

科技部補助
大專學生研究計畫研究成果報告

計 畫 名 稱	： 建立斑馬魚的毛細胞與支持細胞的細胞模式探討感音性聽力損失的分子機制
------------	-------------------------------------

執行計畫學生：黃鈺涵

學生計畫編號：MOST 107-2813-C-040-041-B

研究期間：107年07月01日至108年02月28日止，計8個月

指導教授：楊建洲

處理方式：本計畫涉及專利或其他智慧財產權，2年後可公開查詢

執行單位：中山醫學大學生物醫學科學學系（所）

中華民國 108年03月13日

前言

近幾年斑馬魚(zebrafish, *Danio rerio*)是相當熱門的模式生物之一，其飼養方法簡便、生長週短等等因素經常被應用於各大研究，魚類的側線毛細胞為一種機械性接受器，負責感覺外在水體的流動。而哺乳動物內耳與魚類側線的毛細胞，兩者不論是構造形態或是功能特性都有相似點，在近幾年，利用斑馬魚進行初代培養(primary culture)的人越來越多，因此本研究計畫主要目的是希望建立斑馬魚的毛細胞與支持細胞的細胞模式，來釐清感音性聽力損失的分子機制、探討ROS的路徑分析(LKB1/AMPK/mTOR訊息路徑)和細胞凋亡分析(TUNEL, caspase-9 and caspase-3)。在研究的過程中，先利用顯微注射將質體打入受精卵中，建立內耳聽斑毛細胞和側線毛細胞被標定綠色螢光的斑馬魚品系 Tg(pvalb3b:TagGFP)和內耳支持細胞帶有紅螢光之斑馬魚轉殖基因 Tg(agr2:TagRFP)品系。接著利用上述兩種品系的螢光魚進行研究，我們在本次研究中嘗試了許多方法，從小魚一出生就小心的照護，盡量保持生活環境是乾淨無菌的，避免小魚帶有細菌、真菌會妨礙細胞的培養。同時也嘗試用成魚來做實驗，過程也進行了很多次步驟的修改，儘管最後結果不是很理想，但是這些的改變讓我們對斑馬魚聽斑毛細胞或支持細胞在初代培養的技術上還有些許的進展，期待未來我們能夠完成使命，以利於後續的實驗進行。

研究動機

先前實驗室已得知斑馬魚 CX30.3 基因與人類 CX26 基因有高度同源性 [1]，因此斑馬魚可能可當作一種模式，來研究人類 CX26 突變所導致聽覺障礙。先前實驗室都是利用 HeLa 細胞進行細胞模式的研究，因為 HeLa 細胞缺乏內源性的連結蛋白，所以可以進行相關的研究，在國內外有很多皆是利用此模式來探討聽障基因的突變分子機轉。但此模式仍然與人類耳蝸內毛細胞和支持細胞的特性有所不同，因此本計畫希望利用實驗室建立的內耳支持細胞帶有紅螢光蛋白的斑馬魚品系 Tg(agr2:TagRFP)、內耳聽斑毛細胞和側線毛細胞帶有綠色螢光的斑馬魚品系 Tg(pvalb3b:TagGFP)，將兩種魚分離出來的支持細胞和毛細胞的進行培養，建立斑

馬魚的毛細胞及支持細胞等細胞模式來探討聽障基因相關問題，將能進一步的釐清感音性聽障分子機制。有其他研究指出氧化壓力 reactive oxygen species(ROS)的產生，會參與聽覺組織的細胞凋亡和細胞壞死的路徑，也是引起神經性(感音性)聽障的主因，包含與老化有關的聽力喪失、遺傳性聽力受損、耳毒性藥物誘導的聽力損失和噪音引起的聽力受損，線粒體氧化磷酸化功能異常和 ROS 相關酶的增加或減少會導致 ROS 的產生，造成細胞壞死或凋亡，最終聽覺受損。且 ROS 現在被確定為胺基糖苷類(aminoglycoside)藥物誘導的聽力受損的主要起因[2、3]。因此希望利用斑馬魚支持細胞與毛細胞的細胞模式來進行 ROS 的路徑分析(LKB1/AMPK/mTOR 訊息路徑)和細胞凋亡分析(TUNEL, caspase-9 and caspase-3)來釐清其分子機轉。

