

國立交通大學

生化工程所

碩士論文

人類 securin 蛋白質：

一個無特定三級結構的蛋白質

Human securin：

a structurally disordered protein

研究生：吳昌祐

指導教授：張家靖 教授

中華民國八十六年七月

## 人類 securin 蛋白質：一個無特定三級結構的蛋白質

學生：吳昌祐

指導教授：張家靖

國立交通大學生化工程研究所 碩士班

### 摘要

人類 securin 蛋白質是一個最近為人所發現的致癌基因 (oncogene)，它是由腦下垂體腫瘤轉型基因 (pituitary tumor transforming gene) 經轉錄、轉譯而來。而它在許多的癌症細胞中都有其高量的表現，亦即當 securin 於細胞中大量表現時會促使細胞的癌化。但是對於他造成細胞癌化的分子機制至今仍不清楚。目前僅知其在細胞分裂的 anaphase 中扮演調控者的角色。其調控細胞分裂的方式是藉由和 separase 結合，以抑制 separase 之活性。除此之外，近來許多的研究也發現，securin 與 DNA 修補和細胞凋亡有關。因為陸續的研究發現到 securin 是一個具有多重功能的蛋白質，開始有學者認為它可能是一個沒有結構的蛋白質。因為其可透過結構的多變性可以與許多不同的受質結合而扮演不同之角色。為了瞭解 securin 的結構與功能的關聯性，我們由基因轉殖的技術將 securin 的基因轉殖到 *E. coli* 中，大量表現基因重組之人類 securin 蛋白質。並透過階段性溶液置換準靜態過程 (quasi-static thermal equilibrium dialysis) 將其重新摺疊到其自然狀態。我們利用圓二色光譜儀 (CD) 及微溫差掃描熱卡路里計 (DSC) 之分析，發現重新摺疊的中間物及自然狀態，並無特定的二級結構，且其本身的三級結構不穩定。此外，我們透過 far western 分析發現 securin 會和 p53 直接鍵結。而這樣交互作用可能會在 securin 大量表現時影響 p53 在細胞中的活性。

## Human securin : a structurally disordered protein

Student : Cang-Yiu Wu

Adviser : Dr. Chia-Ching Chang

Institute of Biochemical Engineering

National Chiao Tung University

### Abstract

Human *securin* is an oncogene which has been identified in 1997. It is a pituitary tumor transforming gene encoded protein and serves as a biomarker in several cancer cell. Namely, when securin overexpress in cell, it leads to carcinogenesis. However, its molecular mechanism of carcinogenesis remains unclear. Recently studies indicated that securin is an anaphase inhibitor which prevents premature chromosome separation by blocking the activity of separase. Meanwhile, securin may also regulate cell cycle progression, DNA repair and apoptosis. Due to its multifunctional roles, securin has been proposed as a disordered protein. In order to reveal its structure function relationship, we have cloned human securin gene from small cell lung cancer cDNA library and expressed recombinant securin in *E. coli*, and it has been refolded its native state. Combining both circular dichroism (CD) spectra and differential scanning calorimetry (DSC) analysis indicated that securin is a structural disordered protein. Furthermore, we found that securin binds to p53 directly by Far-western analysis. This interaction indicates that securin may regulate the function of p53.

## 誌謝

轉眼間二年的時間就這樣過去了！當初，為了想換一個跟大學不一樣的環境而到了新竹來唸書，從一開始的不適應新環境，到後來做不完的實驗，最後則是昏天黑地的趕論文，雖說整個過程都是非常忙碌的，不過我很慶幸我過得很充實且愉快。在這兩年的碩士班日子裡，不敢說學到的東西我都扎扎实實地非常瞭解，但我真的學到不少的東西，且我知道自己比以前進步了，且對於研究有更深一層的認識，而這都要感謝我的指導教授張家靖老師。這兩年一路跟著老師從實驗室的建立、實驗的操作及討論到參加研討會及最後撰寫論文，老師都不斷的給予我不同的看法、想法及鼓勵，不但讓我對於自己的實驗及研究更有信心，也使我對自己更有自信，很慶幸自己能在老師的實驗室當研究生。感謝老師您的指導！

這裡也要對在實驗上幫助我最大的學亮及姿亘至上敬意，因為有你們的幫忙才能讓我順利度過實驗上的難關，真的很感謝你們！此外，也非常感謝亦良學長在我最後準備寫作論文、趕實驗數據及準備口試的時候，給予幫忙及指導，讓我能夠順利完成論文。而對於提供許多在物理觀念上的解惑及碩士班過來人經驗的健彰學長，特別感激你！還有常在不順心時給我鼓勵的美儀，謝謝妳讓我能夠迅速從不順心的情緒中恢復。張簡及寶明學長，也非常謝謝你們時常給予我許多實驗及研究上的建議。至於奕辰學長，雖然你常給我捅婁子，但還是要感謝你常在我實驗忙不過來時給予協助。這邊我也要跟師母及實驗室的佩欣、芳馨、碩士班的學弟妹、大學部的學弟說聲感謝，感謝你們在我碩士班的兩年裡在實驗上給予的協助，及生活上的關心和問候。

最後要謝謝我的家人，我父親跟母親。感謝你們對我的支持，讓我能夠順利並沒有後顧之憂地完成我碩士的學位。而這兩年碩士班的訓練讓我更獨立自主，也希望你們能夠放心。

謝謝大家二年來的照顧和支持，謝謝大家。

昌祐 · 2007 · 7月

# 目錄

摘要 .....	I
Abstract .....	II
誌謝 .....	III
目錄 .....	IV
圖目錄 .....	VI
縮寫表 .....	VIII
第一章、序論 .....	1
1-1 研究動機： .....	1
1-2 蛋白質摺疊簡介 .....	1
1-2-1 蛋白質復性 .....	2
1-2-2 復性方法 .....	2
1-3 人類securin蛋白質簡介 .....	3
1-3-1 細胞週期與癌症 .....	3
1-3-2 細胞週期調控 .....	4
1-3-3 人類securin的發現 .....	7
1-3-4 人類securin基因家族 (Human securin gene family) .....	7
1-3-5、Securin功能 .....	7
1-3-6、Securin與tumar suppressor p53 之間的關係 .....	10
1-3-7、Securin結構 .....	13
1-3-8 無特定構形蛋白質 (Disordered protein) .....	14
第二章、實驗原理 .....	19
2-1 蛋白質securin的製備 .....	19
2-2 蛋白質摺疊 .....	19
2-3 圓二色旋光光譜儀 (Circular Dichroism: CD) .....	21
2-4 螢光光譜 (Fluorescence Spectroscopy) .....	22
2-5 微溫差掃描熱卡路里計 (Differential Scanning Calorimetry: DSC) ...	22
第三章、實驗方法 .....	24

3-1 Securin基因之選殖 .....	24
3-2 Securin蛋白質的重新摺疊 .....	26
3-3 圓二色旋光光譜儀 (CD).....	27
3-4 動態光散射儀 (Dynamics light scattering: DLS).....	27
3-5 微溫差掃描熱卡路里計 (Differential Scanning Calorimetry : DSC) ..	28
3-6 Far Western .....	28
第四章、實驗結果 .....	29
4-1 Securin基因鑑定 .....	29
4-2 Securin電泳膠片之分析結果 .....	33
4-3 Western blotting 分析結果 .....	35
4-4 Securin蛋白質的二級結構分析 .....	37
4-5 螢光光譜分析蛋白質疏水性核心之形成 .....	40
4-6 以DLS分析securin摺疊中間體粒徑大小的分布 .....	42
4-7 Securin摺疊中間物的熱穩定性 .....	47
4-8 Securin蛋白質透過DisEMBL程式分析無特定結構的情形 .....	51
4-9 Far western blotting分析結果 .....	54
第五章、討論 .....	56
5-1 Securin基因與蛋白質序列分析 .....	56
5-2 Securin電泳膠片與western blotting Securin電泳膠片之分析 .....	56
5-3 Securin摺疊過程中，摺疊中間體與自然狀態之結構與熱穩定性變化，及無特定結構蛋白質程式分析結果。 .....	56
(1) Securin摺疊 .....	56
(2) 摺疊中間體與自然狀態之結構與熱穩定性變化 .....	57
(3) 無特定結構蛋白質程式分析結果 .....	58
5-3 Securin與p53 之間的關聯 .....	58
參考文獻 .....	61
附錄 .....	69
圖 1: 質體pET200 securin架構圖。 .....	69
Table 1: 蛋白質復性緩衝液配方。 .....	70
Table 2: Hpttg家族蛋白質序列比對 <sup>38</sup> 。 .....	71

## 圖目錄

圖 1- 1、有絲分裂中各個時期模式圖 .....	4
圖 1- 2、細胞週期調控圖 .....	6
圖 1- 3、ANAPHASE PROMOTING COMPLEX 與SECURIN的作用關係圖。 .....	8
圖 1- 4、KU PROTEIN COMPLEX修復雙股斷裂DNA示意圖 .....	9
圖 1- 5、APOPTOSIS示意圖。 .....	12
圖 1- 6、SECURIN序列圖。 .....	14
圖 1- 7、4EBPs與EIF4E結合誘導A-HELIX形成示意圖 <sup>83</sup> 。 .....	16
圖 4- 1、PET200 SECURIN質體PCR鑑定結果圖。 .....	30
圖 4- 2、SECURIN基因DNA定序圖 .....	31
圖 4- 3、SECURIN基因定序比對結果。 .....	32
圖 4- 4、SECURIN SDS-PAGE分析 .....	34
圖 4- 5、破菌上清液及內涵體SDS-PAGE與WESTERN BLOTTING分析結果。 .....	36
圖 4- 6、蛋白質SECURIN各摺疊中間體的CD圖譜。 .....	38
圖 4- 7、蛋白質SECURIN各摺疊中間體之二級結構分布分析表。 .....	38
圖 4- 8、蛋白質SECURIN各摺疊中間體及自然態之二級結構分布比例。 .....	39
圖 4- 9、SECURIN摺疊中間物螢光圖譜。 .....	41
圖 4- 10、蛋白質螢光光譜位移分析。 .....	41
圖 4- 11、動態光散射儀量測未摺疊蛋白質SECURIN的粒子大小分布圖。 .....	43
圖 4- 12、動態光散射儀量測蛋白質SECURIN摺疊中間體M <sub>1</sub> 的粒子大小。 .....	43
圖 4- 13、動態光散射儀量測蛋白質SECURIN摺疊中間體M <sub>2</sub> 的粒子大小。 .....	44
圖 4- 14、動態光散射儀量測蛋白質SECURIN摺疊中間體M <sub>3</sub> 的粒子大小。 .....	44
圖 4- 15、動態光散射儀量測蛋白質SECURIN摺疊中間體M <sub>4</sub> 的粒子大小。 .....	45
圖 4- 16、動態光散射儀量測蛋白質SECURIN摺疊中間體M <sub>5</sub> 的粒子大小。 .....	45
圖 4- 17、動態光散射儀量測蛋白質SECURIN各個摺疊中間體的粒子大小	

分布圖。	46
圖 4- 18、LYSOZYME利用DSC測定其結構熱穩定性。	48
圖 4- 19、SECURIN蛋白質在M <sub>1</sub> 時的熱穩定性。	48
圖 4- 20、SECURIN蛋白質在M <sub>2</sub> 時的熱穩定性。	49
圖 4- 21、SECURIN蛋白質在M <sub>3</sub> 時的熱穩定性。	49
圖 4- 22、SECURIN蛋白質在M <sub>4</sub> 時的熱穩定性。	50
圖 4- 23、SECURIN蛋白質在M <sub>5</sub> 時的熱穩定性。	50
圖 4- 24、DisEMBL分析結果圖。	52
圖 4- 25、DisEMBL各部分分析序列圖。	53
圖 4- 26、FAR WESTERN結果圖	55
圖 4- 27、FAR WESTERN 結果圖	55
圖 5- 1、SECURIN影響P53 功能示意圖 <sup>21, 51, 56, 57</sup> 。	59





## 縮寫表

以英文字母順序排列

Apaf-1	<u>A</u> poptosis <u>a</u> ctivating <u>f</u> actor- <u>1</u>	細胞凋亡活化因子-1
APC	<u>A</u> naphase <u>p</u> romoting <u>c</u> omplex	細胞核分裂後期促進錯合體
CD	<u>C</u> ircular <u>d</u> ichroism	圓二色光譜儀
CDK	<u>C</u> yclin <u>d</u> ependent <u>k</u> inase	細胞週期素依賴激酶
CKI	<u>C</u> yclin dependent <u>k</u> inase <u>i</u> nhibitor	細胞週期素依賴激酶抑制物
D box	<u>D</u> estruction <u>b</u> ox	降解序列
DED	<u>D</u> eath <u>e</u> ffector <u>d</u> omain	死亡受動器區域
DLS	<u>D</u> ynamic <u>l</u> ight <u>s</u> cattering	動態光散射儀
DSC	<u>D</u> ifferential <u>s</u> canning <u>c</u> alorimetry	微溫差掃描熱卡路里計
DSSP	<u>D</u> efinition of <u>s</u> econdary <u>s</u> tructure of <u>p</u> roteins	蛋白質二級結構預測資料庫
eIF4G	<u>E</u> karyotic <u>i</u> nitiation <u>f</u> actor <u>4</u> G	真核生物轉錄活化因子-4G
HRP	<u>H</u> orseradish <u>p</u> eroxidase	山葵過氧化酶
IgG	Immunoglobulin G	免疫球蛋白 G
IPTG	<u>I</u> sopropyl $\beta$ -D -1- <u>t</u> hiogalactopyranoside	異丙基- $\beta$ -D-硫. 代半乳糖苷
MAPK	<u>M</u> itogen <u>a</u> ctivated <u>p</u> rotein <u>k</u> inase	增生因子活化型激酶
NCBI	<u>N</u> ational <u>c</u> enter for <u>b</u> iotecnology information	美國國家生物技術資訊中心
NMR	<u>N</u> uclear <u>m</u> agnetic <u>r</u> esonance	核磁共振儀
PCR	<u>P</u> olymerase <u>c</u> hain <u>r</u> eaction	聚合酶鏈反應
PTTG	<u>P</u> ituitary <u>t</u> umor <u>t</u> ransforming gene	腦下垂體腫瘤轉型基因
PVDF	<u>P</u> oly <u>v</u> inylidene <u>d</u> ifluoride	尼龍轉印紙
RB	<u>R</u> etinoblastoma tumor suppressor gene	視網膜胚細胞瘤基因
TRAIL	<u>T</u> NF- <u>r</u> elated <u>a</u> poptosis <u>i</u> nducing ligand	腫瘤壞死因子相關細胞凋亡 誘導受質

# 第一章、序論

## 1-1 研究動機：

癌症是人類最為關切的疾病之一，但是癌症的成因非常複雜不易全盤瞭解與調控。目前所知癌症的成因，多半與細胞本身細胞週期調控失常有密切的關係。因此我們對cyclin相關基因與其調控極感興趣。securin是近年來剛為人所發現之蛋白質<sup>1</sup>，人類的securin蛋白質已知與細胞週期調控有關<sup>1</sup>，亦即所謂的致癌基因 (oncogene)。然而對於securin本身的分子機制、功能、結構及它造成許多細胞癌化的成因依舊是不清楚。由於這類與細胞週期有關之蛋白質在細胞中表現時期不是很長<sup>2</sup>，而在純化及實驗分析上有其困難<sup>2</sup>，因此本實驗利用基因擴增法選殖人類securin的基因後，再運用基因重組的方式來取得securin蛋白質，並透過重新摺疊的方式，來了解其自然體結構與摺疊過程中蛋白質結構之變化，並瞭解其摺疊機制。此外我們利用far western blotting來分析他與p53之間是否存在直接的連結。因為p53是一個與細胞週期調控與細胞凋亡有關的蛋白質，當其功能喪失的時候，則會引起癌症的發生<sup>3</sup>，加上securin為一個致癌基因 (oncogene)，故藉由far western blotting瞭解securin與p53之間是否存在直接的鍵結，這樣的鍵結可能會影響p53的作用，而影響細胞週期的表現或是造成細胞的癌化。

## 1-2 蛋白質摺疊簡介

一般認為蛋白質能否具有正確的三級結構，與其生物的功能息息相關<sup>4</sup>。當蛋白質因外在環境的劇烈改變將使得蛋白質錯誤摺疊 (misfold)，進而使彼此聚集 (aggregation) 沉澱時。抑或當蛋白質內穩定結構的作用力遭到完全破壞時，蛋白質將形成變性結構 (denature structure)，最後導致其喪失生物的功能性。而蛋白質如何由一無特定構形鬆散的胺基酸序列摺疊至具特殊構形的過程，及這過程中分子內結構的變化與交互作用，是科學家們努力想探討的部分<sup>4</sup>。而在本實驗室中我們已經成功建立一套方法讓蛋白質能摺疊至正常的結構<sup>1,5,6,7,8</sup>。如此一來我們可以透過基因重組的方式利用微生物來大量製造所需之基因重組蛋白質。因為基因重組蛋白質在細胞內大量表現的時候，會造成此一蛋白質在細胞內形成不具活性的內涵體 (inclusion body)。我們可以藉由將此一喪失功能的蛋白質摺疊至具活

性的正常結構下，來研究此一蛋白質在摺疊過程中結構的變化及其摺疊至其自然結構（native structure）時所具有的結構特性與機制。

### 1-2-1 蛋白質復性

透過內涵體這樣的方式來取得大量蛋白質，有一重要的就是它是由大量蛋白質聚集而成，且蛋白質因結構變性而不具活性，而我們需要透過復性（renaturation）的方式將其變成具有活性的蛋白質。所謂的復性是為讓蛋白質從未摺疊或是錯誤摺疊的情況下恢復具有活性的構形<sup>4</sup>。而蛋白質的結構會受到許多的環境因素所影響，包括溫度<sup>9</sup>、pH值、離子強度<sup>10</sup>及壓力<sup>7</sup>等。所以當我們將蛋白質溶液環境改變時，蛋白質會為了要因應新的環境而改變其構形，如此才能夠達到新的平衡。故從熱力學觀點來看，當蛋白質處在於含有高濃度變性劑的環境中，其未摺疊態的構形能量相對於其自然態而言是較低的，而我們將變性劑的濃度逐漸降低甚至移除的時候，蛋白質分子內將形成鍵結。當蛋白質分子內形成一些鍵結的時候，而這樣的鍵結會造成蛋白質態的轉變，態的轉變將會釋放出能量來使蛋白質達到最低構形能量態，即與環境達成新平衡。最後蛋白質復性產生具有活性的結構時，即是處於最低構形能量態下<sup>1</sup>。

### 1-2-2 復性方法

在實驗室裡常用的摺疊方法包括有，直接稀釋法<sup>11</sup>與連續式透析法<sup>12</sup>來進行復性。其目的都是藉由將蛋白質周圍環境的變性劑濃度降低或是移除，使其無法破壞蛋白質結構。下面就兩種不同的稀釋的方法做簡單之介紹：

#### (1) 直接稀釋法（Direct Dilution）<sup>11</sup>

此方法為直接將含有高濃度變性劑的未摺疊態蛋白質直接稀釋自然態溶液中。復性機制如前面所述，降低變性劑濃度使其無法破壞穩定蛋白質結構之力量，蛋白質即可自行摺疊。但缺點就是蛋白質的濃度會下降許多，而造成後續的實驗上之困難。因此，以稀釋法復性需提高復性溶液的稀釋倍數，此對於產品回收和純化皆不適宜，且因高濃度的蛋白質周圍環境經過劇烈的變化將會形成錯誤摺疊與聚集體（aggresome）<sup>13</sup>。

## (2) 準靜態熱平衡透析法 (Quasi-static thermal dynamics Equilibrium

### Dialysis)

透析的方式是指將蛋白質利用透析膜的特性，將溶於變性溶液的蛋白質放置在透析膜中，然後於膜外放置大量之復性溶液，由於透析膜本身的特性（透析膜是有許多孔徑相當小的材質，只允許比孔徑比較小的分子如水分子及鹽類通過），透析膜內外鹽類濃度的不一致，會造成滲透壓的差異，因此溶液內離子藉由布朗運動而自由移動，於是最後膜外與膜內之離子濃度將會相同並且達到平衡，而達到使變性劑濃度降低之目的。而本實驗室又將此方法加以改良，利用準靜過程的方式來進行透析。因為透析膜內的溶液與整體外界之溶液交換擴散是非常緩慢的，加上本實驗室在摺疊時值盡量縮小溶液的初始狀態及末狀態的差異，如此一來整個溶液的置換過程會變的非常緩慢。而透過這樣溶液置換方式，會使的蛋白質一直處於平衡狀態，對於蛋白質來說這樣的過程可以視為近乎靜止的狀態，故我們將此改良的平衡透析法稱為準靜態熱平衡透析法 (quasi-static thermal equilibrium dialysis)<sup>1,5,6,7,8</sup>。透過階段性溶液置換準靜過程的方式我們可以獲得不同溶液置換階段的中間體，而這些中間體可以幫助我們瞭解蛋白質摺疊過程中結構的變化<sup>14</sup>。

### 1-3 人類 securin 蛋白質簡介

#### 1-3-1 細胞週期與癌症

癌症一直是人類最為關切的疾病之一，而其成因是錯綜複雜的，並非單一的過程<sup>15</sup>。癌症簡單來說就是一群原本正常的細胞，當其偏離他原本正常生長的限制，最後失去控制的結果<sup>16</sup>。目前所發現的癌症成因，包括了細胞生長調控因子之突變造成細胞複製的調控失效，或DNA修補分子失去其功能等<sup>15</sup>。因此一旦其生長調控機制發生問題，會讓細胞可以不斷的增生，並且一直複製出許多分化不良的細胞。不斷的不規則生長，到最後可能會無限制的擴展而去侵犯其他的組織，使個體死亡。如同前面所提到的，癌症的發生與細胞週期的調控有著密切的關係，因此我們可由瞭解細胞週期之進程與調控著手，以其瞭解如何控制細胞分裂與可能的癌化機制。

### 1-3-2 細胞週期調控

基本上細胞週期可以分成兩個主要的部分，分別是間期 (interphase) 及分裂期 (M phase)，其中間期占整個週期時間的 90%<sup>16</sup>。在間期中可分成 G1 phase、S phase 及 G2 phase 三個時期，G1 phase 是靜止期，細胞不作用，S phase 是 DNA 合成期，G2 phase 細胞繼續生長，而接著就是分裂期的進行。M phase 亦分成數個時期，包括前期 (prophase)、中期 (metaphase)、後期 (anaphase) 及末期 (telophase)。在有絲分裂 (mitosis) 前期，染色質開始凝聚成染色體，且核仁會跟著消失，中心粒往細胞兩端移動，接著進入有絲分裂中期。中期最明顯的辨識特徵就是紡錘絲將染色體排列在赤道板中央。後期成對的染色體從中節分開並受紡錘絲的牽引向細胞兩端移動。在有絲分裂末期，各染色體抵達細胞兩極，子細胞形成新的核膜，染色體漸漸散開恢復到光學顯微鏡不可見之狀態，最後紡錘絲消失進行質裂，亦即細胞分裂成兩個<sup>2</sup>。(圖 1-1)

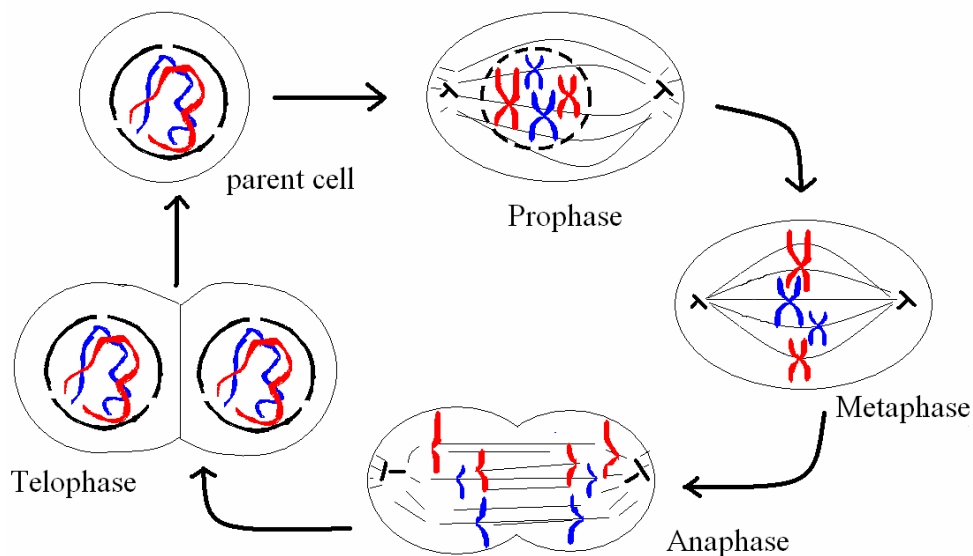


圖 1-1、有絲分裂中各個時期模式圖

因為細胞週期是細胞生命活動的基本過程，其調控是非常重要的，目前已發現的與細胞週期調控有關的分子很多，而主要分成三大類：cyclin、cyclin dependent kinase (CDK)、cyclin dependent kinase inhibitor (CKI)。其中 CDKs 是調控網路的核心，CDKs 對 cyclins 具有促進的功能<sup>17</sup>，相對而言 CKIs 是抑制 cyclins 的功能，透過這樣的促進及抑制的機制，共同構成了細胞週期調控的分子基礎<sup>17</sup>。以下分別舉例及詳述數個重要的調控分子及其



在細胞週期中所表現的功能 (圖 1-2)

### (1)Cyclin dependent Kinase (CDK):

如前面所提的，在細胞週期的研究中，發現CDK在細胞週期的調控上是非常重要的<sup>17</sup>。CDKs 在整個細胞週期中的表現量是平穩的，但在細胞週期進行時，不同時期會有不同的cyclins表現，並與相應CDKs 結合並被活化。而活化的cyclin-CDK complex具有啟動DNA合成、促進細胞週期運行等重要功能。基本上，一種CDK可以結合一種以上的cyclins，如CDK2可以與cyclin D、cyclin E和cyclin A結合<sup>18</sup>；此外兩種CDK亦可與同一cyclin結合，如，CDK1 和CDK2 均可以結合cyclin A。其中CDK2 可分別與cyclin E、cyclin A和cyclin D 結合，而此類結合之complex則分別在G1/ S 期、S 期和G2 期發揮不同的作用。透過不同cyclin與CDK的結合，可以具有不同的調控功能，像CDK2是啟動DNA複製的關鍵激酶，也是細胞週期進入G2 期的必要條件，這種不同功能之差異性取決於與CDK2 結合的cyclin 的種類<sup>17</sup>。近期研究指出，細胞由G1期進入S期需要cyclin E及CDK2的共同參與，當細胞進入S期後，cyclin E降解，CDK2轉而與cyclin A結合，推進細胞由S期越過檢查點進入G2期<sup>16</sup>。

### (2)Cyclins

Cyclins顧名思義，其在細胞中是一個週期性的表現。Cyclins藉由與其相對應的CDK結合，調控細胞各種與細胞週期有關因子的表現<sup>17</sup>。哺乳動物的cyclin為一家族性的蛋白質，主要有cyclin A、B、C、D 和E等，而這些不同種類的cyclin分子在序列上都有一些相似的序列，如cyclin box及destruction box，前者負責結合CDK，後者與cyclin自身降解有關<sup>18</sup>。根據參與細胞週期進程的時期不同，可以分為參與G1期和M期的cyclin、在G1 期和G1/ S 交界處發揮作用的cyclin、G2/M 轉換和細胞分裂活動有關的cyclin。以下就不同時期的cyclin作介紹<sup>16</sup>：

Cyclin D :Cyclin D 是研究較為深入的cyclin。Cyclin D 是開啟細胞週期的起始因子。通常處於G0 期的細胞在生長因子 (growth factor) 和生長因子受體 (growth factor receptor) 的作用下，活化G蛋白及mitogen activated protein kinase (MAPK) 等訊息傳遞途徑使cyclin D在G1 早期表達

