

東海大學理學院化學研究所

碩士論文

氫氘交換質譜分析法分析蛋白質 Cdc42 的活化機制

Hydrogen / Deuterium Exchange Study of Cdc42 Activation

Mechanism

楊勝惟

Sheng-Wei Yang

指導教授: 許員豪 博士

Advisor: Dr. Yuan-Hao Hsu

中華民國 102 年 7 月

July,

2013

## 目錄

目錄.....	I
圖表目錄 .....	III
英文專有名詞縮寫.....	IV
致謝.....	V
中文摘要.....	VI
Abstract.....	VII
第一章 緒論.....	1
1.1 Cdc42.....	1
1.1.1 Rho 家族.....	1
1.1.2 Cdc42 活化機制.....	2
1.1.3 Cdc42 結構.....	5
1.1.4 Cdc42/GMPPCP & Cdc4/GDP 結構之比較.....	8
1.1.5 Cdc42 影響下游反應與相關疾病.....	11
1.2 氫氙交換質譜分析法(DXMS).....	12
1.2.1 電噴灑游離質譜儀(ESI-MS)原理與機制.....	12
1.2.2 氫氙交換原理.....	14
1.2.3 氫氙交換質譜與傳統方法之比較.....	18
第二章 實驗步驟與方法.....	20
2.1 藥品與儀器.....	20
2.2 蛋白質的表達.....	21
2.2.1 蛋白質 IPTG 表達原理.....	21
2.2.2 蛋白質 Cdc42 表達實驗步驟.....	21
2.3 蛋白質純化.....	22
2.3.1 蛋白質利用 GST-Tag 的純化原理.....	22
2.3.2 蛋白質 Cdc42 純化步驟.....	23
2.4 凝膠電泳 SDS-PAGE.....	23
2.4.1 凝膠電泳 SDS-PAGE 實驗原理.....	23
2.4.2 凝膠電泳 SDS-PAGE 實驗步驟.....	24
2.5 基質輔助雷射脫附離子飛行時間質譜(MALDI-TOF Mass Spectrometry).....	25
2.5.1 基質輔助雷射脫附離子飛行時間質譜.....	25

2.5.2	MALDI-TOF MS 實驗步驟.....	26
2.5.3	MALDI-TOF 氫氙交換的實驗步驟.....	26
2.6	ESI-MASS 氫氙交換實驗步驟.....	27
2.7	胃蛋白酶(pepsin)酶切後的片段的確認.....	30
第三章	結果與討論.....	32
3.1	蛋白質的確認.....	32
3.1.1	SDS-PAGE 確認純化蛋白質 Cdc42.....	32
3.1.2	應用 MALDI-TOF MASS 確認純化蛋白質.....	33
3.2	Cdc42 的序列圖.....	35
3.2.1	應用 MALDI-TOF MASS 確認胃蛋白酶(pepsin)酶切的功能.....	35
3.2.2	胃蛋白酶(pepsin)酶切蛋白質 Cdc42 胜肽片段的的身分確認.....	36
3.3	氫氙交換(DXMS)之結果分析.....	38
3.3.1	Cdc42 的氫氙交換質譜圖(DXMS)分析.....	38
3.3.2	GTP 對 Cdc42 氫氙交換影響質譜(DXMS)的分析.....	43
3.4	討論.....	46
3.4.1.	氫鍵與氫氙交換.....	46
3.4.2.	表面電價與氫氙交換.....	48
3.4.3.	B-factor 與氫氙交換.....	49
第四章	結論.....	52
第五章	參考資料.....	54

## 圖目錄

圖 1. CDC42 蛋白質的活化機制.....	4
圖 2. 蛋白質 CDC42 一級結構序列示意圖.....	6
圖 3. 蛋白質 CDC42 一級結構序列.....	7
圖 4. 蛋白質 CDC42 的 X-RAY 結晶結構圖.....	8
圖 5. CDC42 和 GMPPCP(GTP 類似物)、GDP 交互作用的 X-RAY 結晶圖.....	10
圖 6. CDC42 和 CDC42/GMPPCP; CDC42/GMPPCP 和 CDC42/GDP 的 X-RAY 結晶結構比較圖.....	10
圖 7. 電灑游離質譜(ESI-MS)的離子產生的過程圖.....	14
圖 8 蛋白質胜肽的三種型態的氫.....	16
圖 9. 氫氘交換質譜圖.....	17
圖 10. 氫氘交換時間和氘交換量的關係圖.....	17
圖 11. 氫氘交換質譜實驗步驟圖.....	28
圖 12. ESI-MS 和 ESI-MS/MS 參數設定.....	29
圖 13. SDS-PAGE 和 COOMASSIE BLUE 染色確認蛋白質 CDC42.....	33
圖 14. 利用 MALDI-TOF MASS 確認純化的蛋白質 CDC42 蛋白質.....	34
圖 15. 經由 MALDI-TOF MS 確認 PEPSIN- DIGESTED 蛋白質 CDC42.....	35
圖 16 A. HPLC 層析圖 B. ESI-MS1 圖.....	37
圖 17. ESI-MS/MS 圖.....	37
圖 18. 胃切酶酶切的 CDC42 片段序列.....	38
圖 19. 蛋白質 CDC42&CDC42/GTP 的氫氘交換圖.....	41
圖 20. 氫氘交換時間和交換量的關係曲線圖.....	42
圖 21. GTP 影響 CDC42 氫氘交換變化量圖.....	44
圖 22. 經由 X-RAY 結晶結構觀察 GTP 影響 CDC42 氫氘交換變化量圖.....	45
圖 23. 經由 X-RAY 結晶結構觀察 GTP 影響 CDC42 在 3000SEC 的氫氘交換變化量圖.....	45
圖 24. CDC42/GMPPCP & CDC42/GDP X-RAY 結晶氫鍵示意圖.....	47
圖 25. CDC42 表面電價分布圖.....	49
圖 26. CDC42/GTP B-FACTOR 與 DXMS 的比較圖.....	51

## 英文專有名詞縮寫

Cdc42	Cell division control protein 42
MALDI	Matrix-assisted laser desorption/ionization
TOF	Time-of-flight
ESI	electrospray ionization
MS	mass spectrometry
HPLC	high-performance liquid chromatography
LC	liquid chromatography
H/D	hydrogen/deuterium
m/z	mass / charge
TFA	trifluoroacetic acid
ACN	Acetonitrile
CHCA	$\alpha$ -Cyano-4-hydroxycinnamic acid
DTT	Dithiothreitol
GTP	Guanosine 5'-triphosphate
PMSF	Phenylmethylsulphonylfluoride

## 致謝

兩年的生活就這樣過了，原來這就是研究所的生活。想想過去的日子裡，總在夜深人靜時，寫論文的靈感才一一浮現，但是卻字字沉重阿，可能是太安靜了，安靜到想睡了。但終於還是完成了這篇論文，而這篇論文要感謝的人太多了，那就謝天吧(開玩笑)。首先，要感謝指導老師許員豪老師，因為是老師的第一屆學生，所以在實驗方面都是老師親自的技術指導，也不辭辛勞地告訴我邏輯思考和演講口條能力。想起兩年前第一次看到老師，還是在 Skype 上看到，而當時我還睡眼惺忪地開啟視訊，真的有夠糗。感謝口試委員龍鳳娣老師，在研究所的生活裡，會默默的關心我，因為家裡的事情，總會遇到都笑笑的問：我家裡還好嗎？，讓我備感溫暖。感謝口試委員林季千老師在口試時候的寶貴建議，讓這份論文能夠更完善。感謝實驗室一起奮鬥的好夥伴：泓偉學弟、昱任學弟，在實驗忙到分身乏術時，泓偉總是會幫我分擔一些細菌方面的實驗。而在絞盡腦汁的寫論文時，有著三寸不爛之舌的昱任也會時不時的給論文上的建議。當然也感謝專題生朱怡學妹、冠伶學妹、裴芳學妹、子暄學妹、元君學弟、冠逸學弟、義澧學弟，有了你們實驗室多了笑聲，想當初碩一時，老師只有我一個學生的日子，實驗室多麼寂靜阿。

最後，將這篇論文獻給我摯愛的母親，總是在我學生生涯遇到挫折時給我力量，讓我有動力繼續前進，達成目標。

勝惟 凌晨 3:10 于台中

## 中文摘要

氫氘交換分析法(HDX)結合電噴灑質譜儀(ESI-MS)，目前已被廣泛應用於分析蛋白質結構、蛋白質與蛋白質之間的交互作用、蛋白質動力學及蛋白質與配體上交互作用的研究。Cdc42 為 Rho 蛋白質家族中的一種 GTP 水解酶(GTPase)，與 GTP 結合後可形成活化態，與 GDP 結合則失去活性。當呈現活化態時，Cdc42 會與其下游的反應蛋白進行交互作用，啟動許多生物反應。如肌動蛋白的建構、細胞極性、細胞內運輸、轉錄。本研究利用氫氘交換質譜法(DXMS)，分析蛋白質 Cdc42 活化態(Cdc42/GTP)和未活化態(Cdc42)的構型差異。當 GTP 與 Cdc42 上的 P-Loop 結合(序列 7-19)，形成氫鍵時，該區域的氫氘交換量會有明顯的下降。而該結合位周圍的區域也會受到影響，氫氘交換有明顯減少，包含 Switch I、II(序列 27-40 和序列 54-65)。除了 P-Loop、Switch I、II 這三個區域外，尚有其他序列氫氘交換量有明顯下降，如序列 54-65、序列 90-107、序列 125-145、序列 156-168 和序列 171-191。由實驗結果表明了，當 Cdc42 加入 GTP 時，GTP 結合到 P-Loop 區域上導致 Cdc42 有了構型上的改變，而這構型的改變進而使該結合位附近的構型變得較為緊密穩固，並使得 Cdc42 活化。由氫氘交換結果與表面電價比較顯示，當 Cdc42 和 GTP、Mg<sup>2+</sup> 結合時，P-Loop 結合位的氫氘交換量下降，而電價也從負電價轉變為正電價，其周圍的區塊也由負電價轉變為不帶電。而氫氘交換結果與 B-factor 值比較，相較於外圍的區塊約 60 Å<sup>2</sup>，在 P-Loop 區域的 B-factor 值約 40 Å<sup>2</sup>，是屬於較為穩定的區塊。而此較穩定的 P-Loop 區塊相對於氫氘交換結果也是屬於交換量較低的區塊。

## Abstract

Hydrogen/deuterium exchange (HDX) coupled with electrospray ionization mass spectrometry (ESI-MS) has been widely used to analyze the interface of protein-protein interactions, protein conformational changes, protein dynamics and protein-ligand interactions. Cdc42 (cell division cycle protein) is a GTPase which is a member of the Rho family. Like other members of the Rho family, Cdc42 possesses an inactive GDP-bound state and an active GTP-bound state. GTP-bound Cdc42 can bind to and activate downstream effector proteins that are responsible for mediating a diversity of cellular functions, including actin cytoskeletal remodeling, cell polarity, intracellular trafficking, growth, and transcription. In this study, we analyzed the conformational change of Cdc42 upon binding to GTP by hydrogen/deuterium exchange (HDX) coupled with ESI-MS. We also compared HDX of the inactive Cdc42 with the GTP bound form Cdc42. When GTP bound on the P-Loop of Cdc42 and formed hydrogen bonds, the active form was shown to bind GTP in the active site, with significant change in P-Loop. And the binding site around was also affected, it showed a significantly reduced hydrogen-deuterium exchange, including Switch I and Switch II (sequences 27-40 and 54-65 sequence). Besides P-Loop, Switch I and Switch II, there are other sequences showing significantly decreased hydrogen-deuterium exchange, such as residue 54-65, 90-107, 125-145, 156-168, and 171-191. The result of our experiments indicate that GTP binding to P-Loop leads to a conformational change of Cdc42. This conformational change further stabilizes the structure to activate Cdc42. The comparison between the results of the hydrogen-deuterium exchange experiments and surface electrostatic potential showed that GTP·Mg<sup>2+</sup> binding decreased HDX in P-Loop and the charge is shifted from negative



to positive. On the other hand, GTP binding site changes the charge from negative charge to neutral. Moreover, when the result of hydrogen-deuterium exchange compared with B-factor, P-Loop is 40-50 Å<sup>2</sup> that correspond to low hydrogen/deuterium exchange site. In contrast, outside of the binding region was about 60 Å<sup>2</sup> and less stable.



# 第一章 緒論

## 1.1 Cdc42

### 1.1.1 Rho 家族

Rho 家族的 GTP 水解酶 (GTPase) 在酵母菌、果蠅、哺乳動物，多數真核生物體內是非常重要的 [1-3]。Rho 家族的 GTP 水解酶 (GTPase) 會調控細胞骨架中的肌動蛋白絲和細胞間隙的完整性，並且可調控細胞內的訊號傳導路徑。Rho GTP 水解酶 (GTPase) 屬於 Ras 的小型 G 蛋白中 Rho 家族的亞家族成員 [4]。自 1985 年起已經發現共 21 個家族中的成員，分子量約 20~25 kDa，五大族。第一種 Rho 亞家族，包括 RhoA、RhoB 和 RhoC，在序列上具有高度同源性，並在多種細胞中高表達，主要參與壓力纖維 (stress fibers) 形成和粘著斑複合體 (focal adhesion complexes, FACs) 組成；第二種 Rac 亞家族：包括 Rac1、Rac2、Rac3 和 RhoG，促進層狀偽足和胞膜皺褶形成；第三種 Cdc42 亞家族，包括 Cdc42、TC10、TCL、Wrch1 和 chp/Wrch2，其中 Cdc42 促進絲狀偽足形成；第四種 Rnd 亞家族：包括 Rnd1、Rnd3/RhoE 和 Rnd2，可拮抗 Rho 信號通路；第五種 Rho BTB 亞家族，包括 Rho BTB1 和 Rho BTB2，具體功能尚不清楚。而在所有 Rho GTP 水解酶超家族成員中，RhoA、Rac1、Cdc42 是目前研究最多的 Rho GTP 水解酶。Rho 是第一個被發現控制肌動蛋白纖維的聚集促進壓力纖維的形成，此為一種對細胞完整性相當重要的結構和粘著斑複合體；Rac 則是調節血漿膜中的肌動蛋白絲以產

生層狀偽足(Lamellipodia)和膜的皺褶;而 Cdc42 主要是能誘導線狀足的形成[5]。

這三種蛋白質已被發現會出現在內皮細胞中,也被證實出現在細胞中的許多反應以及能夠調節真核生物的功能,包含了肌動蛋白的細胞骨架重組、細胞極性的建立[6]和細胞生長[1, 3, 7-10]而衍生的細胞活性,也包含了細胞運輸、抑制細胞凋亡[11]、轉錄激活、胞飲、(細胞)內吞作用、胞內運輸[1-3, 12]等。

### 1.1.2 Cdc42 活化機制

Cdc42 為小型的 G-蛋白質。相似於其他小型的 GTP 水解酶(GTPase),有三種蛋白質可以直接調控 Cdc42 的活性,參與其活化機制。第一種為鳥糞嘌呤核苷酸交換因子(guanine nucleotide exchange factors, GEFs),是用來催化 GDP 還原成 GTP 使 Cdc42 成活化狀態。第二種為 GTP 水解酶活化蛋白(GTPase activating proteins, GAPs),促進 GTP 水解,使 Cdc42 失去活性。第三種為鳥糞嘌呤核苷酸分解抑制劑(guanine nucleotide dissociation inhibitors, GDIs) [13, 14]。負責誘導失去活性的 Cdc42-GDP 移動到細胞膜上,之後 GDIs 會脫離,使 GTP 能夠結合而活化[15]。

其中 G-蛋白質的 G,指的即是 GTP (Guanine TriPhosphate),而 G-蛋白質是指可與 GTP 與 GDP 結合之蛋白質。Cdc42 在其活化狀態下與 GTP 結合[16, 17],而在去活化狀態下則與 GDP 結合[18, 19]。GEFs 會將去活化態 Cdc42 分子打開[20],讓 GDP 可以從 Cdc42 釋放出來,此時 Cdc42 可與其他分子結合。而在細

胞中 GTP 遠多於 GDP，所以 GTP 便會與 Cdc42 結合，並且活化 Cdc42。Cdc42 接著又與下游的作用分子反應，引發細胞內一連串，如：細胞骨架建立、細胞極性、細胞增殖，甚至到細胞轉錄、生長等現象[21]。Cdc42 並不會一直處於活化狀態，Cdc42 切下 GTP 末尾的一個磷酸根，使 GTP 轉換為 GDP，此時 Cdc42 便與 GDP 結合而失活。另外細胞內一些會幫助 GTP 分子水解的蛋白質，這些蛋白質即 GTP 水解酶活化蛋白(GTPase activating proteins, GAPs)，其功能為水解 Cdc42 上結合的 GTP 轉換為 GDP，也能使 Cdc42 不會一直處在活化狀態。總結 Rho GTP 水解酶之活化機制週期：便是 Cdc42，Rac 及 Rho。接著在其 GDP 結合態下，Rho GTPases 與鳥糞嘌呤核苷酸分解抑制劑(guanine nucleotide dissociation inhibitors, GDIs)結合，抑制了由 GEFs 所引發之 GDP 釋放。上述這些蛋白質活化之結果導致細胞中反應，如 Cdc42 誘發形成一種狀突出物，可用於感測胞外環境的線狀足(flopodia)產生，Rac 蛋白質刺激形成一種當運動時可以看到細胞膜皺折瓣狀足 (lamellipodia)，而 Rho 則刺激形成耐壓力纖維[22]。

