

科技部補助
大專學生研究計畫研究成果報告

計 畫 名 稱	： 蛋白質精胺酸甲基化程度與核仁壓力對FUS蛋白質核仁分布的相關性研究
------------	-------------------------------------

執行計畫學生：劉玉環

學生計畫編號：MOST 109-2813-C-040-044-B

研究期間：109年07月01日至110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 110年03月31日

摘要 (Abstract)

研究顯示多種癌症和蛋白質精氨酸甲基轉移酶 PRMT 的失調及過度表達有關，使用 PRMT 抑制劑，以有效降低癌細胞中 PRMT 的表現可能成為新的治療選擇。本實驗室曾對多種細胞進行 PRMT1 抑制調節的實驗，顯示下調蛋白質精氨酸甲基化，細胞中 SERPB1 蛋白表現由原本在細胞質為主，變成核仁內增加。另有研究針對 FUS protein 的探討，製造出低甲基化環境時，細胞中的 FUS 出現若干於核集中的顆粒，和低甲基化的 SERBP1 相似也是位於核仁的可能性極高，但該文獻作者未指出此點討論。有關 FUS 的蛋白質精氨酸甲基化的研究主要在神經細胞，但 FUS protein 和腫瘤出現也有相關，而核仁負責核糖體組裝，對細胞生長非常重要。因此我想知道除了神經細胞，在其它細胞中 FUS 的蛋白質精氨酸甲基化對 FUS 在細胞中分布的影響，以及 FUS 向核仁分布是否對腫瘤細胞的生長有影響。我將於特定情形下(如:低甲基化環境並且在不同核仁壓力下)，測定不同細胞的生長速率、型態和存活情形。透過不同的實驗方法針對多種細胞的蛋白質精氨酸甲基化進行調控，製造出低甲基化的環境，並且於不同核仁壓力下處理不同的細胞，再藉由實驗室之前建立的核仁分析系統，透過免疫螢光染色法觀察核仁結構及相關 marker 如 fibrillarin 及 NPM1，還有 SERBP1 的移動分布，對照分析 FUS 的移動表現。透過實驗觀察蛋白質精氨酸甲基化程度與核仁壓力對 FUS protein 在不同細胞的細胞核中的位置表現，以及核仁分布比例，分析 FUS 的核仁移動和腫瘤細胞的生長的相關性。

關鍵詞:蛋白質精氨酸甲基轉移酶、FUS、細胞存活率、核仁分布

目錄 (Index)

主題	頁數
摘要	1
一、緒論	
1.1 研究起源	4
1.2 研究動機及研究問題	4
二、文獻討論	
2.1 蛋白質轉譯後修飾	5
2.2 PRMT1	5
2.3 PRMT1 與細胞生長的關係	5
2.4 核仁壓力藥物抑制癌細胞生長	5
2.5 細胞甲基化程度影響 SERBP1 位置	6
2.6 FUS protein	7
2.7 低甲基化環境及核仁壓力下 FUS protein 的位置變化	7
三、研究方法及步驟	
3.1 細胞培養	9
3.2 Lentivirus infection	9
3.3 細胞加藥處理	9
3.4 Western blot	10
3.5 MTT assay 細胞存活率分析	10

3.6 免疫螢光染色	10
四、結果與討論	10
五、參考文獻	18

一. 緒論

1.1 研究起源

蛋白質轉譯後修飾(Post-translation modification, PTM)對於調控細胞中蛋白質執行的功能相當重要。根據附加在蛋白質上的官能基不同而有多種類別，其中，甲基化(methylation)是近年來備受重視的作用之一。蛋白質精胺酸甲基轉移酶(PRMTs)會催化蛋白質精胺酸甲基化，進而影響細胞內重要的生理反應，例如:訊息傳遞、蛋白質細胞內位置、轉錄調節、蛋白質間交互作用以及 DNA 修復等等。蛋白質精胺酸甲基轉移酶(PRMTs)根據其活性不同可區分為九類，其中 PRMT1 是最主要的第一型精胺酸甲基轉移酶，也是本實驗室主要研究的對象。FUS 是一帶有 Arginine Glycine Rich domain 的蛋白質，會被蛋白質精胺酸甲基轉移酶甲基化，進而影響 FUS 在細胞中的位置(Dormann et al., 2012)。近年來與 FUS 相關的研究顯示，發生於 FUS 的突變與遺傳性肌萎縮性脊髓側索硬化症(fALS)有高度相關。此外，有研究分別於 sporadic ALS 和 familial ALS 病患的神經元及神經膠細胞中發現 paraspeckles 的聚集，也被認為可能是 FUS 發生突變所造成的。到目前為止，對於肌萎縮性脊髓側索硬化症如何發生?如何治療?仍是未解之謎。而 FUS 與細胞間相互的影響力，也是我在本研究中探討的問題。

