

行政院國家科學委員會專題研究計畫 成果報告

設計合成 Id 蛋白質之線狀及環狀胜肽拮抗物並探討其結構
與活性關係
研究成果報告(精簡版)

計畫類別：個別型
計畫編號：NSC 98-2113-M-029-004-
執行期間：98年08月01日至99年07月31日
執行單位：東海大學化學系

計畫主持人：龍鳳娣

公開資訊：本計畫可公開查詢

中華民國 99 年 10 月 31 日

行政院國家科學委員會補助專題研究計畫

成果報告
 期中進度報告

設計合成 Id 蛋白質之線狀及環狀胜肽拮抗物並探討其結構與活性關係

計畫類別： 個別型計畫 整合型計畫

計畫編號：NSC 98-2113-M-029-004-

執行期間：98年8月1日至99年7月31日

執行機構及系所：東海大學 化學系

計畫主持人：龍鳳娣 博士

共同主持人：無

計畫參與人員：陳丘泓、蕭又誠、楊德倫、楊詩瑩、廖志偉

成果報告類型(依經費核定清單規定繳交)： 精簡報告 完整報告

本計畫除繳交成果報告外，另須繳交以下出國心得報告：

- 赴國外出差或研習心得報告
- 赴大陸地區出差或研習心得報告
- 出席國際學術會議心得報告
- 國際合作研究計畫國外研究報告

處理方式：除列管計畫及下列情形者外，得立即公開查詢

涉及專利或其他智慧財產權， 一年 二年後可公開查詢

中 華 民 國 99 年 10 月 31 日

中文摘要

Id 蛋白質是DNA 結合蛋白質的抑制物，屬於抑制DNA 與轉錄因子結合的蛋白質家族，其中包括四種相關的蛋白質: Id1、Id2、Id3 和Id4。Id 蛋白質家族包含一個高度保留的helix-loop-helix (HLH) 雙體區塊。在訊息傳遞途徑中， Id 扮演轉錄因子basic helix-loop-helix 家族之拮抗物(antagonist)的角色，在細胞生長、細胞增生、以及細胞分化方面扮演重要的角色。Id 的作用機制在於它們會與basic helix-loop-helix (bHLH)的蛋白質形成高親和性的雙體(heterdimer)而干擾bHLH 蛋白質與DNA 的結合，進而抑制與細胞分化相關基因的轉錄作用。Id藉由與E蛋白、Ets 轉錄因子、以及腫瘤抑制因子之Rb 家族的結合而抑制基因的轉錄作用。許多的研究証實Id 蛋白質的表現與腫瘤生成期間的Ras 訊息途徑有關，在血管的生成方面也扮演重要的角色。因此，前期計畫我們以Id之胜肽抑制物為設計的標的，期望藉由抑制Id之活性而抑制癌細胞的生長與腫瘤的轉移。我們設計一系列以MyoD 蛋白質為藍本的胜肽，應用固相胜肽合成技術合成設計之胜肽後，以逆相高效能液相層析儀分離純化胜肽，並經由質譜儀鑑定其分子量。最後，培養不同的腫瘤細胞株並以胜肽處理後，評估胜肽對癌細胞之影響。研究結果發現胜肽2號(H-Tyr-Ile-Glu-Gly-Leu-Gln-Ala-Leu-Leu-Arg-Asp-Gln-NH₂)具有不錯的抗增生效果。為延續前期之計畫，本計畫第一年擬根據胜肽2號之氨基酸序列，以Ala-scanning的原理設計並合成一系列的胜肽，以體外實驗之方法評估胜肽之結構與活性關係。再根據體外實驗之結果，針對具有抑制效應的線狀胜肽，設計環狀的胜肽，以期增加胜肽之生物安定性、專一性、或抑制腫瘤細胞增生的效果。本實驗擬應用固相胜肽合成技術合成設計之胜肽，經過RP-HPLC 之純化及MALDI-TOF-Mass 鑑定胜肽之分子量後，再應用生物感測器 (BIACORE 3000) 鑑定胜肽對Id蛋白質之親和力，並進行乳癌細胞以及大腸癌細胞的細胞活性測試，探討胜肽對癌細胞增生及細胞週期的影響。研究計畫之成果有助於研發抗癌藥物以及開發新穎的診斷方法。

