

# 國立交通大學

生化工程所

碩士論文

Cyclin 家族新成員:人類 cyclin I 之選殖、摺疊與  
功能分析

Cloning, folding and function analysis of human cyclin I protein:  
a new member of cyclin family

研究生：朱學亮

指導教授：張家靖 博士

中華民國九十六年七月

## Cyclin 家族新成員:人類 cyclin I 之選殖、摺疊與功能分析

學生: 朱學亮

指導教授: 張家靖 博士

國立交通大學生化工程研究所 碩士班

### 摘要

細胞週期調節蛋白 (Cyclins) 是一群調節細胞週期的蛋白質，cyclin depend kinases (CDK) 與 cyclins 結合後，會活化 cyclins，cyclin-CDK 複合體即可調控細胞週期，而在特定之細胞時期結束後，cyclins 會經由 ubiquitin 系統降解。Cyclin I，是於 1995 年由研究學者 Nakamura T 等人所發現的一個新的 cyclin 成員，cyclin I 在 N 端有典型的 cyclin box，C 端則有幫助蛋白質降解的 PEST 序列。其 cyclin box 序列與 cyclin G、cyclin E 有高度相似性。跟一般典型的 cyclin 不同之處在於 cyclin I 的 mRNA 在有絲分裂後之組織中 (post-mitotic tissues) 大量表現，包括心臟、腦、以及肌肉細胞，並且在細胞週期中也持續表現，這亦指出了人類 cyclin I 的功能或許與細胞週期調控並無直接關聯。最近的研究指出，Cyclin I 可以藉由穩定 p21 來保護腎臟足細胞 (kidney podocytes) 免於細胞凋亡 (apoptosis)。顯示 cyclin I 的功能可能是調節其相關鍵結蛋白質之功能，因此本研究將針對其結構與其蛋白質-蛋白質間之交互作用為研究標的。在本實驗室中，我們 clone 人類 cyclin I 基因，並且利用大腸桿菌大量表現此一蛋白質，最後以逐步透析法來重新摺疊蛋白質。藉由圓二色光譜儀 (Circular Dichroism, CD) 分析，可發現 cyclin I 的二級結構大部分為  $\alpha$ -螺旋，微溫差掃描熱卡路里計 (Differential Scanning Calorimetry, DSC) 測量得知 cyclin I 屬於鬆散結構，我們利用 Far western blot 實驗，證實 cyclin I 會與 p21<sup>cip1/waf1</sup> 鍵結，因此我們推測 cyclin I 可能藉由結合 p21 來調控其活性。

# Cloning, folding and function analysis of human cyclin I protein: a new member of cyclin family

Student: Hsueh-Liang Chu

Adviser: Dr. Chia-Ching Chang

Institute of Biochemical Engineering  
National Chiao Tung University

## Abstract

Cell cycle is controlled by a serial regulation proteins, cyclin family. Cyclins are regulatory subunits of Cyclin dependent kinases (CDKs) . The Cyclin–CDK complexes regulate cell mitosis. The cyclins would be degraded at the end of each cell cycle stage via the ubiquitin system. Cyclin I (Ccn1) , a new member of cyclin family was identified in 1995 by Nakamura T. It contains a typical cyclin box at its N-terminal and it is similar to the ones of cyclin G and E. Meanwhile, it contains PEST (proline , glutamic acid , serine , threonine) sequences at its C-terminal. Unlike other cyclins, cyclin I's expression level is high in post-mitotic tissues, including heart, brain, and skeletal muscle, and it is expressed constantly during cell cycle progression. Therefore, the functions of cyclin I may be independent on the cell cycle. However, this protein has been reported that it protects podocytes to avoid apoptosis by stabilization of p21. It indicated that the function of cyclin I may be activated by interacting with other regulatory proteins. Therefore, it is important to study its structure, function, and its interactions with other proteins. In this study, we have cloned and overexpressed the recombinant protein in inclusion body of *E.coli*. We refolded this protein by stepwise thermal equilibrium dialysis. The circular dichroism spectra indicated that cyclin I is a helical major protein. However, differential scanning micro-calorimeter measurements indicated that the cyclin I is a disorder protein. Far western blot analysis showed that the cyclin I would bind with p21<sup>cip1/waf1</sup> directly, *in vitro*. It suggests that cyclin I may regulate p21's activity by direct binding.

## 謝誌

時光荏苒，歲月匆匆，兩年碩士班生涯，有苦有樂，感謝張家靖老師與師母的耐心指導，讓我學習許多實驗技巧，並且能夠成熟的思考問題。感謝劉銀樟老師以及趙瑞益老師於百忙之中撥冗，給予論文上的指導及建議，並且在實驗材料及設備上的協助，使本論文可以順利完成。

感謝健彰學長跟我分享他假日飛車去幫女朋友洗衣服的故事，讓我知道我過的很有尊嚴；感謝奕辰學長分享好人卡的故事，使我了解我是幸福的；感謝張簡學長於空閒時間與我互相切磋 AOE，讓我更加確定只會打嘴砲是沒有用的；感謝姿巨學姐在實驗上的協助以及論文編排上的幫忙，否則論文應該無法如期完成；感謝昌祐在兩年間的幫助與扶持，實驗才可以進行的如此順利；感謝佩欣學姐的加入，讓我過了兩年“超充實”的實驗生活；感謝已經畢業的輔宣學長，沒有你的論文做範本，我到現在還會害怕能否順利畢業；感謝芳馨擇善固執的態度，讓我磨出了好脾氣；感謝奕良學長 go go go，不畏生死一往無回的勇氣，讓我受益良多；感謝寶明學長和新進的小朋友們，帶給我歡樂；感謝琇民、九安兩位小朋友，雖然我也不知道要感謝什麼。

更重要的，是要感謝家人的支持，沒有你們的支持，一路走來不會這麼順遂；更感謝閃亮小琪琪的陪伴，在失意時分擔痛苦，快樂時分享喜悅，讓我可以安心的在求學路程上繼續向前進。

最後，謹以此論文，與關心我的人分享我的喜悅，謝謝大家。

# 目錄

摘要	I
Abstract	II
謝誌	III
目錄	IV
圖目錄	VII
表目錄	VIII
縮寫表	IX
第一章 序論(Introduction)	1
1-1 研究動機	1
1-2 癌症的起源	1
1-3 細胞凋亡	1
1-4 細胞週期	2
1-5 Cyclin 和 CDK	3
1-6 p21 蛋白質	4
1-7 Cyclin-CDK 複合物以及其調控路徑	4
1-8 Cyclin 除了調控細胞週期外的其他功能	4
1-9 Cyclin I	5
1-10 Cyclin I 與 cyclin G1、G2 之功能、分佈位置比較	5
1-11 內涵體	5
1-12 蛋白質摺疊	6
1-13 特定構型蛋白質	6
1-14 無特定構型蛋白質	7
第二章 實驗目的	8
2-1 利用內涵體取得大量的 cyclin I 蛋白質	8
2-2 將內涵體蛋白質再摺疊，並探討摺疊中間體的能量變化	8
2-3 探討 cyclin I 在細胞中的調控機制	8
第三章 實驗策略	9

第四章 實驗步驟 .....	10
4-1 聚合酶連鎖反應 (Polymerase Chain Reaction, PCR)與瓊膠電泳(Agarose Gel Electrophoresis) .....	10
4-2 基因轉型 (Gene Transformation) : .....	10
4-3 蛋白質小量表現 (Expression Protein in Small Scale) 與大量表現(Expression Protein in Large Scale).....	11
4-4 蛋白質的再摺疊 (Protein Refolding): .....	11
4-5 圓二色光譜儀 (Circular Dichroism, CD):.....	12
4-6 微溫差掃描熱卡路里計 (Differential Scanning Calorimeter, DSC).....	12
4-7 Far-Western Blot .....	12
4-8 恆溫滴定微卡路里計(Isothermal Titration Calorimetry, ITC) .....	13
第五章 實驗原理 .....	14
5-1 聚合酶連鎖反應 (Polymerase Chain Reaction, PCR): .....	14
5-2 DNA 定序:.....	14
5-3 蛋白質表現:.....	14
5-4 蛋白質結構:.....	15
5-5 蛋白質變性:.....	15
5-6 蛋白質摺疊 : .....	15
5-7 螢光儀(Fluoresce): .....	16
5-8 圓二色旋光光譜儀 (Circular Dichroism, CD): .....	17
5-9 微溫差掃描熱卡路里計 (Differential Scanning Calorimetry, DSC):.....	17
5-10 Far Western: .....	18
5-11 動態光散射儀(Dynamic Light Scattering, DLS) : .....	18
5-11 恆溫滴定微卡洛里計(Isothermal Titration Calorimetry, ITC).....	18
第六章 實驗結果 .....	19
6-1 pET30a-cyclin I 質體建構結果:.....	19
6-2 pET30a-Cyclin I 質體定序結果:.....	20
6-3 Cyclin I 與其他 Cyclin 序列比對結果 .....	26
6-4 大量表現 cyclin I 蛋白質:.....	28
6-5 利用摺疊中間物探討蛋白質之穩定度:.....	29

6-5-1 螢光儀分析芳香族胺基酸之穩定度 .....	29
6-5-2 圓二色旋光光譜儀測量 cyclin I 蛋白質的二級結構比例: .....	34
6-5-3 動態光散射儀與微溫差掃描熱卡路里計測量 cyclin I 蛋白質之顆粒大小 與熱穩定性: .....	41
6-6 Far Western Blot 篩選可與 cyclin I 結合的蛋白質 .....	44
6-7 ITC 量測 p21 與 cyclin I 的結合熱 .....	45
6-8 以 DisEMBL Intrinsic Protein Disorder Prediction 1.5 程式預測 cyclin I 結構. .....	47
第七章 討論 .....	49
7-1 Cyclin 的功能與蛋白質摺疊 .....	49
7-2 Zn、Ca 離子對於結構之影響 .....	49
7-3 使 cyclin I 蛋白質摺疊至自然態 .....	49
7-4 Cyclin I 為自然無特定結構的蛋白質 .....	50
7-5 自然無特定構型蛋白質與蛋白質摺疊 .....	50
7-6 Cyclin I 蛋白質二級結構主要為 helix 組成 .....	51
7-7 離子對摺疊的影響 .....	51
7-8 Cyclin I 蛋白質與 p21 蛋白質鍵結需要 Ca 離子 .....	51
7-9 推測 Cyclin I 蛋白質在細胞中所扮演的角色 .....	52
7-10 結語 .....	52
Reference .....	54
附錄 .....	62
附錄一: Refolding Buffer .....	62
附錄二: 已解出結構的 Cyclins .....	64
附錄三: 使用 Tris 緩衝液摺疊之 cyclin I 蛋白質中間物分析 .....	67
附錄四: 使用 Tris + Zn 疊之 cyclin I 蛋白質中間物分析 .....	73
附錄五: 使用 Tris + Ca 緩衝液摺疊之 cyclin I 蛋白質中間物分析 .....	78
附錄六: 使用 Tris + Zn、Ca 緩衝液摺疊之 cyclin I 蛋白質中間物分析 .....	83
附錄七: Lysozyme 蛋白質以微熱量掃描熱卡路里計量測熱相變點 .....	88

## 圖目錄

圖一	pET30a-cyclin I 質體建構結果.....	19
圖二	— 1 pET30a-cyclin I 質體以 T7 forward primer 定序結果.....	21
圖二	— 2 pET30a-cyclin I 質體以 T7 reverse primer 定序結果.....	23
圖三	— 1 Cyclin I 蛋白質以內涵體形式大量表現。.....	28
圖四	— 1 Cyclin I 蛋白質以 Tris 緩衝液摺疊中間物螢光圖，激發光為 280nm。.....	31
圖四	— 2 Cyclin I 蛋白質以 Tris+Zn 緩衝液摺疊中間物螢光圖，激發光 280nm。.....	31
圖四	— 3 Cyclin I 蛋白質以 Tris+Ca 緩衝液摺疊中間物螢光圖，激發光 280nm。.....	32
圖四	— 4 Cyclin I 蛋白質 Tris+Ca、Zn 緩衝液摺疊中間物螢光圖，激發光 280nm。..	32
圖四	— 5 Cyclin I 蛋白質在摺疊過程中芳香族胺基酸的穩定度.....	34
圖五	— 1 Cyclin I 蛋白質以 Tris 緩衝液摺疊中間物圓二色旋光光譜儀圖譜.....	36
圖五	— 2 Cyclin I 蛋白質以 Tris 緩衝液摺疊中間物二級結構比例.....	36
圖五	— 3 Cyclin I 蛋白質以 Tris+Zn 緩衝液摺疊中間物圓二色旋光光譜儀圖譜.....	37
圖五	— 4 Cyclin I 蛋白質以 Tris+Zn 緩衝液摺疊中間物二級結構比例.....	37
圖五	— 5 Cyclin I 蛋白質以 Tris 緩衝液+Ca 摺疊中間物圓二色旋光光譜儀圖譜.....	38
圖五	— 6 Cyclin I 蛋白質以 Tris+Ca 緩衝液摺疊中間物二級結構比例.....	38
圖五	— 7 Cyclin I 蛋白質以 Tris 緩衝液+Ca、Zn 摺疊中間物圓二色旋光光譜儀圖譜.....	39
圖五	— 8 Cyclin I 蛋白質以 Tris+Ca、Zn 緩衝液摺疊中間物二級結構比例.....	39
圖六	— 1 以不同緩衝液摺疊 cyclin I 蛋白質的粒徑大小.....	42
圖六	— 2 以不同緩衝液摺疊 cyclin I 蛋白質摺疊中間物的熱穩定性.....	43
圖七	— 1 far western 證明 p21 可與 cyclin I 鍵結。.....	44
圖八	— 1 p21 蛋白質與 cyclin I (Tris) 蛋白質之結合熱.....	45
圖八	— 2 p21 蛋白質與 cyclin I (Ca) 蛋白質之結合熱.....	46
圖九	— 1 以 Intrinsic Protein Disorder Prediction 1.5 程式預測 cyclin I 結構之結果.....	47
圖十	— 1 Cyclin I 調節細胞凋亡之推測示意圖.....	53



## 表目錄

表一 — 1 Cyclin I 蛋白質以 Tris 緩衝液摺疊中間物螢光比較.....	33
表一 — 2 Cyclin I 蛋白質以 Tris+Zn 緩衝液摺疊中間物螢光比較.....	33
表一 — 3 Cyclin I 蛋白質以 Tris+Ca 緩衝液摺疊中間物螢光比較.....	33
表一 — 4 Cyclin I 蛋白質以 Tris+Ca、Zn 緩衝液摺疊中間物螢光比較.....	33
表二 — 1 Cyclin I 蛋白質以 Tris 緩衝液摺疊中間物二級結構比例.....	40
表二 — 2 Cyclin I 蛋白質以 Tris+Zn 緩衝液摺疊中間物二級結構比例.....	40
表二 — 3 Cyclin I 蛋白質以 Tris+Ca 緩衝液摺疊中間物二級結構比例.....	40
表二 — 4 Cyclin I 蛋白質以 Tris+Ca、Zn 緩衝液摺疊中間物二級結構比例.....	40
表三 — 1 以不同緩衝液摺疊 cyclin I 蛋白質的粒徑大小比較.....	42
表四 — 1 以 Intrinsic Protein Disorder Prediction 1.5 程式預測 cyclin I 結構之結果.....	48



縮寫表

<b>ATP</b>	<u>A</u> denosine <u>T</u> riphosphate	腺嘌呤核苷三磷酸
<b>CD</b>	<u>C</u> ircular <u>D</u> ichroism	圓二色光譜
<b>CDK</b>	<u>C</u> yclin <u>D</u> epend <u>K</u> inases	細胞週期素依賴激酶
<b>DED</b>	<u>D</u> eath <u>E</u> ffector <u>D</u> omain	死亡受動器區域
<b>DISC</b>	<u>D</u> eath- <u>I</u> nducing <u>S</u> ignaling <u>C</u> omplex	死亡誘導訊號複合體
<b>CKI</b>	<u>C</u> DK <u>I</u> nhibitor protein	CDK 活性抑制蛋白質
<b>DLS</b>	<u>D</u> ynamic <u>L</u> ight <u>S</u> cattering	動態光散射儀
<b>DNA</b>	<u>D</u> eoxyribonucleic <u>A</u> cid	去氧核糖核酸
<b>DSC</b>	<u>D</u> ifferential <u>S</u> canning <u>C</u> alorimetry	微溫差掃描熱卡路里計
<b>DTT</b>	<u>D</u> ithiothreitol	二硫代蘇糖醇
<b>D-form</b>	Dextrorotatory isomer	右旋異構物
<b>EDTA</b>	<u>E</u> thylenedi <u>a</u> minet <u>e</u> t <u>r</u> a <u>a</u> cetates	乙二胺四乙酸
<b>ER</b>	<u>E</u> ndoplasmic <u>R</u> eticulum	內質網
<b>FADD</b>	<u>F</u> as- <u>A</u> ssociated <u>D</u> eath <u>D</u> omain	Fas 關聯死亡區域
<b>FLICE</b>	<u>F</u> ADD- <u>L</u> ike <u>I</u> nterleukin-1- <u>C</u> onverting <u>E</u> nzyme	FADD 相似白細胞間素 1 轉換酵素
<b>ITC</b>	<u>I</u> sothermal <u>T</u> itration <u>C</u> alorimetry	恆溫滴定微卡洛里計
<b>KDR</b>	Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 2	血管內皮生長因子第二型受器
<b>L-form</b>	Levorotatory Isomer	左旋異構物
<b>PCR</b>	<u>P</u> olymerase <u>C</u> hain <u>R</u> eaction	聚合酶連鎖反應
<b>pRB</b>	<u>R</u> etinoblastoma Tumor Suppressor Gene	視網膜母細胞瘤抑制基因
<b>VEGF</b>	<u>V</u> ascular <u>E</u> ndothelial <u>G</u> rowth <u>F</u> actor	血管內皮生長因子
<b>β-Me</b>	<u>β</u> - <u>M</u> ercaptoethanol	β-氫硫基乙醇

以英文字母順序排列

## 第一章 序論(Introduction)

### 1-1 研究動機

細胞的生長是經由一連串複雜的機制所調控<sup>1</sup>，如果細胞生長不正常，則會造成某些疾病，例如癌症<sup>2</sup>。目前癌症的最佳治療方法為手術切除，但是癌症不容易早期發現，很容易錯過手術可切除的時間。在癌症後期，只能消極的使用藥物或是放射線治療，然而放射線會產生嚴重的副作用，而且癌症細胞多變，所以使用藥物治療的效果也因人而異，到目前為止，並沒有藥物可以對於大部分的癌症有效<sup>3</sup>。在處理癌症細胞時，使癌症細胞細胞凋亡或是停止生長都是目前正在努力的方向。Cyclins，目前發現的功能有調控細胞週期、控制細胞分化、或是幫助細胞凋亡等功能。Cyclin I，目前發現其功能與細胞週期調控無關，但是可能與細胞凋亡有關。因此對 cyclin I 家族之了解將有助於我們對癌症治療之研究。因此我們選定 cyclin 家族蛋白質為研究之標的。Cyclin I 與一般的 cyclins 一樣，擁有典型的 cyclin box 與 PEST 序列，但是功能上確有非常大的差異，如果我們可以了解 cyclin I 的結構以及其作用模式，或許可以利用相似的方式去了解，甚至調控其他 cyclins 的作用，以幫助後續的研究。

### 1-2 癌症的起源

在生命體中，細胞可以藉有絲分裂而增加數目，並會藉由細胞分裂以及細胞凋亡來維持細胞的數目。當外在逆境造成 DNA 突變時，就可能打破這項平衡，使細胞生長不受控制而形成腫瘤，腫瘤可分為良性腫瘤以及惡性腫瘤，良性腫瘤不會擴散或侵入其它組織，但惡性腫瘤(癌症)會擴散並且轉移至其他器官，嚴重時會危害生命。癌症細胞通常具有下列幾項特性: (1) 不受細胞凋亡機制的調控 (2) 不受分裂次數的限制 (3) 可以分泌生長因子 (4) 細胞分裂速率較快 (5) 不受細胞間接觸抑制 (contact inhibition) (6) 有轉移至其他組織的能力 (7) 能促使血管新生 (angiogenesis)。目前對於癌症治療的研究主要為調控癌細胞細胞凋亡、使癌細胞停止生長、或是抑制腫瘤的血管新生<sup>4</sup>。

### 1-3 細胞凋亡

細胞死亡的路徑主要可以分為細胞凋亡 (Apoptosis) 和壞死(necrosis)<sup>5</sup>。細胞壞死指的是不受控制的細胞死亡，通常會釋放出造成發炎的細胞素像TNF- $\alpha$ 或IL-4而造成發炎等不良反應。細胞凋亡是指有計畫的細胞死亡路徑，通常不會引起發炎反應。細胞凋亡主要有兩種起始途徑，分別為內在 (inner/intrinsic/mitochondria) 路徑以及外在 (outer/extrinsic/receptor) 路徑<sup>6-11</sup>。兩條路徑最終都可以誘發細胞凋亡，雖然起始以及作

用路徑不同，不過都會牽涉到粒線體的反應。細胞凋亡在生長以及維持體內平衡扮演重要的角色，例如胚胎形成時控制增生的細胞數目，免疫反應後消除淋巴球的活性，摧毀感染、受傷等不良細胞<sup>12,13</sup>。當細胞凋亡調控缺乏時，會造成一些生理上的危害，例如癌症形成或是自體免疫疾病。啟動內在細胞凋亡路徑的因子包括有物理以及化學傷害（如紫外光、熱、高壓等）、抑癌基因以及致癌基因（c-Myc, c-Fos, p53等）的表現、DNA受損、細胞骨架的毀壞、ATP缺乏、錯誤摺疊的蛋白質堆積、以及其他的壓力因子。在受到環境逆境時，促細胞凋亡蛋白質Bcl-2家族成員Bax/Bak活化使粒線體外膜產生孔洞<sup>14</sup>，或是內質網（endoplasmic reticulum, ER）釋放Ca離子，Ca離子隨後會進入粒線體中<sup>15-17</sup>，粒線體外膜因為高濃度的Ca離子而造成膜電位改變<sup>18,19</sup>，而造成粒線體外膜的滲透能力改變，而造成了cytochrome c及其他促細胞凋亡分子的釋放，如Smac/DIABLO（second mitochondriaderived activator of caspase/direct IAP-binding protein with low pI）、AIF (apoptosis-inducing factor) 等<sup>20-23</sup>。當cytochrome c由粒線體釋放並進入細胞質（cytoplasm）時，會與Apaf-1、procaspase-9形成複合體(apoptosome)<sup>24-26</sup>，此複合體最後會活化procaspase-3並使細胞進行細胞凋亡。在外在路徑部份，細胞是藉由受器（receptor）來接受死亡訊息，當細胞接收到訊號後（例如Fas ligand），與受器相連接的蛋白質功能區FADD (Fas-associated death domain) 即可與procaspase-8 (FADD-like interleukin-1-converting enzyme, FLICE) 及procaspase-10的同源區域（death effector domain, DED），形成死亡誘導訊息複合體（death-inducing signaling complex, DISC)<sup>27-30</sup>。接著procaspase-8或10會自動活化，並活化procaspase-3，進行細胞凋亡。

#### 1-4 細胞週期

細胞可以藉者細胞分裂而複製，這是生物繁衍的基礎。近20年來，細胞週期（cell cycle）的研究為學界所重視，因為這些研究可以當作對抗癌症、疾病還有一些應用科學以及胚胎發育學的基礎。一般而言，細胞週期的進行會受到一些外在的因素影響，如養分或一些生長因子。這些外在因子可藉由一些精密的訊息傳導作用，調控細胞進行細胞週期、中斷細胞週期、分化、或是凋亡<sup>31-33</sup>。

細胞週期都可分為四部份，DNA合成的S期（DNA synthesis phase, S phase），細胞分裂的M期（cell division phase, M phase），和介於S期和M期期間的兩個G期（gap phases, G phase），G1期在M到S期中間，G2期在S期到M期中間。細胞週期的進行是由許多細胞內/外的訊號共同調節的，其中亦涉及內在基因的調控。在細胞週期進行時，有幾個檢查點（checkpoint），其中包括了G1/S期的S-checkpoint，可檢查DNA是否損壞（DNA damage checkpoint）。當DNA受到輻射或是化學藥劑損傷時，細胞生長將停在

S-checkpoint，以進行DNA修復或是細胞凋亡。而G2/M期的M-checkpoint，則會確定進行細胞分裂的準備是否完成，例如所有的染色體 (chromosome) 是否連接到紡錘體 (spindle)。前人研究指出，G1期的checkpoint是被外在的因子(生長因子等)調控，它們會決定細胞是否要繼續進行細胞週期、停留在G0期 (quiescent phase)、分化、或是凋亡<sup>34</sup>。

## 1-5 Cyclin 和 CDK

細胞週期在分子機制上，是由cyclins和cyclin depend kinases (CDKs) 複合體所調控<sup>35-39</sup>。Cyclin蛋白質是由Tim Hunt等在1983年於Woods Hole的海洋生物實驗室中 (Marine Biology Laboratory) 所發現<sup>40</sup>。CDKs是絲胺酸/蘇胺酸蛋白質激酶 (serine/ threonine protein kinases)，和cyclin結合後可活化cyclin蛋白質。哺乳動物 (Mammalian) 細胞中有數種CDK，可以分別活化特定的cyclin蛋白質<sup>41</sup>。CDK的蘇胺酸、酪胺酸 (tyrosine) 的磷酸化可以調節CDK的活性<sup>42,43</sup>。目前已知比較重要的哺乳類cyclin-CDK複合體是在M期的cyclin A、B和CDK1的複合體，以及在G1期的cyclin D，cyclin E與CDK2，CDK4/6的複合體<sup>37,44-46</sup>。在G1期第一個被活化的cyclin-CDK複合體是cyclin D-CDK4或cyclin D-CDK6 (依細胞種類)<sup>46</sup>，cyclin E-CDK2複合體則會在G1後期出現，並且帶領細胞進入S期<sup>47</sup>。當細胞進入S期時，cyclin E會被降解，而CDK2則和cyclin A結合<sup>48</sup>。最後，cyclin A-CDK1和cyclin B-CDK1會幫助細胞進入M期。Cyclin A和CDK1在G2期會結合，並且在進入M期時迅速被降解，這時的細胞調控就換成了cyclin B-CDK1。而要離開M期時，cyclin B也會被降解<sup>49</sup>。由此可知細胞週期的調控所使用的策略是 - 一個調控分子可以刺激細胞進入下一個週期，並且同時抑制其他的調控分子。舉例來說，在G1/S期之間所需的cyclin-CDK複合體，在G2/M期會被抑制。這樣可以確保細胞週期的進行是不可逆的，在checkpoint過了後，ubiquitine會降解cyclins，更加確保這是不可逆的過程<sup>50</sup>。Cyclin全都含有PEST序列，這特殊的序列可以被F box蛋白質辨認並標記，使被F box結合的蛋白質經由ubiquitination而降解<sup>51,52</sup>。

CDK抑制蛋白 (CDK inhibitor protein, CKI) 也與細胞週期的進行有關。根據CDI結構以及與CDK的親合力可以將CKIs分為兩個家族，Cip/Kip家族抑制CDK2，INK家族則是抑制CDK4和CDK6<sup>53,54</sup>，Cip/Kip家族的CKIs成員可以藉由促進cyclin-CDK的結合和/或穩定，抑制活性等來達到正調控或是負調控的效果。INK家族的CKIs抑制CDK4的方法是直接和CDK4結合，抑制CDK2的方法則是去結合cyclin D上CDK2的結合位置，與cyclin D結合的CKIs會再與CKD2結合並抑制其活性。p21蛋白質即是屬於CKI的一員。

## 1-6 p21 蛋白質

p21 (WAF1, CAP20, Cip1, Sdi1<sup>55-58</sup>)，和p27<sup>59,60</sup>、p57<sup>61,62</sup>同屬於Cip/Kip家族的CKI蛋白質，這些CKIs，在N端有可以抑制cyclin/CDK複合體的保守區域，p21的功能主要是在DNA受損時阻斷細胞週期的進行<sup>63,65</sup>。藉由與PCNA的結合，p21可以抑制DNA的合成<sup>66,68</sup>。p21的promoter區域擁有兩個p53的結合位置，在DNA受損時，可以藉由p53的調控而表現<sup>69</sup>。而p21蛋白質可以經由ubiquitin降解路徑以及非ubiquitin降解路徑來控制p21的蛋白質表現量<sup>70-72</sup>。當細胞受到輻射或是藥品處理後，p53蛋白質會調節細胞凋亡或是中斷細胞週期進行修復，p53中斷細胞週期的調控方式主要是藉由調控p21的表現量來達成目標。因此，在許多p53突變的癌細胞中，使用藥物損害DNA後，因為p53的突變造成p21的表現被抑制，而造成細胞凋亡的情形更明顯<sup>73-75</sup>。而p21的功能是與caspase 8、procaspase 3結合並抑制其活性<sup>76,77</sup>，或穩定c-IAP1<sup>78</sup>來達到抑制細胞凋亡的功能。

## 1-7 Cyclin-CDK 複合物以及其調控路徑

當cyclin-CDK複合體被CKI抑制時，細胞生長會停止，相對的，在哺乳類動物細胞中，G1期最重要的cyclin-CDK受質是視網膜母細胞瘤抑制基因(retinoblastoma tumor suppressor gene, pRB)。pRB在細胞生長時期中，會有兩種型態-次磷酸化狀態(hypophosphorylated)與磷酸化狀態(phosphorylated)，在次磷酸化狀態時，pRB會與一些轉錄因子(transcription factor)結合，尤其是E2F家族的成員。pRB在G1早期是呈現次磷酸化狀態，而在G1中期或晚期則呈現磷酸化狀態，pRB磷酸化導致E2F轉錄因子被釋放並且產生活性，使得基因可以在S期的時候進行轉錄<sup>79</sup>。pRB在G1早期是受cyclin D-CDK複合體磷酸化之調節而產生活性，cyclin D可以在缺乏激酶的情況下直接與pRB結合，使得CDK4/CDK6激酶可以磷酸化pRB，在G1晚期時，cyclin E/CDK2也會持續磷酸化pRB，就可以開始啟動S期。

## 1-8 Cyclin 除了調控細胞週期外的其他功能

Cyclin原本被發現時，是因為可以調控細胞週期及細胞增生而命名<sup>40</sup>，但是最近有許多研究指出，cyclin還有許多其他調控細胞的功能，包括細胞凋亡、分化。這些新增的cyclin蛋白質家族成員，都有一段大約100個胺基酸的保守序列-cyclin box，可以與CDK結合，目前在動物細胞發現的cyclin有九種(cyclin A~I)，其中有數種cyclin有多個成員。而cyclin的調控者，CDK，到現在為止已經發現了超過20種，有些具有組織專一性的CDK(如CDK5)，所分布的組織細胞是屬於不分裂的(non-dividing cell)細胞，如腦、肌肉<sup>80</sup>，這些證據可以顯示，有組織專一性的cyclin-CDK有可能在有絲分裂後細胞

(postmitosis cell) 扮演特殊的角色，例如在神經細胞內的CDK5-p35<sup>81,82</sup>。

### 1-9 Cyclin I

1995年，由Nakamura T等人在前腦皮質 (forebrain cortex) 的cDNA基因庫(cDNA library) 中成功分離出cyclin I<sup>83</sup>，cyclin I跟一般的cyclin一樣，在C端擁有PEST序列，在N端則有典型的cyclin box。cyclin I的序列與cyclin G1、G2最相近，並且被分為同一個子群 (subgroup)<sup>84</sup>，可是這些cyclins的表現並不隨者細胞週期而變化，功能也尚未完全清楚，並且也還未發現可能與cyclin I結合的CDK。Cyclin I在老鼠的腦部成熟或不成熟的神經細胞均有表現，尤其在嗅球 (olfactory bulb) 有最高的表現量<sup>83</sup>，另外，cyclin I的mRNA表現量在細胞週期進行時幾乎沒有變化，並且在有絲分裂後細胞後大量表現，這些組織包括心臟、腦、以及肌肉組織等<sup>83</sup>，這些特徵皆顯示cyclin I的功能可能與細胞週期調控無關。

### 1-10 Cyclin I 與 cyclin G1、G2 之功能、分佈位置比較

在人類的乳癌細胞 (breast cancer) 中，利用微晶片陣列 (microarray) 技術檢測發現cyclin I的表現與VEGF (Vascular endothelial growth factor) 與KDR (Vascular endothelial growth factor receptor 2) 有高度相關<sup>85</sup>，在腎臟足細胞中(kidney)，cyclin I可以穩定p21來避免細胞凋亡<sup>86</sup>。Cyclin I雖然與cyclin G1、G2皆有30%相似性，但功能上cyclin I比較類似cyclin G2。Cyclin G1是p53的轉錄目標 (transcription factor)，可能與p53所調控的細胞凋亡有關<sup>87</sup>，而在出生後的老鼠心肌細胞 (postnatal mouse heart)，cyclin I在細胞生長時表現量低，但在週期停止或是分化時會有高的表現量，與p53的表現量並不相同<sup>88</sup>。Cyclin G2，可以抑制纖維組織母細胞 (fibroblasts) 增生<sup>89</sup>，在H9c2細胞與心肌細胞中，利用小分子干擾RNA (siRNA) 抑制cyclin I可以幫助細胞增生，並且幫助細胞分裂<sup>88</sup>。在分布上，cyclin G1是屬於核蛋白 (nuclear protein)<sup>90</sup>，cyclin G2分布在細胞質 (cytoplasm)<sup>91</sup>，cyclin I則在細胞核以及細胞質都有表現。

### 1-11 內涵體

在細菌中 (大部分是在 *E.coli*) 表現蛋白質，是有效獲得大量重組蛋白質的方法，這些蛋白質必須是不需要後修飾 (post-translational modification)作用的蛋白質，例如醣化 (glycosylation)。但是因為蛋白質的高表現量，會容易在細菌中形成不可溶的蛋白質堆積，即是內涵體。利用內涵體獲得蛋白質的好處是<sup>92,93</sup>: 1.蛋白質表現量非常高，可以達到全部細胞蛋白質的30%以上或是每一公升的菌液可以產生8.5g的蛋白質<sup>94</sup>。2.內涵體

不容易被宿主細胞的蛋白質水解酶分解。3.內涵體容易與可溶蛋白分離，減少蛋白質純化的步驟可以得到更高的產率。4.如果表現的是有毒的蛋白質，內涵體可以提高蛋白質表現量（因其不具有活性）。

## 1-12 蛋白質摺疊

獲得內涵體後，接下來最困難的步驟就是將內涵體中聚集的蛋白質，重新摺疊成正確型態、有活性的蛋白質<sup>95</sup>。將內涵體以高濃度的變性藥劑變性後，慢慢的移除過多的變性劑來重新摺疊蛋白質，在大部分的例子中，會添加一些幫助摺疊的藥劑以及維持適合的氧化還原環境<sup>96</sup>。摺疊蛋白質的方法一般可分為下列幾種方法: 1.稀釋，將蛋白質以變性緩衝液溶解後，直接稀釋到復性緩衝液中，但是必須小心的控制蛋白質的濃度以避免沉澱<sup>97</sup>，2.透析，利用透析膜緩慢的移除變性劑<sup>98</sup>。避免聚集以及錯誤摺疊可以提高摺疊產物的產率，另外，添加一些小分子可以減少造成聚集的分子間錯誤鍵結，如下表<sup>99</sup>。

Additive	Typical concentration
Urea (denaturant)	2 M
Guanidinium chloride	1 M
Arginine	0.5 M
Glycerol	0.4 M
Sucrose	0.4 M
Lauryl maltoside	0.3 mM
Polyethylene glycol (3550 MW)	0.05% w/v
Tris buffer	0.5 M
Triton X-100	10 mM
Acetamide	2 M
n-hexanol	5 mM
Salts (NaCl, Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> , K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> )	0.5 M

## 1-13 特定構型蛋白質

到九零年代初期，對於蛋白質功能的觀念仍然建立在序列→結構→功能，換句話說，蛋白質必須要摺疊至其獨一無二的結構時(通常為能量最低態)，才具有功能，當蛋白質處於此種結構狀態時，即稱為自然態 (native state) 從1890年起，大量的實驗均可支持這個觀點，包括Fischer的鑰與鎖假說(lock-and-key hypothesis)<sup>100</sup>、蛋白質的結晶<sup>101,102</sup>、以及一些蛋白質摺疊的研究<sup>103,104</sup>。而當蛋白質三級結構被破壞後，會因此失去功能，此時的狀態就稱為變性態 (Denature state)<sup>105,106</sup>。



