

# 科技部補助

## 大專學生研究計畫研究成果報告

\* \*\*\*\*\* \*\*\*\*\* \*  
\* 計 畫 \*  
\* : 乳癌幹細胞內熱休克 90 蛋白調控 EZH2 表現的機制探討 \*  
\* 名 稱 \*  
\* \*\*\*\*\* \*\*\*\*\* \*

執行計畫學生： 陳怡穎  
學生計畫編號： MOST 105-2815-C-040-017-B  
研究期間： 105 年 07 月 01 日至 106 年 02 月 28 日止，計 8 個月  
指導教授： 張文瑋

處理方式： 本計畫可公開查詢

執行單位： 中山醫學大學生物醫學科學學系（所）

中華民國 106 年 05 月 22 日

二、研究計畫內容(以 10 頁為限):

題目: 乳癌幹細胞內熱休克蛋白 90 調節 EZH2 表現的機制探討

### (一) 摘要

癌症幹細胞是癌症組織中具有幹細胞特性的癌細胞，具有自我更新及細胞分化的能力，並與癌症的抗藥性與轉移有關，因此標靶癌幹細胞是目前癌症治療的重點發展項目之一。Heat shock protein 90 (Hsp90)是一種熱休克蛋白，具有穩定蛋白質結構的功能，有許多致癌基因是Hsp90的客戶蛋白，許多癌症中都發現具Hsp90的過度表現。17-dimethylaminoethylamino-17-demethoxy-geldanamycin (17-DMAG)為Hsp90的抑制劑，透過競爭性結合Hsp90蛋白內ATP結合區，抑制Hsp90活性，進而影響Hsp90客戶蛋白的功能。我們實驗室先前發現17-DMAG在乳癌幹細胞內能藉由抑制c-myc來下調 BMI1蛋白的表現，由初步結果發現調控BMI1的機制中也有EZH2的參與，因此本研究目標為探討Hsp90在乳癌幹細胞內如何調控EZH2的表現，以及EZH2或c-myc的轉錄活性是否需要Hsp90參與，以釐清17-DMAG抑制乳癌幹細胞的分子機制。我們的實驗室以前發現，17-DMAG可以透過降低乳癌幹細胞中c-myc與BMI1啟動子的結合來抑制BMI1的表達。我們進一步發現一種組蛋白甲基轉移酶EZH2參與了17-DMAG誘導的BMI1下調。我們首先觀察到加入17-DMAG能夠導致乳癌幹細胞中EZH2的下降。過度表達EZH2能消除17-DMAG對BMI1表達的抑制。通過免疫染色法，我們發現EZH2能與c-myc形成複合物並結合BMI1啟動子，並且此複合體的結合作用受到17-DMAG抑制。因此我們認為Hsp90會在乳癌幹細胞內與EZH2 / c-myc接合促進EZH2/c-myc進入細胞核，透過細胞核蛋白的免疫沉澱，也發現經過17-DMAG的處理後，會抑制EZH2 / c-myc的核轉位。我們的結果顯示Hsp90參與了乳癌幹細胞中EZH2/ c-myc的核轉位，進而影響BMI1的表達。將來我們將繼續研究在乳癌幹細胞中經過17-DMAG的處理後，Elk1或NF- $\kappa$ B會不會下調 EZH2的表現。

### (二) 研究動機與研究問題

研究動機來自於實驗室過去在乳癌幹細胞的研究中發現，Hsp90 抑制劑 17-DMAG 可以抑制 AS-B244 細胞株自我更新的能力(圖一)，我們也發現到在 17-DMAG 的作用下，BMI1、c-myc、Hsp90 的蛋白表現量均能受到抑制且也發現 c-myc 是 Hsp90 的客戶蛋白。之後我們觀察到 17-DMAG 可以抑制 EZH2 蛋白的表現(圖二)，也發現 17-DMAG 可以抑制 EZH2 mRNA 的表現(圖三)，並發現 Hsp90 和 EZH2 之間有交互作用，並且加入 17-DMAG 會降低其交互作用(圖四)。

本研究的目標為:

- (1) 探討過度表現 EZH2 能否使乳癌幹細胞耐受 17-DMAG 的抑制作用
- (2) 了解 c-myc 結合至 BMI1 啟動子 DNA 區是否需要 Hsp90 的參與

- (3) 了解 Hsp90 對於 EZH2 調控 c-myc 表現的影響
- (4) 17-DMAG 造成 EZH2 的下降是否透過抑制 Elk-1 或 NF- $\kappa$ B

### (三) 文獻回顧與探討

癌症幹細胞是具有幹細胞特性的癌細胞，具有自我更新及細胞分化的能力，這些細胞的存在，可能造成腫瘤的復發與轉移[1]，有文獻指出，乳癌幹細胞可造成癌症轉移，對於化療、放射線治療具有抵抗性[2]，因此如果能夠更了解癌幹細胞的特性與形成的途徑和機制，能有效的進行癌症治療[3]。

熱休克蛋白主要的功能是幫助穩定蛋白質的結構，當細胞受到溫度升高，或其他壓力時，熱休克蛋白的表現就會增加，幫助穩定蛋白質的結構，來維持蛋白質的活性[4]，也可以幫助癌細胞適應在壓力的環境下，因此熱休克蛋白通常在癌細胞中都是過度表現的[5]。

