

國立交通大學

生化工程研究所

碩士論文

建構 Securin 蛋白質交互作用網絡

Construction of Securin Interaction Network



研究生：楊瑤貞

指導教授：張家靖 教授

中華民國九十八年七月

建構 Securin 蛋白質交互作用網絡

Construction of Securin Interaction Network

研究生：楊瑤貞

Student：Yao-Chen Yang

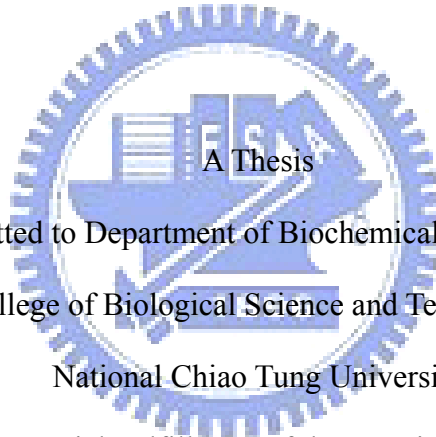
指導教授：張家靖

Advisor：Chia-Ching Chang

國立交通大學

生化工程研究所

碩士論文



Submitted to Department of Biochemical Engineering

College of Biological Science and Technology

National Chiao Tung University

in partial Fulfillment of the Requirements

for the Degree of

Master

in

Biochemical Engineering

July 2009

Hsinchu, Taiwan, Republic of China

中華民國九十八年七月

摘要

Securin 是一個多功能蛋白質，且在許多癌症中有高量的表現，但是對於 securin 如何調控癌症細胞的機制目前尚未完全解開，所以希望能藉由建構與 securin 蛋白質作用的網絡，更進一步的了解 securin 的作用機制。我們使用免疫沉澱(IP)、酵母菌雙雜交系統(yeast two hybrid)及遠西方墨點法(Far Western)等方法篩選出與 securin 結合的蛋白質，經由質譜儀(MALDI-TOF Mass)分析其序列後，確定這些蛋白質為 PCAF、T-box3、Histone H4、KRT1、BCl2A1、Dopamine receptor D4、及 RNA cyclase，藉由這些與 securin 作用的蛋白質，我們可以知道，securin 除了已知功能外，還可能與蛋白質乙醯化的調節、Histone H4、Cytoskeleton 及抗細胞凋亡的 BCl2A1 有關。另外我們使用兩種方式測量蛋白質之間的交互作用：遠西方墨點(Far Western)法及恆溫滴定微卡洛里計(ITC)，實驗中以 p53 與 securin 為代表，分別用兩種方式測得其作用力大小，此測量系統能應用於測量不同環境下蛋白質之間的作用力，以及不同修飾狀態下的蛋白質作用力大小，作為探討蛋白質之間分子作用機制的分析方法。

Global securin interaction network : Functional analysis of securin

Student: Yao-Chen Yang

Advisor: Dr. Chia-Ching Chang

Department of National Chiao Tung University

ABSTRACT

Human securin is a multifunctional protein and highly expressed in many types of tumor cell. The function of securin is regulating separate that control cell division and cell cycle, and DNA repair machinery. However, the molecule mechanism of securin in cell cycle regulation remains unclear. To understand the role of securin in cell cycle, a protein-protein interaction network of securin was constructed try using immunoprecipitation, yeast two hybrid and Far Western methods. We found several proteins may interact with securin such as PCAF, T-box3, Histone H4, KRT1, BC12A1, Dopamine receptor D4 and RNA cyclase. From the results of the experiments, securin may participate in protein acetylation, modification of Histone H4 and apoptosis. Meanwhile we measured the protein-protein interaction by using Far Western and ITC. The two systems offered us a useful tool to analyze protein-protein interaction in different environments and different situations of protein modification.

誌 謝

很開心完成了碩士的學業，在這兩年期間學習到許多實驗的技術及思考的方式，這都要感謝指導教授張家靖老師給予的建議及教導。謝謝甘魯生教授、袁俊傑教授及陳至信博士於百忙之中給與論文上的建議及指正。能夠順利完成論文要特別感謝東華大學何彥鵬老師以及陳佳貞同學在質譜分析上給予的協助。

在兩年之前，對於實驗室的運作算是懵懵懂懂，在兩年間我逐漸清楚做實驗是怎麼回事，也深刻的感覺的做研究的思考必須很靈活、隨時補充新的知識，雖然自己還有很多不足的地方，但是我確信自己的確有所成長，謝謝曾博及鄭博給我很多思考的方式及實驗上的協助，還要特別感謝內心善良的朱大哥，總是用幽默的方式給我很多建議及幫助，銘記在心。謝謝當初教我 securin 的昌祐學長，也謝謝輔宣在 ITC 實驗上給予的協助。謝謝我的實驗室同學及學長們靖淳、芳馨、沈筱薇、子正、辰哥、朱大哥及簡哥，有你們的陪伴讓我覺得兩年過得更快了一點，也祝福大家在未來能更順利，我相信我們都可以的。

實驗之外，我最最感謝的是我的父母不論在經濟上或心靈上總是支持我唸書，家人永遠是我的精神支柱，還要謝謝陪伴我很久的崇豪，從大學畢業以來我一路摸索自己的路，謝謝你總是鼓勵我去嚐試，很慶幸有你。最後要感謝我的好朋友們總是寬容我懶得與人連絡的天性，謝謝闕、依萍、珮琪、晏甄、尼尼、金鈴以及族繁不及備載的朋友，謝謝你們還願意跟我聯絡，在此祝福老師、學長及所有認識的朋友未來都能更順遂。

目錄

摘要	I
Abstract.....	II
誌謝	III
目錄	IV
圖目錄	VII
表目錄	VIII
縮寫表	IX
第一章 緒論	1
1-1 研究動機	1
1-2 系統生物學介紹	1
1-3 Securin 蛋白質介紹	1
1-3.1 Securin 結構	2
1-3.2 Securin 功能	3
1-3.3 細胞週期與癌症	4
1-3.4 securin 的其他功能	5
1-4 A549 及 U937	5
1-4.1 securin 在不同細胞的表現量	6
第二章 實驗策略	7
第三章 實驗原理	8
3-1 蛋白質 securin 製備	8
3-2 Far Western	8
3-3 免疫沉澱 (Immunoprecipitation)	9
3-4 恆溫滴定微卡洛里計 (Isothermo Titration Calorimetry , ITC) ...	10
3-5 二維電泳 (Two-Dimensional Gel Electrophoresis)	11
3-6 Yeast Two Hybrid	11
第四章 實驗材料及方法	13
4-1 Securin 基因鑑定	13

4-2	Securin 蛋白質製備	13
4-3	西方墨點法(Western Blot).....	14
4-4	二維電泳及遠西方墨點法	14
4-5	免疫沉澱	16
4-6	MALDI-TOF Mass	16
第五章	實驗結果	19
5-1	Securin 基因及蛋白質鑑定.....	19
5-2	Far Western & Mass	22
5-3	IP & Mass	26
5-4	酵母菌雙雜交系統(Yeast two hybrid)	32
5-5	ITC	32
5-6	Far Western 確認 p53 及 securin 作用	34
第六章	討論	36
6-1	Securin 可信度及蛋白質純度	36
6-2	文獻搜尋與 Securin 作用的蛋白質	36
6-3	與 Securin 作用蛋白質功能探討	37
6-3.1	P53	38
6-3.2	Ribosomal S10 and HSJ2 (DnaJ).....	38
6-3.3	PTTG-binding factor (PBF).....	39
6-3.4	Cdc28 (CDK2).....	40
6-3.5	Cdc20	41
6-3.6	Ku70/80	42
6-3.7	Phosphatase 2A (PP2A)	43
6-3.8	Separase.....	44
6-3.9	SP1.....	44
6-3.10	MEK1	44
6-4	Far Western 篩選與 Securin 作用蛋白之結果	45
6-5	免疫沉澱篩選與 Securin 作用蛋白之結果	46
6-5.1	Histone H4	46
6-5.2	BCL2A1.....	47
6-5.3	KRT1(CK1)	47

6-5.4	Dopamine receptor D4	48
6-5.5	RNA terminal phosphate cyclase-like 1	49
6-5.6	免疫沉澱結果討論	49
6-6	Securin 作用蛋白質網絡探討	49
6-6.1	細胞分裂	49
6-6.2	細胞凋亡	50
6-6.3	DNA 修復及轉錄活性	50
6-6.4	、其他	51
6-6.5	結論	51
6-7	蛋白質交互作用及作用力的大小	51
6-7.1	模擬細胞內不同胞器的 pH 值及鹽類環境	52
6-7.2	具有後修飾作用蛋白質	52
6-7.3	建構測定蛋白質結合力系統現況	52
6-8	總結	53
第七章	參考文獻	55



圖目錄

圖 1-1、Securin 結構示意圖	3
圖 1-2、Securin 調節 Separase 示意圖	4
圖 3- 1 、Far Western 實驗原理	9
圖 3- 2 、免疫沉澱原理示意圖	10
圖 3- 3 、ITC 結構示意圖	11
圖 3- 4 、Yeast Two Hybrid- CytoTrapsystem	12
圖 5- 1 、pET200-Securin 基因圖譜	19
圖 5- 2 、 securin 轉殖菌株之基因確認	20
圖 5- 3 、 Securin 被 IPTG 大量誘導生產	21
圖 5- 4 、Securin 蛋白質確認	21
圖 5- 5 、Far Western Assay	24
圖 5- 6 、MALDI-TOF Mass 結果	25
圖 5- 7 、免疫沉澱結果	27
圖 5- 8 、免疫沉澱蛋白質經由質譜分析結果 A-1	28
圖 5- 9 、免疫沉澱蛋白質經由質譜分析結果 A-2	29
圖 5- 10 、免疫沉澱蛋白質經由質譜分析結果 B-1	30
圖 5- 11 、免疫沉澱取得蛋白質，經由質譜分析得到的結果 B-2	31
圖 5- 12 、Yeast two hybrid	32
圖 5- 13 、Far Western 證明 p53 與 securin 有交互作用	35
圖 5- 14 、由 Far Western 實驗估計 p53 與 securin 作用常數	35
圖 5- 15 、ITC p53 滴定 securin 圖	33
圖 5- 16 、ITC 之 p53-securin 作用力分析圖	33

圖 6- 1、細胞週期調控因子及 Check Point 示意圖	41
圖 6- 2、APC 對於 Cyclin B 與 Securin 的調控	42
圖 6- 3、APC/Cdc20 與 APC/Cdh1 細胞週期的活性分析圖	42
圖 6- 4、Securin 與 Ku 蛋白作用示意圖	43
圖 6- 5、Nucleosome 形成示意圖	47
圖 6- 6、與 Securin 作用蛋白網絡圖	54

表目錄

表 4- 1、PCR 用量表	13
表 4- 2、PCR 溫度時間定表	13
表 5- 1、Far Western 中與 securin 作用蛋白質之分子量與等電點	23
表 5- 2、免疫沉澱中與 securin 作用蛋白質之分子量與等電點 .	27
表 6- 1、已知與 securin 有作用蛋白質	37

縮寫表

以英文字母排列

APC	Anaphase promoting complex	細胞核分裂後期促進錯合體
BCI2A1	BCI2 related protein A1	BCI 相關蛋白 A1
Cdc14	Cell Division Cycle 14	細胞週期素 14
Cdc28	Cell Division Cycle 28	細胞週期素 28
Cdk1	Cyclin Dependent Kinase 1	細胞週期依賴激酶 1
Cdk2	Cyclin Dependent Kinase 2	細胞週期依賴激酶 2
CHO	Chinese Hamster Ovary	中國倉鼠卵巢細胞
CK1	<u>C</u> ytokeratin 1	細胞骨架蛋白 K1
D box	Destruction Box	降解序列
DTT	<u>D</u> ithiothreitol	2-4 二硫代蘇糖醇
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic Acid	乙二胺四乙酸
IEF	Isoelectro Focusing	等電膠集法
ITC	Isothermal Titration Calorimetry	恆溫滴定熱卡計
MALDI	Matrix-Assisted Laser Desorption Ionoization	基質輔助雷射去吸附離子化
PBF	PTTG Binding Factor	PTTG 結合因子
PBS	Phosphate Buffered Saline	磷酸鹽緩衝液
PCAF	p300/CBP Associated Factor	P300/CBP 相關因子
PCR	Polymerase Chain Reaction	聚合酶連鎖反應
PTTG	Pituitary Tumor Transforming Gene	腦下腺腫瘤轉型基因
PVDF	Polyvinylidene Difluoride	聚偏二氟乙烯樹脂
TBST	Tris Buffered Saline with Tween 20	以 Tris 為基礎含有 Tween20 之緩衝液
TCA	Trichloacetic Acid	三氯醋酸
TOF	Time of Flight	指能測得飛行時間

第一章 緒論

1-1 研究動機

Securin 是一個 oncogene[1-3]，被發現與多種癌症密切相關[4-10]，像是乳癌[6]、直腸癌[11]、肺癌[12]等。在結構上，學者們陸續的發表論文，認為 securin 是一個沒有特定構型的蛋白質。Securin 目前的研究顯示，他主要的角色在調節細胞週期[13-15]及修復 DNA[16]，但是目前對此蛋白質的作用機制尚未有全面性的了解，所以我們希望能將分子系統學的概念加入 securin 的研究中，藉由建立與 securin 蛋白質交互作用的蛋白質網路，使能更全面性的了解 securin 的細胞分子調節機制，以及其與癌症之間的關聯。

1-2 系統生物學介紹：

分子系統生物學是新興的學科，它以不同的角度去探討複雜的生物體內分子作用，傳統的分生生物學研究，都是觀察單一分子的表現量的上升或下降，即判定生理反應走向哪種可能的路徑。然而生物體中分子反應路徑，牽一髮而動全身，僅藉由單一個蛋白質的改變做判斷，是不完整也不夠嚴謹的，系統生物學出現可以讓此問題豁然開朗。分子系統生物學將蛋白質之間的作用系統化，在大量的篩選所有蛋白質之間的交互作用力後[17,18]，分析、建立成網路脈絡，藉由網路圖，我們可以更全面性的了解各個蛋白質的角色。

目前分子系統生物學多是地毯式的篩選不同蛋白質之間的作用。有別於此，我們選擇 securin 作為蛋白質交互作用的網路中心。Securin 蛋白質在腦下垂體腫瘤[19]、乳癌[6]、直腸癌[11]等多種癌症細胞中有大量的表現。相較於傳統的系統分子生物學，選用一個具有標的性的蛋白質做為網路中心，可以更快速的探討這些重要蛋白對生命體的角色，避免耗費大量的時間，當網路建構完成，我們便可以利用不同的交互作用體 (interactome) 的改變，去探討 securin 所影響的所有路徑，進而將這些找到的作用蛋白質點向外擴張，建構成更大的蛋白質交互作用網路。

1-3 Securin 蛋白質介紹：

1997 年 Pei 及 Melmed 等人，發現老鼠的腦下垂體細胞 (pituitary tumor GH4 cells) 中，某個基因大量表現，且將此基因轉殖到裸鼠 NIH3T3 細胞

中，三個禮拜內會誘導細胞轉型(Transform)，形成腫瘤，因此將此基因命名為 Pituitary Tumor Transforming Gene，簡稱 PTTG [19]。

2000年，Chen 等人將人類 PTTG 的同源基因辨識出來，發現人類的 PTTG 是一基因家族^[2]，此家族至少包含了三種同源基因，分別是 PTTG1、PTTG2、PTTG3，其中 PTTG1 即為 securin。繼 Pei 等人在腦下垂體腫瘤發現其大量表現後，Securin 不論是 mRNA 或是蛋白質層面，都被發現在不同的腫瘤細胞或癌症細胞有大量的表現，包括有：卵巢癌 [5]、乳癌 [6]、直腸癌 [11]、肺癌 [20] 等，都被發現其 securin 有高度表現，且研究指出 securin 還與這些荷爾蒙疾病的侵襲力有關，這些都暗示了 securin 與癌症形成及細胞分化間的關係。

Securin 為一多功能蛋白質，在很多生理反應路徑上扮演調節的功能，其功能包括：DNA 的穩定 [21]、染色體的分離 [22] 以及細胞凋亡的調控 [1] 等。在穩定 DNA 的機制中，securin 藉由與 Ku 蛋白相互作用抑制其作用，但是在遇到雙股 DNA 斷裂時候會將 Ku 蛋白釋放以進行 DNA 修復 [23]。securin 在染色體分離的調控主要與 separase 蛋白質相關，securin 能穩定 separase 的存在，但是與 separase 的結合卻也抑制其活化；separase 的功能是分解複製染色體間的 cohesin protein complex，使染色體可以完成分離，由此可知 securin 是細胞週期的把關者 [24-26]。在許多文獻中指出，若 securin 的基因被去除掉(knock out)，細胞染色體會過早分離，導致染色體變異；當 securin 過度表現，也會使細胞的增生受到影響。

Securin 於最近被認為是一個無特定構形的蛋白質 [27]，無特定構形的蛋白質通常是多功能的、扮演調節角色的，而 securin 如上面所敘述，的確參與了許多不同的調控機制，本實驗室也經由多項蛋白質特性的測量，確定了 securin 的確為無特定構形的蛋白質。另外，Securin 在酵母菌中的同源蛋白質：出芽酵母(budding yeast)中的 Pds1、融合酵母中(fission yeast)的 Cut2，已被認為與 Securin 有相同的作用 [7]，所以很多研究者利用酵母菌系統研究 securin 的作用機制 [27,28]。

1-3.1 Securin 結構

人類 Securin 是一個含有 202 個胺基酸的蛋白質，其 N 端及 C 端分別

扮演不同的功能，N端是『細胞核分裂後期促進複合體』（Anaphase promoting complex，簡稱 APC）辨認的位置，與 Securin 分解的有重要關係，APC 辨認蛋白後會將其以 ubiquitin 標定，使走向分解路徑。C 端則為與 Separase 結合的片段，透過此結合會抑制 Separase 作用。另外在 Securin 接近 C 端(163-172)的位置為一 proline-rich 的序列，是 SH3 的結合位置 [28]，SH3 是常見的細胞訊息傳遞蛋白質，所以由 securin 的一級結構可以知道 securin 可能與訊息傳遞有關。

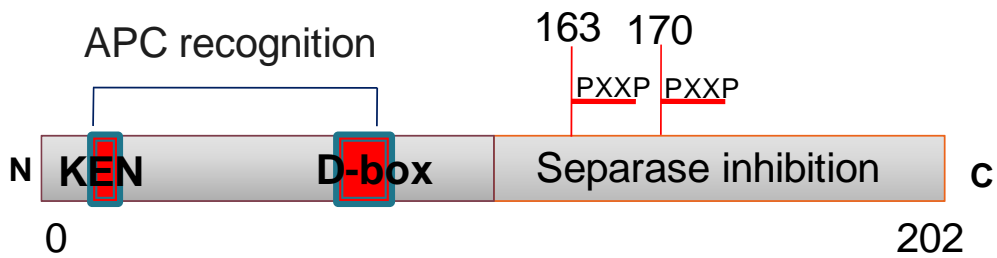


圖 1-1、Securin 結構示意圖

N 端為 APC 複合體辨認位置，包括 D-box(序列為 RxxLxxxxN)及 KEN-box(序列為 K-E-N-x-x-x-D/N)，C 端則為 Separase 辨認位置。

1-3.2 Securin 功能

Securin 最為人所知的，就是其與細胞分裂之間的關係，它也是細胞週期的監控者 [24]。Securin 可藉由與 separase 的結合抑制 separase 活性 [22]，如下圖所示，在細胞分裂前期，securin 是與 separase 結合的，此一複合體會防止細胞進入 anaphase，而 securin 的降解是由 APC/cyclosome (APC/C^{cdc20}) 所調控，此複合體會辨認 securin 上的 D-box(序列為 RxxLxxxxN)，而將 securin 以 ubiquitin 標定，進而降解。當 securin 與 separase 分離之後，separase 會被去磷酸化而成為活化態，活化的 separase 會將 cohesin protein 分解，此時染色質就可以分開，使細胞進入 Anaphase [29]。

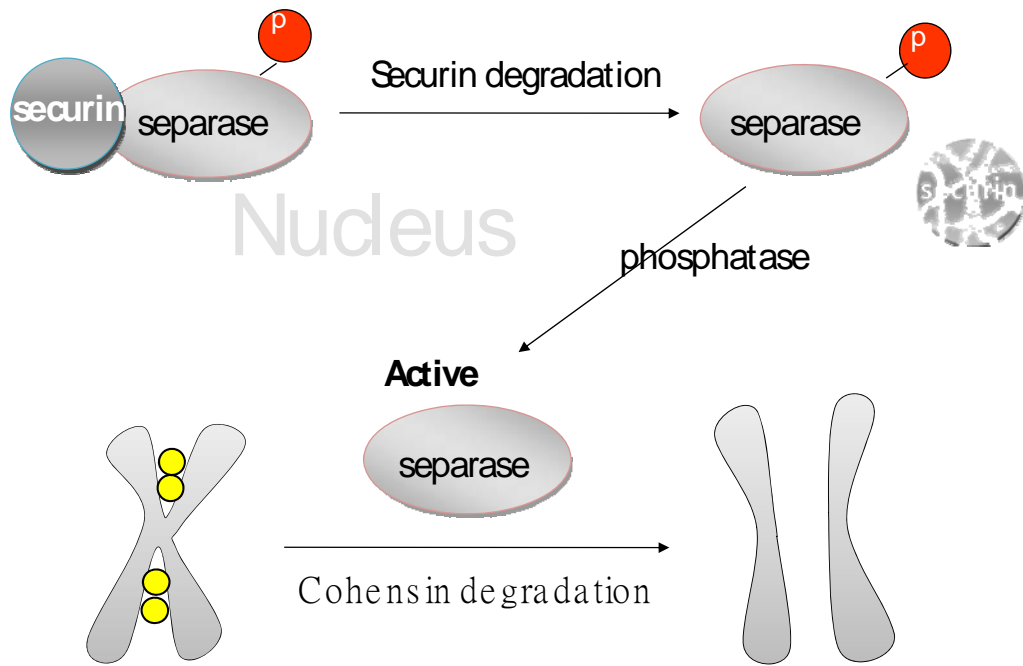


圖 1-2、Securin 調節 Separase 示意圖

Securin 會與磷酸化的 separase 結合，一旦 securin 經由 APC 複合體標定進而分解，separase 會去磷酸化成為有活性狀態，此時便可分解 cohesin complex(圖中黃色圓形處)，使染色質得以分裂。

Securin 也與 DNA 修復有關，其與 Ku70/K80 複合體會直接作用 [23]，但是當 DNA 遇到雙股斷裂的時候，securin 會將此複合體釋放出來，進行 DNA 修復的功能。除此之外，securin 也跟細胞週期有著密切的關係，在 2000 年 Francisco 等人的研究中發現 [30]，securin 在不同的細胞週期 phase 有不同的表現量，由 G1/S、S 至 G2/M，securin 的表現量是依序遞增的，這也顯示了 securin 和細胞週期的調控有關。

