

科技部補助
大專學生研究計畫研究成果報告

計 畫 名 稱	： 第七/九型離胺酸甲基轉移酶調控Klotho蛋白質的分子 機制研究
------------	---------------------------------------

執行計畫學生：陳冠霖

學生計畫編號：MOST 107-2813-C-040-029-B

研究期間：107年07月01日至108年02月28日止，計8個月

指導教授：林庭慧

處理方式：本計畫涉及專利或其他智慧財產權，2年後可公開查詢

執行單位：中山醫學大學生物醫學科學學系（所）

中華民國 108年03月28日

前言

在革蘭氏陰性菌的外膜上有脂多醣(Lipopolysaccharide, LPS)的構造，LPS 刺激哺乳動物的腎臟細胞後，會使細胞產生過度的發炎反應，造成急性腎損傷。而在急性腎損傷的老鼠身上，發現腎臟的 Klotho 蛋白質表現量較少。Klotho 蛋白質在許多研究指出，具有抗氧化壓力和抗老化等重要功能，但是有關於 Klotho 蛋白質在腎臟細胞中如何受到調控之分子機轉，目前的報導並不多。在我們先前發表的論文中指出，經 LPS 處理過後的腎絲球細胞(MES-13 cell)，Klotho 蛋白質之表現量是下降的。而我們找到之分子機轉乃是 LPS 可以藉由上調第六型精胺酸甲基轉移酶(protein arginine methyltransferase 6, PRMT6)，並經由 PRMT6 與 NF- κ B 有交互作用，造成 NF- κ B 精胺酸甲基化，促進 NF- κ B 更容易轉移到細胞核中，抑制 Klotho 基因的轉錄。在本計劃先前的初步結果中，觀察到另一個腎臟細胞株，腎臟近端小管細胞(NRK-52E cell)，經 LPS 處理過後，Klotho 的蛋白質表現量亦會下降。並且除了 PRMT6 的蛋白質表現量會上升之外，我們也觀察到第七/九型離胺酸甲基轉移酶(lysine methyltransferase, Set7/9)的蛋白質表現量會上升。我們想進一步探討 Set7/9 在 LPS 抑制 Klotho 蛋白質表現上是否也扮演重要角色；尤其針對蛋白質離胺酸甲基化是否也可以經由影響 NF- κ B 之活化來調控 Klotho 蛋白質之表現。**從目前的實驗結果得知:** 1. 被 LPS 抑制的 Klotho 的蛋白質表現量會隨著加入 Set7/9 inhibitor 而回升。 2. Set7/9 被 Set7/9 siRNA knockdown 後，Klotho 蛋白質的表現量有回升的趨勢。 3. LPS 會使細胞核中 NF- κ B 的表現量升高，而 PDTC 及 Set7/9 inhibitor 皆可以抑制 NF- κ B 進入細胞核。4. 利用免疫沉澱法的實驗，可以觀察到 Set7/9 跟 NF- κ B 之間確實有交互作用。未來我將繼續完成一些實驗的統計圖表後，希望能證實 LPS 透過上調細胞中 Set7/9 的表現量，促使 NF- κ B 上之離胺酸甲基化後，轉移到細胞核中的量變多，進而抑制 Klotho 蛋白質的表現；另外，在未來的研究中，能更瞭解 Klotho 蛋白質在腎臟細胞中如何受到調控之分子機轉，將可提供藥理策略，用以治療一些由於缺乏 Klotho 蛋白質而以引起之腎臟疾病。

研究動機及目的

Klotho 基因最早是在 1997 年的時候，在老鼠身上發現，此基因編碼的膜蛋白跟 β -葡萄糖苷酶序列同源 [1]，目前發現的 Klotho 蛋白質分別有分泌型及穿膜型形式[2, 3]，分泌型的 Klotho 蛋白質可以從血液