上述的過程還不是 Cdc42 蛋白質作用途徑的全部，尚有另一個層次的調控機制。為了使 Cdc42 能夠再次被活化，它必須被栓在細胞膜上，Cdc42 的 C 端會被加上一個脂肪酸分子 geranylgeranyl group，此步驟稱為異戊間二烯化作用(isoprenylation, isoprenylated at its carboxy terminus)，這個分子便能插入細胞中，Cdc42 也就不會任意移動[23]。然而 Cdc42-GDP 結合態會和 GDIs 結合，此時上述脂肪酸分子無法插入細胞膜中。不過當 GDIs 被磷酸化(phosphorylation)時，例

如：被蛋白質激酶 C 酵素(Protein Kinase C)磷酸化，因此釋出 Cdc42，而 Cdc42 便能藉著 C 端上的特殊官能基結合在細胞膜上。於是 GEFs 使栓在細胞膜的 Cdc42 釋出 GDP，GTP 分子便得以鍵結到 Cdc42 結合位上而活化 Cdc42。活化態的 Cdc42 可與許多後續的聯結分子作用，引發各種生物反應。接著 GTP 會被 GTP 水解酶活化蛋白(GAP)及 Cdc42 本身之 GTPase 水解，使 Cdc42 上的 GTP 成為 GDP，Cdc42 進入去活化的狀態。與 GDP 結合之 Cdc42 又可再一次與 GDIs 結合[24]，自細胞膜釋出並回到細胞質中，如此一個新的循環又得以開始，如圖 1[12]。

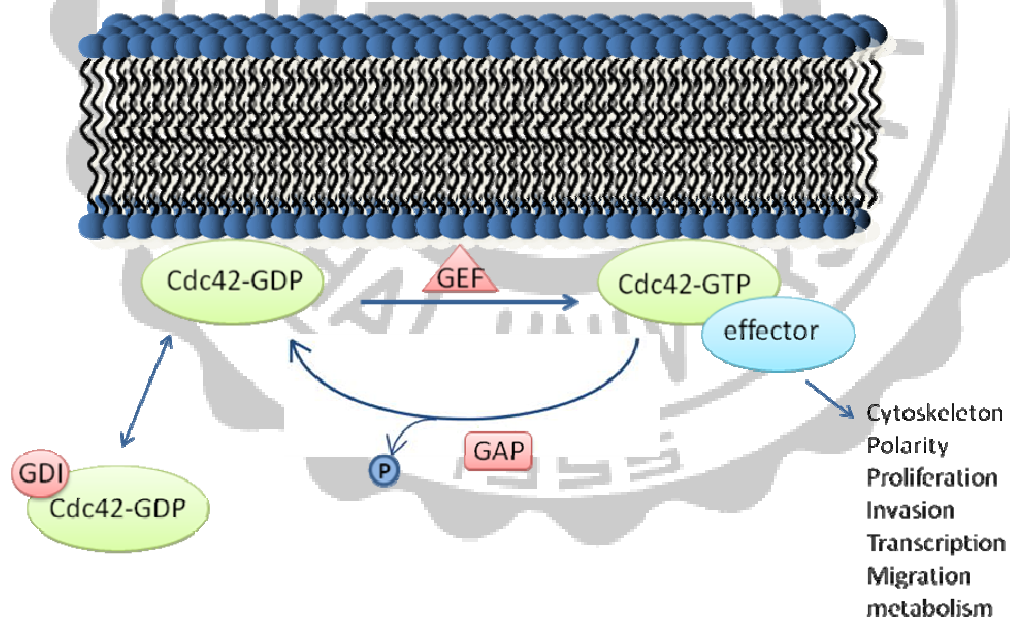


圖 1. Cdc42 蛋白質的活化機制

Cdc42 會受到 GTP 的活化，以及三種蛋白質的影響：第一種是鳥糞嘧磷核苷酸交換因子(guanine nucleotide exchange factors, GEFs)；第二種是 GTP 水解酶活化蛋白(GTPase activating proteins, GAPs)；第三種是鳥糞嘧磷核苷酸分解抑制劑蛋白

質(guanine nucleotide dissociation inhibitors, GDIs)。此機制的活化會引發下游的反應，如：細胞骨架建立、細胞極性、增殖、轉錄。

### 1.1.3 Cdc42 結構

Cdc42 的大小為 21 kDa，由 191 個胺基酸所組成。蛋白質 Cdc42 的結構相似於 Ras 和其他 Rho 家族中的小型 GTP 水解酶。一般 GTP 水解酶(GTPase)結構中包含了 5 個  $\alpha$ -helices，6 個  $\beta$ -strands 與兩個高機動性的(highly mobile)的開關區域 Switch I、II 如圖 2 [25, 26]。在 Cdc42 結構中的 5 個  $\alpha$ -helices，分別是序列 18-24 為  $\alpha_1$ ，序列 65-71 為  $\alpha_2$ ，序列 91-104 為  $\alpha_3$ ，序列 141-148 為  $\alpha_4$ ，序列 166-176 為  $\alpha_5$ ；而 6 個  $\beta$ -strands 則是序列 3-9 為  $\beta_1$ ，序列 10-14 為 P-Loop，序列 41-46 為  $\beta_2$ ，序列 50-53 為  $\beta_3$ ，序列 77-86 為  $\beta_4$ ，序列 110-114 為  $\beta_5$ ，序列 154-158 為  $\beta_6$  [27]。而 Switch I(序列 30-38)區域是位於  $\alpha_1$  和  $\beta_2$  環狀區域(loop)之間，Switch II(序列 60-67)區域則是位於  $\alpha_2$  和  $\beta_3$  環狀區域(loop)之間，如圖 3。在上述結構中有三個重要的區域:P-Loop、Switch I、Switch II。文獻中，Cdc42 已被證實會和 GMPPCP(GTP 類似物)交互作用，形成氫鍵。此段區域為序列 10-17，因其會與 GMPPCP 上的磷酸形成氫鍵，所以命名 P-Loop [28]。這序列中 Gly15、Lys16、Thr17、Cys18 是 4 個主要的胺基酸，會和 GMPPCP 上的  $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$ -磷酸產生氫鍵。其中 Gly15、Lys16、Cys18 和  $\beta$ -磷酸形成氫鍵；Thr17 則和  $\gamma$ -磷酸形成氫鍵。另外 Thr17 會和鎂離子形成配位的效應，讓整個 P-Loop 區域趨於穩定的狀態。並

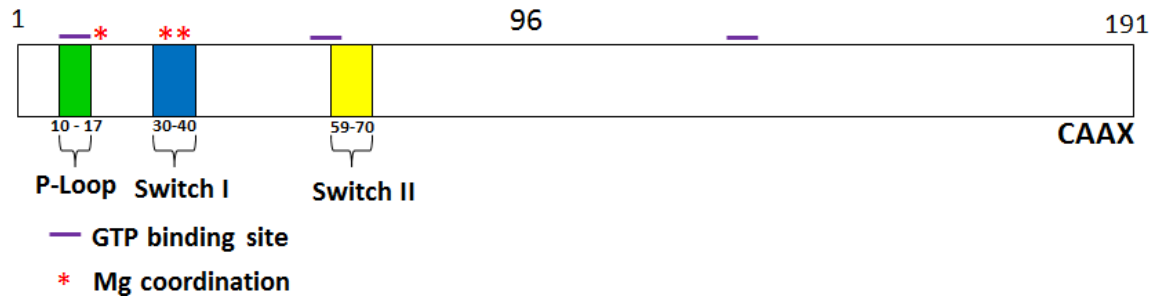


圖 2. 蛋白質 Cdc42 一級結構序列示意圖

分子量大小 21 kDa，由 191 個胺基酸組成，其中重要的區域有:P-Loop 區域(綠色)、Switch I 區域(藍色)、Switch II 區域(黃色)。紫色實線是 GTP 鍵結部位。P-Loop 最主要和 GTP 鍵結的區域，而 Switch I、II 是 Cdc42 活化後和下游反應蛋白交互作用的區域，C 端有一個 CAAX 序列。

且 P-Loop 中的一段序列 G-X-X-X-X-G-K-T，稱為 Walker motif A，一般會與核苷酸結合的特殊序列[29]。Switch I、II 則受到 GMPPCP 與 P-Loop 交互作用的影響，序列中胺基酸也會和 GMPPCP 產生部分的氫鍵。在 Switch II 的部分，分別在 Gly60、Gln61 會與  $\gamma$ -磷酸有氫鍵的交互作用。在 Switch I 中 Thr35 也會和  $\gamma$ -磷酸形成氫鍵。此外，Switch I、II 這兩個區域已被證實和下游的反應蛋白有關聯。在 Cdc42 結構中，其他序列也會受到 GTP 影響而有所改變，如 Thr115、Gln116、Asp118、Ala 159、Leu160 這五個胺基酸。而其中 Thr115、Asp118、Ala159 與 Leu160 這四個胺基酸為靠近 GMPPCP 上的鳥糞嘌呤(Guanine)，而結合形成氫鍵。Thr116 則是與 GMPPCP 上的核苷酸作用。另外，在 C-末端則有一個重要的 C-A-A-X 胺基酸序列，藉由 farnesyltransferase 或

geranylgeranyltransferase，在此段序列的 cysteine 接上 farnesyl group 或 geranylgeranyl group，此過程稱為 prenylation，經由 prenylation 能使 Rho 蛋白質嵌在細胞膜上[30, 31]。在 Cdc42/GDP 未活化態的位置上，雖然結構非常相似，但因 GDP 只有兩個磷酸，所以氫鍵形成上有些許的不同。在 P-Loop 上，有 5 個胺基酸會和 GDP 交互作用，分別為 Ala13、Gly15、Lys16、Thr17、Cys18。其他結構序列部分則分別有 Phe28、Gln116 會有氫鍵的形成。



圖 3.蛋白質 Cdc42 一級結構序列

由 191 個胺基酸組成，結構中包含了 5 個  $\alpha$ -helices 和 6 個  $\beta$ -strands。其中序列 10-17 為 P-Loop，序列 30-40 為 Switch I，序列 59-70 為 Switch II，C 端有一個 CAAX 序列。



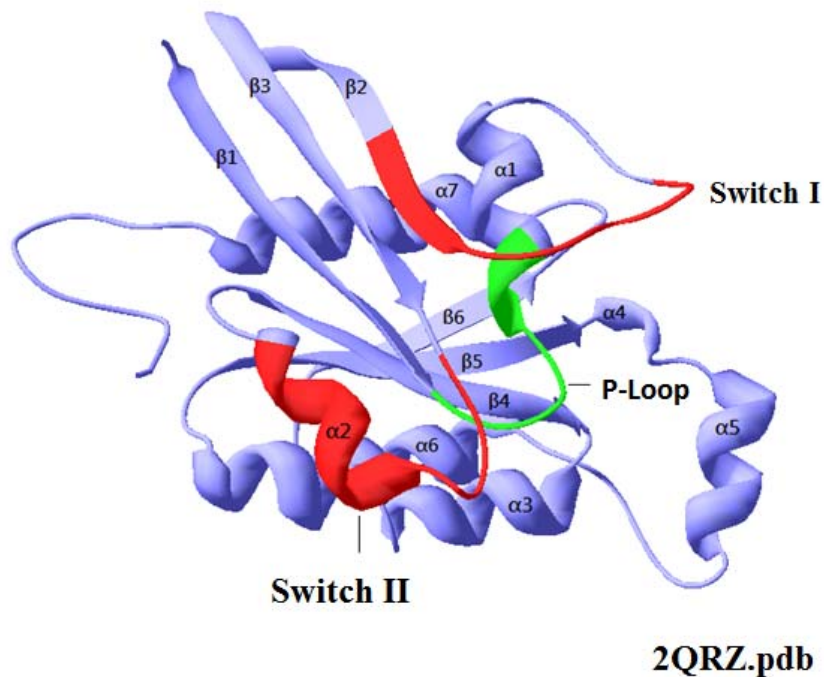


圖 4. 蛋白質 Cdc42 的 x-ray 結晶結構圖

結構中包含了 6 個  $\alpha$ -helix 和 7 個  $\beta$ -strands。序列 10-17 為 P-Loop(綠色)；序列 30-40 為 Switch I(紅色)；序列 59-70 為 Switch II(紅色)。

#### 1. 1. 4 Cdc42/GMPPCP & Cdc4/GDP 結構之比較

在文獻中，大型 G-蛋白質 X-ray 結晶的研究中，GTP/GDP 結合比較中，發現 Switch I、Switch II 區域的結構上有所改變[32, 33]。而小型 G-蛋白質結構類似於 G-蛋白質，也會在 Switch I 和 Switch II 區域有所變化。文獻中印證了小型的 G-蛋白質的確是於 Switch I、Switch II 區域有所改變[28]。先前內容提到的，Cdc42 因為和 GTP 鍵結而活化，和 GDP 鍵結而失去活性。Cdc42 的 X-ray 結晶是結合 GTP 的類似物-GMPPCP(guanylyl  $\beta$ ,  $\gamma$ -methylene-diphosphonate)[28](假定的活化狀態)。

由圖 5 觀察出，結構 P-Loop、Switch I、和 Switch II 這三個區域有非常重大的改變，藉由結合 GMPPCP 到 P-Loop 區域，使得此結合位附近的區塊也受到影響，結構上有所改變，此變化可能是作為下游蛋白質專一性的辨識。另外除了這三個區域以外，還包含了最外圍的  $\alpha 5$  區域在結構上變得較為整齊。從結構中表示出，Cdc42 在與 GMPPCP 交互作用前後，蛋白質 Cdc42 (Cdc42-GMPPCP) 的結構有所改變，變得較為緊實，如圖 6.A，紅色的結構為 Free-Cdc42 為較鬆散的結構。而灰色為 Cdc42/GMPPCP 的結構，相較之下較為整齊緊密。但是在 Cdc42/GMPPCP 和 Cdc42/GDP 的 X-ray 結晶結構的比較中，卻發現 Switch I、Switch II 沒有明顯的變化，如圖 6.B。在文獻中，發現當不同蛋白質(PAK、ACK、WASP)和 Cdc42 反應的時候，其 Switch I、II 結構會有構型上的變化[34]。所以從活化態到和下游蛋白質反應，可能利用不同蛋白質造成結構上的變化，進一步的和下游蛋白質產生反應。

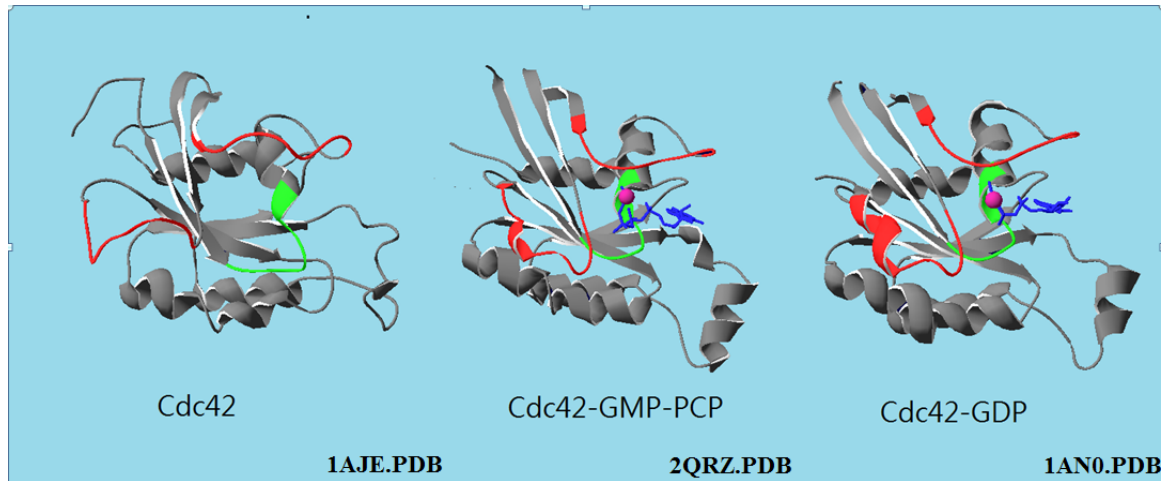


圖 5. Cdc42 和 GMPPCP(GTP 類似物)、GDP 交互作用的 x-ray 結晶圖

相較於加入 GMPPCP 和 GDP 的結構，未活化態的 Cdc42 結構較為鬆散，而 Cdc42/GMPPCP 和 Cdc42/GDP 則較為緊實。而變化最大的區域在 P-Loop、Switch I、II 和  $\alpha 5$ 。

