

科技部補助

大專學生研究計畫研究成果報告

* ***** ***** *
* 計 畫 *
* : 人類跟斑馬魚 PRMT8 之活性與特性分析 *
* 名 稱 *
* ***** ***** *

執行計畫學生： 李明軒
學生計畫編號： MOST 106-2813-C-040-045-B
研究期間： 106年07月01日至107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 107年03月30日

(一)摘要

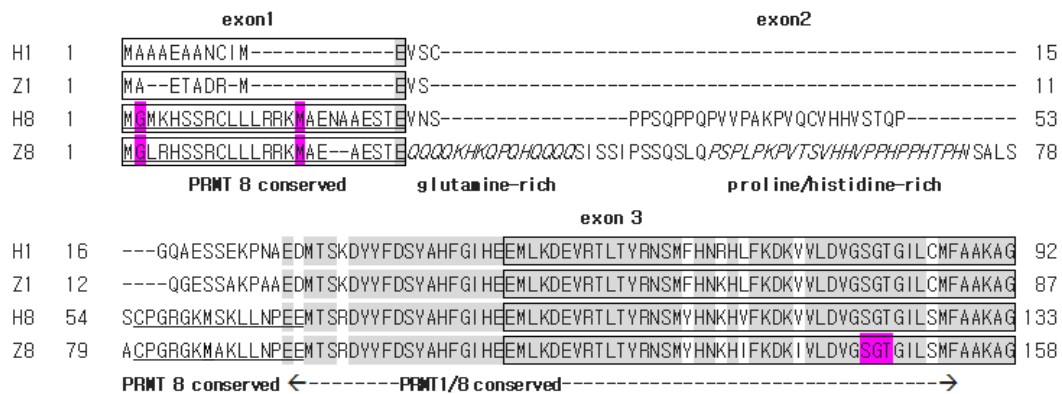
PRMT8 是蛋白質精氨酸甲基轉移酶(protein arginine methyltransferase)家族成員中唯一有組織特異性，只會表現在腦和神經細胞中。PRMT8 在哺乳類與魚類等脊椎動物中發現，是 PRMT1 的旁系基因，也都是第一型的蛋白質精氨酸甲基轉移酶，兩者有很高的同源性，主要的差別是在蛋白質的 N 端序列，因此造成兩者活性與功能的差異。然而在人類 PRMT8 N 端與斑馬魚的序列也不完全相同，在脯胺酸(proline-rich)跟組胺酸(histidine-rich)的區域外，斑馬魚還富含獨特的麩醯胺酸(glutamine-rich; Q-rich)序列。先前研究顯示 PRMT8 N 端的有無對於 PRMT8 的活性有很大的影響，因此想藉由本計畫，進一步探討人類跟斑馬魚 PRMT8 的催化活性及 N 端的功能角色。先前實驗室已經建構完成人類跟斑馬魚 PRMT8 多種基因片段表現載體，在純化多種接上(His)₆標籤的重組蛋白後確認蛋白質特性，之後利用 pull down assay 確認斑馬魚 PRMT8 N 端沒有特異性蛋白結合。接著藉由甲基化反應觀察到，許多 sample 有不同的甲基化特性，也隨著加入不同 PRMT8 N 端片段競爭，受質有不同的甲基化反應。本研究藉由比較分析人類與斑馬魚 PRMT8 的活性與特性，結果應可增進瞭解 PRMT8 的調控，未來可能有機會發展 PRMT8 在人類神經方面疾病上的治療應用。

(二)研究動機與研究問題

蛋白質精氨酸甲基化是一種常見的轉譯後修飾，調控細胞許多功能包含訊息傳遞、RNA 處理、轉錄調節和 DNA 修復。此修飾反應是經由蛋白質精氨酸甲基轉移酶 (PRMTs)所催化。PRMTs 被報導與許多疾病如癌症和神經退化性疾病等都有相關，但對於 PRMTs 的調控機制還不是很清楚。

在脊椎動物中，發現第一型的蛋白質精氨酸甲基轉移酶 PRMT8 和 PRMT1 有很高的同源性，之前有研究顯示，它們的差異性只在 N 端上的 76 個胺基酸，這造成讓它們之間的活性和在細胞中表達的位置不同。PRMT8 是在 PRMTs 家族中唯一會表達組織特異性的蛋白，只會在大腦跟神經細胞中，也發現 PRMT8 N 端的兩個精氨

酸自我甲基化的位點，對於調控 PRMT8 受質的結合跟酵素活性的功能很重要。如果將 PRMT8 N 端剔除(N-deletion)，活性將會有顯著上升，顯示 PRMT 的 N 端區域對於 PRMT8 的調控很重要。雖然 PRMT8 只存在於脊椎動物中，但 N 端在哺乳類(如人類)跟魚類(如斑馬魚)的序列也不完全相同，斑馬魚中則是在脯胺酸(proline-rich)跟組胺酸(histidine-rich)的區域前有獨特的大量麩醯胺酸(glutamine-rich; Q-rich)序列(圖一)。先前實驗室針對哺乳類跟斑馬魚的 PRMT8 N 端差異位置做分析，鄭嘉瑩學姊利用 knockdown/回復(rescue)之斑馬魚實驗系統，以反義寡核苷酸 AMO 抑制斑馬魚 PRMT8 的表現，同時打入不同片段的 PRMT8 cRNA，以觀察胚胎型態回復的情形。結果發現老鼠的 PRMT8 無法取代斑馬魚的 PRMT8 回復斑馬魚胚胎的生長與存活，但是以斑馬魚 PRMT8 N 端取代老鼠 PRMT8 的 N 端的老鼠 PRMT8 則可以，代表哺乳類和斑馬魚 PRMT8 N 端的不同可能是能否回復斑馬魚胚胎生長與存活的關鍵。此外斑馬魚 PRMT8 N 端的麩醯胺酸(glutamine-rich; Q-rich)序列對於斑馬魚 PRMT8 的調控也很重要，剔除掉此段序列的 PRMT8 恢復能力不佳。



圖一、人類與斑馬魚 PRMT8 胺基酸序列比對

人類 PRMT8(H8; NP_062828.3)與斑馬魚 PRMT8(Z8; NP_001038507.1)序列上在 N 端區域有些差異，斑馬魚多出了一個 glutamine-rich(引用自[1])。

那為什麼生物合成活性較低的 PRMT8 全長而非活性高的 N-deletion，還有也反而是斑馬魚 PRMT8 全長修復胚胎之功能比 N-deletion 好，這表示 PRMT8 N 端的

存在雖然會降低酵素活性，但對於生物體的調控機制是不可或缺的；而斑馬魚 PRMT8 N 端上富含麩醯胺酸的(glutamine-rich; Q-rich)序列在人類 PRMT8 上又無法發現，又可能代表斑馬魚 PRMT8 N 端有別的功能。