EZH2 (Enhancer Of Zeste 2 Polycomb Repressive Complex 2 Subunit)是多梳家族的蛋白之一，是多梳抑制複合體 2 (polycomb repressive complex 2, PRC2)中的催化次單元，PRC2 同時還包含 Suz12、EED 及 YY1[6]。文獻指出過度表現的 EZH2 會發生在多種的惡性腫瘤中，特別是乳癌和前列腺癌[7、8]，增加 EZH2 的表現量會增加乳癌細胞的侵略性而且會提高乳癌細胞增長的速率[8、9]。

Bmi1 (B Lymphoma Mo-MLV Insertion Region 1 Homolog)也是一種多梳基因家族的蛋白，屬於 PRC1，能夠修飾染色質，並在幹細胞的維持和癌症的生長扮演重要的角色[10]，Bmi1 被發現它能去調節癌幹細胞自我更新和生長的能力[11]，因此如果抑制 Bmi1 基因表現，會抑制細胞增生、癌細胞轉移、癌症球體形成，並增加對抗癌藥物的敏感性[12]。

### (四) 實驗方法

#### 細胞培養

由乳癌細胞建立的乳癌幹細胞株(AS-B244)，以 MEM $\alpha$  medium(含 10%胎牛血清、1 $\mu$ M sodium pyruvate、1 $\mu$ M glutamine、5 $\mu$ g/ml insulin、100 $\mu$ g/ml penicillin/streptomycin)培養於 37°C 含 5% CO<sub>2</sub> 之培養箱。

#### 藥劑

1mM 17-DMAG 以 DMSO 稀釋成 20 $\mu$ M、200 $\mu$ M 溶液，保存於-20°C。

#### 懸浮性球體培養

先分別將 5 nM 及 50 nM 之 17-DMAG、DMSO 與球體細胞培養用的生長因子 (1X B27 supplement, 10 ng/ml EGF, 10 ng/ml bFGF, 5  $\mu$ g/ml Insulin, 1  $\mu$ g/ml

Hydrocortisone, 4  $\mu\text{g/ml}$  Heparin) 均勻混合，然後將藥物、生長因子及球體細胞培養基(DMEM/F12 containing 0.5% methylcellulose) 混合均勻，再加入 AS-B244 細胞( $1 \times 10^4/\text{ml}$ ) 混合均勻，接著將混合好的培養液以每孔 2ml 加入超低附著依賴性的 6 孔盤中，進行初代球體培養(Primary Sphere)，期間每三天加入 500 $\mu\text{l}$  培養基(含藥物與生長因子)，並於第八天以倒立式顯微鏡觀察並計數球體數目，第九天收取球體細胞。

而二級球體(Secondary sphere) 培養，則是以 HyQTase 將初代球體分解成單細胞懸浮液後，取  $5 \times 10^3/\text{ml}$  的初代球體細胞種回超低貼附培養盤中，依據初代球體培養方式進行培養。

### **慢病毒感染**

取  $2 \times 10^5/\text{well}$  的 AS-B244 細胞種植至一般細胞培養用 6 孔盤中，待其貼附後，將培養液更換為含有 polybrene (8 $\mu\text{g/ml}$ )，加入適當量的 EZH2 慢病毒液，於 37 $^\circ\text{C}$  培養箱中進行感染，24 小時後將含病毒之培養基移除，更換為正常培養基續培養 24 小時後，加入 puromycin (2 $\mu\text{g/ml}$ ) 進行篩選，將存活之細胞擴增，建立過度表現 EZH2 之 AS-B244 細胞株。

### **免疫沉澱法(Immunoprecipitation)**

取  $5 \times 10^5$  之 AS-B244 細胞種植至超低附著依賴性的 10 cm dish 中，於第 5 天加入 50 nM 17-DMAG 及控制組(0.1% DMSO)，第 7 天收取球體細胞，加入 100 $\mu\text{l}$  細胞裂解液破碎細胞，以得到細胞蛋白液，再定出蛋白的濃度，每種處理做兩管樣品，各取 500 $\mu\text{g}$  蛋白量，一管加抗體進行免疫沉澱，另一管為 beads control，並以 20 $\mu\text{g}$  蛋白量當做 input control，再進行西方墨點法。

### **西方墨點法(Western blot)**

取  $2 \times 10^5/\text{well}$  的 AS-B244 細胞種植至超低附著依賴性的 6 孔盤中，加入 5 nM、50 nM 17-DMAG 及控制組(DMSO)，加入細胞裂解液破碎細胞，得到細胞蛋白液後，以 BCA 當作標準去定出蛋白的濃度，每個樣品取 25 $\mu\text{g}$  蛋白量，進行 SDS-PAGE 電泳分離，並轉漬於 PVDF 膜上，以 5% 脫脂牛奶進行 blocking 1 小時，再以特異性一級抗體於 4 $^\circ\text{C}$  培養過夜，隔日以含過氧化酶之特異性二級抗體於室溫培養 1 小時，經過適當清洗後，加入冷光顯影劑反應，以冷光照相機擷取冷光訊號，再進行分析。