關鍵字： Id 蛋白質、細胞生長、細胞增生、細胞分化、胜肽抑制物、固相胜肽合成、腫瘤生成、血管生成、環狀胜肽、細胞週期、結構與活性關係

英文摘要

Id1 protein, DNA binding protein inhibitors, is a protein of four related families. The Id protein families contain a highly conserved dimerization motif known as the helix-loop-helix (HLH) domain. In signaling pathways, Id proteins act as dominant negative antagonists of the basic helix-loop-helix (bHLH) family of transcription factors, which play an important role in cellular development, proliferation, and differentiation. The mechanism of Id proteins is to antagonize basic helix-loop-helix proteins, they bind as dominant-negative HLH proteins by forming high affinity heterodimers with other bHLH proteins, thereby preventing them from binding to DNA and inhibiting transcription of differentiation associated genes. Id proteins perform this by associating with E proteins, Ets transcription factors and the Rb family of tumor suppressor. Biochemical and genetic data have established that Id related to Ras signaling during tumorigenesis and play a critical role in blood vessels formation. We hypothesize that inhibition of Id proteins will retard the growth of cancer cells and metastases of tumors. Recently, we have designed a series of peptides based on the sequence of a structural region of *MyoD*. Peptides were synthesized by solid phase peptide synthesis, purified by RP-HPLC, and characterized by MALDI-TOF Mass spectrometer. Effects of peptidic inhibitors of Id on breast and colony cancer cells were investigated. Biological results showed that among the synthesized peptides, the peptide **2** (the amino acid sequence: H-Tyr-Ile-Glu-Gly-Leu-Gln-Ala-Leu-Leu-Arg-Asp-Gln-NH₂) exhibited the strongest anti-proliferative effects on MCF-7 and HT-29 cells with the IC₅₀ value of 10⁻⁶ M and 20⁻⁶ M, respectively. To further study the structure activity relationship of **2** and to improve the potency of **2**, the objective of this project at the first year is to design and synthesize Ala-scanning analogs of peptide **2**, and to evaluate their effects on breast and colony cancer cells. Effects of peptides on cell proliferation and cell cycle of cancer cells will be evaluated using *in vitro* bioassays. Potent linear peptides will be further designed for cyclization to enhance their stability and potency. Results of this research are useful for the development of anticancer agents.

Keywords : Id, DNA binding protein inhibitors, helix-loop-helix, *MyoD*, tumorigenesis, blood vessels formation, cell proliferation, cell cycle, structure-activity relationship

文獻探討

鹼性的螺旋-環-螺旋 (Basic helix-loop-helix) 蛋白結構在細胞增生及細胞分化中扮演重要的轉錄因子的角色。包含此類結構的蛋白已經證實存在於脊椎及無脊椎動物的各種組織中。包含鹼性的螺旋-環-螺旋的蛋白質之主要功能區域包括兩個雙極性的螺旋結構，並含有許多個鹼性胺基酸序列，這兩個螺旋結構分別座落於環 (loop) 的兩端，而鹼性胺基酸的主要功能則是與E-box DNA 結合，進而促進目標基因的轉錄，螺旋-環-螺旋區塊則會與另一包含鹼性的螺旋-環-螺旋之蛋白形成雙聚合體結構。一般來說具有組織特異性的B 型bHLH 會與A 型的bHLH 形成聚合而促使細胞走入其特殊目的²，例如骨骼肌的發展是由MyoD, Myf-5, myogenin, 及MRF4共同參與形成聚合結構，進而控制哺乳動物的肌肉組織發展。

此外研究顯示，bHLH 或HLH 也扮演調控細胞分化的功能性結構因子的角色。Id 基因所轉譯的Id 蛋白分成四大類，均會與DNA 形成結合並且抑制細胞分化，屬於負調節因子HLH(helix-loop-helix)，其調節機制是與標的bHLH 蛋白形成高親和性的雙異構聚合體進而阻止bHLH蛋白與另一組織特異性bHLH 形成雙聚合體而抑制了DNA 分化基因的轉錄。

越來越多研究顯示 Id 蛋白的過度表現與腫瘤生長或轉移的關係非常密切，其中有研究報告Id1 蛋白在胰臟癌細胞中有過度表現，但是在正常的胰腺細胞很少發現Id1 蛋白的蹤跡。由此歸類出Id 蛋白的過度表現應會導致腫瘤的形成，甚至在其他的研究中指出胚胎的中樞神經統以及血管的形成，Id 蛋白扮演著一重要且關鍵的角色。另外，有關子宮內膜細胞、癌乳癌細胞與Id1 蛋白過度表現的關係與組織切片的研究論文亦在2000 及2001 年發表。除此之外亦有論文顯示腫瘤組織中Id 2、3 和4 蛋白的高度表現擁有正相關性。有些研究顯示，若抑制腫瘤細胞的Id 蛋白的DNA 表現則腫瘤細胞將形成自殺現象，此類研究是利用Id 的反模板DNA 而達到有效抑制的結果。

一般認為當致癌基因被啟動時，Id 扮演著不可或缺的角色，之前的學者研究當同時轉殖Id gene 與Bcl-2 gene 或是只單一轉殖Id gene 都會讓細胞走向腫瘤或是變異途徑。另外，也有研究顯示若剔除Id 家族的基因或是抑制Id 基因之後，將使得腫瘤細胞變得脆弱或是失去了腫瘤轉移的機轉。有學者指出，Id 蛋白透過藉由使 retinoblastoma protein 失去活性，因而增加telomerase 的活性或使p53 所調節的DNA damage系統受到損害。而在很多臨床組織或細胞實驗中顯示Id 在許多腫瘤中的表現量很高，而相對的正常細胞或組織的Id 表現量較少，主要Id 被認為是細胞週期路徑中的下游分子而且其機轉被定義成蛋白-蛋白之間的交互作用。所以很多報告指出抑制Id 的表現量以及減少Id gene 的表現可以降低腫瘤細胞的血管增生作用(vascularization) 以及抑制腫瘤的轉移研究方法。