目前並沒有比較人類與斑馬魚 PRMT8 在活性與功能上差異的研究報導，於是我想利用兩者 PRMT8 數種類型重組蛋白去瞭解 PRMT8 的活性及其 N 端上的特性。也再繼續利用 pull down assay 確認蛋白質是否有特異性結合，進而探討它們對 PRMT8 功能調控的影響。

(三)文獻回顧與探討

蛋白質精氨酸甲基化(protein arginine methylation)是一種在真核生物廣泛常見的蛋白質轉譯後修飾(Post-translational modification)，藉由蛋白質精氨酸甲基轉移酶(protein arginine methyltransferase; PRMT)家族催化反應[2, 3]，將甲基提供者 S-adenosyl-L-methionine(S-AdoMet)的甲基轉移到特定的精氨酸位點上，讓蛋白質改變部分結構調整其功能的機制，調控很多細胞內路徑，例如 RNA 處理、轉錄調節、訊息傳遞跟蛋白質之間的交互作用(subcellular localization)[4]。

PRMTs 根據甲基化的特性分成三種類型，第一種是催化形成非對稱雙甲基化(Asymmetric dimethylarginine; ADMA)包含 PRMT1、PRMT2、PRMT3、PRMT4(CARM1)、PRMT6 跟 PRMT8。第二種是催化形成對稱雙甲基化(Symmetric dimethylarginine; SDMA)，只有 PRMT5[5]。第三種單甲基化(Monomethylarginine; MMA)有 PRMT7，雖然 PRMT7 有被認為是第二種類型，但有研究指出是屬於第三種[6]。

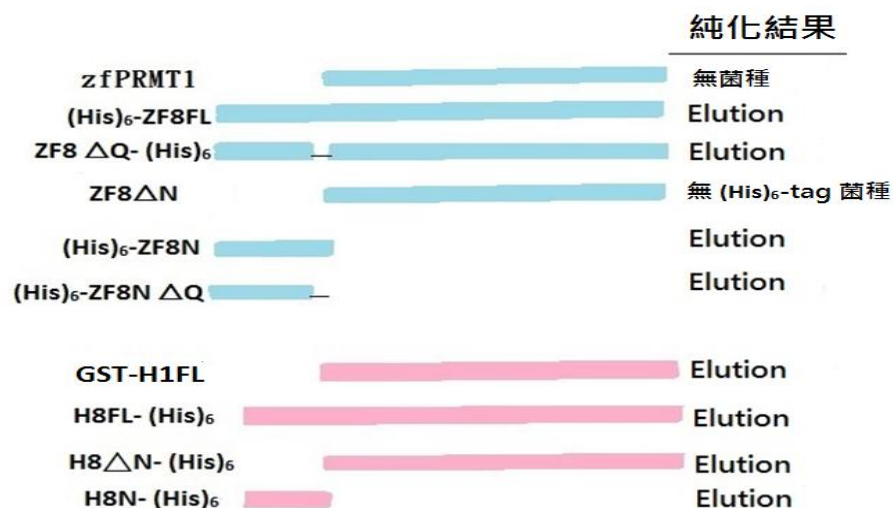
PRMT8 可以在哺乳類跟魚類等脊椎動物中發現，是 PRMT 家族中唯一會表現組織特異性的蛋白，有研究發現 PRMT8 會因為 N 端的莖萘酸化(myristoylation)而讓它附著在細胞膜上，也利用北方點墨法(Northern blot)檢測出 PRMT8 在大腦表達的特異性[7]。但另外也有研究利用 PRMT8 特定的抗體在老鼠的中樞神經內發現 PRMT8 主要表達在細胞核中[8]。

PRMT8 除了可以跟 PRMT8 本身形成同源二聚體(Homodimer)以外,也可以跟 PRMT1 形成異源二聚體(Heterodimer)。它跟 PRMT1 有很高的同源性,是 PRMT1 的旁系同源基因(paralogue),根據先前研究顯示序列約有 83%的一致性,差別只在於 N 端上的 76 個胺基酸,如果將 PRMT8 N 端上面的 60 個胺基酸移除,那它的酵素活性將會幾乎上升到跟 PRMT1 相同程度[9]。此外,有研究顯示 PRMT8 N 端的兩個精氨酸自我甲基的位點,會藉由負調控(down-regulation)降低 PRMT8 對甲基提供者 S-腺苷甲硫胺酸(S-AdoMet)的親和力,抑制 AdoMet 結合[10]。

因此可以發現 PRMT8 N 端有無對於 PRMT8 本身活性調控有著顯著的影響,而人類跟斑馬魚 PRMT8 又有些微的差異性,在於斑馬魚 PRMT8 N 端多出一個麩醯胺酸 (glutamine-rich;Q-rich)序列,於是想利用重組蛋白比較人類跟斑馬魚 PRMT8,探討活性跟分析生理特性,特別是著重在 PRMT8 的 N 端上面。

(四)研究方法與步驟

實驗室已經有學長姐建構好與正在建構中的斑馬魚PRMT8 (zfPRMT8)與人類 PRMT8 (hPRMT8) 多種類型載體,之後可以純化重組蛋白來探討活性(圖二)。