增加<sup>19</sup>，而cyclin D會與細胞中存在的CDK4 和CDK6 結合，通過cyclin D、CDK 4/ CDK 6 通路調控細胞通過G1 期檢查點 (checkpoint)<sup>19</sup>。

Cyclin E: 繼Cyclin D之後為cyclin E，Cyclin E表達始於G1 中期，表現量於G1/ S 交界處達最高，cyclin E 的生合成受E2F 和Myc 共同啟動<sup>20</sup>。當Cyclin D 與CDK 4/ CDK 6 結合後，使RB ( Retinoblastoma tumor suppressor) 蛋白磷酸化，釋放轉錄因子E2F,誘導Cyclin E 和CDK2 的表達，讓細胞越過G1/ S檢查點。當細胞進入S期，cyclin E的表現量急劇下降<sup>20</sup>。因為Cyclin E 控制細胞進入S 期與否,常被視為S 期的標記物。其中p53 也參與這個時期的細胞週期調控，而其中也牽涉另一個蛋白質p21<sup>21</sup>，因當細胞的DNA受到損傷時，會引發p53 的功能表現。而這樣的表現會促使p21 被細胞大量產生，而大量產生的p21 會去影響CDK2 與Cyclin E的結合，而使細胞週期的進行停止，直到損傷修復之後才繼續進行細胞週期<sup>21</sup>。

Cyclin A: Cyclin A 主要表現於S期和M期，在cyclin E2的部分有提到當細胞進入S期，cyclin E的表現量急劇下降。此時CDK 2會和cyclin A 結合。此外Cyclin A 家族有cyclin A1 和cyclin A2，Cyclin A2在G1晚期出現，可分別與CDK 2和CDK 1結合，cyclin A2 在S期能促進DNA合成，促進細胞越過G2/M期檢查點,進入M期<sup>22</sup>。

Cyclin B: Cyclin B在S期晚期和G2期被表現及生合成，與CDK1結合在G2/ S促進細胞進入M期，是M 期cyclin<sup>23</sup>。

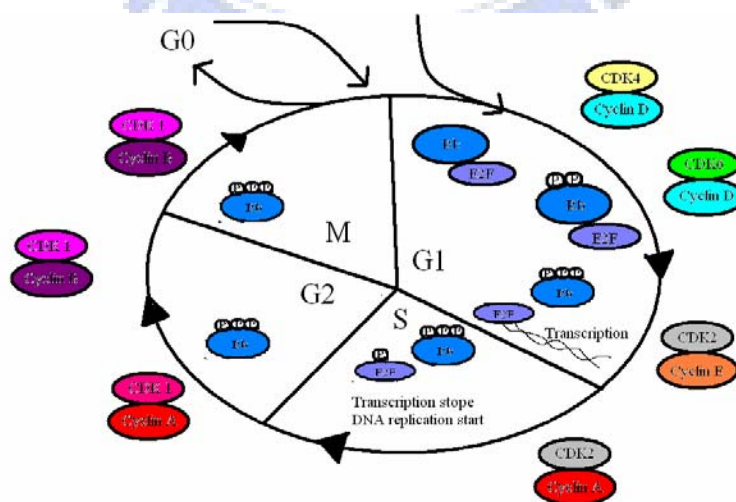


圖 1- 2、細胞週期調控圖

而在有絲分裂 (mitosis) 這個階段裡 (M phase)，同源染色體的分裂

正確與否和癌症的形成亦密切的關係<sup>24</sup>。而securin (又稱PTTG1) 這個蛋白質，在細胞分裂中的間期裡同源染色體分離的調控中扮演很重要的角色。而在許多的研究中發現到不論是securin基因的knock out或是其不正常的大量表現於細胞中，都和許多癌症的形成有關<sup>25</sup>。因此重要性也越來越被重視，現在普遍都認定他是一個protooncogene。下面就針對securin作介紹。

### 1-3-3 人類 securin 的發現

Securin一開始被稱為 PTTG (pituitary tumor transforming gene product)，它是由Pei and Melmed 等人在1997年從老鼠的 pituitary tumor GH4細胞中找到並分離出來的，而以此命名<sup>25</sup>。同時他們也發現當PTTG在裸鼠 (nude mouse) 中大量表現時，會造成腫瘤的產生<sup>6</sup>。不久之後，人類的securin也被選殖出來<sup>26,27</sup>，在許多的癌症細胞基因表現所做的研究中也發現，securin有大量表現的情況，像是在腦下垂體產生的腫瘤<sup>28</sup>，白血病的病人<sup>29,30</sup>，還有睪丸癌<sup>29</sup>、卵巢癌<sup>29</sup>、乳癌<sup>31</sup>、直腸癌<sup>32</sup>、腦下垂體腺瘤<sup>33</sup>及甲狀腺癌<sup>34,35</sup>的病人檢體中也都有同樣的情形，而securin在這些賀爾蒙分泌相關的癌症中，其大量表現還與其侵襲性 (invasiveness)，即癌細胞轉移後傷害其他細胞的能力有極高的相關性<sup>36,37</sup>，在Puri等人的研究中發現當securin大量表現時會刺激basic fibroblast growth factore的表現及分泌，而使得細胞的分化被加強，造成了癌細胞的轉移<sup>29</sup>，而這些現象都暗示著securin是一個和腫瘤形成有關的重要指標。

### 1-3-4 人類 securin 基因家族 (Human securin gene family)

而在2000年Chen等人的研究中，揭露了人類PTTG是一基因家族，而這家族至少包含了三種同源基因，分別是PTTG 1、PTTG 2及PTTG 3<sup>38</sup>，其中PTTG 1就是securin。Securin、PTTG 2和PTTG 3它們的胺基酸序列有將近80%的相似度，PTTG 2不論是在癌症細胞株或是正常的細胞中都有表現，而PTTG 3則是只能在癌症細胞株中發現。到目前為止，PTTG 2及PTTG 3的功能依舊不是非常的清楚。(序列比對圖見附錄table 3)

### 1-3-5、Securin 功能

至於securin又稱作human PTTG 1的這個蛋白質，現在其主要的功能已經被認定為抑制sister-chromatid的分離，而這個功能與出芽酵母菌中pds 1及裂殖酵母菌的cut 2基因有相同的功能<sup>24</sup>。Securin抑制分離的功能是係透過與一種叫做separase的蛋白酶結合而表現<sup>24</sup>，而separase蛋白酶主要作用



是在 metaphase 至 anaphase 的過渡期中，將 sister-chromatid 當中相互連結的蛋白質 cohesin 分解，促使 sister-chromatid 的分離<sup>24</sup>。一旦 securin 與其作結合會抑制 separase 的活性，使其無法作用<sup>24</sup>。換句話說 securin 可以作為一種細胞週期的調控因子，而在細胞週期未進入 anaphase 時，securin 會一直與 separase 結合以抑制其活性，當細胞週期要進入 anaphase 時，會由所謂的 anaphase promoting complex 開啟細胞進入 anaphase 的序曲<sup>39</sup>，此複合蛋白會活化許多蛋白質來促使細胞進入 anaphase，當中包括 separase<sup>24</sup>。而其活化 separase 的方式是透過分解 securin 來達到，因 securin 在其蛋白質的 N 端具有 destruction box 的序列，而 anaphase promoting complex 會活化這個序列而造成 securin 的分解，一旦 securin 被分解後 separase 的活性就會出現，造成 sister chromatid 的分離，而細胞週期也跟著進入了 anaphase<sup>39</sup>。（圖 1-3）

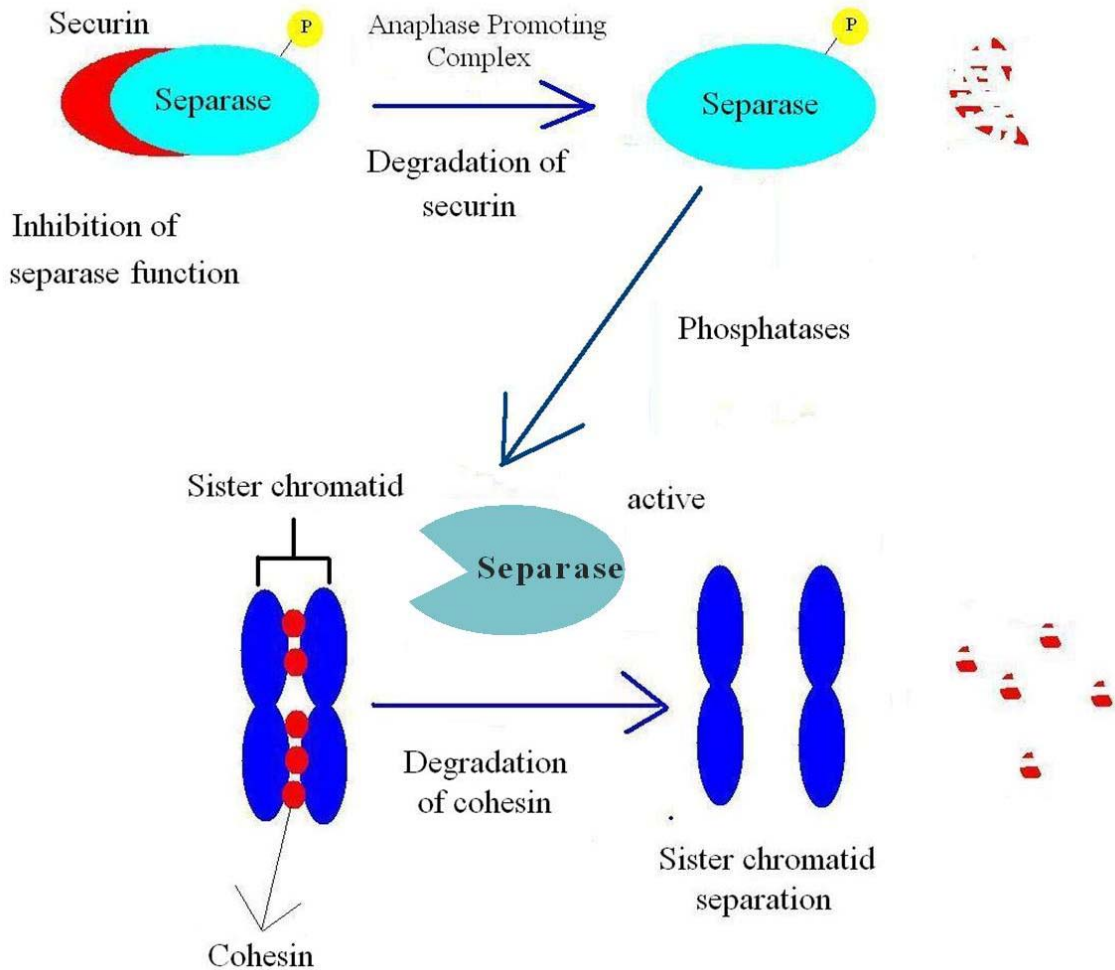


圖 1-3、Anaphase promoting complex 與 securin 的作用關係圖。

Securin除了參與調控細胞分裂的功能外，它也參與了細胞週期的進行<sup>24</sup>、DNA的修復<sup>40</sup>及維持chromosome的穩定<sup>41</sup>。在2000年Yu等人的研究中發現到securin mRNA及蛋白質的表現是隨著細胞所處的時期有所增減的，在G1/S的時候表現較小，而在S時期表現量逐漸提高，在G2/M的時期有大量的表現，而這樣的變化對於細胞週期的進程是有影響的，這也是說它亦是一個細胞週期的調控因子<sup>42</sup>。正因為securin和同源染色體的分離有關，當其過量表現時會造成細胞分裂時期之染色體分離不完全，而出現aneuploidy的狀況（分裂的細胞中有不正常的染色體數目或是染色體片段）<sup>43</sup>。

Securin除了與seperase結合而調節細胞分裂週期的功能外，securin亦會影響到DNA的修復<sup>40</sup>。其機制主要是透過securin與Ku結合蛋白質進行作用。Ku蛋白質是由Ku-70、Ku-80所構成的，再加上另一個蛋白質DNA-PKC就會形成DNA-PK<sup>44,45</sup>，而這個酵素與DNA雙股斷裂的修復有關<sup>46,47,48</sup>。而securin在此所扮演的角色則是穩定Ku，使其並不具有活性，一旦DNA有雙股斷裂的情況產生時，securin就會離開Ku，而讓Ku的活性產生，而進行DNA的修復<sup>46</sup>。（圖1-4）

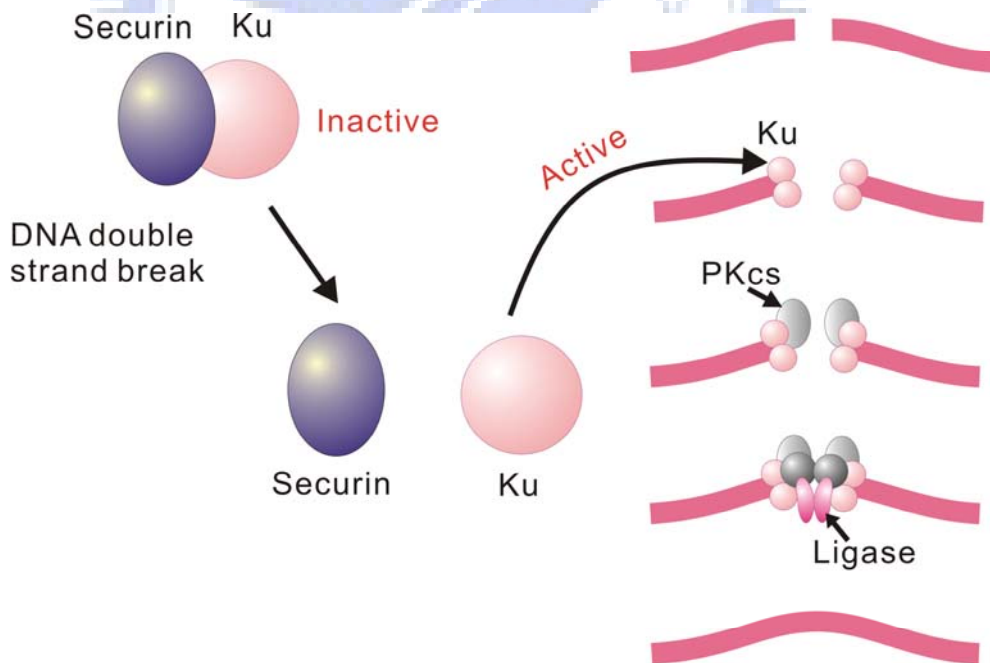


圖 1- 4、Ku protein complex 修復雙股斷裂 DNA 示意圖。

## 1-3-6、Securin 與 tumor suppressor p53 之間的關係

### (1)細胞凋亡

除了細胞週期調控與癌症的發生有關外，另外如果還有一種細胞生理機制失調的時候，同樣會造成癌症的發生，而此機制為細胞凋亡 (Apoptosis)<sup>16</sup>。Apoptosis是一種正常的細胞生理作用，用以除去一些不再需要的細胞<sup>16</sup>，此一作用指的是程序性細胞死亡。基本上就是一種細胞執行自我凋亡的方法，主要是藉由活化細胞自身的酵素來達到分解其DNA和細胞質內蛋白質的作用，最後再利用macrophage行使吞噬的功能，以便將此變性的細胞加以消化分解。因此在許多組織的生理過程中細胞分裂或細胞增生是十分普遍發生的。通常細胞增殖和細胞凋亡會達到平衡，而且受到嚴謹地調控以保證器官和組織的完整性。然而當這樣的一個平衡被打破的時候，不受管制而迅速增殖的細胞就有可能會轉變成腫瘤。就如一開始所提到的，癌症的成因非常複雜不易全盤瞭解與調控的，其中細胞凋亡相關基因的改變亦參與了這一過程。包括誘導凋亡基因如p53的失活，以及抑制凋亡基因如bcl 2等的過度表達，是癌症發生的一個重要原因<sup>16</sup>。以下就針對apoptosis作一介紹，並討論p53與apoptosis間的調控。

### (2)Apoptosis 的作用機制

目前已知道Apoptosis的作用過程可分為兩個階段，分別為initiation phase及execution phase，其中initiation phase是使caspases等酵素活化的階段，而execution phase是指因酵素的作用以致細胞死亡的階段 (圖 1-5)<sup>49</sup>。在initiation phase中，又區分為兩種路徑，分別是extrinsic pathway and intrinsic Pathway：

Extrinsic Pathway又叫做Death Receptor-Initiated pathway，因為此路徑主要是將細胞膜表面所存在的apoptotic signals的受器 (receptor) 活化，以開啟apoptosis的一個過程，而這些受器又分為數種，像是CD95/Fas及TNF-related apoptosis inducing ligand (TRAIL) 等<sup>50,51</sup>。當這些受器接受某些特殊訊息時，便可誘使其位於細胞膜內的特殊蛋白質區域 (稱為death domain) 活化，並引發一連串caspases的活化反應，即可引發apoptosis。而這些受器包括CD95/Fas<sup>50</sup>的受體，當Fas的受體因FasL的關係形成是三聚體 (trimer) 時<sup>52</sup>，會使得Fas在細胞膜下的death domains (DD) 聚合在一起。

之後，細胞內的Fas-associated death domain (FADD) 的蛋白質會與Fas上的 death domains作結合，此時FADD上一個名叫 death effector domain (DED) 的部分，會去和 pro-caspase 8 結合，當其與 pro-caspase 8 聚集在一起後，它們便會自行水解，形成活化態<sup>53</sup>。活化後的 caspase 8 可以藉由一連串的水解來促進其他的 caspases 活化 (如 caspase 9)<sup>53</sup>，從而執行 apoptosis 的指令。另外一個受體為 TNF-related apoptosis inducing ligand (TRAIL) receptor<sup>51</sup>，TRAIL 的訊息傳遞路徑和 FasL 也大致相同，不過它是透過 DR5 (death domain containing receptor) 這個受器來取代，且在 TRAIL 路徑中也沒有 FADD 的存在，簡單來說 caspase 可以直接與 DR 5 位在細胞膜內的蛋白質區域作結合，進而促使細胞 apoptosis。

而 Intrinsic Pathway 又叫做 Mitochondrial pathway：這路徑是主要是經由粒線體 (mitochondria) 來作用的，透過增加粒線體細胞膜的通透性，使得存在於 mitochondria 細胞質中的 apoptosis 前驅物質被釋放出來，而這個過程不需要透過 Extrinsic Pathway 中的那些受器 (receptor)。其主要的作用機制在於 mitochondria 的膜表面受到 Bcl-2 蛋白質的活化之後，使內部的 cytochrome C 和其他的 pro-apoptotic proteins 被釋放到細胞質中，進而引發 caspases 的活化或 apoptosome 的形成<sup>54</sup>。而 Bcl-2 family 可以區分為三個種類的蛋白質<sup>49</sup>，其中的 bcl2 及 bcl-XL 為 pro-survival 蛋白質，為一種可以對抗 apoptosis 的蛋白質，而另外的蛋白質為 pro-apoptotic 蛋白質如 Bad 或 Bax 則是促進 apoptosis，因其結構上與 bcl2 和 bcl-XL 相似，故可以影響其原本抑制 apoptosis 的功能<sup>55</sup>。最後是 pro-apoptotic 'BH3-only' protein<sup>55</sup>。而細胞對於 apoptosis 的敏感度取決於 pro-apoptotic 及 pro-survival 蛋白質之間的平衡，如果細胞內的 pro-apoptotic proteins 比較多的話，這個細胞對於 apoptosis 就會有比較高的敏感度，反之亦然<sup>49</sup>。一般來說，pro-apoptotic 蛋白質存在於細胞質中，用以感知細胞傷害或壓力的信號，一旦這些蛋白質和訊號分子結合後，它就會移到粒線體的表面，和原本就存在於 mitochondria 表面的 pro-apoptotic proteins 結合，進而在 mitochondria 的表面穿孔 (因其結構類似穿孔蛋白)，使原本存在於 mitochondrial intermembrane space 的 cytochrome C 和其他的 pro-apoptotic proteins 被釋放到細胞質中。當 cytochrome C 從 mitochondria 中滲出來之後，便會和細胞質中的 Apaf-1 (Apoptosis activating factor-1) 的蛋白質結合，這過程會使得 Apaf-1 的結構發生改變，相互形成聚合體，而這個聚合體便是所謂的 apoptosome<sup>49</sup>。



apoptosome可以讓procaspases 9 聚集在一起並活化之，而活化的caspase 9 會繼續活化下游的caspase 3、caspase 6 及caspase 7，最後造成細胞apoptosis。

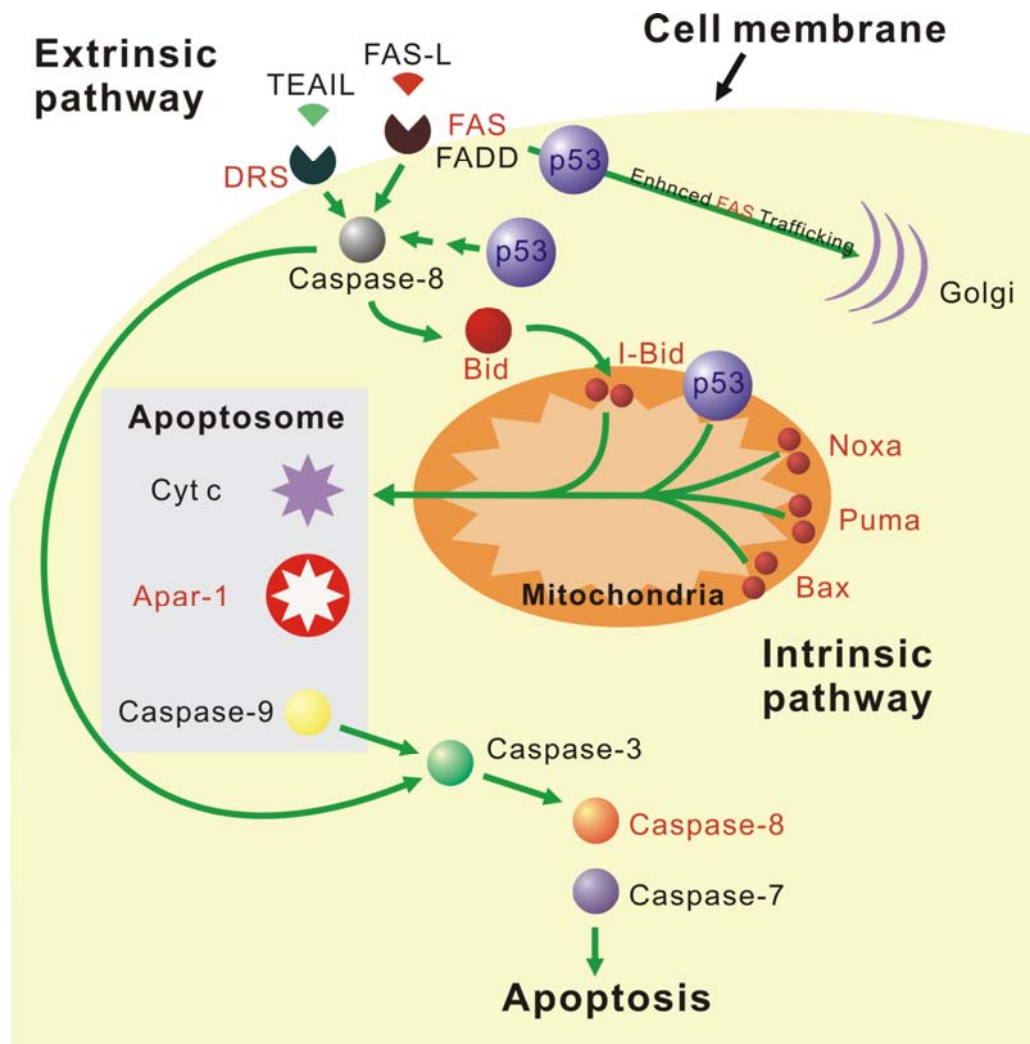


圖 1- 5、apoptosis 示意圖。

### (3) p53 參與 apoptosis

在extrinsic pathway中，p53會去影響Fas受器，主要的方式是透過誘導基因的大量表現，也因為Fas基因的大量表現，使得Fas相對來說亦會大量的出現，對於apoptotic的過程會是一個促進的效果<sup>56</sup>。而p53促進Fas基因的表現是利用其蛋白質上的DNA結合區域和Fas基因上的promoter作結合，而來促進整個基因的表現<sup>57</sup>。此外，p53還會加強Fas蛋白質從高基氏體 (Golgi) 中傳送到細胞膜上，提高Fas在細胞膜上的含量<sup>57</sup>。此外，同樣情況也出現在DR5另一個受器上，p53一樣會去影響DR5的表現<sup>51</sup>。(圖1-5)

而在intrinsic Pathway的部分，p53 會去誘導Bax基因的表現，讓整體

的Bax表現量提高，而造成apoptosis<sup>58</sup>。另外，還有PUMA，它是屬於pro-apoptotic ‘BH3-only’的蛋白質，他同樣會受到p53的影響而大量表現<sup>59</sup>。從整體來看，因為細胞受到外在因子的影響而有所損傷的時候（如DNA damage），會造成p53的大量表現。然後大量表現的p53亦會去誘導一些apoptosis相關分子的基因表現，讓細胞趨向於apoptosis的路徑而造成細胞的凋亡。

#### (4)Securin 與 p53 之間的關係

而在2000年Yu et al 等人也發現當securin大量表現的時後會抑制細胞凋亡的情況發生<sup>60</sup>，而這樣的情況他們推測可能是透過兩種方式，一種是與p53直接有關的調控，而另一種則不直接透過p53的方式<sup>60</sup>。而securin與p53之間的作用關係到目前為止仍然不清楚。早在2002年Bernal<sup>61</sup>等人與2003年Zhou等人的研究中他們發現securin可能會與p53有關聯，而影響到p53促進基因表現的活性<sup>62</sup>。目前僅瞭解大量表現的securin會透過調控c-myc蛋白質的表現來間接影響p53基因promoter的活性，進而影響p53的表現<sup>63,64</sup>。而securin與p53之間的關係，則是需加以探討，包括了securin是否與p53之間有直接的相互結合？而這樣的結合是否造成p53的功能喪失？等問題尚待探討<sup>65</sup>。

#### 1-3-7、Securin 結構

雖然現在對於securin的作用的分子機制、其他功能、結構及它造成許多癌症的原因依舊不清楚。現階段只知道它的蛋白質序列上有一些區域是與它的被分解及抑制separase有關<sup>24</sup>。基本上securin可以將其分成N-terminal及C-terminal的兩個功能區域。

在其N端最重要的功能是與securin的分解有關<sup>66,67</sup>，之前有提到securin在細胞分裂的M-phase會被anaphase promoting complex (APC) 辨識，並促使securin被分解。而在securin N端上的D box (destruction box)或稱作KEN box重複序列，因它是由三個胺基酸所組成，這個序列就是APC所辨識的位置，在一些研究中發現到如果將此一box作突變時，就會影響到其分解的效率，若是將其全部突變，則securin幾乎不會被分解<sup>68</sup>。在securin的C端有兩個PXXP重複序列，一旦發生突變會使得securin失去其transforming及transactivating的活性<sup>69,70</sup>，此外C端也是securin與separase結合的重要位置<sup>71,72</sup>（見圖1-6）。

MGRDLYDDDDKDHPFTMATLIYVD **KEN**GEPGT  
RVVAKDGLKLGSGPSIKALDGRSQVSTPRFGKT  
FDAPPALPKATRKALGTVNRATEKSVKTKGPLK  
QKQPSFSAKKMTEKTVKAKSSVPASDDAYPEIE  
KFFPFNPLDFESFDLPEEHQIAHLPLSGVPLMIL  
DEERELEKLFQLG **PPSP**VKM **PSPP**WESNLLQSP  
SSILSTLDVELPPVCCDIDI

圖 1-6 、securin 序列圖。

圖中灰底部分為 D box；黑底則為 PXXP 序列。

### 1-3-8 無特定構形蛋白質 (Disordered protein)

因為 securin 蛋白質在功能的發現上日趨亦多，而許多研究學者將其認為多功能性的蛋白質 (multiple function protein)，但是這與傳統的觀念有所出入。因為在傳統的觀念上是一種功能具有其特定的結構，若是如此多功能性的蛋白質其結構上又是如何呢？而在近年中開啟了所謂無特定構形蛋白質的研究，因為這類蛋白質被發現在獨立存在時不具有特定構形，且這類蛋白質大部分都具有多功能性，這樣的發現在結構與功能彼此之間是不可缺的傳統觀念中掀起一陣震撼。

