

中國醫藥大學
生物科技系碩士班
碩士學位論文

Pir51 與 CDC20 的交互作用之細胞性功能探討

Explore cellular functions of the interaction between Pir51 and CDC20

指導教授：蔡士彰 助理教授

研究生：陳加恩

中華民國九十九年七月

摘要

Pir51 因為與 Rad51 有交互作用而得名。在病人的樣品中 Pir51 被發現高度表現於具有侵略性的淋巴瘤細胞，而在小淋巴球的淋巴瘤中則無表現。近年來，Pir51 在不同的腫瘤細胞中被發現，像是肝癌、急性的骨髓白血病中都會發現 Pir51 的表現增強。Pir51 的表現是藉由細胞週期來調控，且型態與 Rad51 非常相近。DNA 雙股斷裂的時候，Rad51 在同源重組中扮演重要的角色，可與許多修補機制的蛋白質產生交互作用。我們利用細菌雙雜交系統找出 124 個可與 Pir51 產生交互作用的蛋白質。其中一個令我感興趣的菌落是 CDC20。CDC20 在細胞週期的 M 期有高度表現，是個調節蛋白。我們用免疫沉澱-西方點墨法及免疫染色法顯示 Pir51 與 CDC20 有關連且分布在相同位置，同時發現 Pir51 會經由 APC^{CDC20} 被泛蛋白化。此外，我們發現 Pir51 與 ATR 會有交互作用，再將子宮頸癌細胞加入 20 μ g/mL bleomycin 2 小時使 DNA 斷裂，利用免疫染色法觀察到 ATR 與 Pir51 聚集在 DNA 受損的位置。因此推論 Pir51 有參與 ATR-dependent pathway，並且在 DNA 修補方面佔有重要的角色。

關鍵字: 免疫沉澱法；免疫螢光法；泛蛋白化；蛋白質交互作用

Abstract

Pir51 (protein interacting with Rad51), is found highly expressed in aggressive mantle cell lymphoma but not in indolent small lymphocytic lymphoma patient samples. Recently, Pir51 has been detected in a variety of cell types. The expression level of Pir51 is regulated during the cell cycle in a pattern nearly identical to Rad51. RAD51 plays a major role in homologous recombination of DNA during double strand breaks and interacts with a lot of proteins. We found that there were 124 proteins associated with Pir51 by using the BacterioMatch Two-Hybrid system. One of the interesting clones is CDC20. CDC20 is highly expressed in M phase of the cell cycle, and appears to act as a regulatory protein. We performed IP-Western and immunostaining to verify the interaction between Pir51 and CDC20. Indeed, the data showed that CDC20 associates and colocalizes with Pir51. Pir51 is ubiquitinated via APC^{CDC20}. Moreover, we found that Pir51 can interact with ATR. HeLa cells were treated with 20 µg/mL bleomycin for 2 hours, and then observed the relationship between ATR and pir51 in response to bleomycin by immunostaining. As a result, we showed that Pir51 is involved in the ATR-dependent pathway.

Key words: immunoprecipitation; immunostaining; ubiquitination; protein interaction

致謝

這兩年一路走來，開啟了我對研究以及學術的思考，而我能夠擁有這麼大的收獲，一切都要感謝許多人的提攜與幫助。

首先衷心感謝蔡士彰老師在實驗時的細心指導，總是不厭其煩的教導我做事情的正確觀念，並且能在實驗結果的討論中，獲得您的精闢見解，讓我豁然開朗，受益匪淺。

感謝口試委員高銘欽老師、蔡婉琪老師在百忙之中，撥冗閱讀論文並提供寶貴的意見，使論文呈現的更完善，讓我獲益良多，在此謹誠敬意。感謝系上的老師，每一位老師對我們的諄諄教誨，不僅在課業上，實驗上乃至於生活上皆可詢問，亦師亦友的相處，使得氣氛很融洽。

同時也要感謝實驗室的成員們，沛琪以及建喬幫忙實驗室分擔了許多工作，幫忙指導學弟妹，並且在遇到困難時不吝出手相助。伊閔幫忙處理實驗室的雜物，以及柏翰在我剛進入實驗室時，幫助我許多實驗方面的問題，彥甫以及右昕讓實驗室的氣氛處在融洽的氛圍中，以及有班上同學的幫忙，讓我對實驗充滿活力。

最後，感謝我的家人，讓我在研究過程中，沒有後顧之憂，才有這份論文的產生。

陳加恩謹致於

中國醫藥大學 生物科技學系研究所

中華民國九十九年七月

縮寫及全名對照表

縮寫	全名
3-AT	3-amino-1,2,4-triazole
ATM	Ataia telangieatasia mutated
ATR	ATM and Tad3-related
APC	anaphase promoting complex
APS	Ammonium persulfate
DMSO	Dimethyl sulfoxide
DMEM	Dulbecco modified Eagle medium
FBS	fetal bovine serum
IR	ionizing irradiation
IPTG	Isopropyl-1-thio- β -D-galactopyranoside
IP	immunoprecipitation
MCL	mantle cell lymphoma
Pir51	protein interacting with Rad51
PI	Propidium Iodide
PS	penicillin-streptomycin
SLL	small lymphocytic lymphoma

總目錄

中文摘要.....	I
英文摘要.....	II
致謝.....	III
縮寫與全名對照表.....	IV
總目錄.....	V
圖目錄.....	VI
表目錄.....	VII
第一章 前言.....	1
第一節 研究背景.....	1
第二節 研究目的.....	8
第二章 研究方法.....	9
第一節 研究材料.....	9
第二節 研究設計.....	14
第三章 研究結果.....	30
第四章 討論.....	42
第五章 結論.....	49
第六章 參考文獻.....	50
第七章 附表.....	54

圖目錄

- 圖 1、Rad51 在細胞進行同源重組時扮演的角色。
- 圖 2、Rad51 的蛋白質複合體的形式。
- 圖 3、ATR and ATM 在 DNA 受損的時候所做的立即反應。
- 圖 4、CDC20 的功能性區域。
- 圖 5、細菌雙雜交的系統。
- 圖 6、細菌雙雜交系統篩選的結果。
- 圖 7、以免疫沉澱-西方點墨法來確定 Pir51 與 CDC20 有交互作用。
- 圖 8、CDC20 以及 Pir51 在免疫螢光顯微鏡下的分布情形。
- 圖 9、探討 CDC20 會與 Pir51 有交互作用的區域。
- 圖 10、Pir51 會經由 APC^{CDC20} 被泛蛋白化。
- 圖 11、Pir51 與 ATR 在 DNA 損壞時，在免疫螢光顯微鏡下的分布情形。
- 圖 12、以西方點墨法觀察 Pir51 被抑制的程度。
- 圖 13、MetaCore 分析人類全基因表現晶片相關路徑結果。

表目錄

表 1、由 BLAST 搜尋與 Pir51 有正相關的菌落之基因名稱。

表 2、依不同機制分類與 Pir51 作用正相關的基因

表 3、HeLa 細胞與 Pir51 被抑制的情況下，人類基因庫中基因的表现

差異。



第一章 前言

第一節 研究背景

DNA 在複製的時候，有時候會產生內生性的錯誤配對，這種內生性的錯誤配對屬於自然發生的，在 DNA 複製的過程中所出現的機率不算太高，而且會有修補機制來修補 DNA 複製過程中所出現的錯誤。

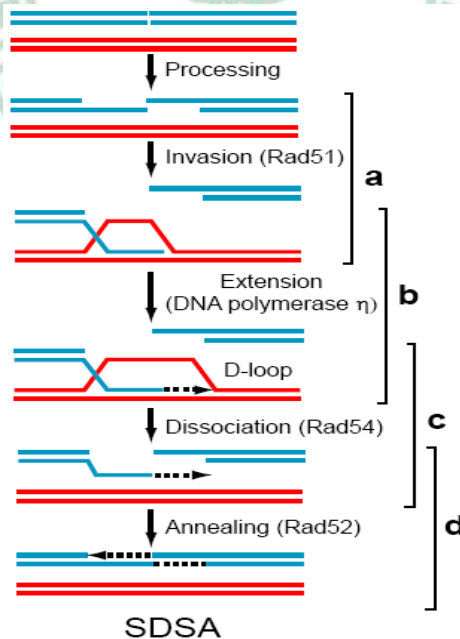
DNA 修補機制可分成以下幾類：

1. 配對錯誤修補作用 (mismatch repair)
2. 鹼基切除修復 (base-excision repair)
3. 核苷酸切除修復 (nucleotide-excision repair)
4. 直接修復 (direct repair)
5. 重組修補作用 (recombination repair)
6. 易出錯的修補作用 (error-prone repair)

DNA 受到外在環境刺激時，例如輻射線的照射，會引發鹼基對的損害，以及 DNA 斷裂的情況 (Lowndes and Murguia, 2000)；而 UV 的照射，會導致環丁烷嘧啶雙體的產生以及一些光產物 (Sage *et al.*, 2010; Tremezaygues *et al.*, 2009)；若加入某些化學物質例如煙化劑，DNA 往往會產生錯誤配對，一般的 direct repair 與 base-excision repair

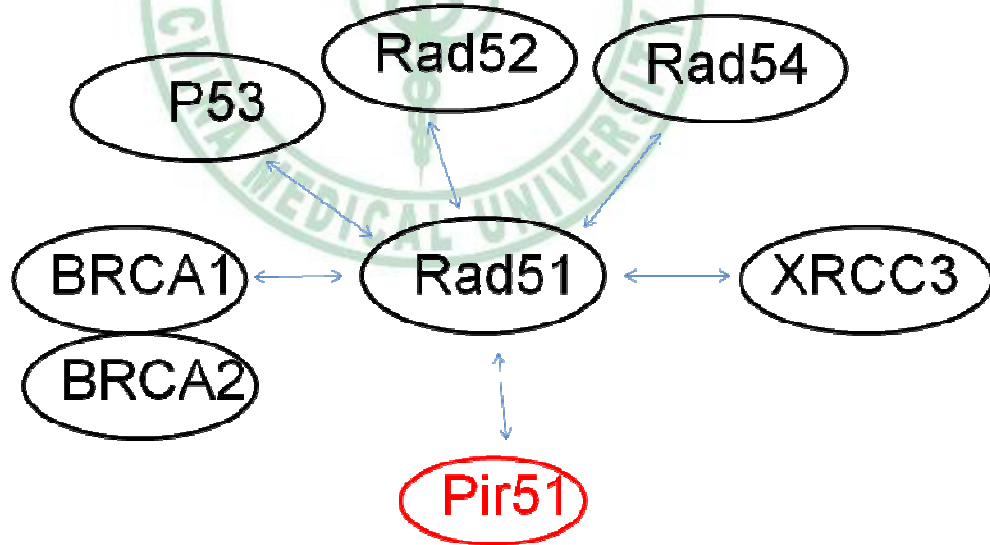
都屬於短期性的代謝反應，一旦修補作用達到飽和可能會失效，因此細菌或細胞內存在著比較長期性的修補系統，像是重組修補作用以及易出錯的修補作用來修補受損的 DNA。

Rad51 是真核生物體內的一種蛋白質，相當於原核生物的 RecA。DNA 在受到損傷的時候，細胞會產生一些反應路徑，包括使細胞週期停止，活化 DNA 修補的基因，抑或是使細胞走向死亡(Du *et al.*, 2010)。同源重組的機制與 DNA 修補有關，其中 Rad51 在細胞的同源重組中扮演一個很重要的角色，當 DNA 受到嚴重損傷，雙股斷裂的時候，Rad51 會被誘發表現，並且啟動一連串的修補機制(Bugreev *et al.*, 2007) (圖 1)。



(圖 1) 當 DNA 雙股斷裂的時候，Rad51 在細胞進行同源重組時扮演的角色

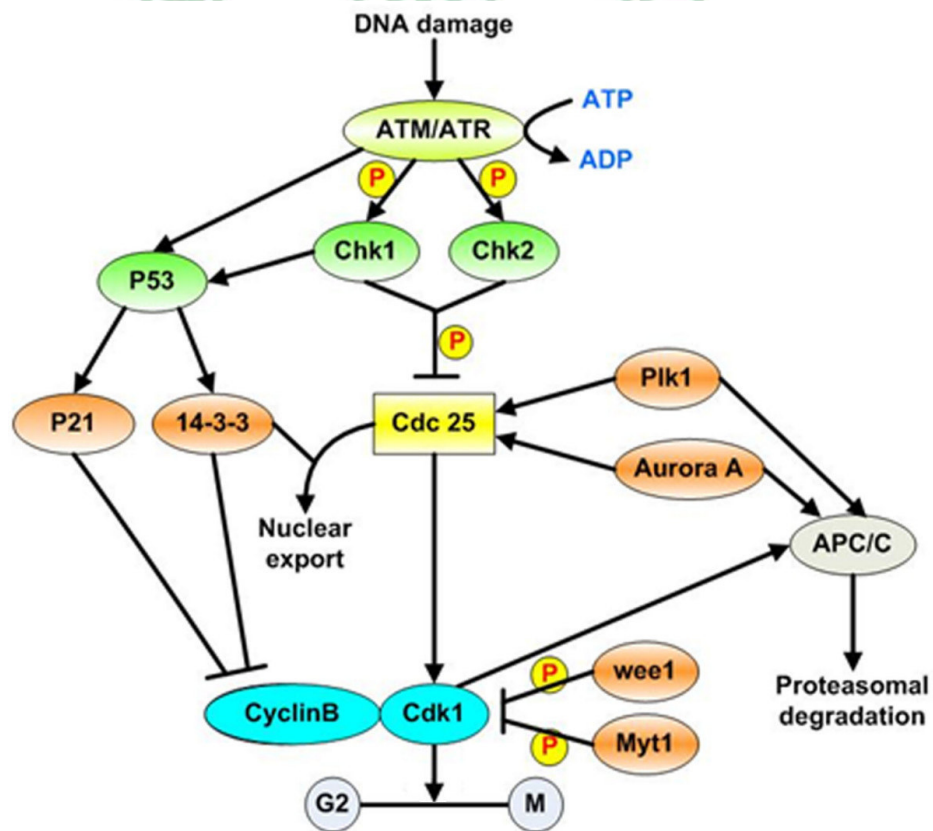
Rad51 常以蛋白質複合體的形式呈現 (圖 2)。Rad51 被發現於細胞進行同源重組的路徑中，當 DNA 受到損傷的時候，Rad51 的表現會增加，並且參與修補的路徑。一些腫瘤抑制基因，像是 p53, ATM, BRCA1, BRCA2, BLM 和 FANCD2 也都被發現與 Rad51 的路徑有密切的關聯(Beucher *et al.*, 2009; Henning and Sturzbecher, 2003)。Rad51 也被發現常以蛋白質複合體的形式存在，包括 RPA，BRCA1，BRCA2，ATM 等重要蛋白皆與 RAD51 有密切的交互作用(Jacquemont and Taniguchi, 2007)。



(圖 2) Rad51 常以蛋白質複合體的形式存在。Pir51 也是屬於 Rad51 的其中一個蛋白質複合體。

ATM 與 ATR 是在 DNA 受損的時候，最早出現在受損位置的蛋白質(Kim and Burke, 2008)，ATM 通常是被 IR (ionizing irradiation) 照射導致 DNA 雙股斷裂時被活化(Pandita *et al.*, 2000)，而 ATR 在 DNA 被 UV 照射或是複製叉(stalled replication forks)錯誤時會有反應(Wright *et al.*, 1998)。

ATM 及 ATR 這兩種蛋白質不但在 DNA 受損時會立即活化，還會活化下游的修補蛋白質，這些修補蛋白複合體會促使細胞做一些立即性的反應，像是使細胞週期停止(Abraham, 2001; Lin and Dutta, 2007)，或是使細胞走向死亡(圖 3)。



