

科技部補助

大專學生研究計畫研究成果報告

* ***** *
* 計畫名稱：蛋白質精氨酸甲基轉移酶 PRMT1 對於糖化終產物形成的抑制作用 *
* ***** *

執行計畫學生：黃瑋豪
學生計畫編號：MOST 106-2813-C-040-049-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：王祖興

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04月02日

蛋白質精氨酸甲基轉移酶 PRMT1 對於糖化終產物形成的抑制作用

摘要

Advanced Glycation End Products(AGEs)主要是經由梅納反應(Maillard reaction)所產生的，還原糖的羰基和蛋白質胺基上的氮原子形成羥基胺，在這醅化的過程中蛋白質往往會因而變性導致原本的功能消失，而失去活性的蛋白質將會堆積在體內，進而造成代謝性的疾病或是生物體衰老現象的加速，這種反應多發生於蛋白質的離胺酸(Lysine)和精氨酸(Arginine)上，然而剛好精氨酸也是蛋白質精氨酸甲基轉移酶(Protein Arginine Methyltransferase, PRMT)的辨識位，根據現有的文獻指出 PRMT 對於蛋白質的甲基轉移的修飾作用可能會影響 AGEs 的形成，所以本次的實驗主要是探討當 Protein Arginine Methyltransferase 1(PRMT1)在精氨酸上的甲基化反應是否會防止蛋白質遭到醅基的攻擊而形成 AGEs，另外，我們所選擇作為甲基化和糖化的受質是 Fibrillar RG-rich Segment，這段胺基酸序列有大量甘胺酸(Glycine)和精氨酸(Arginine)等胺基酸，在之前也有文獻將這段序列用作甲基化實驗的受質，然而 AGEs、PRMT 以及 RG rich domain 三者之間的關聯性尚未能被明確說明，因此我們希望在實驗中除了可以了解甲基化對於 AGEs 形成的影響外，也希望能了解像這種 RG rich domain 是否會影響 AGEs 的形成，藉由從受質以及甲基化等不同角度來探討對 AGEs 的影響，將會有助於了解 AGEs 形成的條件以及環境，而在未來探討因 AGEs 而引起的慢性疾病時，相信這將會成為非常有力的參考資料。

(一) 研究動機與研究問題

Advanced Glycation End Products(AGEs)根據現有的文獻指出，AGEs的 Precursor除了人體重要的養分葡萄糖(Glucose)、果糖(Fructose)外，還包含其他體內的代謝物(Baynes, 2001)，包括糖解作用的其中一項中間產物 Methylglyoxal(MG)，這種Dicarbonyl compound存在於各種細胞，然而像這一類的Reagent會攻擊細胞內Protein上的Arginine，造成Protein的變性並且堆積在細胞內(Fackelmayer, 2005)，隨著我國近年來飲食習慣西方化，罹患第二型糖尿病的人口，逐年提高，且有年輕化的現象，根據WHO 2012年的統計資料顯

示全球罹患糖尿病的人口從1980開始已經成長將近四倍之多，這種代謝性的疾病並非如同一般的疾病一樣因為特定的原因所造成，而是體內錯誤的訊息經由時間日積月累所造成的，近年來的研究指出，糖尿病的發生與AGEs有著密不可分的關聯性(Ahmed, 2005)，其中AGEs目前最廣為人知的影響便是因糖尿病而造成的白內障，AGEs經由調控視網膜周邊細胞的Apoptosis和vascular endothelial growth factor (VEGF) gene expression引起視網膜的病變(Yamagishi et al., 2002)，其他如Cancer(Ishiguro et al., 2005)、[Alzheimer's Association](#)，甚至是Aging都與AGEs或是Receptor for Advanced Glycation End Products(RAGE)有關(Semba, Nicklett, & Ferrucci, 2010)，然而目前尚未有關於蛋白質精氨酸甲基轉移酶(PRMT)與AGEs之間交互作用的研究，僅有推測指出兩者可能有關連(Fackelmayer, 2005)；本次我希望藉由以PRMT主要的標的是蛋白質上的精氨酸，而AGEs的形成主要也是發生在蛋白質上的精氨酸和離胺酸這點為基礎，了解兩者之間的關聯性。