循環到身上其他部位，當作一種賀爾蒙，修飾細胞表面的聚糖，然後抑制細胞內胰島素及似胰島素生長因子(IGF1)的作用，達到抗老化及延長壽命的效果[4]；而穿膜型的 Klotho 蛋白質跟 FGF receptor (FGFR) 結合，可以促進 FGF-23 跟 FGFR 的結合，調控細胞的磷酸代謝[3]。當老鼠缺乏 Klotho 蛋白質時，會有提早老化的現象，如果是過度表現 Klotho 蛋白質時，可以延長老鼠的壽命[3, 4]。Klotho 蛋白質在哺乳動物身上還發現有抗氧化壓力的效果[5]，甚至在急性腎損傷(Acute kidney Injury, AKI)和慢性腎臟疾病(Chronic kidney disease, CKD)的老鼠身上，發現腎臟或整體性的 Klotho 蛋白質表現量比正常老鼠少[6]，所以在氧化壓力增加或是處於發炎狀態的老鼠，Klotho 蛋白質表現量較少。雖然 Klotho 蛋白質有許多重要的功能陸續被發現，但是 Klotho 蛋白質在生物體內的表現所受到的分子機制調控，目前的報導沒有很多，已知的機轉可分為表觀遺傳的調控和非表觀遺傳的調控[7]。

表觀遺傳上的修飾有組蛋白的高度去乙酰化或是 DNA 的高度甲基化[8]，這二種修飾都會造成 Klotho 的表現量受調控後降低；當加入組蛋白去乙酰化抑制劑(TSA)時，造成組蛋白乙酰化，染色質包裹的會較鬆散，可以使 Klotho 的蛋白質表現量回升[9]，另外當 Klotho 的啟動子被甲基化時，去甲基化的調控可以使 Klotho 的表現量再度回升[10]；非表觀遺傳的調控有氧化壓力(ROS)的增加或一些發炎因子的刺激，像是 TNF、IFN 和 IL-1，這些都會造成腎臟的 Klotho 表現量降低[7]，現在甚至可以注射 Klotho 的 cDNA 到老鼠體內，可以發現慢性腎臟疾病的老鼠，Klotho 的表現量回升[11]，但這個方法目前只能用在治療實驗動物上，要當作真正醫學上的治療法，還有待之後的實驗在確認。

在我們先前發表的 paper 中[12]，我們觀察到腎絲球細胞(MES-13 cells)被 LPS(lipopolysaccirade)處理過後，Klotho 的蛋白質表現量會降低，而第六型精胺酸甲基轉移酶(protein arginine methyltransferase 6, PRMT6)的表現量會升高。另外也觀察到 LPS 刺激腎絲球細胞時，細胞整體的 DNA 和蛋白質精胺酸甲基化增加。當使用 DNA 甲基化抑制劑(5-Aza-2'-dc)和專一性的蛋白質精胺酸甲基化抑制劑(AMI-1)處理細胞時，可以使被 LPS 抑制的 Klotho 蛋白質表現量回升。由於有相關研究報導指出 PRMT6 可以甲基化 NF-κB，並與 NF-κB 的活化有關[13]。且 NF-κB 可以抑制 Klotho 基因的轉錄[9, 14]，所以在我們先前發表的

paper 中，我們進一步利用免疫沉澱法證實在腎絲球細胞(MES-13 cells) 中，NF- κ B 跟 PRMT6 確實有交互作用，並且 NF- κ B 上之精胺酸可被甲基化，且此精胺酸甲基化可影響 NF- κ B 之進入細胞核。在螢光顯微的觀察下，當加入甲基轉移酶的抑制劑時，確實可阻擋 NF- κ B 進入細胞核，因為無法抑制 Klotho 基因的表現，而使 Klotho 表現量回升 [12]。

在先前的初步結果中，我們使用另一個腎臟細胞株，腎臟近端小管細胞(NRK-52E)，當給予不同濃度的 LPS 刺激，也可觀察到 NRK-52E 的 Klotho 蛋白質表現量會降低，此外 PRMT6 的表現量也會升高，所以證實 LPS 造成腎臟的發炎反應時，在不同的細胞株，皆可以觀察到相同的蛋白質變化趨勢。在 NRK-52E 細胞中，LPS 除了使 PRMT6 表現量增加之外，亦可使和第七/九型離胺酸甲基轉移酶(lysine methyltransferase, Set7/9)的表現量上升。經由這些初步結果，在此份研究計畫書中，我們將進一步探討，蛋白質離胺酸甲基化，是否在調控 Klotho 蛋白質表現上，亦扮演重要角色。由其針對是否蛋白質離胺酸甲基化可以經由影響 NF- κ B 之活化來調控 Klotho 蛋白質之表現。我們的實驗假設是：當 LPS 的濃度提高時，可提高 Set7/9 表現量，進而促使 NF- κ B 離胺酸甲基化，此甲基化可促使 NF- κ B 進入細胞核變多，進而抑制 Klotho 蛋白質表現。