(圖 3) ATR&ATM 在 DNA 受損的時候所做的立即反應。

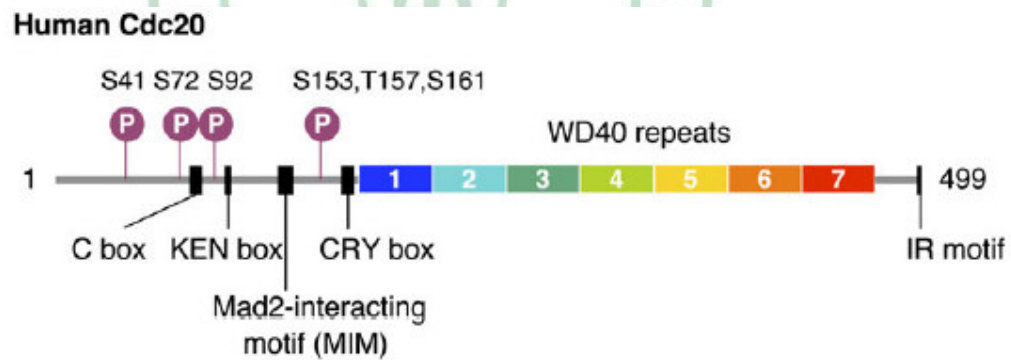
ATM 及 ATR 在 DNA 受損時，會立即活化，並啟動下游修補機因，使細胞週期停止(cell cycle arrest) (Hekmat-Nejad *et al.*, 2000)。ATM 以及 ATR 主要是調控細胞週期的 S 期，但是在 M 期也是有表現，當細胞要進行減數分裂時，會進行同源重組，此時的 ATM 也擔任不可或缺的角色，細胞進行減數分裂時若缺少 ATM，會出現一些不正常斷裂的染色體，也證明了 ATM 在細胞進行同源重組中，扮演了重要的角色(Andegeko *et al.*, 2001; Yang *et al.*, 2004)。

Pir51 (protein interacting with Rad51)是在 1997 年以酵母菌雙雜交法(yeast two-hybrid system)被發現存在於 Rad51 的蛋白複合體中 (Kovalenko *et al.*, 1997)，且兩種蛋白質之間有交互作用而得名。Pir51 的表現形態與 Rad51 非常相近(Modesti *et al.*, 2007)。Pir51 會在一些癌細胞中大量表現，像是肝癌細胞、急性骨髓白血病、以及具有侵略性的淋巴癌細胞皆可發現(Henson *et al.*, 2006)。

Rad51 主要調控細胞同源重組的修復(Wiese *et al.*, 2007)，而 Pir51 與 Rad51 會產生交互作用，加強合成酶的活性來幫助 DNA 的修復。若將 Pir51 的活性抑制住，DNA 受損的敏感性不只會提升，還會造成染色質的斷裂，也因此證明了 Pir51 的重要性，且 Pir51 是細胞進行同源重組中很重要的一個因子。Pir51 與 Rad51 的功能及形態非常相

近，且 Pir51 與 Rad51 皆分布在核與細胞質中。

CDC20 是細胞週期的 M 期中很重要的細胞週期調節者(cell cycle regulator)，並且可在細胞分裂的中期到晚期之間活化 APC，使得染色體分離(Eytan *et al.*, 2006; Nilsson *et al.*, 2008)。CDC20 有許多功能性區域(function domain)(圖 4) (Yu, 2007)，包括有 7 個 WD-40 repeats 掌管蛋白質與蛋白質之間的交互作用(protein-protein interaction) (Fraschini *et al.*, 2001)，C box 以及 IR motif 可以鍵結 APC/C (Schuyler and Murray, 2009)，KEN box 讓 APC/C 鍵結而進行泛蛋白化 (Pfleger and Kirschner, 2000)。



(圖 4) CDC20 的功能性區域(functional domain)。包含了 C box、KEN box、Mad2-interacting motif、CRY box、WD40 repeats、以及 IR motif。

APC 可受細胞週期的調控(Manchado *et al.*, 2010; van Leuken *et al.*, 2008)，在 M 期時，APC 活性變強，直到 G1 期(Baker *et al.*, 2007;

Herzog *et al.*, 2009)。APC^{CDC20}可藉由抑制 securin 來調節泛蛋白化的功能，將 securin 降解後可活化 separase，進而使 cohesin 被切割，使得染色質分離，讓細胞週期由中期(metaphase)進入晚期(anaphase) (Hagting *et al.*, 2002; Kimata *et al.*, 2008)。在中期到晚期的過程中，proteolysis 是一個關鍵(Kraft *et al.*, 2006)，一些細胞週期調控者會被 ubiquitin 所辨識而降解，這過程稱為泛蛋白化(Reddy *et al.*, 2007; Stegmeier *et al.*, 2007)。APC 亦可將一些用不到或摺疊錯誤或是有害的蛋白質清除掉，若這些有害的蛋白質被排成鏈狀的泛蛋白附著，會有蛋白酶體(proteasome)辨識並將之分解。

由於 CDC20 在突變後，細胞週期不能進入晚期，後來也經人發現細胞週期中的 M 期是藉由 CDC20 活化 APC 之後，使得細胞週期由中期進入晚期(Li *et al.*, 2007; Mondal *et al.*, 2007)。

泛蛋白的功能不只這些，泛蛋白-蛋白酶體系統所控制之蛋白分解，調控許多重要之細胞功能，於動物與酵母菌方面之研究顯示受該系統所調控之細胞功能，包括細胞分裂、DNA 修復、凋亡、轉錄調控、訊號傳遞等(Fasanaro *et al.*, 2009)。

第二節 研究目的

Pir51 近年來被發現在許多癌症細胞中會有高度表現，舉凡肝癌細胞，急性骨髓白血病，以及具侵襲性的淋巴瘤，都是 Pir51 會大量表現的地方。有鑑於 Pir51 出現於許多癌症細胞中，並且與 Rad51 有極相近的功能，可以推測 Pir51 與 DNA 修補的路徑有關連，又由於 APC^{CDC20} 具有泛蛋白化的功能，可將一些用不到或摺疊錯誤或是有害的蛋白質清除掉，且泛蛋白-蛋白酶系統所控制之蛋白分解，調控許多重要之細胞功能，於動物與酵母菌方面之研究顯示受該系統所調控之細胞功能，包括細胞分裂、DNA 修復、凋亡、轉錄調控、訊號傳遞等。因此對 Pir51 這個蛋白質開始感到好奇，當 DNA 在受到嚴重損傷的時候，Pir51 所扮演的角色，以及 Pir51 在甚麼情況下是否參與 APC^{CDC20} 的路徑，抑或是 Pir51 參與 ATR-dependent pathway，都是我們感興趣的研究方向。

第二章 研究方法

第一節 研究材料

2-1-1:細胞株

HeLa cell:人類子宮頸癌細胞。

2-1-2 BacterioMatch II Two-Hybrid System XR Plasmid cDNA

Library:

1. Amplified premade library constructed in the pTRG plasmid and harbored in XL1-Blue MRF^rkan cells
2. BacterioMatch II two-hybrid system plasmids: pBT bait plasmid and pTRG target plasmid
3. BacterioMatch II two-hybrid system control plasmids: pTRG-GAL11P control plasmid and pBT-LGF2 control plasmid
4. BacterioMatch II Screening Reporter Competent Cells
5. BacterioMatch II Validation Reporter Competent Cells
6. 14-ml BD Falcon polypropoylene round-bottom tubes 自 BD

Biosciences 購得

7. His-dropout bacteriological media:

10*M9 salts 自 Genemark 公司購得

Adenine HCl 自 Sigma 購得

His Dropout Supplement 自 BD/Clontech 購得

8. Isopropyl-1-thio-β-D-galactopyranoside(IPTG)

9. 3-amino-1,2,4-triazole(3-AT)購自 Sigma

10. Dimethyl sulfoxide(DMSO)

11. SOC 培養基 購自 GeneMark 生物科技公司

2-1-3 DNA 的定序:

由明欣生物科技公司負責定序

2-1-4 免疫沉澱(immunoprecipitation):

1. Protein G beads: 購自 GE 生物科技公司。

2-1-5 免疫染色(immunostaining):

1. Culture slides: 從 BD Falcon 購買，做免疫螢光染色法之前種細胞使用。

2. Paraformaldehyde: 購自 Sigma。

3. Triton-X 100: 購自 Sigma 生物科技公司。

4. DAPI: 購自 Sigma 生物科技公司。

5. BSA: 購自 Sigma 生物科技公司。

2-1-6 ATR , ATM , Cdc20 , Ubi-1 , Flag 抗體:

1.ATM 及 ATR:購自 Genetex 。

2.CDC20:購自 Abcam 。

3.Ubiquitin-1: 購自 Abcam 。

4. Flag antibody: 購自 Sigma 生物科技公司 。

2-1-7 細胞培養所需材料:

1.Dulbecco's Modified Eagle Medium

2.penicillin-streptomycin

3.trypsin-EDTA

4.FBS

以上 購自 Invitrogen

5.tissue culture dish

6.過濾杯

7. 5c.c pipette

8. 10c.c pipette

9. 6 well plate

10. 15c.c 管子

11. 50c.c 管子

12. 外旋式 2 ml 冷凍小管 以上購自 Corning

2-1-8 Western-blot 所需材料:

1. 電泳槽，架膠台由 Bio-Rad 購得
2. Next gel: Amresco
3. PVDF 膜: Millipore
- 4.底片: GE Healthcare Life Sciences
5. Next Gel Running buffer : 購自 Amresco
6. Methanol: 向 MERCK 購買
7. Protein assay: 購買自 Genemark
8. 24well : 購自 Corning

2-1-9 基因轉殖(Molecular Cloning):

- 1.表現載體(vector):FLAG-pCDNA3.1
- 2.嵌入子(insert):由國外的 Protech 廠商合成向 MERCK 購買。
- 3.質體(plasmid)製備:抽取質體使用 Plasmid midiprep- purification kit:購自 Genemark。
- 4.DNA 定序:由明欣生物科技公司執行。
- 5.限制酶及緩衝溶液:皆購自 TOYOBO。
- 6.接合酶及緩衝溶液:購自 New England Biolabs。

2-1-10 轉染試劑(Transfection reagent):

Arrest-In 試劑:購自 Genediscover。

2-1-11 Flowcytometry

1. Triton-X 100: 購自 Sigma 生物科技公司。
2. PI: 購自 Sigma 生物科技公司。
3. FLOW 小管: 購自 BD Falcon



第二節 研究設計

2-2-1 細胞培養(cell culture)

將人類子宮頸癌細胞株(HeLa)培養在含有 10%FBS(fetal bovine serum)和 1%P/S(penicillin-streptomycin)的 DMEM(Dulbecco modified Eagle medium)中，放置於攝氏 37 度，5% CO₂ 的培養箱中培養，每兩天以 trypsinization 方式繼代培養。

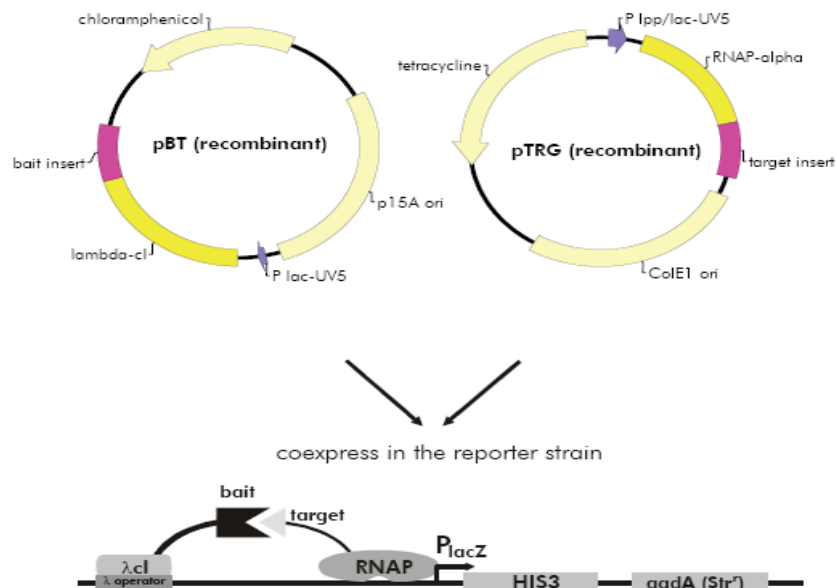
2-2-2 細胞轉染(transfection)

接種 3*10⁵ 顆/well 子宮頸癌細胞株於 6 well 培養盤，使細胞生長至隔天約 6 到 7 分滿。細胞於轉染之前更換 1mL 的新鮮的不含抗生素及胎牛血清的培養液。之後配置 transfection reagent(solution A: 2μg 的 DNA 和 50μl 不含抗生素及胎牛血清的 DMEM，solution B: 10μl 的 Arrest-In reagent 和 50μl 不含抗生素及胎牛血清的 DMEM)。將 solution A 加入 solution B 中，混合均勻後靜置 20 分鐘。然後均勻的滴在培養液中，並在 6 個小時後更換含有抗生素及胎牛血清的培養液，轉染時間為 72 小時。

2-2-3 Bacteriomatch Two-Hybrid system:

- Bait Plasmid Construction and Validation:

pBT 及 pTRG 是 BacterioMatch Two-Hybrid system 的 plasmids，被設計用來偵測蛋白質與蛋白質之間的交互作用(圖.5)。將 pBT 以及 Pir51 經過 digestion(BamHI, XhoI) 放在 37°C 的乾浴器(dry bath) 1 小時，於室溫 ligation 一小時，以及 transformation 後，隔天挑選生長的菌落以 3ml 的 LB 培養液以及 3μl 的抗生素 (chloroamphenicol)搖晃至隔夜。隔天以 Boiling lysis method(見 2-2-6)抽取質體並且以限制酶(BamHI,XhoI)放在 37°C 的 dry bath 1 小時，然後 run agarose gel 去觀察是否為想看的位置，並將此單一菌落養成 100ml 以及 100μl 的抗生素(chloroamphenicol)中，隔天再以 Midiprep kit 抽取質體(pBT-Pir51)。



(圖 5) 細菌雙雜交系統(BacterioMatch-Two Hybrid system)

的圖。Modified from STRATAGENE protocol.

- Preparation of DNA from the pTRG Plasmid HeLa- cDNA Library:

為了要知道 pBT-Pir51 與 cDNA library target plasmid DNA 是否有蛋白質與蛋白質間的交互作用，首先需要將 pTRG cDNA library 中的 DNA 藉由生長在 LB-Tetracycline 的培養皿來純化 DNA，並且使用許多相同含有 LB-Tetracycline 的培養皿(50 plates)來使 library amplification。若使用 150-mm 的 plates，每個培養皿假設塗滿 25000cfu，那麼 50 個培養皿則預期會有 1.25×10^6 cfu，而 library 本身預測會有 7.15×10^8 cfu/ml，因此每一個培養皿預計只需要加入 1.7 μ l 的 library stock 即可。將 1.7 μ l 的 library stock 混合培養基做塗盤的動作，將這 50 盤培養皿(含 tetracycline 的抗生素)放置在 30°C 的培養箱中放隔夜。隔天將這些培養皿上的菌落刮下來收集後，以 maxiprep DNA kit 抽取質體，得到的 DNA 即為 pTRG-cDNA library。

- Library Screening: pBT-Pir51 and pTRG-cDNA library

將 pBT-Pir51 and pTRG-cDNA library 以 co-transformation 的方式，各取 200ng 的量，加入 screening reporter competent cells 放置冰上 30 分鐘。之後將其放入 42°C 的 dry bath 35 秒後，迅速放置冰上 2 分鐘。

再加入 0.9ml 的 SOC 培養基後放在 37°C 的培養箱搖晃 90 分鐘後，塗在培養皿(LB-Tetracycline)上以及塗在含有篩選能力的培養皿(LB-Tetracycline-5mM 3AT)，等待隔天計算菌落的數目。記錄生長在含(LB-Tetracycline)培養皿上的菌落數。將最初生長在含(LB-Tetracycline-5mM 3AT)培養皿的菌落一一挑出來，畫在新的(LB-Tetracycline-5mM 3AT)培養皿上，放置 37°C 培養箱 16-24 小時。重複此步驟三次。此步驟在篩選能生長在含有(LB-Tetracycline-5mM 3AT)的菌落，並將這些菌落送給明欣生物科技公司做定序的動作。

2-2-4 CDC20 and Pir51 免疫沉澱-西方點墨法 (IP-Western):

做 IP 時，從 -80°C 取出 HeLa 細胞的凍管，加入 420 μ l 的 0.1% NP40+PBS 將兩管細胞混合，並放冰上 10 分鐘，此目的是為了將細胞膜打破，之後再以 13000rpm，4°C，10 分鐘去離心，此時上清液含有所要的質體，將上清液分成三管，其中一管加入 20 μ l 的上清液，並且冰到 -80°C 的冰箱，等待隔天做 Western；其餘的兩管，分別加入 200 μ l 的上清液，其中一管加入 20 μ l 的 Pir51 抗體，另外一管不加入任何抗體，做為對照組，兩管同時放置 4°C 的 shaker 兩個小時。兩個小時後，兩管同時加入 80 μ l 的 protein G beads，並放入 4°C 的冰箱搖晃一小時。之後取出來，低速離心去