### **染色質免疫沉澱(Chromatin Immunoprecipitation)**

取 $5 \times 10^5$ 之AS-B244細胞種植至超低附著依賴性的10 cm dish中，於第5天加入200 nM 17-DMAG及控制組(0.1%DMSO)，第7天以500 $\mu$ l PBS收取球體細胞。接著以1% 福馬林(formaldehyde)固定住染色質，再將染色質超音波震盪(sonication)變為200~1000 bp的DNA片段，每種樣品各分為免疫沉澱(IP)、beads control、input control，將1 $\mu$ g antibody加入IP group於4 $^{\circ}$ C培養過夜，隔日，IP group、beads control group分別加入10  $\mu$ l protein A beads於4 $^{\circ}$ C反應2小時，再以不同buffer清洗，最後將所有樣品以PCR cleanup kit純化DNA，以SYBR Green方式進行特定DNA片段的即時定量PCR。本研究預計進行染色質沉澱的抗體有: rat anti-Hsp90 $\alpha$  monoclonal antibody (clone 16F1, Enzo Life Sciences, Inc. Farmingdale, NY, USA)、rabbit anti-Suz12 polyclonal antibody (ab12073, Abcam, Cambridge, MA, USA)

### 定量PCR(quantitative PCR)

取 $2 \times 10^5$  cell/well 的 AS-B244 細胞種植至超低附著依賴性的 6 孔盤中，於第五天加入 5 nM、50 nM 之 17-DMAG 處理 AS-B244 細胞及控制組(0.1%DMSO)，第六天收取細胞。以 Quick-RNATM MiniPrep Kit 進行 RNA 純化後，測出 RNA 的濃度，每個樣品取 1  $\mu$ g 與 RNAREvertAid First Strand cDNA Synthesis Kit(Fermentas)進行反轉錄成 cDNA，接著取 10ng/ $\mu$ l 之 cDNA，以 KAPA SYBR FAST qPCR Kit 進行 qPCR。本研究將使用的引子序列如下:

EZH2 :

EZH2-F : 5'-CCCTGACCTCTGTCTTACTTGTGGA-3'

EZH2-R : 5'-ACGTCAGATGGTGCCAGCAATA-3'

hsp90 :

hsp90-F : 5'- ATCACTGGTGAGAGCAAGAAGGC-3'

hsp90-R : 5'- TTAGTCGACCTCCTCCATCTTGCT-3'

MRPL19(internal control) :

MRPL19 -F : 5'- GGGATTTGCATTCAGAGATCAG -3'

MRPL19 -R : 5'- GGAAGGGCATCTCGTAAG -3'

ChIP 使用的引子序列如下:

Bmi1-P-Ebox-F: 5'-ACGGGCCTGACTACACCGACACT-3'

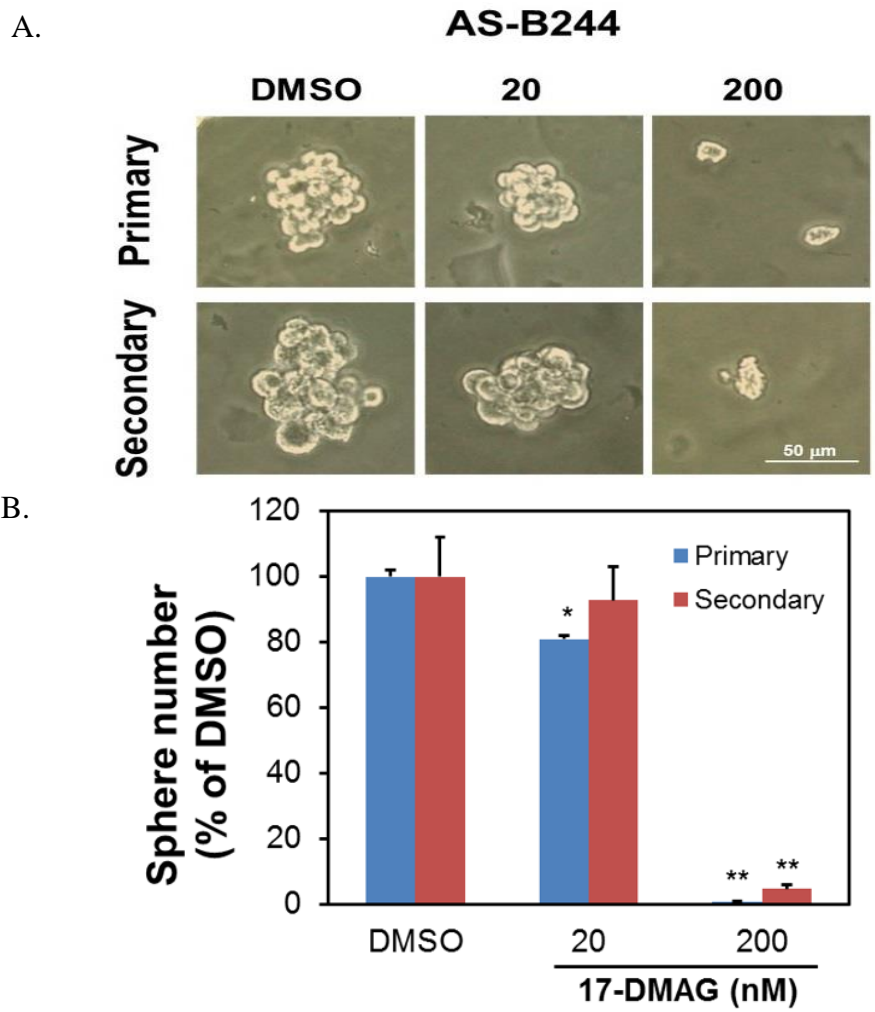
Bmi1-P-Ebox-R: 5'-CTGAAGGCAGAGTGGAAACTGACAC-3'