到目前為止尚未有抑制Id 蛋白的類胜肽發表在國際期刊，我們認為以bHLH 為藍本而合成胜肽類緣物可以有效的達到抑制Id 表現進而阻斷DNA 轉錄因子與Id 結合，如此DNA 即可以被轉錄因子所調節而正常表現蛋白質。另外，有文獻利用mutant construction的方式指出Id蛋白的環狀區域(loop region) 是構成Id 活性的重要區域 (domain) 。本實驗室先前也針對Id1 的loop 區域設計了高親和性的胜肽，在細胞活性測試中也發現有不錯的效果。我們希望在研發Id胜肽抑制劑的同時可以針對Id 的不同功能區有不同的設計方向以達到抑制Id 過度表現的目的。

研究方法

1.1 Id 胜肽抑制物之設計、合成

我們根據胜肽類原物peptide 3C中的特殊結構區域之氨基酸序列，設計了一系列以丙胺酸(Ala.)取代的胜肽。

線狀胜肽是利用固相胜肽合成技術，將胜肽合成在樹脂 (Rink Amide Resin) 固相支撐物上，再以化學裂解方式將胜肽自樹脂上裂解後，進行冷凍乾燥以得到胜肽之粗產物。合成後的胜肽經由冷凍乾

燥處理得到胜肽之粗產物，使用半製備管柱(semi-preparative column)以 RP-HPLC 進行分析與純化，純化後的胜肽再經由分析管柱(analytical column)以 RP-HPLC 確認其純度及滯留時間(Rt)，並以 MALDI-TOF Mass 確定其分子量。

1.2 Id 胜肽抑制物之純化

利用高效能液相層析法 (high performance liquid chromatography, HPLC) 純化合成之胜肽。首先溶解於適當的溶劑中，將欲分析及純化的胜肽樣品先以孔徑 $0.22\ \mu\text{m}$ 過濾器 (filter) 過濾，注射入由HITACHI 購入之RP-HPLC經UV光源225 nm偵測後之數據(滯留時間, retention time, Rt)呈現在積分儀的圖上。分離之最佳狀況可由進速度，孔徑及離析率調配而求得。根據文獻的報告本研究將高效能液相層析儀之偵測波長設定為225 nm，以4 ml/min的速度， $10\ \mu\text{m}$ 孔徑的C18管柱來制定最適當之離析率，HPLC溶劑配製為：solution A是 4L D.I. Water + 0.05 % 由Alfa Aesar –Lancaster購入之trifluoroacetic acid (TFA)，solution B是由ECHO購入之4 L acetonitrile + 0.05 % trifluoroacetic acid (TFA)。個別收集每個波峰出現時 RP-HPLC儀所層析出的液體，經冷凍乾燥，便可獲得純化後胜肽的白色乾燥粉末。

1.3 Id 胜肽抑制物之鑑定

應用基質輔助雷射脫附游離飛行時間質譜儀(MALDI-TOF)分析鑑定合成胜肽。基質輔助雷射脫附游離法是由德國的Hillenkamp 教授及日本的Tanaka 先生分別於1988 年提出，MALDI (matrix-assisted laser desorption ionization) 代表離子源的部份，TOF(time-of-flight)代表質量分析器。此種離子源主要是由雷射光源和金屬樣品盤所構成，將分析樣品和基質 (matrix) 混合後，將樣品與基質的混和液均勻點至金屬盤之樣品槽中，使其混合物在空氣中自然風乾，待溶劑揮發後，混合液會在金屬盤中形成樣品—基質的共結晶，再以雷射光束照射此固態樣品時，結晶中的基質會吸收雷射光的能量，產生質子並由樣品盤中脫附而出，此過程會同時將分析樣品脫附氣化，產生氣相離子，以進入質量分析器測量其 m/z 比值，進而推算其質量。

1.4 Id 胜肽抑制物的親和性與活性測試

1.4.1 生物親和力測試 - 表面薄膜共振技術 (surface plasma resonance technology ; SPR) :

將上述一中所設計合成的一系列胜肽，藉由biosensor-BIACORE 3000 將(1) Id 固定於晶片(CM5 chip) 上，(2) 樣品流經過chip 通道，(3) 測試序列稀釋樣品與Id 之間的親和性並進行分析，確認設計胜肽與Id 蛋白質的親和性如何。本實驗以 PBS buffer 為 running buffer，流速設定為 $5\ \mu\text{L}/\text{min}$ ，選取 Amine coupling 模式進行專一性感應晶片之製備。包括：第一階段為感應晶片表面羧甲基(carboxymethyl group)之活化反應(activation)：利用 $0.4\ \text{M EDC} / 0.1\ \text{M NHS}$ 等體積之混合液，將羧甲基活化生成 NHS-esters。首先 EDC 會與羧甲基反應，形成易與胺基(amines, $-\text{NH}_2$)反應之中間產物(O-acylisourea)，由於此中間產物於水溶液中不穩定。因此，以 NHS 取而代之與羧甲基反應，進而形成 NHS-esters，NHS-esters 亦易與胺基反應。第二階段為感應晶片表面鍵合物之固定化反應(immobilization)：注入Id1 ($30\ \mu\text{g}/\text{ml}$) [125,126]，溶於 Coupling buffer ($10\ \text{mM sodium acetate buffer pH 4.8}$) 至晶片表面，Id1 之胺基(amines, $-\text{NH}_2$)會與晶片表面之 NHS-esters 反應，形成共價鍵結(covalent links)。第三階段為感應晶片表面未與鍵合物反應之活化部位之去化反應(deactivation)：注入 $0.1\ \text{M Ethanolamine hydrochloride}$ ($35\ \mu\text{L}$, pH 8.5)至晶片表面，覆蓋感應晶片上尚未與Id1 結合之 NHS-esters，以避免任何不當的非專一性吸附(non-specific binding)。將Id1固定於晶片表面之後即可分析合成胜肽與Id1 之間結合趨勢。合成胜肽以 HBS-EP buffer 序列稀釋成相同濃度後，於流速為 $25\ \mu\text{L}/\text{min}$ 的條件下，分別取 $55\ \mu\text{l}$ 注入微射流系統中，與晶片表面之Id1 反應。反應完成後，系統會延

