

行政院國家科學委員會補助
大專學生參與專題研究計畫研究成果報告

* ***** *
* 計 畫 : 人類皮膚癌 HaCaT 細胞在紫外線及甲基抑制劑處理後 *
* 名 稱 : 精胺酸甲基化蛋白質的差異表現及鑑定 *
* ***** *

執行計畫學生： 陳詩尹
學生計畫編號： NSC 97-2815-C-040-006-B
研究期間： 97年07月01日至98年02月28日止，計8個月
指導教授： 李娟

處理方式： 本計畫可公開查詢

執行單位： 中山醫學大學生物醫學科學學系(所)

中華民國 98年03月31日

人類皮膚癌 HaCaT 細胞在紫外線照射後精胺酸甲基化蛋白質的差異表現鑑定

(一) 摘要

HaCaT cell (人類皮膚細胞株) 是一種皮膚表皮的癌細胞，在去年的大專生專題研究計畫「以 HaCaT cell 研究精胺酸甲基化和自體免疫疾病—全身性紅斑性狼瘡 (SLE) 自體抗原呈現之相關性」中，我利用 HaCaT cell 照射 UV 光的情形來模擬全身性紅斑性狼瘡的光敏感性。在去年的實驗部分結果中，我觀察到 HaCaT cell 在照射 UV 光的情形下，細胞內部分的雙甲基精胺酸蛋白質訊號會有明顯降低的情形，此次研究的目的是要用蛋白質二維電泳並以質譜儀的方式鑑定出蛋白質的身分，並探討其變化的意義。

在實驗中，我先以一維電泳 pH 3~10，strip 7 cm，二維電泳以 10%SDS-PAGE 跑細胞萃取液，以了解 HaCaT 細胞內蛋白質大致分佈情形。細胞內蛋白質大多分布在 pH 4-7、分子量 24~100 kDa 左右，之後我便以 pH 4-7 的條件進行二維電泳，並以辨識對稱形雙甲基蛋白之抗體 anti-SYM10，找出因照射 UV 而使細胞出現雙甲基精胺酸蛋白差異的點，之後送去鑑定。鑑定出來結果中，並沒有特別好的結果。

另外，我們也觀察在細胞照射 UV 後的一到五小時間，UV 光對細胞所造成的影響。我們觀察到細胞內精胺酸甲基轉移酶會隨著照射 UV 光後的時間不同而有所差異。PRMT 5(type II PRMT) 的在細胞中的表現量會因為照射 UV 光後的時間拉長而增加，而 PRMT 1(type I PRMT)表現量會隨時間而下降。

(二) 研究動機與研究問題

在去年大專生專題研究計畫「以 HaCaT cell 研究精胺酸甲基化和自體免疫疾病—全身性紅斑性狼瘡 (SLE) 自體抗原呈現之相關性」中，我將 HaCaT cell 照射 UV 光的情形來模擬全身性紅斑性狼瘡的光敏感性。在研究中，我利用 UV 光 (164 mJ/cm^2) 來照射 HaCaT cell 的方式使細胞進行細胞凋亡 (apoptosis)，另外添加甲基轉移酶抑制劑 AdOx (Adenosine Dialdehyde, $10 \mu\text{M}$) 來觀察細胞內精胺酸甲基轉移酶以及細胞內精胺酸甲基蛋白的表現情形。在研究的結果中觀察到在 HaCaT cell 照射 UV 光後，細胞內有多個對稱型雙甲基精胺酸蛋白在有照射 UV 的情形下的表現量有明顯的降低 (圖一、箭頭處)。因此我對這些部份蛋白的身分感到興趣，故希望能在本計劃中利用蛋白質二維電泳和質譜儀鑑定蛋白質的身分，並探討此變化的意義。

(三) 文獻回顧與探討

一、蛋白質精胺酸甲基化 (protein arginine methylation)

雖然 DNA 遺傳訊息密碼轉錄轉譯時只對應 20 種主要胺基酸，但研究蛋白組成卻發現，由於轉譯後修飾而造成約有 140 種胺基酸或胺基酸衍生物而能組成多種蛋白質¹。這些轉譯後修飾有些是需酵素催化的，如：醣化 (glycosylation)，磷酸化 (phosphorylation) 以及甲基化 (methylation)；而有些是自發性的，如：去胺化 (deamidation)。

蛋白質甲基化可以發生在不同胺基酸的 side chains，像是 glutamyl 和 isoaspartyl 所形成不穩定的 methylesters 或者是由 arginine 或 lysine 所形成化學上穩定的甲基胺基酸²。蛋白質精胺酸甲基化已知和訊息傳遞 (signal transduction)、蛋白質在細胞中的位置 (protein subcellular localization)、轉錄調控 (transcriptional modification) 以及蛋白質和蛋白質之間的交互作用有關³。

精胺酸甲基化是一種由酵素所催化的蛋白甲基化反應，在人體中精胺酸的甲基化由蛋白精胺酸甲基轉移酶 (PRMT) 家族所催化⁴，PRMT 系列酵素藉由酵素活性可略分為兩大類，分別是第一型 (type I) 及是第二型 (type II) PRMT，type I PRMT 能將

精胺酸催化成為非對稱型雙甲基精胺酸 (asymmetric N^G, N^G -dimethylarginine (aDMA))，type II PRMT 則能將精胺酸催化成為對稱型雙甲基精胺酸 (symmetric N^G, N^G -dimethylarginine (sDMA))，此外不論是 type I 或 type II PRMT 都會催化單甲基精胺酸 (N^G -monomethylarginine (MMA)) 的生成 (附圖二)，已知的 type I PRMT 有：PRMT1⁵、PRMT3⁶、PRMT4 (CARM1)⁷、PRMT6⁸ 及 PRMT8⁹；type II PRMT 則包含 PRMT5¹⁰、PRMT7¹¹ 及 PRMT9¹²，至於 PRMT2¹³ 目前尚未歸屬於任一類。