cMyc-PRC2-F: 5'- TCCTCTCTCGCTAATCTCCGC-3'

cMyc-PRC2-R: 5'- CCCTCCGTTCTTTTCCCG-3'

## (五) 結果與討論

(1)17-DMAG 可抑制乳癌幹細胞的自我更新



圖一、17-DMAG 可抑制 AS-B244 乳癌細胞內癌幹細胞活性

A.將 AS-B244 細胞以 0.1%DMSO 或 20nM、200nM 的 17-DMAG 進行癌症球體培養，七天後以倒立式顯微鏡觀察、拍照及計數。顯示 17-DMAG 具有抑制乳癌幹細胞自我更新的效果。顯示 17-DMAG 具有抑制乳癌幹細胞自我更新的效果。

B.球體數目的量化表，200nM 的 17-DMAG 會抑制 AS-B244 的形成能力。\*， $p < 0.05$ ; \*\*， $p < 0.01$ 。

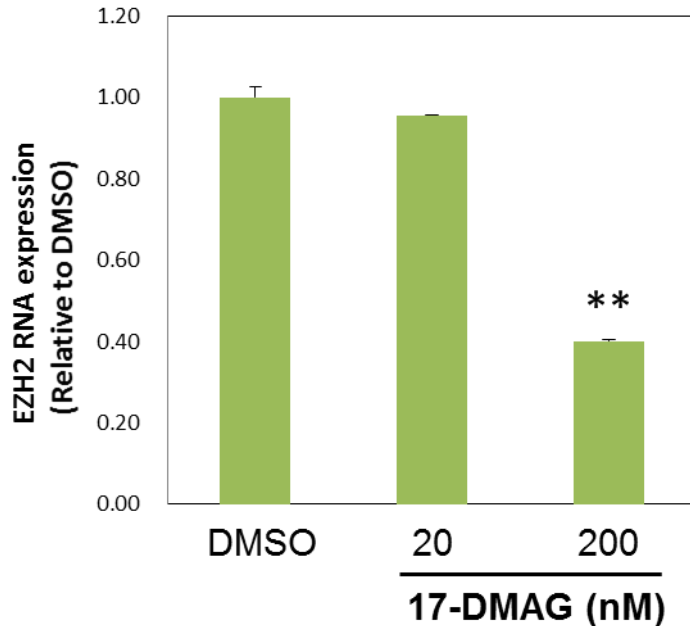
(2) 17-DMAG 能抑制 EZH2 蛋白的表現



圖二、17-DMAG 能抑制 AS-B244 癌症球體細胞內 EZH2 的蛋白表現。將

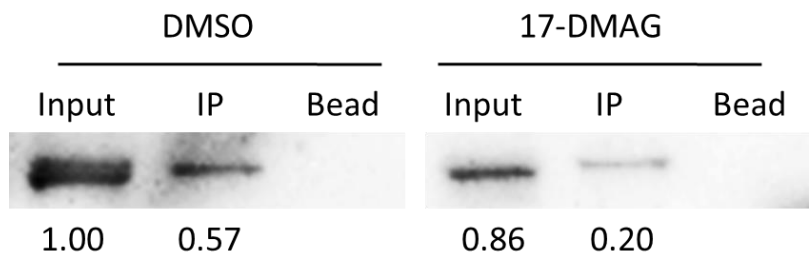
AS-B244 細胞加入 0.1%DMSO 或 17-DMAG (20, 200nM)並培養成癌症球體 5 天後，以西方點墨法分析 EZH2 的蛋白表現。結果發現，17-DMAG 在 200nM 濃度下可以抑制 EZH2 的蛋白表現。

(3) 17-DMAG 能抑制 EZH2 的 mRNA 表現



圖三、17-DMAG 能抑制 AS-B244 癌症球體細胞內 EZH2 的轉錄。將 AS-B244 細胞加入 0.1%DMSO 或 17-DMAG (20, 200nM)並培養成癌症球體 48 小時後，收集細胞總 RNA，以即時定量 PCR 分析細胞內 EZH2 的 mRNA 表現。\*\*,  $p < 0.01$ . 結果發現 17-DMAG 能抑制 EZH2 的轉錄。