研究問題

1. 使用 Set7/9 siRNA 或 Set7/9 inhibitor 處理 NRK-52E 細胞，用 Western blot 實驗，觀察被 LPS 抑制的 Klotho 表現量是否會回升。
2. 經 PDTC 或 Set7/9 inhibitor 處理 NRK-52E 細胞，利用螢光顯微鏡，觀察抑制 Set7/9 是否會抑制 NF- κ B 進入細胞核。
3. 使用免疫沉澱法的實驗，觀察 NF- κ B 跟 Set7/9 之間有無交互作用，並且觀察 NF- κ B 上之離胺酸是否可被甲基化。

文獻回顧

LPS 是一種在革蘭氏陰性菌外膜上的主要構造，LPS 的構造又分成 3 部份，有 polysaccharide、oligosaccharide region 和 lipid A，lipid A 是刺激受感染的細胞產生免疫反應的主要原因。LPS 主要的致病機

制，是使細胞產生過度的發炎反應，LPS 會跟 LPS 結合蛋白(LBP)結合，而 LBP 會結合在有 CD14 的 TLR4 上，引起細胞內一連串的下游訊號傳遞，改變基因的表現[15]。當 LPS 跟 LBP 結合後，TLR4 調節的下游訊號，會活化 LPS 誘導的促發炎基因表現[16]，LPS 主要是透過活化 NF- κ B、STAT3、AP-1 後，再誘導促發炎因子的表現[17]。當細胞被發炎因子刺激時，NF- κ B 被認為是可以抑制 *Klotho* 基因表現的重要轉錄因子[9, 14]。而在老鼠的實驗中，發現 *Klotho* 蛋白質有抗老化及抗氧化壓力的效果[4, 5]。

在臨床的研究發現，慢性的腎臟疾病(CKD)的病人，腎臟細胞中的 *Klotho* 啟動子有被甲基化的現象，造成 *Klotho* 的表現受到抑制[18]，另外還有尿毒症毒素，會造成 *Klotho* 啟動子被高度甲基化，也會使蛋白質產量被減低[8]，透過這二個疾病患者上發現的現象，可以推論出 LPS 誘導的 DNA 甲基化，是造成我們先前做的研究中，看到腎絲球細胞 *Klotho* 表現量下降的主要原因之一[12]。

細胞中的 DNA 和蛋白質表現經常會透過化學修飾，造成基因的表現被調控，像是甲基化、乙醯化、去甲基化，其中最主要的化學修飾是甲基化的修飾，甲基化會發生在染色質包裹的組蛋白胺基酸，像是精胺酸(arginine)或是離胺酸(lysine)，或是發生在非組蛋白的其他蛋白質上[19]，而 DNA 的甲基化造成的基因修飾會使基因無法表現 (gene silencing)。細胞內甲基化反應通常由甲基轉移酶催化產生，甲基轉移酶由構造可分為 3 種，第一種的甲基轉移酶會甲基化 DNA、RNA 和蛋白質，像是 DNA 甲基轉移酶(DNA methyltransferases, DNMT)和蛋白質精胺酸甲基轉移酶(protein arginine methyltransferases, PRMT)；第二種是蛋白質離胺酸甲基轉移酶 (protein lysine methyltransferases, PKMT)，包含了 SET domain；第三種是在細胞膜上的異戊烯半胱氨酸羧基甲基轉移酶 (isoprenylcysteine carboxy methyltransferases)[20]。

在先前研究有看到 LPS 會使腎絲球細胞(MES-13 cell)內 *Klotho* 的蛋白表現量受到調控而降低，和 PRMT6 的表現量上升，但是加入 DNA 甲基化抑制劑(5-Aza-2'-dc) 和專一性的蛋白質精胺酸甲基化抑制劑(AMI-1)時，被 LPS 抑制的 *Klotho* 蛋白質表現量會回升，證明 DNA 的甲基化和精胺酸的甲基化會調控 *Klotho* 的白質表現量 [12]。透過 AMI-1 抑制 PRMT6 精胺酸甲基化 NF- κ B，使 NF- κ B 無法轉移進

入細胞核抑制基因表現，所以 AMI-1 可能可以當作治療腎臟疾病的藥劑[21]；此計畫實驗中，我會加入 Set7/9 siRNA 或 Set7/9 inhibitor，觀察被 LPS 抑制的 Klotho 蛋白質表現量是否有回升，Set7/9 siRNA 或 Set7/9 inhibitor 可能也有當作治療腎臟疾病的潛力。