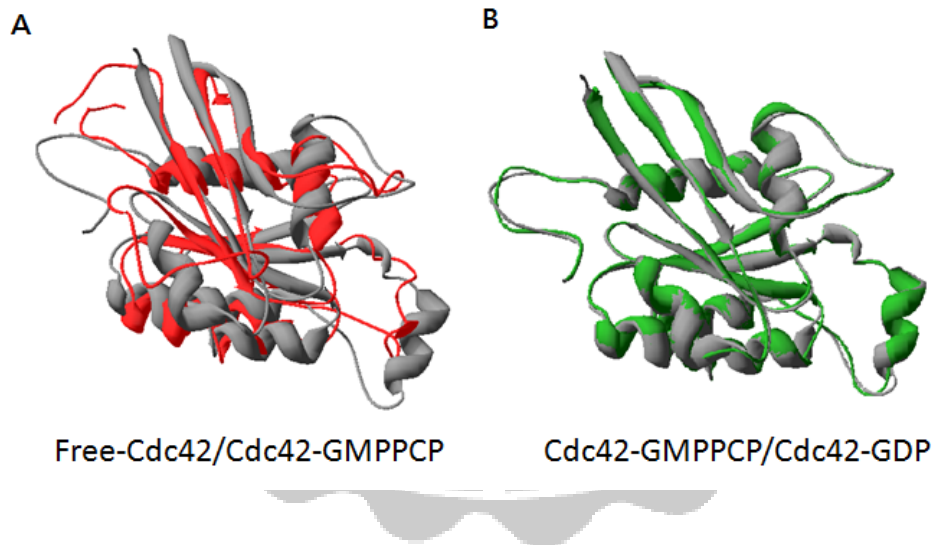


圖 6. Cdc42 和 Cdc42/GMPPCP；Cdc42/GMPPCP 和 Cdc42/GDP 的 x-ray 結晶結構比較圖

紅色為 Cdc42 結構；灰色為 Cdc42/GMPPCP 的結構；綠色為 Cdc42/GDP 結構。

### 1.1.5 Cdc42 影響下游反應與相關疾病

根據研究指出，Cdc42 的活性可調節造血幹細胞(HSC)的衰老和活性[35, 36]。過去科學家普遍認為造血幹細胞的衰老由細胞內部某種機制控制，無法通過治療干預。研究人員發現，在衰老過程中，提高造血幹細胞中的小 Rho GTP 水解酶 Cdc42 的活力可以促進造血幹細胞的衰老，使衰老的造血幹細胞失去極性。而利用藥物去抑制 Cdc42 的活性，衰老的造血幹細胞活性重新恢復，極性的造血幹細胞佔所有衰老細胞的比例也增加。結果說明了 Cdc42 的表達量與衰老成正相關[36-38]。

Cdc42 的過度表現與細胞之癌化也有關係[39-41]。在咽喉癌的研究中發現，Cdc42/Rac1 會參與端粒酶(telomerase)活性的轉錄後控制，發現蛋白質激酶 C-z (PKCz)會調控在咽喉癌中的端粒酶(telomerase)，而 Cdc42 會調節 C-z (PKCz)的活性。在研究中治療咽喉癌可以利用對抗 Cdc42/Rac1 而產生抑制端粒酶的效果[40]。

在基底細胞癌(Basal cell carcinoma, BBC)的研究中，也發現癌細胞和 Cdc42 息息相關[42]。基底細胞癌是屬於皮膚癌的一種，是老年人最常出現的皮膚癌類型。利用免疫組織化學法和西方點墨法分析 15 個正常人皮膚(normal skin, NS)和 30 個基底細胞癌(Basal cell carcinoma, BBC)患者的鈣黏著素 E(e-cadherin)和 Cdc42 的表達，30 個基底癌細胞中包含 10 個表面型，9 個節結型和 11 個滲透型。發現相較於 NS 型的 BBC 型有低表達的鈣黏著素 E(e-cadherin)和高表達的 Cdc42。而且在 BBC 中，鈣黏著素在滲透型比在表面型和節結型的更低。而鈣黏著素是一種細胞與細胞之間的黏附分子，正常的上皮細胞與細胞之間有大量的

鈣黏著素，在鈣離子的協助下將彼此緊密的抓在一起。Cdc42 的升高造成鈣黏著素(E-cadherin)的減少可能會打斷黏著機制和使細胞失去極性。使癌細胞穿過正常角質細胞的功能，導致癌細胞擴散[43-46]。

Cdc42 在哺乳動物肝臟中的作用及影響[47, 48]。利用肝臟 2/3 切除手術模型，研究了 Cdc42 基因敲除對肝損傷后再生過程的影響。Cdc42 在對照小鼠肝臟部分切除后的 3 小時至 24 小時顯著激活，證明其參與了肝臟再生過程。而在缺失 Cdc42 蛋白後，小鼠肝臟的再生能力明顯下降，主要表現為肝重回復的延遲。對分子機理的研究進一步顯示在肝再生過程中，缺失 Cdc42 的小鼠肝臟 DNA 合成水平顯著下降，並且細胞周期因子的表達以及數條與 Cdc42 相關的重要生長信號通路（如 ERK、JNK 和 p70S6K）的激活發生延遲。此外，Cdc42 的缺失還影響了脂肪轉運蛋白 ABCA1 的細胞內定位，造成肝再生過程中脂肪代謝的異常。此項研究揭示了 Cdc42 在肝臟再生過程中擔負的重要功能，Cdc42 在肝細胞中的功能調控是一個復雜的網絡，可能涉及到多種不同的細胞內功能和復雜的信號分子通路，對這些問題的闡釋對於我們更深入理解肝臟的生理功能和發病機理具有重要的指導意義。

## 1.2 氫氣交換質譜分析法(DXMS)

### 1.2.1 電噴灑游離質譜儀(ESI-MS)原理與機制

電噴灑游離質譜(ESI-MS)的離子產生的過程分為三部分，如圖 7。帶電液滴的形成、帶電液滴的揮發和爆裂、氣相多價電荷離子的產生。又稱為霧化、去溶

劑、游離。帶電液滴的形成是以低流速將分析物溶液推送至不銹鋼毛細管前端，並施加一正高電壓，而不銹鋼毛細管的前端受到正高電壓的形成的電場影響下，使得溶液在流出毛細管尖端時，因溶液中具有負電荷之離子會往正電場方向移動，使得溶液在流出出口端時表面會累積過多正電荷，而當溶液會因水的高表面張力及電荷密度導致不穩定而將溶液以帶電荷的液滴方式噴灑出來。也就是當管口液滴所累積的庫倫斥力大於液滴本身的表面張力時，會以電噴灑的方式，以霧狀型態噴灑出。帶電液滴的揮發、爆裂是隨著帶電液滴中溶劑分子的快速揮發，液滴會逐漸變小，相對使得電荷的數目維持不變的液滴中電荷密度增大。當達到一定的密度時，電荷的庫倫排斥力大於液滴的表面張力時，此帶電液滴便會再度爆裂而形成更小的帶電液滴，此過程反覆進行，便會形成氣相離子。氣相多價電荷離子的產生是電噴灑游離法可以產生具多價電荷的氣相離子，游離過程目前有兩種可能的游離機制：一是 Dole 的單一離子理論，另一個是 Iribarne 與 Thomson 等人的離子揮發理論[49]。單一離子理論是結合揮發和庫倫排斥力兩種力的關係所得的結果。帶電液滴在被噴灑出來後，因為溶劑不斷揮發，液滴中電荷數沒有減少，液滴表面的庫倫排斥力相對增加，造成液滴的爆裂。離子揮發理論是在一滴的飛行過程中，經由一連串的揮發與爆裂到了一定程度時，帶電液滴中的分析物因為液滴表面的同性電荷排斥力變大而被排出液滴之外，同時部分帶電液滴的表面的電荷也會隨著分析物離開液面，進而被游離成帶多價電荷的氣相離子。

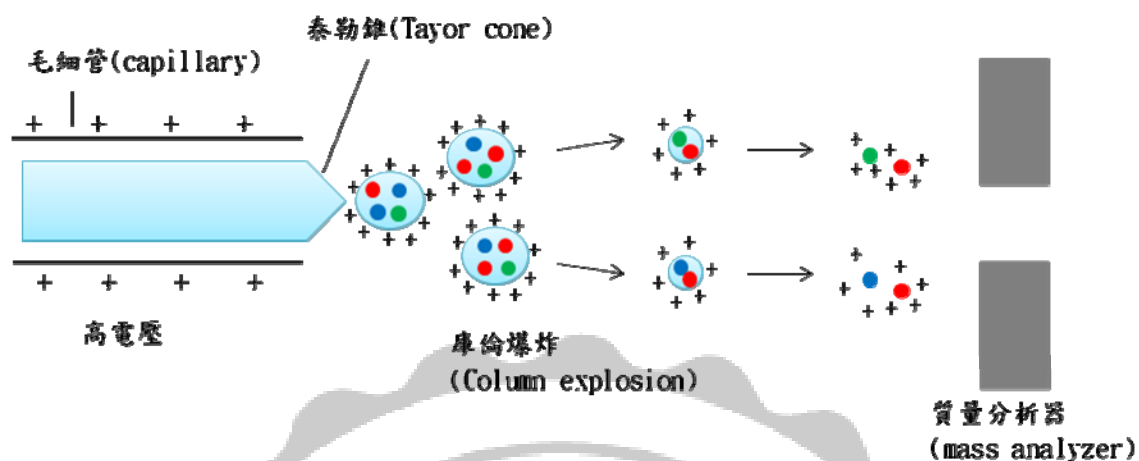


圖 7.電灑游離質譜(ESI-MS)的離子產生的過程圖

分成三個過程: (1) 帶電液滴的形成(2) 帶電液滴的揮發、爆裂(3) 氣相多價電荷離子的產生。

### 1.2.2 氫氘交換原理

氫氘交換(Amide H/D exchange)結合質譜儀的發展廣泛的應用在分析蛋白質結構上的改變[50]、蛋白質蛋白質之間的交互作用[51]、和在溶劑可接觸性(solvent accessibility)的動力學上的表現[52]。氫氘交換的方法分析蛋白質在不同功能狀態下，提供了關於特定區域結構上和功能上的變化的訊息。氫氘交換法結合質譜儀，可以進一步的瞭解，蛋白質特定區域的結構靈活度(flexibility)和溶劑的可接觸性。

原理是將蛋白質浸入重水(D<sub>2</sub>O)的溶液下，讓蛋白質上的氫和氘交換，每交換一個氘進去，其分子量會多一個 Da。不同原子上的氫，會因為環境或鍵結特

性的不同，而有不同的交換速率。一般來說，蛋白質包含了三種型態的氫。第一種為蛋白質主鏈結構  $\alpha$ -碳上的氫是幾乎不交換，因為交換的速率太慢，以至於無法觀察出它的變化量；第二種為側鏈 R 基上的氫交換速率最快，基本上，氫和氘一直處於交換狀態，由於交換速率過快，屬於不穩定的氫，而且蛋白質側鏈上氫的數目會因為不同胺基酸而有所差異，所以無法進行觀察、比較；第三種為醯胺基(amide group)氮上的氫，其氫氘交換速率介於主鏈上  $\alpha$ -碳上和側鏈 R 基之間，屬於多肽(polypeptide)主鏈上的一環(proline 例外，proline 沒有醯胺基上的氫)，而多肽鏈是二級結構中  $\alpha$ -螺旋， $\beta$ -折疊的一部份，所以可以藉由在醯胺基(amide group)上的氫，觀察出結構的變化。醯胺基在蛋白質內部核心部位的氫氘交換緩慢，反之在表面的氫則交換快速，因此藉由不同的氫氘交換值，可以提供不同的結構訊息，交換快的代表開放的或非折疊的(unfolding)結構，交換慢的代表剛硬(rigid)的或折疊的(folding)結構。因此主要是藉由觀察醯胺基的氫氘交換變化量，來探討蛋白質的三度空間結構，如圖 8。



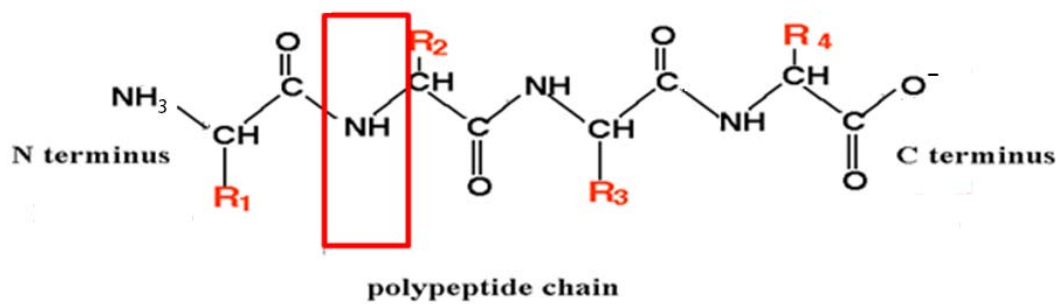


圖 8 蛋白質胜肽的三種型態的氫

在  $\alpha$ -碳上的氫為交換速率幾乎不進行交換；在側鏈 R 基上的氫為交換速率最快；醯胺基(amide group)氮上的氫交換速率則介於  $\alpha$ -碳和 R 基之間，是主要觀察氫氘交換變化的地方。紅色框則為醯胺基。

### 測量氫氘交換的變化

以質譜儀(ESI-MS)偵測完成氫氘交換後的質量，藉由同位素分布的比例差異，得到氫氘交換的變化量，進而推測蛋白質構型上的變化。蛋白質氫氘交換時間增加，質譜上偵測的質量也會位移(shift)，如圖 9(紅色為平均質量)。訊號位移(shift)的多寡，說明氫氘交換的速率，通常暴露於結構外面的序列區域，氫氘交換速率較快，位移較多；而位於蛋白質內部核心的序列區域，氫氘交換速率較慢，位移較少。另一個造成交換速率不同的原因是當可交換位置上的氫參與分子內氫鍵的形成，氫鍵的形成，變得更不容易與環境中的氘接觸來產生氫氘交換的現象。通常得到氫氘交換質譜圖的變化後，會將氫氘交換的變化量和時間作圖，如圖 10，作為分析數據的關係圖。以曲線的斜率高低，判斷在此序列氫氘交換

在不同狀態中的變化。

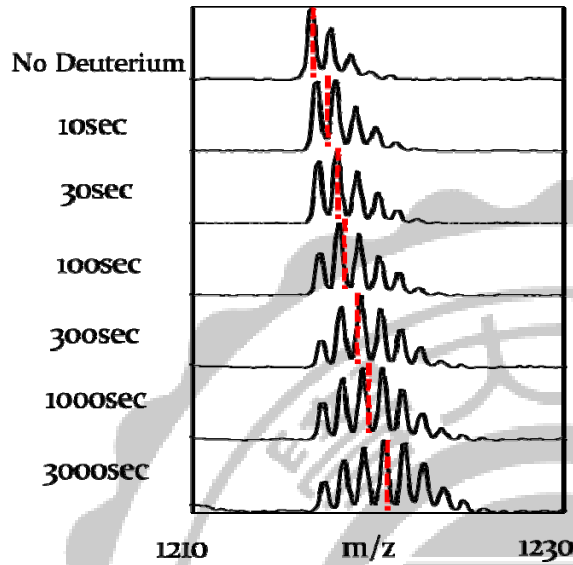


圖 9. 氘氣交換質譜圖

質譜偵測出來的其中一個質量。質量隨著氘氣交換的時間增加，而有所位移。紅色虛線為訊號峰的平均質量，以平均質量的位移，來判斷氘氣交換的量。

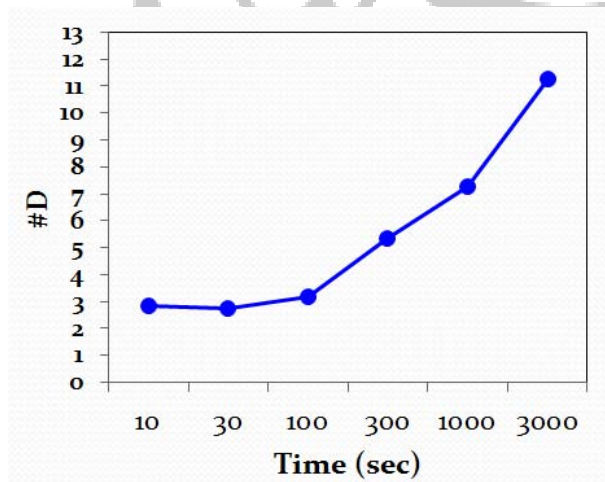


圖 10. 氘氣交換時間和氘交換量的關係圖

X 軸為交換時間，Y 軸為氘交換量。質譜圖的平均質量變化量，與氘氣交換時間的關係圖。

### 1.2.3 氫氙交換質譜與傳統方法之比較

在傳統上用於研究蛋白質三度空間結構分析的方法包含各式的光譜法，如 X-射線結晶繞射法(X-ray)、圓二色圖譜(circular dichroism, CD)、UV/VIS 光譜法，螢光光譜法，以及核磁共振光譜法(NMR)等方法。光譜法必須使用高濃度的蛋白質溶液再藉由蛋白質分子的吸收或是放射光譜而間接推論蛋白質結構以及其構形變化。以螢光光譜為例，主要是利用蛋白質分子特定的胺基酸所放出的螢光訊號作為偵測，由於這些胺基酸的螢光訊號，如波長、螢光強度會受到其所處的化學環境影響。

X-射線結晶法和 NMR 雖然可以提供蛋白質分子更細部的三度空間結構的消息，但是卻又受限於當分析樣品為非極性蛋白質或是蛋白質中有非極性的部分無法得到結晶，而無法以 X-射線得到蛋白質分子全部或是部分的結構訊息。此外，X-射線結晶繞射法必須把蛋白質以結晶方式測定，此時蛋白質所處環境為固相晶體，因此以此種分析法得到的蛋白質結構與真正存在於水溶液中的結構可能會有些許的差距，而且當分析物與蛋白質無法順利結晶時，便無法以 X-射線結晶法的方式分析蛋白質結構。NMR 則因為所需分析時間長且需要大量的樣品與高純度來進行分析才能有好的結果，且所能分析的蛋白質分子僅侷限於分子量小於 30 kDa。

