 protease inhibitor 的組別 (No) 為對照組。GAPDH 作為 loading control。 **B.** Thrombin 與 caspase 1 被預測為可能截切 full-length THSD7A 的 protease。圖中顯示其可能截切的位置。 **C.** *THSD7A*-transfected HEK293T cell 培養液中加入 complete protease inhibitor (C), hirudin (H), caspase 1 inhibitor I (I) 後, 收集 cell lysates 與 cultured medium, 並用 Western blot 分析 soluble THSD7A 表現狀態。未加入任何 protease inhibitor 的組別 (No) 為對照組。GAPDH 作為 loading control。



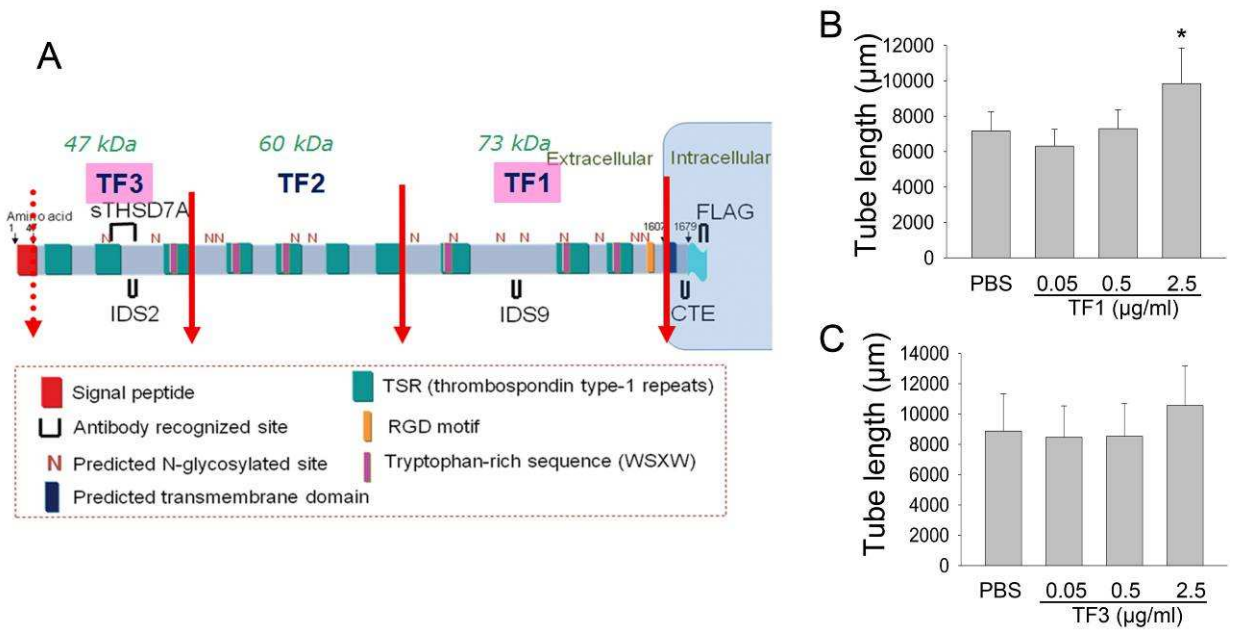


圖 13. 在昆蟲細胞中以 baculovirus expression system 表現並純化 THSD7A

truncated protein。

A. THSD7A 從 amino-terminus 到 transmembrane domain 的區域被區分為三個 truncated fragment；我負責表現與純化 TF1 與 TF3。**B.** 使用 Matrigel 來檢驗 HUVEC 在 TF1 蛋白質存在與否的環境中，形成管柱的能力。2.5 μg/ml TF1 約為 34 μM。**C.** 使用 Matrigel 來檢驗 HUVEC 在 TF3 蛋白質存在與否的環境中，形成管柱的能力。2.5 μg/ml TF3 約為 53 μM。*P < 0.05 vs. PBS。