#### (1) 無特定構形蛋白質討論

在 1959 的時候於分子生物學 (Journal Molecular Biology) 的期刊上，發表了第一個蛋白質的三維架構，而那個蛋白質為 myoglobin，是由 Kendrew 等人所解出來的<sup>73</sup>。隨著後基因體時代的來臨，人類對於基因的研究焦點，已由解碼定序轉移到由基因表現的最終產物蛋白質的身上。換言之，儘管科學家已知一基因的序列內容，但還必須進一步了解此基因的生理功能，而基因的功能又是以蛋白質的形式表現。蛋白質的功能又與其三度空間結構有很大的關聯性，因此，蛋白質的功能與結構預測方面的研究漸形重要。

然而在後基因時代，對於從轉譯蛋白質的序列來決定其功能來說，是一項極大的挑戰。而目前一般的認知都認為蛋白質的功能與其三級結構有著密切的關連<sup>4</sup>，而我們最常用鎖與鑰來形容蛋白質與其受質的關係，也就是架構在這樣的觀念下，以致運用預測及實驗的方式，來瞭解資料庫中大量蛋白質序列的結構，變成重要的事情了。然而在近代的許多實驗與研究中，逐漸發現許多基因於水溶液中並無法摺疊出良好的球形蛋白質，取

而代之的是結構鬆散，無特定結構的蛋白質。雖然對於許多蛋白質結構與功能是有高度相關性的，但是也有不少蛋白質在生理環境下是缺少固定的結構，而且這些沒有特定結構的蛋白質，在一些細胞重要的調控環節中扮演極重要的角色，也因為其結構並不固定，使得這些蛋白質在與其受質結合的時候有極大的包容性，意即可以與數種不同的受質作結合。目前已知道許多無特定結構的蛋白質與細胞週期、轉錄與轉譯的調控有關<sup>74</sup>。

而最早無特定結構蛋白質的例子為glucagon，為一個很小的多胺基酸鏈賀爾蒙，在水溶中為一random coil的結構<sup>75</sup>。陸陸續續發現許多蛋白質部分區域或是整個蛋白質是沒有特定結構<sup>74</sup>。透過分析許多蛋白質的胺基酸序列，發現到有許多的蛋白質具有部分鬆散結構，而這些結構的胺基酸序列複雜度並不高。而這樣的發現，在以結構與功能關聯為主要的研究中掀起了波瀾，並激起了對於結構無序蛋白質在生物中所扮演的角色的研究。簡單來說，結構生物學的中心教條是完整的結構與其功能是息息相關的，但隨著無特定結構蛋白質的發現，將這樣的定則打破了。雖然蛋白質的功能與其結構是相互關連的，但並不是所有的有功能的蛋白質其結構都是穩定存在的。就之前所敘的，蛋白質結構不穩定可以分成部分或是整個蛋白質的架構，而部分的蛋白質結構不穩定可以在很多的X-ray及NMR的結果中發現，而在一些蛋白質中，部分未摺疊的區域常常與生理活性有關係。以下就針對一些無特定構形與生理活性之間的關係作介紹：

### (2)無特定構形蛋白質與RNA之間的辨認

目前已知道的像是在HIV-1 Rev及BIV Tat兩個蛋白質中的RNA辨認區域是一鬆散的結構，但當其與目標基因作結合 (RRE及TAE) 的時候，會變成 $\alpha$ -helical及 $\beta$ -hairpin的結構<sup>76-79</sup>。此外，透過NMR分析的方式也發現在噬菌體中的protein N這個蛋白質在水溶液中亦是一個無次序的蛋白質<sup>80</sup>。而在一些特定的核糖體蛋白質，亦是透過與RNA結合的方式來穩定其結構<sup>81</sup>。例如在核糖體蛋白質L11- C7原本具有一個15胺基酸所形成的沒有結構及具有高度彈性的環形架構，當其與RNA結合的時候就會形成一個特定結構的蛋白質<sup>82</sup>。而這樣具有彈性的蛋白質，可能在核糖體蛋白質形成上扮演一個即為關鍵的角色。

### (3)無特定構形蛋白質與轉譯過程

mRNA轉譯成蛋白質讀真核生物質中是一個受到高度調控的過程。而在其中有一蛋白質叫做eIF4G。而eIF4G扮演的角色扮是加速核糖體的次



單元結合在mRNA的5'端，而它亦是eIF4E (m7GpppN cap binding protein，它是一個在mRNA的前端加cap的蛋白質)與the RNA helicase eIF4A之間的橋樑。而在NMR的檢測中發現eIF4G內有一98個胺基酸的區域在eIF4E不存在的時候是沒有摺疊的<sup>83</sup>。同樣透過與eIF4E的結合來讓此區域摺疊起來。在哺乳動物的細胞裡，是由三個eIF4E-binding proteins (termed 4EBPs)來調控eIF4G與eIF4E的連結，同樣透過NMR的研究發現，4E-BP1同樣是具有一個未摺疊的區域<sup>84</sup>。而這些未摺疊區域同樣透過與eIF4E結合的方式，最後形成一個兩端為一L形的延展區域而內部具有一個短 $\alpha$ -helix的結構(圖1-6)。

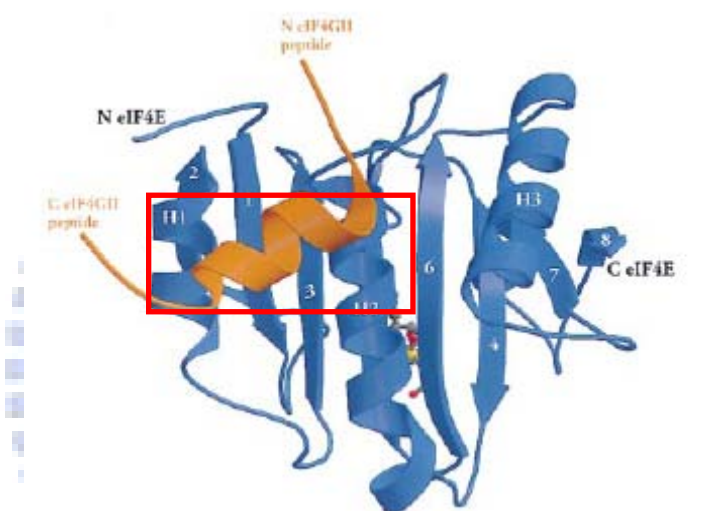


圖 1-7、4EBPs與eIF4E結合誘導 $\alpha$ -helix形成示意圖<sup>83</sup>。

圖中框框處為結合及 $\alpha$ -helix形成之處。

#### (4)細胞週期調控 (Cell cycle regulation)

除了一開始所提到的無特定結構的蛋白質在基因的轉錄、轉譯調控上具有一定的影響力，這些無特定結構的蛋白質在細胞週期的調控上亦扮演重要的角色。尤其，因為它們無特定結構，當其需要與其受質結合時可以迅速地翻轉其結構，此外當受質離開時，又可以迅速地打開其結構。而這樣的特性可以讓細胞在細胞週期的過程中，對於環境及其內部的變化具有很高的敏感度。而p21<sup>Waf1/Cip1/Sdi1</sup>就是一個很好的例子，它是在細胞週期中扮演CDK的抑制者。雖然p21已被證實了具有功能性，但是在一開始的時候，卻沒有相關文獻研究出其有特定的結構。而在1996年Peter E. Wright等人利用NMR (nuclear magnetic resonance) 及CD (circular dichroism)技術，證實了蛋白質p21沒有特定的二級結構與三級結構<sup>85</sup>，而在本實驗室之前的

研究中，透過蛋白質重新摺疊的方式及熱穩定的分析，亦證實了p21並無一個穩定的三級結構<sup>86</sup>。而這是一個相當驚人的發現，因為對於大部分的球形蛋白質來說，在水溶液中若是沒有一個特定的結構，其會形成堆積的狀態且失去功能。此外在Kriwacki等人發現Cdk2蛋白質可以造成p21的摺疊<sup>85,87</sup>，而這樣的情況讓研究者提出了一個想法，就是p21本身所具備的有彈性及無特定構形的結構，在其功能上具有很重要的地位。因為結構不穩定性讓其可以和其他不同的成分作結合<sup>88</sup>。

#### (5) 誘導摺疊在分子辨識及訊息傳導上的生物特性

某些生物機能，例如酵素的催化，免疫上的辨識或者細胞receptor的分子區別，在蛋白質的結構要求上是絕對地要求精準的<sup>89</sup>。相對的在訊息傳導上，只要簡單的一段序列或是二級結構就可以很輕易達到傳遞的效果。然而無特定結構的蛋白質可以透過誘導摺疊的方式提供生物許多重要的優勢在訊息傳導及調控上。如前所述，因為天生無特定結構的蛋白質，在結構上就是具有彈性，容易因應環境來改變其構形，如此一來就可以讓一個蛋白質辨識許多其他的生物目標。如同p21<sup>Waf1/Cip1/Sdi1</sup>可以抑制多數cyclin-Cdk的複合體<sup>85</sup>。如此一來，無特定結構的蛋白質好像在辨識的專一性上並不是非常的高，但在1994年 Spolar & Record<sup>90</sup>的研究中提到了這樣的情形，即無特定結構蛋白質與其受質結合是透過摺疊過渡的狀態來達到分子的辨識機制，因為無特定結構的蛋白質在和受質結合後一樣要從無特定結構的狀態形成特定的結構，所以在形成特定結構的過渡狀態時，一些比較特定的小區域結構就會形成，而這些結構即可達到辨識的效果。

#### (6) 未摺疊蛋白質與securin之間的關係

而在Nuria<sup>91</sup>等人在2005所發表的論文中他們也提到了的structure-function paradigm的概念<sup>92</sup>，這個概念就是由無特定結構蛋白質而來的，就是說一般在生物化學的領域中都認為結構與功能彼此之間是不可缺的，換句話說結構與其功能有很大的關聯性，但是在近年來的研究中發現到有許多的蛋白質在它有功能的狀態下的時候，其並不具有特定的結構，而這樣的特性對蛋白質來說有不少的好處，像是可與很多種的target作結合，因為他的結構具有很大彈性。此外還可以降低蛋白質結合時候的立體障礙<sup>93</sup>。而它們認為securin亦是屬於unfolded的蛋白質，因為在之前的研究發現securin具有很多不同的功能，而這對一個結構穩定的蛋白質來說似乎是個不太可能發生的事，除了是很多蛋白質形成的複合體，才能具有

很多的功能。他們透過one-step摺疊方式，來研究securin的結構，而所得到的結果是它們認為securin是一個native unfolded protein<sup>91</sup>。

然而在 one-step 直接稀釋法中，其摺疊效率皆會隨著蛋白質的濃度增加而大幅降低此外，由於是直接稀釋，最後得到的蛋白質濃度會非常的低，這樣對後續的實驗有著一定程度的影響。且在許多的蛋白質摺疊研究中也發現蛋白質的摺疊需要一定的時間，就以 one-step 的摺疊方式來說，可能無法給予蛋白質足夠的摺疊時間。因為本實驗室於之前的蛋白質摺疊的研究中，已經成功的建立一套蛋白質重新摺疊的系統，於此我們想利用這套成功的摺疊系統來重新摺疊 securin 這個蛋白質，以期能夠瞭解它在重新摺疊的過程中一些結構的變化，以及 securin 在 native state 的狀態下是否真的為一 disordered 蛋白質。此外因 securin 與許多的癌症形成有關，加上有研究發現它和 p53 這個抑癌蛋白質之間有關聯所以我們也利用 far western 的技術來分析它和 p53 之間是否存在一個直接的連結，而這樣的連結可能會影響到 p53 的功能。



## 第二章、實驗原理

在蛋白質的結構與功能分析上，最重要的部分就是蛋白質樣品的取得，而因為生物科技的進步，利用基因重組的方式來生產蛋白質已經是非常普遍的方式，而本實驗中就是利用這樣的方式來生產大量的蛋白質。並透過本實驗室的準靜態熱平衡透析法 (quasi-static thermal equilibrium dialysis) 將蛋白質進行重新摺疊<sup>1,5,6,7,8</sup>。並透過圓二色旋光光譜儀 (CD) 的分析來瞭解摺疊過程中蛋白質的結構變化，及二級結構的比例，並加上動態光散射儀 (DLS) 的分析來瞭解蛋白質在摺疊過程中，分子大小的變化。並且為了更進一步瞭解重新摺疊的蛋白質在結構上的熱穩定性，我們還採用了微溫差掃描熱卡路里計 (DSC) 來測量蛋白質的相變溫度與能量。最後透過far western的技術，我們可以去偵測蛋白質之間的是否存在著直接的交互作用。以下分別介紹各個實驗方法的原理：

### 2-1 蛋白質 securin 的製備

近年來生物科技和基因重組技術的進步，使我們能將重組之基因送進微生物細胞內，利用微生物來大量製造，再加以純化分離出我們所需要的基因重組蛋白質<sup>3</sup>。而由於我們將基因重組蛋白質在細胞內大量的表現，容易造成此一蛋白質在細胞內形成不具活性的內涵體 (inclusion body)<sup>94</sup>。

本實驗是將securin基因構築到大腸桿菌 (*E. coli*) 的表現系統 BL21(DE3)中，由大腸桿菌大量表現securin蛋白質。利用BL21(DE3)菌株大量複製帶有securin基因片段的pET200質體，並在37°C環境下以IPTG引發大腸桿菌大量表現securin蛋白質，最後形成內涵體 (inclusion body)。待細菌培養適當時間之後再用物理性破壞方式來把細胞打碎以得到所需要的蛋白質。利用誘導大腸桿菌產生蛋白質內涵體的優點有：(1) 細菌生長快速。(2) 蛋白質產量極高。(3) 蛋白的純度也相對較高。

### 2-2 蛋白質摺疊

因由細菌內涵體所得到的蛋白質為不具有功能的結構，因蛋白質是形成錯誤的摺疊 (misfolding)，且分子間是相互堆疊的<sup>1</sup>。而一般而言蛋白質的結構決定了其生理上的活性表現<sup>95</sup>，這些內涵體內的蛋白質純度雖高但並不具有功能性，因此還是需要利用摺疊的方法讓這些蛋白質能在實驗室中摺疊至正常的結構。首先為了要讓蛋白質摺疊恢復活性，要將沒有活性



的內涵體以變性劑溶解。而這個過程我們稱為「變性」(denaturation)，這類變性劑主要是破壞維持蛋白質三級結構的疏水作用力及穩定二級結構的氫鍵作用力等<sup>96</sup>。透過變性劑的作用，蛋白質回到只有一級結構胜肽鏈，在此狀態下蛋白質並無生物活性及特定的三級結構。

在經過蛋白質變性這個步驟之後，我們要將蛋白質從未摺疊的狀態(unfolding)摺疊到自然態(native state)，透過將變性劑的濃度逐漸降低，到最後甚至移除，讓原本破壞蛋白質分子間作用力漸漸消失，使蛋白質重新自我排列、組織，而這樣的一個過程就稱之為蛋白質的「再摺疊」(refolding)。而將蛋白質重新摺疊的方式有分成很多種，包括直接稀釋法(direct dilution)、透析法(dialysis)、分子大小排阻層析(size-exclusion chromatograph)等。一般來說在摺疊的過程中，蛋白質的濃度對其重新摺疊過程來說有一定的影響，當蛋白質濃度過高時，會使原本在胜肽鏈間的疏水性殘基區域容易互相作用形成錯誤的摺疊，且聚集在一起形成聚集體(aggregosome)<sup>2</sup>。因此通常在摺疊蛋白質時最直接的方式就是降低蛋白質濃度，但蛋白質濃度的降低，對我們之後進行一些分析的實驗上來說，並不是非常有利。為了避免此問題，本實驗採用準靜態熱平衡透析法(quasi-static thermal equilibrium dialysis)來將蛋白質摺疊<sup>5</sup>。這是一種能將高濃度的蛋白質摺疊的方法，以此可獲得高活性、高濃度、和高回收率的蛋白質<sup>5</sup>。

本實驗的目的是想要瞭解蛋白質在摺疊過程中的結構變化，故我們把各階段的摺疊中間體(intermediates)<sup>97</sup>取出來來比較其間之差異，這也是本實驗利用階段性溶液控制透析法進行蛋白質摺疊的主因。基本上蛋白質摺疊至具有生物活性的自然結構(native state)，從熱力學的角度來看，蛋白質摺疊是從高構形轉變能量趨向低構形能量的過程，當蛋白質摺疊至其自然結構時，其蛋白質構形能量是處於相對最低的狀態。故不論是直接稀釋<sup>66</sup>和階段性熱平衡透析法<sup>98</sup>，其目的都是要將變性劑移除，讓破壞蛋白質結構的因素逐漸消除，使其能逐漸摺疊至其最低構形能量態。在此介紹本實驗主要使用到的摺疊方式，準靜態熱平衡透析法(quasi-static thermal equilibrium dialysis)：

此方法顧名思義主要是利用逐步透析的方式來降低變性劑的濃度到完全移除。其中為了避免蛋白質因周圍環境劇烈的改變而造成摺疊上的錯誤或是聚集沉澱，所以採用逐步的透析方式，來降低緩衝溶液中的變性劑濃

度或離子濃度。因為當環境的改變相當微小的時候，可以說摺疊過程中每一個階段都是符合準靜熱力學平衡。故最後當變性劑漸漸的移除後，蛋白質因其自組織的能力，而自發性 (spontaneous) 的摺疊形成其自然結構<sup>5</sup>。如前面所言的，在本方法的透析過程中，每一個階段都是遵守準靜熱力學平衡原理，蛋白質的構形能量會很快達到能量最低態 (local minima)，所以在階段性熱平衡透析法的過程中，能量改變是連續性的，持續的改變反應位能，最後達到自然結構的能量，不會因環境劇烈的變化造成結構急速的改變而形成錯誤的摺疊<sup>5</sup>。

### 2-3 圓二色旋光光譜儀 (Circular Dichroism: CD)

如前面所提到的，本實驗主要的目的是要瞭解蛋白質在摺疊過程中其結構的變化，而圓二色旋光光譜儀 (Circular Dichroism spectrometer) 就是一個很重要的實驗工具<sup>99</sup>。因為圓二色旋光光譜儀主要是用以測量蛋白質的二級結構，透過瞭解二級結構的分佈比例就可探討蛋白質二級結構在摺疊過程中的改變。

因為組成蛋白質的胺基酸分子大部分都具有光學活性。從胺基酸的結構來看，其是一個四面體的形狀，其四個角都帶有不同的基團，因各個基團的排列在空間中有所不同會形成兩種不同的構形的胺基酸，一般來說我們都稱這樣不同的構形為鏡像異構物 (enantiomer)，或是生物分子的手性 (chirality)<sup>100</sup>。而這類分子光學活性的來源是由於能產生左旋或右旋偏極光，一般能將產生左旋偏極光稱為左旋異構物 (levorotatory isomer, L-form)；而能產生右旋偏極光的則為右旋異構物 (dextrorotatory isomer, D-form)<sup>101</sup>。也因胺基酸擁有光學活性，所以胺基酸組成之蛋白質之立體結構同樣也具有光學活性，其中又以當中二級結構的光學活性更具特徵性。一圓形入射光可想像為左右旋光向量之合，當通過蛋白質時，將會吸收與電子雲方向相同之電場，而使入射光產生偏向，最後變為橢圓偏極光。

透過所產生連續的左旋與右旋光，當其穿過蛋白質樣本時，其原本的右旋或左旋光被吸收後，其吸收值經由訊號接收器讀出，而圓二色旋光光譜儀就是透過計算左旋偏極光 (LCPL) 與右旋偏極光之差異 (RCPL) 吸收來得到一個特徵吸收圖形。

以  $\alpha$ -helix 與  $\beta$ -sheet 之多胜鏈為例，以往的研究中發現，典型的  $\alpha$ -helix 在 222nm、208nm 擁有兩個負的譜帶，而在 192nm 左右會產生一正的譜帶；

至於  $\beta$ -sheet 在 210nm、222nm 也會有兩個負的譜帶，此外在 195nm 有一正的譜帶；其他像是 turn 的結構是在 190nm 有一負譜帶，208nm 左右產生一正的譜帶<sup>22</sup>。

## 2-4 螢光光譜 (Fluorescence Spectroscopy)

光物質是一受到特定能量的光源激發後，可以產生低於原本能量光源的光（此光就稱為螢光）的物質。在平常的狀況下，這些螢光物質的電子會處在最低能量的狀態，稱為基態。當分子吸收了與它所具有的特徵頻率一致的特定光源時，其電子便由基態躍遷至能量較高的激發態（此激發態又依能量的高低區分為各階的激發態）。經過一段時間，處於不同能階激發態的電子會降至最低能量的激發態，在這一過程中所消耗的能量，並不以光的形式釋放，這是因為這些螢光分子會和周圍的同類分子或其他分子撞擊而將能量散失掉。當降至最低能量激發態的電子又下降至基態時，此時會以光的形式釋放出多餘的能量，所產生的光即是螢光。這也是為何螢光的能量會比原本激發光源的能量來得低的原因。

而一般而言蛋白質也是螢光物質，因為在大部分的蛋白質中都具有芳香族的胺基酸，分別是酪胺酸 (tyrosine)、色胺酸 (tryptophan) 和苯丙胺酸 (phenylalanine)，這些芳香族的胺基酸是一種螢光發色團 (fluorophore)。而這些螢光基團的螢光光譜對其四周環境的改變十分敏感，當蛋白質的立體結構出現變化時會影響其螢光光譜，當螢光基團在蛋白質中被其他胺基酸基團所包覆而遠離水相時其螢光光譜會有所謂的藍位移 (blue shift)；而螢光基團是暴露在水相時，其螢光最強波長則會向紅光移動，稱為紅位移 (red shift)<sup>102</sup>。此外螢光強度也是一種蛋白質結構穩定的一種特徵，當蛋白質結構穩定時，其螢光基團的共振結構也是比較穩定的，故其螢光強度也會相對比較高，若是結構較為鬆散，其共振結構也會不穩定，如此一來螢光的強度會跟著變弱。而透過螢光光譜來分析我們的摺疊中間物可以瞭解蛋白質在摺疊過程中一些結構的變化及其結構的穩定性。

## 2-5 微溫差掃描熱卡路里計 (Differential Scanning Calorimetry: DSC)

除了透過圓二色旋光光譜儀及螢光來瞭解蛋白質摺疊過程中的結構變

化，我們還可以利用微溫差掃描熱卡路里計 (DSC) 來分析蛋白質在摺疊過程中的結構穩定性<sup>103</sup>。基本上蛋白質摺疊是一種由高能往低能的過程，因此當蛋白質摺疊愈接近自然結構時，其結構對於熱的穩定性會相對提高，而這也是我們利用微溫差掃描熱卡路里計 (DSC) 的原因，因為微溫差掃描熱卡路里計 (DSC) 是透過加熱的方式來使蛋白質變性藉此來觀察其三級結構的穩定性<sup>103</sup>。因為透過加熱的方式使蛋白質變性會讓蛋白質產生所謂的結構相變，而觀察結構相變最直接的方式就是量測比熱的變化，而微溫差掃描熱卡路里計 (DSC) 能夠提供穩定的熱源，以溫度為變數來量測樣品吸熱與放熱的情形，藉由吸放熱的改變來觀察樣品比熱的改變並了解其相變的溫度。而本試驗中所使用的DSC使屬於熱補償式的熱卡計，一個熱卡計的基本原型是具有一個樣品端及另一個參考端的測量槽，其外包覆有熱電偶來量測兩端的溫度，藉此轉換成電訊號，而熱補償式的DSC是以保持樣品端及參考端溫度相同為其儀器操作的原則，所以當樣品端的能量有所變化時，儀器為達到兩端的溫度相同而需要額外去供給的熱量，而這額外所提供的能量最後就等於樣品端的能量。

## 2-6 動態光散射儀 (Dynamic Light Scattering: DLS) :

DLS 主要是用於分析溶液中粒子大小的分佈情形。當我們利用雷射光射入含有粒子的溶液中 (如蛋白質溶液)，雷射光撞擊到溶液中的粒子後會產生散射光，而散射光會隨時間產生變化，而透過量測散射光而可以計算出粒子之粒徑分佈。由於粒子處於溶液中，本身具有動能而產生不規則的擴散運動 (Diffusion motion)，此外粒子的大小亦會影響粒子之擴散速度與布朗運動，加上雷射光照射的區域粒子數量和位置不同。使得訊號到達偵測器時會產生光程差，產生干涉影響光線強度，因粒子位置會隨時間改變，因此散射光亦會隨時間改變。而透過這樣的變化，可以得到所謂的擴散係數，而根據 Stokes-Einstein 方程式：

$$D = \frac{kT}{6\pi\eta R}$$

$D$  是擴散係數， $k$  是波茲曼常數， $T$  是絕對溫度， $\eta$  為溶液之黏滯係數， $R$  為水合半徑。我們就可測量到在溶液中蛋白質的粒徑大小。



## 第三章、實驗方法

### 3-1 Securin 基因之選殖

#### (1) Securin 基因引子 (primers) 的設計

依照NCBI(National Center for Biotechnology Information)的基因資料庫中所發表的Homo sapiens pituitary tumor-transforming 1 的基因序列<sup>25</sup>，設計 5'端 (Forward) 及 3'端 (Reverse) 的 primer，其分別如下：

Forward primer: 5'-CATATGGCTACTCTGATCTATGTT-3'

Reverse primer: 5'-ATTTAAATATCTATGTCACAGCA-3'

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

PCR 的反應物包括 1.0 uL 的 cDNA (small cell lung cancer cDNA library)、1.0 uL 的 forward primer (10 $\mu$ M)、1.0 uL 的 reverse primer (10 $\mu$ M)、5 uL 的 10x pfx enzyme buffer、1uL 的 10 $\mu$ M dNTP 及 1 $\mu$ L 的 pfx enzyme(Invitrogen Corporation)，最後以無菌水加至體積為 50 uL。而 PCR 條件設定如下：

1. Pre-Heat: 於 95 $^{\circ}$ C 下，一分鐘。
2. Denaturing: 95 $^{\circ}$ C 下，三十秒。
3. Annealing: 50 $^{\circ}$ C，三十秒。
4. Extension: 72 $^{\circ}$ C，三十五秒。

將上述步驟進行 30 循環，最後再以 72 $^{\circ}$ C 四分鐘進行 final extension。

#### (3) 結合作用 (Ligation)

本實驗室使用 Champion. pET Directional TOPO<sup>®</sup> Expression Kits，將 pET200 vector 及純化之後的 PCR 產物以 1:2 的比例混合，最後加入無菌水反應體積為 5 $\mu$ L，於 4 $^{\circ}$ C 下反應 12 小時，進行 ligation。

#### (4) *E. coli* 勝任細胞 (competent cell) 的製備

本實驗的勝任細胞是利用化學法的方式來製備的。首先挑取單一 *E. coli* 菌落接種於 LB 培養液於 37 $^{\circ}$ C 隔夜活化 (refresh) 後，取 1mL 活化之菌液於 50 mL LB 中，同在於 37 $^{\circ}$ C 中培養，之後測定 OD<sub>660</sub> 的吸光值來瞭解細菌的生長狀況，當吸光值達到 0.4 時將菌液冰浴 10 分鐘，再以 3000rpm、4 $^{\circ}$ C 下離心 10 分鐘，將上清液去除並把沈澱菌體 (pellet) 懸浮於 10ml 100 mM 的 CaCl<sub>2</sub>，再以 2500rpm、4 $^{\circ}$ C 下離心 5 分鐘。最後同樣再以 10 ml 100 mM 的 CaCl<sub>2</sub>

溶解之前離心所形成的沈澱菌體並冰浴30分鐘，最後用2500rpm、4°C離心5分鐘，最後去除上清液後以50% glycerol懸浮菌液以液態氮冷凍之後，置於-80°C下保存。

