

科技部補助
大專學生研究計畫研究成果報告

計 畫 名 稱	： 精氨酸甲基化在Klotho蛋白質穩定度及蛋白質交互作用 之角色探討
------------	--

執行計畫學生： 陳柏宇

學生計畫編號： MOST 107-2813-C-040-036-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05月07日

(一) 摘要

Indoxyl Sulfate (IS) 為尿毒素，是造成慢性腎臟病之致病因子。在尿毒素處理的大鼠腎細胞中，具抗老化功能的 Klotho 蛋白質表現量下降。Klotho 蛋白質的重要功能陸續被發表出來，但是對於調節 Klotho 蛋白質表達的分子機制尚未完全闡明。我們先前發表的論文中指出，經內毒素(Lipopolysaccharide, LPS)處理過後的腎絲球細胞(MES-13 cells)，Klotho 蛋白質之表現量是下降的。我們找到之分子機轉乃是 LPS 可以藉由上調 protein arginine methyltransferase 6 (PRMT6)，並經由 PRMT6 與 NF- κ B 有交互作用，造成 NF- κ B 精氨酸甲基化，促進 NF- κ B 更容易轉移到細胞核中，進而抑制 Klotho 蛋白質之表現。在本計劃的初步結果中，在腎絲球細胞(MES-13 cells)以及腎臟近端小管細胞(NRK-52E cells)中，觀察到 Klotho 蛋白質也會隨著 IS 濃度上升而表現量降低。而經專一性的精氨酸甲基轉移酶抑制劑(AMI-1)處理過後，可使被 IS 抑制的 Klotho 蛋白質表現量回升。在此份成果報告書中，我們確認了精氨酸甲基化在 IS 抑制 Klotho 蛋白質表達機轉上扮演的角色。研究成果如下：一、IS 在 NRK-52E 細胞中可以上調 PRMT6 蛋白質表達，並確定 PRMT6 與 NF- κ B 之間有交互作用，且證實 NF- κ B 蛋白質上的精氨酸甲基化。二、Klotho 蛋白質上的精氨酸有受到甲基化，且此種轉譯後修飾與 Klotho 蛋白質的穩定度有關。三、Klotho 蛋白質與其交互作用蛋白質 heat shock protein 70 的互動並沒有受到精氨酸甲基化顯著影響。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，以治療一些由於缺乏 Klotho 蛋白質而以引起之腎臟疾病。

(二) 研究動機與研究問題

在現代的社會裡，衰老對每個人來說都是必經的過程，因此與抗老化相關功能的蛋白質就變成炙手可熱的研究對象了。Klotho 蛋白質首次發現在小鼠細胞膜上，有抗老化的功能[1]。Klotho 蛋白質有兩種型式分別為跨膜型和分泌型[2]，跨膜型 Klotho 蛋白質透過結合 FGF 受體增加 Klotho 蛋白質對 FGF23 的親和力後，調節磷酸鹽/鈣代謝[3]。分泌型的 Klotho 蛋白質可利用循環系統來到達全身各系統中[4]，作為循環激素，與細胞表面受體結合，抑制對胰島素和胰島素生長因子(IGF-1)作用，達到抗衰老作用[5]。目前對於 Klotho 蛋白質的重要功能陸續被發表出來，但是 Klotho 蛋白質表達調節的分子機制尚未完全闡明。

對於 Klotho 蛋白質已知的調控機轉包含轉錄層次調控、轉譯後修飾以及表觀遺傳調控。Klotho 蛋白質的表現在轉錄層次上的調控包含兩個重要的轉錄因子 Nrf2 [6]、NF- κ B [7, 8]。Klotho 蛋白質的轉譯後修飾可分為三種，包括蛋白質泛素化[9]、糖基化[10]以及被切割導致蛋白質脫落[11]。Klotho 蛋白質透過表關遺傳的調控包括組蛋白的乙酰化[12]及 DNA 甲基化作用[13]。

在我們先前發表的論文中指出[14]，在腎絲球細胞(MES-13 cells)中，經由脂

多醣 lipopolysaccharide (LPS) 加藥處理後，會促使蛋白質精氨酸甲基轉移酶 6 (protein arginine methyltransferase 6 , PRMT6) 的表現量提升及 Klotho 蛋白質表現量下降。而 PRMT6 與 NF- κ B 之間有交互作用，可使 NF- κ B 精氨酸甲基化，而使 NF- κ B 更容易轉移到細胞核中，抑制 Klotho 基因的轉錄。

LPS 主要造成敗血症誘導的急性腎損傷[15]，在急性腎損傷早期，發現 Klotho 蛋白質表達下降[16]。此外，Indoxyl Sulfate (IS) 也是影響腎功能的一大指標，IS 為尿毒素，影響慢性腎臟病(chronic kidney disease, CKD)的發展，有論文指出 Klotho 蛋白質在尿毒素處理之大鼠腎細胞的表現量是下降的[17]。所以我們在此研究計畫書中利用了兩個腎臟細胞株，分別是腎絲球細胞(MES-13 cells)以及腎臟近端小管細胞(NRK-52E cells)處理 IS 此藥物，觀察 IS 是否亦可調降 Klotho 蛋白質的表達。而在初步實驗中，使用了 MTT assay，來檢測處理 IS 不同濃度下，兩株細胞的存活率(Fig.1)。在細胞存活率維持 70% 以上的情形之下，Klotho 蛋白質會隨著 IS 濃度上升而表現量降低(Fig.2-1、2-2)。當加入 DNA 甲基轉移酶抑制劑(5-Aza-2'-dC)及專一性的精氨酸甲基化抑制劑(AMI-1)後，可使被 IS 抑制的 Klotho 蛋白質表現量回升(Fig.3-1、3-2)。此外利用螢光顯微鏡，也觀察到當在 MES-13 細胞中加入 IS 處理，發現 IS 可以誘導 NF- κ B 進入細胞核(Fig.4)。