目前實驗證實的多個 type I PRMT 受質都包含 GAR (glycine and arginine rich) domain，例如：hnRNP Q¹⁴、hnRNP K¹⁵、nucleolin¹⁶ 等，成為一種共通的特徵；不過近年也有研究發現 GAR 序列上可能有 sDMA 修飾，如：Sm D1、Sm D3¹⁷、Sm B/B'¹⁸。蛋白發生精胺酸甲基化後，可能會對其功能造成影響，包括對轉錄的調控 (transcriptional regulation)、RNA processing、DNA 的修補 (DNA repair) 等¹⁹。而此次的研究便是想要找出，在有照射 UV 光的 HaCaT 細胞在細胞凋亡後消失之甲基接受蛋白。

二、自體免疫疾病與蛋白質轉譯後修飾

人體的免疫系統可分為 T 細胞有關的細胞性免疫 (cellular

immunity) 與 B 細胞有關的體液性免疫 (humoral immunity)。一般而言，自體免疫疾病可分為二大類：(1) 器官專一性自體免疫疾病 (organ-specific)，免疫反應直接攻擊單獨的器官或腺體的特定目標抗原。如：第 I 型胰島素依賴型糖尿病 (IDDM)，作用於胰島。(2) 全身性自體免疫疾病 (systemic)，作用的是大範圍的全身性目標抗原，引起全身性的組織傷害。如：全身性紅斑性狼瘡 (SLE)，包括皮膚、腎臟等組織均會受到影響。

近年來研究指出，蛋白轉譯後修飾可能破壞免疫系統對自體抗原的耐受性，而引發自體免疫反應²⁰，已知的研究有：在多發性硬化症 (Multiple sclerosis) 中自體免疫抗原髓鞘鹼性蛋白 (myelin basic protein, MBP) 的過度瓜胺化 (Citruination) 被認為是引發此一自體免疫疾病的原因²¹；在血球細胞的 Tn 抗原上發生醣化不正常的現象則會引發 Tn-Syndrome²² 在 SLE (systemic lupus erythematosus) 中自體免疫抗原 Sm D1、SmD3¹⁷、Sm B/B'¹⁸ 的甲基化也可能會引發自體免疫反應。

(四) 研究方法及步驟

一、HaCaT cell 的培養

將 HaCaT cell 培養於 25T (25cm²) 的 flask 中，所用的培養液為 90%PRMI、10%FBS、1%penicillin、1% L-glutamine。之

後二天換一次新鮮的細胞培養液，將 flask 置於 37°C、5%CO₂ 之培養箱。

當 flask 中的細胞長到八分滿時，先吸出 flask 內液體再以一倍的 PBS 緩衝液 3ml 沖洗，之後加入一倍的胰蛋白酶 1ml，讓胰蛋白酶覆蓋所有細胞後反應一分鐘，利用手輕拍邊緣，待細胞脫落後加入 4ml 培養液沖洗，並以 10ml 無菌玻璃吸管吸取 1ml 分別置於 4 盒 25T flask 中，再分別將培養液補至 5ml。

二、HaCaT cell 加藥 (AdOx) 及照射 UV 光的培養：

HaCaT cell 培養於含 10 ml (20 ml) 培養液的 25 cm² (75 cm²) flask 中，所用的培養液為 90 % RPMI，10 % FBS，1 % penicillin，1 % L-glutamine。將 flask 置於 37°C，5 % 二氧化碳培養箱，每兩天換一次細胞培養液。於細胞長滿時，更換新鮮的培養液並加入 10 μM 的甲基轉移酶抑制劑 AdOx (adenosine periodate oxidized；Sigma)，再放回培養箱中靜置，24 小時之後再將 UV 光組照射 UV 光 (100 μJ/cm²)，最後在 24 小時之後以刮棒刮細胞的方式收細胞以備抽取蛋白。

三、細胞蛋白萃取液的製備：

HaCaT cell extracts - 待培養在 25 cm² flask 的細胞長滿後 (約

3.5×10⁶ 個細胞)，將培養液吸出，以 1×PBS 8 ml 清洗後，再加入 1×PBS 8 ml 用刮勺把貼壁生長的細胞刮下，並把包含細胞的 PBS 抽出至 15 ml 離心管中，以 1500 rpm 離心 (HITACHI O5P21, Japan) 10 分鐘收細胞，倒掉培養液後以滅過菌的 1×PBS 10 ml 清洗 3 次將殘留的培養液洗掉，再將 pellete 回溶於 200-500 μl 的細胞蛋白萃取液 [1×PBS; 5% glycerol ; 1 mM sodium EGTA ; 1 mM dithiothreitol (DTT) ; 1×Complete EDTA-free protease inhibitor cocktail (Roche) ; 0.5% Triton X-100] 中，混合之後，用超音波震盪器 (MISONIX XL2020, USA) 設定為：強度 7~8，ON 20 秒，OFF 30 秒，總處理時間為 5 分鐘，直到細胞液澄清為止。最後在 4°C 以 12000 g 離心 20 分鐘 (Beckman AVANTI30, USA)，取上清液保存於-20°C。

四、蛋白濃度的測定：

BCA Protein Assay (Pierce) - 準備不同稀釋倍數 (0、0.2、0.4、1、2、4 μg / 5 μl) 的標準蛋白 (Bovine serum albumin; BSA) 與待測蛋白各 5 μl，並在各管加入 100 μl working reagent (BCA reagent A : BCA reagent B = 50 : 1) 混合均勻，於 60°C incubate 30 分鐘後，待試管溫度回到室溫，以光度比色儀 (Beckman DU640, USA) 測波長 562 nm 的相對吸光值 (OD₅₆₂)，將得到的數值扣除背景

值，再與標準蛋白 BSA 的斜率做比較，就可換算出欲測定蛋白的濃度 ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$)。