除上清液之後，再用 0.1% NP40+PBS 的 lysis buffer 去清洗三次並且低速離心，沉澱物即為經過免疫沉澱方法之後我們所需的產物，兩管一同冰到-80°C 的冰箱，等待隔天做 Western。隔天將三管從冰箱取出，分別加入 loading dye 在 95°C 煮 5 分鐘。膠體置備上:配置 10%的 acrylamide gel，取出 10ml 的 next gel buffer，加入 100µl 的 Ammonium persulfate(APS)，10µl 的 TEMED。以固定 100V，2 小時來分離蛋白質。分離蛋白質後，膠體用 200mA，轉漬 3 小時至 PVDF membrane 上。取出 PVDF membrane 後，浸到含有 5%脫脂奶粉的 blocking buffer (用 PBST 溶)，室溫下搖晃 1 小時。將 PVDF membrane 從牛奶中取出，放入含有一抗的 PBST 中(1:1000)，4°C 隔夜搖晃。隔天取出 PVDF membrane，以 PBST 清洗，每搖晃 5 分鐘換新的 PBST，重複 6 次。之後取出 PVDF membrane，放入含有二抗的 PBST 中(1:7000)，室溫下搖晃 1 小時。取出 PVDF membrane，以 PBST 清洗，每搖晃 5 分鐘換新的 PBST，重複 6 次。最後使用化學冷光呈色劑與底片壓片偵測蛋白質的表現，並用 Adobe Photoshop 軟體分析量化結果。

2-2-5 CDC20 and Pir51 免疫染色法:

做免疫染色的前一天，先將細胞種在 culture slides 上，細胞

量是 10000 顆/well，每個 well 200 μ l 的培養液即可覆蓋，在含有胎牛血清以及抗生素的培養液中生長。隔天，從培養箱中取出來，將培養液倒掉，並且用 PBS 去清洗，清洗完畢後，加入 4% 的 paraformaldehyde(福馬林)固定 15 分鐘，並以 PBS 清洗三次。清洗完之後，加入 0.1% 的 Triton X-100 200 μ l/well 並放冰上，讓細胞膜的孔洞增加，使抗體容易進入，經過 20 分鐘後將 Triton X-100 倒掉，加入 5% BSA+PBS，類似 Western 中 blocking 的功能，60 分鐘後倒掉。準備一抗，取出 Pir51 以及 CDC20 的抗體各 2 μ l，以 1:100 的比例溶在 5% BSA+PBS 中，放在 4 $^{\circ}$ C 隔夜。隔天，從 4 $^{\circ}$ C 的冰箱中取出一抗，之後加入含有螢光染劑的二抗各 2 μ l，(FITC 為綠色，Rhodamine 為紅色)，也是以 1:100 的比例與 5% BSA+PBS 混合，這一步必須用鋁箔紙避光，並且放入 37 $^{\circ}$ C 的培養箱中搖晃一個小時。一個小時之後，用 PBS 清洗 6 次，每次 5 分鐘。若要觀察細胞核的狀況，則須再加入 DAPI 染劑，DAPI 以 1:50000 稀釋，並且加入之後需以鋁箔紙避光，放入 37 $^{\circ}$ C 的培養箱中靜置 15 分鐘，之後再以 PBS 清洗 6 次，每次 5 分鐘，即可完成上機前步驟，並且拿去共軛焦顯微鏡底下觀察細胞的表現。

2-2-6 分子選殖(Molecular cloning):

- 養菌:

養菌時，需要準備培養液(LB medium)以及抗生素，抗生素與培養液以 1:1000 的比例混合加入養菌小管，並將菌落(colony)加入，在 37°C 的培養箱中搖晃 12~16 小時。

- 抽取質體(plasmid)的方法: Boiling lysis method

將搖晃 12-16 小時的菌液從培養箱中取出，將菌液加入微量離心管中，以 13000rpm，1 分鐘離心，留下 pellet。

加入 DNA lysis buffer 50 μ l 均勻回溶 pellet，並放置 shaker 搖晃 5 分鐘反應。放置 95°C 的乾浴器反應 1 分鐘後，迅速放置冰上 1 分鐘，再以 13000rpm，15 分鐘，4°C 的狀況下離心，上清液中含有所需要的 plasmid。

- 限制酶的反應(Restriction Enzyme digestion)

將 Boiling 法所抽出的 DNA plasmid 以限制酶 (EcoRI, XhoI) 檢測在總體積 20 μ l, 37°C 的乾浴器進行反應 1 小時或隔夜。

DNA	2 μ g	(x μ l)
EcoRI	10 units/ μ l	1 μ l
XhoI	9 units/ μ l	1 μ l
10X buffer		2 μ l
ddH ₂ O		(16-x) μ l

- 中量的質體抽取法(midiprep extraction)

挑選單一菌株，養在 3ml LB 培養液以及 3 μ l 的抗生素中，在 37°C 的培養箱中搖晃培養 12-16 小時。之後取出 500ml 的菌液加入 500ml 的 80% glycerol 中，混合均勻放入 -80°C 保存。剩餘的菌液加入 100ml 的 LB 培養液以及 100 μ l 的抗生素中，在 37°C 的培養箱中搖晃 12-16 小時。之後使用 Plasmid midiprep purification kit (Genemark) 來抽取質體。將菌液置於 50ml 的離心管中，分兩次以 6000rpm，離心 10 分鐘，倒掉上清液，留下 pellet。加入 5ml 事先加好 RNase A 的 Resuspension Buffer，將菌重新混合均勻。加入 5ml 的 Lysis Buffer，緩和的混合數次，等待 2-4 分鐘。再加入 5ml 的 Precipitation Buffer，緩和的混合數次，使溶液均勻的混合後，以 8000rpm，離心 10 分鐘。吸取離心過後的上清液至新的 50ml 離心管，並加入 10ml 的 ethanol，混合後放入 -20°C 的冰箱 30 分鐘以增加 DNA 沉澱的效率。取出後以 8000rpm，4°C 離心 10 分鐘，此時會看到 DNA 的 pellet 附著在管壁上。小心去除上清液，並加入 500 μ l 的 binding solution 去回溶管壁上的 DNA。將含 DNA 的 solution 加入 Midi-Spin column，等待 1 分鐘後，以高速轉速離心 2 分鐘。將 Collection tube 內的廢液倒掉之後，再加入 500 μ l 的 Binding Solution，等待 2 分鐘後，以高速轉速離心 2 分鐘後將廢液

倒掉。加入 650 μ l 的 Endotoxin Removal Wash Solution(須先加入 isopropanol)，等待 2 分鐘後以高速離心 2 分鐘後將廢液倒掉，並且重複此步驟兩次。加入 600 μ l 的 Washing solution 並且以高速離心 2 分鐘後將廢液倒掉，重複此步驟兩次。再以最高轉速離心 midi-spin column 5 分鐘，使殘留在膜上的 ethanol 去除掉。將 midi-spin column 放置 60°C 的乾浴器 10 分鐘，去除多餘的酒精。將 midi-spin column 放置於新的離心管中，此時再加入事先預熱於 60°C 的 Elution Solution 150 μ l 至 midi-spin column，等待 3 分鐘，以最高轉速離心 2 分鐘，離心管中的溶液即為所要的 DNA plasmid。

- 瓊脂醣凝膠純化 DNA 片段(gel extraction)

用 midiprep 抽取完質體之後，以限制酶(EcoRI,XhoI)在總體積 100 μ l, 37°C 反應 1 小時至隔夜。

DNA	10 μ g	(x μ l)
EcoRI	10units/ μ l	5 μ l
XhoI	5units/ μ l	5 μ l
10X buffer		10 μ l
ddH ₂ O		(80-x) μ l

經過 1 小時放置於 37°C 乾浴器中 digestion 之後，將溶液加入 6X

的 loading dye 下去進行 1% agarose gel 電泳。經過限制酶作用過的 DNA 產物，在 1% agarose gel 中會依片段大小游動分離，再使用 DNA Clean/Extraction Kit (GeneMark)來純化本研究所需要的 DNA 片段。將 agarose gel 放置在紫外光照射台上，刀片經過酒精滅菌過火之後，將所需要的 DNA 片段 (5.4Kb)切下來，放置於 1.7ml 的微量離心管中。加入 500 μ l 的 Binding Solution，混合均勻後放在 60°C 反應 10-15 分鐘，直到膠體全部溶解為止。將 Spin column 放入 Collection tube 中，把 DNA solution 加入 Spin column 內，以 13000rpm 離心 1 分鐘後，移除在 Collection tube 中的液體。再加入 500 μ l 的 Binding Solution，以 13000rpm 離心 1 分鐘後，移除在 Collection tube 中的液體。之後加入 700 μ l 的 Washing Solution，混合均勻後，在室溫下以最高轉速離心 1 分鐘，並重複此步驟 1 次。再以最高速離心 3-5 分鐘以移除 Spin column 中殘留的 ethanol。將 Spin column 移至新的微量離心管中，加入 50 μ l 的 Elution solution(預熱於 60°C 的乾浴器)，等待 2 分鐘後，以最高速離心 1 分鐘，elute 出我們所要的 DNA 產物。將產物重新加入 Spin column，等待兩分鐘後，再以最高轉速離心 1 分鐘，可得到濃度更好的 DNA 產物。

- 接合反應(Ligation)

將載體與欲接合的 insert DNA 以莫耳數比 1 :10 的比例混合，並加入 10X 的 ligation buffer，以及 T4 DNA ligase，若有需要再以無菌水補足體積，在室溫中反應 1 小時。

- 轉形反應(Transformation)

從-80°C 的冰箱中取出勝任細胞(competent cell)，放置在冰上等待溶解。加入接合反應後的產物，將產物與勝任細胞混合均勻，放置於冰上 5 分鐘。之後放在 42°C 的乾浴器中短暫刺激 90 秒(heat-shock)，再立刻放置冰上 5 分鐘。之後在無菌操作台內加入 400µl 的 LB 培養液，置於 37°C 的培養箱中以 250rpm 搖晃 1 小時。搖晃 1 小時後，將 250µl 的菌液取出，塗在含有 50mg/ml ampicillin 的培養皿上，將培養皿放入 37°C 的培養箱中生長 12-16 小時，隔天觀察是否有菌落的產生。菌落出現後，便再挑選出來進行培養，以 miniprep 抽取質體之後，再以限制酶確定是否為含有 insert 的質體 DNA。一切無誤之後，再將此單一菌落交由明欣生物科技公司進行 DNA 序列的判讀。

2-2-7: 抽取 siPir51 及控制組的 RNA(RNA extraction)

抽取 RNA 的前一天，先將細胞種在 6 well 的培養盤中，每個 well 的細胞數為 3×10^5 細胞量。

隔天，轉染 siPir51 到細胞中，兩天後與控制組一起收集。

抽取 RNA 必須非常小心謹慎，因為 RNA 極為容易降解。先噴灑 RNase free 在所要抽取 RNA 的環境。加入 1mL 的 TRIZOL 至離心管中的細胞，放置室溫 5 分鐘，再加入 0.2mL 的氯仿 (chloroform)，上下搖晃約 15 秒並且放置室溫 2-3 分鐘。以 12000rpm、 4°C 的狀況下離心 15 分鐘。離心後，小心的吸取上層 RNA 至新的微量離心管。加入 0.5mL 的異丙醇 (isopropanol)，放置冰上 10 分鐘反應。再以 12000rpm、 4°C 的狀況下離心 10 分鐘，會看到 RNA 的沉澱物附著在管壁上。將上清液抽掉，並以 75% 的乙醇清洗一次後，抽掉上清液，並且以陰乾的方法蒸發多餘的酒精，再以 50 μl 含 DEPC 的水回溶。

2-2-8: 流式細胞儀偵測 flag-Pir51、siPir51 與控制組的細胞週期

做 Flowcytometry 的前一天，先將細胞種殖在 6 well 的培養基上，每個 well 的細胞數為 3×10^5 細胞量。

隔天將 well 從培養箱取出，並且轉染 Flag-Pir51 以及 siPir51 兩天。

兩天後從培養箱取出以回溫過的 PBS 清洗，每個 well 再加入 trypsin 300 μ l，待細胞變圓之後，以 3ml 的 medium 稀釋並加入 15ml 的離心管，低速離心 5 分鐘，抽掉上清液，再以 5ml 冰冷的 PBS 清洗細胞 3 次。加入 0.2ml 的冰冷 PBS 均勻的打散細胞，一邊震盪混合細胞懸浮液，同時一滴一滴的加入 3ml 預冷的 70% 酒精以固定細胞，靜置在 -20 $^{\circ}$ C 冰箱中至少一小時(酒精固定後樣品可靜置過夜)。

隔天將細胞從 -20 $^{\circ}$ C 冰箱取出，低速離心 5 分鐘，吸除上清液，再加入含有 1%FBS 的 PBS 來清洗細胞，並抽掉上清液。加入 1.0ml PI/Triton X-100 染色液，將細胞團塊均勻的打散，並均勻混合，在室溫下避光作用 30 分鐘後上機。

2-2-9：探索 Pir51 會與 CDC20 的交互作用區域(interacting domain)

在研究 CDC20 的功能性區域(functional domain)之後，依照所想研究的 CDC20 不同片段，(1500bp、500bp、400bp、以及 WD-40 repeats)，5' 及 3' 端分別由 EcoRI 以及 XhoI 包夾來設計引子(primer)。

將引子搭配 CDC20 模板(template)，聚合酶(polymerase)以及 dNTP 去做 PCR。

將 PCR 的產物分別進行 DNA 瓊脂糖凝膠(agarose gel)，二十分鐘後置於紫外燈箱中觀察。將所觀察到的 PCR 產物分別用乾淨的刀片切下來，放入 eppendorf tube 內，準備進行 DNA 回收的純化。

以 DNA gel extraction kit 將切下來的膠純化之後，接著將這些 DNA 產物連接到 TA cloning kit 中的載體，再做轉形(transformation)實驗，之後塗在培養皿上。

隔天，將培養皿取出，將菌落(colonies)挑出並且以小量(3ml)的 LB 培養。

經過 12~18 小時的培養之後，隔天將菌液以 boiling 的方法抽取質體(plasmid)，並且以 EcoRI 以及 XhoI 兩個限制酶(restriction enzyme)做 digestion 來確定是否有接入本研究所需要的插入子(insert)長度。

確定插入子有接入 TA cloning kit 所附的載體之後，再將插入子以乾淨的刀子切下來，並且重新做 DNA 的純化，最終目標是將插入子接入我們所需要的載體: flag-pcdna3。使用 flag-pcdna3 這個載體的原因是為了讓插入子在經由轉染的過程中讓細胞大量表現。

將不同片段的 flag-CDC20 經由轉染到細胞之後，一方面做西方點墨法，使用 anti-flag antibody 來確定 flag 有表現的功能；另

一方面，為了探索 Pir51 會與何段 flag-CDC20 有交互作用，因此我們以免疫沉澱-西方點墨法(IP-Western) 來探討，免疫沉澱法(IP) 時添加 Pir51 抗體，而西方點墨法以 anti-flag antibody 來觀察，若 Pir51 與某段 flag-CDC20 有交互作用，便可偵測到訊號。

2-2-10: Pir51 是否經由 APC^{CDC20} 的路徑被泛蛋白化

探討 Pir51 是否會經由 APC^{CDC20} 的路徑被泛蛋白化，首先，先轉染 flag-CDC20 以及 siCDC20 到細胞中。將轉染過的細胞收下來，並且以免疫沉澱-西方點墨法來觀察。

為了探討 Pir51 是否被泛蛋白化，因此，免疫沉澱法添加 Pir51 抗體，西方點墨法以 anti-ubiquitin antibody 來觀察正常細胞、轉染 flag-CDC20 的細胞、轉染 siCDC20 的細胞。另一方面，為了確定 Pir51 是被泛蛋白化，本研究並加入 MG132 這個蛋白酶體抑制劑(proteasome inhibitor)當對照組來確定。