在我們先前發表的 paper 中，被 LPS 處理過後的 MES-13 細胞中，發現 PRMT6 跟 NF- κ B 之間有交互作用[12]，而當發炎因子刺激細胞後，NF- κ B 會是抑制 Klotho 基因表現的重要轉錄因子[9, 14]，所以我們觀察到當 LPS 刺激 MES-13 細胞，PRMT6 的表現量會升高，使 NF- κ B 蛋白質精胺酸甲基化[13]，活化後的 NF- κ B 轉移到細胞核後，造成 Klotho 的轉錄減少[12]。在糖尿病跟一些發炎反應中，Set7/9 被發現可跟 NF- κ B 結合後，調節 NF- κ B 下游會影響的發炎基因表現[22]。在之前的研究已經發現當細胞處於發炎狀態時，PRMT6 表現量上升會藉由 NF- κ B 調控 Klotho 基因[12]，所以此計畫我會設計實驗，觀察 LPS 處理過後的 NRK-52E 細胞，Set7/9 是否會透過 NF- κ B 的離胺酸甲基化，使 NF- κ B 轉移到細胞核中，然後抑制 Klotho 的蛋白質表現。

研究方法及步驟

1.細胞培養

腎臟近端小管細胞，NRK-52E，培養於 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM medium)，包含有 5% 胎牛血清、1% L-glutamine 及 1% PS。

2.加藥

先準備 5 個 15ml 的離心管，將 medium 加入管中(除了 1 μ g/ μ l 加入 10ml，其餘 5 管接加入 6ml)，以實驗所需的濃度，先將加藥佔體積的 medium 先抽起來，再加入藥；將培養的細胞去除舊的 medium，以 PBS 洗 2 次。(用 1000 μ l pipet 確實吸乾 PBS)，control 組加入 5ml 無加藥的 medium，其餘 5 管再依序加入分別標好的 dish 中。(在加入 dish 之前，要先將有藥的 medium 混合均勻再加入 5ml)

3.收蛋白

細胞從培養箱取出後，將 medium 倒乾，用 PBS 100ml 洗 2 次(要將 PBS 確實倒乾，避免有殘留影響之後的濃度測定)。加入 0.5ml RIPA 後(使用前加入 proteinase inhibitors)，將細胞放置冰上刮取下來，避免細胞 degrade，收集至 eppendorf。利用 sonicator 將細胞震碎(total time 30secs；pulse on 2secs；pulse off 3secs)將震菌完的 eppendorf 放置離心機離心 (轉速:12000 rpm；時間:30mins；溫度:4 度)；離心後，的 eppendorf，吸取上清液到新的 eppendorf，待測濃度。將 BSA 10mg/ml 10X 稀釋→1μg/ul，以不同濃度作為樣本，進行蛋白質定量，算出標準曲線，接下來將吸取出來的樣本上清液取出 1μl，加入 799ul ddH₂O，以及 200ul protein assay dye 混合，以分光光度計 OD595 測定吸光值。用 EXCEL 算出蛋白質濃度並定量

4. Western blot

配好 10% Separating Gel 後，倒入架好的膠台中，再倒入酒精使氣泡溢出，待 Separating Gel 凝固後將酒精倒掉，並加入 4% Stacking Gel，插入齒梳等待膠片凝固。在製好的膠中，先 load 4μl protein marker，在依每一次收蛋白定的量，load sample，然後在迷你垂直電泳槽進行電泳，70V 30min 壓膠，100V 90min 進行跑膠。轉印模切成膠片大小後，以 95% 酒精活化，置入 transfer buffer 中。切除膠片上不需要的部分，轉印夾上放海綿並鋪上濾紙，疊上濕潤膠片，將多餘的空氣趕出去，然後將轉印夾放入有 transfer buffer 轉印槽中，在迷你垂直電泳槽進行 100V 60mins。轉印完成後，將轉印夾打開，沿著膠的大小剪開膜，再用脫脂奶粉加 buffer B 和轉印紙溫和作用 1 小時，倒掉 blocking buffer，以 buffer A 清洗三次，加入 1 抗 overnight；隔天再以 buffer A 清洗三次，加入二抗 1 小時，buffer A 清洗三次。最後以冷光分析儀測 Klotho 的表現。