#### **(5)質體轉殖 (transformaiton) 至 *E. coli* BL21(DE3)**

本實驗中是透過Heat-shock的方式來進行質體轉殖。先取100 uL製備好的勝任細胞加入4 uL的重組質體DNA，冰上冰浴15秒後於42°C下heat shock一分鐘後立刻冰浴5分鐘。最後取適量的混合物塗抹於含有抗生素(kanamysine, 20ug/mL)的LB plate，於37°C培養16~24小時。

#### **(6)重組securin基因鑑定**

本實驗中所建構好的securin表現載體，一方面透過DNA定序的方式，由ABI 3730XL DNA Analyzer機器來確定securin基因的完整性。另一方面還利用PCR的方式來鑑定securin基因的方向性，而聚合酶連鎖反應其條件如先前所述，不過將引子的部分換成T7 forward primer而reverse primer為securin設計好的reverse primer，最後PCR結果利用1% TBE DNA電泳鑑定。將確定有接上securin基因的菌株製備成儲存菌株 (stock)，以利之後的大量養菌。此外，我們還委託明欣生技公司利用ABI 3730XL DNA Analyzer，利用T7 forward primer針對securin基因進行定序。

#### **(7)重組securin之大量生產**

本實驗室透過IPTG誘導的方式來表現大量蛋白質將之前製備好的儲存菌株 (stock)，取出適當體積加入3ml含有抗生素 (Kanamysine, 20g/ml)的LB中，於37°C震盪培養隔夜，使菌株活化。接著於活化的菌株中取出250µl加入含有250ml LB的培養錐形瓶中，同樣在37°C中震盪培養4小時，之後加入IPTG (最終濃度為1mM) 再繼續培養16小時。將培養好之菌液以10000 rpm,於4°C下離心10分鐘得到沈澱的菌體，將菌體以1ml去離子水溶解。將溶解所得到之菌液放入破菌機 (constant cell disruption systems) 中，以壓力30kpsi進行破菌。將破菌後之溶液以10000 rpm,於4°C下離心10分鐘，得到上層液體及不溶水的包含體 (inclusion body) 所形成之沈澱物。把沈澱物以去離子水溶解後，在10000 rpm 4°C下離心5分鐘，重複此步驟數次把沈澱物中雜質清洗乾淨。最後取適量的上清液及沈澱物進行SDS-PAGE分析。

### 3-2 Securin 蛋白質的重新摺疊

因為本實驗一開始所得到的蛋白質是存在於包含體內，而在包含體內，蛋白質是相互堆疊而失去結構與功能的，而為了得到有功能的蛋白質我們必須使蛋白質重新摺疊。而首先是要將蛋白質變性，然後逐步的將變性劑移除，讓蛋白質摺疊至自然結構，再從中取得我們實驗所需的樣品。

#### (1) 蛋白質變性 (denature)

第一步就是要讓蛋白質變性，本實驗當中所使用的變性緩衝溶液 (Denature Buffer)，包含有 4.5M 的尿素 (Urea) 用來破壞蛋白質內氫鍵與疏水作用力等，一些非共價鍵結力；0.1M 的二硫代蘇糖醇 (D.T.T) 是一種還原劑，可以將一些強共價鍵結力完全破壞掉，如蛋白質中含有硫的胺基酸 (半胱胺酸) 之間容易形成的雙硫鍵結。而一般常用為緩衝溶液的有磷酸 (phosphate) 與 Tris，磷酸為酸性的緩衝液，而 Tris 則是鹼性的緩衝液。本實驗的 securin 蛋白質，是在鹼性環境 Tris buffer 下進行摺疊。除了變性劑和還原劑之外，還有加入 0.1% 的甘露醇 (Mannitol) 和 0.5 $\mu$ M 的 Pefabloc，這兩種藥劑的功能主要是用來保護在水溶液中的蛋白質。甘露醇能保護蛋白質的側鏈分子，避免在高度氧化、還原的環境下發生一些修飾 (modify) 作用。而 Pefabloc 是一種可抑制蛋白質分解酶的化合物 (synthetic protease inhibitors)，也就是能避免蛋白質被分解。它能和蛋白質分解酶產生不可逆的共價鍵結，使分解酶失去活性，就無法分解蛋白質。因此在摺疊的過程中，都會加入 Pefabloc 來保護蛋白質不會被分解。另外，低濃度 (0.1mM) 的二硫代蘇糖醇 (D.T.T) 可以當做抗氧化劑，其作用和甘油 (glycerol) 相似。

#### (2) 準靜態熱平衡透析法 (Quasi-static thermal equilibrium dialysis)

如同之前所述，本實驗中為了避免蛋白質因環境劇烈的變化而發生摺疊錯誤，而使用透析法使蛋白質周遭環境逐步的改變。將溶在變性緩衝溶液裡的蛋白質放在半透膜內，再將此半透膜置於 2.5L 的摺疊緩衝溶液 (Refolding Buffer) 中。利用半透膜的特性，慢慢的將變性緩衝溶液內，高濃度的變性劑及還原劑擴散到外面低濃度的摺疊緩衝溶液中，使膜內變性劑及還原劑濃度降低，讓蛋白質順利的進行摺疊。而本實驗中的階段摺疊依序分成五個部分，透過 5 種摺疊緩衝溶液來進行摺疊，讓蛋白質的環境緩慢的改變到接近自然態的環境。而五個階段中，先以三階段將變性劑

尿素移除，從 4.5M 依次減為 2M、1M，然後移除，而還原劑 DTT 則從重新摺疊開始就降為 0.1mM 當作保護劑，而在摺疊最後兩階段的時候將摺疊緩衝液的 pH 值調至接近中性，而在最後一個階段移除保護劑 Mannitol，使環境接近自然狀態，讓蛋白質能摺疊至自然結構。而在每個階段，蛋白質都會形成一較穩定的摺疊中間體 (folding intermediates) 的結構，本實驗中會將這些摺疊中間體收集起來，進行一些分析包括測量其結構和熱穩定度，比較各個樣品之間的差異。

### 3-3 圓二色旋光光譜儀 (CD)

本實驗 CD 測量使用型號 JASCO-815 旋光光譜儀。而進行圓二色旋光光譜儀測量時樣品的濃度會影響 CD 光譜的訊號，所以要先將蛋白質稀釋，此外因為 CD 為光學測量儀器，所以各個樣品間的濃度差異也會影響到測量結果，故在測量前需將各個樣品的濃度稀釋至相同的狀態。取稀釋好的樣品 250 $\mu$ l 加入 1mm 寬的 CD cell 中，實驗的參數設定為：wavelength range：260~190nm；scan speed：100nm/min；Accumulation：10 次；step resolution：0.2nm；band width：1nm；response：2 seconds。而在進行 CD 測量實驗中是要注意的是燈壓 (high tension, HT) 的訊號，燈壓的高低會影響樣品吸收偏極光的程度，當樣品的濃度過高或溶劑的極性很強時，對偏極光的吸收將相對的提高許多。所以在實驗過程中必須隨時注意燈壓的變化，當燈壓訊號超過 800 時，得到的圖譜是不可信的，應立即停止實驗並重新調整參數。最後實驗得到的結果為 mean residue weight ellipticity  $[\theta]_{MRW}$  (單位：deg $\cdot$ cm<sup>2</sup> $\cdot$ dmole<sup>-1</sup>/residues)<sup>104</sup>，並使用 SELCON3<sup>82</sup> 程式進一步分析蛋白質二級結構的比例。

### 3-4 動態光散射儀 (Dynamics light scattering: DLS)

本實驗所使用的為 Brookhaven Instruments Corporation 型號 BI-200SM 的 DLS。透過 DLS 的分析我們可以瞭解摺疊中間體的分子大小分布狀況，而蛋白質樣品的準備是由同樣狀態的復性溶液稀釋至適當濃度，吸取 2mL 的樣品置放於透明試管中；而動態光散射儀裝備了氬離子雷射 (波長 4880 $\text{\AA}$ )，訊號接受器則由側角器固定於 90 $^\circ$ 角；腔體內溫度由循環水槽控制在 20 $^\circ$ C，最後將試管至於儀器的樣品槽中，即可透過儀器的軟體進行粒徑大小的偵測。



### 3-5 微溫差掃描熱卡路里計 (Differential Scanning Calorimetry : DSC)

本實驗中所使用的是 CSC 公司的 N-DSC II 來測量樣品的熱穩定度，此機型為熱補償式的 DSC。此機型主要是測量生物樣品，當中以兩個 Pt 材質的 cell 分為樣品端 (sample) 與參考端 (reference)。另外，cell 上方有恆壓器可用於加壓，可以增加壓力提高液體的沸點，防止溶液沸騰氣化。此 DSC 測量的溫度範圍從  $-10^{\circ}\text{C}$  到  $130^{\circ}\text{C}$ ；升溫度速率可從  $0.125^{\circ}\text{C}/\text{min}$  到  $2^{\circ}\text{C}/\text{min}$ ；cell 容量為  $0.33\text{ml}$ ；靈敏感為  $1\ \mu\text{cal}$ 。在進行 DSC 測量之前，所有樣品都需要經過去除氣泡的步驟，因樣品中存在有氣泡時，氣泡的移動、破裂都會影響實驗的結果。我們使用抽真空的方法將氣泡抽出，再使用超音波洗淨機 (supersonic cleaner) 將氣泡震出，確保去除樣品的氣泡。我們實驗的參數使用：溫度從  $10^{\circ}\text{C}$  到  $90^{\circ}\text{C}$ ；升溫速度  $0.5^{\circ}\text{C}/\text{min}$ ；壓力為  $4\ \text{atm}$ 。

### 3-6 Far Western

基本上的操作方式與一般的西方點墨法 (western blot) 相似，將想要測試的樣品 (本實驗為 p53 蛋白質及 securin 蛋白質) 以 SDS-PAGE 依分子量分離之後，透過轉漬的方式將膠片上的蛋白質移到 PVDF 膜上，之後使用 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。接下來依序按照前面實驗步驟所題的摺疊緩衝液 (Refolding buffer, R1、R2、R3、R4、R5) 浸泡，進行膜上的蛋白質摺疊。再將欲進行接合反應測定的蛋白質 (本實驗為 securin 及 p53) 加進緩衝液中進行雜合 (hybridization)，接下來以具專一性的一抗、二抗去辨認特定的蛋白質序列。若液中的蛋白質可以和 PVDF 膜上的蛋白質結合的話，則會在該位置成像。

## 第四章、實驗結果

### 4-1 Securin 基因鑑定

除了在 securin 選殖過程中我們利用了 PCR (polymerase chain reaction) 的方式來確定 securin 基因是否有存在質體當中及其基因的方向性，這裡我們利用 T7 forward primer 及 securin reverse primer 及質體當作模版 (template) 來進行 PCR，由於 T7 forward primer 可以辨識質體上的 T7 promoter，而 securin reverse primer 則可辨識 securin 基因末端的序列，而我們預期如果有選殖成功的話，可以得到一段長度大約為 600 bp 附近的 DNA 片段，若是 securin 基因的方向性是錯誤的，則我們無法得到長度達到 600 bp 的 DNA 片段。而 DNA 電泳的分析 (1.5% agarose gel) 證實我們的確選殖到正確方向性的基因 (圖 4-1)。此外我們還利用 DNA 定序的方式來確定我們所選殖到的基因為 securin，和其序列中是否有突變的發生。以下是定序與序列比對的結果 (圖 4-2、圖 4-3)，定序是透過 ABI 3730XL DNA Analyzer 機器，序列比對是利用 NCBI (National Center for Biotechnology Information) 的 BLAST 功能。而從比對的結果來看，我們所選殖到的基因的確是 securin 且其基因上並沒有出現突變。

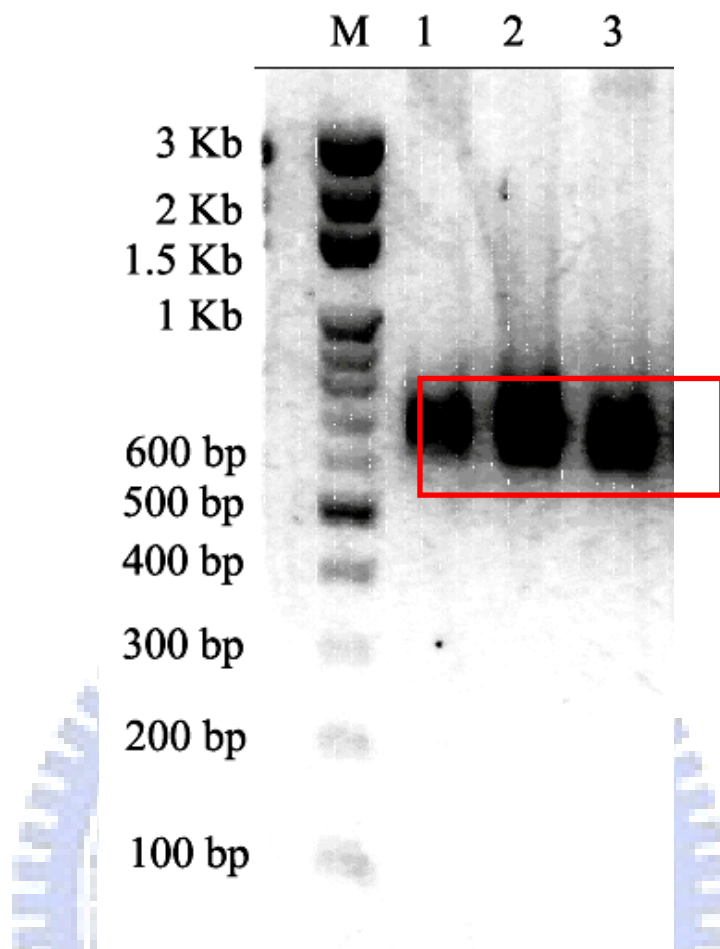


圖 4- 1、pET200 securin 質體 PCR 鑑定結果圖

圖中 marker 為 100bp ladder 的 marker；1、2、3 為分別挑選出來得菌落號碼。紅框則為 PCR 所得之 DNA 片段，圖中可以發現到所得到之 DNA 片段大約在 600~700bp 附近，符合我們實驗一開始所預期。DNA 電泳使用 1.5 % agaros gel 及 0.5x TBE buffer。

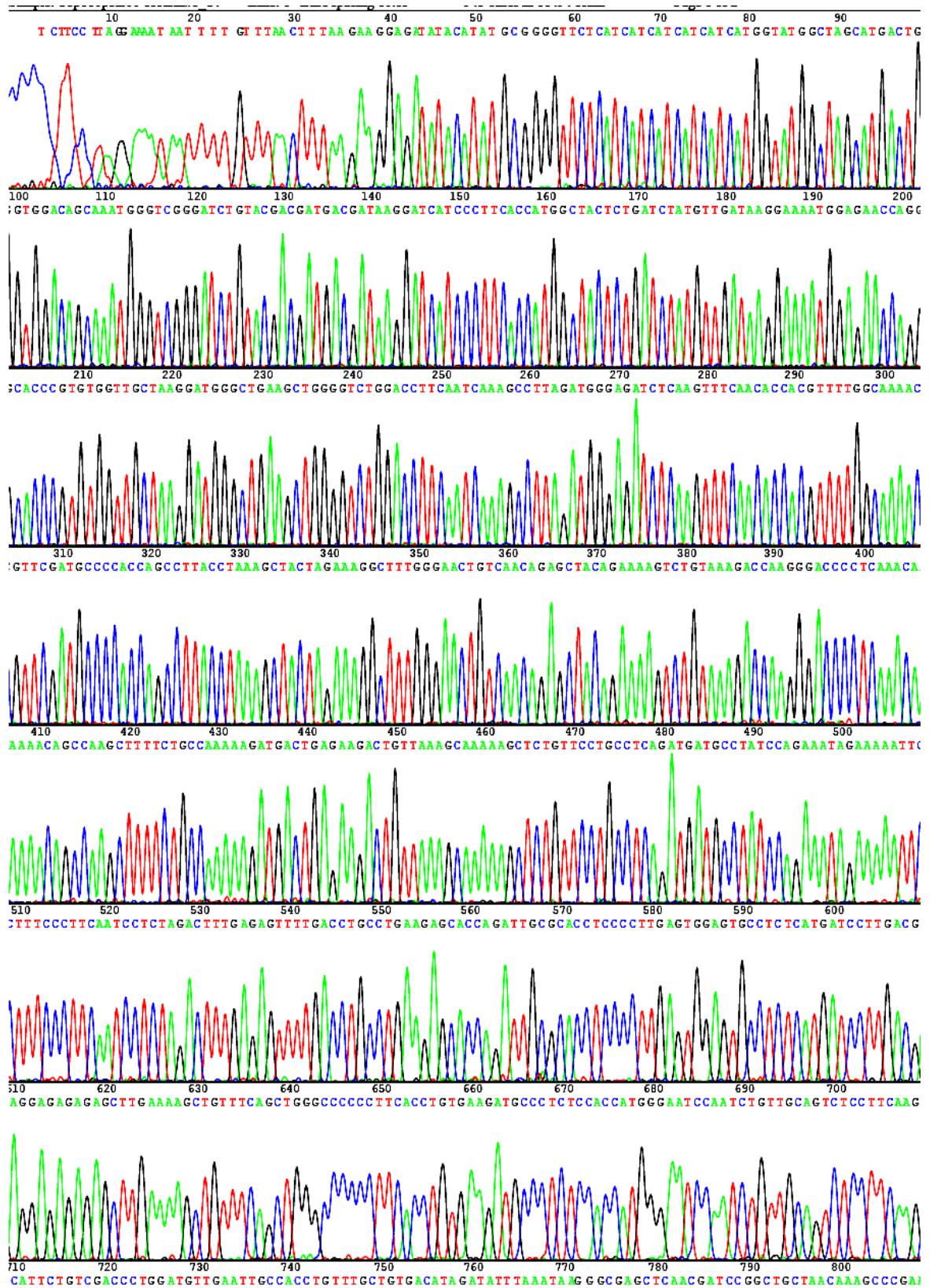


圖 4- 2、 securin 基因 DNA 定序圖



## Homo sapiens pituitary tumor-transforming 1 (PTTG1)

Identities =100%

Strand=Plus/Plus

```
Query 1 ATGGCTACTCTGATCTATGTTGATAAGGAAAATGGAGAACCAGGCACCCGTGTGGTTGCT 60
      ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct 46 ATGGCTACTCTGATCTATGTTGATAAGGAAAATGGAGAACCAGGCACCCGTGTGGTTGCT 105
Query 61 AAGGATGGGCTGAAGCTGGGGTCTGGACCTTCAATCAAAGCCTTAGATGGGAGATCTCAA 120
      ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct 106 AAGGATGGGCTGAAGCTGGGGTCTGGACCTTCAATCAAAGCCTTAGATGGGAGATCTCAA 165
Query 121 GTTTC AACACCCACGTTTGGCAAACGTTGCGATGCCACCAGCCTTACCTAAAGCTACT 180
      ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct 166 GTTTC AACACCCACGTTTGGCAAACGTTGCGATGCCACCAGCCTTACCTAAAGCTACT 225
Query 181 AGAAAGGCTTTGGGAACTGTCAACAGAGCTACAGAAAAGTCTGTAAAGACCAAGGGACCC 240
      ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct 226 AGAAAGGCTTTGGGAACTGTCAACAGAGCTACAGAAAAGTCTGTAAAGACCAAGGGACCC 285
Query 241 CTCAAACAAAAACAGCCAAGCTTTTCTGCCAAAAAGATGACTGAGAAGACTGTTAAAGCA 300
      ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct 286 CTCAAACAAAAACAGCCAAGCTTTTCTGCCAAAAAGATGACTGAGAAGACTGTTAAAGCA 345
Query 301 AAAAGCTCTGTTCCCTGCCTCAGATGATGCCTATCCAGAAATAGAAAAATCTTTCCCTTC 360
      ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct 346 AAAAGCTCTGTTCCCTGCCTCAGATGATGCCTATCCAGAAATAGAAAAATCTTTCCCTTC 405
Query 361 AATCCTCTAGACTTTGAGAGTTTGGACCTGCCTGAAGAGCACCAGATTGCGCACCTCCCC 420
      ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct 406 AATCCTCTAGACTTTGAGAGTTTGGACCTGCCTGAAGAGCACCAGATTGCGCACCTCCCC 465
Query 421 TTGAGTGGAGTGCCTCTCATGATCCTTGACGAGGAGAGAGCTTGAAAAGCTGTTTCAG 480
      ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct 466 TTGAGTGGAGTGCCTCTCATGATCCTTGACGAGGAGAGAGCTTGAAAAGCTGTTTCAG 525
Query 541 TCTCCTCAAGCATCTGTGCGACCCTGGATGTTGAATTGCCACCTGTTTGTGTGACATA 600
      ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct 586 TCTCCTCAAGCATCTGTGCGACCCTGGATGTTGAATTGCCACCTGTTTGTGTGACATA 645
Query 601 GATATTTAA 609
      |||||||
Sbjct 646 GATATTTAA 654
```

圖 4- 3、securin 基因定序比對結果

透過 NCBI BLAST 資料庫的比對結果，證明我們所選殖的基因為 PTTG1，

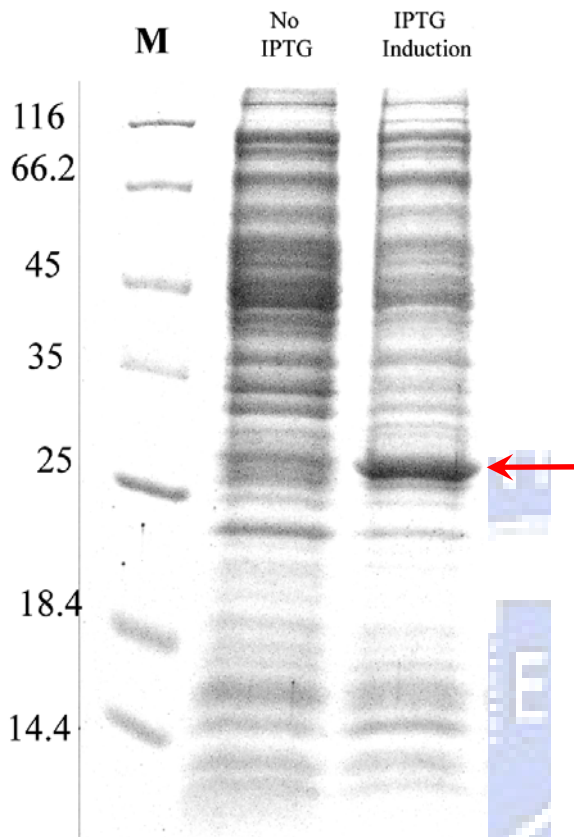
即 securin。而在序列當中也沒有突變的方式 (Identities: 100%)。

## 4-2 Securin 電泳膠片之分析結果

透過實驗4-1的部分，我們可以得到選殖成功含有securin基因的大腸桿菌菌株。不過基本上當大腸桿菌開始成長時，其內部包含了許多不同的蛋白質，而為了確定我們可以利用IPTG誘導的方式來表現securin蛋白質，將其培養方式分為對照組及實驗組，其中實驗組加入IPTG，對照組沒有加入IPTG，而其餘的培養參數皆相同。分別將兩組的菌收集下來，用物理的方式（超音波破碎機）將菌打破以取得蛋白質，之後進行SDS-PAGE分析。結果我們發現到經過IPTG的誘導，的確是有一特定分子量的蛋白質比起對照組來的多（圖4-4）。確定我們的表現系統是可以使用的，之後就將大腸桿菌進行長時間培養（16小時），經過細菌破碎機的處理，讓蛋白質細胞破裂而分別得到可溶性蛋白質（supernatant）與不可溶性蛋白質（inclusion body）。同樣將所得到的supernatant和清洗後的inclusion body進行電泳分析，securin的分子量大小為26kDa附近，而我們的确可以在inclusion body的部分得到一個分子量約26kD的蛋白質（圖4-4）。



A.



B.