在我們之前發表的論文中提到，LPS 上調 PRMT6 的表達，且 PRMT6 與 NF- κ B 之交互作用，可調控 Klotho 蛋白質的表現。在此份研究計畫書中，我的初步研究動機是想瞭解 IS 是否也可透過之前發表論文的機轉來調控 Klotho 蛋白質的表現。亦即 IS 是否可上調 PRMT6 的表達，藉由 PRMT6 與 NF- κ B 交互作用，促使 NF- κ B 精氨酸甲基化，而使 NF- κ B 更容易轉移到細胞核中，進而抑制 Klotho 蛋白質表達。此外，我也想探討 Klotho 蛋白質本身上的精氨酸是否可以被甲基化。進一步的，根據目前最新的一篇論文報導[18]，Klotho 蛋白質可結合多種蛋白質，其中之一為 S-formylglutathione hydrolase (FGH)，此外還有保護蛋白(如 heat shock protein 60、heat shock protein 71；hsp60、hsp71)及核糖體蛋白。因此，我也想探討 Klotho 蛋白質與這三種蛋白質(FGH、hsp60、hsp71)之間的交互作用是否受到精氨酸甲基化的影響。

本計畫研究目標：

1. 探討 IS 在 NRK-52E 細胞是否可以誘導 PRMT6 蛋白質表達上升，並且確定 PRMT6 蛋白質與 NF- κ B 之間的交互作用，且證實 NF- κ B 蛋白質上的精氨酸可被甲基化。
2. 探討 Klotho 蛋白質上的精氨酸是否受到甲基化的修飾。由於專一性的精氨酸甲基轉移酶抑制劑(AMI-1)可使被 IS 抑制的 Klotho 蛋白質表現量回升，因此，是否 Klotho 蛋白質本身的甲基化/去甲基化，與 Klotho 蛋白質的穩定度有關，將於此研究計畫書中，作進一步的驗證。
3. 探討 Klotho 蛋白質與其他蛋白質 (FGH、hsp60、hsp71) 的交互作用是否受到精氨酸甲基化影響。

(三) 文獻回顧與探討

Klotho 基因突變，會造成類似於人類衰老的特徵[1]。Klotho 蛋白質也可在血清中偵測到，是隨年齡上升而表現量下降的循環因子[19]。有研究指出，在猴子大腦白質區發現 Klotho 蛋白質隨著年齡的增長而表現下降，且使腦細胞功能衰退[20]。綜觀上述，Klotho 無疑為抗老化之重要蛋白質。

Klotho 蛋白質可以與腎小管細胞膜上纖維母細胞的生長因子受體(Fibroblast growth factor receptor, FGFR) 形成複合物，以增強 FGF23 對 FGFR 的親和力，來調節磷酸鹽平衡[3]。Klotho 也可抑制胰島素生長因子-1 (IGF-1) 信號傳導，達到抗老化的效果[5]。Klotho 蛋白質可視為潛在的腫瘤抑制因子，在人類乳腺癌中，Klotho 蛋白質可抑制 IGF-1 及活化 FGF 途徑[21]。此外，Klotho 蛋白質也可藉由調節細胞內信號傳遞途徑作為抗老化、凋亡的保護機制。舉例來說，Klotho 蛋白質可活化 Nrf2 來抑制細胞衰老和凋亡 [22]。當 Klotho 缺陷時，活化 Wnt 信號傳遞路徑，導致幹細胞耗損或衰老，引起組織萎縮和纖維化[23]。在慢性腎病、炎症相關以及神經元病症中，TNF 因子透過 NF- κ B 路徑抑制 Klotho 蛋白質的表現[7]。

目前，相關的研究報導如 PPAR- γ 促進劑[24]、Ang-II type I receptor 阻斷劑[25]、HMG-CoA 還原酶抑制劑[26]等，皆可使 Klotho 蛋白質表現量提高及降低血管鈣化、硬化。此外，調控 Klotho 蛋白質已知分子調控機轉還有表觀遺傳調控[27]。表觀遺傳調控包括組蛋白乙醯化及 DNA 甲基化作用。在乳癌細胞中發現 DNA 甲基化及組蛋白的去乙醯化會使 Klotho 蛋白質表達下降 [12]。基因的去甲基化使 Klotho 表達上升及減少腎纖維化[28]，所以在 CKD 患者中，啟動子甲基化可能是 Klotho 基因抑制的途徑之一[13]。尿毒症毒素 IS 可引起 Klotho 啟動子的高度甲基化來抑制 Klotho 蛋白質表達，顯示尿毒症毒素對 Klotho 蛋白質的表觀遺傳修飾可能是致病的重要機制[29]。此外，在腎臟近端小管細胞中，IS 藉由產生活性氧(ROS)，促使活化 NF- κ B 路徑來抑制 Klotho 蛋白質的表達[8]。

IS 是酸性腎毒素，是慢性腎臟病發展的重要致病因素[30]。IS 是肝臟代謝 indole 的產物，具有與蛋白質強力結合的能力。IS 可與酸性藥物競爭藥物運送蛋白，而使藥物在血中濃度升高而增加毒性。因為 IS 在身體的積累，加速了慢性腎臟疾病和腎功能衰竭，包括腎小球硬化及腎小管間質纖維化[31]。IS 刺激腎臟中纖維化基因的表達如 TGF- β 1 和 α -平滑肌肌動蛋白(SMA)，和炎症基因(IL-6，IL-1 β 和 TNF- α)[32, 33]，促進自由基產生，抑制抗氧化酶的活性[34]。IS 誘導內皮細胞內 ROS 的生成並透過 MAPKs /NF- κ B/ AP-1 等路徑來增加 IL-1 β 誘導 E-selectin 的表達[35]。