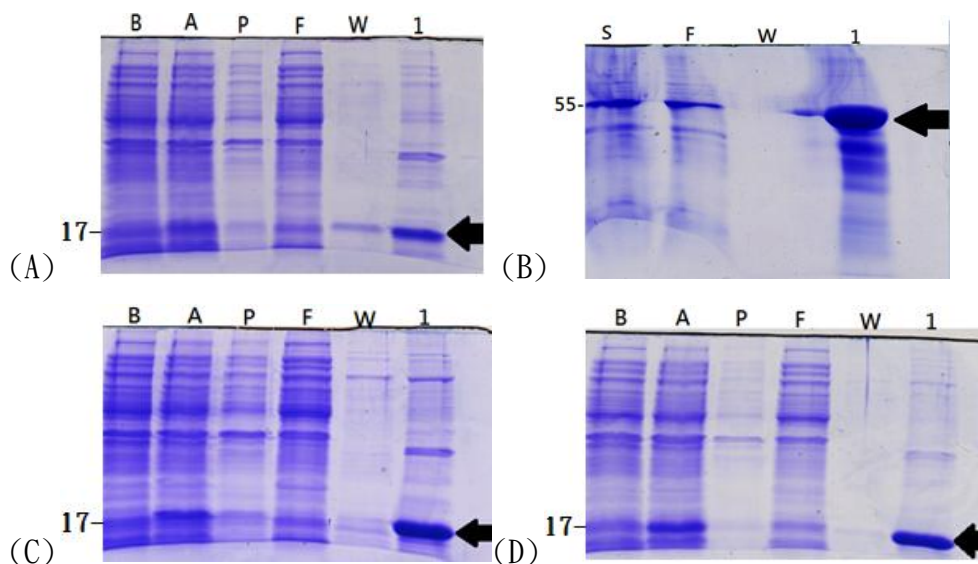
圖二、zfPRMT 與hPRMT 基因片段之簡易示意圖

藉由純化出不同類型重組蛋白來探討zfPRMT8 與hPRMT8 的活性,大部分載

體都已建構好且有蛋白表現出來，除了少數幾個正在進行建構。

一、zfPRMT8 N端結合蛋白特異性分析

先前為了探討 zfPRMT8 N端調控的重要性，實驗室蔡政剛學長用斑馬魚腦萃取液跟 zf8N 做 pull down，尋找特異性結合的蛋白，發現 ependymin(EPD)、Ywhaba(ZFYW)這兩種可能的目標蛋白。我接續學長實驗，製備重組蛋白去確認 zf8N 和這兩種蛋白是否有特異性結合存在。除了純化實驗室已建構好表現載體的(His)₆-zfPRMT8 N端、全長、N端 Q-deletion 數種重組蛋白以外，也另外純化出 hPRMT8 N端連結有(His)₆的重組蛋白(圖三)，將這些重組蛋白保留在樹脂上，和接上 GST-標籤的 EPD 或 ZFYW 做 pull down assay，接著藉由西方點墨法觀察，用 Anti-HIS 確認保留在(His)₆上的蛋白有存在和 Anti-GST 確認蛋白質之間是否有結合。目前已經初步進行，除了發現在 55 kDaGST-ZFYW 蛋白質有成功結合以外(4, 5, 6)，也發現在 26 kDaGST 的位置上，第 1 跟 3 組的 negative control 有出現些微 band，代表可能是 tag 之間有結合，這部分需要再做實驗確認(圖四)。之後會修改實驗條件繼續做 pull down assay 確認蛋白質之間是否有特異性結合。



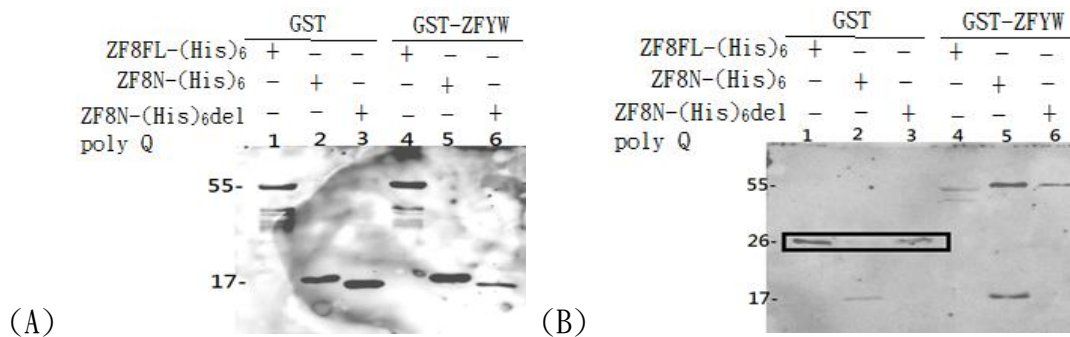
圖三、PRMT8 重組蛋白純化

(A) h8N-(His)₆ (B)(His)₆-zf8FL (C)(His)₆-zf8N (D)(His)₆-zf8N-Qdel

養出成功轉染表現載體的大腸桿菌(BL21)後，加入 IPTG 誘導，用高速離心

管收集且離心，收集上清液後再使用 Sonic 超音波震盪與高速離心再分離出所要的上清液，底下沉澱另外加 PBS 回溶。取 His-Tag purification Resin 到 Gravity column 處理過，加入 supernatant 收集 flow through 後，加入 wash buffer 收集 wash sample，因為接下來要做 pull down assay 所以(His)₆ 標籤蛋白保留在樹脂上，之後跑 SDS-PAGE 確認重組蛋白位置的大小。

B: 誘導前菌液(before)、A: 誘導後菌液(after)、S: supernatant、P: pellet、F: flow through、W: wash、1: 保留在(His)₆上的重組蛋白



圖四、用 western blot 看 pull down assay 確認 zf8N 是否有特異性結合

將(His)₆標籤的斑馬魚PRMT8重組蛋白保留在resin上面，利用Anti-HIS確認重組蛋白都有保留在位置上(A)，之後(His)₆重組蛋白與GST、GST-ZFYW 做 pull down assay，利用Anti-GST檢查GST-ZFYW 是否有結合被拉下(B)。(His)₆重組蛋白部分 15 μg，GST重組蛋白部分 45 μg。

二、觀察 PRMT8 N 端序列對 PRMT8 活性的影響

藉由之前的研究可以得知，hPRMT8 N 端如果剔除(N-deletion)，那它的甲基轉移酶活性將會顯著上升，幾乎會達到 PRMT1 1/3 程度，表示 N 端對於 PRMT8 活性的調控很重要[9]。zfPRMT8 的 N 端和 hPRMT8 相當不同，是否也會抑制甲基轉移酶活性還沒有人探討過。此外 zfPRMT8 N 端富含麩醯胺酸的序列(glutamine-rich; Q-rich)是 zfPRMT8 跟 hPRMT8 在 N 端主要的差異，如果剔除(Q-deletion)，修復胚胎的能力不佳，代表它對於 zfPRMT8 也有重要性，是否會影響甲基轉移酶活性也想進一步瞭解。因此想藉由製備 zfPRMT8 跟 hPRMT8 多種類型的重組蛋白去

做實驗(參考圖二)，探討 PRMT8 基因片段的活性與特性。

1. 檢測 zfPRMT8 跟 hPRMT8 的活性

首先製備 zfPRMT8 跟 hPRMT8 全長、N-deletion 還有 zf8-Qdel 的重組蛋白，用 SDS-PAGE 觀察純化情形，觀察位置大小與蛋白表現。另外，透過 *In vitro* Methylation 就能在試管內進行甲基化能力測試，比較 PRMT8 全長與 N-deletion 活性差異與探討 zf8-Qdel 的活性。加入有 ^3H 放射線標記的甲基提供者 S-腺苷甲硫胺酸(S-adenosyl-L-[methyl- ^3H]methionine)，利用含 arginine-rich 的蛋白序列當受質(實驗室學長已建構完成之 His-tag GAR)，接著在 37°C 中進行反應，跑 SDS-PAGE 後再加入 Enhancer 增強訊號，乾燥之後用 Fluorography 或 Autoradiography 原理成像。

2. 檢測 zfPRMT8 是否會自我甲基化(Automethylation)

zfPRMT8 跟 hPRMT8 全長、N-deletion 還有 zf8-Qdel 的重組蛋白，因為只要測定 zfPRMT8 的自我甲基化，所以不用加入受質，接著在 37°C 中進行反應，測試 zfPRMT8 重組蛋白活性與觀察自我甲基化現象。