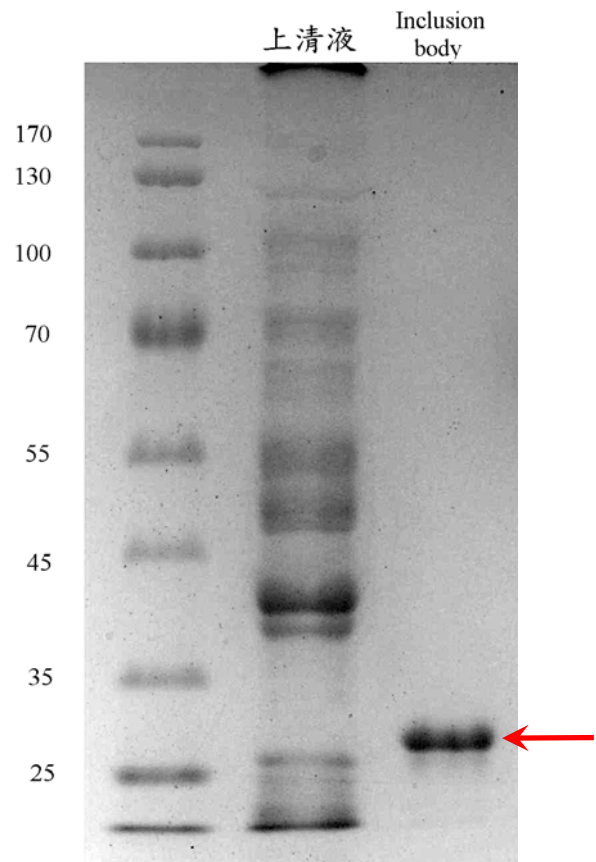


圖 4- 4、Securin SDS-PAGE 分析。

A: SDS-PAGE 確定可以利用 IPTG 誘導的方式來表現 securin 蛋白質，樣品的順序分別如圖所示，從左到右為 Marker、未經過 IPTG 處理及經過 IPTG 處理。B: 將經過細菌破碎機處理所得之可溶性蛋白質 (supernatant) 與不可溶性蛋白質 (inclusion body) 進行 SDS-PAGE 分析，樣品的順序分別 Marker、可溶性蛋白質及不可溶蛋白質。圖中箭頭所標示出來的為 securin 蛋白質。而從 SDS-PAGE 分析我們可以大約估計出，每次若培養 1L 的大腸桿菌可以得到純度約為 ~90% 及 10mg 重的 securin。本實驗的膠體染色用的是 Coomassie blue R-250 (CBR) 染色法。

### 4-3 Western blotting 分析結果

為了確定我們所得到包含體內的蛋白質確實為securin，所以透過抗體結合的方式來進行western blotting的實驗。而得到的結果證實我們包含體內的蛋白質確實為securin (圖4-5)。在左邊的圖為SDS-PAGE的結果，樣品的順序從左到右分別為：標準蛋白質分子量標籤 (marker)、破菌所得之上清液、破菌所得之內涵體及作為negative control的BSA。而右邊的圖為相同sample順序，將轉漬的PVDF膜透過western blotting的方式與底片進行感光，所得到結果圖。從底片上的結果來看可以發現到只有在破菌所得之上清液及內涵體的部分可以觀察到底片被感光的部份，而在marker及negative control的部分卻無法觀測到。這說明了我們所得到內涵體中的蛋白質的確是我們所要的securin蛋白質。而在上清液的部分也觀察到些許的感光部分，這可能是在破菌所得之上清液中依然存在有可溶性的securin蛋白質 (solubale state)。



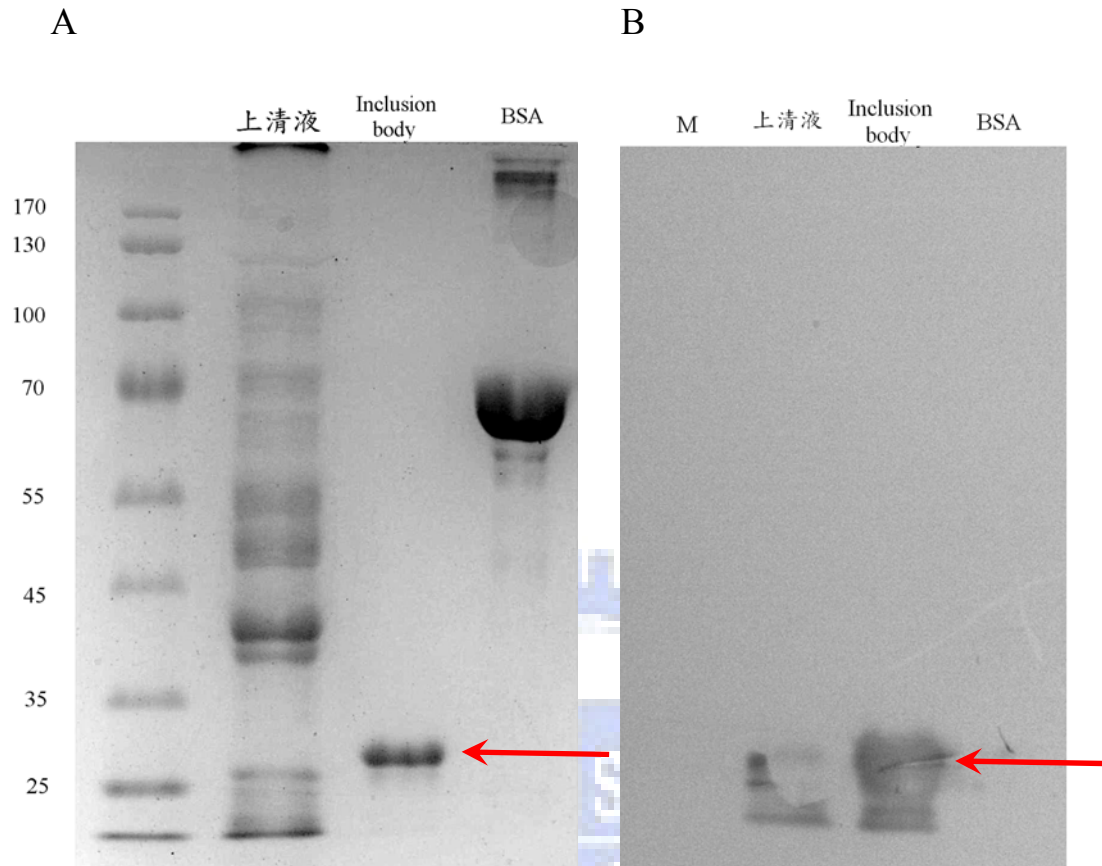


圖 4- 5、破菌上清液及內涵體 SDS-PAGE 與 Western blotting 分析結果。  
 本實驗所使用到的一級抗體為 mouse monoclonal first antibody to securin (Novus Biologicals, Inc.)，二級抗體為 goat anti-mouse IgG-HRP (Santa Cruz Biotechnology, Inc.)，最後透過加入 HRP 的受質 (substrate) 在 membrane 上進行呈色。A：為 SDS-PAGE 的結果圖、B：為 western blotting 的結果圖。樣品的順序分別如圖所示，從左到右為 Marker、破菌所得之上清液、破菌所得之內涵體及 BSA。其中 BSA 為 negative control。圖中箭頭所指之處為 securin 蛋白質。



#### 4-4 Securin 蛋白質的二級結構分析

本實驗將securin蛋白質在摺疊過程中，包括已摺疊的M<sub>5</sub>以及各個摺疊中間體M<sub>1</sub>、M<sub>2</sub>、M<sub>3</sub>、M<sub>4</sub>進行far-UV的CD分析，其掃描的波段在190-260nm。並且將分析所得到之CD圖譜數據經由SELCON3軟體來分析securin蛋白質所包含的二級結構比例(圖4-7)<sup>105</sup>。在SELCON3的分析下將二級結構分類成六個形式，分別為 $\alpha$ -helix (H)、distorted  $\alpha$ -helix (H(d))、 $\beta$ -sheet (S)、distorted  $\beta$ -sheet (S(d))、turn、與unordered。其中Distorted是扭曲之意，產生之原因是由於helix頭尾兩端的四個胺基酸因為結構已經趨於終止，於是結構較正中間之helix為扭曲，故稱之；同樣的情況亦發生在sheet，扭曲部分為在頭尾的兩個胺基酸上。

而在securin的分析結果中，我們發現securin於M<sub>1</sub>的時候除了 $\beta$ -sheet比例比較高以外並沒有太多的特定二級結構，大部分是屬於turn及unordered的結構(包含了5%  $\alpha$ -helix, 27.7%  $\beta$ -sheet, 16.6% turn and 32.2% unordered structure)。而在M<sub>2</sub>時期，卻出現較高比例的 $\alpha$ -helix(包含了23.1%  $\alpha$ -helix, 9.4%  $\beta$ -sheet, 14.9% turn and 27.7% unordered structure)，不過在turn及unordered的部分依舊是佔了一個很高的比例。而當蛋白質摺疊到M<sub>3</sub>, M<sub>4</sub>, M<sub>5</sub>的時候，其二級結構的比例又變成了 $\alpha$ -helix、 $\beta$ -sheet等這類特定二級結構的含量變的很少，取而代之的是turn及unordered的結構比例整個變高了(M<sub>3</sub>: 6%  $\alpha$ -helix, 14.2%  $\beta$ -sheet, 22.8% turn and 37.9% unordered structure; M<sub>4</sub>: 6.3%  $\alpha$ -helix, 11.2%  $\beta$ -sheet, 24.1% turn and 39.4% unordered structure; M<sub>5</sub>: 5.3%  $\alpha$ -helix, 14.2%  $\beta$ -sheet, 22.6% turn and 40% unordered structure)(圖4-8)，而這個結果說明了當securin在其已摺疊態時，特徵性的二級結構比例並不很多，相對的大部分是一個unoreded的狀態。且從M<sub>3</sub>, M<sub>4</sub>, M<sub>5</sub>的二級結構比例變化來看，可以發現到M<sub>3</sub>、M<sub>4</sub>摺疊中間體與以摺疊的M<sub>5</sub>之間的差距並不大，這也說明了securin從高的酸鹼值(pH)到最終native緩衝液的環境中，其實結構的變化差異並不大。而在M<sub>1</sub>及M<sub>2</sub>的部分，雖然經過分析所得到的結果，有一些特徵性的二級結構比例(M<sub>1</sub>: 27.7%  $\beta$ -sheet、M<sub>2</sub>: 23.1%  $\alpha$ -helix)，但這可能是因為有尿素(urea)存在的環境中，給予蛋白質在摺疊上的另一種穩定力量所造成的，此外尿素也會影響到CD測定的結果，因有尿素的存在會造成CD測定時在低波長的部分產生高燈壓，而所測量到的數值可能會有所誤差。不過基本上我們在接近native狀態的M<sub>3</sub>、M<sub>4</sub>及native狀態下的M<sub>5</sub>的部分所得到的結果，可以說明securin為一個無特定構形蛋白質。

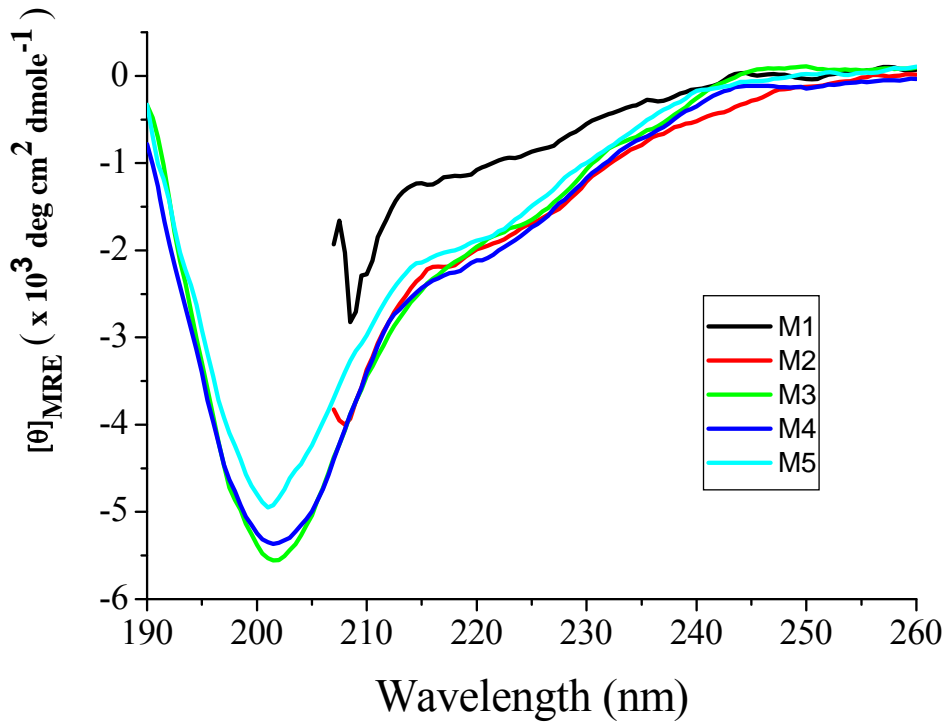


圖 4-6、蛋白質 securin 各摺疊中間體的 CD 圖譜。

圖中將各個中間體及最終自然態 (native state) 依摺疊順序編號為 M1~M4、M5 (native state)，並以不同顏色作為區分。

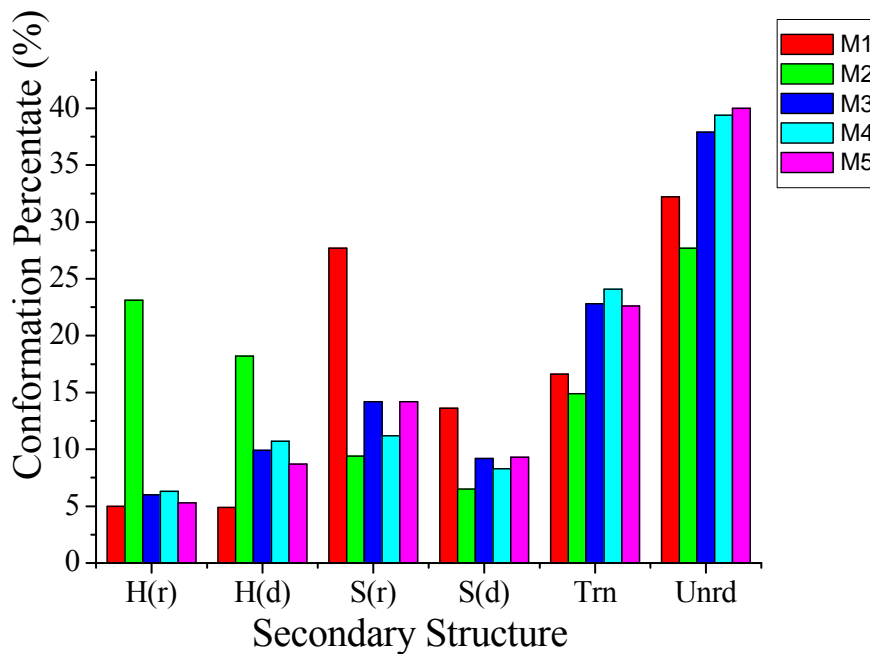


圖 4-7、蛋白質 securin 各摺疊中間體之二級結構分布分析表。

圖中同樣將折疊中間體及自然態蛋白質以不同顏色做區分。橫軸的部份為 SELCON3 所進行分析的二級結構，縱軸的部份為各個中間體所含二級結構的比例。

	<b>H(r) (%)</b>	<b>H(d) (%)</b>	<b>S(r) (%)</b>	<b>S(d) (%)</b>	<b>Trn (%)</b>	<b>Unrd (%)</b>
<b>M1</b>	<b>5</b>	<b>4.9</b>	<b>27.7</b>	<b>13.6</b>	<b>16.6</b>	<b>32.2</b>
<b>M2</b>	<b>23.1</b>	<b>18.2</b>	<b>9.4</b>	<b>6.5</b>	<b>14.9</b>	<b>27.7</b>
<b>M3</b>	<b>6</b>	<b>9.9</b>	<b>14.2</b>	<b>9.2</b>	<b>22.8</b>	<b>37.9</b>
<b>M4</b>	<b>6.3</b>	<b>10.7</b>	<b>11.2</b>	<b>8.3</b>	<b>24.1</b>	<b>39.4</b>
<b>M5</b>	<b>5.3</b>	<b>8.7</b>	<b>14.2</b>	<b>9.3</b>	<b>22.6</b>	<b>40</b>

圖 4-8、蛋白質 securin 各摺疊中間體及自然態之二級結構分布比例。



#### 4-5 螢光光譜分析蛋白質疏水性核心之形成

螢光光譜中 (圖4-9)，可以發現到在從未摺疊蛋白質、摺疊中間體M1、M2、M3及M4到M5的native state其螢光光譜最高峰有有所謂的光譜藍位移現象 (blue shift)，從特定螢光波長的分析 (I320/365)，我們也可以證實這一結果 (圖4-10)。這代表了在蛋白質結構中的芳香族胺基酸被其他構造包覆而遠離水相，而這也符合了我們一般所認為的水溶性蛋白質其核心是屬與比較疏水性的胺基酸。此外也發現到隨著摺疊中間體的改變，其螢光的強度也跟著改變，說明了隨著透析的緩衝液逐步改變，securin的部分結構是越趨緊密的，尤其是透過芳香族間的疏水力 (hydrophobic force) 所構成的結構，而這樣的結構會使得芳香族間的共振結構更為穩定，一旦共振結構更為穩定，則原本螢光分子所要放出的能量就不易以熱能的方式散出，讓螢光的強度變強。而對照CD的結果，可以發現到雖然securin為一無特定構形蛋白質，但是它在水溶液的狀態下其結構中的芳香族胺基酸依然會遠離水相，甚至形成一個核心，而其他親水性的胺基酸則是形成一個鬆散的結構。



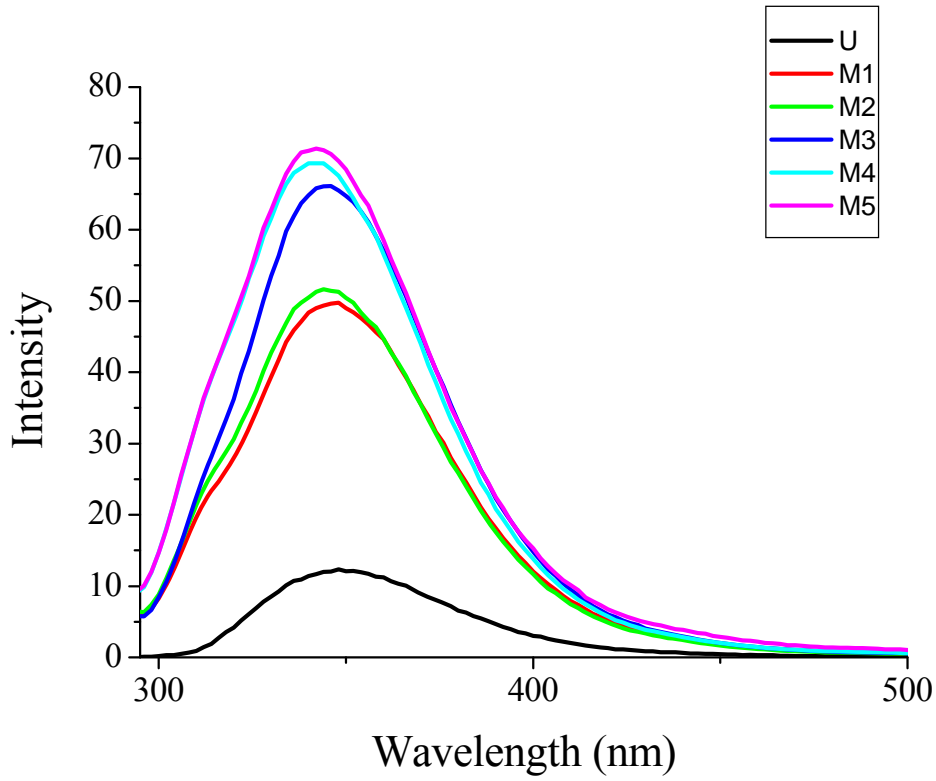


圖4-9、securin摺疊中間物螢光圖譜。  
 螢光激發波長：280 nm；螢光測定波長：300~500 nm

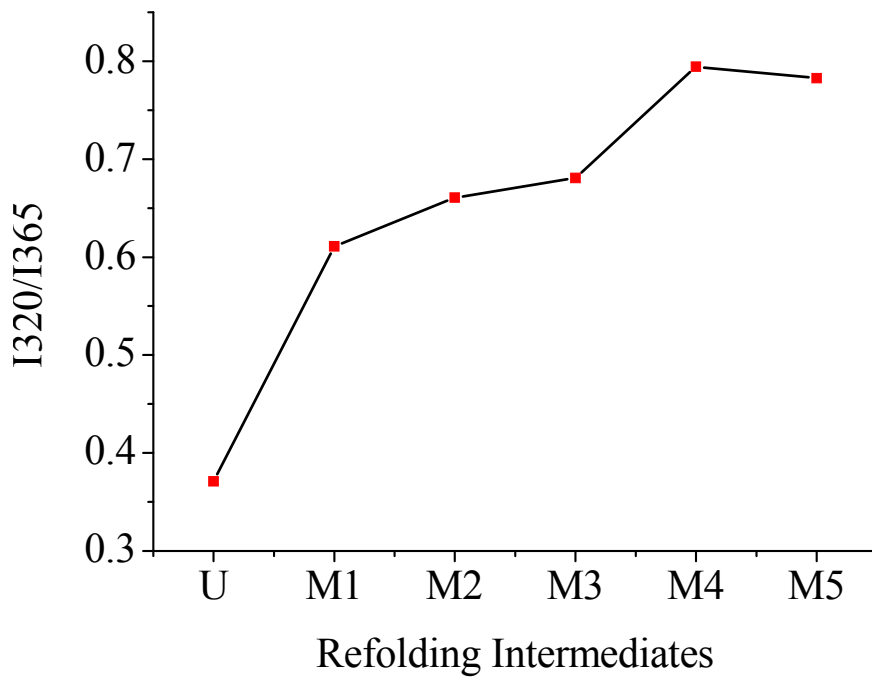


圖 4-10、蛋白質螢光光譜位移分析。



#### 4-6 以 DLS 分析 securin 摺疊中間體粒徑大小的分布

動態光散射儀 (DLS) 是在分析水溶液中粒子的粒徑大小是一種相當方便而迅速的方法。圖為 DLS 的 auto correlation function 經由 non-negative constrained least square (NNLS) 的方法分析得到的結果 (圖 4-11~4-17)。由 DLS 數據的結果可以瞭解 securin 蛋白質在 denature buffer 下是變性而展開的情形，其有效直徑為  $10.76 \pm 0.36 \text{ nm}$ 。而其他摺疊中間體  $M_1$ - $M_4$  在  $20^\circ\text{C}$  測得有效粒徑大小分別為  $8.38 \pm 0.25 \text{ nm}$ 、 $6.68 \pm 0.21 \text{ nm}$ 、 $5.96 \pm 0.01 \text{ nm}$ 、 $5.84 \pm 0.02 \text{ nm}$ 。最後的已摺疊蛋白質  $M_5$  的粒子大小為  $5.21 \pm 0.12 \text{ nm}$ 。藉由 DLS 的分析可以瞭解 securin 透過藉由透析置換 buffer 的方式移除變性劑，然後進行摺疊且其構形上有所變化，使得我們可以觀察到蛋白質顆粒在粒徑上的變化。而在摺疊中間體  $M_3$ 、 $M_4$  及已摺疊蛋白質  $M_5$  三者的粒徑變化上並不大，與 CD 的結果可以相呼應，說明了 securin 蛋白質在這三個狀態中，其結構變化上並不是很大。