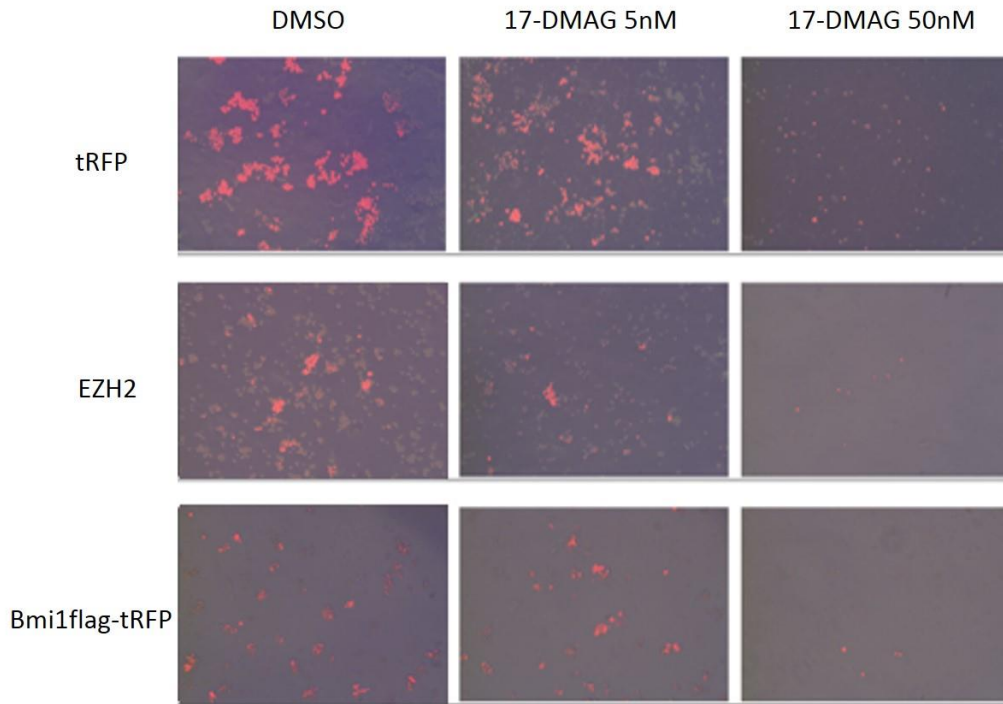
(4) 17-DMAG 可抑制乳癌幹細胞內 Hsp90 與 EZH2 的交互作用



圖四、將 AS-B244 細胞加入 0.1%DMSO 或 17-DMAG (200nM)並培養成癌症球體 5 天後，收集細胞總蛋白，以抗 Hsp90α 抗體進行免疫沉澱，將沉澱下之蛋白以西方點墨法分析 EZH2 的表現，17-DMAG 在 200nM 濃度下能抑制 Hsp90 與 EZH2 的結合。

(5) 探討過度表現 EZH2 能否使乳癌幹細胞耐受 17-DMAG 的抑制作用

我們利用帶有 EZH2 或 BMI1 的慢病毒感染 MDA-MB-231 細胞後，進行癌症球體培養，結果發現，過度表現 EZH2 或 BMI1 並沒有辦法使 17-DMAG 減少對乳癌幹細胞自我更新的抑制作用(圖五)。

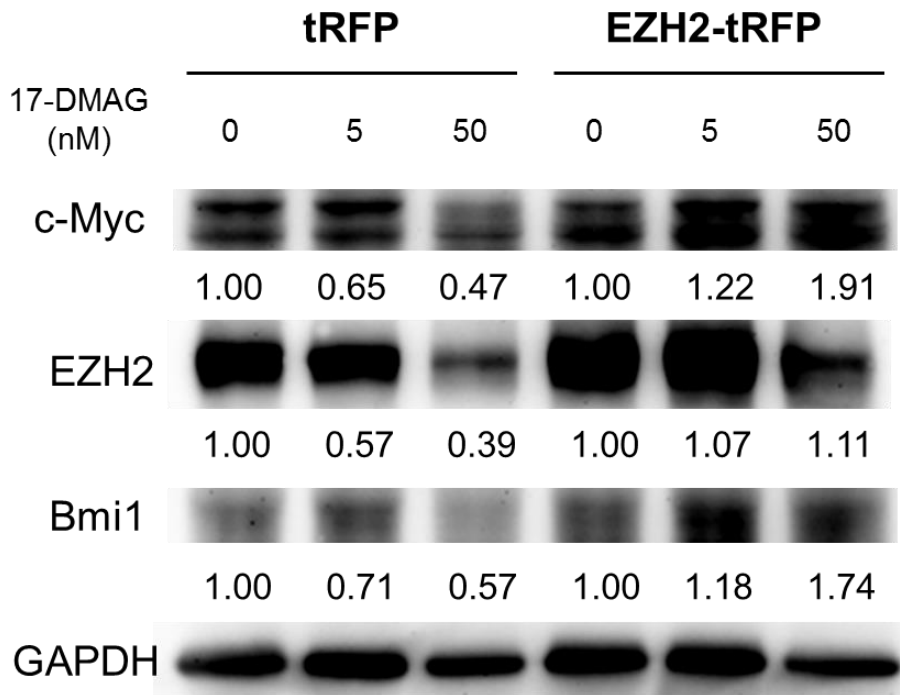


圖五、EZH2 或 BMI1 的過度表現並無法改善乳癌幹細胞對 17-DMAG 的敏感性。將帶有 EZH2 或 BMI1 基因之慢病毒感染 MDA-MB-231 乳癌細胞，加入 0.1%DMSO 或 17-DMAG (5nM、50nM)處理並進行癌症球體培養，七天後以倒立式顯微鏡觀察。