## 1-14 無特定構型蛋白質

最近有研究指出，生物體內含有一些無特定構型蛋白質<sup>107</sup> (Natively disorder protein<sup>108</sup>、natively unfolded protein<sup>109</sup>)。在特定構型蛋白質中，因為Ramachandran angle 以及蛋白質殘基非等向的小幅度運動會受到附近胺基酸的限制，所以蛋白質的形狀會較固定。粒子的擺動主要受到兩個因素，一為隨機的熱運動，另一為被附近粒子所帶動的運動，所以在特定構型蛋白質中，因為同區域殘基互相影響，使得結構較不容易改變<sup>110</sup>。相對的，無特定構型蛋白質的殘基之間交互作用可視為一種動態的效果，也就是說，在同一區的殘基，可能有許多種排列方式都可以達到能量最低態，這些不同的結構有可能是因為隨機運動排列而成的，所以，無特定構型蛋白質可以在缺乏穩定三級結構的情況下，讓穩定的二級結構進行晃動。因為如此，無特定構型蛋白質可以存在非常多種可能的蛋白質結構，有功能的無特定構型蛋白質片段可能只需要幾個胺基酸，或是很長的蛋白質片段。

在本論文中，我們將人類的 cyclin I 基因接在 pET30a 表現載體上(expression vector)，送入細菌 BL21 中，利用 IPTG 誘導 cyclin I 蛋白質大量表現並形成內涵體 (inclusion body)。將內涵體以變性緩衝液 (denature buffer) 變性，再使用逐步透析的方式，將蛋白質摺疊成接近自然態 (native form)。藉由圓二色光譜儀分析，可發現 cyclin I 的二級結構大部分為  $\alpha$ -螺旋，微溫差掃描熱卡路里計測量得到 cyclin I 屬於鬆散結構，利用 Far western 實驗，證實 cyclin I 會與 p21<sup>cip1/waf1</sup> 可在活體外鍵結，顯示 cyclin I 可能藉由結合 p21 來調控其活性。

## 第二章 實驗目的

### 2-1 利用內涵體取得大量的 cyclin I 蛋白質

目前一般實驗室取得特定蛋白質的方法，通常是將基因轉殖進入細菌中，利用 IPTG 短時間(大約四小時)誘導特定蛋白質產生。如果長時間誘導蛋白質生成，則容易因為錯誤摺疊而形成內涵體。內涵體雖然因錯誤摺疊而喪失功能，但其特定蛋白質純度及量都比一般的可溶性蛋白質高，利用長時間 IPTG 誘導可得到高純度的 cyclin I 蛋白質內涵體。

### 2-2 將內涵體蛋白質再摺疊，並探討摺疊中間體的能量變化

根據本實驗室所擁有的蛋白質摺疊技術，可以將內涵體蛋白質經由變性，再摺疊的方法，將摺疊錯誤的蛋白質，藉由透析的方法使蛋白質逐步摺疊成接近自然態的蛋白質，我們分別取摺疊中間物來測量其特性，包括螢光儀 (Fluoresce) 量測芳香族胺基酸之穩定度；微溫差掃描熱卡路里計 (Differential Scanning Calorimetry, DSC) 分析中間物之熱穩定性；動態光散射儀 (Dynamic Light Scattering, DLS) 測量中間物粒徑大小；圓二色旋光光譜儀 (Circular Dichroism, CD) 可得知二級結構比例。這些資訊可以幫助我們了解 cyclin I 蛋白質的摺疊路徑以及不同摺疊環境的差異。

### 2-3 探討 cyclin I 在細胞中的調控機制

有文獻指出，cyclin I 可以藉由穩定 p21 來保護腎臟足細胞免於細胞凋亡，但其作用機制並不清楚，我們利用 far-western 來檢測 cyclin I 與 p21 的結合，在摺疊中間體的研究中，我們發現了 Ca 離子可能會對 cyclin I 的結構產生影響，許多蛋白質的功能會與蛋白質在細胞中的分佈有關，cyclin I 蛋白質在細胞質及細胞核均有分佈，而其結構與功能可能是經由 Ca 離子濃度所調控。目前對於 cyclin I 的研究並不多，所以希望可以在接下來的研究中，進行 cyclin I 的調控機制研究。

### 第三章 實驗策略

利用聚合酶連鎖反應從 A549 細胞株 cDNA 中大量複製 cyclin I 基因

將 cyclin I 基因放入 pET30a 表現載體中並轉殖進入宿主 *E.coli*. (BL21(DE3)) 中

長時間 IPTG 誘導蛋白質產生並且收取 cyclin I 所形成的包涵體，並利用不同溶液環境進行蛋白質摺疊。

利用螢光儀、微溫差掃描熱卡路里計、動態光散射儀、圓二色旋光光譜儀測量摺疊中間物特性。

使用 Far-western 檢測 cyclin I 與 p21 的活體外鍵結。

使用恆溫滴定卡洛里計量測 cyclin I 與 p21 的結合熱。

## 第四章 實驗步驟

### 4-1 聚合酶連鎖反應 (Polymerase Chain Reaction, PCR)與瓊膠電泳(Agarose Gel Electrophoresis)

實驗步驟:

每一管皆加入下列藥劑

藥劑	濃度/體積
去離子水(DDW)	8 $\mu$ l
正向引子(Forward primer)	10mM / 0.2 $\mu$ l
反向引子(Reverse primer)	10mM / 0.2 $\mu$ l
脫氧核苷酸三磷酸(dNTP)	10mM / 0.2 $\mu$ l
模板(template)	10pM/ 0.2 $\mu$ l
去氧核糖核酸聚合酶(Tag plus)	500u / 0.2 $\mu$ l
去氧核糖核酸聚合酶 10 倍緩衝液(10x tag buffer)	1 $\mu$ l
總和	10 $\mu$ l

以下列條件進行聚合酶連鎖反應: (1)樣品加熱至 95°C, 5 分鐘, 將 DNA 雙股打開。(2)樣品加熱至 95°C, 30 秒, 將 DNA 雙股打開。(3)樣品回溫至 60°C, 30 秒, 使引子與 DNA 上可辨認的序列黏合。(4)樣品加熱至 72°C, 30 秒, DNA 聚合酶會開始合成互補股。(5)第(2)~(4)步重複 30 個循環。(6)樣品回溫至 72°C, 3 分鐘, 確保所有互補股接合成完畢。以 0.5xTBE 緩衝液 (45mM Tris-Boric, pH7.6, 1mM EDTA) 配製 1.2%瓊膠, 將欲進行電泳之 DNA 先加入 1/6 體積的 6x gel loading buffer (0.25% bromophenol blue, 0.25% xylene cyanol FF, 15% Ficoll Type 400 溶於水), 瓊膠的樣品槽中, 其中一個樣品槽載 250ng 的 100b.p. ladder DNA size marker, 用來比較分子量大小。以 100 伏特電壓在電泳器 (Mupid, Advance Co.Ltd, Japan) 進行電泳。最後在紫外線觀察箱 (Ultra-lum Inc., USA) 中, 以波長 300nm 分析 DNA 分子量大小與含量。

### 4-2 基因轉型 (Gene Transformation) :

實驗步驟:

將作為宿主的大腸桿菌 *E.coli*. (品系 BL21(DE3))於 2ml LB 培養以液中作隔夜培

養，取 0.2ml 的飽和菌液加入 10ml LB 培養液，於 37°C 200 rpm 搖晃培養 1 小時。以 12000 rpm 轉速離心 1 分鐘，倒掉上清液，沈澱菌液以 5ml 冰過的 100mM 氯化 Ca (CaCl<sub>2</sub>) 回溶，並靜置冰上 3 小時後，此時已完成勝任細胞 (competent cell) 的置備。取適量的質體 DNA 與 100ul 的勝任細胞混合後，置於冰上 30 分鐘，期間每 5-10 分鐘拍打混合物一次，防止菌液沈澱。放入 42°C 水浴 45 秒熱休克處理。加入 1ml LB 培養液於 37°C 200rpm 搖晃 1 小時。取已完成基因轉型作用的菌液，以推棒均勻塗抹於含抗生素 kanamycin 的 LB 固體培養基上，每個培養基含濃縮菌液 150ul，作隔夜培養。長出的單一菌株利用聚合酶連鎖反應，確定是否帶有 pET30a (Novagen, USA) -Cyclin I 基因。

#### 4-3 蛋白質小量表現 (Expression Protein in Small Scale) 與大量表現(Expression Protein in Large Scale)

實驗步驟:

挑選一顆含有質體 pET30a-Cyclin I 的菌株，使用 T7 forward primer 與 T7 reverse primer 當引子，以 ABI 3730 XL DNA analyzer 機器定序後，確定質體 pET30a-Cyclin I 的序列正確。挑選序列正確的菌株，放入 1ml LB 培養液中培養 4 小時。將菌液均分成兩管，並各加入 2.5ml LB 培養液，其中一管加入 1mM 的 IPTG，隔夜培養。抽取 1ml 菌液，以 12000rpm 離心 1 分鐘，將沉澱的細菌以 100 ul sample buffer (100mM Tris-HCl, pH6.8, 4% SDS, 0.2% Bromophenol Blue, 20% Glycerol, 200mM DTT) 回溶。以超音波震盪器 (UP200s, Hielscher) 打碎細胞。以 12%SDS-PAGE 確定是否有目標蛋白質大量表現。將小量表現成功的菌株，以 3ml LB 培養液培養隔夜。取飽和菌液 50 ul 加入 3ml LB 培養液培養四小時以活化 (refresh) 細菌。取 50 ul 的已活化菌液加入 250ml LB 培養液，四小時後加入 IPTG (1mM)，隔夜培養。將菌液以 13000rpm 離心 5 分鐘以沉澱菌體，以 4°C 二次水回溶菌體。使用細胞破碎機 (Cell disruptor, Constant systems LTD) 打碎細胞，以二次水清洗，則可獲得內涵體 (Inclusion body)。

#### 4-4 蛋白質的再摺疊 (Protein Refolding):

實驗步驟:

將內涵體溶解在變性緩衝液中 (denature buffer)，在 4°C 下劇烈攪拌 12 小時，將蛋白質完全變性。將變性後的蛋白質以 0.22µm 的濾膜過濾，去除雜質以及未完全變性的蛋白質聚集。透析膜浸泡在 0.1M 的乙二胺四乙酸 (EDTA) 水溶液，煮沸 5 分

鐘。去除膜上殘存的離子。樣品裝入透析膜中，放入 2500 ml 摺疊緩衝液 R1 中透析兩次，一次 24 小時。放入 2500 ml 摺疊緩衝液 R2 中透析兩次，一次 12 小時。放入 2500 ml 摺疊緩衝液 R3 中透析兩次，一次 12 小時。放入 2500 ml 摺疊緩衝液 R4 中透析兩次，一次 12 小時。放入 2500 ml 摺疊緩衝液 R5 中透析兩次，一次 12 小時。

#### 4-5 圓二色光譜儀 (Circular Dichroism, CD):

實驗步驟:

將蛋白質濃度調整為 0.2mg/ml，開氮氣。打開冷卻系統 CFT-33，等 2~3 分鐘。打開 Xe LAMP power 1，等 30 分鐘。開啟電腦。取 200 $\mu$ l 樣品加入 1mm 寬的 cell 中，實驗參數: wavelength range : 260~200nm ; scan speed : 100nm/min ; Accumulation : 10 次 ; step resolution : 0.2nm ; band width : 1nm ; response : 2 seconds。使用 SELCON3 程式分析蛋白質二級結構的比例。

#### 4-6 微溫差掃描熱卡路里計 (Differential Scanning Calorimeter, DSC)

實驗步驟:

將蛋白質濃度調整為 1mg/ml。利用抽真空的方法降低空氣的溶解度。使用超音波洗淨機 (supersonic cleaner) 將氣泡震出。分別加入 500 $\mu$ l 緩衝液到樣品端及參考端，實驗條件為掃描溫度 10 $^{\circ}$ C~95 $^{\circ}$ C，掃描速率每分鐘 0.5 $^{\circ}$ C，外加 3 大氣壓力。此次實驗結果當做基準線 (baseline)。加入 500 $\mu$ l 蛋白質到樣品端，500 $\mu$ l 緩衝液到參考端，實驗條件為掃描溫度 10 $^{\circ}$ C~95 $^{\circ}$ C，掃描速率每分鐘 0.5 $^{\circ}$ C，外加 3 大氣壓力。將兩次結果相減，即可得到純蛋白質樣品的訊號。

#### 4-7 Far-Western Blot

實驗步驟:

將蛋白質電泳膠轉漬至轉漬膜上 (PVDF, Millipore, USA)。室溫下，用 5%脫脂牛奶 (non-fat milk) 浸泡轉漬膜 1 小時，避免抗體與轉漬膜的非專一性鍵結。依序用 R1、R2、R3、R4、R5 摺疊緩衝液浸泡轉漬膜各兩次，一次 10 分鐘，將轉漬膜上的蛋白質進行膜上摺疊而恢復成自然態。將 p21 蛋白質溶解在 20 mM HEPES buffer 中，以 37 $^{\circ}$ C 雜合 (Hybridization) 90 分鐘。以 TBST buffer (10mM Tris-base, 100mM NaCl, 0.1% Tween-20, pH 7.5) 清洗四次，一次五分鐘。加入 p21 的一抗 (Santa Cruz, USA)，室溫雜合 2 小時。以 TBST 清洗四次，一次五分鐘。加入二抗 (Santa Cruz, USA)，室溫雜合 1 小時。以

TBST 清洗四次，一次五分鐘。將 Peroxide Solution 與 Enhancer Solution (SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate, Pierce) 1:1 混合。將轉漬膜浸泡 40 秒，進行壓片。

#### 4-8 恆溫滴定微卡路里計(Isothermal Titration Calorimetry, ITC)

將樣品以 13000rpm 離心，再使用 0.22  $\mu$ m 的濾膜過濾，將 cyclin I 濃度調整為 10  $\mu$ M，總體積 2.8ml，置於反應槽內； p21 濃度調整為 350  $\mu$ M，總體積為 0.2ml，將 p21 分 20 次滴入反應槽內，每次間隔十分鐘，最終體積為 3ml。將數值對時間積分，可得到熱量差  $\Delta Q$ ，即可知蛋白質結構改變的焓變化量 ( $\Delta H$ )。



## 第五章 實驗原理

### 5-1 聚合酶連鎖反應 (Polymerase Chain Reaction, PCR):

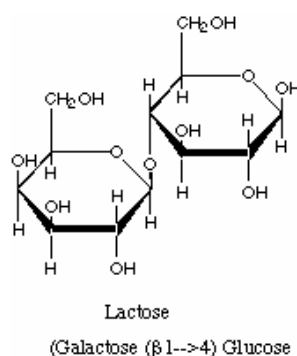
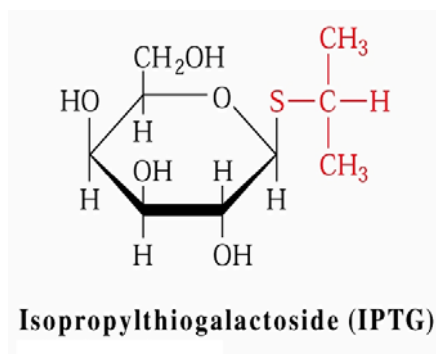
聚合酶連鎖反應是將去氧核糖核酸快速複製的技術。利用高溫去打開(denature) 去氧核糖核酸的雙股，再以適當溫度將使擁有專一性的兩端引子(primer) 與單股的去氧核糖核酸黏合，接下來以 72°C 讓去氧核糖核酸聚合酶 (DNA polymerase) 去製造新的去氧核糖核酸互補股。此方法可在短時間內得到大量所需的去氧核糖核酸。(Dr Kary B. Mullis, La Jolla, California, U.S.A., The polymerase chain reaction (PCR) method. 1993 Nobel Prize)

### 5-2 DNA 定序:

以 pET30a-cyclin I 質體為模板，加入四種不同螢光標定的核苷酸的類似物 ddATP，ddTTP，ddCTP 與 ddGTP 作為原料進行聚合酶連鎖反應。因為這些核苷酸類似物沒有 3'-hydroxyl group，因此 DNA 的複製不會繼續進行，並會停留在接上 ddNTP 的位置，並終止 DNA 的複製，造成各種長短不一的 DNA 片段。再以毛細管電泳技術將這些長短不一的 DNA 片段分離，最後透過雷射光激發，並利用 CCD 偵測每一片段不同螢光的組合來判讀 DNA 序列。

### 5-3 蛋白質表現:

將所需的基因接合在 pET30a 載體上，送入大腸桿菌 BL21(DE3) 中，以 IPTG 誘導 16 小時，即可獲得大量所需蛋白質的內涵體。IPTG 為乳糖 (lactose) 的相似物，可以誘導乳糖操作組 (lac operon) 活化，表現下游的基因。在大腸桿菌 BL21(DE3) 中，活化乳糖操作組，可以產生大量的 T7 聚合酶 (T7 polymerase)，而 T7 聚合酶可以活化 pET30a 載體上的 T7 促進子 (T7 promoter)，使得我們所需要的蛋白質大量表現。IPTG 雖然與乳糖結構相似，但卻不會被  $\beta$ -乳糖水解酶 ( $\beta$ -galactosidase) 分解，更可持續穩定的保持蛋白質的大量產生。(Studier, F. W. and Dunn, J. J. (1982) Cold Spring Harbor symposium - quantitative biology, NY, USA)





#### 5-4 蛋白質結構:

蛋白質結構可以決定蛋白質是否有功能性，在自然界中生物體內產生的蛋白質，大部份會在細胞內部摺疊成正確的結構。近年來，由於生物科技與基因重組技術的進步，使得傳統必須由多細胞生物體所萃取的蛋白質，現在可藉由微生物系統大量產生，只須將我們所需要的重組基因，送進微生物體內，即可利用微生物系統來大量表現我們所需的蛋白質。使用微生物系統有者方便、便宜的優點。但是因為一般的原核細胞缺少一些真核細胞所擁有的蛋白質後修飾作用 (post-translation modification) 或是因為誘導物所使得蛋白質快速且大量的表現，而容易形成內涵體 (inclusion body)。內涵體為大量未正確摺疊的蛋白質所聚集而成，而我們將此內涵體藉由變性 (denature) 然後再重新摺疊 (refold) 成正確的型態，來獲得大量、高純度的功能性蛋白質。

#### 5-5 蛋白質變性:

加熱，改變 pH 值、暴露於混合的有機溶劑 (乙醇、丙酮)，或某些溶劑 (如尿素)、清潔劑都會引起蛋白質變性。事實上，當蛋白質進行變性時，多肽鏈的共價鍵並沒有斷裂，被破壞的只有蛋白質的二、三、四級結構。

在本實驗室中，常使用來使蛋白質變性的藥劑或因素如下列:

##### (1) 尿素 (Urea):

尿素可以破壞分子內氫鍵 (intra-molecular hydrogen bond) 以及疏水性作用力 (hydrophilic effect)。

##### (2) 還原劑 (reducing agent):

二硫代蘇糖醇 (dithiothreitol, DTT)， $\beta$ -巰基乙醇 ( $\beta$ -Mercaptoethanol,  $\beta$ -Me) 皆屬於還原劑。主要的作用是破壞雙硫鍵。

##### (3) pH 值 :

胺基酸的組成中含有胺基 ( $-\text{NH}_3^+$ ) 與羧基 ( $-\text{COO}^-$ )，在高 pH 值的環境中胺基會失去一個氫原子而變成  $\text{NH}_2$ ，使得胺基酸帶負電，在低 pH 值的環境中羧基會接上一個氫原子形成  $\text{COOH}$  而使胺基酸帶正電。因此在高、低 pH 值的環境中，蛋白質會因為胺基酸之間有庫倫作用力互相相斥，而無法正常的排列、組織成自然的結構。

#### 5-6 蛋白質摺疊 :

蛋白質與 DNA 一樣，皆是屬於有自組織能力的生物分子。本實驗室利用階段性熱平衡透析法，將蛋白質由變性的狀態，逐步摺疊成蛋白質的自然態 (native form)<sup>111</sup>，而

我們在進行摺疊實驗時，所使用的化學藥劑與原理如下：

(1) 尿素 (Urea):

避免蛋白質由高濃度的尿素中直接置換成無尿素的環境，因為劇烈的環境變化，容易使得蛋白質形成聚集。

(2) Tris:

Tris buffer 可以穩定透析緩衝液的 pH 值。

(3) 二硫代蘇糖醇 (dithiothreitol, DTT):

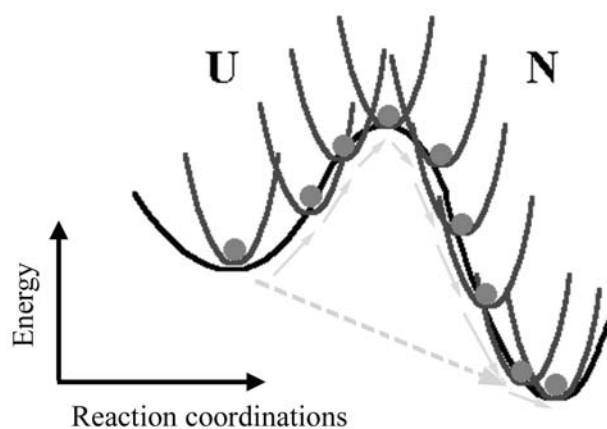
少量的二硫代蘇糖醇可當作抗氧化劑。

(4) 甘露醇 (Mannitol):

甘露醇含有大量的氫氧基，可以保護蛋白質的側鏈分子，避免在高度氧化、還原的環境下被修飾。但是甘露醇會影響金屬離子與金屬蛋白質的鍵結能力。

(5) 蛋白酵素抑制劑 (Pefabloc):

蛋白酵素抑制劑可以與蛋白質分解酶 (protease) 產生不可逆的共價鍵結而抑制其活性，保護蛋白質不會在摺疊過程中被降解。



階段性熱平衡透析法中間物能量示意圖

### 5-7 螢光儀(Fluoresce):

當分子吸收可見光或紫外光時，位於基態 (ground state) 能階的電子會被激發至激發態 (excited state)，在激發態的電子隨即以不同的能量方式(光或熱)衰退回基態。若衰退時以放出光的形式衰退回基態則會產生所謂的螢光 (fluorescence)。蛋白質中的芳香族胺基酸因為擁有苯環，所以可以吸收特定波長的激發光，並將此吸收的能量以較低能量的光或是熱的形式散發。當芳香族胺基酸處於親水性環境時，因為電子容易與外在環境交互作用而損失能量，使得釋放出的能量變低，此時能量就會以較長波長的螢光 (紅

位移, red shift) 或是熱散出。反之, 當芳香族胺基酸的苯環處於疏水性環境時, 會因為與外在環境作用較少, 而能保留較高的能量, 所散發出的螢光能量也會較高 (藍位移, blue shift)。

### 5-8 圓二色旋光光譜儀 (Circular Dichroism, CD):

圓二色旋光光譜儀 (Circular Dichroism) 可用於測量蛋白質的二級結構。胺基酸有光學活性, 因為除了甘胺酸 (glycine) 外, 其餘的胺基酸皆具有四個不同的基團 ( 碳基、胺基、羰基、以及R group), 在空間中會因為不同的排列而形成兩種鏡像異構物 (enantiomer)。其中, 可將平面偏極光偏轉向左的稱為左旋異構物 (levorotatory isomer, L-form), 反之則稱為右旋異構物 (dextrorotatory isomer, D-form), 而在生物體中的胺基酸大部分為左旋異構物。在入射光通過蛋白質時, 因為蛋白質或是多肽鏈在水溶液中的空間非均向性, 會產生一個偏轉角度, 則可利用此得到的蛋白質吸收橢圓率 (ellipticity) 來推測蛋白質的二級結構比例。一般橢圓偏極光光譜的波長都操作在far-UV (260~195nm), 在這波長區間可以觀察到蛋白質三個主要的二級結構:  $\alpha$ -helix、 $\beta$ -sheet、random coil。在 $\alpha$ -helix結構, 於波長208 nm 和222 nm 有兩個負的波峰, 而 $\beta$ -sheet 結構於215 nm 有一個負的波峰, 因此在探討蛋白質摺疊的狀態時, 通常會選擇這些波長。

在測量圓二色光譜儀時, 樣品的濃度對結果有相當大的影響, 一般而言, 圓二色光譜儀的光譜需求在 0.5-1.0 吸收值範圍內的訊號會有比較好的訊雜比, 所以我們一般將蛋白質的濃度控制在 0.2mg/ml。而測量前必需先將蛋白質以 0.2 $\mu$ m 的濾膜過濾, 可去除影響 CD 測量的灰塵、聚集的蛋白質及其他粒子。

### 5-9 微溫差掃描熱卡路里計 (Differential Scanning Calorimetry, DSC):

蛋白質摺疊通常是由高構型能階態往低構型能階態進行, 大部分自然態的蛋白質, 皆處於構型能量最低態。所以接近自然結構的蛋白質, 對熱的穩定性就越高。加熱使蛋白質變性, 可觀察其三級結構的穩定性。加熱會使蛋白質產生變性, 也就是形成相變, 蛋白質變性後, 其比熱會發生變化。我們利用微溫差掃描熱卡路里計 (Differential Scanning Calorimeter) 觀察蛋白質的比熱變化, 即可得到蛋白質對熱的穩定性。

微溫差掃描熱卡路里計可分為熱流式 (Heat flux DSC) 與熱補償式 (Compensation Calorimeters) 兩種, 熱流式是對樣品端 (sample) 及參考端 (reference) 提供相同的功率的能量將兩端同時加熱, 當樣品達到相變點時, 會吸收或釋放出額外的熱量, 使得兩端溫度產生了溫度差, 再使用熱電偶 (thermocouple) 將此溫度差轉換成熱量差, 由此計算出樣品的相變點以及比熱變化。而補償式的則是提供不同功率的熱量, 去維持

樣品端以及參考端的溫度相同，根據所提供的熱量不同，也可以計算出樣品的相變點及比熱變化。

本實驗所使用儀器為 CSC 公司所出產的 N-DSC-II，可測量的溫度範圍從-10°C 到 130°C，升溫度速率可從 0.125°C/min 到 2°C/min；cell 容量為 0.33ml；靈敏感為 1  $\mu$ cal。

### 5-10 Far Western:

與一般的西方點墨法 (western blot) 相似，將樣品以 SDS-PAGE 分離後轉漬到 PVDF 膜上，使用 5% 的脫脂奶浸泡 PVDF 膜，將未被蛋白質接上的區域覆蓋，避免非專一性的鍵結。接下來依序以我們的摺疊緩衝液 (Refolding buffer, R1、R2、R3、R4、R5) 浸泡，進行膜上的蛋白質摺疊，再將感興趣的蛋白質加進緩衝液中進行雜合 (hybridization)，接下來以一抗、二抗去辨認特殊的蛋白質序列。如果膜上有蛋白質可與溶液中的蛋白質結合的話，則會在該位置呈像。

### 5-11 動態光散射儀(Dynamic Light Scattering, DLS):

雷射光射入含有懸浮粒子的溶液中時，雷射光因粒子而產生散射光，散射的雷射光會隨時間改變，再由散射光的變化計算出平均粒徑大小。因為粒子所處的環境並非絕對零度，本身含有動能而進行布朗運動 (Brownian Motion)，粒子大小不同會造成不同的擴散運動，因為粒子隨時在移動而相對位置不斷變化，各個粒子的散射光互相干涉也隨時在變化，因此散射光強度也隨時間在變化，粒子越小，擴散運動速度越快，粒子越大，擴散運動越慢，利用雷射光穿透溶液時，粒子會產生散射光，粒子因為大小及位置的不同，產生的散射光到達檢測器時會有光程差。不同時間粒子位置會改變，散射光也跟著改變，可利用 Stokes-Einstein equation 計算出粒徑大小。

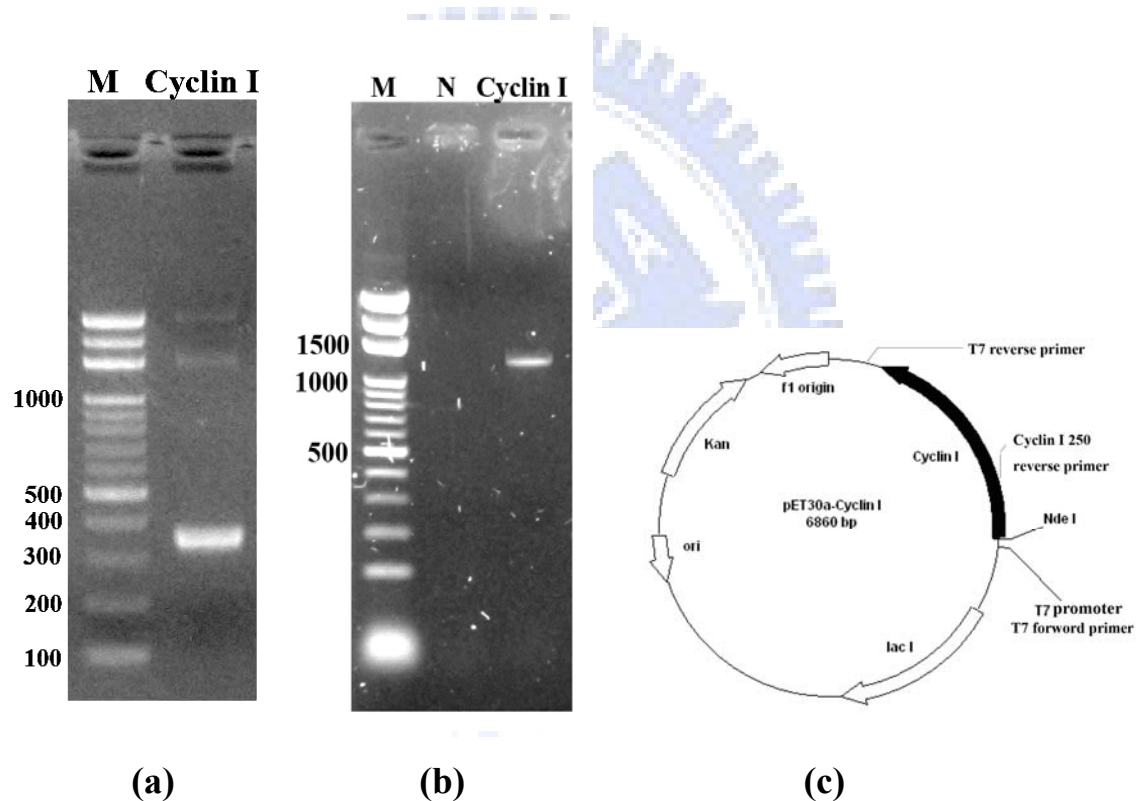
### 5-11 恆溫滴定微卡洛里計(Isothermal Titration Calorimetry, ITC)

當分子結合或是解離時，會產生吸熱或放熱的現象。恆溫滴定微卡洛里計可測量為量的熱變化。ITC 主要可以分為下列三類: 1. 絕熱式 (adiabatic) 2. 熱傳導式 (heat conduction) 3. 補償式 (compensation)。絕熱式恆溫滴定微卡洛里計是使用電流平衡熱量的改變，反應槽 (ampoule) 與環境並無淨熱的產生。而熱傳導式則是利用反應槽溫度變化時，會與外部之恆溫水槽產生熱交換，當熱通過熱電偶 (thermopile) 時會產生電流，即可推算出能量改變。本實驗使用之恆溫滴定微卡洛里計為 Thermometric 公司製造，型號為 2277，屬於熱傳導式，恆溫水槽容量為 25L，可控制溫度變化在 0.0001°C 內(24 小時內)，恆溫水槽的溫度可控制在 5°C - 90°C，靈敏度可到達  $10^{-6}$  °C。

## 第六章 實驗結果

### 6-1 pET30a-cyclin I 質體建構結果:

將轉殖後含有 pET30a-cyclin I 的 *E.coli*.(BL21(DE3))以 T7 forward primer 與 cyclin I 250 reverse primer (cyclin I 基因全長為 1134 b.p.，此 primer 為 cyclin I 基因中第 250b.p. 開始的 reverse primer) 進行聚合酶連鎖反應，並以 1.5%瓊膠進行電泳，以確定 cyclin I 基因是否成功插入 pET30a 中並且方向是否正確。兩個引子之間距離大約為 334b.p.，實驗結果初步可證明 cyclin I 成功插入 pET30a 載體中，並且方向正確。

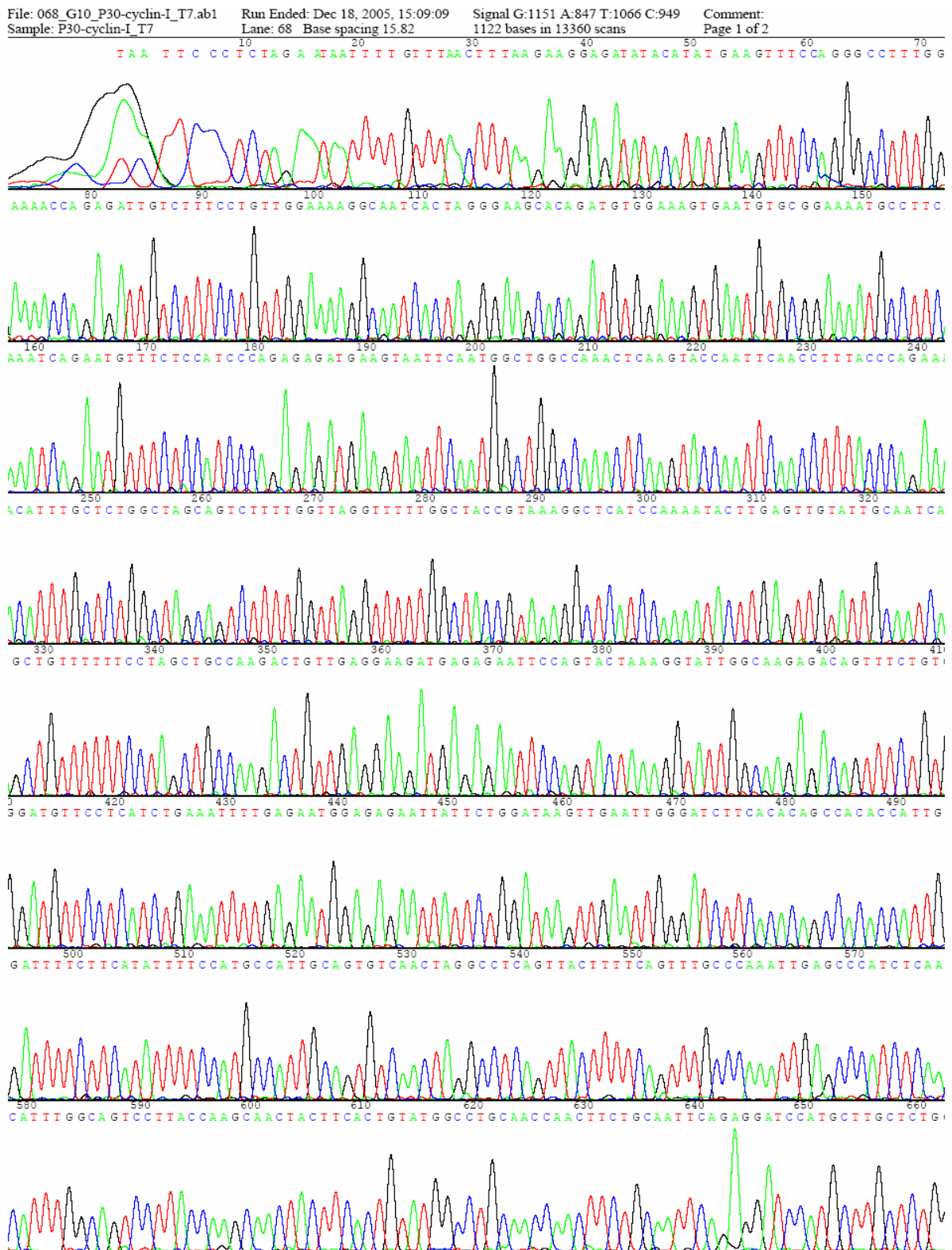


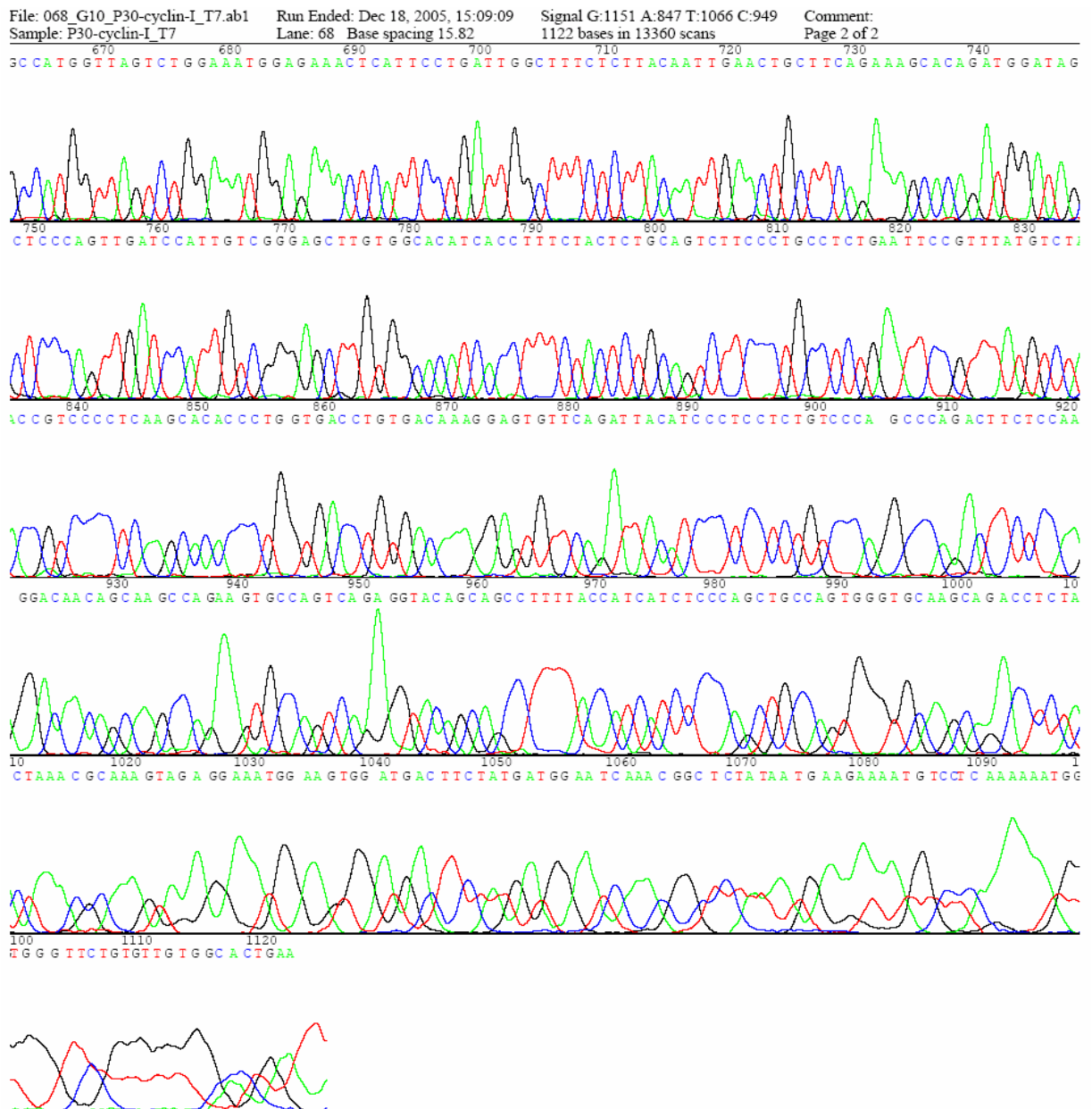
圖一 pET30a-cyclin I 質體建構結果。

(a) pET30a-cyclin I 以 T7 forward primer 與 cyclin I 250 reverse primer 進行聚合酶連鎖反應後結果，分子量大約為 334b.p.。(b) pET30a-cyclin I 以 cyclin I forward primer 與 cyclin I reverse primer 進行聚合酶連鎖反應結果，分子量大約為 1134b.p.，N 為 negative control。(c) 質體 pET30a-cyclin I 建構圖。因為 T7 forward primer 與 cyclin I reverse primer 之  $T_m$  相差太多(分別為  $47^\circ\text{C}$  與  $69^\circ\text{C}$ )，故分兩步驟確定 pET30a-cyclin I 質體是否建構成功。