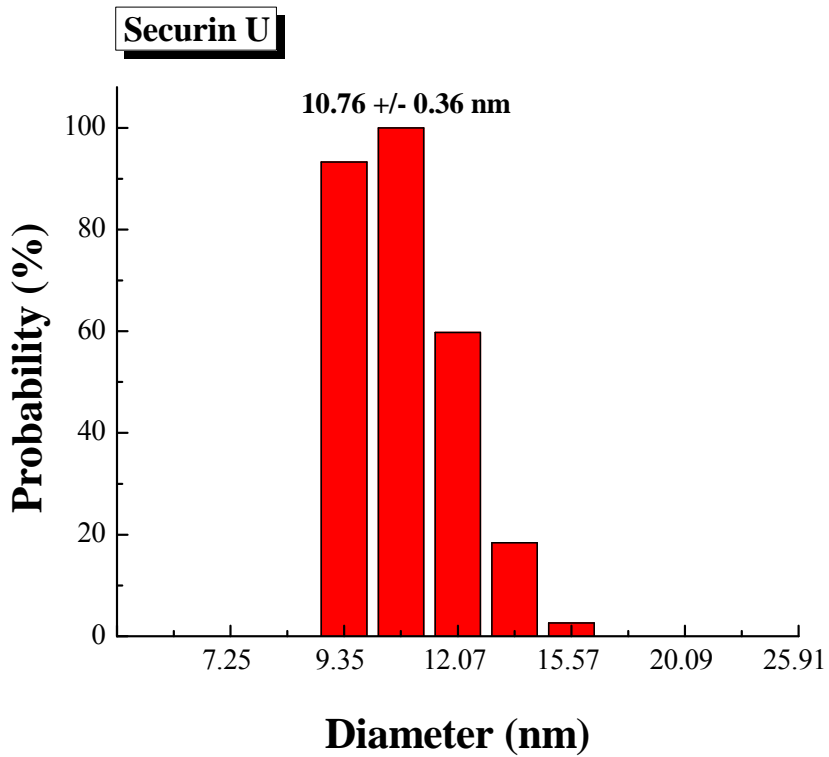


圖 4-11、動態光散射儀量測未摺疊蛋白質 securin 的粒子大小分布圖。

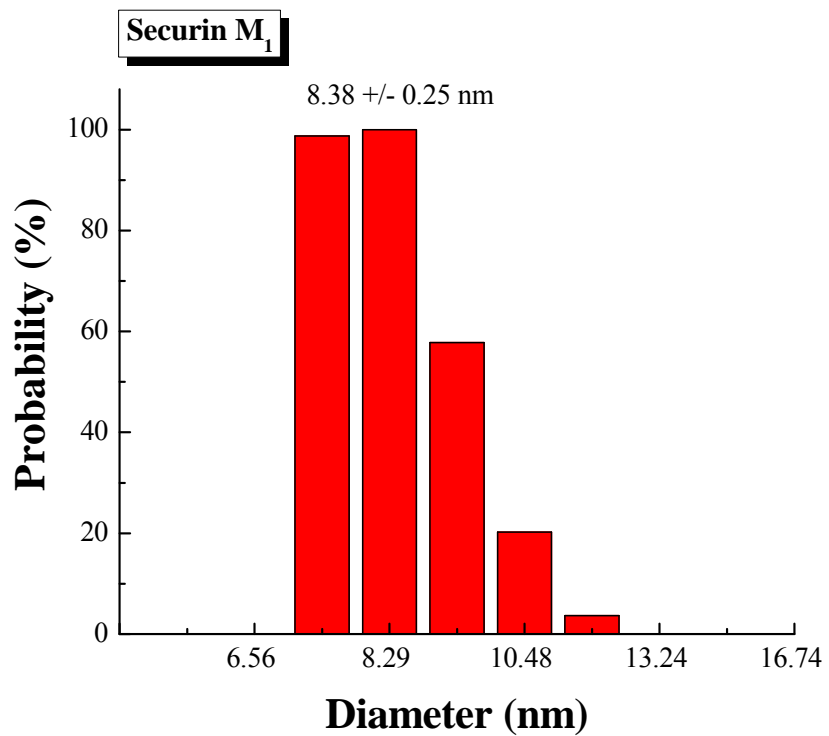


圖 4-12、動態光散射儀量測蛋白質 securin 摺疊中間體 M<sub>1</sub> 的粒子大小。

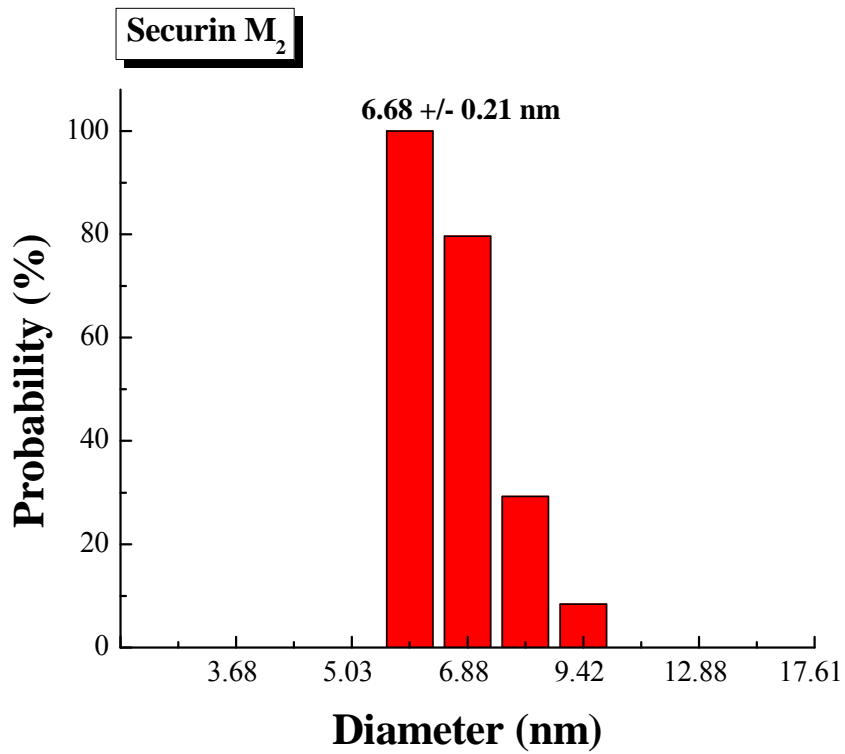


圖 4-13、動態光散射儀量測蛋白質 securin 摺疊中間體 M<sub>2</sub> 的粒子大小。

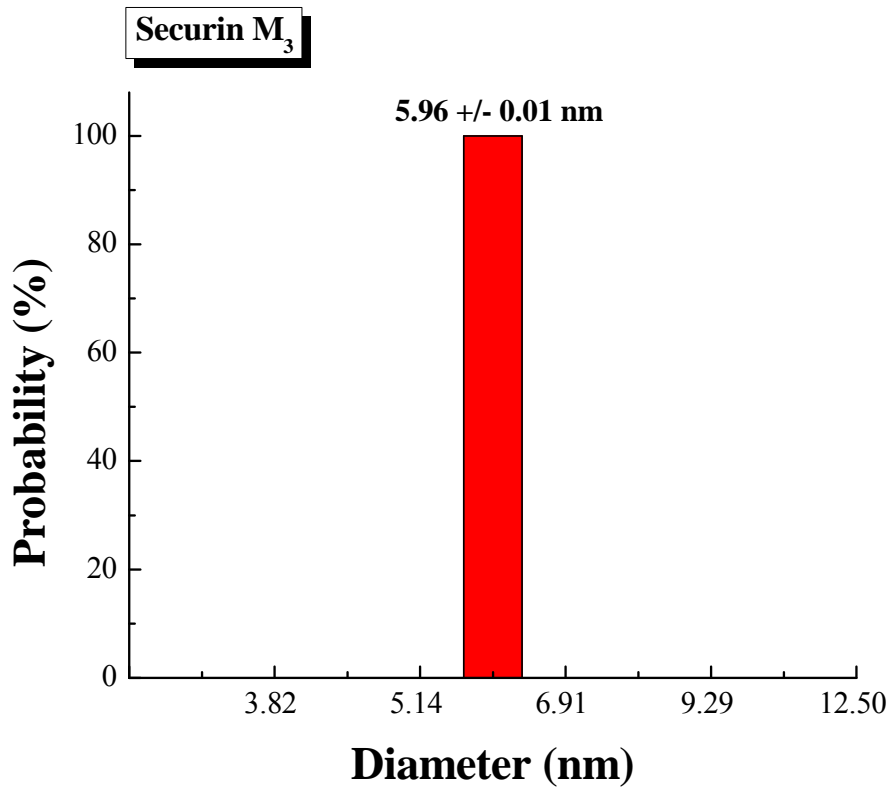


圖 4-14、動態光散射儀量測蛋白質 securin 摺疊中間體 M<sub>3</sub> 的粒子大小。

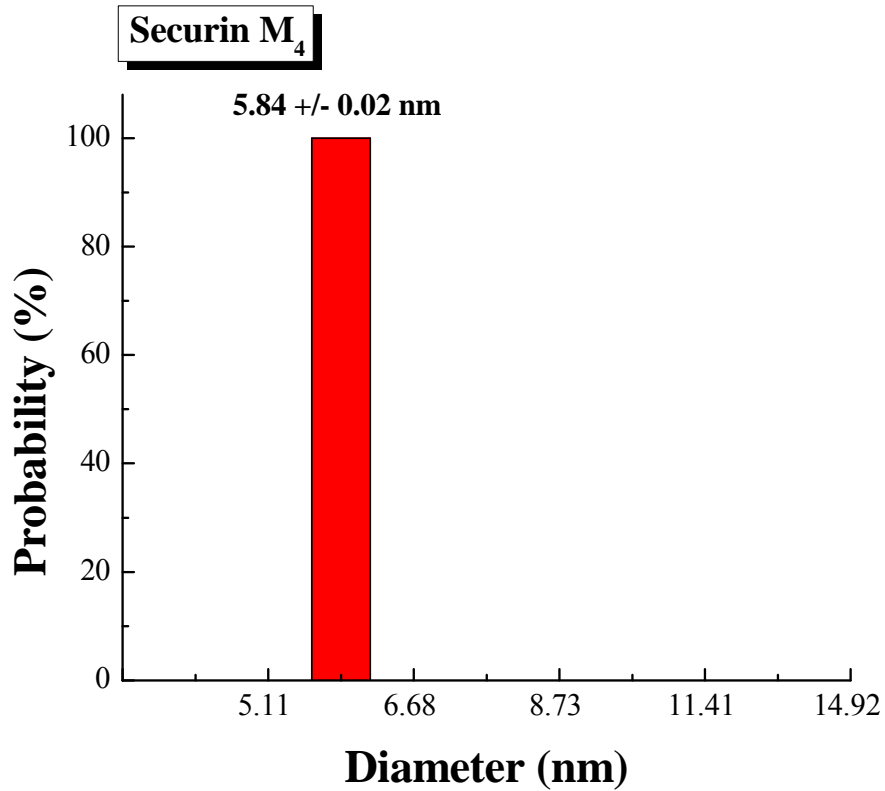


圖 4-15、動態光散射儀量測蛋白質 securin 摺疊中間體 M<sub>4</sub> 的粒子大小。

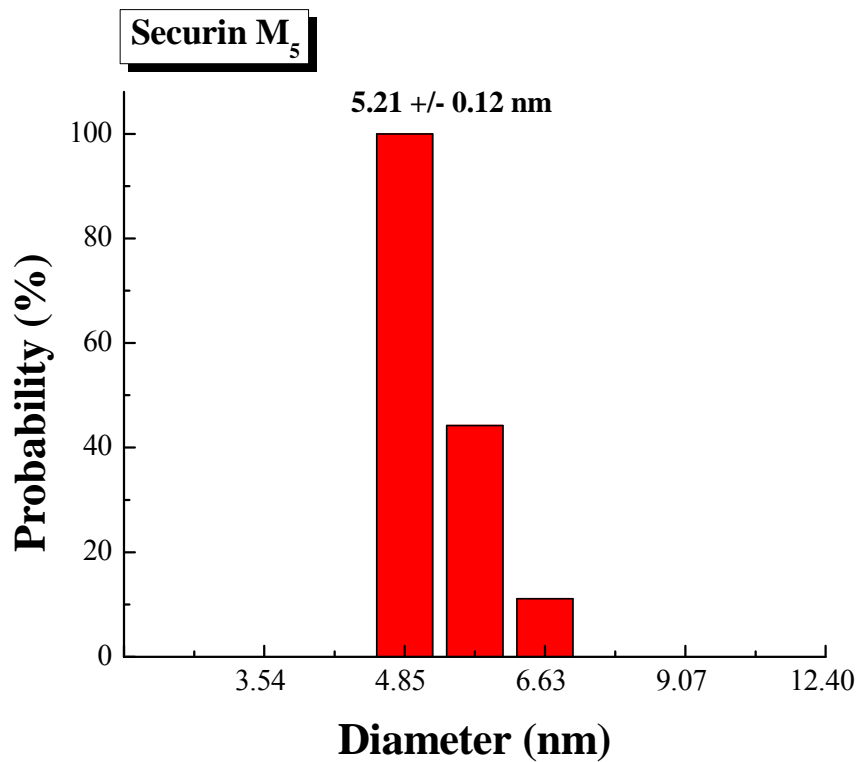


圖 4-16、動態光散射儀量測蛋白質 securin 摺疊中間體 M<sub>5</sub> 的粒子大小。

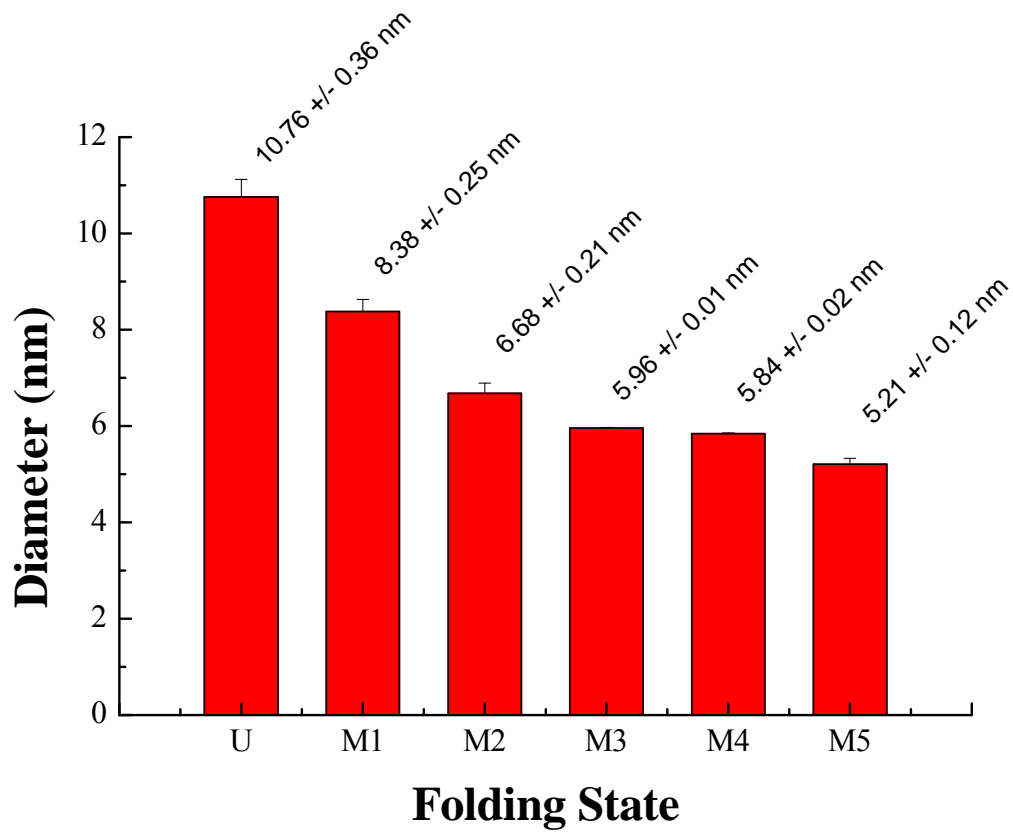


圖 4-17、動態光散射儀量測蛋白質 securin 各個摺疊中間體的粒子大小分布圖。





#### 4-7 Securin 摺疊中間物的熱穩定性

DSC的圖譜指出蛋白質securin在未摺疊態 (U)、摺疊中間體M<sub>1</sub>、M<sub>2</sub>、M<sub>3</sub>、M<sub>4</sub>、M<sub>5</sub>在溫度掃描的過程中皆無相變溫度的產生 (圖 4-19~4-23)。在M<sub>1</sub>、M<sub>2</sub>的部分，可能因為變性的存在使得蛋白質的結構是比較鬆散的，因為結構的不緊密使得蛋白質並無法測量到相變溫度，而在M<sub>3</sub>的部分因為在較高的pH值，蛋白質的胺基酸鍊可能因為電性的關係讓整個蛋白質結構也不緊密，可是當在M<sub>4</sub>、M<sub>5</sub>的時候，環境已經改變到接近自然環境時securin依舊沒有較緊密的結構發生，不過在M<sub>5</sub>的部分還是可以隱約在DSC的分析圖中發現一個微弱及一個非常寬的相變波峰 (圖 4-23)。而在之前的研究中稱這樣的蛋白質為處在玻璃態 (glassy state) 的情況下<sup>106</sup>。一般來說，一個結構穩定的蛋白質在其摺疊過程中，會有一個穩定的能量最低態，如溶菌酶 (Lysozyme) (圖 4-18)，lysozyme在DSC的分析下會有一明顯的相變溫度。但是在disordered蛋白質的部分，因為蛋白質內胺基酸間的交互作用很弱，進而造成蛋白質三級結構的交互作用變弱。如此一來蛋白質的結構並不是穩定的，會具有許多同樣構形能量最低態 (conformation energy minima) 的蛋白質結構同時存在，而這些能量最低態可以共同存在並且互相轉變，而這樣的情形就稱為玻璃態 (glassy state)。所以根據DSC的結果，securin在三級結構上是沒有次序且為一個不穩定及鬆散的結構，是一個處於玻璃態的蛋白質。

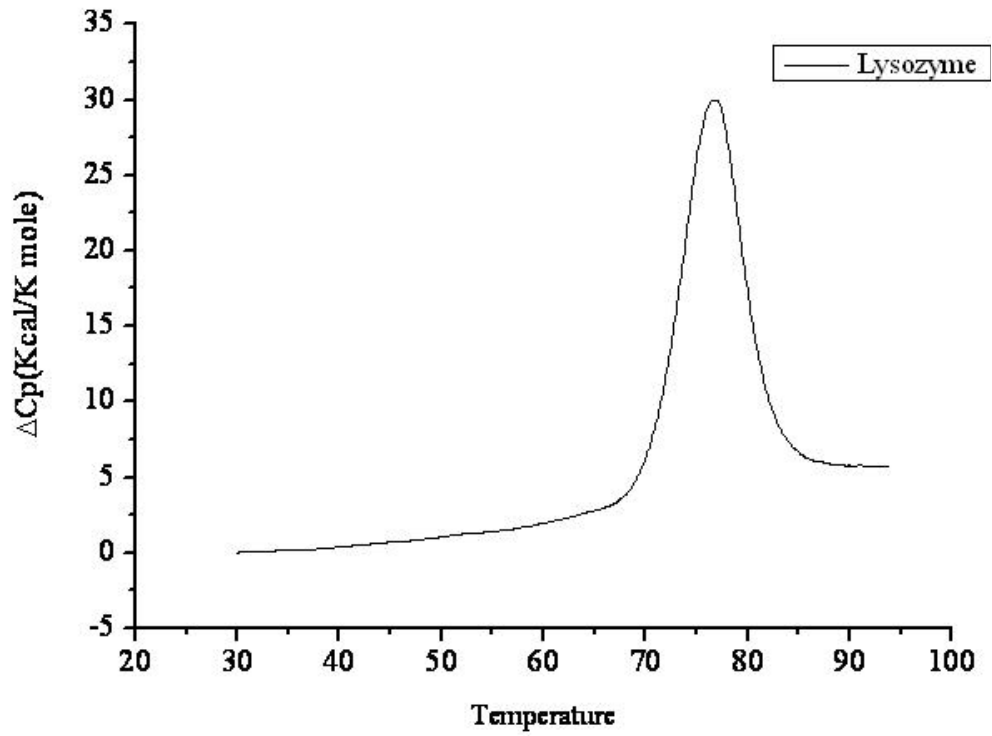


圖 4-18、Lysozyme 利用 DSC 測定其結構熱穩定性。

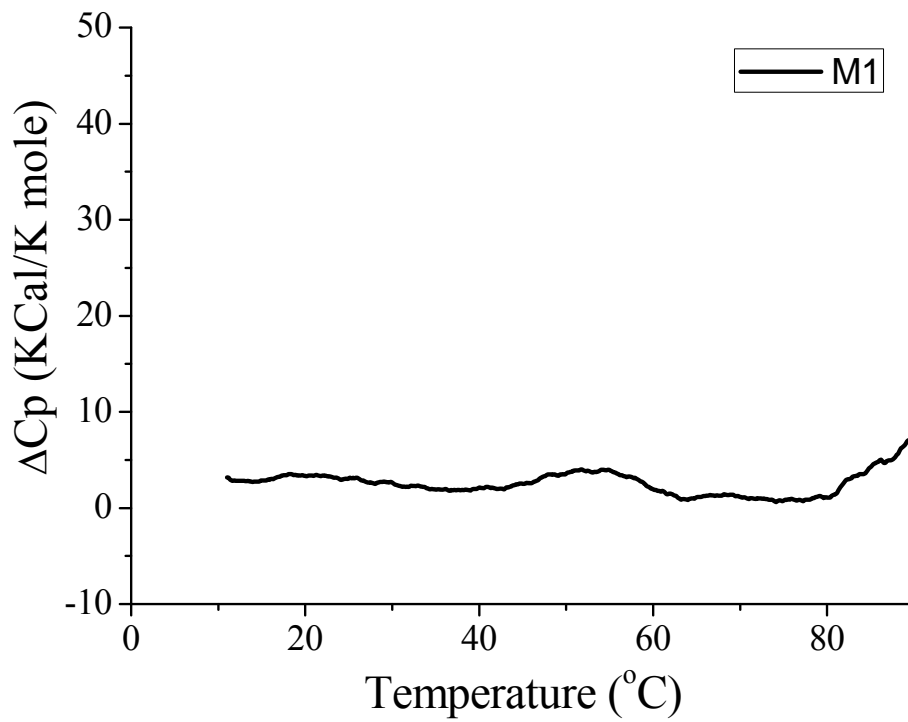


圖 4-19、Securin 蛋白質在 M<sub>1</sub> 時的熱穩定性。

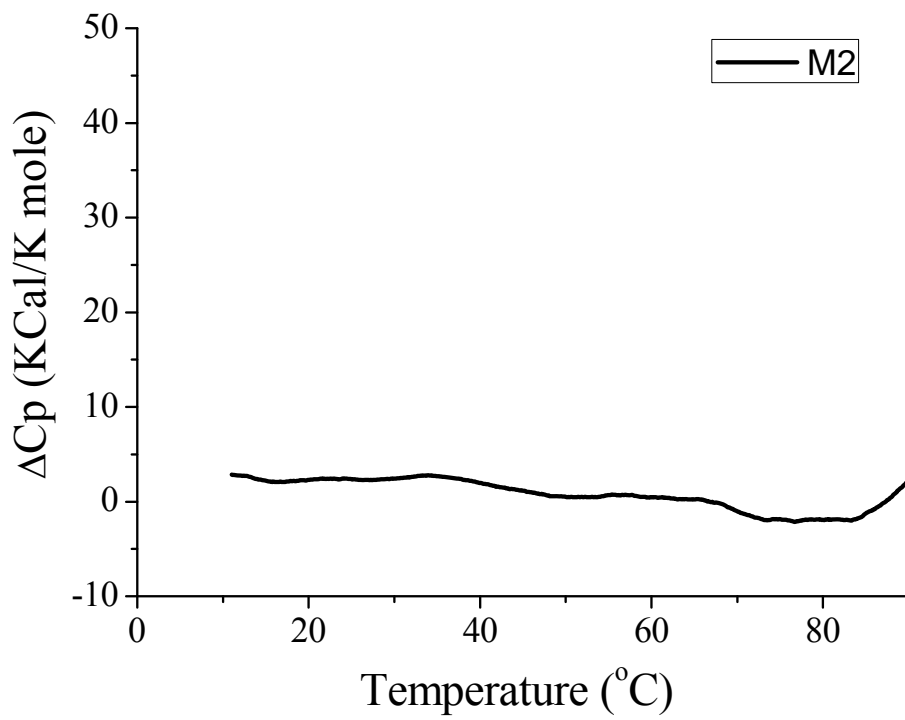


圖 4-20、Securin 蛋白質在 M<sub>2</sub> 時的熱穩定性。

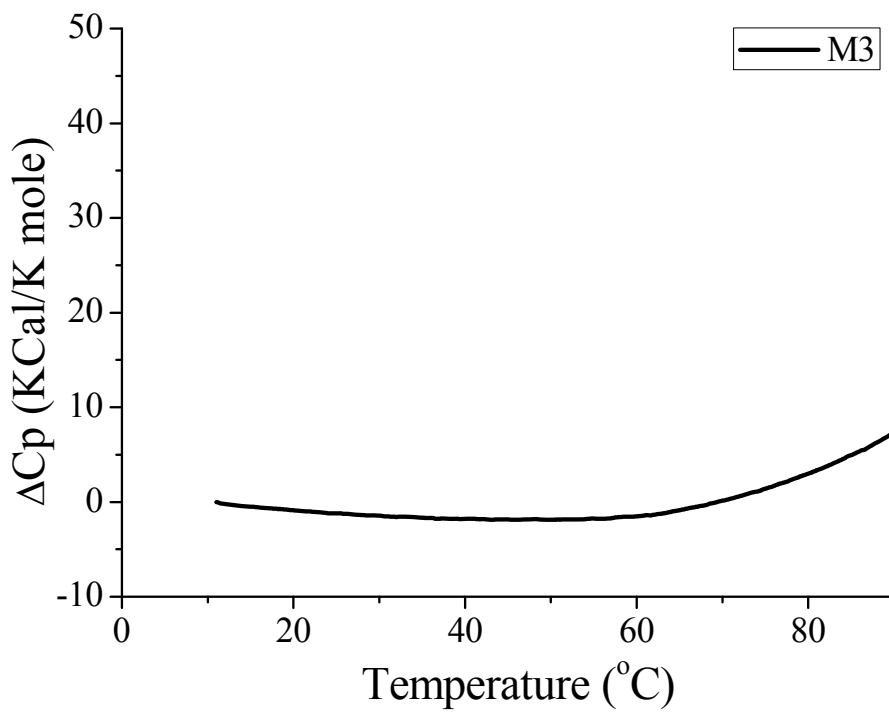


圖 4-21、Securin 蛋白質在 M<sub>3</sub> 時的熱穩定性。

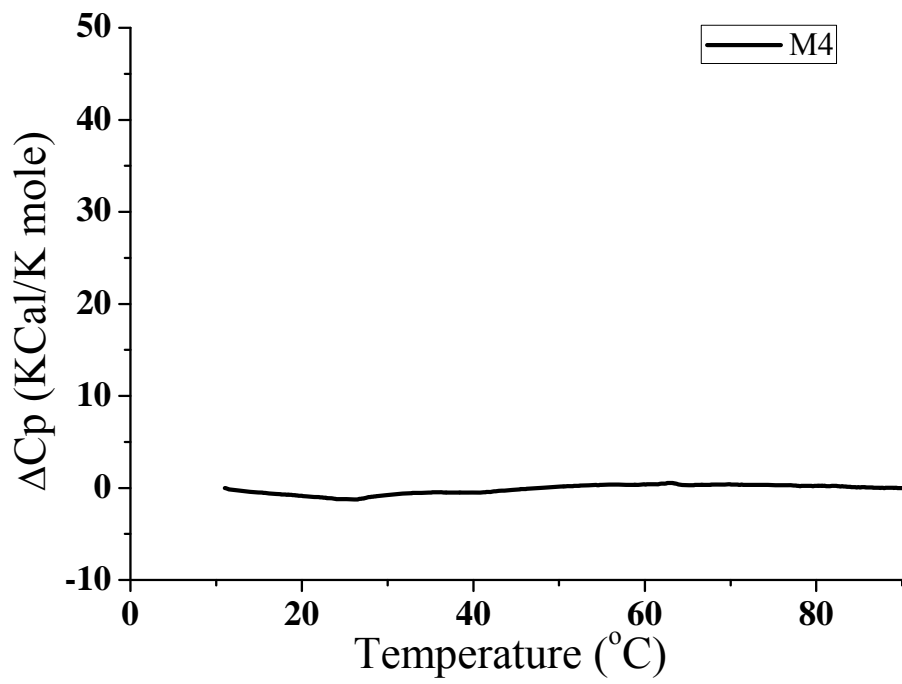


圖 4-22、Securin 蛋白質在 M<sub>4</sub> 時的熱穩定性。

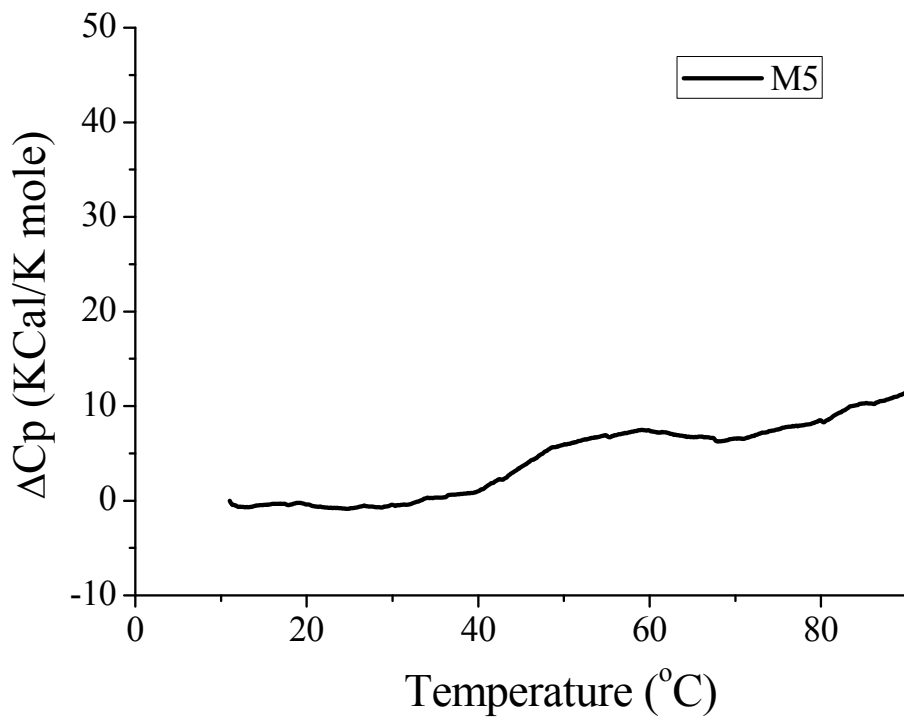


圖 4-23、Securin 蛋白質在 M<sub>5</sub> 時的熱穩定性。

#### 4-8 Securin 蛋白質透過 DisEMBL 程式分析無特定結構的情形

DisEMBL Intrinsic Protein Disorder Prediction 1.5 為一無特定結構蛋白質的預測軟體<sup>107</sup>。經由輸入蛋白質序列，與其資料庫進行比對之後來預測蛋白質是否具有無特定的結構。以下是securin的分析結果 (圖 4-24、圖 4-25)。

分析主要分成三個部分，分別是 Loops/coils、Hot loops 及 Missing coordinates，而在圖中虛線所表示的為每個分析方式的門檻值 (threshold)。其中 Loops/coils 的部分是以 DSSP 為依據 (Definition of secondary structure of proteins，為另一蛋白質資料庫，以二級結構分析為主)，此資料庫是將蛋白質的胺基酸側基們歸類成不同的二級結構組成，包括 alpha-helix ('H')、3\_10-helix ('G') 及 beta-strand ('E') 為有次序的結構，其他的二級結構則歸類成 loops 或稱作 coils。一般來說沒有特定結構的部分都是發現在 loops 中，所以當蛋白質具有高度 Loops/coils 的二級結構比例時，很容易就會形成一個沒有特定結構的型態。而 Hot loops 的部分則是將 Loops/coil 加以延伸，透過與 x-ray 的 B-factor 資料比對，來找出具有高度靈活性 (high degree of flexibility) 的 loops。而當 loops 具有高度的靈活性時，可被認為是蛋白質結構中較鬆散且不具特定構形的部分。最後是 Missing coordinates，這個部分是藉由與 X-ray 分析的蛋白質結構資料庫 (PDB, protein data bank) 作比對，這些 missing coordinates 是指在 X-ray 分析中因為結構不穩定的關係，而我們無法獲得準確的電子密度圖譜，而這樣的情形多半都是出現在蛋白質中具有高度靈活性的結構，藉由這樣的比對，可以預測蛋白質中是否有可能存在一些不穩定的結構。

securin 的程式分析結果發現其 Loop/coils 的部分佔了很高的比例，而這些 Loop/coils 的中，又很多的部分為 Hot loops。這樣的結果說明了在結構預測上，securin 亦為一個沒有特定結構的蛋白質，而造成沒有特定結構的原因可能是由於具有高度比例的 Loop/coils 結構，而這些結構又是具有高度的移動性所造成的。而在最後 Missing coordinates 的部分，同樣是有不少的序列是同時與 Hot loops 的部分相符合。綜合以上的結果，說明了在無特定結構蛋白質預測軟體的分析下，securin 為一個具有高度無特定結構的蛋白質。



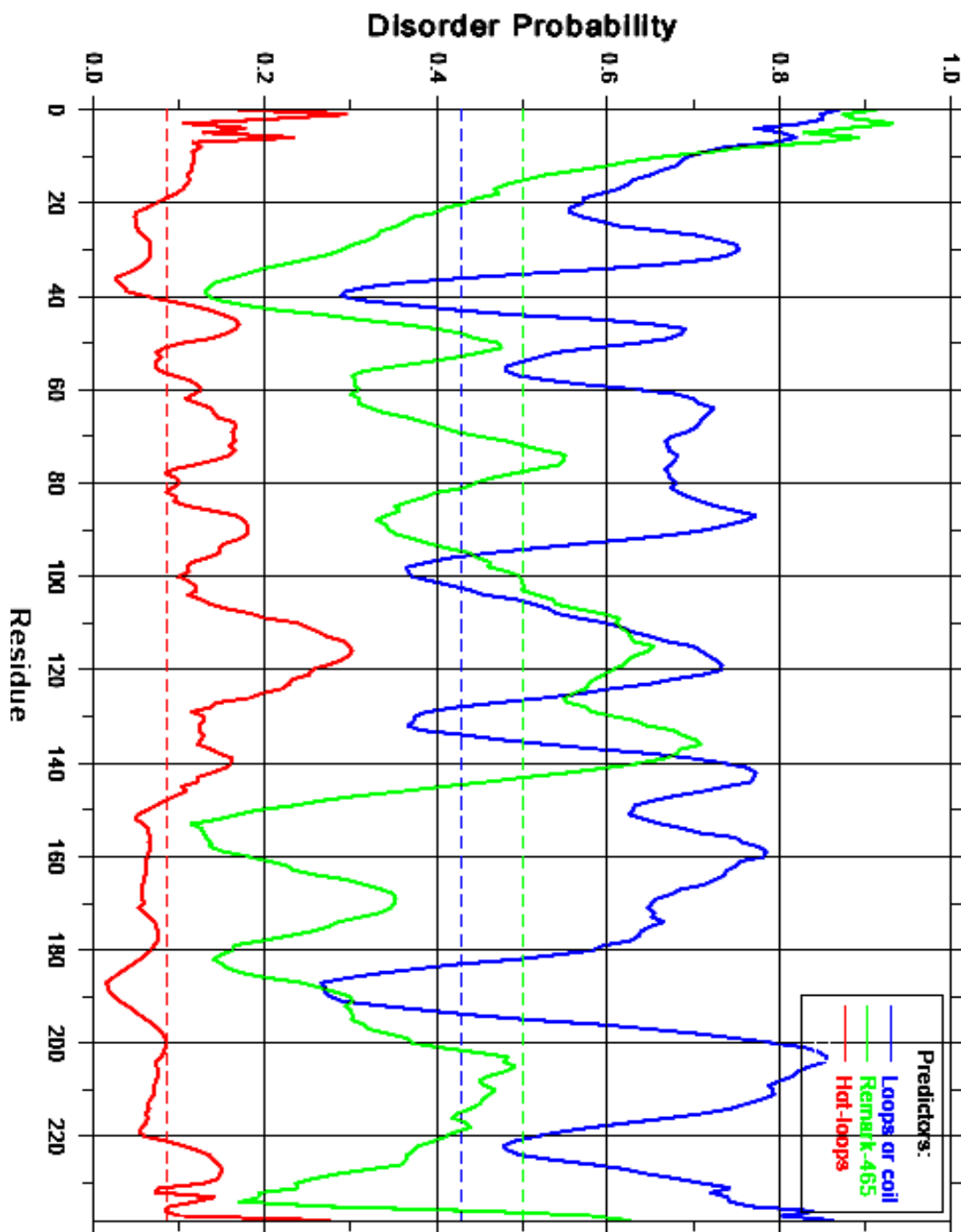


圖 4- 24、DisEMBL 分析結果圖。

圖中橫軸為蛋白質胺基酸序列從 N 端到 C 端依序的編號，縱軸為無特地結構的機率。

圖中藍色部份為 Loops/coils 的分析結果、紅色部分為 Hot loops 的分析結果，綠色 (remark 465) 為 Missing coordinates 的分析結果，而圖中虛線的部份代表每個分析機率的門檻值。

