

國立政治大學神經科學研究所

碩士論文

Hes-1 的類小泛素化修飾可調節 Hes-1 蛋白質的穩定及
GluR1 的表現

Sumoylation of Hes-1 regulates the protein stability of Hes-1
and GluR1 expression

研究生：許芳芸 撰
指導教授：李小媛 博士
趙知章 博士

中華民國 101 年 7 月 26 日

誌謝

兩年的研究所生涯，就這樣完美的劃上句點，最要感謝指導教授在這段時間不論是生活上或是研究上給予我的指導及啟發，提供給我一個很好的研究環境，讓我可以向一群優秀的學長姐們學習。最後，要感謝口試委員針對論文的缺失給予我寶貴意見，使論文能更完善。

在這兩年的過程中，感謝實驗室學長姊們在實驗上給予我最大的鼓勵，協助我尋找方向。謝謝馨瑩學姊、瑞徵學長、正雄學長、大倫學長、紹宇學長、彥呈學長、定佑學長、彥竹學長、治傑學長，一個步驟一個步驟不厭其煩的耐心指導，並且在每一次我對課業及實驗上產生疑惑的時候，協助我一起解決問題。同時，也要感謝馬哥在動物實驗上的協助。除了，實驗上及課業上，也非常謝謝學長姊們在這段期間對我生活上的照顧，讓我的碩士生涯在歡樂中度過。沒有實驗室學長姊們以及老師的耐心指導，就沒有這篇論文的誕生。此外，也要感謝神經科學研究所所辦的于姐，協助我處理許多文書上的問題。

最後感謝我的家人對我的栽培及全心全意的支持著我，讓我能朝著目標前進，同時也要感謝我身旁的朋友們以及認識我的學長姊們給予我最大的支持與鼓勵，在我每一次面對挫折及壓力的時候，陪著我調整腳步重新出發。最後在此感謝碩士生涯這段時間所有幫助過我及關心我的人，謹以此論文獻給你們。

中文摘要

轉譯後修飾作用 (post-translational modifications) 包含甲基化 (methylation)、磷酸化 (phosphorylation)、泛素化 (ubiquitination)、類小泛素化修飾 (sumoylation) 等。過去有研究指出類小泛素化修飾可以調節目標蛋白質的穩定度，進而調節許多細胞內反應，例如：細胞核運輸作用、DNA 複製、調節轉錄作用、染色體分離、訊息傳遞、細胞週期調控、DNA 修補作用等現象。類小泛素化修飾是藉由一系列的酵素，使類小泛素這個蛋白質能夠修飾目標蛋白質的 lysine 殘基。類小泛素化修飾是一個可逆性動態修飾過程，類小泛素化修飾連結途徑包含有三個主要的步驟：活化 (activation)，結合 (conjugation)，連接 (ligation)，它們分別是藉由 E1、E2 和 E3 這三種不同的酵素催化的。本篇研究主要是藉由類小泛素 E3 連接酶 PIAS1 進行修飾作用，我們發現 *Hairy and Enhancer of split 1* (Hes-1) 蛋白質可被類小泛素修飾。若將類小泛素 E3 連接酶 PIAS1 突變，就無法讓野生型 Hes-1 進行類小泛素修飾化，證實 PIAS1 的參與對於類小泛素化修飾扮演重要的角色。除此之外，將類小泛素目標蛋白質 Hes-1 序列上第八個位置的 lysine 突變，會抑制 Hes-1 進行類小泛素化修飾。因此，透過 PIAS1 所進行的類小泛素化修飾可以使目標蛋白質 Hes-1 蛋白質更為穩定。之後更進一步探討在空間學習與記憶中，Hes-1 進行類小泛素化修飾與 GluR1 蛋白質表現的關係。實驗結果顯示，Hes-1 進行類小泛素化修飾使空間學習與記憶變差並使 GluR1 蛋白質表現下降。

Abstract

There are several post-translational modifications including methylation, phosphorylation, ubiquitination, sumoylation, etc. Previously studies indicated that sumoylation can regulate target protein stability. Sumoylation also modulates many cellular processes, including nuclear transport, DNA replication, transcription, chromosome segregation, signal transduction, cell cycle and DNA repair. Sumoylation is a process mediated by SUMOs which are attached to specific lysine residues of target proteins by the action of a series of enzymes. Sumoylation is a dynamically reversible process. Sumoylation consists of three steps: activation, conjugation and ligation, which are respectively mediated by E1, E2 and E3 ligase. This study focuses on SUMO modification by E3 ligase. Here, we identified a new target protein, *Hairy and Enhancer of split 1* (Hes-1), for SUMO conjugation. The E3 ligase deficient mutant of PIAS1 that leads to failure of Hes-1 protein sumoylation. We demonstrated that PIAS1 is involved in SUMO modification of Hes-1. In addition mutation of Hes-1 protein on lysine 8 residue that inhibits the sumoylation of Hes-1. Therefore, sumoylation of Hes-1 regulates the protein stability of Hes-1. Further study of the relationship between sumoylation of Hes-1 and GluR1 in spatial memory formation indicated that spatial memory is impaired and GluR1 protein expression is decreased upon sumoylation of Hes-1.

目 錄

誌 謝	I
中文摘要.....	II
英文摘要.....	III
目 錄	IV
圖 次	VII
英文縮寫表.....	VIII
第一章、緒論	1
第一節、學習與記憶.....	2
一、學習與記憶的定義.....	2
二、學習與記憶的種類.....	2
三、參與學習與記憶的腦區.....	3
第二節、空間學習記憶與海馬迴組織.....	4
一、海馬迴的構造與投射路徑.....	4
二、海馬迴相關的動物行為模式.....	5
第三節、Hes-1蛋白質介紹.....	6
一、Hes-1基因結構與轉錄活性.....	6
二、Hes-1基因表現的訊號調控.....	7
三、Hes-1基因在神經發育系統的表現.....	8
第四節、類小泛素化修飾.....	9
一、類小泛素結構與分類.....	9
二、類小泛素可逆性修飾途徑.....	10
三、類小泛素化修飾的功能.....	12
第五節、類小泛素E3連接酶PIAS1蛋白質介紹.....	14
一、PIAS家族介紹.....	14
二、PIAS結構介紹與類小泛素化修飾的關係.....	14
第六節、本論文之研究目的及策略.....	16
第二章、實驗材料與方法.....	17
第一節、細胞培養 (Cell culture).....	18
一、細胞解凍.....	18

二、細胞培養.....	18
三、冷凍細胞.....	18
第二節、細胞轉染 (Transfection).....	19
一、細胞轉染.....	19
二、蛋白質均質液的萃取.....	19
第三節、西方墨點法 (Western blot).....	19
一、蛋白質濃度測定及樣本配製.....	19
二、硫酸十二酯鈉聚丙醯胺凝膠製備.....	20
三、膠體電泳.....	21
四、蛋白質電泳轉漬法.....	21
五、免疫染色法.....	21
第四節、共同免疫沈澱法 (Co-immunoprecipitation, Co-IP).....	22
第五節、構建質體 (Plasmid construction).....	22
一、聚合酶連鎖反應及構建質體.....	22
二、轉型.....	22
三、小量質體 DNA 的抽取.....	23
四、建構定點突變之質體.....	24
五、菌液的保存.....	24
第六節、蛋白質穩定分析 (Protein stability assay).....	24
第七節、實驗動物 (Experimental animals).....	24
第八節、海馬迴內基因轉染作用 (transfection).....	25
一、立體定位手術與埋管.....	25
二、質體基因與聚乙烯亞胺混合物的製備.....	25
三、海馬迴 CA1 區域注射.....	25
第九節、動物行為實驗：莫氏水迷津實驗 (Morris water maze).....	26
一、水迷津試驗器材.....	26
二、隱藏式平台水迷學習津試驗.....	26
三、分離腦組織.....	27
四、腦組織蛋白質萃取.....	27
五、海馬迴組織之免疫沈澱與西方墨點法.....	27

第十節、藥物的製備 (Preparation of drugs).....	27
第十一節、統計分析 (Statistics).....	28
第三章、實驗結果	29
第一節、Hes-1 透過 PIAS1 進行類小泛素化修飾.....	30
第二節、探討類小泛素化修飾 Hes-1 的 lysine 位置.....	33
第三節、類小泛素修飾化影響 Hes-1 蛋白質穩定度.....	37
第四節、類小泛素修飾化影響內生性 Hes-1 蛋白質的穩定度	42
第五節、Hes-1 透過 PIAS1 進行類小泛素化修飾影響 Hes-1 蛋白質穩定度	49
第六節、Hes-1 進行類小泛素化修飾調節空間學習記憶及海馬迴 CA1 區域 GluR1 蛋白質的表現.....	57
第四章、討論	60
第五章、結論	70
參考文獻.....	72
附錄.....	82
附錄一、Hes-1 基因的 conserved domains.....	82
附錄二、類小泛素化修飾連結途徑.....	83
附錄三、PIAS1 結構.....	84
附錄四、Hes-1 蛋白質穩定度.....	85

圖次

圖1、HEK293T 細胞內生性 Hes-1 蛋白質可透過 PIAS1 進行類小泛素化修飾。.....	31
圖2、探討 Hes-1 蛋白質上可被類小泛素修飾的 lysine 位置。.....	35
圖3、依據濃度梯度轉染四種不同濃度之 Hes-1 質體，測定 Hes-1 蛋白質在 HEK293T 細胞的表現。.....	38
圖4、類小泛素化修飾影響 Hes-1 蛋白質的穩定度。.....	40
圖5、HEK293T 細胞內 Hes-1 蛋白質透過 PIAS1 進行類小泛素化修飾對於其內生性 Hes-1 蛋白質穩定度的影響。.....	44
圖6、抑制細胞內 PIAS1 進而抑制 Hes-1 蛋白質的穩定度。.....	47
圖7、同時轉染野生型 PIAS1 及野生型 Hes-1 或是突變型 Hes-1 質體，觀察 Hes-1 蛋白質的穩定。.....	51
圖8、同時轉染 SUMO1 質體及 PIAS1 質體及野生型 Hes-1 或是突變型 Hes-1，觀察被類小泛素修飾後 Hes-1 蛋白質穩定度。.....	53
圖9、Hes-1 蛋白質透過 PIAS1 進行類小泛素化修飾而調節 Hes-1 蛋白質穩定度。.....	55
圖10、大白鼠海馬迴 CA1 區域內轉染 Hes-1 可抑制大白鼠的空間學習記憶能力。.....	58

英文縮寫表

AD : acid domain
Ala (A) : alanine
AMPA : α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid
ANOVA : analysis of variance
Arg (R) : arginine
Asn (N) : asparagine
APS : ammonium persulfate
bHLH : basic helix-loop-helix
BSA : bovine serum albumin
BMP : bone morphogenic protein
CA1 : cornu ammonis 1
CaMK II : Ca^{2+} /calmodulin-dependent kinase II
CNS : central nerve system
Cys (C) : cystine
CHX : cycloheximide
CMV : cytomegalovirus
DNA : deoxyribonucleic acid
DMSO : dimethyl sulfoxide
DMEM : Dulbecco's Modified Eagles Medium
EGFP : enhanced green fluorescent protein
FBS : fetal bovine serum
GluR1 : glutamate receptor 1
HA : hemagglutinin A
Hes-1 : *Hairy and Enhancer of split 1*
HEK293T : human embryonic kidney 293T
ICD : intracellular domain
Ile (I) : isoleucine
IP : immunoprecipitation
JNK1 : c-Jun N-terminal kinase 1
kDa : kilodalton
 μ g : microgram
 μ l : microliter
mRNA : messenger RNA

NDSM : negatively charged amino acid dependent SUMO motif
NMDA : N-methyl-D-aspartate
NSCs : neuron stem cells
Lys (K) : lysine
PBS : phosphate buffered saline
PCR : polymerase chain reaction
PDSM : phosphorylation-dependent SUMO motif
PIAS1 : protein inhibitor of activated signal transducer and activators of transcription 1
PINIT : Pro-Ile-Asn-Ile-Thr
Pro (P) : proline
PVDF : polyvinylidene fluoride membrane
RLD : RING finger like zinc binding domain
RNA : ribonucleic acid
SAP : scaffold attachment factor-A/B/acinus/PIAS
SD : Sprague-Dawley
SDS : sodium dodecyl sulfate
SDS-PAGE : SDS-PolyAcrylamide Gel Electrophoresis
Ser (S) : serine
SENP : sentrin-specific proteases
Shh : sonic hedgehog
siRNA : small interfering RNA
STAT1 : signal transducer and activators of transcription 1
SUMO : Small ubiquitin-like modifier
TEMED : tetramethylethylenediamine
Thr (T) : threonine
Trp (W) : tryptophan
Ubc9 : ubiquitin-conjugating 9
WRPW : Trp-Arg-Pro-Trp



第一章 緒論

第一節 學習與記憶

一、學習與記憶的定義

對人類而言，學習與記憶 (learning and memory) 是最重要的心智活動過程。尤其現代人身處在資訊爆炸的社會裡，幾乎是無時無刻都在學習接受新事物的刺激。學習是中樞神經系統接受感官傳來的訊息隨著時間及經驗的累積而逐漸改變行為的反應；而記憶則是保留學習的成果，將接收到的訊息儲存及再回憶 (recall) 的機制。此機制的重要性在於當再次碰到同樣狀況的時候，能夠讓個體迅速做出適當的反應，而避免上一次的失敗或錯誤再發生。因此，學習與記憶兩者的關係相當密切。目前已知，中樞神經系統可將接收到訊息分別在不同腦區中進行處理，例如：空間學習記憶與海馬迴 (hippocampus) 有關 (Morris et al., 1996)；恐懼學習記憶與杏仁核 (amygdala) 有關 (Bear et al., 2001c)。然而，學習與記憶是一個複雜的歷程，隨著近代研究工具及分子生物醫學的快速進展，除了過去所探討的哲學與認知心理學的研究，近年來科學家進一步從細胞內基因與訊息調控的方向著手，試圖瞭解這個複雜的機制。

二、學習與記憶的種類

記憶形成的過程包含四個階段：編譯 (encoding)、儲存 (storage)、穩固 (consolidation)、提取 (retrieval)。中樞神經系統接受來自感官系統的各種訊息後，在大腦將訊息轉換成特殊的編譯。為了儲存的需要，將記憶做各種不同的轉換儲存至記憶系統。當再次遇到相同的狀況時，儲存在大腦內的記憶重新被提取，倘若這些環節中有任何一個出問題，都會使記憶被遺忘。

早期認知心理學家將記憶的歷程依據儲存在大腦時間的長短區分為立即記憶 (immediate memory)、短期記憶 (short-term memory)、長期記憶 (long-term memory)。立即記憶為感官系統受到外界刺激後所得到的印象，只能持續數秒鐘，若沒有特別的記住並儲存在大腦便很快會忘記。短期記憶可以透過細胞內原有的一些蛋白質活化在短時間內改變細胞間的交互作用，因此短期記憶可以持續數分鐘至數小時。長期記憶則可以持續數天到數個月，甚至終其一生。從短期記憶到長期記憶是需要經過記憶的穩固歷程 (memory consolidation) 參與，也就是所謂的記憶形成 (memory formation)。經由神經元相關基因的表現、蛋白質合成以及神經突觸結構的重組 (remodeling)。使記憶能夠從一個短暫不穩定的狀態轉換成較為持久且穩固的記憶 (Goelet et al., 1986 ; Squire and Alvarez, 1995)。

記憶除了依據儲存在大腦時間的長短區分外，記憶可再依據形式的不同分為陳述性記憶 (declarative memory) 又稱為外顯 (explicit) 以及非陳述性記憶 (nondeclarative memory) 又稱為內顯 (implicit) 兩類。陳述性記憶屬於有意識的回憶過去所發生的事件，例如：上禮拜

週末去了哪裡，或者是昨天你穿了什麼衣服、吃了什麼，這都是可以用言語描述的記憶。然而，此記憶模式較為短暫，對大部份的人而言很難記得去年的某一天去了哪裡、做了什麼。雖然，非陳述性記憶比起陳述性記憶是較難形成的，屬於非意識的記憶，一旦記憶形成後，可以轉換成長期記憶。此記憶模式包含 (1) 技術性記憶：與習慣性或技能性有關的記憶，例如：學會了怎麼開車，並不會因為很久沒有開車而忘記；(2) 促發 (priming)：經過提示的記憶，例如：給予一個文字的字首即能完整拼出整個單字 (Warrington and Weiskrantz, 1968)；(3) 古典制約 (classical conditioning)：動物學習到有某種刺激發生後，接著將會再發生另一個事件，因而有的反應，例如：我們都知道許多蛇有毒，在野外活動遇到蛇即能做出遠離的反應 (Milner et al., 1998)。

三、參與學習與記憶的腦區

1952 年 Paul D. Maclean 提到邊緣神經系統 (limbic system) 包含無數在大腦皮質 (cortex) 及皮質下區域 (sub-cortex) 的結構，如：下視丘 (hypothalamus)、海馬迴 (hippocampus)、杏仁核 (amygdala)、邊緣皮質 (limbic cortex)、中隔區 (septal area)，這些腦區參與的功能包含情緒及空間學習記憶 (Maclean, 1952)。海馬迴在邊緣神經系統扮演最主要的結構，它的功能包含多種訊息的彙整及產生新的記憶。

1957 年 Scoville 及 Milner 發表的研究指出 Henry Molaison (H.M.) 病患在九歲那一年因為腦部受到傷害而導致癲癇 (epilepsy)。隨著年齡增長而癲癇病症逐漸惡化，即使以藥物治療也無效的情況下，將 H.M. 大腦兩邊的顳葉 (Temporal lobe) 內側切除，其中包含了海馬迴的部份。這樣的治療方式，儘管改善了 H.M. 的病症，卻因此導致新的記憶形成受損，例如：H.M. 無法記住別人對他說過的話沒多久就會忘記。這項發現首度證實了海馬迴參與記憶穩固的過程 (Scoville and Milner, 1957)。Milner 等學者發現海馬迴受損的病患並非喪失了所有的記憶。透過請 H.M. 描繪鏡子上的圖案，會隨著練習次數的增加，觀察 H.M. 描繪的能力逐漸進步，可見非陳述性記憶並沒有受到影響。並且 H.M. 還能記得小時候曾經發生的事情，也保有語言及技術性的學習能力與記憶的能力。這樣的結果顯示海馬迴不是長期記憶唯一儲存的位置，海馬迴負責陳述性記憶的形成，並不影響非陳述性記憶。因此，記憶並非一種形式，不同的記憶形式由不同腦區負責執行及處理 (Maclean, 1952)。

杏仁核主要與情緒及厭惡害怕的學習記憶有關 (Amunts et al., 2005)。屬於非陳述性記憶的恐懼制約學習 (fear conditioning learning) 的記憶與杏仁核有關，然而杏仁核並非只與非陳述性記憶有關，也包含了因情緒的影響而加強了記憶的形成的陳述性記憶 (McGaugh et al., 1996)。藉由功能性核磁共振 (functional magnetic resonance imaging, fMRI) 的研究而發現技術性學習記憶與紋狀體 (striatum) 有關，如：巴金森氏症 (Parkinson's disease) 患者由於紋狀體退化而導致其技術性學習記憶較差 (Sarazin et al., 2002)。

第二節、空間學習記憶與海馬迴組織

一、海馬迴的構造與投射路徑

海馬迴在長久以來一直被認定與空間學習記憶的形成有關。海馬迴在發育過程中是經由顳葉內側區域向頂葉擴展而成，位在側腦室顳角 (temporal horn of lateral ventricle) 底部，為左右半腦對稱的結構。海馬迴於冠狀切面下呈 C 字型，因外型上像公羊的角又被稱為阿蒙 (Ammon) 氏角 (Ammon's horn; cornu ammonis, 簡稱 CA)。海馬迴在結構上直接或間接的與大腦皮質的許多區域及其他邊緣系統結構都有連接。海馬迴複合體 (hippocampal complex) 結構由海馬迴 (hippocampus)、齒狀迴 (dentate gyrus)、海馬旁迴 (parahippocampal gyrus) 組成。

海馬迴的皮質組織可分成三層：分子層 (molecular layer)、錐狀細胞層 (pyramidal layer)、多形細胞層 (polymorphic cell layer)，其中錐狀細胞層的錐狀細胞 (pyramidal cell) 是海馬迴最主要的細胞 (Amaral and Witter, 1989)。依據錐狀細胞形態及接受投射纖維的不同可細分為 CA1、CA2、CA3，其細胞大小為 CA3 > CA2 > CA1 (Bartesaghi and Ravasi, 1999)。CA1 神經細胞以錐狀細胞為主，每一層錐狀細胞含有 3 至 6 個神經細胞聚集在其中。錐狀細胞有兩種樹突 (dendrite)，一種是基本樹突 (basal dendrite) 另一種是頂端樹突 (apical dendrite)。錐狀神經細胞之所以又被稱為多極神經元細胞 (multipolar neuron) 是因為基本樹突通常含有兩個不同方向而延伸出細胞本體 (cell body) 的樹突 (Bartesaghi and Ravasi, 1999)。頂端樹突的樹突長度較長，離開錐狀神經細胞後會朝向海馬迴延伸，因此，此種樹突主要接受來自 CA3 的神經訊息 (Bartesaghi and Ravasi, 1999)。此外，齒狀迴也是分成三層細胞層：顆粒細胞層 (granule cell layer)、次細胞分子層 (acellular molecular layer)、多形細胞層 (polymorphic cell layer)。齒狀迴主要的神經細胞為顆粒細胞 (granule cell layer)，每一層顆粒細胞層由 4 至 6 個細胞聚集而成。在齒狀迴的神經細胞之樹突屬於單一方向，故又被稱之為單極細胞神經元 (monopolar neuron) (Johnston and Amaral, 1998)。

海馬迴神經訊息傳遞最主要分成三條路徑：貫穿纖維路徑 (Perforant fiber pathway)、苔狀纖維路徑 (Mossy fiber pathway)、Schaffer collateral。貫穿纖維路徑是海馬迴輸入神經中被研究最為清楚的一條路徑，首先內鼻皮質層 (entorhinal cortex) 藉由平行式投射 (longitudinal projection) 的穿透纖維路徑將接收到的訊息傳到齒狀迴的顆粒細胞。齒狀迴的顆粒細胞將接收到的訊息彙整之後而形成 Mossy fiber，再將訊息傳遞到 CA3 區域的錐狀神經細胞，故這條路徑稱之苔狀纖維路徑。Schaffer collateral 則是將 CA3 區域的錐狀神經細胞接收 CA1 區域到的訊息傳遞至 CA1 區域的錐狀神經細胞，而當訊息傳遞至 CA1 區域會再經由窘隆 (fornix) 將訊息輸出至海馬迴。最後，所有的訊息經過海馬迴彙整處理過再藉由

輸出神經元將訊息輸出傳遞至大腦皮質層、內鼻皮質層、下皮質層 (subcortex)。輸出神經元以兩條路徑為主分別是：(1) 經由下腳 (subiculum) 傳遞至內鼻皮質層再到大腦皮質層；(2) 直接或間接將訊息傳遞至下皮質層 (Amaral and Witter, 1989 ; Burwell et al., 1995)。

二、海馬迴相關的動物行為模式

除了透過臨床病例的研究外，研究人員也藉由動物行為模式以觀察海馬迴對於記憶的影響，常見的動物行為模式有 (1) 情境式制約學習 (contextual fear-conditioning learning)；(2) 單向抑制性躲避學習試驗 (one-way inhibitory avoidance learning)；(3) 莫氏水迷津試驗 (Morris water maze learning)。1998 年 Atkins 將一個中性制約因子 (情境) 與一個厭惡性制約因子 (電極刺激) 結合進行制約行為測試，告知實驗動物當中性制約因子出現時，再過不久將有一個厭惡性制約因子 (電極刺激) 的出現。因此，當中性制約因子再度出現時，若實驗動物仍記得先前的經驗會出現恐懼的反應，此為情境式制約學習 (Atkins et al., 1998)。單向抑制性躲避學習試驗則藉由老鼠的天性是喜好待在黑暗處。故此試驗是將老鼠放置在一個同時具有明亮區及黑暗區的行為箱中，老鼠一開始會選擇進入黑暗區。此時給予電極刺激，當下次再將老鼠放入行為箱時，若是實驗動物仍記得先前被電極到的經驗，則選擇停留於明亮區的時間會較長 (Kesner and Hardy, 1983)。情境式制約學習與單向抑制性躲避學習試驗這兩種動物行為模式試驗是兩事件相互關連的記憶，在本篇論文研究中所使用的動物行為模式試驗主要是探討空間學習與記憶，故採用莫氏水迷津試驗。

1971 年 O'Keefe 將一電極放入大鼠海馬迴區域紀錄其神經電位，發現海馬迴內的神經細胞對於特定空間位置會產生動作電位，而將此產生動作電位之細胞稱之位置細胞 (place cells) (O'Keefe and Dostrovsky, 1971)。而，1989 年 McNaughton 和 Foster 皆提到大白鼠在黑暗的環境中，位置細胞並沒有特別的活動，當給予一明亮燈光照射後位置細胞才会有特殊的偏好性。特別的是，若是給予一明亮燈光照射後隨即將燈光關閉，位置細胞的偏好性依舊存在。因此，可以瞭解到位置細胞並非只有受限於外界的視覺線索，而是會將視覺線索與其他的線索做出一個空間輿圖 (spatial map) 的連結 (Foster et al., 1989 ; McNaughton et al., 1989)。

1984 年 Morris 提到莫氏水迷津試驗的做法是將老鼠放置於一個不透明的游泳池中，在水面下放置一個低於水面數公分的平台，而牆壁上給予視覺線索 (cue)，任由老鼠自由探索以尋找隱藏於水面下的平台。當其找到平台並游上平台，即可獲得休息。藉由此水迷津試驗紀錄老鼠由放入水中直到找到平台所花費的時間，稱之逃離時間 (escape latency)，推斷老鼠尋找平台的逃離時間越短表示其空間學習記憶較佳 (Morris, 1984)。由於，莫氏水迷津試驗其空間學習記憶的基礎是建立在外在環境的參考物 (reference)，又稱之水迷津參考座標記憶試驗 (water maze reference memory task)。1990 年 Eichenbaum 欲瞭解是否破壞海馬迴會影響到空間學習記憶，先將大白鼠的海馬迴破壞後再進行莫氏水迷津試驗，若是每次試驗的進行都將大白鼠放置到相同的位置訓練其以固定方式尋找隱藏於水面下的平台，觀察

到大白鼠能夠以固定的方式正確的尋找到平台；然而，當每次試驗的進行都隨機的將大白鼠放置到不同的位置或是減少牆壁上的線索，觀察到大白鼠就無法藉由牆壁上的線索與目標所在地的相對空間位置的關係做出正確的連結，而無法形成空間與圖 (Eichenbaum et al., 1990)。由此可以瞭解到海馬迴特殊的結構及錯綜複雜的神經迴路，因而能將不同的訊息透過神經細胞傳入海馬迴，經過處理後將訊息再傳到不同的腦區，因此海馬迴在學習與記憶的形成過程扮演重要的角色。

第三節、Hes-1 蛋白質介紹

一、Hes-1 基因結構與轉錄活性

Hairy and Enhancer of split 1 (Hes-1) 基因屬於哺乳類果蠅同源的 *Hairy and Enhancer of split* (Hes) 家族，主要的功能是調節神經的發育 (Akazawa et al., 1992; Sasai et al., 1992)。Hes-1 屬於基本型螺旋-環-螺旋 (basic helix-loop-helix, bHLH) 的轉錄抑制子 (Akazawa et al., 1992; Kageyama et al., 1999; Kageyama et al., 2005; Kageyama et al., 2008)。Hes-1 屬於 Hes 家族七大成員之一，Hes-1 和 Hes-4 結構上較相似於 hairy，而其他成員的結構則與 E (spl) 較相似。也有一些 Hes 相關的 bHLH 基因，例如：Hesr/Hey/HRT/Herp/CHF/Gridlock (Iso et al., 2001) 和 Hes-like (Miyoshi et al., 2004) 會形成不同的亞型家族。在 Hes 家族成員中，Hes-1、Hes-3、Hes-5 在老鼠的神經發育過程中會高度表現在其神經幹細胞 (Bae et al., 2000)。經由南方墨點法 (Southern blot) 及物種間交叉比對 (interspecies backcross) 分析證實老鼠的 Hes 基因是一個單一複製 (single-copy) 的基因，位於第 16 個染色體上的第 26 個位置 (Takebayashi et al., 1994)。並且藉由 S 核酸 (S nuclease) 及引子延伸 (primer extension) 實驗找出 Hes-1 基因初始轉錄作用位置 (transcription initiation site) 是位在 TATA 盒子下游的第 31 個核苷酸 (nucleotide) (Takebayashi et al., 1994)。

每一個 Hes 基因都具有三個 conserved domains：(1) bHLH domain [包含鹼性區域 (basic region) 及螺旋-環-螺旋 (helix-loop-helix, bHLH)]；(2) Orange domain (the helix 3-helix 4 domain)；(3) WRPW (Trp-Arg-Pro-Trp) domain，這對於轉錄活性的調節是很重要的(附錄一) (Kageyama et al., 2008)。

bHLH domain 位於胺基酸末端區域，對於二聚體的形成 (dimer formation) 以及與 deoxyribonucleic acid (DNA) 結合是很重要的。基本型螺旋-環-螺旋因子透過 bHLH domain 中的基本區域與目標基因結合並且在 bHLH domain 中的 HLH domain 形成同型聚體 (homodimer) 或者異型聚體 (heterodimer) (Sasai et al., 1992)。特別的是，在 bHLH 基因中