1.2 研究動機與研究問題

FUS 是一種 RNA-binding protein，富含 Arginine、Glycine(GAR)的序列，會被蛋白質精胺酸甲基轉移酶甲基化。在肌萎縮性脊髓側索硬化症(ALS)研究中顯示 FUS 的蛋白質精胺酸甲基化會影響 FUS 在細胞中的位置(Dormann et al., 2012)，低甲基化時可能集中於核仁(Qamar et al., 2018)，而核仁蛋白質體研究顯示 Actinomycin D 處理細胞後，FUS 是會增加移至核仁的蛋白質之一。我們實驗室主要是進行蛋白質精胺酸甲基化的研究，對細胞的 PRMT 進行調控，觀察對細胞以及對其一些 RNA-binding protein 受質的影響。先前實驗室抑制細胞甲基化，或將 PRMT1 表現 knockdown，觀察到一含 RG 及 GAR 序列的 SERBP1 蛋白質在低甲基化時於核仁明顯集中。核仁是 rRNA 合成及核糖體組裝之處，和細胞生長息息相關。核仁當中的 Fibrillarin 蛋白質的 N 端胺基酸含有 GAR 的序列，是典型會被 PRMT1 甲基化的蛋白質。近期，本實驗室以會造成核仁壓力的一種 RNA polymerase I inhibitor (Actinomycin D)處理細胞，發現 Fibrillarin 在加藥前後也顯現差異，核仁結構發生變化。因此我想利用 RNA polymerase I inhibitor (Actinomycin D、CX-5461)進行加藥處理，或是合併透過 PRMT1 專一性抑制劑 K313，及 lentivirus 感染以基因 knockdown 的方式，直接抑制細胞的 PRMT1，製造出低甲基化的環境，並且在不同核仁壓力下，以免疫螢光染色觀察 FUS 是否有往核仁的聚集現象，再以 SERBP1 和 Fibrillarin 這幾種蛋白質在不同細胞的細胞核中的位置表現加以對照。我將根據核仁蛋白質體研究使用子宮頸癌細胞 HeLa，以及 PRMT1 表現量及精胺酸甲基化程度不同的口腔鱗狀細胞癌細胞 SAS 和 HSC-3，以得知:

1. 於特定情形下(如:低甲基化環境並且在不同核仁壓力下)測定不同細胞的生長型態及細胞存活率。
2. 於低甲基化環境並且在不同核仁壓力下，觀察對核仁結構及相關 marker 的移動表現，對照分析 FUS 的移動表現。
3. 透過實驗觀察蛋白質精胺酸甲基化程度與核仁壓力對 FUS protein 在不同細胞的細胞核中的位置表現，以及核仁分布比例，分析 FUS 的細胞核移動和腫瘤細胞的生長的相關性。

二. 文獻討論

2.1 蛋白質轉譯後修飾(Post-translation modification, PTM)

蛋白質轉譯後修飾由於附加在蛋白質上的官能基不同而區分為許多種類別，如目前被廣泛應用於研究的蛋白質乙醯化(acetylation)和磷酸化(phosphorylation)。近年來，其他重要的蛋白質修飾作用也開始受到重視，例如:泛素化(ubiquitination)和甲基化(methylation)等。其中蛋白質甲基化可發生在胺基酸中的離胺酸(lysine)、精胺酸(arginine)、組胺酸(histidine)、脯胺酸(proline)以及羧基等(Lee et al., 2005)。蛋白質精胺酸甲基轉移酶(PRMTs)會催化蛋白質精胺酸甲基化。它是一種重要的轉譯後修飾，調控細胞內多種生理反應，如訊息傳遞、細胞信號調控、轉錄調節、DNA 修復和 RNA 合成與運輸。