本次實驗中我們選擇作為糖化和甲基化受質的GAR(Glycine Arginine Rich Domain) 在1993年時就已經有文獻將其製備成重組蛋白用作甲基化實驗的受質(Najbauer, Johnson, Young, & Aswad, 1993)，而某些帶有GAR domain的RNA protein在GAR區域被甲基化後會影響到該蛋白的執行功能的位置等(McBride, Conboy, Brown, Ariyachet, & Rutledge, 2009)，甚至修復DNA的Protein Complex都會受其影響(Dery et al., 2008)，但目前尚未有資料指出GAR和AGEs的關聯性，本次實驗中所提出的假設為Fackelmayer於2005年推測蛋白質精氨酸甲基化在生物中存在目的之一是減少糖化所帶來傷害累積(Fackelmayer, 2005)為基礎，AGEs和PRMT1皆可辨識位在GAR上的Arginine，而PRMT1在將甲基轉移至Arginine後導致糖基無法辨識，因而抑制AGEs的形成。

研究目標：

1. 釐清GAR是否會被糖基辨識並形成AGEs
2. PRMT1是否會因為將Arginine甲基化後進而抑制AGEs的產生

(二) 文獻回顧與探討

蛋白質精氨酸甲基轉移酶Protein Arginine Methyltransferase(PRMT)是一種存在於真核生物中的甲基轉移酶，根據其甲基化的特性可以分成兩種不同Type，Type I主要是可以催化N^G-monomethylarginine(MMA)、N^G-asymmetric dimethylarginine(ADMA)，這一類型的甲基轉移酶有PRMT1、PRMT3、PRMT4、PRMT6，另外Type II負責催化N^G-symmetric dimethylarginine(SDMA)，其主要成員有PRMT5、PRMT9，PRMT的甲基化修飾參與很多細胞內的活動，如細胞轉譯因子Stat的位置(Gilbreth et al., 1996)、轉譯因子的啟動(Xu et al., 2001)，甚至會影響RNA於細胞內的穩定度等(Yu et al., 2004)。本次實驗使用的PRMT1，主要是藉由將S-adenosylmethionine (AdoMet)上的甲基轉移至蛋白質的Arginine上的guanidinium(Lee, Kim, & Paik, 1977)，最初被發現與PRMT1有關的功能為Histones H3和H4的甲基化，或是Chromatin的remodeling，這些都與DNA的複製與表現有關(An, Kim, & Roeder, 2004; Chen et al., 1999)，另外，在人體內的細胞中，負責蛋白質精氨酸甲基化的約有85%都是由PRMT1所進行，PRMT1^{-/-}Knock out的小鼠會在胚胎時期就直接死亡(Pawlak, Scherer, Chen, Roshon, & Ruley, 2000)，由此可以看出PRMT1對於生物體而言有著不可或缺的存在必要性，對此如果可以證明PRMT1和AGEs之間的關聯性，或許就可以從另外一個角度探討細胞的正常功能在某些疾病瓦解的原因以及其改善的方法。

Glycation End Product(AGEs)屬於無酵素參與的褐化反應Maillard reaction的產物，常見於火烤或是油炸等食物烹調技術中，當食物中的還原糖的羰基和蛋白質上的胺基形成羰基胺，這部分屬於可逆的化學反應，之後當溫度達到25°C後便自動進入Amadori rearrangement重排現象，此為不可逆的化學反應，反應之羰基胺會在脫水形成Shiff base之後又會再進行一次Amadori rearrangement，最終產物便是AGEs，在最初羰基胺形成的步驟中，主要多發生於蛋白質的Arginine和Lysine上，而Maillard reaction的反應中提供醣基的Precursor和反應時的酸鹼值以及Amadori rearrangement皆會影響產出的產物，Maillard reaction最早是由法國食品科學家Maillard所發現的，早期對於該反應以及其產物AGEs的研究多半都集中在食品研究上，但隨著AGEs被發現與