遲 2 分鐘再進行高速清洗感應晶片表面，移除非專一性結合的部分，專一性結合的部分則以篩選出最適之 regeneration buffer 進行感應晶片表面之再生作用，使 RU 值回到未注射入樣品前的基礎線，再進行下一分析物之測定。

1.4.2 生物活性測試:

本實驗中所使用的乳癌細胞(MCF-7)購自新竹食品工業研究所。MCF-7所用的細胞培養液是使用由GIBCO購入之 DMEM 粉末溶於4.5公升已滅菌Mili-Q去離子水中，加入23.5 g及的NaHCO₃，再用HCl調整pH至7.2~7.4後以Mili-Q已滅菌去離子水補足體積至5公升，再以0.22 μM過濾器過濾滅菌，儲存於4℃冰箱備用。並在每100毫升 DMEM 細胞培養液添入GIBCO購入之100 IU青黴素 (penicillin)、100 μg 鏈黴素 (streptomycin)，最後加入10% 胎牛血清(Fetal bovine serum, FBS)為完全培養液。而HT-29所使用的細胞培養液則是McCoy's 5A medium(GIBCO 12330)，並在每100 毫升培養液中添100 IU 青黴素 (penicillin)、100 μg 鏈黴素(streptomycin)，最後加入10% 胎牛血清(Fetal bovine serum, FBS)。兩株細胞皆培養於37℃、5% CO₂的培養箱中；繼代培養時 (subculture)，以1500 rpm離心5分鐘，再分種於新的細胞培養皿中，每一培養皿注入約4×10⁶個細胞，細胞培養液每三天更換一次。待細胞狀況穩定，開始進行癌細胞的存活率測試。將利用生物感測器初步篩選出來的並具有高親和性的胜肽，處理兩株癌細胞，再利用MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl tetrazolium bromide)法來判定。MTT是一種活細胞染色法，其原理是利用細胞內粒腺體中的dehydrogenase代謝，將tetrazolium ring切斷還原呈紫色不溶性沈澱物formazan (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl-formazan)堆積在細胞中，將此結晶溶於Merck購入之DMSO (Dimethyl Sulfoxide)中，以OD540的吸光值來量化，由於活細胞才具有活性的粒腺體酵素，故所測得的吸光值會與活細胞數量成正比關係，因此利用formazan產量的多寡來評估細胞的存活率。

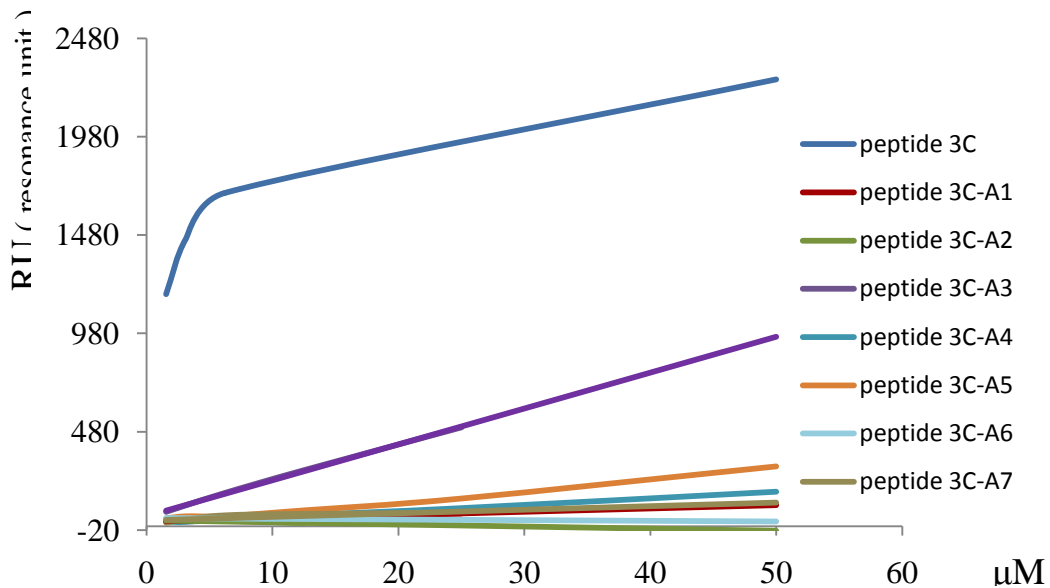
結果與討論

在前一年度的國科會實驗中，實驗室成功設計出一條具有抑制效果的胜肽結抗物。在本年的國科會實驗中，實驗室承續前一年的實驗，進一步以固相胜肽合成法合成一系列分別以丙胺酸(Alanine)取代之peptide 3C胜肽類緣物及 peptide 3C，試圖比較原胺基酸殘基對於抑制 Id1 蛋白質的活性關係，其胜肽序列及分子量以及滯留時間整理於下表一。