2-2-11: Pir51 是否參與 ATR-dependent pathway

本研究以免疫螢光染色法來觀察 Pir51 是否參與 ATR-dependent pathway。做免疫螢光染色前，須先將細胞種在從

BD Falcon 購買的 culture slides 上，每格 well 種 7500 顆細胞。為了觀察 Pir51 是否參與 ATR pathway，種完細胞的隔天，細胞皆添加 bleomycin 20 μ g/ml，由於細胞添加 bleomycin 會使得 DNA 雙股螺旋斷裂導致 DNA 損壞，在實驗的時候將細胞以 bleomycin 處理兩小時後，以乾淨的培養液重新培養兩小時、十八小時、以及二十四小時。隔天，將 culture slides 從培養箱中取出，並且做免疫螢光染色上機前的前置步驟。之後，於免疫螢光染色的機器中觀察 Pir51 與 ATR 在加入 bleomycin 之後的表現情形。



第三章 研究結果

1. 找到與 Pir51 有交互作用的蛋白質

篩選	菌落數
生長在沒有 3-AT 培養皿上	57371
最初生長在低濃度 3-AT 培養皿上	345
最終生長在高濃度 3-AT 培養皿上	124

圖 6 用細菌雙雜交系統篩選的結果。將 pBT-Pir51 與 pTRG-cDNA library co-transformation，生長在含(LB-Tetracycline-5mM 3AT)的培養皿上，經過三次重複生長在(LB-Tetracycline-5mM 3AT)的培養皿上，從最初的 345 個菌落到最後確定共有 124 個菌落(圖 6，表 1)，並將這些菌落交由明欣生物科技公司進行定序，之後在 NCBI 上以 BLAST 搜尋此 124 個與 Pir51 有交互作用的基因，發現這 124 個基因可分類成 5 種不同的機制，分別是：細胞骨架(cytoskeleton)、轉錄因子(transcription factors)、酵素(enzyme)、細胞凋亡路徑(apoptosis pathway)，以及細胞週期(cell cycle)(表 2)。

2. 確定 Pir51 與 CDC20 有蛋白質間的交互作用

經過搜尋 124 種與 Pir51 有交互作用的基因之後，由於 CDC20 主要存在於細胞週期 M 期，且調控細胞表現的關聯性與 Pir51 最相近，因此選擇 CDC20 做為主題。為了確定 CDC20 與 Pir51 有蛋白質與蛋白質間的交互作用，首先使用免疫共沉澱-西方點墨法確定 CDC20 與 Pir51 是否真的有交互作用 (圖 7)。

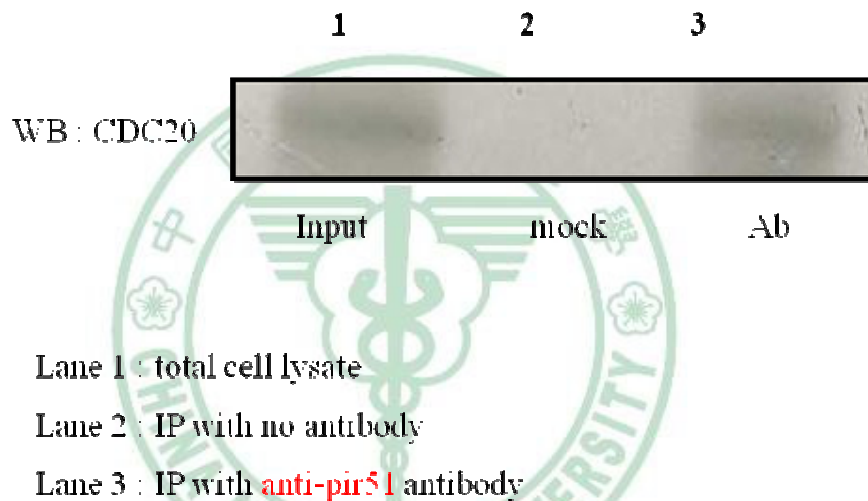


圖 7 以免疫沉澱-西方點墨法來確定 Pir51 與 CDC20 有交互作用。Lane1 : HeLa 細胞的總蛋白(total protein)，Lane2 : 做免疫沉澱時不添加 Pir51 抗體。Lane3 : 做免疫沉澱時加入 Pir51 抗體。西方點墨法時以 CDC20 抗體來認，確定 Pir51 與 CDC20 有交互作用。

3. 以免疫染色法確定 CDC20 與 Pir51 之間有交互作用。

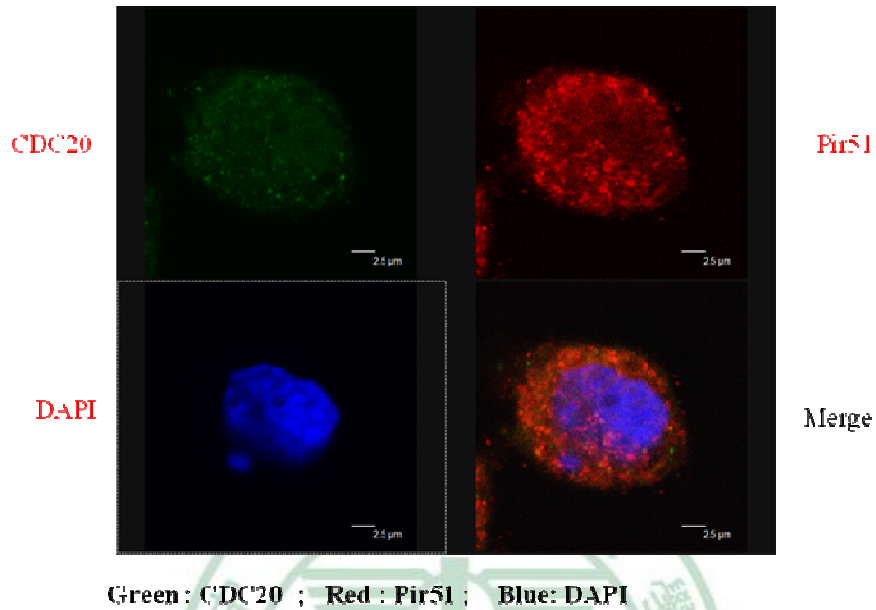
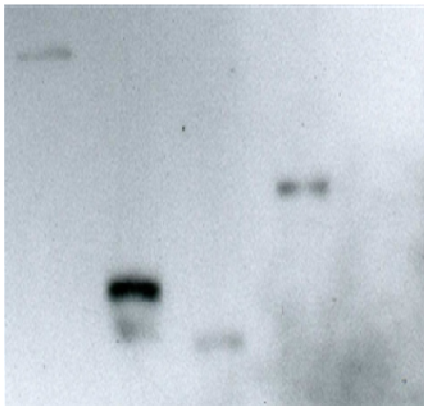


圖 8 CDC20 以及 Pir51 在免疫螢光顯微鏡下的分布情形。綠色螢光是 CDC20，紅色螢光是 Pir51，藍色是 DAPI，可染細胞核，而右下角是聚集(merged)的結果。

4. CDC20 與 Pir51 有交互作用的區域(CDC20 interacting domain)

在使用 BacterioMatch-two hybrid 這個系統發現 CDC20 與 Pir51 有交互作用之後，經過 NCBI 的 BLAST 搜尋，發現 CDC20 會與 Pir51 有交互作用。為了進一步知道 CDC20 與 Pir51 彼此交互作用的關係，我們從 CDC20 之 5'端開始，設計了長度 400 個鹼基對以及 500 個鹼基對的 DNA，以及 CDC20 的 WD-40 repeats 的部分，另外也設計一段 CDC20 的全長(1.5Kb)，總共四段，來探討 Pir51 與不同 region 之 CDC20 之間的功能性。由圖 9a 來看，是四條不同長度的 Flag-CDC20 的 total cell lysate，用來確定每段 Flag-CDC20 皆會表現，由左而右分別是 CDC20 的全長 1500bp、500bp、400bp、WD-40 repeats 共四段。由圖 9b 來看，可以得到一個結論，Pir51 只會與 CDC20 的全長有交互作用。

Input : total protein
WB: flag-antibody



IP:pir51
WB: flag-antibody

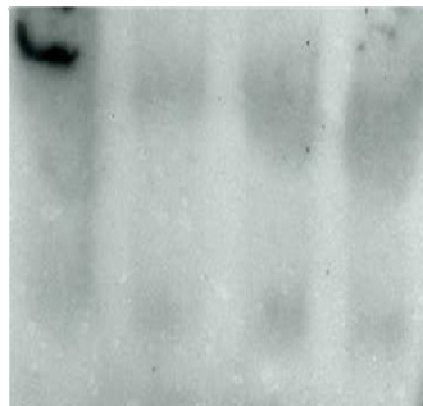
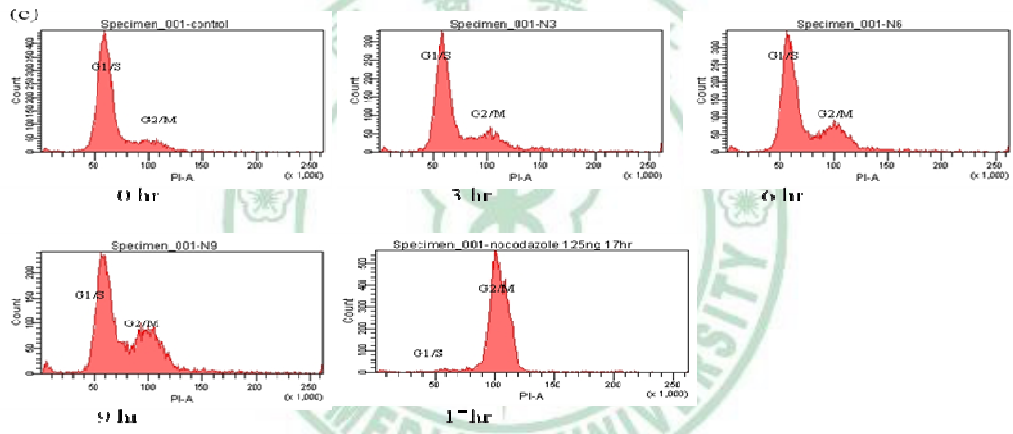
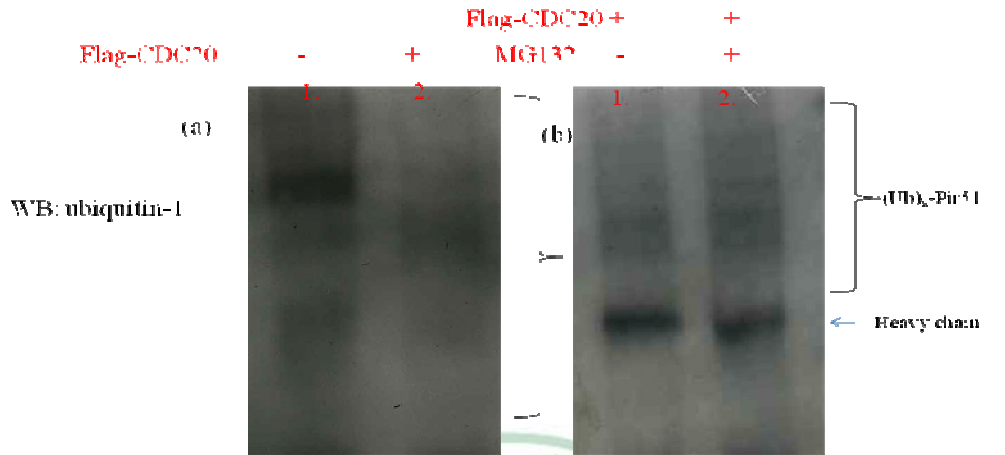


圖 9 探討 CDC20 會與 Pir51 有交互作用的區域。(a)由左至右分別是四段不同長度 CDC20 的 total protein，分別是 CDC20 全長 1500bp、從 CDC20 的 N 端 500bp、CDC20 的 N 端 400bp、CDC20 的 WD-40 repeats 995bp，以證明 Flag-CDC20 有表現。(b) 由左至右分別是 (圖 9a)中的四個不同長度的 Flag-CDC20，IP 加入 Pir51，Western 以 Flag-antibody 來偵測，發現 Pir51 會與 Flag-CDC20 的全長有交互作用。



5. Pir51 會經由 APC^{CDC20} 而被泛蛋白化。



(d)

- MVRPVRHKKPVNYSQFDHSDSDDDDFV'SATVPLNKKSRTPAKELKQDKPK
 PNLNNLRKEEIPV'QEKTPKKRLPEGTFSPASAVPCTKMALDDKLYQRDLE
 VALALSVKELPTVTTNVQNSQDKSIEKHGSSKIETMINKSPHISNC'SVASYL
 DLLKITV'EDDV'GGV'QGKRKAASKAAAQQRKILLEGSDGDSANDTEPDFAP
 GEDSEDDSDFC'ESEDNDEDFSMRKS'KYKEIKKKEV'K'KSPVEKKEKSKSKC'
 NALVTSVDSAPA'AVKSESQS'LPKKV'SLSSDTTRKPLEIRSPSAESKKPKWVPPAA
 SGGSRSSSSPLV'V'V'KSPNQSLRLGLSRLARV'KPLHPNATST

D(Destruction) box: RXXL

D box and KEN box are required for efficient ubiquitination by APC^C.

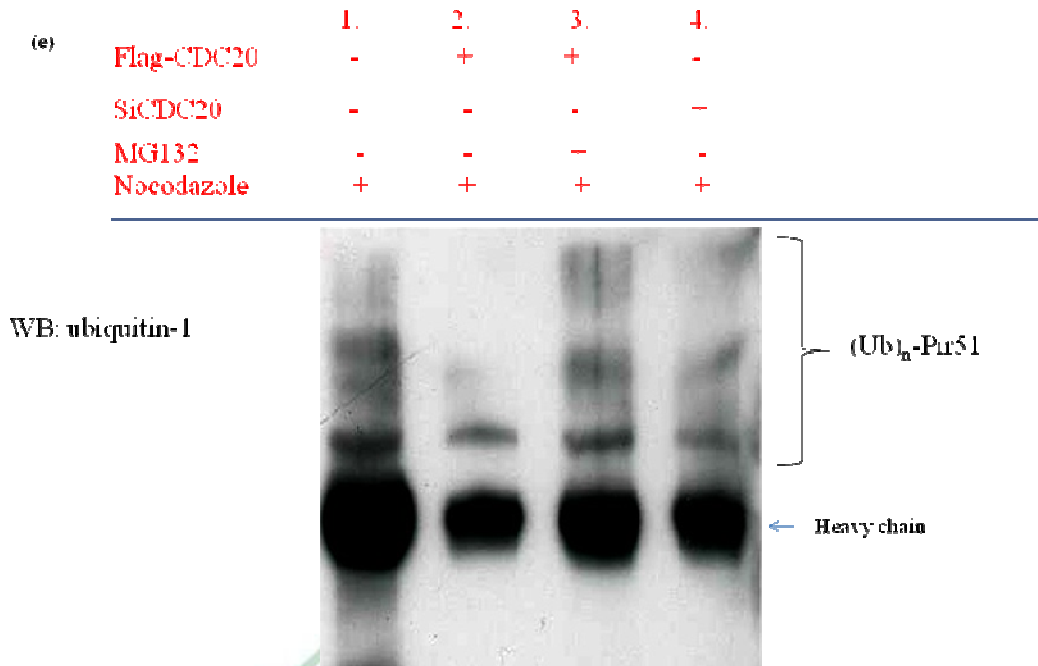
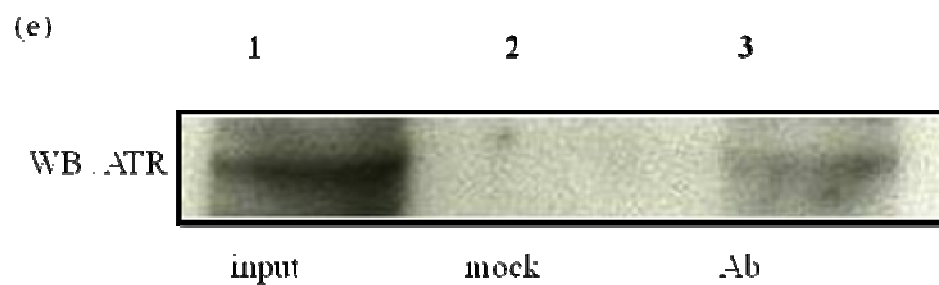
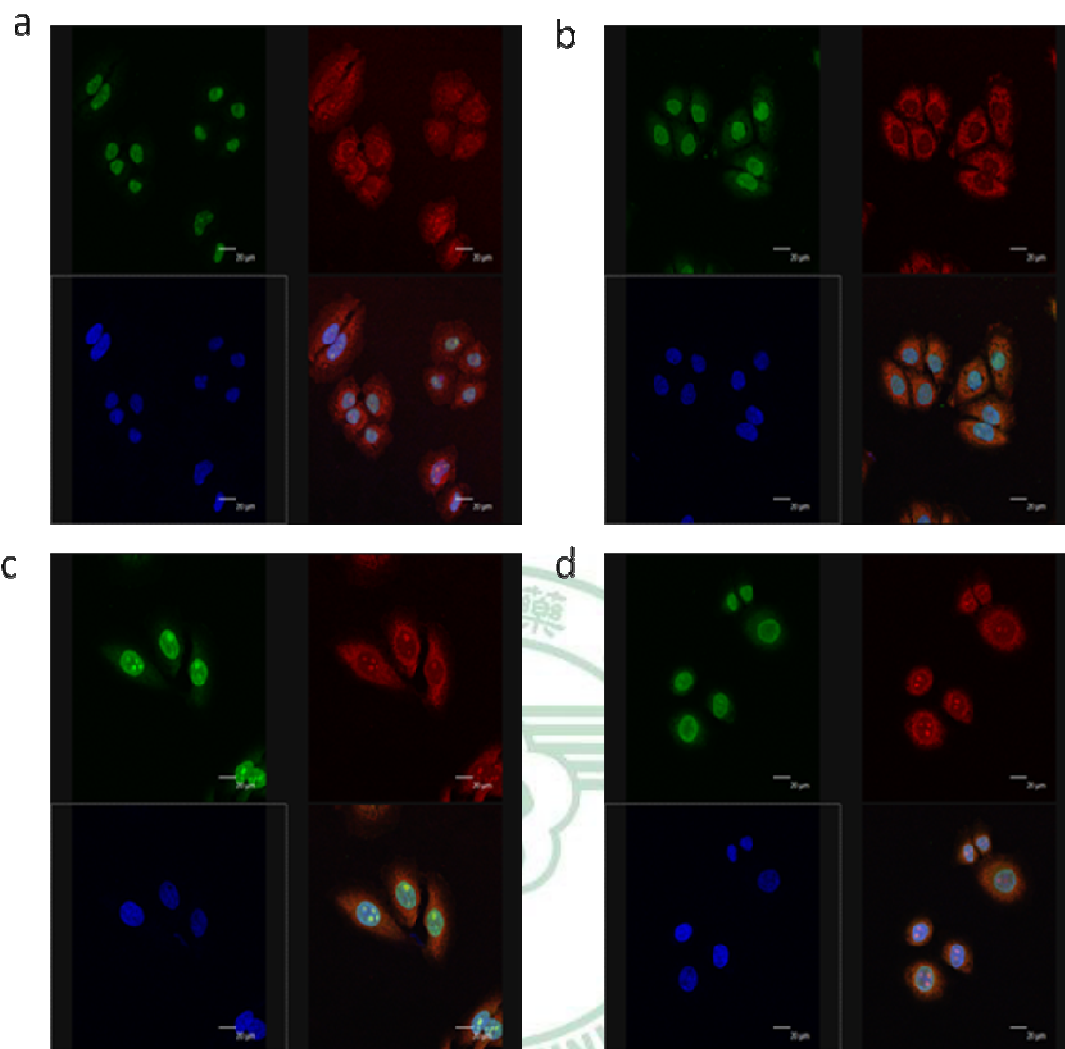