糖尿病之間的關聯性後，與AGEs有關的研究就逐漸集中在醫療上。

(三) 材料及方法

一、重組蛋白純化

作為實驗中將參與反映的受質和精氨酸甲基轉移酶，我們選擇使用的蛋白質精氨酸甲基轉移酶為PRMT1，和其受質Fibrillarlin RG-rich Segment，在過去進行的研究中，李娟老師實驗室的魏宏銘學長曾經有過為解決甲基化蛋白質於真核生物中不易取得的問題而設計的可以同時表現PRMT1以及其受質的雙表現載體，利用pET-28b載體上的T7 Promoter作為第一組的啟動子，並連接著重組蛋白HIS⁶-GAR，然後在相同載體上搭載pGEX-4T1載體上的tac Promoter作為第二組的啟動子並在後方接上GST-PRMT1，通過雙表現載體的系統，可以表現出被甲基化的GAR蛋白，因此我們在日後的實驗中將可以十分方便的取得實驗所需的受質。

Fibrillarlin RG-rich(GAR)	
1	D P M E P G F S P R G G G F G G R G G F
2	GATCCTATGGAGCCAGGATTCAGTCCCCGTGGGGTGGCTTTGGCGGCCGAGGGGGCTTT
21	G D R G G R G G R G G F G G G R G R G G
62	GGTGACCGTGGTGGTCGTGGAGGCCGAGGGGGCTTTGGCGGGGGCCGAGGTTCGAGGAGGA
41	G F R G R G R G G G G G G G G G G G G
122	GGCTTTAGAGGTCGTGGACGAGGAGGAGGTGGAGGCGGCGGCGGCGGTGGAGGAGGAGGA
61	R G G G G F H S G G N R G R G R G G K R
182	AGAGGTGGTGGAGGCTTCCATTCTGGTGGCAACCGGGTTCGTGGTCGGGGAGGAAAAAGA
81	G N Q S G K N V M V E P H R H E G V F I
242	GAAACCAGTCGGGAAGAATGTGATGGTGGAGCCGCATCGGCATGAGGGTGTCTTCATT
101	C R G K E D A L V T K N L V P G E S V Y
302	TGTCGAGGAAAGGAAGATGCACTGGTCACCAAGAACCTGGTCCCTGGGGAATCAGTTTAT
121	G E K R V S I S E G D D K I E Y R A W N
362	GGAGAGAAGAGAGTCTCGATTTCCGGAAGGAGATGACAAAATTGAGTACCGAGCCTGGAAC
141	P F R S K L - E F
422	CCCTCCGCTCCAAGCTATGAGAATTC

搭載pET-28b-GAR-MAPp-hPRMT1雙表現載體的*E. coli*(BL21)利用Luria-Bertani(100 g/ml Ampicillin)培養液於37°C培養16~18小時，將LB(100 g/ml Ampicillin)的體積放大25倍後繼續培養約2~3小時，待O.D(600nm)值到達約0.6~0.8之間後加入IPTG(1 mM)誘導蛋白質表現於25°C約12~16小時。

將培養完的菌液離心(3000xG)10 min後倒掉LB，並加入Lysis Buffer 20 ml(50 mM NaH₂PO₄; 300 mM NaCl; PH8)利用Sonicator(Sonics, Vibra Cell™)將菌體擊碎，頻率為Ampl 30%，ON 10s；OFF 30s 共6min，再以12000 rpm 4°C高速離心10min，將上清液分離出來並準備1 ml His⁶ tag resin(Roche)置於Column中利用ddH₂O和Wash Buffer(50 mM NaH₂PO₄; 300 mM NaCl; 20 mM Imidazole; pH 8)清洗，並將resin移置上清液中反應約1hr後，通過Column收集第一次的液體(Flow)作為判斷resin是否有結合上的依據，再利用Wash buffer 15 ml沖洗resin，並收集最後1 ml的液體，以確保是否清洗乾淨，最後加入Elution Buffer 6 ml(50 mM NaH₂PO₄; 300 mM NaCl; 250 mM Imidazole; pH8)，收集蛋白。