1-3.3 細胞週期與癌症

細胞週期與癌症最早在生物科學的研究上是獨立的課題，但是隨著這兩個領域的研究發現日益增加，之間關係的重疊也愈見明顯。在正常情況下，細胞週期控制細胞以一定的速度增生，癌症則是由於細胞週期的調節失去控制，對於黏附細胞(adhere cell)之間的感應靈敏度也大量的降低，使癌細胞得以大量且密集的增生 [31]。細胞週期的調控機制可以分為兩大類，一是利用一連串的磷酸化/去磷酸化的反應達成目的，其二是 check point 的控制 [31]。第一部分的調控，主要藉由 cyclin 及其

cyclin-dependent kinase(CDK)形成具有活性的複合體，來調控各種與細胞週期調控有關的因子。另一部分是 check point 的調節，在細胞週期的進行過程中，有一些重要的事件是必需的，像是 DNA 複製的完成，染色體分離完成，才可使細胞進行到下一個週期，若細胞沒有複製完成或是 DNA 受到損害，就會使細胞週期延誤。

Securin 與細胞週期調控之間的關係可能同時透過這兩種機制，因為 securin 不但透過與 separase 的結合來調節細胞分裂，且 securin 蛋白質本身也受到磷酸化及去磷酸化的調控。在 2002 年 Ritu 及 Orna 的研究發現，securin 為 Cdc28(人類 Cdk2 的同源蛋白質) 的受質，會被其磷酸化，磷酸化的 Securin 與 Separase 之間的作用具有較高的效力，且會促進 separase 的定位(localization) [13]。Securin 的去磷酸化則關係到此蛋白質的分解，Cdk1 及 Cdc14 參與了 Securin 的去磷酸化作用，一旦 securin 的磷酸消失，被 ubiquitin 標定的比例會增加許多，標定後的蛋白質將走向被分解的路徑[32]。

1-3.4 securin 的其他功能

Securin 近年來也被發現與血管增生相關[33]，這與 securin 是 oncogene 的角色是相呼應的，因為對於癌細胞來說，血管增生是必須的，因為癌細胞需要大量快速的增生，所以必須要大量的新生血管，才可以得到足夠的養分，因此在標靶治療的研究中，也常常針對血管新生的標靶基因著手，希望能透過破壞血管新生的機制，抑制或破壞癌細胞的生長。

1-4 A549 及 U937

securin 不僅與腫瘤及癌症高度相關，在快速增生的細胞，如 T 細胞，也有大量的表現，所以在篩選與其有作用的蛋白質時，我們分別使用了肺腺癌細胞 A549 及快速增生的 U937 細胞，做為研究的主要材料。A549 全名為人類肺腺癌內皮細胞(Human lung adenocarcinoma epithelial cell line)，此細胞源自 1982 年一位 58 歲的男性白種人的肺腺癌內皮細胞[34,35]。U937 則屬於淋巴細胞(diffuse hislytic lymphoma cell)，取自 1974 年一位 37 歲男性胸膜組織，有明顯單核細胞型態，透過藥物驅動可使其出現巨噬細胞特徵[36]。

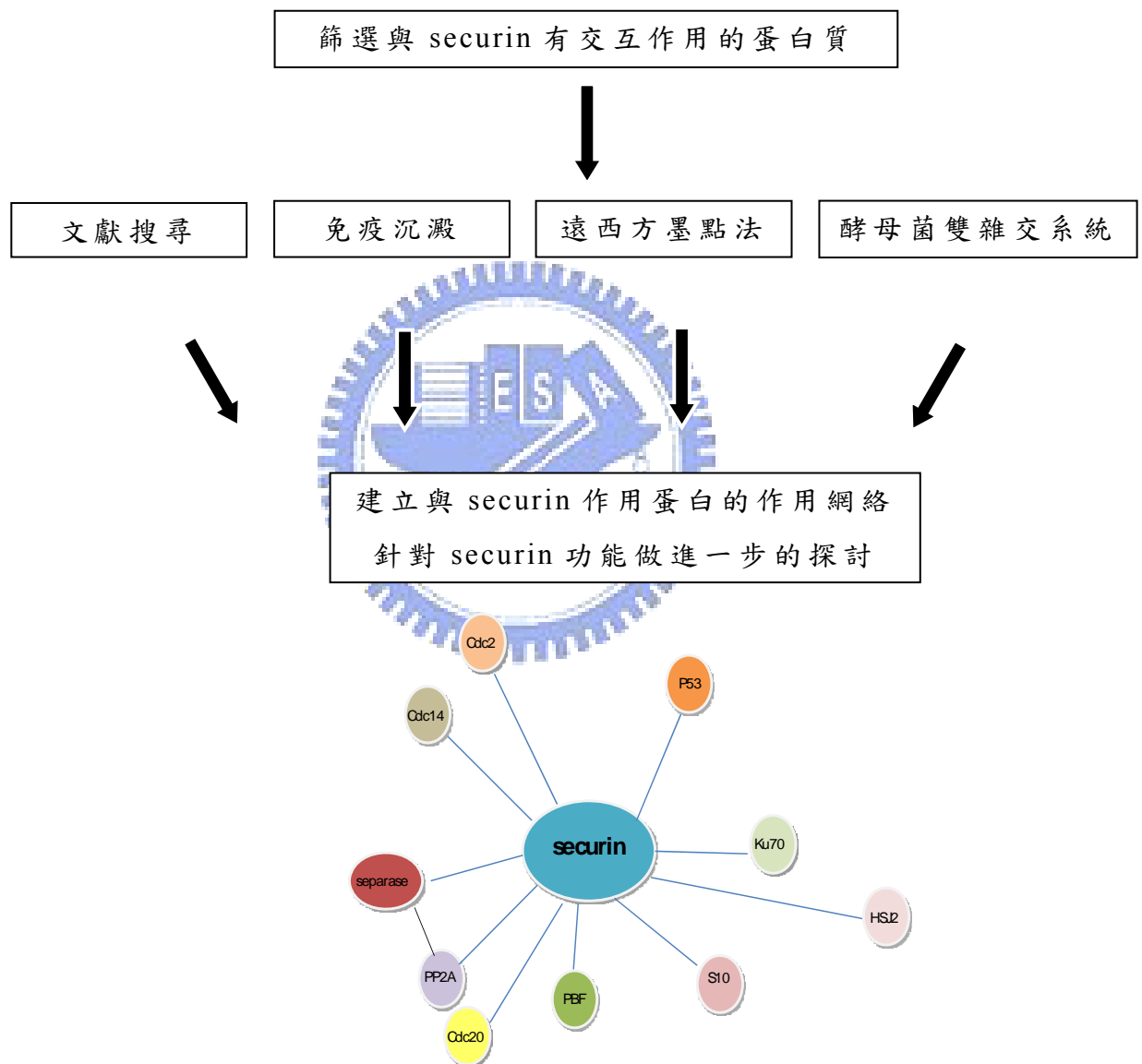
1-4.1 securin 在不同細胞的表現量

Securin 會表現在正常成人的睪丸、結腸、小腸、肺以及胎兒的肝^[3]，但是在各種癌細胞內其 mRNA 及蛋白質的表現量會特別的高，在目前的研究中，以大腸直腸癌的表現量最高[11]。在本篇論文中，我們也利用 Western 辨識 A549、CHO 及 U937 三種細胞的 securin 含量，發現在 U937 中，securin 蛋白質的含量的確是較高的。



第二章 實驗策略

本實驗在建構與 securin 有作用的蛋白質網絡，透過網絡希望能將 securin 的功能及作用機制了解得更透徹，所以我們搜尋文獻，將前人所、已知與 securin 作用的蛋白質篩選出來，同時也分別利用 *In vivo* 及 *In vitro* 的方式找出更多與 securin 作用的蛋白質，最後建構成網絡，進一步分析 securin 功能及可能作用機制。



第三章 實驗原理

3-1 蛋白質 securin 製備

近年來隨著生物科技發展快速，將特定基因送到為生物體內大量複製已是常見的方法，我們將 PTTG1 的基因送到 pET200 載體中，再送入大腸桿菌 BL21(DE3)，培養至 OD 值為 0.6 時，加入 IPTG 誘導此蛋白質的表現，大量產生 securin 蛋白質，最後形成內涵體(Inclusion body)。內涵體為錯誤折疊結構的蛋白質聚集而成，而功能又與其結構息息相關，我們使用本實驗室的折疊方式[39]，得到純度高且自然態的蛋白質。

為了要讓蛋白質摺疊恢復活性，我們首先以變性劑溶解內涵體，此過程稱為「變性」，變性作用主要在破壞蛋白質的三級結構(主要為疏水作用力)及二級結構(氫鍵)，此狀態下的蛋白質僅擁有一級結構，並無生物活性。在重新折疊的過程中，我們使用透析的方式，將溶於變性劑的蛋白質置於透析膜內，膜外則是大量的復性溶液，藉由內外離子濃度的不同，溶液內離子會自由運動而達到平衡，進而達到使變性劑濃度降低的目的。因透析的過程緩慢，本實驗室改良了一般透析的方式，利用多次的溶液置換，使蛋白質在透析的過程中近乎靜止，因此我們稱之為準靜態熱平衡透析法[37]。

3-2 Far Western

Far Western 最早作為篩選蛋白質表現的方法(cite)，但是近年來已被大量用在蛋白質之間交互作用的確認，諾貝爾獎得主 Roger D. Kornberg，也曾用此方法證明許多轉錄因子之間的交互作用[38]。此方法的優點可以充分的研究蛋白質後修飾作用與蛋白質之間作用力。Far Western 的原理與 Western 非常相似，不同的是，在 Western 中，我們使用一級抗體去辨認蛋白質，而在 Far Western 中，我們使用的是可能與其有交互作用的蛋白質(bait protein)，再使用此蛋白質(bait protein)的一級抗體、二級抗體使有作用的蛋白質呈色。

Far Western 的標準流程：

一般 Far Western 多以 Native Gel 來進行實驗，希望能保持蛋白質原有的結構，確保蛋白質之間的作用力仍有效。但是 Native Gel 無法添加 SDS 及還原劑，所以解析度相對較差。因此實驗室將傳統的 Far western 做一些修飾：我們仍以一般 SDS PAGE 的方式分離蛋白質、將膠體上的蛋白質

轉到膜上，但是接著利用實驗室準靜態透析法的方式，將膜上蛋白質折疊至自然態，接著與蛋白質(bait protein)培養、蛋白質(bait protein)的一級抗體、二級抗體培養及呈色，就可以得到與特定蛋白質作用的蛋白質。

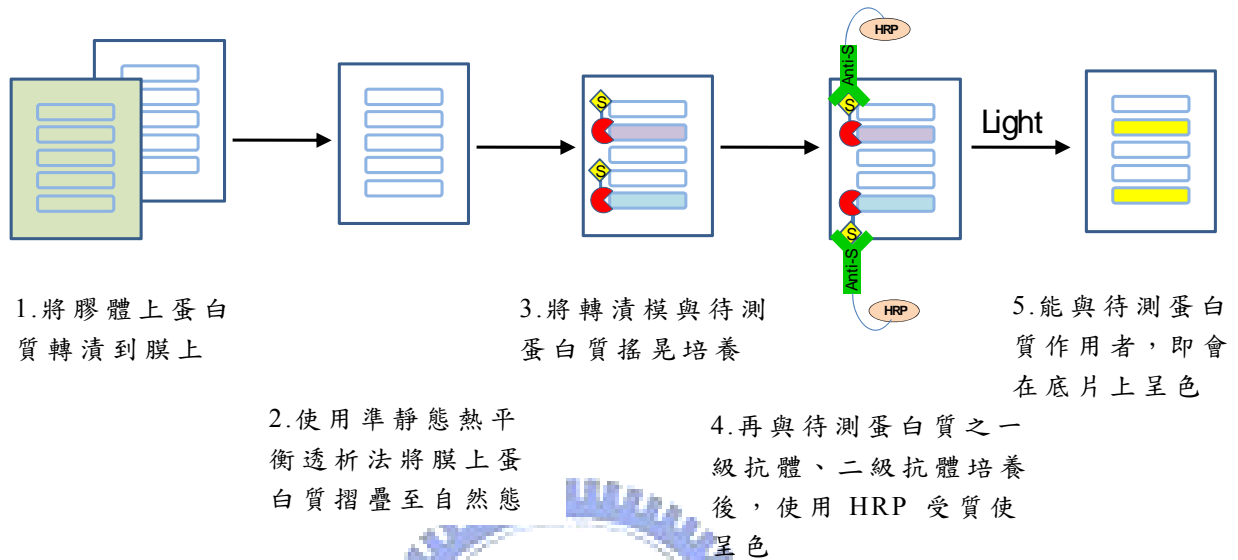


圖 3-1 、Far Western 實驗原理

3-3 免疫沉澱 (Immunoprecipitation)

免疫沉澱發展：

免疫沉澱是測定蛋白質之間交互作用常用的方式，實驗的原理是在細胞裂解蛋白質(Lysis proteins)溶液中加入目標蛋白質(若裂解蛋白中已有目標蛋白可不必額外添加)，再依序加入目標蛋白質的抗體及接有 G 蛋白/A 蛋白的 Sepharose 作培養，若眾多的裂解蛋白中有與目標蛋白作用者，便會與目標蛋白、其一級抗體、A/G-Sepharose 形成複合體，經過離心後得到的沉澱再以電泳方式分離，即可得知與目標蛋白質作用的其他蛋白質。

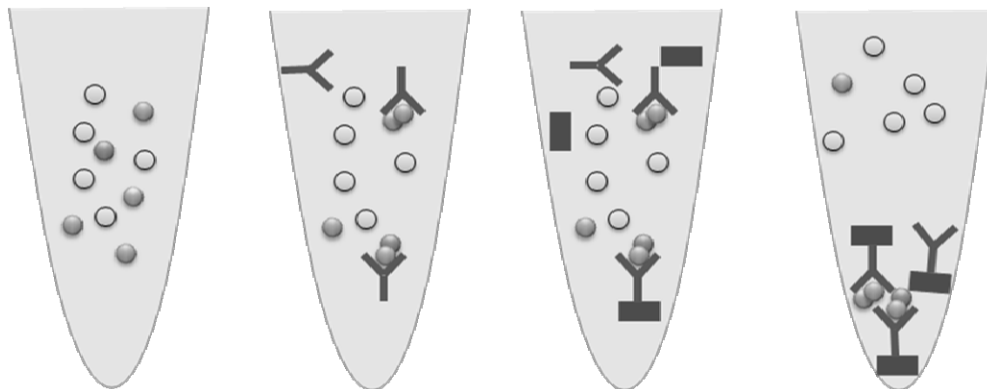


圖 3- 2、免疫沉澱原理示意圖

各色圓圈狀(●●●●)代表不同蛋白質，假設藍色(●)與綠色(●)會與橙色(●)作用，所以在培養過後會與橙色(●)蛋白作用，再加入呈色蛋白之一級抗體(↯)及 sephorse(■) 後離心，即可得到整個複合體。

3-4 恆溫滴定微卡洛里計(Isothermo Titration Calorimetry, ITC)

恆溫滴定微卡洛里計可以測量微量的反應熱，而分子之間的結合或解離常伴隨著吸熱或放熱，因此恆溫滴定微卡洛里計是測量分子之間作用很好的生物物理技術^[39]。此卡計可分為三類：1.絕熱式(adiabatic) 2.熱傳導式 3.補償式。我們所使用的是熱傳導式：反應槽溫度變化時，會與外部恆溫水槽產生即時的熱交換，當熱通過熱電偶時，會產生電位差，即可推算出能量的變化。本實驗所使用之恆溫滴定微卡洛里計為 Thermometric 公司製造，型號為 2277(Thermometric, Jarfalla, Sweden)。

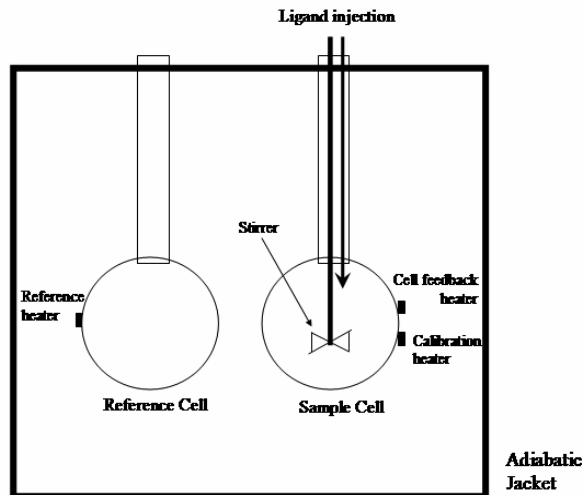


圖 3- 3、ITC 結構示意圖

其中 reference cell 置放蛋白質的溶劑，sample cell 置放被滴定的蛋白質溶液，用來滴定的另一蛋白質溶液則由” Ligand injection”處伸入至 cell 上方，待儀器平衡後進行滴定。

3-5 二維電泳 (Two-Dimensional Gel Electrophoresis)

二維膠體電泳是一維膠體電泳的擴增，一維電泳主要是靠蛋白質的分子量作為分離的依據，二維電泳則是多了依其等電點分離 (isoelectric point) 的步驟，此步驟稱為等電聚焦 (isoelectric focusing) 簡稱 IEF。當 pH 值不等於蛋白質的等電點時，蛋白質會帶有正或負的靜電荷，若靜電荷是負的，則蛋白質會往正極移動，反之則往負極移動，直到 $\text{pH}=\text{pI}$ 為止。因此在膠體上的蛋白質會呈現梯度 pH 的分布。

3-6 Yeast Two Hybrid

本實驗使用 CytoTrap Vector Kit，此系統中使用 *cdc25H* 酵母菌 (*S. cerevisiae*)，此菌株中 *cdc25* 基因的第 1328 個胺基酸受到突變，不能啟動 Ras 訊息傳遞路徑，因此無法在 37°C 存活。系統中主要使用兩種載體，分別是 pSOS、pMyr，cDNA Library 被建構在 pMyr 載體中，Securin DNA 片段則插入 pSOS 載體中。若兩個載體產生的蛋白質之間有交互作用，則 hSos 會被帶到細胞膜表面，活化 Ras 訊號傳遞路徑，使 *cdc25H* 菌株能夠在 37°C 存活。

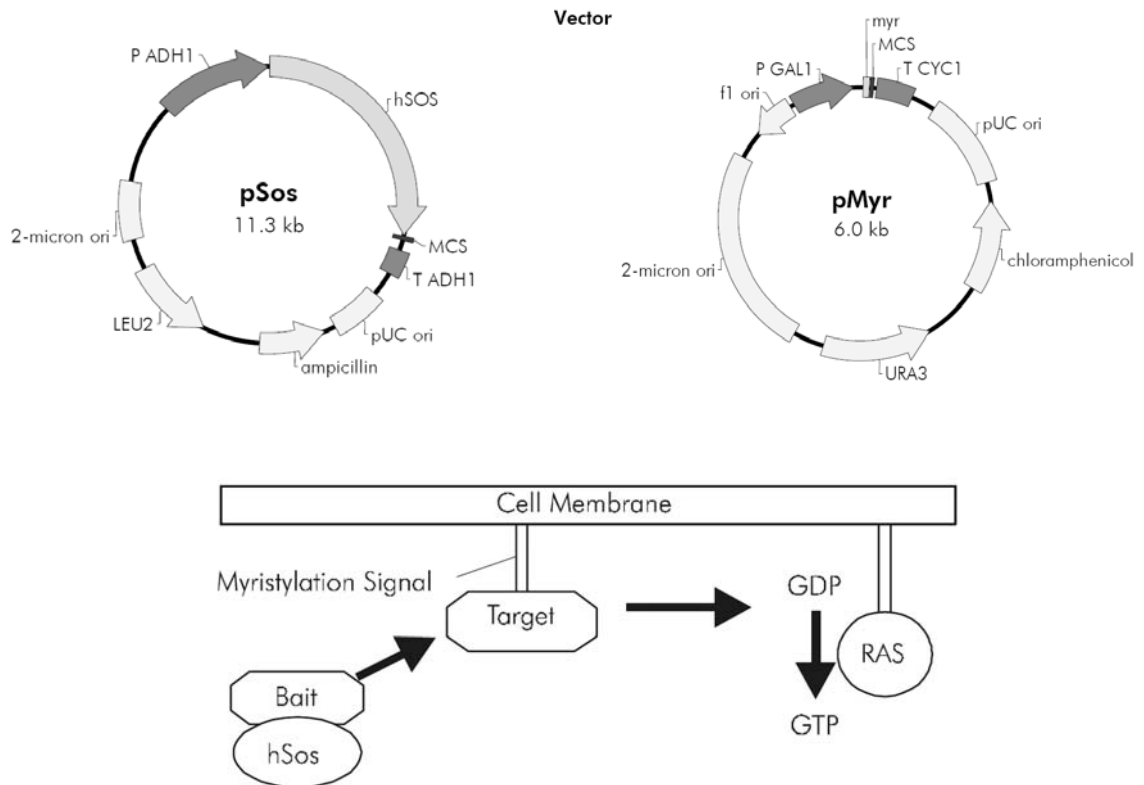


圖 3- 4、Yeast Two Hybrid- CytoTrapsystem

圖上方為此系統中主要的兩種載體(vector)，pSos 質體將會接上待測蛋白之基因序列(securin)，cDNA 的基因序列則隨機的接上 pMyr 質體中。將建構好的兩種載體轉殖(transform)到酵母菌當中，若有蛋白質與待測蛋白質(securin)作用，則 pMyr 基因序列會將 hSos 蛋白質帶到細胞膜表面，進行 Ras 路徑，使酵母菌得以在 37 °C 的環境下生長。若蛋白質之間沒有交互作用，則酵母菌僅能存活於 25 °C 的環境。

第四章 實驗材料及方法

4-1 Securin 基因鑑定

(1) 實驗中使用本實驗室建構之 pET200-securin 之質體，轉殖到大腸桿菌 BL21(DE3) 品系，基因序列及胺基酸序列如附錄一。

(2) 聚合酶連鎖反應 (Polymerase Chain Reaction, PCR)

使用本實驗室設計之 Securin 引子 (primers)

Forward primer 5'-CATATGGCTACTCTGATCTATGTT-3'

Reverse primer 5'-ATTTAAATATCTATGTCACAGCA-3'

10x Sample Buffer	5 μ L	溫度	時間	循環數
10uM dNTP	1 μ L	94°C	1 分鐘	1
Forward primer	1 μ L	94°C	30 秒	30
Reverse primer	1 μ L	50°C	30 秒	
ddH ₂ O	41 μ L	72°C	30 秒	
Pro-taq polymerase	1 μ L	72°C	3 分鐘	1

表 4-1 PCR 用量表

表 4-2、PCR 溫度時間定表

(3) 將表 4-1 所列樣品依序加入混合均勻後，以牙籤挑選菌落加入，再依照表 4-2 設定進行反應，反應完成後將產物以 1.5% Agarose 膠做確認。

4-2 Securin 蛋白質製備

(1) 以 IPTG 誘導細胞大量產生 Securin 蛋白質

解凍含有 pET200securin 的 BL21(DE3) 菌種，取出適當體積加入 3 ml 的 LB(含 20ng/mL Knamycin)，於 37°C/200rpm 震盪培養至隔天使菌種活化。取活化菌種 250 μ L 加入 250 mL LB(含 20ng/mL Knamycin)，37°C 震盪培養四小時後加入 IPTG，使 IPTG 最終濃度為 1mM，持續震盪培養 16 小時。將培養完成菌液以 4°C /9000 rpm 離心得沉澱的菌體，將菌體以 1mL 回溶，放入破菌機(constant cell disruption system)，以 30 kpsi 高壓使菌體破碎。將破碎菌液以 11000 rpm 離心，得到沉澱物即為