的 Hes 基因其 bHLH domain 的基本區域的中間都具有一個高度保留的 proline (P)，並且證實 proline 可能與特別的目標 DNA 序列高度結合能力有關 (Sasai et al., 1992)。有文獻指出 Hes-1 結合到 N 盒子 (N box, CACNAG) 和典型的 C site (CACGCG) 的親和性比結合到 E 盒子 (E box, CANNTG) 高，並指出當破壞 Hes-1 的 N 盒子會使其抑制作用受到嚴重的損害 (Sasai et al., 1992)。因此，Hes-1 可透過結合到 N 盒子而抑制屬於基本型螺旋-環-螺旋的神經性基因如：*Mash1* 表現。然而，對其它的活化型基本型螺旋-環-螺旋基因而言，則對於結合到 E 盒子的親和性較高 (Chen et al., 1997; Takebayashi et al., 1994; Sasai et al., 1992)。

Orange domain 位在 bHLH domain 的下游，已證實 Orange domain 含有兩個雙極性螺旋 (amphipathic helices)，並已知 Orange domain 與 bHLH 基因所表現之蛋白質與蛋白質間產生的交互作用有關 (Dawson et al., 1995; Taelman et al., 2004)，例如：Hes 相關的基本型螺旋-環-螺旋基因：*Hairy* 可藉由 Orange domain 和基本型螺旋-環-螺旋基因：*Scute* 產生交互作用，然而卻不能與 Hes 相關的基本型螺旋-環-螺旋基因：*E (spl)* 產生交互作用 (Dawson et al., 1995)。另一方面，Orange domain 也能調節轉錄抑制 (Castella et al., 2000)。

WRPW domain 的位置靠近於 C 端 (carboxyl terminus) 或是位在 C 端。這個 domain 主要作為抑制結構域 (repression domain)。WRPW domain 會與共同抑制子 (co-repressor) TLE (transducin-like enhancer of split) / Grg (a homologue of *Drosophila* Groucho) 形成交互作用，並藉由召集組蛋白去乙酰酶 (histone deacetylase, Rpd3) 而修飾染色質 (chromatin) 的結構，因而使染色質不活化並且活化轉錄抑制作用活性 (active repression) (Paroush et al., 1994; Fisher et al., 1996)。其中，Grg 會藉由召集組織蛋白去乙酰酶 (histone deacetylase, Rpd3) 而修飾染色質 (chromatin) 的結構，因而活化轉錄抑制活性 (represses transcription)，稱之 active repression (Chen et al., 1997)。

由於，Hes-1 基因可活化轉錄抑制作用因此被歸類為抑制子型的基本型螺旋-環-螺旋的基因。藉由轉錄作用的分析指出 Hes-1 基因扮演負向調節者 (negative regulatory) 是透過兩種不同的機制：(1) 直接結合到目標基因的 N 盒子而產生抑制作用及 (2) 避免其他的活化子結合到 E 盒子 (Sasai et al., 1992)。

二、Hes-1 基因表現的訊號調控

Hes-1 基因表現的主要受到 Notch signaling 的調控。Notch 是一種跨膜蛋白 (transmembrane protein) 可以藉由與主要的 ligand 結合，如：Delta、Jagged 所活化，接著藉由 γ 分解 (γ -secretase) 切割，使 Notch 細胞內區域 (intracellular domain, ICD) 從細

胞膜轉移到核內，並與 DNA 結合蛋白質 RBP-J 形成一個轉錄活化子 (transcriptional activator) 複合物而誘導 Hes-1 和 Hes-5 的表現。然而，當 ICD 與 RBP-J 沒有形成複合物的時候，RBP-J 具有轉錄抑制子的角色會結合到 Hes-1 和 Hes-5 啟動子上而抑制它們的表現 (Artavanis-Tsakonas et al., 1999 ; Honjo, 1996)。

有文獻指出 Notch 可抑制神經分化及藉由抑制神經新生 (neurogenesis) 維持神經幹細胞 (neuron stem cells, NSCs) (Gaiano et al., 2000) 恆定。當缺少了 Hes-1 和 Hes-5，Notch 則無法抑制神經分化及抑制神經新生，這代表著 Hes-1 和 Hes-5 在 Notch signaling 中扮演重要的角色 (Ohtsuka et al., 1999)。在中樞神經系統發育過程，Hes-1 和 Hes-5 作為 Notch 的下游，主要表現在 ventricular zone (VZ) 扮演神經分化的負向調節者及促進神經幹細胞特性 (Ohtsuka et al., 1999)。

然而，並沒有證據指出 Hes-3 表現會受到 Notch signaling 調控。除此之外，在早期 Hes-1 的表現會發生在 Notch 和 Delta 還未表現之前，這代表的意義是 Notch signaling 並非主要影響 Hes 基因表現的調節者。在許多的研究中，指出 Shh (sonic hedgehog)、Wnt signaling 和 BMP (bone morphogenic protein)，同樣也能誘導 Hes 基因表現。因此，Hes 基因表現除了受到 Notch signaling 調控也受到其他訊號路徑調控 (Issac et al., 1998 ; Nakashima et al., 2001 ; Solecki et al., 2001)。

三、Hes-1 基因在神經發育系統的表現

神經發育過程中，神經上皮細胞 (neuroepithelial cell) 一開始會形成神經板 (neural plate) 和神經管 (neural tube) 薄壁，這些細胞通常會演化成輻射狀神經膠細胞 (radial glial cells) (Hatakeyama et al., 2004)。上述提到 Hes-1 基因可抑制神經分化，有文獻指出 Hes-1 基因突變的小鼠其神經分化會在前驅細胞增殖前先成熟，而造成神經管形成受損，使胚胎發育過程中或者是出生後沒多久隨即死亡 (Ishibashi et al., 1995)。在神經發育過程的早期，Hes-1 基因可以維繫神經上皮細胞 (neuroepithelial cell) 和輻射狀神經膠細胞 (radial glial cells) 的數目；發育後期 Hes-1 基因可以促進星狀神經膠細胞 (astrocytes) 形成。Hes-1 和 Hes-5 參與輻射狀神經膠細胞早期發育的生成，兩者呈現互補的關係，舉例來說：Hes-5 高度表現在中腦 (midbrain)、後腦 (hindbrain) 而不表現在 isthmus，而 Hes-1 則表現在 isthmus (Hatakeyama et al., 2004)。若是在鼠腦胚胎發育的第 13.5 天，Hes-1 或是 Hes-5 若無法表現則會抑制神經元 (neuron) 的分化並且抑制輻射狀神經膠細胞的數目 (Ohtsuka et al., 2001)。在 Hes 突變小鼠中 proneural bHLH 基因，如：Mash1 和 Ngn2 (Neurog2) 會高度表現，這被視為一種不成熟的神經新生 (premature neurogenesis) (Hatakeyama et al., 2004)。Hes-1 基因剔除小鼠 (knock-out mice) 在胚胎發育過程中有無

腦的現象產生，且 proneural 基因如：Mash1 表現量增加並且神經新生會加速進行 (Ishibashi et al., 1995 ; Cau et al., 2000)。

在神經發育過程的後期，當神經膠細胞新生 (gliogenesis)，Hes-1 藉由星狀神經膠細胞持續表現在發育的大腦中。假使缺乏 Hes-1 及 Hes-5 這兩個基因，會促進大腦內的星狀神經膠細胞產生及視網膜 (retina) 的 Muller 神經膠細胞產生 (Nakashima et al., 2001)。然而，當缺乏 Hes-1 或 Hes-5 這兩個基因其中之一，則會使 Muller 神經膠細胞產生減少 (Hojo et al., 2000 ; Nakashima et al., 2001)。由此可知，Hes-1 基因在發育過程的不同時間扮演不同的角色，在早期可以維繫神經幹細胞的數量而在後期則促進神經膠細胞新生。

在 2007 年 Lee 等人指出，第一型血清及糖皮質素誘導激酶 (Serum- and glucocorticoid-inducible kinase 1, SGK1) 可透過抑制與 Hes-1 蛋白質同一個家族中的 Hes-5 進而增強恐懼學習與記憶 (Lee et al., 2007)。另外，過去有研究指出，抑制 γ 分解酶 (γ -secretase) 使得 Notch 受體無法完成切割作用，而抑制 Notch 訊息傳遞，進而促進恐懼學習與記憶以及空間學習與記憶 (Dash et al., 2005)。目前已知 Notch 下游基因 Hes-5 並不參與空間學習與記憶 (Lee et al., 2007)，因此另一個 Notch 下游基因 Hes-1 可能參與空間學習與記憶的形成。因此，本篇論文研究想進一步探討 Hes-1 與空間學習與記憶的相關性。

Hes-1 基因除了影響神經系統，也影響其他組織的細胞分化及其細胞形態，如：血球細胞、內分泌 (endocrine) - 外分泌 (exocrine) 細胞、體節 (somite) 等 (Kageyama et al., 2005)。在 T 細胞發育過程中，缺乏 Hes-1 基因會使 T 細胞發育停留在早期，有趣的是若缺乏 Hes-1 基因並不影響 B 細胞發育 (Tomita et al., 1999)。

第四節、類小泛素化修飾

一、類小泛素結構與分類

類小泛素 (SUMO) 全名是 small ubiquitin-like modifier，類小泛素這種蛋白質分布很廣，存在於各種真核生物中。最早是在酵母菌 *S. cerevisiae* 發現的，命名為 SMT3 (Suppressor of MIF Two 3 protein) (Meluh and Koshland, 1995)。類小泛素從酵母菌到哺乳類細胞皆具有高度的保留性 (Kerscher et al., 2006)。由於類小泛素其基因序列上大約有 18 % 與泛素 (ubiquitin) 相似且結構上與泛素有相同的三維結構 (Hershko et al., 1998 ; Ohsumi, 1999) 包括一個 β 摺疊 (β -sheet) 纏繞一個 α 螺旋 (α -helix) 的球狀摺疊 (Bayer et al., 1998)。又因其蛋白質作用方式類似於泛素，故歸類於泛素相關蛋白質 (ubiquitin-

related protein) 的一類。除此之外，類小泛素與泛素兩者在 C 端都有兩個 glycine 殘基 (di-glycine) 與目標蛋白質的 lysine 位置形成共價類異肽鍵 (isopeptide bond) 的連結而參與反應 (Gill, 2004)。不同的是，類小泛素的 N 端 (N-terminal) 約有 10-25 個非結構延伸的胺基酸，這個在其他的泛素相關蛋白質中並沒有發現到 (Johnson, 2004)。

類小泛素大約由 100 個胺基酸所組成的，分子量大約是 10 kDa 的小分子蛋白 (Bayer et al., 1998)。經由基因序列分析，酵母菌、果蠅只表現單一個類小泛素基因，哺乳類可表現四個類小泛素基因，而植物更可表現高達八個類小泛素基因 (Kurepa et al., 2003)。目前，從哺乳類基因序列上編碼出四個不同亞型的類小泛素，分別是 SUMO1 (Ubl1, Smt3c, Sentrin, PIC1, GMP1)，SUMO2 (Smt3a, Sentrin2)，SUMO3 (Smt3b, Sentrin3)，SUMO4 (Melchior et al., 2000)。SUMO2 和 SUMO3 相似性極高，在序列上高達 97 % 是相同的，所以常被歸類為 SUMO2/3，SUMO2/3 與 SUMO1 的相似性只約有 50 %，而與 SUMO4 則有 87 % 相似性 (Melchior et al., 2000)。在發育的過程中，SUMO1 - 3 會廣泛表現在所有的組織中。然而，對 SUMO4 而言，卻主要表現在脾臟、腎臟及淋巴結 (Melchior et al., 2000)。研究 SUMO 在細胞內的位置，指出 SUMO2/3 主要位在核質 (nucleoplasm)，而 SUMO1 則位在核膜 (nuclear envelope)、核仁 (nucleolus) (Ayaydin et al., 2004)。

類小泛素所修飾的目標蛋白質大多包含一個一致性序列， Ψ KXE，其中 Ψ 代表一個具有疏水性的胺基酸，K 是會被類小泛素修飾的 lysine (K)，X 則是任何一個胺基酸，E 是 glutamic acid (Rodriguez et al., 2001)。 Ψ KXE motif 對於直接結合到類小泛素 E2 結合酶 (E2 conjugating enzyme) Ubc9 (ubiquitin-conjugating 9) 上是很重要的，並且類小泛素所修飾的目標蛋白質主要的結合位是藉由 lysine 這個位置。然而，有些目標蛋白質的修飾結合位並不在這個一致性序列中。目前，已確定有兩個不同的 motif，例如：phosphorylation-dependent SUMO motif (PDSM) 和 negatively charged amino acid dependent SUMO motif (NDSM) (Wilkinson and Henley et al., 2010)。PDSM 是另一個 SUMO motif，由 ψ KXEXXSP 組成，S 代表 Serine 被磷酸化，而 P 代表相鄰 proline 磷酸化的位置。近期的研究結果指出在 *in vitro* 或是 *in vivo* 中，PDSM 磷酸化可以增加類小泛素 E2 結合酶的結合及修飾 lysine。另一個小泛素 motif 稱之為 NDSM 它是由一個可延伸性的 motif， ψ KXEXXD / E 所組成，它也被發現在其他的受質中扮演相似的角色且能正確的預測出類小泛素目標蛋白。然而，關於這些非一致性的修飾結合位是如何被修飾的目前的研究尚不清楚。

二、類小泛素可逆性修飾途徑

類小泛素化修飾是藉由一系列的酶，使類小泛素能夠修飾目標蛋白質上的 lysine (Hay et al., 2005)。類小泛素化修飾連結途徑包含有三個主要的步驟：活化 (activation)，結合

(conjugation)，連接 (ligation)，它們分別是藉由 E1、E2 和 E3 這三種不同的酶催化的 (Liu et al., 2008)。

一開始表現的類小泛素是一個不成熟的前驅蛋白質 (immature proform)，末端帶有一段約 2~11 個胺基酸不等的短肽鏈，需透過 SENPs (senrin-specific proteases) 在其 C 端進行切除。而之後在 C 端露出兩個 glycine 殘基 (di-glycine)，才能成為成熟的類小泛素型式，因此才能進入類小泛素化修飾途徑 (Bailey et al., 2004； Li and Hochstrasser, 2003)。首先，成熟的類小泛素會藉由 ATP 提供能量使 C 端羧基產生腺苷酸化，然後與 E1 活化酶 (E1 activating enzyme) 的 cysteine 反應後，釋放出 AMP，使類小泛素與 E1 形成硫酯鍵 (thioester bond) 共價結合在一起。E1 活化酶在哺乳類主要的形式是由 SAE1 / SAE2 所形成的異型聚體 (heterodimer) (Okuma et al., 1999)。接著，類小泛素會從 E1 轉移到具有 cysteine 活化位的 E2 結合酶上，同樣的與類小泛素形成硫酯鍵。最後一個步驟是透過類小泛素 E3 連接酶 (E3 ligation enzyme) 催化，E2 結合酶 (Ubc9) 會讓類小泛素轉移到類小泛素的目標蛋白質上。因為在目標蛋白質的 lysine 支鏈和 C 端的羧基產生共價類異肽鍵 (isopeptide bond) 連結的修飾作用，因而使得受質的構型 (conformation) 或是結構 (structure) 改變，進而影響受質的功能 (Gill, 2004)。在很多的細胞體外實驗研究都指出類小泛素修飾化只需要透過 E1 活化酶和 E2 結合酶就能完成修飾作用。例如在細胞體外，SUMO1 與 RanGap1 的結合只需要透過 SAE 和 Ubc9 參與反應，即能完成修飾作用 (Hay, 2005； Tatham et al., 2001)。但是，細胞內大多數的類小泛素修飾化仍需要透過 E3 連接酶的參與。E3 連接酶雖然不會與類小泛素共價結合在一起，但是 E3 連接酶可以與 E2 結合酶和目標蛋白質結合在一起，促進類小泛素由 E2 結合酶轉移到目標蛋白質 (Johnson, 2004)。

類小泛素化修飾是一個可逆性動態修飾過程 (附錄二)。在細胞內有一種特異性的蛋白質 SENPs，除了具有 C 端水解功能 (hydrolase) 還能夠將類小泛素從已發生修飾的目標蛋白上移除，此過程稱作去類小泛素化修飾 (de-sumoylation) (Schwienhorst et al., 2000)。在酵母菌中與 SENPs 相對應的去類小泛素化修飾的酵素，分別是 Ulp1 和 Ulp2 (Gill, 2004)。Ulp1 位在核孔複合體 (nuclearpore complex, NPC) 上，可切除類小泛素 immature 的 C 端短肽以及切除類小泛素與目標蛋白的接合；Ulp2 位在核仁，雖然不能切除類小泛素 immature 的 C 端短肽，但是能夠切除一些特殊的類小泛素與目標蛋白的接合 (Gill, 2004)。在哺乳動物中，則有七種去類小泛素化修飾的酵素，即上述所提到的 SENPs。他們所作用的類小泛素亞型也不同，其細胞內的位置及功能上也略有差異 (Gill, 2004)。由於，去類小泛素化修飾的酵素不只能夠使類小泛素從不成熟的前驅蛋白質成為成熟的類小泛素，也具有將類小泛素從目標蛋白上移除的功能。因此，有了去類小泛素化修飾的酵素存在，細胞內類小泛素化修飾的才能呈現恆定的狀態。

三、類小泛素化修飾的功能

轉譯後修飾作用 (post-translational modifications) 包含甲基化 (methylation)、磷酸化 (phosphorylation)、泛素化 (ubiquitination)、類小泛素化修飾 (sumoylation)，可逆性的轉譯後修飾作用廣泛的運用在動態調節蛋白質活性，在細胞訊息中傳遞中也扮有重要的角色。類小泛素及其修飾作用影響層面相當的廣泛，過去研究發現類小泛素修飾的目標蛋白主要以核蛋白 (nucleus protein) 為主 (Verger et al., 2003)，但是近年來的研究發現到參與訊息傳遞的蛋白、轉錄因子、病毒蛋白、與 DNA 修補系統相關之蛋白等也會發生類小泛素化修飾，這可以說明類小泛素化修飾在細胞核外也具有一定的重要性。過去有研究指出類小泛素化修飾可以調節目標蛋白質，改變目標蛋白質之構型、胞內分布位置、轉錄活性、穩定，或是影響與其它蛋白質之間的交互作用。除此之外，也包含調節細胞內反應，例如：DNA 複製、細胞週期調控、DNA 修補作用、細胞核運輸作用、染色體分離、基因體完整性、調節轉錄作用、訊息傳遞、發炎反應等現象 (Bies et al., 2002 ; Gill et al., 2003 ; Kahyo et al., 2001 ; Nacerddine et al., 2005)。

(一) 細胞週期的調節

在酵母菌中，類小泛素 E1 活化酶和類小泛素 E2 連結酶的突變會阻礙細胞週期 (cell cycle) 進行且會造成 G2 / M phase 停滯使整個細胞週期停止 (Seufert et al., 1995)。類小泛素修飾化對於細胞面對基因毒性壓力 (genotoxic stress) 的存活也很重要。在酵母菌中，抑制類小泛素修飾化會增加基因毒性的敏感性；在人類細胞中，則發現到不管是藉由顯性負向 (dominant-negative) Ubc9 或是因腺病毒感染透過病毒蛋白 Gam1 會使類小泛素 E1 活化酶降解而抑制類小泛素化修飾，都會影響細胞對於基因毒性敏感性增加，進而誘導細胞凋亡 (apoptosis) (Tempé et al., 2008)。

(二) DNA 修補作用

研究指出類小泛素 E3 連接酶：Mms21 / Nse2 (Non-structural maintenance of chromosomes element 2 homolog) 可以使 Smc5 / 6 (structural-maintenance-of-chromosome, SMC) 複合體透過類小泛素修飾化修復 DNA 雙股斷裂 (Andrews et al., 2005 ; McDonald et al., 2003 ; Potts et al., 2005 ; Zhao et al., 2005)。因此，若是喪失 E3 連接功能會使 DNA 傷害敏感性提高。在 DNA 複製及修補作用中有一個重要的蛋白，proliferating-cell nuclear antigen (PCNA)，在細胞週期 G2 期複製於 DNA 複製後修補過程中扮演重要角色。PCNA 上的 lysine 164 會進行單一泛素化 (mono-ubiquitination) 或多泛素化 (poly-ubiquitination)，然而在 S 期類小泛素會與泛素競爭 PCNA 上的 lysine 164 的結合位，阻斷泛素化發生，因而抑制 DNA 傷害所誘導的 DNA 修補作用 (Hoege et al., 2002)。由此可瞭解到雖然泛素與類小泛素修飾目標蛋白同一個位置 lysine 位置，但其影響層面卻是不同的。

(三) 胞內分布位置

RanGAP 是第一個發現到可被類小泛素修飾的目標蛋白，對於細胞核與細胞質之間物質的運輸 (nucleocytoplasmic transport) 相當重要。RanGAP (Ran small GTPase activating protein) 在細胞內的位置是位在細胞質，一旦被類小泛素修飾後，RanGAP 會聚集到細胞核邊緣與細胞核孔複合物 (nuclearporecomplex) 之一的 RanBP2 結合，以調節細胞內物質運輸 (Mahajan et al., 1998)。

(四) 蛋白質穩定的調節

研究發現，細胞內類小泛素會與泛素競爭目標蛋白質的 lysine 結合位，進而阻止蛋白質因類泛素化而發生降解作用。例如：在正常的情況下，在細胞質中的轉錄因子 NF-kappaB 會和它的抑制物 I κ B α 結合成非活化態的複合物。當有外來的刺激如 Tumor necrosis factor (TNF) 的作用，I κ B α 發生泛素化而被 26S 蛋白體 (26S proteasome) 降解，因而使 NF-kappaB 進入細胞核內啟動下游基因的轉錄。因此，當細胞內類小泛素化修飾發生，可以與泛素競爭 I κ B α 的 lysine 結合位，而穩定了 I κ B α 與 NF-kappaB 的結合，進而抑制 NF-kappaB 的功能 (Desterro et al., 1998)。另一篇研究同樣也指出泛素化和類小泛素修飾化會競爭同一個目標蛋白質的 lysine 結合位，當 von Hippel-Lindau (VHL) 被類小泛素修飾可以調節其蛋白質的穩定以及其蛋白在細胞中存在的位置 (Qiliang Cai et al., 2010)。在 Smad4 (mothers against decapentaplegic homolog 4) 中也有觀察到類小泛素化修飾會影響其穩定 (Lin et al., 2003)。類小泛素化修飾除了直接影響其目標蛋白質的蛋白質穩定，在 2003 年 Gill 的研究中提到 SUMO1 可活化 p53 的轉錄作用，並且與 p53 蛋白結合使 p53 的蛋白質更為穩定 (Gill et al., 2003)。另一篇相關研究，顯示將 Specificity Protein 1 (Sp1) 突變使之不能進行類小泛素化修飾會比野生型穩定，更進一步研究觀察到類小泛素修飾 Sp1 可增加 Sp1 結合到 26S 蛋白體而促進其降解作用進行 (Wang et al., 2008)。由此可以瞭解到，類小泛素修飾目標蛋白而影響其穩定的機制，也可能是透過其他機制再進而影響其穩定。

(五) 轉錄活性的調節

在哺乳動物中，類小泛素修飾化的目標蛋白大多是轉錄調節因子、共同活化因子或是共同抑制子。許多研究證實，類小泛素修飾的轉錄調節因子常見的有 p53、EIk-1、STAT1、C/EBPs、SRF 等，轉錄共同調節因子常見的則有 p300 及雄性激素受體 (androgen receptor) (Gross et al., 2001 ; Gross et al., 2004 ; Nishida et al., 2002)。一般而言，轉錄因子發生類小泛素化修飾會抑制它們的目標基因轉錄作用的進行。然而，類小泛素化修飾是如何抑制基因轉錄呢？它的機制，可能是因為類小泛素結合在目標蛋白上而吸引如：HDAC、Daxx 這類的分子，進而抑制轉錄的進行。有許多的證據顯示類小泛素化修飾可能會透過不同的方式抑制不同的轉錄因子其轉錄活性，其中最簡單的方式是藉由減少轉錄因子的表現量。另外，也可以藉由干擾轉錄因子與它的目標 DNA 序列的交互作用抑制轉錄

活性，例如類小泛素化修飾可以影響 TFIID 結合到它的目標 DNA 序列，這可能會減弱依賴 TFIID 的初始轉錄進行。類小泛素化修飾除了負向調節，當熱休克蛋白 (heat shock factor, HSF) HSF1、HSF2 發生類小泛素化修飾可進行正向調節，使之與 DNA 結合能力增強 (Hong et al., 2001)。由此可見，類小泛素化修飾對於轉錄活性的調節是一個複雜的機制 (Goodson et al., 2001 ; Johnson, 2004)。

第五節、類小泛素 E3 連接酶 PIAS1 蛋白質介紹

一、PIAS 家族介紹

PIAS (protein inhibitor of activated signal transducer and activators of transcription) 蛋白質是以 STAT1 β (signal transducer and activators of transcription 1) 為誘餌蛋白，使用人類 B 細胞庫 (B cell library) 並透過酵母菌雙雜交系統分析是否有蛋白質可和 STAT1 β 蛋白質結合，經由實驗發現有一大小約 650 個胺基酸的蛋白質會和 STAT1 結合，將之命名為 PIAS1 (Liu et al., 1998)。在先前的研究指出，利用共同免疫沈澱法 (co-immunoprecipitation) 分析在 *in vivo* 情況下，STAT1 tyrosine 701 位置發生磷酸化，可使 PIAS1 與 STAT1 產生交互作用 (Liu et al., 1998)。更進一步研究指出，當受到干擾素 (interferon) 影響，PIAS1 會抑制 STAT1 所媒介的基因表現 (Liu et al., 1998)，並且藉由細胞激素的刺激 (cytokine) 的刺激 PIAS1 和 STAT1 結合會降低 STAT1 與 DNA 結合的能力 (Liu et al., 1998)。經由哺乳類細胞的基因序列分析，發現除了 PIAS1 之外，尚有三個蛋白質其胺基酸序列組成與 PIAS1 的相似度很高，分別是 PIASx (又稱之 PIAS2)、PIAS3 和 PIASy (又稱之 PIAS4) 並將其一併歸類為 PIAS 蛋白質家族 (Chung et al., 1997 ; Copeland et al., 1995)。除了 PIAS1 外，其他的 PIAS 皆發現到在 mRNA 剪接過程中會形成兩個異形體 (isoform)。哺乳類 PIAS 同源蛋白也存在於非脊椎動物、植物和酵母菌發現到。人類的 Zimp10 和 Zimp7 以及酵母菌中的 SIZ1 和 SIZ2，在近年來也發現到與哺乳類 PIAS 蛋白具有高度同源性 (Johnson and Gupta, 2001)。

二、PIAS1 結構介紹與類小泛素化修飾的關係

目前的相關研究已知 PIAS 會藉由不同的催化方式進而調控多個與免疫相關的轉錄因子的活性，故能穩定細胞內免疫系統的恆定 (Shuai et al., 2005)。本篇研究主要要介紹的是 PIAS1，它除了作為 STAT1 的負向調控者，同時具有類小泛素 E3 連接酶的活性，可以對 STAT1 或者是類小泛素的目標蛋白質進行修飾 (Liu et al., 2007 ; Song et al., 2006)。目前已知的類小泛素 E3 連接酶包含有 PIAS 家族、Pc2 和 RanBP2 (Jackson, 2001)，其中只有 Pc2 不具有環狀結構，然而其中 PIAS 的活化需要環狀結構的存在。PIAS 蛋白會促進許

多的轉錄因子發生類小泛素修飾化，而改變其轉錄活性。哺乳類動物 PIAS 蛋白，目前發現到已知有七種，它們在胺基酸序列上至少有 50 % 是相同的，經由分析在它們的 N 端和及某些區域上具有高度保留性。PIAS 的結構上有四個主要的 motif：N 端 SAP (scaffold attachment factor-A/B/acinus/PIAS) motif，PINIT (Pro - Ile - Asn - Ile - Thr) motif，RING finger like zinc binding domain (RLD)，C 端區域富含酸性區域 acid domain (AD) 及 serine 和 threonine rich (S / T) 區域 (Rytinki et al., 2009) (附錄三)。

在許多會與染色質結合的蛋白中發現到 SAP motif，研究指出 PIAS1 會和 DNA 序列上 scaffold attachment regions (SARs) 內富含腺嘌呤 (A, adenine) 和胸腺嘧啶 (T, thymidine) 的區域結合 (Klapp et al., 1993)。SAP motif 含有一段 LXXLL (L 是 lysine；X 是任何的胺基酸) 保留序列，有研究顯示這對於核質受體 (nuclear receptor) 與共同活化子 (co-activator) 複合物的形成很重要。除此之外，若是將 PIASy 上的 LXXLL 後面兩個 lysine 突變成 alanine 會降低 PIASy 原本對於 STAT1 轉錄活性的抑制。

PINIT motif 存在所有的 PIAS 蛋白質中，PINIT motif 會與 RING finger motif 形成具有類小泛素 E3 連接酶的模型，故 PINIT motif 與 RING finger motif 對於發生類小泛素化修飾是很重要的。若是破壞 PIAS3 的 PINIT motif 會影響它細胞內的位置 (Duval et al., 2003)。

PIAS1 中的 RLD domain 是一個富含 cysteine 的 conserved domain，它可能與形成 RING finger motif 的 Siz / PIAS RING (SP-RING) 有關，這個結構與類小泛素 E3 連接酶的鋅指 (zinc finger) 結構很相似，故這個 conserved domain 與類小泛素 E3 連接酶的活性有很大的關係 (Jackson, 2001)。因此，不管是在細胞體外或者是體內，若是將 PIAS1 蛋白上的 RLD 突變，會使得它的類小泛素 E3 連接酶活性喪失。PIAS 蛋白的 C 端有高度的 serine / threonine 保留性，PIASx 剪接成的 PIASx α 和 PIASx β 只有在 C 端區域不一樣，其餘區域皆是一樣的 (Arora et al., 2003；Rytinki et al., 2009)。