二、Western Blot

將菜瓜布、濾紙(Filter paper)和SDS-PAGE以及Nitrocellulose paper依序排在Transfer cassette中並夾緊，放置於mini Trans-Blot Cell中，倒入Transfer Buffer(12 mM Tris pH 8.3; 96 mM Glycine; 20% Methanol)，電壓200 mV約66min，待結束後加入Blocking Buffer(7%脫脂奶粉; TTBS Buffer)，Blocking約1hr，配置一抗(ASYM24 1:2000; Anti-HIS⁶ 1:2000)加入Binding O/N，隔天使用TTBS wash三次每次5min，之後加入二抗(Anti-mouse IgG-HRP 1:10000)結合1hr再利用TTBS wash三次每次5min，最後加入Working solution，使用冷光儀觀察結果。

三、AGEs-BSA糖化測試

最初因為實驗室缺少可以做為AGEs marker的樣本，所以根據研究AGEs文獻裡面的資料(Bhatwadekar & Ghole, 2005)，利用Bovine serum albumin(BSA)與Glucose於PB buffer中在50°C培養約四天左右，相較於未加入Glucose的對照

組，AGEs-BSA在約100kDa左右有十分明顯的訊號，同時已可以觀察到相較於對照組的BSA，經過糖化後的BSA在位置上有些許向上移動的情況。

將BSA(50 mg/mL)與0.5M Glucose溶於0.2 M Phosphate buffer(pH 7.4)，置於55°C水浴槽中培養4天，同時另外配置Negative Control，BSA(50 mg/mL)溶於0.2 M Phosphate buffer(pH 7.4)於50°C水浴槽中培養4天。

四、TCA precipitation

將100% TCA 加入至樣本中，使其最終濃度達到20%，均勻混和後至於冰上靜置30分鐘，待反應結束後於利用13000xG於4°C離心30分鐘，離心結束後將上清液吸除並加入0.5 ml的cold acetone，混合均勻後再利用13000G離心15分鐘並將上清液吸除，殘留至管壁內的pellet則乾燥後保存。

五、糖化蛋白分析

AGEs可以藉由370nm的光線激發，並會產生440nm，藉由測定吸收光的強度並和對照組進行比較後可以得到相對螢光強度，在得到相對螢光強度的同時，可以了解AGEs生成的量，螢光的測定主要是使用SpectraMax M5 Microplate Reader。

(四) 結果

本次計畫執行初期考量到用於糖化以及甲基化的受質Fibrillar GAR segment單一次的純化後所能取得的量有限的情況下，在實驗進行前，都是採用較為方便的材料進行條件測試，同時並試圖增加重組蛋白GAR的產量。為了測試糖化條件，因此利用BSA並根據文獻內的方法進行了測試，不論是於55°C (Figure 1a)或是37°C (Figure 1b)的環境溫度下，在經過反應後所形成的AGEs-BSA，其相對螢光強度都較控制組還要高，同時在外觀上也有十分明顯的差異 (Figure 1c)，但是文獻中所使用的是高濃度的BSA(50 mg/ml)，而實際上每次重組蛋白GAR的濃度都不足20 µg/µl，因此為了確定是否這樣的實驗環境在較低濃度