5. siRNA 的製備和 transfection 實驗

第一天數完細胞細胞後，將 3×10^5 的細胞種到 3.5cm 的培養皿，使細胞第二天生長達 70-80%(此步驟用正常培養細胞的 medium)，第二天需先事先製備好 Set7/9 siRNA、scramble siRNA 和含有 lipofectamine 的無 FBS 和 PS 的 medium，先將 dish 的換成無 FBS 和 PS 的 medium，然後加入 Set7/9 siRNA 和 scramble RNA，培養 4-6 小時，接下來去除舊的 medium，換成 no phenol red medium 讓細胞穩定生長 18

小時後，再加藥處理；第三天收下蛋白後，測訂蛋白質的濃度，然後計算蛋白質的總產量，另外還要測 NO，收下來的蛋白質樣本，再做 Western blot 實驗。

6. Immunofluorescence analysis

第一天數細胞 1×10^5 個(6well)，將細胞養在 coverslip 上 loading 細胞時，用 tip 輕微壓住玻璃片，不要讓 coverslip 跟 plate 有空隙。第二天加藥後，第三天細胞拿出後用 PBS 洗三次，加入 4% paraformaldehyde/PBS 室溫下反應 15 min 後，用 PBS 洗三次，再加入 0.5% Triton X-100/PBS 室溫下反應 5 min(此步驟是將細胞膜上打洞，讓抗體可以進入細胞內)，反應後，用 PBS 洗三次，接下來用 2% BSA/PBS blocking 室溫下反應 1h，加一抗時，每一 coverslip 上加 100ul，在室溫 2h 搖，反應結束後，用 PBS 洗三次；加二抗：每一 coverslip 上加 100ul，室溫反應 2h(此步驟開始避光，因為二抗有螢光 label)，直接加入 DAPI 室溫下反應 5 min，再用 PBS 洗三次，最後封片完成後，即可用螢光顯微鏡觀察

7. Immunoprecipitation

第一天數完細胞後，每一盤培養皿 1×10^6 的細胞，隔天加藥(LPS)和製備抗體的前置處理，每一 tube 加入 Protein A/G(1:1) 50 ul 和 Anti-Methylated Lysine (di methyl) antibody 10ul(5:1)，然後放在 4°C 冰箱 16 小時；第三天收蛋白時，取 20μg 的蛋白質樣本(當作 input total lysate，第一組)，另外取 1mg 的 cell lysate 加入(10:1) 100ul Protein A/G agarose beads 中，在放入 4°C 冰箱 1 小時，接下來離心 6000rpm 10 min 4°C，將離心後的上清液轉移到前一天製備的 Protein A/G/antibody tube，再放入 4°C 冰箱搖晃 overnight；第四天，離心 6000rpm 5 min 4°C，離心後的上清液取出放入另一個 tube(第二組)，pellet 再用 buffer A 洗 3 次，用 20ul 的 5X SDS sample buffer 將 pellet 溶入，然後在 100°C 下降解 10min，最後插入冰上冷卻後離心 13000rpm 1min(第三組)，sample 製備完成後再進行 Western blot 實驗。

結果與討論

1. 在先前的實驗中已經證實給予 LPS 刺激的 NRK-52E 細胞，Klotho 的蛋白質表現量回隨著 LPS 濃度梯度下降，而 Set7/9 的蛋白質表現量