圖 10 Pir51 會經由 APC^{CDC20} 而被泛蛋白化。(a)左邊是 HeLa 細胞，右邊是有轉染 Flag-CDC20 的細胞，以 ubi-1 抗體來觀察 Pir51 細胞被 ubiquitination 的情形。(b)左邊及右邊皆有轉染 Flag-CDC20 的細胞，右邊另外添加了 MG132，MG132 是 proteasome 的抑制劑。(c)以 nocodazole 處理細胞 17 小時後，可以發現細胞週期停在 M 期。(d) Pir51 的序列。(e)以 Ubi-1 抗體來觀察 Pir51 在不同條件下表現的情形，由左而右分別是:HeLa 細胞、轉染 Flag-CDC20 的細胞、轉染 Flag-CDC20 的細胞並且加入 MG132 處理、轉染 siCDC20 的細胞。

6. DNA 在受損的狀況下 Pir51 與 ATR 之間的關係

ATR 被發現是 Rad51 的其中一個蛋白複合體，而 Pir51 也被發現是 Rad51 的其中一個蛋白複合體，且型態非常相近，因此也要探討 Pir51 與 ATR 之間的關係。

DNA 在斷裂的時候，ATM 與 ATR 會立即出現在 DNA 受損的位置，而展開一連串的修補機制。由於 Pir51 與 Rad51 有非常相近的功能，且 Rad51 在 DNA 受損後，細胞進行同源重組中扮演著重要的修補蛋白質的機制；又因為 Pir51 在同源重組中也扮演著重要的角色，因此預期 DNA 在受損之後，ATM 與 ATR 的表現會大量提升，而 Pir51 有參與修補的路徑，因此表現量預期會增加。我們做免疫染色的方法，在加入 Bleomycin(可使 DNA strand 斷裂)使 DNA 受損的前後，觀察 ATM,ATR 與 Pir51 的表現。



Lane 1 : input
 Lane 2 : IP with no antibody
 Lane 3 : IP with anti-pir51 antibody

圖 11 Pir51 與 ATR 在加入 bleomycin 之後在免疫螢光顯微鏡下的情形。綠色是 ATR，紅色是 Pir51，藍色是 DAPI。(a) 為 Pir51 與 ATR 在細胞內的分布情形。ATR 主要分布在細胞核，Pir51 則分布在細胞核及細胞質。(b) Pir51 與 ATR 在加入 bleomycin 兩小時之後，重新換培養液模擬細胞修復放置 2 小時後在免疫螢光顯微鏡下的情形。(c) Pir51 與 ATR 在加入 bleomycin 兩小時之後，重新換培養液模擬細胞修復 18 小時後在免疫螢光顯微鏡下的情形。(d) Pir51 與 ATR 在加入 bleomycin 兩小時之後，重新換培養液模擬細胞修復 24 小時後在免疫螢光顯微鏡下的情形。(e) 以免疫沉澱-西方點墨法確定 Pir51 與 ATR 之間有交互作用。Lane1：HeLa 細胞的總蛋白(total protein)，Lane2：做免疫沉澱時不添加 Pir51 抗體。Lane3：做免疫沉澱時加入 Pir51 抗體。西方點墨法時以 ATR 抗體來認，確定 Pir51 與 ATR 有交互作用。

7. Pir51 微陣列(Pir51 microarray)

將子宮頸癌細胞(HeLa cell)與將細胞經過轉染後抑制 Pir51 表現的 siRNA 細胞，做 Western blot 確定抑制效果比較好的 siPir51 細胞 (圖 12)。抽取子宮頸癌細胞以及 siPir51 的 RNA，一同交由 Genetech 生物科技公司進行 array data 的分析。由 data 分析的結果，發現 Pir51 與免疫反應有密切的關係。

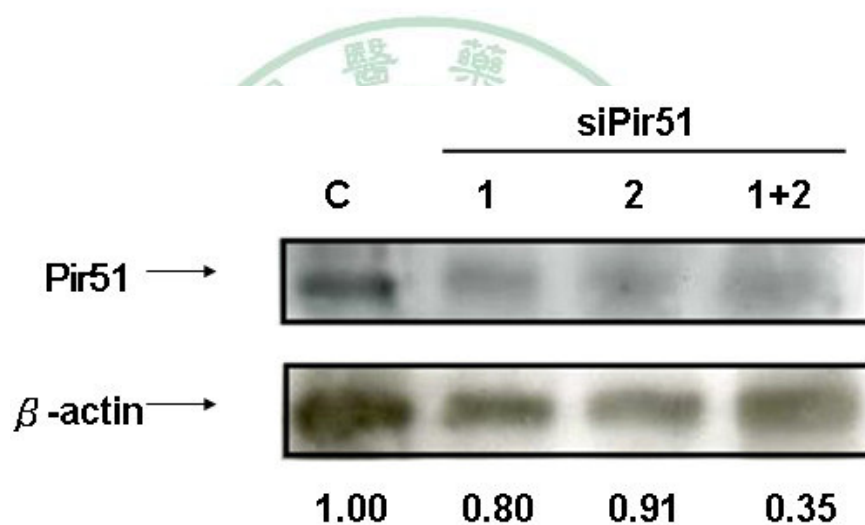


圖 12 觀察 Pir51 被抑制的程度。同時轉染 1 以及 2 的 siRNA 可較明顯降低 Pir51 的表現量。

8. 將 siRNA 以及 HeLa 細胞送至 Genetech 公司做 array 的結果(表 3)。

在確定 Pir51 有被抑制的效果之後，將 HeLa 以及 siPir51 的 RNA 交由 Genetech 公司做 array 分析。

9. Metacore 分析人類全基因表現晶片相關路徑結果

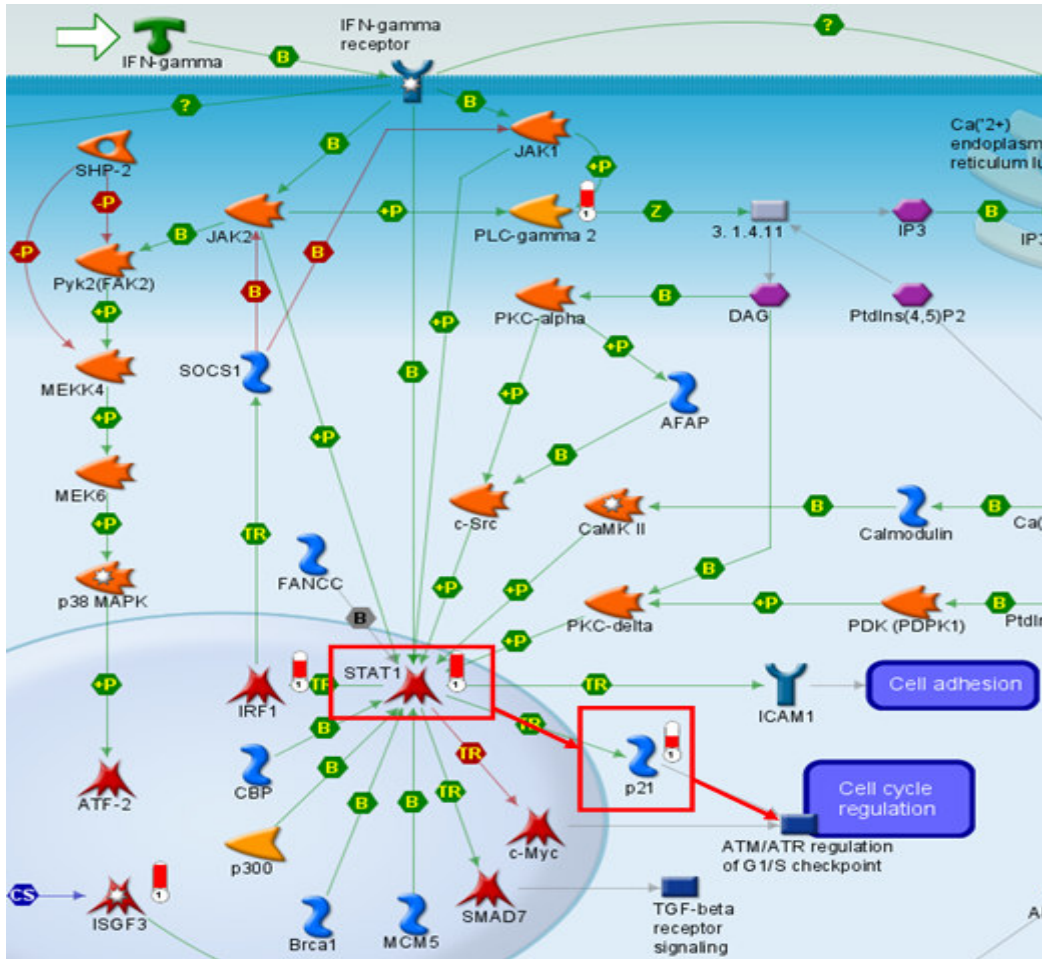


圖 13 MetaCore 分析人類全基因表現晶片相關路徑結果。由此軟體分析晶片結果後，可以觀察到將 Pir51 knockdown 後會影響與細胞週期調節相關的基因。

第四章 討論

本論文以細菌雙雜交系統來篩選與 Pir51 有交互作用的蛋白質，從結果顯示，經過高濃度的 3-AT 篩選菌落之後，最終發現有 124 個菌落與 Pir51 有正相關 (圖 6，表 1)，將這 124 個菌落分別進行定序 (sequencing) 以及在 NCBI 上做 BLAST 搜尋之後，發現這 124 個基因可分類成 5 種不同的機制，分別是：細胞骨架(cytoskeleton)、轉錄因子(transcription factors)、酵素(enzyme)、細胞凋亡路徑(apoptosis pathway)，以及細胞週期(cell cycle)(表 2)。

由於 Pir51 可受細胞週期的調控，並且在近年來，在許多癌症細胞中會有高度表現，舉凡肝癌細胞，急性骨髓白血病，以及具侵襲性的淋巴瘤，Pir51 都會大量表現。Pir51 會受細胞週期的調控，且在 M 期中也會出現。因此，選擇 CDC20 來探討 Pir51 與 CDC20 在生物體內扮演的角色，我們認為是值得探討的。

為了確定當初從細菌雙雜交系統選出的 CDC20 菌落與 Pir51 會有正相關的關係，我們利用免疫沉澱-西方點墨法以及免疫螢光顯微鏡來證實 Pir51 與 CDC20 之間的關係。從結果顯示，由免疫沉澱-西方點墨法可確定 Pir51 與 CDC20 有交互作用(圖 7)；在免疫螢光顯微鏡底下，可看到 Pir51 與 CDC20 分布在相同的位置，即有共位 (colocalization) 的現象(圖 8)。

從圖 7 及圖 8 確定 Pir51 與 CDC20 有交互作用之後，接著想知道 CDC20 會與 Pir51 交互作用的區域(interacting domain)，因此，我們設計了四段不同長度的 CDC20，分別是 CDC20 全長 1500bp、從 N 端算起 500bp、從 N 端算起 400bp、以及 CDC20 的 WD-40 repeats 區域。

為了讓這四段不同長度的 CDC20 能夠大量表現，將這四段不同長度的 CDC20 分別連接到含有 flag 的 pcDNA3 載體，以便在進行轉染實驗的時候大量表現。為了確定不同長度的 flag-CDC20 能夠表現，首先轉染四段不同的 flag-CDC20 片段到 HeLa 細胞中，並且以西方點墨法來確定這四段 flag-CDC20 的蛋白質(total protein)可以表現(圖 9a)。確定 flag-CDC20 可以表現之後，再以免疫沉澱-西方點墨法來看不同片段的 flag-CDC20 是否會與 Pir51 有交互作用，由結果來看，Pir51 僅會與 flag-CDC20 的全長有交互作用(圖 9b)。由此推判 Pir51 與 CDC20 的二級結構必須在很完整的情況下，兩者才會有緊密的關聯性，任何片段的 CDC20，其結構皆不能與 Pir51 之間有交互作用。

由於 CDC20 可活化後期組成複合體(anaphase promoting complex；APC)，而 APC^{CDC20} 會去標靶(target) securin 使得結構損壞，並且使得 separase 活化，進而使得 cohesin 被分離，這是細胞週期 M 期中，從中期變成晚期的過程。

在中期變成晚期的過程之中，許多細胞週期素(cyclins)以及細胞週期調節者(regulators)會被泛蛋白所標靶而導致降解，這個過程稱為泛蛋白化。Pir51以及CDC20都是細胞週期的調節者，探討兩者在細胞週期的M期扮演的腳色，變得很重要。被泛蛋白化的蛋白質，最終會被送至巨大的蛋白酶體所辨識並且摧毀。

本研究將細胞轉染可大量表現的flag-CDC20來觀察Pir51被泛蛋白化的現象。由結果顯示，Pir51細胞可被大量表現的flag-CDC20泛蛋白化(圖10a)。MG132的使用，可以抑制蛋白酶體將被泛蛋白化的蛋白質分解掉，由結果顯示，細胞轉染過Flag-CDC20，在加入MG132後，可有效的抑制細胞被泛蛋白化(圖10b)。