(6) 過度表現 EZH2 使 17-DMAG 對於 BMI1 的抑制效果下降

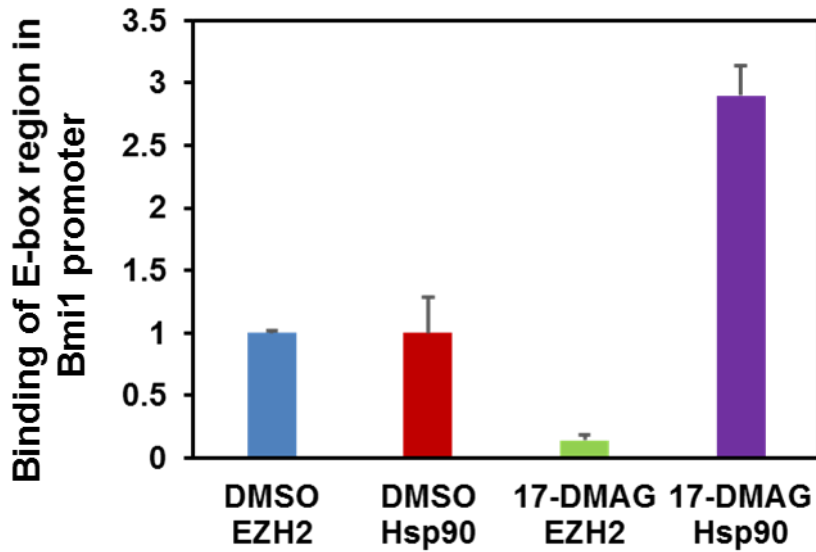
我們利用帶有 EZH2 的慢病毒感染 MDA-MB-231 細胞後，培養成癌症球體，將球體細胞以 17-DMAG 處理 48 小時後，收取細胞蛋白進行西方點墨法分析，結果發現，17-DMAG 對於 BMI1 或 c-myc 的抑制，隨著 EZH2 的過度表現，有減少的現象(圖六)。





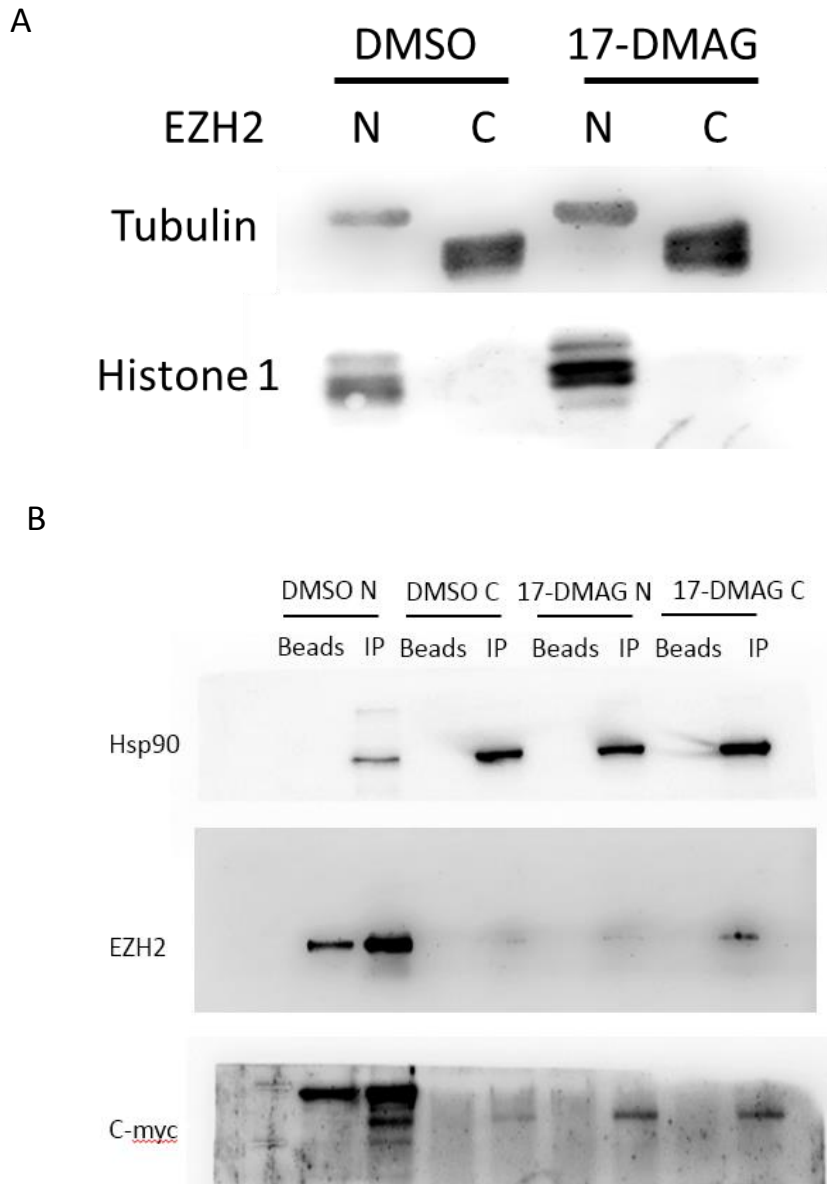
圖六、過度表現 EZH2 使 17-DMAG 對於 BMI1 的抑制效果下降。利用攜帶 EZH2 基因的慢病毒，感染三陰性乳癌細胞株 MDA-MB-231，使細胞過度表現 EZH2，將 MDA-MB-231 細胞培養成癌症球體後，加入 0.1%DMSO 或 17-DMAG (5nM 或 50 nM) 並培養 48 小時後，以西方點墨法分析的 EZH2、HSP90、c-myc、Bmi1 蛋白表現。