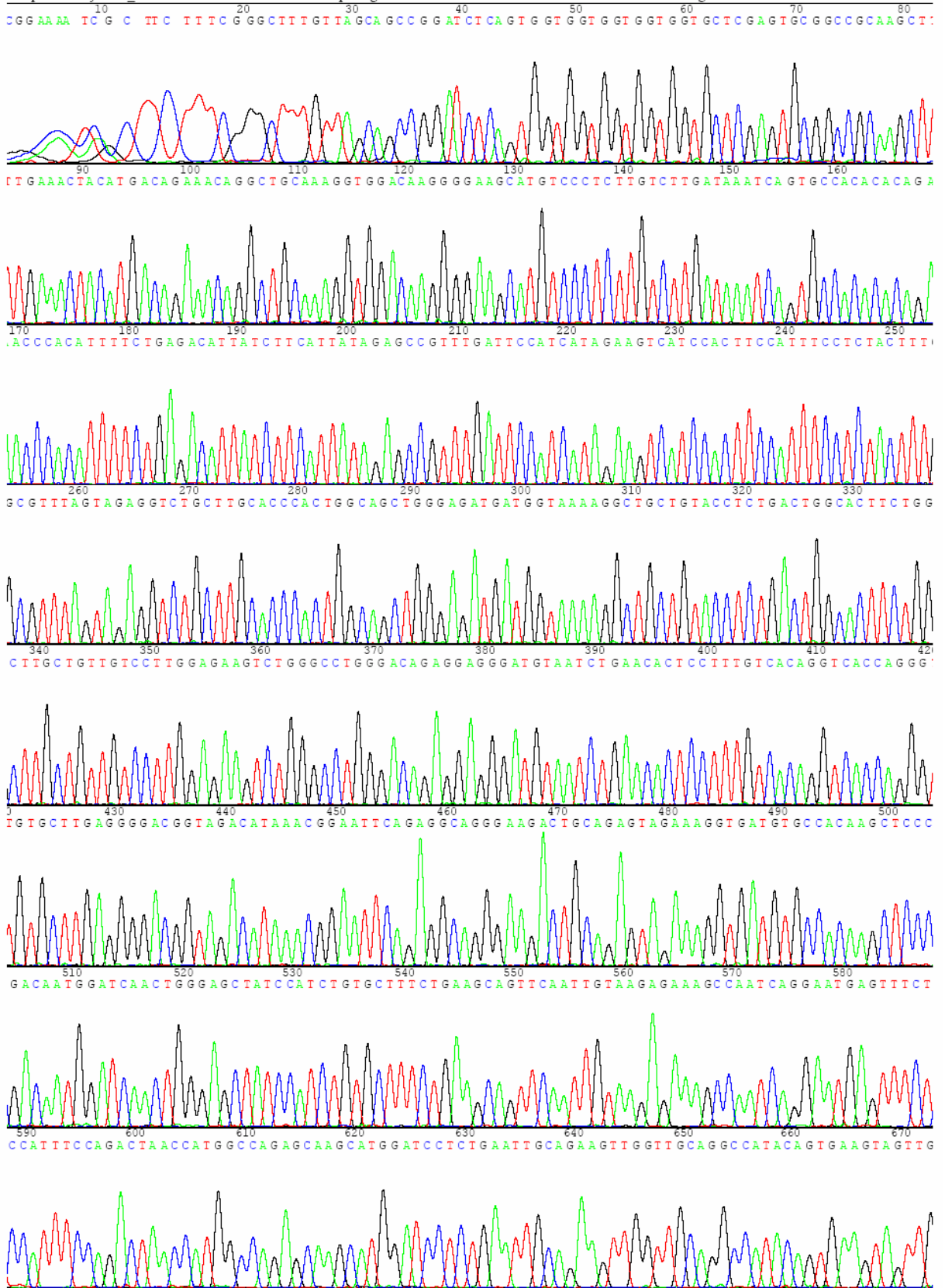
## 6-2 pET30a-Cyclin I 質體定序結果:

因為 cyclin I 基因超過 1000 個鹼基，所以使用 T7 forward primer 與 T7 reverse primer 來分別定序。

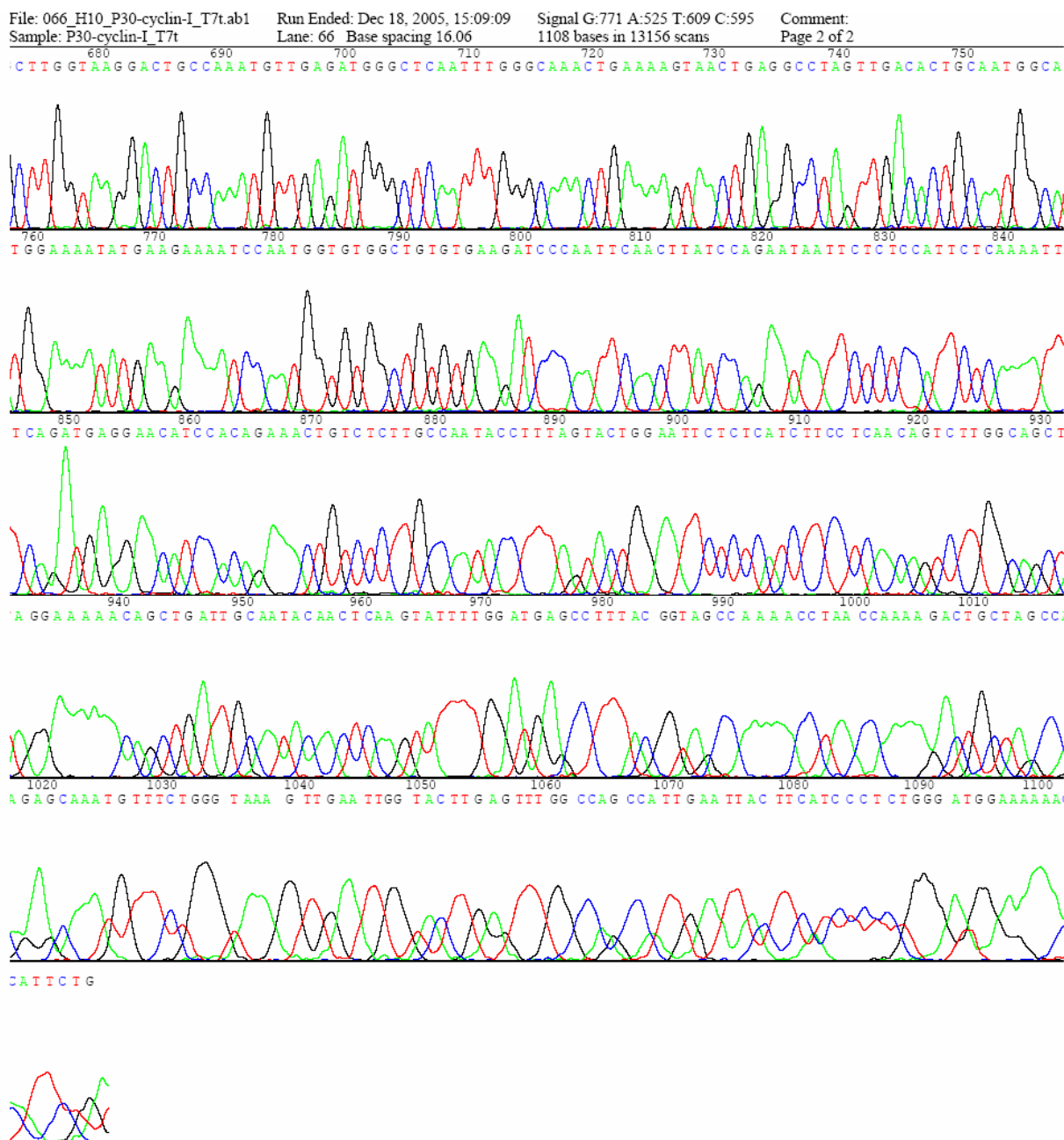




圖二 — 1 pET30a-cyclin I 質體以 T7 forward primer 定序結果







圖二 — 2 pET30a-cyclin I 質體以 T7 reverse primer 定序結果

1 ATG AAG TTT CCA GGG CCT TTG GAA AAC CAG AGA TTG TCT TTC CTG TTG GAA AAG GCA ATC  
1 M K F P G P L E N Q R L S F L L E K A I  
61 ACT AGG GAA GCA CAG ATG TGG AAA GTG AAT GTG CGG AAA ATG CCT TCA AAT CAG AAT GTT  
21 T R E A Q M W K V N V R K M P S N Q N V  
121 TCT CCA TCC CAG AGA GAT GAA GTA ATT CAA TGG CTG GCC AAA CTC AAG TAC CAA TTC AAC  
41 S P S Q R D E V I Q W L A K L K Y Q F N  
181 CTT TAC CCA GAA ACA TTT GCT CTG GCT AGC AGT CTT TTG GTT AGG TTT TTA GCT ACC GTA  
61 L Y P E T F A L A S S L L V R F L A T V  
241 GAG GCT CAT CCA AAA TAC TTG AGT TGT ATT GCA ATC AGC TGT TTT TTC CTA GCT GCC AAG  
81 K A H P K Y L S C I A I S C F F L A A K  
301 ACT GTT GAG GAA GAT GAG AGA ATT CCA GTA CTA AAG GTA TTG GCA AGA GAC AGT TTC TGT  
101 T V E E D E R I P V L K V L A R D S F C  
361 GGA TGT TCC TCA TCT GAA ATT TTG AGA ATG GAG AGA ATT ATT CTG GAT AAG TTG AAT TGG  
121 G C S S S E I L R M E R I I L D K L N W  
421 GAT CTT CAC ACA GCC ACA CCA TTG GAT TTT CTT CAT ATT TTC CAT GCC ATT GCA GTG TCA  
141 D L H T A T P L D F L H I F H A I A V S  
481 ACT AGG CCT CAG TTA CTT TTC AGT TTG CCC AAA TTG AGC CCA TCT CAA CAT TTG GCA GTC  
161 T R P Q L L F S L P K L S P S Q H L A V  
541 CTT ACC AAG CAA CTA CTT CAC TGT ATG GCC TGC AAC CAA CTT CTG CAA TTC AGA GGA TCC  
181 L T K Q L L H C M A C N Q L L Q F R G S  
601 ATG CTT GCT CTG GCC ATG GTT AGT CTG GAA ATG GAG AAA CTC ATT CCT GAT TGG CTT TCT  
201 M L A L A M V S L E M E K L I P D W L S  
661 CTT ACA ATT GAA CTG CTT CAG AAA GCA CAG ATG GAT AGC TCC CAG TTG ATC CAT TGT CGG  
221 L T I E L L Q K A Q M D S S Q L I H C R  
721 GAG CTT GTG GCA CAT CAC CTT TCT ACT CTG CAG TCT TCC CTG CCT CTG AAT TCC GTT TAT  
241 E L V A H H L S T L Q S S L P L N S V Y  
781 GTC TAC CGT CCC CTC AAG CAC ACC CTG GTG ACC TGT GAC AAA GGA GTG TTC AGA TTA CAT  
261 V Y R P L K H T L V T C D K G V F R L H  
841 CCC TCC TCT GTC CCA GGC CCA GAC TTC TCC AAG GAC AAC AGC AAG CCA GAA GTG CCA GTC  
281 P S S V P G P D F S K D N S K P E V P V  
901 AGA GGT ACA GCA GCC TTT TAC CAT CAT CTC CCA GCT GCC AGT GGG TGC AAG CAG ACC TCT  
301 R G T A A F Y H H L P A A S G C K Q T S

961 ACT AAA CGC AAA GTA GAG GAA ATG GAA GTG GAT GAC TTC TAT GAT GGA ATC AAA CGG CTC  
 321 T K R K V E E M E V D D F Y D G I K R L  
 1021 TAT AAT GAA GAT AAT GTC TCA GAA AAT GTG GGT TCT GTG TGT GGC ACT GAT TTA TCA AGA  
 341 Y N E D N V S E N V G S V C G T D L S R  
 1081 CAA GAG GGA CAT GCT TCC CCT TGT CCA CCT TTG CAG CCT GTT TCT GTC ATG TAG  
 361 Q E G H A S P C P P L Q P V S V M Stop

紅字底線標示部分為 cyclin box 序列 (可能與 CDK 鍵結之區域)

藍字部分為 PEST 序列 (可幫助蛋白質降解之序列)



### 6-3 Cyclin I 與其他 Cyclin 序列比對結果

藉由比較 cyclin I 與其他 cyclins 蛋白質序列，可以推測 cyclin I 可能作用區域以及可能鍵結之 CDKs，以幫助後續研究。

Cyclin I

Cyclin A2

MLGNSAPGPA

Cyclin B1

Cyclin E2

Cyclin D1

Cyclin I

Cyclin A2 TREAGSALLA LQQTALQEDQ ENINPEKAAP VQQRTRAAL AVLKSGNPRG LAQQRPKTR RVAPLKDLPV

Cyclin B1 MALRVTRNSK INAENKAKIN MAGAKRVPTA PAATSKPGLR PRTALGDIGN KVSEQLQAKM PMKKEAKPSA

Cyclin E2 M SRRSSRLQAK

Cyclin D1

Cyclin I

Cyclin A2 NDEHVTVPW KANSKQPAFT IHVDEAEKEA QKKPAESQKI EREDALAFNS AISLPGPRKP LVPLDYPMDG

Cyclin B1 TGKVIDKKLP KPLEKVPMLV PVPVSEPVPE PEPEPEPEPV KEEKLSPEPI LVDTASPSM ETSGCAPAE

Cyclin E2 QQPQSQTES PQEAQIIQAK KRKTTQDVKK RREEVTKKHQ YEIRNCWPPV LSGGISPCII IETPHKEIGT

Cyclin D1

Cyclin I MKFPG PLENQR-LSF LLEKA-ITREA QMWKVNVRKM PSNQVSPSQ RDEVIQWLAK

Cyclin A2 SFESPHTMDM SIVLEDEKPV SVNEVPDYHE DIHTY-LREME VKCKPKVGYM KKQPDITNSM RAILVDWLVE

Cyclin B1 DLCQAFSDVI LAVNDVDAED GADPNLCSEY VKDIYAYLRQL EEEQAVRPKY LLGREVTGNM RAILIDWLQV

Cyclin E SDFSRTNYR FKNLFINPSP LPDLSWGCSK EVWLN-MLKKE SRYVHDKHFE VLHSDLEPQM RSILLDWLLE

Cyclin D1 MEHQLLCCEV ETIRRAYPDA NLLNDRVLR ML-KAEETCAP SVSYFKCVQK ----EVLPSM RKIVATWMLE

Cyclin I LKYQFNLYPE TFALASSLLD RFLATVKAHP K-YLSCIAIS CFFLAAKTVE EDERIPVLKV LARDFCGCS

Cyclin A2 VGEEYKLQNE TLHLAVNYID RFLSSMSVL- RGKQLVGTA AMLLASK-FE E-IYPPEVAE FVYITDDTYT

Cyclin B1 VQMKFRLQE TMYMTVSIID RFMQNVCVP- KKMLQLVGT AMFIASKY-E E-MYPPEIGD FAFVTDNTYT

Cyclin E2 VCEVYTLHRE TFYLAQDFFD RFMLTQKDIN KNMLQLIGIT SLFIASKL-E EIYA-PKLQE FAYVTDGACS

Cyclin D1 VCEEQKCEEE VFPLAMNYLD RFLSLE-PVK KSRLQLLGAT CMFVASKMKE -TIPLTAEK LCIYTDNSIR

Cyclin I SSEILRMERI ILDKLNWDLH TATPLDFLHI -FHAIVAVSTRP QLFLSLPKLS PSQHLAVLTK QLLHCMACNQ

Cyclin A2 KQVLRMEHL VLKVLTFDLA APTVNQFLTQ YFLHQPANCK VESLAMFLGE LSLIDADPYL KYLPSVIAGA



Cyclin B1 KHQIRQMEMK ILRALNFGLG RPLPLHFLRR ASKIGEVDVEQ HTLAKYLMEL TMLDYDMVHF PPSQIAAGAF

Cyclin E2 EEDILRMELI ILKALKWELC PVTIISWNL -FLQVDALKDA PKVL-LPQY- -SQETFIQIA QL DLCILAI  
 Cyclin D1 PEELIQMELL LVNKLKWNLA AMTPHDFIEH -FLSKMPEAEE NKQIRKHAQ TFVALCATDV KFISNPPSMV

Cyclin I LLQFRGSM LA MVSL EMEK LIPDWLSLTI ELLQKAQMDS SQLIHCRELV AHHLSTLQSS LPLNSVYVYR  
 Cyclin A2 AFHLALYTVT GQSWPESLIR KTGTYLESK PCLMDLHQTY LKAPQHAQQS IREKYKNSKY HGVSLNPNPE  
 Cyclin B1 CLALKILDNG EWTPTLQHYL SYTEESLLPV MQLAKNVVM VNQGLTKHMT VKNKYATSKH AKISTLPQLN  
 Cyclin E2 DSLEFQYRIL TAAALCHFTS IEVVKKASGL EWDSISECVD WMVPFVNVVK STSPVKLKTFF KKI PMEDRHN  
 Cyclin D1 AAGSVAAVQ GLNLRSPNNF LSYR—-LTR FLSRVIKCDP DCLRACQEQI EALLE---SS LRQAQQNMDP

Cyclin I PLKHTLVTC D KGVFRLHPSS VPGPDFSKDN SKPEVPVRGT AAFYHHLPA A SGCKQTSTKR KVEEMEVD D F  
 Cyclin A2 TLNL  
 Cyclin B1 SALVQDLAKA VAKV  
 Cyclin E2 IQTHNYLAM LEEVNYINTF RKGQLSPVC NGGIMTPPKS TEKPPGKH  
 Cyclin D1 KAAEEEEEEE EEVDLACTPT DVRDVI

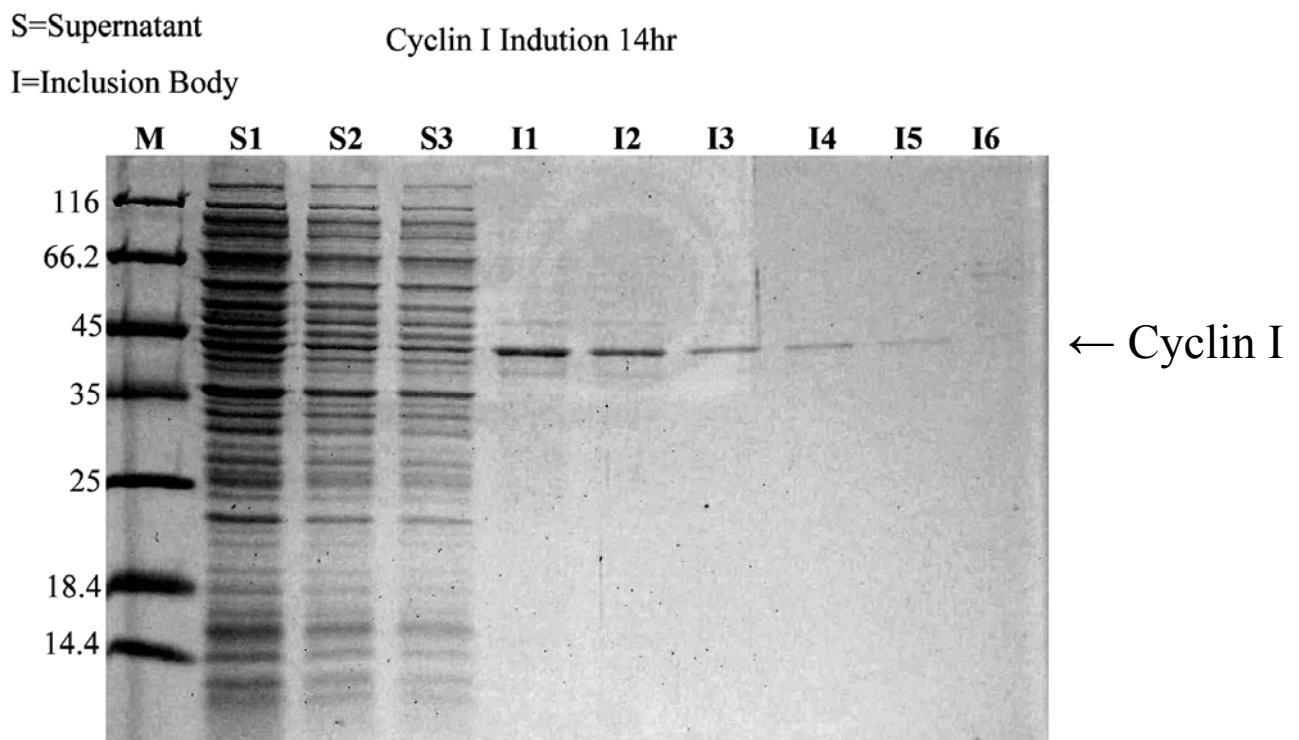
Cyclin I YDGIKRLYNE DNSENVGSV CGTDL SRQEG HASPCPLQP VSVM  
 Cyclin A2  
 Cyclin B1  
 Cyclin E2  
 Cyclin D1

 - cyclin box  
 - PEST sequence



#### 6-4 大量表現 cyclin I 蛋白質:

我們將建構好的 pET30a-cyclin I 質體送入 *E.coli* (BL21(DE3)) 中，以 IPTG 誘導 14 小時，破菌後之產物以 11000rpm 速度離心五分鐘，沉澱物即為我們所需之 cyclin I 內涵體。由圖三可知，我們所得到的 cyclin I 內涵體，所含之 cyclin I 蛋白質大約有 95% 純度。而每一公升的菌液大約可以產生 200mg 的 cyclin I 內涵體。



圖三 — 1 cyclin I 蛋白質以內涵體形式大量表現。

使用 IPTG 誘導 cyclin I 蛋白質表現，破菌離心後即可分別得到上清液及內涵體。其中 M=Marker，S=上清液，I=內涵體，圖中之分子量單位皆為 KD。此為 12.5% 之 SDS-PAGE，inclusion body 取約萬分之一體積(約為 5  $\mu$ g 溶於 20  $\mu$ l sample buffer 中)，以序列稀釋的方法分別 loading 樣品。每一個 well 所下的樣品量分別為 2.5  $\mu$ g，1.25  $\mu$ g，0.625  $\mu$ g，0.313  $\mu$ g，0.156  $\mu$ g，0.078  $\mu$ g，而上清液 loading 量分別為 20  $\mu$ g，10  $\mu$ g，5  $\mu$ g。

## 6-5 利用摺疊中間物探討蛋白質之穩定度:

### 6-5-1 螢光儀分析芳香族胺基酸之穩定度

蛋白質中的芳香族 (aromatic) 胺基酸-色胺酸 (tryptophan) 、酪胺酸 (tyrosine) 、苯丙胺酸 (phenylalanine) ，會吸收波長280nm左右的光，如果這些胺基酸處於親水性環境時，這些被吸收的能量大部分會以熱釋放出來。反之，若是芳香族胺基酸處於疏水性環境，或形成疏水性核心時，則被吸收的能量會以光的形式釋放出來<sup>110</sup>，我們可以用放出的光強度來比較屬水性胺基酸的穩定度。圖四-1為使用Tris緩衝液摺疊的中間物，其螢光強度為M5>M4>M3> M2>M1，圖四-2為使用Tris緩衝液+Zn摺疊的中間物，其螢光強度為M5≥M4>M3> M2>M1，圖四-3為使用Tris+Ca緩衝液摺疊的中間物，其螢光強度為M5>M4>M3> M2>M1，這三組的結果相似，代表蛋白質的疏水性胺基酸隨者摺疊形成較穩定的狀態。圖四-4為使用Tris+Zn、Ca緩衝液摺疊的中間物，其螢光強度為M5>M4>M1> M3>M2，雖然在摺疊的過程中，我們一步步移除造成蛋白質變性的因素，但是蛋白質的摺疊有可能不會平順的往能量最低態進行，中間可能會出現一些區域的能量最低型態 (Local minimal energy) ，如果直接將蛋白質從變性狀態直接去除變性劑，可能會造成蛋白質在摺疊時會有聚集沉澱的現象<sup>112</sup>。所以當我們逐步移除變性劑時，有可能會使蛋白質在摺疊過程中，出現比前面或是後面步驟穩定的情形。

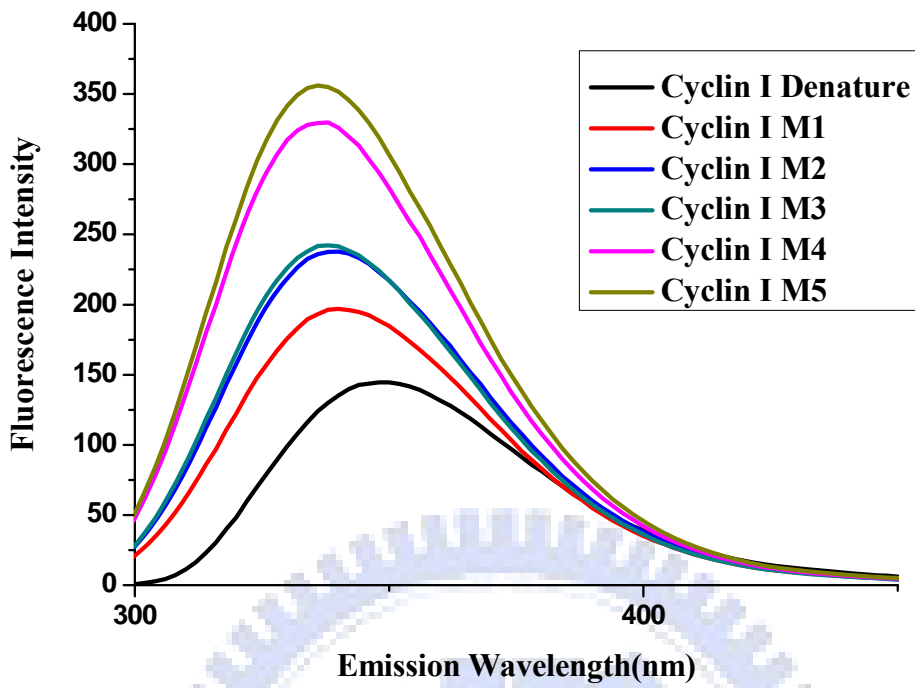
使用Tris緩衝液的摺疊中間物螢光光譜中，散射光波峰位置為 Denature: 348nm，M1: 340nm，M2: 340nm，M3: 338nm、M4: 336nm、M5: 336nm；在使用Tris+Zn緩衝液的摺疊中間物螢光光譜中，散射光波峰位置為 Denature: 348nm，M1: 342nm，M2: 338nm，M3: 338nm、M4: 336nm、M5: 336nm；在使用Tris+Ca緩衝液的摺疊中間物螢光光譜中，散射光波峰位置為 Denature: 348nm，M1: 340nm，M2: 340nm，M3: 338nm、M4: 336nm、M5: 336nm；在使用Tris+Zn、Ca緩衝液的摺疊中間物螢光光譜中，散射光波峰位置為 Denature: 348nm，M1: 338nm，M2: 338nm，M3: 338nm、M4: 336nm、M5: 336nm；蛋白質的螢光波峰隨者摺疊步驟有向左移動 (blue shift)的情形。因為當色胺酸包藏在蛋白質內部時，最大散射波長為325~330 nm，而色胺酸暴露在蛋白質表面時，最大散射波長為 345~350 nm。所以可以證明蛋白質隨者摺疊步驟趨向穩定結構，並且與一般自然態的蛋白質一樣，疏水性胺基酸被包埋在蛋白質裡面。

圖四-5結果顯示芳香族胺基酸隨者摺疊的進行，從親水性環境(芳香族胺基酸較不穩定)進入疏水性環境(芳香族胺基酸較穩定)，在M4、M5時達到最穩定的狀態，其中在同時添加Zn、Ca的摺疊組中，其I<sub>320</sub>/I<sub>365</sub>的(320nm與365nm時之激發光強度)比例在M1、M2、

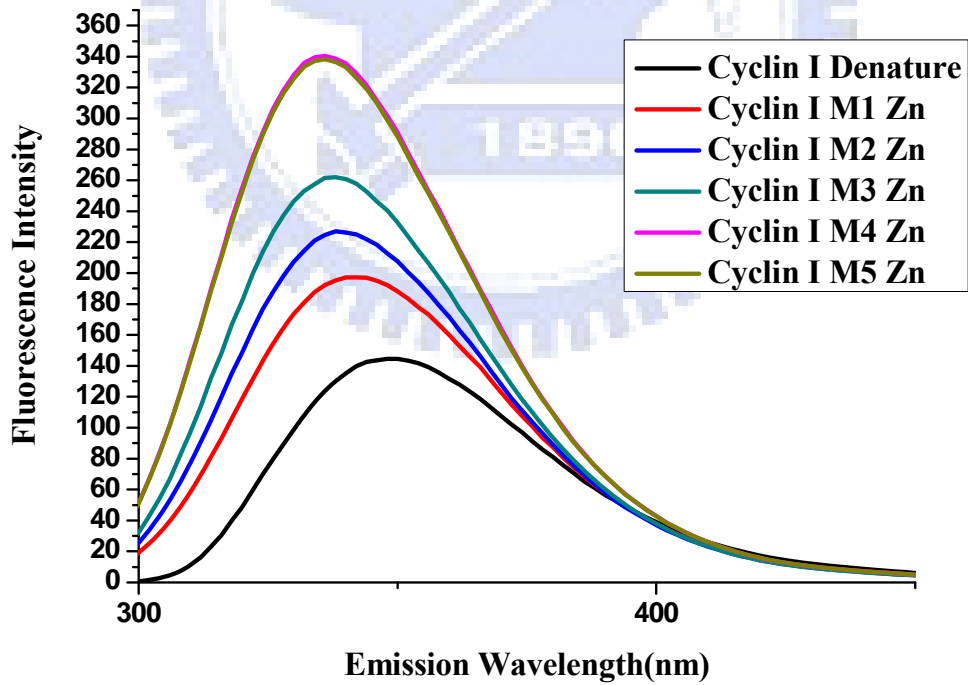
M3、M4、M5時均較其它三組高，但因本方法之吸光值會因離子或緩衝液之不同產生些許之偏移，所以不同緩衝液之間的蛋白質無法比較，只可顯示在摺疊過程中各組蛋白質疏水性胺基酸是否有漸趨穩定，結果顯示在四組摺疊環境中，蛋白質疏水性胺基酸均有漸趨穩定的情形。



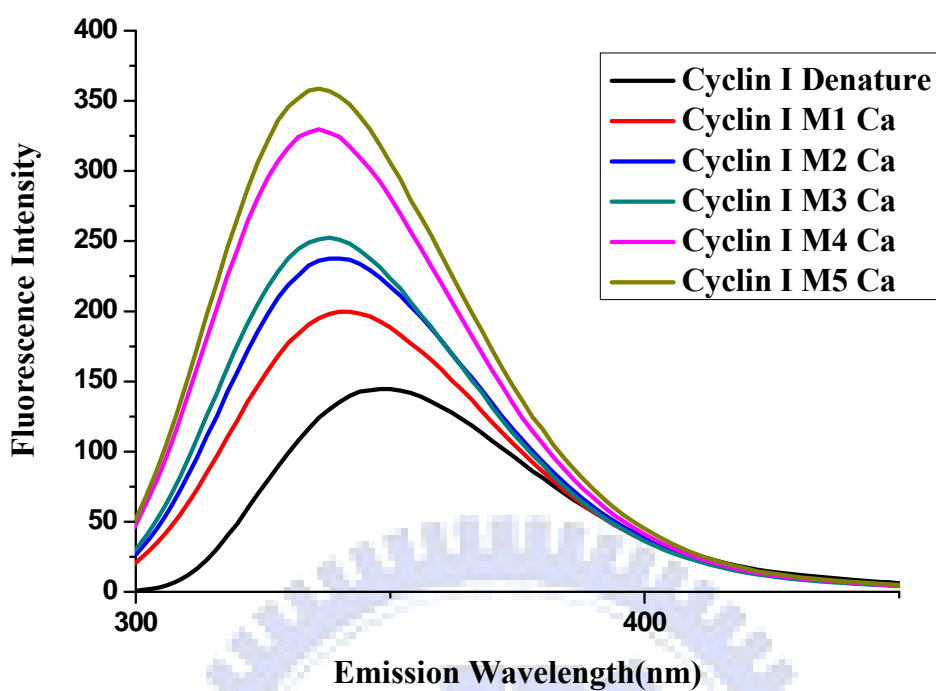




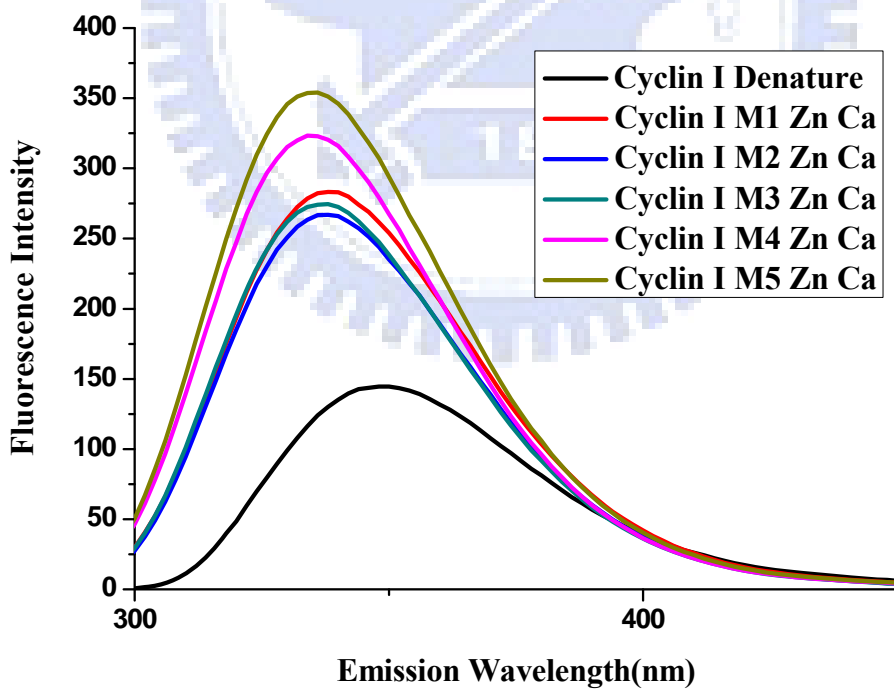
圖四 — 1 cyclin I 蛋白質以 Tris 緩衝液摺疊中間物螢光圖，激發光為 280nm。