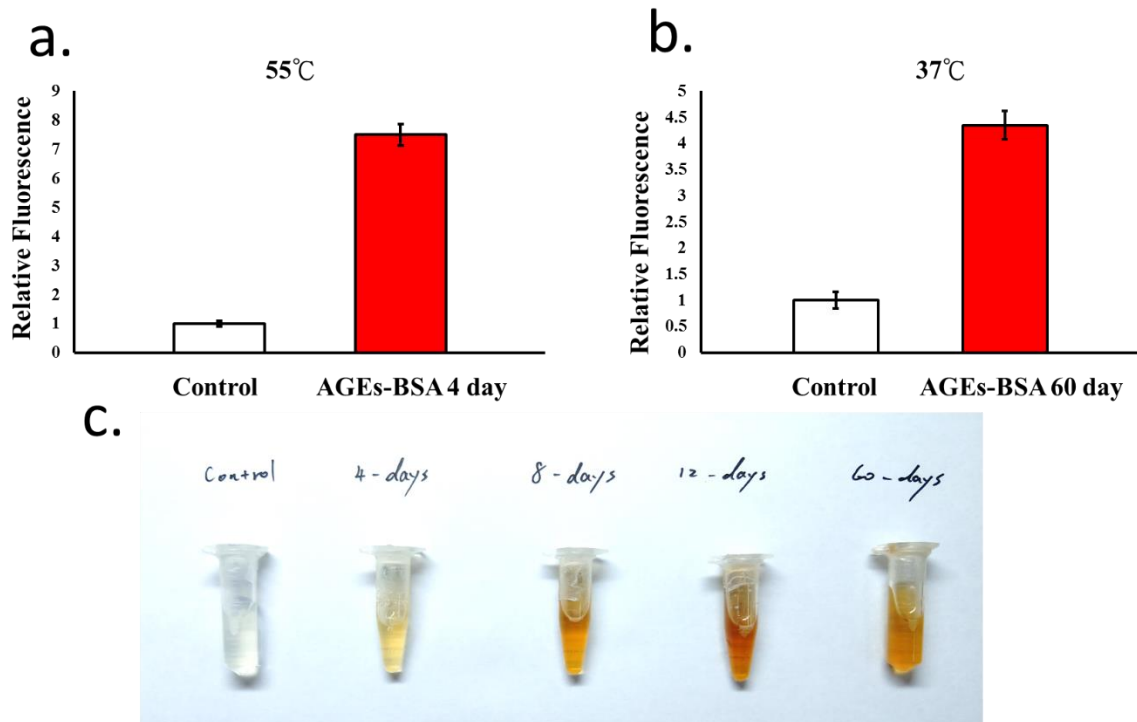


Figure. 1 (a) 將BSA(50 mg/mL)與0.5M Glucose溶於0.2M Phosphate buffer(pH7.4)，經過四天反應後，control組為只有添加50 mg/mL的BSA (b) 將BSA(50 mg/mL)與0.5M Glucose溶於0.2M Phosphate buffer(pH7.4)於37°C反應60 days，control組為只有添加50 mg/mL的BSA (c) control組為只有添加50 mg/mL的BSA，4 days、8 days、12 days 為BSA(50 mg/mL)與0.5M Glucose溶於0.2M Phosphate buffer(pH7.4)於55°C反應四天，60 days 則為BSA(50 mg/mL)與0.5M Glucose溶於0.2M Phosphate buffer(pH7.4)於37°C反應60 days

的蛋白質的條件下也可以產生這樣的差異，又分別測試了不同濃度的BSA在這樣的條件下是否也能有相同的效果，經過測試後發現，雖然在50 mg/ml BSA的結果最為理想，但是10 mg/ml BSA在螢光的生成量上，就已經高於對照組約2~3倍左右(Figure 2a)，並且經過調整重組蛋白GAR的誘導時間從4hr延長至16hr以及利用濃縮管將GAR的濃度增加為原來的四倍(Figure 2b)。到目前為止實驗初步的準備階段已經完成，便準備正式開始GAR的糖化反應，於是在純化並利用濃縮管濃縮後，變將0.5M的Glucose加入濃度約為20 μ g/ μ l的GAR中後於55°C反應四天，然而出乎我們意外的是，經過四天後GAR並未有任何外觀上的改變，之後又將反應時間拉長至約為兩周，但是在外觀上，仍舊沒有任何的改變，因此在經過和指導教授的討論後，懷疑可能是純化蛋白時所用的Elution buffer內的Imidazole在經過濃縮管濃縮後，仍舊有殘留的鹽類存在，而導致干擾糖化的反應，於是實驗的下一個階段是希望釐清GAR未發生糖化的原因是否是因為Imidazole所致。

為了釐清Imidazole對於實驗的影響，透過建立不同濃度梯度的Imidazole並進行糖化反應，進而觀察Imidazole對於糖化反應的影響(Table.1)，經過測試後，我們發現Imidazole確實會影響糖化的反應，但是並非是像當初我們所預期般是會抑制糖化的進行，透過這次實驗，我們發現Imidazole非但不會抑制糖化的發生，反而會進一步的增加糖化的效果。