表一. 分別以丙胺酸(丙胺酸(Alanine)nine)取代之 peptide 3C胜肽類緣物及 peptide 3C之胜肽序列及分子量以及滯留時間。

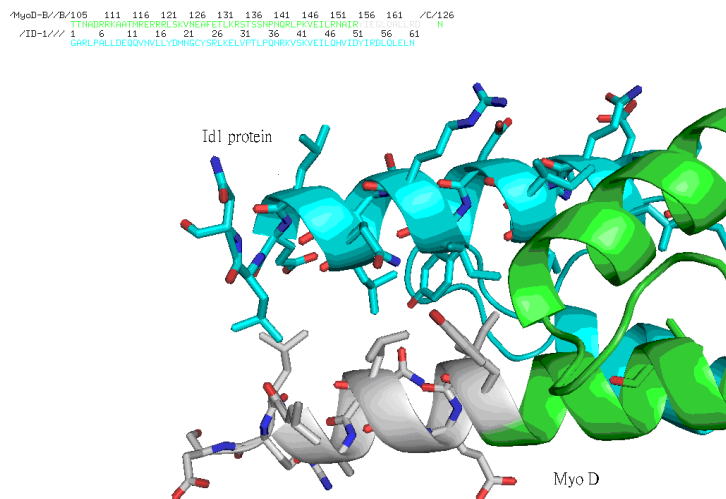
命名	胜肽序列	分子量 (Da)	滯留時間 (mins)
peptide 3C	YIEGLQALLRDQC	1520.7	13.63
Peptide 3C-A1	AIEGLQALLRDQC	1428.6	13.63
Peptide 3C-A2	YAEGLQALLRDQC	1478.6	13.63
Peptide 3C-A3	YIAGLQALLRDQC	1462.6	13.63
Peptide 3C-A4	YIEALQALLRDQC	1534.7	13.63
Peptide 3C-A5	YIEGAQALLRDQC	1478.6	14.6
Peptide 3C-A6	YIEGLAALLRDQC	1463.6	14.6
Peptide 3C-A7	YIEGLQ	720.7	8.6

首先，先以 peptide 3C 的 N 端前六個胺基酸分別以丙胺酸(Alanine)取代後，對於 Id1 全長蛋白質的親和性測試，並以 peptide 3C 作為對照組進行實驗，如下圖一。實驗結果發現，peptide 3C 的 N 端前六個胺基酸對於 peptide 3C 皆很重要，依其殘基位置重要程度的排序為 3<5<4<1<6<2，這樣的結果可以印證多了這六個胺基酸殘基 peptide 3C 的抑制活性比 peptide 3D 抑制活性要高。



圖一. 以表面薄膜共振技術檢測 peptide 3C 的 N 端前六個胺基酸分別以丙胺酸(Alanine)取代後，對於 Id1 蛋白質的親和性測試，並以 peptide 3C 作為對照組。

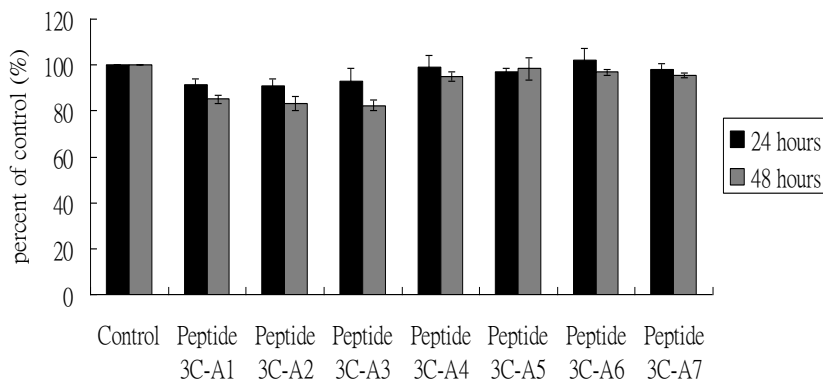
而二號位置的重要性可以從 d1 蛋白質與 peptide 3C 結合模擬圖中窺知一二，如圖二。從委請弘光科技大學生物科技系的陳擘老師對 Id1 蛋白質與 peptide 3C 結合進行結合模擬圖中發現，Id1 蛋白質與 peptide 3C 最佳的結合方式是以疏水性鍵結，其中又以 Isoleucine 的鍵結更顯為重要。