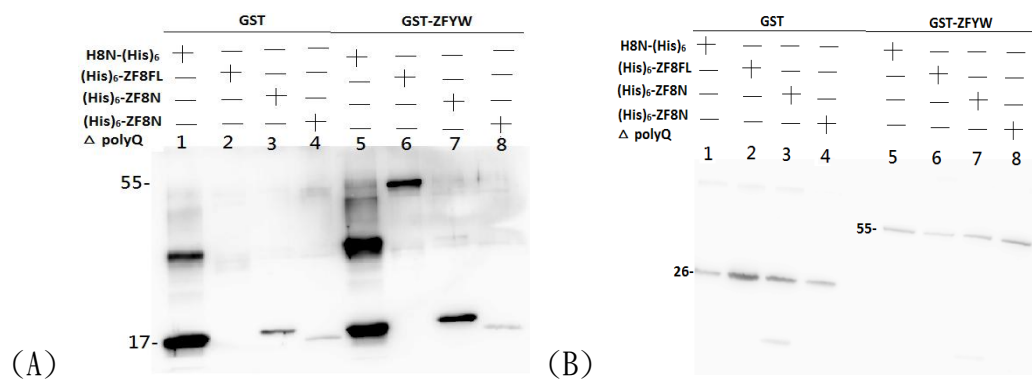
3. 檢測不同物種 PRMT8 N 端與 PRMT 片段之間的酵素競爭反應

之前已經有研究發表做過類似實驗[10]，除了檢測 hPRMT8 自我甲基化的情況，也發現 h8N 會跟 hPRMT8 N-deletion 競爭甲基提供者 S-腺苷甲硫胺酸(S-AdoMet)，會抑制 AdoMet 結合。於是參考那篇研究方法，製備 zfPRMT8 跟 hPRMT8N 端、N-deletion、zf8N-Qdel、zfPRMT1 跟 hPRMT1 的重組蛋白，將不同物種與數種濃度的 PRMT8 N 端(zf8N、h8N、zf8N-Qdel)分別與不同物種之 PRMT1 或 PRMT8 N-deletion 一起加入，另外加入甲基提供者 S-腺苷甲硫胺酸 ([methyl- ^3H]AdoMet)，在 37°C 中進行反應後跑 SDS-PAGE，用 Autoradiography 觀察反應情況。

(五)結果

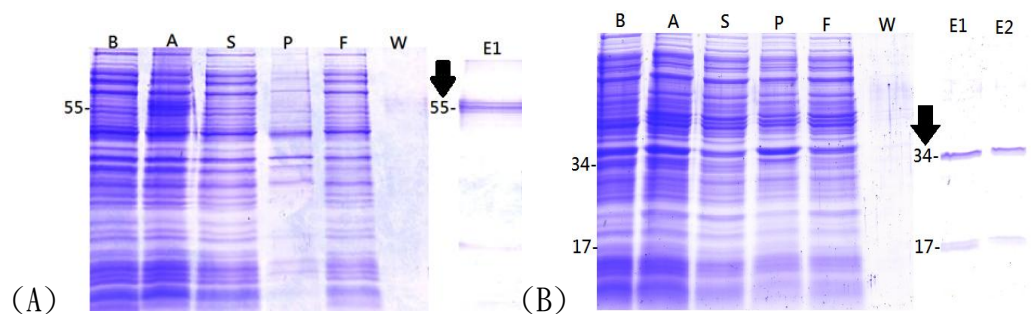
一、zfPRMT8 N 端結合蛋白特異性分析

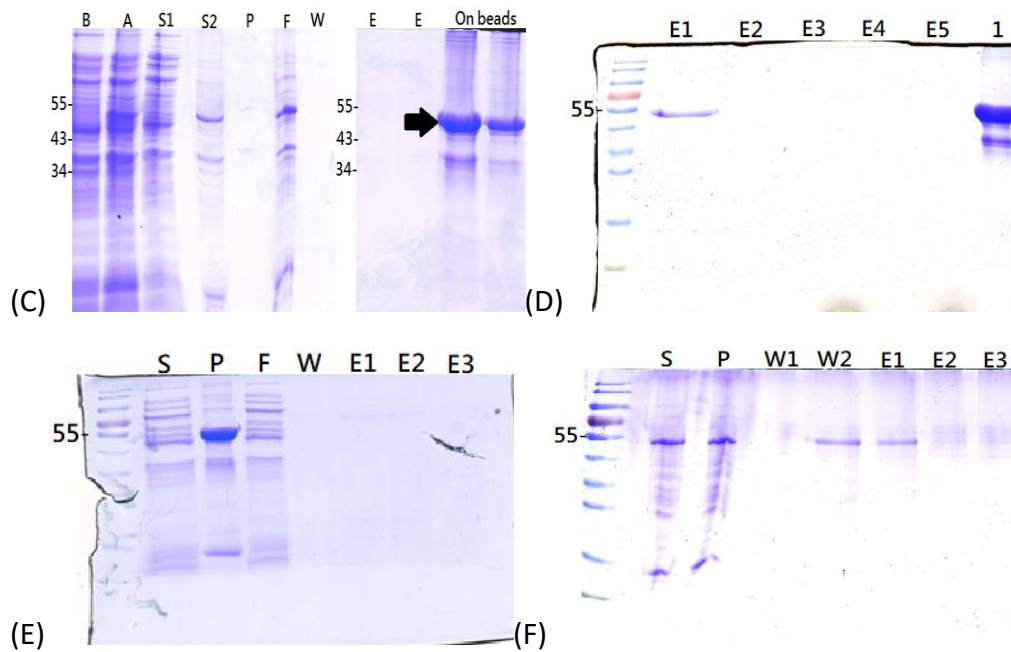
經過修改條件後反覆測試 zf8N 對 GST-ZFYW 是否有特異性結合，發現實驗組與控制組訊號相近，所以推測蛋白質沒有特異性結合(圖五)。之後繼續依照列表(圖二)純化其他種類的重組蛋白，確認蛋白大小與特性(圖六)。發現到大片段較難純化，而且 ZF8 Δ polyQ-(His)₆ 與 (His)₆-zf8FL 兩種重組蛋白容易形成 inclusion body 卡在 pellet，需要用處理 pellet 的耗材處理，但是去掉 N 端後的片段與 H8FL-(His)₆ 卻不會，用一般的方法純化就行。



圖五、利用 western blot 測試 pull down assay 推測 zf8N 沒有特異性結合

將 (His)₆ 標籤的人類跟斑馬魚 PRMT8 重組蛋白保留在 resin 上面，利用 Anti-HIS 確認重組蛋白都有保留在位置上(A)，之後 (His)₆ 重組蛋白與 GST、GST-ZFYW 做 pull down assay，利用 Anti-GST 檢查 GST-ZFYW 是否有結合被拉下(B)。(His)₆ 重組蛋白部分 15 μ g，GST 重組蛋白部分 45 μ g。