(7) 17-DMAG 能抑制 EZH2 結合至 BMI1 啟動子區域內 c-myc 結合位  
 我們接著想了解 c-myc 結合到 BMI1 啟動子區域使否需要 EZH2 協同，以及 Hsp90 是否又對於此結合作用有所影響。利用染色質免疫沉澱法，以抗 EZH2 抗體對 MDA-MB-231 癌症球體之染色質進行免疫沉澱後，以即時定量 PCR 法分析，發現 EZH2 抗體能同時沉澱 BMI1 啟動子的 c-myc 結合區域 DNA，顯示 EZH2 可能與 c-myc 形成複合體並調控 BMI1 的表達(圖七，藍色柱狀)。而使用 Hsp90 抗體也同時能沉澱 BMI1 啟動子的 c-myc 結合區域 DNA，顯示 Hsp90 也可能存在在此 EZH2/c-myc 複合體中(圖七，紅色柱狀)。當癌症球體以 17-DMAG 處理後，EZH2 結合至 BMI1 啟動子的 c-myc 結合區域的情況明顯受到抑制(圖七，綠色柱狀)；但 Hsp90 結合至 BMI1 啟動子的 c-myc 結合區域的情況則有增加(圖七，紫色柱狀)



圖七、17-DMAG 能抑制 EZH2 結合至 BMI1 啟動子區域內 c-myc 結合位。將 MDA-MB-231 癌症球體細胞加入 0.1% DMSO 或 17-DMAG (50n M) 並培養 48 小時後，以福馬林固定並收集細胞染色質裂解液，接著利用染色質免疫沉澱法以抗 Hsp90 $\alpha$  或抗 EZH2 抗體進行免疫沉澱，將沉澱下 DNA 純化後，以 Bmi1 啟動子片段內 E-box 區域 (c-Myc 結合之 DNA 區域) 特異性引子進行即時定量 PCR 分析。

(8) 17-DMAG 能抑制 EZH2 或 c-myc 進入乳癌幹細胞的細胞核內  
 為了瞭解 Hsp90 對於 EZH2 或 c-myc 調控 BMI1 表現的影響，以及進一步證實 Hsp90 能在乳癌幹細胞的細胞核內與 EZH2/c-myc 形成複合體，我們分離經 17-DMAG 處理後的乳癌幹細胞之細胞質與細胞核蛋白，由圖八(A)可以證明細胞質或細胞核蛋白分離效果良好(tubulin 蛋白只在細胞質樣品被偵測到，而 Histone 蛋白只在細胞核樣品被偵測到)。接著我們利用抗 Hsp90 抗體對細胞質或細胞核蛋白進行免疫沉澱，透過西方點墨法分析發現，抗 Hsp90 抗體能同時從細胞核蛋白中沉澱下 EZH2 及 c-myc，顯示與 EZH2 與 c-myc 在細胞核內形成複合體；而 17-DMAG 能明顯抑制 EZH2 或 c-myc 與 Hsp90 的在細胞核蛋白中的共免疫沉澱，但在細胞質蛋白中則仍可見到 EZH2/c-myc/Hsp90 的複合體(圖八 B)。因此我們推測，Hsp90 在乳癌幹細胞內能協助 EZH2/c-myc 的核轉位，並此核轉位協助作用是需要 Hsp90 上 ATP 的結合。



圖八、17-DMAG 能抑制 EZH2 或 c-myc 進入乳癌幹細胞的細胞核內。將 MDA-MB-231 癌症球體細胞加入 0.1%DMSO 或 17-DMAG (50nM) 並培養 48 小時後，收集細胞並且作細胞質或細胞核蛋白質的分離。(A) 以抗 tubulin 或抗 histone1 抗體驗證細胞質或細胞核蛋白質的分離效率。(B) 以抗 Hsp90 $\alpha$  抗體進行免疫沉澱，將沉澱下之蛋白以西方點墨法分析 EZH2 或 c-myc 蛋白的免疫共沉澱情況。

由我們的結果發現，17-DMAG 能夠導致乳癌幹細胞中 BMI1、c-myc 及 EZH2 的下降，但過度表達 EZH2 能消除 17-DMAG 對 BMI1 表達的抑制。通過染色質免疫沉澱法，我們發現 Hsp90 能與 EZH2 及 c-myc 形成複合物結到 BMI1 啟動子，而此結合能力會被 17-DMAG 抑制。此外，17-DMAG 會抑制乳癌幹細胞