研究問題

1. 將斑馬魚帶有螢光的毛細胞和支持細胞分離出來培養，建立斑馬魚毛細胞和支持細胞的細胞模式。
2. 利用此細胞模式來進行 ROS 的路徑分析(LKB1/AMPK/mTOR 訊息路徑)和細胞凋亡分析(TUNEL, caspase-9 and caspase-3)來釐清其分子機轉，未來還可以繼續用此細胞模式探討聽障的相關問題。

文獻回顧與探討

初代培養在人類和老鼠這方面技術已成熟，近幾年也開始應用在斑馬魚上，像是斑馬魚的神經、心肌細胞和尾部造血胚胎基質組織細胞(caudal hematopoietic embryonicstromal tissue cells)等[4-6]，我們希望利用初代培養的方式建立毛細胞與支持細胞的細胞模式，但文獻中有提到耳蝸的毛細胞不能增生，所以耳毒性藥物誘導的聽力受損是不可逆的[2]，因此推測毛細胞增生能力可能有限，視情況必須嘗試改成，運用支持細胞誘導分化成毛細胞[7、8]。

有其他研究指出氧化壓力 reactive oxygen species(ROS)的產生，會參與聽覺

組織的細胞凋亡和細胞壞死的路徑，也是引起神經性聽力損失的主因，線粒體氧化磷酸化電子傳遞鏈的活性降低導致 ROS 增加，這誘導線粒體內膜非專一性高傳導性、通透性轉換孔的開放，線粒體膜電位降低，進而造成細胞凋亡、壞死，導致聽力方面受損。在耳毒性藥物誘導的聽力受損方面，胺基糖苷類(aminoglycoside) 抗生素和鉑類(platinum-based)抗癌藥物是在臨床上廣為人知的兩種類型的耳毒性藥物，且主要通過ROS 的產生和凋亡途徑來損傷柯蒂氏器中的毛細胞，胺基糖苷類傾向累積在毛細胞的線粒體中，且 ROS 現在被確定為胺基糖苷類藥物誘導的聽力受損的主要起因[2]。ROS 是由於胺基糖苷對鐵的親和力所產生的，藥物與鐵結合，所得到的鐵 - 胺基糖苷複合物能夠促進自由基的形成，並接續造成粒線體細胞膜通透性的改變而釋放出 ROS，最終活化細胞凋化路徑(apoptotic cell death pathway)而造成毛細胞的凋亡[9]。

文獻認為鈣離子的平衡對於毛細胞的存亡也扮演重要的角色，而胺基糖苷類抗生素已被證明與鈣網伴護蛋白(calreticulin)相互作用，calreticulin是主要在內質網的鈣離子結合蛋白和鈣離子結合區域。推測這種相互作用會干擾鈣離子結合，導致鈣離子開始流失，內質網或粒線體的鈣離子恆定被破壞，而誘發細胞內產生大量的ROS 且使毛細胞趨向凋亡[10]。

目前已知內耳離子的恆定性對於毛細胞的存活以及功能皆扮演重要的角色，文獻發現merovingian突變的斑馬魚，因為缺乏H⁺-ATPase-rich ionocytes而失去調節H⁺離子平衡的功能，會造成內耳以及側線毛細胞外的環境呈現酸化，同時發現突變的斑馬魚可減少neomycin或cisplatin進入毛細胞的數量而降低對毛細胞的傷害，突變斑馬魚之側線毛細胞對於耳毒性藥物具有抗性，因此作者推測毛細胞內外的pH 平衡與MET channels的通透性有高度相關性，會影響毛細胞對耳毒性藥物的感受性