大部分APC/C的受質，會含有一個或者兩者皆有的元素，一個是destruction box (D box) (Zachariae, 2004)，另一個是KEN box (Pfleger and Kirschner, 2000)，含有這兩個元素的蛋白質，很容易經由APC/C的路徑被泛蛋白化(Qi and Yu, 2007)。經由搜尋了Pir51蛋白質的序列，發現Pir51含有三個Destruction box (圖10c)，因此推論Pir51會經由APC^{CDC20} 的途徑被泛蛋白化。

CDC20在細胞週期的M期中扮演著不可或缺腳色，為了讓細胞同時停止在M期，將細胞以Nocodazole來處理；Nocodazole可隨著處理時間的長短最終將細胞週期停滯在M期中的中期(圖10d)。

細胞以Nocodazole處理停留在M期後，做西方點墨法實驗，以Ubiquitin-1抗體觀察APC^{CDC20}與Pir51在M期中表現的情形，由結果可知，當細胞轉染Flag-CDC20之後，會比正常細胞(HeLa)容易使Pir51被泛蛋白化，而細胞轉染Flag-CDC20之後再加入蛋白酶體抑制劑MG132處理六小時之後，與沒有添加MG132處理過的相比，可發現Pir51並不會被泛蛋白化；另一方面，若將CDC20降解掉，亦不會使Pir51被泛蛋白化(圖10e)。

本研究已經證明 CDC20 是 Pir51 蛋白質複合體的其中一個蛋白質，且經過實驗證明 Pir51 會被 APC^{CDC20} 所標定而被泛蛋白化。

Pir51 已知與同源性重組的修補有關連性，且在許多癌細胞中會高度表現；而 ATR 蛋白質不但在 DNA 受損時會立即活化，還會活化下游的修補蛋白質，這些修補蛋白複合體會促使細胞做一些立即性的反應，像是使細胞週期停止，或是使細胞走向死亡。探討 Pir51 與 ATR 在 DNA 受損的情況下的表現，也是個有趣的課題。

要研究 Pir51 與 ATR 是否在 DNA 受損時候有任何表現之前，本研究也是先以免疫沉澱-西方點墨法以及免疫螢光染色法來證明 Pir51 與 ATR 之間是有關聯性的。從免疫沉澱-西方點墨法來看，Pir51 與 ATR 確實有交互作用(圖 11e)。在免疫螢光染色法實驗中，可看到 ATR 均勻分布在細胞核內，屬於核蛋白；而 Pir51 則均勻分布於細胞核以

及細胞質中，由結果來看，Pir51 以及 ATR 有共位(colocalization)的現象，因此亦可證明 Pir51 與 ATR 之間有關聯性(圖 11a)。

ATR 在 DNA 受損時，可迅速活化至受損的部位，並引發一連串的修復反應。經由添加 bleomycin 這個抗生素，bleomycin 可誘發 DNA 雙股螺旋斷裂，因此可模擬 DNA 受損的狀況。將細胞以 bleomycin 處理兩小時後，再重新加入培養液兩小時、十八小時、以及二十四小時的修復時間。會選擇這些時間的原因，在於 ATR 在 DNA 受損之後，可迅速活化，而 Pir51 大約要十二小時之後，才會開始進入細胞做修復的動作，因此才會挑選修復時間兩小時、十八小時、以及二十四小時來觀察 ATR 與 Pir51 在 DNA 受損時候的互動情形。細胞以 bleomycin 處理兩小時之後，再以新的培養液處理兩小時，可看到 ATR 在細胞的核內有一點一點的亮點(foci)，這些正是因為 DNA 雙股螺旋斷裂，而 ATR 立即活化並聚集至 DNA 受損處的原因。此時的 Pir51 與控制組相比還尚未有明顯變化 (圖 11b)。細胞以 bleomycin 處理兩小時，再以培養液處理十八小時之後，可看到 ATR 在細胞核內很聚集，並且產生明亮的亮點，此時的 Pir51 開始大量表現，並且出現在 ATR 所聚集的位置，有共位的現象(圖 11c)。細胞以 bleomycin 處理兩小時，再以培養液處理二十四小時之後，可看到 ATR 的表現已趨於平緩，並沒有像圖 11b 以及圖 11c 這麼明顯的亮點聚集在 DNA 受

損的位置。此時的 Pir51 與圖 11c 相比，有更明顯的聚集在 DNA 受損的位置(圖 11d)。

由免疫螢光顯微鏡(immunostaining)來觀察 Pir51 與 ATR 在加入 bleomycin 處理之後的表現，由結果得知，DNA 在受損的時候，ATR 可立即活化並且聚集至受損處表現，十八小時之後，活性便會慢慢降低。Pir51 在 DNA 受損的初期，並沒有明顯的反應，在修復十八小時的時候，活性已經開始增加並且表現，在修復二十四小時之後，Pir51 的表現量越來越強，聚集在 DNA 受損的位置。因此推論 Pir51 有參與 ATR-dependent pathway，並且在 DNA 修補方面佔有重要的腳色。

Pir51 不僅參與 ATR-dependent pathway，在 DNA 修補機制中扮演著重要的腳色。另一方面，本研究也發現 Pir51 會經由 APC^{CDC20} 的路徑被泛蛋白化。APC^{CDC20} 具有泛蛋白化的功能，可將一些用不到或摺疊錯誤或是有害的蛋白質清除掉，且泛蛋白-蛋白酶體系統所控制之蛋白分解，調控許多重要之細胞功能。因此，有關於 Pir51、ATR、以及 CDC20 在生物體內的角色及關聯性，是一個好的研究方向。

另一方面，本研究將子宮頸癌細胞(HeLa cell)與將細胞經過轉染後抑制 Pir51 表現的 siRNA 細胞，做 Western blot 確定抑制效果比較好的 siPir51 細胞(圖 12)，之後抽取子宮頸癌細胞以及 siPir51 的 RNA，一同交由 Genetech 生物科技公司做 array data 的分析(表 3)。

分析的結果，發現 Pir51 與免疫反應有密切的關係，並且由 Metacore 軟體可得知 Pir51 的增減會影響細胞週期路徑的調控(圖 13)。

Pir51 已知高度表現在一些癌細胞中，像是肝癌細胞，急性骨髓白血病，以及具侵襲性的淋巴瘤，都是 Pir51 會大量表現的地方。關於 Pir51、CDC20 以及 ATR 在這些癌細胞中所扮演的腳色，以及在細胞週期中的影響，將是本研究未來研究的重點。



第五章 結論

本論文主要在探討 Pir51 與 CDC20 之間的交互作用，以及 Pir51 及 CDC20 在生物體內所扮演的功能及角色；另一方面，也探討 Pir51 是否參與 ATR-dependent pathway 的修補機制。經過實驗的結果，得到以下的結論：

1. 在細胞週期的 M 期時，Pir51 會經由 APC^{CDC20} 的路徑被泛蛋白化。
2. DNA 受損時，Pir51 會參與 ATR 相關的修復路徑。



第六章 參考文獻

- Abraham RT (2001). Cell cycle checkpoint signaling through the ATM and ATR kinases. *Genes Dev* **15**: 2177-96.
- Andegeko Y, Moyal L, Mittelman L, Tsarfaty I, Shiloh Y, Rotman G (2001). Nuclear retention of ATM at sites of DNA double strand breaks. *J Biol Chem* **276**: 38224-30.
- Baker DJ, Dawlaty MM, Galardy P, van Deursen JM (2007). Mitotic regulation of the anaphase-promoting complex. *Cell Mol Life Sci* **64**: 589-600.
- Beucher A, Birraux J, Tchouandong L, Barton O, Shibata A, Conrad S *et al* (2009). ATM and Artemis promote homologous recombination of radiation-induced DNA double-strand breaks in G2. *EMBO J* **28**: 3413-27.
- Bugreev DV, Hanaoka F, Mazin AV (2007). Rad54 dissociates homologous recombination intermediates by branch migration. *Nat Struct Mol Biol* **14**: 746-753.
- Du LQ, Wang Y, Wang H, Cao J, Liu Q, Fan FY (2010). Knockdown of Rad51 expression induces radiation- and chemo-sensitivity in osteosarcoma cells. *Med Oncol*.
- Eytan E, Moshe Y, Braunstein I, Hershko A (2006). Roles of the anaphase-promoting complex/cyclosome and of its activator Cdc20 in functional substrate binding. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**: 2081-6.
- Fasanaro P, Capogrossi MC, Martelli F (2009). Regulation of the endothelial cell cycle by the ubiquitin-proteasome system. *Cardiovasc Res* **85**: 272-80.
- Fraschini R, Beretta A, Sironi L, Musacchio A, Lucchini G, Piatti S (2001). Bub3 interaction with Mad2, Mad3 and Cdc20 is mediated by WD40 repeats and does not require intact kinetochores. *EMBO J* **20**: 6648-59.
- Hagting A, Den Elzen N, Vodermaier HC, Waizenegger IC, Peters JM, Pines J (2002). Human securin proteolysis is controlled by the spindle checkpoint and reveals when the APC/C switches from activation by Cdc20 to Cdh1. *J Cell Biol* **157**: 1125-37.

Hekmat-Nejad M, You Z, Yee MC, Newport JW, Cimprich KA (2000). Xenopus ATR is a replication-dependent chromatin-binding protein required for the DNA replication checkpoint. *Curr Biol* **10**: 1565-73.

Henning W, Sturzbecher HW (2003). Homologous recombination and cell cycle checkpoints: Rad51 in tumour progression and therapy resistance. *Toxicology* **193**: 91-109.

Henson SE, Tsai SC, Malone CS, Soghomonian SV, Ouyang Y, Wall R *et al* (2006). Pir51, a Rad51-interacting protein with high expression in aggressive lymphoma, controls mitomycin C sensitivity and prevents chromosomal breaks. *Mutat Res* **601**: 113-24.

Herzog F, Primorac I, Dube P, Lenart P, Sander B, Mechtler K *et al* (2009). Structure of the anaphase-promoting complex/cyclosome interacting with a mitotic checkpoint complex. *Science* **323**: 1477-81.

Jacquemont C, Taniguchi T (2007). Proteasome function is required for DNA damage response and fanconi anemia pathway activation. *Cancer Res* **67**: 7395-405.

Kim EM, Burke DJ (2008). DNA damage activates the SAC in an ATM/ATR-dependent manner, independently of the kinetochore. *PLoS Genet* **4**: e1000015.

Kimata Y, Baxter JE, Fry AM, Yamano H (2008). A role for the Fizzy/Cdc20 family of proteins in activation of the APC/C distinct from substrate recruitment. *Mol Cell* **32**: 576-83.

Kovalenko OV, Golub EI, Bray-Ward P, Ward DC, Radding CM (1997). A novel nucleic acid-binding protein that interacts with human rad51 recombinase. *Nucleic Acids Res* **25**: 4946-53.

Kraft C, Gmachl M, Peters JM (2006). Methods to measure ubiquitin-dependent proteolysis mediated by the anaphase-promoting complex. *Methods* **38**: 39-51.

Li M, York JP, Zhang P (2007). Loss of Cdc20 causes a securin-dependent metaphase arrest in two-cell mouse embryos. *Mol Cell Biol* **27**: 3481-8.

- Lin JJ, Dutta A (2007). ATR pathway is the primary pathway for activating G2/M checkpoint induction after re-replication. *J Biol Chem* **282**: 30357-62.
- Lowndes NF, Murguia JR (2000). Sensing and responding to DNA damage. *Current Opinion in Genetics & Development* **10**: 17-25.
- Manchado E, Eguren M, Malumbres M (2010). The anaphase-promoting complex/cyclosome (APC/C): cell-cycle-dependent and -independent functions. *Biochem Soc Trans* **38**: 65-71.
- Modesti M, Budzowska M, Baldeyron C, Demmers JA, Ghirlando R, Kanaar R (2007). RAD51API1 is a structure-specific DNA binding protein that stimulates joint molecule formation during RAD51-mediated homologous recombination. *Mol Cell* **28**: 468-81.
- Mondal G, Sengupta S, Panda CK, Gollin SM, Saunders WS, Roychoudhury S (2007). Overexpression of Cdc20 leads to impairment of the spindle assembly checkpoint and aneuploidization in oral cancer. *Carcinogenesis* **28**: 81-92.
- Nilsson J, Yekezare M, Minshull J, Pines J (2008). The APC/C maintains the spindle assembly checkpoint by targeting Cdc20 for destruction. *Nat Cell Biol* **10**: 1411-20.
- Pandita TK, Lieberman HB, Lim DS, Dhar S, Zheng W, Taya Y *et al* (2000). Ionizing radiation activates the ATM kinase throughout the cell cycle. *Oncogene* **19**: 1386-91.
- Pfleger CM, Kirschner MW (2000). The KEN box: an APC recognition signal distinct from the D box targeted by Cdh1. *Genes Dev* **14**: 655-65.
- Qi W, Yu H (2007). KEN-box-dependent degradation of the Bub1 spindle checkpoint kinase by the anaphase-promoting complex/cyclosome. *J Biol Chem* **282**: 3672-9.
- Reddy SK, Rape M, Margansky WA, Kirschner MW (2007). Ubiquitination by the anaphase-promoting complex drives spindle checkpoint inactivation. *Nature* **446**: 921-5.
- Sage JM, Gildemeister OS, Knight KL (2010). Discovery of a novel function for human Rad51: maintenance of the mitochondrial genome. *J Biol Chem* **285**: 18984-90.

Schuyler SC, Murray AW (2009). An in vitro assay for Cdc20-dependent mitotic anaphase-promoting complex activity from budding yeast. *Methods Mol Biol* **545**: 271-85.

Stegmeier F, Rape M, Draviam VM, Nalepa G, Sowa ME, Ang XL *et al* (2007). Anaphase initiation is regulated by antagonistic ubiquitination and deubiquitination activities. *Nature* **446**: 876-81.

Tremezaygues L, Seifert M, Tilgen W, Reichrath J (2009). 1,25-dihydroxyvitamin D(3) protects human keratinocytes against UV-B-induced damage: In vitro analysis of cell viability/proliferation, DNA-damage and -repair. *Dermatoendocrinol* **1**: 239-45.

van Leuken R, Clijsters L, Wolthuis R (2008). To cell cycle, swing the APC/C. *Biochim Biophys Acta* **1786**: 49-59.

Wiese C, Dray E, Groesser T, San Filippo J, Shi I, Collins DW *et al* (2007). Promotion of homologous recombination and genomic stability by RAD51AP1 via RAD51 recombinase enhancement. *Mol Cell* **28**: 482-90.

Wright JA, Keegan KS, Herendeen DR, Bentley NJ, Carr AM, Hoekstra MF *et al* (1998). Protein kinase mutants of human ATR increase sensitivity to UV and ionizing radiation and abrogate cell cycle checkpoint control. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**: 7445-50.

Yang J, Xu ZP, Huang Y, Hamrick HE, Duerksen-Hughes PJ, Yu YN (2004). ATM and ATR: sensing DNA damage. *World J Gastroenterol* **10**: 155-60.

Yu H (2007). Cdc20: a WD40 activator for a cell cycle degradation machine. *Mol Cell* **27**: 3-16.

Zachariae W (2004). Destruction with a box: substrate recognition by the anaphase-promoting complex. *Mol Cell* **13**: 2-3.