內涵體 (Inclusion body)，持續以二次去離子水回溶、離心、去除上清液，使內涵體純度提高，清洗至上清液完全澄清。

(2) 蛋白質摺疊

本方法係由本實驗室所開發[37]。養菌得到的蛋白質位於內涵體中，此蛋白質相互堆疊且失去功能的，所以需利用重新摺疊方式將蛋白質摺疊至自然態。首先加入高濃度的尿素(4.5M urea、pH = 11)的變性溶劑，使用磁石轉動子於 4°C 攪拌 12 小時左右，使蛋白質充分變性溶解。溶解完全的蛋白質使用 0.2 μ mPVDF 膜過濾後，裝入事先處理過的透析模(將 0.1M EDTA 煮沸後放入透析膜煮五分鐘去除金屬離子，再以二次去離子水沖洗透析模，除去多餘的 EDTA。) ，將透析袋放入 250mL 的 R1 緩衝液中，於 4°C 透析 24 小時後，置換新的 R1 緩衝液透析 24 小，然後置換於 R2 緩衝液透析 12 小時，依此類推，依序透析至 R5，將變性劑濃度降低，使蛋白質逐漸回到自然態，詳細緩衝液內含物及透析時間如附錄一所示。

4-3 西方墨點法(Western Blot)

我們使用西方墨點法來確認大量生產的蛋白質是否為 Securin。首先使用 15% SDS PAGE 分離蛋白質，接著使用半乾式轉漬槽(Semi-dry transfer system)將膠體上的蛋白質轉到 PVDF 材質上，將轉漬膜置於脫脂奶溶液中(蛋白質含量 5%，容於 TBST 緩衝液)，以降低之後抗體的非專一性反應；轉漬膜浸泡於牛奶溶液 30 分鐘後，改浸泡於稀釋 1/3500 的 Mouse Anti-Securin 一級抗體 (Santa Cruz Biotechnology, Inc. Cat No. SC56461)，2 小時後使用 TBST 緩衝液清洗四次，每次 5 分鐘，接著將轉漬膜浸泡於稀釋 1/10000 的二級抗體(goat anti-mouse IgG-HRP)培養 1 小時，再使用 TBST 緩衝液清洗四次，每次五分鐘。整個轉漬膜與抗體的培養過程結束後，添加 HRP 受質(Millipore Corporation Cat No. WBKL S0500)於轉漬膜上，以底片呈色。

4-4 二維電泳及遠西方墨點法

在遠西方墨點法(Far Western)中，我們使用二維電泳來分離蛋白質，二維電泳的操作可分下列幾項說明：

(1) 樣品製備

細胞裂解(Cell Lysis)：將回溶於 200 μL 的細胞裂解緩衝液(Cell Lysis Buffer-附錄一)，將細胞置入液態氮 30 秒後置於室溫水中，重複三次以上，於 4°C 離心 10 分鐘。

蛋白質沉澱：取上述上清液加入預冷之 Trichloroacetic acid (簡稱 TCA) 置於 -20°C 冰箱中 1 小時，使蛋白質充分沉澱，樣品與 TCA 比例為 4 : 1。1 小時後將樣品於 4°C 離心 10 分鐘，沉澱物即為蛋白質。

蛋白質處理及定量：以 TCA 沉澱的蛋白質經過離心後需以丙酮(Acetone) 清洗後離心，重複三次，以降低 TCA 對之後二維電泳的影響。最後沉澱的蛋白質回溶於水合緩衝液(Rehydration Buffer-附錄一)，以 Bradford 定量試劑定蛋白質的濃度。

(2) 一維電泳 (依等電點分離蛋白質)

我們使用 13 公分的 IEF Strip(GE Healthcare Immobilized Dry Strip, pH=3-10 Nonlinear)，其所需添加的溶液體積為 250 μL 。在這體積內添加 DTT 使其最後濃度為 2.8mg/ml，蛋白質的量在 30-60 μg ，另加入 1-2 μL Bromophenol blue 做為指示劑，最後以二次去離子水將體積補滿 250 μL ，將溶液混合均勻後吸取放入 Strip Holder，再以 IEF Strip 覆蓋，置於一維電泳機器上，機器設定如附錄一。

(3) Tricine gel

Tricine Gel 有助於分析分子量較小的蛋白質，因此我們採用 Tricine SDS PAGE 取代一般的 SDS PAGE。膠體製作方法如附錄二，將表中所列物質混合均勻後抽真空 15 分鐘，再加入 150 μL APS 及 30 μL TEMED，稍微搖晃均勻後注入 0.75 mm 的電泳膠隔板中，液體加至離頂端一公分處停止，加入二次去離子水壓平膠體，得 10% Tricine Gel。Tricine 最重要的是其內外使用不同配方的緩衝液，分別是 Cathod Buffer 及 Anode Buffer。

(4) 二維電泳(依分子量大小分離蛋白質)

一維電泳完成後，首先將電泳膠條放入含有 50mg/5ml DTT 的平衡液震盪 20 分鐘，使蛋白質之間雙硫鍵結完全打開，後將膠條移至含有 125mg/5ml IAA 的平衡液震盪 20 分鐘，避免雙硫鍵重新形成。處理完膠條放入做完的 Tricine Gel 上方，與 Tricine Gel 相接觸，加入含有指示劑(Bromophenol blue)之 Agarose 以固定膠條。將電泳膠接上電源後，

先以 10 mA/片跑約 15 分鐘，當藍色指示劑跑至 Tricine Gel，將電流調快至 20 mA/片。

(5) Far Western

使用一樣的條件跑三張二維電泳的膠片，其中一張銀染呈色，另兩張則轉漬到 PVDF 膜上。兩張轉漬膜分別做 Far Western 及 Western(對照組)，轉漬膜與溶液培養的順序、時間如附錄三。

4-5 免疫沉澱

(1) 細胞裂解

免疫沉澱的細胞裂解步驟中，為避免清潔劑干擾後續實驗，所以不添加任何清潔劑。實驗使用 5×10^7 個 u937 細胞，離心後用預冷的 PBS 回溶，重複操作兩次，加入 Lysis Buffer，用超音波破菌器震盪 2 分鐘後離心，取其上清液。

(2) 預洗(preclear)

加入 3 μ L Sepharose-G 於 4°C 震盪 25 分鐘，若蛋白質本身與 Sepharose-G 有直接作用，可在此步驟中預先剔除。

(3) 與 Securin 蛋白質、抗體培養

將預洗的細胞裂解蛋白離心，取上清液加入 Securin 蛋白質，使其最後濃度為 2 μ g/mL，震盪培養 50 分鐘，再加入 Securin 一級抗體(1/200)，震盪培養 50 分鐘後，加入 Sepharose 震盪培養 14 小時。

(4) 清洗

為避免特定蛋白質因表現量較高殘留於 Sepharose G 上，使用 PBS 清洗、離心，重複三次，最後沉澱物即為免疫沉澱產物。

4-6 MALDI-TOF Mass

(1a) 切下膠體及清洗 - Coomassie blue 染

1. 以小刀切下膠體中欲分析的斑點，所切的大小約為 1~2 mm³。
2. 將切下的膠體置於 1.5mL 的 eppendorf。
3. 加入 100 μ L 純水，將切下的膠體以純水清洗二次(置於超音波震盪 10min)。
4. 離心後，小心移去清洗液並取出丟棄。
5. 加入 50 μ L 的 50mM 之 NH₄HCO₃/ACN 1:1(v/v) (【註】將 50mM 之

- NH₄HCO₃ 以 ACN 配製 1:1 溶液) 振盪 15min 後，離心取出上層液丟棄。
6. 加入可覆蓋住膠體量(約 25ul)的 ACN 收縮，之後取出 ACN。
 7. 加入 25 μ L 之 50mM NH₄HCO₃，將其 rehydrate。
 8. 加入適量的 ACN 以覆蓋膠體，當膠體收縮聚在一起後取出 ACN。
 9. 以 speedvac 抽乾膠體(約 10min)。

(1b) 切下膠體及清洗-銀染

1. 用水洗兩次 gel。
2. 以小刀切下膠體中欲分析的斑點，所切的大小約為 1~2 mm³。
3. 將切下的膠體置於 1.5mL 的 eppendorf。
4. 加入 50 μ L 的 50mM 之 NH₄HCO₃/ACN 1:1(v/v) (【註】將 50mM 之 NH₄HCO₃ 以 ACN 配製 1:1 溶液) 振盪 15min 後，離心取出上層液丟棄。
5. 加入 200 μ L silver solution (0.5g K₃[Fe(CN)₆]、0.8g Na₂S₂O₃ in 50mL DI 水) destain 10 min 後，取出丟棄。
6. 用 200 μ L 25mM NH₄HCO₃ 清洗 gel pieces，重複這步驟，直到 gel 變成無色，取出溶液丟棄。
7. 加入可覆蓋住膠體量(約 25ul)的 ACN，當膠體收縮聚在一起後，取出 ACN。
8. 以 speedvac 抽乾膠體(約 10min)。

(2) Reduction and alkylation

1. 加入 25 μ L 新鮮配置的 10mM DTT (dithiothreitol) /25mM NH₄HCO₃。
【註】將乾燥的 DTT 以 25mM NH₄HCO₃ 配成 10mM
2. 於 56°C 下 incubate 45min 後，使之冷卻到室溫，離心將上清液取出丟棄。
3. 加入 25 μ L 的現配 55mM iodoacetamide (IAA) (10mg IAA/【mL 25mM NH₄HCO₃】)
4. 在暗室下反應 30-60min，再將上清液取出丟棄。
5. 加入 50mM NH₄HCO₃ and ACN(1:1,v/v),清洗 15min(2 次)。
6. 加入適量的 ACN 以覆蓋膠體，當膠體收縮聚在一起後，取出 ACN。
7. 以 speedvac 抽乾膠體(約 10min)。

(3) Digestion with trypsin

1. 膠體中加入 $25\ \mu\text{L}$ $5\text{ng}/\mu\text{L}$ ($20\text{ng}/\mu\text{L}$) 之 trypsin 溶液(溶劑為 25mM NH_4HCO_3)(依膠體濃度酌量加入)
2. 加入適量(約 $15\ \mu\text{L}$ ，使其總量為 $40\ \mu\text{L}$)的 25mM NH_4HCO_3 (使膠體保持水份)， 37°C 下 incubate overnight。

(4) Extract peptides for analysis

1. 確保 tube 中仍含有 $3\ \mu\text{L}$ 溶液(若不足，可加一點點純水)先以超音波震盪 10min 。
2. 將溶液取出收集。
3. 在膠體中加入 $3\ \mu\text{L}$ 50% ACN 含 0.1% TFA。
4. 超音波振盪 10min 後，將溶液取出收集。
5. 重覆步驟 3 及步驟 4 兩次。
6. 收集溶液「2」及溶液「4」，若濃度不夠可濃縮，以 MALDI 分析。

MALDI 分析

1. 取消化產物 $0.5\ \mu\text{L}$ 混合 $0.5\ \mu\text{L}$ matrix (CHCA, α -Cycno-4-hydroxy-cinnamic acid) (CHCA 溶於 50% ACN + 0.1% TFA) 點於 384 well 的 ground target 上。
2. 待乾燥結晶後，推入 MALDI-TOF-MS 分析。
3. 根據質譜圖，使用 MASCOT 軟體線上搜尋，根據其及格分數及 cover 到之片段進行結果判斷。

第五章 實驗結果

5-1 Securin 基因及蛋白質鑑定

表現 Securin 蛋白質的菌株由本實驗室所建構。Securin 的 cDNA 由 A549 cDNA 萃取擴增放大而來，而後嵌入 pET200 的載體後轉殖 (transformation) 至 BL21(DE3) 品系的大腸桿菌，詳細的基因圖譜如圖 5-1，序列及比對結果如附錄一、二。

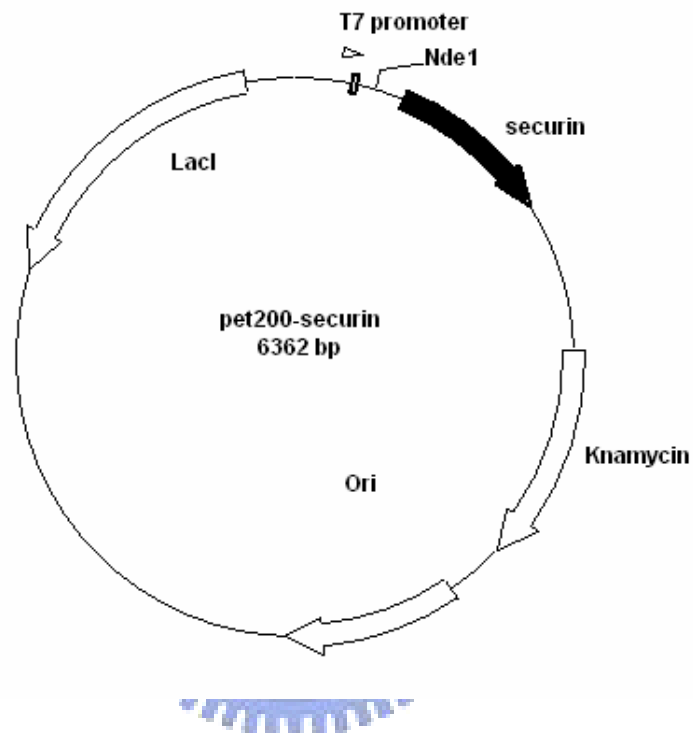


圖 5- 1、pET200-Securin 基因圖譜

以 pET200 為主要表現的質體，利用 T7 promoter 調控基因，以抗-kanmycin 作為篩選的機制。

為確認現在所使用的菌株仍然 含有 securin 基因序列，將現使用的菌株劃盤後，挑選 10 顆菌落，使用實驗室設計的引子進行 PCR，DNA 膠的結果顯示，在 600-700 bp 位置皆有產物，符合預期大小 606 bp，如圖 5-2 所示，顯示我的 securin 基因的確還存在此菌種當中。

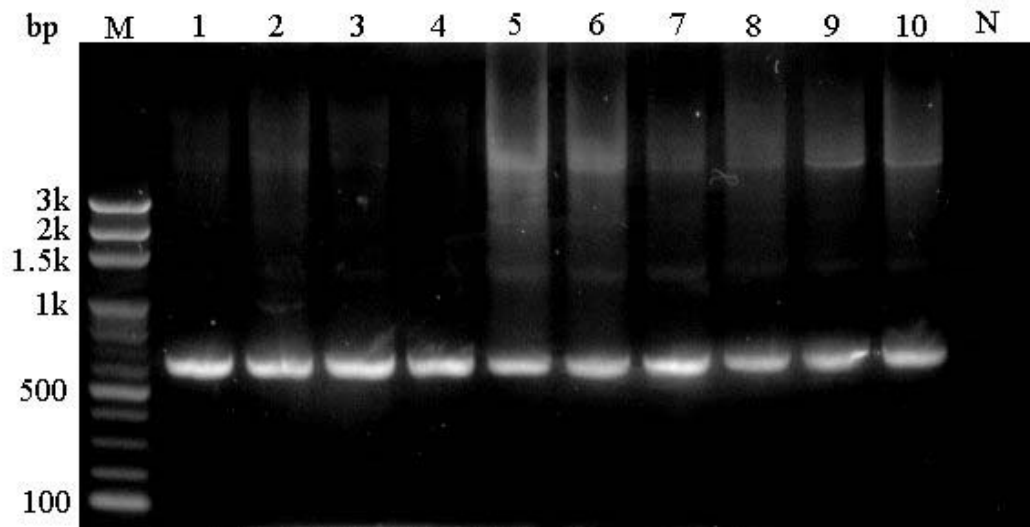


圖 5- 2、 securin 轉殖菌株之基因確認

圖中 M 為 DNA ladder；1-10 為挑選之菌落編號。圖中可見 1-10 間皆有預期的片段(600-700 bp)。DNA 電泳使用 1.5% Agarose gel 及 0.5x TBE buffer。

為確認蛋白質是否正確，所以將有無加入 IPTG 誘導的菌種做比較，如圖 5-3 所示，可以看到有誘導的部分明顯的在 26 kD 左右的位置有較明顯的條紋，經由右圖-西方墨點法也再次確認了 securin 含量的確在有誘導的菌種中有大量表現。另外因為實驗室選擇使用內涵體(Inclusion body) 做摺疊以得到大量的蛋白質，所以將內涵體及上清液的樣品以 securin 的抗體做確認，如圖 5-4，不論上清液或是內涵體中，都確認含有 securin 蛋白質，且此蛋白質的純度高達 95% 以上，BSA 則做為負控制因子，確認此抗體的確不會辨認到其他的蛋白質。

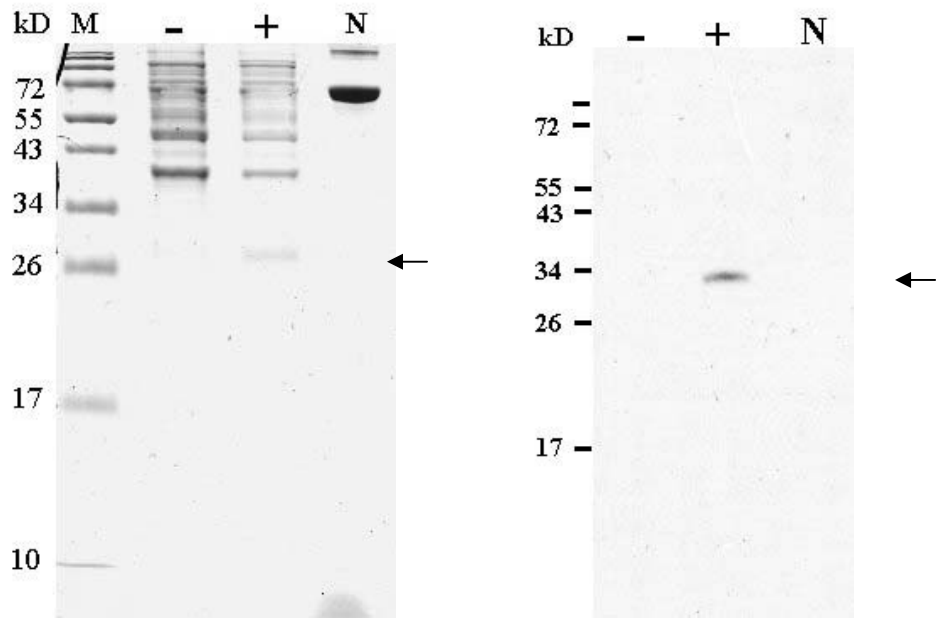


圖 5-3、Securin 被 IPTG 大量誘導生產

15% SDS PAGE 顯示，經 IPTG 誘導的大腸桿菌(+)，的確獲得純度高的 Securin 蛋白質(箭頭標示處)，右圖進一步使用西方墨點法(Western)證實大量被誘導的的確為 securin 蛋白質(箭頭標示處)。N 為 BSA 蛋白質，作為負對照組。

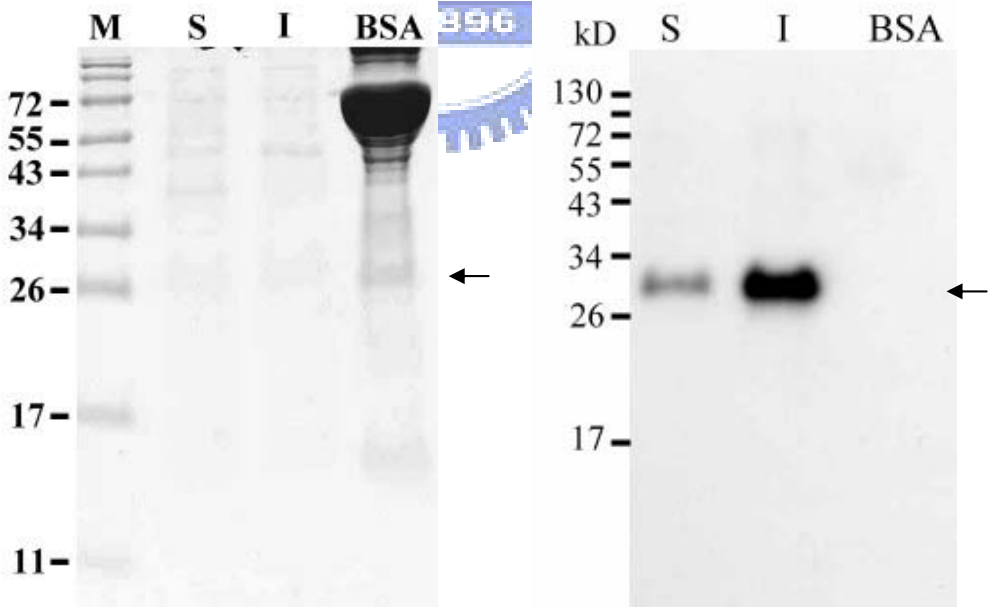


圖 5-4、Securin 蛋白質確認

左圖為 15% SDS PAGE 顯示，經由 IPTG 誘導及破菌的方式，的確獲得純度高的 Securin 蛋白質(I)，右圖進一步使用西方墨點法(Western)證實不論上清液(S)或是內涵體(I)的確都含有 securin 蛋白質(箭頭標示處)。N 為 BSA 蛋白質，作為負對照組。

5-2 Far Western & Mass

圖 5-5 為 Far Western 的實驗結果。Far Western 的實驗中共得到三張結果圖，一張是以 15% Tricine Gel 分離 A549 細胞裂解蛋白質的結果(圖 A)，另外兩張使用相同條件下的膠體，將其蛋白質轉漬到 PVDF 膜上，轉漬膜經由緩衝液的置換摺疊回近乎自然態。其一與 Securin 培養 1.5hr，接著兩張膜再同時培養於 securin 之一級抗體、二級抗體，使用 HRP 受質始呈色。由圖 B 中可知，有與 securin 培養過的膜上有許多呈色點，這些都是可能與 securin 作用的蛋白質；圖 C 因為沒有與 securin 蛋白質震盪培養過，所以有可能呈色的蛋白質只有 securin 本身，其他蛋白質都不會呈色，圖 C 中符合預期的沒有任何其他的蛋白質呈色，而 Securin 沒有呈色的原因可能是細胞內的 Securin 含量太低，所以在這次的抗體濃度下無法顯示。

在圖 5-5-B 中的各個呈色點雖然都是可能與 securin 作用的蛋白質，但是與膠體對照的結果，僅三個點能在膠體得到相對應的結果，將這三點編號為 1、2、3，其分子量分別為 54kD、54kD、34kD，等電點(pI)則約為 5.0、5.0、4.5，如表 5-1。實驗中僅三個點(編號 1、2、3 點)可分析出結果的原因，可能是每個蛋白質與 Securin 結合的能力不同，有些蛋白質濃度雖低但與 securin 鍵結的強度較強，所以有差不多強度的呈色，但實際上濃度過低而無法經由銀染呈現，因此無法取出辨認為何種蛋白質。