### Disordered by Loops/coils definition

HMRGSEHHHH HGMASMTGGQ QMGRDLYDDD DKDHPFTMAT LIYVDKENG E PGTRVVAKD G  
LKLGSGPSIK ALDGRSQVST PRFGKTFDAP PALPKATRKA LGTVNRATEK SVKTKGPLKQ  
KQPSFSAKMM TEKTVKAKSS VPASDDAYPE IEKFFPFNPL DFESFDLPEE HQIAHLPLSG  
VPLMILDEER ELEKLFQLGP PSPVKMPSPW WESNLLQSPS SILSTLDVEL PPVCCDIDI

### Disordered by Hot-loops definition

HMRGSEHHHH HGMASMTGGQ QMGRDLYDDD DKDHPFTMAT LIYVDKENG E PGTRVVAKD G  
LKLGSGPSIK ALDGRSQVST PRFGKTFDAP PALPKATRKA LGTVNRATEK SVKTKGPLKQ  
KQPSFSAKMM TEKTVKAKSS VPASDDAYPE IEKFFPFNPL DFESFDLPEE HQIAHLPLSG  
VPLMILDEER ELEKLFQLGP PSPVKMPSPW WESNLLQSPS SILSTLDVEL PPVCCDIDI

### Disordered by Remark-465 definition

HMRGSEHHHH HGMASMTGGQ QMGRDLYDDD DKDHPFTMAT LIYVDKENG E PGTRVVAKD G  
LKLGSGPSIK ALDGRSQVST PRFGKTFDAP PALPKATRKA LGTVNRATEK SVKTKGPLKQ  
KQPSFSAKMM TEKTVKAKSS VPASDDAYPE IEKFFPFNPL DFESFDLPEE HQIAHLPLSG  
VPLMILDEER ELEKLFQLGP PSPVKMPSPW WESNLLQSPS SILSTLDVEL PPVCCDIDI

圖 4-25、DisEMBL 各部分分析序列圖。

將 DisEMBL 各個分析所得到的結果利用蛋白質序列的方式來表現，並將分析結果有超過門檻值的部份以不同顏色標示出來。圖中藍色部份為 Loops/coils、紅色部分為 Hot loops，綠色 (remark 465) 為 Missing coordinates 的分析結果。

## 4-9 Far western blotting 分析結果

透過本實驗室蛋白質摺疊的技術，我們可以將 western 的技術加以改良，讓蛋白質在 membrane 上進行摺疊，回到 native 的狀態。本實驗分別是以兩種方式進行，一種方式是將 p53 轉漬到 membrane 上，進行摺疊；相對來說另一種方式是將 securin 轉漬到 membrane 上，進行摺疊。然後分別使用 securin 及 p53 蛋白質去進行雜合，接著就如同 western blotting 的方式一般，將 securin 蛋白質及 p53 蛋白質的一級抗體及二級抗體進行辨認，最後同透過加入 HRP 的受質 (substrate) 在 membrane 上進行呈色。這裡我們同樣利用 BSA 作為對造組 (negative control)，並同時進行 western blotting 來確定 securin 及 p53 的抗體對 p53 及 securin 蛋白質是沒有專一性的。圖 4-26 A1 及圖 4-26 A2 為 securin 雜合 p53 的結果，其中圖 A1 為 western blotting，可以發現到 securin 的抗體對於 p53 並無專一性，而在 securin 的部分同樣可以偵測到訊號。圖 A2 是 Far western blotting，在 p53 的地方出現了一個明顯的訊號，BSA 仍然沒有訊號出現。而圖 4-27 B1 圖 4-27 B2 為 p53 雜合 securin 的結果，圖 B1 為 western blotting 的結果，同樣的我們仍然可以觀察到 p53 抗體對於 securin 無專一性，而在 p53 的部分可已觀察到訊號。而圖 B2 為 Far western blotting，我們依舊可以在 securin 的部分偵測到訊號。透過這樣兩種反覆的實驗，我們可以發現到 securin 與 p53 之間似乎有關連，且這樣的關係可能是一個直接的連接。



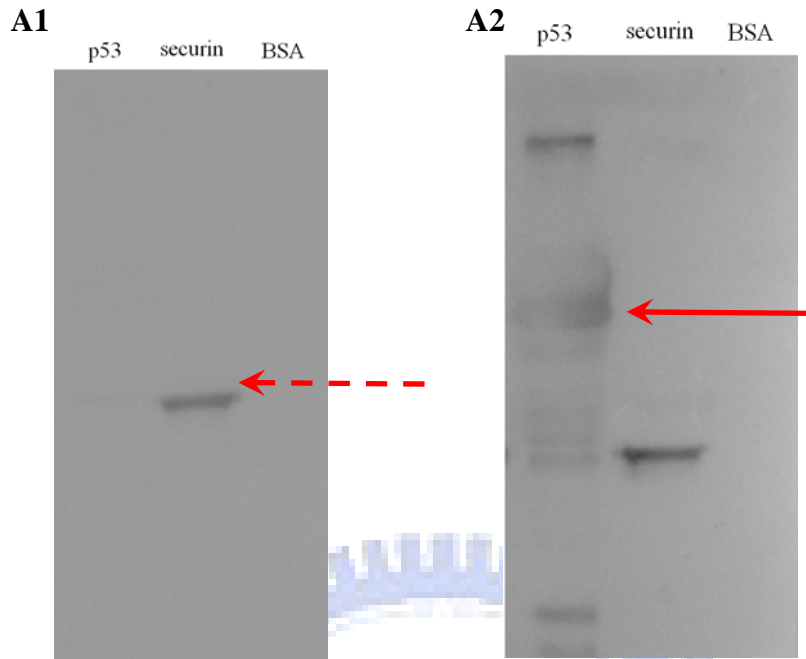


圖 4- 26、Far western 結果圖

A1:為一般西方點墨法，A2:以 securin 雜合 p53 的 far-western 結果。虛線箭頭所標為 antibody 所雜合到的 securin，實線箭頭所標為 securin 所雜合到的 p53。

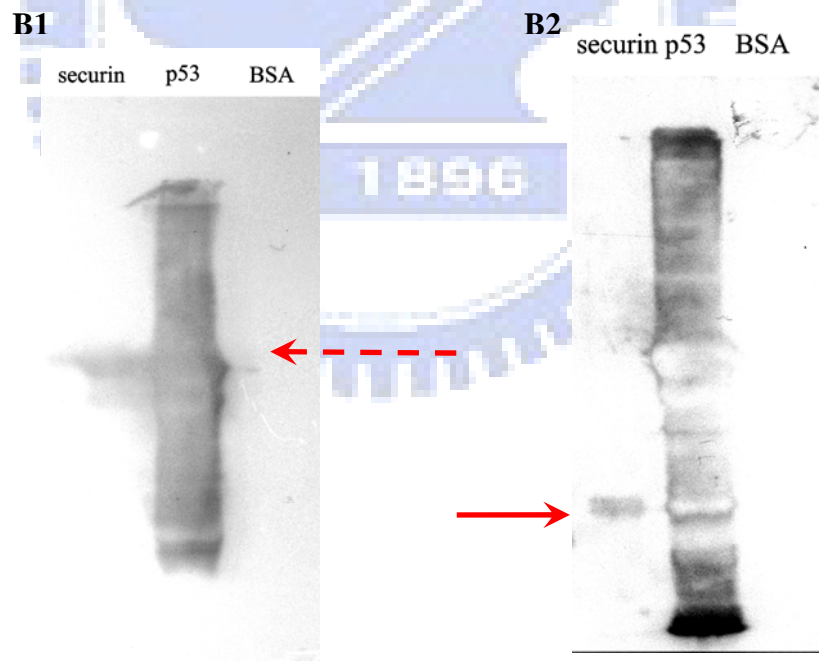


圖 4- 27、Far western 結果圖

B1:為一般西方點墨法，B2:以 p53 雜合 securin far-western 結果。虛線箭頭所標示為 antibody 所雜合到的 p53，實線箭頭所標為 p53 所雜合到的 securin。不過圖 B2 的 p53 部分因蛋白質濃度過高，所以在成色時有反應過度的現象，使得結果變成空洞的情況。

## 第五章、討論

### 5-1 Securin 基因與蛋白質序列分析

透過 PCR 及 DNA 序列分析的方式，可以確定我們所選殖的基因的確是 securin，在基因序列上並沒有突變的產生，且有成功地將質體（質體序列圖見附錄圖 1）轉形到 *E. coli* 中，如此一來我們可以透過 *E. coli* 來大量表現 securin，以利進行各項的實驗分析。而在蛋白質序列的部分，我們也同樣觀察到 securin 其上的保守序列，包括 D box 及 PxxP 序列（圖 1-6）。

### 5-2 Securin 電泳膠片與 western blotting Securin 電泳膠片之分析

在研究蛋白質的實驗中，蛋白質的表現與純化在實驗中是很重要的一部份，而像 securin 這類與細胞週期有關之蛋白質在表現及純化上有其困難度，因此本實驗利用基因重組的方式來取得 securin 蛋白質。透過基因重組及分子生物學的基因表現誘導的機制，本實驗可以得到大量表現的 securin 蛋白質於 *E. coli* 中。而且為了得到更大量且純度較高的 securin 蛋白質，我們將 *E. coli* 的培養時間延長，讓 securin 蛋白質在細胞內形成不具活性的內涵體 (inclusion body)，再藉由本實驗室重新摺疊的系統即可得到大量且具有活性的蛋白質。而在 SDS-PAGE 與 Western blotting 的分析下，證明了本實驗所得到內涵體蛋白質的確是 securin。雖然在破菌的過程中會有些微蛋白質降解或是損失於上清中的現象，但是整體來說並不影響到本實驗之後所進行的蛋白質摺疊與分析。

### 5-3 Securin 摺疊過程中，摺疊中間體與自然狀態之結構與熱穩定性

變化，及無特定結構蛋白質程式分析結果。

#### (1) Securin 摺疊

本實驗因為是使用 *E. coli* 產生蛋白質內涵體的方式來得到大量且純度較高的蛋白質，然而這些蛋白質內涵體是處在一個蛋白質相互堆疊失去結構的狀態。一般來說，相互堆疊的蛋白質是不具有活性，故為了得到有活性的蛋白質，本實驗透過蛋白質重新摺疊的方式。而本實驗採用本實驗室成功建立的蛋白質摺疊系統，以準靜過程的方式來進行透析與摺疊蛋白質<sup>1,5,6,7,8</sup>。因為本實驗在摺疊時盡量縮小溶液的初始狀態及末狀態的差異。而透過這樣溶液置換方式，會使的蛋白質一直處於平衡狀態，對於蛋白質來說這樣的過程可以視為近乎靜止的狀態。透過這樣的方式我們不但可以獲得最後摺疊完成的自然態蛋白質，還可得到不同溶液置換階段的中間體，而這些中間體可以幫助我們瞭解蛋白質摺疊過程中結構的變化。而本實驗就將這些中間體及自然態的蛋白質進行實驗分析，而分析的項目分別有測定二級結構比例的圓二色光譜儀、測量摺疊過程中蛋白質粒徑大小變化的動態光散射儀、透過螢光光譜的分析瞭解蛋白質的摺疊



情況及藉由微溫差掃描熱卡路里計來測定蛋白質三及結構的熱穩定性。

## (2) 摺疊中間體與自然狀態之結構與熱穩定性變化

而在CD的分析下<sup>99</sup>，本實驗發現到securin的自然態其二級結構為一個沒有次序的狀態，而且從高pH值 (pH=11) 到接近中性的摺疊中間體的結果來看，發現到在除去變性劑的情況下 (除去urea的環境中) securin就一直維持著沒有次序的狀態，而這樣的結果說明了securin本身可能因為其蛋白質序列的關係，造成其在自然狀態下與環境達成一個平衡狀態時並不具有一個特定結構。對照於DLS的粒徑分析及螢光分析也發現到隨著摺疊緩衝液的改變，蛋白質粒徑有所改變且螢光光譜有紅移的現象，這表示securin蛋白質隨著緩衝液的改變依舊具有摺疊的變化。但是同樣在除去變性劑的情況下，從高pH值 (pH=11) 的緩衝液到接近中性，securin的粒徑大小變化變的不是非常明顯，更加證明在沒有變性劑的情況下，securin隨然有摺疊的情形發生，但是其大部分的結構還是沒有次序而鬆散的。然而在螢光的分析中，我們卻也發現到雖然securin蛋白質在結構上是沒有次序的，但是因為在螢光光譜中隨著摺疊環境的改變，其疏水性胺基酸同樣會因疏水力 (hydrophobic force) 的關係而相互聚集在一起，而造成光譜上有藍位移 (blue shift) 的現象且因其螢光強度 (intensity) 隨著摺疊過程逐漸提高，這樣的結果說明了securin蛋白質在水溶液的環境中同樣具有一個疏水性核心，且這樣的核心可能在摺疊初期就出現了，並且隨著摺疊過程其核心逐漸緊密。

而為了更進一步瞭解在二級結構不具有次序的securin，其三級結構亦是鬆散而不具有穩定結構，本實驗也將各個摺疊中間體及自然體的蛋白質進行微溫差掃描熱卡路里計 (DSC) 的測量<sup>86</sup>，因為當蛋白質的具有一穩定的三級結構時，在加熱的同時比熱的變化 ( $\Delta C_p$ ) 在融點的部份將形成相轉變的波峰。結果本實驗發現到其在加熱的過程中，securin蛋白質的摺疊中間體M1、M2 在含有變性劑的情況下並沒有一個相轉變的波峰存在，這樣的結果符合在有變性劑的情況下蛋白質結構並不穩定。然而當securin摺疊至M3、M4，沒有變性劑的環境中時，我們同樣觀察不到有相轉變的波峰存在。至於在其自然狀態下M5 的情況下，DSC的結果我們有觀察到一個微弱及很寬的波峰，這樣的情況與螢光的結果相比較，我們認為當在摺疊過程中M3、M4 雖然具有一個疏水性核心，但其結構因為pH值及溶液環境 (M4 的緩衝液具有甘露醇) 使其不是非常緊緻，故我們無法在DSC的偵測下觀察到相變波峰。可是在自然狀態下的M5 雖然具有一個較緊緻的疏水性核心，但是其他的結構還是鬆散及非常沒有次序，M5 的DSC分析結果是一個微弱及一個非常寬的相變波峰，而在之前的研究中稱這樣的蛋白質為處在玻璃態 (glassy state) 的情況下<sup>106</sup>。一般來說，一個結構穩定的蛋白質在其摺疊過程中，會有一個穩定的能量最低態，不過因為disordered其分子內胺基酸間的交互作用很弱，進而造成蛋白質三級結構的交互作用也跟著變弱。如此一來蛋白質的結構並不是絕對穩定的，會同時具有許多同樣構形能量最低態 (conformation energy minima)，而這些能量最低態可以共



同存在並且互相轉變，而這樣的情形就稱為玻璃態 (glassy state)。綜合以上的結果，意味著securin不論在二級及三級結構上是沒有次序且為一個不緊密及鬆散的結構。

### (3) 無特定結構蛋白質程式分析結果

而在DisEMBL的分析中<sup>107</sup>，在securin的序列中，具有許多Loop/coils無特定構形的結構，而這樣的結果與CD結果相呼應，證明在securin結構中的確具有高度的無特定構形的結構。此外其中Hot loops的分析也說明這些Loop/coils結構具有高度的移動性，而這樣高度的移動性代表了整體securin結構是不緊緻、鬆散的，而這也合我們DSC的結果相符合，證明其無緊緻的三極結構。綜合DisEMBL各部分的分析，說明securin為一無特定結構的蛋白質。

### (4) Securin 與 disordered 蛋白質

透過我們利用CD、DSC及DisEMBL的分析下<sup>86, 99, 107</sup>，我們發現了securin為一個disordered蛋白質，而這樣的結果符合securin為一個多功能蛋白質 (multiplefunction protein)。因為其結構的不緊緻，讓securin可與許多不同的受質作結合，在結合上具有有極大的包容性。而因為目前許多研究已知道許多無特定結構的蛋白質與細胞週期、轉錄與轉譯的調控有關，而securin也是其中的一員。不過在這些無特定構形蛋白質，雖然在自然環境中其獨立結構是鬆散的，可是其在結合上還是具有一定的結構。而在securin的部分，這樣的結構還是需要去探討的，就是當securin與不同受質結合時，會形成哪些結構。而這些結構是具有一致性呢？還是應映不同的受質其結構也有所不同，而這樣不同的結構又是哪些結構呢？這都需要在更進一步地去瞭解。

## 5-3 Securin 與 p53 之間的關聯

在目前的研究中都將securin認定為一致癌基因 (oncogene)，而它在許多的癌症細胞中都有其高量的表現。另外一方面p53 (tumor suppressor) 已經瞭解其功能與DNA的修復<sup>108</sup>、細胞週期調控<sup>21</sup>及apoptosis等有關<sup>51, 56, 57</sup>。而許多癌症的形成都與p53有相關性<sup>49</sup>，因為當p53失去其原本的功能，會造成原本細胞的正常生理活性被影響，如細胞週期的檢查點 (check point) 無法執行及apoptois的作用失去，一旦細胞的生長及死亡不受到控制，就會造成癌症的發生。而當securin大量表現的時後會抑制細胞凋亡的情況發生，而這樣的情況可能與影響p53的調控有關，不過securin與p53之間的作用關係到目前為止仍然不是非常的清楚。而本實驗透過far western的方式，將p53重新摺疊於membrane上，並去分析它是否和securin之間有關聯。而結果我們發現到在*in vitro*的條件下，securin與p53有相互間的作用。然而因為我們是在membrane上進行實驗，而membrane有可能會提供一個鞏固蛋白質位置的功能，而這樣的功能是否會成為蛋白質相互作用間的cofactor。換言之securin與p53之間可能是直接的作用，亦可能是需要一個cofacotr來幫助兩者之間的連結 (在這裡為membrane，而在生理環境中可能為另一種蛋白質)，而這一部份還需要更進一步的探討，若是兩者之間為直接

的作用，那在作用下兩者是以怎樣的結構存在，而另一方面若是需要一個 cofactor，那在生理環境中又是哪種蛋白質。雖然本實驗無法透過far western的方式瞭解securin是透過怎樣的形態來和p53 作用，不過far western的結果暗示顯著securin的大量表現可能會去影響到p53 的一些生理活性 (圖 5-1)。

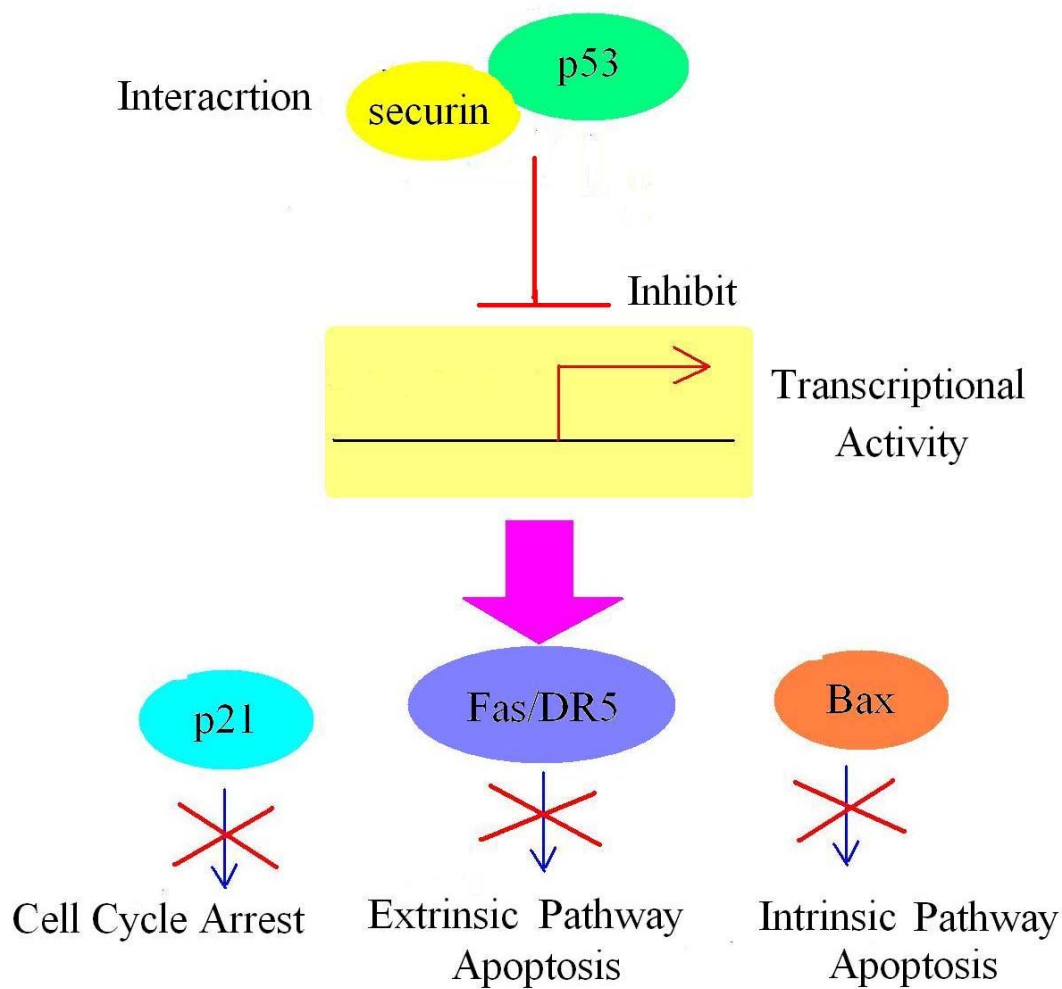


圖 5-1、securin影響p53 功能示意圖<sup>21, 51, 56, 57</sup>。

如在本文一開始所提到securin會和saparase及Ku蛋白質作結合<sup>40</sup>，而這樣的結合所表現出來都是securin的抑制作用，即securin與其他蛋白質的作結合時，可能都會抑制其原有功能的表現，而Bernal<sup>31</sup> 等人與 2003 年Zhou等人的研究中他們已經發現securin可能會與p53 相互間有關聯<sup>62</sup>，而影響到p53 促進基因表現的活性，他們認為主要的方式是抑制p53 與DNA鍵結的能力並造成細胞凋亡的能力失去。而細胞凋亡這個部分主要可能影響的部分包括像是extrinsic pathway 中Fas、DR5 這些受器apoptotic受器的表現<sup>50, 51</sup>，因為這類受器的表現都受到p53 在基因表現上的促進，另外在intrinsic pathway的部分，則是Bax及PUMA這類 pro-apoptotic基因的表現同樣會受到影響。而在securin表現量不正常的細胞中，透過p53 所表現的apoptosis過程則可能會被抑制，如此一來細胞則不會進入細

胞凋亡的程序，取而代之則是繼續存活下去，造成細胞生長不受控制進而轉成癌細胞的生成 (carcinogenesis)<sup>49</sup>。另一方面，我們需要去探討的就是p53 在細胞週期調控上，是否會同樣受到securin影響，其中p21、cyclin B及CDC2 這些細胞調控蛋白質首當其衝<sup>21</sup>。在p21 的部分，其基因的表現同都是受到p53 所促進的，而一但p53 在促進轉錄的活性上被抑制了，則p21 蛋白質的表現同樣會受到影響，如此一來原有細胞週期檢查點的功能則會喪失，因為p21 的表現量降低，相對來說p21 去影響cyclin E及CDC2 這對促進細胞週期運行的蛋白質複合體的能力亦會降低，甚至失去抑制的能力<sup>21</sup>。不過一但securin影響p53 在細胞週期上的調控，同樣可能會促進細胞不斷生長而轉成癌細胞的生成 (carcinogenesis)<sup>60</sup>。

而在p53 存活期 (life time) 的部分，因為p53 的存活受到MDM2 這個蛋白質所調控，而這兩者之間的表現具有回饋控制，即當p53 在細胞中達到一定量的時候會去誘導MDM2 的生成，而MDM2 會去促進p53 的分解，當p53 的量降低時同樣會使MDM2 的表現量降低<sup>109</sup>。而當securin與p53 結合時是否會影響這樣的平衡，像是p53 的分解被抑制，但其活化MDM2 的能力同樣也喪失，讓p53 於細胞中的含量不會有變動，但是同樣不具有功能性的情況出現，亦或是其他的情況發生，這都是需要再深入探討的。而因為securin與p53 之間結合的機制目前依舊不清楚，若是能將這些機制釐清，則在癌症發生的研究及癌症治療上都能夠提供不小的助力。



## 參考文獻

1. Kakar, S. S. (1998) Assignment of the human tumor transforming gene TUTOR1 to chromosome band 5q35.1 by fluorescence in situ hybridization. *Cytogenet. Cell Genet.*, **83**, 93-95.
2. Lodish, H., Berk, A. (1999) *Molecular Cell Biology*, 4 Edition, W. H. Freeman, PP. 496.
3. Michael, B. K., Christine, E. C. and Christopher, J. L. (1995) P53, cell cycle control and apoptosis: Implications for cancer. *Cancer and Metastasis Reviews*, **14**, 3-15.
4. Chang, C. C., Yeh, X. C., Lee, H. T., Lin, P. Y. and Kan, L. S. (2004) Reversible Folding of Lysozyme by a Quasi-static Process: A First-Order-Like State Transition. *Physical Review E*, **70**, 011904.
5. 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.
6. Liu, Y. L., Lee, H. T., Chang, C. C., and Kan, L. S. (2003) Reversible folding of cysteine-rich metallothionein by an over-critical reaction path. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **306**, 59-63.
7. Chang, C. C., Tsai, C. T. and Chang, C. Y. (2002) Structural restoration of inactive recombinant fish growth hormones by chemical chaperonin and solvent restraint approaches. *Protein Eng.*, **15**, 437-441.
8. Chang, C. C., Su, Y. C., Cheng, M. S. and Kan, L. S. (2002) Protein folding by quasi-static-like process-a first order state transition. *Physical Review E*, **66**, 021903.
9. Ackerson, B. J. and Pusey, P. N. (1988) Shear-Induced Order in Suspensions of Hard Spheres. *Phys. Rev. Lett.*, **61**, 1033-1036.
10. Lau, A.W.C., Lin, K. H., and Yodh, A. G. (2002) Entropic interactions in suspensions of semiflexible rods: Short-range effects of flexibility. *Physical Review E*, **66**, 020401.
11. Boris, B., Julian, B. C. (1996) Protein refolding at high concentration using size-exclusion chromatography. *Biotechnol. Bioeng.*, **50**, 15-23.
12. Maeda, Y., Koga, H., Yamada, H., Ueda, T., and Imoto, T. (1995) Effective renaturation of reduced lysozyme by gentle removal of urea. *Protein Eng.*, **8**, 201-205.
13. Chang, C. C., Lin, P. Y., Yeh, X. C., Deng, K. H., Ho, Y. P. and Kan, L. S. (2005) Protein folding stabilizing time measurement: a direct folding process and three-dimensional random walk simulation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **328**, 845-850.