五、2D-gel electrophoresis 二維凝膠電泳：

(1) 第一維電泳 (pI)：利用 Rehydration buffer 收下的 cell extracts，取 250 μg 的蛋白量並依 holder 的大小補到適合的 loading 體積，將樣本打入 holder 中，並按正負極放入 IPG strip (pH 3-10 or 4-7, 7 cm) (Bio-Rad)，加入 IPG Cover Fluid 使覆蓋 strip，最後把蓋子蓋上，放到 Ettan IPGphor (Amersham Biosciences) 機器中跑 IEF (isoelectric focusing)。

(2) 第二維電泳 (MW)：將跑完 IEF 的 strip 用 $\text{d}_2\text{H}_2\text{O}$ 清洗後，放入含 0.01 g DTT 的 10 ml 平衡 buffer (50 mM Tris-Cl, pH 8.8, 6 M urea, 30% glycerol, 2% SDS) shake 15 分鐘，再放入含 0.25 g IAA 的 10 ml 平衡 buffer shake 15 分鐘，接著跑 10% (12.5%) SDS-PAGE, 100 V, 1.5hr (Bio-Rad Mini-PROTEAN II, III)，跑完後依前述的膠體染色及 western blot 作接下去的分析。

六、In gel digestion 膠體內蛋白酵素水解：

將欲分析之膠體上含某蛋白的點挖下，以 trypsin 做膠體內蛋白酵素水解並使用 Montage In-Gel DigestZP Kit (MILLIPORE)

回收酵素水解後之 peptides。將水解並萃取出來的 peptides 片段送清華大學呂平江教授實驗室，進行 MALDI-TOF 及 MS/MS 質譜儀分析來鑑定蛋白。

七、Mass spectrometry 質譜儀分析：

將 MALDI-TOF 及 MS/MS 質譜儀分析後的質譜儀圖譜及數據，利用 matrix science 網站的 Mascot 軟體進行分析比對，以鑑定蛋白質的身份。

(五) 實驗結果

一、HaCaT cell 的蛋白質二維電泳

在去年的大專生專題研究計畫「以 HaCaT cell 研究精胺酸甲基化和自體免疫疾病－全身性紅斑性狼瘡 (SLE) 自體抗原呈現之相關性」中，我利用 HaCaT cell 照射 UV 光的情形來模擬全身性紅斑性狼瘡的光敏感性。在去年的實驗部分結果中，我觀察到 HaCaT cell 在照射 UV 光的情形下，細胞內部分的雙甲基精胺酸蛋白訊號會有明顯降低的情形 (圖一)，本研究計畫期能利用蛋白質二維電泳和質譜儀鑑定，鑑定照射 UV 光後的 HaCaT 細胞內表現有所改變之甲基接受蛋白。在實驗室中未有建立 HaCaT 細胞蛋白質的二維電泳的條件，所以我先以未做任何處理的

HaCaT 細胞來進行二維電泳，細胞內蛋白質大多分布在 pH 4~7、分子量 17~72 kDa 左右（圖二）。之後我便以 pH 4~7 的條件進行二維電泳（圖三），並以辨識對稱形雙甲基蛋白之抗體 anti-SYM10，找出因照射 UV 而使細胞出現雙甲基精胺酸蛋白差異的點。

二、蛋白質身分之鑑定

我將照射 UV 光前後細胞內有對稱行甲基化蛋白有明顯差異點挖下（圖四），以 trypsin 做膠體內蛋白酵素水解並使用 Montage In-Gel Digest ZP Kit（MILLIPORE）回收酵素水解後之 peptides。將水解並萃取出來的 peptides 片段送清華大學呂平江教授實驗室，進行 MALDI-TOF 及 MS/MS 質譜儀分析，再將數據利用 matrix science 網站的 Mascot 軟體進行分析比對，鑑定蛋白質的身份。

在利用 matrix science 網站的 Mascot 軟體進行分析比對後，得到的數據並沒有非常的顯著性意義（表一）。在我仔細探討其可能的原因後，也許在這次的研究中，膠體內的蛋白質量也許不足，導致濃度太低而沒有好的結果。

三、細胞在照射 UV 後細胞內精胺酸甲基轉移酶之變化

另外，去年的大專生專題研究計畫「以 HaCaT cell 研究精胺

酸甲基化和自體免疫疾病－全身性紅斑性狼瘡 (SLE) 自體抗原呈現之相關性」中，我觀察到在細胞照射 UV 光 24 小時後，細胞內精胺酸甲基轉移酶會產生明顯的變化，在未處理的細胞中，細胞內 PRMT1(type I PRMT)的表現量最高；相反的，細胞內 PRMT5(type II PRMT)的表現量卻是在有照 UV 的情況下有著較明顯的訊號 (圖五)。所以我特別觀察細胞在照射 UV 光 5 個小時的細胞內精胺酸甲基轉移酶蛋白質表現的變化，隨照射 UV 後時間的增長，細胞內會有 PRMT 5 表現量逐漸上升、PRMT 1 表現量逐漸下降的現象 (圖六)。