[11]。目前文獻大多認為減少毛細胞對於耳毒性藥物的感受性，以及後續的訊息傳遞以抑制ROS產生皆能有效避免耳毒性藥物對毛細胞的破壞。caspase()的功能是調節細胞凋亡，在胺基酸苷醣類藥物、順鉑(cisplatin)和噪音作用下，caspase-9和caspase-3會被活化，是造成毛細胞死亡重要的調節者，此外Bcl-2家族也扮演角色，促細胞凋亡和

抗細胞凋亡的Bcl-2家族會互相抗衡來調節細胞的存活[12]。綜合上述資料，我們希望運用初代培養的方式，建立斑馬魚的細胞模式，來觀察ROS對毛細胞的影響，並去分析ROS和細胞凋亡的路徑，未來還能利用此模式進行快速的篩選耳毒性藥物和保護型藥物，也可以進行更多路徑的探討。

研究方法及步驟

1. 斑馬魚(*Danio rerio*)飼養

本實驗使用內耳支持細胞帶有紅螢光蛋白的斑馬魚品系Tg(agr2:TagRFP)、內耳聽斑毛細胞和側線毛細胞帶有綠色螢光的斑馬魚品系Tg(pvalb3b:TagGFP)，兩種品系的斑馬魚皆飼養於28°C培養箱中，日夜週期為光週期14小時與暗週期10小時，並以適量人工飼料與豐年蝦餵食。

2. 初代培養(Primary culture)

先用稀釋1000倍漂白水洗5天大的毛細胞螢光魚或支持細胞螢光魚。在無菌操作台用5c.c.的針筒將魚搗碎，接著在Eppendorf中加入1mg/ml collagenase，放入37°C培養箱，作用45-60分鐘，且5-10分鐘搖晃一次。作用完成後，加入等體積的DMEM(含10%FBS)，中和collagenase。離心3分鐘後，即可進行培養，並加2.5ug/ml Amphotericin B solution和50ug/ml的Ampicillin，最後用倒立螢光顯微鏡進行觀察。

3. 細胞培養(cell culture)

本實驗主要以Flask 25T作為培養毛細胞和支持細胞的容器，細胞所使用的細胞培養液為Leibovitz's L-15 Medium加上15%的胎牛血清Fetal Bovine Serum (FBS) 2%的Pencillin/Steptomycin (PS)放至於37°C/5% CO₂培養箱培養。

4. 細胞藥物處理

為了瞭解胺基酸甘醣類抗生素(如：新黴素和慶大黴素)或順鉑(cisplatin)對斑馬魚聽覺感受毛細胞或支持細胞的傷害，將分別以不同濃度(0, 50, 100, 150, 200 M)的抗生素進行藥物處理1小時，或以同一濃度的抗生素分別處理不同的時間點，

而藥物處理後皆以倒立式螢光顯微鏡觀察毛細胞或支持細胞螢光表現的變化並統計細胞存活率。

5. 細胞ROS之測量

將毛細胞或支持細胞依照我們所建立的藥物處理模式作用後，待藥物移除後將細胞以20 g/ml的DCF-DA溶液於28°C避光反應30分鐘，最後利用SpectraMax M5 microplate reader (Molecular Devices)以激發波長485 nm/放射波長530 nm進行細胞內ROS量的偵測。為了去除轉殖基因魚本身的綠色螢光訊號，實驗組的螢光強度將以控制組(未經DMSO或新黴素處理)的螢光強度進行標準化(normalization)以表示之。

6. 細胞凋亡試驗 (TUNEL Analysis)

將毛細胞或支持細胞依照我們所建立的藥物處理模式進行藥物作用後，依序將細胞進行固定(fixation)、脫色(decolorized)和打洞(permeabilization)步驟，隨後將細胞以50 l TUNEL反應溶液(包含TdT和TMR-labeled dUTP)於4°C反應1小時，再置於37°C反應1小時，利用倒立式螢光顯微鏡下以595 nm激發波長觀察TUNEL訊號。