圖四 — 2 cyclin I 蛋白質以 Tris+Zn 緩衝液摺疊中間物螢光圖，激發光 280nm。



圖四 — 3 cyclin I 蛋白質以 Tris+Ca 緩衝液摺疊中間物螢光圖，激發光 280nm。



圖四 — 4 cyclin I 蛋白質 Tris+Ca、Zn 緩衝液摺疊中間物螢光圖，激發光 280nm。

	Denature	M1	M2	M3	M4	M5
最高吸收螢光值	144.587	196.95	237.62	242.137	329.668	356.092
波峰位置(nm)	348	340	340	338	336	336
波峰位移(nm)(相對於 U)	0	-8	-8	-10	-12	-12

表一 — 1 cyclin I 蛋白質以 Tris 緩衝液摺疊中間物螢光比較

	Denature	M1	M2	M3	M4	M5
最高吸收螢光值	144.587	197.297	226.929	262.087	340.304	338.3
波峰位置(nm)	348	342	338	338	336	336
波峰位移(nm)(相對於 U)	0	-6	-10	-10	-12	-12

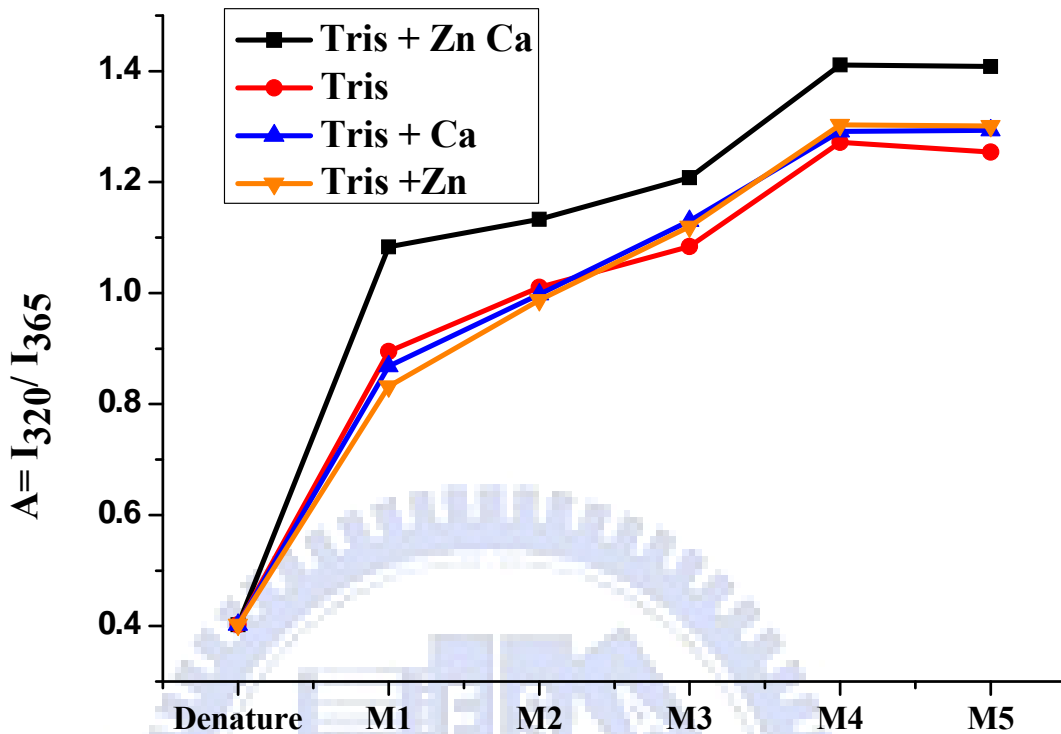
表一 — 2 cyclin I 蛋白質以 Tris+Zn 緩衝液摺疊中間物螢光比較

	Denature	M1	M2	M3	M4	M5
最高吸收螢光值	144.587	199.71	237.538	252.356	329.598	358.631
波峰位置(nm)	348	340	340	338	336	336
波峰位移(nm)(相對於 U)	0	-8	-8	-10	-12	-12

表一 — 3 cyclin I 蛋白質以 Tris+Ca 緩衝液摺疊中間物螢光比較

	Denature	M1	M2	M3	M4	M5
最高吸收螢光值	144.587	283.173	266.846	274.712	323.496	353.737
波峰位置(nm)	348	338	338	338	336	336
波峰位移(nm)(相對於 U)	0	-10	-10	-10	-12	-12

表一 — 4 cyclin I 蛋白質以 Tris+Ca、Zn 緩衝液摺疊中間物螢光比較



圖四 — 5 Cyclin I 蛋白質在摺疊過程中芳香族胺基酸的穩定度

#### 6-5-2 圓二色旋光光譜儀測量 cyclin I 蛋白質的二級結構比例:

本實驗測量以不同溶液摺疊之 cyclin I 蛋白質之二級結構，以比較不同溶液摺疊的 cyclin I 中間體二級結構是否有不同，以探討離子對摺疊路徑的影響。

圖五-1，五-3，五-5 五-7 為使用不同緩衝液摺疊的 cyclin I 蛋白質中間體 CD 圖譜，圖五-2、五-4、五-6、五-8 則為使用 SELCON3 程式換算而得的中間體二級結構比例。圖五-1、五-3 的 M1、M2 因為燈壓過高，致使在低於 210nm 時數據不可信，因此 M1、M2 只測量到 210nm。

蛋白質的二級結構基本上包括了無序鏈 (random coil)、 $\alpha$ -螺旋( $\alpha$ -helix)、 $\beta$ -薄片 ( $\beta$ -sheet) 及翻轉 (turn)。用 CD 來鑑定蛋白質的結構仍屬於經驗法 (empirical method)，也就是要靠資料庫的建立。SELCON 3 程式最大的特色是可以選取基本的二級結構，將各波長不同的 CD 吸收值代入程式可得蛋白質中各種二級結構之百分比。

圖五-1、圖五-2 分別代表在 Tris 緩衝液所摺疊的 cyclin I 蛋白質 CD 圖譜以及二級比例結構，M1 的二級結構包括了 56.6%  $\alpha$ -helix；21.8% distorted  $\alpha$ -helix；0.29%  $\beta$ -sheet；0.29% distorted  $\beta$ -sheet 5.54%；turn；15.38% unordered；幾乎沒有  $\beta$ -sheet 的結構，M2、M3、M4 的二級結構比例與 M1 相似。比較不一樣的是 M5，M5 的二級結構包括了 52.5%  $\alpha$ -helix；21.1% distorted  $\alpha$ -helix；0.4%  $\beta$ -sheet；0.9% distorted  $\beta$ -sheet；8.2% turn；17.0% unordered。

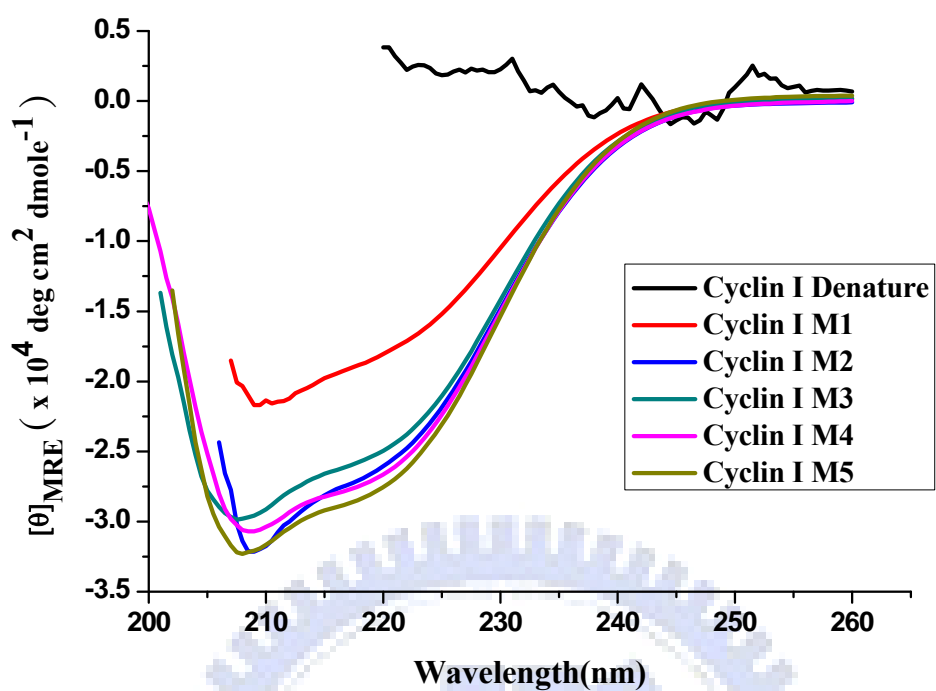
圖五-3、圖五-4 表示 Tris+Zn 緩衝液所摺疊的 cyclin I 蛋白質的 CD 圖譜及二級結構比例，M1 的二級結構包括了 57.44%  $\alpha$ -helix；22.11% distorted  $\alpha$ -helix；0.10%  $\beta$ -sheet；0.20% distorted  $\beta$ -sheet 5.48% turn；14.68% unordered；與單純只使用 Tris 緩衝液的結果相似，M2、M4 的二級結構比例與 M1 相似。而 M3 的二級結構包括了 51.44%  $\alpha$ -helix；21.00% distorted  $\alpha$ -helix；0.35%  $\beta$ -sheet；1.14% distorted  $\beta$ -sheet 8.92% turn；17.15% unordered，而 M5 的二級結構比例則與 M3 相似。

而圖五-5、圖五-6 是 Tris+Ca 緩衝液所摺疊的 cyclin I 蛋白質 CD 圖譜及二級結構比例，M1 的二級結構包括了 56.76%  $\alpha$ -helix；22.15% distorted  $\alpha$ -helix；0.19%  $\beta$ -sheet；0.19% distorted  $\beta$ -sheet 5.47% turn；15.24% unordered；

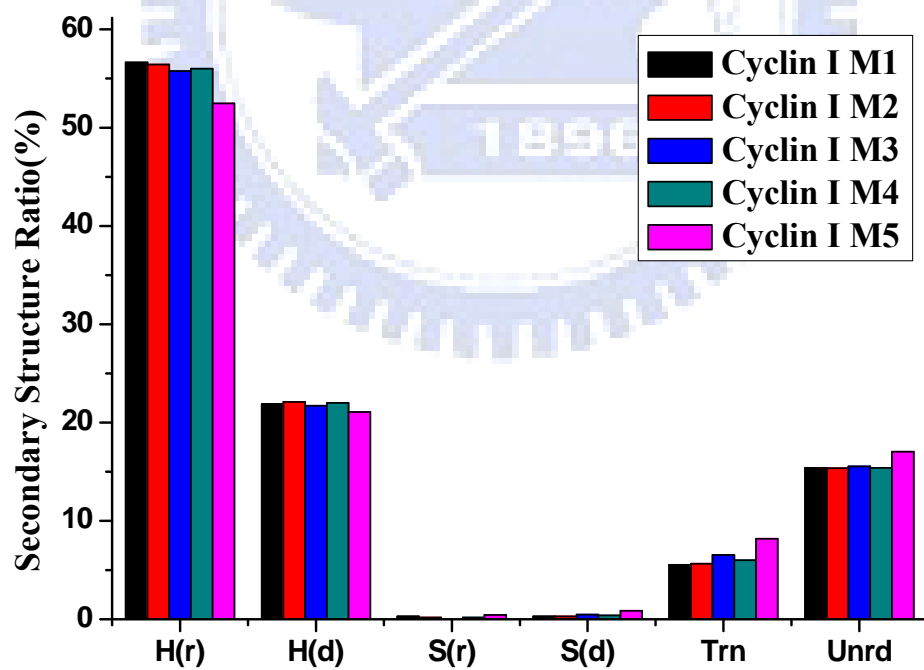
圖五-7、圖五-8 表示 Tris+Zn、Ca 緩衝液所摺疊的 cyclin I 蛋白質的 CD 圖譜及二級結構比例，M1 的二級結構包括了 57.61%  $\alpha$ -helix；22.08% distorted  $\alpha$ -helix；0.10%  $\beta$ -sheet；0.20% distorted  $\beta$ -sheet 5.40 turn；14.62% unordered；而 M2、M3、M4、M5 的二級結構比例與 M1 大致相同。

雖然各組的二級結構比例有少許差異，不過其二級結構跟現在已知結構的 cyclin 家族其他成員一樣(參照附錄二)，大部分由 helix 組成，並且早在 M1 時，helix 就已經形成，與 M2、M3、M4、M5 相比，helix 的比例也無明顯改變。表示在蛋白質的摺疊過程中，helix 的形成是在早期，並且不容易受到外在的環境干擾。

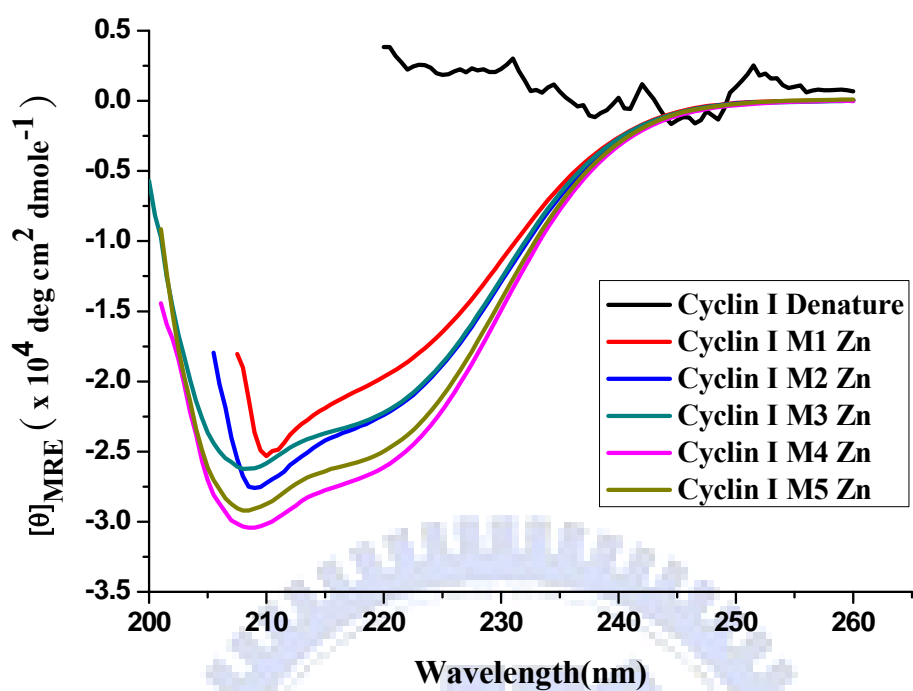
縮寫	H	S	Trn	Unrd	r	d
二級結構狀態	$\alpha$ -Helix	$\beta$ -sheet	turn	random coil	regular	distroed



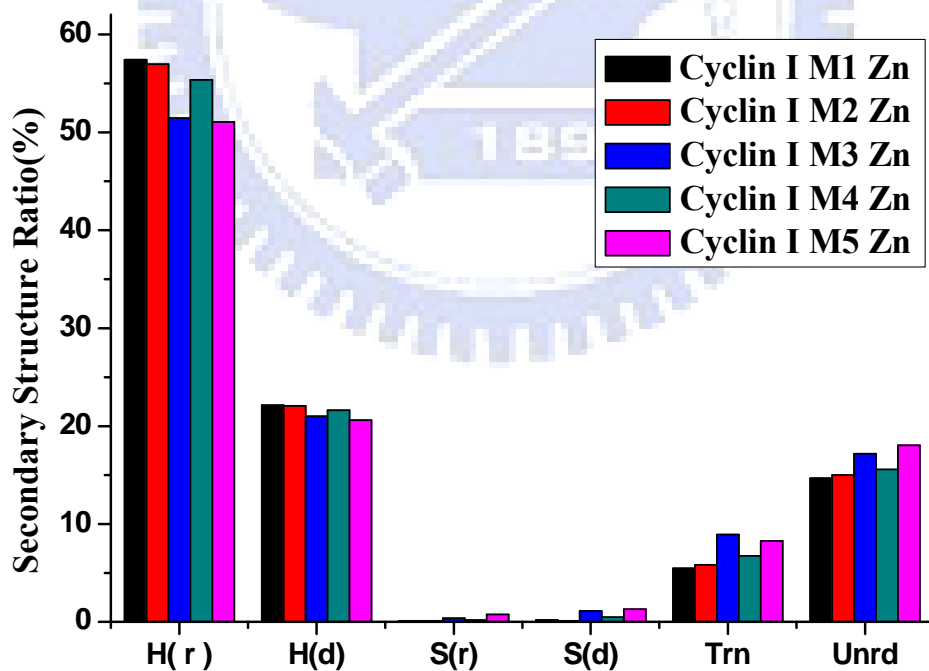
圖五 — 1 cyclin I 蛋白質以 Tris 緩衝液摺疊中間物圓二色旋光光譜儀圖譜



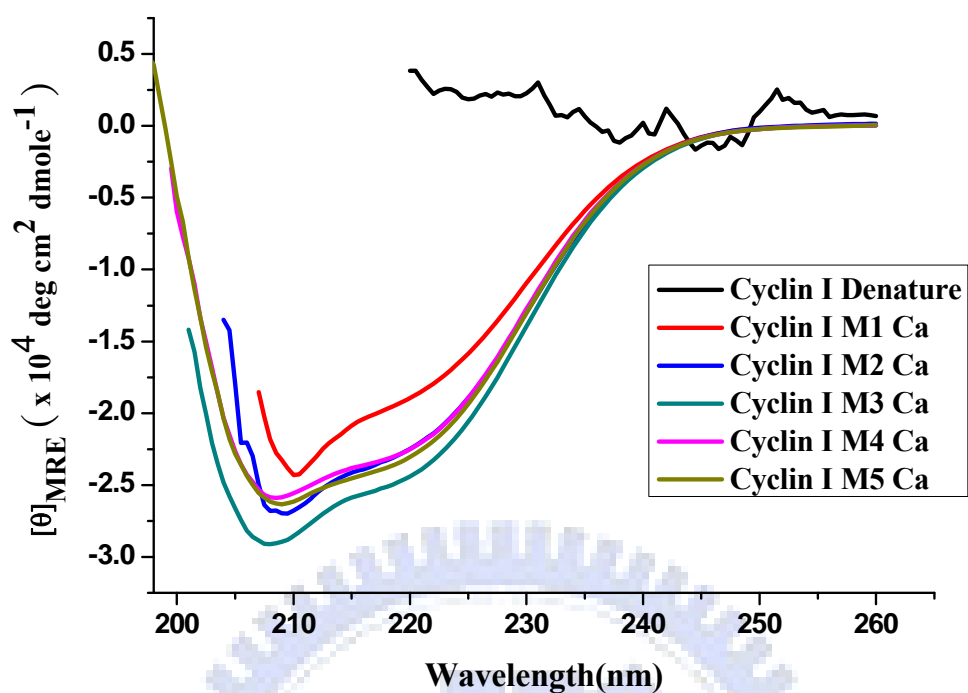
圖五 — 2 cyclin I 蛋白質以 Tris 緩衝液摺疊中間物二級結構比例



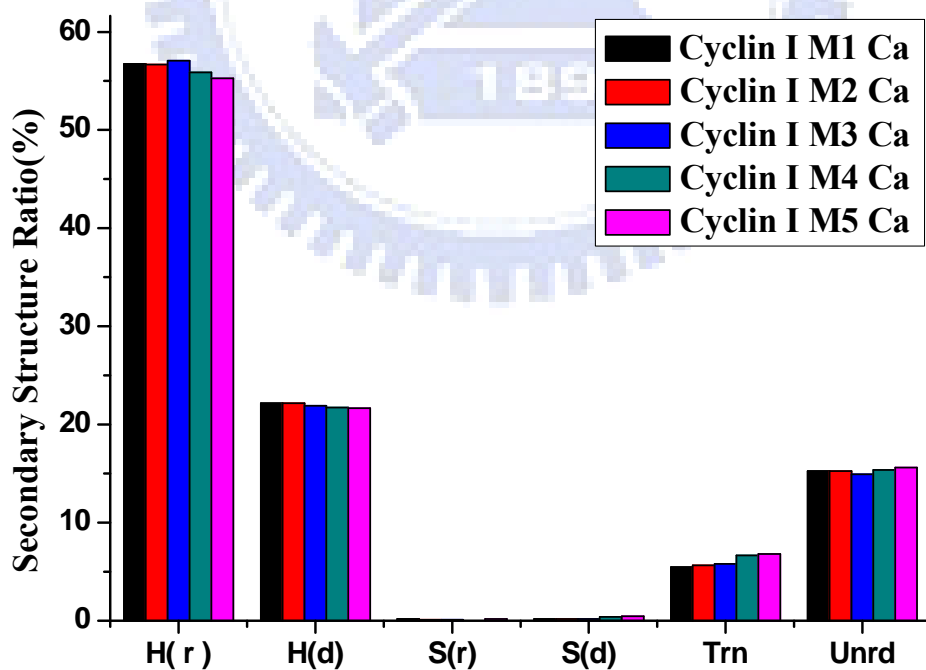
圖五 — 3 cyclin I 蛋白質以 Tris+Zn 緩衝液摺疊中間物圓二色旋光光譜儀圖譜



圖五 — 4 cyclin I 蛋白質以 Tris+Zn 緩衝液摺疊中間物二級結構比例

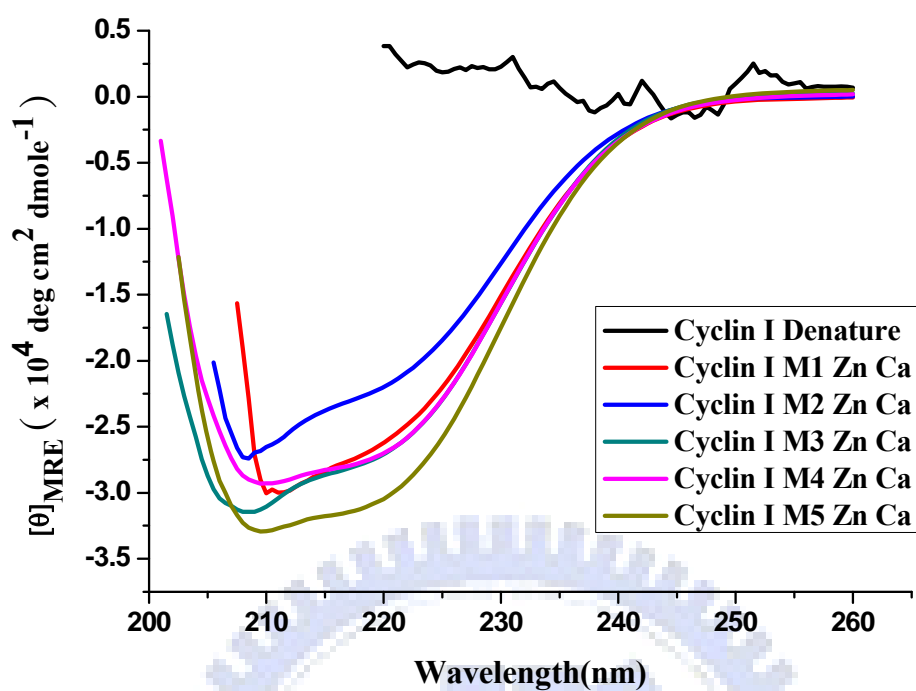


圖五 — 5 cyclin I 蛋白質以 Tris 緩衝液+Ca 摺疊中間物圓二色旋光光譜儀圖譜

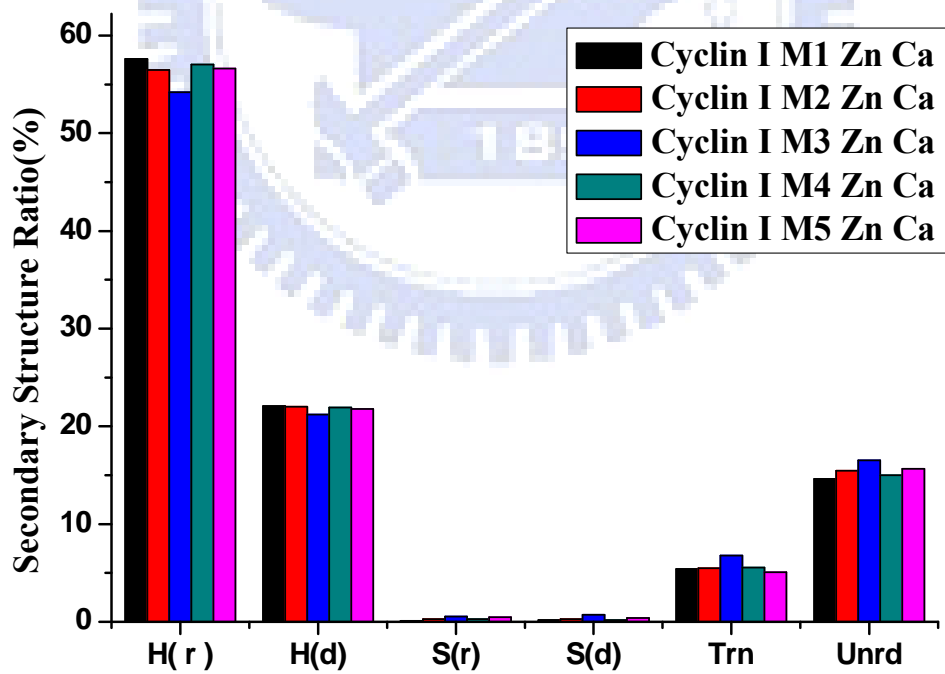


圖五 — 6 cyclin I 蛋白質以 Tris+Ca 緩衝液摺疊中間物二級結構比例





圖五 — 7 cyclin I 蛋白質以 Tris 緩衝液+Ca、Zn 摺疊中間物圓二色旋光光譜儀圖譜



圖五 — 8 cyclin I 蛋白質以 Tris+Ca、Zn 緩衝液摺疊中間物二級結構比例

	H(r)	H(d)	S(r)	S(d)	Trn	Unrd
M1	56.64%	21.87%	0.29%	0.29%	5.54%	15.38%
M2	56.43%	22.12%	0.19%	0.29%	5.62%	15.35%
M3	55.73%	21.71%	0.00%	0.47%	6.54%	15.55%
M4	56.01%	22.00%	0.19%	0.39%	6.01%	15.41%
M5	52.45%	21.07%	0.43%	0.86%	8.17%	17.02%

表二 - 1 cyclin I 蛋白質以 Tris 緩衝液摺疊的摺疊中間物二級結構比例

	H(r)	H(d)	S(r)	S(d)	Trn	Unrd
M1	57.44%	22.11%	0.10%	0.20%	5.48%	14.68%
M2	56.97%	22.04%	0.10%	0.10%	5.82%	14.98%
M3	51.44%	21.00%	0.35%	1.14%	8.92%	17.15%
M4	55.38%	21.63%	0.19%	0.48%	6.73%	15.58%
M5	51.07%	20.60%	0.77%	1.29%	8.24%	18.03%

表二 - 2 cyclin I 蛋白質以 Tris+Zn 緩衝液摺疊的摺疊中間物二級結構比例

	H(r)	H(d)	S(r)	S(d)	Trn	Unrd
M1	56.76%	22.15%	0.19%	0.19%	5.47%	15.24%
M2	56.66%	22.15%	0.10%	0.19%	5.66%	15.24%
M3	57.07%	21.91%	0.10%	0.20%	5.80%	14.93%
M4	55.89%	21.72%	0.00%	0.39%	6.66%	15.35%
M5	55.27%	21.65%	0.19%	0.48%	6.80%	15.61%

表二 - 3 cyclin I 蛋白質以 Tris+Ca 緩衝液摺疊的摺疊中間物二級結構比例

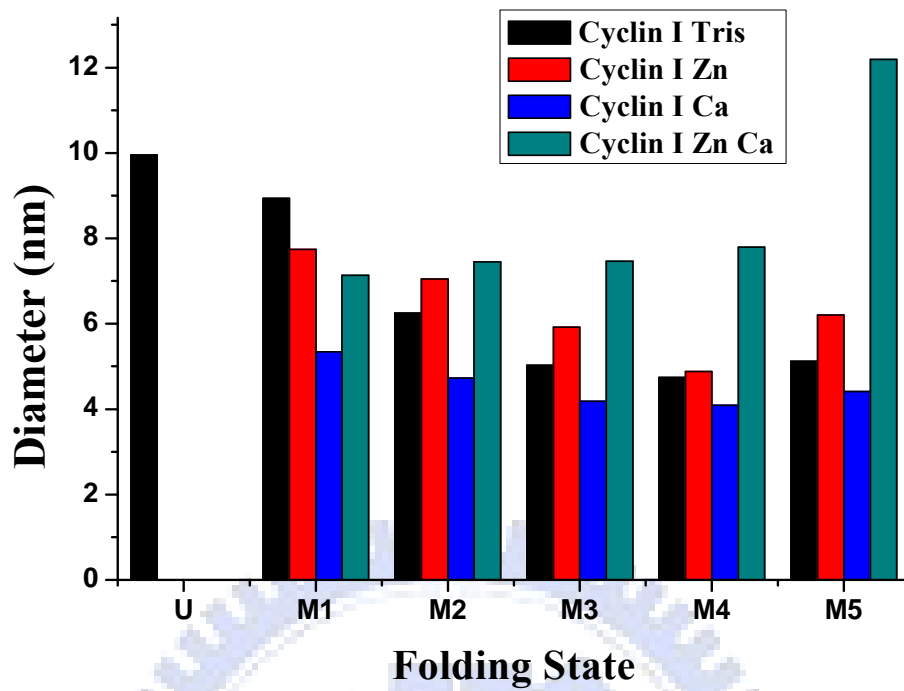
	H(r)	H(d)	S(r)	S(d)	Trn	Unrd
M1	57.61%	22.08%	0.10%	0.20%	5.40%	14.62%
M2	56.48%	22.00%	0.29%	0.29%	5.48%	15.47%
M3	54.18%	21.21%	0.55%	0.73%	6.80%	16.53%
M4	57.02%	21.93%	0.29%	0.19%	5.56%	15.01%
M5	56.62%	21.79%	0.48%	0.38%	5.09%	15.64%

表二 - 4 cyclin I 蛋白質以 Tris+Ca、Zn 緩衝液摺疊的摺疊中間物二級結構比例

### 6-5-3 動態光散射儀與微溫差掃描熱卡路里計測量 cyclin I 蛋白質之顆粒大小與熱穩定性:

動態光散射儀可以測量摺疊中間物的顆粒大小，而微溫差掃描熱卡路里計可以測量摺疊中間物的熱穩定性。一般而言，當相同分子量的蛋白質，所測出的顆粒粒徑越小，代表其分子排列較緊緻，也就有可能越趨近於能量最低態，而如果中間物的熱穩定性越高，同樣也代表了蛋白質較趨近能量最低態。我們同時使用動態光散射儀與微溫差掃描熱卡路里計來測量摺疊中間物，來確定蛋白質摺疊是否有向能量最低態進行的趨勢。因為水會跟尿素會形成複合體，並在 70°C-80°C 有一熱相變點，在微溫差掃描熱卡路里計掃描時，會產生一個強烈的訊號，所以測量變性蛋白質時，會因為高濃度尿素造成雜訊過大，而無法正常判讀蛋白質的訊號。

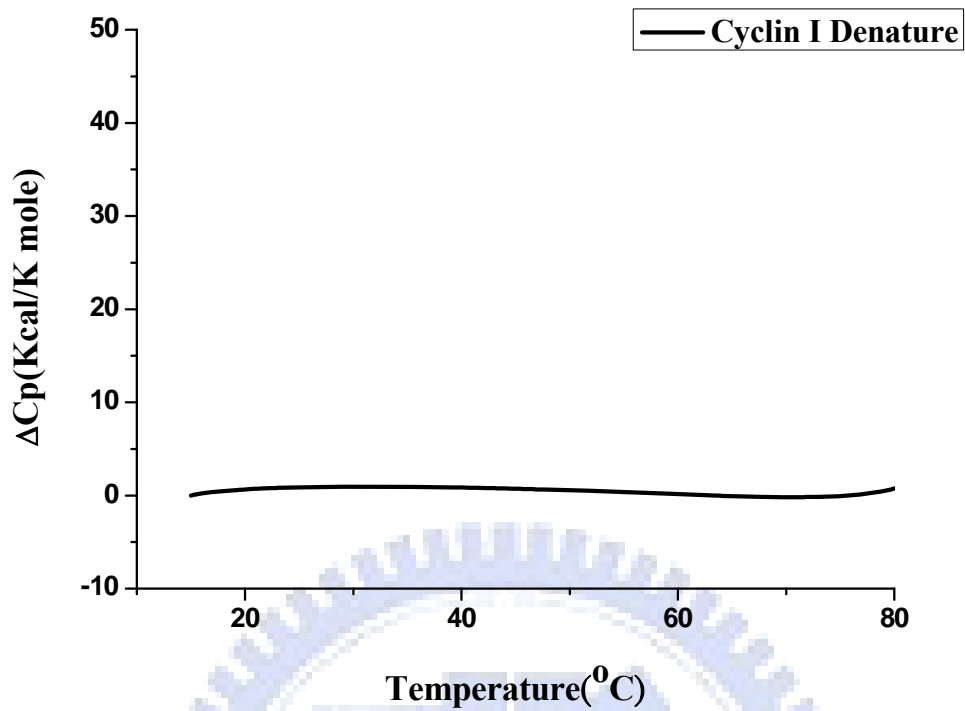
Cyclin I 蛋白質的粒徑大小，在變性時為  $9.95 \pm 1.47 \text{ nm}$ ，使用 Tris 緩衝液摺疊的中間體大小分別為：M1:  $8.94 \pm 0.55 \text{ nm}$ ；M2:  $6.25 \pm 0.29 \text{ nm}$ ；M3:  $4.64 \pm 0.81 \text{ nm}$ ；M4:  $4.74 \pm 0.04 \text{ nm}$ ；M5:  $5.12 \pm 0.01 \text{ nm}$ ，在 Tris 加 Zn 緩衝液摺疊的中間體大小分別為：M1:  $7.74 \pm 0.21 \text{ nm}$ ；M2:  $7.05 \pm 0.26 \text{ nm}$ ；M3:  $5.92 \pm 0.15 \text{ nm}$ ；M4:  $4.88 \pm 0.02 \text{ nm}$ ；M5:  $6.20 \pm 0.20 \text{ nm}$ 。在 Tris 加 Ca 緩衝液摺疊的中間體大小分別為：M1:  $5.34 \pm 0.01 \text{ nm}$ ；M2:  $4.73 \pm 0.10 \text{ nm}$ ；M3:  $4.18 \pm 0.08 \text{ nm}$ ；M4:  $4.09 \pm 0.01 \text{ nm}$ ；M5:  $4.41 \pm 0.12 \text{ nm}$ 。在 Tris 加 Ca、Zn 緩衝液摺疊的中間體大小分別為：M1:  $7.13 \pm 0.12 \text{ nm}$ ；M2:  $7.45 \pm 0.28 \text{ nm}$ ；M3:  $7.46 \pm 0.31 \text{ nm}$ ；M4:  $7.79 \pm 0.04 \text{ nm}$ ；M5:  $12.19 \pm 0.14 \text{ nm}$ 。在 Tris、Tris+Zn、Tris+Ca 的三組結果中，粒徑大小皆隨者摺疊過程而變小，表示在摺疊過程中，蛋白質漸漸趨向穩定態。M5 的粒徑大小突然變大，可能是因為在移除側基保護藥劑甘露醇後，蛋白質形成雙聚體或是蛋白質呈現較不穩定的狀態，在這一方面還需要驗證。而在 Tris+Zn、Ca 的摺疊過程中，M1、M2、M3、M4 粒徑大小並沒有顯著的差異，M5 時突然變大，超過了變性的蛋白質大小。可能是因為過多的離子會造成蛋白質內的電性改變，無法摺疊成正確的型態，所以顆粒會變的比較大。另外，在這四組結果中，添加 Ca 離子的緩衝液摺疊的蛋白質粒徑較小，表示蛋白質在此狀態中較穩定。而熱穩定性方面，M1、M2、M3、M4、M5 在偵測範圍內皆無出現可能為相變之訊號。可能是因為 cyclin I 蛋白質並沒有穩定的三級結構，或是其三級結構太過鬆散，導致訊號太弱而無法明確偵測到。