圖六、其他種類 PRMT8 重組蛋白純化

(A)H8FL-(His)₆ (B)H8ΔN-(His)₆ (C)、(D)ZF8ΔpolyQ-(His)₆ (E)、
(F)(His)₆-ZF8FL

發現到 ZF8ΔpolyQ-(His)₆與(His)₆-zf8FL 兩個重組蛋白的特性相似，都會形成 inclusion body 卡在 pellet(E)，所以都是改用 pellet lysis buffer 進行破菌來純化，裡面主要成分的 Urea 和 Guanidine Hcl 可以溶解 inclusion body 並純化出沉澱的蛋白，再利用 wash buffer 和 elution buffer 不同 PH 值的梯度差純化出蛋白(F)。

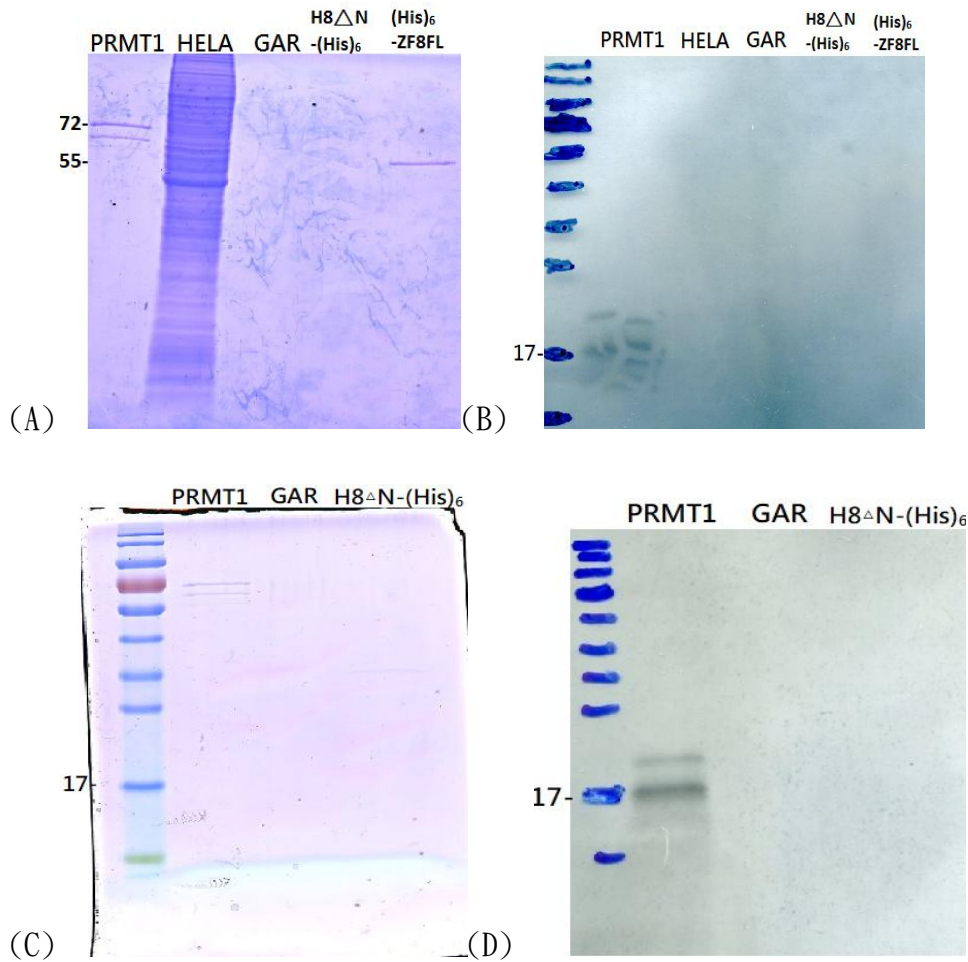
B:誘導前菌液(before)、A:誘導後菌液(after)、S:supernatant、P:pellet、
F:flow through、W:wash、1:保留在(His)₆ 上的重組蛋白(On beads)

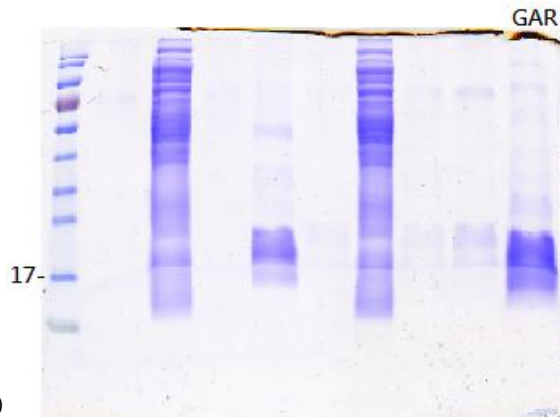
二、觀察 PRMT8 N 端序列對 PRMT1、動物組織與細胞活性的影響

1. 檢測zfPRMT8跟hPRMT8的活性

首先由之前的研究可以得知，hPRMT8 N端如果剔除(N-deletion)，那它的甲基轉移酶活性將會顯著上升，會達到PRMT1 1/3程度活性，表示N端對於PRMT8活性的調控很重要[9]。於是在純化出

H8 Δ N-(His)₆後，一起利用PRMT1做 In vitro Methylation 觀察酵素活性(圖七B)，確認實驗材料與方法，Positive control的 PRMT1順利將17 kDa位置的受質GAR甲基化，可是H8 Δ N-(His)₆卻無法觀察到受質甲基化反應(圖七B)，但因為PRMT8的酵素活性本來就比PRMT1低很多，所以提高蛋白量再重新測試，但發現還是無法觀察到受質甲基化情況(圖七D)。而(His)₆-ZF8 Δ N也還在建構，無法確認酵素活性跟確認活性更低的 zfPRMT8 是否會自我甲基化 (Automethylation)，於是修改一下後續實驗方向。





(E)

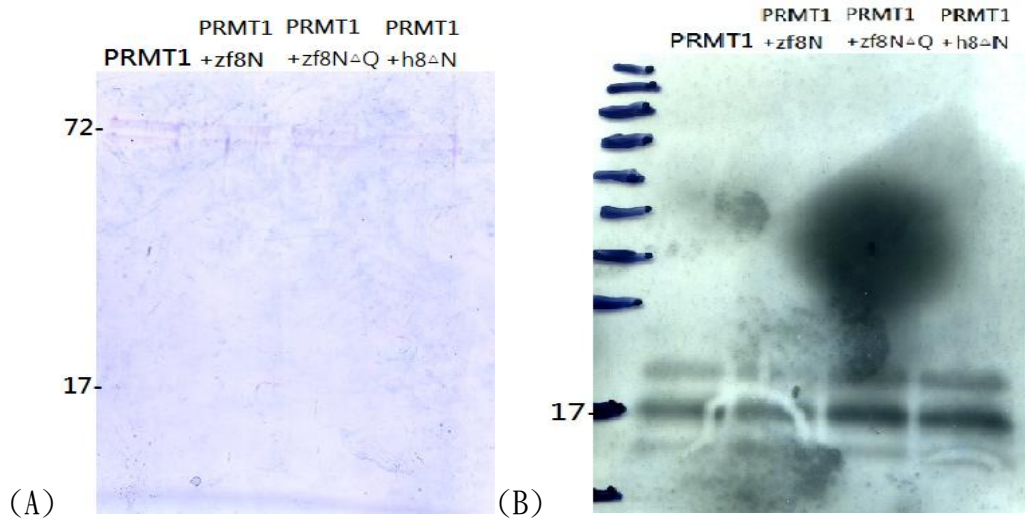
圖七、利用 In vitro Methylation 確認實驗材料與觀察酵素活性