圖二. 委請弘光科技大學生物科技系的陳擘老師對 Id1 蛋白質與 peptide 3C 結合進行結合模擬圖。

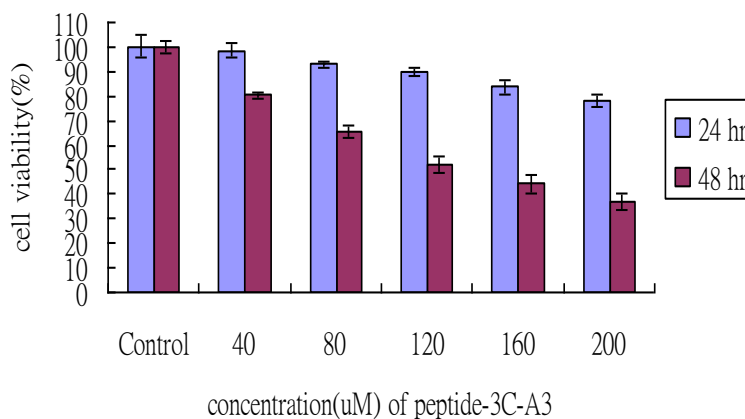
接著，進一步將分別以丙胺酸(Alanine)取代之 peptide 3C 胜肽類緣物進行癌細胞存活率實驗，由於 peptide 3C 對於癌細胞具有極佳的抑制效果，其對於乳癌細胞 MCF-7 的 IC₅₀ 為 25 μM 左右，因此，實驗室以 50 μM 作為統一的藥物濃度，將胜肽類緣物分別與乳癌細胞 MCF-7 作用 24 小時及 48 小時，

並以 MTT assay 觀測胜肽類緣物的抑制效果，將細胞存活率以長條圖整理表示，如下圖三。



圖三. 以 50 μ M 胜肽類緣物分別與乳癌細胞 MCF-7 作用 24 小時及 48 小時，以 MTT assay 檢測其細胞存活率，以長條圖表示之。

普遍而言，分別以丙胺酸(Alanine)取代之 peptide 3C 胜肽類緣物對於乳癌細胞 MCF-7 的抑制效果皆欠佳，此結果符合表面薄膜共振技術的親和性測試之結果。其中，發現 peptide 3C-A3 的抑制效果較佳，顯示 3 號位置較不重要，這樣的結果與表面薄膜共振技術檢測的結果有一致性；因此，實驗室進一步對 peptide 3C 胜肽類緣物 peptide 3C-A3 進行不同濃度對乳癌細胞 MCF-7 作用 24 小時及 48 小時的細胞存活率實驗，並以 MTT assay 觀測抑制效果，將細胞存活率以長條圖整理表示，如下圖四。



圖四. 胜肽類緣物 peptide 3C-A3 進行不同濃度對乳癌細胞 MCF-7 作用 24 小時及 48 小時的細胞存活率實驗，並以 MTT assay 觀測抑制效果，以長條圖表示之。

結果顯示，胜肽類緣物 peptide 3C-A3 的 IC_{50} 不佳，其 IC_{50} 近乎 160 μ M，顯示 3 號位置雖然不重要，但是對於胜肽結合 Id1 蛋白質的效果依然仍具影響，推測可能是胜肽與 Id1 蛋白質結合時，仍須氫鍵與 Id1 蛋白質鍵結的輔助，而導致這樣的結果。

綜合以上實驗所得之結果，雖然 Id1 蛋白質與 peptide 3C 結合進行結合模擬圖顯示 Id1 蛋白質與 peptide 3C 最佳結合為疏水性鍵結，且表面薄膜共振技術的結果亦支持此認知，但是從細胞存活率的結果中，可以看到氫鍵的作用亦不可小覷。因此，實驗室將進一步依此實驗結果，以特定胺基酸取代部分重要位置之胺基酸探討胺基酸殘基的結合作用與抑制效果，並藉以探索抑制效果更佳的胜肽序列。

參考文獻

Jan, Y. N.; Jan, L. Y., Functional gene cassettes in development. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1993**, 90, (18),8305-7.

Olson, E. N.; Klein, W. H., bHLH factors in muscle development: dead lines and commitments, what to leave in and what to leave out. *Genes Dev* **1994**, 8, (1), 1-8.

Weintraub, H., The MyoD family and myogenesis: redundancy, networks, and thresholds. *Cell* **1993**, 75, (7), 1241-4.

Murre, C.; Bain, G.; van Dijk, M. A.; Engel, I.; Furnari, B. A.; Massari, M. E.; Matthews, J. R.; Quong, M. W.; Rivera, R. R.; Stuiver, M. H., Structure and function of helix-loop-helix proteins. *Biochim Biophys Acta* **1994**, 1218, (2), 129-35.

Lyden, D.; Young, A. Z.; Zagzag, D.; Yan, W.; Gerald, W.; O'Reilly, R.; Bader, B. L.; Hynes, R. O.; Zhuang, Y.; Manova, K.; Benezra, R., Id1 and Id3 are required for neurogenesis, angiogenesis and vascularization of tumour xenografts. *Nature* **1999**, 401, (6754), 670-7.

Lin, C. Q.; Singh, J.; Murata, K.; Itahana, Y.; Parrinello, S.; Liang, S. H.; Gillett, C. E.; Campisi, J.; Desprez, P. Y., A role for Id-1 in the aggressive phenotype and steroid hormone response of human breast cancer cells. *Cancer Res* **2000**, 60, (5), 1332-40.