圖六 - 1 以不同緩衝液摺疊 cyclin I 蛋白質的粒徑大小  
(其餘結果放置於附錄 3、4、5、6)

(unit: nm)	Tris	Tris + Zn	Tris + Ca	Tris + Ca、Zn
U	9.95±1.47			
M1	8.94±0.55	7.74±0.21	5.34±0.01	7.13±0.12
M2	6.25±0.29	7.05±0.26	4.73±0.1	7.45±0.28
M3	5.03±0.25	5.92±0.15	4.18±0.08	7.46±0.31
M4	4.74±0.04	4.88±0.02	4.09±0.01	7.79±0.04
M5	5.12±0.01	6.2±0.2	4.41±0.12	12.19±0.14

表三 - 1 以不同緩衝液摺疊 cyclin I 蛋白質的粒徑大小比較

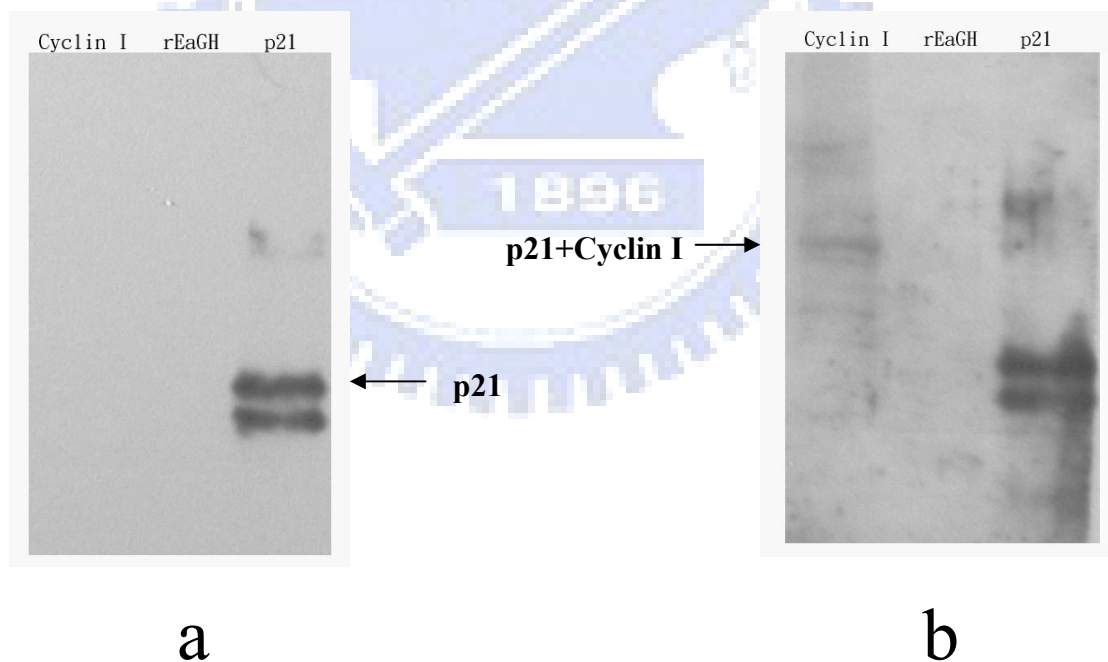


圖六 — 2 以不同緩衝液摺疊 cyclin I 蛋白質摺疊中間物的熱穩定性

結果顯示 cyclin I 蛋白質無穩定之三級結構，可能是處於玻璃態中，無特定構型蛋白質因擁有許多區域結構能量最低態，且各區域結構能量最低態之能量相差不大，故無法出現明顯之相變點。但結構確實緩慢在改變，仍會出現比熱改變之情形，以微溫差掃描熱卡洛里計測量 cyclin I 蛋白質的摺疊中間物結果也發現此現象，證明 cyclin I 蛋白質為無特定構型蛋白質。(其餘結果與此圖相似，並放置於附錄 3、4、5、6)

## 6-6 Far Western Blot 篩選可與 cyclin I 結合的蛋白質

Far Western blot可以檢測蛋白質交互作用，首先使用摺疊緩衝液進行轉漬膜上的蛋白質再摺疊，使轉漬膜上的蛋白質恢復成接近自然態。然後使用p21蛋白質去進行雜合，當p21蛋白質與轉漬膜上的cyclin I蛋白質結合時，即可在轉漬膜上原本cyclin I蛋白的位置，出現p21抗體偵測的訊號。圖a為一般的西方墨點法，其中的rEaGH蛋白質是魚的生長激素，與p21一樣都是在本實驗室中利用細菌表現得到的，用來當對照組，在西方墨點法中，使用p21的抗體去雜合，在cyclin I以及rEaGH兩個蛋白質都沒有發現任何訊號，只有在p21蛋白質的地方發現訊號，可以證明p21抗體的專一性足夠，p21蛋白質因為有truncate狀況，所以有兩條band。圖b為Far western blot，在cyclin I蛋白質的地方，出現了一個明顯的訊號，rEaGH部分仍然沒有訊號出現，代表cyclin I蛋白質與p21蛋白質的鍵結是有專一性的。原本較佳的作法是使用cyclin I蛋白質去進行雜合，找出可以和cyclin I蛋白質鍵結的蛋白質，可惜的是cyclin I的抗體專一性不足，所以只好使用p21抗體去雜合，證明cyclin I蛋白質與p21蛋白質可以在活體外鍵結。

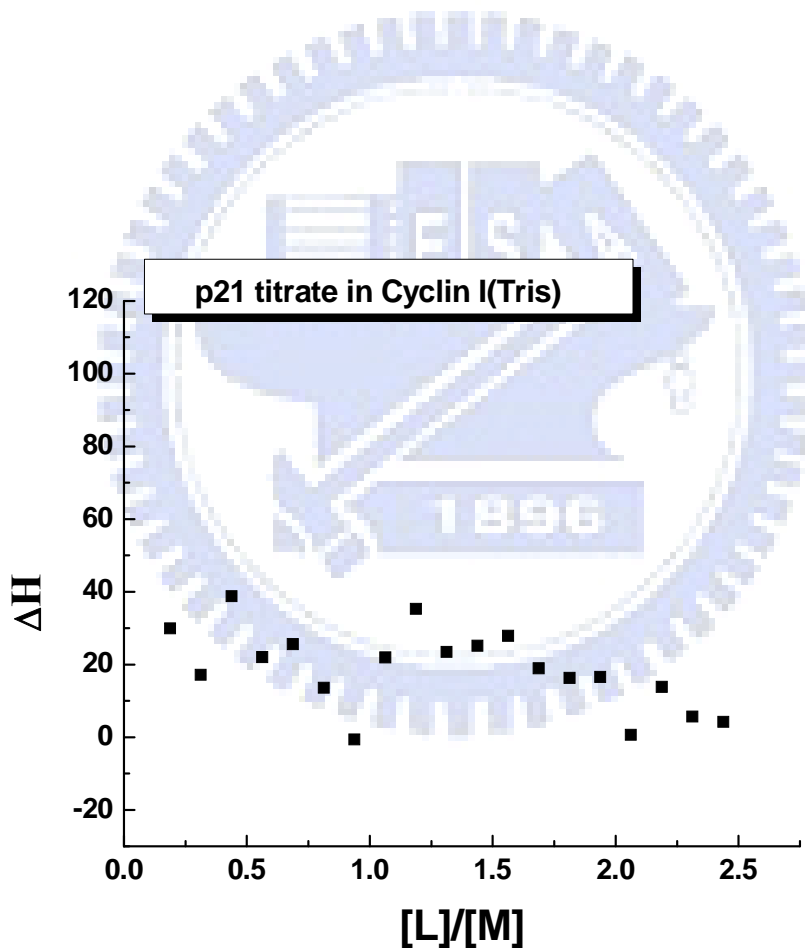


圖七 — 1 far western 證明 p21 可與 cyclin I 鍵結。

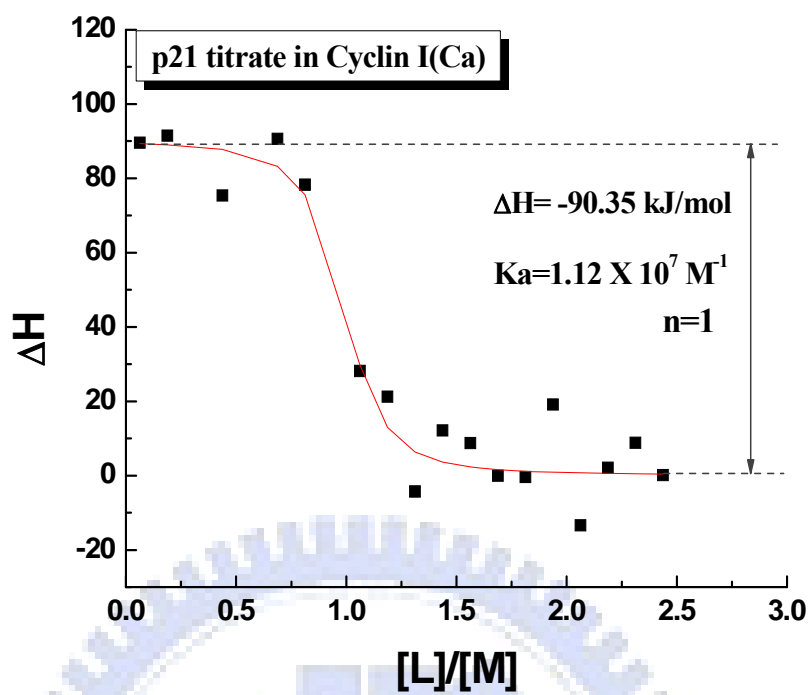
(a)圖為一般西方點墨法，(b)圖為西方-西方點墨法，在西方-西方點墨法的結果中，可以發現 cyclin I 蛋白質的位置出現了 p21 抗體的訊號，表示 cyclin I 可以與 p21 在活體外鍵結。p21 蛋白質含有 truncate form，故出現兩條 band。

### 6-7 ITC 量測 p21 與 cyclin I 的結合熱

ITC (Isothermal Titration Calorimetry) 可以測量非常微量的熱變化，將p21蛋白質滴定至cyclin I蛋白質中，測量其結合熱。p21濃度為350 $\mu$ M，總體積為0.2ml，分為20次滴入cyclin I蛋白質中，cyclin I蛋白質濃度為10 $\mu$ M，總體積為2.8ml。在p21滴入cyclin I蛋白質(未添加Ca)時無明顯吸熱訊號出現，相對的，當p21滴定至含Ca之cyclin I蛋白質時，可以測量出cyclin I與p21蛋白質的結合熱 $\Delta H = 90.35\text{KJ/mole}$ ，結合之平衡常數 (association equilibrium constant)  $K_a = 1.12 \times 10^7/\text{M}$ ，結合比例大約為1:1。由公式 $\Delta G = -RT \ln k_a$ 可求得 $\Delta G = -40.215 \text{ kJ/mole}$ 。且 $\Delta G = \Delta H - T\Delta S$ ，故可求出 $\Delta S = -168\text{kJ/mole}$ 。



圖八 — 1 p21 蛋白質與 cyclin I(Tris)蛋白質之結合熱

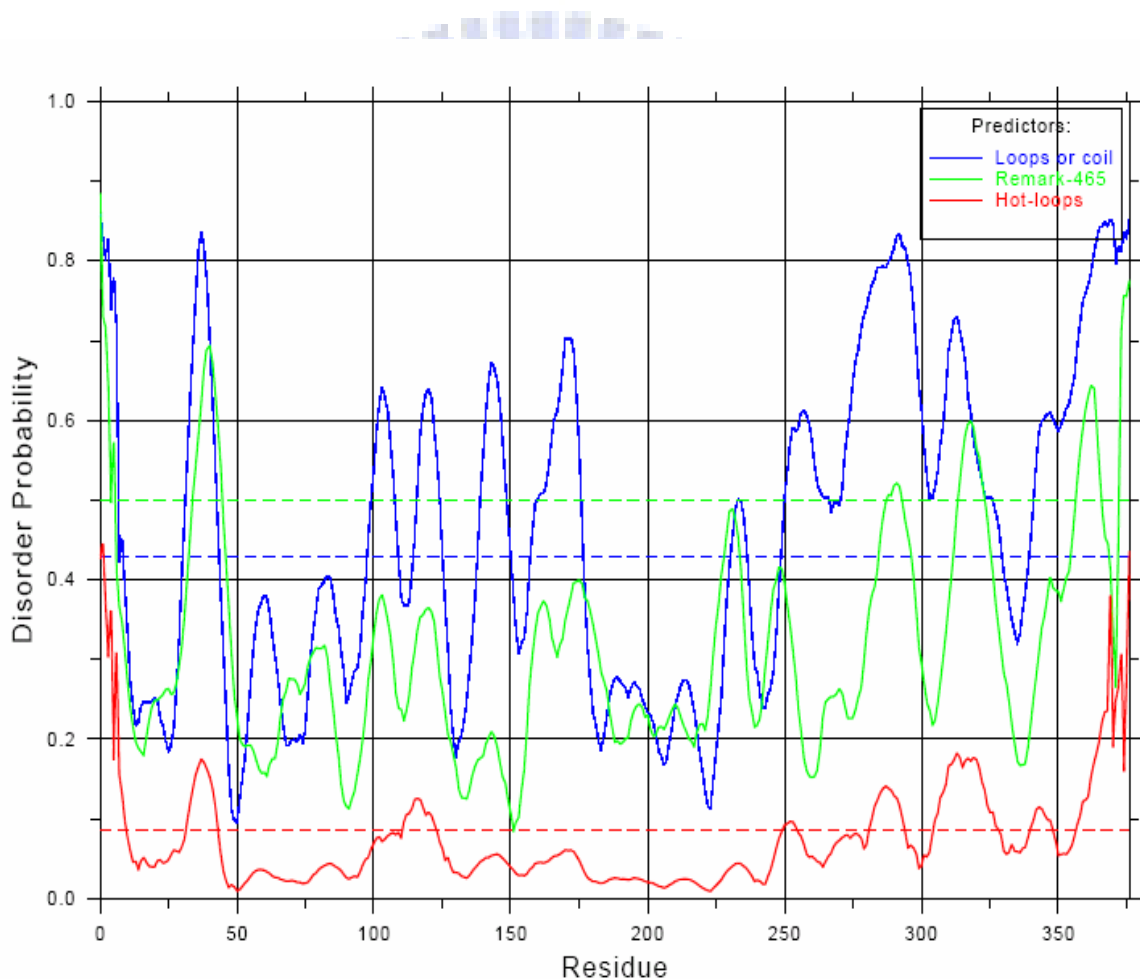


圖八 - 2 p21 蛋白質與 cyclin I(Ca)蛋白質之結合熱



## 6-8 以 DisEMBL Intrinsic Protein Disorder Prediction 1.5 程式預測 cyclin I 結構

利用程式 DisEMBL Intrinsic Protein Disorder Prediction 1.5 (<http://dis.embl.de/>) 分析 cyclin I 蛋白質之二級與三級結構有可能成為無特定構型結構之序列。藍色實線代表序列預測結果，當超出閾值(threshold)時，表示其二級結構是無特定構型(disorder)的，即非  $\alpha$ -helix 或  $\beta$ -strand。紅色實線超出閾值時表示此段序列之 C- $\alpha$  temperature(B) factor 較大，表示此段序列晃動的能力較強，有可能是無特定構型的蛋白質，綠色實線超過閾值時表示在結晶之資料庫中，電子雲密度較低的區域，此區因原子晃動較劇烈，所以電子雲密度會低於其他穩定原子的電子雲。分析結果顯示 cyclin I 為無特定構型蛋白質。



圖九 — 1 以 Intrinsic Protein Disorder Prediction 1.5 程式預測 cyclin I 結構之結果

### Disordered by Loops/coils definition

mkfpgplenq rlsfllekai treaqmwkvn v**RKMPSNQNV** **SPSQ**rdeviq  
wlaklkyqfn lypetfalas sldrflatv kahpkylsci aiscffla**AK**  
**TVEEDERIP**v lkvla**RDSFC** **GCSSE**ilrm eriildklnw **DLHTATPLDF**  
lhifhaiavs **TRPQLLFSLP** **KLSPSQH**lav ltkqllhcma cnqllqfrgs  
mlalamvsle meklipdwls ltiellqkaq mdssqlihcr elvahhlst**L**  
**QSSLPLNSVY** **VYRPLKHTLV** **TCDKGVFRLH** **PSSVPGPDFS** **KDNSKPEVPV**  
**RGTAIFYHHL** **PAASGCKQTS** **TKRKVEEMEV** ddfydgikrl **YNEDNVSENV**  
**GSVCGTDLR** **QEGHASPCPP** **LQPVSVM**

### Disordered by Hot-loops definition

**MKFPGPLENQ** rlsfllekai treaqmwkvn vr**KMPSNQNV** **SPSQ**rdeviq  
wlaklkyqfn lypetfalas sldrflatv kahpkylsci aiscfflaak  
tveederipv l**KVLARDSFC** **GCS**sseilrm eriildklnw dlhtatpldf  
lhifhaiavs trpqlfslp klspsqhlav ltkqllhcma cnqllqfrgs  
mlalamvsle meklipdwls ltiellqkaq mdssqlihcr elvahhlstl  
qsslplnsvy vyrplkhtlv tcdkgvfrlh p**SSVPGPDFS** **KDNS**kpevpv  
rgtaa**FYHHL** **PAASGCKQTS** **TKRKVEEME**v ddfydgikrl ynednvsenv  
gsvcgtd**LSR** **QEGHASPCPP** **LQPVSVM**

### Disordered by Remark-465 definition

mkfpgplenq rlsfllekai treaqmwkvn vrkm**PSNQNV** **SPSQ**rdeviq  
wlaklkyqfn lypetfalas sldrflatv kahpkylsci aiscfflaak  
tveederipv lkvlar**DSFC** gcsseilrm eriildklnw dlhtatpldf  
lhifhaiavs trpqlfslp klspsqhlav ltkqllhcma cnqllqfrgs  
mlalamvsle meklipdwls ltiellqkaq mdssqlihcr elvahhlstl

表四 — 1 以 Intrinsic Protein Disorder Prediction 1.5 程式預測 cyclin I 結構之結果

## 第七章 討論

### 7-1 Cyclin 的功能與蛋白質摺疊

在細胞週期中，Cyclin可藉由與CDK結合，調控細胞週期的進行，而也是因為這種特性，被命名為cyclin。但是最近許多研究指出，除了調控細胞週期外，cyclin也具有調控細胞分化或是凋亡等功能。Cyclin I，與cyclin G1、G2屬於同一個cyclin家族子群，因為在整個細胞週期均有表現，並且主要分布在有絲分裂後組織，所以推測其功能與細胞週期的進行無直接相關。與其序列相似的Cyclin G1，會直接受到p53的調控，功能與細胞凋亡有關；而cyclin G2可以抑制纖維組織母細胞增生；cyclin I，目前被研究出來的功能是抑制細胞生長以及藉由穩定p21來保護細胞避免凋亡，但是目前並無相關的文獻指出cyclin I如何調控p21，並在細胞中扮演其獨特的角色。在實驗室中，我們利用Tris緩衝液、Tris+Zn緩衝液、Tris+Ca緩衝液、以及Tris + Zn、Ca緩衝液去摺疊cyclin I蛋白質，希望可以藉此了解cyclin I蛋白質的結構，以幫助接下來的研究。

### 7-2 Zn、Ca 離子對於結構之影響

在正常生理環境下，有些蛋白質需要金屬的結合或是幫助才可以擁有功能，例如TFIIIA，可以藉由Zn離子的幫助形成Zn手指區域(Zinc-finger domain)，可以插入DNA鏈中並且解開DNA鏈，幫助轉錄(Transcription)的進行。Cyclin I的序列中含有可能的Zn手指鍵結序列，因為cyclin I屬於核蛋白，或許有可能參與這類反應，所以我們在摺疊時添加了Zn離子；相同的，在細胞凋亡時，Ca離子濃度會上升，並進入粒線體中，粒線体外膜因為高濃度的Ca離子而造成膜電位改變並造成一系列的影響，其中一項便是抑制p21的轉錄，但是cyclin I卻可以穩定p21蛋白質的量並抑制細胞凋亡，所以推測cyclin I的功能可能會跟Ca離子的濃度相關，故另外做了一組含有Ca離子的摺疊。

### 7-3 使 cyclin I 蛋白質摺疊至自然態

蛋白質中的芳香族胺基酸 (aromatic amino acid) 會因為苯環的電子共振而吸收大約波長為280nm的紫外光，並且在較低能量釋放出螢光。我們利用螢光儀測量cyclin I蛋白質的摺疊中間物，發現螢光的最高峰有增加並且有藍位移 (blue shift) 的情形。當芳香族胺基酸的側基處於親水性較佳的環境中時，會與附近的粒子作用而造成能階較不穩定，使得部份的能量以熱的形式散溢出來，以及螢

光的能量較低(紅位移)。反之，當芳香族胺基酸在疏水性較強的環境時，因為結構的穩定，可使得螢光強度較強並且能量較高。芳香族胺基酸也是屬於疏水性胺基酸，我們的結果顯示，蛋白質隨者摺疊過程有呈現螢光增強並且向左移動的趨勢，顯示在摺疊過程中，cyclin I蛋白質的芳香族胺基酸從親水性環境(蛋白質外側)摺疊到疏水性環境中(疏水性核心，Hydrophobic core)。這與一般認知的蛋白質結構相似。

#### 7-4 Cyclin I 為自然無特定結構的蛋白質

cyclin I的結構以微溫差掃描熱卡路里計測量的結果，並沒有出現明顯的熱相變點，但卻有緩慢的比熱改變，顯示cyclin I的三級結構非常鬆散，類似玻璃態(glassy state)。玻璃態指的是蛋白質內鍵結主要是靠短距離的交互作用，並非長距離交互作用，存在許多區域能量最低態構型，當加熱時，短距離鍵結被打開後，會再與附近的胺基酸鍵結，達到另一個能量最低態，因為從一個能量最低態到達另一個能量最低態時能量改變不大，故無明顯熱相變點，由於相變確實在進行，所以比熱會出現改變的情形。而以DisEMBL Intrinsic Protein Disorder Prediction 1.5程式預測結果也顯示cyclin I 含有可能形成無特定構型的序列。直到九零年代初期，大部分蛋白質的研究有結構決定功能的觀點，最近的研究指出，雖然有些蛋白質的功能是與其特殊結構相關，但是無特定構型蛋白質也有其特殊功能，其主要功能是在訊息傳導或是調控方面，推測可能是因為蛋白質結構鬆散，造成蛋白質可以形成多種形狀，與受調控的蛋白質接合，蛋白質在此時即扮演接合(Adaptor)的角色。

#### 7-5 自然無特定構型蛋白質與蛋白質摺疊

Cyclin I為自然無特定構型蛋白質，在我們獲得cyclin I蛋白質後，需要進行摺疊的原因如下 (1) 從細菌中所取得之蛋白質為內涵體，因為錯誤鍵結，所以疏水性胺基酸易裸落在外，形成不可溶的聚集體，所以需要使用變性緩衝液打斷錯誤鍵結，並重新摺疊，螢光的結果顯示，當摺疊時，疏水性胺基酸會從蛋白質外部重新排列並形成疏水性核心，形成可溶性的蛋白質，疏水性核心的形成也代表蛋白質結構趨近於自然態的蛋白質。(2) 無特定構型蛋白質並非無結構之蛋白質，而是可能存在多種可容易變換的結構，所以需要重新摺疊。(3) cyclin I雖然為無特定構型蛋白質，但在摺疊過程中，粒子的大小顯示出cyclin I依照摺疊過程中逐步摺疊成較穩定的狀態。(4)在不正確的環境下，蛋白質溶液聚集沉

澱，利用摺疊過程緩慢移除變性劑可以確保cyclin I蛋白質可以依照本身特性而形成正確型態，而非多單元聚集。

### 7-6 Cyclin I 蛋白質二級結構主要為 helix 組成

圓二色光譜儀測量顯示在四組不同溶液環境下摺疊的cyclin I蛋白質，均有類似的二級結構比例，並且在M1~M5的改變也不大，大部分都是由helix組成，表示在摺疊初期，cyclin I 的二級結構很快就會出現，另外，因為二級結構比例在四組中並無明顯差異，代表在摺疊過程中，金屬離子並無牽涉在二級結構的形成中。而二級結構主要以helix組成，也與已經解開結構的其他cyclin家族成員一樣，再次印證了cyclin I圓二色光譜儀分析的結果。

### 7-7 離子對摺疊的影響

在一般情況下，相同分子量的蛋白質，如果擁有較小的粒徑大小，即代表其分子排列越緊緻，也就代表其越穩定，而在一般的狀況下，分子會趨近於能量最低態，也就是較穩定的狀態。利用動態光散射儀測量cyclin I蛋白質的粒徑大小，可以發現在含有Ca離子摺疊的cyclin I蛋白質，擁有最小的粒徑大小，也是唯一比Tris緩衝液摺疊小的組別。在正常細胞中，Ca離子濃度大約為 $1\mu\text{M}$ ，而在細胞凋亡時，Ca離子的濃度會提高。Cyclin I蛋白質或許可以在Ca離子出現的情形下，與Ca離子結合，形成能量最低態的cyclin I蛋白質結構。

### 7-8 Cyclin I 蛋白質與 p21 蛋白質鍵結需要 Ca 離子

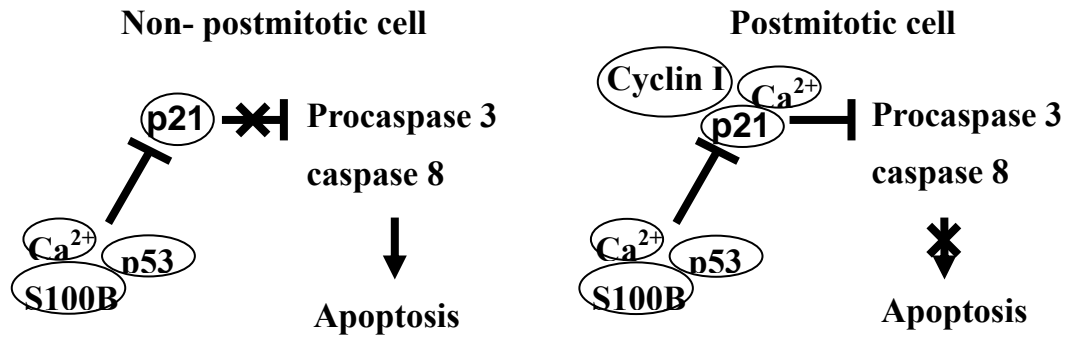
使用Far-western證實cyclin I可以與p21在活體外鍵結，結果顯示，當作負控制組 (negative control) 的rEaGH中並沒有出現任何訊號，可以證實cyclin I與p21的鍵結並非偽陽性，使用恆溫滴定卡洛里計測量的結果顯示cyclin I蛋白質如果無添加Ca離子時，並無法與p21蛋白質結合，如果cyclin I蛋白質添加Ca後，即可與p21蛋白質結合，其中， $\Delta H$ 為 $-90.35\text{kJ/mole}$ ， $K_a$ 為 $1.12 \times 10^7 \text{M}^{-1}$ 。因為 $\Delta G = -RT \ln k_a = \Delta H - T\Delta S$ ，故可求出 $\Delta S$  (Entropy，兩狀態之亂度差) 約為  $-168 \text{kJ/mole}$ 。當 $\Delta S$ 小於0時，表示物體亂度變小並趨向穩定態，換句話說，當含Ca之cyclin I蛋白質與p21蛋白質結合後，會變得比較穩定。添加Ca對於cyclin I蛋白質有影響，也與我們之前的動態光散射儀結果可以互相呼應。

### 7-9 推測 Cyclin I 蛋白質在細胞中所扮演的角色

Cyclin I 蛋白質主要出現在有絲分裂後組織中，這些組織的細胞與一般組織的細胞不同，在細胞死亡後幾乎沒有辦法再分裂出新的細胞來填補原來的位置。換句話說，在細胞受到傷害後，如何去保存細胞數目是很重要的問題。依據上述的實驗結果以及文獻，指出當細胞受到傷害時，p21 會被表現來中斷細胞週期以及避免細胞凋亡，使細胞有時間修復傷害，但是如果傷害比較嚴重或是需要較長的修復時間時，一般細胞會選擇提高細胞內 Ca 離子濃度，降低 p21 蛋白質的表現量，並進行細胞凋亡。我們推測，在有絲分裂後細胞中，Ca 離子的濃度或許是一個訊號，當細胞受損較嚴重時，Ca 離子的濃度會升高，致使 cyclin I 蛋白質可以與 p21 蛋白質結合並且穩定 p21 蛋白質，使細胞有較長時間修復，這對於有絲分裂後細胞去保存細胞數目是非常有幫助的，當然，這些推測，還需要進一步的驗證。

### 7-10 結語

在本論文中，我們將 cyclin I 基因 clone 至 pET30a 載體中，送入大腸桿菌 BL21(DE3) 中，經由 IPTG 誘導後，可以在一公升的菌液中獲得大約 200mg 的 cyclin I 內涵體蛋白質。將內涵體經由重新摺疊，可得到自然態的蛋白質，藉由儀器與程式分析，證實 cyclin I 蛋白質為無特定結構之蛋白質。在添加 Ca 折疊後，cyclin I 蛋白質可與 p21 蛋白質結合，之前其他研究指出，p21 蛋白質可以與 caspase 8 及 procaspase 3 結合來抑制細胞凋亡，而 Ca 離子可促進細胞凋亡，本論文的結果與先前的研究可以推論 cyclin I 可以在細胞凋亡訊號出現時，藉由穩定 p21 來增加細胞修復的時間，藉此保存細胞分裂後組織之細胞數目。下圖為推測之結果，Ca 離子雖然均可抑制 p21 蛋白質的表現，但是在有絲分裂後組織細胞中，Ca 離子可以使 p21 蛋白質與 cyclin I 蛋白質結合，降低 p21 蛋白質的降解速度，使細胞有較多時間可修復。



當Ca離子濃度升高，會活化S100B蛋白質，活化的S100B蛋白質可與p53結合，並抑制其轉錄活性，使p21基因不表現，當p21被降解減少時，procaspase-3或caspase-8即不被抑制，而造成細胞凋亡。

在有絲分裂後細胞，Ca離子的出現也可以造成cyclin I與p21的結合，並且減緩p21被降解的速率，穩定p21的量，而此時procaspase-3 與caspase-8仍被p21鍵結而失去活性，細胞將有更

圖十 - 1 Cyclin I 調節細胞凋亡之推測示意圖



## Reference

1. Mitchison, J. M. (2003) Growth during the cell cycle. *Int Rev Cytol.* **226**, 165-258.
2. Wagner, H. P. (1998) Cell cycle control and cancer. *Indian J Pediatr.* **65**, 805-814.
3. Vadeyar, H. J. (2007) Current therapeutic options for colorectal liver metastases. *Indian J Gastroenterol.* **26**, 26-29.
4. Lodish, Berk, Matsudaira, Kaiser, Krieger, Scott, Zipursky, and Darnell. (1999) *Molecular Cell Biology*, 1055-1067, New York, ISBN 0-7167-3136-3.
5. Fink, S. L., and Cookson, B. T. (2005) Apoptosis, pyroptosis, and necrosis: mechanistic description of dead and dying eukaryotic cells. *Infect. Immun.* **73**, 1907-1916.
6. Kroemer, G., and Reed, J. C. (2000) Mitochondrial control of cell death. *Nat. Med.* **6**, 513-519.
7. Petak, I., and Houghton, J.A. (2001) Shared pathways: death receptors and cytotoxic drugs in cancer therapy. *Pathol. Oncol. Res.* **7**, 95-106.
8. Malisan, F., and Testi, R. (2003) Mitochondrial lipids as apoptosis regulators. *Curr. Med. Chem.* **10**, 1573-1580.
9. Rossi, D., and Gaidano, G. (2003) Messengers of cell death: apoptotic signaling in health and disease. *Haematologica* **88**, 212-218.
10. Green, D. R., and Kroemer, G. (2004) The pathophysiology of mitochondrial cell death. *Science* **305**, 626-629.
11. Thorburn, A. (2004) Death receptor-induced cell killing. *Cell Signal.* **16**, 139-144.
12. Nagata, S. (1997) Apoptosis by death factor. *Cell* **88**, 355-365.
13. Testa, U. (2004) Apoptotic mechanisms in the control of erythropoiesis. *Leukemia* **18**, 1176-1199.
14. Green, D. R., and Kroemer, G. (2004) The pathophysiology of mitochondrial cell death. *Science* **305**, 626-629.
15. Breckenridge, D. G., Germain, M., Mathai, J. P., Nguyen, M., and Shore, G. C. (2003) Regulation of apoptosis by endoplasmic reticulum pathways. *Oncogene* **22**, 8608-8618.
16. Scorrano, L., Oakes, S. A., Opferman, J. T., Cheng, E. H., Sorcinelli, M. D., Pozzan, T., and Korsmeyer, S. J. (2003) BAX and BAK regulation of endoplasmic reticulum  $Ca^{2+}$ : a control point for apoptosis. *Science* **300**, 135-139.
17. Zong, W. X., Li, C., Hatzivassiliou, G., Lindsten, T., Yu, Q. C., Yuan, J., and Thompson, C. B. (2003) Bax and Bak can localize to the endoplasmic reticulum to initiate apoptosis. *J. Cell Biol.* **162**, 59-69.
18. Brookes, P. S., Yoon, Y., Robotham, J. L., Anders, M. W., and Sheu, S. S. (2004) Calcium, ATP, and ROS: a mitochondrial lovehate triangle. *Am. J. Physiol. Cell*



*Physiol.* **287**, 817-833.