(六) 討論

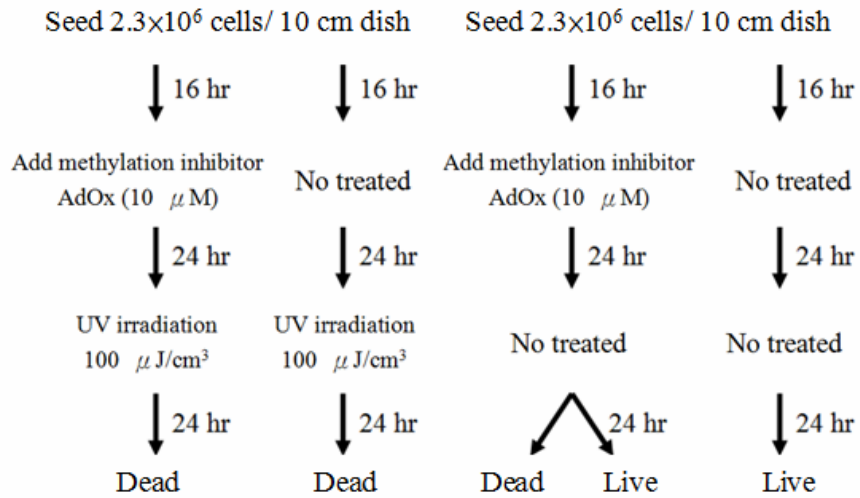
在我去年的大專生專題研究計畫「**以 HaCaT cell 研究精胺酸甲基化和自體免疫疾病－全身性紅斑性狼瘡 (SLE) 自體抗原呈現之相關性**」中，我利用 HaCaT cell 照射 UV 光的情形來模擬全身性紅斑性狼瘡的光敏感性。實驗結果中，我觀察到 HaCaT cell 在照射 UV 光的情形下，細胞內部分的對稱雙甲基精胺酸蛋白訊號會有明顯降低的情形(圖一)。因著我對這些部份蛋白的身分感到興趣，所以在本次實驗中我以 HaCaT 細胞照射 UV 光的有無並以蛋白質二維電泳的方法來觀察細胞內對稱雙甲基精胺酸蛋白質的變化。

實驗中，我將照射 UV 光前後細胞內有對稱行甲基化蛋白有明顯差異點挖下(圖三、四)。將水解並萃取出來的 peptides 片段送清華大學呂平江教授實驗室，進行 MALDI-TOF 及 MS/MS 質譜儀分析後，再利用 matrix science 網站的 Mascot 軟體進行分析比對，鑑定蛋白質的身份。雖然在結果上並未發現有好的鑑定結果(表一)，但是我對於蛋白質二維電泳、打 MS 及分析數據等都有更深入的了解。

另外在去年研究結果中，對於 HaCaT cell 在照射 UV 24 小時後細胞內精胺酸蛋白甲基轉移酶所產生的變化，在本次研究中我也做了近一步的探討，我將照射 UV 光後的細胞，在五小時間分別收取細胞，萃取細胞萃取液後進行 western blot，發現隨照射 UV 後時間的增長，細胞內會有 PRMT 5 表現量逐漸上升、PRMT 1 表現量逐漸下降的現象(圖六)。關於細胞內精胺酸甲基轉移酶在照射 UV 後所產生之變化，實驗室將會以 RT-PCR 的方式觀察細胞在照射 UV 後五小時中細胞內 RNA 的表現量，以了解 PRMT 在照射 UV 後改變的原因。