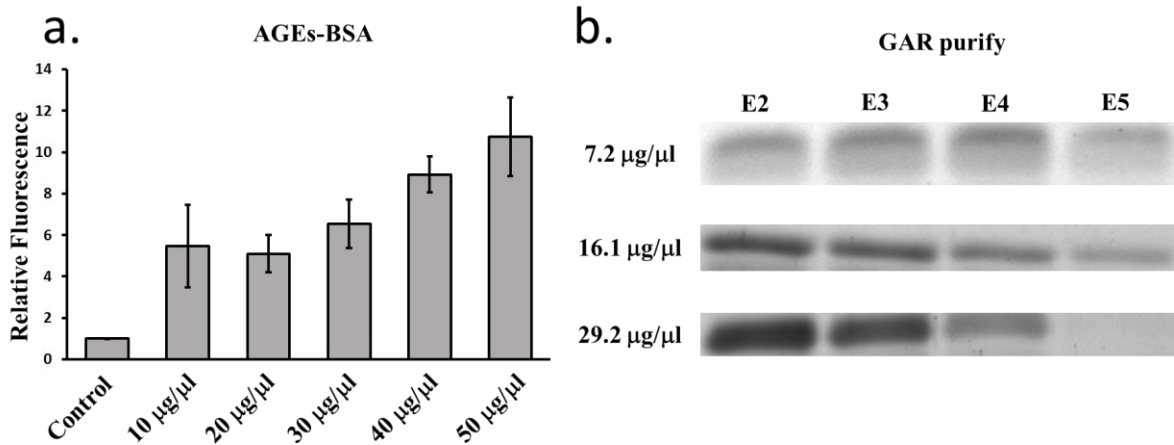


Figure. 2 (a) 圖中各濃度的BSA皆為55°C反應4 days (b) 圖中的左側為經過定量後的濃度，7.2µg/µl為最初未經過任何處理的原始濃度，將誘導時間延長至16hr後可以看到再蛋白質的濃度有著明顯的增加，而最後29.2µg/µl則為利用濃縮管處理後的結果，E2-5:Elution2-5

	250mM	25mM	2.5mM	0.25mM	0mM
Glucose only	206.97	198	180.21	163.28	
BSA only	914.65	1404.7	841.75	886.51	866.67
AGEs-BSA	3513.9	4177.6	2376.3	2122.8	1111.1

Table.1 橫軸為Imidazole的濃度，BSA因為本身帶有一點淡黃色，所以在測定螢光時數值會較高，然而可以看到有添加Imidazole的AGEs-BSA在結果上明顯高出Positive control，表中的數據為二重複後的平均值。

(五) 討論

在經過Imidazole的測試後，仍然對於GAR為何不會發生糖化沒有得到任何的解答，但是我們在之後的文獻探討中有發現2000年左右，有一篇文獻是利用N-carboxybenzoyloxy-Arg-Lys短片段的peptide進行實驗，而這段序列會與Imidazole形成一個複合式的結構，該作者稱其為arginine-lysine imidazole(ALI)(Al-Abed & Bucala)，這種AGEs並非像傳統的其他糖化終產物一樣，可以藉由測定螢光的方式進行分析，但是在缺乏HPLC等分析方法的情況下，我們必須另外找到有效的分析方法才可以進一步確認這項推測是正確的，另外，我們同時也在嘗試利用TCA沉澱、Spin column或是透析等方式將鹽類去除後再進行糖化反應，希望可以將其他實驗變因從實驗中剷除。

(六) 參考文獻

- Ahmed, N. (2005). Advanced glycation endproducts--role in pathology of diabetic complications. *Diabetes Res Clin Pract*, 67(1), 3-21. doi: 10.1016/j.diabres.2004.09.004
- Al-Abed, Y., & Bucala, R. Structure of a synthetic glucose derived advanced glycation end product that is immunologically cross-reactive with its naturally occurring