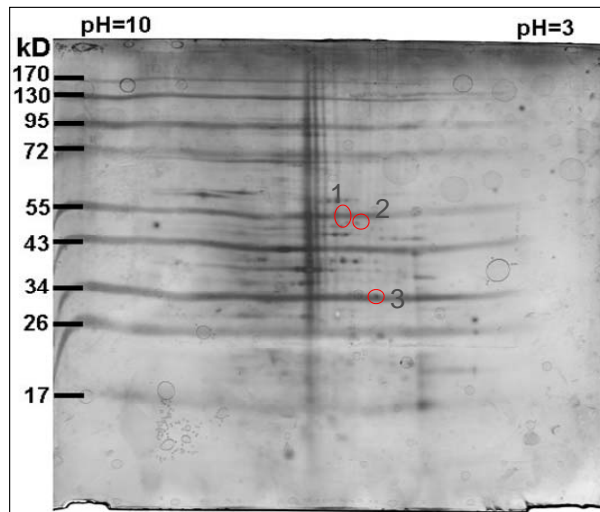
將此三點蛋白質經過 Trypsin 消化後，跑 MALDI-TOF Mass 得到光譜後，使用 MASCOT 軟體線上搜尋。結果顯示編號 1、2 的蛋白質分別是 PCAF 的次單元及 Tbx3(圖 5-6)，其分子量依序為 54.7kD 及 55kD，與二維電泳的結果是相符合的。另一蛋白質可能因濃度過低，質譜分析的圖譜無法在資料庫比對出理想的結果。

編號	分子量(約略值)	等電點(約略值)
1	54 kDa	5.0
2	54 kDa	5.0
3	34 kDa	4.5
4	110 kDa	4.3
5	53 kDa	5.5
6	40 kDa	5.0
7	39 kDa	3.6
8	37 kDa	3.4
9	40 kDa	4.0
10	39 kDa	3.8
11	30 kDa	5.2
12	32 kDa	5.0
13	31 kDa	4.3
14	30 kDa	4.2
15	30 kDa	3.4
16	24 kDa	4.5
17	20 kDa	5.0
18	21 kDa	4.4
19	24 kDa	3.2
20	22 kDa	4.5
21	22 kDa	3.8
22	20 kDa	3.4
23	18 kDa	3.4
24	12 kDa	4.0
25	10 kDa	3.8
26	15 kDa	10.0
27	14 kDa	9.5
28	12 kDa	10.0

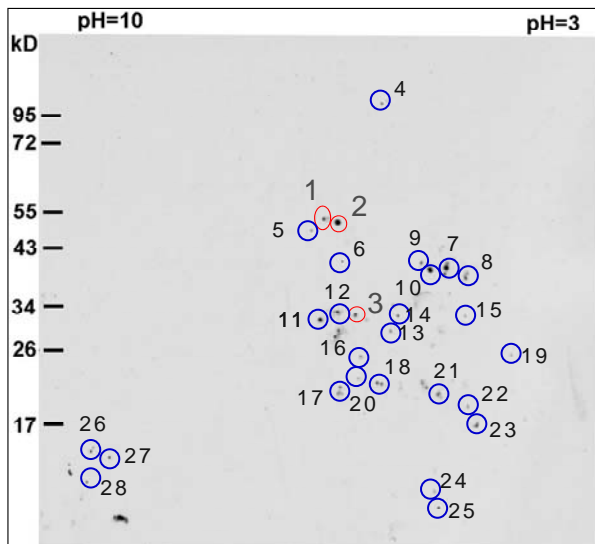
表 5- 1、Far Western 中與 securin 作用蛋白質之分子量與等電點

其中僅 1-3 所對應的膠體位置，蛋白質含量足以在質譜儀中分析出來，其餘蛋白質無法得到分析結果。

A



B



C

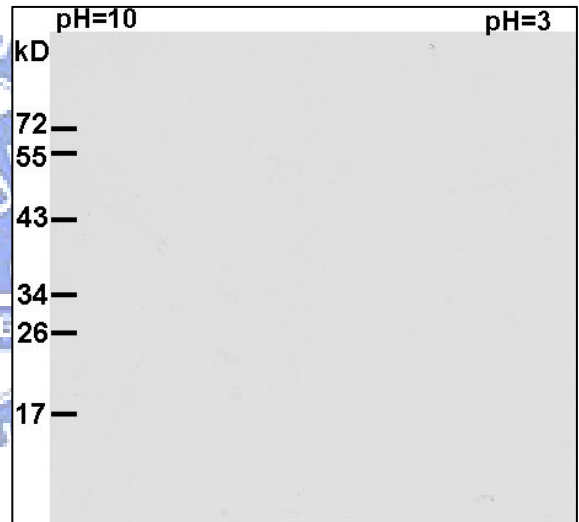
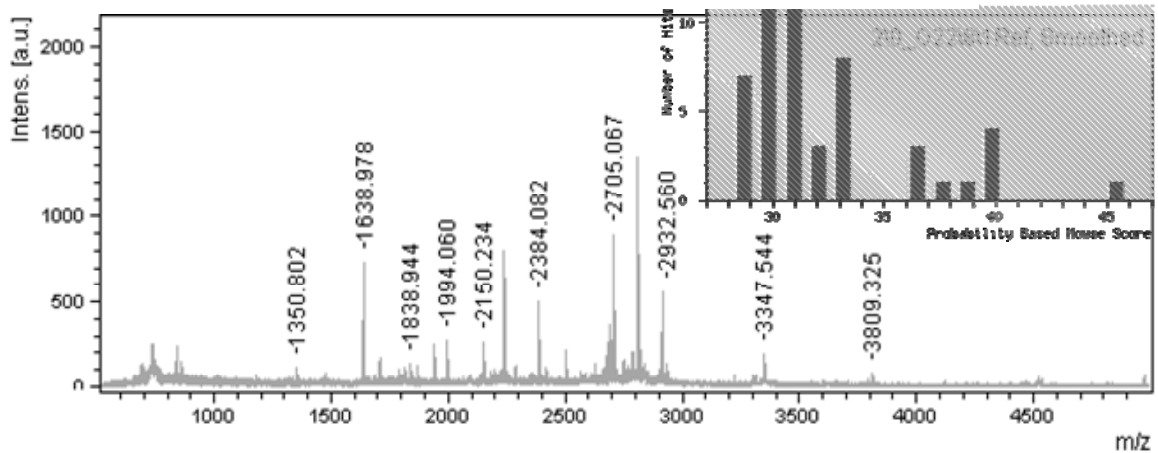


圖 5- 5、Far Western Assay

A 圖為 A549 細胞裂解蛋白質跑二維膠體電泳的結果；B 圖為 Far Western 結果，呈色點表示可能與 securin 作用的蛋白質；C 圖為對照組，因沒有與 securin 培養過，所以除了 securin 本身外，其他蛋白質無法與 securin 之一級抗體、二級抗體接合，所以沒有呈色，而 securin 本身沒有呈色在兩張膜上，是因為在細胞中 securin 的濃度相較於其他蛋白質是較低的，所以在一抗稀釋 1/1000 的實驗狀況下無法呈色。

A、PCAF



B、T-box 3

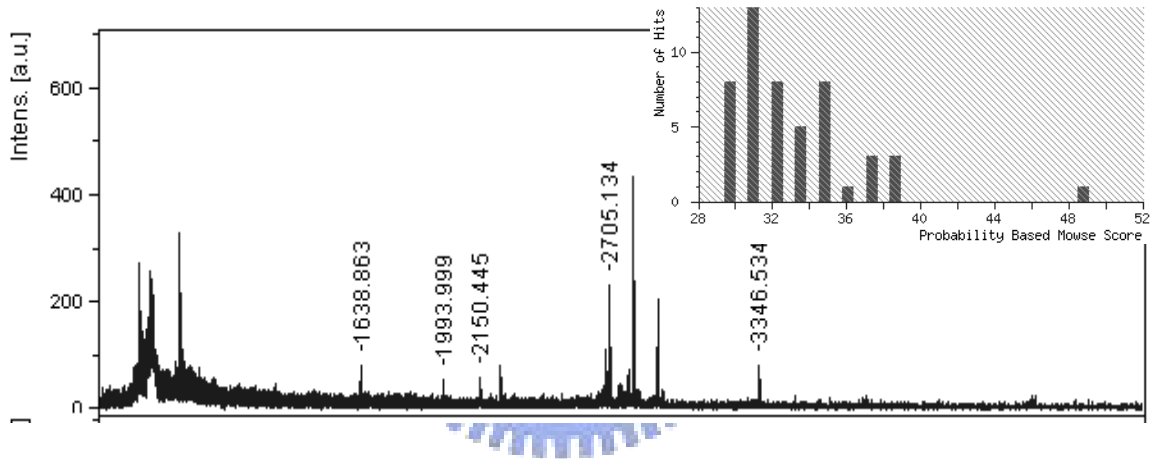


圖 5- 6、MALDI-TOF Mass 結果

圖 A-B 為 Far Western 中得到的蛋白質，經由 MALDI-TOF-MS 得到圖譜，在使用 MASCOT 軟體分析得到的結果。A 圖的結果為

【TAF6-like RNA polymerase II, p300/CBP-associated factor (PCAF)-associated factor, 65kDa, isoform CRA_c】，B 圖結果為

【T-box 3 (ulnar mammary syndrome), isoform CRA_b [Homo sapiens]】

5-3 IP & Mass

在免疫沉澱的實驗中，分別做了額外添加(圖 5-7 之 IP1-1)及沒有額外添加(圖 5-7 之 IP1-2) securin 的實驗，圖 5-7 中 A、B 為不同批次免疫沉澱的結果，因為分別將 A、B 的膠體做過遠西方墨點法後發現，其上有幾個點的確與 securin 有反應(附錄十)，所以將這些點取出，跑 MALDI-TOF 確認為何種蛋白質，取了 A1-A10 以及 B1-B5 共 15 個點，A1-A10 分子量依序約為：11kD、15kD、17kD、23kD、25kD、30kD、35kD、40kD、43kD、50kD。另外 B1 至 B5 的分子量依序為這十五個點的分子量依序為：11kD、15kD、17kD、23kD、30kD，如表 5-2。將這十五個點取下跑質譜儀的結果如圖 5-8~圖 5-11，其中我們取其資料比對分數較高者，且根據 securin 有關的蛋白質皆與細胞週期調控有關係，篩選出三個最有可能與 securin 作用的蛋白質，這三個蛋白質分別是 A1/B1-Histone H4(分子量為 11.3kD，與電泳實驗的預估值 11 kD 接近)、B4-Bcl2A1(分子量為 20kD，與電泳實驗之預估值 23 kD 接近)、B5-cytoskeleton K1(分子量為 67 kD，與電泳實驗預估值 30 kD 有落差，所以此蛋白質在質譜分析的過程有受到汙染的可能)(圖 5-8)。在其餘蛋白質中，A2、A3 分析的結果為免疫球蛋白 IG heavy chain 片段，但 IG heavy chain 分子量為 55 kD，且其質譜分析的結果分數都偏低，所以可信度較低；A4 為 DJ1 蛋白質，是 DnaJ 的同源蛋白，在文獻中以證明能與 securin 有交互作用；A5 則為已申請專利但尚未命名，且未知功能之蛋白質；B2 及 B3 分別為 Dopamine receptor D 片段、RNA terminalphosphate cyclase-like1 片段，雖然分數較低，我們仍針對其可能調控機制作探討(第六章)，其餘蛋白質則因濃度不足，無法得到有效的分析結果。

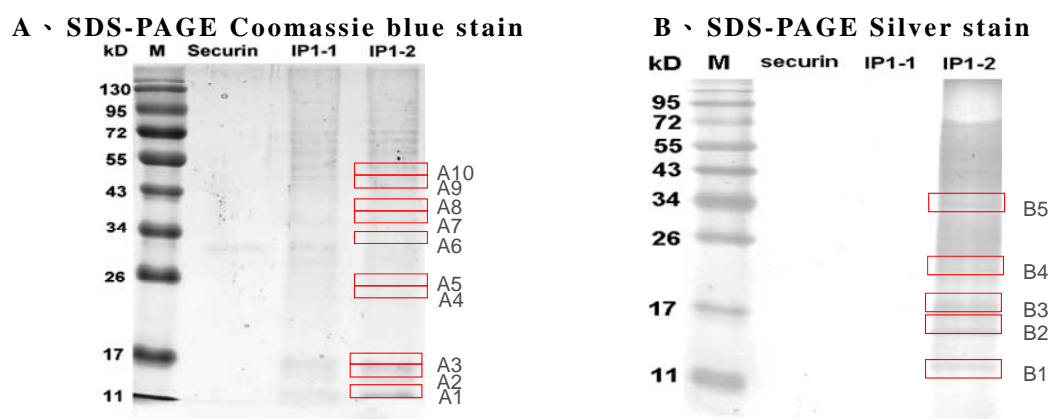


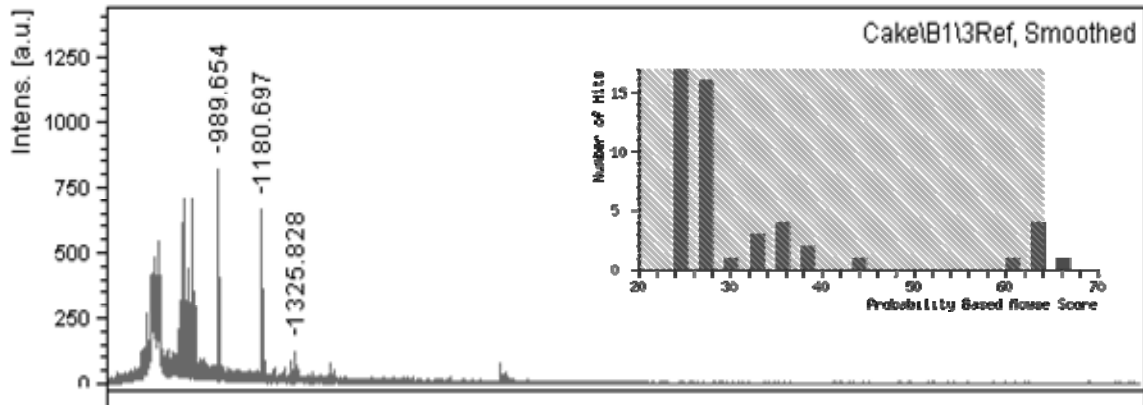
圖 5- 7、免疫沉澱結果

圖 A 及圖 B 為不同批次免疫沉澱的結果，M：marker，Securin：實驗室製備重組 securin 蛋白，IP-1：添加重組 Securin 做免疫沉澱的結果，IP1-2：無添加重組 securin 蛋白做免疫沉澱的結果。紅色方框選取的蛋白質皆被取出，以 MALDI-TOF Mass 測定為何種蛋白質，分析時特別著重在兩次免疫沉澱皆有出現的蛋白質。

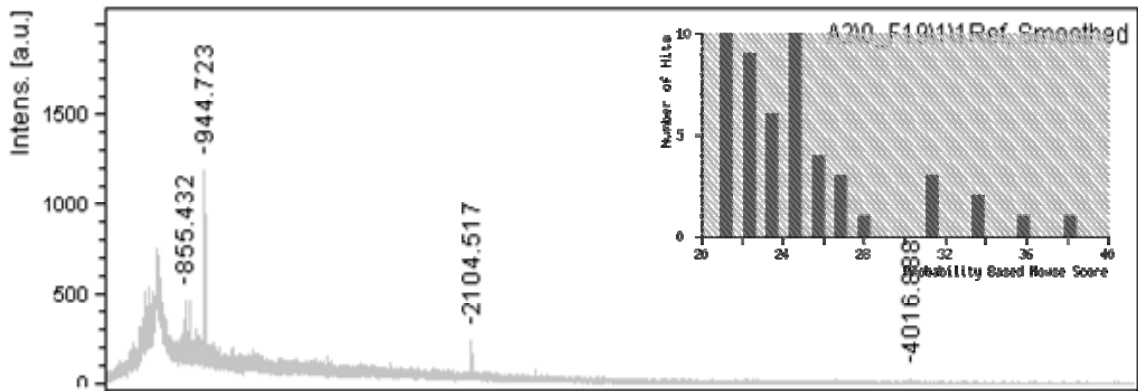
編號	分子量(約略值)
A1	11 kDa
A2	15 kDa
A3	17 kDa
A4	23 kDa
A5	25 kDa
A6	30 kDa
A7	35 kDa
A8	40 kDa
A9	43 kDa
A10	50 kDa
B1	11 kDa
B2	15 kDa
B3	17 kDa
B4	20 kDa
B5	30 kDa

表 5- 2、免疫沉澱中與 securin 作用蛋白質之分子量與等電點

A1 及 B1 : Histone H4



A2 : IG Heavy Chain (Fragment)



A3 : IG Heavy Chain (Fragment)

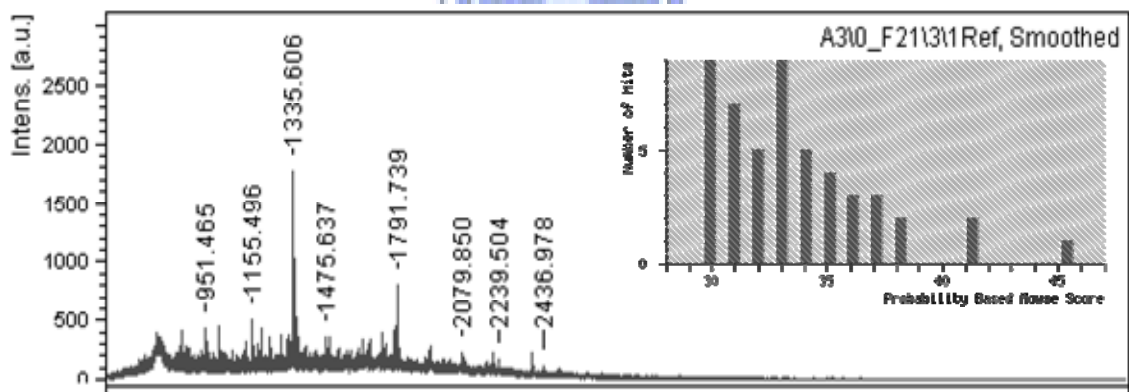
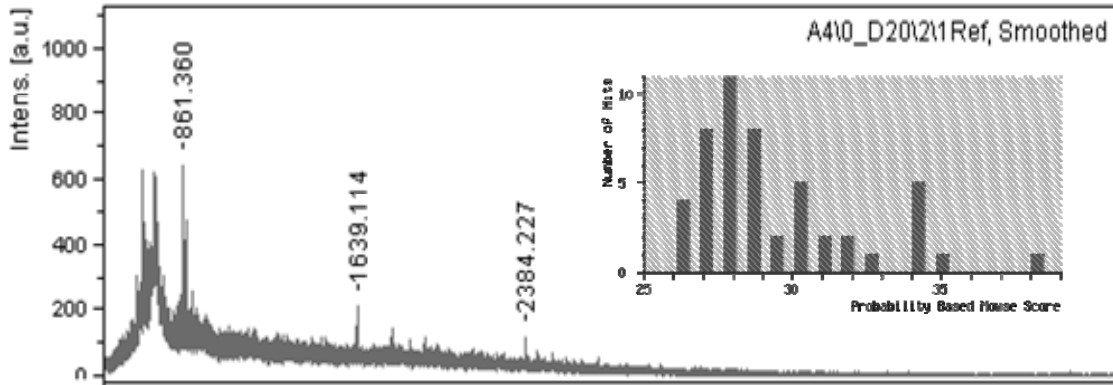


圖 5- 8、免疫沉澱蛋白質經由質譜分析結果 A-1

此為蛋白質經由 MALDI-TOF-MS 得到圖譜，再使用 MASCOT 軟體分析得到的結果。A1 為【Histone H4 [validated] – human】，A2 及 A3 為【IG Heavy Chain (Fragment)-Human】。

A4 : DJ-1 protein



A7 : Sequence 149 from Patent WO03048202

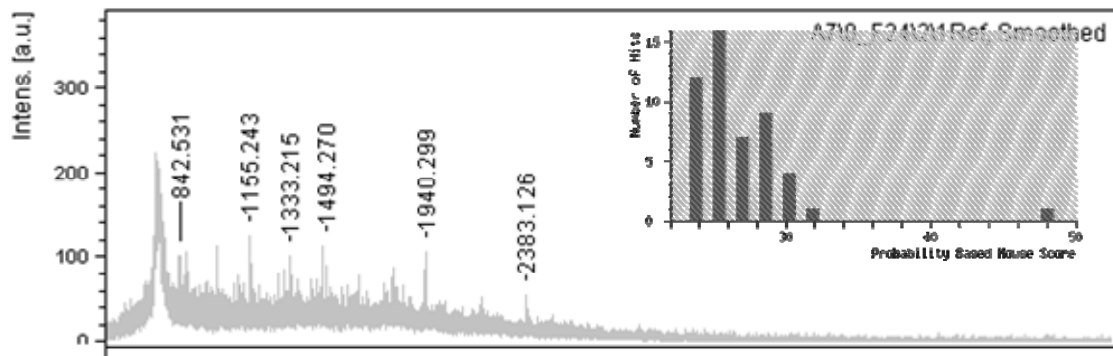
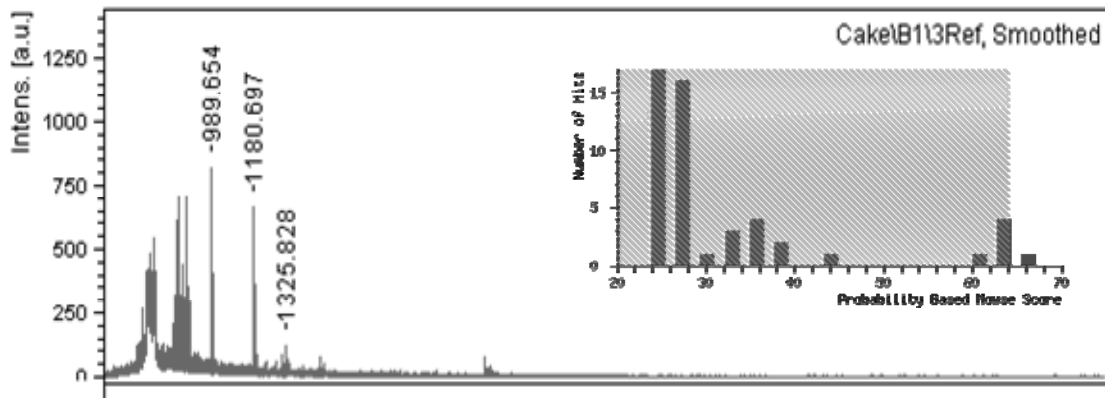
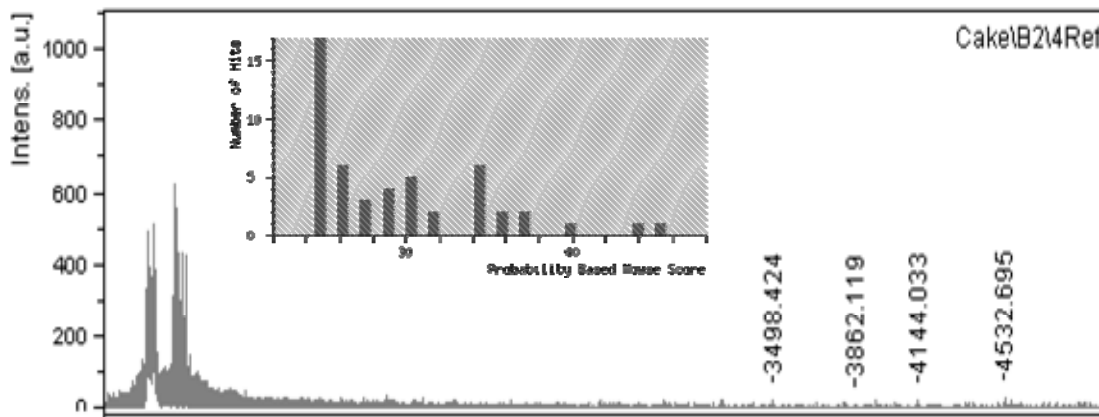