(七) 附圖

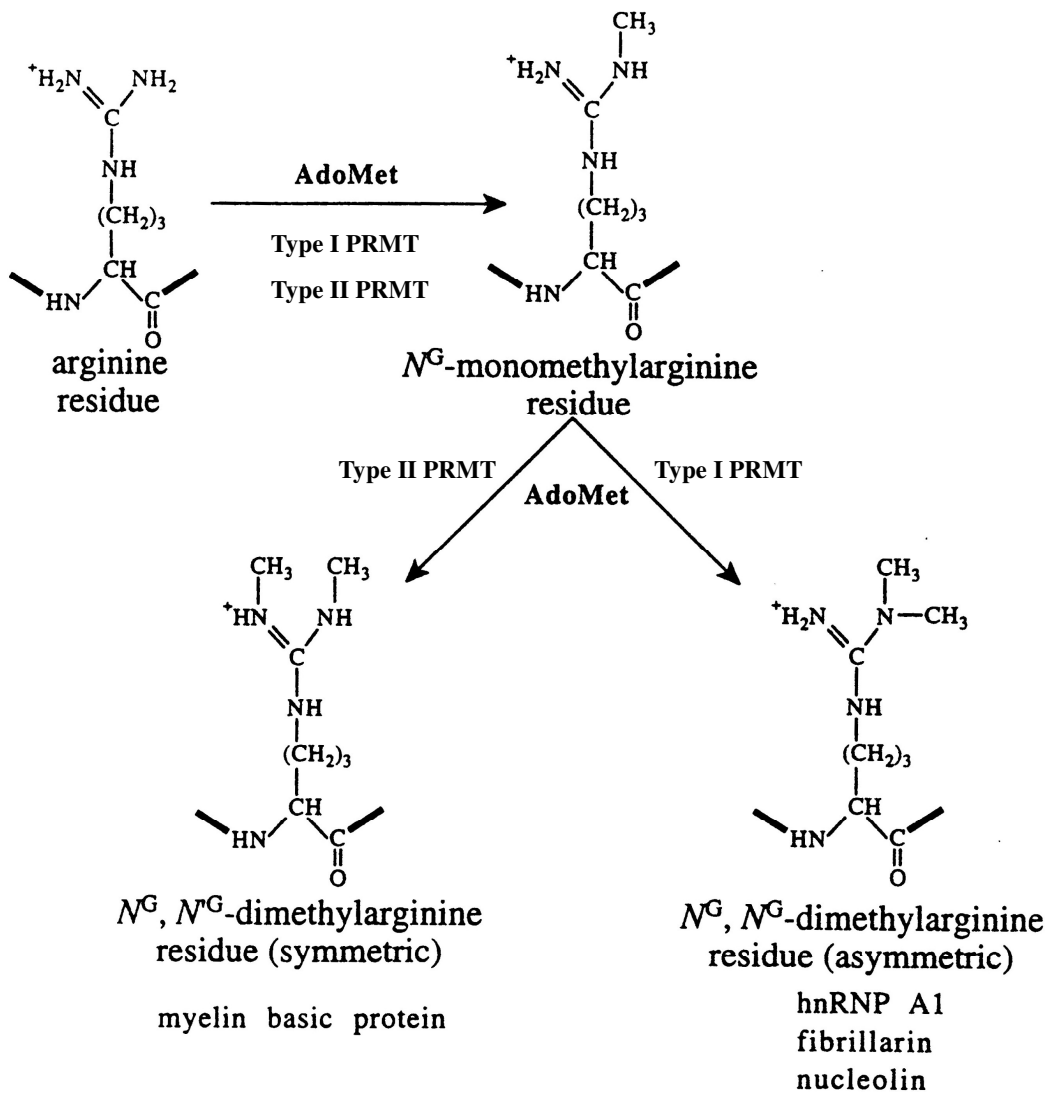
	1	2	3	4
UV 光	+	+	-	-
AdOx	+	-	+	-



	1	2	3	4	5
AdOx	+	-	+	+	-
UV	+	+	-	-	-
D or L	D	D	D	L	L

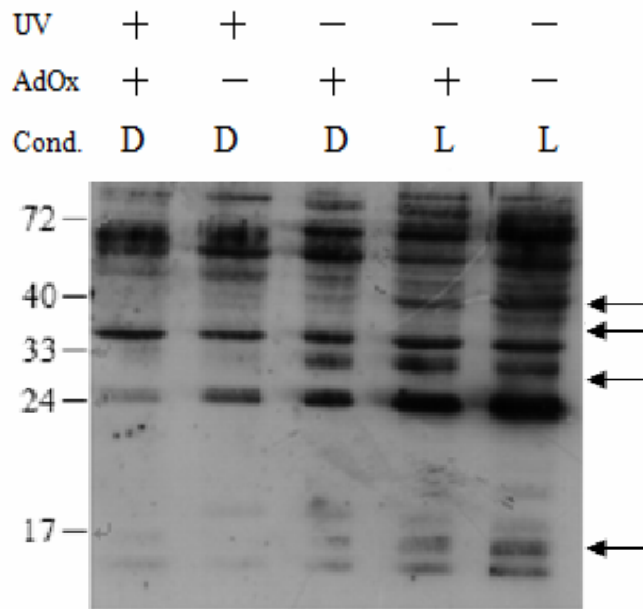
附圖一、在「以HaCaT cell 研究精胺酸甲基化和自體免疫疾病—全身性紅斑性狼瘡 (SLE) 自體抗原呈現之相關性」研究計畫中，HaCaT 細胞加藥甲基抑制劑AdOx及照射UV光的處理

先將HaCaT cell培養於25T (25cm²) 的flask中，待細胞數足夠時將適量的細胞分成四組，16小時後細胞貼到dish時加藥AdOx (10 μ M)，24小時之後再照射UV光 (100 μ J/cm²)，最後在24小時之後以刮棒括細胞的方式收細胞。因為AdOx具有毒性會使部分細胞死亡、照射UV後的細胞全數死亡以及未處理的細胞大多存活，因此可收到五組細胞，隨後以western blot進行分析。



附圖二、精胺酸甲基轉移酶酵素機制及精胺酸甲基化之結構示意圖

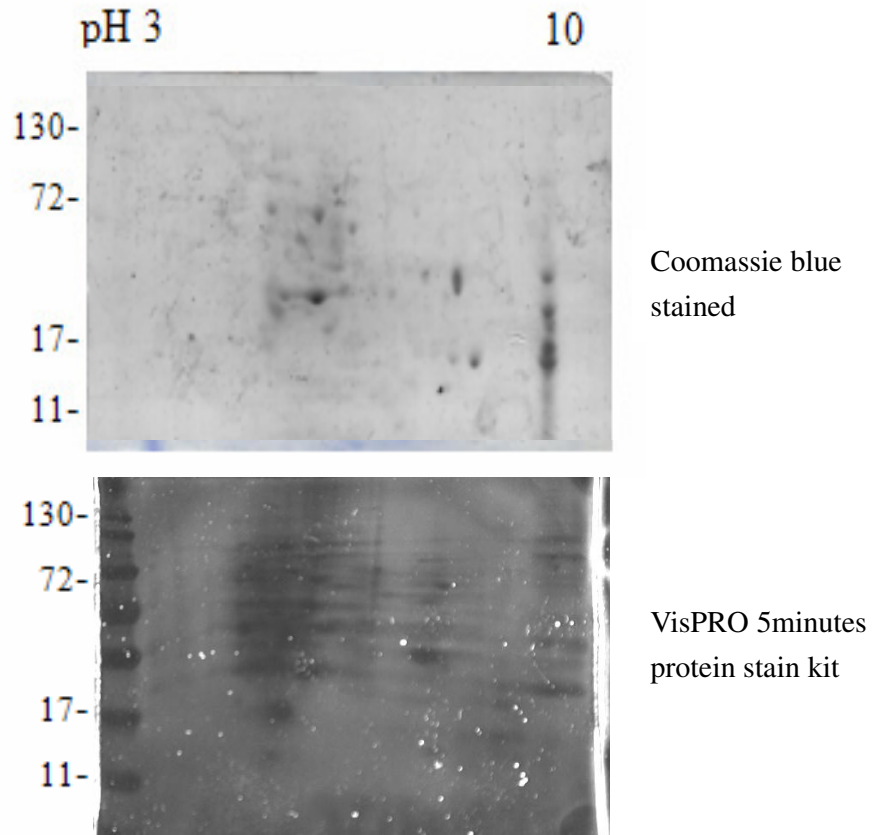
PRMT系列酵素藉由酵素活性可略分為兩大類，分別是第一型（type I）和第二型（type II）PRMT，type I PRMT能將精胺酸催化成為非對稱型雙甲基精胺酸（asymmetric N^G, N^G -dimethylarginine (aDMA)），type II PRMT則能將精胺酸催化成為對稱型雙甲基精胺酸（symmetric N^G, N^G -dimethylarginine (sDMA)），此外不論是type I或type II PRMT都會催化單甲基精胺酸（ N^G -monomethylarginine (MMA)）的生成