19. Petrosillo, G., Ruggiero, F. M., Pistolese, M., and Paradies, G. (2004) Ca<sup>2+</sup>-induced reactive oxygen species production promotes cytochrome c release from rat liver mitochondria via mitochondrial permeability transition (MPT)-dependent and MPT-independent mechanisms: role of cardiolipin. *J. Biol. Chem.* **279**, 53103-53108.
20. Liu, X., Kim, C. N., Yang, J., Jemmerson, R., and Wang, X. (1996) Induction of apoptotic program in cell-free extracts: requirement for dATP and cytochrome c. *Cell* **86**, 147-157.
21. Susin, S. A., Lorenzo, H. K., Zamzami, N., Marzo, I., Snow, B. E., Brothers, G. M., Mangion, J., Jacotot, E., Costantini, P., Loeffler, M., Larochette, N., Goodlett, D. R., Aebersold, R., Siderovski, D. P., Penninger, J. M., and Kroemer, G. (1999) Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor. *Nature* **397**, 441-446.
22. Du, C., Fang, M., Li, Y., Li, L., and Wang, X. (2000) Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition. *Cell* **102**, 33-42.
23. Li, L. Y., Luo, X., and Wang, X. (2001) Endonuclease G is an apoptotic DNase when released from mitochondria. *Nature* **412**, 95-99.
24. Finucane, D. M., Bossy-Wetzell, E., Waterhouse, N. J., Cotter, T. G., and Green, D. R. (1999) Bax-induced caspase activation and apoptosis via cytochrome c release from mitochondria is inhibitable by Bcl-xL. *J. Biol. Chem.* **274**, 2225-2233.
25. Susin, S. A., Lorenzo, H. K., Zamzami, N., Marzo, I., Brenner, C., Larochette, N., Prevost, M. C., Alzari, P. M., and Kroemer, G. (1999) Mitochondrial release of caspase-2 and -9 during the apoptotic process. *J. Exp. Med.* **189**, 381-394.
26. Arnoult, D., Gaume, B., Karbowski, M., Sharpe, J. C., Cecconi, F., and Youle, R. J. (2003) Mitochondrial release of AIF and EndoG requires caspase activation downstream of Bax/Bak-mediated permeabilization. *EMBO J.* **22**, 4385-4399.
27. Chinnaiyan, A. M., Tepper, C. G., Seldin, M. F., O'Rourke, K., Kischkel, F. C., Hellbardt, S., Krammer, P. H., Peter, M. E., and Dixit, V. M. (1996) FADD/MORT1 is a common mediator of CD95 (Fas/APO-1) and tumor necrosis factor receptor-induced apoptosis. *J. Biol. Chem.* **271**, 4961-4965.
28. Kischkel, F. C., Lawrence, D. A., Tinel, A., LeBlanc, H., Virmani, A., Schow, P., Gazdar, A., Blenis, J., Arnott, D., and Ashkenazi, A. (2001) Death receptor recruitment of endogenous caspase-10 and apoptosis initiation in the absence of caspase-8. *J. Biol. Chem.* **276**, 46639-46646.
29. Seol, D. W., Li, J., Seol, M. H., Park, S. Y., Talanian, R. V., and Billiar, T. R. (2001) Signaling events triggered by tumor necrosis factor-related

- apoptosis-inducing ligand (TRAIL): caspase-8 is required for TRAIL-induced apoptosis. *Cancer Res.* **61**, 1138-1143.
30. Kang, J., Kisenge, R. R., Toyoda, H., Tanaka, S., Bu, J., Azuma, E., and Komada, Y. (2003) Chemical sensitization and regulation of TRAIL-induced apoptosis in a panel of B-lymphocytic leukaemia cell lines. *Br. J. Haematol.* **123**, 921-932.
  31. Heldin, C. H. (1996) Protein tyrosine kinase receptors. *Cancer Surv.* **27**, 7–12.
  32. Gutkind, J. S. (1998) Cell growth control by G protein-coupled receptors: from signal transduction to signal integration. *Oncogene* **17**, 1331–1342.
  33. Hulleman, E., and Boonstra, J. (2001) Regulation of G1 phase progression by growth factors and the extracellular matrix. *Cell. Mol. Life Sci.* **58**, 80– 93.
  34. Boonstra, J. (2003) Progression through the G1-phase of the on-going cell cycle. *J. Cell. Biochem.* **90**, 244– 252.
  35. Reed, S. I., Bailly, E., Dulic, V., Hengst, L., Resnitzky, D., and Slingerland, J. (1994) G1 control in mammalian cells. *J. Cell Sci., Suppl.* **18**, 69– 73.
  36. Schafer, K.A. (1998) The cell cycle: a review. *Vet. Pathol.* **35**, 461– 478.
  37. Nigg, E.A. (1995) Cyclin-dependent protein kinases: key regulators of the eukaryotic cell cycle. *BioEssays* **17**, 472–480.
  38. Ekholm, S. V., and Reed, S. I. (2000) Regulation of G(1) cyclin-dependent kinases in the mammalian cell cycle. *Curr. Opin. Cell Biol.* **12**, 676–684.
  39. Norbury, C., and Nurse, P. (1992) Animal cell cycle and their control. *Ann. Rev. Biochem.* **61**, 441– 470.
  40. Evans, T., Rosenthal, E. T., Youngblom, J., Distel, D., and Hunt, T. (1983) Cyclin: A protein specified by maternal mRNA in sea urchineggs that is destroyed at each cleavage division. *Cell* **33**, 389–396.
  41. Roussel, M. F. (1998) Key effectors of signal transduction and G1 progression. *Adv. Cancer Res.* **69**, 1 – 24.
  42. Bird, R. C. (2003) Role of cyclins and cyclin-dependent kinases in G1 phase progression. In: Boonstra, J. (Ed.), *G1 Phase Progression*. Kluwer Academic/Plenum, New York, pp. 40–57. ISBN: 0-306-47831-5.
  43. Obaya, A. J., and Sedivy, J. M. (2002) Regulation of cyclin-Cdk activity in mammalian cells. *Cell. Mol. Life Sci.* **59**, 126– 142.
  44. Reed, S. I. (1997) Control of the G1/S transition. *Cancer Surv.* **29**, 7– 23.
  45. Arellano, M., and Moreno, S. (1997) Regulation of CDK/cyclin complexes during the cell cycle. *Int. J. Biochem.* **29**, 559– 573.
  46. Sherr, C. J. (1995) D-type cyclins. *Trends Biochem. Sci.* **20**, 187– 190.
  47. Ohtsubo, M., Theodoras, A. M., Schumacher, J., Roberts, J. M., and Pagano, M. (1995) Human cyclin E, a nuclear protein essential for the G1-to-S phase transition. *Mol. Cell. Biol.* **15**, 2612– 2624.

48. Fotedar, R., and Fotedar, A. (1995) Cell cycle control of DNA replication. *Prog. Cell Cycle Res.* **1**, 73– 89.
49. Murray, A. (1995) Cyclin ubiquitination: the destructive end of mitosis. *Cell* **81**, 149– 152.
50. Koepp, D. M., Harper, J. W., and Elledge, S. J. (1999) How the cyclins became a cyclin: regulated proteolysis in the cell cycle. *Cell* **97**, 431–434.
51. Schafer, K.A. (1998) The cell cycle: a review. *Vet. Pathol.* **35**, 461– 478.
52. King, R. W., Deshaies, R. J., Peters, J. M., and Kirschner, M. W. (1996) How proteolysis drives the cell cycle. *Science* **274**, 1652–1659.
53. El-Deiry, W., Tokino, T., Velculescu, V., Levy, D., Parsons, R., Trent, J., Lin, D., Mercer, W. E., Kinzler, K., and Vogelstein, B. (1993) WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression. *Cell* **75**, 817–825.
54. Harper, J. W., Adami, G., Wei, N., Keyomarsi, K., and Elledge, S. (1993) The p21 cdk-interacting protein Cip1 is a potent inhibitor of G1 cyclin-dependent kinases. *Cell* **75**, 805–816.
55. Xiong, Y., Hannon, G., Zhang, H., Casso, D., Kobayashi, R., and Beach, D. (1993) p21 is a universal inhibitor of cyclin kinases. *Nature* **366**, 701–704.
56. Noda, A., Ning, Y., Venable, S. F., Pereira-Smith, O. M., and Smith, J. R. (1994) Cloning of senescent cell-derived inhibitors of DNA synthesis using an expression screen. *Exp. Cell Res.* **211**, 90–98.
57. Polyak, K., Kato, J. Y., Solomon, M. J., Sherr, C. J., Massague´ , J., Roberts, J. M., and Koff, A. (1994) p27Kip1, a cyclin-Cdk inhibitor, links transforming growth factor- $\beta$  and contact inhibition to cell cycle arrest. *Genes Dev.* **8**, 9–22.
58. Toyoshima, H., and Hunter, T. (1994) p27, a novel inhibitor of G1 cyclin/cdk protein kinase activity, is related to p21. *Cell* **78**, 67–74.
59. Lee, M. H., Reynisdottir, I., and Massague´ , J. (1995) Cloning of p57KIP2, a cyclin-dependent kinase inhibitor with unique domain structure and tissue distribution. *Genes Dev.* **9**, 639–649.
60. Matsuoka, S., Edwards, M., Bai, C., Parker, S., Zhang, P., Baldini, A., Harper, J., and Elledge, S. (1995) p57, a structurally distinct member of the p21 cdk inhibitor family, is a candidate tumor suppressor gene. *Genes Dev.* **9**, 650–662.
61. Dulic, V., Kaufman, W. K., Wilson, S. J., Tlsty, T. D., Lees, E., Harper, J. W., Elledge, S. J., and Reed, S. I. (1994) p53-dependent inhibition of cyclin dependent kinase activities in human fibroblasts during radiation-induced G1 arrest. *Cell* **76**, 1013–1023.
62. Deng, C., Zhang, P., Harper, J. W., Elledge, S. J., and Leder, P. (1995) Mice lacking p21CIP1/WAF1 undergo normal development, but are defective in G1 checkpoint control. *Cell* **82**, 675–684.

63. Brugarolas, J., Chadrsekaran, C., Gordon, J., Beach, D., Jacks, T., and Hannon, G. (1995) Radiation-induced cell cycle arrest compromised by p21 deficiency. *Nature* **377**, 552–557.
64. Waga, S., Hannon, G., Beach, D., and Stillman, B. (1994) The p21 inhibitor of cyclin-dependent kinases controls DNA replication by interaction with PCNA. *Nature* **369**, 574–578.
65. Flores-Rozas, H., Kelman, Z., Dean, F. B., Pan, Z. Q., Harper, J. W., Elledge, S. J., O'Donnell, M. O., and Hurwitz, J. (1994) Cdk-interacting protein 1 directly binds with proliferating cell nuclear antigen and inhibits DNA replication catalyzed by the DNA polymerase  $\delta$  holoenzyme. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **91**, 8655–8659.
66. Gibbs, E., Kelman, Z., Gulbis, J. M., O'Donnell, M., Kuriyan, J., Burgers, P., and Hurwitz, J. (1997) The influence of the proliferating cell nuclear antigen-interacting domain of p21(CIP1) on DNA synthesis catalyzed by the human and *Saccharomyces cerevisiae* polymerase  $\delta$  holoenzymes. *J. Biol. Chem.* **272**, 2373–2381.
67. El-Deiry, W. S., Tokino, T., Waldman, T., Oliner, J. D., Velculescu, V. E., Urrrel, M., Hill, D. E., Healy, E., Rees, J. L., Hamilton, S. R., Kinzler, K. W., and Vogelstein, B. (1995) Topological control of p21 (WAF1/CIP1) expression in normal and neoplastic tissues. *Cancer Res.*, **55**, 2910–2919.
68. Maki, C. G., and Howley, P. M. (1997) Ubiquitination of p53 and p21 is differentially affected by ionizing and UV radiation. *Mol. Cell. Biol.* **17**, 355–363.
69. Sheaff, R. J., Singer, J. D., Swanger, J., Smitherman, M., Roberts, J. M., and Clurman, B. E. (2000) Proteasomal turnover of p21/Cip1 does not require p21/Cip1 ubiquitination. *Mol. Cell* **5**, 403–410.
70. Touitou, R., Richardson, J., Bose, S., Nakanishi, M., Rivett, J., and Allday, M. J. (2001) A degradation signal located in the C-terminus of p21WAF1/ CIP1 is a binding site for the C8\_ subunit of the 20S proteasome. *EMBO J.* **20**, 2367–2375.
71. Kaneuchi, M., Yamashita, T., Shindoh, M., Segawa, K., Takahashi, S., Furuta, I., Fujimoto, S., and Fujinaga, K. (1999) Induction of apoptosis by the p53–273L (Arg3Leu) mutant in HSC3 cells without transactivation of p21Waf1/Cip1/Sdi1 and bax. *Mol. Carcinog.* **26**, 44–52.
72. Okaichi, K., Wang, L. H., Sasaki, J., Saya, H., Tada, M., and Okumura, Y. (1999) A point mutation of human p53, which was not detected as a mutation by a yeast functional assay, led to apoptosis but not p21Waf1/Cip1/Sdi1 expression in response to ionizing radiation in a human osteosarcoma cell line, Saos-2. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* **45**, 975–980.
73. Kokontis, J. M., Wagner, A. J., O'Leary, M., Liao, S., and Hay, N. (2001) A

- transcriptional activation function of p53 is dispensable for and inhibitory of its apoptotic function. *Oncogene* **20**, 659–668.
74. Xu, S. Q., and El-Deiry, W. S. (2000) p21(WAF1/CIP1) inhibits initiator caspase cleavage by TRAIL death receptor DR4. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **269**, 179–190.
  75. Suzuki, A., Tsutomi, Y., Akahane, K., Araki, T., and Miura, M. (1998) Resistance to Fas-mediated apoptosis: activation of caspase 3 is regulated by cell cycle regulator p21WAF1 and IAP gene family ILP. *Oncogene* **17**, 931–939.
  76. Steinman, R. A., and Johnson, D. E. (2000) p21WAF1 prevents down modulation of the apoptotic inhibitor protein c-IAP1 and inhibits leukemic apoptosis. *Mol. Med.* **6**, 736–749.
  77. Sherr, C. J., and Roberts, J. M. (1999) CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1 phase progression. *Genes Dev.* **13**, 1501–1512.
  78. Vidal, A., and Koff, A. (2000) Cell cycle inhibitors: three families united by a common cause. *Gene* **247**, 1 – 15.
  79. DeGregori, J., Kowalik, T., and Nevins, J. R. (1995) Cellular targets for activation by the E2F transcription factor include DNA synthesis- and G1/S regulatory genes. *Mol. Cell. Biol.* **15**, 4215– 4224.
  80. Meyerson, M., Enders, G. H., Wu, C. L., Su, L. K., Gorka, C., Nelson, C., Harlow, E., and Tsai, L. H. (1992) A family of human cdc2-related protein kinases. *EMBO J.* **11**, 2909-2917.
  81. Lew, J., Huang, Q. Q., Qi Z., Winkfein, R. J., Aebersold, R., Hunt, T., and Wang, J. H. (1994) A brain-specific activator of cyclin-dependent kinase 5. *Nature* **371**, 423-426.
  82. Tsai, L. H., Delalle, I., Caviness, V. S. Jr., Chae, T., and Harlow, E. (1994) p35 is a neural-specific regulatory subunit of cyclin-dependent kinase 5. *Nature* **371**, 419-423.
  83. Nakamura, T., Sanokawa, R., Sasaki, Y. F., Ayusawa, D., Oishi, M., and Mori, N. (1995) Cyclin I: a new cyclin encoded by a gene isolated from human brain. *ExpCell Res.* **221**, 534-542.
  84. Bates, S., Rowan, S., and Vousden, K. H. (1996) Characterisation of human cyclin G1 and G2: DNA damage inducible genes. *Oncogene* **13**, 1103–1109.
  85. Landberg, G., Nilsson, K., Jirström, K., Rydén, L., Kitching, R., Burger, A. M., and Seth, A. (2005) Cyclin I is expressed in human breast cancer and closely associated with VEGF and KDR expression. *Breast Cancer Res Treat.* **89**, 313-316.
  86. Griffin, S. V., Olivier, J. P., Pippin, J. W., Roberts, J. M., and Shankland, S. J. (2006) Cyclin I protects podocytes from apoptosis , *J Biol Chem* **281**,

28048-28057

87. Gao, C. Y., and Zelenka, P. S., (1997) Cyclins, cyclin-dependent kinases and differentiation. *Bioessays* **19**, 307–315,
88. Liu, Y., Tang, M. K., Cai, D. Q., Li, M., Wong, W. M., Chow, P. H., and Lee, K. K. (2007) Cyclin I and p53 are differentially expressed during the terminal differentiation of the postnatal mouse heart. *Proteomics* **7**, 23-32.
89. Bennin, D. A., Don, A. S., Brake, T., McKenzie, J. L., Rosenbaum, H., Ortiz, L., DePaoli-Roach, A. A., and Horne, M. C. (2002) Cyclin G2 associates with protein phosphatase 2A catalytic and regulatory B' subunits in active complexes and induces nuclear aberrations and a G1/S phase cell cycle arrest. *J Biol Chem.* **277**, 27449-27467.
90. Jensen, M. R., Factor, V. M., and Thorgeirsson, S. S. (1998) Regulation of cyclin G1 during murine hepatic regeneration following Dipin-induced DNA damage. *Hepatology* **28**, 537-546.
91. Jensen, M. R., Audolfsson, T., Keck, C. L., Zimonjic, D. B., and Thorgeirsson, S. S. (1999) Gene structure and chromosomal localization of mouse cyclin G2 (Ccng2). *Gene.* **230**, 171-180
92. Fischer, B., Sumner, I., and Goodenough, P. (1992) Isolation and renaturation of bioactive proteins expressed in *Escherichia coli* as inclusion bodies. *Arzneimittelforschung* **42**, 1512–1515
93. Datar, R.V., Cartwright, T., and Rosén, C.-G., (1993) Process economics of animal cell and bacterial fermentations: a case study analysis of tissue plasminogen activator. *Bio/Technology* **11**, 349–357
94. Misawa, S. and Kumagai, I. (1999) Refolding of therapeutic proteins produced in *Escherichia coli* as inclusion bodies. *Biopolymers (Peptide Science)* **51**, 297–307.
95. Clark, E. B. (1998) Refolding of recombinant proteins. *Curr. Opin. Biotechnol.* **9**, 157–163.
96. Clark, E.B. (2001) Protein refolding for industrial processes. *Curr. Opin. Biotechnol.* **12**. 202–207.
97. Hevehan, L., and Clark, E. B. (1997) Oxidative renaturation of lysozyme at high concentrations. *Biotechnol. Bioeng.* **54**, 221–230.
98. West, S. M., Chaudhuri, J. B. and Howell, J. A. (1998) Improved protein refolding using hollow-fibre membrane dialysis. *Biotechnol. Bioeng.* **57**, 590–599
99. Chen, Y., and Barkley, M. D. (1998) Toward understanding tryptophan fluorescence in proteins. *Biochemistry* **37**, 9976-9982.
100. Fischer, E. (1894) Einfluss der configuration auf die wirkung der enzyme. *Ber. Dt. Chem.Ges.* **27**, 2985–2993.

101. Kendrew, J. C., Bodo, G., Dintzis, H. M., Parrish, R. G., Wyckoff, H., and Phillips, D. C. (1958). A three-dimensional model of the myoglobin molecule obtained by x-ray analysis. *Nature* **181**, 662–666.
102. Kendrew, J. C., Dickerson, R. E., and Strandberg, B. E. (1960) Structure of myoglobin: a three-dimensional Fourier synthesis at 2 Å resolution. *Nature* **206**, 757–763.
103. Anson, M. L., and Mirsky, A. E. (1925) On some general properties of proteins. *J. Gen. Physiol.* **9**, 169–179.
104. Anfinsen, C. B. (1973) Principles that govern the folding of protein chains. *Science* **181**, 223–230.
105. Wu, H. (1931) Studies on denaturation of proteins. XIII. A theory of denaturation. *Chin. J. Physiol.* **1**, 219–234.
106. Mirsky, A. E., and Pauling, L. (1936) On the structure of native, denatured and coagulated proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **22**, 439–447
107. Dunker, A. K., Lawson, J. D., Brown, C. J., Williams, R. M., Romero, P., Oh, J. S., Oldfield, C. J., Campen, A. M., Ratliff, C. M., Hipps, K. W., Ausio, J., Nissen, M. S., Reeves, R., Kang, C., Kissinger, C. R., Bailey, R. W., Griswold, M. D., Chiu, W. E., Garner, C., and Obradovic, Z. (2001) Intrinsically disordered protein. *J. Mol. Graph. Model.* **19**, 26–59.
108. Daughdrill, G. W., Pielak, G. J., Uversky, V. N., Cortese, M. S., and Dunker, A. K. (2005) Natively disordered protein. In *Protein Folding Handbook*. J. Buchner and T. Kiefhaber, editors. Wiley-VCH: Verlag, Weinheim, Germany. 271–353.
109. Weinreb, P. H., Zhen, W. A., Poon, W., Conway, K. A., and Lansbury, P. T. Jr. (1996) NACP, a protein implicated in Alzheimer's disease and learning, is natively unfolded. *Biochemistry* **35**, 13709–13715.
110. Halle, B. (2002) Flexibility and packing in proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **99**, 1274–1279.
111. Chang, C. C., Yeh, X.C., Lee, H.G, Lin, P.Y., and Kan, L.S. (2004) Refolding of lysozyme by quasistatic and direct dilution reaction paths: A first-order-like state transition. *Phy. Rev. E.* **70**, 011904
112. Chang, C. C., Cheng, M. S., Su, Y. C., and Kan, L. S. (2002) A first-order like state transition for recombinant protein folding. *J. Biomol. Struct. dyn.* **21**, 247-255

## 附錄

### 附錄一: Refolding Buffer

#### A. Denature Buffer (50 ml) pH = 11 - 12

(1) 4.5M Urea -----	13.5 g
(2) 10mM Tris-base -----	60 mg
(3) 0.1M DTT -----	0.77 g
(4) 0.1% Mannitol -----	50 mg
(5) 0.1mM Pefabloc -----	5 $\mu$ l

#### B. Refolding 1 Buffer (2.5 L) pH = 11

24 ; 48hr

(1) 2M Urea -----	300.3g
(2) 10mM Tris-base -----	3 g
(3) 0.1mM DTT-----	38.6mg
(4) 0.1% Mannitol -----	2.5 g
(5) 0.1mM Pefabloc -----	250 $\mu$ l

#### C. Refolding 2 Buffer (2.5 L) pH = 11

08 ; 24 hr

(1) 1M Urea -----	150.15g
(2) 10mM Tris-base -----	3 g
(3) 0.1mM DTT-----	38.6mg
(4) 0.1% Mannitol -----	2.5 g
(5) 0.1mM Pefabloc -----	250 $\mu$ l

#### D. Refolding 3 Buffer (2.5 L) pH = 11

08 ; 24 hr

(1) 10mM Tris-base -----	3 g
(2) 0.1mM DTT-----	38.6mg
(3) 0.1% Mannitol -----	2.5 g
(4) 0.1mM Pefabloc -----	250 $\mu$ l

#### D. Refolding 4 Buffer (2.5 L) pH = 8.8

08 ; 24 hr

(1) 10mM Tris-base -----	3 g
(2) 0.1mM DTT-----	38.6mg
(3) 0.1% Mannitol -----	2.5 g
(4) 0.1mM Pefabloc -----	250 $\mu$ l

#### E. Refolding 5 Buffer (2.5 L) pH = 8.8

08 ; 24 hr

(1)10mM Tris-base -----	3 g
-------------------------	-----

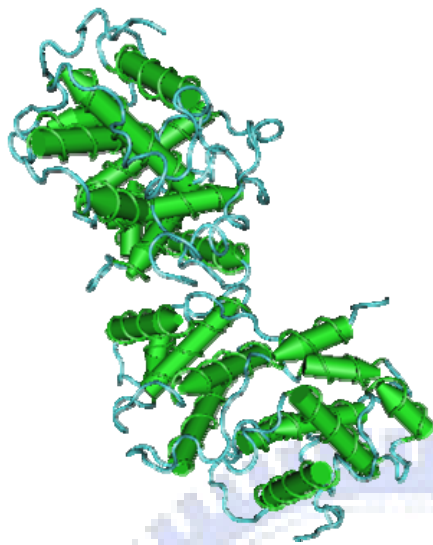


(2)0.1mM DTT----- 38.6mg  
(3)0.1mM Pefabloc ----- 250 $\mu$ l



附錄二: 已解出結構的 Cyclins

Cyclin B



67% helical (17 helices; 182 residues)

0% beta sheet

Basavappa R, Petri E, 2005/10/12

Cyclin C



74% helical (14 helices; 175 residues)

0% beta sheet

Hoepfner, S., Baumli, S., and Cramer, P. Structure of the mediator subunit cyclin C and its implications for CDK8 function *J. Mol. Biol.* **350**, 833-842

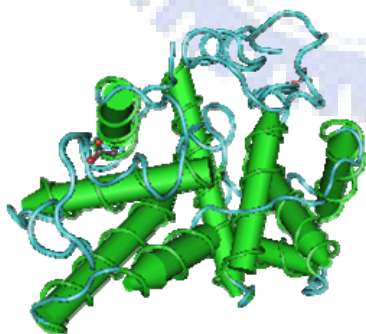
## Cyclin H



54% helical (13 helices; 182 residues)  
0% beta sheet

Kim, K. K., Chamberlin, H. M., Morgan, D. O., and Kim, S. H. Three-dimensional structure of human cyclin H, a positive regulator of the CDK-activating kinase *Nat. Struct. Biol.* **3**, 849-855

## Cyclin K



74% helical (17 helices;  
191 residues)  
0% beta sheet

Baek, K., Brown, R. S., Birrane, G., and Ladas, J. A. Crystal structure of human cyclin K, a positive regulator of cyclin-dependent kinase 9 *J. Mol. Biol.* **366** 563-573

## Cyclin T2



79% helical (15 helices; 205 residues)  
0% beta sheet

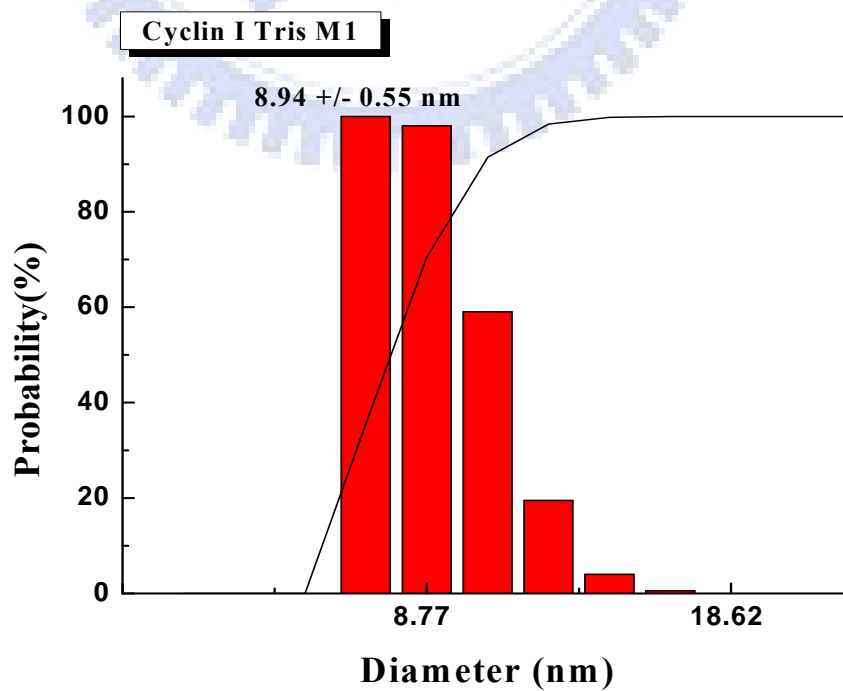
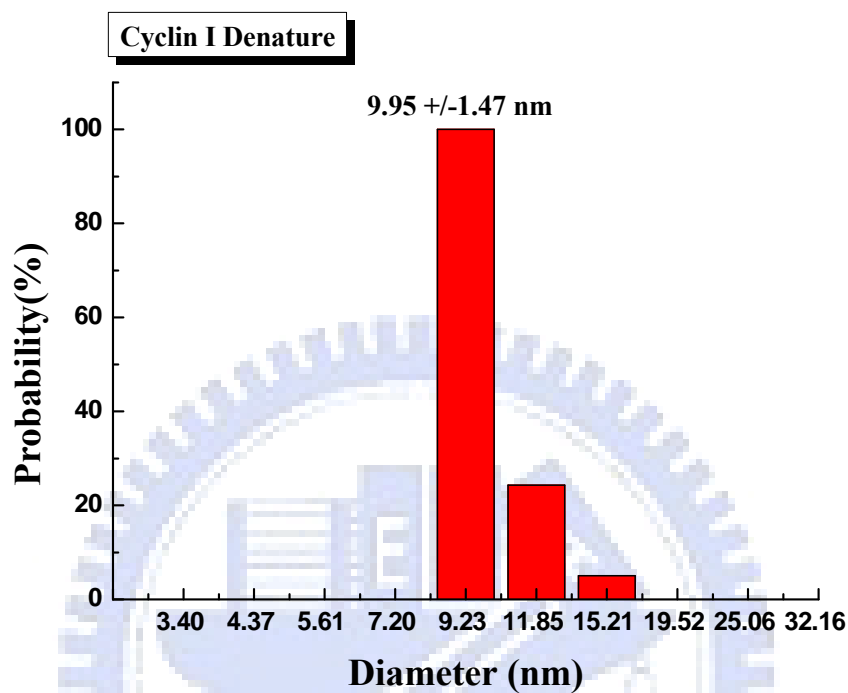
Debreczeni, J. E., Bullock, A., Fedorov, O., Savitsky, P., Berridge, G., Das, S., Pike, A. C. W., Turnbull, A., Ugochukwu, E., Papagrigoriou, E., Gorrec, F., Sundstrom, M., Edwards, A., Arrowsmith, C., Weigelt, J., Von Delft, F., and Knapp, S., 2006/6/21

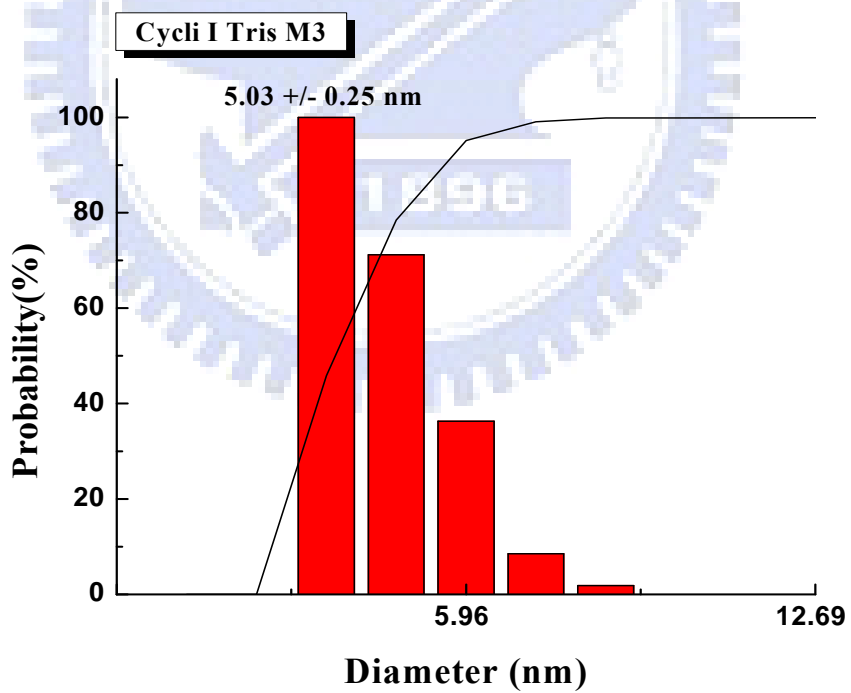
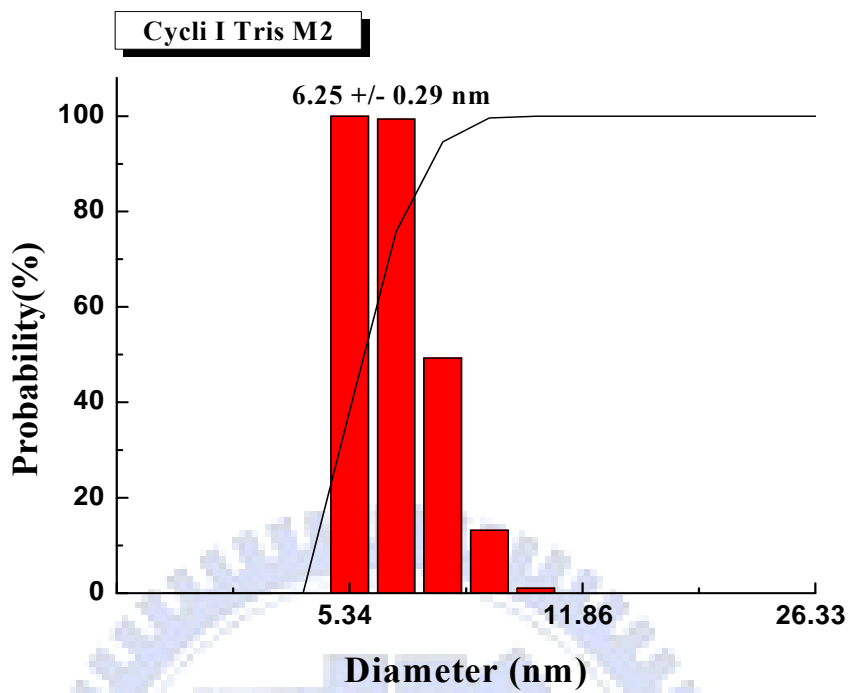


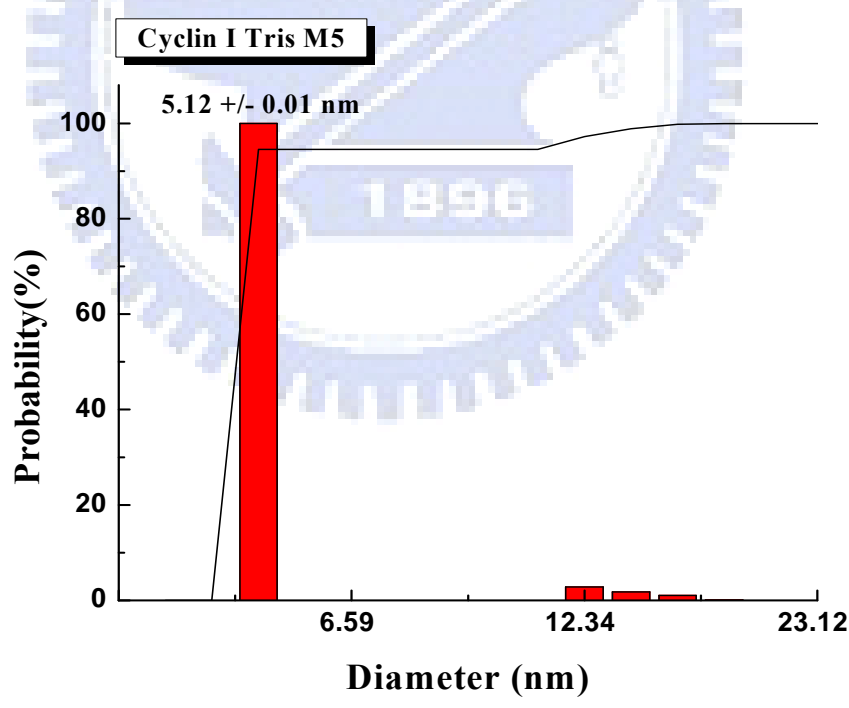
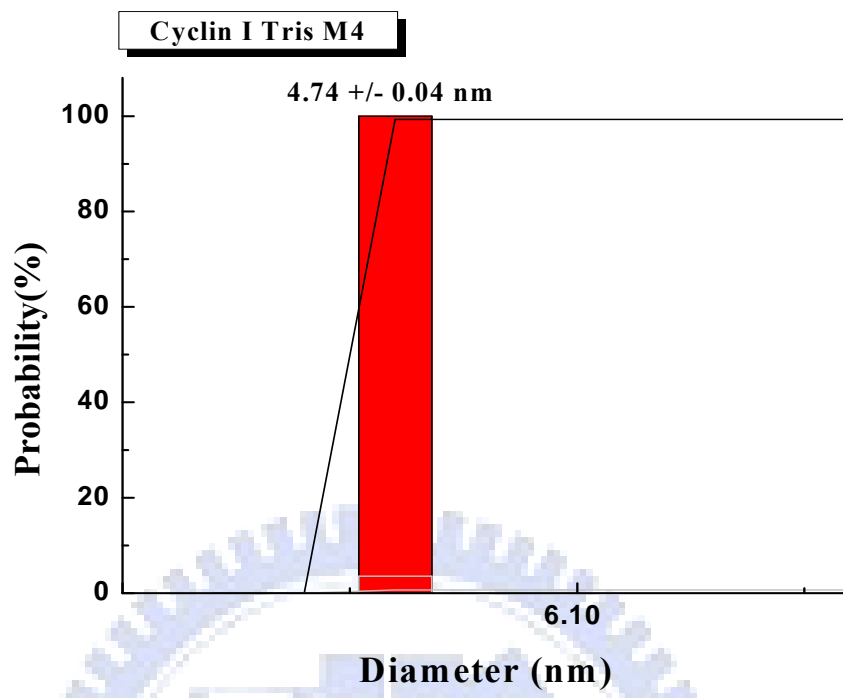
### 附錄三：使用 Tris 緩衝液摺疊之 cyclin I 蛋白質中間物分析