7. Total RNA extraction

收集細胞抽取Total RNA。首先收集細胞均質化，加0.2ml chloroform 到有1ml均質液的tube裡，vortex約15秒，放置在室溫約1~3分鐘。放入4°C低溫離心機12000rpm 離心15分鐘，離完之後吸取上清液到新的tube，大約能吸300~500 l。加入相同體積的isopropyl alcohol，輕輕搖晃混合均勻，室溫靜置10分鐘。再以4°C低溫離心機12000rpm 離心10分鐘，離心完後可以看到tube底端有pellet附著，將液體倒掉，加入75% ethanol (DEPC d2H2O) wash，再以4°C低溫離心機12000rpm離心5分鐘，離心完後小心吸取上清液，避免殘留管壁，接著air dry到全乾，加入25~50ul RNase free water，在55~60°C 10~15分鐘回溶，回溶後馬上插在冰裡，直接測濃度或放入-80°C冰箱保存。

8. 即時定量聚合酶連鎖反應 (Real-time PCR)

分析將 2 μ g 之RNA 反轉錄為互補去氧核糖核酸 (cDNA)，然後於PRISM ABI 7700 Sequence Detecting System (美國Applied Biosystems 公司)進行定量即時聚合酶連鎖反應 (quantitative real-time transcriptional PCR) 實驗。

9. 西方墨點法(Western blotting)

利用western blotting 的方法測定細胞凋亡的蛋白量及與其相關的訊息傳遞蛋白如：MAPK pathway及細胞凋亡相關的蛋白與細胞週期相關的蛋白的表現量Sodium dodecylsulfate-polyacrylamide gelelectrophoresis 依蛋白質分子量，製作不同濃度的下膠 (Separating gel) 與4 %上膠 (Stacking gel)。將做好的板膠固定到電泳裝置上，並將電泳緩衝液 (0.025 M Tris-base、0.192 M Glycine和SDS)注滿內外電泳槽，取蛋白質樣品注入電泳膠片凹槽中。先以電壓80伏特進行電泳，直到蛋白質樣品超過separating gel和stacking gel介面後，將電壓調至120伏特以加速分離蛋白質。轉漬 (Transfer) 待電泳完成之後，進行轉漬的工作。將PVDF膜先置入甲醇中使其活化，依電極由負往正極方向，依序將海綿、3M濾紙、separating gel、PVDF膜、3 M濾紙、海綿放於轉漬夾板中，其中gel與PVDF的接觸面不能有氣泡存在，接著將轉漬夾整組放入含有transfer buffer (0.025 M Tris-base、0.192 M Glycine和20 % methanol)的轉漬槽中，以電壓100伏特轉漬30分鐘至2小時不等。轉漬完成後，在室溫下，將PVDF膜以5%脫脂牛奶進行blocking 1小時。之後PVDF膜用1 \times TBST清洗3次，每次10分鐘，加入一級抗體在4 $^{\circ}$ C下反應至隔天，每次10分鐘後，加入二級抗體在室溫下作用1小時，作用完後以1 \times TBST清洗3次，每次10分鐘，最後利用ECL試劑組，使二級抗體上結合之HRP反應，以冷光儀呈色。

結果與討論

我們取在受精後分化1-2個細胞的受精卵，利用顯微注射的方式將10ng/μl的Tol2表現質體【圖 1】注射2-3nl到細胞的部位。已經獲得一個內耳聽斑毛細胞和側線毛細胞被標定綠色螢光的斑馬魚品系 Tg(pvalb3b:TagGFP)，我們運用紅色螢光染劑 FM4-64 來確認螢光標定的位子是否正確【圖 2】。感謝中央研究院黃聲蘋教授提供實驗室含 agr2 啟動子 (promoter) 的質體，分別 Tol2-exo200-Agr2-96ecto-EGFP、Tol2-exo200-Agr2-177ecto-EGFP 以及 Tol2-3416-Agr2-EGFP。其中，3416 代表著 agr2 基因啟動子之全長，起始於基因-3416 處的位置；exo200 代表 agr2 基因前啟動子之功能部分；96ecto 與 177ecto 則代表 otic vesicle specific element DNA，使基因能夠更專一地表現在耳囊組織，因此成功地建立一個內耳支持細胞帶有紅螢光蛋白之斑馬魚轉殖基因 Tg(agr2:TagRFP)品系。