第七章 附表

表 1 與 Pir51 有正相關的菌落。由 NCBI 的 BLAST 分析找出與 Pir51 有交互作用菌落的名稱。

Individual clone	基因名字	出現重複次數
1	Homo sapiens mitochondrion, complete genome	16
2	Homo sapiens tubulin	4
3	Homo sapiens prion protein interacting protein (PRNPIP), mRNA	1
4	Homo sapiens trafficking protein particle complex 1 (TRAPPC1), mRNA	1
5	Homo sapiens processing of precursor 4, ribonuclease P/MRP subunit (<i>S. cerevisiae</i>) (POP4), mRNA	1
6	Homo sapiens non-metastatic cells 4, protein expressed in (NME4), mRNA	1
7	Homo sapiens FXYD domain containing ion transport regulator 5 (FXYD5), transcript variant 2, mRNA	1
8	Homo sapiens VAMP (vesicle-associated membrane protein)-associated protein A, 33kDa (VAPA), transcript variant 2, mRNA	1
9	Homo sapiens NmrA-like family domain containing 1 (NMRAL1), mRNA	1
10	Homo sapiens methyltransferase like 9 (METTL9), transcript variant 1, mRNA	1
11	Homo sapiens chromosome	6
12	Homo sapiens cyclin-dependent kinase 5 (CDK5), mRNA	1
13	Homo sapiens protein phosphatase 1, catalytic subunit, alpha isoform (PPP1CA), transcript variant 1, mRNA	1
14	Homo sapiens galanin prepropeptide (GAL), mRNA	2
15	Homo sapiens peptidylprolyl isomerase A (cyclophilin A) (PPIA), mRNA	1

16	Homo sapiens Keratin 7 (KRT7),mRNA	1
17	Homo sapiens coiled-coil domain containing 95 (CCDC95), mRNA	1
18	Homo sapiens NADH dehydrogenase (ubiquinone) Fe-S protein 3, 30kDa (NADH-coenzyme Q reductase) (NDUFS3), mRNA	1
19	Homo sapiens proteolipid protein 2 (colonic epithelium-enriched) (PLP2), mRNA	1
20	Homo sapiens glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH), mRNA	2
21	Homo sapiens HLA-B associated transcript 3 (BAT3)	1
22	Homo sapiens ATPase, H ⁺ transporting, lysosomal accessory protein 1 (ATP6AP1), mRNA	1
23	Homo sapiens N-acylaminoacyl-peptide hydrolase (APEH), mRNA	1
24	Homo sapiens acidic (leucine-rich) nuclear phosphoprotein 32 family, member B (ANP32B), mRNA	1
25	Homo sapiens ribosomal protein	6
26	Homo sapiens secretory leukocyte peptidase inhibitor (SLPI), mRNA	1
27	Homo sapiens transcription factor binding to IGHM enhancer 3 (TFE3), mRNA	1
28	Homo sapiens zer-1 homolog (C. elegans) (ZER1), mRNA	1
29	Homo sapiens COP9 constitutive photomorphogenic homolog subunit 7A (Arabidopsis) (COPS7A), mRNA	2
30	Homo sapiens aldolase A	5
31	Homo sapiens moesin (MSN), mRNA	1
32	Homo sapiens 24-dehydrocholesterol reductase (DHCR24), mRNA	1
33	Homo sapiens molybdenum cofactor sulfurase (MOCOS), mRNA	1
34	Homo sapiens family with sequence similarity 62 (C2 domain containing) member B (FAM62B), mRNA	1
35	Homo sapiens pyruvate kinase, muscle (PKM2), transcript variant 3, mRNA	1

36	Homo sapiens cutA divalent cation tolerance homolog (E. coli) (CUTA), transcript variant 1, mRNA	1
37	Homo sapiens DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 54 (DDX54), transcript variant 2, mRNA	1
38	Homo sapiens eukaryotic translation initiation factor 1 (EIF1), mRNA	1
39	Homo sapiens collagen, type V, alpha 1 (COL5A1), mRNA	1
40	Homo sapiens actin, beta (ACTB), mRNA	1
41	Homo sapiens clusterin (CLU), transcript variant 2, mRNA	1
42	Homo sapiens 24-dehydrocholesterol reductase (DHCR24), mRNA	1
43	Homo sapiens eukaryotic translation elongation factor 1 gamma (EEF1G), mRNA	1
44	Homo sapiens procollagen-proline, 2-oxoglutarate 4-dioxygenase (proline 4-hydroxylase), beta polypeptide (P4HB), mRNA	1
45	Homo sapiens testis enhanced gene transcript (BAX inhibitor 1) (TEGT), transcript variant 1, mRNA	1
46	Homo sapiens FAD-dependent oxidoreductase domain containing 2 (FOXRED2), transcript variant 2, mRNA	1
47	Homo sapiens regulatory factor X-associated ankyrin-containing protein (RFXANK), transcript variant 2, mRNA	1
48	Homo sapiens amino-terminal enhancer of split (AES), transcript variant 2, mRNA	1
49	Homo sapiens enolase 1	1
50	Homo sapiens transmembrane protein 138 (TMEM138), mRNA	1
51	Homo sapiens branched chain keto acid dehydrogenase E1, alpha polypeptide (BCKDHA), mRNA	1
52	Homo sapiens COP9 constitutive photomorphogenic homolog subunit 6 (Arabidopsis) (COPS6), mRNA	1
53	Homo sapiens interleukin 17 receptor A (IL17RA), mRNA	1
54	Homo sapiens amidohydrolase domain containing 2 (AMDHD2), mRNA	3
55	Homo sapiens coiled-coil domain containing 59 (CCDC59), mRNA	1
56	Homo sapiens trafficking protein particle complex 1 (TRAPPC1), mRNA	1

57	Homo sapiens GABA(A) receptor-associated protein (GABARAP), mRNA	1
58	Homo sapiens BAT2 domain containing 1 (BAT2D1), mRNA	1
59	Homo sapiens cytochrome c-1 (CYC1), mRNA	1
60	Homo sapiens family with sequence similarity 20, member B (FAM20B), mRNA	1
61	Homo sapiens solute carrier family 2 (facilitated glucose transporter), member 1 (SLC2A1), mRNA	1
62	Homo sapiens WNT1 inducible signaling pathway protein 2 (WISP2), mRNA	1
63	Homo sapiens tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 9 (TNFSF9), mRNA	2
64	Homo sapiens cell division cycle 20 homolog (<i>S. cerevisiae</i>) (CDC20), mRNA	1
65	Homo sapiens heat shock protein 90kDa alpha (cytosolic), class B member 1 (HSP90AB1), mRNA	2
66	Homo sapiens S100 calcium binding protein A4 (S100A4), transcript variant 1, mRNA	1
67	Homo sapiens protein phosphatase 2A activator, regulatory subunit 4 (PPP2R4), transcript variant 5, mRNA	1
68	Homo sapiens uridine-cytidine kinase 1-like 1 (UCKL1), mRNA	1
69	Homo sapiens hypothetical LOC401052 (LOC401052), mRNA	1
70	Homo sapiens N-myc downstream regulated gene 1 (NDRG1), mRNA	2
71	Homo sapiens heterogeneous nuclear ribonucleoprotein F (HNRPF), transcript variant 5, mRNA	1
72	Homo sapiens pyruvate kinase, muscle (PKM2), transcript variant 3, mRNA	1
73	Homo sapiens sterol O-acyltransferase (acyl-Coenzyme A: cholesterol acyltransferase) 1 (SOAT1), transcript variant 688113, mRNA	1
74	Homo sapiens phospholipase D family, member 3 (PLD3), transcript variant 1, mRNA	1

75	Homo sapiens Yip1 domain family, member 2 (YIPF2), mRNA	1
76	Homo sapiens protein tyrosine phosphatase, receptor type, F (PTPRF), transcript variant 1, mRNA	1
77	Homo sapiens ferritin, heavy polypeptide 1 (FTH1), mRNA	1
78	Homo sapiens cleavage stimulation factor, 3' pre-RNA, subunit 2, 64kDa (CSTF2), mRNA	1
79	Homo sapiens isocitrate dehydrogenase 3 (NAD+) gamma (IDH3G), nuclear gene encoding mitochondrial protein, transcript variant 2, mRNA	1
80	Homo sapiens ATPase type 13A1 (ATP13A1), mRNA	2
81	Homo sapiens tumor protein D52-like 2 (TPD52L2), transcript variant 5, mRNA	1
82	Homo sapiens dullard homolog (<i>Xenopus laevis</i>) (DULLARD), mRNA	1
83	Homo sapiens prefoldin subunit 1 (PFDN1), mRNA	1

共計 124 個基因

表 2 與 Pir51 作用正相關的基因分類。大致可歸類成五種機制。

細胞骨架	轉錄及轉譯因子	酵素	細胞凋亡路徑	細胞週期	其他
Tubulin	TFE3	G3PDH	Clusterin	CDC20	PRNPIP
Collagen	EIF1	APEH	WISP2		TRAPPC1
actin	TEGT	NADH dehydrogenase	TNFSF9		POP4
COL5A1	BAX inhibitor 1	Protein phosphatase 1			NME4
ACTB	EEF1G	Leukocyte peptidase			FXYD5
	AES	ALDOA			VAPA
		FOXRED2			NMRAL1
		Enolase 1			CDK5
		Amidohydrolase			GAL
		METTL9			KRT7
		PPP1CA			CCDC95
		PPIA			PLP2
		NDUFS3			BAT3
		Aldolase			ATP6AP1
		DHCR24			ANP32B
		MOCOS			SLPI
		PKM2			ZER1
		DHCR24			COPS7A
		P4HB			MSN
		BCKDHA			FAM62B
		AMDHD2			CUTA
					DDX54
					RFXANK
					TMEM138
					IL17RA
					CCDC59
					GABARAP
					TRAPPC
					BAT2D1
					CYC1
					FAM20B
					SLC2A1

表 3 比較 HeLa 細胞與 Pir51 被抑制的情況下，人類基因庫中基因的表現差異。

SYMBOL	倍數(sipir51/Hela)	DEFINITION
IFI27	51.69292833	Homo sapiens interferon, alpha-inducible protein 27 (IFI27), transcript variant 2, mRNA.
IFI6	25.00881524	Homo sapiens interferon, alpha-inducible protein 6 (IFI6), transcript variant 2, mRNA.
PSG5	15.32011004	Homo sapiens pregnancy specific beta-1-glycoprotein 5 (PSG5), mRNA.
OAS2	12.72178838	Homo sapiens 2'-5'-oligoadenylate synthetase 2, 69/71kDa (OAS2), transcript variant 1, mRNA.
IFI44L	12.25329827	Homo sapiens interferon-induced protein 44-like (IFI44L), mRNA.
PSG4	11.92737465	Homo sapiens pregnancy specific beta-1-glycoprotein 4 (PSG4), transcript variant 1, mRNA.
PSG3	11.25729259	Homo sapiens pregnancy specific beta-1-glycoprotein 3 (PSG3), mRNA.
PSG4	9.679536654	Homo sapiens pregnancy specific beta-1-glycoprotein 4 (PSG4), transcript variant 1, mRNA.
IFI6	5.709091356	Homo sapiens interferon, alpha-inducible protein 6 (IFI6), transcript variant 3, mRNA.
HLA-B	5.569509114	Homo sapiens major histocompatibility complex, class I, B (HLA-B), mRNA.
PSG6	4.951365761	Homo sapiens pregnancy specific beta-1-glycoprotein 6 (PSG6), transcript variant 1, mRNA.
IFI44	4.920502991	Homo sapiens interferon-induced protein 44 (IFI44), mRNA.
PARP10	4.913795882	Homo sapiens poly (ADP-ribose) polymerase family, member 10 (PARP10), mRNA.
PSG6	4.881319762	Homo sapiens pregnancy specific beta-1-glycoprotein 6 (PSG6), transcript variant 2, mRNA.
IRF7	4.807565616	Homo sapiens interferon regulatory factor 7 (IRF7), transcript variant b, mRNA.
TMEM16B	4.732065652	Homo sapiens transmembrane protein 16B (TMEM16B), mRNA.
OAS1	4.587219183	Homo sapiens 2',5'-oligoadenylate synthetase 1, 40/46kDa

		(OAS1), transcript variant 2, mRNA.
IFIT3	4.557961803	Homo sapiens interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 3 (IFIT3), mRNA.
PSG4	4.515411739	Homo sapiens pregnancy specific beta-1-glycoprotein 4 (PSG4), transcript variant 1, mRNA.
STAT1	4.508247518	Homo sapiens signal transducer and activator of transcription 1, 91kDa (STAT1), transcript variant beta, mRNA.
HCP5	4.490156953	Homo sapiens HLA complex P5 (HCP5), mRNA.
HRASLS2	4.488280997	Homo sapiens HRAS-like suppressor 2 (HRASLS2), mRNA.
TAP1	4.377921391	Homo sapiens transporter 1, ATP-binding cassette, sub-family B (MDR/TAP) (TAP1), mRNA.
KRT80	4.369785029	Homo sapiens keratin 80 (KRT80), transcript variant 1, mRNA.
KIAA1853	4.353405254	Homo sapiens KIAA1853 (KIAA1853), mRNA.
OAS1	4.312560985	Homo sapiens 2',5'-oligoadenylate synthetase 1, 40/46kDa (OAS1), transcript variant 3, mRNA.
DDX60	4.299139858	Homo sapiens DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 60 (DDX60), mRNA.
RSAD2	4.265959354	Homo sapiens radical S-adenosyl methionine domain containing 2 (RSAD2), mRNA.
UBE2L6	4.198172045	Homo sapiens ubiquitin-conjugating enzyme E2L 6 (UBE2L6), transcript variant 1, mRNA.
PLAC8	4.188860335	Homo sapiens placenta-specific 8 (PLAC8), mRNA.
IL6	4.165637472	Homo sapiens interleukin 6 (interferon, beta 2) (IL6), mRNA.
CPA4	4.147630469	Homo sapiens carboxypeptidase A4 (CPA4), mRNA.
IFIH1	4.10694532	Homo sapiens interferon induced with helicase C domain 1 (IFIH1), mRNA.
CYR61	4.074169923	Homo sapiens cysteine-rich, angiogenic inducer, 61 (CYR61), mRNA.
ISG20	3.091120211	Homo sapiens interferon stimulated exonuclease gene 20kDa (ISG20), mRNA.
HSPB8	3.069639459	Homo sapiens heat shock 22kDa protein 8 (HSPB8), mRNA.
BMP2	3.056542569	Homo sapiens bone morphogenetic protein 2 (BMP2), mRNA.
SAMD9	3.054243911	Homo sapiens sterile alpha motif domain containing 9 (SAMD9), mRNA.
PLCG2	3.030416726	Homo sapiens phospholipase C, gamma 2

		(phosphatidylinositol-specific) (PLCG2), mRNA.
IRF1	3.028639439	Homo sapiens interferon regulatory factor 1 (IRF1), mRNA.
ANXA3	3.011822756	Homo sapiens annexin A3 (ANXA3), mRNA.
PSG2	3.002084238	Homo sapiens pregnancy specific beta-1-glycoprotein 2 (PSG2), mRNA.
ZC3HAV1	2.952999468	Homo sapiens zinc finger CCCH-type, antiviral 1 (ZC3HAV1), transcript variant 1, mRNA.
RND3	2.901334232	Homo sapiens Rho family GTPase 3 (RND3), mRNA.
HERC5	2.89521216	Homo sapiens hect domain and RLD 5 (HERC5), mRNA.
IFIT2	2.844027909	Homo sapiens interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 2 (IFIT2), mRNA.
IFIT3	2.837297244	Homo sapiens interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 3 (IFIT3), mRNA.
SLCO2A1	2.804393523	Homo sapiens solute carrier organic anion transporter family, member 2A1 (SLCO2A1), mRNA.
XAF1	2.796993514	Homo sapiens XIAP associated factor 1 (XAF1), transcript variant 2, mRNA.
ATF3	2.752283101	Homo sapiens activating transcription factor 3 (ATF3), transcript variant 4, mRNA.
PARP14	2.739186099	Homo sapiens poly (ADP-ribose) polymerase family, member 14 (PARP14), mRNA.
ZC3HAV1	2.725539468	Homo sapiens zinc finger CCCH-type, antiviral 1 (ZC3HAV1), transcript variant 2, mRNA.
KLF4	2.692131711	Homo sapiens Kruppel-like factor 4 (gut) (KLF4), mRNA.
PLSCR1	2.678686125	Homo sapiens phospholipid scramblase 1 (PLSCR1), mRNA.
GCNT3	2.673826902	Homo sapiens glucosaminyl (N-acetyl) transferase 3, mucin type (GCNT3), mRNA.
NMNAT2	2.668199071	Homo sapiens nicotinamide nucleotide adenylyltransferase 2 (NMNAT2), transcript variant 1, mRNA.
BAMBI	2.66704355	Homo sapiens BMP and activin membrane-bound inhibitor homolog (<i>Xenopus laevis</i>) (BAMBI), mRNA.
CSF2RA	2.663137291	Homo sapiens colony stimulating factor 2 receptor, alpha, low-affinity (granulocyte-macrophage) (CSF2RA), transcript variant 2, mRNA.
HDC	2.643693742	Homo sapiens histidine decarboxylase (HDC), mRNA.
TRIML2	2.636503868	Homo sapiens tripartite motif family-like 2 (TRIML2), mRNA.