Takai, N.; Miyazaki, T.; Fujisawa, K.; Nasu, K.; Miyakawa, I., Id1 expression is associated with histological grade and invasive behavior in endometrial carcinoma. *Cancer Lett* **2001**, 165, (2), 185-93.

McAllister, S. D.; Christian, R. T.; Horowitz, M. P.; Garcia, A.; Desprez, P. Y., Cannabidiol as a novel inhibitor of Id-1 gene expression in aggressive breast cancer cells. *Mol Cancer Ther* **2007**, 6, (11), 2921-7.

Sablitzky, F.; Moore, A.; Bromley, M.; Deed, R. W.; Newton, J. S.; Norton, J. D., Stage- and subcellular-specific expression of Id proteins in male germ and Sertoli cells implicates distinctive regulatory roles for Id proteins during meiosis, spermatogenesis, and Sertoli cell function. *Cell Growth Differ* **1998**, 9, (12), 1015-24.

Sikder, H. A.; Devlin, M. K.; Dunlap, S.; Ryu, B.; Alani, R. M., Id proteins in cell growth and tumorigenesis. *Cancer Cell* **2003**, 3, (6), 525-30.

Fong, S.; Itahana, Y.; Sumida, T.; Singh, J.; Coppe, J. P.; Liu, Y.; Richards, P. C.; Bennington, J. L.; Lee, N. M.; Debs, R. J.; Desprez, P. Y., Id-1 as a molecular target in therapy for breast cancer cell invasion and metastasis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2003**, 100, (23), 13543-8.

Perk, J.; Iavarone, A.; Benezra, R., Id family of helix-loop-helix proteins in cancer. *Nat Rev Cancer* **2005**, 5, (8), 603-14.

Lasorella, A.; Uo, T.; Iavarone, A., Id proteins at the cross-road of development and cancer. *Oncogene* **2001**, 20, (58), 8326-33.

Fong, S.; Debs, R. J.; Desprez, P. Y., Id genes and proteins as promising targets in cancer therapy. *Trends Mol Med* **2004**, 10, (8), 387-92.

Perk, J.; Gil-Bazo, I.; Chin, Y.; de Candia, P.; Chen, J. J.; Zhao, Y.; Chao, S.; Cheong, W.; Ke, Y.; Al-Ahmadie, H.; Gerald, W. L.; Brogi, E.; Benezra, R., Reassessment of id1 protein expression in human mammary, prostate, and bladder cancers using a monospecific rabbit monoclonal anti-id1 antibody. *Cancer Res* **2006**, 66, (22), 10870-7.

Maruyama, H.; Kleeff, J.; Wildi, S.; Friess, H.; Buchler, M. W.; Israel, M. A.; Korc, M., Id-1 and Id-2 are overexpressed in pancreatic cancer and in dysplastic lesions in chronic pancreatitis. *Am J Pathol* **1999**, 155, (3), 815-22.

Benezra, R., The Id proteins: targets for inhibiting tumor cells and their blood supply. *Biochim Biophys Acta* **2001**, 1551, (2), F39-47.

- Benezra, R., Role of Id proteins in embryonic and tumor angiogenesis. *Trends Cardiovasc Med* **2001**, 11, (6), 237-41.
- Benezra, R.; Rafii, S.; Lyden, D., The Id proteins and angiogenesis. *Oncogene* **2001**, 20, (58), 8334-41.
- Bounpheng, M. A.; Melnikova, I. N.; Dimas, J. J.; Christy, B. A., Identification of a novel transcriptional activity of mammalian Id proteins. *Nucleic Acids Res* **1999**, 27, (7), 1740-6.
- Schindl, M.; Oberhuber, G.; Obermair, A.; Schoppmann, S. F.; Karner, B.; Birner, P., Overexpression of Id-1 protein is a marker for unfavorable prognosis in early-stage cervical cancer. *Cancer Res* **2001**, 61,(15), 5703-6.
- Itahana, Y.; Singh, J.; Sumida, T.; Coppe, J. P.; Parrinello, S.; Bennington, J. L.; Desprez, P. Y., Role of Id-2 in the maintenance of a differentiated and noninvasive phenotype in breast cancer cells. *Cancer Res* **2003**, 63, (21), 7098-105.
- Wong, Y. C.; Wang, X.; Ling, M. T., Id-1 expression and cell survival. *Apoptosis* **2004**, 9, (3), 279-89.
- Stighall, M.; Manetopoulos, C.; Axelson, H.; Landberg, G., High ID2 protein expression correlates with a favourable prognosis in patients with primary breast cancer and reduces cellular invasiveness of breast cancer cells. *Int J Cancer* **2005**, 115, (3), 403-11.