本實驗利用上述兩種螢光魚品系，進行初代培養。

◇ 成魚:

用小魚做發現細胞有貼盤的情況，但都沒有亮螢光並不是毛細胞或支持細胞，這可能是因為有太多其他部位的細胞，成魚可較精準的取側線毛細胞的位置，因此想試試看用成魚來做實驗。一開始是取整個背部組織(包含骨頭)和頭部軟組織【圖 3】，但有骨頭膠原蛋白酶比較無法作用完全，所以改成只取背部魚肉和頭部軟組織【圖 4】，可是又因為有汙染的問題，最後變成只取背部魚肉和避開鰓的位置取頭部軟組織【圖 5】。成魚的生長環境是在系統缸，也沒有特別的無菌系統，所以內臟和魚體表面有許多的細菌和真菌，即使小心地避開內臟和鰓的位置，仍會造成嚴重的汙染，因此再次改回運用小魚做實驗。

◇ 小魚:

一開始利用 5 天大的小魚進行實驗，並用均質機將小魚搗碎，由於過程中小魚會卡在機器中導致許多細胞丟失，也可能會使細胞受損，因此改用滅菌過的研磨棒，但小魚會黏在研磨棒上，而且磨碎小魚的效果不佳，最終使用 5ml 的針筒進行抽吸，不僅能在無菌台進行而且效果也很好。

◇ 實驗過程~培養盤:

在實驗的過程中，發現貼盤的細胞數量不多，因此嘗試 coating collagen 來幫助細胞貼盤，但效果不佳，可能是因為使用老鼠尾巴萃取的膠原蛋白，與魚的細胞不合。後續改用 Flask 25T 進行培養，可以降低外在環境所造成的汙染。

◇ 實驗過程~魚的照顧:

在收卵的當下，用稀釋 1000 倍的漂白水做清洗，可去除卵表面的髒汙，降低汙染的機率，培養的時候使用滅菌的蛋水，且在實驗當天先用稀釋 1000 倍的漂白水將小魚做清洗，再進行後續的實驗。

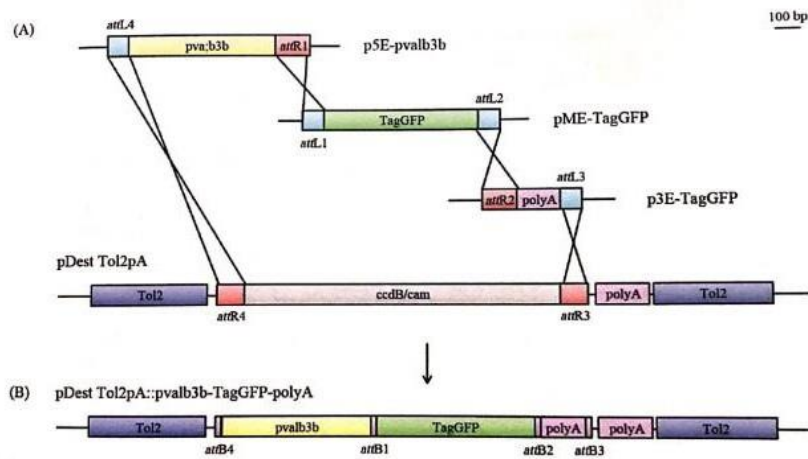
◇ 實驗過程:

1. 將collagenase作用的時間減少，從3個小時改成1個小時，可以避免過多細胞死亡。
2. Collagenase作用容器從3.5公分的dish改成ependorf，5~10分鐘晃一次，可避免組織聚集在一起，增加作用的功效，使其作用面積增加。
3. 1.5 ml ependorf 改成 2ml，改善組織會積在底部的問題。
4. 最後減少用 PBS 潤洗的步驟，改成使用含有10% FBS 的 DMEM 來終止collagenase作用，減少步驟，降低汙染及細胞流失的風險。
5. 最後抗生素的部分將 2% PS改成 2% PSA。多加 50ug/ml的 Ampicillin。再加 2.5ug/ml的兩性黴素(Amphotericin B solution)，可以抗真菌，避免酵母菌的增生。

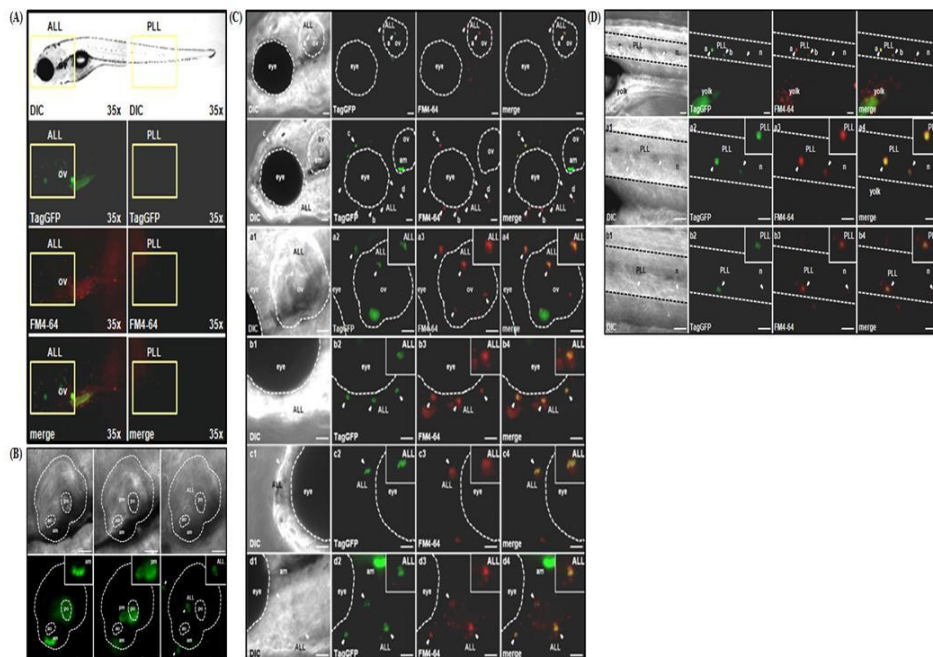
◇ 討論:

初代培養的過程中，遇到很多的問題，最嚴重的問題就是細胞汙染的問題，將在水中生活的魚，變成無菌的細胞株，有很多困難需要克服。從一開始剛出生的魚卵就小心的照顧，在換水的過程中，因為無法在無菌台操作，所以在換水的過程中以酒精燈代替，會先以酒精擦拭操作的空間並全程點酒精燈，也不會將蓋子全部打開，只會開一個小孔進行操作，蛋水也會先滅菌再使用。成魚的部分因為魚的體積比老鼠的小，在無顯微鏡的操作中，無法精準地避開內臟和鰓的位置，因此汙染的機會大幅上升。而且不只有細菌的汙染，也有真菌汙染的問題，所以在細胞培養的時候多加了兩性黴素(Amphotericin B solution)來改善問題。雖然已經做了很多的更改與嘗試，在細

胞貼盤的部分，細胞的貼盤狀況不佳，導致細胞無法持續培養，其中嘗試了coating 膠原蛋白，也可能是在碾碎魚體時造成細胞受損，因此也改變了碾碎魚體的方式，但實驗的結果仍不如預期。最終實驗結果並不成功，細胞無法持續的培養，貼盤的細胞不是支持細胞或是毛細胞，也有污染的問題，可能是coating的物質需要換一個，也須要注意更多的細節。