此外，應該已證實了在 C 端區域富含的酸性區域 acid domain (AD) 存在 SIM (SUMO1 Interaction Motif)，與 SUMO1 會產生相互作用 (Shuai K., 2006)。有趣的是，即使將 SIM 去除並不會影響類小泛素 E3 連接酶的活性，PIAS 蛋白仍具有類小泛素 E3 連接酶的活性，可催化類小泛素與目標基因的作用 (Kotaja et al., 2002)。以上文獻結果顯示，PIAS 蛋白的各種結構與類小泛素化修飾的關係。本篇研究，主要是探討透過類小泛素 E3 連接酶 PIAS1 進行的類小泛素化修飾，是否可調節目標蛋白質的穩定。

第六節、本論文之研究目的及策略

實驗室之前的研究結果顯示，c-Jun N-terminal kinase 1 (JNK1) 可使 Hes-1 Serine 263 的位置發生磷酸化，並進一步增加 Hes-1 蛋白質的穩定以及增強 Hes-1 轉錄抑制子對 GluR1 基因的抑制效果 (Lin et al., 2012)。由此可知，轉譯後修飾作用對於 Hes-1 相當重要。然而，目前 Hes-1 的轉譯後修飾作用相關研究瞭解並不多。因此，本篇論文主題是探討 Hes-1 是否會進行另一種轉譯後修飾作用：類小泛素化修飾，以及修飾後對 Hes-1 性質和功能上的影響。以下分成幾點來探討：第一點，類小泛素化修飾是否可影響 Hes-1 其蛋白質的穩定。雖然之前研究報導類小泛素化修飾只需要透過 E1 活化酶和 E2 結合酶就能完成目標蛋白的修飾作用，但是對於細胞內大多數的蛋白質而言，類小泛素化修飾的發生仍需要透過 E3 連接酶的參與。第二點，藉由 E3 連接酶之一的 PIAS1，以瞭解是否可促使 Hes-1 蛋白質進行類小泛素化修飾。根據實驗室之前的研究結果證實 PIAS1，除了扮演類小泛素 E3 連接酶的角色，也會藉由修飾轉錄因子進而促進大白鼠的空間學習記憶 (Tai et al., 2011)。除此之外，根據實驗室之前的研究成果，證實與 Hes-1 序列相似屬於同一個蛋白質家族之 Hes-5 與恐懼學習記憶相關 (Lee et al., 2007)。第三點，探討透過 PIAS1 進行類小泛素化修飾之後是否 Hes-1 蛋白質會影響空間學習記憶以及是否會調節 GluR1 蛋白質表現。因此，本篇論文主要的研究目標整理如下：

- 一、確認 Hes-1 是否能透過類小泛素 E3 連接酶 PIAS1 進行類小泛素化修飾。
- 二、經過類小泛素修飾後的 Hes-1 是否會影響其蛋白質穩定性。
- 三、經過類小泛素修飾後的 Hes-1 是否會影響大白鼠空間學習與記憶的表現及 GluR1 的表現。



第二章 實驗材料與方法

第二章 實驗材料與方法

第一節、細胞培養 (cell culture)

一、細胞解凍

本實驗使用的細胞株是人類胚胎腎臟細胞 human embryonic kidney 293T，以下簡稱 HEK293T。從液態氮桶中取出細胞管到細胞解凍完成的過程需要快速進行，以避免因時間的延長而造成少部份細胞死亡。先將含有 10 % 胎牛血清 (fetal bovine serum, FBS) 的 Dulbecco's Modified Eagles Medium (DMEM, Life Technologies) 細胞培養液，置於 37 °C 水浴槽中預熱以作為準備。從液態氮桶中取出細胞冷凍管後，立即將細胞管放入 37 °C 水浴槽使管內之細胞融解，待其解凍完成後，取 10 ml 之細胞培養液回溶細胞管內的細胞，回溶過程需要緩慢小心的打散細胞，離心 1000 rpm、5 分鐘。接著，先吸掉原先含有 dimethyl sulfoxide (DMSO, Sigma) 抗凍劑的培養液並加入 10 ml 新鮮的培養液，再將離心後所形成的細胞團塊緩慢小心的打散成懸浮細胞液，隨之將細胞種到直徑 10 公分細胞培養皿中，培養在溫度 37 °C、5 % CO₂ 之濕式培養箱中。隔天進行繼代培養，當繼代培養到第三代，並視其細胞生長狀況穩定後，方可進行細胞實驗。

二、細胞培養

HEK293T 細胞，培養於直徑 10 公分細胞培養皿中，細胞培養液為含有 10 % 胎牛血清 (fetal bovine serum, FBS) 的 DMEM 培養液。細胞培養環境為溫度 37 °C、5 % CO₂ 之濕式培養箱中。在進行細胞培養前，先將細胞培養液預熱。每三天進行一次繼代 (subculture) 分盤培養，首先先吸掉培養皿中的培養液，再加入少許磷酸鹽溶液以清洗剩餘的培養液，接著吸掉磷酸鹽溶液並加入適量之新鮮細胞培養液，將原先貼附在培養皿上之細胞緩慢的打散，最後取適量之細胞懸浮液重新加入到含有 10 ml 細胞培養液的直徑 10 公分的培養皿中，以維持其生長。若因實驗進行之需求，需要將細胞分殖到 6 或 12 孔盤中，則先將打散後的細胞團塊懸浮液取 20 μ l 與 20 μ l 的 0.4 % trypan blue (Invitrogen, USA) 混合均勻，再將混合液加在血球計數器 (Hemocytometer) 上面計數細胞，最後以 2.5×10^5 cell/well 將細胞分盤到孔盤中，待隔日細胞生長狀況穩定後即可進行實驗。當細胞養至約 20 代，需重新解凍細胞。

三、冷凍細胞

在進行冷凍細胞前，先預熱細胞培養液。將生長至八分滿之細胞，先吸掉原先在培養皿中的細胞培養液，隨之加入新鮮的培養液後，將貼附在培養皿上之細胞團塊緩慢均勻的打散，收集至 15 ml 離心管，離心 1000 rpm、5 分鐘。待其離心完成後，先吸掉原先的細胞培養液，取適量之新鮮細胞培養液將細胞團塊打散，再與 10 % DMSO (Sigma) 抗凍劑均勻

混合，在每個冷凍管中分裝 1 ml 待冷凍之細胞。接著，將冷凍管放置到細胞冷凍專用盒子內，置於 -80 °C 冰箱 24 小時，再將之移入到液態氮桶中保存。

第二節、細胞轉染 (transfection)

一、細胞轉染

在細胞轉染的前一天，如上述所述，先預熱細胞培養液，將生長至八分滿的 HEK293T 細胞以新鮮細胞培養液打散，再以血球計數器 (Hemocytometer) 計數細胞後，以 2.5×10^5 cell/well 之密度將細胞分盤到 6 或 12 孔盤，置放於溫度 37 °C、5 % CO₂ 之培養箱中培養。隔日，即可進行細胞轉染實驗。在進行細胞轉染之前，先預熱無血清的 Dulbecco's Modified Eagles Medium (DMEM, Life Technologies) 培養液。本論文的細胞轉染是以 lipofection 的方式將欲表現之質體轉移送入細胞內。首先，在裝有欲轉染之質體的微量離心管中加入 100 μ l 無血清的 DMEM 培養液，同時在另一個裝有 100 μ l 無血清的 DMEM 培養液的微量離心管中，依照每 μ g 之質體濃度取 2.5 μ l 的 Lipofectamine™ 2000 (Invitrogen) 試劑稀釋，混合均勻靜置於室溫作用五分鐘後，方可將兩者混合均勻並靜置於室溫作用 20 分鐘。進行轉染時，將混合液緩慢滴入孔盤中，完成後將孔盤再放置於溫度 37 °C、5 % CO₂ 之培養箱中培養。質體轉染後培養至 24 小時，可再進行其他相關實驗如藥物的處理；若不需要經過其他處理的實驗，則培養至 48 小時後，即可收取細胞以進行後續實驗分析。

二、蛋白質均質液的萃取

轉染完成並且經過一定時間作用之細胞，即可收取其細胞以進行後續實驗分析。首先，吸掉孔盤內的細胞培養液，以磷酸鹽溶液清洗一次後，加入含有蛋白質酶抑制劑 (protease inhibitor, Roche) 及磷酸酶抑制劑 (phosphatase inhibitor, Roche) 的均質緩衝液 (RIPA Lysis Buffer) 以將細胞膜打破，放置在平面震盪器 (shaker) 以 120 rpm 搖晃十分鐘，收集細胞液至於 1.5 ml 之微量離心管，於 4 °C、14000 rpm 離心十分鐘以去除細胞殘骸，收取其上清液即為細胞蛋白質均質液 (cell lysate)，保存於 -80 °C 冰箱。

第三節、西方墨點法 (Western blot)

一、蛋白質濃度測定及樣本配製

本實驗採用 Bradford 方法，藉由酸性染劑 Protein Assay Dye Reagent (Coomassie Brilliant Blue G-250; Bio-Rad Laboratories, USA) 測定蛋白質均質液中所含的蛋白質濃度。首

先，將 Protein Assay Dye Reagent 以蒸餾水稀釋五倍，每個待測樣本取 2 μl 加入 1000 μl 的 Protein Assay Dye Reagent 稀釋液中混合均勻後，置於室溫反應 2 分鐘，再以分光光度計 595 nm 的波長偵測其吸光值變化，即可得到樣本中蛋白質的濃度。此方法的原理主要是 Coomassie Brilliant Blue G-250 酸性染劑與蛋白質結合時，最大吸光值會從 465 nm 轉移到 595 nm 的特性，因此藉由分光光度計 595 nm 的波長偵測蛋白質的濃度，並以胎牛血清蛋白 (bovine serum albumin, BSA) 2、4、6、8 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 這四種濃度作為標準濃度曲線，推算出偵測之樣本的蛋白質濃度。樣本經過濃度定量分析後，以 5 倍 loading dye、滅菌水及樣本蛋白質均質液配製成每 1 μl 含有 1 μg 的蛋白質溶液，混合均勻後，置於 95 $^{\circ}\text{C}$ 加熱板 (heat plate) 加熱 10 分鐘，即成為可待分析之蛋白質樣本。經過加熱製備好的蛋白質樣本可保存於 -20 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱。

二、 硫酸十二酯鈉聚丙醯胺凝膠製備

依照樣本蛋白質分子量而定，配製好分離膠 (separating gel)，注入已架設好之玻璃隙縫中，再加入 1 ml 的異丙酮 (isopropanol) 使其膠體平整。分離膠凝固後，將原先注入之異丙酮倒掉，再以蒸餾水清洗玻璃隙縫中的膠體，並擦乾玻璃隙縫的水，接著插入梳子 (comb) 設備，將配製好的聚集膠 (stacking gel) 緩慢注入梳子與玻璃隙縫間，待聚集膠凝固後，小心取出梳子，並以蒸餾水清洗孔洞 (well)，待進行蛋白質電泳分析，或者放到含有蒸餾水的密封以避免其凝膠乾掉並保存於 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱。本篇論文使用的硫酸十二酯鈉聚丙醯胺凝膠 (sodium dodecyl sulfate-polyAcrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE) 主要以 10 % SDS-PAGE 為主，以下為凝膠配製之配方。

10 % 分離膠 separating gel :

40 % Acrylamide	2.5 ml
Separating gel buffer	2.5 ml
ddH ₂ O	4.85 ml
10 % SDS	100 μl
10 % APS	100 μl
TEMED	7.5 μl

聚集膠 stacking gel :

40 % Acrylamide	333.33 μ l
Stacking gel buffer	833.33 μ l
ddH ₂ O	2.1 ml
10 % SDS	33.33 μ l
10 % APS	33.33 μ l
TEMED	5 μ l

三、膠體電泳

首先，若是從 -20 °C 冰箱取出待分析的蛋白質樣本，必須先放到 95 °C 加熱板加熱 5 分鐘作為事前準備。接著，將製備好的硫酸十二酯鈉聚丙醯胺凝膠放到電泳槽內，注入電泳緩衝液 (running buffer)，需注意電泳緩衝液要蓋過凝膠，電泳槽內則為八分滿。將配製好的蛋白質樣本以固定的體積，加入凝膠孔洞內。每片凝膠以最大伏特及固定電流 30 毫安培進行不同分子量之蛋白質分離。待染料跑至接近底部後，再將凝膠小心取下，以進行蛋白質電泳轉印步驟。

四、蛋白質電泳轉漬法

先將 polyvinylidene fluoride membrane (PVDF) 膜 (Millipore, MA) 浸潤在 100 % 甲醇 (methanol) 內一分鐘，以蒸餾水清洗三分鐘後，浸潤在轉漬緩衝液 (transfer buffer) 中，同時將 3M 濾紙也浸潤在轉漬緩衝液中，作為事前預處理。再使用濕式轉印槽 (Bio-Rad, CA) 進行轉印，放置順序由負電 (black side) 到正電 (white side) 分別是海綿-濾紙-凝膠-PVDF membrane-濾紙-海綿，小心放置並且避免氣泡產生再放置到濕式轉印槽，為避免轉漬過程有過熱的現象故取一個冰塊放置到濕式轉印槽，完成裝置後設定 105 伏特、最大毫安培及 65 分鐘，使凝膠上的蛋白質完全轉漬到 PVDF 膜上。轉漬完成後，取出 PVDF 膜浸潤在含有 2 % BSA 的 0.05 % TBST 中，於室溫下以震盪器搖晃一小時，以進行 blocking，藉此以阻斷非特異性結合。

五、免疫染色法

PVDF 膜加入欲分析之一級抗體，於 4 °C 反應至隔日或室溫下反應兩小時。本文使用的一級抗體有：mouse anti- β -actin antibody (1:10000, Chemicon)、rabbit-anti-HES-1 antibody (1:3000, Genetex)、rabbit-anti-PIAS1 antibody (1:6000, Genetex)、mouse anti-Flag M2 antibody (1:10000, Sigma)、mouse anti-Myc antibody (1:6000, Millipore)、mouse anti-EGFP antibody (1:6000, Millipore)、mouse anti-HA antibody (1:2000, Millipore)、rabbit-anti-GluR1 antibody (1:3000, Millipore)。完成一級抗體反應的 PVDF

膜，以 0.1 % TBST 清洗十分鐘各三次，再加入接有 HRP 的二級抗體 (anti-rabbit or anti-mouse IgG conjugated to horseradish peroxidase) (1:10000, Jason)於室溫下反應一小時。反應後，以 0.1 % TBST 清洗十分鐘各三次，最後，在 PVDF 膜加入化學冷光試劑 (Chemiluminescence reagent) (Immobilon Western Chemiluminescent HRP Substrate, Millipore) 呈色反應作用一分鐘，再放置於冷光分析儀中，呈色曝光後即可得到影像。所得到的影像可進一步以 Image J 軟體進行量化分析。若是，同一張 PVDF 膜需要使用到不同的抗體反應，先以蒸餾水清洗五分鐘以去除化學冷光試劑，再置於含有 stripping buffer 的溶液中，於 80 °C 水浴槽中作用半小時，以去除原先結合在 PVDF 膜上之抗體，再以 0.1 % TBST 清洗十分鐘各兩次，接著再進行完上述之 blocking 步驟後，即可重新加入抗體以進行免疫染色法。

第四節、共同免疫沈澱法 (Co-immunoprecipitation, Co-IP)

細胞轉染完 48 小時後，收取其細胞並測定其蛋白質濃度。測定後，取 300 µg 的蛋白質樣本，再以磷酸鹽溶液補到總體積為 300 µl，隨後加入 15 µl 之 anti-Flag M2 Affinity Gel (Sigma)，放置於 4 °C 冷房的旋轉器反應作用至隔日。隔天，以轉速 1000 g 離心 1 分鐘讓形成的免疫複合物沈澱下來，再以磷酸鹽溶液清洗三次，每次清洗後都需要再以轉速 1000 g 離心 1 分鐘，接著加入 2x loading dye 於 95 °C 煮 10 分鐘。將煮後的上清液取出，即可進行西方墨點法分析。

第五節、構建質體 (Plasmid construction)

一、聚合酶連鎖反應及構建質體

取大鼠之細胞，以 RNAspin mini kit (GE Healthcare, UK) 萃取出細胞內的 RNA，以分光光度計 OD260 nm 測量 RNA 濃度，接著進行反轉錄酵素反應 (QuantiTect Reverse Transcription, QIAGEN)：取 1 µg template RNA 加入 2 µl g DNA Wipeout Buffer，並加入 nuclease-free water 使總體積為 14 µl，置於 42 °C 反應 2 分鐘後取出放置於冰上 5 分鐘使之冷卻，再加入 6 µl 的反應溶液 (包含：1 µl Quantiscript Reverse Transcriptase、4 µl Quantiscript RT Buffer、1 µl RT Primer Mix)，置於 42 °C 反應 30 分鐘及 95 °C 反應 3 分鐘後，即完成反轉錄酵素反應，此互補去氧核糖核酸 (complementary DNA, cDNA) 產物可放置於 -20 °C 冰箱保存。

以 cDNA 當成模板 (template) 及兩段引子 (primer)，分別是 Forward primer : 5' ATC GGG ATC CAT GCC AGC TGA TAT AAT GG 3' ; Reverse primer : 5' CGA TTC TAG ACT GTT CCG CCA CGG CCT CCA C 3' 。取 5 μ l DNA (10 ng/ μ l)、0.5 μ l pfu ultra polymerase、2 μ l pfu ultra buffer、0.5 μ l dNTP、0.4 μ l forward primer (10 μ M)、0.4 μ l Reverse primer (10 μ M)，最後總體積 20 μ l，進行聚合酶連鎖反應 (polymerase chain reaction, PCR)。反應完成後，利用 2 % 瓊脂凝膠電泳 (agarose gel electrophoresis) 分析聚合酶連鎖反應的產物，設定電壓 100 伏特，進行半小時電泳。最後將瓊脂凝膠放到紫外光照相系統觀察聚合酶連鎖反應的產物。接著，將聚合酶連鎖反應的產物接入含有 BamHI 和 XbaI 限制切位 (restriction enzyme site) 的 pCMV-Flag 載體 (Vector)，形成 pCMV-Flag-Hes-1 質體。此質體是以 CMV (cytomegalovirus) 當啟動子所驅動的，故能表現於哺乳類動物中。

二、轉型

取 10 μ l DNA 產物加入到置於冰上解凍完成的勝任細胞 (competent cell, Ecos) 中，混合均勻靜置於冰上作用一分鐘，放到 42 $^{\circ}$ C 水浴槽加熱振盪刺激 (Heat shock) 45 秒鐘，隨後取出立即放置在冰上一分鐘，使質體能夠進入到勝任細胞中。由於是以 pCMV-Flag 當成載體 (vector)，故取 500 μ l 的 LB-broth medium 加入到轉型完成細胞管中，放置於 37 $^{\circ}$ C 摩天旋轉輪作用一小時，進行 recover。最後，將之塗到含有 kanamycin 抗生素的 LB 培養皿上，靜置在 37 $^{\circ}$ C 培養箱至隔天，以利菌落生長。

三、小量質體 DNA 的抽取

首先，先從培養皿上挑一顆單一菌落 (colony)，於含有 100 μ g/ml kanamycin 抗生素的 LB-broth medium 中，並培養於 37 $^{\circ}$ C 迴轉式震盪培養箱 (Orbital shaker incubator)，振搖約 16 小時。接著，取 2 ml 的菌液加入到微量離心管，以 3500 rpm 離心三分鐘，收集菌體 (pellet)。利用 QIAGEN Plasmid Purification Kits 抽取細菌中質體 DNA。第一步驟：離心完成收集好菌體，將上清液倒掉留下菌體，加入 250 μ l resuspension solution 震搖 (vortex)，使菌體均勻散佈在整個溶液中。第二步驟：加入 250 μ l lysis buffer 後，以手上下反轉微量離心管直到混合液成黏液狀。第三步驟：加入 350 μ l neutralization solution，以手上下反轉微量離心管，以 13000 rpm 離心五分鐘。第四步驟：將上清液倒入含有 spin column 的收集管中，以 13000 rpm 離心一分鐘。第五步驟：開始進行 column 清洗，先加入 500 μ l column wash solution，以 13000 rpm 離心一分鐘後，倒掉液體；再進行第二次的清洗，加入 700 μ l 含有酒精的 column wash solution，同樣以 13000 rpm 離心一分鐘後，倒掉液體後再離心一次。第六步驟：將 spin column 移至 1.5 ml 微量離心管後，取 60 μ l elution buffer 加到 spin column 上靜置一分鐘後，以 13000 rpm 離心一分鐘，即得到質體 (plamid) DNA。建構好的質體，可以藉由 BamHI 和 XbaI 的限制酶酵素作用，並且再藉由定序

(sequencing) 加以驗證。質體 (plamid) DNA 可保存於 -20°C 冰箱。

四、建構定點突變 (site-directed mutagenesis) 之質體

首先，設計好帶有特定位置突變的引子，分別是 Forward primer : 5' ATCGGG ATC CAT GCC AGC TGA TAT AAT GG 3' ; Reverse primer : 5' CGA TTC TAG ACT GTT CCG CCA CGG CCT CCA C 3'。以正常啟動子的野生型 (wild type) DNA 當成模板，進行聚合酶連鎖反應。取 5 μl DNA (10 ng/ μl)、1 μl pfu ultra polymerase、5 μl pfu ultra buffer、1 μl dNTP、1 μl forward primer (10 μM)、1 μl Reverse primer (10 μM)，最後總體積 50 μl ，進行聚合酶連鎖反應。反應完成後，同樣利用 2 % 瓊脂凝膠電泳 (agarose gel electrophoresis) 分析聚合酶連鎖反應的產物，設定電壓 100 伏特，進行半小時電泳。最後將瓊脂凝膠放到紫外光照相系統觀察聚合酶連鎖反應的產物。接著，取 1 μl 20 u/ μl 的 DpnI 加到聚合酶連鎖反應產物中，於 37°C 反應一小時，以去除原質體的 DNA。最後，接著進行轉型、塗盤、挑選菌落、養菌、抽取小量質體 DNA 及送定序的步驟。

五、菌液的保存

取 600 μl 滅菌過的 50 % Glycerol 與 400 μl 菌液混合後，放置到 -80°C 冰箱保存。

第六節、蛋白質穩定分析 (Protein stability assay)

首先，進行細胞轉染，培養至 24 小時後，即可進行蛋白質穩定分析。本論文，所使用的藥劑是 cycloheximide (Sigma)，cycloheximide 是透過與真核細胞內的異位酶 translocase enzyme 作用進而去抑制蛋白質的生成。因實驗所需，將原本溶在 DMSO 中濃度是 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的 cycloheximide (CHX) 稀釋於無血清的 DMEM 培養液，配製成濃度為 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ，在不同時間點加入 10 μl 的 cycloheximide，使最後濃度為 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 。待加藥完成後，收取其蛋白質均質液，進行西方墨點法。完成後，再進一步以 Image J 軟體進行量化分析。

第七節、實驗動物 (Experimental animals)

本論文實驗選用 Sprague-Dawley 品系之雄性大白鼠 (購自樂斯科，Bio LASCO Taiwan Co., Ltd)，年齡為八週大，體重介於 250~400 克之間。實驗動物皆由中央研究院生物醫學研究所動物房飼養與管理，並且依據生物醫學研究所動物中心之規章進行飼養。動物房之室內溫度設定為 $25 \pm 1^{\circ}\text{C}$ ，晝夜循環設定為 12 / 12 小時，早上八點到晚上八點為白

畫。實驗動物之大白鼠飼養於 PV 飼養盒內，並給予充足的飼料與水。動物實驗人員的操作均遵照 [中央研究院生物醫學研究所實驗動物手冊] 之規定進行。

第八節、海馬迴內基因轉染作用 (transfection)

一、立體定位手術與埋管

選取年齡約八週大的 Sprague-Dawley 品系之雄性大白鼠，進行腦部立體定位手術 (stereotaxic surgery)。手術進行前，先以腹腔注射的方式進行麻醉劑巴比妥鹽 (sodium pentobarbital, 50 mg/kg) 的注射，待其全身麻醉後，剔除大白鼠頭上的毛髮，再將其固定於立體定位儀 (stereotaxic instrument) 上，門牙固定桿 (tooth bar) 標高為 -2.4 mm。以手術刀切開頭皮，使頭骨裸露出，以生理食鹽水止血、清潔乾淨後，定出前囟 (bregma) 的位置。依據大白鼠腦部定位圖譜 (Paxinos et al., 1986)，選擇欲進行基因轉染作用之海馬迴 CA1 區域的座標。以前囟為原點，在其後方 3.5 mm，離中線兩側各 2.0 mm 的位置，取一根消毒過的不鏽鋼管 (外徑 0.63 mm，內徑 0.33 mm) 埋入。海馬迴 CA1 區域為頭蓋骨表面下 3.4 mm，為了預留注射藥物之內管多出的 1.5 mm，因此埋管的深度為 1.9 mm。不鏽鋼管以三根螺絲釘及牙粉固定於頭蓋骨，需要再放入等長的鋼絲於不鏽鋼管中以避免阻塞。埋管手術完成後，給予適當光源照射以維持正常體溫，待大白鼠清醒後再送回動物室，以正常飼養方式飼養一周後，待其身體狀況復原後，方可進行動物實驗。

二、質體基因與聚乙炔亞胺混合物的製備

將質體基因轉染至海馬迴 CA1 區域前，先製備質體基因與聚乙炔亞胺 (polyethylenimine, PEI) 混合物。由於，質體基因為負電，故須與帶正電的有機聚合物聚乙炔亞胺包覆在一起形成微小體，再藉由內噬作用 (endocytosis) 送入到細胞內。此混合物低毒性，可穿過血腦障壁，在基因轉染後 48 至 72 小時便可以穩定的表現於皮質神經元細胞內 (Abdallah et al., 1996 ; Martres et al., 1998 ; Lungwitz et al., 2005)。

首先，純化大量的質體基因，以 5 % 葡萄糖將質體基因濃度調整至 2.7 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ，取 0.45 μl 的 1M PEI 與 0.55 μl 的質體基因 (2.7 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$)，並連續震盪 15 秒使其相互混合，質體基因最終濃度為 1.5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ，於室溫下靜置 15 分鐘即可進行海馬迴 CA1 區域的注射。

三、海馬迴 CA1 區域注射

埋管手術完成後，待大白鼠休息一周，即可進行海馬迴 CA1 區域注射。藉由微量注射幫浦，以每分鐘 0.1 μl 的速度注入總體積為 0.5 μl 之質體基因與聚乙炔亞胺混合物至海馬迴 CA1 區域。注射完畢後，先停留五分鐘，再將注射針取出以避免因腦部內外壓力的不同

會隨著針頭的拔出而使原先注入的藥物滲出。經過 48 小時的轉染作用，方可進行莫氏水迷津實驗。

第九節、動物行為實驗：莫氏水迷津實驗 (Morris water maze)

一、水迷津試驗器材

水迷津試驗器材依據 Richard Morris 於 1984 年所提出的藍本稍作修改。選用塑膠製圓形泳池，直徑 2 公尺，高 0.6 公尺，在池內邊緣約 30 公分處放置一個直徑 8 公分的圓形透明壓克力平台，於池內注入 20 公分高而水溫約 25 ± 2 °C 的水，使平台隱藏於水面下約 2.5 公分，並於池內加入奶粉及漂白粉，使池內的水呈白色不透明混濁狀。牆壁四周貼上顏色與形狀各異的圖案以作為空間學習的空間參考線索 (spatial cues)。為紀錄及分析動物行為活動軌跡，在泳池上方架設攝影機並連接電腦，利用影像追蹤軟體 (water-maze video tracking record system, HasoTec, Germany) 將泳池區分成四個虛擬象限區域。

二、隱藏式平台水迷學習津試驗

隱藏式平台 (hidden platform) 水迷津學習試驗又稱莫氏水迷津試驗 (Morris water maze learning task)，最早是 1984 年由 Morris 所提出的。本論文實驗依據此藍本做適當的修改。在進行此水迷津試驗前 48 小時，將質體基因以微量注射幫浦轉染注射至大白鼠海馬迴 CA1 區域，第一次注射完畢後的 72 小時再追加一劑相同劑量，並讓大白鼠休息一小時後再進行水迷津試驗。測試時，將大白鼠面向池壁緩慢放入池中，任其在泳池中自由的探索游泳直到尋找到平台，並站立在平台上為止。大白鼠由放入泳池後至找到平台並站立於平台上的時間被紀錄為逃離時間 (escape laterncy)。假使，大白鼠無法在逃離時間內順利找到平台，則由測試者帶領大白鼠至平台上。不論是大白鼠自行尋找到平台或是由測試者帶領才至平台上，皆讓大白鼠在平台上休息 20 秒，如此算是一個學習嘗試 (trail)。在每一個學習嘗試隨機將大白鼠放到泳池中不同的象限，大白鼠尋找平台所花費的時間越短，表示其空間記憶越好。

本論文實驗的進行，給予大白鼠 60 秒的逃離時間尋找平台，並同樣給予 20 秒在平台上的休息時間。每天有兩個學習嘗試，分別於早上十點半、下午一點半、下午四點半進行，每三個學習嘗試為一個學習時段 (session)，連續進行四天，總共四個學習時段。在連續四天的學習嘗試後，於第五天進行探測試驗 (probe trial)。這試驗是將泳池中的平台取出，仍保留牆壁上的空間線索，將大白鼠放入泳池任其游泳探索 60 秒，並利用攝影機連接影像追蹤軟體紀錄游泳的軌跡、速度、穿越平台的次數、停留在平台所在象限區域的時間。此方式可確認大白鼠是藉由對於平台空間位置的記憶而尋找到平台。

三、分離腦組織

大白鼠在行為測試後，立刻斷頭犧牲取出全腦，立即放入 4 °C 的磷酸鹽緩衝溶液 (pH7.4) 中浸泡數分鐘，接著將全腦取出放置在乾冰台上，利用腦組織切割器 (brain slicer) 進行解剖分離。將腦組織以冠狀切面分割成六片，每片腦組織厚度 0.2 mm 後，並依照解剖位置，以不鏽鋼管 (外徑 0.63 mm, 內徑 0.33 mm) 取出雙側海馬迴 CA1 區域，取出後立即以乾冰冰凍起來，並儲存於 -80 °C 冰箱保存。