細胞內的轉譯後修飾，如甲基化、乙醯化以及磷酸化都可影響蛋白質的穩定及與其他蛋白質的交互作用，蛋白質的甲基化常發生在精氨酸(arginine)或離氨酸(lysine) [36]。我們先前發表的論文指出，LPS 提升 PRMT6 的表現量，PRMT6

與 NF- κ B 的相互作用，會使 NF- κ B 精氨酸甲基化，抑制 Klotho 基因的轉錄作用。於此研究計劃書中，將探討在 IS 加藥處理下之腎臟細胞，是否也會影響 PRMT6 及 Klotho 蛋白質的表達。此外，探討 Klotho 蛋白質本身上的精氨酸是否可以被甲基化。進一步想瞭解，Klotho 蛋白質與已知三種 Klotho 相互作用的蛋白質(FGH、hsp60、hsp71)是否會受到精氨酸甲基化的影響。

(四) 研究方法及步驟

研究方法：

1. 使用 Western blot 實驗探討 IS 觀察在 NRK-52E 細胞是否可以誘導 PRMT6 蛋白質表達上升。
2. 使用免疫沉澱法，確定 PRMT6 與 NF- κ B 之間的相互作用
3. 使用免疫沉澱法，證實 NF- κ B 蛋白質上或 Klotho 蛋白質上的精氨酸可被甲基化。我們將使用 anti-dimethyl-arginine, asymmetric antibody (ASYM24)及 anti-dimethyl-arginine, symmetric antibody (SYM10)抗體接上 protein A/G，將細胞內所有可被甲基化的蛋白質先沉澱下來，再使用 NF- κ B 或是 Klotho 蛋白質的抗體進行 Western blot 實驗的觀察。
4. 使用 Cycloheximide (CHX)- blocking 實驗，偵測 Klotho 蛋白質的穩定度，將設計組別【control、IS 1200 μ M、IS 1200 μ M+ AMI-1 100 μ M】中分別加入 1mM CHX 的新鮮培養基，透過不同時間收集細胞裂解物 (80 μ g)，並進行 Western blot 實驗。
5. 使用免疫沉澱法，確認 NRK-52E 細胞中 Klotho 蛋白質確實與 FGH、hsp60、hsp71 之間的交互作用，再處理 AMI-1 觀測 Klotho 蛋白質與上述蛋白質的交互作用是否受到影響。

研究步驟：

1. 細胞株和細胞培養

本研究需要製備兩種細胞株分別是大鼠腎臟近端小管細胞 NRK-52E 培養於 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM medium) 包含 1.5 g/L Sodium bicarbonate、5% FBS、5% PS、1% L-glutamine；而腎絲球細胞 MES-13 則培養在 DMEM medium 包含有 F12 Nutrient Mixture、6.138 g/L Sodium bicarbonate、5% FBS、1% PS、1% L-glutamine 及 1M HEPES 皆在 37 °C，5% 的 CO₂ 條件下培養。

2. 細胞存活率估算 (MTT Assay)

將 2 \times 10⁵個 NRK-52E、MES-13 細胞種植在 6 well 盤，加入含 0.5mg/ml MTT 之

medium，在3小時後，加入1000 μ l isopropanol，然後吸取300 μ l 至eppendorf tubes，離心7000rpm，5min利用ELISA reader測得其在細胞在波長570 nm的O.D.值。

3. 蛋白質萃取與西方點墨法(Protein extraction and Western blotting) <蛋白質萃取>

收取細胞前以1 x PBS 清洗兩次，加入300 μ l RIPA，以細胞刮杓將細胞連同蛋白質刮下置於1.5 ml 離心管，利用超音波細胞粉碎儀打破細胞。接下來於4°C下離心12000 rpm、30 分鐘，取上清液稀釋並加入Bio-Rad protein assay dye。利用分光光度計OD₅₉₅測定，算出蛋白質濃度並定量。配置好等濃度的樣品後，於95°C加熱 5分鐘後，使蛋白質denature 並在-20°C 保存或進行下一步實驗。

<西方點墨法>

經由SDS-PAGE電泳膠體，將蛋白質轉到PVDF膜上，用5%的脫脂牛奶溶於TBS室溫一小時，TBS清洗三次、10分鐘。一抗抗體(1:1000稀釋)，置於4°C 處理隔夜。隔日，TBST清洗3次、10分鐘。加入二抗抗體，濃度為1:10000溶於TBST裡，室溫處理1小時後，TBST清洗三次、10分鐘。利用Chemiluminescence substrate 呈色，以冷光螢光數位分析系統進行冷光測定。

4. 免疫螢光分析(Immunofluorescence analysis)

將2 \times 10⁵個 NRK-52E、MES-13 細胞種植在6 well，並且在每個組別中加入coverslip，經加藥培養24hr後，細胞拿出後用PBS沖洗，加入4% paraformaldehyde/PBS 室溫下反應15 min 後，再用PBS 洗滌，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)，再用PBS 沖洗，接下來用2% BSA/PBS blocking室溫下反應1 hr，直接加入一抗反應16-18hr，後加入二抗反應2hr，直接加入DAPI 室溫下反應5 min，再用PBS 沖洗，封片完成後，即可用螢光顯微鏡觀察。