利用 PRMT1 和 HeLa 當作 Positive control，GAR 當作 Negative control，跑膠後先染色確認蛋白質是否有加入(A、C)，之後利用 fluorography 壓片後在底片成像，觀察控制組與另外 2 組蛋白質的酵素活性(B)，H8 Δ N-(His)₆ 蛋白量提高到 1 μ g 重新做測試後，還是無法觀察到受質甲基化情況(D)。可以發現最右邊 elution 的 GAR 重組蛋白位於 17 kDa 位置(E)。除了 HeLa 加入 25 μ g，其他都是 200 ng，H8 Δ N-(His)₆ 1 μ g。

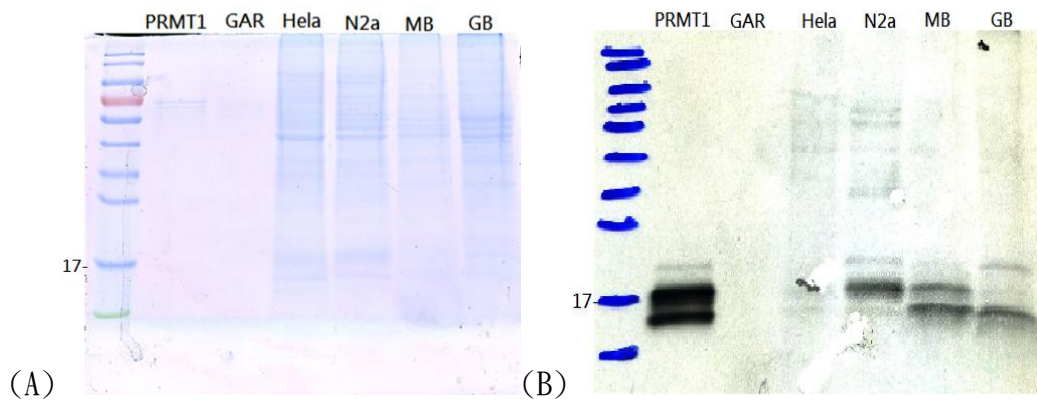
2. 檢測斑馬魚 PRMT8 N端片段與 PRMT1、動物組織和細胞之間的酵素競爭反應

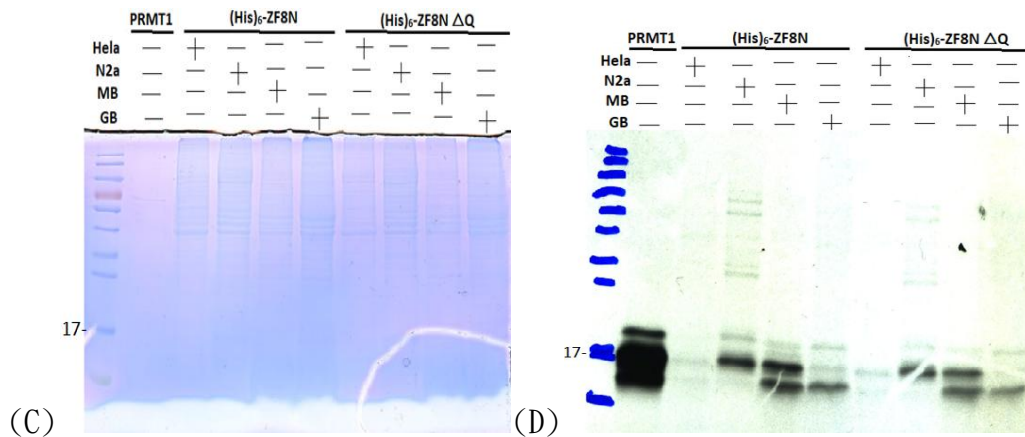
首先確認了實驗材料與方法沒有問題外，當作控制組的 PRMT1 是一個很好的指標，在純化數種 PRMT8 N端片段後，與 PRMT1 酵素一起競爭，探討受質 GAR 的甲基化差異(圖八)，觀察到反應訊號相近，但討論過後也發現可以用其他組織或細胞來做 In vitro Methylation 觀察受質 GAR 甲基化。之後決定先利用實驗室現有的樣品 HeLa、N2a 細胞萃取液與 Mouse brain(MB)、Chicken brain(GB) 組織萃取液做實驗觀察(圖九)，發現到除了 HeLa 活性較低難以觀察之外，其他三種 sample 的受質 GAR 甲基化情況有明顯差異，N2a 偏好中間、MB 偏好中間跟下面兩條、GB 偏好下面那條，在加入 (His)₆-zf8N 和 (His)₆-ZF8N Δ Q 去競爭後，受質甲基化反應訊號跟先前控制組相

近。



圖八、利用斑馬魚prmt8 N端片段與人類prmt1酵素競爭觀察酵素活性變化如圖七跑完膠後先染膠觀察蛋白表現 (A)，在底片成像後發現在 17 kDa 位置的受質 GAR 甲基化訊號都很好，推測 N 端片段不會影響 prmt1 酵素甲基轉移的活性(B)。PRMT1 與受質 GAR 與外加蛋白(zf8N、zf8N Δ polyQ 片段與 h8 Δ N)都是 200 ng。