圖 5-9、免疫沉澱蛋白質經由質譜分析結果 A-2
此為蛋白質經由 MALDI-TOF-MS 得到圖譜，再使用 MASCOT 軟體分析得到的結果。A4 為【 DJ-1 protein – human】，A7 為【 Sequence 149 from Patent WO03048202-Human】。

B1 : Histone H4



B2 : AY671463/Dopamine receptor D4 (Fragment)



B3 : RNA terminal phosphate cyclase-like 1 (Fragment)

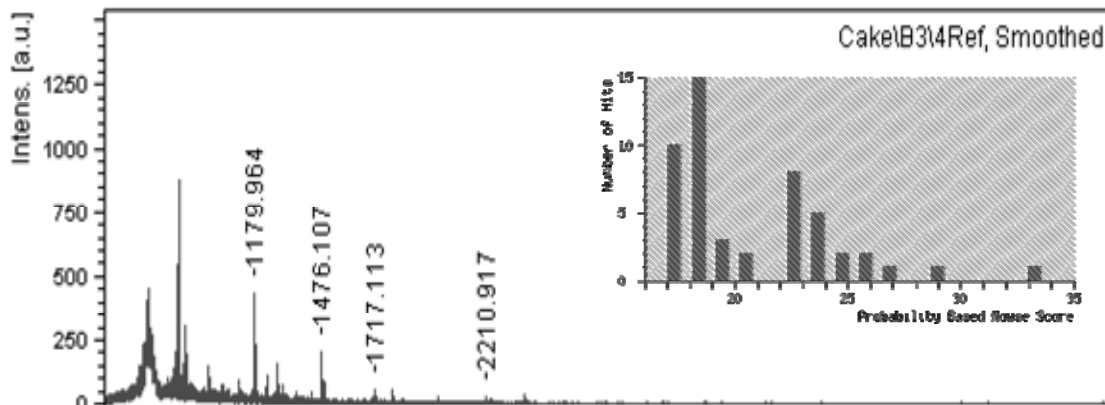
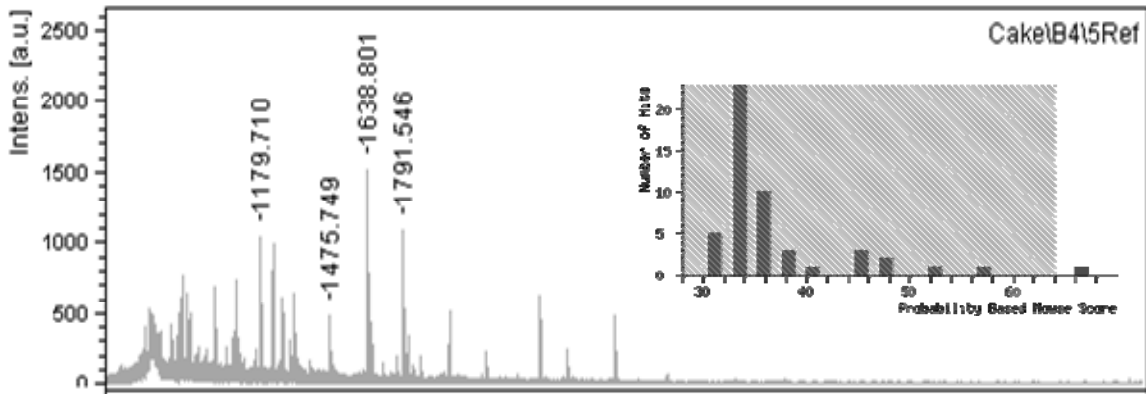


圖 5- 10、免疫沉澱蛋白質經由質譜分析結果 B-1

此為蛋白質經由 MALDI-TOF-MS 得到圖譜，再使用 MASCOT 軟體分析得到的結果。B1 為【Histone H4 [validated] – human】，B2 為【Dopamine receptor D4 (Fragment)-Human】，B3 為【RNA terminal phosphate cyclase-like 1 (Fragment)-Human】。

B4 : BCL2A1



B5 : KRT1

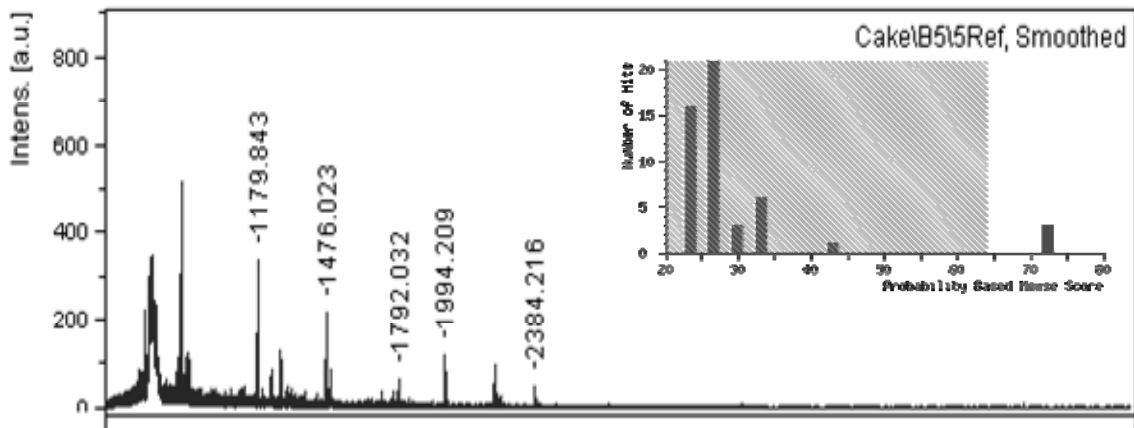


圖 5- 11、免疫沉澱取得蛋白質，經由質譜分析得到的結果 B-2
此為蛋白質經由 MALDI-TOF-MS 得到圖譜，再使用 MASCOT 軟體分析得到的結果。B4 為【 Bcl-2 related – human】，B5 為【 Keratin, type II cytoskeletal 1 (Cytokeratin-1) (CK-1) (Keratin-1) (K1) (67 kDa cytokeratin) (Hair alpha protein)-Human】。

5-4 酵母菌雙雜交系統(Yeast two hybrid)

在本實驗使用的 Yeast Two Hybrid 系統，Securin 被嵌入至 pSOS 載體，cDNA library 則嵌入 pMyr 載體，若兩載體上的基因轉錄後的蛋白質會有交互作用，則菌落得以在 37°C 的 SD-2(-UL) galatose plate 上生長。圖 5-9 為兩個符合此條件的菌落，我們利用系統中所附的 pSOS 載體引子進行 PCR，可以看到兩菌落皆含有 Securin 的 DNA 片段在 800 bp 左右的位置。另外以系統所附的 pMyr 載體引子進行 PCR，發現此兩蛋白質的基因片段約在 700 bp 及 900 bp，我們將這兩株菌送定序的結果分別為 Homo sapiens selenoprotein W、ribosomal protein S3A，但都有 Frame Shift 的現象，所以這兩株菌是偽陽性的結果，定序結果如附錄六-九。

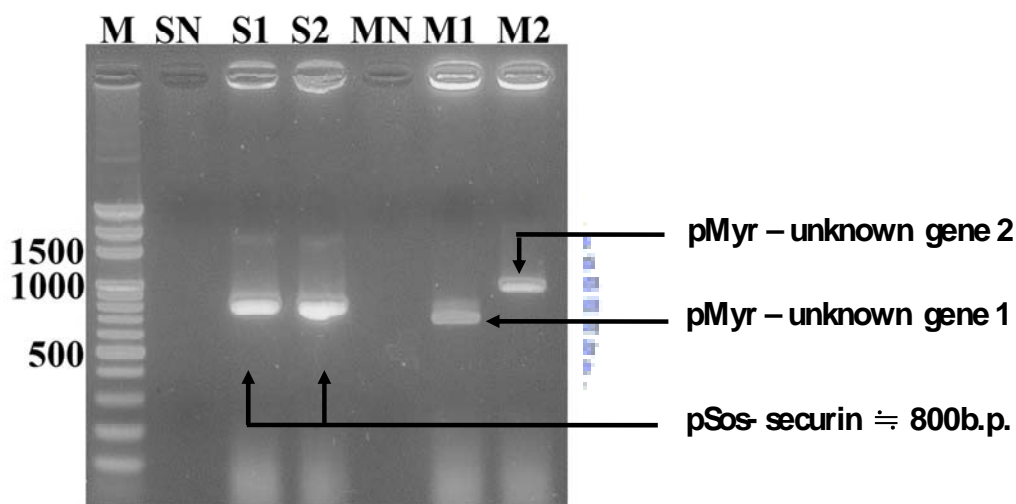


圖 5- 12、Yeast two hybrid

本圖為雙雜交系統篩選的結果。將培養盤上長出的兩顆菌株分別使用不同載體之引子 (primer) 進行聚合酶連鎖反應 (PCR)，確認菌株中含有 securin，也得知此兩個未知基因片段大小約為 700 及 900 bp。

5-5 ITC

實驗中我們利用物理的方式-恆溫滴定微卡洛里計，來確認蛋白質之間的作用。實驗中我們將 p53 滴定到 securin 中，共 20 滴，在滴定終點時 p53 莫耳數約為 securin 的兩倍。滴定熱量圖如圖 5-11，可以看到從第一滴 p53 反應熱就非常大，在五滴之內即達到作用力飽和的狀態，所以 p53 與 securin

之間的結合力是非常大的，經過計算得到平衡常數 K 值為： $3.11 \times 10^{11} \text{ M}^{-2}$ 。由實驗飽和的情況也可計算出 $n = 0.5$ ，意即 p53 與 securin 之間的鍵結個數比為 $\text{p53}:\text{securin} = 1:2$ ， $\Delta G = -14.7 \text{ kcal/mol}$ ， $\Delta S = 1.5 \text{ kcal/Kmol}$ ，由各常數都可看出這兩個蛋白質之間的自發反應能力非常大，作用力也很大。

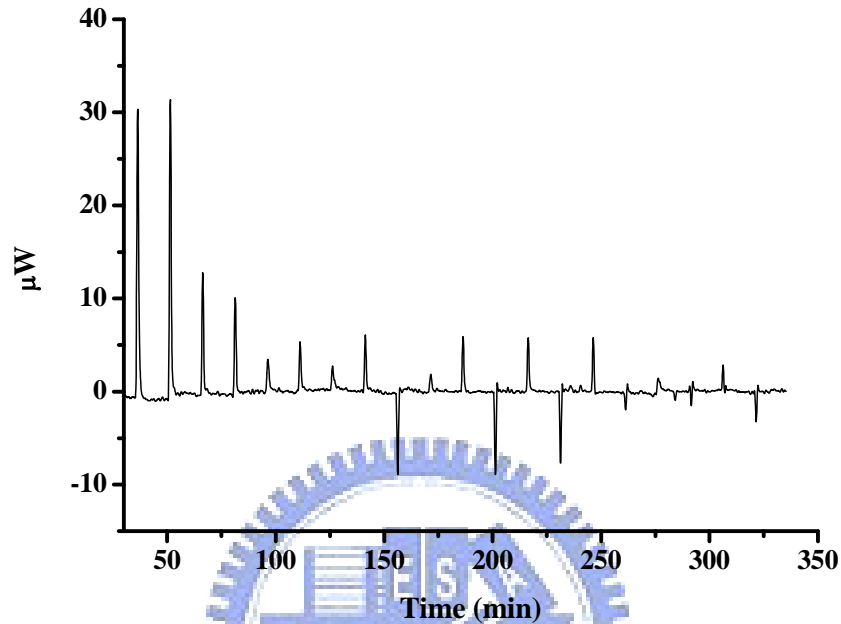


圖 5- 13、ITC p53 滴定 securin 圖

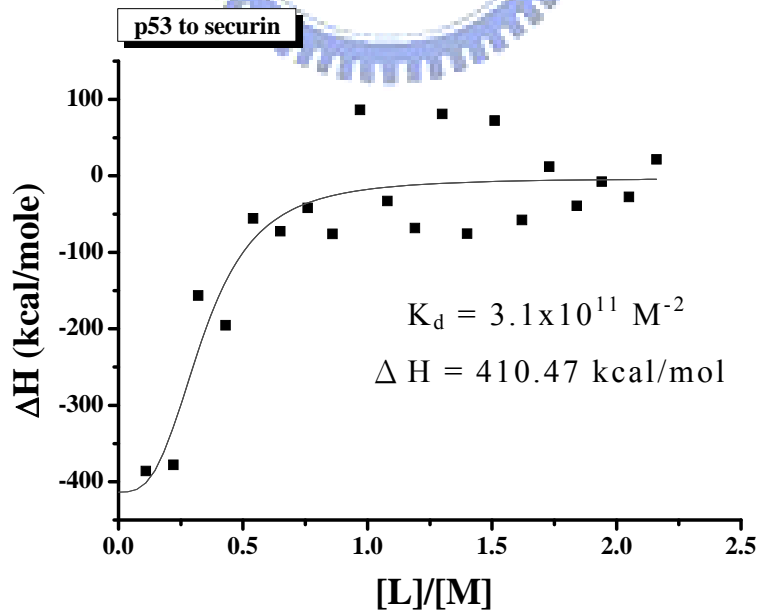
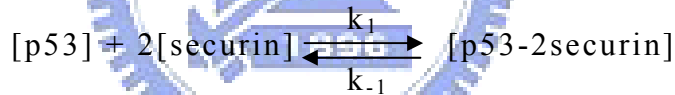


圖 5- 14、ITC 之 p53-securin 作用力分析圖

5-6 Far Western 確認 p53 及 securin 作用

在先前的研究中以 phage play 篩選出 p53 與 securin 之間有交互作用，且進一步使用免疫沉澱及 pull down assay 證實 p53 與 securin 有交互作用 [40]，我們利用實驗室遠西方墨點法同樣的也證實兩個蛋白質之間有交互作用。在圖 5-13 中，我們使用 securin 作為正控制組，BSA 作為負對照組，可以清楚的看到，在 Far Western 實驗中，與 securin 培養過後，僅 securin 及 p53 有呈色。

我們進一步利用遠西方墨點法來計算兩個蛋白質之間作用力大小。圖 5-14 為 p53 由右至左作序列稀釋(120 μg 、60 μg 、30 μg ……依此類推)，與 securin 作遠西方墨點法的結果，因為不同量的 p53 與 securin 結合的程度不同，經由 securin 一級抗體、二級抗體-HRP 呈色後，可以看到強度也有所不同，將 p53 濃度與呈色強度作圖後，縱軸為呈色強度，相當於 p53-securin 的量，橫軸為 p53 量，securin 濃度絕大於 p53，因此可由 Y 軸飽和強度 1/2 處得到 X 為 2.2×10^{-12} ，可得到平衡常數 $K_m = K_d = 2.2 \times 10^{-12} \text{ M}^2$ 。



$$[\text{P53-2securin}] = \frac{[\text{securin}]^2[\text{p53}]}{K_m + [\text{p53}]}$$

$$K_m = \frac{k_{-1}}{k_1} = K_d$$

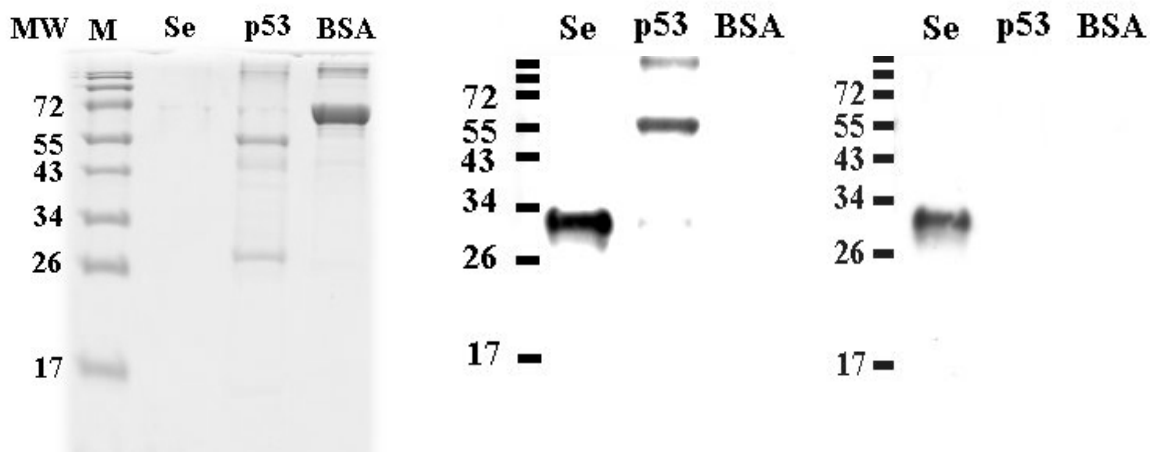


圖 5- 15、Far Western 證明 p53 與 securin 有交互作用

M: marker, Se: securin, BSA 作為負對照組。A 圖為 15%SDS PAGE, B 圖為 Far western 結果, 顯示 p53 的確有與 securin 作用, 所以在 p53 的位置上, 能被 securin 一抗辨認進而呈色。C 圖作為對照組, 因轉漬膜沒有與 securin 培養所以在 p53 的位置上沒有呈色。另外 A 圖中 securin 看不到的原因是, 在 securin 一抗為 1/1000 的條件下, securin 本身濃度要低於 0.04 μ g 左右, 才能在西方墨點法中不會有過曝的現象。

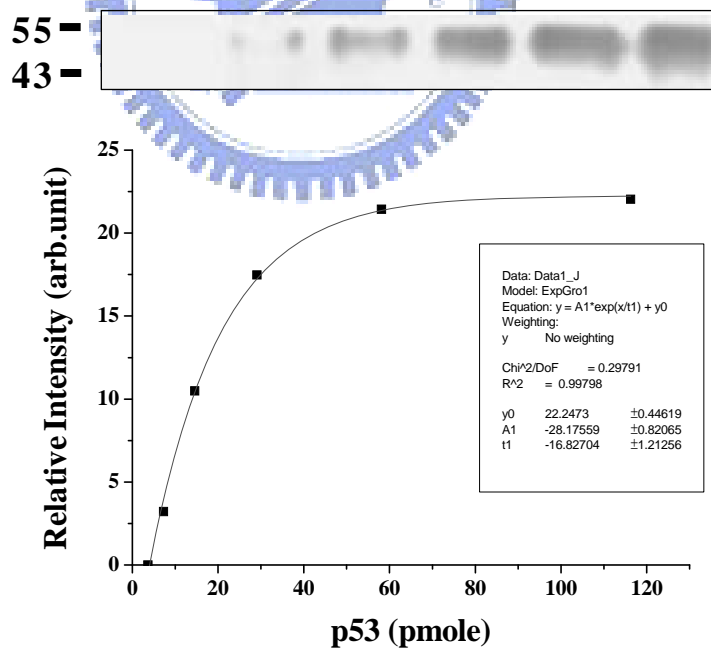


圖 5- 16、由 Far Western 實驗估計 p53 與 securin 作用常數

圖為西方墨點法結果, 將 p53 由右到左作序列稀釋, 以 SDS PAGE 分離後轉漬到 PVDF 膜上, 再依序與 securin、securin 一抗(mouse)、IgG-anti-mouse 培養後呈色結果。

第六章 討論

6-1 Securin 可信度及蛋白質純度

透過聚合酶連鎖反應(PCR)的確認，我們所轉殖的大腸桿菌中，的確含有 securin 的基因片段，且經由 IPTG 誘導，菌株也能大量製造 Securin。從上清液及內涵體的電泳膠我們也可看出，內涵體的純度非常高，將此內涵體經由實驗室的準靜態熱透析平衡法摺疊後，成為自然態的 securin 蛋白質。

6-2 文獻搜尋與 Securin 作用的蛋白質

在文獻搜尋中，共找到十一個與 Securin 作用的蛋白質，大多是利用免疫沉澱以及酵母菌雙雜交系統得到的結果，少數是利用電子顯微鏡或晶片實驗得到的結果，將其名稱、分子量以及篩選出來的實驗方式列出如表 6-1。在這些蛋白質當中，HSJ2(DnaJ)的細胞質同源蛋白也在我們的免疫沉澱的結果當中(圖 5-7 及圖 5-9 的 A4 蛋白質)，其他有許多蛋白質的分子量與免疫沉澱中得到的蛋白質是非常相近的，像是 ribosomal S10 蛋白質與免疫沉澱中的 A3 分子量皆為 19 kDa 左右，Separase 與 A4 蛋白質皆為 23 kDa 左右，Cdk2 與 A5 蛋白質分子量在左右，還有 p53 與 A10 蛋白質都在 50 kDa 左右大小，沒有在免疫沉澱實驗中分離、分析出這些蛋白質的原因，可能是因為不同蛋白質的分子量太過接近且濃度低於我們這次索取的蛋白質，所以無法分離出來。

表 6- 1、已知與 securin 有作用蛋白質			
蛋白質	分子量	實驗方式	參考資料
P53	53 kD	1. Pull-down Assay	[40]
PBF = PTTG binding factor	20 kD	1. Pull-down Assay 2. Immunoprecipitation 3. Yeast two hybrid	[41,42]
Cdk2/Cdc28	25.9 kD	1. Immunoprecipitation	[13]
Cdc20	54.7 kD	1. Yeast two hybrid 2. Pull-down assay 3. Immunoprecipitation	[43]
Ku 70/80 heterodimer	Ku70:69.8 kD Ku (p70/p80) =82.7KD	1. Two hybrid system 2. Immunoprecipitation	[23]
PP2A	56 kD	1. Immunoprecipitation 2. Yeast two hybrid	[45]
separase	23.3 kD	1. Immunoprecipitation 2. EM	[45]
Ribosomal S10	18.9 kD	1. Pull-down Assay 2. Immunoprecipitation	[47]
HSJ2 (DnaJ)	26.9 kD	1. Pull-down Assay 2. Immunoprecipitation	[47]
SP1	9.6 kD	1. Immunoprecipitation 2. ChIP	[48]
MEK1	43.4 kD	1. Immunoprecipitation	[49]

6-3 與 Securin 作用蛋白質功能探討

文獻搜尋的結果顯示，目前與 Securin 有確定交互作用的蛋白質，都與細胞週期調控有關，依這些蛋白質的角色，可分為三部分討論：染色體的分離、細胞凋亡、DNA 修復及轉錄，參與細胞染色體分離的蛋白質有 Separase、Cdc2228、Cdc20、PP2A；與細胞凋亡有