氫氙交換質譜法雖然無法直接提供像 X-射線結晶及 NMR 所得的蛋白質

三度空間細部結構訊息，但是藉由與其他方法的結合，而間接證實蛋白質的精確分子量與部分結構訊息。質譜分析蛋白質的優點是能以微量就可分析所需蛋白質樣品，且分析物的分子量大小並不受限制。在蛋白質中僅存在短暫的特殊結構變化，也可以迅速被偵測出來。而分析對象不受蛋白質分子極性的影響，且分析的時間較短較快速。最重要的是分析時蛋白質處於與生物體環境相同的液相中，並非結晶分析時所處的固相，所以利用氫氙交換質譜法更接近於生物體的表現。



## 第二章 實驗步驟與方法

### 2.1 藥品與儀器

#### 藥品

1. Alpha-Cyano-4-hydroxycinnamic acid(CHCA)購於 Sigma 公司，存放於 4°C。
2. Glutathione Agarose:購於 Thermo 公司，存放於 4°C。
3. Pepsin immobilized 6% agarose beads 購於 Thermo 公司，存放於 4°C。
4. Thrombin:購於 Calbiochem 公司，存放於-20°C。
5. Deuterium oxide(D<sub>2</sub>O)，純度為 99.9%以上，購於 CIL(CAMBRIDGE ISOTOPE LABORATORIES)公司，存放於 4°C。
6. Guanosine-5'-triphosphate (GTP)購於 CAIBIOCHEM 公司，存放於-80°C。
7. LB broth；購於 LAB 公司，存放於 25°C。
8. Triton X100 購於 Calbiochem 公司，存放於 25°C。
9. Lysozyme 購於 Bio Basic Inc.公司，存放於-20°C。
10. SDS 購於 Calbiochem 公司，存放於 25°C。

#### 儀器

基質輔助雷射脫附質譜儀(MALDI-TOF MS)-Bruker Microflex

電噴灑質譜儀(ESI-MS)-Bruker Esquire 6000

高壓液相層析儀(HPLC)-HITACH autosampler L2200, pumpL2310

## 2.2 蛋白質的表達

### 2.2.1 蛋白質 IPTG 表達原理

常態下，由於缺乏乳糖，抑制蛋白會和操作子結合，形成競爭型抑制，因此 E.coli RNA polymerase 無法結合至操作子上，加入 IPTG 和抑制蛋白結合，藉由改變其構型，抑制物失去結合操作子的能力，讓 E.coli RNA polymerase 能夠接上操作子，將後續的 T7 基因轉錄，再經由轉譯生成 T7 RNA polymerase。原本影響 T7 啟動子後續轉錄的抑制蛋白，同樣也受到 IPTG 的影響，而無法干涉基因的轉錄，T7 RNA polymerase 得以參與轉錄步驟，目標基因便能進行轉錄、轉譯，產生目標蛋白質。

### 2.2.2 蛋白質 Cdc42 表達實驗步驟

秤量 12.5 g 的 LB Broth 粉末到 500 ml 的純水中，混合均勻放入滅菌釜中滅菌，滅菌 20 分鐘，冷卻至室溫 40 分鐘，總共約 1 小時。加入 500  $\mu$ l Ampicillin (1mg/ml)到培養液中，混合均勻。取其中 5ml 的培養液到 15ml 離心管中，放入含有 Cdc42 質體的細菌培養，然後放到 37°C 培養箱中培養 16 小時。把 5 ml 小量培養的細菌倒入 500 ml 的培養液中以 37°C 再培養約 3 小時。然後使用 UV 偵測  $A_{600nm} = 0.6$ ，表示已到達了一定的細菌數，用乾淨的培養液當作 blank  $A_{600nm} = 0$ ，加入 2 mM 的 IPTG 進行表達，在 37°C 培養 3 小時。3 小時後，取出菌液分裝到四個離心管中，以 10,000 x g，0°C 離心 20 分鐘，把我們要的細菌離

心到底部。之後取出在底層的細菌，冷凍置-80°C中，等到要使用時再取出。最後使用過細菌的器皿必須以漂白水消毒。

## 2.3 蛋白質純化

### 2.3.1 蛋白質利用GST-Tag 的純化原理

GST標記蛋白(GST-Tag fusion protein)是使用 glutathione S-transferase (GST) 與glutathione的親和特性進行重組蛋白質純化。先選擇含glutathione S-transferase 基因的載體(vector)，並將重組蛋白質的基因接在GST基因後方製作出glutathione S-transferase (GST)-fusion protein。Glutathione在進行蛋白質純化前預先結合在凝膠珠上作為glutathione-Agarose resin，當帶有GST標記的蛋白(GST-fusion protein) 通過glutathione-Agarose resin時，GST-Tag與glutathione會產生親和性反應，並結合在glutathione coated resin上，此時未含GST的蛋白質會通過resin並使用wash buffer達到純化目的。最後在elute步驟中放入含有free glutathione 的elute buffer，就能使GST-protein 脫離resin 並溶解於elute buffer。GST-Tag由220個胺基酸組成，分子量約為26KDa，相對於His-Tag(6 histidine)來說相當巨大；在一般載體的GST-Tag 後方常會先接上凝血酶(thrombin)切點，在純化的GST-fusion protein 的過程中可使用凝血酶(thrombin)切除GST-Tag 並使GST-Tag留在管柱中，最後elute 將得到不含GST-Tag的重組蛋白。

## 2.3.2 蛋白質Cdc42純化步驟

將細菌加入 GST binding buffer(25 mM Tris pH 7.5、150 mM NaCl、1 mM EDTA、2 mM PMSF)，再加入 0.1%的 Triton 和 1 mg/ml 的 Lysozyme，混合均勻。放入-80°C 冷凍 1 小時。待解凍後，上下搖動混合均勻，使其變成液態狀。使用超音波(sonication)在冰上震盪 30 秒重複 5 次，每次中間間隔 30 秒。然後放入離心機以 10000 rpm, 0°C，離心 20 分鐘，收集上清液加入 1 ml 的 GST Agarose beads 進行鍵結。GST Agarose beads 先以 GST binding buffer 潤洗三次，然後以 4°C 鍵結 3 小時。3 小時之後，將 GST Agarose beads 以 2000 rpm 0°C 離心 10 分鐘，將凝膠珠以 GST binding buffer 潤洗三次，把 beads 表面非 GST tag 蛋白質洗去。之後加入 400  $\mu$ l 的 GST elute buffer 和 20  $\mu$ l(10 unit)的凝血酶(Thrombin)，在 4°C 中進行 1 小時的酶切。之後以 2000 rpm, 0°C，離心 1 分鐘，取上清液並加入 2 mM 的 DTT。而 GST Agarose beads 加入 400 $\mu$ l elution buffer: (1M Tris pH 8.0, 50 mM Glutathione)，以 Glutathione 取代 GST，此步驟在室溫 5 分鐘。最後加入 1ml 酒精，保存至-20°C。

## 2.4 凝膠電泳 SDS-PAGE

### 2.4.1 凝膠電泳 SDS-PAGE 實驗原理

蛋白質分子所帶的淨電荷，由環境pH值所決定，在蛋白質分子結構中，胺基酸上的胺基及酸基個別擁有一帶電基團，然而界定蛋白質分子帶的淨電荷，即



由此胺基及酸基的解離所決定，如果當環境pH值大於pI值時，蛋白質分子帶負電，那當pH值大於pI值則相反。製膠時，上膠的Stacking gel，pH值就滴定在 6.8，而下膠的Separating gel，pH值則滴定成8.8，這些pH值上的差異性，在電泳過程中扮演非常重要角色，當Sample 滴入膠片且加上電場後，Running buffer中的Glycine(其pI=6.8)在Stacking gel中為中性不帶電，帶負電的氯離子，因外加電壓而快速向下移動，Glycine和氯離子之間產生離子空乏區，此區域會被Sample取代(形成band)，當Glycine緩慢離開Stacking gel，之前和氯離子形成的離子空乏區瞬時瓦解，而Sample也離開Stacking gel，到達Separating gel，蛋白質分子開始以其分子量、電荷等因素泳動。

#### 2.4.2 凝膠電泳 SDS-PAGE 實驗步驟

乾浴機溫度設定95℃，取5 μl樣品加入15 μl的水，再加入5 μl的sample buffer混合均勻。之後配製SDS-PAGE上、下膠(下膠-H<sub>2</sub>O 10.05 ml、1.5 M tris-HCl 7.5 ml、10%(w/v)SDS 0.3 ml、Acrylamide/Bis-acrylamide 12 ml、10%(w/v)ammonium persulfate(APS) 0.15 ml、TEMED 0.02 ml;上膠-H<sub>2</sub>O 3.35 ml、1.5 M tris-HCl 2.5 ml、10%(w/v)SDS 0.1 ml、Acrylamide/Bis-acrylamide 4 ml、10% (w/v) ammonium persulfate(APS) 0.05 ml TEMED 0.0066 ml)。配完等待凝固，等待凝固的同時，將樣品放入乾浴機中加熱5分鐘進行變性(denature)，5分鐘後把蛋白質標準ladder和加熱完畢的樣品分別快速注入膠片裡槽，以避免蛋白質擴散。上膠的電源供應器

設定為80伏特；下膠的電源供應器設定為100伏特，約反應3小時，注意避免Dye front落入跑液中。之後把膠片取出，用大量的清水沖洗，倒入適量的浸泡染色液Comassie blue，並確定蓋過膠片，進行染色1小時。染完色之後倒去染液，加入水褪染，Comassie blue stain solution褪染時間約為一天。

## 2.5 基質輔助雷射脫附離子飛行時間質譜(MALDI-TOF Mass Spectrometry)

### 2.5.1 基質輔助雷射脫附離子飛行時間質譜

近年來，質譜被廣泛的用在生物領域、生化領域、和醫學領域方面。而基質輔助雷射脫附離子飛行時間質譜法在 1985 年由德國科學家 Michael Karas 和 Franz Hillenkamp 共同提出。MALDI-TOF 就是其中一種。其理論上和設計上，都是十分簡單有效的。基質輔助雷射脫附離子飛行時間質譜儀，簡稱：MALDI-TOF。MALDI-TOF 質譜儀由兩部分組成：基質輔助雷射脫附(MALDI)，飛行時間質譜(TOF)。原理是先將分析樣本 Cdc42 片段與基質混和行成共結晶的固態薄膜(此基質具有高度吸收雷射能量特性)，用雷射照射，此時基質會吸收雷射能量，之後傳遞給樣品，使樣品成帶電的游離狀態，而這些帶電的離子在電場的作用下，通過飛行管道，到達偵測氣的先後與其質量以及電荷有關，質量小、電荷大者，越快抵達。因此可以經由飛行時間計算出各個離子的質量電荷比(m/z)，而繪製出質量電荷比(m/z)與其所對應的強度(intensity)的質譜圖，以進行

質譜資料的分析。

## 2.5.2 MALDI-TOF MS 實驗步驟

取 2 $\mu$ l 的蛋白質 Cdc42(6 mg/ml)，用 50 $\mu$ l 得胃蛋白酶(pepsin)進行酶切 (digest)。胃蛋白酶凝膠珠以 0.1 % TFA 潤洗三次，進行活化。酶切以 30 秒震盪一次，持續 5 分鐘，全程在冰上。之後以 30 秒 0 $^{\circ}$ C 2000rpm 離心去除凝膠珠，取上清液。樣品 Cdc42 和基質以 1 $\mu$ l:1 $\mu$ l 的比例混和進行樣品點盤。放置等待風乾成固態狀，如果是氫氣交換則必須以幫浦快速抽乾，最後放入 MALDI-TOF 質譜進行偵測。

## 2.5.3 MALDI-TOF 氫氣交換的實驗步驟

首先，將含有緩衝液的 D<sub>2</sub>O ( 50 mM Tris pH 7.5、125 mM NaCl、2mM DTT) 加入 2  $\mu$ l Cdc42 (6mg/ml)，進行氫氣交換，氫氣交換反應必須保持在 25 $^{\circ}$ C，pH 7.5。氫氣交換反應，分別在 7 個時間點: 0 秒、10 秒、30 秒、100 秒、300 秒、1000 秒、3000 秒，加入 180  $\mu$ l 0.1% ，0 $^{\circ}$ C 的 trifluoroacetic acid (TFA) Quench buffer 到蛋白質 Cdc42 中，終止氫氣交換的反應，此時 pH 為 2.5。把七點已氫氣交換完的蛋白質 Cdc42 樣品，加入胃蛋白酶凝膠珠(pepsin agarose beads)進行酶切，以 0.1% TFA 潤洗三次，進行活化。此酶切過程 5 分鐘，每 30 秒震盪一次，

全程在冰上進行。最後把樣品以 30 秒，2000 rpm，0°C 離心去除凝膠珠，終止酶切反應。樣品必須放置乾冰中快速冷凍，待要測量時解凍。樣品 Cdc42 和基質以 1ul:1ul 的比例混和進行樣品點盤，金屬盤必須預冷。利用抽氣幫浦快速抽乾，最後放入 MALDI-TOF MASS 進行偵測。

基質為 5mg/ml  $\alpha$ -Cyano-4-hydroxycinnamic acid (CHCA)，溶液 1:1 的 0.1% TFA pH 2.5、acetonitrile 的混和溶液。基質 1 $\mu$ l 與蛋白質 Cdc42 樣品 1ul 快速混合，點盤至 4°C 的 MALDI-TOF 鋼製樣品盤上面，利用真空幫浦抽乾，使其達到固體結晶狀，最後進到 MALDI-TOF MS 裡面進行偵測，獲得數據。利用 Bruker Daltonics flexAnalysis 2.4 進行數據分析和校正。

## 2.6 ESI-MASS 氫氣交換實驗步驟

首先，將含有緩衝液的 D<sub>2</sub>O (50 mM Tris pH 7.5, 125 mM NaCl, 2mM DTT) 加入 2 $\mu$ l Cdc42 (6mg/ml)，進行氫氣交換，氫氣交換反應必須保持在 25°C，pH 7.5。氫氣交換反應，分別在 7 個時間點:0 秒、10 秒、30 秒、100 秒、300 秒、1000 秒、3000 秒，加入 180  $\mu$ l 0.1% 0°C 的 trifluoroacetic acid(TFA) Quench buffer 到蛋白質 Cdc42 中，終止氫氣交換的反應，此時 pH 為 2.5。把七點已氫氣交換完的蛋白質 Cdc42 樣品，加入胃蛋白酶凝膠珠(Pepsin Agarose beads)進行酶切，以 0.1% TFA 潤洗三次，進行活化。此酶切過程 5 分鐘，每 30 秒震盪一次，全程在冰上。最後把樣品以 30 秒，2000rpm，0°C 離心去除凝膠珠，終止酶切反

應。樣品必須放置乾冰中快速冷凍，待要測量時再解凍。不同於 MALDI-TOF 實驗，ESI-MS 分析時，利用 HPLC  $C_{18}$  進行分離，分離後直接流入 ESI-MS 進行偵測，最後得到數據，如圖 11。全程必須在  $0^{\circ}\text{C}$  進行。

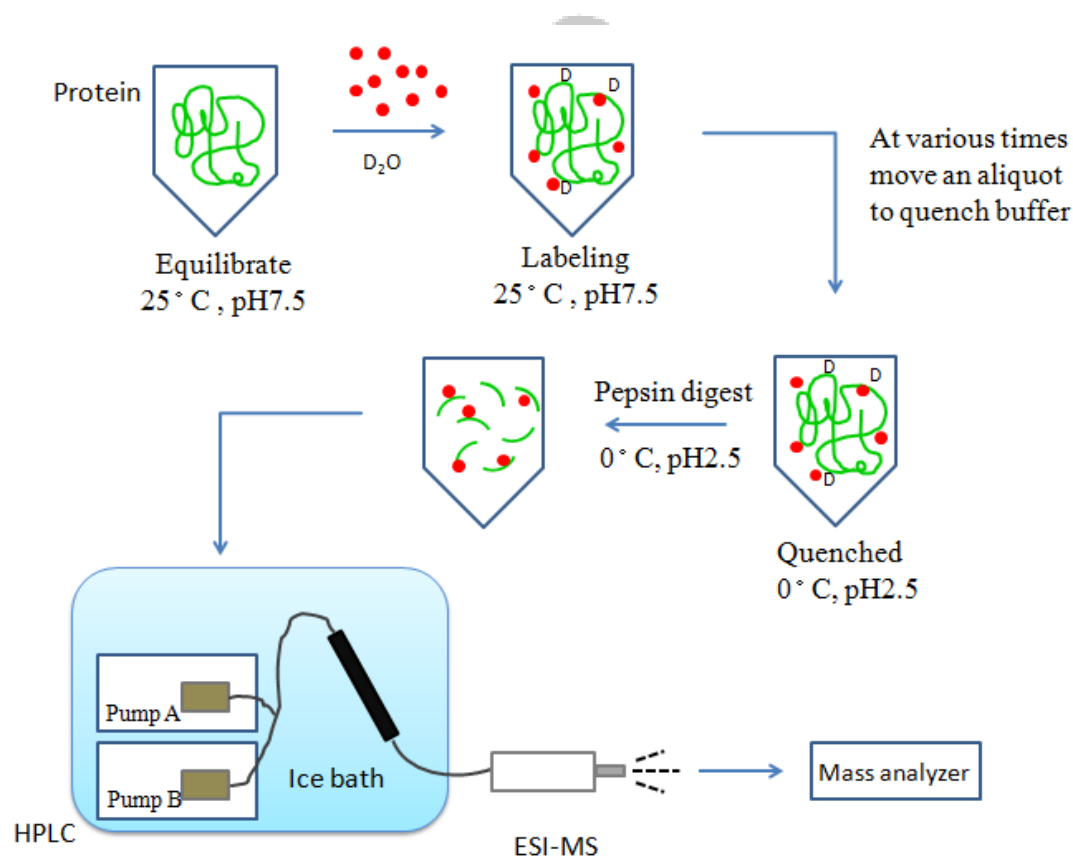


圖 11 氫氣交換質譜實驗步驟圖

將蛋白質 Cdc42 加入  $\text{D}_2\text{O}$  進行氫氣交換反應，以 0.1% TFA 終止反應，將蛋白質以胃蛋白酶快速酶切成肽片，HPLC 分離以質譜偵測得到數據。