四、腦組織蛋白質萃取

將腦組織加入含有蛋白質酶抑制劑 (protease inhibitor) 及磷酸酶抑制劑 (phosphatase inhibitor) 的均質緩衝液中。於低溫環境利用超音波震盪器 (sonifier/cell disruptor, Branson Sonic Power, USA) 將組織打碎均質化，接著把震碎的細胞，於 4 °C、14000 rpm 高速離心十分鐘以去除細胞殘骸及未震碎的細胞後，收取其含有蛋白質的上清液即為組織均質液，保存於 -80 °C 冰箱。

五、海馬迴組織之免疫沈澱與西方墨點法

海馬迴組織均質液進行免疫沈澱前，先進行蛋白質濃度測定。測定後，取 500 µg 的組織均質液，再以磷酸鹽溶液補到總體積為 500 µl，隨後加入 3 µl 之抗體 anti-Flag M2，放置於 4 °C 冷房的旋轉器上反應作用 1 至 2 小時。接著，取 15 至 20 µl 之蛋白質 A 球狀物 (protein A Mag Sepharose Xtra, GE) 與之混合，同樣放置於 4 °C 冷房的旋轉器上反應作用整晚。隔天，將微量離心管放置到專用的磁座上，將形成的免疫複合物沈澱下來，再以磷酸鹽溶液清洗兩次及均質緩衝液清洗一次，每次清洗的時候都需要將微量離心管以手上下搖晃 16 至 20 次，在最後一次清洗及以手上下搖晃後需離心，讓微量離心管上的免疫複合物沈澱全部聚集到微量離心管管底。接著，加入 2x loading dye 於 95 °C 煮 5 分鐘。取出上清液並且避免不要吸取到磁珠，即可進行西方墨點法以確認免疫沈澱法沈澱出來的 Flag-bound protein A 是否與 Hes-1 有相連結。

第十節、藥物的製備 (Preparation of drugs)

1. 均質緩衝液 (RIPA lysis buffer) : Tris-HCl (50 mM, pH8.0)、NaCl (150 mM)、NP-40 (1%)、EDTA (2 mM)
2. 5x loading dye : Tris-HCl (250 mM, pH6.8)、DTT (500 mM)、10% SDS、50 % Glycerol、0.5 % Bromophenol
3. 電泳緩衝液 (Running buffer) : Tris-HCl (25 mM)、Glycine (192 mM)、0.1 % SDS

- 4.轉漬緩衝液 (Transfer buffer) : Tris-HCl (25mM, pH8.3)、Glycine (192 mM)、15 % Methanol
- 5.PBS (phosphate buffered saline) : NaCl (137 mM)、Na₂HPO₄ (10 mM)、KH₂PO₄ (1.8 mM)、pH7.4
- 6.TBST : Tris-HCl (25 mM, pH8.0)、NaCl (150 mM)、0.05 % Tween-20
- 7.Stripping buffer : Glycine (200mM, pH2.5)、0.05 % Tween-20

第十一節、統計分析 (Statistics)

西方墨點法若僅有實驗組及控制組兩組別時，以 Student's t-test 分析；若是有三個組別時，則以單因子變異分析 [one-way analysis of variance (ANOVA) with repeated measure] 加上 Newman-Kuels method 分析。水迷津空間學習試驗行為結果以雙因子變異分析中的一重複測量 [two-way analysis of variance (ANOVA) with repeated measure] 進行統計分析。





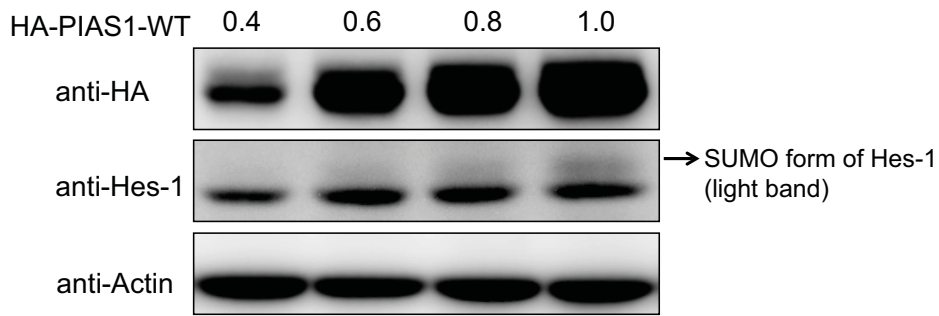
第三章 實驗結果

第三章 實驗結果

第一節、Hes-1 透過 PIAS1 進行類小泛素化修飾

為了確認 Hes-1 是否能透過類小泛素 E3 連接酵素 PIAS1 進行類小泛素化修飾。首先，在 HEK293T 細胞內轉染根據濃度梯度轉染 PIAS1 質體 (HA-PIAS1-WT)。經由西方墨點法分析，顯示在 HEK293T 細胞內 PIAS1 表現量有隨著轉染濃度的增加而增加，並且觀察其內生性 Hes-1 蛋白質。發現在轉染高濃度 (1.0 μg) 之 PIAS1 質體的條件下，Hes-1 明顯有被類小泛素修飾的現象 (圖1A)。接著，為了更一進步確認圖1A中被類小泛素修飾的現象，在細胞中依據濃度梯度到高濃度也共同轉染相同濃度 (0.4 μg) 之 SUMO1 質體 (Myc-SUMO1)。經由西方墨點法分析，顯示在分子量位置較高的地方看見 PIAS1 被類小泛素修飾的型式存在，這個現象在未轉染 SUMO1 質體基因的圖1A 並沒有觀察到其內生性 Hes-1 蛋白質類小泛素化修飾的現象比起圖1A 更加明顯，同時會隨著 PIAS1 質體轉染濃度的增加而增加其內生性 Hes-1 蛋白質被類小泛素修飾的型式 (圖1B)。經由圖1 確認了在 HEK293T 細胞中 Hes-1 蛋白質可以經由PIAS1的作用進行類小泛素化修飾。SUMO1 及 PIAS1 兩者對於 Hes-1 蛋白質的類小泛素化修飾具有加成的作用，可以明顯增加 Hes-1 蛋白質被類小泛素修飾。

圖 1 (A)



(B)

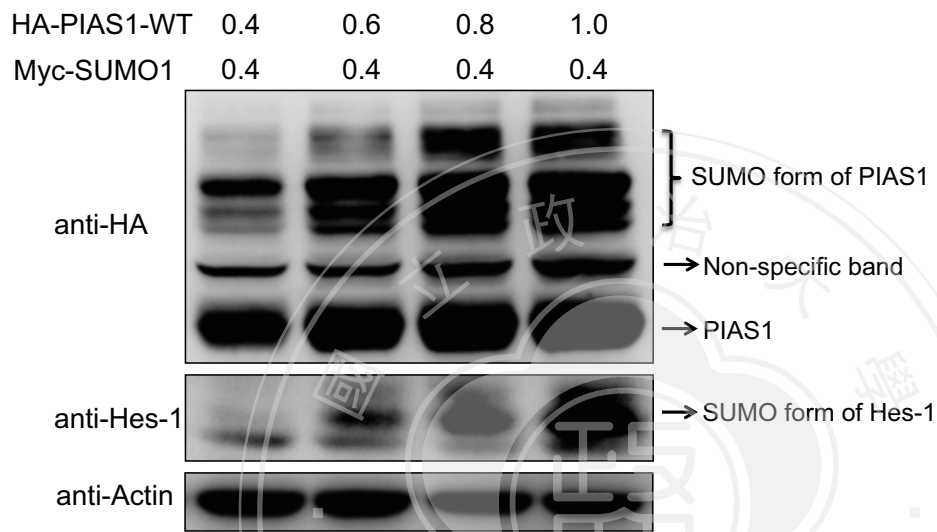


圖1、HEK293T 細胞內生性 Hes-1 蛋白質可透過 PIAS1 進行類小泛素化修飾。

(A) 在 HEK293T 細胞轉染濃度梯度，分別是 0.4 μg 、0.6 μg 、0.8 μg 、1.0 μg 之類小泛素 E3 連接酶 PIAS1 質體。西方墨點法分析，觀察到轉染高濃度 (1.0 μg) 之 PIAS1 質體在 HEK293T 細胞內生性 Hes-1 蛋白質可透過 PIAS1 進行類小泛素化修飾。

(B) 在 HEK293T 細胞共同轉染相同濃度 (0.4 μg) 之 SUMO1 質體及轉染濃度梯度，分別是 0.4 μg 、0.6 μg 、0.8 μg 、1.0 μg 之類小泛素 E3 連接酶 PIAS1 質體。西方墨點法分析，顯示在 HEK293T 細胞內生性 Hes-1 蛋白質可明顯透過 PIAS1 被 SUMO1 修飾。



第二節、探討類小泛素化修飾 Hes-1 的 lysine 位置

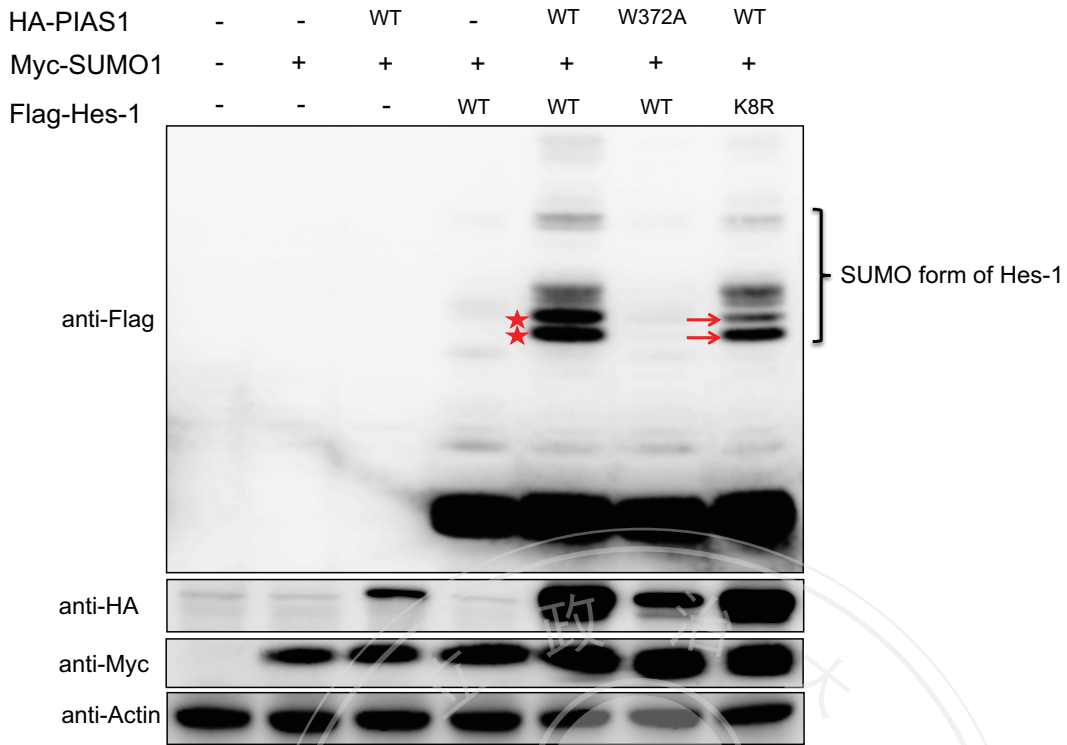
先前的研究指出類小泛素主要修飾目標蛋白質的 lysine 位置。為了確認 Hes-1 蛋白質被 SUMO1 修飾的胺基酸位置，先透過類小泛素修飾位置預測軟體 (SUMOsp 2.0) 分析 Hes-1 胺基酸序列 (Jian et al., 2009)。經過分析，軟體會分別依據其演算法邏輯列出可能被類小泛素修飾的 lysine 位置。根據結果，將分數較高的幾個可能的位置進行突變。最後，經由細胞的類小泛素化修飾實驗以及西方墨點法以確認其修飾位置。首先，分別轉染野生型 PIAS1 質體 (HA-PIAS1-WT) 或 E3 連接酶活性缺失之突變型質體 (HA-PIAS1-W372A) 及 SUMO1 質體 (Myc-SUMO1) 及野生型 Hes-1 質體 (Flag-Hes-1-WT) 或 Hes-1 蛋白質第八個胺基酸位置上的 lysine (K) 突變成 arginine (R) 的質體 (Flag-Hes-1-K8R)，將之分成七組。第一組：作為控制組只轉染其載體 (HA-vector, Myc-vector, Flag-vector)；第二組：SUMO1 質體 (Myc-SUMO1)；第三組：野生型 PIAS1 質體 (HA-PIAS1-WT) 及 SUMO1 質體 (Myc-SUMO1)；第四組：SUMO1 質體 (Myc-SUMO1) 及野生型 Hes-1 質體 (Flag-Hes-1-WT)；第五組：野生型 PIAS1 質體 (HA-PIAS1-WT) 及 SUMO1 質體 (Myc-SUMO1) 及野生型 Hes-1 質體 (Flag-Hes-1-WT)；第六組：突變型 PIAS1 質體 (HA-PIAS1-W372A) 及 SUMO1 質體 (Myc-SUMO1) 及野生型 Hes-1 質體 (Flag-Hes-1-WT)；第七組：野生型 PIAS1 質體 (HA-PIAS1-WT)，SUMO1 質體 (Myc-SUMO1) 及突變型 Hes-1 質體 (Flag-Hes-1-K8R)。經由西方墨點法分析，比較第四組與第五組的結果得知 Hes-1 蛋白質可透過 PIAS1 進行類小泛素化修飾。然而，第六組的結果顯示失去 E3 連接酶活性之突變型 PIAS1 質體即無法進行類小泛素化修飾。由此可知，Hes-1 蛋白質進行類小泛素化修飾的過程中 PIAS1 E3 連接酶的活性是不可或缺的。最後，比較第五組與第七組結果顯示突變型 Hes-1 蛋白質 (Flag-Hes-1-K8R) 的類小泛素修飾型式 (圖2A 箭頭標示) 與野生型 Hes-1 蛋白質 (圖2A 星號標示) 相較之下明顯減少。因此，若將 Hes-1 序列上第八個胺基酸位置的 lysine (K) 突變成 arginine (R) 後，Hes-1 將無法有效的進行類小泛素化修飾，因此 Hes-1 序列上第八個胺基酸位置的 lysine 是主要可被類小泛素所修飾的位置。

由於 Hes-1 蛋白質可透過 PIAS1 進行類小泛素化修飾。為了進一步探討 Hes-1 蛋白質與 PIAS1 蛋白質是否會經由彼此的直接交互作用進行類小泛素化修飾。在這裡實驗設計分成五個組別分別在 HEK293T 細胞中轉染不同的質體：(1) 野生型 PIAS1 質體 (HA-PIAS1-WT)；(2) 野生型 Hes-1 質體 (Flag-Hes1-WT)；(3) 野生型 PIAS1 質體及野生型 Hes-1 質體；(4) 野生型 PIAS1 質體及突變型 Hes-1 質體 (Flag-Hes-1-K8R)；(5) 突變型 PIAS1 質體 (HA-PIAS1-W372A) 及野生型 Hes-1 質體。首先，透過共同免疫沈澱法 (Co-immunoprecipitation)，再以西方墨點法分析免疫沈澱複合物中的蛋白質。結果顯示野生型 Hes-1 蛋白質與野生型 PIAS1 蛋白質之間有直接交互作用會產生蛋白質複合物。然而，突

變型 PIAS1 蛋白質因為失去 E3 連接酶活性，故與野生型 Hes-1 蛋白質結合作用力明顯減弱。另一方面，突變型 Hes-1 蛋白質與野生型 PIAS1 蛋白質之間，因為失去結合作用力，而無法形成蛋白質複合物。更進一步證實了 Hes-1 蛋白質與 PIAS1 蛋白質之間的結合作用對於類小泛素化修飾反應的進行有著決定性的影響。



圖2 (A)



(B)

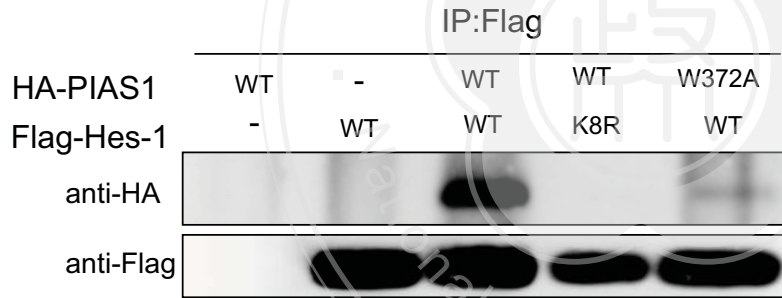


圖2、探討 Hes-1 蛋白質上可被類小泛素修飾的 lysine 位置。

(A) 由第五組轉染 HA-PIAS1 及 Myc-SUMO1 及 Flag-Hes-1 之質體，顯示 Hes-1 可以被類小泛素修飾。進而觀察第五組轉染 HA-PIAS1 及 Myc-SUMO1 及 Flag-Hes-1、第六組轉染突變型 HA-PIAS1-W372A 及 Myc-SUMO1 及 Flag-Hes-1 以及第七組轉染 HA-PIAS1 及 Myc-SUMO1 及突變型 Flag-Hes-1-K8R。突變型 PIAS1 讓野生型 Hes-1 無法被類小泛素修飾，由此可見 Hes-1 蛋白質進行類小泛素修飾化需要透過 E3 連接酶 PIAS1 作用。轉染突變型 Flag-Hes-1-K8R 會使得被類小泛素修飾的型式 (圖2A 箭頭標示) 比起轉染野生型 Flag-Hes-1-WT 的類小泛素修飾的型式 (圖2A 星號標示) 明顯減少，顯示 Hes-1 序列上第八個胺基酸位置的 lysine 是主要可被類小泛素所修飾的位置。

(B) 利用共同免疫沈澱法，再透過西方墨點法分析，結果顯示野生型 Hes-1 蛋白質與野生型 PIAS1 蛋白質之間有交互作用存在會形成蛋白質複合物，而突變型 Hes-1 (Hes-1-K8R) 蛋白質無法與野生型 PIAS1 蛋白質無法形成蛋白質複合物。

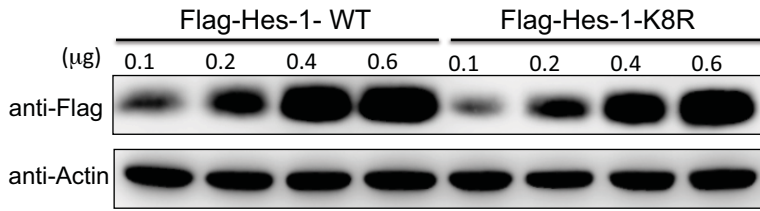


第三節、類小泛素修飾化影響 Hes-1 蛋白質穩定度

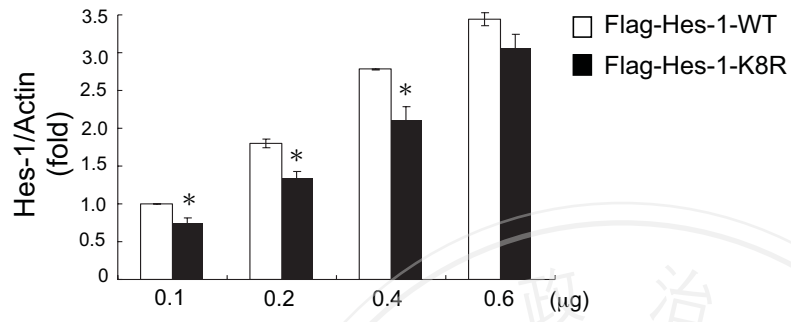
根據本實驗室先前的研究成果證實 Hes-1 蛋白質 Serine 263 的位置發生磷酸化作用可使 Hes-1 蛋白質較為穩定 (Lin et al., 2012)。由於，在論文中證實 Hes-1 可進行類小泛素化修飾。進一步探討類小泛素化修飾對於 Hes-1 蛋白質穩定度的影響。因此，實驗分成兩組進行蛋白質穩定度分析，分別一組為野生型 Hes-1，另一組為突變型 Hes-1 (Hes-1-K8R)。首先，在 HEK293T 細胞內分別依據濃度梯度轉染四種不同濃度 0.1 μg 、0.2 μg 、0.4 μg 、0.6 μg 之質體：野生型 Hes-1 及突變型 Hes-1 (Hes-1-K8R)。西方墨點法分析顯示，野生型 Hes-1 及突變型 Hes-1 (Hes-1-K8R) 在細胞內蛋白質表現量會隨著轉染濃度的增加而增加 (圖3A)。比較相同濃度野生型 Hes-1 及突變型 Hes-1 (Hes-1-K8R) 蛋白質表現量及穩定度的差異，除了轉染 0.6 μg 這個濃度外統計分析皆達顯著差異 (圖3B、圖3C) (0.1 μg : $T_{1,6}=3.59$; 0.2 μg : $T_{1,6}=5.04$; 0.4 μg : $T_{1,6}=3.88$; 0.6 μg : $T_{1,6}=1.92$, $p<0.05$, Student's t-test)，因此一旦 Hes-1 胺基酸序列上可被類小泛素所修飾的位置突變，將使其蛋白質在細胞內表現量較低也較為不穩定，結果顯示類小泛素化修飾確實會影響 Hes-1 蛋白質的穩定。

接著，藉由 cycloheximide 抑制蛋白質生成的特性，作為蛋白質穩定研究的材料。首先，同樣分成野生型 Hes-1 及突變型 Hes-1 (Hes-1-K8R) 兩組。細胞轉染 24 小時後，於每個細胞孔盤內加入 20 $\mu\text{g/ml}$ cycloheximide 處理六個不同時間點，分別為 0、1、2、4、6、8 小時。待加藥處理完成後收取其細胞並測定蛋白質濃度，再以西方墨點法分析以測定 Hes-1 蛋白質的穩定度 (圖4)。以野生型 Hes-1 的 0 小時蛋白質表現量作為控制組，分別與野生型 Hes-1 及突變型 Hes-1 (Hes-1-K8R) 其他時間點蛋白質表現量比較其蛋白質穩定度，結果顯示突變型 Hes-1 的降解速率較快意謂其蛋白質表現量較為不穩定 (圖4B 及圖4C)。再分別比較同一個時間點野生型 Hes-1 及突變型 Hes-1 (Hes-1-K8R) 其蛋白質穩定度的差異，統計分析各個時間點皆達到顯著差異且突變型 Hes-1 (Hes-1-K8R) 蛋白質穩定度顯著的比較差 (0 小時 : $T_{1,10}=14.28$; 1 小時 : $T_{1,10}=9.74$; 2 小時 : $T_{1,10}=12.24$; 4 小時 : $T_{1,10}=18.44$; 6 小時 : $T_{1,10}=150.42$; 8 小時 : $T_{1,10}=19.87$, $p<0.001$, Student's t-test) (圖4B 及圖4C)。另外，再分別把野生型及突變型的 0 小時當成控制組，比較同一時間點穩定度的差異，其中在 2、4、6、8 小時達顯著性差異 (1 小時 : $T_{1,10}=4.42$; 2 小時 : $T_{1,10}=7.20$; 4 小時 : $T_{1,10}=16.84$; 6 小時 : $T_{1,10}=28.25$; 8 小時 : $T_{1,10}=17.02$, $p<0.001$, Student's t-test) (圖4D)。以上結果證實類小泛素修飾化會影響 Hes-1 蛋白質的穩定度，使 Hes-1 蛋白質更為穩定，反之無法進行類小泛素化修飾之突變型 Hes-1 蛋白質其降解速率較快且較為不穩定 (圖4)。

圖3 (A)



(B)



(C)

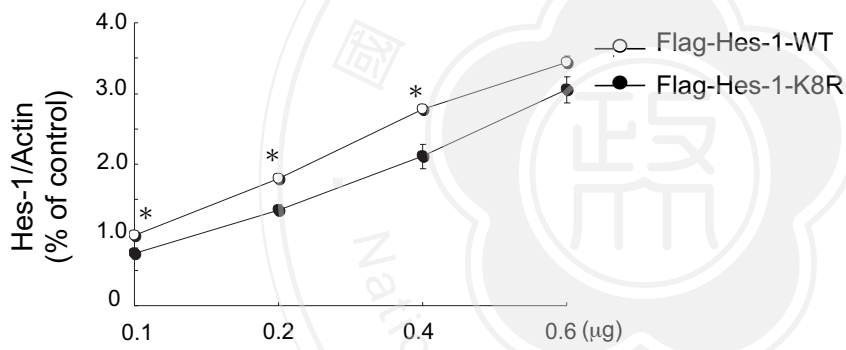


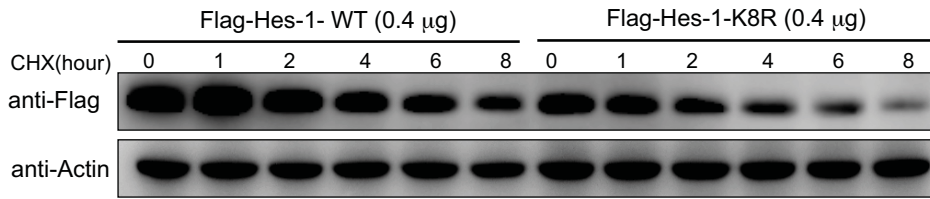
圖3、依據濃度梯度轉染四種不同濃度之 Hes-1 質體，測定 Hes-1 蛋白質在 HEK293T 細胞的表現。

(A) 在 HEK293T 細胞內依據濃度梯度分別轉染 0.1 μg 、0.2 μg 、0.4 μg 、0.6 μg 野生型 Hes-1 及突變型 Hes-1 (Hes-1-K8R)。野生型及突變型 Hes-1 在細胞內的蛋白質表現量皆隨著轉染濃度的增加而表現增加。

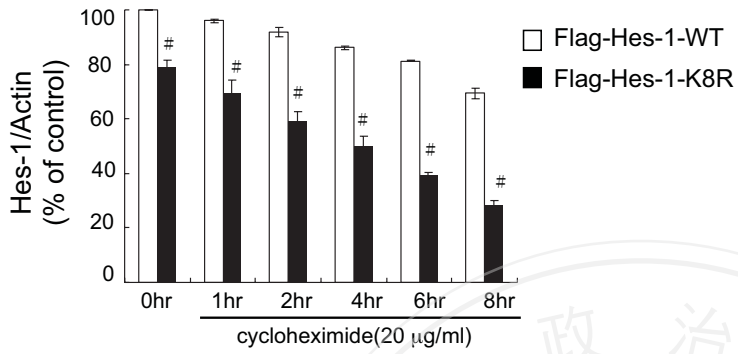
(B) 及 (C) 統計結果顯示這四個不同濃度之野生型 Hes-1 蛋白質及突變型 Hes-1 蛋白質穩定及表現量，結果顯示野生型 Hes-1 蛋白質較為穩定且表現量較高，並且在 0.1 μg 、0.2 μg 、0.4 μg 這幾個濃度達統計上的差異。實驗數值來自三次獨立實驗結果，實驗數值以 $\text{mean} \pm \text{SEM}$ 表示 (* , $p < 0.05$, Student's t-test)。



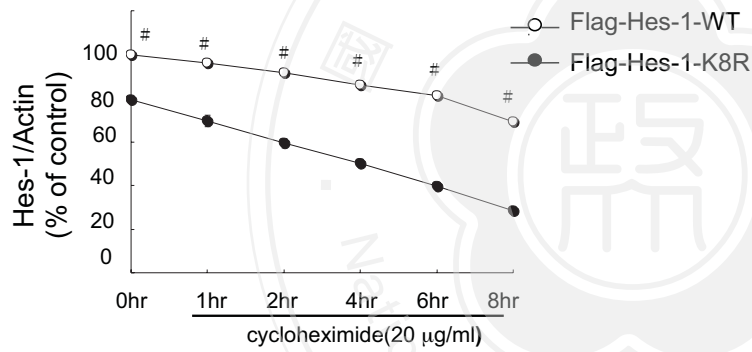
圖4 (A)



(B)



(C)



(D)

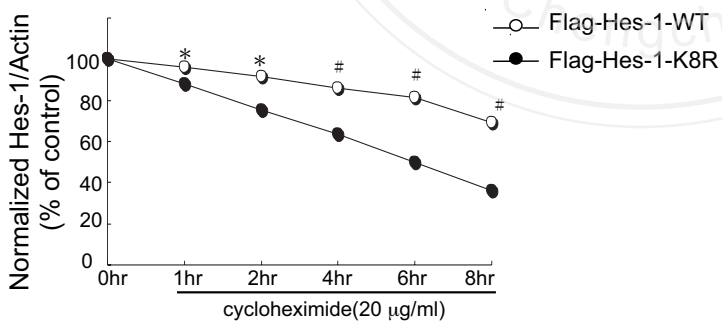


圖4、類小泛素化修飾影響 Hes-1 蛋白質的穩定度。

(A) 分成野生型 Hes-1 及突變型 Hes-1 (Hes-1-K8R) 兩組。細胞轉染 24 小時後，於每個細胞孔盤內加入 20 $\mu\text{g/ml}$ cycloheximide (簡稱 CHX) 處理六個不同時間點，分別為 0、1、2、4、6、8 小時。再以西方墨點法分析其蛋白質穩定度的差異。

(B) 及 (C) 及 (D) 統計分析顯示，突變型 Hes-1 (Hes-1-K8R) 降解速率較快且較為不穩定，野生型 Hes-1 蛋白質由於可進行類小泛素化修飾，因此其蛋白質較為穩定，證實類小泛素修飾化會影響 Hes-1 蛋白質的穩定。實驗數值來自三次獨立實驗結果，實驗數值以 mean \pm SEM 表示 (*, $p < 0.05$; #, $p < 0.001$; Student's t-test)。