5. 免疫共沉澱 (co-Immunoprecipitation)

將1 \times 10⁶個 NRK-52E細胞種植在培養皿上經過24hr 的培養後，加藥(IS)和製備抗體的前置處理，每一tube加入Protein A/G(1:1) 50 μ l 和ASYM24及SYM10 10 μ l (5:1)，然後4°C放置16-18hr。當細胞培養了24hr之後，取20 μ g的蛋白質樣本(NO.1)，另外取1mg的cell lysate加入(10:1) 100 μ l Protein A/G agarose beads中，放入4°C冰箱1小時，接下來離心(6000rpm、10 min、4°C)，將離心後的上清液抽取至前一天製備的Protein A/G/antibody tube，再放入4°C冰箱搖晃16-18hr，再離心(6000rpm、5 min、4°C)，離心後的上清液取出放入另一個tube(NO.2)，pellet使用buffer A 清洗，用20 μ l的 5X SDS sample buffer將pellet溶入，用加熱儀100°C降解蛋白質10分鐘，再離心(13000rpm、1min)(NO.3)，sample製備完成後再進行Western blot實驗。

6. 放線菌酮阻斷實驗 (Cycloheximide blocking experiment)

為了測定Klotho蛋白質的穩定性，使用三個組別，分別為Control、IS 1200 μ M、IS (1200 μ M) + AMI-1 (100 μ M)加藥至10 cm培養皿中生長的NRK-52E細胞 (約106個細胞 / plate)。然後從培養基中除去這些化學物質，並將細胞與含有1mM Cycloheximide (CHX)的新鮮培養基一起孵育不同時間。在指定的時間點 (1,3,6,10和12小時) 收集細胞裂解物 (80 μ g)，並進行Western blot實驗分析。

(五) 結果

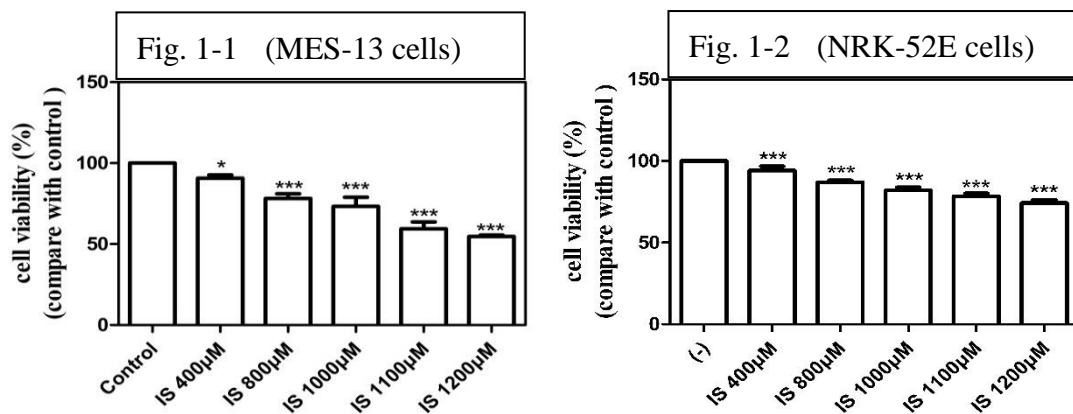


Fig.1-1、1-2 不同濃度的 Indoxyl Sulfate 對於 MES-13 及 NRK-52E 細胞存活率的影響

結果顯示在 MES-13 cells 加藥處理 24hr 中，IS 會隨著劑量提高(濃度範圍:400-1200 μ M)而導致細胞存活率下降，當濃度為 1000 μ M 時，MES-13 cells 的存活率約為 70%；而在 NRK-52E cells 透過 IS 加藥處理 24hr 中，也能看到 IS 濃度(400-1200 μ M)上升導致細胞階梯式凋亡，而濃度為 1200 μ M 時，NRK-52E cells 的細胞存活率為 70%。我們推論由於 IS 主要作用於腎小管細胞，因此 NRK-52E cells 對於劑量耐性相對比較高。

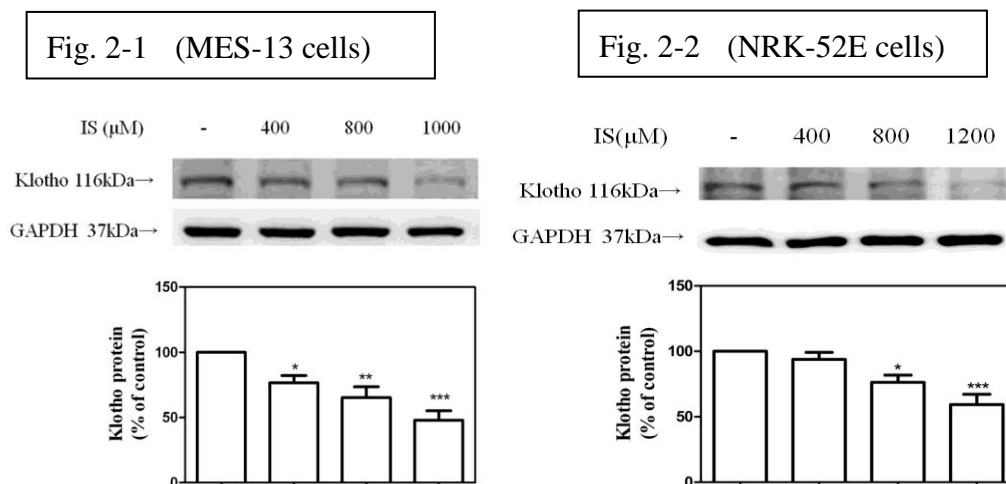


Fig.2-1、2-2 Indoxyl Sulfate 劑量上升，MES-13 及 NRK-52E 細胞內的 Klotho 蛋白質表現量變化

透過 Western blot 實驗分析和量化統計結果，IS 濃度提升抑制了 Klotho 蛋白質表達下降。在 MES-13 cells 中，我們挑選了濃度為 400、800、1000 μ M 所得出來的解果顯示，在 IS 濃度為 1000 μ M，Klotho 蛋白質表現量相比控制組減少了 50%；而在 NRK-52E cells 中，我們選定 400、800、1200 μ M，在 IS 濃度 1200 μ M 時，Klotho 蛋白質表現量相比控制組減少約 40% 表現量。