【圖 1】Tg(pvalb3b:TagGFP)轉殖基因魚所使用之質體。(A)將四個載體，p5E-pvalb3b、pME-TagGFP、p3E-polyA 和 pDest Tol2pA，以可預測的方式排列。(B)顯示出重組的結果。Tol2 的質體，可用於顯微注射和產生轉殖魚的品系。

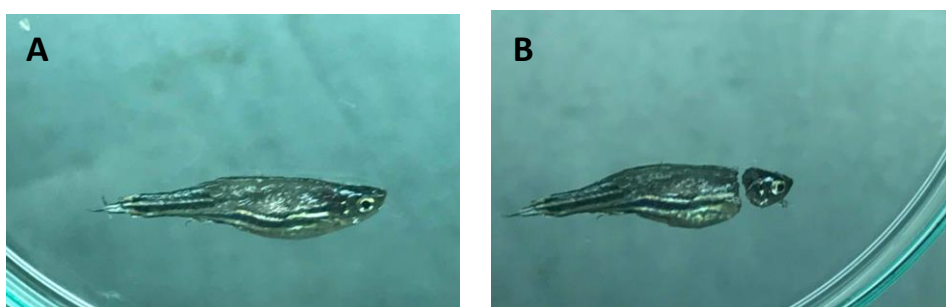


【圖2】Tg(pvalb3b:TagGFP)轉殖基因魚的螢光表現型態。(A)於受精後5天的胚胎，TagGFP綠色螢光蛋白專一性表現於斑馬魚的內耳(ov)及側線系統(ALL和PLL)。(B)自腹面觀察受精後4天的胚胎內耳(白色虛線)，發現TagGFP綠色螢光蛋白會分別表現於相鄰兩耳石(otolith)的前聽斑(am)和後聽斑(pm)，以及前側線的毛細胞。隨後於受精後5天的胚胎，以紅色螢光染劑FM4-64藉由具有功能性的機械傳導通道(mechanotransduction channel)進行前側線(C)及後側線(D)系統的毛細胞標定，可發現TagGFP綠色螢光蛋白確實會表現於側線系統的毛細胞(白色箭頭所示)。ov: otic vesicle、ao: anterior otolith、po: posterior otolith、am: anterior macula、pm: posterior macula、ALL: anterior lateral line、PLL: posterior lateral line。