<b>ESI-MS 設定</b>		
設定	數值	單位
Nebulizer	25	Psi
Dry gas	8	L/min
Dry Temp.	325	°C
Mass range	400-2000	m/z
Target mass	1800	m/z
Target (MS2/MS1)	50000/20000	m/z
Flow Rate	0.1	mL/min
<b>ESI-MS/MS 設定</b>		
No. of Precursor Ion	8	
Threshold Abs	5000	
Excluded after	2	Spectra
Release after	2	min
SPS		
Active exclude		

圖 12. ESI-MS 和 ESI-MS/MS 參數設定

## 2.7 胃蛋白酶(pepsin)酶切後的片段的確認

2 $\mu$ l 的蛋白質 Cdc42(6  $\mu$ g/ $\mu$ l)，加入 198  $\mu$ l 0.1% TFA。以 50 $\mu$ l 的胃蛋白酶 (pepsin Agarose beads)進行五分鐘的酶切，每 30 秒震盪一次。使用胃蛋白酶之前，以 0.1% TFA pH 2.5 潤洗三次，全程 0 $^{\circ}$ C。樣品以 30 秒 0 $^{\circ}$ C 2000 rpm 離心去除凝膠珠。使用 HPLC C<sub>18</sub> 進行分離。A 溶劑為 0.1 % TFA，pH 2.5，B 溶劑為 80 Acetonitrile (ACN)。線性梯度從 0% - 100% 的 B 溶劑和 100%-0%的 A 溶劑流 40 分鐘，流速為 0.1 ml/min。分離後直接進 ESI-MS 做蛋白質胜肽的二次裂解 (MS/MS)。質譜得到的 MS/MS 數據以 DataAnalysis 開啟，設定 AutoM(n)中的 Compound detection: Intensity threshold 5000, Maximum Number of 1000, Retention Time Window 0.1, 後以 Compound-AutoMS(n)計算。完成後以 Biotoools 軟體開啟，設定電價為+1，此步驟重複+2、+3，得到的數據中可能包含+1、+2、+3 的訊號，所以理論計算出的也必須包含+1、+2、+3 才能夠比對。之後放入 Cdc42 序列檔案 Cdc42.sqs。設定 Pepsin 的切點，在 Enzyme definition sequence 中的 after cut 輸入 A,C,D,E,F,G,H,I,K,L,M,N,P,Q,R,S,T,V,W,Y，Pepsin 是 nospecific 的切點。Not allowed 輸入 P，除了 Proline 不做酶切，完成 Pepsin 切點的設定。接著設定 Error(Da)2.5，MSMS error 2.5，limit mass range m/z 400-2500，進行 MS/MS 比對。比對完後，數據全部複製以 excel 開啟，將沒有比對成功的刪除，再儲存為文字檔。開啟 HDexamer 軟體，輸入 Cdc42 序列檔案 Cdc42.fasta，開啟 MS/MS 文字檔 Cdc42.txt，選定四個參數 Charge、Sequence、RT、Score。以上設定好後，將

時間點 0s、10s、30s、100s、300s、1000s、3000s 的 MS1 數據匯入計算。計算完後，將分數小於 0.8 和重複的 peaks 留分數最高者其餘刪除。之後再一次計算 HDexamer，得到最後比對完的序列位置確認。





## 第三章 結果與討論

### 3.1 蛋白質的確認

#### 3.1.1 SDS-PAGE 確認純化蛋白質 Cdc42

首先為確定所表達的蛋白質在實驗過程中有表現，所以利用 glutathione resin 專一性帶有 GST 標記(GST-Tag)的蛋白質鍵結，如圖 13。5 號分子量大小約 46 kDa，和 GST-Cdc42 大小相同，所以可以確定蛋白質的表達，並且鍵結到 glutathione agarose beads 上。第二，確認凝血酶(Thrombin)是否有進行酶切的反應，在目標蛋白上有特定的凝血酶的切點。6 號是加入凝血酶到 GST-Cdc42，進行酶切反應之後的結果。經由比對，6 號的分子量約 25 kDa，和 GST 之分子量大小相符合，所以可以確認凝血酶有進行酶切的動作，將目標蛋白質從凝膠珠上面切下。最後，確認純化出的目標蛋白質是 Cdc42 蛋白質。2 號是先前實驗純化出的 Cdc42，和 3、4 號相互比對，發現分子量大小皆為 21 kDa。所以 3 號和 4 號沖提下來的蛋白質是目標蛋白 Cdc42(圖 13)。而我們使用 MALDI-TOF MS 做進一步的確認。

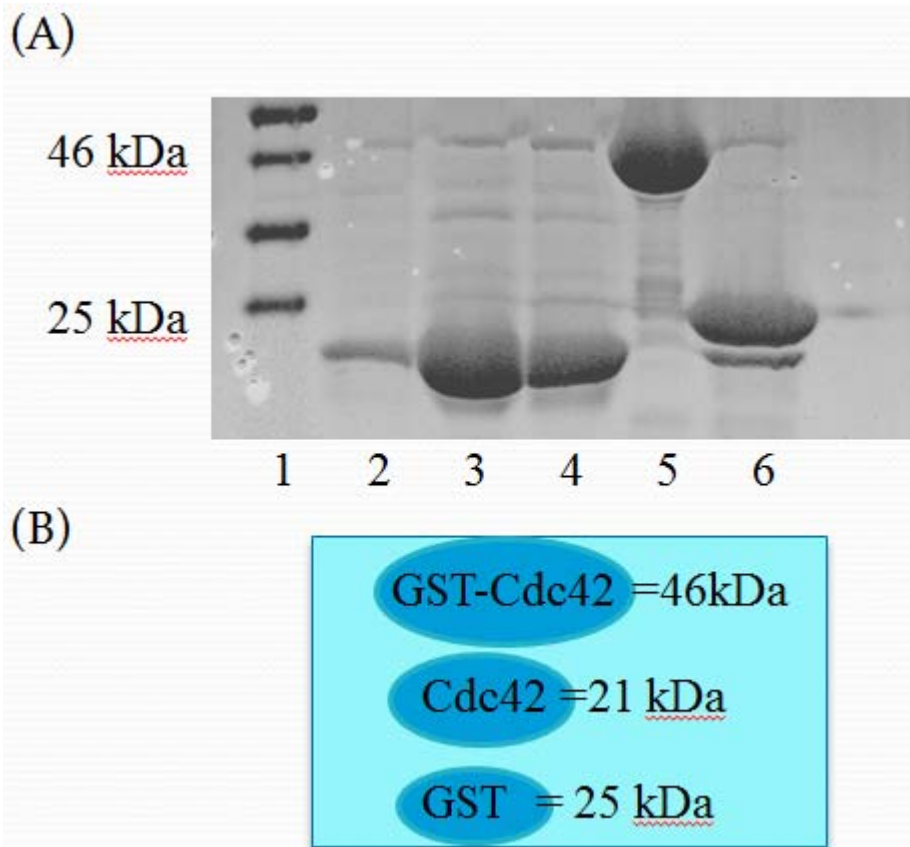


圖 13. SDS-PAGE 和 Coomassie blue 染色確認蛋白質 Cdc42

利用 glutathione crosslinked resin 將帶有 GST 標記(GST-tag)的目標蛋白純化出來。GST-Cdc42 分子量大小 46 kDa；GST 分子量大小 25 kDa；Cdc42 分子量大小 21kDa。將未知的蛋白質樣品進行凝膠電泳(SDS-PAGE)的測試。使用 Coomassie blue 染色。1 號是標準分子量(standard ladder)；2 號是標準的 Cdc42 band；3 號是純化過程中洗出(elute)的 Cdc42；4 號是純化洗出(elute)的第二次 Cdc42；5 號為 GST 和 Cdc42 鍵結後的凝膠珠(GST-Cdc42)；6 號是加入凝血酶(Thrombin)酶切完的凝膠珠。

### 3.1.2 應用 MALDI-TOF MASS 確認純化蛋白質

利用 SDS-PAGE 確認純化的目標蛋白 Cdc42 後，接著再以 MALDI-TOF 質譜進行重複確認，由質譜儀偵測的質量確定蛋白質 Cdc42。由圖 14 得知，偵測

到兩個訊號峰:一個為  $m/z$  10830，另一個為  $m/z$  21699。質譜圖中  $m/z$  21699 為一價蛋白質 Cdc42。另一個訊號峰  $m/z$  10830 則是 Cdc42 的二價電荷所得到的訊號峰，約一價電荷質量的一半( $21699/2$ )。經由 MALDI-TOF MASS 確認純化的目標蛋白質為 Cdc42。

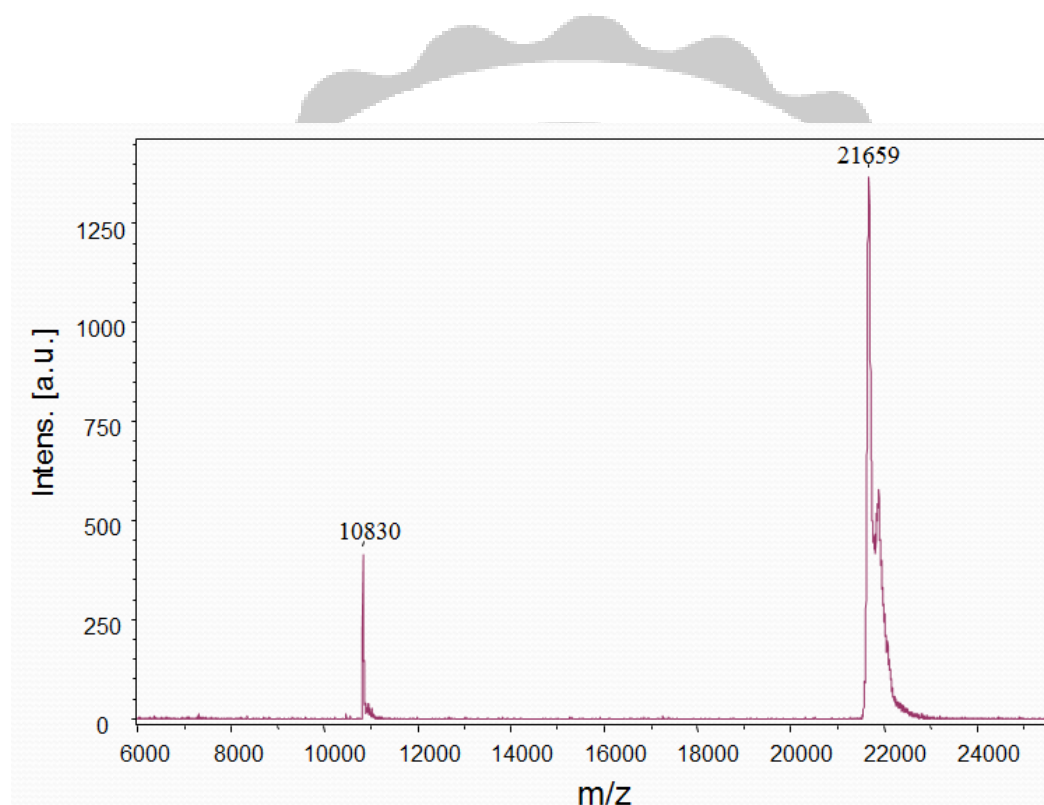


圖 14.利用 MALDI-TOF MASS 確認純化的蛋白質 Cdc42 蛋白質

X 軸為質量( $m/z$ )，Y 軸為相對強度(intensity)。偵測到兩個訊號峰:分別為  $m/z$  21659、10830。 $m/z$  21659 為一價 Cdc42 的質量； $m/z$  10830 為二價 Cdc42 的質量。此實驗使用的基質是 SA(Sinapinic Acid)，15 mg 粉末加入 500  $\mu$ l ACN 與 500  $\mu$ l 0.1% TFA。

## 3.2 Cdc42 的序列圖

### 3.2.1 應用 MALDI-TOF MASS 確認胃蛋白酶(pepsin)酶切的功能

在進行氫氙交換實驗前，必須先確認胃蛋白酶的效用，所以我們使用純化出的蛋白質 Cdc42，在酸性條件下進行胃蛋白酶酶切的步驟。將蛋白質 Cdc42 加入胃蛋白酶切成小的胜肽片段後，利用基質輔助雷射脫附游離質譜儀(MALDI-TOF)進行偵測。如圖 15。胃蛋白酶將蛋白質 Cdc42 切成許多胜肽片段，這些 Cdc42 片段分子量大小分佈的質量範圍在 1000 到 3000 之間。分別為  $m/z$  1077、 $m/z$  1271、 $m/z$  1706、 $m/z$  1792、 $m/z$  1869、 $m/z$  1992、 $m/z$  2127、 $m/z$  2334、 $m/z$  2932、 $m/z$  2734 等等的訊號峰。

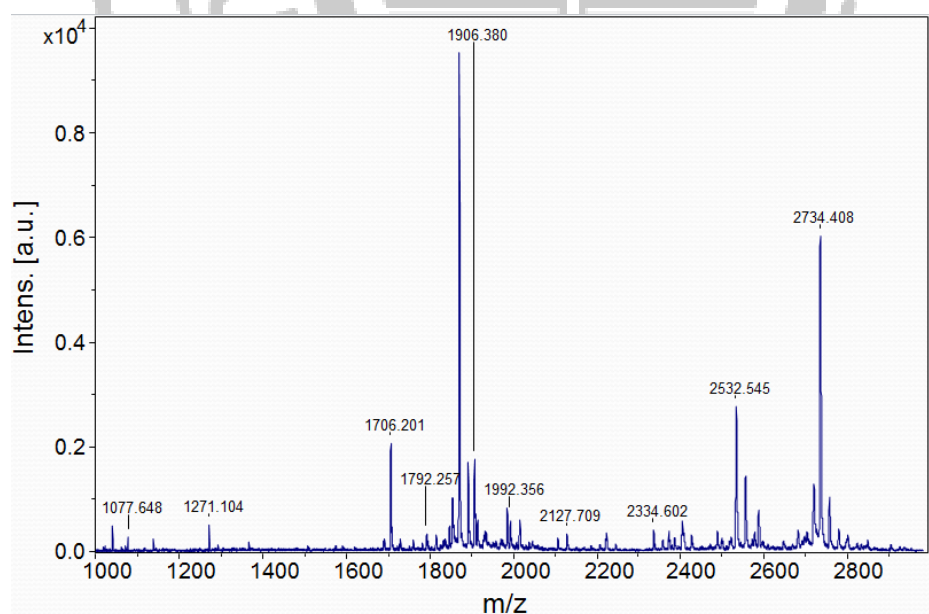


圖 15. 經由 MALDI-TOF MS 確認 Pepsin- digested 蛋白質 Cdc42

X 軸為質量( $m/z$ )，Y 軸為相對強度(Intensity)，胜肽片段質量在 1000 至 3000 之間。

### 3.2.2 胃蛋白酶(pepsin)酶切蛋白質 Cdc42 胜肽片段的身分確認

在進行氫氘交換實驗前，我們必須確認每一個由質譜儀偵測到的胜肽片段在序列中的正確位置。將蛋白質 Cdc42 進行酶切步驟之後，進入 HPLC 進行分離，如圖 16A，為 HPLC 層析圖，圖 16B 為 ESI-MS 在時間點 33~37 的訊號峰。而利用串聯式質譜儀(ESI-MS/MS)進行胜肽的身分確認，圖 17 為 ESI-MS/MS 的圖，以二次裂解(MS/MS)方法做比對，得到正確的胜肽序列位置。由圖 18 得知，蛋白質 Cdc42 由 191 個胺基酸組成，總共有 74 個立的胜肽序列確認出來，整體的序列覆蓋率為 91%。而實線部分是作為後續氫氘交換實驗分析的序列部分，虛線則是有確認出序列身分並且得到氫氘交換結果的部分，但因為序列覆蓋範圍太小或重疊的序列太多，所以後續的圖沒有放入比對及參考。