關的為 p53；ribosomal S10、HSJ2 及 Ku 蛋白則與 DNA 轉錄的活化及 DNA 修復有關。以下針對每個蛋白質說明其功能。

6-3.1 P53

P53 腫瘤抑制蛋白的功能是抑制腫瘤細胞快速增生及轉型[50]，而且與 DNA 受損後的細胞反應機制有很大的關係[51,52]。當細胞 DNA 受到損害，像是 UV 光的照射、化學藥劑的傷害等，p53 會快速的聚集到細胞核中[53]，p53 的聚集使細胞週期停留在 G1/S，使 DNA 有修復的時間[52]。p53 也是促進細胞凋亡的因子，在 1995 年的文獻中使用溫度敏感型 p53 蛋白質 (temperature sensitive p53, p53^{ts}) 做測試[54]，發現在 32 °C 時加入低濃度使 DNA 受損的化學試劑，會使內皮細胞的細胞凋亡增加，但是若在 37 °C 時，p53 失去功能的狀態下，細胞凋亡沒有明顯的誘導。在許多其他的細胞實驗中也顯示，p53 是細胞凋亡的關鍵因子[55]。

P53 與 Securin 具有互相調節的功能[40,56]，2002 年，Juan 等人使用 H1299 細胞做實驗，發現 securin 會抑制 p53 與特定 DNA 之間的結合，降低其活化特定基因表現的能力 (transactivation)，抑制 p53 在細胞凋亡的影響[1,40]。Tariq 及 Sham 在 2004 年的研究則指出，在 MCF-7 細胞中，securin 可以活化 p53 本身的轉錄及轉譯活性，使其在基因或是蛋白質的表現都增加[1]。然而 securin 也受到 p53 的調節，像是加入使 DNA 損害試劑能抑制 securin 表現，以及 securin 促進大腸直腸癌細胞的死亡，都是透過 p53 的調節[56,57]。綜合目前的研究，p53 對於 securin 的調節是利用蛋白質之間的作用，且傾向抑制 securin 表現，securin 對於 p53 的調節則是利用基因層面，影響 p53 蛋白質與特定 DNA 的結合能力，也影響 p53 本身的表現量；從這些研究中也可看出 securin 與 p53 之間的調節與 DNA 的修復緊密相關，進而影響細胞凋亡。

6-3.2 Ribosomal S10 and HSJ2 (DnaJ)

Ribosome S10 蛋白質是核糖體的組成單元之一[58]，有研究指出其與其他的抑制轉錄終止的因子有直接的作用，且的確能抑制轉錄過程的終止[59-61]。HSJ2 則屬於熱休克蛋白，是人體中與 DnaJ 同源的

蛋白質，擁有 a/b 兩種不同形態[62]，在 *In situ* 的實驗中發現 Hsc73、Hsj2、及 Hsp86 三種熱休克蛋白在齒源細胞中有表現，被認為與其他齒源細胞的發育有關[63]。

目前 ribosomal S10 及 HSJ 蛋白質與 securin 之間的相關研究，除了 1999 年 Lin Pei 利用酵母菌雙雜交系統(yeast two hybrid)篩選與 PTTG(Securin)作用的蛋白質[47]，發現不論 *In vitro* 或 *In vivo* 的方式，這兩個蛋白質都與 securin 之間有交互作用，但是至目前 2009 年，對於 securin 與這兩個蛋白質之間的調控關係尚未有進一步的發現，所以未來我們希望能建構這兩個蛋白質的表現系統，將蛋白質表現出來後，用不同的方式確認這樣的實驗結果是不是能夠重複。

6-3.3 PTTG-binding factor (PBF)

Lin Pei 及 Wenwen Chien 在 2000 年發表的文獻中指出，利用酵母菌雙雜交系統篩選出一個未知蛋白質與 Securin 有交互作用，因而命名為 PTTG-binding factor，簡稱為 PBF。此蛋白質片段大小為 179 個胺基酸(ORF)，分子量及等電點估計為 22 kDa 及 10.7[41]。作者將此基因送至 EBI 及 GenBank 做同源比對，發現其與染色體 *C21orf3* 有 92% 的相似度，此位置基因在更早之前已被發現和好幾種遺傳疾病相關。PBF 的序列中有一段極可能是細胞核定位訊號(nuclear localization signal)，所以作者測試 PBF 對於 PTTG 進入細胞核的影響，發現的確 PBF 能加速 PTTG 移動至細胞核，也進一步發現 PBF 對於 securin 活化 fibroblast growth factor 是必須的因子。研究也發現 securin 會促進 PBF mRNA 的表現，且觀察到 PBF 與 securin 在甲狀腺癌細胞皆有大量的表現，被認為與 securin 都是使癌細胞轉形的重要蛋白[42]。

綜觀以上，PBF 能夠調節 securin 進入細胞核的量，securin 又能增加 PBF 的基因表現。可能是因為一旦 securin 的表現量增加，必需伴隨著 PBF 的增加，才有足夠的能力將高量的 securin 帶入細胞核，因此 securin 刺激 PBF 的基因表現，所以兩者在甲狀腺癌細胞中都有高量的表現。

6-3.4 Cdc28 (CDK2)

Cyclin 與 Cyclin dependent kinase (Cdk)是調節細胞週期重要的因子，在哺乳動物中 Cyclin 是一家族，主要的成員有 cyclin A、B、C、D、E，每種 cyclin 都有其對應的 CDK。Cyclin 的調節可由其序列窺知一二，每種 cyclin 都有些相似的序列：cyclin box 及 destruction box，前者與 CDK 的結合有關係，後者則與 cyclin 的降解相關。細胞週期可以分為 G1、S、G2、M 四期，每個階段參與的 Cyclin-CDK 皆不同，其中 Cdk2 在 G1 期會與 CyclinE1、E2 作用，促進 DNA 複製 [64]。當細胞進入 S 期，Cyclin A 會開始表現成為主要的 Cyclin，這個動作會使 Cdk2 對受質的專一性改變 [65]。

Cdc28 是人類 Cdk2 的同源蛋白質，2002 年 Ritu 及 Orna 發現 Cdc28 會將 Pds1/Securin (Pds1 為 budding yeast 中 Securin 同源蛋白質) 磷酸化 [13]，且磷酸化的過程會使 Separase 的定位更有效率。在前文中已提及 securin 是細胞週期的把關者，主要監控細胞由 G1 進入 S 期，如圖 6-1 右圖，securin 影響染色質是否正常分裂，與 DNA damage checkpoint 有關，細胞週期中，Cdk2 主要也是在 G1 及 S 期有表現，這與 securin 調節週期相呼應，所以 Cdk2 不只利用其夥伴 cyclin E、cyclin A 來調節週期，使 securin 磷酸化也是其調控週期的機制之一。

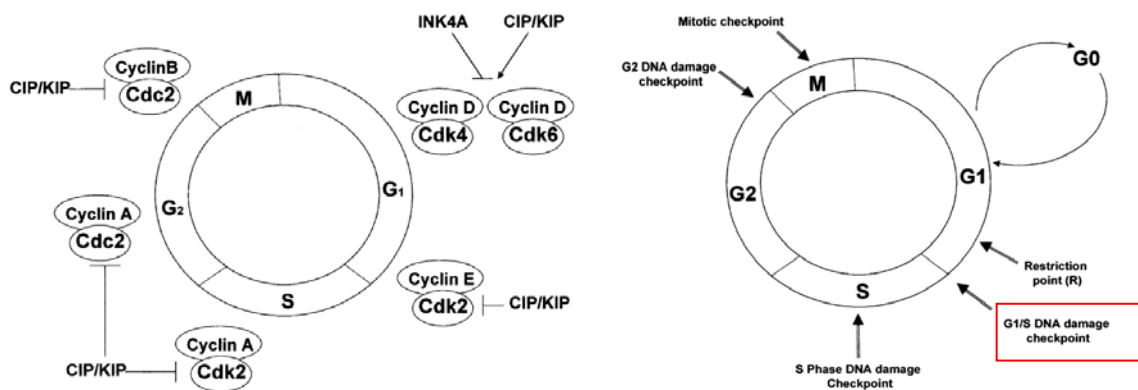


圖 6- 1、細胞週期調控因子(左)及 Check Point 示意圖(右)

細胞週期在進行的同時，受到很多不同因子的調控，如左圖所示，在 G1 期 CyclinD 會與其 kinase-Cdk4 及 Cdk6 作用，CyclinE 則在 G1 末期與 Cdk2 作用，但是進到 S 其的 Cdk2 會改變專一性與 CyclinA 作用，CyclinB 與 Cdc2 則調控 G2 進入 M 期。右圖顯示週期中需要經過哪些必須事件才能使細胞週期持續往下走，其中 Securin 與 G1/S 期的調控最有關係。

6-3.5 Cdc20

很多擔任細胞週期的重要角色，常藉由調節蛋白質的水解達到目的，其中有絲分裂後期促進因子(Anaphase Promoting Complex，簡稱 APC)，即是成員之一。APC 屬於 Ubiquitin Ligase，會辨認蛋白質使標定 ubiquitin，進而被分解，Cdc20 及 Cdh1 會分別與 APC 形成複合體，決定 APC 對受質的專一性[66,67]，APC/Cdc20 會辨認 D-box 序列(RxxLxxxxN)，APC/Cdh1 則辨認 D-box 或 KEN box 序列(K-E-N-x-x-x-D/N) 蛋白質[68]，Securin 同時擁有 D-box 及 KEN box，可想而知大多受到 APC/Cdh1 調控，在 Fission yeast 中同源蛋白也觀察到同樣的現象[69]。

APC complex 在染色體分離上的調控主要經由兩條路徑 [70,71]，第一是透過 Cyclin B(B1)，第二透過 Securin(圖 6-2)。不論是 Cyclin B 或是 securin，都是抑制 separase 去磷酸化，避免其活化(圖 6-2)[70,72]。在週期中，Cdc20、Cdh1 這兩個蛋白質也的確各自在 M 期、G1 期有高活性[70]，如圖 6-3，Cdh1 活性主要在 G1 期，其又使

APC 辨認 securin 的專一性提高，與 securin 主要的調控位於 G1 期相呼應。

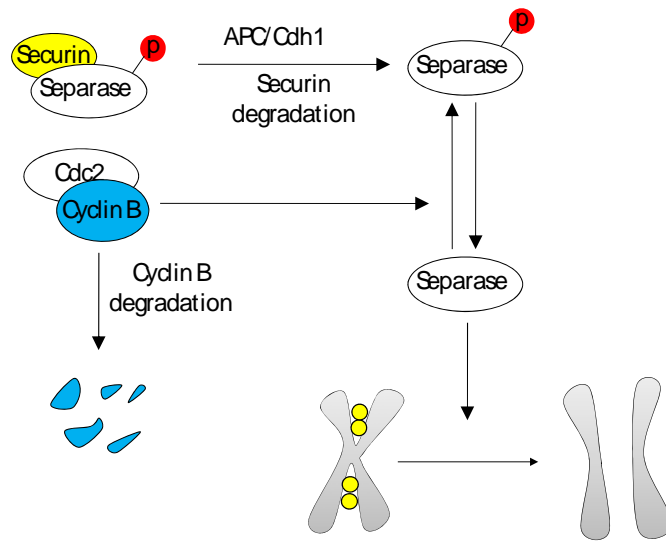


圖 6-2、APC 對於 Cyclin B 與 Securin 的調控

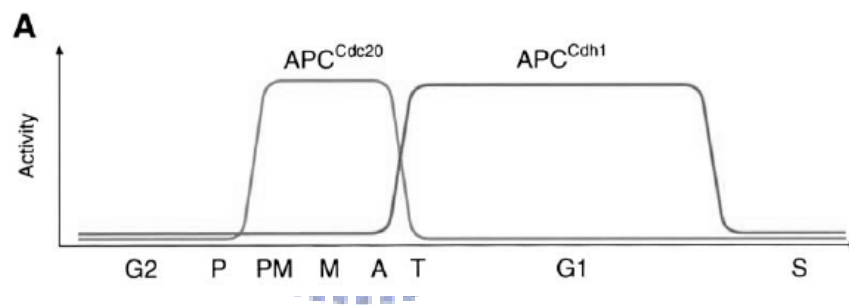


圖 6-3、APC/Cdc20 與 APC/Cdh1 細胞週期的活性分析圖

6-3.6 Ku70/80

Ku 結核蛋白由 Ku70、Ku80 兩種蛋白組成，在細胞核中有大量表現，對於 DNA 斷裂的修復有很重要的功能[73,74]。當 Ku 結核蛋白與斷裂雙股 DNA 結合後，會與一 DNA dependent protein kinase (DNA-PKcs) 形成複合體，進而啟動一連串磷酸化及蛋白質交互作用的過程，使修復 DNA 的酵素作用。Securin 在 DNA 修復上的功能是穩定 Ku 蛋白，使其不具活性，一旦有 DNA 雙股斷裂的情形，Ku 蛋白離開 Securin 而具有活性，進行 DNA 修復。

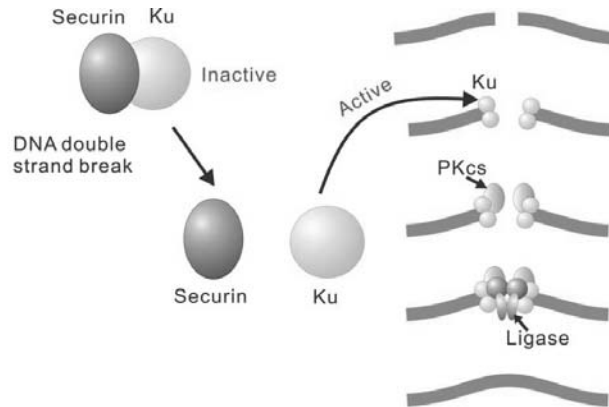


圖 6-4、Securin 與 Ku 蛋白作用示意圖

6-3.7 Phosphatase 2A (PP2A)

PP2A 屬於 Ser-Thr 去磷酸酶家族中一員，在哺乳動物細胞中是最主要的 Ser-Thr 去磷酸酶 [75,76]。PP2A 由 A、B、C 三個不同的次單元組成，C 次單元負責催化，A 次單元負責結構，B 次單元則影響受質專一性及 PP2A 的定位功能，也是主要與受質作用的部分。

PP2A 是腫瘤抑制因子，與腫瘤細胞的轉型有很大的關係，有一些 DNA 腫瘤病毒的表現蛋白質能夠取代其 B56 γ 次單元，促使細胞轉型 [75]。PP2A 實際參與很多訊息傳遞路徑，像是促進 MAPK 訊息傳遞、促使 Myc 因去磷酸化而分解等。在細胞分裂中，PP2A 也扮演重要角色，這部分可分別以其對 Sgo1 及 Securin 兩種蛋白質的影響作探討。Sgo1 家族蛋白質會保護聚凝蛋白 (cohesion)，使其次單元 SA2 免於被磷酸化，[77]，Sgo1 與 PP2A 之間的作用能讓 Sgo1 定位到著絲點上，複製好的染色體得以在適當的時間分離 [77,78]。

在 Securin 方面，2006 年 PP2A 證實與 securin 有交互作用，且 PP2A 具有穩定 securin 的功能 [44]。在此研究中也指出，securin 的分解除了經由 APC 標定，還有另外的途徑：被另一個 E3 ubiquitin Ligase-SCF 所標定，SCF 能辨別磷酸化 securin，而 PP2A 是去磷酸化酵素，能拮抗 securin 的磷酸化，使免於受到 SCF 辨認而走向分解，securin 在細胞分裂的重要性則詳述於前文。至此我們可以知道 Securin 受到的調控越見細密，在去磷酸化狀態下，securin 易於被 APC/Cdh1 標定而分解，在磷酸化狀態下卻又容易被 SCF 標定走向分解途徑，在在暗示了 Securin 多

功能調控的角色。

6-3.8 Separase

細胞染色質的分離，需要凝聚蛋白 (cohesion) 的移除，在脊椎動物中，關於此蛋白的移除經由兩條路徑[79]，一是發生在細胞前期 (prophase)，需藉由凝聚蛋白的次單元 SA2 的磷酸化達成目的；另一條則與 separase 有關，發生在細胞分裂後期 (Anaphase)，separase 是蛋白質分解酵素，可將凝聚蛋白複合體中的 Scc1 分解，使染色體得以順利分離。

Securin 對於 separase 的調控非常的重要，在介紹的部分曾經提到 securin 可藉由與 separase 的結合，抑制其活化。但若將 securin 的基因剔除，separase 並不會因此大量的活化，相反的會因為穩定性不好，功能受到影響[80]，這或許能說明為什麼 Securin 在不同的細胞，有促進增生及抑制增生的不同結果。

6-3.9 SP1

SP1 是常見的轉錄活化子，主要的功能是協助 Transcription factors IID (TFIID) 重新與 DNA 產生關聯[81]。TFIID 是一個複合體，由 TATA box-binding protein (TBP) 及很多的 TBP-associated factors (TAFs) 所組成，是基因轉錄時重要的因子，能夠讓 polymerase II 有效的結合在 DNA 序列上。在此複合體中，TAFIII30 會與 SP1 有直接的交互作用[82]。

2000 年 SP1 被發現會與 PTTG 有直接的交互作用。在 oncogene 的這篇文章中，作者檢視 PTTG (securin) 對於 DNA promoter 的影響，發現 PTTG 會使 746 個基因表現增加，且進一步確認了 PTTG 會與 SP1 有直接的交互作用，使 cyclinD3 表現高三倍，促進細胞由 G1 期進入 S[48]。至此我們可以知道，securin 不只調控細胞染色體的分離，也藉由調控細胞週期重要因子-cyclin 的表現量，維持細胞週期的穩定。

6-3.10 MEK1

繼 Lin Pei 在 1997 年發現 PTTG 後[19]，PTTG 的功能逐漸被探索，在 1998 年 PTTG 開始被發現具有促進特定基因活化的功能，作者 Africa Domingue 等人在研究中證實 PTTG 的 C 端與 binding domain 融合在一起，能促進特定基因的活化，且不論在酵母菌或哺乳動物細胞都成立

[83]。接著在 1999 年，Xun Zhang 等人有進一步相關的實驗，發現 PTTG 過量表現會使 bFGF 的 mRNA 有高的表現，但如果將 C 端的 SH3 domain 突變，bFGF 的 mRNA 表現就沒有增加的情形[3]。那麼 PTTG 促進轉錄活性的功能有受到誰的調節呢？Lin Pei-發現 PTTG 的作者，在 2000 年針對這個部份有進一步的實驗，發現 MAPK 能夠將其 Ser¹⁶² 磷酸化，這樣的磷酸化對於 PTTG 活化轉錄作用(transactivation)的能力很重要，同時也證實 PTTG 能直接與 MAPK 訊息傳遞路徑的上游蛋白-MEK1 (MAPK Kinase)直接作用[49]。這些發現不僅說明了 securin 對於基因層面的調節，也暗示了 securin 為何在許多癌症細胞中有大量的表現。細胞增生與分化常常都和細胞表面受體(receptor)接收到特定蛋白質，所引起的路徑有關，在這些路徑中，很多都包含 mitogen-activated protein (MAP) kinase cascade，所以 securin 與 MEK1 的結合可能就是癌細胞為何含有大量 securin 的原因。

6-4 Far Western 篩選與 Securin 作用蛋白之結果

在二維電泳結合 Far Western 的實驗中，我們篩選到三個極有可能與 Securin 作用的蛋白質，經由 MADI-TOF Mass 的分析，編號 1 的蛋白質為 PCAF-associated factor，編號 2 蛋白質為 Tbx3。編號 3 則因為濃度不足，所以打出的序列無法做分析。以下針對這三個可能的蛋白質做介紹。

遠西方墨點法中，編號 1(圖 5-5)的蛋白質經由質譜儀分析的結果為 PCAF(P300/CBP-associated factor) associated factor，這個因子實際上是構成 PCAF 複合體的蛋白之一。PCAF 是乙醯化酵素，其受質有 Histone H3、H4、TFIIF 等[84]。p53 也是 PCAF 受質，在 DNA 受到損害時 p53 能夠活化特定基因的轉錄[85]，在一些文獻中指出 p53 促進特定基因轉錄的能力需要其他因子的協助，像是 PCAF、CREB。這兩個因子都具有將 p53 乙醯化的能力，且乙醯化的 p53 其結合在特定基因上的能力是增加的。研究也發現以 UV 照射使 DNA 受到損害時，p53 特定位置:Lys320、Lys373 被乙醯化的程度的確大為提高。因此我們認為在 securin 的調控中，若 PCAF 確定與 Securin 作用，可能是參與 p53 的調控，與細胞凋亡或 DNA 修復相關。

編號 2(圖 5-5)為 Tbx3，是與乳腺的發育有高度相關的蛋白質，

研究發現 Tbx3 若突變，會導致乳線、手臂及卵黃囊有缺失[86]，且在尺骨乳腺綜合症中也觀察到 Tbx3 自動突變的情形。Tbx3 還與細胞凋亡 [87,88]及老化[89]調控有關。Tbx3 能壓抑與 p53 與 p19^{ARF} 表現，抑制老化[89]，Tbx3 在細胞凋亡的角色也和 p53 相衝突，扮演負調節的角色 [87]。

目前尚未有文獻指出 PCAF 與 Tbx3 這兩個蛋白質，與 Securin 之間有直接或間接的調控關係。

6-5 免疫沉澱篩選與 Securin 作用蛋白之結果

由免疫沉澱，我們篩選共 15 個膠體上的蛋白質，經由 Mass 打出圖譜做分析後，我們選擇分數較高且及週期調控較有關係的蛋白質，於是篩選三個最可能的蛋白質，分別是 Histone H4、BCL2A1 及 KRT1，另外 Dopamine receptorD4、RNA terminal phosphate cyclase-like1 蛋白也在這次的免疫沉澱結果當中，雖然分數較低，但仍有可能與 Securin 作用，其餘蛋白質為實驗中所用抗體(IgG)、未知蛋白質，或因濃度過低無法分析出結果，以下針對所篩選出的蛋白質作探討。

6-5.1 Histone H4

Histone 是核小體(nucleosome)結構形成的重要蛋白，可分為 Histone H1、H2a、H2b、H3、H4。除 H1 外，其餘四種蛋白質共同組成一個八單位的核小體，H1 則包覆在外層。在酵母菌的研究中，發現 H3 及 H4 對於八個單位核小體的形成非常重要[90]，細胞分裂的過程在活體中不斷的進行，核小體這些蛋白質都會經過很多的後修飾作用，像是磷酸化[91]、甲基化[92,93]、乙醯化[92,94-96]。其中甲基化、乙醯化被認為與 Histone H4 本身的轉錄活性有關[93,96]，另有文獻指出 H4 於癌症的關係： Histone H4 的去乙醯化，及去甲基化，是人類腫瘤細胞與癌症的特徵[97,98]。