#### 附錄三-1：動態光散射儀量測摺疊中間物大小

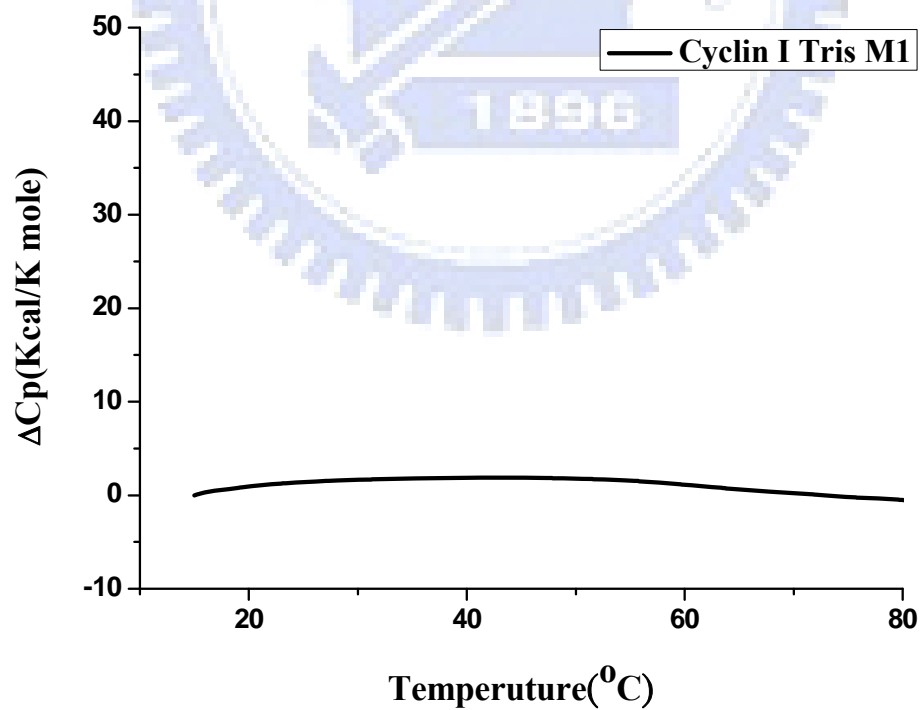
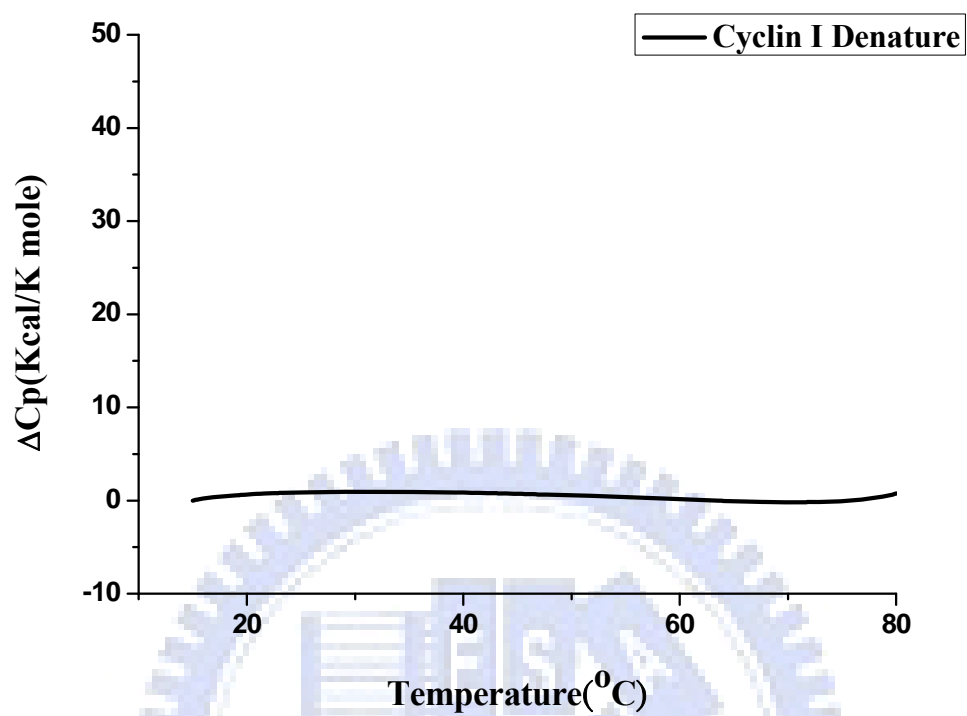
(橫軸座標為水合直徑，縱軸座標表示相對數目，分佈比例最高之點為 100%。)



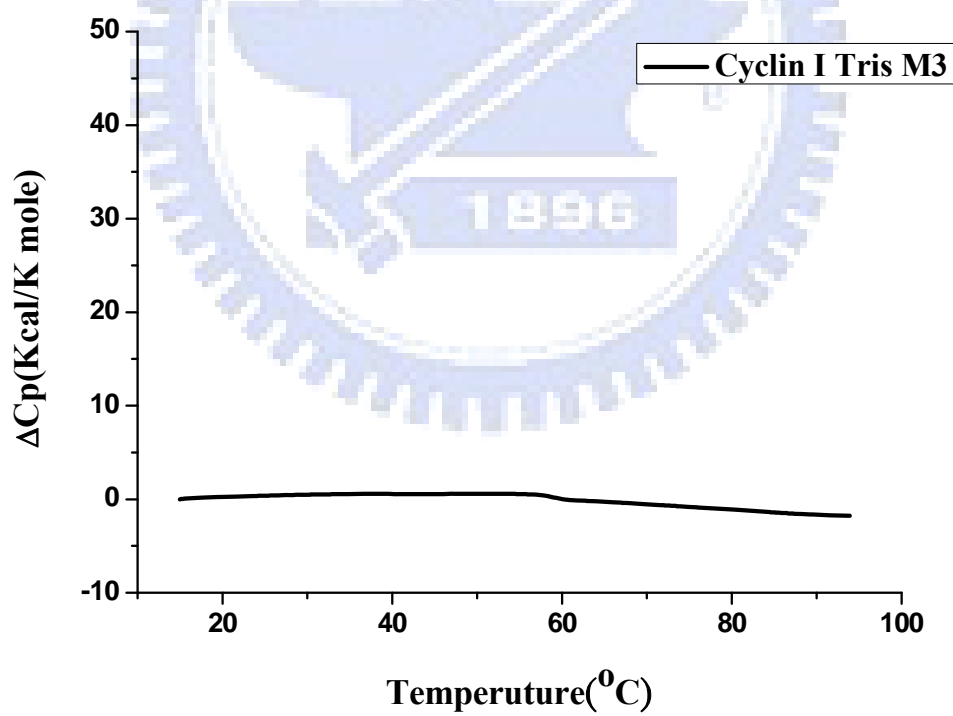
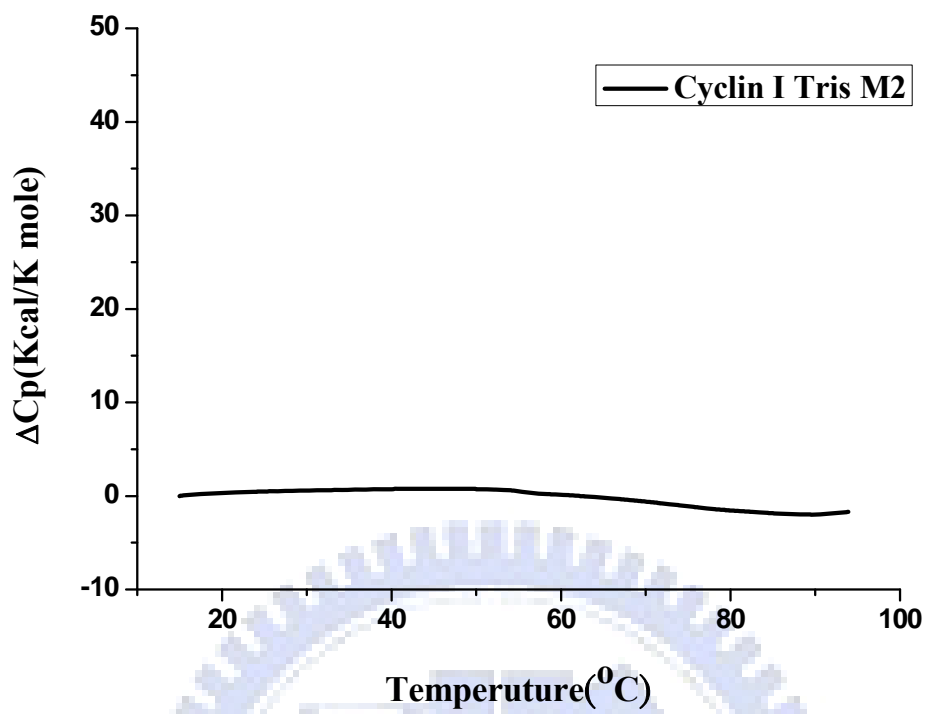


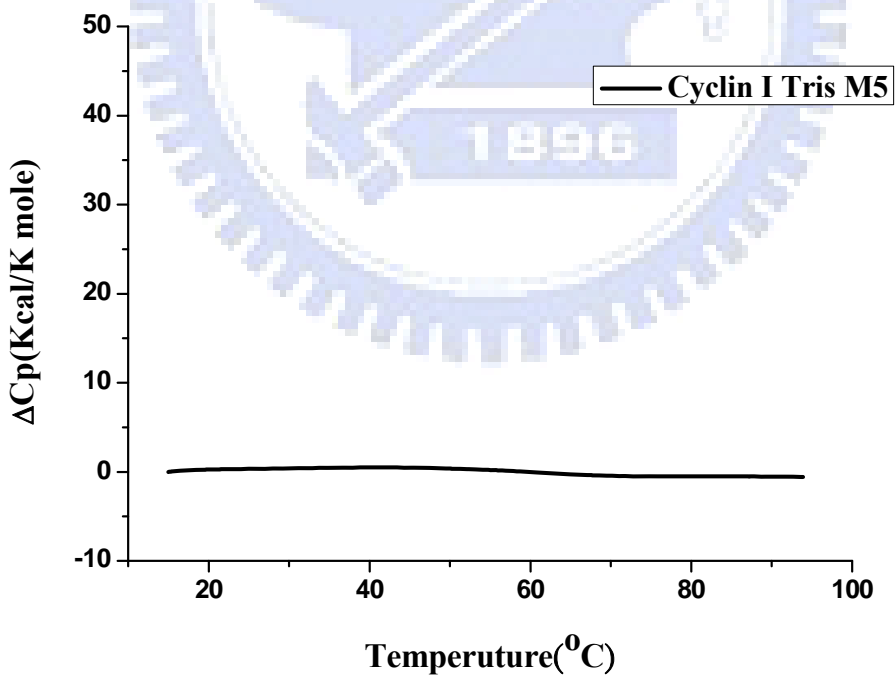
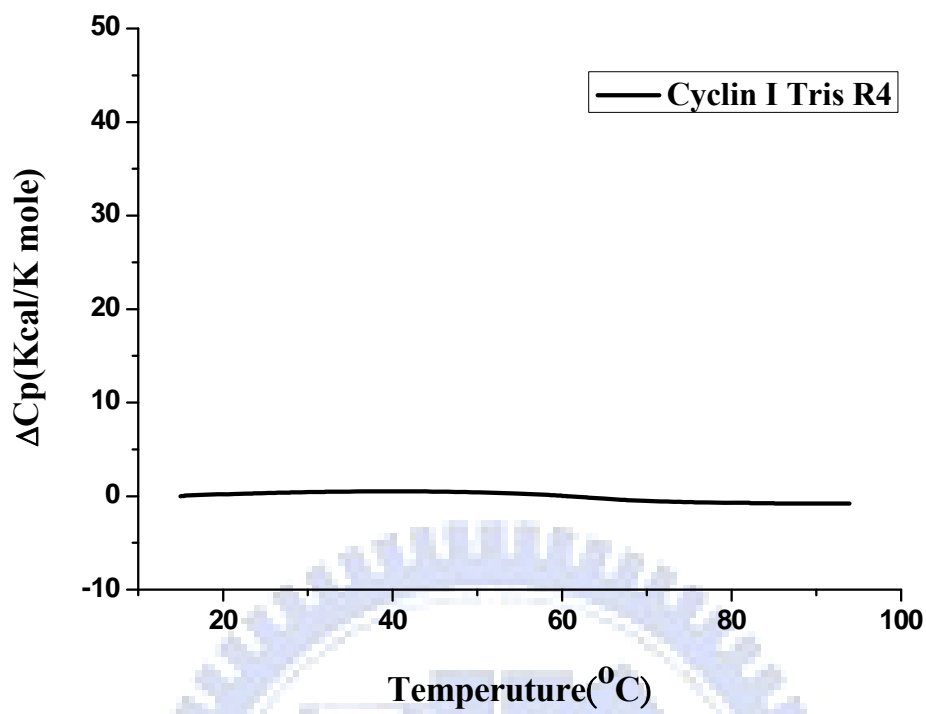


附錄三-2：使用微熱量掃描熱卡路里計量測摺疊中間物熱相變點  
(橫軸座標為溫度變化，縱軸為樣品端與參考端升高至同一溫度所需之能量差)



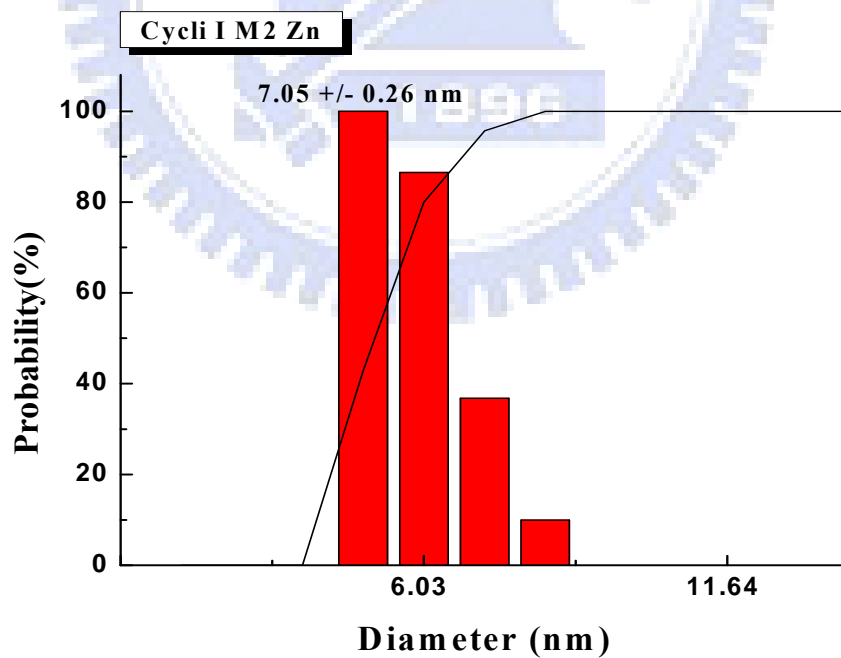
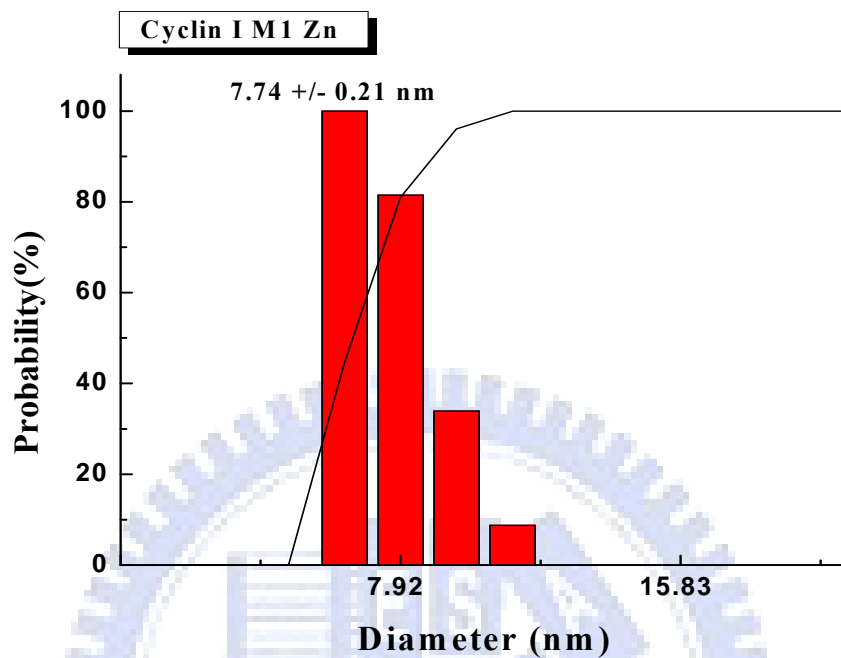


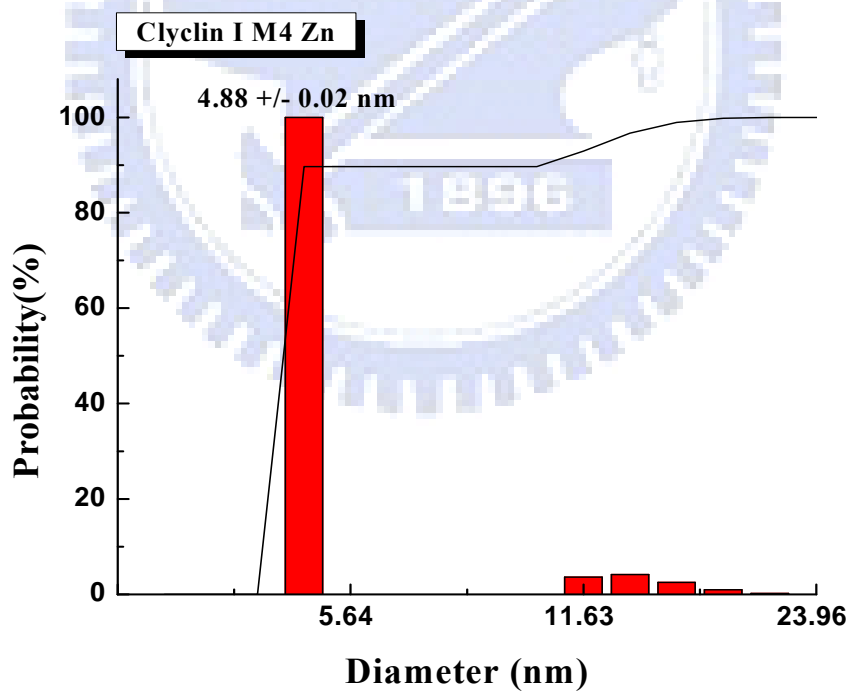
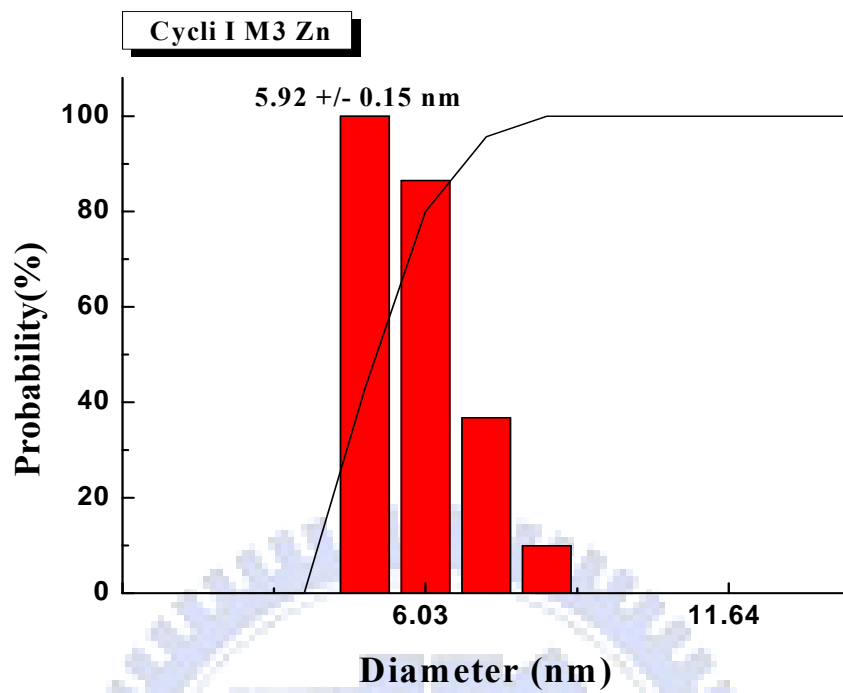


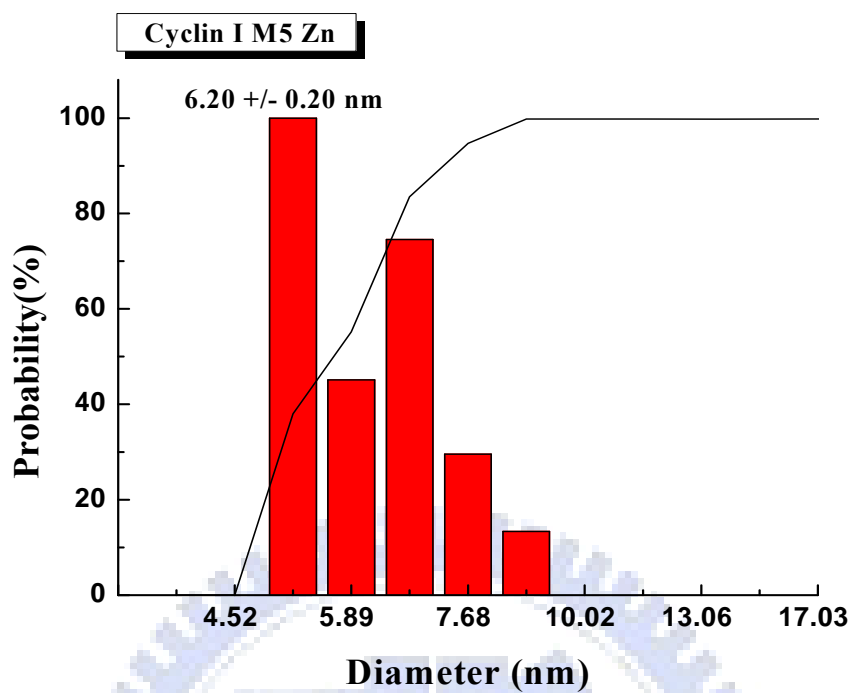


附錄四：使用 Tris + Zn 疊之 cyclin I 蛋白質中間物分析

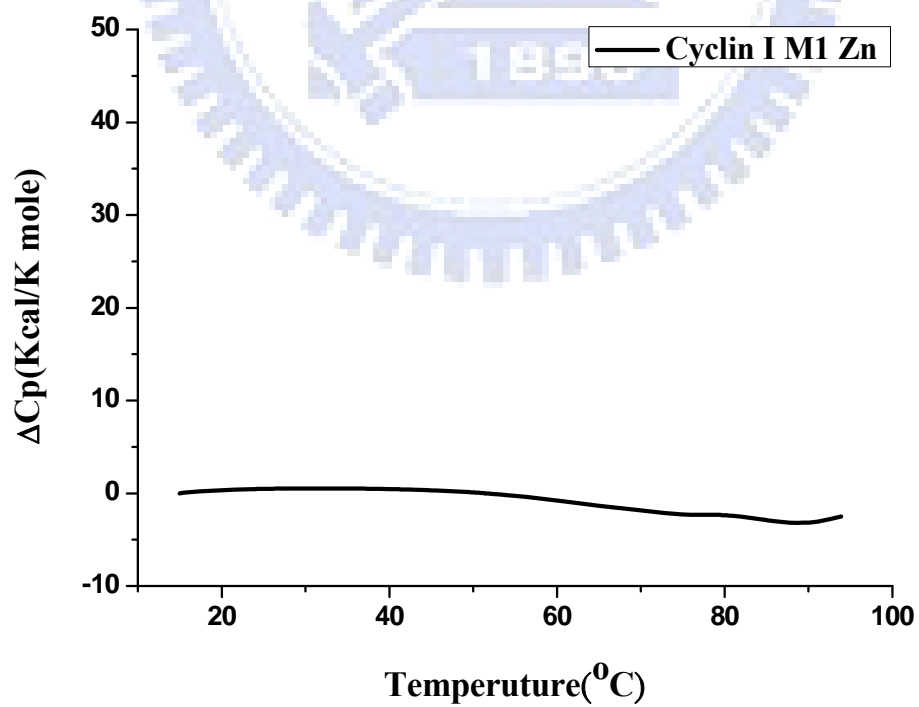
附錄四-1：動態光散射儀量測摺疊中間物大小

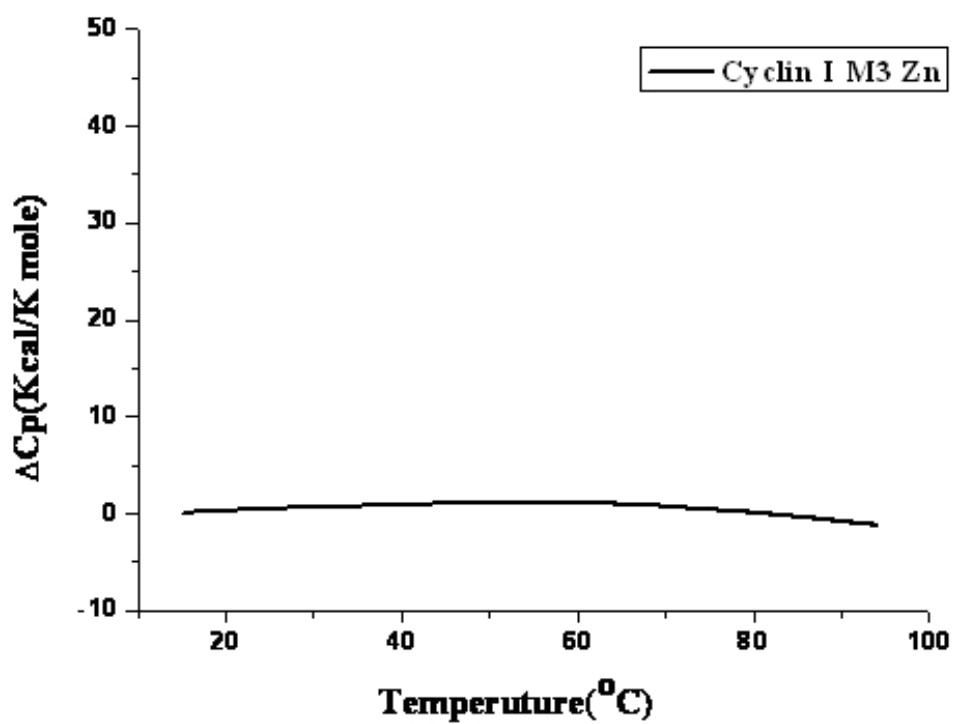
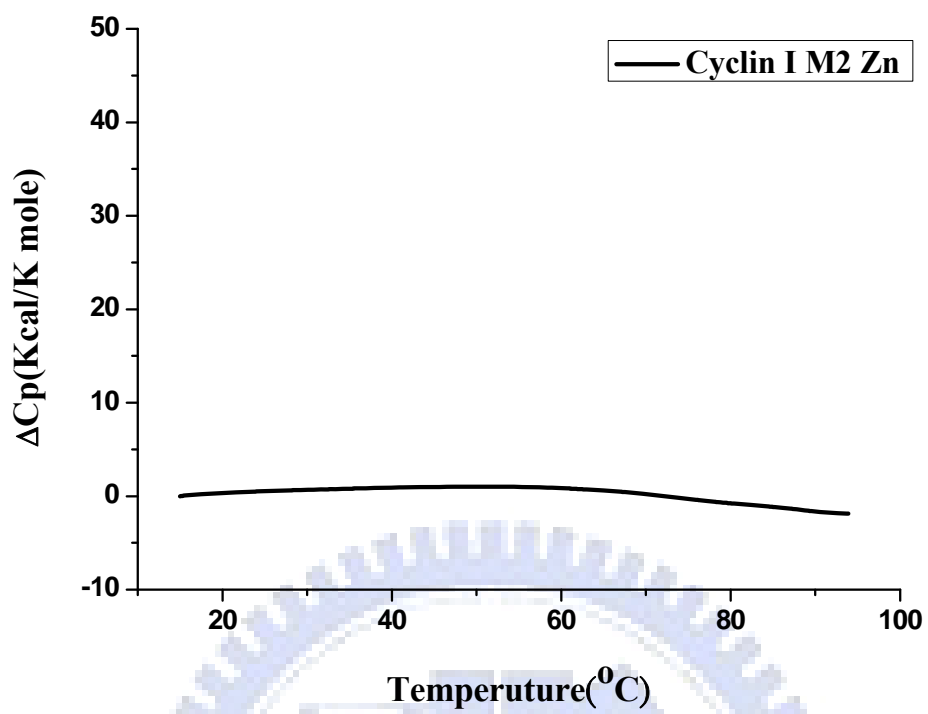


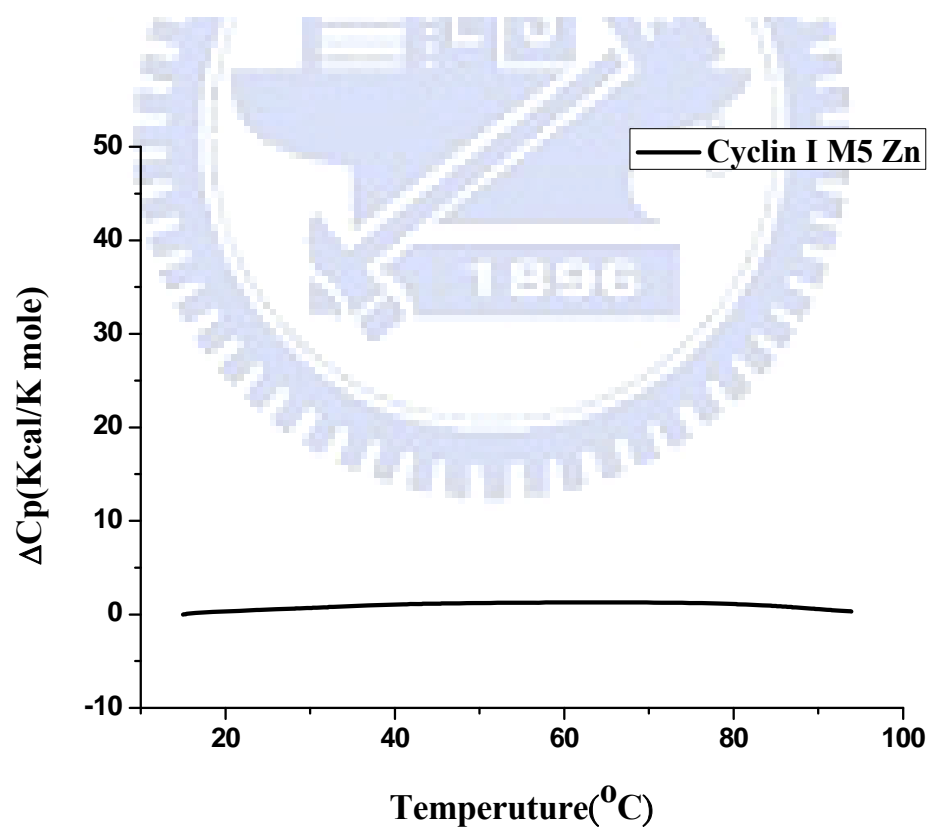
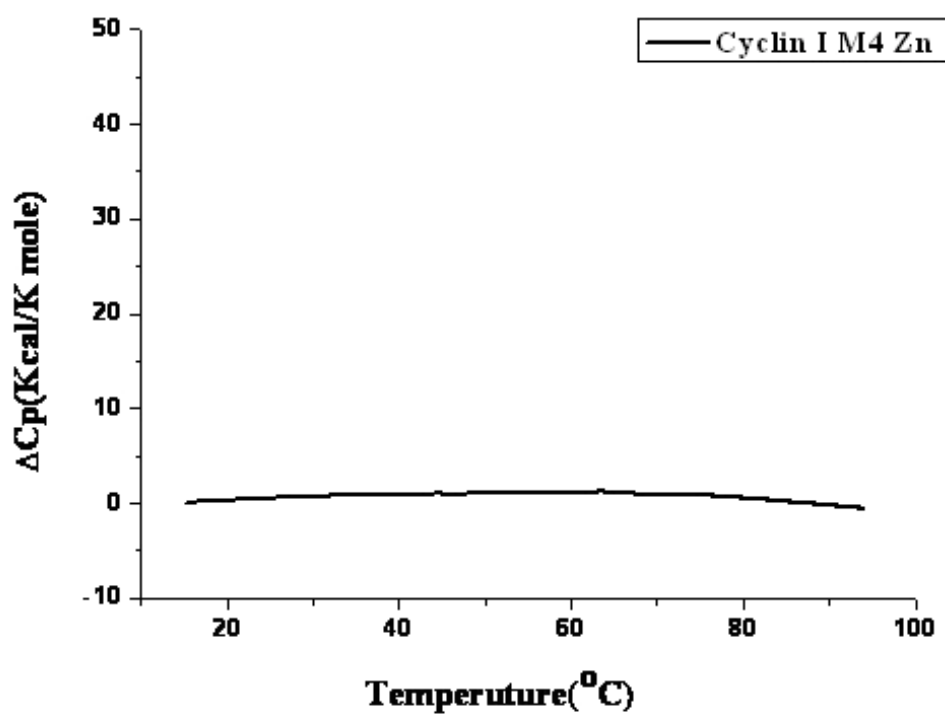




附錄四-2：使用微熱量掃描熱卡路里計量測摺疊中間物熱相變點

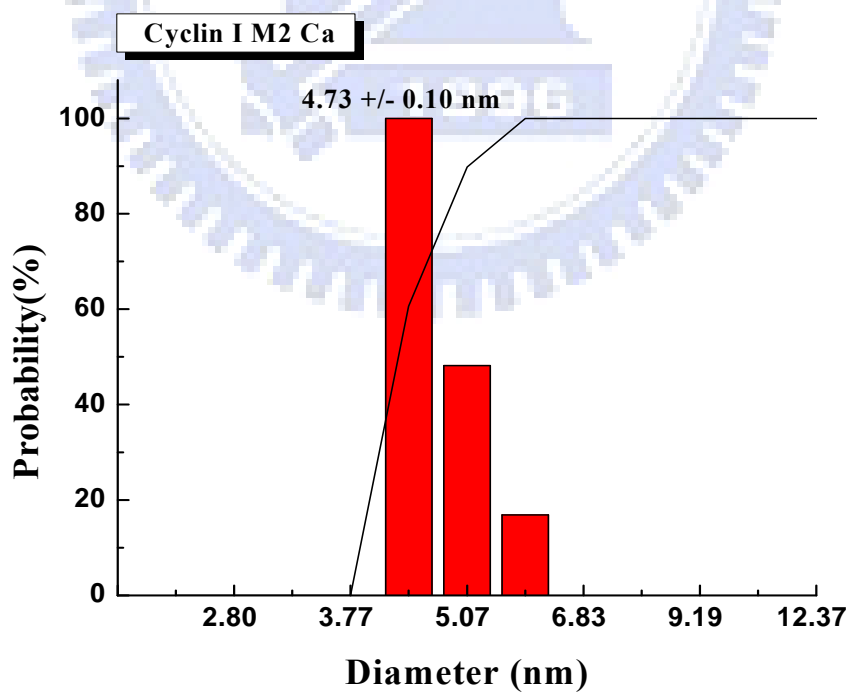
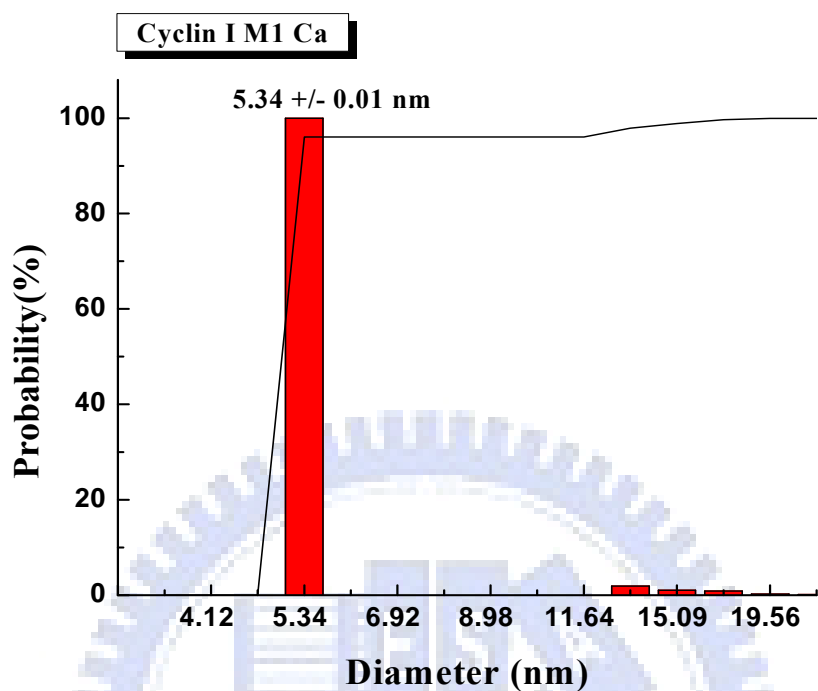