- counterparts. (1043-1802 (Print)).
- An, W., Kim, J., & Roeder, R. G. (2004). Ordered cooperative functions of PRMT1, p300, and CARM1 in transcriptional activation by p53. *Cell*, *117*(6), 735-748. doi: 10.1016/j.cell.2004.05.009
- Baynes, J. W. (2001). The role of AGEs in aging: causation or correlation. *Exp Gerontol*, *36*(9), 1527-1537.
- Bhatwadekar, A. D., & Ghole, V. S. (2005). Rapid method for the preparation of an AGE-BSA standard calibrator using thermal glycation. *J Clin Lab Anal*, *19*(1), 11-15. doi: 10.1002/jcla.20048
- Chen, D., Ma, H., Hong, H., Koh, S. S., Huang, S. M., Schurter, B. T., . . . Stallcup, M. R. (1999). Regulation of transcription by a protein methyltransferase. *Science*, *284*(5423), 2174-2177.
- Dery, U., Coulombe, Y., Rodrigue, A., Stasiak, A., Richard, S., & Masson, J. Y. (2008). A glycine-arginine domain in control of the human MRE11 DNA repair protein. *Mol Cell Biol*, *28*(9), 3058-3069. doi: 10.1128/MCB.02025-07
- Fackelmayer, F. O. (2005). Protein arginine methyltransferases: guardians of the Arg? *Trends Biochem Sci*, *30*(12), 666-671. doi: 10.1016/j.tibs.2005.10.002
- Gilbreth, M., Yang, P., Wang, D., Frost, J., Polverino, A., Cobb, M. H., & Marcus, S. (1996). The highly conserved *skb1* gene encodes a protein that interacts with Shk1, a fission yeast Ste20/PAK homolog. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *93*(24), 13802-13807.
- Ishiguro, H., Nakaigawa, N., Miyoshi, Y., Fujinami, K., Kubota, Y., & Uemura, H. (2005). Receptor for advanced glycation end products (RAGE) and its ligand, amphoterin are overexpressed and associated with prostate cancer development. *Prostate*, *64*(1), 92-100. doi: 10.1002/pros.20219
- Lee, H. W., Kim, S., & Paik, W. K. (1977). S-adenosylmethionine: protein-arginine methyltransferase. Purification and mechanism of the enzyme. *Biochemistry*, *16*(1), 78-85.
- McBride, A. E., Conboy, A. K., Brown, S. P., Ariyachet, C., & Rutledge, K. L. (2009). Specific sequences within arginine-glycine-rich domains affect mRNA-binding protein function. *Nucleic Acids Res*, *37*(13), 4322-4330. doi: 10.1093/nar/gkp349
- Najbauer, J., Johnson, B. A., Young, A. L., & Aswad, D. W. (1993). Peptides with sequences similar to glycine, arginine-rich motifs in proteins interacting with RNA are efficiently recognized by methyltransferase(s) modifying arginine in numerous proteins. *J Biol Chem*, *268*(14), 10501-10509.
- Pawlak, M. R., Scherer, C. A., Chen, J., Roshon, M. J., & Ruley, H. E. (2000). Arginine N-methyltransferase 1 is required for early postimplantation mouse development, but cells deficient in the enzyme are viable. *Mol Cell Biol*, *20*(13), 4859-4869.
- Semba, R. D., Nicklett, E. J., & Ferrucci, L. (2010). Does accumulation of advanced glycation end products contribute to the aging phenotype? *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*, *65*(9), 963-975. doi: 10.1093/gerona/glq074
- Xu, W., Chen, H., Du, K., Asahara, H., Tini, M., Emerson, B. M., . . . Evans, R. M. (2001). A transcriptional switch mediated by cofactor methylation. *Science*, *294*(5551), 2507-2511. doi: 10.1126/science.1065961
- Yamagishi, S., Amano, S., Inagaki, Y., Okamoto, T., Koga, K., Sasaki, N., . . . Makita, Z.

(2002). Advanced glycation end products-induced apoptosis and overexpression of vascular endothelial growth factor in bovine retinal pericytes. *Biochem Biophys Res Commun*, 290(3), 973-978. doi: 10.1006/bbrc.2001.6312

Yu, M. C., Bachand, F., McBride, A. E., Komili, S., Casolari, J. M., & Silver, P. A. (2004). Arginine methyltransferase affects interactions and recruitment of mRNA processing and export factors. *Genes Dev*, 18(16), 2024-2035. doi: 10.1101/gad.1223204