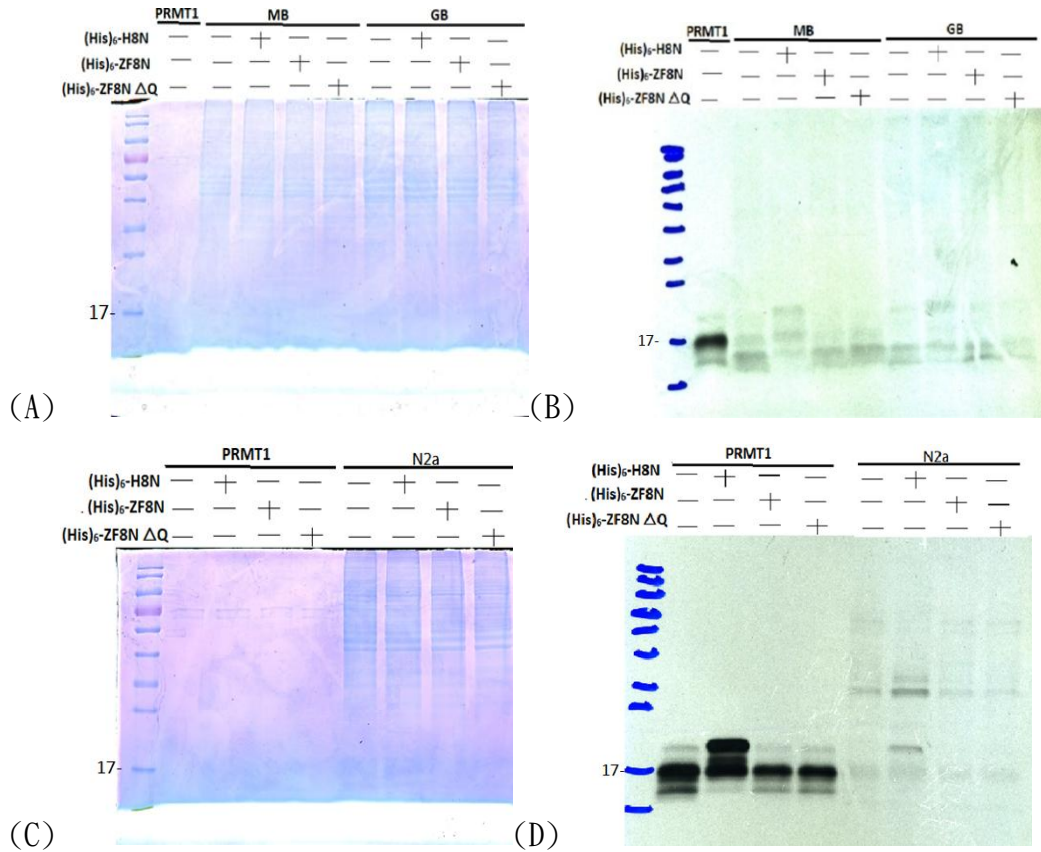
圖九、利用斑馬魚 N 端片段與各種 sample 競爭觀察酵素活性變化

在染膠後可以看到各個萃取液的蛋白表現(A、C)，之後藉由 fluorography 觀察到 HeLa、N2a、Mouse brain(MB)、Chicken brain(GB)的受質 GAR 甲基化情況明顯都不一樣(B)，加入(His)₆-zf8N 和(His)₆-ZF8NΔQ 兩種小片段去競爭(D)。HeLa、N2a、MB、GB 加入 25 μg，PRMT1、GAR、(His)₆-zf8N、(His)₆-ZF8NΔQ 加入 200 ng。

3. 檢測人類和斑馬魚PRMT8 N端片段與PRMT1、動物組織和細胞之間競爭的甲基化反應

於是用 PRMT1，另外多加入 h8N-(His)₆ 一組片段去做 In vitro Methylation 觀察受質 GAR 甲基化。利用 h8N-(His)₆、(His)₆-zf8N、(His)₆-ZF8NΔQ 三種片段和 PRMT1、N2a、Mouse brain(MB)、Chicken brain(GB) 四種 sample 做競爭觀察受質 GAR 甲基化的差異，除了在 N2a、MB、GB 可以觀察到原來的反應情況，在新加入的 h8N-(His)₆ 這組中，發現不管一同加入的酵素來源 sample 為何，相當於受質 GAR 最上面那條的位置都會出現明顯甲基化的訊號(圖十)，不像 (His)₆-zf8N、(His)₆-ZF8NΔQ 兩種片段不太影響原本受質甲基化的位置，因此為了確認是否 N 端片段會影響 sample 中酵素對 GAR 這種受質辨識及修飾，之後利用 SK 和 SK+K313 (PRMT1 抑制劑) 兩種細胞萃取液，不外加

受質，做In vitro Methylation，訊號應該來自細胞萃取液本身酵素對受質作用結果，來觀察加入N端片段影響。



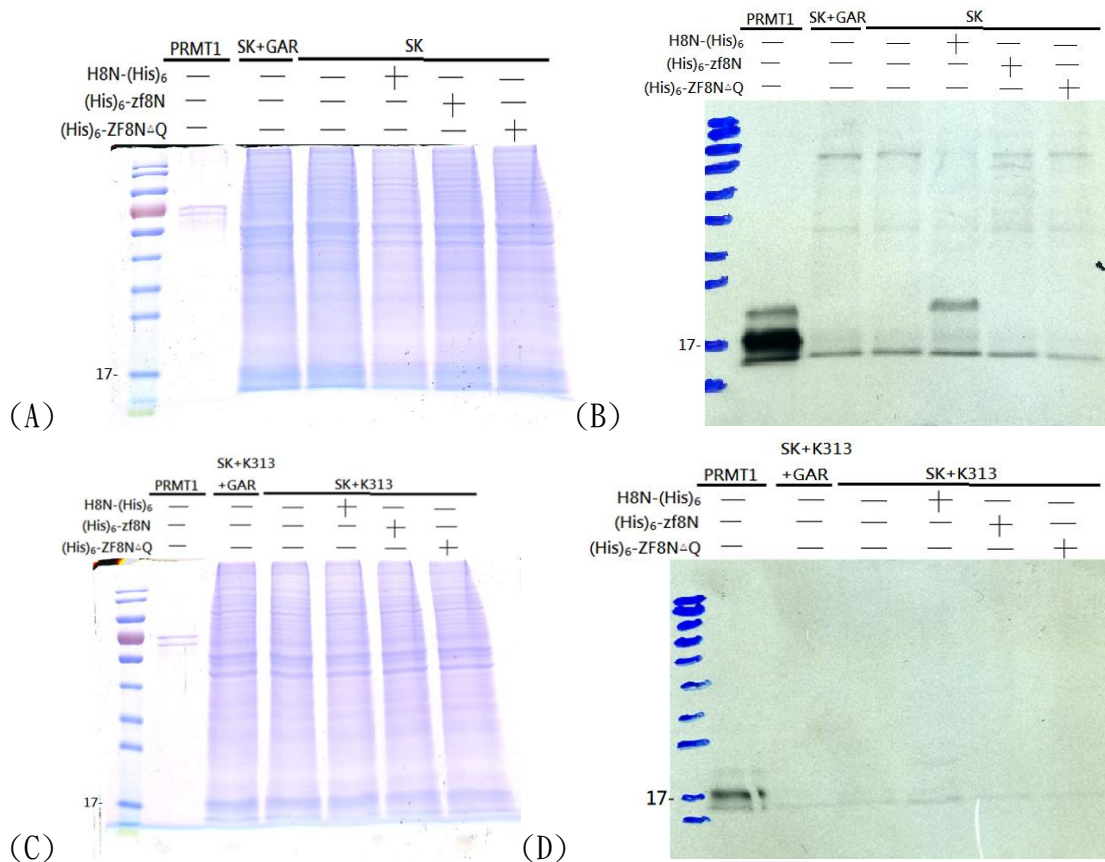
圖十、利用人類和斑馬魚 N 端片段與各種 sample 競爭來觀察酵素活性變化

在染膠後可以看到PRMT1與其他三種萃取液的蛋白表現(A、C)，在 fluorography 成像後可以發現各種sample的受質甲基化情況和強度有些差異(B、D)。N2a、MB、GB 加入25 μg，PRMT1、GAR、h8N-(His)₆、(His)₆-zf8N、(His)₆-ZF8NΔQ 加入200 ng。