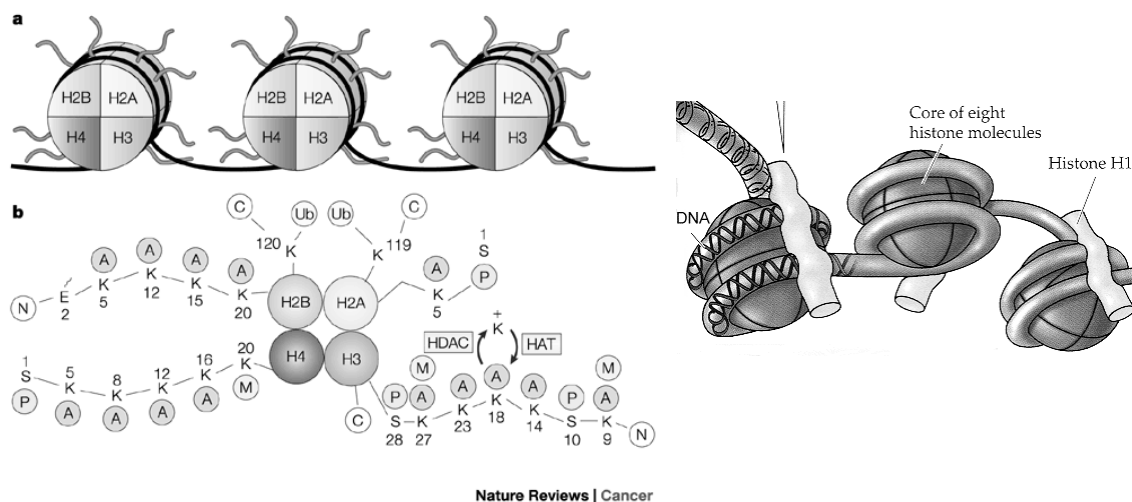


圖 6- 5、Nucleosome 形成示意圖

6-5.2 BCL2A1

Bcl2 家族蛋白質可分為兩大族群，一是抑制細胞凋亡，另一個則促進細胞凋亡。抑制細胞凋亡的族群與 Bcl2 蛋白質的序列、結構、功能有很高的相似性，Bcl2A1 即屬於這個族群[99,100]。Bcl2A1 最早由老鼠身上骨髓細胞被分離出來[101,102]，在造血細胞中表現量較高，所以當初在鼠科動物發現時認為其專一的表現在造血相關的細胞中[103]。但是在人類中，A1 不僅表現在造血細胞中，也表現在平滑肌肉細胞(Smooth Muscle Cell)、肺、小腸及睪丸[104]。Bcl2A1 可能參與發炎反應的調節，因為很多實驗證明，細胞中加入引起發炎反應的細胞分裂素(Cytokine)，如 PMA、TNF- α 等，都會使其基因表現增加，但是其作用機制目前尚不清楚。

6-5.3 KRT1(CK1)

Cytoskeleton K1(CK1)屬於細胞骨架(cytoskeleton)蛋白質，位於細胞膜上[105]，很多文獻指出，CK1 突變會造成皮膚角化病(hyperkeratosis)[106-108]。除了與皮膚疾病相關外，CK1 也與細胞免疫中的 Lectin complement pathway (LCP)有關[109]，人類的補體系統主要有三種路徑，LCP 為其中一種，主要是 MBL 蛋白質結合到外來細胞表面的糖類引起的一連串反應。研究指出，CK1 會與此路徑中的 MBL 相結合，而且當內皮細胞受到氧化壓力時，這樣的結合更為明顯[109]。另有研究發

現 CK1 蛋白質與 kininogen 之間有交互作用，此蛋白質是一種使血管舒張的激素，被發現能抑制細胞增生及血管增生[110]，研究中認為 CK1 很可能是此激素的受體(receptor)[105,111]。雖然細胞骨架蛋白的本質是維持細胞構形及參與細胞分裂，但是對於表現在細胞膜表面的 KRT1 來說，除了維持細胞結構，同時也參與了免疫與血管增生的訊息傳遞，或許還有更多的訊息傳遞路徑與其相關。

6-5.4 Dopamine receptor D4

Dopamine(多巴胺)是一種由大腦分泌的神經傳導物質，其在體內的平衡會影響人類的情緒，像是抽菸和吸毒都會使 Dopamine 上升，所以使人上癮，Dopamine 也可使用在憂鬱症病患上。除了感覺、情感上的關聯，Dopamine 近來也用來治療許多分泌失調的相關疾病，其中以帕金森氏症最為著名。可想而知的，Dopamine receptor 主要結合的蛋白質就是 Dopamine，Dopamine receptor 可分為兩大類：【D1-like 家族】以及【D2-like 家族】，D1-like 家族包括 D₁、D₅ receptor，會和 G 蛋白 - G_s 耦合再一起，活化 adenylyl cyclase，增加細胞內 cAMP 含量。D2 則和 G_{αi} 耦合，抑制 adenylyl cyclase，所以 cAMP 的含量將會下降，因此兩家族的功能是互相拮抗的，D2-like 家族包括 D₂、D₃、D₄ receptor。

Dopamine receptor 與 securin 的相關性，目前建立在促乳素瘤 (prolactinomas) 上，在 2000 年後陸續有研究指出 Dopamine receptor D2 (DRD2) 與 securin 的關係，因為在促乳素瘤中 securin 也有大量表現，而且在腦下垂體腫瘤中 Dopamine receptor 又被當作治療的標的，所以作者研究 DRD2 與 securin 的關係，發現將 DRD2 的基因 knock out 之後，securin 的 mRNA 含量不變，但是蛋白質含量卻會大量的減少[112]。雖然研究中沒有指出 DRD4(免疫沉澱篩選到蛋白質)與 securin 直接的關係，但是 DRD2 與 DRD4 常常同時表現於特定的組織，像是腎上腺皮質僅表現這兩種受器，且其功能是相對的，說明這兩個受質的共同存在，可能是為了使調控達到平衡。在我們的實驗中發現 DRD4 可能與 securin 有作用，若經進一步證明屬實，securin 可能參與促乳素瘤的形成機制，securin 蛋白質除了受到 DRD2 的調控，可能也會受到 DRD4 調控，且兩者對於 securin 的表現量影響可能是相反的。

6-5.5 RNA terminal phosphate cyclase-like 1

RNA terminal phosphate cyclase-like 1 為 RNA cyclase 的同源蛋白質，是一個將 RNA 環化的酵素，其反應示如下：



此酵素對於 tRNA splicing 的中間產物以及 U6 snRNA 的 3' 端的環化有關[113,114]，僅表現在細胞核當中，目前的文獻並沒有任何與 securin 的關聯性，且質譜分析的可信度較低，所以認為 securin 與其結合的可能性較小。Securin 在基因的調控上除了能促進特定基因的轉錄，也與 ribosom protein S10 有作用，若 securin 與 RNA Cyclase 酵素有作用，推測可能與 ribosome 的作用或形成有關。

6-5.6 免疫沉澱結果討論

由免疫沉澱篩選出的這三個蛋白質，Histone H4 參與了細胞分裂，Bcl2A1 抑制細胞凋亡，KRT1 則位於細胞膜表面，與免疫反應、血管增生的訊息傳遞相關，雖然目前尚無文獻指出其與 securin 的相關性，但這些調節都在 securin 所扮演的範圍之內。此外，DRD4 與 RNA Cyclase 在質譜分析的可信度較低，但仍可能與 securin 有作用。值得一提的是我們在免疫沉澱中也找到文獻中提及與 securin 作用的蛋白質：DJ-1 蛋白質，其與 securin 的相關性如 6-3.2 所敘述，其餘蛋白質為實驗中所使用的 IgG 抗體片段、未知蛋白質或是因濃度太低分析不出結果。

6-6 Securin 作用蛋白質網絡探討

藉由建構與 securin 作用的所有蛋白質的作用網絡，希望能更廣、更深的了解 securin 的角色及作用機制。根據文獻搜尋的結果，securin 參與的調節可分為幾個區塊，細胞分裂、細胞凋亡以及 DNA 修復或特定基因的活化，另外我們在實驗中篩選到一些新的、可能與 securin 作用的蛋白質，將文獻與實驗結果整理分析如下：

6-6.1 細胞分裂

在細胞分裂區塊中，cdc28 能將 securin 磷酸化，磷酸化能使 securin 與 separase 的結合效果更好，而 securin 對於 separase 的調節亦正亦負，

能穩定 separase 但又抑制其活化。因此 securin 本身的分解也是調控細胞週期的重點，securin 的分解大部分認為是經由 APC 標定泛素(Ubiquitin)進而分解，而 Cdh1 影響 APC 專一性使與 securin 作用，因此常以 APC^{Cdh1} 表示。但也有實驗證明另一個 E3 ligase-SCF 也能將 securin 標定泛素，有趣的是，APC^{Cdh1} 偏好辨認去磷酸化的 securin，SCF 卻辨認磷酸化的 securin。PP2A 能使 securin 更為穩定，正是因為其去磷酸化的特性拮抗了 securin 的磷酸化，減少其被 SCF 標定而分解。在細胞分裂的作用網絡中，除了上述的蛋白質，我們新篩選一個可能與 Securin 作用的蛋白質：Histone H4，此蛋白質對於核小體(Nucleosome)的形成很重要，且其後修飾作用的有無和腫瘤或癌症有很大的關係，因細胞分裂時核小體的形成是必須的，因此若 HistoneH4 確有與 Securin 作用，可能在細胞分裂的調節部分。

6-6.2 細胞凋亡

在細胞凋亡的部分，目前已知道 securin 會調節 p53 促進細胞凋亡的能力，而這次篩選到的 Bcl2A1，很明確的是抑制細胞凋亡的蛋白質，另外篩選到的 PCAF 主要功能在乙酰化，在這個建構的作用網絡中，PCAF 能乙酰化 p53 及 Histone H4，然而 p53 的乙酰化很明確的與 DNA 修復相關，因此將 PCAF 與 p53 並列。

6-6.3 DNA 修復及轉錄活性

在 DNA 修復及特定基因的轉錄活化中，Securin 也參與很多環節，在這個區塊 Securin 與 Ku70、S10、HSJ2 及 p53 有交互作用。在 DNA 修復上，Securin 最直接的就是調控 Ku70/Ku80，一旦遇到雙股 DNA 斷裂的情形，Securin 會離開此蛋白，使其協助 DNA 的修復。P53 除了促進細胞凋亡外，在細胞遭受損害時也會協助 DNA 的修復，雖然目前 securin 對於 p53 的調控在細胞凋亡的部分有較明顯的證據，我們仍將 p53 並列於細胞凋亡及 DNA 修復的區塊。另外 S10 與 HSJ2 都與特定基因的轉錄活性及轉譯相關，所以也被列在此區塊。

在此功能區塊中，我們新增四個可能與 securin 作用蛋白質：Tbx3、Histone H4、PCAF 以及 RNA cyclase，Tbx 為轉錄活化因子，Histone H4 的後修飾作用對於特定基因的活化很重要，PCAF 能夠將 Histone H3 H4

以醃化，RNA Cyclase 則與 tRNA 及 snRNA 的結構有關。

6-6.4 、其他

除了以上三個區塊，另外有三個蛋白質被獨立出來，PBF、CK1 及 DRD4。PBF 主要的功能在調節 Securin 進出細胞核，不直接參與這三類的調節，所以將其獨立在外。我們所篩選到的 Cytoskeleton K1(CK1)與血管增生及一些免疫反應有關，雖文獻中已知 Securin 能誘導血管新生，但是在這個領域的調控上，還未有相關蛋白質確定與 securin 有交互作用，所以目前也將 CK1 蛋白質獨立出來。DRD4 則是與賀爾蒙調控有關，因為目前之道與內分泌有關、又與 securin 有交互作用的蛋白質尚未被發現，所以在這裡也單獨的將它列出來。

6-6.5 結論

結合文獻搜尋及實驗結果，securin 為週期調控重要的因子，也是細胞轉型為腫瘤、癌症的重要標的，在週期調控上 securin 是細胞分裂的把關者：與 Cdk2、PP2A、separase、Cdh1 作用有關，也可能與 Histone H4 有關；securin 也影響 DNA 修復：藉由 Ku70/Ku80 蛋白作用機制；對於特定基因的轉錄活性也可能有調節的功能：透過 Tbx3、S10、HSJ2、PCAF 及 RNA cyclase。在抑制細胞凋亡部分：securin 抑制 p53 作用且可能促進反細胞凋亡因子-BC12A1 的作用。在腫瘤及癌症方面 securin 則與血管新生有關，這與我們篩選到的 CK1 蛋白質可能有關係。另外 PBF 調控 securin 在細胞核內外的分布，DRD4 則可能與 securin 的內分泌方面的調控有關。

6-7 蛋白質交互作用及作用力的大小

本實驗除建構與 securin 作用網絡，也希望能建構探討蛋白質之間作用力的實驗系統。細胞中訊息傳遞是很重要的調控機制，這樣的傳遞當然的需經由不同蛋白質之間的作用，雖然不同的蛋白質之間作用力的大小不一定與後續引起的反應強度成正比，但若針對同一個蛋白質，在不同條件下觀察與其他蛋白質作用力的變化，是有意義且能觀察出其作用機制的。舉以下兩者為例：

6-7.1 模擬細胞內不同胞器的 pH 值及鹽類環境

很多調節蛋白質都是多功能的，且存在細胞內不同的胞器中，以 securin 為例，同時存在於細胞質及細胞核中，若模擬這兩個位置的生理狀況-pH 及鹽類濃度等，可以知道在不同的環境中是否與其他蛋白質作用力有改變，這樣的改變可能與其位於不同位置，具有不同調節功能有關係。

6-7.2 具有後修飾作用蛋白質

後修飾作用對於蛋白質的正常功能非常重要，舉凡磷酸化、甲基化、乙醯化等等，都是訊息傳遞及蛋白質具有活性的重要修飾。以 securin 來說，如前文所述，它具有磷酸化及非磷酸化的狀態，而且磷酸化與否對其與 separase 的作用，以及本身被分解的機制很重要。若我們將有無磷酸化的 securin 分別偵測與其他蛋白質的作用力大小，即可知道 securin 的磷酸化是否對於特定的路徑有影響。

6-7.3 建構測定蛋白質結合力系統現況

我們希望使用 ITC 及遠西方墨點法(Far Western)兩中方式來進行作用力的測量。ITC 是使用微量滴定的熱量變化來計算其作用力，藉由其作用常數的計算及作用飽和的觀察，我們可以知道作用力的強弱，以及蛋白質結合時的莫耳比例約為多少。但是因為 ITC 的實驗操作有所限制，蛋白質濃度需大於 $5\mu\text{M}$ ，所以我們搭配遠西方墨點法進行實驗。在遠西方墨點法中，待測蛋白質在跑 SDS-PAGE 後轉漬到 PVDF 膜上，因此處於二維空間，蛋白質也依其分子量到達其相對位置，相同的蛋白質會集中在一起，所以蛋白質之間碰撞機率相對增加，解析度較高，可以補足 ITC 的不足。

在本次實驗中，我們先使用 p53 與 securin 的交互作用為範本，在 ITC 測量得到作用平衡常數 $K=3.1 \times 10^{11} \text{ M}^{-2}$ ，在遠西方墨點法實驗中，得到 $K=2.1 \times 10^{11} \text{ M}^{-2}$ ，數值非常相近，證實 p53 與 securin 之間的確有很強的作用力。未來我們依照上述方式，進一步探討 securin 在不同環境、不同後修飾狀態下的作用力改變，以及分析這些結果暗示了 securin 有甚麼樣的作用機制。

6-8 總結

綜合所有的實驗及文獻，securin 蛋白質的功能非常明確的可以分為三個區塊，染色質的分離、細胞凋亡及 DNA 調節-修復或活化基因轉錄，在圖 6-6 中可以看到，所有圓形框的蛋白質為文獻中發現與 securin 有作用的蛋白質，Cdc28、separase、PP2A、Cdh1 與染色質分裂有關；在細胞凋亡中，securin 已被證實能影響 p53 促進細胞凋亡的活性，我們則新增了 Bcl2A1 及 PCAF 蛋白質，這兩個蛋白質可能參與細胞凋亡的調控；最後是 DNA 的修復及轉錄，securin 的確能活化許多特定基因的表現，這與 MEK1、SP1 之間作用有很大的關係，在 DNA 修復上則是藉由與 Ku70/Ku80 之間的結合來調控，ribosomal S10 及 HSP27 雖然被證實與 securin 有作用，但是關於機制目前一無所知，如有作用應參與 DNA 調控，但我們需經進一步證實，在關於 DNA 調控的這塊區域，我們也篩選到 Tbx3 這個蛋白質，他是一個活化轉錄的因子，因此最可能參與 DNA 調控，其他像是 Histone H4、PCAF 及 RNA cyclase 可能參與基因的轉錄過程。另外 p53 除了與細胞凋亡有關，也在 DNA 調控占有一席之地，因為其受到刺激後能促使某些基因的大量表現，因此同時被列在細胞凋亡與 DNA 轉錄的功能中。在我們進一步的實驗中，也證明了 p53 的確與 securin 有交互作用，PCAF 又具有乙醯化 p53 功能，很可能 PCAF 與 p53、securin 之間會構成一個複合體，像 PP2A-separase-securin 一樣，securin 透過調節 PCAF 來影響 p53 活性。另外有三個蛋白質獨立在 securin 的這三個功能區塊之外，文獻指出 PBF 調控 securin 進出細胞核，另外我們篩選到兩個蛋白質，分別是 KRT 1：與血管增生相關，DRD4：Dopamine receptor，與 securin 在促乳素瘤的調控有關。

除了對 securin 的功能有更透徹的了解，我們還使用 p53 與 securin 為範本，使用兩種不同的系統來測試蛋白質之間作用力的強弱，以及鍵的個數比，尤其我們實驗室建立的方式：使用遠西方墨點法的呈色強度來計算蛋白質之間的鍵結強度，能夠精準、且高解析度的測量出蛋白質之間的作用力強弱，對於日後探討蛋白質在不同環境、不同修飾狀態下的交互作用，有非常大的助益。

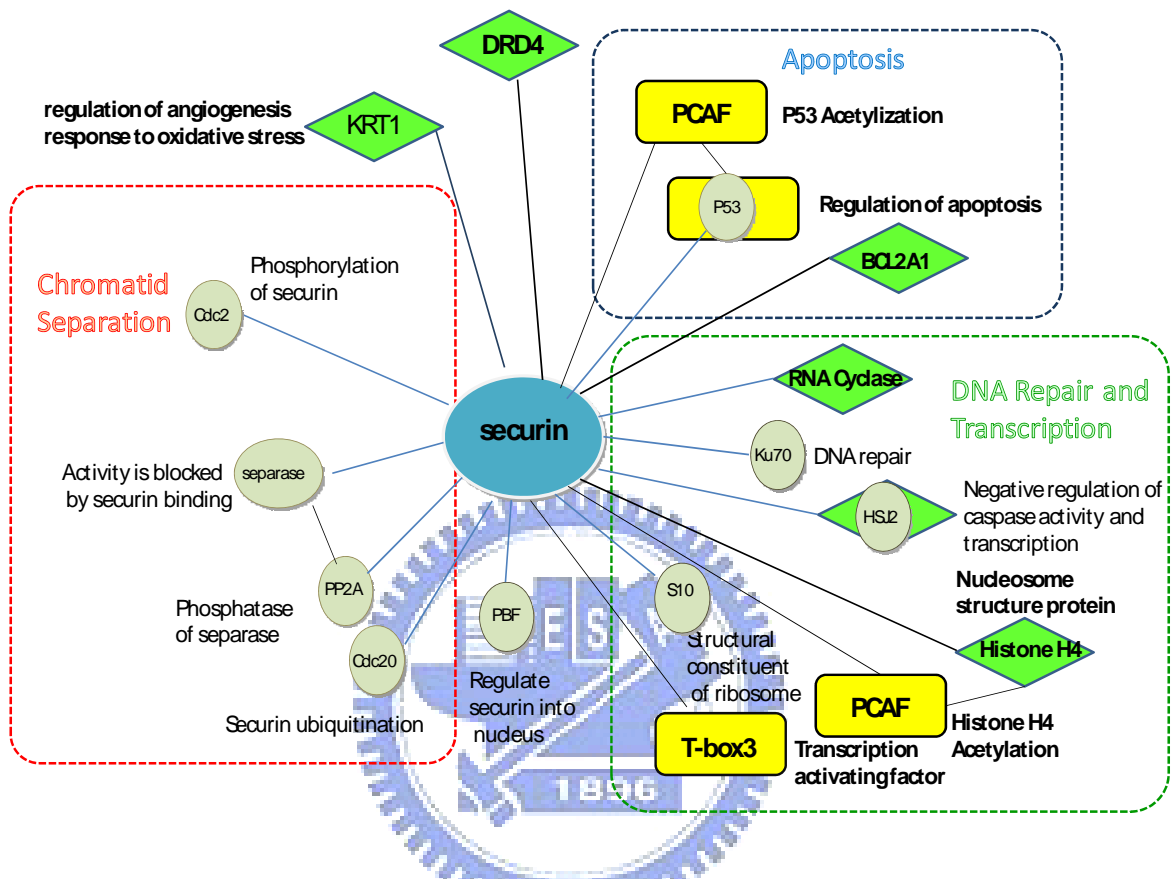


圖 6- 6、與 Securin 作用蛋白網絡圖

IP Results
 Paper search
 Far Western Results

圖中綠色菱形框為免疫沉澱實驗中篩選到可能與 securin 作用的蛋白質，黃色矩形為遠西方墨點法得到的蛋白質，其餘圓形蛋白則是在文獻中記載能與 securin 作用的蛋白質。

第七章 参考文献

1. Hamid T, Kakar S: PTTG/securin activates expression of p53 and modulates its function. *Molecular Cancer* 2004, **3**, 18.
2. Chen L, Puri R, Lefkowitz EJ, Kakar SS: Identification of the human pituitary tumor transforming gene (hPTTG) family: molecular structure, expression, and chromosomal localization. *Gene* 2000, **248**, 41-50.
3. Zhang X, Horwitz GA, Prezant TR, Valentini A, Nakashima M, Bronstein MD, Melmed S: Structure, Expression, and Function of Human Pituitary Tumor-Transforming Gene (PTTG). *Molecular Endocrinology* 1999, **13**, 156-166.
4. Run Yu SM: Oncogene Activation in Pituitary Tumors. *Brain Pathology* 2001, **11**, 328-341.
5. Rashmi P, Albert T, Leilei C, Sham SK: Molecular cloning of pituitary tumor transforming gene 1 from ovarian tumors and its expression in tumors. *Cancer letters* 2001, **163**, 131-139.
6. Solbach C, Roller M, Fellbaum C, Nicoletti M, Kaufmann M: PTTG mRNA expression in primary breast cancer: a prognostic marker for lymph node invasion and tumor recurrence. *The Breast* 2004, **13**, 80-81.
7. Carmen SaÂ ez TP, Juan J Borrero: Expression of hpttg proto-oncogene in lymphoid neoplasias. *Oncogene* 2002, **21**, 8173-8177.
8. Zhang X, Horwitz GA, Heaney AP, Nakashima M, Prezant TR, Bronstein MD, Melmed S: Pituitary Tumor Transforming Gene (PTTG) Expression in Pituitary Adenomas. *Journal of Clinical Endocrinology Metabolism* 1999, **84**, 761-767.
9. Heaney AP, Nelson V, Fernando M, Horwitz G: Transforming Events in Thyroid Tumorigenesis and Their Association with Follicular Lesions. *Journal of Clinical Endocrinology Metabolism* 2001, **86**, 5025-5032.
10. Boelaert K, McCabe CJ, Tannahill LA, Gittoes NJL, Holder RL, Watkinson JC, Bradwell AR, Sheppard MC, Franklyn JA: Pituitary Tumor Transforming Gene and Fibroblast Growth Factor-2 Expression: Potential Prognostic Indicators in Differentiated Thyroid Cancer. *Journal of Clinical Endocrinology Metabolism* 2003, **88**, 2341-2347.