第四節、類小泛素修飾化影響內生性 Hes-1 蛋白質的穩定度

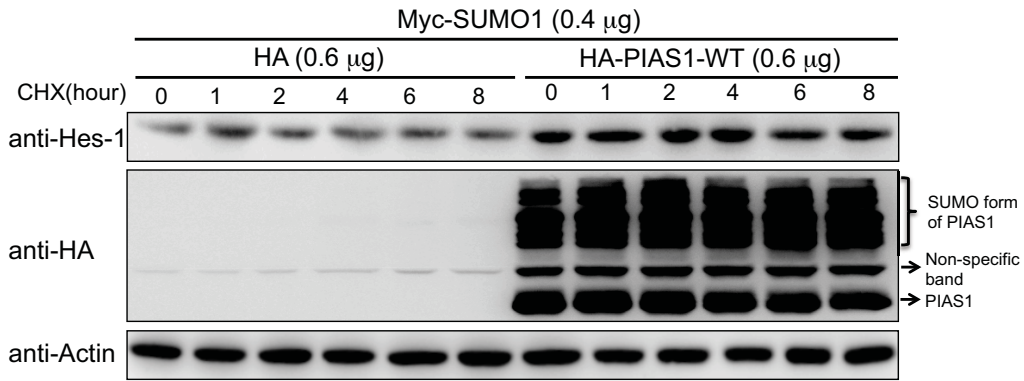
為了探討在 HEK293T 細胞內 Hes-1 蛋白質透過 PIAS1 進行類小泛素化修飾對於其內生性 Hes-1 蛋白質穩定度的影響。分成兩組，一組為SUMO1質體 (Myc-SUMO1) 及載體 (HA-vector)，另一組為SUMO1質體 (Myc-SUMO1) 及野生型PIAS1質體 (HA-PIAS1)。細胞轉染 24 小時後，於每個細胞孔盤內加入 20 $\mu\text{g/ml}$ cycloheximide 處理六個不同時間點，分別為 0、1、2、4、6、8 小時，再以西方墨點法分析以測定內生性 Hes-1 蛋白質穩定 (圖 5A)。結果顯示 SUMO1 質體及野生型 PIAS1 質體的組別，儘管經過 cycloheximide 處理後其內生性 Hes-1 蛋白質仍相對較為穩定且表現量較高 (圖 5A)。以只轉染載體、SUMO1 質體的 0 小時作為控制組與其組別內其他時間點以及轉染 SUMO1 質體、野生型 PIAS1 質體組內其他時間點比較 (圖 5B)，統計分析比較同一時間點顯示 SUMO1 質體及 PIAS1 質體的組別其內生性 Hes-1 蛋白質較為穩定，且達顯著差異 (圖 5B 及圖 5C) (0 小時： $T_{1,10}=7.90$ ；1 小時： $T_{1,10}=8.63$ ；2 小時： $T_{1,10}=6.78$ ；4 小時： $T_{1,10}=5.93$ ；6 小時： $T_{1,10}=7.98$ ；8 小時： $T_{1,10}=4.45$, $p<0.001$, Student's t-test)。另外，再分別把只轉染載體、SUMO1 質體及轉染 SUMO1 質體、野生型 PIAS1 質體的 0 小時當成控制組，比較同一時間點穩定度的差異，其中在 1、4、6 小時達顯著性差異 (1 小時： $T_{1,10}=1.62$ ；4 小時： $T_{1,10}=4.39$ ；6 小時： $T_{1,10}=5.19$, $p<0.05$, Student's t-test) (圖 5D)。

欲探討是否會受到 PIAS1 質體的濃度梯度的差異而造成細胞內 Hes-1 蛋白質的表現量及穩定度的差異。在此除了轉染 SUMO1 質體 (Myc-SUMO1) 並同時轉染三種不同濃度之野生型 PIAS1 質體 (HA-PIAS1)，分別是 0.3 μg 、0.6 μg 、1.2 μg 。細胞轉染 24 小時後，於每個細胞孔盤內加入 20 $\mu\text{g/ml}$ cycloheximide 處理六個不同時間點，分別為 0、4、8 小時，測定其內生性 Hes-1 蛋白質的穩定 (圖 5E)。結果顯示內生性 Hes-1 蛋白質隨著濃度梯度的增加而增加其蛋白質表現量及穩定。在高濃度 (1.2 μg) PIAS1 質體的組別，因為含有 SUMO1 質體，使其儘管經過 8 小時 cycloheximide 處理其內生性蛋白質依舊相當穩定。以野生型 0.3 μg 之 PIAS1 質體的 0 小時作為控制組與其組別內的其他時間小時及 0.6 μg 及 1.2 μg 之 PIAS1 質體的 0、4、8 小時統計分析，統計分析結果顯示 0.3 μg 及 0.6 μg 這兩個濃度在 4 小時皆達到顯著差異 (4 小時- 0.3 μg vs. 0.6 μg ： $T_{1,4}=2.27$ ；0.3 μg vs. 1.2 μg ： $T_{1,4}=3.44$ ；0.6 μg vs. 1.2 μg ： $T_{1,4}=0.54$, $p<0.05$, Student's t-test)，而 0.3 μg 及 1.2 μg 這兩個濃度在 8 小時皆達到顯著差異 (8 小時- 0.3 μg vs. 0.6 μg ： $T_{1,4}=1.68$ ；0.3 μg vs. 1.2 μg ： $T_{1,4}=5.13$ ；0.6 μg vs. 1.2 μg ： $T_{1,4}=1.90$, $p<0.01$, Student's t-test) (圖 5F)。由圖 5 證實 Hes-1 蛋白質透過 PIAS1 進行類小泛素化修飾可增加其蛋白質表現量及穩定。

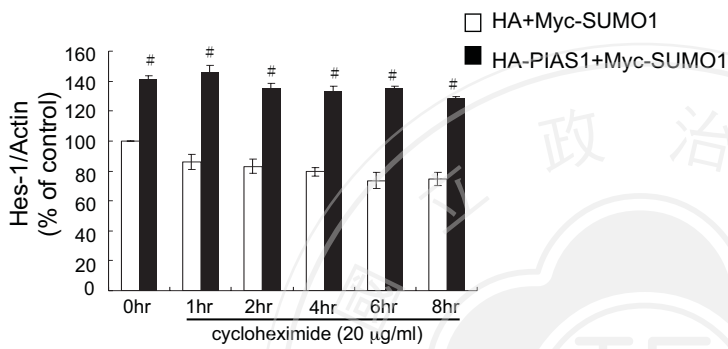
更進一步探討是否是因為 PIAS1 的參與使被類小泛素所修飾的 Hes-1 蛋白質其蛋白質更為穩定，因此藉由小片段干擾核糖核酸 (short interfering RNA, siRNA) 抑制細胞內

PIAS1。分成兩組，一組為 control siRNA，另一組為 PIAS1 siRNA (siPIAS1)，轉染濃度皆為 50 μ M。細胞轉染 24 小時後，於每個細胞孔盤內加入 20 μ g/ml cycloheximide 處理六個不同時間點，分別為 0、1、2、4、6、8 小時，以測定其內生性 Hes-1 蛋白質穩定度的差異。以未轉染 PIAS1 siRNA 的 0 小時作為控制組與其組別內其他時間點及 PIAS1 siRNA 其他時間點比較 (圖6B)。統計分析各個時間點皆達到顯著差異且 PIAS1 siRNA 組別其內生性 Hes-1 蛋白質穩定度顯著的較差 (0 小時： $T_{1,10}=67.45$ ；1 小時： $T_{1,10}=16.52$ ；2 小時： $T_{1,10}=17.71$ ；4 小時： $T_{1,10}=23.17$ ；6 小時： $T_{1,10}=8.81$ ；8 小時： $T_{1,10}=3.75$, $p<0.001$, Student's t-test)，並且由於抑制細胞內 PIAS1 因而 Hes-1 蛋白質的表現量在 0 小時也相對較為不穩定，特別是在處理 cycloheximide 8 小時這個時間點 Hes-1 蛋白質幾乎完全降解 ($T_{1,10}=3.751$, $p<0.001$, Student's t-test) (圖6B 及圖6C)。再分別把 control siRNA 及 PIAS1 siRNA 的 0 小時當成控制組，比較同一時間點穩定度的差異，在 1、2、4、8 小時達顯著差異 (1 小時： $T_{1,10}=1.62$ ；2 小時： $T_{1,10}=3.93$ ；4 小時： $T_{1,10}=4.39$ ；8 小時： $T_{1,10}=3.18$, $p<0.01$, Student's t-test)；在 6 小時達顯著差異 (6 小時： $T_{1,10}=5.19$, $p<0.05$, Student's t-test) (圖6D)。結果顯示 Hes-1 若無法透過 PIAS1 進行類小泛素化修飾，將使其蛋白質相對的較為不穩定。因此，綜合上述圖5 及圖6 結果再次證實 Hes-1 透過 PIAS1 進行類小泛素化修飾，進而調控其蛋白質穩定度。

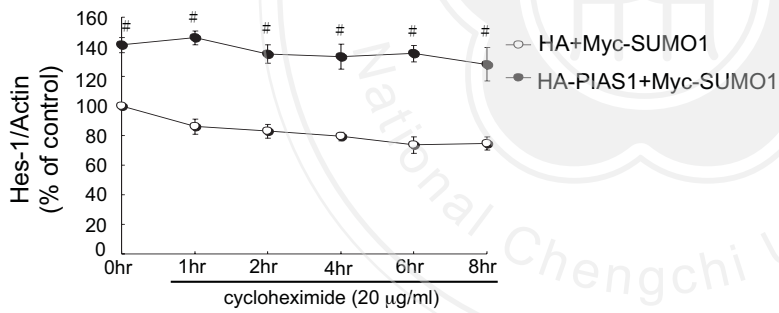
圖5 (A)



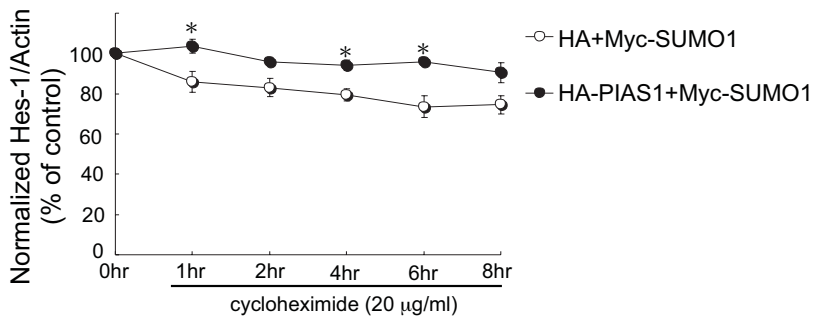
(B)



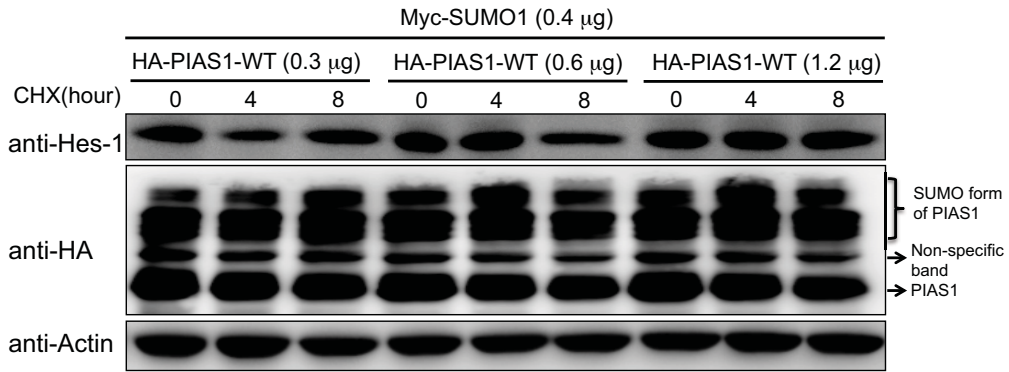
(C)



(D)



(E)



(F)

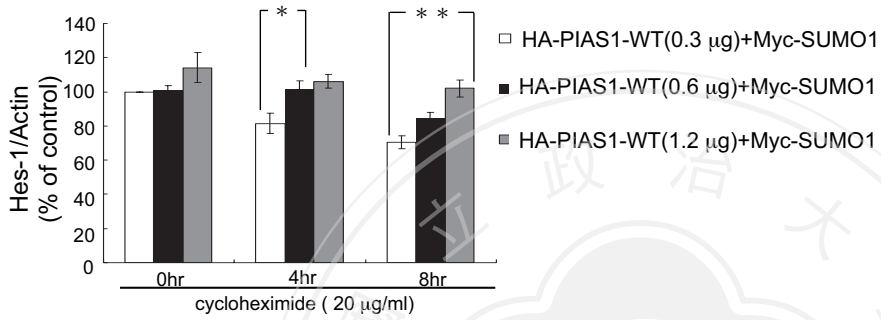


圖5、 HEK293T 細胞內 Hes-1 蛋白質透過 PIAS1 進行類小泛素化修飾對於其內生性 Hes-1 蛋白質穩定度的影響。

(A) 分成兩組，一組為SUMO1質體 (Myc-SUMO1) 及載體 (HA-vector)，另一組為SUMO1質體 (Myc-SUMO1) 及野生型PIAS1質體 (HA-PIAS1)。細胞轉染 24 小時後，於每個細胞孔盤內加入 20 $\mu\text{g/ml}$ cycloheximide (簡稱 CHX) 處理六個不同時間點，分別為 0、1、2、4、6、8 小時。再以西方墨點法分析其蛋白質穩定度的差異。

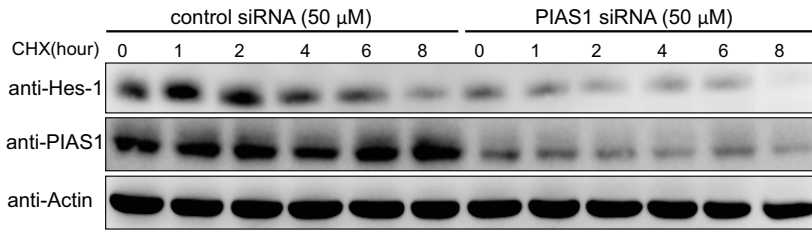
(B) 及 (C) 及 (D) 統計分析在相同時間點，皆達統計上的差異 (*, $p < 0.05$; #, $p < 0.001$, Student's t-test)。

(E) SUMO1質體並同時轉染三種不同濃度之野生型 PIAS1質體，分別是 0.3 μg 、0.6 μg 、1.2 μg ，於每個細胞孔盤內加入 20 $\mu\text{g/ml}$ cycloheximide (簡稱 CHX) 處理三個不同時間點，分別為 0、4、8 小時。

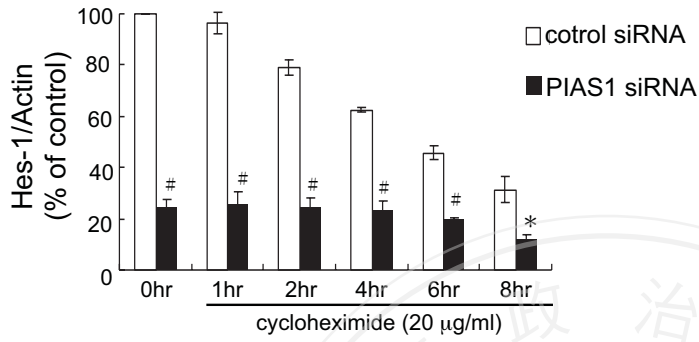
(F) 統計分析這三種不同濃度，在 4 小時 0.3 μg 與 0.6 μg 達顯著差異，在 8 小時 0.3 μg 與 1.2 μg 達顯著差異。實驗數值來自三次獨立實驗結果，實驗數值以 mean \pm SEM 表示 (*, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$, Student's t-test)。



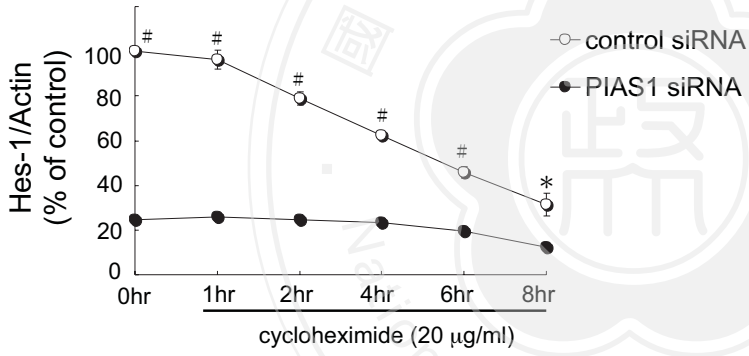
圖6 (A)



(B)



(C)



(D)

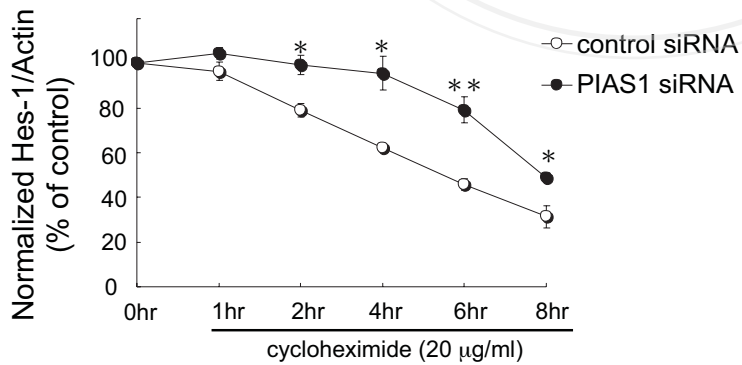


圖6、抑制細胞內 PIAS1 進而抑制 Hes-1 蛋白質的穩定度。

(A) 分成兩組，一組為 control siRNA，另一組為 PIAS1 siRNA。細胞轉染 24 小時後，於每個細胞孔盤內加入 20 $\mu\text{g/ml}$ cycloheximide (簡稱 CHX) 處理六個不同時間點，分別為 0、1、2、4、6、8 小時，以測定其內生性 Hes-1 蛋白質穩定度的差異。

(B) 及 (C) 及 (D) 統計分析顯示 Hes-1 若無法透過 PIAS1 進行類小泛素化修飾，將使其蛋白質相對的較為不穩定，且皆達統計差異。實驗數值來自三次獨立實驗結果，實驗數值以 $\text{mean} \pm \text{SEM}$ 表示 (*, $p < 0.05$; **, $p < 0.05$; #, $p < 0.001$, Student's t-test)。



第五節、Hes-1 透過 PIAS1 進行類小泛素化修飾影響 Hes-1 蛋白質穩定度

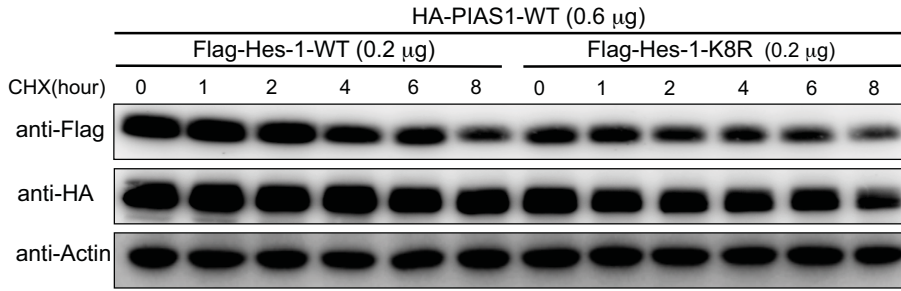
首先，在此同樣分成兩組，一組為 PIAS1 (HA-PIAS1) 質體及野生型 Hes-1 質體，另一組為 PIAS1 (HA-PIAS1) 質體及突變型 Hes-1 (Hes-1-K8R) 質體，探討 Hes-1 透過 PIAS1 進行類小泛素化修飾是否影響 Hes-1 蛋白質的穩定度。細胞轉染 24 小時後，於每個細胞孔盤內加入 20 $\mu\text{g/ml}$ cycloheximide 處理六個不同時間點，分別為 0、1、2、4、6、8 小時。實驗結果顯示由於野生型 Hes-1 透過 PIAS1 進行類小泛素化修飾使 Hes-1 蛋白質更為穩定 (圖7)。以 PIAS1 質體及野生型 Hes-1 質體的 0 小時蛋白質表現量作為控制組，分別與組別內其他時間點及 PIAS1 質體及突變型 Hes-1 (Hes-1-K8R) 質體其他時間點蛋白質表現量比較其蛋白質穩定，結果顯示突變型 Hes-1 組別的降解速率較快意謂其蛋白質表現量較為不穩定 (圖7B 及圖7C)。分析兩個組別在同一個時間點其蛋白質穩定度的差異，在各個時間點皆達到顯著差異，其中 0、1、4 小時差異達 0 小時： $T_{1,10}=4.89$ ；1 小時： $T_{1,10}=5.27$ ；4 小時： $T_{1,10}=4.78$, $p<0.01$ 的差異，2、6、8 小時差異達 2 小時： $T_{1,10}=3.62$ ；6 小時： $T_{1,10}=3.15$ ；8 小時： $T_{1,10}=2.81$, $p<0.05$ 的差異。然而，當分別把野生型及突變型的 0 小時當成控制組，比較同一時間點穩定度的差異，皆未達顯著性差異 (圖7D)。

在本論文研究中一開始證實透過 SUMO1 質體及 PIAS1 質體於 HEK293T 細胞證實其內生性 Hes-1 蛋白質可以被類小泛素修飾 (圖1)。在此為了更進一步探討野生型 Hes-1 蛋白質及突變型 Hes-1 (Hes-1-K8R) 蛋白質同時轉染 SUMO1 質體及 PIAS1 質體其蛋白質穩定的差異性。分成兩組，一組為野生型 Hes-1 質體、SUMO1 (Myc-SUMO1) 質體及 PIAS1 (HA-PIAS1) 質體，另一組突變型 Hes-1 (Hes-1-K8R) 質體、SUMO1 (Myc-SUMO1) 質體及 PIAS1 (HA-PIAS1) 質體。細胞轉染 24 小時後，於每個細胞孔盤內加入 20 $\mu\text{g/ml}$ cycloheximide 處理六個不同時間點，分別為 0、1、2、4、6、8 小時，測定兩組間 Hes-1 蛋白質穩定度的差異 (圖8)。以野生型 Hes-1 的 0 小時作為控制組與組別內其他時間點及突變型 Hes-1 (Hes-1-K8R) 其他時間點比較其蛋白質穩定度，由直線圖顯示突變型 Hes-1 的降解速率較快且較為不穩定 (圖8C)。再分別比較同一個時間點野生型 Hes-1 及突變型 Hes-1 (Hes-1-K8R) 其蛋白質穩定度的差異，統計分析各個時間點皆達到顯著差異且突變型 Hes-1 (Hes-1-K8R) 蛋白質穩定度顯著的比較差 (0 小時： $T_{1,10}=279.07$ ；1 小時： $T_{1,10}=18.28$ ；2 小時： $T_{1,10}=15.05$ ；4 小時： $T_{1,10}=16.10$ ；6 小時： $T_{1,10}=13.96$ ；8 小時： $T_{1,10}=18.09$, $p<0.001$, Student's t-test) (圖8B 及圖8C)。另外，再分別把野生型及突變型的 0 小時當成控制組，比較同一時間點穩定度的差異，其中在 1、4、6、8 小時達顯著性差異 (1 小時： $T_{1,10}=3.45$ ；4 小時： $T_{1,10}=3.81$ ；6 小時： $T_{1,10}=3.61$ ；8 小時： $T_{1,10}=3.31$, $p<0.001$, Student's t-test) (圖8D)。在這個部份的實驗結果與圖4 不同的是在此同時轉染 SUMO1 質體及 PIAS1 質體，因此測定的是被類小泛素所修飾後的 Hes-1 蛋白質穩定度的差異。在這

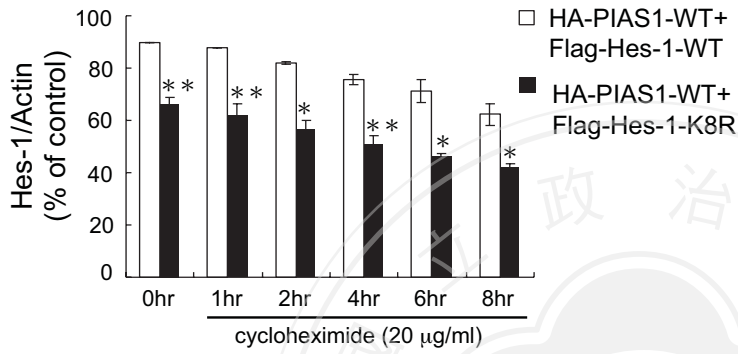
個實驗結果明顯看出突變型 Hes-1 (Hes-1-K8R) 蛋白質由於其被類小泛素修飾的 lysine 位置突變因而無法進行類小泛素化修飾，因此即使轉染 SUMO1 質體及 PIAS1 質體依舊相當不穩定，相反的對野生型Hes-1蛋白質而言，由於有 SUMO1 及 PIAS1 的參與使其蛋白質更加穩定，並且與突變型Hes-1蛋白質的差距性又比起圖4 及圖7 觀察到的結果更大。綜合上述所有的實驗結果，示意圖說明野生型 Hes-1 蛋白質透過 PIAS1 進行類小泛素化修飾使 Hes-1 蛋白質更為穩定，而突變型 Hes-1 (Hes-1-K8R) 蛋白質因其無法透過 PIAS1 進行類小泛素化修飾因此其蛋白質相對的較為不穩定 (圖9)。



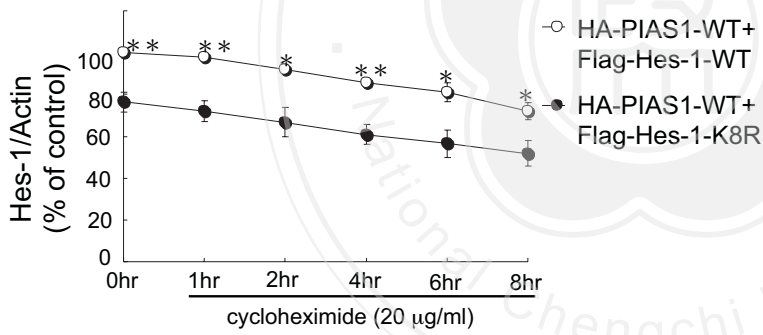
圖 7 (A)



(B)



(C)



(D)

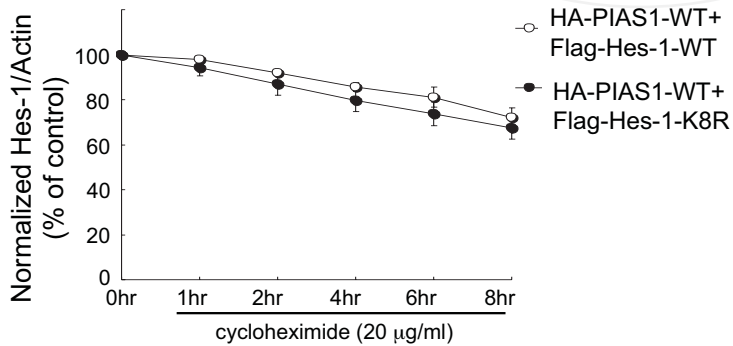


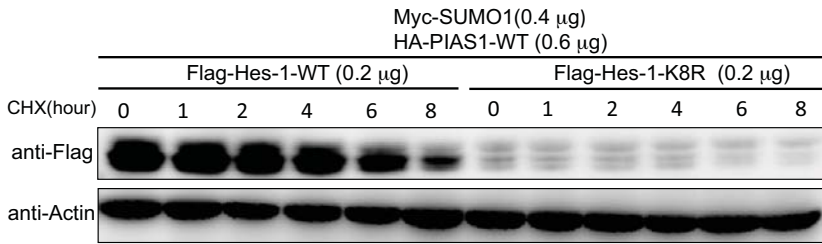
圖7、同時轉染野生型 PIAS1 及野生型 Hes-1 或是突變型Hes-1 質體，觀察Hes-1 蛋白質的穩定。

(A) 分成兩組，一組為 PIAS1 (HA-PIAS1) 質體及野生型 Hes-1質體，另一組為 PIAS1 (HA-PIAS1) 質體及突變型 Hes-1 (Hes-1-K8R) 質體。細胞轉染 24 小時後，於每個細胞孔盤內加入 20 $\mu\text{g/ml}$ cycloheximide (簡稱 CHX) 處理六個不同時間點，分別為 0、1、2、4、6、8 小時。實驗結果：PIAS1 及野生型 Hes-1 的組別其Hes-1蛋白質更為穩定。

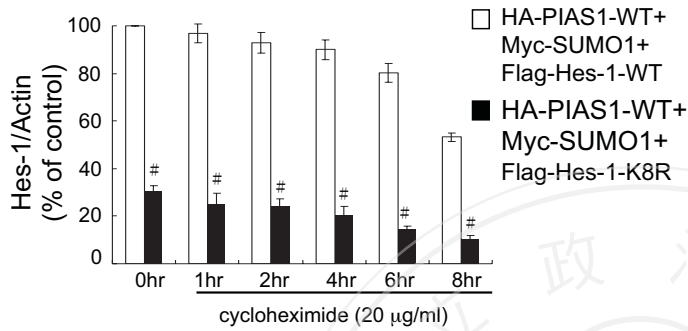
(B) 及 (C) 及 (D) 實驗結果經由定量及統計分析顯示，突變型 Hes-1 降解速率較快且較為不穩定，證實類小泛素修飾化會影響Hes-1蛋白質的穩定，野生型 Hes-1 蛋白質由於可以進行類小泛素化修飾，因此其蛋白質較為穩定。實驗數值來自三次獨立實驗結果，實驗數值以 $\text{mean}\pm\text{SEM}$ 表示(*, $p<0.05$; **, $p<0.01$; Student's t-test)。