4. 利用In vitro Methylation比較 SK、SK+K313兩種細胞在不同種類 PRMT8 N端片段的情況下受質甲基化的差異

SK+K313可以抑制in vivo甲基化反應，跟SK組比較理論上會有更多甲基化位點可以在In vitro Methylation反應。利用兩組細胞觀察，比較在不另外加受質GAR的情況下，不同PRMT8 N端片段的競爭，細胞內甲基化的情況會有怎樣的差異，探討影響受質甲基化的差異是

否是PRMT8 N端片段的不同導致(圖十一)。可以發現就算在沒有外加受質GAR的存在下，在加入了 h8N-(His)₆的組別還是可以發現到17 kDa位置上面的band，但 (His)₆-zf8N、(His)₆-ZF8N△Q兩種片段則無。因此推測 h8N-(His)₆片段，是否有可能是甲基化受質。之後也會利用其他實驗方法，探討SK、SK+K313兩種細胞萃取液的甲基化反應，探討SK+K313甲基化反應較弱的原因。



圖十一、藉由 In vitro Methylation 比較 SK、SK+K313 兩種細胞的甲基化情況

首先藉由染膠觀察 SK、SK+K313 兩種細胞萃取液的蛋白表現差異(A、C)，fluorography 底片成像，在加入 h8N-(His)₆的情況下，出現了 17 kDa 位置上面的 band(B)。SK+K313 細胞沒有出現甲基化訊號(D)。SK、SK+K313 加入 25 μg，PRMT1、GAR、h8N-(His)₆、(His)₆-zf8N、(His)₆-ZF8N△Q 加入 200 ng。

(六) 討論

對於斑馬魚 PRMT8 特性的一些瞭解，實驗室已經有研究出相關的成果，誘導重組蛋白的載體也都有製備過，這些重組蛋白的純化讓人更能瞭解蛋白質的特性，像是片段的大小、表現量的差異、活性保存的時間長短，這些實驗結果的比較對於探討人類的 PRMT8、分析跟斑馬魚 PRMT8 活性的差別與在 N 端上的特性有初步的認識。在探討 zfPRMT8 N 端調控的重要性上，利用 GST-pull down assay 反覆實驗後，發現斑馬魚 PRMT8 N 端沒有蛋白質特異性結合，結合蛋白對斑馬魚 PRMT8 N 端、全長、N-deletion、Q-deletion 結合力之間也沒有太大差異。在檢測 N 端與 PRMT 片段甲基化方面的酵素競爭跟斑馬魚 PRMT8 本身自我甲基化之能力上，雖然無法觀察到 PRMT8 酵素的活性跟自我甲基化情況，但利用除了 PRMT1 酵素以外的動物組織和細胞當酵素，與人類和斑馬魚 N 端片段做競爭，發現受質 GAR 有不同的甲基化情況，觀察到不同方面的 PRMT8 的調控。為了進一步確認是哪種原因造成影響，另外利用 SK、SK+K313 兩種細胞進行實驗，在沒有加入受質 GAR 的情況下，利用不同 PRMT8 N 端片段競爭，發現細胞內其他受質甲基化還是出現相同差異，推測應該是 PRMT8 N 端片段不同所造成的影響，使 sample 有不同的甲基化反應出現。這次結果應可增進瞭解 PRMT8 的調控，乃至有助探討 PRMT8 在人類神經疾病上可能關聯的路徑。

(七) 參考文獻.

- [1] Y. L. Lin, Y. J. Tsai, Y. F. Liu, Y. C. Cheng, C. M. Hung, Y. J. Lee, *et al.*, "The critical role of protein arginine methyltransferase prmt8 in zebrafish embryonic and neural development is non-redundant with its paralogue prmt1," *PLoS One*, vol. 8, p. e55221, 2013.
- [2] C. D. Krause, Z. H. Yang, Y. S. Kim, J. H. Lee, J. R. Cook, and S. Pestka, "Protein arginine methyltransferases: evolution and assessment of their pharmacological and therapeutic potential," *Pharmacol Ther*, vol. 113, pp. 50-87, Jan 2007.
- [3] M. T. Bedford and S. Richard, "Arginine methylation an emerging regulator of protein function," *Mol Cell*, vol. 18, pp. 263-72, Apr 29 2005.

- [4] M. T. Bedford and S. G. Clarke, "Protein arginine methylation in mammals: who, what, and why," *Mol Cell*, vol. 33, pp. 1-13, Jan 16 2009.
- [5] Y.-C. Wang and C. Li, "Evolutionarily conserved protein arginine methyltransferases in non-mammalian animal systems," *FEBS Journal*, vol. 279, pp. 932-945, 2012.
- [6] C. I. Zurita-Lopez, T. Sandberg, R. Kelly, and S. G. Clarke, "Human protein arginine methyltransferase 7 (PRMT7) is a type III enzyme forming omega-NG-monomethylated arginine residues," *J Biol Chem*, vol. 287, pp. 7859-70, Mar 09 2012.
- [7] J. Lee, J. Sayegh, J. Daniel, S. Clarke, and M. T. Bedford, "PRMT8, a New Membrane-bound Tissue-specific Member of the Protein Arginine Methyltransferase Family," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 280, pp. 32890-32896, September 23, 2005 2005.
- [8] A. Kousaka, Y. Mori, Y. Koyama, T. Taneda, S. Miyata, and M. Tohyama, "The distribution and characterization of endogenous protein arginine N-methyltransferase 8 in mouse CNS," *Neuroscience*, vol. 163, pp. 1146-57, Nov 10 2009.
- [9] J. Sayegh, K. Webb, D. Cheng, M. T. Bedford, and S. G. Clarke, "Regulation of protein arginine methyltransferase 8 (PRMT8) activity by its N-terminal domain," *J Biol Chem*, vol. 282, pp. 36444-53, Dec 14 2007.
- [10] M. B. Dillon, H. L. Rust, P. R. Thompson, and K. A. Mowen, "Automethylation of protein arginine methyltransferase 8 (PRMT8) regulates activity by impeding S-adenosylmethionine sensitivity," *J Biol Chem*, vol. 288, pp. 27872-80, Sep 27 2013.