柒、參考文獻

1. Lamalice L, Le Boeuf F, Huot J (2007) Endothelial cell migration during angiogenesis. *Circ Res* 100: 782-794.
2. Adams RH, Alitalo K (2007) Molecular regulation of angiogenesis and lymphangiogenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8: 464-478.
3. Bergers G, Benjamin LE (2003) Tumorigenesis and the angiogenic switch. *Nat Rev Cancer* 3: 401-410.
4. Hoeben A, Landuyt B, Highley MS, Wildiers H, Van Oosterom AT, et al. (2004) Vascular endothelial growth factor and angiogenesis. *Pharmacol Rev* 56: 549-580.
5. Herbert SP, Stainier DY (2011) Molecular control of endothelial cell behaviour during blood vessel morphogenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 12: 551-564.
6. Munoz-Chapuli R, Quesada AR, Angel Medina M (2004) Angiogenesis and signal transduction in endothelial cells. *Cell Mol Life Sci* 61: 2224-2243.
7. Mattila PK, Lappalainen P (2008) Filopodia: molecular architecture and cellular functions. *Nat Rev Mol Cell Biol* 9: 446-454.
8. Galbraith CG, Yamada KM, Galbraith JA (2007) Polymerizing actin fibers position

- integrins primed to probe for adhesion sites. *Science* 315: 992-995.
9. Horowitz A, Simons M (2008) Branching morphogenesis. *Circ Res* 103: 784-795.
10. De Smet F, Segura I, De Bock K, Hohensinner PJ, Carmeliet P (2009)
Mechanisms of vessel branching: filopodia on endothelial tip cells lead the
way. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 29: 639-649.
11. Jakobsson L, Franco CA, Bentley K, Collins RT, Ponsioen B, et al. (2010)
Endothelial cells dynamically compete for the tip cell position during
angiogenic sprouting. *Nat Cell Biol* 12: 943-953.
12. Hellstrom M, Phng LK, Hofmann JJ, Wallgard E, Coultas L, et al. (2007) Dll4
signalling through Notch1 regulates formation of tip cells during angiogenesis.
Nature 445: 776-780.
13. Suchting S, Freitas C, le Noble F, Benedito R, Breant C, et al. (2007) The Notch
ligand Delta-like 4 negatively regulates endothelial tip cell formation and
vessel branching. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104: 3225-3230.
14. Braren R, Hu H, Kim YH, Beggs HE, Reichardt LF, et al. (2006) Endothelial FAK
is essential for vascular network stability, cell survival, and lamellipodial
formation. *J Cell Biol* 172: 151-162.
15. Parsons JT (2003) Focal adhesion kinase: the first ten years. *J Cell Sci* 116:
1409-1416.

16. Miranti CK, Brugge JS (2002) Sensing the environment: a historical perspective on integrin signal transduction. *Nat Cell Biol* 4: E83-90.
17. Parsons JT, Martin KH, Slack JK, Taylor JM, Weed SA (2000) Focal adhesion kinase: a regulator of focal adhesion dynamics and cell movement. *Oncogene* 19: 5606-5613.
18. Humphries JD, Wang P, Streuli C, Geiger B, Humphries MJ, et al. (2007) Vinculin controls focal adhesion formation by direct interactions with talin and actin. *J Cell Biol* 179: 1043-1057.
19. Zamir E, Geiger B (2001) Molecular complexity and dynamics of cell-matrix adhesions. *J Cell Sci* 114: 3583-3590.
20. Hall A (1998) Rho GTPases and the actin cytoskeleton. *Science* 279: 509-514.
21. Pepper MS (2001) Role of the matrix metalloproteinase and plasminogen activator-plasmin systems in angiogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 21: 1104-1117.
22. Seandel M, Noack-Kunnmann K, Zhu D, Aimes RT, Quigley JP (2001) Growth factor-induced angiogenesis in vivo requires specific cleavage of fibrillar type I collagen. *Blood* 97: 2323-2332.
23. Park JA, Choi KS, Kim SY, Kim KW (2003) Coordinated interaction of the vascular and nervous systems: from molecule- to cell-based approaches.

Biochem Biophys Res Commun 311: 247-253.

24. Eichmann A, Makinen T, Alitalo K (2005) Neural guidance molecules regulate vascular remodeling and vessel navigation. *Genes Dev* 19: 1013-1021.
25. Eichmann A, Le Noble F, Autiero M, Carmeliet P (2005) Guidance of vascular and neural network formation. *Curr Opin Neurobiol* 15: 108-115.
26. Miller G (2009) Origins. On the origin of the nervous system. *Science* 325: 24-26.
27. Tam SJ, Watts RJ (2010) Connecting vascular and nervous system development: angiogenesis and the blood-brain barrier. *Annu Rev Neurosci* 33: 379-408.
28. Carmeliet P, Tessier-Lavigne M (2005) Common mechanisms of nerve and blood vessel wiring. *Nature* 436: 193-200.
29. Wang CH, Su PT, Du XY, Kuo MW, Lin CY, et al. (2010) Thrombospondin type I domain containing 7A (THSD7A) mediates endothelial cell migration and tube formation. *J Cell Physiol* 222: 685-694.
30. Wang CH, Chen IH, Kuo MW, Su PT, Lai ZY, et al. (2011) Zebrafish Thsd7a is a neural protein required for angiogenic patterning during development. *Dev Dyn* 240: 1412-1421.
31. Lawson ND, Weinstein BM (2002) Arteries and veins: making a difference with zebrafish. *Nat Rev Genet* 3: 674-682.
32. Kimmel CB, Ballard WW, Kimmel SR, Ullmann B, Schilling TF (1995) Stages of