11. Heaney AP, Singson R, McCabe CJ, Nelson V, Nakashima M, Melmed S: Expression of pituitary-tumour transforming gene in colorectal tumours. *The Lancet* 2000, **355**, 716-719.
12. Jung CR, Yoo J, Jang YJ, Kim S, Chu IS, Yeom YI, Choi JY, Im DS: Adenovirus-mediated transfer of siRNA against PTTG1 inhibits liver cancer cell growth *in vitro* and *in vivo*. *Hepatology* 2006, **43**, 1042-1052.
13. Cohen-Fix RAO: Phosphorylation of the mitotic regulator Pds1/securin by Cdc28 is required for efficient nuclear localization of Esp1/separase. *Genes & Dev.* 2002, **16**, 1371-1382.
14. Waizenegger IC, Gimenez-Abian JF, Wernic D, Peters J-M: Regulation of human separase by securin binding and autocleavage. *Current Biology* 2002, **12**, 1368-1378.
15. Uhlmann F: Secured cutting: controlling separase at the metaphase to anaphase transition. *EMBO Rep.* 2001, **2**, 487-492.
16. Gellert DARaM: Ku protein stimulates DNA end joining by mammalian DNA ligases: a direct role for Ku in repair of DNA double-strand breaks. *The EMBO Journal* 1998, **17**, 609-614.
17. Drewes G, Bouwmeester T: Global approaches to protein-protein interactions. *Current Opinion in Cell Biology* 2003, **15**, 199-205.
18. Phizicky E, Bastiaens PIH, Zhu H, Snyder M, Fields S: Protein analysis on a proteomic scale. *Nature* 2003, **422**, 208-215.
19. Pei L, Melmed S: Isolation and Characterization of a Pituitary Tumor-Transforming Gene (PTTG). *Molecular Endocrinology* 1997, **11**, 433-441.
20. Sham SK, Mohammad TM: Suppression of lung cancer with siRNA targeting PTTG. *INTERNATIONAL JOURNAL OF ONCOLOGY* **29**, 387-395.
21. Bernal JA, Roche M, Mendez-Vidal C, Espina A, Tortolero M, Pintor-Toro JA: Proliferative potential after DNA damage and non-homologous end joining are affected by loss of securin. *Cell Death Differ* 2007, **15**, 202-212.

22. Huang X, Hatcher R, York JP, Zhang P: Securin and Separase Phosphorylation Act Redundantly to Maintain Sister Chromatid Cohesion in Mammalian Cells. *Molecular Biology of the Cell* 2005, **16**, 4725-4732.
23. Romero F, Multon M-C, Ramos-Morales F, Dominguez A, Bernal JA, Pintor-Toro JA, Tortolero M: Human securin, hPTTG, is associated with Ku heterodimer, the regulatory subunit of the DNA-dependent protein kinase. *Nucleic Acids Research* 2001, **29**, 1300-1307.
24. Yanagida M: Cell cycle mechanisms of sister chromatid separation; roles of Cut1/separin and Cut2/securin. *Genes to Cells* 2000, **5**, 1-8.
25. Cohen-Fix O, Peters JM, Kirschner MW, Koshland D: Anaphase initiation in *Saccharomyces cerevisiae* is controlled by the APC-dependent degradation of the anaphase inhibitor Pds1p. *Genes Dev.* 1996, **10**, 3081-3093.
26. Funabiki H, Yamano H, Kumada K, Nagao K, Hunt T, Yanagida M: Cut2 proteolysis required for sister-chromatid separation in fission yeast. *Nature* 1996, **381**, 438-441.
27. Nuria Sanchez-Puig DBVARF: Human full-length Securin is a natively unfolded protein. *Protein Science* 2005, **14**, 1410-1418.
28. Boelaert K, Yu R, Tannahill LA, Stratford AL, Khanim FL, Eggo MC, Moore JS, Young LS, Gittoes NJL, Franklyn JA, et al.: PTTG's C-terminal PXXP motifs modulate critical cellular processes in vitro. *Journal of Molecular Endocrinology* 2004, **33**, 663-677.
29. Anja Hagting, 1, Nicole den Elzen, 1: Human securin proteolysis is controlled by the spindle checkpoint and reveals when the APC/C switches from activation by Cdc20 to Cdh1. 2002, 1125-1137.
30. Ramos-Morales F: Cell cycle regulated expression and phosphorylation of hpttg proto-oncogene product. *Oncogene* 2000, **19**, 403-409.
31. Collins K, Jacks T, Pavletich NP: The cell cycle and cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1997, **94**, 2776-2778.
32. Holt LJ, Krutchinsky AN, Morgan DO: Positive feedback sharpens the

- anaphase switch. *Nature* 2008, **454**, 353-357.
33. Ishikawa H, Heaney AP, Yu R, Horwitz GA, Melmed S: Human pituitary tumor-transforming gene induces angiogenesis. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 2001, **86**, 867-874.
 34. Giard DJ, Aaronson SA, Todaro GJ, Arnstein P, Kersey JH, Dosik H, Parks WP: In vitro cultivation of human tumors: establishment of cell lines derived from a series of solid tumors. *J Natl Cancer Inst.* 1973, **51**, 1417-1423.
 35. Lieber M, Smith B, Szakal A, Nelson-Rees W, Todaro G: A continuous tumor-cell line from a human lung carcinoma with properties of type II alveolar epithelial cells. *Int J Cancer* 1976, **17**, 62-70.
 36. Sundström C NK: Establishment and characterization of a human histiocytic lymphoma cell line (U-937). *Int J Cancer* 1976, **17**, 565-577.
 37. Chang C-C, Yeh X-C, Lee H-T, Lin P-Y, Kan L-S: Refolding of lysozyme by quasistatic and direct dilution reaction paths: A first-order-like state transition. *Physical Review E* 2004, **70**, 011904.
 38. N. Lynn Henry AMC, 2 William-I. Feaver, 1 David Poon, 2 P. Anthony Weil, 2, ~'3 aRDK: TFHIF-TAF-RNA polymerase II connection. *Genes Dev.* 1994, 2868-2878.
 39. Pierce MM, Raman CS, Nall BT: Isothermal Titration Calorimetry of Protein-Protein Interactions. *Methods* 1999, **19**, 213-221.
 40. Bernal JA, Luna R, Espina A, Lazaro I, Ramos-Morales F, Romero F, Arias C, Silva A, Tortolero M, Pintor-Toro JA: Human securin interacts with p53 and modulates p53-mediated transcriptional activity and apoptosis. *Nat Genet* 2002, **32**, 306-311.
 41. Chien W, Pei L: A Novel Binding Factor Facilitates Nuclear Translocation and Transcriptional Activation Function of the Pituitary Tumor-transforming Gene Product. *J. Biol. Chem.* 2000, **275**, 19422-19427.
 42. Stratford AL, Boelaert K, Tannahill LA, Kim DS, Warfield A, Eggo MC, Gittoes NJL, Young LS, Franklyn JA, McCabe CJ: Pituitary Tumor

- Transforming Gene Binding Factor: A Novel Transforming Gene in Thyroid Tumorigenesis. *Journal of Clinical Endocrinology Metabolism* 2005, **90**, 4341-4349.
43. Hilioti Z, Chung Y-S, Mochizuki Y, Hardy CFJ, Cohen-Fix O: The anaphase inhibitor Pds1 binds to the APC/C-associated protein Cdc20 in a destruction box-dependent manner. *Current Biology* 2001, **11**, 1347-1352.
44. Gil-Bernabe AM, Romero F, Limon-Mortes MC, Tortolero M: Protein Phosphatase 2A Stabilizes Human Securin, Whose Phosphorylated Forms Are Degraded via the SCF Ubiquitin Ligase. *Molecular and Cellular Biology* 2006, **26**, 4017-4027.
45. Holland AJ, Bottger F, Stemmann O, Taylor SS: Protein Phosphatase 2A and Separase Form a Complex Regulated by Separase Autocleavage. *J. Biol. Chem.* 2007, **282**, 24623-24632.
46. Viadiu H, Stemmann O, Kirschner MW, Walz T: Domain structure of separase and its binding to securin as determined by EM. *Nat Struct Mol Biol* 2005, **12**, 552-553.
47. Pei L: Pituitary Tumor-transforming Gene Protein Associates with Ribosomal Protein S10 and a Novel Human Homologue of DnaJ in Testicular Cells. *J. Biol. Chem.* 1999, **274**, 3151-3158.
48. Tong Y, Tan Y, Zhou C, Melmed S: Pituitary tumor transforming gene interacts with Sp1 to modulate G1/S cell phase transition. *Oncogene* 2007, **26**, 5596-5605.
49. Pei L: Activation of Mitogen-activated Protein Kinase Cascade Regulates Pituitary Tumor-transforming Gene Transactivation Function. *J. Biol. Chem.* 2000, **275**, 31191-31198.
50. Vogelstein B, Kinzler KW: p53 function and dysfunction. *Cell* 1992, **70**, 523-526.
51. Zambetti GP, Levine AJ: A comparison of the biological activities of wild-type and mutant p53. *The FASEB Journal* 1993, **7**, 855-865.
52. Lane DP: p53, guardian of the genome. *Nature* 1992, **358**, 15-16.
53. Hall PA, P. H. du P. Menage, R. Dover, and D. P. Lane High levels of p53

- protein in UV-irradiated normal human skin. *Oncogene* 1993, **8**, 203-207.
54. Merlo GR, Basolo F, Fiore L, Duboc L, Hynes NE: p53-dependent and p53-independent activation of apoptosis in mammary epithelial cells reveals a survival function of EGF and insulin. *The Journal of Cell Biology* 1995, **128**, 1185-1196.
55. Shaw P, Bovey R, Tardy S, Sahli R, Sordat B, Costa J: Induction of apoptosis by wild-type p53 In a human colon tumor-derived cell-line. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1992, **89**, 4495-4499.
56. Zhou Y, Mehta KR, Choi AP, Scolavino S, Zhang X: DNA Damage-induced Inhibition of Securin Expression Is Mediated by p53. *J. Biol. Chem.* 2003, **278**, 462-470.
57. Chiu S-J, Hsu T-S, Chao J-I: Expression of securin promotes colorectal cancer cell death via a p53-independent pathway after radiation. *Chemico-Biological Interactions* 2007, **170**, 153-161.
58. Collatz E, Ulbrich N, Tsurugi K, Lightfoot HN, MacKinlay W, Lin A, Wool IG: Isolation of eukaryotic ribosomal proteins. Purification and characterization of the 40 S ribosomal subunit proteins Sa, Sc, S3a, S3b, S5', S9, S10, S11, S12, S14, S15, S15', S16, S17, S18, S19, S20, S21, S26, S27', and S29. *J. Biol. Chem.* 1977, **252**, 9071-9080.
59. Friedman DI, Schauer AT, Baumann MR, Baron LS, Adhya SL: Evidence that ribosomal protein S10 participates in control of transcription termination. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1981, **78**, 1115-1118.
60. Mason SW, Li J, Greenblatt J: Direct interaction between two Escherichia coli transcription antitermination factors, NusB and ribosomal protein S10. *Journal of Molecular Biology* 1992, **223**, 55-66.
61. Nodwell JR, Greenblatt J: Recognition of boxA antiterminator RNA by the Escherichia-Coli antitermination factors NusB and ribosomal-protein S10. *Cell* 1993, **72**, 261-268.
62. Hanai R, Mashima K: Characterization of two isoforms of a human DnaJ

- homologue, HsJ2. *Mol. Biol. Rep.* 2003, **30**, 149-153.
63. Wada H, Kobayashi I, Yamaza H, Matsuo K, Kiyoshima T, Akhtar M, Sakai T, Koyano K, Sakai H: In situ expression of heat shock proteins, Hsc73, Hsj2 and Hsp86 in the developing tooth germ of mouse lower first molar. *Histochem.J.* 2002, **34**, 105-109.
64. Massague J: G1 cell-cycle control and cancer. *Nature* 2004, **432**, 298-306.
65. Hartwell LH, Kastan MB: Cell cycle control and cancer. *Science* 1994, **266**, 1821-1828.
66. Morgan DO: Regulation of the APC and the exit from mitosis. *Nat Cell Biol* 1999, **1**, E47-E53.
67. Schwab M, Lutum AS, Seufert W: Yeast Hct1 Is a Regulator of Clb2 Cyclin Proteolysis. *Cell* 1997, **90**, 683-693.
68. Pflieger CM, Kirschner MW: The KEN box: an APC recognition signal distinct from the D box targeted by Cdh1. *Genes Dev.* 2000, **14**, 655-665.
69. Yamashita YM, Nakaseko Y, Kumada K, Nakagawa T, Yanagida M: Fission yeast APC/cyclosome subunits, Cut20/Apc4 and Cut23/Apc8, in regulating metaphase-anaphase progression and cellular stress responses. *Genes to Cells* 1999, **4**, 445-463.
70. Peters J-M: The Anaphase-Promoting Complex: Proteolysis in Mitosis and Beyond. *Mol. Cell* 2002, **9**, 931-943.
71. Jeganathan KB, van Deursen JM: Differential mitotic checkpoint protein requirements in somatic and germ cells. *Biochemical Society Transactions* 2006, **34**, 583-586.
72. Holland AJ, Taylor SS: Cyclin-B1-mediated inhibition of excess separase is required for timely chromosome disjunction. *Journal of Cell Science* 2006, jcs.03083.
73. Jackson SP: Sensing and repairing DNA double-strand breaks. *Carcinogenesis* 2002, **23**, 687-696.
74. Lieber MR, Ma Y, Pannicke U, Schwarz K: Mechanism and regulation of human non-homologous DNA end-joining. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2003, **4**, 712-720.

75. Westermarck J, Hahn WC: Multiple pathways regulated by the tumor suppressor PP2A in transformation. *Trends Mol. Med* 2008, **14**, 152-160.
76. Millward TA, Zolnierowicz S, Hemmings BA: Regulation of protein kinase cascades by protein phosphatase 2A. *Trends in Biochemical Sciences* 1999, **24**, 186-191.
77. Tang ZY, Shu HJ, Qi W, Mahmood NA, Mumby MC, Yu HT: PP2A is required for centromeric localization of sgol and proper chromosome segregation. *Developmental Cell* 2006, **10**, 575-585.
78. Riedel CG, Katis VL, Katou Y, Mori S, Itoh T, Helmhart W, Galova M, Petronczki M, Gregan J, Cetin B, et al.: Protein phosphatase 2A protects centromeric sister chromatid cohesion during meiosis I. *Nature* 2006, **441**, 53-61.
79. Nakajima M, Kumada K, Hatakeyama K, Noda T, Peters J-M, Hirota T: The complete removal of cohesin from chromosome arms depends on separase. *Journal of Cell Science* 2007, **120**, 4188-4196.
80. Jensen S, Segal M, Clarke DJ, Reed SI: A Novel Role of the Budding Yeast Separin Esp1 in Anaphase Spindle Elongation: Evidence that Proper Spindle Association of Esp1 Is Regulated by Pds1. *The Journal of Cell Biology* 2001, **152**, 27-40.
81. Pugh BF, Tjian R: Mechanism of transcriptional activation by Sp1: Evidence for coactivators. *Cell* 1990, **61**, 1187-1197.
82. Rojo-Niersbach E, Furukawa T, Tanese N: Genetic Dissection of hTAFII130 Defines a Hydrophobic Surface Required for Interaction with Glutamine-rich Activators. *J. Biol. Chem.* 1999, **274**, 33778-33784.
83. Dominguez A, Ramos-Morales F, Romero F, Rios RM, Dreyfus F, Tortolero M, Pintor-Toro JA: hpttg, a human homologue of rat pttg, is overexpressed in hematopoietic neoplasms. Evidence for a transcriptional activation function of hPTTG. *Oncogene* 1998, **17**, 2187-2193.
84. Zeng L, Zhang Q, Gerona-Navarro G, Moshkina N, Zhou M-M: Structural

- Basis of Site-Specific Histone Recognition by the Bromodomains of Human Coactivators PCAF and CBP/p300. 2008, **16**, 643-652.
85. Liu L, Scolnick DM, Trievel RC, Zhang HB, Marmorstein R, Halazonetis TD, Berger SL: p53 sites acetylated in vitro by PCAF and p300 are acetylated in vivo in response to DNA damage. *Molecular and Cellular Biology* 1999, **19**, 1202-1209.
86. Davenport TG, Jerome-Majewska LA, Papaioannou VE: Mammary gland, limb and yolk sac defects in mice lacking Tbx3, the gene mutated in human ulnar mammary syndrome. *Development* 2003, **130**, 2263-2273.
87. Carlson H, Ota S, Song YS, Chen YW, Hurlin PJ: Tbx3 impinges on the p53 pathway to suppress apoptosis, facilitate cell transformation and block myogenic differentiation. *Oncogene* 2002, **21**, 3827-3835.
88. Ito A, Asamoto M, Hokaiwado N, Takahashi S, Shirai T: Tbx3 expression is related to apoptosis and cell proliferation in rat bladder both hyperplastic epithelial cells and carcinoma cells. *Cancer Letters* 2005, **219**, 105-112.
89. Brummelkamp TR, Kortlever RM, Lingbeek M, Trettel F, MacDonald ME, van Lohuizen M, Bernards R: TBX-3, the Gene Mutated in Ulnar-Mammary Syndrome, Is a Negative Regulator of p19ARF and Inhibits Senescence. *J. Biol. Chem.* 2002, **277**, 6567-6572.
90. Ling X, Harkness TA, Schultz MC, Fisher-Adams G, Grunstein M: Yeast histone H3 and H4 amino termini are important for nucleosome assembly in vivo and in vitro: redundant and position-independent functions in assembly but not in gene regulation. *Genes Dev.* 1996, **10**, 686-699.
91. Woodland HR: Modification of stored histone-H3 and histone-H4 during the oogenesis and early development of xenopus-laevis. *Developmental Biology* 1979, **68**, 360-370.
92. Waterborg JH, Fried SR, Matthews HR: Acetylation and methylation sites in histone H4 from *Physarum polycephalum*. *European Journal of Biochemistry* 1983, **136**, 245-252.
93. Wang H, Huang Z-Q, Xia L, Feng Q, Erdjument-Bromage H, Strahl BD,

- Briggs SD, Allis CD, Wong J, Tempst P, et al.: Methylation of Histone H4 at Arginine 3 Facilitating Transcriptional Activation by Nuclear Hormone Receptor. *Science* 2001, **293**, 853-857.
94. VetteseDadey M, Grant PA, Hebbes TR, CraneRobinson C, Allis CD, Workman JL: Acetylation of histone H4 plays a primary role in enhancing transcription factor binding to nucleosomal DNA in vitro. *Embo Journal* 1996, **15**, 2508-2518.
95. Turner BM, O'Neill LP, Allan IM: Histone H4 acetylation in human cells Frequency of acetylation at different sites defined by immunolabeling with site-specific antibodies. *Febs Letters* 1989, **253**, 141-145.
96. Oliva R, Mezquita C: Histone H4 hyperacetylation and rapid turnover of its acetyl groups in transcriptionally inactive rooster testis spermatids. *Nucleic Acids Research* 1982, **10**, 8049-8059.
97. Fraga MF, Ballestar E, Villar-Garea A, Boix-Chornet M, Espada J, Schotta G, Bonaldi T, Haydon C, Ropero S, Petrie K, et al.: Loss of acetylation at Lys16 and trimethylation at Lys20 of histone H4 is a common hallmark of human cancer. *Nature Genetics* 2005, **37**, 391-400.
98. Marks PA, Rifkind RA, Richon VM, Breslow R, Miller T, Kelly WK: Histone deacetylases and cancer: Causes and therapies. *Nature Reviews Cancer* 2001, **1**, 194-202.
99. Lin EY, Orlofsky A, Wang HG, Reed JC, Prystowsky MB: A1, a Bcl-2 family member, prolongs cell survival and permits myeloid differentiation. *Blood* 1996, **87**, 983-992.
100. Thomadaki H, Scorilas A, Thomas Hindmarsh J: BCL2 Family of Apoptosis-Related Genes: Functions and Clinical Implications in Cancer. *Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences* 2006, **43**, 1-67.
101. Moscinski LC, Prystowsky MB: Identification of a series of differentiation-associated gene-sequences from GM-CSF stimulated bone-marrow. *Oncogene* 1990, **5**, 31-37.
102. Orlofsky A, Mark S. Berger t, Prystowsky MB: Novel expression pattern of a new member of the MIP-1 family of cytokine-like genes. 1991, **2**,

403-412.

103. Lin EY, Orlofsky A, Berger MS, Prystowsky MB: Characterization of A1, a novel hemopoietic-specific early-response gene with sequence similarity to bcl-2. *The Journal of Immunology* 1993, **151**, 1979-1988.
104. Karsan A, Yee E, Kaushansky K, Harlan JM: Cloning of a human Bcl-2 homologue: Inflammatory cytokines induce human A1 in cultured endothelial cells. *Blood* 1996, **87**, 3089-3096.
105. Mahdi F, Shariat-Madar Z, Todd RF, III, Figueroa CD, Schmaier AH: Expression and colocalization of cytokeratin 1 and urokinase plasminogen activator receptor on endothelial cells. *Blood* 2001, **97**, 2342-2350.
106. Virtanen M, Smith SK, Gedde-Dahl T, Vahlquist A, Bowden PE: Splice site and deletion mutations in keratin (KRT1 and KRT10) genes: Unusual phenotypic alterations in scandinavian patients with epidermolytic hyperkeratosis. *Journal of Investigative Dermatology* 2003, **121**, 1013-1020.
107. Tal O, Bergman R, Alcalay J, Indelman M, Sprecher E: Epidermolytic hyperkeratosis type PS-1 caused by aberrant splicing of KRT1. *Clinical and Experimental Dermatology* 2005, **30**, 64-67.
108. Virtanen M, Gedde-Dahl T, Vahlquist A, Bowden PE: Absence of exon 6 in the KRT1 gene from a patient with epidermolytic hyperkeratosis. *Journal of Investigative Dermatology* 2000, **115**, 575-575.
109. Collard CD, Montalto MC, Reenstra WR, Buras JA, Stahl GL: Endothelial Oxidative Stress Activates the Lectin Complement Pathway : Role of Cytokeratin 1. *American Journal of Pathology* 2001, **159**, 1045-1054.
110. Colman RW, Jameson BA, Lin Y, Johnson D, Mousa SA: Domain 5 of high molecular weight kininogen (kininostatin) down-regulates endothelial cell proliferation and migration and inhibits angiogenesis. *Blood* 2000, **95**, 543-550.
111. Hasan AAK, Zisman T, Schmaier AH: Identification of cytokeratin 1 as a binding protein and presentation receptor for kininogens on endothelial

- cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1998, **95**, 3615-3620.
112. Cristina C, Diaz-Torga G, Goya R, Kakar S, Perez-Millan M, Passos V, Giannella-Neto D, Bronstein M, Becu-Villalobos D: PTTG expression in different experimental and human prolactinomas in relation to dopaminergic control of lactotropes. *Molecular Cancer* 2007, **6**, 4.
113. Filipowicz W, Konarska M, Gross HJ, Shatkin AJ: RNA 3'-terminal phosphate cyclase activity and RNA ligation in HeLa cell extract. *Nucleic Acids Research* 1983, **11**, 1405-1418.
114. Genschik P, Billy E, Swianiewicz M, Filipowicz W: The human RNA 3'-terminal phosphate cyclase is a member of a new family of proteins conserved in Eucarya, Bacteria and Archaea. *Embo Journal* 1997, **16**, 2955-2967.