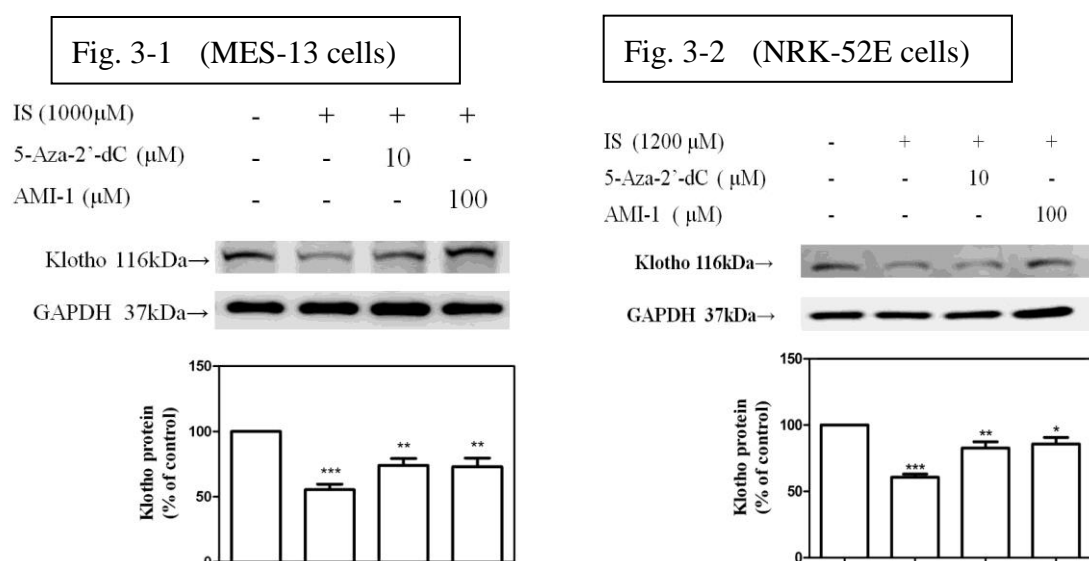


Fig.3-1、3-2 在 Indoxyl Sulfate、5-Aza-2'-dC、AMI-1 處理下，MES-13 及 NRK-52E 細胞內的 Klotho 蛋白質表現量變化

透過 Western blot 實驗分析及量化統計結果，在 MES-13 cells 中 IS 濃度為 1000 μ M 加藥處理下，加入了不同種甲基轉移酶抑制劑(包含 5-Aza-2'-dC 及 AMI-1) 對 Klotho 蛋白質表達作用得知，這兩種甲基轉移酶抑制劑作用在 IS 處理中皆會抑制 IS 造成的甲基化，而提高 Klotho 蛋白質的表現量；在 NRK-52E cells 中 IS 濃度為 1200 μ M 加藥處理下，也加入了 5-Aza-2'-dC 及 AMI-1 的甲基轉移酶抑制劑對 Klotho 蛋白質表達作用得知，這兩種甲基轉移酶抑制劑作用在 IS 處理中皆會抑制 IS 導致的甲基化，而提高 Klotho 蛋白質的表現量約各 20%左右。

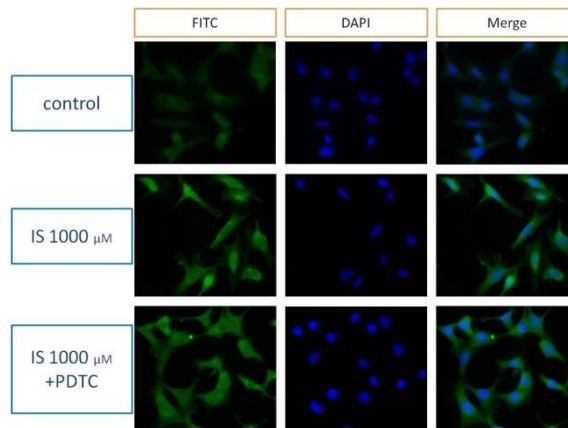


Fig.4 在 MES-13 cells 中經由 Indoxyl Sulfate 處理下，可使 NF-κB 在由細胞質進入細胞核

在 MES-13 cells 中加入 IS 處理下，使用 DAPI 染色(中圖，藍色)，以標記細胞核位置，樣品也用 NF-κB 抗體染色，然後用 FITC 相關的二抗進行信號擴增(左圖，綠色)，而右圖為將 DAPI 與 FITC 染色圖做合成，可觀測 NF-κB 是否入核。發現 IS 濃度 1000μM 時，會誘導 NF-κB 進入細胞核內。再加入 20μM PDTC(選擇性 NF-κB 抑制劑)後，發現了 NF-κB 入核減少許多。