FGF2	2.629287884	Homo sapiens fibroblast growth factor 2 (basic) (FGF2), mRNA.
SCIN	2.622759607	Homo sapiens scinderin (SCIN), mRNA.
SP110	2.60531413	Homo sapiens SP110 nuclear body protein (SP110), transcript variant b, mRNA.
SMAD6	2.598743535	Homo sapiens SMAD family member 6 (SMAD6), mRNA.
MUC13	2.590222986	Homo sapiens mucin 13, cell surface associated (MUC13), mRNA.
IRF7	2.5862912	Homo sapiens interferon regulatory factor 7 (IRF7), transcript variant b, mRNA.
MYPN	2.579507963	Homo sapiens myopalladin (MYPN), mRNA.
HEG1	2.543228101	Homo sapiens HEG homolog 1 (zebrafish) (HEG1), mRNA.
FOLR1	2.535141052	Homo sapiens folate receptor 1 (adult) (FOLR1), transcript variant 7, mRNA.
IFITM1	2.528044331	Homo sapiens interferon induced transmembrane protein 1 (9-27) (IFITM1), mRNA.
CCL5	2.520522988	Homo sapiens chemokine (C-C motif) ligand 5 (CCL5), mRNA.
KRT81	2.490785678	Homo sapiens keratin 81 (KRT81), mRNA.
DAB2	2.480277478	Homo sapiens disabled homolog 2, mitogen-responsive phosphoprotein (Drosophila) (DAB2), mRNA.
IFI35	2.455731912	Homo sapiens interferon-induced protein 35 (IFI35), mRNA.
LAMA1	2.433672293	Homo sapiens laminin, alpha 1 (LAMA1), mRNA.
CD24	2.432619405	Homo sapiens CD24 molecule (CD24), mRNA.
PPP1R15A	2.428521005	Homo sapiens protein phosphatase 1, regulatory (inhibitor) subunit 15A (PPP1R15A), mRNA.
MYPN	2.42227674	Homo sapiens myopalladin (MYPN), mRNA.
DENND3	2.420241717	Homo sapiens DENN/MADD domain containing 3 (DENND3), mRNA.
DUSP16	2.405355047	Homo sapiens dual specificity phosphatase 16 (DUSP16), mRNA.
RUNDC3B	2.401237611	Homo sapiens RUN domain containing 3B (RUNDC3B), mRNA.
WARS	2.400954392	Homo sapiens tryptophanyl-tRNA synthetase (WARS), transcript variant 2, mRNA.
TBC1D2	2.400282245	Homo sapiens TBC1 domain family, member 2 (TBC1D2), mRNA.

FOLR1	2.374887976	Homo sapiens folate receptor 1 (adult) (FOLR1), transcript variant 8, mRNA.
C19orf66	2.358446509	Homo sapiens chromosome 19 open reading frame 66 (C19orf66), mRNA.
DKK1	2.357004988	Homo sapiens dickkopf homolog 1 (Xenopus laevis) (DKK1), mRNA.
PSG7	2.355308899	Homo sapiens pregnancy specific beta-1-glycoprotein 7 (PSG7), mRNA.
DDX58	2.351937304	Homo sapiens DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 58 (DDX58), mRNA.
EIF2AK2	2.348198237	Homo sapiens eukaryotic translation initiation factor 2-alpha kinase 2 (EIF2AK2), mRNA.
WARS	2.341129469	Homo sapiens tryptophanyl-tRNA synthetase (WARS), transcript variant 1, mRNA.
CSF2RA	2.337339345	Homo sapiens colony stimulating factor 2 receptor, alpha, low-affinity (granulocyte-macrophage) (CSF2RA), transcript variant 6, mRNA.
MAOB	2.336599294	Homo sapiens monoamine oxidase B (MAOB), nuclear gene encoding mitochondrial protein, mRNA.
PI16	2.327455843	Homo sapiens peptidase inhibitor 16 (PI16), mRNA.
KRT80	2.32498109	Homo sapiens keratin 80 (KRT80), transcript variant 1, mRNA.
CRYAB	2.317822625	Homo sapiens crystallin, alpha B (CRYAB), mRNA.
PPP2R2B	2.307503105	Homo sapiens protein phosphatase 2 (formerly 2A), regulatory subunit B, beta isoform (PPP2R2B), transcript variant 4, mRNA.
IFIT1	2.293822913	Homo sapiens interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 1 (IFIT1), transcript variant 2, mRNA.
HLA-C	2.293148817	Homo sapiens major histocompatibility complex, class I, C (HLA-C), mRNA.
ID2	2.292568789	Homo sapiens inhibitor of DNA binding 2, dominant negative helix-loop-helix protein (ID2), mRNA.
DAB2	2.286385311	Homo sapiens disabled homolog 2, mitogen-responsive phosphoprotein (Drosophila) (DAB2), mRNA.
REC8	2.284780414	Homo sapiens REC8 homolog (yeast) (REC8), transcript variant 1, mRNA.
PSMB9	2.282169968	Homo sapiens proteasome

MGC42367	2.281858493	Homo sapiens similar to 2010300C02Rik protein (MGC42367), mRNA.
ID2	2.274320294	Homo sapiens inhibitor of DNA binding 2, dominant negative helix-loop-helix protein (ID2), mRNA.
CASP1	2.272968782	Homo sapiens caspase 1, apoptosis-related cysteine peptidase (interleukin 1, beta, convertase) (CASP1), transcript variant delta, mRNA.
STAT2	2.269776846	Homo sapiens signal transducer and activator of transcription 2, 113kDa (STAT2), mRNA.
C10orf54	2.253350745	Homo sapiens chromosome 10 open reading frame 54 (C10orf54), mRNA.
SDSL	2.253248945	Homo sapiens serine dehydratase-like (SDSL), mRNA.
VWA5A	2.248714467	Homo sapiens von Willebrand factor A domain containing 5A (VWA5A), transcript variant 2, mRNA.
ZBED1	2.242560542	Homo sapiens zinc finger, BED-type containing 1 (ZBED1), mRNA.
CD24	2.242000592	Homo sapiens CD24 molecule (CD24), mRNA.
CYP11A1	2.241632948	Homo sapiens cytochrome P450, family 11, subfamily A, polypeptide 1 (CYP11A1), nuclear gene encoding mitochondrial protein, transcript variant 1, mRNA.
COL18A1	2.238382299	Homo sapiens collagen, type XVIII, alpha 1 (COL18A1), transcript variant 2, mRNA.
RGS20	2.099766206	Homo sapiens regulator of G-protein signaling 20 (RGS20), transcript variant 1, mRNA.
CSPG4	2.096749582	Homo sapiens chondroitin sulfate proteoglycan 4 (CSPG4), mRNA.
PIK3C2B	2.096384335	Homo sapiens phosphoinositide-3-kinase, class 2, beta polypeptide (PIK3C2B), mRNA.
B4GALT5	2.096170945	Homo sapiens UDP-Gal:betaGlcNAc beta 1,4-galactosyltransferase, polypeptide 5 (B4GALT5), mRNA.
IGF1R	2.095151782	Homo sapiens insulin-like growth factor 1 receptor (IGF1R), mRNA.
BTN3A3	2.09220597	Homo sapiens butyrophilin, subfamily 3, member A3 (BTN3A3), transcript variant 2, mRNA.
DAPK1	2.088960655	Homo sapiens death-associated protein kinase 1 (DAPK1), mRNA.
WWC1	2.085167389	Homo sapiens WW and C2 domain containing 1 (WWC1), mRNA.

HES4	2.085162492	Homo sapiens hairy and enhancer of split 4 (Drosophila) (HES4), mRNA.
PSG1	2.083286097	Homo sapiens pregnancy specific beta-1-glycoprotein 1 (PSG1), mRNA.
MUC1	2.07246327	Homo sapiens mucin 1, cell surface associated (MUC1), transcript variant 5, mRNA.
KLHL3	2.069761728	Homo sapiens kelch-like 3 (Drosophila) (KLHL3), mRNA.
C1S	2.066118052	Homo sapiens complement component 1, s subcomponent (C1S), transcript variant 1, mRNA.
ZNF548	2.065632833	Homo sapiens zinc finger protein 548 (ZNF548), mRNA.
CASP1	2.06373155	Homo sapiens caspase 1, apoptosis-related cysteine peptidase
ARHGDIB	2.059924708	Homo sapiens Rho GDP dissociation inhibitor (GDI) beta (ARHGDIB), mRNA.
SMPDL3A	2.057534782	Homo sapiens sphingomyelin phosphodiesterase, acid-like 3A (SMPDL3A), mRNA.
KRT86	2.056658063	Homo sapiens keratin 86 (KRT86), mRNA.
TGM1	2.05542967	Homo sapiens transglutaminase 1
TGFBR3	2.054229052	Homo sapiens transforming growth factor, beta receptor III (TGFBR3), mRNA.
RASGRP3	2.046656012	Homo sapiens RAS guanyl releasing protein 3 (calcium and DAG-regulated) (RASGRP3), mRNA.
TFRC	2.044008356	Homo sapiens transferrin receptor (p90, CD71) (TFRC), mRNA.
OPTN	2.043616221	Homo sapiens optineurin (OPTN), transcript variant 4, mRNA.
KIAA1618	2.041945627	Homo sapiens KIAA1618 (KIAA1618), mRNA.
HCFC1R1	2.041605151	Homo sapiens host cell factor C1 regulator 1 (XPO1 dependent) (HCFC1R1), transcript variant 3, mRNA.
MED16	2.041354553	Homo sapiens mediator complex subunit 16 (MED16), mRNA.
SAMD4A	2.038100304	Homo sapiens sterile alpha motif domain containing 4A (SAMD4A), mRNA.
SLC27A2	2.027815405	Homo sapiens solute carrier family 27 (fatty acid transporter), member 2 (SLC27A2), mRNA.
RHOB	2.026436171	Homo sapiens ras homolog gene family, member B (RHOB), mRNA.
LMO4	2.023526061	Homo sapiens LIM domain only 4 (LMO4), mRNA.

IGFBP6	2.021501947	Homo sapiens insulin-like growth factor binding protein 6 (IGFBP6), mRNA.
LYPD6	2.021163539	Homo sapiens LY6/PLAUR domain containing 6 (LYPD6), mRNA.
PSMB8	2.016534156	Homo sapiens proteasome
CEBPA	2.014710664	Homo sapiens CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP), alpha (CEBPA), mRNA.
IFITM3	2.008910539	Homo sapiens interferon induced transmembrane protein 3 (1-8U) (IFITM3), mRNA.
CACNG6	2.005542635	Homo sapiens calcium channel, voltage-dependent, gamma subunit 6 (CACNG6), transcript variant 3, mRNA.
CDKN1A	2.005032566	Homo sapiens cyclin-dependent kinase inhibitor 1A (p21, Cip1) (CDKN1A), transcript variant 1, mRNA.
SMOC1	0.49996896	Homo sapiens SPARC related modular calcium binding 1 (SMOC1), transcript variant 1, mRNA.
UNG	0.499622665	Homo sapiens uracil-DNA glycosylase (UNG), transcript variant 1, mRNA.
VDR	0.498312647	Homo sapiens vitamin D (1,25- dihydroxyvitamin D3) receptor (VDR), transcript variant 1, mRNA.
B4GALNT4	0.497511707	Homo sapiens beta-1,4-N-acetyl-galactosaminyl transferase 4 (B4GALNT4), mRNA.
TMPRSS3	0.496381515	Homo sapiens transmembrane protease, serine 3 (TMPRSS3), transcript variant A, mRNA.
IMPDH2	0.494895309	Homo sapiens IMP (inosine monophosphate) dehydrogenase 2 (IMPDH2), mRNA.
MT1X	0.492951903	Homo sapiens metallothionein 1X (MT1X), mRNA.
PGK1	0.492540277	Homo sapiens phosphoglycerate kinase 1 (PGK1), mRNA.
RPLP0	0.491649997	Homo sapiens ribosomal protein, large, P0 (RPLP0), transcript variant 2, mRNA.
RANBP3L	0.491523208	Homo sapiens RAN binding protein 3-like (RANBP3L), mRNA.
TMEM45A	0.459121508	Homo sapiens transmembrane protein 45A (TMEM45A), mRNA.
LOC90835	0.45695715	Homo sapiens hypothetical protein LOC90835 (LOC90835), mRNA.
PTGS2	0.453399982	Homo sapiens prostaglandin-endoperoxide synthase 2
COL7A1	0.452797022	Homo sapiens collagen, type VII, alpha 1

LOC728643	0.450432168	Homo sapiens heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1 pseudogene (LOC728643), non-coding RNA.
FER1L4	0.446023031	Homo sapiens fer-1-like 4 (C. elegans) (FER1L4) on chromosome 20.
LOC645436	0.435542715	PREDICTED: Homo sapiens similar to Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1 (Helix-destabilizing protein) (Single-strand binding protein) (hnRNP core protein A1) (HDP-1) (Topoisomerase-inhibitor suppressed) (LOC645436), mRNA.
SLC29A1	0.429889548	Homo sapiens solute carrier family 29
SNORD30	0.426227954	Homo sapiens small nucleolar RNA, C/D box 30 (SNORD30), non-coding RNA.
TMPRSS3	0.421402502	Homo sapiens transmembrane protease, serine 3 (TMPRSS3), transcript variant D, mRNA.
IL11	0.418116982	Homo sapiens interleukin 11 (IL11), mRNA.
SLC29A1	0.417916139	Homo sapiens solute carrier family 29 (nucleoside transporters), member 1 (SLC29A1), nuclear gene encoding mitochondrial protein, transcript variant 4, mRNA.
ATF4	0.415263846	Homo sapiens activating transcription factor 4 (tax-responsive enhancer element B67) (ATF4), transcript variant 1, mRNA.
NT5DC2	0.409247017	Homo sapiens 5'-nucleotidase domain containing 2 (NT5DC2), mRNA.
MME	0.407536909	Homo sapiens membrane metallo-endopeptidase (MME), transcript variant 1, mRNA.
SNORD31	0.406073545	Homo sapiens small nucleolar RNA, C/D box 31 (SNORD31), non-coding RNA.
LOC85390	0.4026412	Homo sapiens RNA, small nucleolar (LOC85390), non-coding RNA.
PLAT	0.399598781	Homo sapiens plasminogen activator, tissue (PLAT), transcript variant 1, mRNA.
DDIT4	0.398863667	Homo sapiens DNA-damage-inducible transcript 4 (DDIT4), mRNA.
ETV5	0.387028763	Homo sapiens ets variant gene 5
RANBP3L	0.381797231	Homo sapiens RAN binding protein 3-like (RANBP3L), mRNA.
SLC5A3	0.377329083	Homo sapiens solute carrier family 5
HNRPA1L-2	0.367526336	Homo sapiens heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1 pseudogene (HNRPA1L-2), non-coding RNA.

DMBT1	0.366798554	Homo sapiens deleted in malignant brain tumors 1 (DMBT1), transcript variant 3, mRNA.
NDUFA4L2	0.365505763	Homo sapiens NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1 alpha subcomplex, 4-like 2 (NDUFA4L2), mRNA.
AKR1C4	0.362864821	Homo sapiens aldo-keto reductase family 1, member C4
ETV4	0.354256911	Homo sapiens ets variant 4 (ETV4), transcript variant 1, mRNA.
HNRNPA1	0.352630212	Homo sapiens heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1 (HNRNPA1), transcript variant 2, mRNA.
PMEPA1	0.347940913	Homo sapiens prostate transmembrane protein, androgen induced 1 (PMEPA1), transcript variant 2, mRNA.
ARNT2	0.343660717	Homo sapiens aryl-hydrocarbon receptor nuclear translocator 2 (ARNT2), mRNA.
OLFM1	0.325392988	Homo sapiens olfactomedin 1 (OLFM1), transcript variant 1, mRNA.
WFDC1	0.323177432	Homo sapiens WAP four-disulfide core domain 1 (WFDC1), mRNA.
ETV4	0.315938634	Homo sapiens ets variant gene 4 (E1A enhancer binding protein, E1AF) (ETV4), mRNA.
CXCR4	0.30985772	Homo sapiens chemokine (C-X-C motif) receptor 4 (CXCR4), transcript variant 1, mRNA.
PMEPA1	0.30403058	Homo sapiens prostate transmembrane protein, androgen induced 1 (PMEPA1), transcript variant 2, mRNA.
CA9	0.29750476	Homo sapiens carbonic anhydrase IX (CA9), mRNA.
CXCR4	0.283664205	Homo sapiens chemokine (C-X-C motif) receptor 4 (CXCR4), transcript variant 2, mRNA.
IER3	0.278299679	Homo sapiens immediate early response 3 (IER3), mRNA.
AKR1C2	0.228327582	Homo sapiens aldo-keto reductase family 1, member C2
SERPINE2	0.096258156	Homo sapiens serpin peptidase inhibitor, clade E