圖一、HaCaT cell 以 UV 光 照射或以甲基抑制劑 AdOx 處理後，含對稱型雙甲基精胺酸蛋白質分布變化

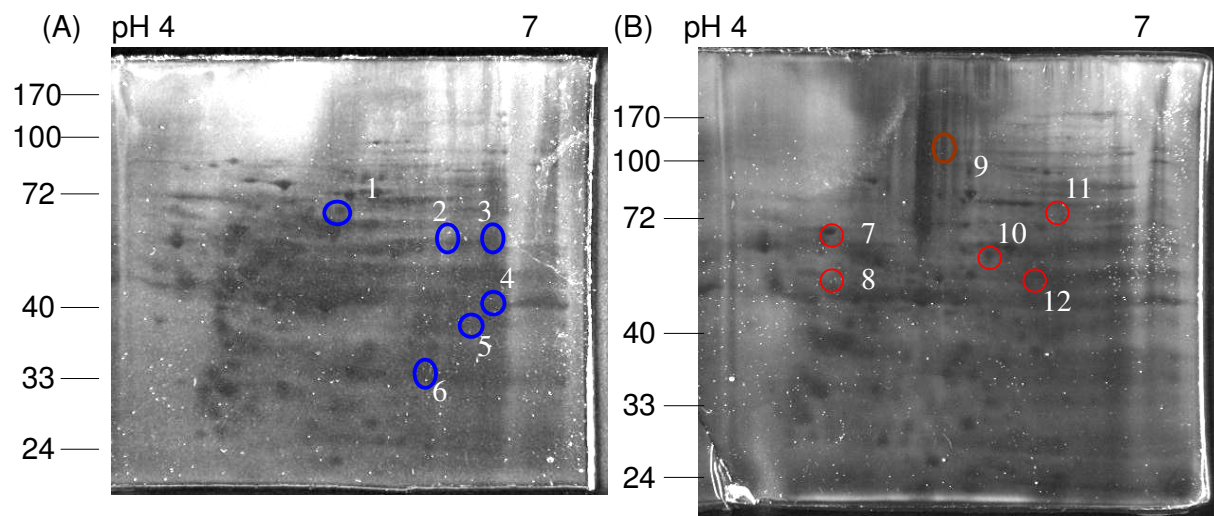
去年的大專生專題研究計畫「以 HaCaT cell 研究精胺酸甲基化和自體免疫疾病－全身性紅斑性狼瘡 (SLE) 自體抗原呈現之相關性」的結果，將細胞處以加藥 AdOx (10 μ M) 及照射 UV 光 (100 μ J/cm²) 後，分別收取死和活細胞，萃取蛋白後利用 12.5% 的 SDS-PAGE 做分離並以抗對稱型雙甲基精胺酸抗體 SYM10(1:550) 做 western blot。

(D: Dead; L: Live)



圖二、HaCaT cell 的蛋白質二維電泳的 pattern

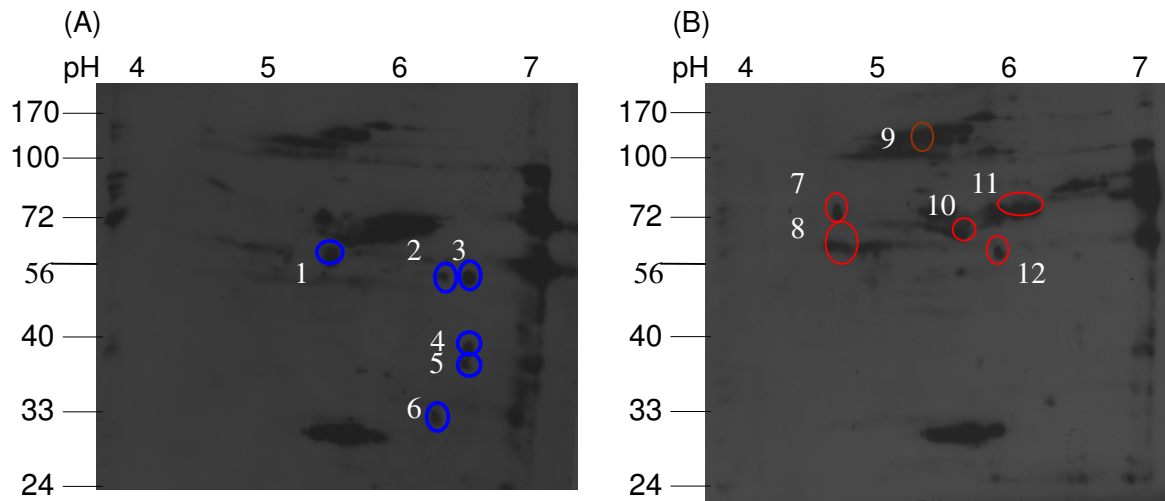
一維電泳以 pH 3-10, 7 cm strip, 二維電泳以 10% SDS-PAGE 跑 HaCaT cell 細胞萃取液。實驗以未做任何處理的 HaCaT cell 蛋白質(250mg)進行蛋白質二維電泳, 蛋白質的分部大多分布在 pH 4~7、分子量 17~72 kDa 左右。



圖三、HaCaT cell 的蛋白質二維電泳的 pattern (pH 4~7)

一維電泳以 pH 4-7, 7 cm strip, 二維電泳以 10% SDS-PAGE 跑 HaCaT cell 細胞萃取液。實驗分別以未做任何處理以及照射 UV 後 24 小時的 HaCaT cell, 萃取出蛋白質後進行蛋白質二維電泳(250mg), 蛋白質的分部大多分布在 pH 4~7、分子量 24~100 kDa 左右。