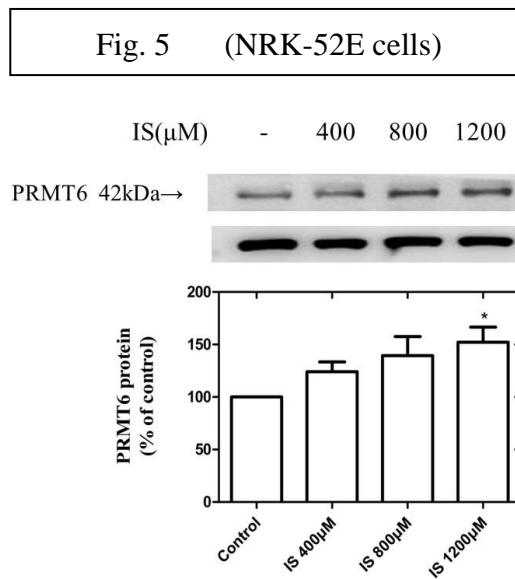


Fig.5 Indoxyl Sulfate 劑量上升，NRK-52E 細胞內的 PRMT6 蛋白質表現量變化

透過 Western blot 實驗分析和量化統計結果，IS 濃度提升促使 PRMT6 蛋白質表達增加。在 NRK-52E cells 中，我們選定 400、800、1200μM，在 IS 濃度 1200μM 時，Klotho 蛋白質表現量相比控制組增加約 50% 表現量。

Fig. 6 (NRK-52E cells)

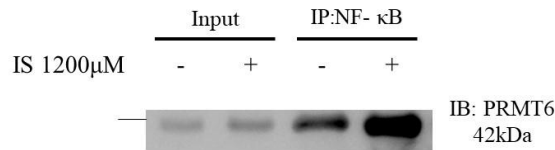


Fig.6 Indoxyl Sulfate 劑量有無，觀察 NF- κ B 與 PRMT6 蛋白質之交互作用

在 Indoxyl sulfate 濃度為 1200 μ M 有無的情況下，將 NRK-52E cells 處理 24 小時，收取下來的細胞裂解液利用 NF- κ B 抗體進行 Immunoprecipitation 實驗，再使用 PRMT6 抗體進行 Western blot 的實驗進行分析。結果圖發現，在 NRK-52E cells 中，NF- κ B 以及 PRMT6 蛋白質有交互作用，而且經過 IS 濃度為 1200 μ M 處理後，NF- κ B 以及 PRMT6 蛋白質交互作用有明顯的增加。

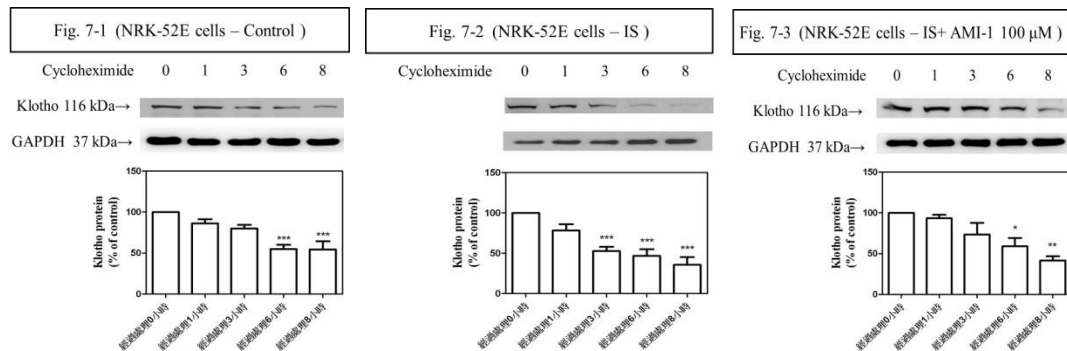


Fig.7 利用放線菌酮阻斷實驗測量在 Indoxyl sulfate 的有無對於 Klotho 蛋白質的穩定性影響

利用 NRK-52E cells 中的放線菌酮(CHX)阻斷實驗觀測 Klotho 蛋白質的穩定性。NRK-52E cells 生長 10 cm 培養盤 (約 10⁶ 個細胞/盤) 中使用 Indoxyl sulfate 濃度為 1200 μ M 有無存在的情況下處理 24 小時，(Fig.7-1)控制組、(Fig.7-2)加入 IS、(Fig.7-3)IS + 100 μ M AMI-1。藥物經由 24 小時後，在不存在或存在 1mM 的 CHX 情況下用新鮮培養基替換。在添加後的不同時間 (0,1,3,6,8 小時) 收集細胞裂解物，通過 Western blot 檢測 CHX 和 Klotho 蛋白水平。結果圖發現，經由 IS 處理下的 NRK-52E cells 中的 Klotho 蛋白質半衰期相比控制組是下降的，而透過 AMI-1 的作用下，恢復 Klotho 蛋白質的穩定度

Fig. 8 (NRK-52E cells)

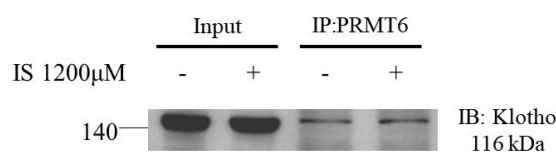


Fig.8 Indoxyl Sulfate 劑量有無，觀察 PRMT6 與 Klotho 蛋白質之交互作用
 在 Indoxyl sulfate 濃度為 1200 μ M 有無的情況下，將 NRK-52E cells 處理 24 小時，收取下來的細胞裂解液利用 PRMT6 抗體進行 Immunoprecipitation 實驗，再使用 Klotho 抗體進行 Western blot 的實驗進行分析。結果圖發現，在 NRK-52E cells 中，PRMT6 以及 Klotho 蛋白質有交互作用。