內 EZH2 / c-myc 的核轉位，顯示 Hsp90 會調控 EZH2 及 c-myc 在乳癌幹細胞的核轉位，進而影響 BMI1 的表達。

#### (六) 參考文獻

1. Pardal R, Clarke MF, Morrison SJ. Applying the principles of stem-cell biology to cancer. *Nat Rev Cancer* 2003. 3(12):895-902.
2. Phillips TM, McBride WH, Pajonk F. The response of CD24(-/low)/CD44+ breast cancer-initiating cells to radiation. *J Natl Cancer Inst* 2006; 98:1777-1785.
3. Paranjape AN, Balaji SA, Mandal T, Krushik EV, Nagaraj P, Mukherjee G, Rangarajan A. Bmi1 regulates self-renewal and epithelial to mesenchymal transition in breast cancer cells through Nanog. *BMC Cancer*. 2014.14:785.
4. Rosic NN, Pernice M, Rodriguez-Lanetty M, Hoegh-Guldberg O. Validation of housekeeping genes for gene expression studies in *Symbiodinium* exposed to thermal and light stress. *Mar Biotechnol (NY)*. 2011. 13(3):355-65.
5. Wang C, Zhang Y, Guo K, Wang N, Jin H, Liu Y, Qin W. Heat shock proteins in hepatocellular carcinoma: Molecular mechanism and therapeutic potential. *Int J Cancer*. 2016. 138(8):1824-34.
6. Schuettengruber B, Chourrout D, Vervoort M, Leblanc B, Cavalli G. Genome regulation by polycomb and trithorax proteins. *Cell*. 2007. 128: 735–745
7. Varambally S, Dhanasekaran SM, Zhou M, Barrette TR, Kumar-Sinha C, Sanda MG et al. The polycomb group protein EZH2 is involved in progression of prostate cancer. *Nature*. 2002. 419: 624–629.
8. Kleer CG, Cao Q, Varambally S, Shen R, Ota I, Tomlins SA et al. EZH2 is a marker of aggressive breast cancer and promotes neoplastic transformation of breast epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2003. 100: 11606–11611.
9. Bachmann IM, Halvorsen OJ, Collett K, Stefansson IM, Straume O, Haukaas SA et al. EZH2 expression is associated with high proliferation rate and aggressive tumor subgroups in cutaneous melanoma and cancers of the endometrium, prostate, and breast. *J Clin Oncol*. 2006. 24: 268–273
10. Valk-Lingbeek ME, Bruggeman SW, van Lohuizen M: Stem cells and cancer; the polycomb connection. *Cell* 2004. 118:409–418
11. Chiba T, Miyagi S, Saraya A, Aoki R, Seki A, Morita Y, Yonemitsu Y, Yokosuka O, Taniguchi H, Nakauchi H, Iwama A: The polycomb gene product BMI1 contributes to the maintenance of tumor-initiating side population cells in hepatocellular carcinoma. *Cancer Res*. 2008. 68:7742–7749.
12. Dingjun Zhu, Xuesi Wan, Hai Huang, Xu Chen, Wu Liang, Fengjin Zhao, Tianxin

Lin, Jinli Han, Wenlian Xie. Knockdown of Bmi1 inhibits the stemness properties and tumorigenicity of human bladder cancer stem cell-like side population cells. *Oncol Rep.* 2014. 31(2):727-36.

13. Lee CH, Yu CC, Wang BY, Chang WW. Tumorsphere as an effective in vitro platform for screening anti-cancer stem cell drugs. *Oncotarget.* 2015. doi: 10.18632/oncotarget.6261.

14. Fiskus W, Buckley K, Rao R, Mandawat A, Yang Y, Joshi R, Wang Y, Balusu R, Chen J, Koul S, Joshi A, Upadhyay S, Atadja P, Bhalla KN. Panobinostat treatment depletes EZH2 and DNMT1 levels and enhances decitabine mediated de-repression of JunB and loss of survival of human acute leukemia cells. *Cancer Biol Ther.* 2009. 8(10):939-50.

15. Suvà ML, Riggi N, Janiszewska M, Radovanovic I, Provero P, Stehle JC, Baumer K, Le Bitoux MA, Marino D, Cironi L, Marquez VE, Clément V, Stamenkovic I. EZH2 is essential for glioblastoma cancer stem cell maintenance. *Cancer Res.* 2009. 69(24):9211-8.

16. Padmini E, Usha Rani M. Heat-shock protein 90 alpha (HSP90 $\alpha$ ) modulates signaling pathways towards tolerance of oxidative stress and enhanced survival of hepatocytes of *Mugil cephalus*. *Cell Stress Chaperones.* 2011. 16(4):411-25.

17. Fujii S, Tokita K, Wada N, Ito K, Yamauchi C, Ito Y, Ochiai A. MEK-ERK pathway regulates EZH2 overexpression in association with aggressive breast cancer subtypes. *Oncogene.* 2011. 30(39):4118-28.

18. De Donatis GM, Pape EL, Pierron A, Cheli Y, Hofman V, Hofman P, Allegra M, Zahaf K, Bahadoran P, Rocchi S, Bertolotto C, Ballotti R, Passeron T. NF- $\kappa$ B2 induces senescence bypass in melanoma via a direct transcriptional activation of EZH2. *Oncogene.* 2015. doi: 10.1038/onc.2015.331.