會隨著 LPS 濃度梯度上升；所以我們會給予細胞 Set7/9 inhibitor 的刺激後，觀察受 LPS 抑制的 Klotho 蛋白質表現量是否會回升。

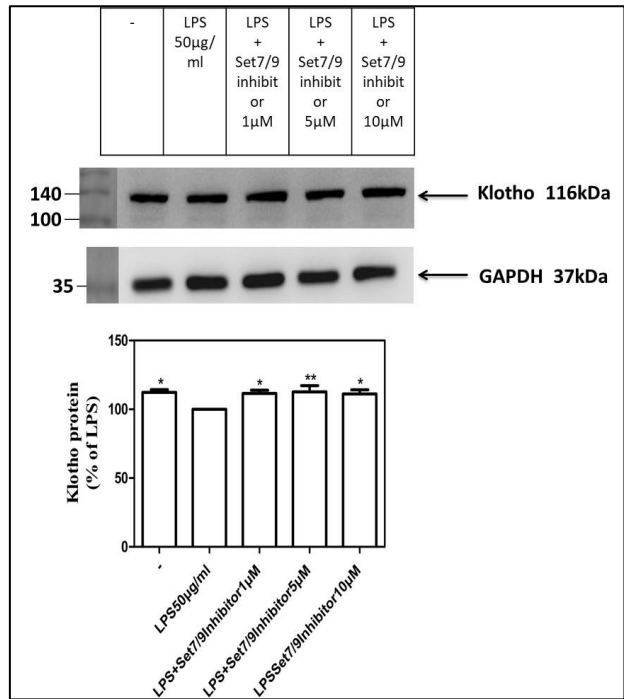


Figure 1. 被 LPS 抑制的 Klotho 的蛋白質表現量會隨著加入 Set7/9 inhibitor 而回升。

從量化後的統計圖觀察到，當加入 LPS 50µg/ml 後，Klotho 的蛋白質表現量會受抑制，而當加入 Set7/9 inhibitor(1、5、10µM)後，Klotho 的蛋白質表現量皆有回升，但是回升的趨勢並不是非常顯著，所以會在用 Set7/9 siRNA knockdown 後，做進一步的確認。

2. 在給予 Set7/9 inhibitor 後，Klotho 蛋白質的表現量回升趨勢並不是非常明顯，所以我們會用 Set7/9 siRNA transfect NRK-52E 細胞後，觀察 Set7/9 被 knockdown 後，Klotho 蛋白質的表現量回升的趨勢是否會更顯著。

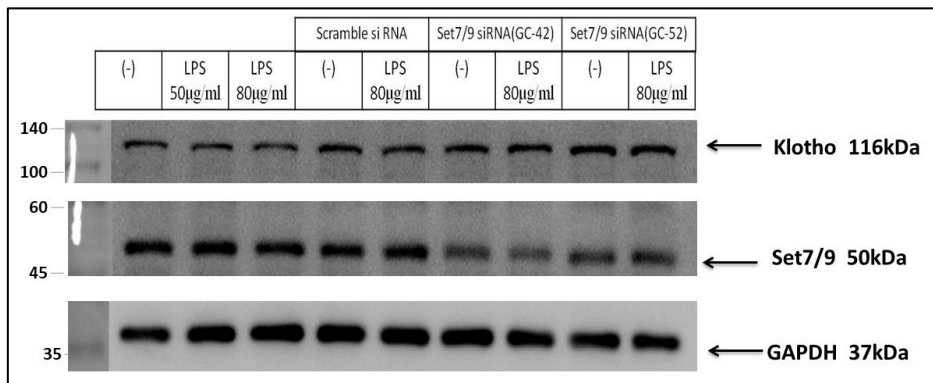


Figure 2. Set7/9 被 knockdown 後，Klotho 蛋白質的表現量有回升的趨勢

從 Western blot 圖中，能觀察到 Set7/9 siRNA transfect 細胞後，Set7/9 的蛋白質表現量確實有被抑制，而 Klotho 蛋白質的表現量也有回升的趨勢；但是目前累積數值還不足以量化作圖，所以之後需要再累積更多數值才能做完整的確定。

3. 我們會透過正立螢光顯微鏡觀察給予 LPS 刺激後，NRK-52E 細胞中，NF- κ B 是否會被誘導進入細胞核；另外還會分別加入 PDTC 及 Set7/9 inhibitor 後，觀察 NF- κ B 是否有被抑制進入細胞核。