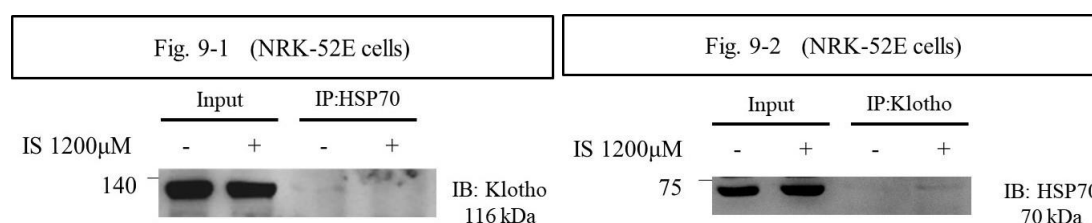


Fig.9 Indoxyl Sulfate 及 AMI-1 劑量有無，觀察 Klotho 與 HSP70 蛋白質之交互作用

在 Indoxyl sulfate 濃度為 1200 μ M 有無的情況下，(Fig.9-1、9-2)加入 IS，將 NRK-52E cells 處理 24 小時，將收取下來的細胞裂解液利用 HSP70 或 Klotho 抗體進行 Immunoprecipitation 實驗，再使用 Klotho 或 HSP70 抗體進行 Western blot 的實驗進行分析。結果圖發現，此兩免疫沉澱圖沒有顯著的交互作用。

(六) 討論

甲基化反應，包括 DNA 甲基化和蛋白質甲基化是基因表達調控重要的調節因素。我們先前發表的論文說明，在腎絲球細胞(MES-13 cells)中，專一性的精氨酸甲基酶抑制劑 AMI-1 可以恢復由 LPS 抑制的 Klotho 蛋白質表現量。且在腎絲球細胞(MES-13 cells)中，LPS 提升 PRMT6 的表達。在本篇研究，對於 MES-13 cells 以及腎臟近端小管細胞(NRK-52E cells)中分別在濃度 1000 μ M 及 1200 μ M 的 Indoxyl Sulfate 處理下，細胞存活率約維持在 70% 以上 (Fig.1-1、1-2)。在 MES-13 cells 以及 NRK-52E cells 中，觀察到 Klotho 蛋白質也會隨著 IS 濃度上升而表現量降低(Fig.2-1、2-2)。而經專一性的精氨酸甲基轉移酶抑制劑(AMI-1)處理過後，可使被 IS 抑制的 Klotho 蛋白質表現量回升(Fig.3-1、3-2)。觀察經由 IS 處理的 MES-13 細胞中，可使 NF- κ B 由細胞質進入細胞核(Fig. 4)。在先前發表的論文中指出，LPS 可以藉由上調 PRMT6 並經由 PRMT6 與 NF- κ B 有交互作用，造成 NF- κ B 精氨酸甲基化，促進 NF- κ B 更容易轉移到細胞核中，進而抑制 Klotho 蛋白質之表現。透過 IS 劑量上升，發現 PRMT6 蛋白質表達在 NRK-52E 細胞中也有增加的趨勢(Fig. 5)，利用免疫沉澱實驗確定 PRMT6 蛋白質與 NF- κ B 之間的交互作用(Fig. 6)。使用放線菌酮(CHX)阻斷實驗，我們證明在 NRK-52E 細胞中，IS 加速了 Klotho 蛋白質的降解(Fig.7-2)，而施以濃度為 100 μ M 的 AMI-1，可回 Klotho 蛋白質的穩定度(Fig.7-3)，上述實驗證明了透過專一性的精氨酸甲基酶抑

制劑作用，使 Klotho 蛋白質的穩定度變高。綜合(Fig. 5)和(Fig. 7)，我們推測 Klotho 蛋白質在甲基化的時候表現不穩定，而在去甲基化的時候表現安定。我們進一步推測且證實 Klotho 蛋白質與 PRMT6 蛋白質有交互作用(Fig.8)。根據目前最新的一篇論文報導[18]，Klotho 蛋白質可結合多種蛋白質，在本計畫選定 HSP70 蛋白質，(Fig. 9-1)我們利用 HSP70 抗體將細胞裂解液進行免疫沉澱實驗，在使用 Klotho 抗體做 Western blot 實驗。結果發現二者並沒有交互作用。反之，(Fig. 9-2)使用 Klotho 抗體進行免疫沉澱實驗，使用 HSP70 抗體進行 Western blot 實驗，亦發現二者無交互作用。所以我們確認 Klotho 蛋白質與 HSP70 之間並沒有交互作用。總之，我們在本篇研究計畫書中，在 NRK-52E cells，確定透過專一性精胺酸甲基酶抑制劑的作用，可恢復因 IS 導致 Klotho 蛋白質穩定度下降的情況。此外，我們也發現由 IS 處理後的 NRK-52E cells 中，細胞內第六型精胺酸甲基轉移酶表現量增加。