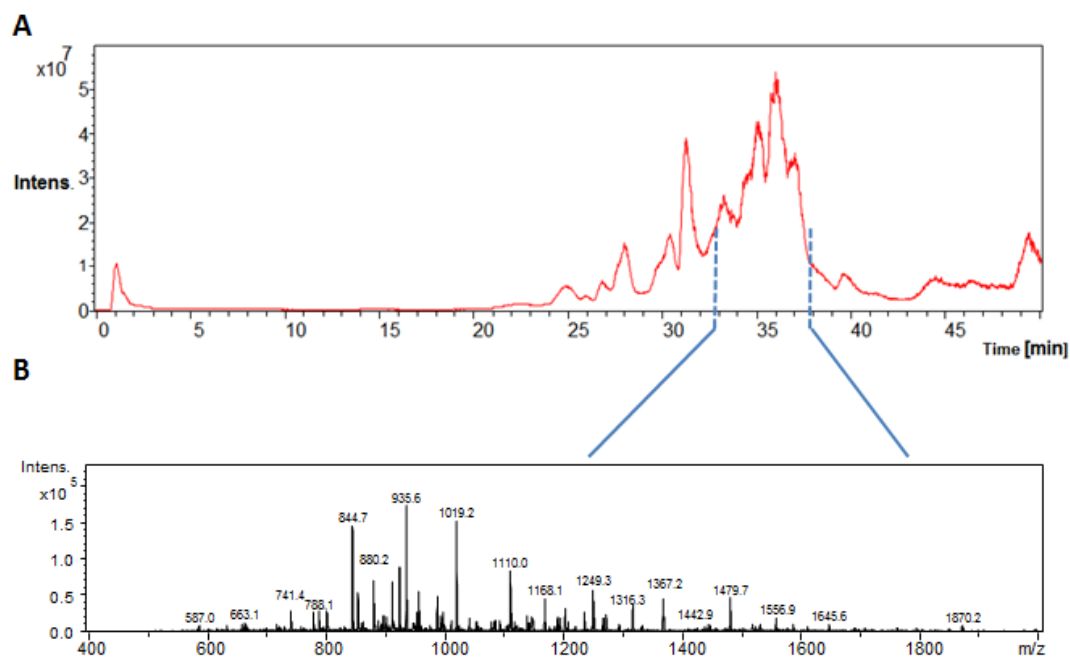


圖 16 A. Cdc42 序列片段的 HPLC 色層分析圖 B. Cdc42 序列片段的 ESI-MS1 圖

A 溶液是 0.1% TFA，B 溶液是 80% ACN。梯度為 40 分鐘從 100% A 液到 100% 的 B 溶液。大部分的訊號在 20-40 分鐘之間出現。

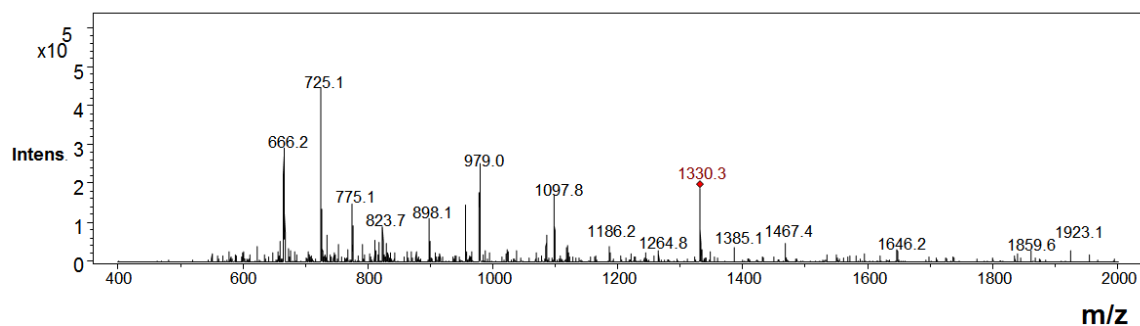


圖 17. Cdc42 經由 ESI-MS/MS 二次裂解訊號圖

利用 ESI-MS 進行 MS/MS 的二次裂解偵測。此圖是其中一根訊號峰(m/z 1331) 經過 2 次撞擊後的圖譜。

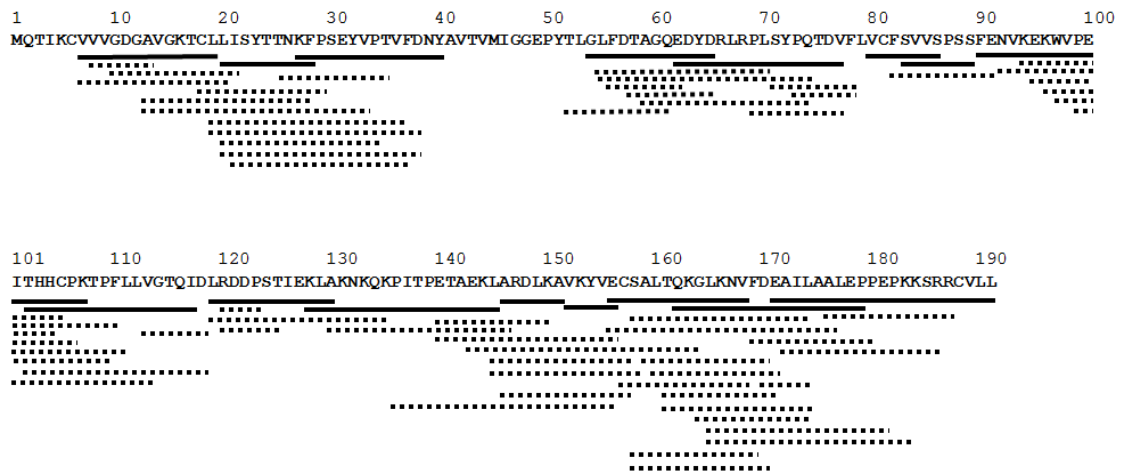


圖 18.胃切酶酶切的 Cdc42 片段序列

利用胃蛋白酶(pepsin)進行酶切，切成胜肽片段。胜肽的序列確認是經由串聯式質譜儀(ESI-MS/MS)做比對確認。結果總共有 73 個胜肽片段產生並確認序列位置，而序列總覆蓋率為 91%。實線部分是作為我們後續氫氣交換實驗分析到的序列部分，虛線則是有確認出序列身分並且得到氫氣交換數據。

### 3.3 氫氣交換(DXMS)之結果分析

#### 3.3.1 Cdc42 的氫氣交換質譜圖(DXMS)分析

將蛋白質 Cdc42 加入  $D_2O$ ，進行氫氣交換的實驗。氫氣交換時間範圍從 10s-3000s 和 86400s，86400s 作為完全氫交換(full deuteration)。氫氣交換反應溫度為  $25^{\circ}C$ ，pH 7.5 的情況下進行，終止反應的 Quech buffer 則為  $0^{\circ}C$  pH 2.5 的 0.1% TFA。氫氣交換百分率用顏色表示，偏深藍色(<10%)為低氫氣交換率；偏深紅色(>90%)為高氫氣交換率，如圖 19。首先，單獨將 Cdc42 進行氫氣交換實驗，觀察在最初氫氣交換時間點 10s 的時候，序列 54-65 和序列 80-86 的氫氣交換率較低，小於 20%。其餘序列部分，則介於 30-60%的交換量。而在氫氣交換

時間點最長的 3000s 的時候，除了序列 148-151 和序列 152-156 小於 60% 以外，幾乎全部的序列氫氙交換率都超過 70%。將 Cdc42 加入 2mM  $Mg^{2+}$  和 1mM GTP 進行氫氙交換實驗(圖 19)，發現相較於 Cdc42 的情況下，全部的序列氫氙交換率都下降，而在最初氫氙交換時間點 10s 的時候，氫氙交換率小於 20% 的有序列 7-19、序列 54-65、序列 62-77、序列 80-86 和序列 165-168，而在氫氙交換時間點最長的(3000s)的時候，超過 70% 的交換率的，只剩下序列 102-117。而我們將 Cdc42 和 Cdc42/GTP 的氫氙交換圖利用氫氙交換時間和交換量的曲線圖(圖 20) 做比較，藍色曲線是只有 Cdc42，而紅色曲線是 Cdc42-GTP。

在 P-Loop 區域，序列 7-19 在加入 GTP 時，時間點 10 sec 的差異 8%，差異性不大，但隨著氫氙交換時間增加，氫氙交換下降量也變大，在 3000sec 時下降量甚至為 64%，屬於變化量大的區域。序列 7-20，最初的時間 10sec 差 1%，到 3000sec 時下降量為 43%。

在 Switch I 區域，序列 20-38 在 10sec 時氫氙交換下降量為 3%，隨著氫氙交換時間增加 30s、100s、300s、1000s、3000sec 分別為 14%、18%、34%、42%、62%，屬於變化量大的區域。此區域還有序列 27-40 各個時間點下降量分別為 12%、33%、37%、39%、23%、33%。

在 Switch II 的區域，序列 54-65 在 10sec 的時候氫氙交換下降量為 4%，此區域隨著氫氙交換時間增加，氫氙交換下降量也變大，各個時間點下降量為 10%、17%、32%、45%、78%。序列 58-65 與序列 69-77 也是隨著時間增加而下



降量增多大，前者下降量分別為 1%、3%、10%、13%、23%、49%，後者下降量為 6%、10%、22%、43%、29%、45%。

在  $\alpha 1$  為序列 18-29，此區域的氫氬交換下降量平均為 26%。 $\beta 3$  為序列 52-61，氫氬交換下降量平均為 12.5%。 $\beta 4$  為序列 82-91，此區域的氫氬交換下降量平均為 32%。 $\alpha 2$  helix 中包含序列 92-105，序列 95-110，96-104，序列的氫氬交換下降量隨著時間沒有超過 40% 下降，整體平均下降量分別為 24%、24%、13%。 $\beta 5$  為序列 102-117，整體平均下降量 10%。 $\alpha 3$  為序列 119-130，整體平均下降量 17.5%。 $\alpha 4$  為序列 128-145，序列 130-146，序列 136-156，平均下降量分別為 19%，15%，126%。 $\beta 6$  為序列 156-168，這序列整體下降量 47% 為最大，但隨著時間增加下降量變化不大。此區域還包含序列 156-176 與序列 158-169，此兩序列在 3000sec 時，下降量分別為 58% 與 52%，都超過 50%。 $\alpha 5$  為序列 165-184、序列 169-180，分別的平均下降量為 24%，37%。序列 171-191 為 C 端，分別的下降量為 9%、14%、13%、22%、34%、33%，平均下降量為 20%。

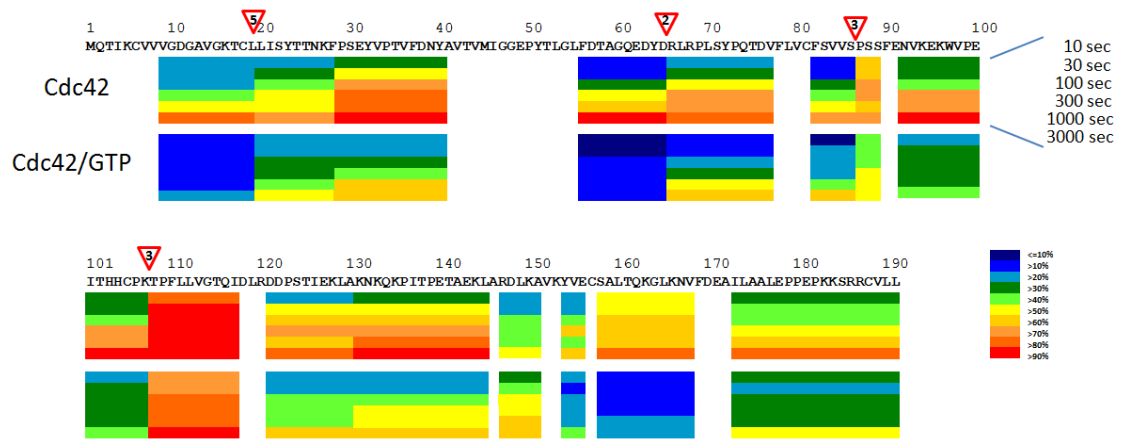


圖 19.蛋白質 Cdc42&Cdc42/GTP 的氫氬交換圖

胜肽片段的氫氬交換百分比 在不同時間點以不同顏色表示，小於 10%的為深藍色；大於 90%的為紅色。分析的氫氬交換時間點總共 6 個:10、30、100、300、1000、3000s。空白地方是氫氬交換沒有數據的位置，紅色三角區塊為兩序列有重疊的氨基酸數。

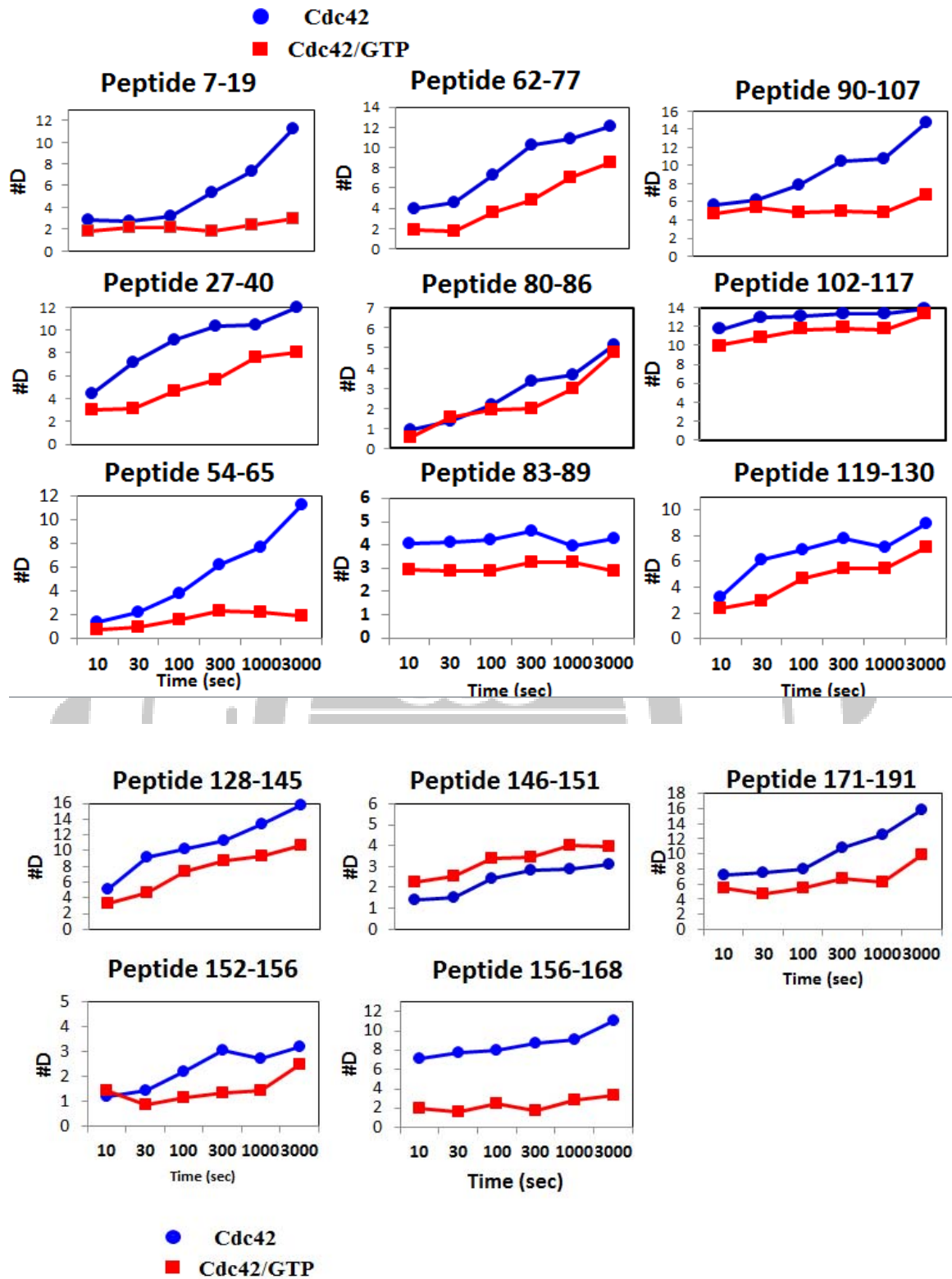


圖 20 氫氣交換時間和交換量的關係曲線圖

x 軸為交換時間點，Y 軸為交換量。藍色曲線為 Cdc42，紅色曲線為 Cdc42/GTP。

### 3.3.2 GTP 對 Cdc42 氫氬交換影響質譜(DXMS)的分析

Cdc42 氫氬交換百分率減去加入 GTP 和  $Mg^{2+}$  後的 Cdc42 氫氬交換百分率，得到圖 21，為 GTP 影響 Cdc42 後氫氬交換的變化量。氫氬交換變化量分別以 6 個時間點相減(10、30、100、300、1000、3000sec)。偏紅色的為氫氬交換變化量上升(0~+50%)；偏紫色的為氫氬交換變化量下降(0~-50%)。由圖 21 得之，當加入 GTP 和  $Mg^{2+}$  後，氫氬交換率都是下降。尤其是在序列 7-19(紫色)下降量為 64%、序列 27-40(藍)下降量為 33%、序列 54-65(紫色)下降量 78%、序列 90-107(深藍)下降量 49%、序列 128-145(藍)下降量為 32%和序列 156-168(紫色)下降量為 58%，這些區域的下降量在氫氬交換時間點最長的(3000s)時候，下降量超過 30%。圖 22 為把氫氬交換下降量放到結構圖(2QRZ.DB)上作為探討，去觀察每個時間點的氫氬交換變化量。由圖可以觀察到，隨著時間的增加，在蛋白質 Cdc42 結構可以發現內部區域的下降率相較於外圍比較大，尤其在 3000s 的時候變化量最明顯。而我們把差異性特別多的幾個片段作為探討(圖 23)。在結構上發現，在序列 7-19 為 P-Loop 區域，此區域在時間點 10sec 與 30sec 時，氫氬交換量下降量約 5%，但是隨著時間慢慢上升時，到 3000sec 此區域的氫氬交換下降量變為 64%，有明顯的下降，整體的下降量平均為 24。而在序列 27-40 為 Switch I 區域，在 10sec 時氫氬交換下降量為 12%，到了 30sec、100sec、300sec、1000sec 與 3000sec 時，下降量為 33%、37%、39%、23%、33%，變化趨勢較為平緩，整體氫氬交換下降量平均為 29%。序列 54-65 為 Switch II 區域，此區域與 P-Loop