- embryonic development of the zebrafish. *Dev Dyn* 203: 253-310.
33. Sinha Roy R, Soni S, Harfouche R, Vasudevan PR, Holmes O, et al. (2010) Coupling growth-factor engineering with nanotechnology for therapeutic angiogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107: 13608-13613.
34. Nicoli S, De Sena G, Presta M (2009) Fibroblast growth factor 2-induced angiogenesis in zebrafish: the zebrafish yolk membrane (ZFYM) angiogenesis assay. *J Cell Mol Med* 13: 2061-2068.
35. Huang WC, Hsieh YS, Chen IH, Wang CH, Chang HW, et al. (2010) Combined use of MS-222 (tricaine) and isoflurane extends anesthesia time and minimizes cardiac rhythm side effects in adult zebrafish. *Zebrafish* 7: 297-304.
36. Koh W, Stratman AN, Sacharidou A, Davis GE (2008) In vitro three dimensional collagen matrix models of endothelial lumen formation during vasculogenesis and angiogenesis. *Methods Enzymol* 443: 83-101.
37. Davis GE, Saunders WB (2006) Molecular balance of capillary tube formation versus regression in wound repair: role of matrix metalloproteinases and their inhibitors. *J Invest Dermatol Symp Proc* 11: 44-56.
38. Stratman AN, Davis MJ, Davis GE (2011) VEGF and FGF prime vascular tube morphogenesis and sprouting directed by hematopoietic stem cell cytokines. *Blood* 117: 3709-3719.

39. Serbedzija GN, Flynn E, Willett CE (1999) Zebrafish angiogenesis: a new model for drug screening. *Angiogenesis* 3: 353-359.
40. Vainionpaa N, Kikkawa Y, Lounatmaa K, Miner JH, Rousselle P, et al. (2006) Laminin-10 and Lutheran blood group glycoproteins in adhesion of human endothelial cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 290: C764-775.
41. Sieg DJ, Hauck CR, Ilic D, Klingbeil CK, Schaefer E, et al. (2000) FAK integrates growth-factor and integrin signals to promote cell migration. *Nat Cell Biol* 2: 249-256.
42. Adams JC, Tucker RP (2000) The thrombospondin type 1 repeat (TSR) superfamily: diverse proteins with related roles in neuronal development. *Dev Dyn* 218: 280-299.
43. Murphy-Ullrich JE, Poczatek M (2000) Activation of latent TGF-beta by thrombospondin-1: mechanisms and physiology. *Cytokine Growth Factor Rev* 11: 59-69.
44. Young GD, Murphy-Ullrich JE (2004) The tryptophan-rich motifs of the thrombospondin type 1 repeats bind VLAL motifs in the latent transforming growth factor-beta complex. *J Biol Chem* 279: 47633-47642.
45. Sipes JM, Guo N, Negre E, Vogel T, Kruttsch HC, et al. (1993) Inhibition of fibronectin binding and fibronectin-mediated cell adhesion to collagen by a

- peptide from the second type I repeat of thrombospondin. J Cell Biol 121: 469-477.
46. Guo NH, Kruttsch HC, Negre E, Vogel T, Blake DA, et al. (1992) Heparin- and sulfatide-binding peptides from the type I repeats of human thrombospondin promote melanoma cell adhesion. Proc Natl Acad Sci U S A 89: 3040-3044.
47. Sipes JM, Kruttsch HC, Lawler J, Roberts DD (1999) Cooperation between thrombospondin-1 type 1 repeat peptides and $\alpha(v)\beta(3)$ integrin ligands to promote melanoma cell spreading and focal adhesion kinase phosphorylation. J Biol Chem 274: 22755-22762.
48. Marchal I, Jarvis DL, Cacan R, Verbert A (2001) Glycoproteins from insect cells: sialylated or not? Biol Chem 382: 151-159.
49. Watanabe S, Kokuho T, Takahashi H, Takahashi M, Kubota T, et al. (2002) Sialylation of N-glycans on the recombinant proteins expressed by a baculovirus-insect cell system under beta-N-acetylglucosaminidase inhibition. J Biol Chem 277: 5090-5093.
50. Joukov V, Sorsa T, Kumar V, Jeltsch M, Claesson-Welsh L, et al. (1997) Proteolytic processing regulates receptor specificity and activity of VEGF-C. EMBO J 16: 3898-3911.
51. Lawrence DA (2001) Latent-TGF-beta: an overview. Mol Cell Biochem 219:

163-170.