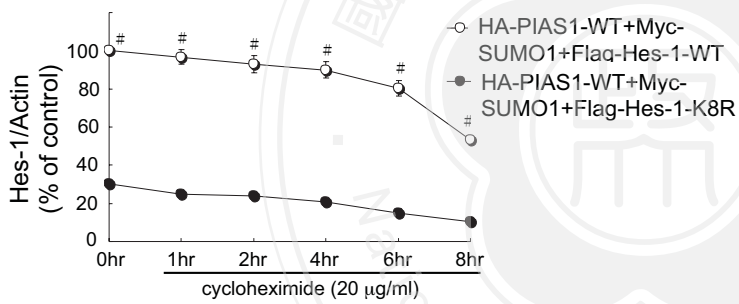
圖 8 (A)



(B)



(C)



(D)

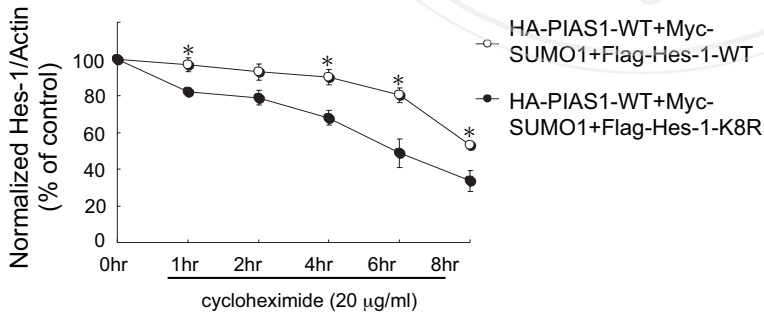


圖8、同時轉染 SUMO1 質體及 PIAS1 質體及野生型 Hes-1 或是突變型 Hes-1，觀察被類小泛素修飾後 Hes-1 蛋白質穩定度。

(A) 分成兩組，一組為野生型 Hes-1 質體、SUMO1 (Myc-SUMO1) 質體及 PIAS1 (HA-PIAS1) 質體，另一組突變型 Hes-1 (Hes-1-K8R) 質體、SUMO1 (Myc-SUMO1) 質體及 PIAS1 (HA-PIAS1) 質體。細胞轉染 24 小時後，於每個細胞孔盤內加入 20 $\mu\text{g/ml}$ cycloheximide (簡稱 CHX) 處理六個不同時間點，分別為 0、1、2、4、6、8 小時，測定兩組間 Hes-1 蛋白質穩定度的差異。

(B) 及 (C) 及 (D) 實驗結果經統計分析顯示，突變型 Hes-1 (Hes-1-K8R) 降解速率較快且較為不穩定，證實類小泛素化修飾會影響 Hes-1 蛋白質的穩定，野生型 Hes-1 蛋白質由於可以進行類小泛素化修飾，因此其蛋白質較為穩定。實驗數值來自三次獨立實驗結果，實驗數值以 $\text{mean} \pm \text{SEM}$ 表示 (*, $p < 0.05$; #, $p < 0.001$; Student's t-test)。



圖9 (A)

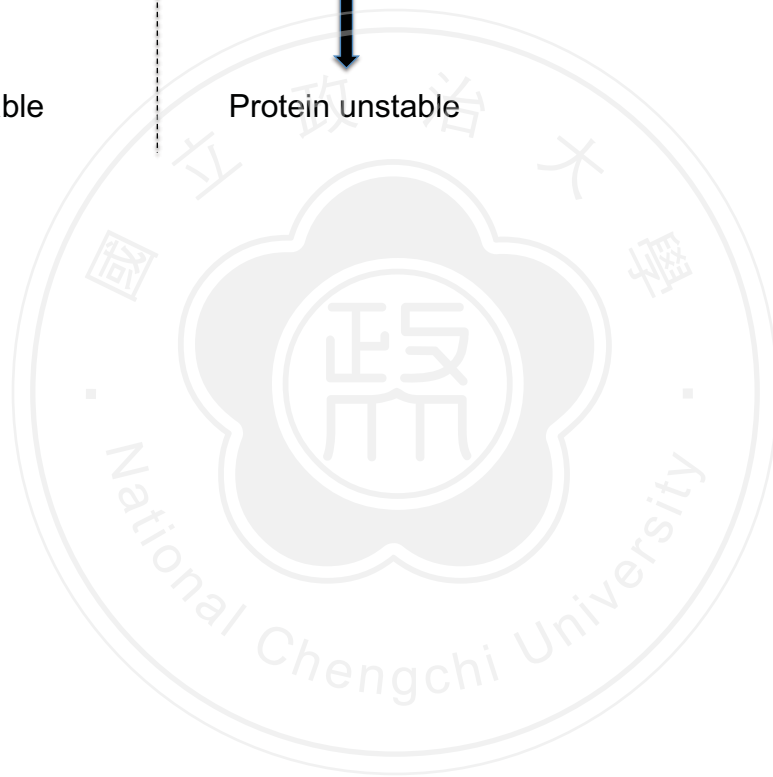
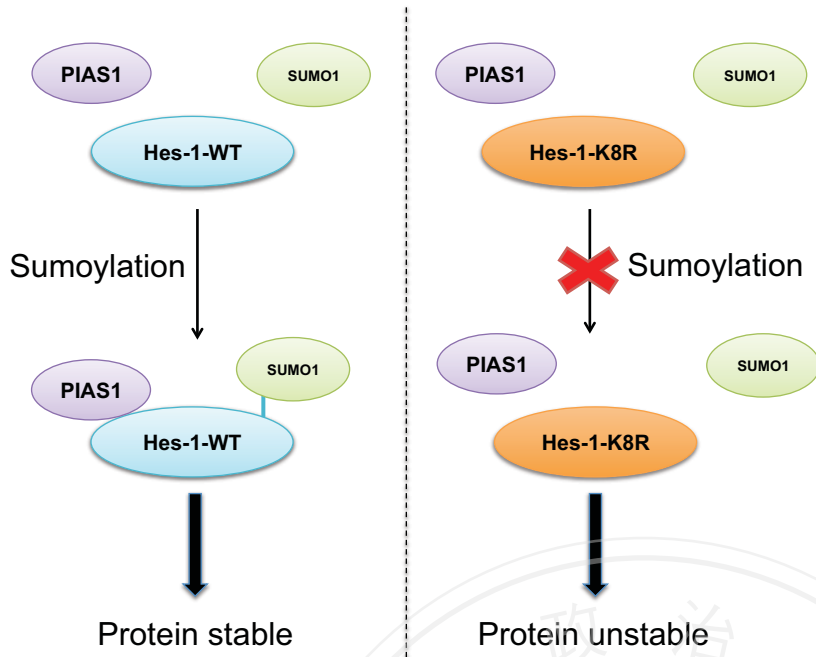


圖9、Hes-1 蛋白質透過 PIAS1 進行類小泛素化修飾而調節 Hes-1 蛋白質穩定度。

(A) 左圖野生型 Hes-1 蛋白質透過 PIAS1 進行類小泛素化修飾而使 Hes-1 蛋白質更為穩定；右圖突變型 Flag-Hes-1-K8R 無法透過 PIAS1 進行類小泛素化修飾而 Hes-1 蛋白質較為不穩定。

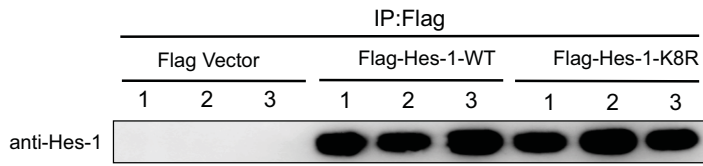


第六節、Hes-1 進行類小泛素化修飾調節空間學習記憶及海馬迴 CA1 區域 GluR1 蛋白質的表現

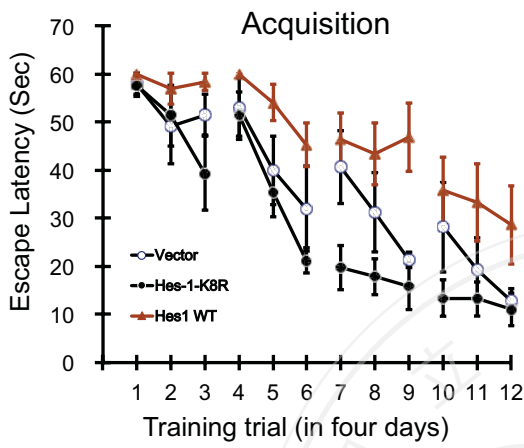
根據實驗室先前的研究證實 Hes-1 可透過結合到 GluR1 啟動子上的 N 盒子而抑制其表現 (Lin et al., 2012)，以及在本論文研究中證實 Hes-1 透過PIAS1 進行類小泛素化修飾可穩定其蛋白質。因此，本論文研究想進一步探討是否影響大白鼠海馬迴 CA1 區域 GluR1 蛋白質的表現以及空間學習記憶。首先，實驗設計大白鼠分為三組分別是：第一組控制組在海馬迴 CA1 區域轉染載體 (n=8)；第二組實驗組為野生型 Hes-1 (n=8)；第三組實驗組為突變型 Hes-1 (Hes-1-K8R) (n=8)。以上三組皆經過水迷津訓練 (spatial learning)。在進行水迷津試驗前 48 小時，將質體以微量注射幫浦轉染注射至大白鼠海馬迴 CA1 區域，第一次注射完畢後的 72 小時再追加一劑相同劑量，並讓大白鼠休息一小時後再進行水迷津試驗。試驗結束後，立即犧牲並取出大白鼠海馬迴 CA1 區域進行實驗。首先，利用免疫沈澱法以確認於大白鼠海馬迴 CA1 區域進行的轉染質體的效率，再經由西方墨點法分析顯示質體成功轉染至大白鼠海馬迴 CA1 區域，也確實對於大白鼠海馬迴 CA1 區域的蛋白質有影響(圖10A)。經過水迷津試驗實驗結果證實野生型 Hes-1 的組別由於可進行類小泛素化修飾其蛋白質較為穩定而明顯抑制其空間學習記憶的能力 $F_{2,21}=12.469$, $p<0.001$, $q=4.4$, $p<0.01$ ，然而突變型 Hes-1 (Hes-1-K8R) 的組別因無法進行類小泛素化修飾其蛋白質較不穩定，其本身雖未顯著促進記憶 ($q=2.584$, $p>0.05$)，但其與野生型 Hes-1 組別相比則顯著促進記憶的形成 ($q=6.984$, $p<0.001$) (圖10B)。

進一步分析大白鼠海馬迴 CA1 區域內 GluR1 蛋白質的表現，以西方墨點法分析 (圖10C)，經由統計分析 (1) 顯示野生型 Hes-1 的組別 (n=6) 比起轉染載體的組別 (n=6) 顯著抑制 GluR1 蛋白質的表現 ($F_{2,15}=38.38$, $q=5.397$, $p<0.01$, one-way ANOVA and Newman-Keuls method; 圖10D)；(2) 突變型 Hes-1 (Hes-1-K8R) 的組別 (n=6) 比起野生型 Hes-1 的組別 (n=6) 較不抑制 GluR1 蛋白質的表現 ($F_{2,15}=38.38$, $q=12.389$, $p<0.005$, one-way ANOVA and Newman-Keuls method; 圖10D)；(3) 突變型 Hes-1 (Hes-1-K8R) 的組別 (n=6) 比起只轉染載體的組別 (n=6) 結果同樣顯示較不抑制 GluR1 蛋白質的表現 ($F_{2,15}=38.38$, $q=6.992$, $p<0.005$, one-way ANOVA and Newman-Keuls method; 圖10D)。因此，證實野生型 Hes-1 進行類小泛素化修飾使蛋白質更穩定，促使之抑制 GluR1 蛋白質的表現，反之突變型 Hes-1(Hes-1-K8R) 無法進行類小泛素化修飾而蛋白質較為不穩定，而無法抑制 GluR1 蛋白質的表現。

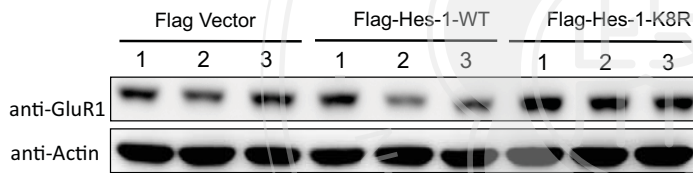
圖 10 (A)



(B)



(C)



(D)

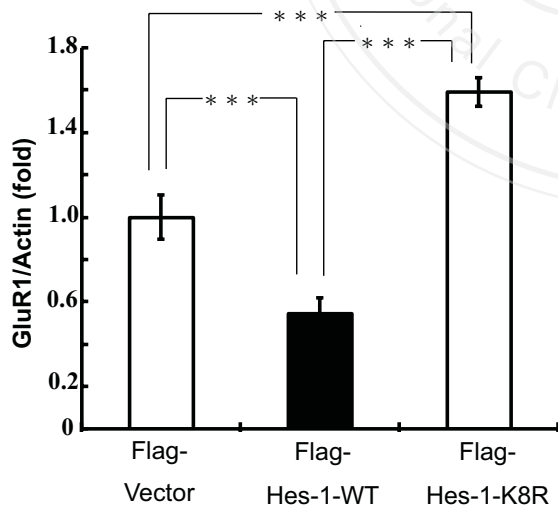


圖10、大白鼠海馬迴 CA1 區域內轉染 Hes-1 可抑制大白鼠的空間學習記憶能力。

(A) 探測試驗完成後，取出大白鼠海馬迴 CA1 區域，以免疫沈澱法及西方墨點法分析，結果顯示質體皆有成功轉染至大白鼠海馬迴 CA1 區域。

(B) 分別轉染載體、野生型 Hes-1 質體、突變型 Hes-1 (Hes-1-K8R) 質體，野生型 Hes-1 組別之大白鼠水迷津試驗結果顯示空間學習能力受到抑制 ($F_{2,21}=12.469$, $p<0.001$, two-way mixed ANOVA, one factor repeated measure)

(C) 及 (E) 水迷津試驗完成後，取出大白鼠海馬迴 CA1 區域，以西方墨點法分析，統計分析轉染載體、野生型 Hes-1 質體、突變型 Hes-1 (Hes-1-K8R) 質體這三組 GluR1 蛋白質的表現皆達統計上的差異 (***, $p<0.001$, Student's t-test)。

以上實驗結果 (A) (B) 分別來自 8 隻轉染載體、8 隻野生型 Hes-1 質體、8 隻突變型 Hes-1-K8R 質體的大白鼠；實驗結果 (C) (D) 分別來自 6 隻轉染載體、6 隻野生型 Hes-1 質體、6 隻突變型 Hes-1-K8R 質體的大白鼠。實驗數值以 mean±SEM 表示 (*, $p<0.05$; **, $p<0.01$; ***, $p<0.001$, Student's t-test)。





第四章 討論

類小泛素屬於泛素相關蛋白質，序列及結構上與泛素極為相似。它們皆具有轉譯後修飾作用(post-translational modifications)的功能：泛素化(ubiquitination)、類小泛素化修飾(sumoylation)。在連結路徑中，同樣的分成三個步驟：活化(activation)，結合(conjugation)，連接(ligation) (Liu et al., 2008)。類小泛素化修飾與泛素化最大不同點在於，即使沒有類小泛素 E3 連接酶的存在，同樣能夠進行目標蛋白的修飾作用。在很多的的研究中，主要是透過類小泛素 E2 結合酶 Ubc9 進行類小泛素修飾化。然而，在細胞內的類小泛素化修飾仍然需要類小泛素 E3 連接酶的參與 (Hay et al., 2001; Johnson, 2002; Tatham et al., 2001)。在 2009 年 Zimnik 等人將 E2 結合酶 Ubc9 與 FKBP (FK506 binding protein) 以及欲研究的目標蛋白質與 FKB (FKBP rapamycin associated protein) 作成融合蛋白 (fusion protein) 並處理細胞膜透水 (membrane permeable) 化合物 AP21967 建構出 Ubc9/substrate dimerization-dependent SUMOylation (USDDS) 系統，首次證實 Hes-1 蛋白質可以進行類小泛素化修飾，然而在此研究中觀察到當沒有處理 AP21967 的情況下即使 Ubc9 及 Hes-1 都作成特定的融合蛋白，Hes-1 蛋白質仍無法進行類小泛素化修飾，因此在 Zimnik 等人這篇研究中 Hes-1 蛋白質能否被類小泛素修飾建構在 USDDS 系統之下 (Zimnik et al., 2009)。

然而，在本論文研究中並未藉由類小泛素 E2 結合酶 Ubc9 進行類小泛素化修飾，也沒有透過其他的刺激物或者是以人工的方式製作成融合蛋白。而是，直接透過轉染類小泛素 E3 連接酶之一的 PIAS1 或者同時轉染 SUMO1 便觀察到 HEK293T 細胞其內生性 Hes-1 蛋白質的確是可以進行類小泛素化修飾，並且隨著 PIAS1 轉染的濃度梯度增加而增加內生性 Hes-1 蛋白質進行類小泛素化修飾 (圖 1)。另一方面當同時轉染 SUMO1 比較轉染相同濃度之 PIAS1 則觀察到轉染 SUMO1 而使更多的內生性 Hes-1 蛋白質進行類小泛素化修飾，這樣的結果代表著在 HEK293T 細胞其內生性 Hes-1 蛋白質進行類小泛素化修飾過程中 PIAS1 扮演重要的角色。在這個部份的實驗設計與 Zimnik 等人的研究所採用的方法不同 (Zimnik et al., 2009)，且本篇的研究成果在 HEK293T 細胞即能觀察到其內生性 Hes-1 蛋白質可進行類小泛素化修飾。由於，很多的蛋白質主要是透過類小泛素 E2 結合酶 Ubc9 參與而被類小泛素修飾，在未來的實驗也許可透過 Ubc9 參與，以進一步探討能否有類小泛素 E2 結合酶 Ubc9 參與而加強其修飾作用，使得更多的內生性 Hes-1 蛋白質進行類小泛素化修飾。並且比較當只有 E2 結合酶或只有 E3 連接酶的情況下對於類小泛素修飾 Hes-1 蛋白質是否有不同的影響。

圖 2 為了確認在 HEK293T 細胞內是否有效的轉染 PIAS1 至細胞內，以 HA 抗體呈色顯示，在有轉染的組別中確實 PIAS1 皆有成功轉染至細胞內。然而，呈色結果顯示轉染 HA-

PIAS1-WT、Myc-SUMO1 的組別其 PIAS1 表現量明顯的比起另外兩組也同樣轉染 HA-PIAS1-WT 較低。關於這個問題，在實驗室其他人的實驗結果中也觀察到同樣的現象，這可能是因為當轉染了其他質體而造成 PIAS1 表現量的差異，其中的機制我們並不知道。可以確信的是並非是因為 PIAS1 轉染濃度不同，而造成野生型 Hes-1 與突變型 Hes-1-K8R 被類小泛素所修飾的形式有所差異。因為，從 HA 抗體呈色顯示這兩個組別其 PIAS1 表現量並沒有差異。證實，確實是因為 Hes-1 胺基酸序列上第八個位置的 Lysine 突變而使之無法進行類小泛素化修飾。

圖2B 透過共同免疫沈澱法的實驗，顯示野生型 Hes-1 及野生型 PIAS1 兩者蛋白質與蛋白質之間有交互作用而形成蛋白質複合物。這樣的結果可以解釋為什麼圖2A 的實驗中，當只有轉染 Myc-SUMO1 與 Flag-Hes1-WT 的情況下卻不能使 Hes-1 進行類小泛素化修飾，因為少了 PIAS1 這個重要的 E3 連接酶使 Hes-1 的類小泛素化修飾無法進行。圖2A Flag-Hes-1-WT、Myc-SUMO1 與 HA-PIAS1-W372A、Flag-Hes-1-WT、Myc-SUMO1 的組別皆顯示 Hes-1 無法進行類小泛素化修飾。這意謂著在細胞內內生性 E2 結合酶或是其他的 E3 連接酶都不足以促使 Hes-1 進行類小泛素化修飾。因此，欲研究細胞內 Hes-1 被類小泛素修飾的相關機制需藉由 E2 結合酶或是 E3 連接酶的參與才足以放大類小泛素修飾的成效。除此之外，當 Hes-1 胺基酸序列上第八個位置的 Lysine 突變後，則無法與類小泛素 E3 連接酶 PIAS1 形成蛋白質複合物而失去交互作用。因而，無法讓 Hes-1 蛋白質進行類小泛素化修飾。由此可知，Hes-1 蛋白質進行類小泛素化修飾強烈影響著 Hes-1 與 PIAS1 之間的交互作用。根據這樣的結果，讓我們產生一個疑惑有可能 Hes-1 與 PIAS1 主要的結合位置坐落在 Hes-1 胺基酸序列上 Lysine 8 位置。在本論文研究中，儘管只有針對 Hes-1 胺基酸序列上其中一個位置的修飾位置進行探討，然而我們並不排除 Hes-1 蛋白質上有其他的位置可被類小泛素所修飾。

另一部份，儘管由圖1 及圖2 證實可透過 PIAS1 使 Hes-1 蛋白質被 SUMO1 所修飾。然而，從哺乳類基因序列上編碼出四個不同亞型的類小泛素，分別是 SUMO1 (Ubl1, Smt3c, Sentrin, PIC1, GMP1)，SUMO2 (Smt3a, Sentrin2)，SUMO3 (Smt3b, Sentrin3)，SUMO4 (Melchior et al., 2000)。以及目前已知的類小泛素 E3 連接酶包含有 PIAS 家族、Pc2 和 RanBP2 (Jackson, 2001)。其中經由哺乳類細胞的基因序列分析，發現 PIAS1 家族，尚有三個蛋白質其胺基酸序列組成與 PIAS1 的相似度很高，分別是 PIASx (又稱之 PIAS2)、PIAS3 和 PIASy (又稱之 PIAS4) 並將其一併歸類為 PIAS 蛋白質家族 (Chung et al., 1997; Copeland et al., 1995)。是否是透過 SUMO 其他的亞型 及其他的 E3 ligase 促使 Hes-1 蛋白質進行類小泛素化修飾呢？在這個部份，可以進一步藉由 SUMO1 抗體或者是突變型 SUMO1 以再次確認 Hes-1 蛋白質確實是藉由 PIAS1 而被 SUMO1 所修飾。

Hes-1 蛋白質進行類小泛素化修飾在細胞內是否有任何意義存在呢？在先前的研究中，指出細胞內的類小泛素會與泛素競爭目標蛋白質的 lysine 結合位，進而阻止蛋白質因泛素化而發生降解作用。根據先前的研究，指出泛素化和類小泛素修飾化會競爭同一個目標蛋白 Hippel-Lindau (VHL) 的 lysine 結合位，進而可以調節其蛋白質的穩定度以及細胞中的位置 (Qiliang Cai et al., 2010)。另一篇研究更指出，若是在細胞中過度表現 SUMO1，即使 retinoblastoma suppressor (Rb)-associated protein 46 (RbAp46) 這一類的蛋白質以 cycloheximide 處理後抑制其蛋白質生成，並不會改變其降解速率。這意謂著透過 SUMO1 進行轉譯後修飾作用可以讓細胞內 RbAp46 蛋白質更為穩定 (Giri R. et al., 2008)。在本篇研究中，首先圖3 隨著濃度梯度轉染不同濃度之野生型 Hes-1 或者無法被類小泛素修飾之突變型 Hes-1 (Hes-1-K8R) 質體，顯示野生型 Hes-1 其蛋白質在細胞內相對於突變型表現量較高也較為穩定。然而，單就轉染不同濃度而導致野生型及突變型的蛋白質有如此差異，是否是因為將 Hes-1 蛋白上第八個位置突變而導致結構改變，而使之在細胞內表現量有差異而並非是蛋白質變得較為不穩定呢？在這個部份仍無法排除是否將 Hes-1 蛋白質突變不會影響其在細胞內轉錄作用及轉譯作用的效率，這需要再進一步確認。

為了更進一步確定這樣的結果是否代表著 Hes-1 進行類小泛素化修飾而能使其被修飾之蛋白質較為穩定。在後續實驗設計同樣的分成野生型 Hes-1 及突變型 Hes-1 (Hes-1-K8R) 質體兩組 (圖4)，取六個時間點在每個時間點皆利用 cycloheximide 處理以抑制其蛋白質生成，一開始曾經以 30 $\mu\text{g/ml}$ 的 cycloheximide 處理以觀察是否蛋白質抑制的效果會較為明顯。然而實驗結果顯示與 20 $\mu\text{g/ml}$ 處理的結果相比並沒有太大的差異 (實驗結果於論文中未呈現)，這代表著在細胞內 20 $\mu\text{g/ml}$ 之 cycloheximide 作用已足以抑制其蛋白質生成，故本論文實驗最後選用的 cycloheximide 濃度以 20 $\mu\text{g/ml}$ 為主。在這六個不同時間點皆顯示野生型 Hes-1 較突變型穩定，且可以明顯觀察到突變型降解的速率較快，這意謂著突變型 Hes-1 (Hes-1-K8R) 無法進行類小泛素化修飾而導致其蛋白質較為不穩定且降解較快。蛋白質穩定度測定實驗，一開始的條件是細胞轉染質體後的 48 小時以 20 $\mu\text{g/ml}$ 之 cycloheximide 處理 (附錄四 A)，然而實驗結果觀察這樣的條件與細胞轉染質體後的 24 小時再以 20 $\mu\text{g/ml}$ 之 cycloheximide 處理，其蛋白質穩定度的趨勢相似。因此，本篇論文研究中關於探討蛋白質穩定度測定的實驗，皆是在細胞轉染質體後的 24 小時即以 20 $\mu\text{g/ml}$ 之 cycloheximide 處理。然而，在實驗中並未進一步探討細胞轉染質體後對於其內生性 Hes-1 蛋白質穩定度的變化是否有任何影響。因此，只能藉由在未轉染任何質體的細胞中觀察處理相同濃度之 cycloheximide 其內生性 Hes-1 蛋白質穩定度的變化。實驗結果顯示內生性 Hes-1 蛋白質穩定度會隨著 cycloheximide 的處理而使其內生性 Hes-1 蛋白質降解 (附錄四 B)。

在此好奇的是這個實驗的設計並沒有外加 E3 連接酶 PIAS1 或 SUMO1，由於先前其他的研究都指出類小泛素化修飾是一個可逆性動態修飾過程。因此當沒有外加 E3 連接酶 PIAS1 或SUMO1 情況下，不排除對野生型 Hes-1 而言，並非一直持續進行著類小泛素化修飾。而實驗結果觀察到兩組有如此差異，不排除是因為突變型Hes-1 (Hes-1-K8R) 不能進行類小泛素化修飾，因此其初始條件比起野生型較為劣勢。這是否有可能是因為在細胞內仍有其他的轉錄因子調控及修飾野生型 Hes-1 而導致此差異性呢？這個問題尚待進一步釐清。為了解決這個問題，前面的實驗結果透過 E3 連接酶 PIAS1、SUMO1 確實能讓內生性 Hes-1 進行類小泛素化修飾。因此，為了比較野生型 Hes-1 在細胞內持續進行類小泛素化修飾與突變型Hes-1 (Hes-1-K8R) 兩者對於蛋白質穩定度的影響，接下來的實驗設計皆有 E3 連接酶 PIAS1、SUMO1 的參與使之在細胞內表現。

在圖2B 結果顯示 PIAS1 與 Hes-1 之間會形成蛋白質複合物而產生交互作用。進一步確認 PIAS1 與 Hes-1 之間產生交互作用是否影響著 Hes-1 蛋白質的穩定度，故分別轉染載體及 PIAS1 質體後，同樣在六個不同時間點處理cycloheximide，顯示在 HEK293T 細胞 PIAS1 質體的組別其內生性 Hes-1 蛋白質的表現量較轉染載體多且較為穩定 (實驗結果於論文中未呈現)。並且轉染不同濃度之 PIAS1 質體於 0、4、8 小時這三個不同時間點處理 cycloheximide皆顯示其內生性 Hes-1 蛋白質有隨著濃度梯度增加而增加表現量且較為穩定 (實驗結果於論文中未呈現)。這樣的結果顯示兩種可能：第一是 PIAS1 與內生性 Hes-1 產生交互作用，而使 HEK293T 細胞內生性 Hes-1 蛋白質較為穩定；第二是轉染 PIAS1 質體比起只轉染載體的組別而言，PIAS1 當成上游刺激並透過轉錄作用或轉譯作用讓 HEK293T 細胞內生性 Hes-1 蛋白質表現量較高且較為穩定。在這樣的基礎下分成兩組，一組為載體和 SUMO1質體，另一組為 PIAS1 質體和 SUMO1 質體，探討內生性 Hes-1 蛋白質是否能透過 E3 連接酶 PIAS1 使之進行類小泛素化修飾更為穩定 (圖5)。實驗結果顯示在 PIAS1 質體 和 SUMO1 質體的組別，HEK293T 細胞內其內生性 Hes-1 蛋白質很穩定，並分析其降解速率沒有太大的變化。然而，在只有載體和 SUMO1 質體的組別相對的 Hes-1 蛋白質降解速率較快且較為不穩定。更進一步，透過轉染不同濃度之 PIAS1 質體和 SUMO1 質體也同樣顯示其內生性 Hes-1 蛋白質有隨著轉染濃度梯度增加而表現量增加且較為穩定的現象。然而，在這裡並不確定是否是因為 PIAS1 半生期較長，而間接使內生性 Hes-1 蛋白質較為穩定。在這個部份，未來的實驗中可以進一步增加處理cycloheximide 的時間點以釐清的這個問題。另外，在這個部份特別的是比較轉染載體及 SUMO1 質體的組別與同時轉染 SUMO1 質體及 PIAS1 質體的組別，發現到未加 cycloheximide 的 0 小時這個時間點，轉染載體及 SUMO1 質體的組別其內生性 Hes-1 蛋白質表現量只有些許增加。因此，這樣的結果可以解釋為什麼在實驗中結果顯示有 PIAS1 質體的參與可使 HEK293T 細胞內其內生性 Hes-1 蛋白質表現量較多也較為穩定。除了是因為 Hes-1 蛋白質進行類小泛素化修飾需要透過 PIAS1 這個重要的 E3 連接酶，也可能是因為 Hes-1 與 PIAS1 兩者蛋白質之間產生