(七) 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 as a regulator of fibroblast growth factor signaling and phosphate/calcium metabolism*. Curr Opin Nephrol Hypertens, 2006. **15**(4): p. 437-41.
4. Hu, M.C., et al., *Renal Production, Uptake, and Handling of Circulating alphaKlotho*. J Am Soc Nephrol, 2016. **27**(1): p. 79-90.
5. Kurosu, H., et al., *Suppression of aging in mice by the hormone Klotho*. Science, 2005. **309**(5742): p. 1829-33.
6. Zhu, H., et al., *Klotho Improves Cardiac Function by Suppressing Reactive Oxygen Species (ROS) Mediated Apoptosis by Modulating Mapks/Nrf2 Signaling in Doxorubicin-Induced Cardiotoxicity*. Med Sci Monit, 2017. **23**: p. 5283-5293.
7. Teocchi, M.A., et al., *Hippocampal gene expression dysregulation of Klotho, nuclear factor kappa B and tumor necrosis factor in temporal lobe epilepsy patients*. J Neuroinflammation, 2013. **10**: p. 53.
8. 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.
9. Wagner, S.A., et al., *Proteomic analyses reveal divergent ubiquitylation site patterns in murine tissues*. Mol Cell Proteomics, 2012. **11**(12): p. 1578-85.
10. Kurosu, H., et al., *Regulation of fibroblast growth factor-23 signaling by klotho*. J

- Biol Chem, 2006. **281**(10): p. 6120-3.
11. Chen, C.D., et al., *Identification of cleavage sites leading to the shed form of the anti-aging protein klotho*. Biochemistry, 2014. **53**(34): p. 5579-87.
 12. Rubinek, T., et al., *Epigenetic silencing of the tumor suppressor klotho in human breast cancer*. Breast Cancer Res Treat, 2012. **133**(2): p. 649-57.
 13. Chen, J., et al., *Elevated Klotho promoter methylation is associated with severity of chronic kidney disease*. PLoS One, 2013. **8**(11): p. e79856.
 14. 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.
 15. Wu, Y., et al., *The Role of Autophagy in Kidney Inflammatory Injury via the NF-kappaB Route Induced by LPS*. Int J Med Sci, 2015. **12**(8): p. 655-67.
 16. Hu, M.C. and O.W. Moe, *Klotho as a potential biomarker and therapy for acute kidney injury*. Nat Rev Nephrol, 2012. **8**(7): p. 423-9.
 17. Adijiang, A., et al., *Indoxyl sulfate reduces klotho expression and promotes senescence in the kidneys of hypertensive rats*. J Ren Nutr, 2011. **21**(1): p. 105-9.
 18. Xu, Y. and Z. Sun, *Regulation of S-formylglutathione hydrolase by the anti-aging gene klotho*. Oncotarget, 2017. **8**(51): p. 88259-88275.
 19. Martin-Nunez, E., et al., *Soluble levels and endogenous vascular gene expression of KLOTHO are related to inflammation in human atherosclerotic disease*. Clin Sci (Lond), 2017. **131**(21): p. 2601-2609.
 20. Duce, J.A., et al., *Gene profile analysis implicates Klotho as an important contributor to aging changes in brain white matter of the rhesus monkey*. Glia, 2008. **56**(1): p. 106-17.
 21. Wolf, I., et al., *Klotho: a tumor suppressor and a modulator of the IGF-1 and FGF pathways in human breast cancer*. Oncogene, 2008. **27**(56): p. 7094-105.
 22. Maltese, G., et al., *The anti-ageing hormone klotho induces Nrf2-mediated antioxidant defences in human aortic smooth muscle cells*. J Cell Mol Med, 2017. **21**(3): p. 621-627.
 23. Bian, A., et al., *Klotho, stem cells, and aging*. Clin Interv Aging, 2015. **10**: p. 1233-43.
 24. Speeckaert, M.M., et al., *Peroxisome proliferator-activated receptor agonists in a battle against the aging kidney*. Ageing Res Rev, 2014. **14**: p. 1-18.
 25. Karalliedde, J., et al., *Effect of renin-angiotensin system blockade on soluble Klotho in patients with type 2 diabetes, systolic hypertension, and albuminuria*. Clin J Am Soc Nephrol, 2013. **8**(11): p. 1899-905.
 26. Narumiya, H., et al., *HMG-CoA reductase inhibitors up-regulate anti-aging klotho mRNA via RhoA inactivation in IMCD3 cells*. Cardiovasc Res, 2004. **64**(2): p. 331-6.

27. Neyra, J.A. and M.C. Hu, *Potential application of klotho in human chronic kidney disease*. Bone, 2017. **100**: p. 41-49.
28. 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.
29. 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.
30. Tan, X., et al., *Indoxyl sulfate, a valuable biomarker in chronic kidney disease and dialysis*. Hemodial Int, 2017. **21**(2): p. 161-167.
31. Ellis, R.J., et al., *Indoxyl sulphate and kidney disease: Causes, consequences and interventions*. Nephrology (Carlton), 2016. **21**(3): p. 170-7.
32. Shimizu, H., et al., *NF-kappaB plays an important role in indoxyl sulfate-induced cellular senescence, fibrotic gene expression, and inhibition of proliferation in proximal tubular cells*. Am J Physiol Cell Physiol, 2011. **301**(5): p. C1201-12.
33. Jofre, R., et al., *Inflammatory syndrome in patients on hemodialysis*. J Am Soc Nephrol, 2006. **17**(12 Suppl 3): p. S274-80.
34. Chen, Z.W., et al., *Pterostilbene protects against uraemia serum-induced endothelial cell damage via activation of Keap1/Nrf2/HO-1 signaling*. Int Urol Nephrol, 2017.
35. Shen, W.C., et al., *Indoxyl sulfate enhances IL-1beta-induced E-selectin expression in endothelial cells in acute kidney injury by the ROS/MAPKs/NFkappaB/AP-1 pathway*. Arch Toxicol, 2016. **90**(11): p. 2779-2792.
36. Migliori, V., et al., *Arginine/lysine-methyl/methyl switches: biochemical role of histone arginine methylation in transcriptional regulation*. Epigenomics, 2010. **2**(1): p. 119-37.