類似，在時間點 10sec 與 30sec 時，氫氬交換下降量約 7%，隨著時間上升，從 17%、32%、45%到 3000sec 時氫氬交換下降量為 78%，此區域的變化量非常大，整體得下樣量平均為 31。序列 90-107 也相似於序列 7-19，在時間點 10sec 與 30sec 時，氫氬交換量下降約 5%。隨著時間慢慢上升，氫氬交換下降量分別為 18%、34%、36%、49%，整體的氫氬交換下降量為 24%。序列 128-145 與 171-191 加入 GTP 後，屬於整體穩定氫氬交換量下降的，分別為 11%、28%、18%、16%、24%、32%和 9%、14%、13%、22%、34%、33%，整體氫氬交換下降量平均為 21%與 20%。特別的是在序列 156-168，雖然屬於穩定的下降量，但在每一個時間點的下陷量都超過 39%，從 10sec 到 3000sec 分別為 39%、46%、41%、53%、48%、58%，整體氫氬交換下降量平均為 47.5%，屬於穩定但是卻下降非常多。

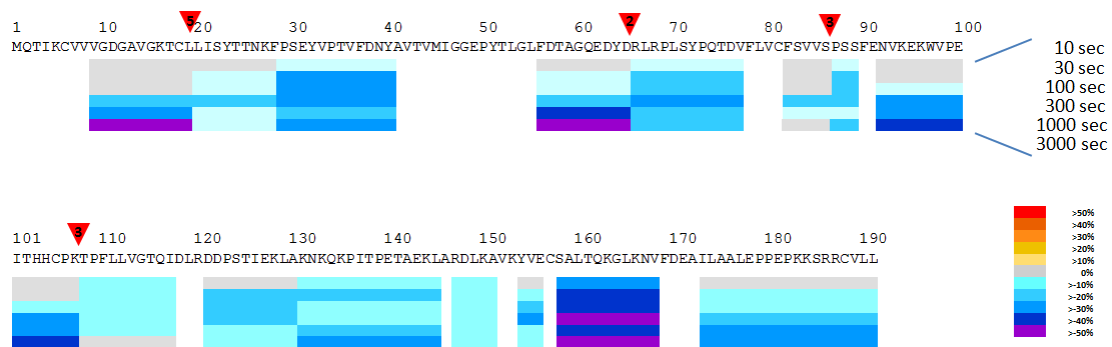


圖 21. GTP 影響 Cdc2 氫氬交換變化量圖

氫氬交換變化量以不同顏色表示，下降區域由藍色表示(-50%)，上升區域由紅色表示(50%)。總共有 6 個時間點:10、30、100、300、1000、3000s，紅色三角區塊為兩序列有重疊的氨基酸數。

。

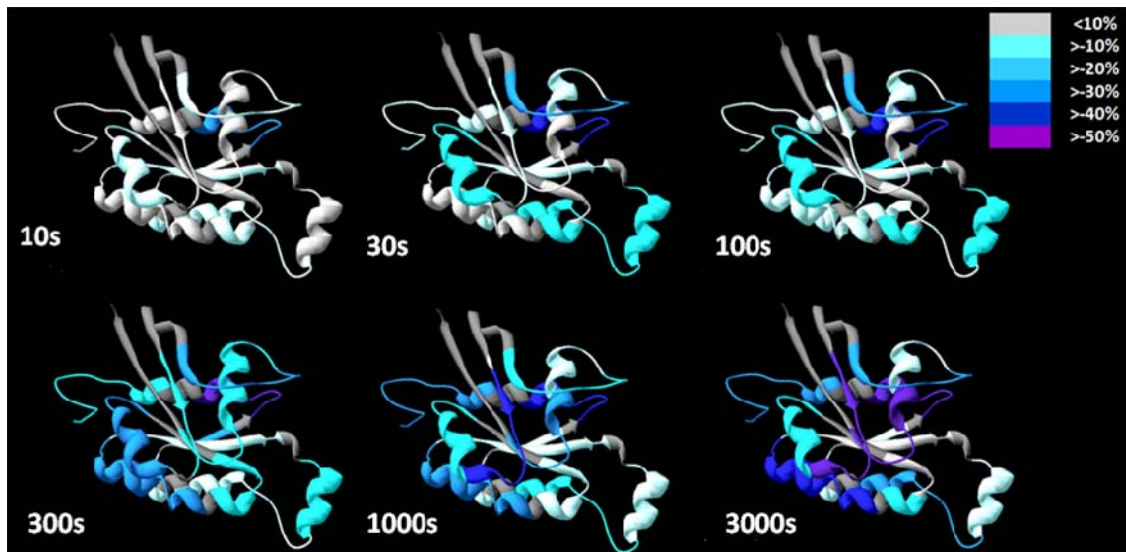


圖 22. 經由 X-ray 結晶結構觀察 GTP 影響 Cdc42 氫氬交換變化量圖

氫氬交換變化量以不同顏色表示，下降部分為藍色，顏色愈深下降量愈多 (0~50%)。總共有 6 個時間點:10、30、100、300、1000、3000s。

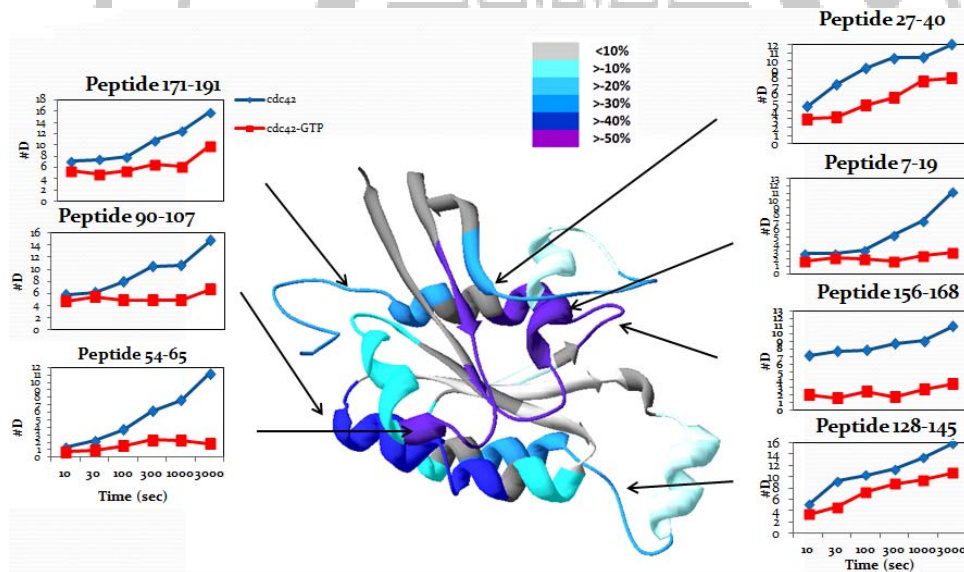


圖 23.X-ray 結晶結構觀察 GTP 在 3000sec 影響 Cdc42 的氫氬交換變化量圖

氫氬交換下降量以 0~ -50%表示，這七個區域為時間點最長時(3000s)下降量超過 30%，在序列 7-19 下降量 64%，此區域為 P-Loop；序列 27-40 下降量 33%，此區域為 Switch I；序列 54-65 下降量 78%，此區域為 Switch II。

## 3.4 討論

### 3.4.1. 氫鍵與氫氘交換

Cdc42 的氫氘交換結果，在最初時間點 10 秒和最長時間點 3000 秒都顯示出比 Cdc42/GTP(活化態)的氫氘交換量還多。從原本 14 個超過 70%氫氘交換量的序列區域，到加入 GTP 之後只剩一個超過 70%的序列區塊。說明 Cdc42 在結構上有了改變，整體氫與氘不容易交換，所以在結構上因為受到 GTP 的影響而變得較為緊密。在 GTP 影響 Cdc42 的氫氘交換下降量中發現，序列 7-19、序列 27-40、序列 54-65、序列 90-107、序列 128-145、和序列 156-168，下降的百分率都超過 30%，推測這些區域是會和 GTP 形成氫鍵的部位，或是鄰近的序列區域，所以變化量相當明顯。在文獻中提及，在 P-Loop 區塊中的 Gly15、Lys16、Thr17、Cys18 主要會和 GTP 形成氫鍵的胺基酸，圖 24 [28]。當 GTP 和 P-Loop 結合同時，交互作用也會影響附近區域的結構變化。如 Switch II 區域，受到 GTP 和 P-Loop 的影響，胺基酸 Gly60、Gln61 和 GTP 也產生氫鍵結合。所以我們可以推測在氫氘交換下降特別明顯的序列 7-19，是因為 GTP 的結合形成氫鍵，造成氘不易交換進去，所以此區域的氫氘交換量明顯的下降。而在序列 54-65 氫氘交換的下降，是當 GTP 影響 P-Loop 時，此區域的部分胺基酸也和 GTP 形成氫鍵的交互作用，所以也有明顯的下降。序列 156-168 在 x-ray 結晶結構中也有部份的胺基酸會和 GTP 形成氫鍵，胺基酸 Ala159、Leu 160，所以此區域也符合氫氘交換的結果，有明顯的氘下降量。特別的是，序列 27-40 區域，此區域為 Cdc42 上的 Switch I，在 Cdc42/GMPPCP 的 X-ray 晶體結構中，沒有氫鍵的形成。而在氫氘交換的結果中發現序列 27-40(Switch I)有明顯的氘下降量，說明 GTP 和 Switch I 區域沒有形成氫鍵，但此區域是會受到 GTP 的影響，使結構有所改變，造成明顯的下降量。或者此區域不同於 GMPPCP 的氫鍵形成，部分胺基酸也會和 GTP 形成氫鍵，造成氘的不易交換，但以氫氘交換結果的變化量推測，前者

的可能性較大。在其他序列 90-107、序列 128-145、序列 171-191，分別有 49%、32%、33% 的下降量。而這些區域距離 GTP 大於 3 Å，所以很難形成氫鍵，推測下降的原因可能是結構產生變化。因為從鬆散的結構變為較緊實的結構，導致這些區域整體的氫交換變少。這些區域分別為  $\alpha$ -helix\_3 號、6 號和 N-terminal 端。從氫氫交換結果得知，GTP 的結合確會影響到 Cdc42。GTP 結合到 P-Loop 上形成氫鍵，而使 P-Loop 氫氫交換下降。而靠近 P-Loop 的 Switch II 也產生氫鍵的結合，而周圍的區塊則因為 GTP 結合整體結構有改變，變得較為緊實，尤其是區域  $\alpha$ -helix3 號、6 號和 N-terminal 端。

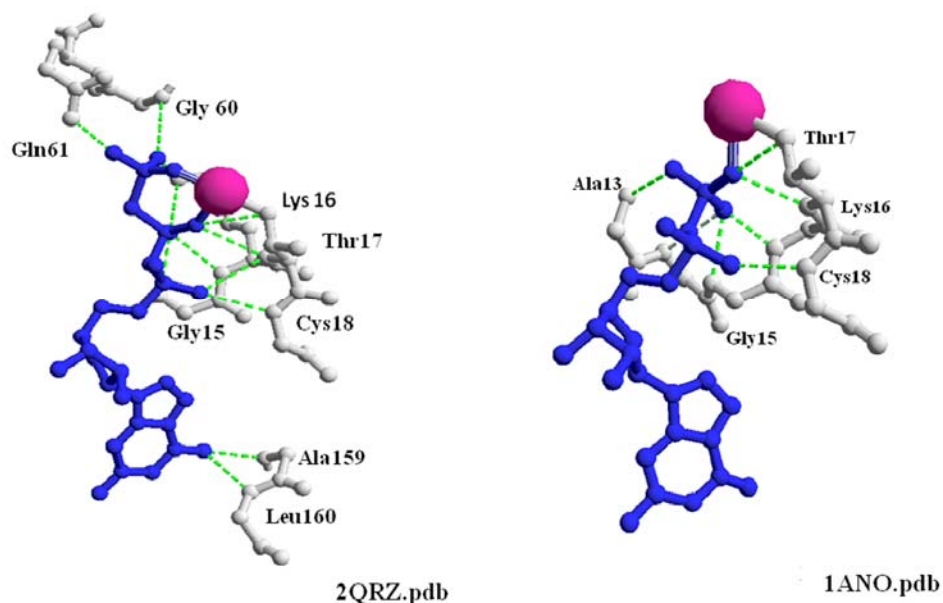


圖 24.Cdc42/GMPPCP & Cdc42/GDP 之 X-ray 結晶氫鍵示意圖

藍色為 GMPPCP(GTP 的類似物)，桃紅色為鎂，白色為 Cdc42 產生氫鍵的區域，綠色虛線為 Cdc42 和 GMPPCP/GDP 形成氫鍵的鍵結部分。



### 3.4.2. 表面電價與氫氙交換

從表面電價來看，圖 25A 為 Cdc42 的未活化狀態表面電價圖。我們可以觀察到在 Cdc42 表面 P-Loop 周圍區域是屬於帶負電價的區域(紅色)，此區域中是由 5 個負電價的胺基酸 Asp11、Asp38、Asp57、Glu62 和 Asp 6 所組成。圖 24B 為 Cdc42 的活化狀態，表面電價移除 GTP 與  $Mg^{2+}$  所計算出得結果。觀察到在 P-Loop 區域有一個胺基酸 Lys16 暴露出來。所以可以推測當 GTP/ $Mg^{2+}$  結合到 P-Loop 上時，其附近區域結構會改變使之打開，讓帶正電價的 Lys16 能夠與 GTP 上得磷酸結合。而另一方面，帶有磷酸負電價的 GTP(三個磷酸)進入 P-Loop 區域結合時會相互排斥。推測鎂離子的加入，有助於正負電荷吸引力的產生。當鎂離子和 GTP 上的  $\gamma$ -磷酸產生正負電荷吸引力後，鎂離子會帶著 GTP 一起被吸引到 P-Loop 區域進行交互作用。此時的鎂離子和 Cdc42 上胺基酸的吸引力大於 GTP 和 Cdc42 的排斥力。所以由圖 25C 表示，當鎂離子和 GTP 進入 P-Loop 區域時，會使此區塊帶正電(藍色部分)，而周圍的負電價被鎂離子正電價綜合呈現不帶電的狀態(白色部分)。在氫氙交換有明顯氫下降量序列中發現，序列 7-19、序列 27-40 和序列 54-65，屬於電價變化最大的區域。此部分序列從原本帶負電價，當 GTP 和鎂離子加入後呈現不帶電的狀態，明顯的受到了鎂離子和 GTP 的影響，而結構有所改變。而在其他有明顯氫下降量的序列中，序列 90-107、序列 128-145、序列 156-168、和序列 171-191 在表面電價的部分，並沒有明顯的改變。所以我們可以從表面電價得知，當電價有明顯改變時，此區域推測是結合位，也

是氫氘交換有重大變化的區域，而結合位周圍的電價改變，可能是當 GTP 結合後，結構的改變，使得電荷分佈有所不同。

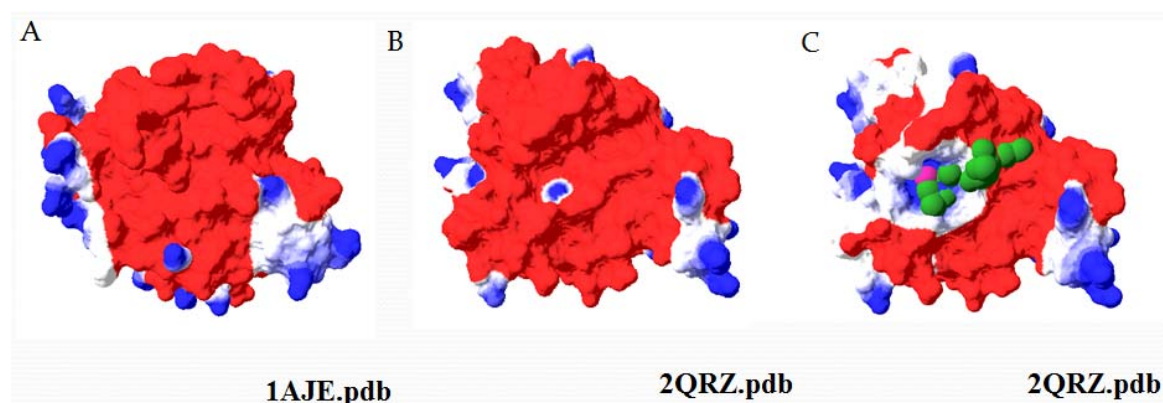


圖 25.Cdc42 表面電價分布圖

A 為未活化態的 Cdc42。B 為 Cdc42 結合 GTP 活化態，但不包含 GTP 與鎂的表面電價。C 為 Cdc42 結合 GTP 活化態，且包含 GTP 與鎂的表面電價。綠色是 GTP，桃紅色是鎂離子，紅色是負電價，藍色是正電價，白色是不帶電區域。當鎂離子結合進 P-Loop 時，原本帶負電價的區塊呈現正電價，而周圍則呈現不帶電。