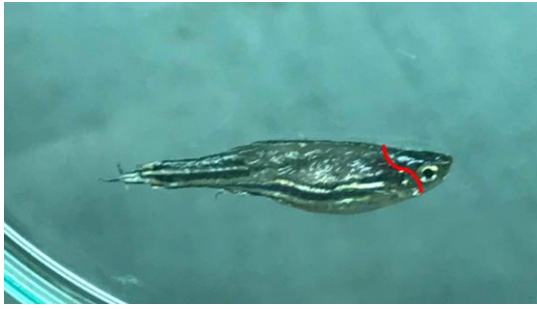


【圖3】Tg(agr2:TagRFP/pvalb3b:TagGFP)品系的成魚進行初代培養。

利用滅過菌的器材取整個背部組織且包含骨頭，但這個方式背部組織取的不完全，因此會再進行更改。

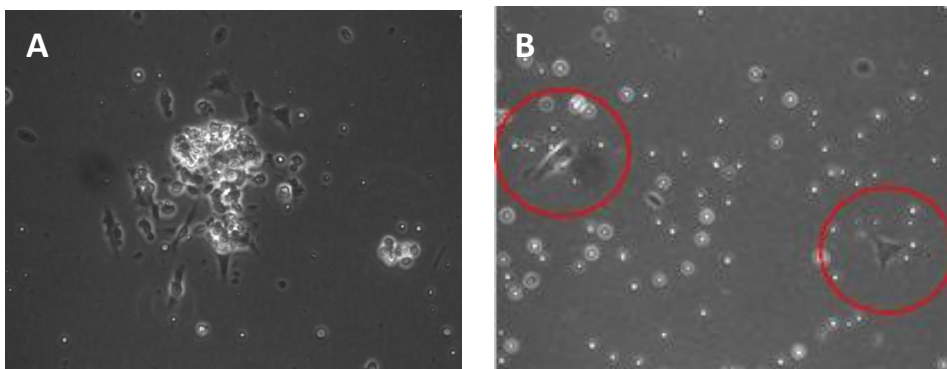


【圖4】Tg(agr2:TagRFP/pvalb3b:TagGFP)品系的成魚進行初代培養。(A)更改了取成魚組織的方式，只取魚肉的部分，沒有骨頭膠原蛋白酶會比較好作用。(B)取整個頭部的軟組織。



【圖 5】 Tg(*agr2:TagRFP* /*pvalb3b:TagGFP*) 品系的成魚進行初代培養。

改變取頭部軟組織的方式，不是將頭部整個切下，而是按照紅色線的位置取下，避開鰓的位置，減少污染源。



【圖 6】 Tg(*pvalb3b:TagGFP*) 基因轉殖魚初代培養。(A)可以看到有很多貼盤的細胞，而且有聚集的現象。(B)紅色圈起來的部分為貼盤的細胞。但細胞皆無螢光，因此不是毛細胞或是支持細胞。

參考文獻

- [1] Chang-Chien J et al. (2014) The connexin 30.3 of zebrafish homologue of human connexin 26 may play similar role in the inner ear. *Hearing Research* 313:55-66
- [2] Kamogashira T et al. (2015) Reactive Oxygen Species, Apoptosis, and Mitochondrial Dysfunction in Hearing Loss. *BioMed Res. International* 617207:1-7
- [3] Yang CH et al. (2015) Age-related hearing impairment and the triad of acquired hearing loss. *Front Cell Neurosci.* 9: (276) 1-12.
- [4] Sander V et al. (2013) Isolation and in vitro culture of primary cardiomyocytes from adult zebrafish hearts. *Nat Protoc.* 8(4):800-809.

- [5] Chen Z et al.(2013) Primary Neuron Culture for Nerve Growth and Axon Guidance Studies in Zebrafish (*Danio rerio*). PLoS One.8(3):e57539.
- [6] Anja Wolf et al.(2017) Zebrafish Caudal Haematopoietic Embryonic Stromal Tissue (CHEST) Cells Support Haematopoiesis. Sci Rep. 7: 44644.
- [7] Atkinson PJ et al.(2015) Sensory hair cell development and regeneration: similarities and differences. Development. 142(9):1561-1571.
- [8] Lush ME et al.(2014) Sensory hair cell regeneration in the zebrafish lateral line. Dev Dyn. 243(10):1187-1202.
- [9] Rizzi MD and Hirose K (2007) Aminoglycoside ototoxicity. Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg. 15(5):352-357
- [10] Esterberg R et al. (2014) ER-mitochondrial calcium flow underlies vulnerability of mechanosensory hair cells to damage. J Neurosci 34(29): 9703-9719
- [11] Stawicki TM et al. (2014) The zebrafish merovingian mutant reveals a role for pH regulation in hair cell toxicity and function. Disease models & mechanisms 7(7): 847-856
- [12] Cheng AG et al. (2005) Mechanisms of hair cell death and protection. Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg. 13(6):343-348.
- [13] Li GH et al.(2015) Ox-Lp(a) transiently induces HUVEC autophagy via an ROS-dependent PAPR-1-LKB1-AMPK-mTOR pathway. Atherosclerosis. 243(1):223-235.
- [14] Youn CK et al.(2017) Peanut sprout extract attenuates cisplatin-induced ototoxicity by induction of the Akt/Nrf2-mediated redox pathway. Int J Pediatr Otorhinolaryngol.92:61-66.
- [15] Nesrine Benkafadar et al.(2017) Reversible p53 inhibition prevents cisplatin ototoxicity without blocking chemotherapeutic efficacy. EMBO Mol Med.9(1):7–26.