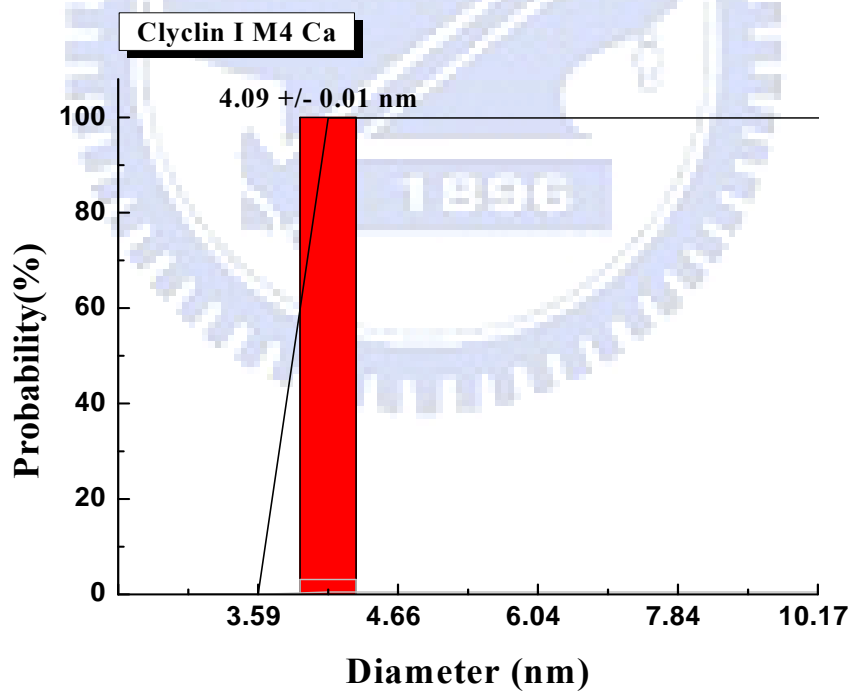
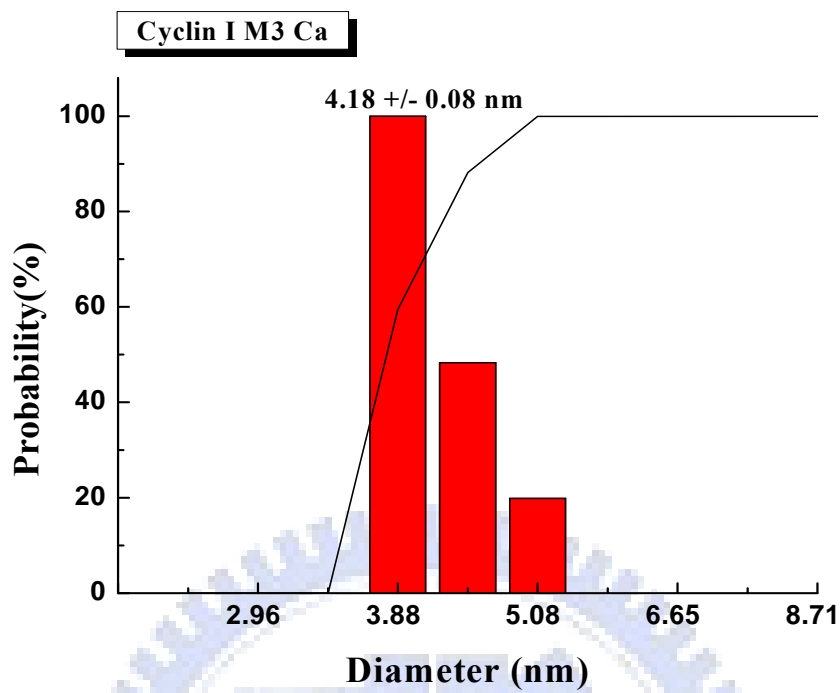


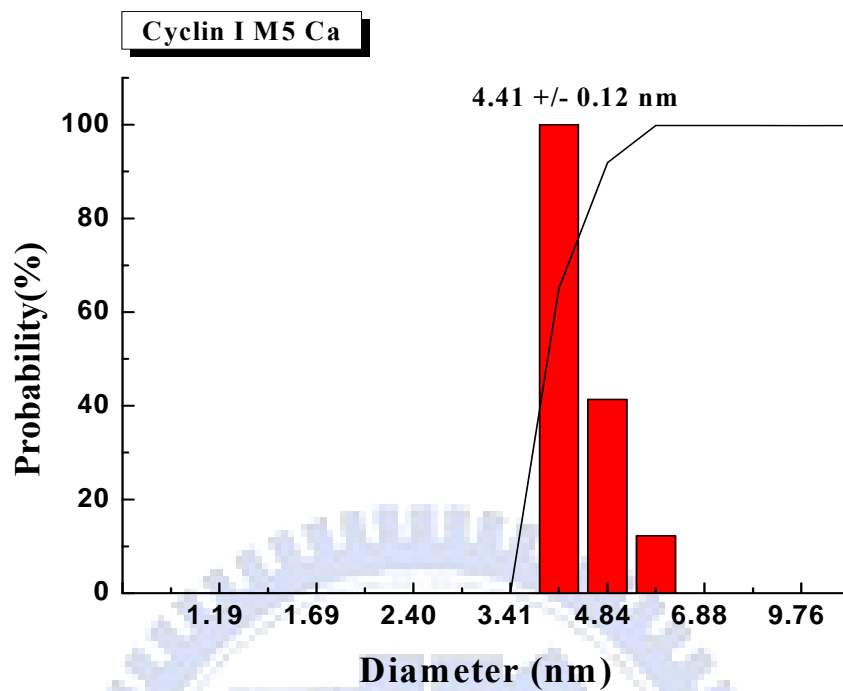
附錄五：使用 Tris + Ca 緩衝液摺疊之 cyclin I 蛋白質中間物分析

附錄五-1：動態光散射儀量測摺疊中間物大小

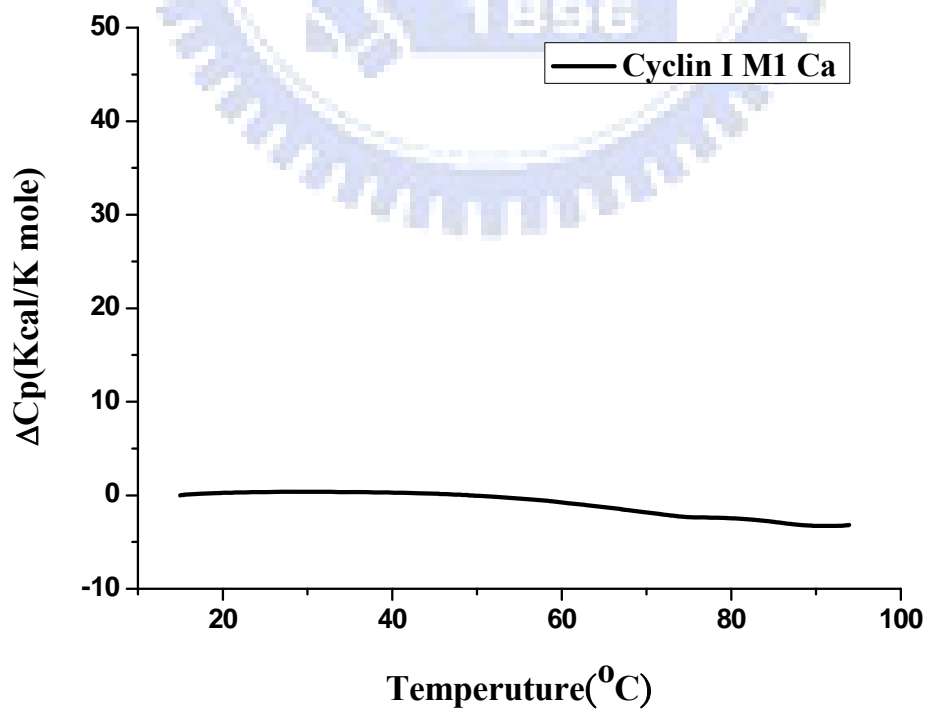


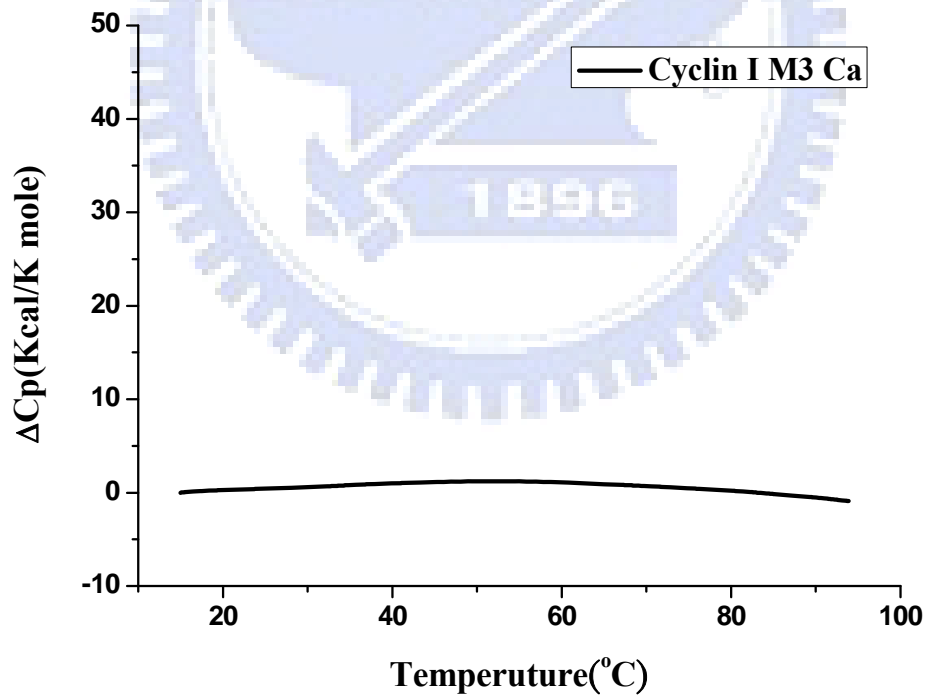
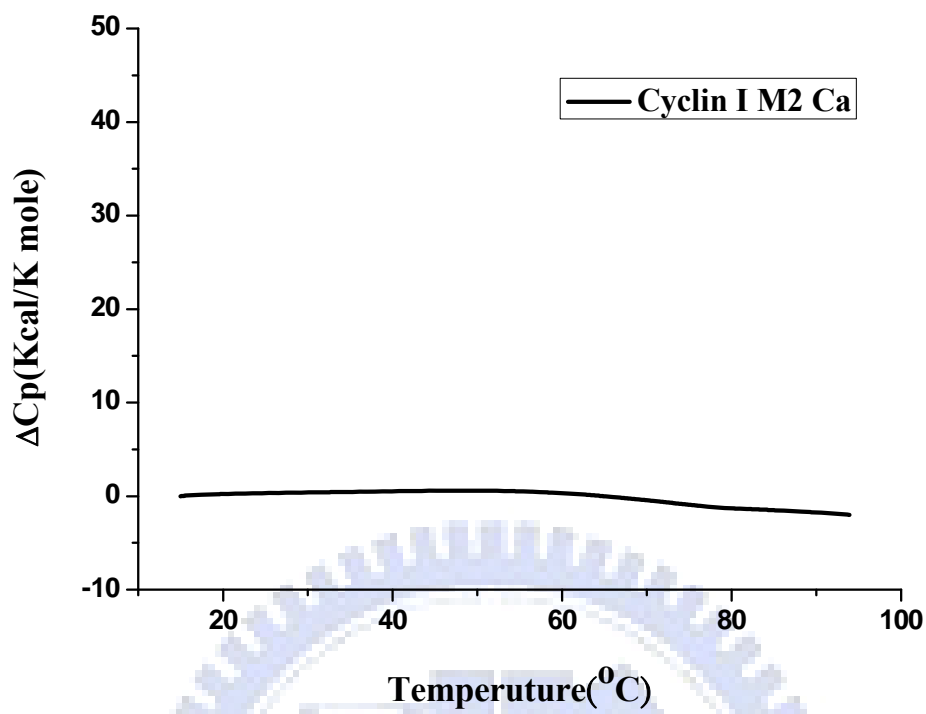


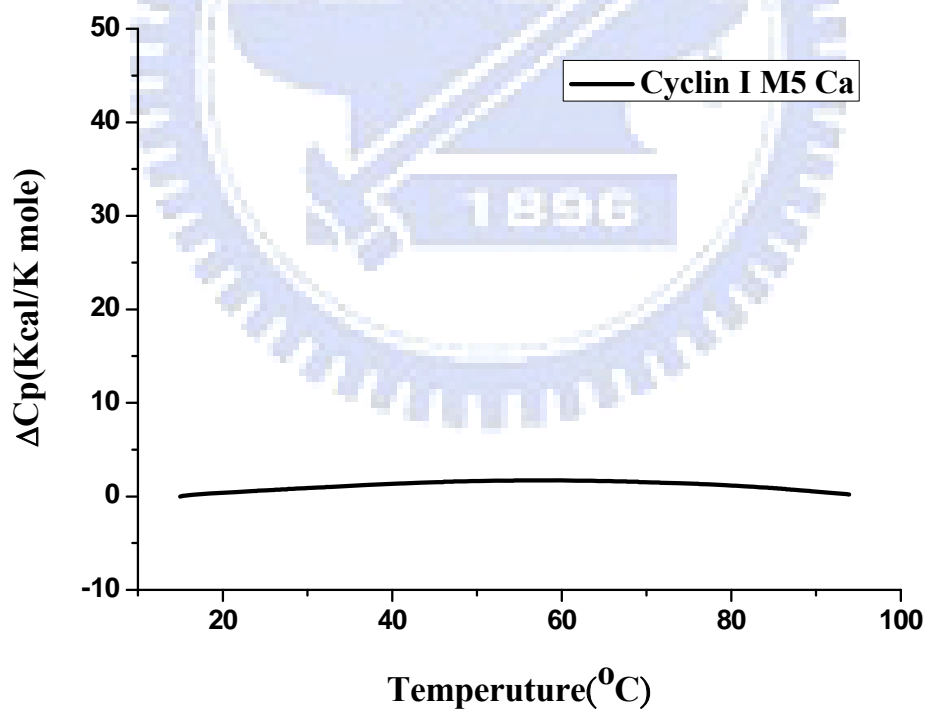
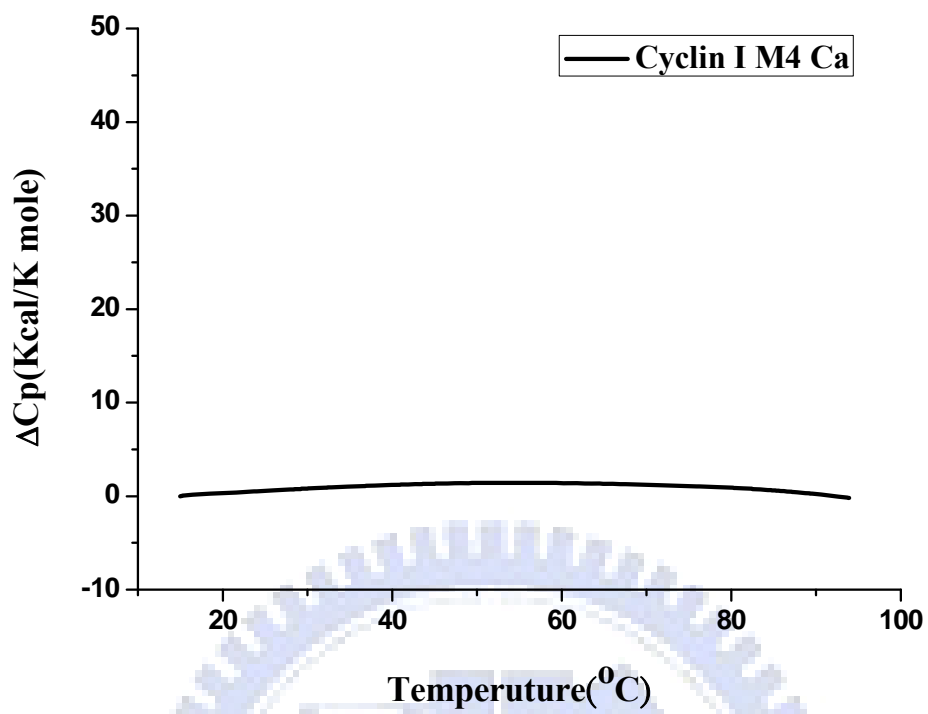




附錄五-2：使用微熱量掃描熱卡路里計量測摺疊中間物熱相變點

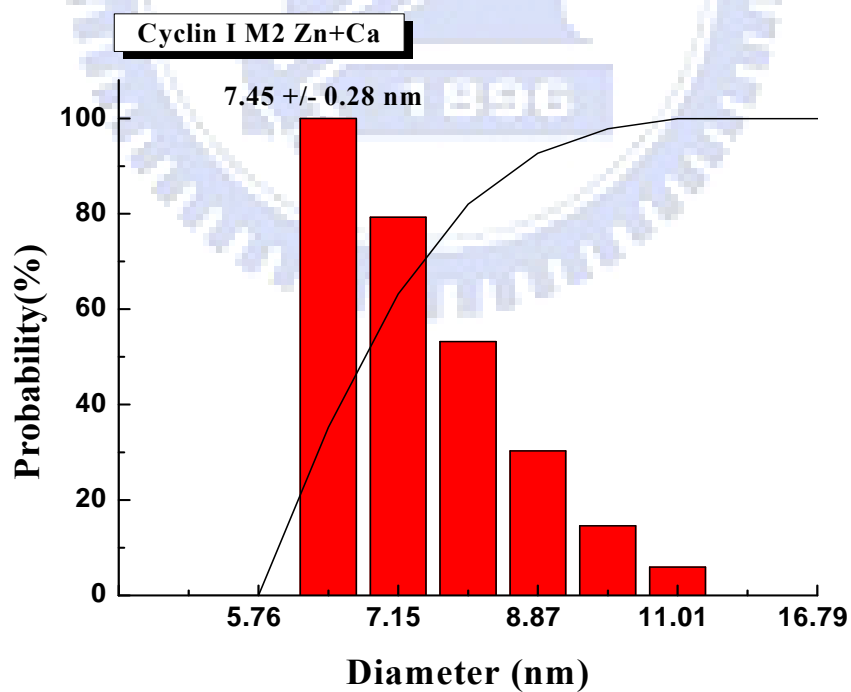
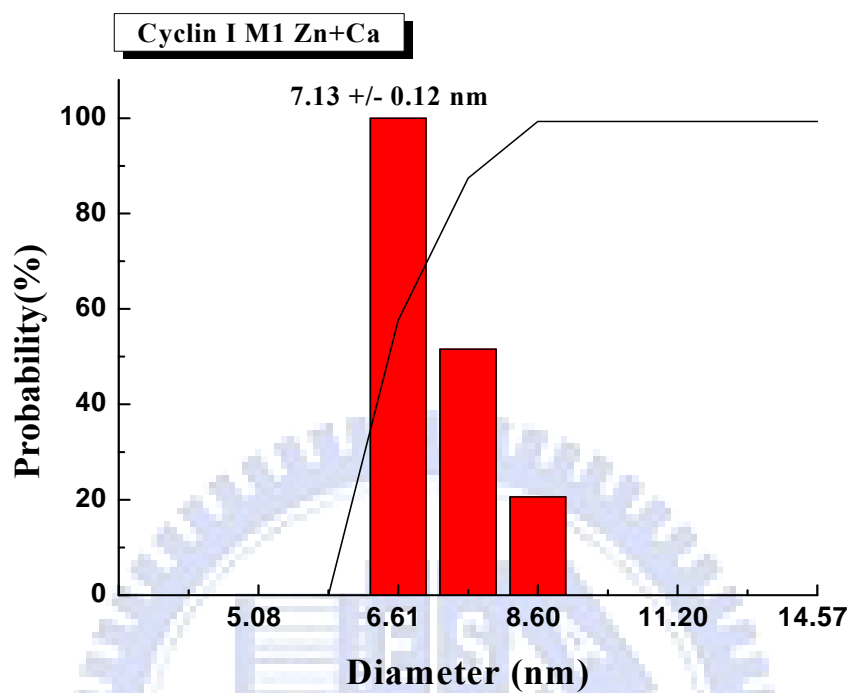


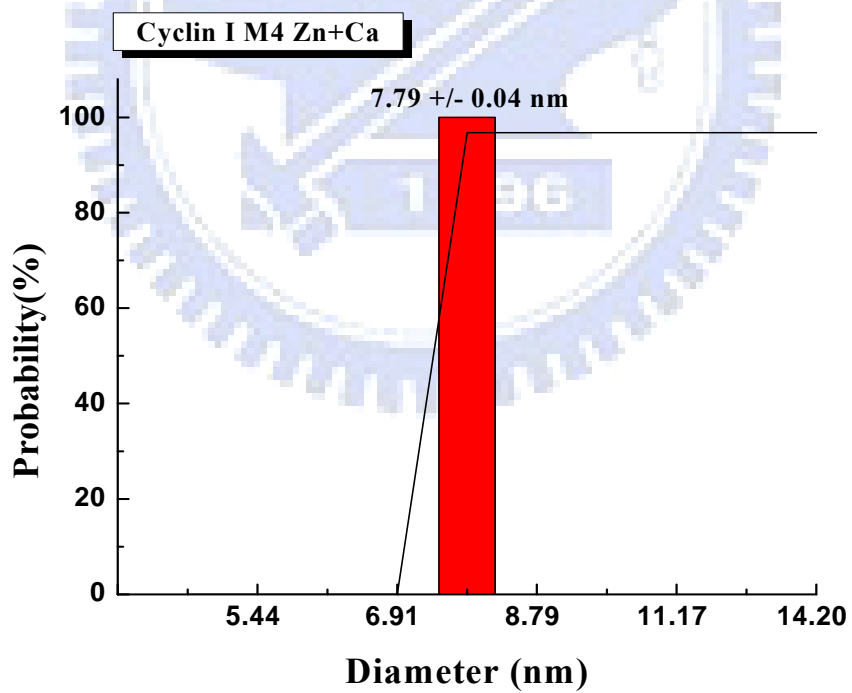
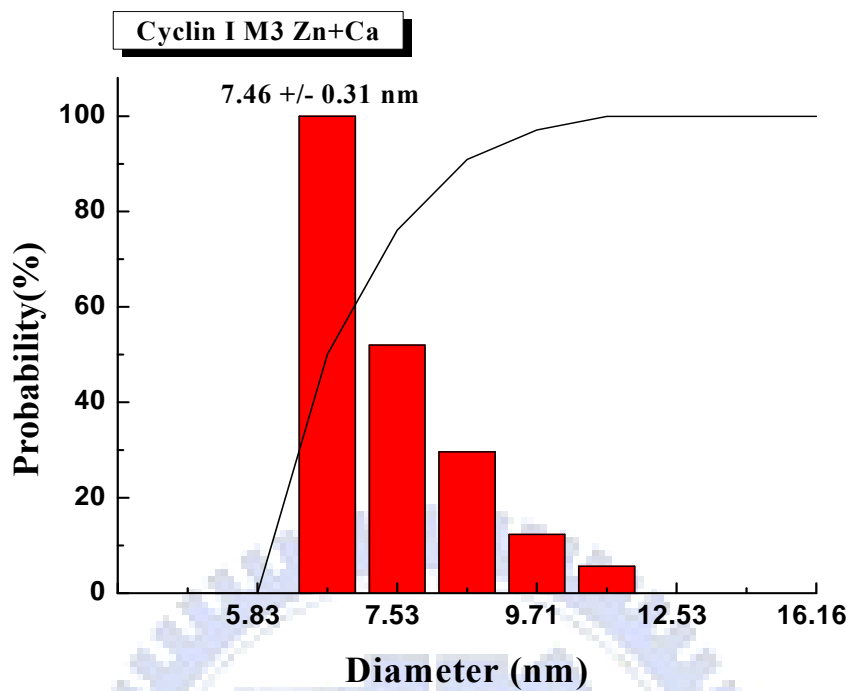


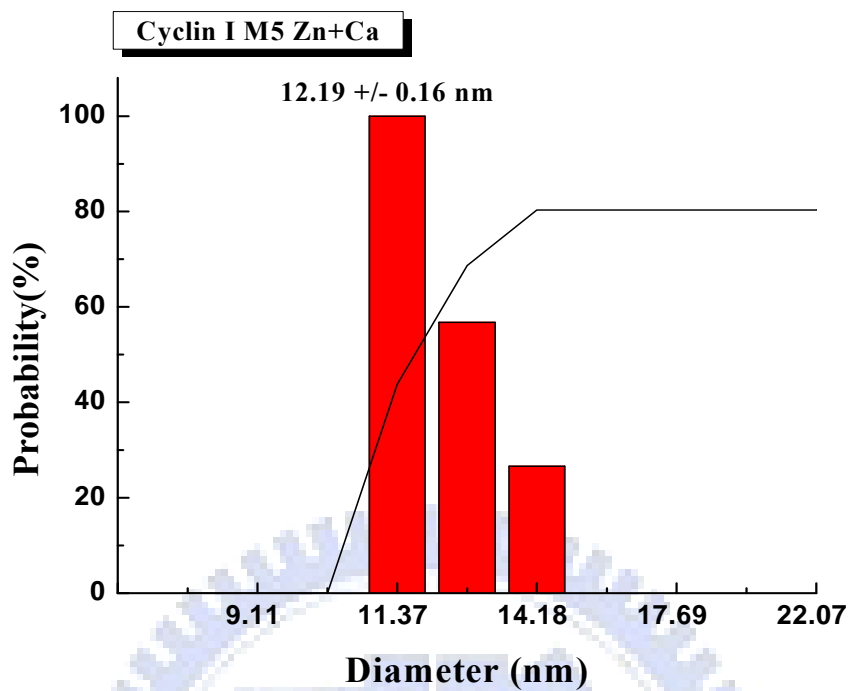


附錄六：使用 Tris + Zn、Ca 緩衝液摺疊之 cyclin I 蛋白質中間物分析

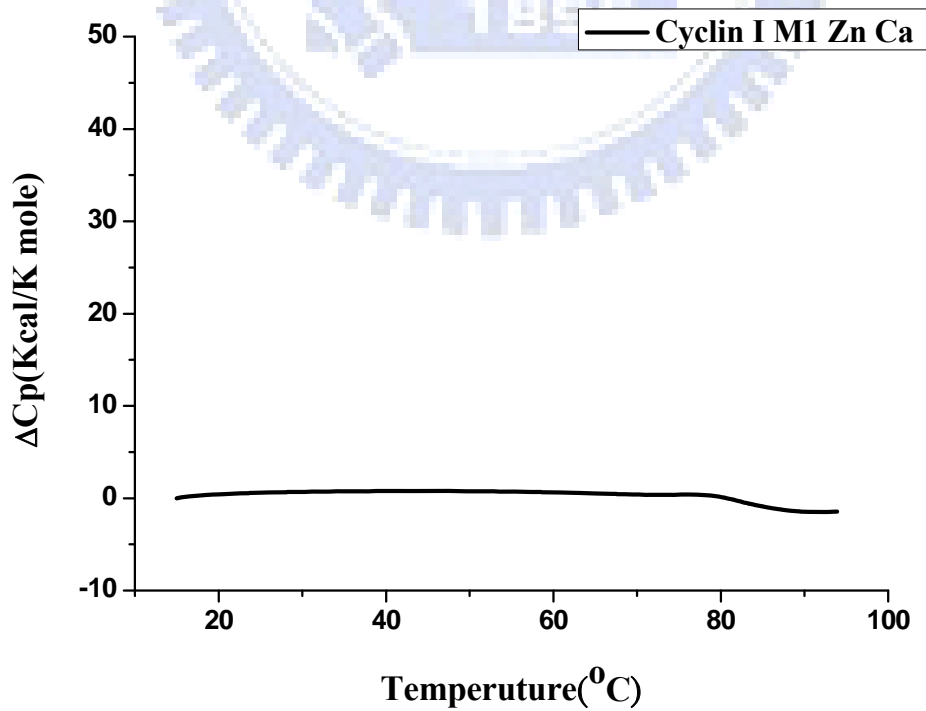
附錄六-1：動態光散射儀量測摺疊中間物大小

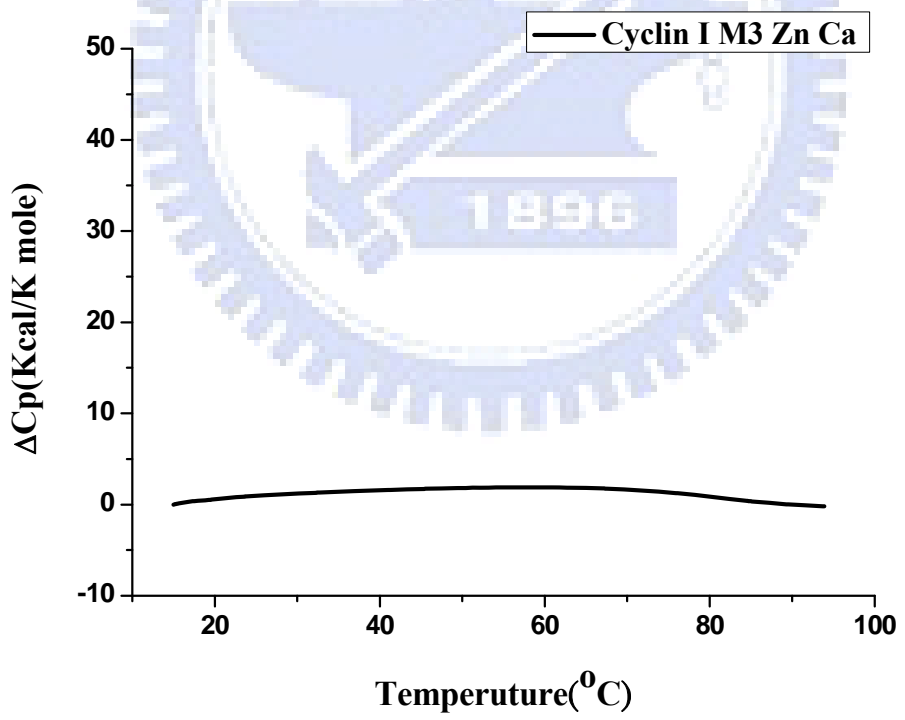
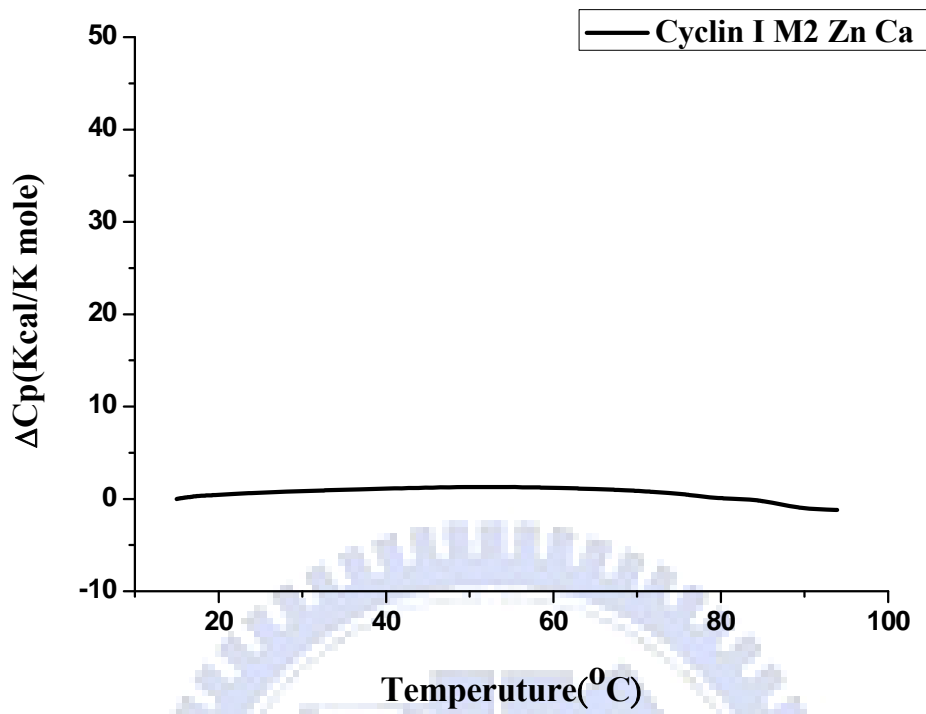




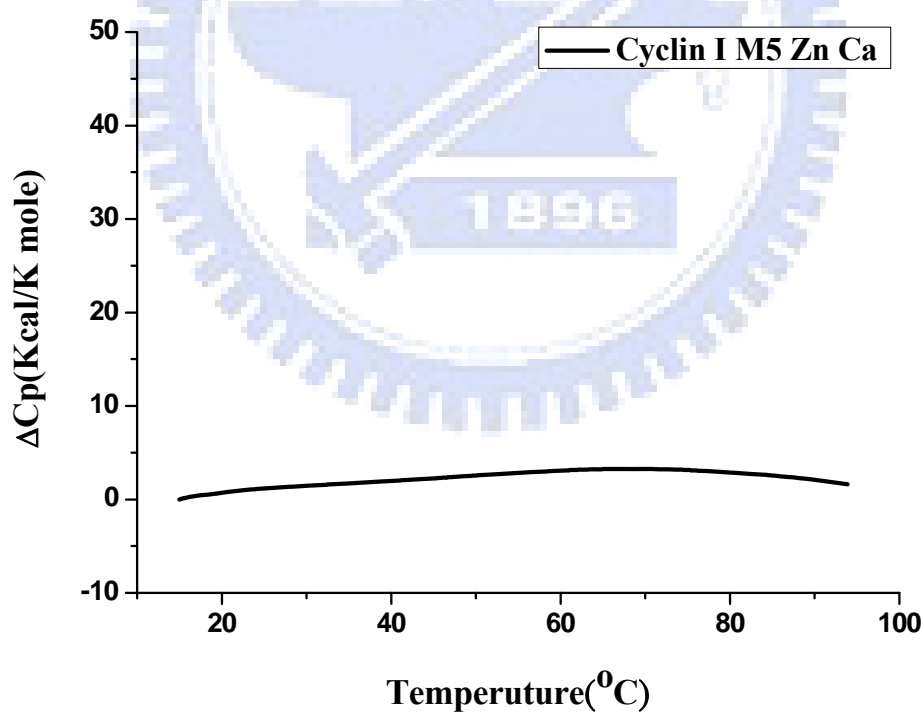
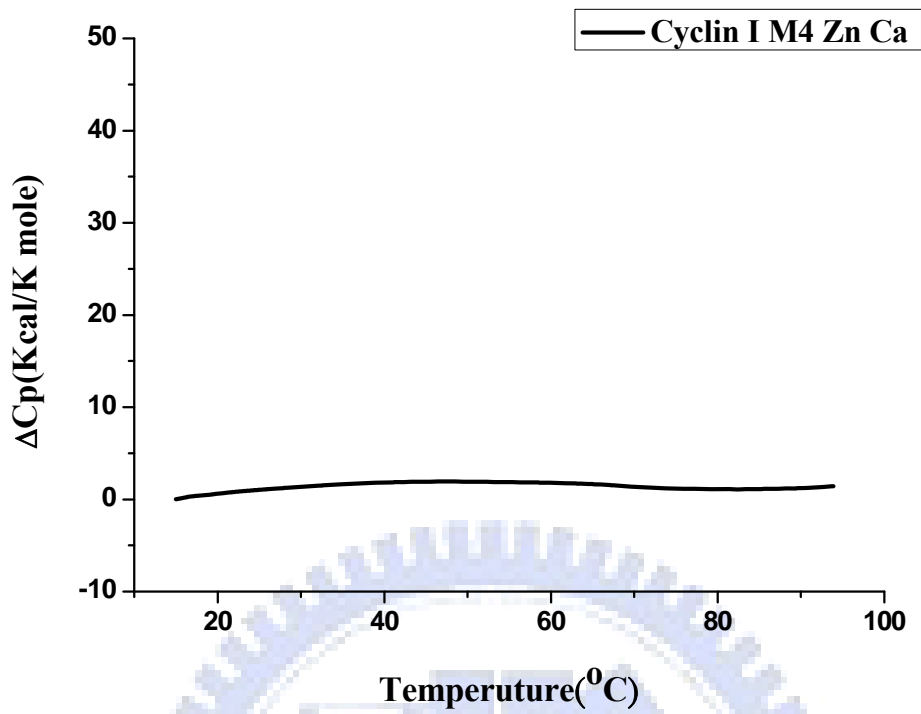


附錄六-2：使用微熱量掃描熱卡路里計量測摺疊中間物熱相變點









附錄七: Lysozyme 蛋白質以微熱量掃描熱卡路里計量測熱相變點