### 3.4.3.B-factor 與氫氘交換

B-factor 為此蛋白質每一個原子位置不確定性的參數，它表示晶體中原子電子密度的“模糊度”，反映了蛋白質分子在晶體中的構象狀態。B-factor 越高，“模糊度”越大，相應部位的構型就越不穩定。愈低，“模糊度”越小，相應不為的構型就越穩定。B 因子在晶體學數據中一般是以原子為單位，可以換算成相應胺基酸的 B-factor，從而分析殘基的構象穩定性。圖 26 左為 Cdc42 B-factor 圖，綠色

為 B-factor 低的較為穩定的結構，紅色為 B-factor 高的較為不穩定的結構。可以發現在 P-Loop 序列 7-19，其多數原子的 B-factor 值約為 40-50  $\text{\AA}^2$ ，較外圍區域的 B-Factor 值 60-90  $\text{\AA}^2$  低。相對應 P-Loop 區域在 Cdc42 加入 GTP 氫氬交換變化量的結果中，其氫氬交換下降量較明顯，紫色為下降量超過 50%。所以我們可以推測，P-Loop 因為和 GTP 結合後，使此區域的結構變得較為穩定，所以其 B-factor 值較低。而在 P-Loop 附近的 Switch I、II 區域，B-factor 值也是 40-50  $\text{\AA}^2$ ，屬於較低的值。而在 Switch I、II 的氫氬交換的結果也是紫色跟藍色，下降量分別為 40%、50%。所以我們可以利用 B-factor 與氫氬交換下降量觀察出，在 B-factor 值低的區塊是其結合位，而結合位的氫氬交換變化量因為交互作用的關係，所以氫氬交換下降量也相對明顯。

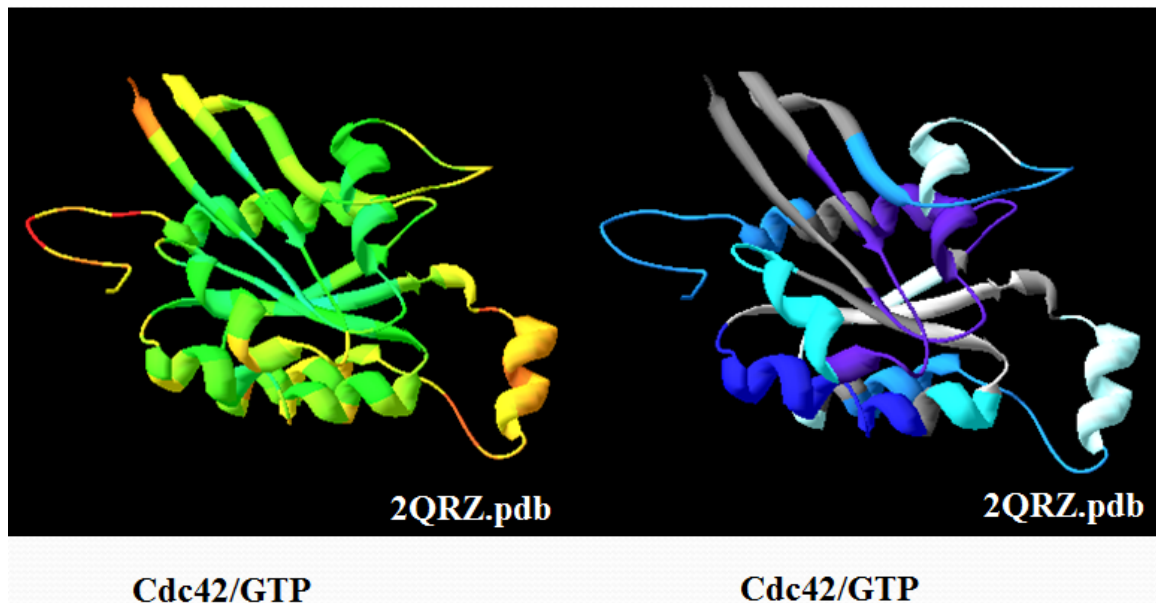


圖 26. Cdc42/GTP B-factor 與 DXMS 的比較圖

左圖為 B-factor 值，紅色為 B-factor 較高，綠色為 B-factor 較低。右圖為加入 GTP 後的氫氙交換下降量，淺藍為 10% 下降量。顏色愈深下降愈多，紫色為超過 50% 下降。在 P-Loop 序列 7-19，其多數原子的 B-factor 值約為 40-50  $\text{\AA}^2$ ，外圍區域的 B-factor 值約為 60-90  $\text{\AA}^2$ 。

## 第四章 結論

在蛋白質體學研究當中，蛋白質結構的分析是相當重要的。氫氘交換結合質譜可以分析蛋白質結構上的變化，蛋白質蛋白質的交互作用，蛋白質特定位點。而氫氘交換質譜法(DXMS)就是我們主要的研究方法，在 Cdc42 和 Cdc42/GTP 的氫氘交換實驗中，整體氫氘交換率下降，說明結構變得較緊實。而 GTP 影響在 P-Loop(序列 27-40)區域和 Switch II(序列 54-65)區域，因為 GTP 的結合造成氫氘交換率的下降。特別的是，相較於 x-ray Cdc42/GMPPCP 結晶在 Switch I 區域沒有明顯的影響，Cdc42/GTP 的氫氘交換實驗中發現，在區域 Switch I(27-40)，GTP 會影響此區域的結構改變，或者是有氫鍵的形成，所以造成氫氘交換率的下降。另外，在區域  $\alpha 3$ (序列 90-107)、 $\alpha 6$ (序列 128-145)、 $\alpha 7$  和  $\beta 3$  之間(序列 156-158)和 C-terminal(序列 171-179)，也有明顯的氘下降量，表示這些區域也受到 GTP 影響，但可能不是受到 GTP 直接鍵結，而是 GTP 鍵結 P-Loop(序列 7-19)後，造成這些區域結構變得較緊密。我們推測當 GTP 和 Cdc42 上 P-Loop 形成氫鍵時，Switch II 也接著產生氫鍵。使周圍區塊在結構上有所改變，尤其是在 Switch I、 $\alpha$ -helix3 號、6 號和 N-terminal 端，變化最大。當 Cdc42 沒有結合 GTP 時，此時 P-Loop 及其附近會帶負電價。當 GTP 藉由鎂與 P-Loop 正負電荷吸引時，結合到 P-Loop 上，使得 P-Loop 上電價由負電荷轉變為正電荷，其周圍也從負電荷變為不帶電。除了 P-Loop 以外的區塊電荷些許的改變，可能是因為結合 GTP 使結

構變緊實，造成電荷分佈與 Cdc42 不一樣。從 B-factor 可以觀察出，P-Loop 區域 B-factor 值為  $40 \text{ \AA}^2$ ，相較於外圍的區域  $60 \text{ \AA}^2$  為低，在氫氘交換結果中，P-Loop 區域也是交換量較少的地方，說明了 B-factor 值較低的區域，可能就是結合位，結合位與 GTP 結合時，造成氫氘交換的量較低。



## 第五章 參考資料

1. Johnson, D.I., Cdc42: An essential Rho-type GTPase controlling eukaryotic cell polarity. *Microbiol Mol Biol Rev*, 1999. **63**(1): p. 54-105.
2. Nobes, C.D. and A. Hall, Rho, rac and cdc42 GTPases: regulators of actin structures, cell adhesion and motility. *Biochem Soc Trans*, 1995. **23**(3): p. 456-9.
3. Cerione, R.A., Cdc42: new roads to travel. *Trends Cell Biol*, 2004. **14**(3): p. 127-32.
4. Bustelo, X.R., V. Sauzeau, and I.M. Berenjano, GTP-binding proteins of the Rho/Rac family: regulation, effectors and functions in vivo. *Bioessays*, 2007. **29**(4): p. 356-70.
5. Krugmann, S., et al., Cdc42 induces filopodia by promoting the formation of an IRSp53:Mena complex. *Curr Biol*, 2001. **11**(21): p. 1645-55.
6. Filipenko, N.R., et al., Integrin-linked kinase activity regulates Rac- and Cdc42-mediated actin cytoskeleton reorganization via alpha-PIX. *Oncogene*, 2005. **24**(38): p. 5837-49.
7. Etienne-Manneville, S. and A. Hall, Rho GTPases in cell biology. *Nature*, 2002. **420**(6916): p. 629-35.
8. Ridley, A.J., Rho-related proteins: actin cytoskeleton and cell cycle. *Curr Opin Genet Dev*, 1995. **5**(1): p. 24-30.
9. Van Aelst, L. and C. D'Souza-Schorey, Rho GTPases and signaling networks. *Genes Dev*, 1997. **11**(18): p. 2295-322.
10. Tapon, N. and A. Hall, Rho, Rac and Cdc42 GTPases regulate the organization of the actin cytoskeleton. *Curr Opin Cell Biol*, 1997. **9**(1): p. 86-92.
11. Tu, S. and R.A. Cerione, Cdc42 is a substrate for caspases and influences Fas-induced apoptosis. *J Biol Chem*, 2001. **276**(22): p. 19656-63.
12. Erickson, J.W. and R.A. Cerione, Multiple roles for Cdc42 in cell regulation. *Curr Opin Cell Biol*, 2001. **13**(2): p. 153-7.
13. Cerione, R.A. and Y. Zheng, The Dbl family of oncogenes. *Curr Opin Cell Biol*, 1996. **8**(2): p. 216-22.
14. Erickson, J.W. and R.A. Cerione, Structural elements, mechanism, and evolutionary convergence of Rho protein-guanine nucleotide exchange factor complexes. *Biochemistry*, 2004. **43**(4): p. 837-42.
15. Chen, C., A. Wirth, and E. Ponimaskin, Cdc42: an important regulator of neuronal morphology. *Int J Biochem Cell Biol*, 2012. **44**(3): p. 447-51.

16. Hoffman, G.R., N. Nassar, and R.A. Cerione, Structure of the Rho family GTP-binding protein Cdc42 in complex with the multifunctional regulator RhoGDI. *Cell*, 2000. **100**(3): p. 345-56.
17. Ma, L., et al., Corequirement of specific phosphoinositides and small GTP-binding protein Cdc42 in inducing actin assembly in *Xenopus* egg extracts. *J Cell Biol*, 1998. **140**(5): p. 1125-36.
18. Bassilana, M., J. Blyth, and R.A. Arkowitz, Cdc24, the GDP-GTP exchange factor for Cdc42, is required for invasive hyphal growth of *Candida albicans*. *Eukaryot Cell*, 2003. **2**(1): p. 9-18.
19. Zhao, J., et al., Probing the binding states of GDP to Cdc42 using urea interaction. *Biochem Biophys Res Commun*, 2002. **291**(5): p. 1276-82.
20. Meller, N., et al., Zizimin1, a novel Cdc42 activator, reveals a new GEF domain for Rho proteins. *Nat Cell Biol*, 2002. **4**(9): p. 639-47.
21. Etienne-Manneville, S. and A. Hall, Cdc42 regulates GSK-3beta and adenomatous polyposis coli to control cell polarity. *Nature*, 2003. **421**(6924): p. 753-6.
22. Nobes, C.D. and A. Hall, Rho, rac, and cdc42 GTPases regulate the assembly of multimolecular focal complexes associated with actin stress fibers, lamellipodia, and filopodia. *Cell*, 1995. **81**(1): p. 53-62.
23. Dunford, J.E., et al., Inhibition of protein prenylation by bisphosphonates causes sustained activation of Rac, Cdc42, and Rho GTPases. *J Bone Miner Res*, 2006. **21**(5): p. 684-94.
24. Siderovski, D.P. and F.S. Willard, The GAPs, GEFs, and GDIs of heterotrimeric G-protein alpha subunits. *Int J Biol Sci*, 2005. **1**(2): p. 51-66.
25. Jurnak, F., Structure of the GDP domain of EF-Tu and location of the amino acids homologous to ras oncogene proteins. *Science*, 1985. **230**(4721): p. 32-6.
26. de Vos, A.M., et al., Three-dimensional structure of an oncogene protein: catalytic domain of human c-H-ras p21. *Science*, 1988. **239**(4842): p. 888-93.
27. Broman, M.T., et al., Cdc42 regulates adherens junction stability and endothelial permeability by inducing alpha-catenin interaction with the vascular endothelial cadherin complex. *Circ Res*, 2006. **98**(1): p. 73-80.
28. Phillips, M.J., et al., Effector proteins exert an important influence on the signaling-active state of the small GTPase Cdc42. *J Biol Chem*, 2008. **283**(20): p. 14153-64.
29. Ramakrishnan, C., V.S. Dani, and T. Ramasarma, A conformational analysis of Walker motif A [GXXXXGKT (S)] in nucleotide-binding and other proteins.



- Protein Eng, 2002. **15**(10): p. 783-98.
30. Solski, P.A., et al., RhoA biological activity is dependent on prenylation but independent of specific isoprenoid modification. *Cell Growth Differ*, 2002. **13**(8): p. 363-73.
  31. Wright, L.P. and M.R. Philips, Thematic review series: lipid posttranslational modifications. CAAX modification and membrane targeting of Ras. *J Lipid Res*, 2006. **47**(5): p. 883-91.
  32. Noel, J.P., H.E. Hamm, and P.B. Sigler, The 2.2 Å crystal structure of transducin- $\alpha$  complexed with GTP  $\gamma$ S. *Nature*, 1993. **366**(6456): p. 654-63.
  33. Coleman, D.E., et al., Structures of active conformations of Gi  $\alpha$  1 and the mechanism of GTP hydrolysis. *Science*, 1994. **265**(5177): p. 1405-12.
  34. Morreale, A., et al., Structure of Cdc42 bound to the GTPase binding domain of PAK. *Nat Struct Biol*, 2000. **7**(5): p. 384-8.
  35. Florian, M.C., et al., Cdc42 activity regulates hematopoietic stem cell aging and rejuvenation. *Cell Stem Cell*, 2012. **10**(5): p. 520-30.
  36. Geiger, H., A. Koehler, and M. Gunzer, Stem cells, aging, niche, adhesion and Cdc42: a model for changes in cell-cell interactions and hematopoietic stem cell aging. *Cell Cycle*, 2007. **6**(8): p. 884-7.
  37. Chambers, S.M., et al., Aging hematopoietic stem cells decline in function and exhibit epigenetic dysregulation. *PLoS Biol*, 2007. **5**(8): p. e201.
  38. Dorshkind, K. and S. Swain, Age-associated declines in immune system development and function: causes, consequences, and reversal. *Curr Opin Immunol*, 2009. **21**(4): p. 404-7.
  39. Shekarabi, M., et al., Deleted in colorectal cancer binding netrin-1 mediates cell substrate adhesion and recruits Cdc42, Rac1, Pak1, and N-WASP into an intracellular signaling complex that promotes growth cone expansion. *J Neurosci*, 2005. **25**(12): p. 3132-41.
  40. Yeh, Y.M., Y.T. Pan, and T.C. Wang, Cdc42/Rac1 participates in the control of telomerase activity in human nasopharyngeal cancer cells. *Cancer Lett*, 2005. **218**(2): p. 207-13.
  41. Bourguignon, L.Y., et al., Hyaluronan-CD44 interaction with IQGAP1 promotes Cdc42 and ERK signaling, leading to actin binding, Elk-1/estrogen receptor transcriptional activation, and ovarian cancer progression. *J Biol Chem*, 2005. **280**(12): p. 11961-72.
  42. Tucci, M.G., et al., Cdc42 is involved in basal cell carcinoma carcinogenesis. *Arch Dermatol Res*, 2013.

43. Zahedi, B., et al., Leading edge-secreted Dpp cooperates with ACK-dependent signaling from the amnioserosa to regulate myosin levels during dorsal closure. *Dev Dyn*, 2008. **237**(10): p. 2936-46.
44. Elliot-Smith, A.E., et al., Specificity determinants on Cdc42 for binding its effector protein ACK. *Biochemistry*, 2005. **44**(37): p. 12373-83.
45. Ahmed, I., et al., Cdc42-dependent nuclear translocation of non-receptor tyrosine kinase, ACK. *Biochem Biophys Res Commun*, 2004. **314**(2): p. 571-9.
46. Muller, N., et al., Characterization and intracellular localization of putative *Chlamydia pneumoniae* effector proteins. *Med Microbiol Immunol*, 2008. **197**(4): p. 387-96.
47. Yuan, H., et al., Hepatocyte-specific deletion of Cdc42 results in delayed liver regeneration after partial hepatectomy in mice. *Hepatology*, 2009. **49**(1): p. 240-9.
48. Sharma, M., F. Urano, and A. Jaeschke, Cdc42 and Rac1 are major contributors to the saturated fatty acid-stimulated JNK pathway in hepatocytes. *J Hepatol*, 2012. **56**(1): p. 192-8.
49. Weiss, J.H., J.Y. Koh, and D.W. Choi, Neurotoxicity of beta-N-methylamino-L-alanine (BMAA) and beta-N-oxalylamino-L-alanine (BOAA) on cultured cortical neurons. *Brain Res*, 1989. **497**(1): p. 64-71.
50. Hoofnagle, A.N., et al., Changes in protein conformational mobility upon activation of extracellular regulated protein kinase-2 as detected by hydrogen exchange. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2001. **98**(3): p. 956-61.
51. Hughes, C.A., et al., Phosphorylation causes subtle changes in solvent accessibility at the interdomain interface of methylesterase CheB. *J Mol Biol*, 2001. **307**(4): p. 967-76.
52. Mandell, J.G., et al., Solvent accessibility of the thrombin-thrombomodulin interface. *J Mol Biol*, 2001. **306**(3): p. 575-89.