(A)照射 UV 後 24 小時之 HaCaT cell (B)未處理之 HaCaT cell



圖四、HaCaT cell 以 UV 光 照射或未有處理，含對稱型雙甲基精胺酸蛋白質分布變化

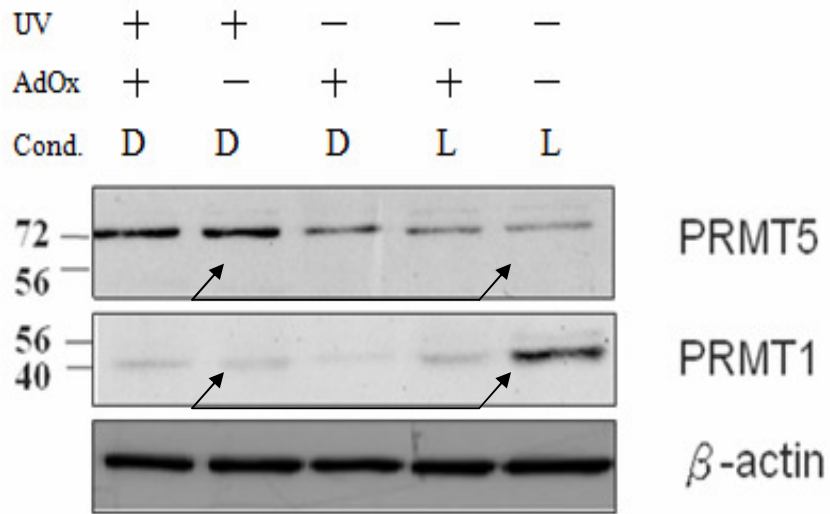
實驗分別以未做任何處理以及照射 UV 後 24 小時的 HaCaT cell，取出細胞萃取液後進行蛋白質二維電泳(250mg)，並以 anti-SYM10 做 western blot。
 (A)照射 UV 後 24 小時之 HaCaT cell (B)未處理之 HaCaT cell

Spots	Protein name	NCBI gi number	Measured MW / pI	Theoretical MW / pI	Score (MS/MS ion search)
1	transducin beta-like 1X isoform a	gil5032159	60 / 5.5	63.255 / 6.08	44
2	No appropriate result	—	57 / 6.3	—	—
3	No appropriate result	—	57 / 6.4	—	—
4	NAD kinase	gil56202539	40 / 6.4	64.214 / 6.32	40
5	RecName: Full=Uncharacterized protein C1orf172	gil152125836	38 / 6.4	44.469 / 6.10	38
6	hypothetical protein LOC285636, isoform CRA_a	gil119576420	33 / 6.2	31.539 / 5.01	47
7	No appropriate result	—	73 / 4.8	—	—
8	No appropriate result	—	68 / 4.8	—	—
9	zinc finger and BTB domain containing 5	gil7662074	120 / 5.3	75.086 / 5.79	42
10	MMS19-like (MET18 homolog, <i>S. cerevisiae</i>), isoform CRA_e	gil119570310	72 / 5.5	95.809 / 6.00	37
11	No appropriate result	—	73 / 6.1	—	—
12	No appropriate result	—	58 / 5.9	—	—

Table.1 anti-Sm辨識上降低的點挖下作質譜儀分析的結果

1~6:照射UV 24 小時後anti-SYM10 辨識增強的點

7~12:未處理細胞以 anti-SYM10 辨識，相較於照射UV後細胞增強的點

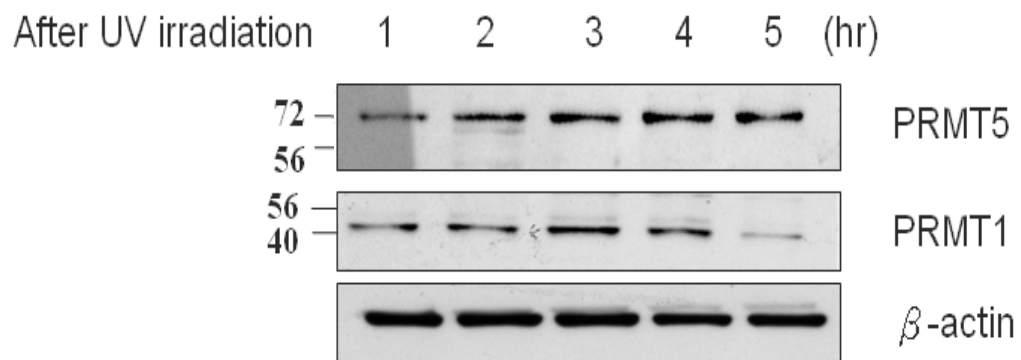


圖五、HaCat cells 在不同處理下，細胞內精胺酸甲基轉移酶的含量

去年的大專生專題研究計畫「以 HaCaT cell 研究精胺酸甲基化和自體免疫疾病—全身性紅斑性狼瘡 (SLE) 自體抗原呈現之相關性」的結果，將細胞處以加藥 AdOx (10 μ M) 及照射 UV 光 (100 μ J/cm²) 後，分別收取死和活細胞的 HaCaT cells extracts 20 μ g 蛋白量跑 12.5% 的 SDS-PAGE 作分離，並將蛋白轉移到 NC 膜上做 western blot。PRMT5 (1:1000) 在 HaCaT cell 照射 UV 光後的細胞內表現量較高，而 PRMT1 (1:2000) 在 HaCaT 細胞中以未處理的情況下表現量最高。

箭頭：有照 UV 光和沒照 UV 光 pattern 比較有所不同之處

(PRMT1：會辨識精胺酸甲基轉移酶 I；PRMT5：會辨識精胺酸甲基轉移酶 V)