交互作用。而，另一個可能的原因是如其他對於 PIAS1 的研究指出 PIAS1 扮演轉錄因子調控的角色 (Liu et al., 2008)，而召集其他分子調節 Hes-1 蛋白質，使 Hes-1 蛋白質較容易與其他可能導致降解作用進行的酵素作用。

在實驗中顯示內生性 Hes-1 會因為 PIAS1 的存在而有差異，進一步透過 PIAS1 siRNA 抑制細胞內 PIAS1，同樣的在六個不同時間點處理相同濃度之 cycloheximide 與未抑制 PIAS1 情況下相互比較，結果顯示一旦在 HEK293T 細胞抑制 PIAS1，將導致內生性 Hes-1 蛋白質明顯受到抑制且較為不穩定，這樣的結果除了是因為 Hes-1 蛋白質不能透過 PIAS1 進行類小泛素化修飾而較為穩定 (圖6)，也可能是因為 PIAS1 直接作為 Hes-1 的上游刺激，一旦抑制內生性 PIAS1 使之不能與內生性 Hes-1 蛋白質產生交互作用或者無法藉由 PIAS1 調節 Hes-1 蛋白質，也可能是 PIAS1 調節其他分子使原本抑制 Hes-1 蛋白質降解，因此當抑制 PIAS1 使之不能調控其他分子故使 Hes-1 蛋白質快速降解。另外，關於圖 6D 分別以 PIAS1 siRNA 及 control siRNA 0 小時當成控制組進行統計分析，PIAS1 siRNA 的組別事實上並沒有增加其內生性 Hes-1 蛋白質穩定度。這是因為當抑制 PIAS1 而使內生性 Hes-1 蛋白質表現量在未處理 cycloheximide 0 小時這個時間點明顯受到抑制。導致 PIAS1 siRNA 的組別在不同時間點再以 cycloheximide 處理，其內生性 Hes-1 蛋白質幾乎被完全降解。針對當抑制 PIAS1 也造成 Hes-1 蛋白質表現量受到抑制，未來的實驗需進一步探討 PIAS1 是否會影響 Hes-1 mRNA 表現。

在圖7 的部份實驗結果顯示同時轉染 PIAS1 質體及野生型 Hes-1 質體較為穩定，再次證明 Hes-1 蛋白質透過 PIAS1 進行類小泛素化修飾而較為穩定。仔細觀察發現到一個有趣的現象此實驗的設計皆在兩個組別都轉染相同濃度之 PIAS1 質體，在突變型 Hes-1 (Hes-1-K8R) 的組別細胞內 PIAS1 蛋白質也比起轉染野生型那組明顯降解較快，有可能 PIAS1 不見得作為 Hes-1 的上游而是作為下游，因此當 Hes-1 蛋白質突變而使 PIAS1 也受到影響。從圖6 及圖7 結果讓人產生一個疑惑究竟 PIAS1 與 Hes-1 在細胞內的關係為何呢？讓人好奇是否在細胞內除了如本論文中證實透過 PIAS1 進行 Hes-1 蛋白質的類小泛素化修飾使其較為穩定之外，有可能 PIAS1 或者 Hes-1 召集了其他分子參與間接調節其細胞內反應。或者，另一個可能是 PIAS1 具有調節 Hes-1 蛋白質的轉錄作用及轉譯作用的功能，這需要進一步藉由轉染濃度梯度之 PIAS1 質體以測定其細胞內 Hes-1 mRNA 的變化。

由於，本論文研究不斷的強調透過 PIAS1 進行 Hes-1 蛋白質的類小泛素化修飾可讓 Hes-1 蛋白質較為穩定。並且，由圖7D 統計結果顯示野生型與突變型這兩個組別當以各自的 0 小時當成控制組，其 Hes-1 蛋白質降解速率並沒有達到統計上差異。因此，進一步進行圖8 實驗，以不同的統計分析結果皆顯示在 SUMO1 質體、PIAS1 質體及野生型 Hes-1 質體的組別比起突變型 Hes-1 (Hes-1-K8R) 質體的組別相對穩定許多，這樣的結果可以解

釋圖7D 結果的。並且，由圖8 也更確定 Hes-1 因可被類小泛素修飾而更為穩定。然而，為何轉染 SUMO1 質體與未轉染 SUMO1 質體的結果相比會有如此大的差異性存在，這並非只單純是因為 Hes-1 進行類小泛素化修飾而調節 Hes-1 蛋白質，也透露著細胞內仍有許多複雜的機制一起參與調控 Hes-1 蛋白質穩定度。

另外，在本論文研究中並未再進一步探討當 PIAS1 到達一定高濃度是否 PIAS1 會變成負向調控 Hes-1 蛋白質的表現量及穩定度。以上關於 Hes-1 進行類小泛素化修飾而調節 Hes-1 蛋白質穩定使其更為穩定的問題，在細胞內是否有其他分子參與調控仍尚待釐清，猜測 PIAS1 不單純只是扮演類小泛素 E3 連接酶的角色，可能是 PIAS1 透過其他的轉錄因子作用直接或間接調節 Hes-1 蛋白質穩定度，也可能是 PIAS1 與 Hes-1 產生交互作用使其他可能使 Hes-1 降解的分子無法靠近而不能影響 Hes-1 蛋白質穩定。除此之外，有很大的可能性是透過 PIAS1 進行類小泛素化修飾使 SUMO1 修飾 Hes-1 蛋白質，因為 PIAS1 與 Hes-1 產生交互作用緊密結合在一起。一旦 SUMO1 修飾 Hes-1 蛋白質將更緊密的包裹修飾 Hes-1 蛋白質而不容許其他分子靠近。令一個可能因素是 SUMO1 同時召集其他轉錄因子一起參與調節 Hes-1 蛋白質的穩定。又或者撇開其他轉錄因子的作用，有可能是因為 Hes-1 進行類小泛素化修飾後，改變了其細胞內胞器的位置，而使之相對穩定不容易進入降解系統。並且，不能排除有可能 PIAS1 被 Hes-1 負向調控反之調節 Hes-1 蛋白質的穩定在細胞內是一個複雜的機制，除了探討其蛋白質的降解也可以進一步探討其蛋白質合成的效率，關於調節 Hes-1 蛋白質穩定的問題可能在細胞內還有其他複雜的機制未知，未來可以進一步透過不同的方式研究釐清。

究竟蛋白質穩定的與否，在生理上是否有什麼意義呢？記憶形成過程中包含調節細胞內分子機制及蛋白質形成的過程。讓人好奇的是在細胞內 Hes-1 蛋白質進行類小泛素化修飾可以使其 Hes-1 蛋白質更為穩定，而 Hes-1 蛋白質穩定與否是否影響大白鼠空間學習記憶。Hes-1 是神經發育系統過程中重要的轉錄因子，長久以來科學家對於 Hes-1 蛋白質在神經可塑性與學習記憶上所扮演的角色並不清楚。直到，實驗室 Lin 等人首次證實 Hes-1 透過結合到 GluR1 啟動子上的 N 盒子進而抑制 GluR1 基因 (Lin et al., 2012)，才瞭解到 Hes-1 蛋白質對於神經可塑性與學習記憶有一定的影響。神經細胞會藉由突觸後細胞膜上受體增加、改變突觸結構、增加神經元突觸的數目等增加神經細胞傳導效率，過程中可藉由轉錄因子使其細胞生理結構及功能上改變，造成細胞內結構蛋白改變、影響蛋白質激酶活性，進而影響特定基因表現與蛋白質新生，促進學習記憶的形成 (Teyler and DisScenna, 1987 ; Davies and Collingridge, 1989)。在本論文研究中，主要想探討 Hes-1 進行類小泛素化修飾調節海馬迴 CA1 區域 GluR1 蛋白質的表現。

過去對於 glutamate 的瞭解，可知其在哺乳類的中樞神經系統中扮演興奮性神經傳遞物質的角色 (Fonnum, 1984 ; Orrego and Villanueva, 1993)。glutamatergic neurons 分布極

為廣闊，主要在前腦 (forebrain)，在這裡有大部份的皮質 (cortex) 投射含有 glutamate (Fagg and Foster, 1983 ; Cotman et al., 1988)。glutamate 在大腦中的代謝分成兩個部位：神經元 (neuron)及膠質細胞 (glial)。glutamate 的合成主要透過位在 glutamatergic neurons 末端粒線體 (mitochondria) 的谷胺酸酶 (glutaminase) 作用將 Glutamine 轉成 glutamate，合成後的 glutamate 經過依賴型 ATP 過程 (adenosine triphosphate-dependent process) 被送入突觸小泡 (synaptic vesicle) 中，儲存於神經末梢。而， glutamate 的代謝則是透過位在神經膠細胞的谷胺酸生成酶 (glutamine synthetase) 將 glutamate 轉成 glutamine (Fonnum, 1984)。在神經末梢去極化過程中， glutamate 經由鈣離子依賴的方式釋放到突觸間隙 (synaptic vesicle)，在突觸間隙達到高濃度 (Clements, 1996)，使 glutamate 作用在突觸後受體上 (Kullmann and Asztely, 1998)。釋放到突觸間隙的 glutamate 經由擴散作用 (diffusion) 和位於神經元及鄰近的膠質細胞的高親和性的依賴型鈉離子轉運子 (high-affinity sodium dependent transporter) 結合後，使之去活性。glutamate receptor 可以分成離子性 (ionotropic) 及代謝性 (metabotropic)。離子性 glutamate receptor 根據藥理特性及電生理特性以及其具有專一性結合的促進劑 (agonist) 再分成三類：N-methyl-D-aspartate(NMDA)， α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid (AMPA) 和 kainate；代謝性受體含有八個亞型 (mGluR1-mGluR5)，並且根據其特性的不同再分成三大類 (Hollmann and Heinemann, 1994 ; Sprengel and Seeburg, 1993)。

離子性 glutamate receptor 屬於離子通道 (ion channel) 的蛋白質，允許細胞外的離子流入至細胞內。當細胞處在靜止膜電位 (resting membrane potential) 時，由於鎂離子 (Magnesium) 藉由電位依賴 (voltage-dependent) 的形式阻擋在 NMDA 受體上而使之無法產生電流。此時神經細胞的突觸傳遞透過 AMPA 和 kainate 受體進行，讓鈉離子 (Sodium)、鉀離子 (Potassium) 流入。當細胞去極化 (depolarization) 達某一定程度時，鎂離子會從 NMDA 受體上離開使通道打開讓鈣離子 (Calcium)、鈉離子、鉀離子大量的流入細胞內，故細胞內因鈣離子濃度的增加而促使產生過極化 (hyperpolarization) (Kandel et al., 1991 ; Larkman and Jack, 1995)。由這個現象可以瞭解長期增益效應的誘發需要高頻率的電刺激，才能讓鎂離子離開而通道打開。代謝性 glutamate receptor 結構上屬於 G 蛋白偶合受體 (G-protein couple receptor) 的活化則是透過 G 蛋白活化細胞膜上磷脂酶 C (phospholipase C, PLC)。當磷脂酶 C 活化會將 phosphatidylinositol 4, 5 - diphosphate (PIP₂) 水解成 diacylglycerol (DAG) 及 1, 4, 5 - triphosphate (IP₃)，此時 IP₃ 與內質網膜上 IP₃ 敏感性受體結合，因而使原本儲存於內質網之鈣離子釋出 (Malinow et al., 1989)。

當 glutamate receptor 活化，造成細胞內二級傳訊者 (secondary messenger) 鈣離子濃度增加，進而與一些酵素 (enzyme) 鍵結而活化特定蛋白激酶 (protein kinase) 活性，如：蛋白激酶 A (protein kinase A, PKA) (Frey et al., 1993)、蛋白激酶 C (protein kinase C,

PKC) (Klapp et al., 1993 ; Malinow et al., 1989)、鈣離子/攜鈣素依賴蛋白II (Ca^{2+} / calmodulin-dependent protein kinase II, CaMKII) (Malinow et al., 1989)，因而使神經細胞突觸傳遞效率增加，進而影響長期增益效應的發生。

AMPA 受體是由 GluR1 到 GluR4 四個次體 (subunit) 組成的異型聚合 (hetero-oligomeric) 蛋白 (Hollmann&Heinemann 1994 ; Wisden et al., 1993)。AMPA受體對於神經細胞突觸的動態平衡、突觸間神經電位信號的強弱扮演重要角色。每一個受體複合物包含四個次體組成 (Rosenmund et al., 1998)。在成年大鼠海馬迴有兩類的 AMPA 受體：由 GluR1 和 GluR2 組成、或由 GluR3 和 GluR2 組成 (Rosenmund et al., 1998)。在本論文研究中比較感興趣的是 AMPA 受體四個次體之一的 GluR1。GluR1 全名是 glutamate receptor 1。從長期增益效應研究得知，當細胞受到高頻率的電刺激會釋放 glutamate 到突觸間隙，活化突觸後神經細胞上的 GluR1。研究也指出 GluR1 會影響 AMPA 受體活化使其影響神經突觸的可塑性，並且有研究指出小鼠失去 GluR1 作用會影響海馬迴長期增益效應 (Zamanillo et al., 1999 ; Mack et al., 2001)。

由於，Hes-1 蛋白質進行類小泛素化修飾進而調節其蛋白質穩定是在細胞實驗中觀察到的。比較可惜的是對於 Hes-1 蛋白質在大鼠海馬迴 CA1 區域是否能透過 PIAS1 進行類小泛素化修飾的部份，需要在未來的實驗中進一步研究證實。在本論文的水迷津訓練中，首先在大鼠分成三組分別在海馬迴 CA1 區域內轉染載體、野生型 Hes-1 質體、突變型 Hes-1-K8R 質體。本實驗轉染質體的方式是利用質體帶負電須與帶正電的有機聚合物聚乙炔亞胺包覆在一起形成微小體，再藉由內噬作用 (endocytosis) 送入到細胞內。此混合物低毒性對於細胞的傷害也低於病毒且在成年動物的大腦內其轉染效率較高，並且可以穿過血腦障壁，轉染 48 至 72 小時便可以穩定的表現於皮質神經元細胞內 (Abdallah et al., 1996 ; Martres et al., 1998 ; Lungwitz et al., 2005)。控制組與實驗組的大鼠在進行水迷津試驗前皆以相同方式處理，因此應該可排除因埋管手術、注射轉染質體而導致實驗結果的差異。大鼠歷經四天的空間學習訓練，可能會活化與學習記憶相關的 NMDA 受體或 AMPA 受體，促使細胞外大量的 Ca^{2+} 流入進而促進海馬迴 CA1 區域內 cAMP 濃度的上升，進而促進其空間學習記憶。然而，野生型 Hes-1 組別其水迷津試驗結果顯示比起突變型 (Hes-1-K8R) 的組別明顯空間學習記憶受到抑制，並藉由西方墨點法分析顯示 Hes-1 抑制 AMPA 受體次體之一的 GluR1 蛋白質表現。這個結果與實驗室先前的研究成果是符合的。另外也顯示突變型 Hes-1 (Hes-1-K8R) 的組別其對於 GluR1 蛋白質表現較不抑制。

然而，於 2011 年實驗室所發表的論文研究中指出 PIAS1 可促進大鼠的空間學習與記憶能力 (Tai et al., 2011)。這樣的結果，與 Hes-1 透過 PIAS1 進行類小泛素化修飾卻反而抑制其空間學習記憶的結果是不一致的。根據過去研究結果指出 PIAS1 除了扮演類小泛素 E3 連結酶的角色，也具有調節轉錄因子的角色。這可以進一步解釋大鼠經由四天的水

迷津試驗訓練後活化 PIAS1，PIAS1 除了調節大部份促進學習與記憶的相關分子，可能也會調節一些抑制學習與記憶的相關分子，因此最後整體的影響顯示 PIAS1 是促進大白鼠空間學習與記憶 (Tang et al., 2005)。神經細胞內訊息傳遞是一個複雜的機制，PIAS1 參與在不同的調控機制並非只調控 Hes-1 單一路徑。因此，當只專注在本篇論文所研究的 PIAS1 和 Hes-1 這一條訊息傳遞路徑，結果卻是顯示 Hes-1 受到 PIAS1 調控而增加其蛋白質穩定度，進而抑制大白鼠空間學習與記憶。

除此之外，針對 2011 年實驗室研究結果指出，大白鼠經由水迷津試驗訓練後將學習與記憶快的與慢的兩組，進一步藉由聚合酶連鎖反應差異顯示法 (differential display PCR) 分析，發現 PIAS1 在學習與記憶快的組別表現量較高 (Tai et al., 2011)。可以從另一個角度思考，第一點：當大白鼠進行歷經四天的空間學習訓練大量活化的 PIAS1 表現，使得更多的 Hes-1 蛋白質可透過 PIAS1 進行類小泛素化修飾，進而使其蛋白質更為穩定，因而抑制空間學習與記憶。第二點：PIAS1 與 Hes-1 彼此之間形成蛋白質複合物產生交互作用，使 PIAS1 只能調節少部份促進學習與記憶的因子，PIAS1 同時召集了其他抑制學習與記憶相關因子，進而使之結合到 Hes-1 的 N 盒子上，而增強強化了 Hes-1 這個轉錄抑制子對於空間學習記憶及 GluR1 蛋白質表現的抑制。反之，對於突變型 Hes-1 (Hes-1-K8R) 組別而言，除了因突變型 Hes-1 (Hes-1-K8R) 無法透過 PIAS1 進行類小泛素化修飾使蛋白質較為不穩定，對於空間學習與記憶的抑制能力較差。另一個可能的因素是 PIAS1 無法與突變型 Hes-1 (Hes-1-K8R) 形成蛋白質複合物產生交互作用，因此在大白鼠海馬迴 CA1 區域依舊有大量的 PIAS1 存在，使 PIAS1 主要以調節其他促進學習與記憶的相關分子。因而，水迷津試驗結果顯示轉染突變型 Hes-1 (Hes-1-K8R) 比起轉染野生型 Hes-1 是促進大白鼠空間學習與記憶且對於 GluR1 蛋白質表現較不抑制。

關於 PIAS1 與 Hes-1 對於大白鼠空間學習與記憶的影響。這個問題除了上述幾個可能的因素，也可以藉由同時轉染小分子干擾核糖核酸 PIAS1 siRNA 及野生型 Hes-1 質體到大白鼠海馬迴 CA1 區域，以探討當 Hes-1 無法透過 PIAS1 進行類小泛素化修飾後，對於大白鼠空間學習記憶能力是否會比起只有轉染野生型 Hes-1 質體的組別較不抑制空間學習記憶及 GluR1 蛋白質表現。另一方面，很可惜的是我們並未深入探討在大白鼠海馬迴 CA1 區域轉染野生型 Hes-1 質體，除了抑制 GluR1 蛋白質表現是否也抑制了 PIAS1 蛋白質表現。因此，不排除是否因為過度表現 Hes-1 而使之負向調控而抑制 PIAS1 蛋白質表現，導致 PIAS1 無法活化其他促進學習記憶的相關轉錄因子。針對 Hes-1 是否影響 PIAS1 蛋白質表現的問題是未來需要再進一步研究證實的。除此之外，關於 Hes-1 是否是因為透過抑制 GluR1 而影響大白鼠的空間學習。未來的實驗可進一步藉由同時轉染 GluR1 與 Hes-1 組別與只轉染 Hes-1 組別其學習能力差異比較。實驗結果預期同時轉染 GluR1 與 Hes-1 的組別對於空間學習較不抑制。



第五章 結論

在 HEK293T 細胞內轉染野生型 PIAS1 及野生型 Hes-1 及 SUMO1 質體，實驗結果顯示內生性 Hes-1 蛋白質可進行類小泛素化修飾。失去 E3 連接酶活性之突變型 PIAS1 將使 Hes-1 蛋白質無法透過 PIAS1 進行類小泛素化修飾。另一方面將可被類小泛素所修飾的目標蛋白質 Hes-1 胺基酸序列上一個特定位置的 lysine 突變成 arginine 之後，結果顯示因為類小泛素無法修飾這個特定的位置，因此突變型 Hes-1 無法進行類小泛素化修飾。在本篇論文中，利用 cycloheximide 可以與真核細胞內的異位酶 (translocase enzyme) 作用而抑制蛋白質生成的特性。在不同時間點處理相同劑量濃度的 cycloheximide，實驗結果證實一旦 Hes-1 蛋白質無法被類小泛素修飾會使得 Hes-1 蛋白質快速降解意謂著其蛋白質較為不穩定。實驗結果也顯示共同轉染 PIAS1 質體及 SUMO1 質體的組別比起只有轉染 SUMO1 質體的組別，HEK293T 細胞內其內生性 Hes-1 蛋白質較為穩定。而，藉由小片段干擾核醣核酸 (short interfering RNA, siRNA) 抑制細胞內 PIAS1，分別轉染控制組 control siRNA 及實驗組 PIAS1 siRNA，顯示 HEK293T 細胞內其內生性 Hes-1 蛋白質的因無法透過 PIAS1 進行類小泛素化修飾較為不穩定。另外，在野生型或突變型 Hes-1 質體這兩組同時轉染 PIAS1 質體及 SUMO1 質體，結果顯示轉染野生型 Hes-1 質體這組蛋白質較為穩定，實驗結果顯示 Hes-1 進行類小泛素化修飾可以讓 Hes-1 更為穩定。更進一步證實 Hes-1 蛋白質進行類小泛素化修飾使之蛋白質較為穩定，將造成大白鼠空間學習記憶及 GluR1 蛋白質表現受到抑制。

參考文獻

- Abdallah B, Hassan A, Benoist C, Goula D, Behr JP, Demeneix BA (1996) A powerful non-viral vector for in vivo gene transfer into the adult mammalian brain: polyethylenimine. *Hum Gene Ther* 7:1947-1954.
- Amaral DG, Witter MP (1989) The three-dimensional organization of the hippocampal formation: a review of anatomical data. *Neuroscience* 31:571-591.
- Amunts, K., Kedo, O., Kindler, M., Pieperhoff, P., Mohlberg, H., Shah, N.J., Habel, U., Schneider, F., and Zilles, K. (2005) Cytoarchitectonic mapping of the human amygdala, hippocampal region and entorhinal cortex: intersubject variability and probability maps. *Anatomy and embryology* 210(5-6): 343-352.
- Andrews Emily A., Palecek Jan, Sergeant John, Taylor Elaine, Alan R. Lehmann, Watts Felicity Z.(2005) Nse2, a Component of the Smc5-6 Complex, Is a SUMO Ligase Required for the Response to DNA Damage. *Mol Cell Bio.* 25:185-196.
- Atkins CM, Selcher JC, Petraitis JJ, Trzaskos JM, Sweatt JD (1998) The MAPK cascade is required for mammalian associative learning. *Nat Neurosci* 1:602-609.
- Akazawa C, Sasai Y, Nakanishi S, Kageyama R. (1992) Molecular characterization of aort negative regulator with a basic helix-loop-helix structure predominantly expressed in the developing nervous system. *J Biol Chem.*267:21879–21885.
- Artavanis-Tsakonas S, Rand MD, lake RJ.(1999) Notch signaling : cell fate control and signal integration in development. *Science.*284:770–776.
- Arora T, Liu B, He H, Kim J, Murphy TL, Murphy KM, Modlin RL, Shuai K (2003) PIASx is a transcriptional co-repressor of signal transducer and activator of transcription 4. *J Biol Chem* 278:21327-21330.
- Ayaydin, F. and Dasso, M.(2004)Distinct in vivo dynamics of vertebrate SUMO paralogues. *Mol. Biol. Cell* 15, 5208-5218.
- Bae S, Bessho Y, Hojo M, Kageyama R.(2000)The bHLH gene Hes6, an inhibitor of Hes1, promotes neuronal differentiation. *Development.*127:2933–2943.
- Bailey, D. and P. O' Hare. (2004) Characterization of the localization and proteolytic activity of the SUMO-specific protease, SENP1. *J.Biol.Chem.* 279:692-703.
- Bartesaghi R., and L. Ravasi. (1999) Pyramidal neuron types in field CA2 of the guinea pig. *Brain Res Bull.* 50: 263-273.
- Bayer P. , Arndt A., Metzger S., Mahajan R., Melchior F. (1998) Structure determination of the small ubiquitin-related modifier SUMO-1. *J. Mol. Biol.* 280: 275–286.
- Bear M. F., B. W. Connors, and M. A. Paradiso.(2001)Neurotransmitters. In *Neuroscience*,

edited by M. F. Bear. Baltimore, MD: Williams & Wilkins, 2001c.

- Bies, J., J. Markus, and L. Wolff. (2002) Covalent attachment of the SUMO-1 protein to the negative regulatory domain of the c-Myb transcription factor modifies its stability and transactivation capacity. *J.Biol.Chem.* 277:8999-9009.
- Burwell RD, Witter MP, Amaral DG (1995) Perirhinal and postrhinal cortices of the rat: a review of the neuroanatomical literature and comparison with findings from the monkey brain. *Hippocampus* 5:390-408.
- Cai Q, Robertson ES. (2010) Ubiquitin/SUMO modification regulates VHL protein stability and nucleocytoplasmic localization. *PLoS One.* 9;5(9)
- Cau E, Gradwohl G, Casarosa S, Kageyama R, Guillemot F. (2000). Hes genes regulate sequential stages of neurogenesis in the olfactory epithelium. *Development.* 127:2323–2332.
- Castella P, Sawai S, Nakao K, Wagner JA, Caudy M. (2000). HES–1 repression of differentiation and proliferation in PC12 cells : role for the helix 3–helix 4 domain in transcription repression. *Mol Cell Biol.*20:6170–6183.
- Chung CD, Liao J, Liu B, Rao X, Jay P, Berta P, Shuai K (1997) Specific inhibition of Stat3 signal transduction by PIAS3. *Science* 278:1803-1805.
- Chen H, Thiagalingam A, Chopra H, Borges MW, Feder JN, Nelkin BD, Baylin SB, Ball DW. (1997) Conservation of the lateral inhibition pathway in human lung Drosophila cancer : A hairy-related protein (HES–1) directly represses achaete-scute homolog–1 expression. *Proc Natl Acad Sci USA* 94:5355–5360.
- Copeland NG, Gilbert DJ, Schindler C, Zhong Z, Wen Z, Darnell JE, Jr., Mui AL, Miyajima A, Quelle FW, Ihle JN, et al. (1995) Distribution of the mammalian Stat gene family in mouse chromosomes. *Genomics* 29:225-228.
- Cotman CW, Monaghan DT, Ganong AH. (1988) Excitatory amino acid neurotransmission: NMDA receptors and Hebb-type synaptic plasticity. *Annu Rev Neurosci.* 1988;11:61-80.
- Davies SN, Collingridge GL (1989) Role of Excitatory Amino-Acid Receptors in Synaptic Transmission in Area Ca1 of Rat Hippocampus. *Proceedings of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences* 236:373-384.
- Dawson SR, Turner DL, Weintraub H, Parkhurst SM. (1995) Specificity for the hairy/enhancer of split basic helix-loop-helix (bHLH) proteins maps outside the bHLH domain and suggests two separable modes of transcriptional repression. *Mol Cell Biol.*15:6923–6931.

- Desterro, J. M., M. S. Rodriguez, and R. T. Hay. (1998) SUMO-1 modification of I κ B inhibits NF- κ B activation. *Mol. Cell* 2:233-239.
- Duval D, Duval G, Kedinger C, Poch O, Boeuf H (2003) The 'PINIT' motif, of a newly identified conserved domain of the PIAS protein family, is essential for nuclear retention of PIAS3L. *FEBS Lett* 554:111-118.
- Eichenbaum H, Stewart C, Morris RG (1990) Hippocampal representation in place learning. *J Neurosci* 10:3531-3542.
- Fagg, G. E., Foster, A. C. (1983) Amino acid neurotransmitters and their pathways in the mammalian central nervous system. *Neuroscience* 9: 701-19.
- Fisher AL, Ohsako S, Caudy M. (1996) The WRPW motif of the Hairy-related basic helix-loop-helix repressor proteins acts as a 4-amino-acid transcription repression and protein-protein interaction domain. *Mol Cell Biol*.16:2670–2677.
- Fonnum F. (1984) Glutamate : a neurotransmitter in mammalian brain. *J Neurochem*. 42(1):1-11.
- Foster TC, Castro CA, McNaughton BL (1989) Spatial Selectivity of Rat Hippocampal-Neurons-Dependence on Preparedness for Movement. *Science* 244:1580-1582.
- Frey U, Huang YY, Kandel ER (1993) Effects of cAMP simulate a late stage of LTP in hippocampal CA1 neurons. *Science* 260:1661-1664.
- Gaiano, N., Nye, J. S. and Fishell, G.(2000). Radial glial identity is promoted by Notch1 signaling in the murine forebrain. *Neuron* 26, 395-404.
- Gill, G.(2003) Post-translational modification by the small ubiquitin-related modifier SUMO has big effects on transcription factor activity. *Curr. Opin. Genet. Dev*. 13, 108-113.
- Gill, G.(2004) SUMO and ubiquitin in the nucleus: different functions, similar mechanisms? *Genes Dev*. 18:2046-2059.
- Giri R, Yeh HH, Wu CH, Liu HS. (2008) SUMO-1 Overexpression Increases RbAp46 Protein Stability and Suppresses Cell Growth. *ANTICANCER RESEARCH* 28: 3749-3756.
- Goelet P, Castellucci VF, Schacher S, Kandel ER (1986) The long and the short of long-term memory--a molecular framework. *Nature* 322: 419- 422.
- Goodson, M.L., Hong, Y., Rogers, R., Matunis, M.J., Park-Sarge, O.-K. and Sarge, K.D. (2001) SUMO-1 modification regulates the DNA binding activity of heat shock transcription factor 2, a promyelocytic leukemia nuclear body associated transcription factor. *J. Biol. Chem*. 276, 18513-18518.
- Gross M, Liu B, Tan J, French FS, Carey M, Shuai K. (2001) Distinct effects of PIAS

proteins on androgen-mediated gene activation in prostate cancer cells. *Oncogene* 20:3880-3887.