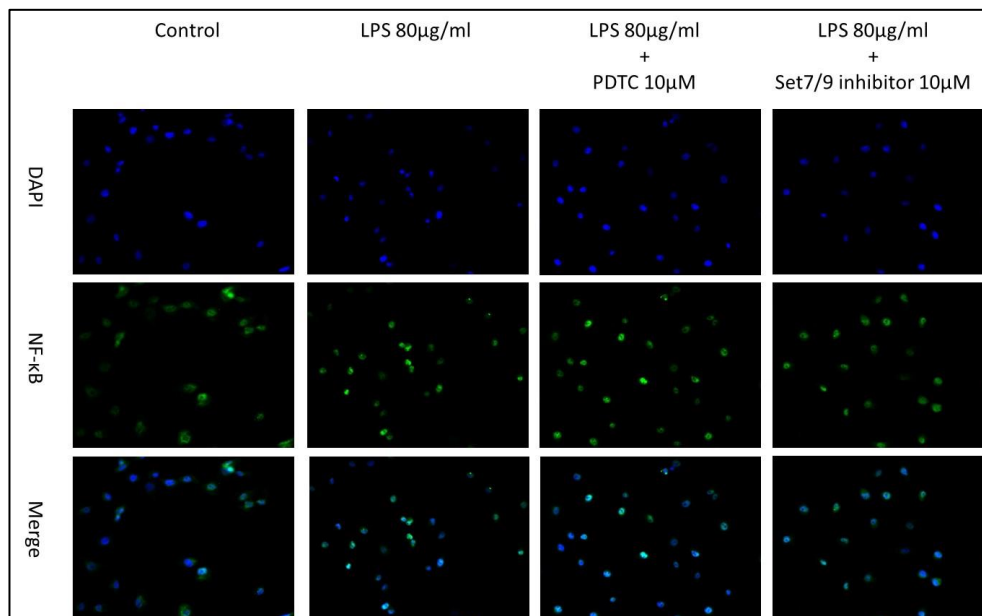


Figure 3. LPS 會使細胞核中 NF- κ B 的表現量升高，而 PDTC 及 Set7/9 inhibitor 皆可以抑制 NF- κ B 進入細胞核。

從正立螢光顯微鏡的圖中，可以觀察到 LPS 80μg/ml 刺激後的細胞核中，NF- κ B 表現較明顯；另外，分別加入 PDTC 10μM 及 Set7/9 inhibitor 10μM 後，皆可以觀察到 NF- κ B 進入細胞核的情況下降。

4. 在糖尿病跟一些發炎反應中，Set7/9 被發現可跟 NF- κ B 結合後，調節 NF- κ B 下游會影響的發炎基因表現[22]，證實 Set7/9 跟 NF- κ B 之間是有交互作用的；我們會用免疫沉澱法的實驗，做進一步確認 Set7/9 跟 NF- κ B 之間是否有交互作用。

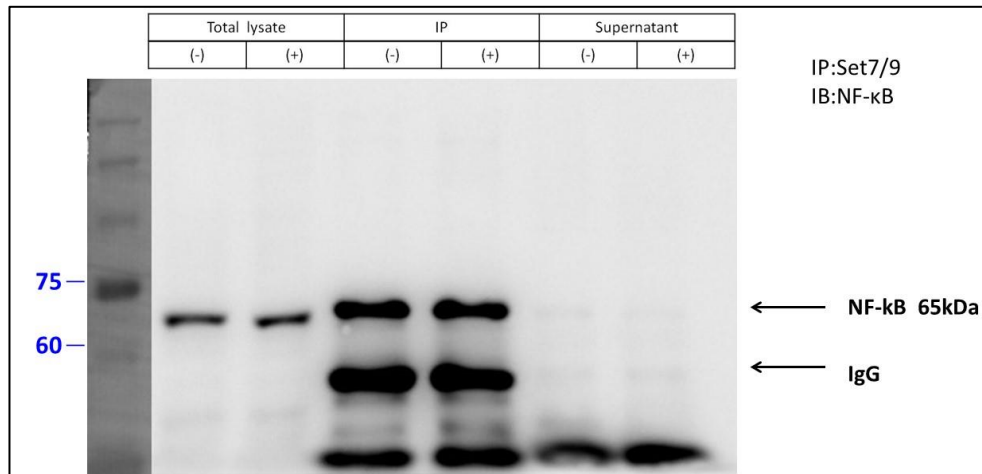


Figure 4. 利用免疫沉澱法的實驗，可以觀察到 Set7/9 跟 NF- κ B 之間確實有交互作用。

Cell lysate 先跟 Set7/9 抗體形成免疫沉澱後，再以 NF- κ B 抗體確認二者之間是否有交互作用。從圖中的結果得知 NF- κ B 跟 Set7/9 之間確實又交互作用。

目前尚有實驗必須累積更多的數值才能做出統計的圖表，未來完成所有圖表後，我們希望能找到 LPS 除了透過上調 PRMT6 的表現量後，使活化的 NF- κ B 進入細胞核中，抑制 Klotho 蛋白質的表現量；另外，也能透過上調 Set7/9 的表現量，促使 NF- κ B 上之離胺酸甲基化後，轉移到細胞核中的量變多，進而抑制 Klotho 蛋白質的表現。