國科會補助專題研究計畫成果報告自評表

請就研究內容與原計畫相符程度、達成預期目標情況、研究成果之學術或應用價值（簡要敘述成果所代表之意義、價值、影響或進一步發展之可能性）、是否適合在學術期刊發表或申請專利、主要發現或其他有關價值等，作一綜合評估。

1. 請就研究內容與原計畫相符程度、達成預期目標情況作一綜合評估

- 達成目標
 未達成目標（請說明，以 100 字為限）
 實驗失敗
 因故實驗中斷
 其他原因

說明：

雖然達成目標，但對於實驗室而言，數據不夠細膩，因為實驗室利用這個實驗的機會，跨足到蛋白質體的表現，自行表現 Id1 蛋白質，所以花較多的時間於此，並希望以此做為經驗的累積。

2. 研究成果在學術期刊發表或申請專利等情形：

- 論文：已發表 未發表之文稿 撰寫中 無
專利：已獲得 申請中 無
技轉：已技轉 洽談中 無
其他：（以 100 字為限）

此次實驗成果將與未來一至二年的結果整併一起發表。

3. 請依學術成就、技術創新、社會影響等方面，評估研究成果之學術或應用價值（簡要敘述成果所代表之意義、價值、影響或進一步發展之可能性）（以 500 字為限）

綜合以下實驗所得之結果，雖然 Id1 蛋白質與 peptide 3C 結合進行結合模擬圖顯示 Id1 蛋白質與 peptide 3C 最佳結合為疏水性鍵結，且表面薄膜共振技術的結果亦支持此認知，但是從細胞存活率的結果中，可以看到氫鍵的作用亦不可小覷。因此，實驗室將進一步依此實驗結果，以特定胺基酸取代部分重要位置之胺基酸探討胺基酸殘基的結合作用與抑制效果，並藉以探索抑制效果更佳的胜肽序列。

國科會補助計畫衍生研發成果推廣資料表

日期:2010/11/01

國科會補助計畫	計畫名稱: 設計合成Id蛋白質之線狀及環狀胜肽拮抗物並探討其結構與活性關係
	計畫主持人: 龍鳳娣
	計畫編號: 98-2113-M-029-004- 學門領域: 有機化學
無研發成果推廣資料	

98 年度專題研究計畫研究成果彙整表

計畫主持人：龍鳳娣		計畫編號：98-2113-M-029-004-					
計畫名稱：設計合成 Id 蛋白質之線狀及環狀胜肽拮抗物並探討其結構與活性關係							
成果項目		量化			單位	備註（質化說明：如數個計畫共同成果、成果列為該期刊之封面故事...等）	
		實際已達成數（被接受或已發表）	預期總達成數（含實際已達成數）	本計畫實際貢獻百分比			
國內	論文著作	期刊論文	2	2	100%	篇	
		研究報告/技術報告	0	0	100%		
		研討會論文	2	2	100%		
		專書	0	0	100%		
	專利	申請中件數	0	0	100%	件	
		已獲得件數	0	0	100%		
	技術移轉	件數	0	0	100%	件	
		權利金	0	0	100%	千元	
	參與計畫人力 （本國籍）	碩士生	3	0	100%	人次	
		博士生	2	0	100%		
		博士後研究員	0	0	100%		
		專任助理	0	0	100%		
國外	論文著作	期刊論文	0	0	100%	篇	
		研究報告/技術報告	0	0	100%		
		研討會論文	0	0	100%		
		專書	0	0	100%		章/本
	專利	申請中件數	0	0	100%	件	
		已獲得件數	0	0	100%		
	技術移轉	件數	0	0	100%	件	
		權利金	0	0	100%	千元	
	參與計畫人力 （外國籍）	碩士生	0	0	100%	人次	
		博士生	0	0	100%		
		博士後研究員	0	0	100%		
		專任助理	0	0	100%		

<p>其他成果 (無法以量化表達之成果如辦理學術活動、獲得獎項、重要國際合作、研究成果國際影響力及其他協助產業技術發展之具體效益事項等，請以文字敘述填列。)</p>	<p>九十七年度中區十大院校暨台中榮民總醫院合作研究計畫聯合成果發表會 TCVGH-T977801 應用 Id 蛋白質及生物感測器研發藥物篩選及新的診斷方法 論文海報比賽 第三名</p>
--	---

	成果項目	量化	名稱或內容性質簡述
科 教 處 計 畫 加 填 項 目	測驗工具(含質性與量性)	0	
	課程/模組	0	
	電腦及網路系統或工具	0	
	教材	0	
	舉辦之活動/競賽	0	
	研討會/工作坊	0	
	電子報、網站	0	
	計畫成果推廣之參與(閱聽)人數	0	

國科會補助專題研究計畫成果報告自評表

請就研究內容與原計畫相符程度、達成預期目標情況、研究成果之學術或應用價值（簡要敘述成果所代表之意義、價值、影響或進一步發展之可能性）、是否適合在學術期刊發表或申請專利、主要發現或其他有關價值等，作一綜合評估。

1. 請就研究內容與原計畫相符程度、達成預期目標情況作一綜合評估

達成目標

未達成目標（請說明，以 100 字為限）

實驗失敗

因故實驗中斷

其他原因

說明：

2. 研究成果在學術期刊發表或申請專利等情形：

論文： 已發表 未發表之文稿 撰寫中 無

專利： 已獲得 申請中 無

技轉： 已技轉 洽談中 無

其他：（以 100 字為限）

兩篇文稿審查中

3. 請依學術成就、技術創新、社會影響等方面，評估研究成果之學術或應用價值（簡要敘述成果所代表之意義、價值、影響或進一步發展之可能性）（以 500 字為限）

1. 研究成果之學術：研究成果可以提供學術界及業者重要之資訊

2. 研究成果之應用價值：研究成果可以提供抗癌新藥之研發的重要資訊