- Gross M, Yang R, Top I, Gasper C, Shuai K (2004) PIASy-mediated repression of the androgen receptor is independent of sumoylation. *Oncogene* 23:3059-3066.
- Hatakeyama J, Bessho Y, Katoh K, Ookawara S, Fujioka M, Guillemot F, Kageyama R. (2004) Hes genes regulate size, shape and histogenesis of the nervous system by control of the timing of neural stem cell differentiation. *Development*.131:5539–5550.
- Hay, R. T. (2005) SUMO: a history of modification. *Mol.Cell* 18:1-12.
- Hollmann M., and S. Heinemann. (1994) Cloned glutamate receptors. *Annu Rev Neurosci.* 17: 31-108.
- Hoege, C., B. Pfander, G. L. Moldovan, G. Pyrowolakis, and S. Jentsch.(2002) RAD6-dependent DNA repair is linked to modification of PCNA by ubiquitin and SUMO. *Nature* 419:135-41.
- Hershko, A. and A. Ciechanover.(1998) The ubiquitin system. *Annu.Rev.Biochem.* 67:425-479.
- Hojo M, Ohtsuka T, Hashimoto N, Gradwohl G, Guillemot F, Kageyama R. (2000) Glial cell fate specification modulated by the bHLH gene Hes5 in mouse retina. *Development* 127:2515–2522.
- Hong Y, Rogers R, Matunis MJ, Mayhew CN, Goodson ML, Park-Sarge OK, Sarge KD. (2001) Regulation of heat shock transcription factor 1 by stress-induced SUMO-1 modification. *J Biol Chem.* 276(43):40263-7.
- Honjo, T. (1996). The shortest path from the surface to the nucleus : RBP-J kappa /Su(H) transcription factor. *Genes Cells* 1, 1-9.
- Ishibashi M, Ang S-L, Shiota K, Nakanishi S, Kageyama R, Guillemot F. (1995) Targeted disruption of mammalian hairy and Enhancer of split homolog-1 (HES-1) leads to up-regulation of neural helix-loop-helix factors, premature neurogenesis, and severe neural tube defects. *Genes Dev*9:3136–3148.
- Iso T, Sartorelli V, Poizat C, Iezzi S, Wu H, Chung G, Kedes L, Amadori Y. (2001) HERP, a novel heterodimer partner of HES/E(spl) in Notch signaling. *Mol Cell Biol* 21:6080–6089.
- Issac PS, Ziff EB (1998) Genetic elements regulating HES-1 induction in Wnt-1 transformed PC12 cells. *Cell Growth Differ* 9:827–836.
- Jackson PK (2001) A new RING for SUMO : wrestling transcriptional responses into nuclear bodies with PIAS family E3 SUMO ligases. *Genes Dev*

15:3053-3058.

- Jakobs A, Koehnke J, Himstedt F, Funk M, Korn B, Gaestel M, Niedenthal R (2007) Ubc9 fusion-directed SUMOylation (UFDS) : a method to analyze function of protein SUMOylation. *Nat Methods* 4:245-250.
- Jian Ren, Xinjiao Gao, Changjiang Jin, Mei Zhu, Xiwei Wang, Andrew Shaw, Longping Wen, Xuebiao Yao and Yu Xue. (2009) Systematic study of protein sumoylation : Development of a site-specific predictor of SUMOsp 2.0. *Proteomics*. 9:3409-3412.
- Johnson ES, Gupta AA (2001) An E3-like factor that promotes SUMO conjugation to the yeast septins. *Cell* 106:735-744.
- Johnson ES (2004) Protein modification by SUMO. *Annu Rev Biochem* 73:355-382.
- Johnston D., and D. G. Amaral.(1998) Hippocampus in "The synaptic organization of the brain" (GM Shepherd, Ed) chapter 11.
- Kageyama R, Ohtsuka T (1999) The Notch-Hes pathway in mammalian neural development. *Cell Res* 9: 179-188.
- Kageyama R, Ohtsuka T, Hatakeyama J, Ohsawa R (2005) Roles of bHLH genes in neural stem cell differentiation. *Exp Cell Res* 306: 343-348.
- Kageyama R, Ohtsuka T, Kobayashi T (2008) Roles of Hes genes in neural development. *Dev Growth Differ* 50 Suppl 1: S97-103.
- Kahyo, T., T. Nishida, and H. Yasuda. (2001) Involvement of PIAS1 in the sumoylation of tumor suppressor p53. *Mol. Cell* 8:713-718.
- Kandel ER, Schwartz JH, Jessell TM. (1991) Principles of neural science. 3rd ed. Elsevier Science Publishing Co. New York pp153-160.
- Kesner RP, Hardy JD (1983) Long-term memory for contextual attributes : dissociation of amygdala and hippocampus. *Behav Brain Res* 8:139-149.
- Kerscher, O., R. Felberbaum, and M. Hochstrasser. (2006) Modification of proteins by ubiquitin and ubiquitin-like proteins. *Annu.Rev.Cell Dev.Biol.* 22:159-180.
- Klapp E, Chen SJ, Sweatt JD (1993) Mechanism of protein kinase C activation during the induction and maintenance of long-term potentiation probed using a selective peptide substrate. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 90: 8337-8341.
- Kotaja, N., U. Karvonen, O. A. Janne, and J. J. Palvimo. (2002) PIAS proteins modulate transcription factors by functioning as SUMO-1 ligases. *Mol. Cell Biol.* 22:5222-5234.

- Kullmann DM, Asztely F.(1998) Extrasynaptic glutamate spillover in the hippocampus: evidence and implications. *Trends Neurosci.* 21(1):8-14.
- Kurepa J, Walker JM, Smalle J, Gosink MM, Davis SJ, Durham TL, Sung DY, Vierstra RD. (2003) The small ubiquitin-like modifier (SUMO) protein modification system in Arabidopsis. Accumulation of SUMO1 and -2 conjugates is increased by stress. *J Biol Chem.* 28;278(9):6862-72.
- Larkman AU, Jack JJ (1995) Synaptic plasticity : hippocampal LTP. *Current Opinion in Neurobiology* 5:324-334.
- Lee Ching T., Ma Yun L. and Lee Eminy H. Y. (2007) SGK enhances fear memory formation through down –regulation of the expression of Hes5. *J Neurochem.* 100(6):1531-42.
- Lin Xia , Liang Min, Liang Yao-Yun , Brunicardi F. Charles, Feng Xin-Hua. (2003) SUMO-1/Ubc9 Promotes Nuclear Accumulation and Metabolic Stability of Tumor Suppressor Smad4. *J. Biol. Chem.*, 278:31043-31048.
- Lin Cheng H, Lee Eminy H. Y. (2012) JNK1 Inhibits GluR1 Expression and GluR1-Mediated Calcium Influx through Phosphorylation and Stabilization of Hes-1. *The Journal of Neuroscience.* 32(5):1826 –1846.
- Li SJ, Hochstrasser M. (2003) The Ulp1 SUMO isopeptidase : distinct domains required for viability, nuclear envelope localization, and substrate specificity. *J Cell Biol.* 160:1069-81.
- Liu B, Liao J, Rao X, Kushner SA, Chung CD, Chang DD, Shuai K (1998) Inhibition of Stat1-mediated gene activation by PIAS1. *Proc Natl Acad Sci USA* 95:10626-10631.
- Liu B, Yang Y, Chernishof V, Loo RR, Jang H, Tahk S, Yang R, Mink S, Shultz D, Bellone CJ, Loo JA, Shuai K (2007) Proinflammatory stimuli induce IKKalpha-mediated phosphorylation of PIAS1 to restrict inflammation and immunity. *Cell* 129:903-914.
- Liu B, Shuai K. (2008) Targeting the PIAS1 SUMO ligase pathway to control inflammation. *Trends Pharmacol Sci.* 29(10):505-9.
- Lungwitz U, Breunig M, Blunk T, Gopferich A (2005) Polyethylenimine-based non-viral gene delivery systems. *Eur J Pharm Biopharm* 60:247-266.
- Macleay, P. D. (1952) Some psychiatric implications of physiological studies on frontotemporal portion of limbic system (visceral brain). *Electroencephalography and clinical neurophysiology* 4(4): 407-418.
- Mahajan R., Gerace L., Melchior F. (1998) Molecular characterization of the SUMO-1

- modification of RanGAP1 and its role in nuclear envelope association. *J. Cell Biol.* 140: 259–270.
- Mack V, Burnashev N, Kaiser KM, Rozov A, Jensen V et al. (2001) Conditional restoration of hippocampal synaptic potentiation in Glur-A-deficient mice. *Science* 292: 2501-2504.
- Malinow R, Schulman H, Tsien RW (1989) Inhibition of postsynaptic PKC or CaMKII blocks induction but not expression of LTP. *Science* 245:862-866.
- Martres MP, Demeneix B, Hanoun N, Hamon M, Giros B (1998) Up- and down-expression of the dopamine transporter by plasmid DNA transfer in the rat brain. *Eur J Neurosci* 10:3607-3616.
- McDonald WH, Pavlova Y, Yates JR, Boddy MN. (2003) Novel essential DNA repair proteins Nse1 and Nse2 are subunits of the fission yeast Smc5-Smc6 complex. *J Biol Chem* 278:45460-45467.
- McGaugh JL, Cahill L, Roozendaal B (1996) Involvement of the amygdala in memory storage : interaction with other brain systems. *Proc Natl Acad Sci USA* 93:13508-13514.
- McNaughton BL, Barnes CA, Meltzer J, Sutherland RJ (1989) Hippocampal Granule Cells Are Necessary for Normal Spatial-Learning but Not for Spatially-Selective Pyramidal Cell Discharge. *Exp Brain Res* 76:485-496.
- Melchior F. (2000) SUMO-nonclassical ubiquitin. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 16: 591-626.
- Meluh, P.B. and Koshlnad, D. (1995) Evidence that the MIF2 gene of *s. cerevisiae* encodes a centromer protein with homology to the mammalian centromer protein CENP-C. *Mol. Biol. Cell* 6 793–807.
- Milner B, Squire LR, Kandel ER (1998) Cognitive neuroscience and the study of memory. *Neuron* 20:445-468.
- Miyoshi G, Bessho Y, Yamada S, Kageyama R. (2004) Identification of a novel basic helix-loop-helix gene, Heslike, and its role in GABAergic neurogenesis. *J Neurosci* 24:3672–3682.
- Morris R (1984) Developments of a water-maze procedure for studying spatial learning in the rat. *J Neurosci Methods* 11:47-60.
- Morris RG, Pickering A, Abrahams S, Feigenbaum JD (1996). Space and the hippocampal formation in humans. *Brain Research Bulletin* 40:487–90.
- Nacerddine, K., F. Lehembre, M. Bhaumik, J. Artus, M. Cohen-Tannoudji, C. Babinet, Pandolfi, and A. Dejean. (2005) The SUMO pathway is essential for nuclear integrity and chromosome segregation in mice. *Dev.Cell* 9:769-779.

- Nakashima K, Takizawa T, Ochiai W, Yanagisawa M, Hisatsune T, Nakafuku M, Miyazono K, Kishimoto T, Kageyama R, Taga T (2001) BMP2-mediated alteration in the developmental pathway of fetal mouse brain cells from neurogenesis to astrocytogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 98:5868–5873.
- Nishida, T. and H. Yasuda. (2002) PIAS1 and PIAS α function as SUMO-E3 ligases toward androgen receptor and repress androgen receptor-dependent transcription. *J. Biol. Chem.* 277:41311-41317.
- Ohtsuka T, Ishibashi M, Gradwohl G, Nakanishi S, Guillemot F, Kageyama R. (1999) Hes1 and Hes5 as Notch effectors in mammalian neuronal differentiation. *EMBO J* 18:2196–2207.
- Ohtsuka T, Sakamoto M, Guillemot F, Kageyama R. (2001) Roles of the basic helix-loop helix genes Hes1 and Hes5 in expansion of neural stem cells of the developing brain. *J Biol Chem* 276:30467–30474.
- Ohsumi Y. (1999) Molecular mechanism of autophagy in yeast, *Saccharomyces cerevisiae*. *Philos. Trans. R Soc. London Ser. B Biol Sci.* 354:1577-1580.
- O'Keefe J, Dostrovsky J (1971) The hippocampus as a spatial map. Preliminary evidence from unit activity in the freely-moving rat. *Brain Res* 34:171-175.
- Okuma T, Honda R, Ichikawa G, Tsumagari N, Yasuda H (1999) In vitro SUMO-1 modification requires two enzymatic steps, E1 and E2. *Biochem Biophys Res Commun* 254:693-698.
- Orrego F, Villanueva S. (1993) The chemical nature of the main central excitatory transmitter : a critical appraisal based upon release studies and synaptic vesicle localization. *Neuroscience.* 56(3):539-55.
- Paroush Z, Finley Jr RL, Kidd T, Wainwright SM, Ingham PW, Brent R, Ish-Horowitz D. (1994) Groucho is required for *Drosophila* neurogenesis, segmentation, and sex determination and interacts directly with hairy-related bHLH proteins. *Cell* 79:805–815.
- Paxinos G. WC (1986) *The rat brain in stereotaxic coordinates*, Orlando, Academic Press.
- Rodriguez, M. S., C. Dargemont, and R. T. Hay. (2001) SUMO-1 conjugation in vivo requires both a consensus modification motif and nuclear targeting. *J. Biol. Chem.* 276:12654-9.
- Rosenmund C, Stern-Bach Y, Stevens CF. (1998) The tetrameric structure of a glutamate receptor channel. *Science.* 280(5369):1596-9.
- Rytinki MM, Kaikkonen S, Pehkonen P, Jääskeläinen T, Palvimo JJ. (2009) PIAS

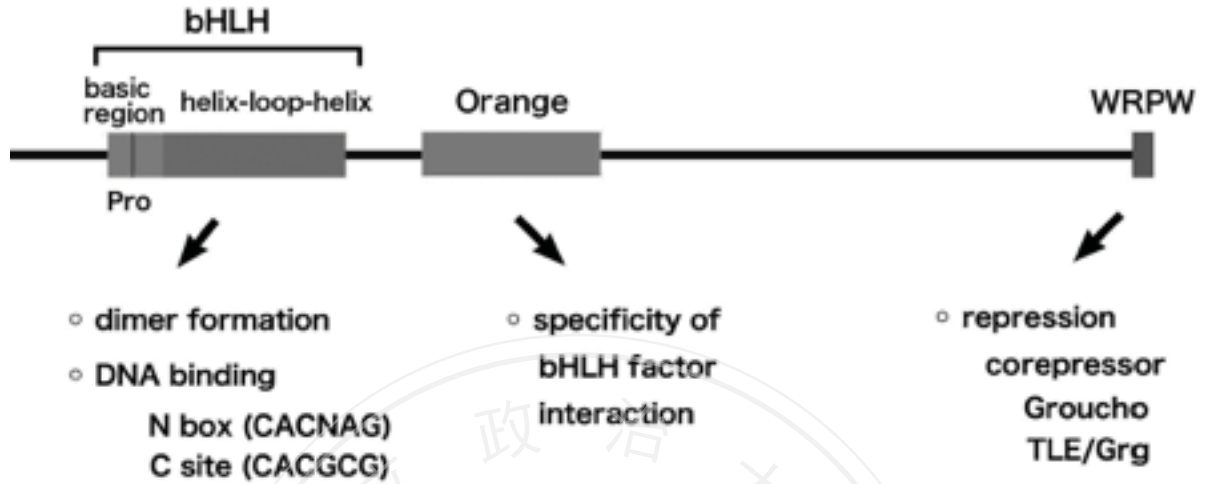
proteins : pleiotropic interactors associated with SUMO. *Cell Mol Life Sci.* 66:3029-41.

- Potts PR, Yu H. (2005) Human MMS21/NSE2 is a SUMO ligase required for DNA repair. *Mol Cell Biol.* 25:7021-32.
- Sasai Y, Kageyama R, Tagawa Y, Shigemoto R, Nakanishi S (1992) Two mammalian helix-loop-helix factors structurally related to *Drosophila* hairy and Enhancer of split. *Genes Dev* 6: 2620-2634.
- Sarazin M, Deweer B, Merkl A, Von Poser N, Pillon B, Dubois B (2002) Procedural learning and striatofrontal dysfunction in Parkinson's disease. *Mov Disord* 17:265-273.
- Schwienhorst, I., E. S. Johnson, and R. J. Dohmen.(2000) SUMO conjugation and deconjugation. *Mol.Gen.Genet.* 263:771-786.
- Scoville WB, Milner B (1957) Loss of recent memory after bilatera hippocampal lesions. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 20:11-21.
- Seufert W, Futcher B, Jentsch S. (1995) Role of a ubiquitin-conjugating enzyme in degradation of S- and M-phase cyclins. *Nature* 373:78-81.
- Shuai K (2006) Regulation of cytokine signaling pathways by PIAS proteins. *Cell Res* 16:196-202.
- Shuai K, Liu B (2005) Regulation of gene-activation pathways by PIAS proteins in the immune system. *Nat Rev Immunol* 5:593-605.
- Solecki DJ, Liu XL, Tomoda T, Fang Y, Hatten ME (2001) Activated Notch2 signaling inhibits differentiation of cerebellar granule neuron precursors by maintaining proliferation. *Neuron* 31:557–568
- Song L, Bhattacharya S, Yunus AA, Lima CD, Schindler C (2006) Stat1 and SUMO modification. *Blood* 108:3237-3244.
- Squire LR, Alvarez P (1995) Retrograde amnesia and memory consolidation : a neurobiological perspective. *Curr Opin Neurobiol* 5:169-177.
- Taelman V, Van Wayenbergh R, Solter M, Pichon B, Pieler T, Christophe D, Bellefroid EJ. (2004) Sequences downstream of the bHLH domain of the *Xenopus* hairy-related transcription factor–1 act as an extended dimerization domain that contributes to the selection of the partners. *DevBiol* 276:47–63.
- Tai Derek J C, Hsu Wei L, Liu Yen C, Ma Yun L and Lee Eminy H Y. (2011) Novel role and mechanism of protein inhibitor of activated STAT1 in spatial learning. *The EMBO Journal.* 30, 205 - 220.
- Tang Z, El Far O, Betz H, Scheschonka A. (2005) Pias1 interaction and sumoylation

- of metabotropic glutamate receptor 8. *J Biol Chem.* 280:38153-9.
- Tatham, M. H., E. Jaffray, O. A. Vaughan, J. M. Desterro, C. H. Botting, J. H. Naismith, and R. T. Hay. (2001) Polymeric chains of SUMO-2 and SUMO-3 are conjugated to protein substrates by SAE1/SAE2 and Ubc9. *J. Biol.Chem.* 276:35368-35374.
- Takebayashi, K., Y Sasai, Y. Sakai, T. Watanabe, S. Nakanishi, and R. Kageyama. (1994) Structure, chromosomal locus, and promoter analysis of the gene encoding the mouse helix-loop-helix factor HES-1. Negative autoregulation through the multiple N box elements. *J Biol Chem.* 269:5150-5156.
- Tempé D, Piechaczyk M, Bossis G. (2008) SUMO under stress. *Biochem Soc Trans.* 36:874-8.
- Teyler TJ, Discenna P (1987) Long-Term Potentiation. *Annual Review of Neuroscience* 10:131-161.
- Tomita, K., Hattori, M., Nakamura, E., Nakanishi, S., Minato, N., Kageyama, R. (1999) The bHLH gene *Hes1* is essential for expansion of early T cell precursors. *Genes Dev.* 13(9): 1203–1210.
- Verger, A., Perdomo, J., and Crossley, M. (2003) Modification with SUMO : A role in transcriptional regulation. *EMBO Rep.* 4, 137-142.
- Wang YT, Chuang JY, Shen MR, Yang WB, Chang WC, Hung JJ. (2008) Sumoylation of Specificity Protein 1 Augments Its Degradation by Changing the Localization and Increasing the Specificity Protein 1 Proteolytic Process. *J mol biol.* 25; 380(5):869-85.
- Warrington EK, Weiskrantz L (1968) New method of testing long-term retention with special reference to amnesic patients. *Nature* 217:972-974.
- Wilkinson Kevin A. and Henley Jeremy M. (2010) Mechanisms, regulation and consequences of protein SUMOylation. *Biochem. J.* 428, 133–145.
- Wisden W, Seeburg PH. (1993) Mammalian ionotropic glutamate receptors. *Curr Opin Neurobiol.* 3(3):291-8.
- Zamanillo D, Sprengel R, Hvalby O, Jensen V, Burnashev N et al. (1999) Importance of AMPA receptors for hippocampal synaptic plasticity but not for spatial learning. *Science* 284: 1805-1811.
- Zhao, X. , Blobel, G. (2005) A SUMO ligase is part of a nuclear multiprotein complex that affects DNA repair and chromosomal organization. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102 , 4777-4782.

附錄

附錄一、Hes1 基因的 conserved domains

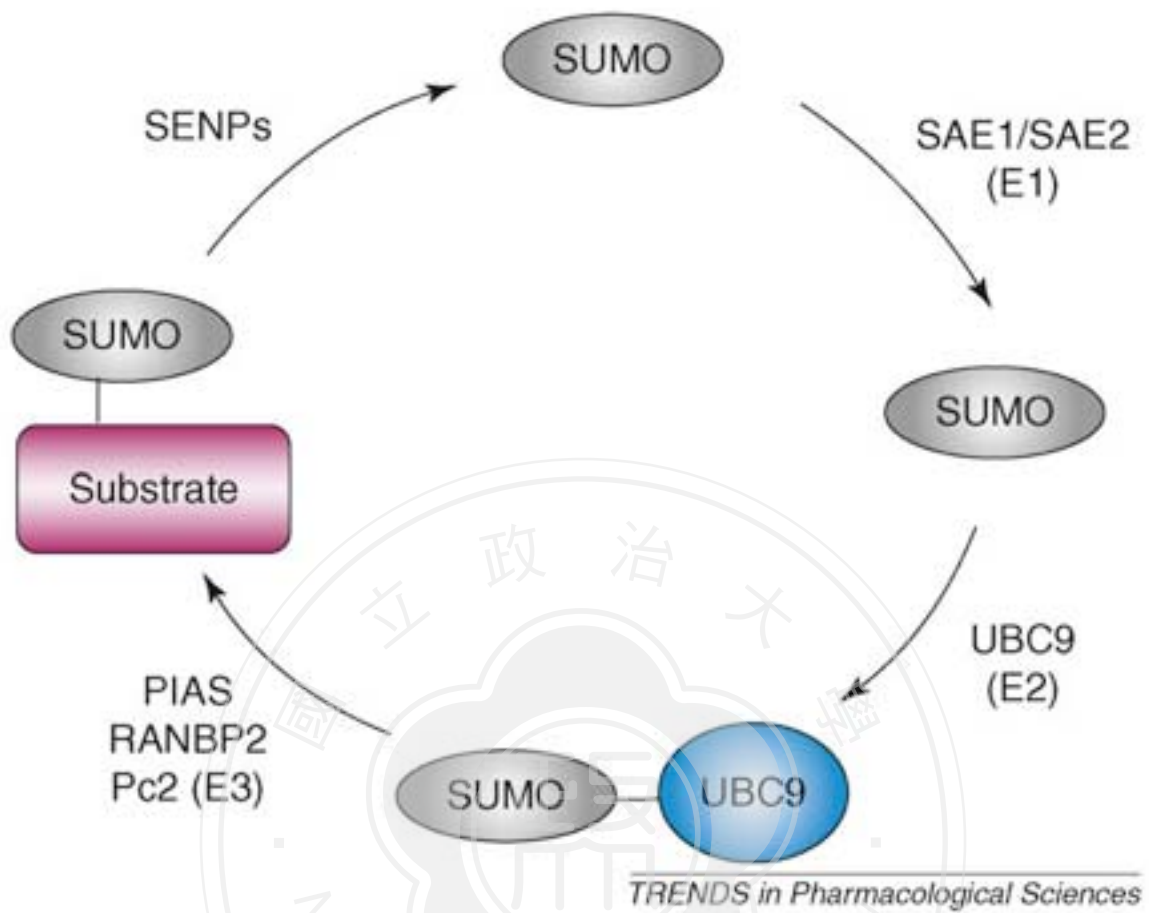


(Kageyama et al., 2008)

每一個 Hes 因子都具有三個 conserved domains :

1. bHLH domain : 參與二聚體的形成 (dimer formation) 和 DNA 結合。
2. Orange domain (the helix 3–helix 4 domain) : 與特別的 bHLH 因子作用。
3. WRPW (Trp-Arg-Pro-Trp) domain : 主要的抑制區域會與共同抑制子結合。

附錄二、類小泛素化修飾連結途徑

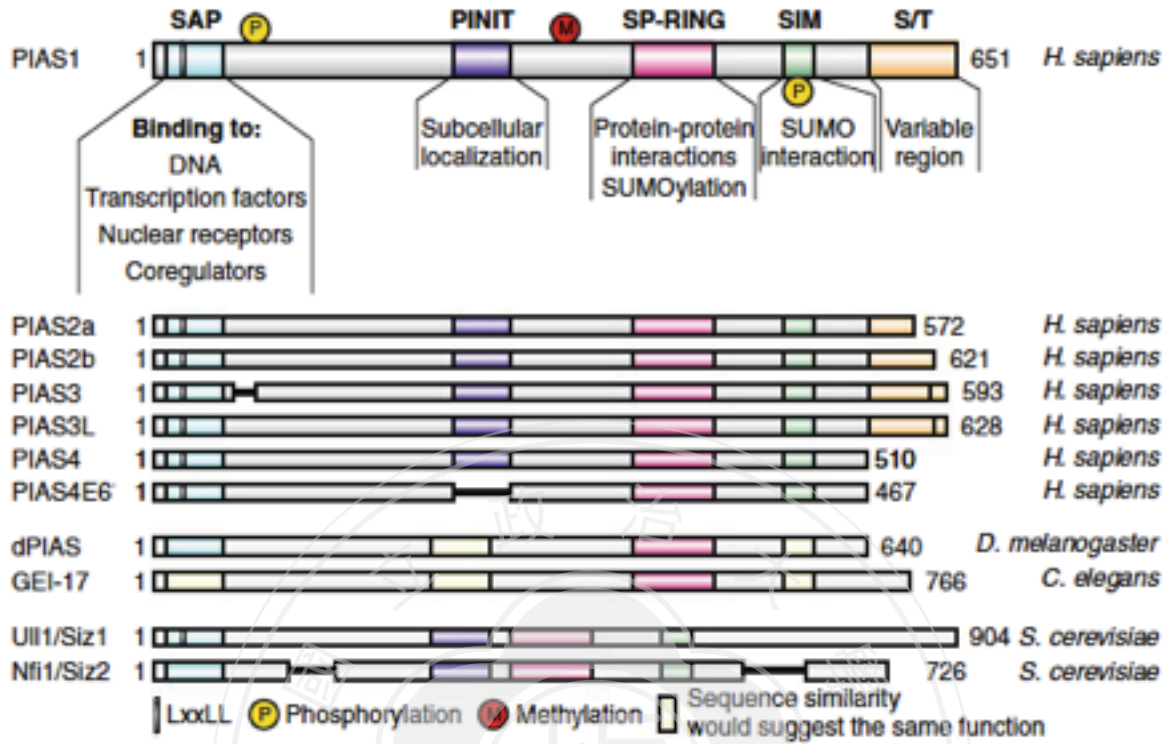


(Liu et al., 2008)

類小泛素化修飾連結途徑包含有三個主要的步驟：

1. 活化 (activation)
2. 結合 (conjugation)
3. 連接 (ligation)

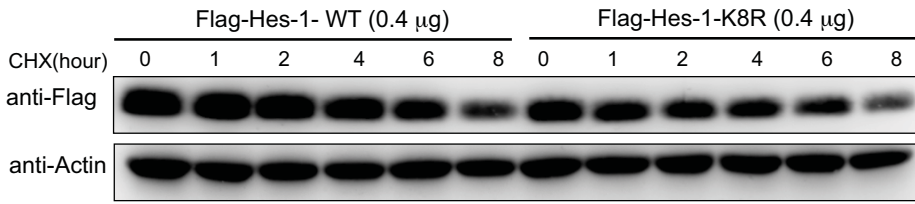
附錄三、PIAS1 結構



(Rytinki et al., 2009)

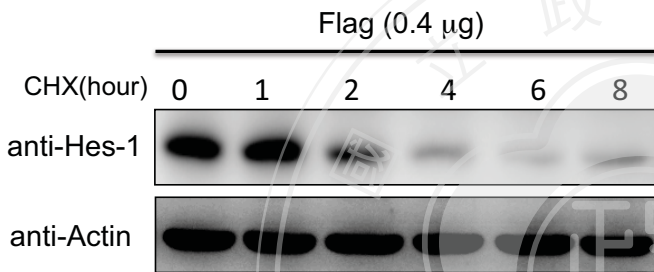
附錄四、Hes-1 蛋白質穩定

(A)



細胞轉染質體 48 小時後，於每個細胞孔盤內加入 20 μ g/ml cycloheximide (簡稱 CHX) 處理六個不同時間點，分別為 0、1、2、4、6、8 小時。觀察其蛋白質穩定度。

(B)



細胞只轉染載體 (Flag) 24 小時後，於每個細胞孔盤內加入 20 μ g/ml cycloheximide (簡稱 CHX) 處理六個不同時間點，分別為 0、1、2、4、6、8 小時。觀察其內生性蛋白質穩定度。