52. Gerhardt H, Golding M, Fruttiger M, Ruhrberg C, Lundkvist A, et al. (2003)

VEGF guides angiogenic sprouting utilizing endothelial tip cell filopodia. *J*

Cell Biol 161: 1163-1177.

53. Benest AV, Harper SJ, Herttuala SY, Alitalo K, Bates DO (2008) VEGF-C induced

angiogenesis preferentially occurs at a distance from lymphangiogenesis.

Cardiovasc Res 78: 315-323.

54. Huang C, Jacobson K, Schaller MD (2004) MAP kinases and cell migration. *J*

Cell Sci 117: 4619-4628.

55. Tangkijvanich P, Santiskulvong C, Melton AC, Rozengurt E, Yee HF, Jr. (2002)

p38 MAP kinase mediates platelet-derived growth factor-stimulated migration

of hepatic myofibroblasts. *J Cell Physiol* 191: 351-361.

56. Robinson MJ, Cobb MH (1997) Mitogen-activated protein kinase pathways. *Curr*

Opin Cell Biol 9: 180-186.

57. Klemke RL, Cai S, Giannini AL, Gallagher PJ, de Lanerolle P, et al. (1997)

Regulation of cell motility by mitogen-activated protein kinase. *J Cell Biol*

137: 481-492.

58. Ono K, Han J (2000) The p38 signal transduction pathway: activation and

function. *Cell Signal* 12: 1-13.

59. Hedges JC, Dechert MA, Yamboliev IA, Martin JL, Hickey E, et al. (1999) A role for p38(MAPK)/HSP27 pathway in smooth muscle cell migration. *J Biol Chem* 274: 24211-24219.
60. Rousseau S, Houle F, Landry J, Huot J (1997) p38 MAP kinase activation by vascular endothelial growth factor mediates actin reorganization and cell migration in human endothelial cells. *Oncogene* 15: 2169-2177.
61. McLaughlin MM, Kumar S, McDonnell PC, Van Horn S, Lee JC, et al. (1996) Identification of mitogen-activated protein (MAP) kinase-activated protein kinase-3, a novel substrate of CSBP p38 MAP kinase. *J Biol Chem* 271: 8488-8492.
62. Hood JD, Cheresch DA (2002) Role of integrins in cell invasion and migration. *Nat Rev Cancer* 2: 91-100.
63. Silva R, D'Amico G, Hodivala-Dilke KM, Reynolds LE (2008) Integrins: the keys to unlocking angiogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 28: 1703-1713.
64. Hodivala-Dilke KM, Reynolds AR, Reynolds LE (2003) Integrins in angiogenesis: multitasking molecules in a balancing act. *Cell Tissue Res* 314: 131-144.
65. Ruoslahti E (1996) RGD and other recognition sequences for integrins. *Annu Rev Cell Dev Biol* 12: 697-715.
66. Somanath PR, Malinin NL, Byzova TV (2009) Cooperation between integrin

- alphavbeta3 and VEGFR2 in angiogenesis. *Angiogenesis* 12: 177-185.
67. Masson-Gadais B, Houle F, Laferriere J, Huot J (2003) Integrin alphavbeta3, requirement for VEGFR2-mediated activation of SAPK2/p38 and for Hsp90-dependent phosphorylation of focal adhesion kinase in endothelial cells activated by VEGF. *Cell Stress Chaperones* 8: 37-52.
68. Lu X, Le Noble F, Yuan L, Jiang Q, De Lafarge B, et al. (2004) The netrin receptor UNC5B mediates guidance events controlling morphogenesis of the vascular system. *Nature* 432: 179-186.
69. Wang B, Xiao Y, Ding BB, Zhang N, Yuan X, et al. (2003) Induction of tumor angiogenesis by Slit-Robo signaling and inhibition of cancer growth by blocking Robo activity. *Cancer Cell* 4: 19-29.
70. Carmeliet P, Jain RK (2011) Molecular mechanisms and clinical applications of angiogenesis. *Nature* 473: 298-307.