圖六、HaCaT cell 在照射 UV 光後細胞內 PRMT5 及 PRMT1 表現

HaCaT cell extracts 分別在照射 UV 後 1~5 小時間收取，並以 HaCaT cells extracts 20 μ g 蛋白量跑 12.5% 的 SDS-PAGE 作分離，並將蛋白轉移到 NC 膜上做 western blot。PRMT5 在 HaCaT cell 照射 UV 光後隨時間增長而表現量增加，而 PRMT1 在 HaCaT 細胞中則是隨照射 UV 光後隨時間增長而表現量下降。

(六) 參考文獻

- [1] Uy, R., and Wold, F. (1977). Posttranslational covalent modification of proteins. *Science (New York, N.Y)* **198**(4320), 890-896
- [2] Lin, C.H., Hsieh, M., Li Y.C., Li, S.Y., Pearson, D.L., Pollard, K.M., and Li, C. (2000) Protein N-arginine methylation in subcellular fractions of lymphoblastoid cells. *J. Biochem. (Tokyo)* 128,493-498.
- [3] McBride A.E. and Silver P.A.: State of the arg: protein methylation at arginine comes of age (2001) *Cell* 106, 5-8
- [4] Christopher D. Krause, Zhi-Hong Yang, Young-Sun Kim, Jin-Hyung Lee, Jeffrey R. Cook, Sidney Pestka Protein arginine methyltransferases: evolution and assessment of their pharmacological and therapeutic potential. *Pharmacol Ther.*(2007) Jan;113(1):50-87.
- [5] Tang, J., Gary, J. D., Clarke, S., and Herschman, H. R. (1998). PRMT 3, a type I protein arginine N-methyltransferase that differs from PRMT1 in its oligomerization, subcellular localization, substrate specificity, and regulation. *The Journal of biological chemistry* **273**(27), 16935-16945
- [6] Chen, D., Ma, H., Hong, H., Koh, S. S., Huang, S. M., Schurter, B. T., Aswad, D. W., and Stallcup, M. R. (1999). Regulation of transcription by a protein methyltransferase *Science (New York, N.Y)* **284**(5423), 2174-2177
- [7] Frankel, A., Yadav, N., Lee, J., Branscombe, T. L., Clarke, S., and Bedford, M. T. (2002). The novel human protein arginine N-methyltransferase PRMT6 is a nuclear enzyme displaying unique substrate specificity. *The Journal of biological chemistry* **277**(5), 3537-3543
- [8] Lee, J., Sayegh, J., Daniel, J., Clarke, S., and Bedford, M. T. (2005). PRMT8, a new membrane-bound tissue-specific member of the protein arginine methyltransferase family. *The Journal of biological chemistry* **280**(38), 32890-32896
- [9] Rho, J., Choi, S., Seong, Y. R., Cho, W. K., Kim, S. H., and Im, D. S. (2001). Prmt5, which forms distinct homo-oligomers, is a member of the protein-arginine methyltransferase family. *The Journal of biological chemistry* **276**(14), 11393-11401
- [10] Miranda, T. B., Miranda, M., Frankel, A., and Clarke, S. (2004). PRMT7 is a member of the protein arginine methyltransferase family with a distinct substrate specificity. *The Journal of biological chemistry* **279**(22), 22902-22907
- [11] Cook, J. R., Lee, J. H., Yang, Z. H., Krause, C. D., Herth, N., Hoffmann, R., and Pestka, S. (2006). FBXO11/PRMT9, a new protein arginine

- methyltransferase, symmetrically dimethylates arginine residues. *Biochemical and biophysical research communications* **342**(2), 472-481
- [12] Scott, H. S., Antonarakis, S. E., Lalioti, M. D., Rossier, C., Silver, P. A., and Henry, M. F. (1998). Identification and characterization of two putative human arginine methyltransferases (HRMT1L1 and HRMT1L2). *Genomics* **48**(3), 330-340
- [13] Passos, D. O., Quaresma, A. J., and Kobarg, J. (2006). The methylation of the C-terminal region of hnRNPQ (NSAP1) is important for its nuclear localization. *Biochemical and biophysical research communications* **346**(2), 517-52512
- [14] Chiou, Y. Y., Lin, W. J., Fu, S. L., and Lin, C. H. (2007). Direct Mass-Spectrometric Identification of Arg296 and Arg299 as the Methylation Sites of hnRNP K Protein for Methyltransferase PRMT1. *The protein journal* **26**(2), 87-9312
- [15] Pellar, G. J., and DiMario, P. J. (2003). Deletion and site-specific mutagenesis of nucleolin's carboxy GAR domain. *Chromosoma* **111**(7), 461-469
- Doyle, H. A., and Mamula, M. J. (2001). Post-translational protein modifications in antigen recognition and autoimmunity. *Trends in immunology* **22**(8), 443-449
- [16] Brahms, H., Raymackers, J., Union, A., de Keyser, F., Meheus, L., and Luhrmann, R. (2000). The C-terminal RG dipeptide repeats of the spliceosomal Sm proteins D1 and D3 contain symmetrical dimethylarginines, which form a major B-cell epitope for anti-Sm autoantibodies. *The Journal of biological chemistry* **275**(22), 17122-17129
- [17] Brahms, H., Meheus, L., de Brabandere, V., Fischer, U., and Luhrmann, R. (2001). Symmetrical dimethylation of arginine residues in spliceosomal Sm protein B/B' and the Sm-like protein LSm4, and their interaction with the SMN protein. *RNA*. **7**(11), 1531-42
- [18] Bedford, M., and Richard, S. (2005). Arginine methylation an emerging regulator of protein function. *Mol Cell*. **18**(3), 263-272
- [19] Cao, L., Sun, D., and Whitaker, J. (1998). Citrullinated myelin basic protein induces experimental autoimmune encephalomyelitis in Lewis rats through a diverse T cell repertoire. *J Neuroimmunol*. **88**(1-2), 21-29
- [20] Ju, T., and Cummings, R. D. (2005). Protein glycosylation: chaperone mutation in Tn syndrome *Nature* **437**(7063), 1252