14. Chang, C. C., Cheng, M. S., Su, Y. C., and Kan, L. S. (2003) A first-order-like state transition for recombinant protein folding. *J. Biomol. Struct. Dyn.*, **21**, 247-255.
15. Lengauer, C., Kinzler, K. W. and Vogelstein, B. (1998) Genetic instabilities in human cancers. *Nature*, **396**, 643-649.
16. Lodish, H., Berk, A. (2003) *Molecular Cell Biology*, 5 Edition, W. H. Freeman, PP. 935.
17. Evan, G. I., Vouaden, K. H. (2001) Proliferation, cell cycle and apoptosis in cancer. *Nature*, **411**, 342-348.
18. Hunter, T., Pines, J. (1994) Cyclins and cancer II : Cyclin D and CDK inhibitors come of age. *Cell*, **79**, 573-582.
19. Kurt, W. K., (1999) Molecular Interaction Map of the Mammalian Cell Cycle Control and DNA Repair Systems. *Molecular Biology of the Cell*, **8**, 2703-2734.
20. Nakayama, K. I., et al. (2001) Regulation of the cell cycle at the G1-S transition by proteolysis of cyclin E and p27<sup>Kip1</sup>. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **282**, 853-860.
21. Lodish, H., Berk, A. (1999) *Molecular Cell Biology*, 4 Edition, W. H. Freeman, P.P. 532.
22. Yang, R., Müller, C., Huynh, V., Fung, Y. K., Yee, A. S., Koeffler, H. P. (1999) Functions of cyclin A1 in the cell cycle and its interactions with transcription factor E2F-1 and the Rb family of proteins. *Mol Cell Biol.*, **19**, 2400-2407.
23. Lodish, H., Berk, A. (1999) *Molecular Cell Biology*, 4 Edition, W. H. Freeman, P.P. 527.
24. Zou, H., McGarry, T. J., Bernal, T., Kirschner, M. W. (1999 ) Identification of a vertebrate sister-chromatid separation inhibitor involved in transformation and tumorigenesis. *Science*, **285**, 418-422.
25. Pei, L. and Melmed, S. (1997) Isolation and characterization of a pituitary tumor-transforming gene (PTTG). *Mol. Endocrinol.*, **11**, 433-441.
26. Zhang, X., Horwitz, G. A., Prezant, T. R., et al. (1999) Structure, expression, and function of human pituitary tumor-transforming gene (PTTG). *Mol. Endocrinol.*, **13**, 156-166.
27. Kakar, S. S. (1999) Molecular cloning, genomic organization, and identification of the promoter for the human pituitary tumor transforming gene (PTTG). *Gene*, **40**, 317-324.
28. Yu, R., Melmed, S. (2001) Oncogene activation in pituitary tumors. *Brain Pathol.*, **11**, 328-341.
29. Puri, R., Tousson, A., Chen, L., and Kakar, S. (2001) Molecular cloning of



- pituitary transforming gene 1 from ovarian tumors and its expression in tumors. *Cancer Lett.*, **163**, 131–139.
30. Saez, C., Pereda, T., Borrero, J. J., et al. (2002) Expression of hPTTG protooncogene in lymphoid neoplasias. *Oncogene*, **21**, 8173-8177.
  31. Solbach, C., Roller, M., Fellbaum, C., Nicoletti, M., Kaufmann, M. (2004). PTTG mRNA expression in primary breast cancer: a prognostic marker for lymph node invasion and tumor recurrence. *Breast*, **13**, 80-81.
  32. Heaney, A. P., Singson, R, McCabe, C. J., Nelson, V., Nakashima, M., and Melmed, S. (2000) Expression of pituitary-tumour transforming gene in colorectal tumours. *Lancet.*, **355**, 716-719.
  33. Zhang, X., Horwitz, G. A., Heaney, A. P., et al. (1999). Pituitary tumor transforming gene (PTTG) expression in pituitary adenomas. *J. Clin. Endocrinol Metab.*, **84**, 761-767.
  34. Heaney, A. P., Nelson, V., Fernando, M., Horwitz, G. (2001) Transforming events in thyroid tumorigenesis and their association with follicular lesions. *J. Clin. Endocrinol Metab.*, **86**, 5025-5032.
  35. Boelaert, K., McCabe, C. J., Tannahill, L. A., Gittoes, N. J., et al. (2003) Pituitary tumor transforming gene and fibroblast growth factor-2 expression: potential prognostic indicators in differentiated thyroid cancer. *J. Clin. Endocrinol Metab.*, **88**, 2341-2347.
  36. Ishikawa, H., Heaney, A. P., Yu, R., Horwitz, G. A., and Melmed, S. (2001) Human pituitary tumor-transforming gene induces angiogenesis. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **86**, 867-874.
  37. Pei, L. (2001) Identification of c-myc as a down-stream target for pituitary tumor-transforming gene. *J. Biol. Chem.*, **276**, 8484-8491.
  38. Chen, L., Puri, R., Lefkowitz, E., and Kakar, S. (2000) Identification of the human pituitary tumor transforming gene (hPTTG) family: Molecular structure, expression and chromosomal localization. *Gene*, **248**, 41–50.
  39. Peters, J. M. (2002) The Anaphase-Promoting Complex: Proteolysis in Mitosis and Beyond. *Molecular Cell*, **9**, 931-943.
  40. Romero, F., Multon, M. C., Ramos-Morales, F., Dominguez, A., Bernal, J. A., Pintor-Toro, J. A., Tortolero, M. (2001) Human securin, hPTTG, is associated with Ku heterodimer, the regulatory subunit of the DNA-dependent protein kinase. *Nucleic. Acids Res.*, **29**, 1300-1307.
  41. Jallepalli, P., Waizenegger, I., Bunz, F., et al. (2001). Securin is required for chromosomal stability in human cells. *Cell*, **105**, 445-457.
  42. Yu, R., Ren, S. G., Horwitz, G. A., Wang, Z., Melmed, S. (2000) Pituitary tumor transforming gene (PTTG) regulates placental JEG-3 cell division and survival:



- evidence from live cell imaging. *Mol. Endocrinol.*, **14**,1137-1146.
43. Yu, R., Heaney, A.P., Lu, W., Chen, J., Melmed, S. (2000) Pituitary tumor transforming gene causes aneuploidy and p53-dependent and p53-independent apoptosis. *J. Biol. Chem.*, **275**, 36502-36505.
  44. Wu, X., Lieber, M. R. (1996) Protein-protein and protein-DNA interaction regions within the DNA end-binding protein Ku70-Ku86. *Mol. Cell Biol.*, **16**, 5186-5193.
  45. Koike, M., Awaji, T., Kataoka, M., et al. (1999) Differential subcellular localization of DNA-dependent protein kinase components Ku and DNA-PKcs during mitosis. *J. Cell Sci.*, **112**, 4031-4039.
  46. Ramsden, D. A., Gellert, M. (1998) Ku protein stimulates DNA end joining by mammalian DNA ligases: a direct role for Ku in repair of DNA double-strand breaks. *Embo. J.*, **17**, 609-614.
  47. Gottlieb, T. M., Jackson, S. P. (1993) The DNA-dependent protein kinase: requirement for DNA ends and association with Ku antigen. *Cell*, **72**, 131-142.
  48. Romero, F., Multon, M.C., Ramos-Morales, F., et al. (2001) Human securin, hPTTG, is associated with Ku heterodimer, the regulatory subunit of the DNA-dependent protein kinase. *Nucleic. Acids Res.*, **29**, 1300-1307.
  49. Susan, H., Michael, B., Zehavit, G. and Ygal, H. (2003) Apoptosis – the p53 network. *Journal of Cell Science*, **116**, 4077-4085.
  50. Nagata, S. and Golstein, P. (1995). The Fas death factor. *Science*, **267**, 1449-1456
  51. Wu, G. S., Burns, T. F., McDonald, E. R., et al. (1997) KILLER/DR5 is a DNA damage-inducible p53-regulated death receptorgene. *Nat. Genet.* **17**, 141-143.
  52. Nagata S. (1999) Fas ligand-induced apoptosis. *Annu Rev Genet* **33**, 29-55.
  53. Beni, B. W. and Douglas, R. G. (1999) Suicidal Tendencies: Apoptotic Cell Death by Caspase Family Proteinases. *J. Biol. Chem.*, **274**, 20049-20052.
  54. Adams, J. M. and Cory, S. (2002) Apoptosomes: engines for caspase activation. *Curr. Opin. Cell Biol.*, **14**, 715-720.
  55. Bouillet, P. and Straser, A. (2002) BH3-only proteins – evolutionarily conserved pro-apoptotic Bcl-2 family members essential for initiating programmed cell death. *J. Cell Sci.*, **115**, 1567-1574.
  56. Muller, M., Wilder, S., Bannasch, D., Israeli, D., Lehlbach, K., Li-Weber, M., Friedman, S. L., Galle, P. R., Stremmel, W., Oren, M. et al. (1998) p53 activates the CD95 (APO-1/Fas) gene in response to DNA damage by anticancer drugs. *J. Exp. Med.*, **188**, 2033-2045.
  57. Bennett, M., Macdonald, K., Chan, S.W., Luzio, J. P., Simari, R. and Weissberg, P. (1998). Cell surface trafficking of Fas: a rapid mechanism of p53-mediated

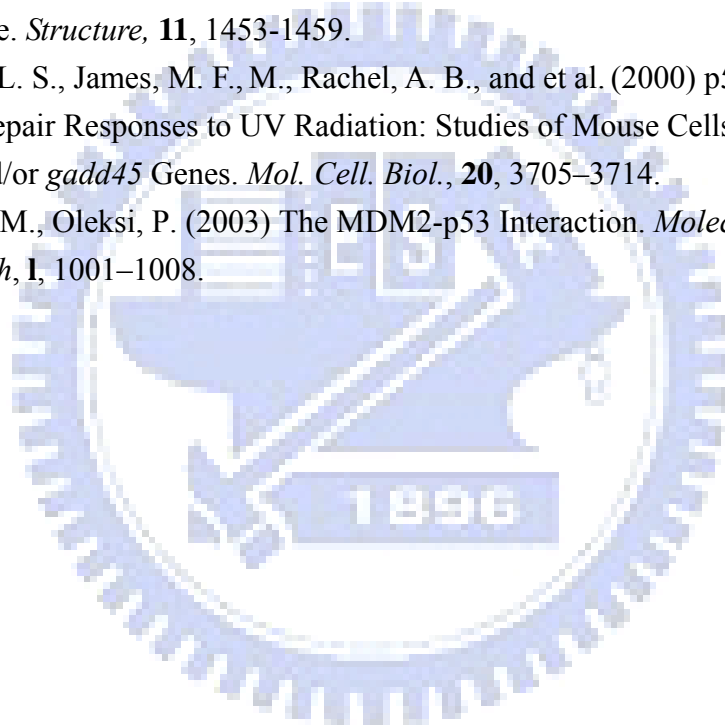
- apoptosis. *Science*, **282**, 290-293.
58. Thornborrow, E. C., Patel, S., Mastropietro, A. E., Schwartzfarb, E. M. and Manfredi, J. J. (2002) A conserved intronic response element mediates direct p53-dependent transcriptional activation of both the human and murine bax genes. *Oncogene*, **21**, 990-999.
  59. Yu, J., Zhang, L., Hwang, P., Kinzler, K. W. and Vogelstein, B. (2001) PUMA induces the rapid apoptosis of colorectal cancer cells. *Mol. Cell*, **7**, 673-682.
  60. Yu, R., Lu, W., Chen, J., McCabe, C. J., Medmed, S. (2003). Overexpressed pituitary tumor transforming gene causes aneuploidy in live human cells. *Endocrinology*, **144**, 4991-4998.
  61. Bernal, J. A., Luna, R., Espina, A., et al. (2002) Human securin interacts with p53 and modulates p53-mediated transcriptional activity and apoptosis. *Nat. Genet.*, **32**, 306-311.
  62. Zhou, Y., Mehta, K. R., Choi, A. P., Scolavino, S., and Zhang, X. (2003) DNA damage-induced inhibition of securin expression is mediated by p53. *J. Biol. Chem*, **278**, 462-470.
  63. Pei, L. (2001) Identification of c-myc as a down-stream target for pituitary tumor-transforming gene. *J. Biol. Chem.*, **276**, 8484-8491.
  64. Henriksson, M., Luscher, B. (1996) Proteins of the Myc network: essential regulators of cell growth and differentiation. *Adv. Cancer Res.*, **68**, 109-82.
  65. Hamid, T. and Kakar, S. S. (2004) PTTG/securin activates expression of p53 and modulates its function. *Mol. Cancer*, **3**, 18-32.
  66. Cohen-Fix, A., Peters, J. M., Kirschner, M. and Koshland, D. (1996) Anaphase initiation in *Saccharomyces cerevisiae* is controlled by the APC-dependent degradation of the anaphase inhibitor Pds1p. *Genes Dev.*, **15**, 3081-3093.
  67. Funabiki, H., Yamano, H., Nagao, K., et al. (1997) Fission yeast Cut2 required for anaphase has two destruction boxes. *EMBO J.*, **19**, 5977-5987.
  68. Zur, A, Brandeis, M. (2001) Securin degradation is mediated by fzy and fzr, and is required for complete chromatid separation but not for cytokinesis. *Embo J.*, **20**,792-801
  69. Pei, L. (2000) Activation of mitogen-activated protein kinase cascade regulates pituitary tumor-transforming gene transactivation function. *J. Biol. Chem.*, **275**, 31191-31198
  70. Wang, Z., Melmed, S. (2000) Pituitary tumor transforming gene (PTTG) transforming and transactivation activity. *J. Biol. Chem.*, **275**, 7459-7461.
  71. Funabiki, H., Kumada, K. & Yanagida, M. (1996b) Fission yeast Cut1 and Cut2 are essential for sister chromatid separation, concentrate along the metaphase spindle and form large complexes. *EMBO J.*, **15**, 6617-6628.

72. Kumada, K., Nakamura, T., Nagao, K., et al. (1998) Cut1 is loaded onto the spindle by binding to Cut2 and promotes anaphase spindle movement upon Cut2 proteolysis. *Curr. Biol.*, **8**, 633-641.
73. Kendrew, J. C., Bodo, G., Dintzis, H. M., Parrish, R. G., et al. (1958). A threedimensional model of the myoglobin molecule obtained by X-ray analysis. *Nature*, **181**, 662-666.
74. Wright, P. E. and Dyson, H. J. (1999) Intrinsically Unstructured Proteins: Re-assessing the Protein Structure-Function Paradigm. *J. Mol. Biol.*, **293**, 321-331.
75. BoÈsch, C., Bundi, A., Oppliger, M. and WuÈthrich, K. (1978). <sup>1</sup>H nuclear-magnetic-resonance studies of the molecular conformation of monomeric glucagon in aqueous solution. *Eur. J. Biochem.*, **91**: 209-214.
76. Tan, R., Frankel, A. D. (1994). Costabilization of peptide and RNA structure in an HIV Rev peptide-RRE complex. *Biochemistry*, **33**, 14579-14585.
77. Battiste, J. L., Mao, H. Y., Rao, N. S., et al. (1996)  $\alpha$ -Helix-RNA major groove recognition in an HIV-1 Rev peptide RRE RNA complex. *Science*, **273**, 1547-1551.
78. Puglisi, J. D., Chen, L., Blanchard, S. and Frankel, A. D. (1995). Solution structure of a bovine immunodeficiency virus Tat-TAR peptide-RNA complex. *Scienc.*, **270**, 1200-1203.
79. Ye, S., Kumar, R. A., and Patel, D. J. (1995) Molecular recognition in the bovine immunodeficiency virus Tat peptide-TAR RNA complex. *Chem. Biol.*, **2**, 827-840.
80. Mogridge, J., Legault, P., Li, J., Van, O., et al. (1998) Independent ligand-induced folding of the RNA-binding domain and two functionally distinct antitermination regions in the phage lambda N protein. *Mol. Cell*, **1**, 265-275.
81. Yonath, A. and Franceschi, F. (1997) New RNA recognition features revealed in ancient ribosomal proteins. *Nature Struct. Biol.*, **4**, 3-5.
82. Markus, M. A., Hinck, A. P., Huang, S. R., et al. (1997). High resolution solution structure of ribosomal protein L11-C76, a helical protein with a flexible loop that becomes structured upon binding to RNA. *Nature Struct. Biol.*, **4**, 70-77.
83. Hershey, P. E., McWhirter, S. M., Gross, J. D., et al. (1999) The cap-binding protein eIF4E promotes folding of a functional domain of yeast translation initiation factor eIF4G1. *J. Biol. Chem.*, **274**, 21297-21304.
84. Fletcher, C. M., McGuire, A. M., Gingras, A. C., et al. (1998). 4E binding proteins inhibit the translation factor eIF4E without folded structure. *Biochemistry*, **37**: 9-15.
85. Kriwacki, R. W., Hengst, L., Tennant, L., et al. (1996) Structural studies of p21Waf1/Cip1/Sdi1 in the free and Cdk2-bound state: conformational disorder

- mediates binding diversity. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **93**, 11504-11509.
86. Chang, C. C., Lin, C. S., Chen, M. C., Liu, Y. C., Huang, Y. F., Lin, P. Y., Chen Y. F., Chang, C. S., Kan, L. S. (2006) Folding and Structural Characterization of Recombinant Cyclin-dependent Kinase Inhibitor p21<sup>(Cip1, Waf1, Sdi1)</sup>. *Biophysical Reviews and Letters*, **1**, 45-56.
  87. Pavletich, N. P. (1999) Mechanisms of cyclin-dependent kinase regulation: structures of Cdks, their cyclin activators, and Cip and INK4 inhibitors. *J. Mol. Biol.*, **287**, 821-828.
  88. Johnson, D. G. and Walker, C. L. (1999) Cyclins and cell cycle checkpoints. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, **39**, 295-312.
  89. Peter, E. W., Dyson, H. J. (1999) Intrinsically Unstructured Proteins: Re-assessing the Protein Structure-Function Paradigm. *J. Mol. Biol.*, **293**, 321-331.
  90. Spolar, R. S. & Record, M. T. (1994). Coupling of local folding to site-specific binding of proteins to DNA. *Science*, **263**, 777-784.
  91. Sanchez, P. N., Veprintsev, D. B., Fersht, A. R. (2005) Human full-length Securin is a natively unfolded protein, *Protein Sci.*, Jun, **14**, 1410-1418,
  92. Wright, P. E. and Dyson, H. J. (1999). Intrinsically unstructured proteins: Reassessing the protein structure–function paradigm. *J. Mol. Biol.*, **293**, 321–331.
  93. Dunker, A. K., Brown, C. J., Lawson, J. D. (2002). Intrinsic disorder and protein function. *Biochemistry*, **41**, 6573–6582.
  94. Bret, A. S. Protein stability and folding: Theory and practice. Humana Press. Humana Press, 1st edition.
  95. Lowe, G. (1970). The structure and mechanism of action of papain. *Philos. Trans. R. Soc. Lond B. Biol. Sci.*, **257**, 237-248.
  96. Arakawa, T., Timasheff, S. N. (1984) Protein stabilization and destabilization by guanidinium salts. *Biochemistry*, **23**, 5924–5929.
  97. Baum, J., Dobson, C. M., Evans, P. A., Hanley, C. (1989) Characterization of a partly folded protein by NMR methods: studies on the molten globule state of guinea pig alpha-lactalbumin. *Biochemistry*, **28**, 7-13.
  98. Maeda, Y., Koga, H., Yamada, H., Ueda, T., et al. (1995) Effective renaturation of reduced lysozyme by gentle removal of urea. *Protein Eng.*, **8**, 201-205.
  99. Chang, C. T., Wu, C. S., Yang, J. T. (1978) Circular dichroic analysis of protein conformation: inclusion of the beta-turns. *Anal. Biochem.*, **91**, 13-31
  100. Leffingwell, C. J., (2003) Chirality and Bioactivity I. *Pharmacology*. Leffingwell Reports, **3**, 1-27.
  101. Boelens, M. H., Boelens, H., van Gemert, L. J.. (1993) Sensory properties of optical isomers. *Perfumer and Flavorist*, **18**, 1-15.
  102. Lakowicz, J. R. (1983) *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, Plenum Press,

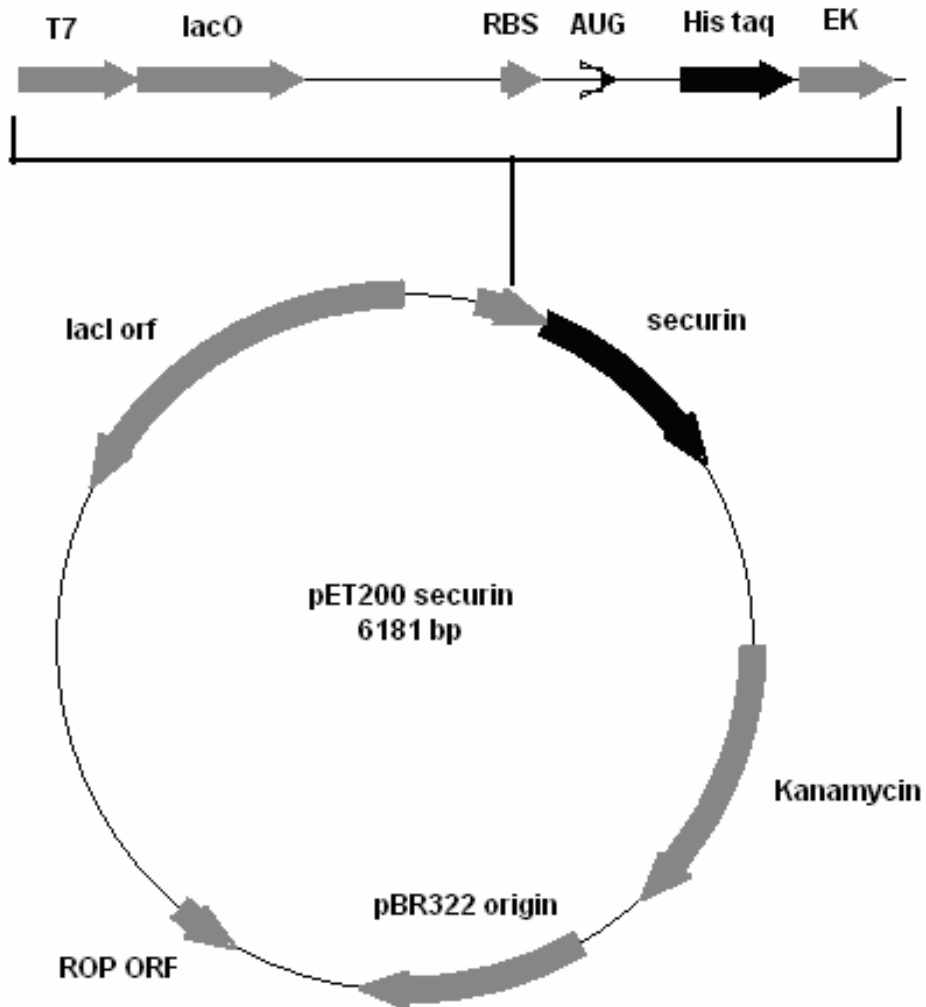
New York.

103. Privalov, P. L., Khechinashvili, N. N. (1974) A thermodynamic approach to the problem of stabilization of globular protein structure: a calorimetric study. *J. Mol. Biol.*, **86**, 665-684.
104. Yadav, S., Ahmad, F. (2000) A new method for the determination of stability parameters of proteins from their heat-induced denaturation curves. *Anal. Biochem.*, **283**, 207-213
105. Sreerama, N., Woody, R. W. (1993) A self-consistent method for the analysis of protein secondary structure from circular dichroism. *Anal. Biochem.*, **209**, 32-44.
106. Bryngelson, J. D., Wolynes P. G. (1987) Spin glasses and the statistical mechanics of protein folding. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **84**, 7524-7528.
107. Linding, R., Jensen, L. J., Diella, F., Bork, P., Gibson, T. J. and Russell, R. B. (2003) Protein disorder prediction: implications for structural proteomics Structure. *Structure*, **11**, 1453-1459.
108. Martin, L. S., James, M. F., M., Rachel, A. B., and et al. (2000) p53-Mediated DNA Repair Responses to UV Radiation: Studies of Mouse Cells Lacking *p53*, *p21*, and/or *gadd45* Genes. *Mol. Cell. Biol.*, **20**, 3705–3714.
109. Ute, M. M., Oleksi, P. (2003) The MDM2-p53 Interaction. *Molecular Cancer Research*, **1**, 1001–1008.



## 附錄

圖 1: 質體 pET200 securin 架構圖。



本實驗是以 pET200 為主要的表現質體，其上接有 securin 的基因。本質體是用 T7 promoter 來負責基因的調控，其後有 RBS (ribosomal binding site)、AUG (轉譯起始密碼) 及 EK (內切酶的辨識序列)。



**Table 1: 蛋白質復性緩衝液配方。**

	Tris-base (mM)	pH	Urea (M)	DTT (mM)	Mannitol (%)	Pefabloc. (mM)
Denature Buffer	10	11	4.5	100	0.1	0.5
Folding Buffer 1	10	11	2	0.1	0.1	0.5
Folding Buffer 2	10	11	1	0.1	0.1	0.5
Folding Buffer 3	10	8.8	-	0.1	0.1	0.5
Folding Buffer 4	10	8.8	-	0.1	0.1	0.5
Folding Buffer 5	10	8.8	-	0.1	-	0.5

Table 2: Hpttg家族蛋白質序列比對<sup>38</sup>。

hpttg1	MATLIYVDKE	NGEPGTRVVA	KDGLKLGSGP	SIKALDGRSQ	VSTPE
hpttg3	MATLIYVDKE	NEEPGILVAT	KDGLKLGSGP	SIKALDGRSQ	VSISC
hpttg2	MATLIYVDKE	IGEPGTRVAA	KDVLKLESRP	SIKALDGTISO	VLTFR
hpttg1	FGKTFDAPP	LPKATRKA LG	TVNRATEKSV	KTKGPLKQKQ	PSFSA
hpttg3	FGKTFDAPT	LPKATRKA LG	TVNRATEKSV	KTNGPLKQKQ	PSFSA
hpttg2	FGKTFDAPSA	LPKATRKA LG	TVNRATEKSV	KTNGPRKQKQ	PSFSA
hpttg1	KMTEKTVKA	KSSVPASDDA	YPEIEKFFPF	NPLDFESFDL	PEEHQ
hpttg3	KMTEKTVKA	KNSVPASDDG	YPEIEKFFPF	NPLGFESFDL	PEEHQ
hpttg2	KMTEKTVKT	KSSVPASDDA	YPEIEKFFPF	NLLDFESFDL	PEERQ
hpttg1	IAHLPLSGVP	LMILDEEREL	EKLFQLGPPS	PVKMPSPPE	SNLLQ
hpttg3	IAHLPLSEVP	LMILDEEREL	EKLFQLGPPS	PLKMPSPPK	SNLLQ
hpttg2	IAHLPLSGVP	LMILDEEGEL	EKLFQLGPPS	PVKMPSPPE	CNLLQ
hpttg1	SPSSILSTLD	VELPPVCCDI	DI*		
hpttg3	SPLSILSTLD	VELPPVCSDI	DI*		
hpttg2	SPSSILSTLD	VELPAVCYDI	DI*		

Table中為securin家族成員在蛋白質序列上的比較<sup>38</sup>，分別是PTTG 1、PTTG 2及PTTG 3。Securin、PTTG 2和PTTG 3它們的胺基酸序列有將近80%的相似度，PTTG 2不論是在癌症細胞株或是正常的細胞中都有表現，而PTTG 3則是只能在癌症細胞株中發現。到目前為止，PTTG 2及PTTG 3的功能依舊不是非常的清楚。