參考文獻

1. Kuro-o, M., et al., *Mutation of the mouse klotho gene leads to a syndrome resembling ageing*. Nature, 1997. **390**(6655): p. 45-51.
2. Imura, A., et al., *Secreted Klotho protein in sera and CSF: implication for post-translational cleavage in release of Klotho protein from cell membrane*. FEBS Lett, 2004. **565**(1-3): p. 143-7.
3. Kuro-o, M., *Klotho and aging*. Biochim Biophys Acta, 2009. **1790**(10): p. 1049-58.
4. Kurosu, H., et al., *Suppression of aging in mice by the hormone Klotho*. Science, 2005. **309**(5742): p. 1829-33.
5. Yamamoto, M., et al., *Regulation of oxidative stress by the anti-aging hormone klotho*. J Biol Chem, 2005. **280**(45): p. 38029-34.
6. Hu, M.C., M. Kuro-o, and O.W. Moe, *The emerging role of Klotho in clinical nephrology*. Nephrol Dial Transplant, 2012. **27**(7): p. 2650-7.

7. Neyra, J.A. and M.C. Hu, *Potential application of klotho in human chronic kidney disease*. Bone, 2017. **100**: p. 41-49.
8. Sun, C.Y., S.C. Chang, and M.S. Wu, *Suppression of Klotho expression by protein-bound uremic toxins is associated with increased DNA methyltransferase expression and DNA hypermethylation*. Kidney Int, 2012. **81**(7): p. 640-50.
9. Moreno, J.A., et al., *The inflammatory cytokines TWEAK and TNFalpha reduce renal klotho expression through NFkappaB*. J Am Soc Nephrol, 2011. **22**(7): p. 1315-25.
10. Zhang, Q., et al., *Rhein reverses Klotho repression via promoter demethylation and protects against kidney and bone injuries in mice with chronic kidney disease*. Kidney Int, 2017. **91**(1): p. 144-156.
11. Shiraki-Iida, T., et al., *Improvement of multiple pathophysiological phenotypes of klotho (kl/kl) mice by adenovirus-mediated expression of the klotho gene*. J Gene Med, 2000. **2**(4): p. 233-42.
12. Tsai, K.D., et al., *Upregulation of PRMT6 by LPS suppresses Klotho expression through interaction with NF-kappaB in glomerular mesangial cells*. J Cell Biochem, 2017.
13. Di Lorenzo, A., et al., *A gain-of-function mouse model identifies PRMT6 as a NF-kappaB coactivator*. Nucleic Acids Res, 2014. **42**(13): p. 8297-309.
14. Shimizu, H., et al., *Indoxyl sulfate downregulates renal expression of Klotho through production of ROS and activation of nuclear factor-kB*. Am J Nephrol, 2011. **33**(4): p. 319-24.
15. Alexander, C. and E.T. Rietschel, *Bacterial lipopolysaccharides and innate immunity*. J Endotoxin Res, 2001. **7**(3): p. 167-202.
16. Law, R.E., et al., *Lipopolysaccharide-induced NF-kappa B activation in mouse 70Z/3 pre-B lymphocytes is inhibited by mevinolin and 5'-methylthioadenosine: roles of protein isoprenylation and carboxyl methylation reactions*. Mol Cell Biol, 1992. **12**(1): p. 103-11.
17. Liu, X., et al., *LPS induced proinflammatory cytokine expression in human airway epithelial cells and macrophages via NFkappaB, STAT3 or AP1 activation*. Mol Med Rep, 2018.
18. Chen, J., et al., *Elevated Klotho promoter methylation is associated with severity of chronic kidney disease*. PLoS One, 2013. **8**(11): p. e79856.
19. Paik, W.K., D.C. Paik, and S. Kim, *Historical review: the field of*

- protein methylation*. Trends Biochem Sci, 2007. **32**(3): p. 146-52.
20. Anderson, J.L. and C.A. Hrycyna, *9 Structure and function of isoprenylcysteine carboxymethyltransferase (Icmt): A key enzyme in CaaX processing*. Enzymes, 2006. **24**: p. 245-72.
 21. Gupta, S.C., et al., *Inhibiting NF-kappaB activation by small molecules as a therapeutic strategy*. Biochim Biophys Acta, 2010. **1799**(10-12): p. 775-87.
 22. Li, Y., et al., *Role of the histone H3 lysine 4 methyltransferase, SET7/9, in the regulation of NF-kappaB-dependent inflammatory genes. Relevance to diabetes and inflammation*. J Biol Chem, 2008. **283**(39): p. 26771-81.