2.2 PRMT1

人體中蛋白質精胺酸甲基轉移酶(PRMTs)根據其活性不同可區分為九類。第 I 型功能是催化非對稱雙甲基精胺酸(ADMA)的形成，為 PRMT1、2、3、4、6；第 II 型功能是催化對稱雙甲基(SDMA)的形成，為 PRMT5、9；第 III 型功能是催化單甲基精胺酸(MMA)的形成，為 PRMT7。研究指出多種疾病都和 PRMT 的失調和過度表達有關聯，因此利用 PRMT 抑制劑可以有效降低癌細胞中 PRMT 的表現，並且導致癌細胞的細胞週期停滯、減少癌細胞增殖(Raposo and Piller, 2018)。已有研究在許多物種中鑑定出精胺酸甲基轉移酶，其中 PRMT1 的蛋白質序列具有較高度的演化保留性(Wang and Li, 2012)。

2.3 PRMT1 與細胞生長的關係

本實驗室曾以口腔角質化細胞(SG)、口腔鱗狀細胞癌細胞(SAS, HSC-3)來探討蛋白質精胺酸甲基化和頭頸癌的關聯，PRMT1 是最主要的第一型精胺酸甲基轉移酶，實驗發現 PRMT1 和 ADMA 表現量較高的 SAS 生長速率較快，而 PRMT1 和 ADMA 表現量較低的 HSC-3 生長速率則較慢，所以不同的口腔癌細胞 PRMT1 和 ADMA 的表現量與癌細胞的生長均有相關(Chuang et al., 2017)。此外，除過去常用的廣效性甲基轉移酶抑制劑 AdOx，也使用一種 PRMT1 的專一性抑制劑 K313，與其它的甲基轉移酶相(PRMTs)比，K313 於 selectivity panel screen 中顯現出對 PRMT1 的特異性抑制作用，本實驗室近年對人類神經母細胞瘤細胞(SK-N-SH)也做了 PRMT1 抑制調節的實驗，研究發現 PRMT1-KD 的 SK-N-SH 細胞其 p53、p21 及 PAI-1 的表現量均會提升，而 p53、p21 及 PAI-1 是調節 cell-cycle 的相關基因，位於 p53 下游的 p21、PAI-1 與細胞衰老有關，為了確認 KD 細胞中 p21 和 PAI-1 的表現量提升是否與 PRMT1 抑制有關，於是此實驗便使用 PRMT1 的專一性抑制劑 K313 進行細胞處理(Lee et al., 2019)。

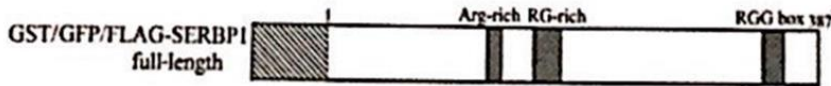
2.4 核仁壓力藥物抑制癌細胞生長

近年來抑制核糖體生合成已成為治療轉移性腫瘤的有效策略。核仁是進行核糖體生合成的無膜胞器，為 rRNA 修飾以及核糖體組裝之處，由內而外可分為三大結構，分別是 fibrillar center (FC)、dense fibrillar component (DFC)、granular component (GC)。首先 RNA polymerase I 會在 FC 區域進行轉錄，由 RNA polymerase I 轉錄生成的 pre-rRNA 會在第二結構 DFC 進行加工生成 rRNA，GC 則是負責組裝 ribosome subunit 的區域。而 RNA polymerase I inhibitor (如:Actinomycin D 或 CX-5461)會產生核仁壓力(Nucleolar stress)，導致核仁改變瓦解，在多種癌症中都有明顯效用，CX-5461 目前也正在臨床試驗中進行測試(El Hassouni et al., 2019)。我及本實驗室其他成員也曾多次使用 CX-5461 處理細

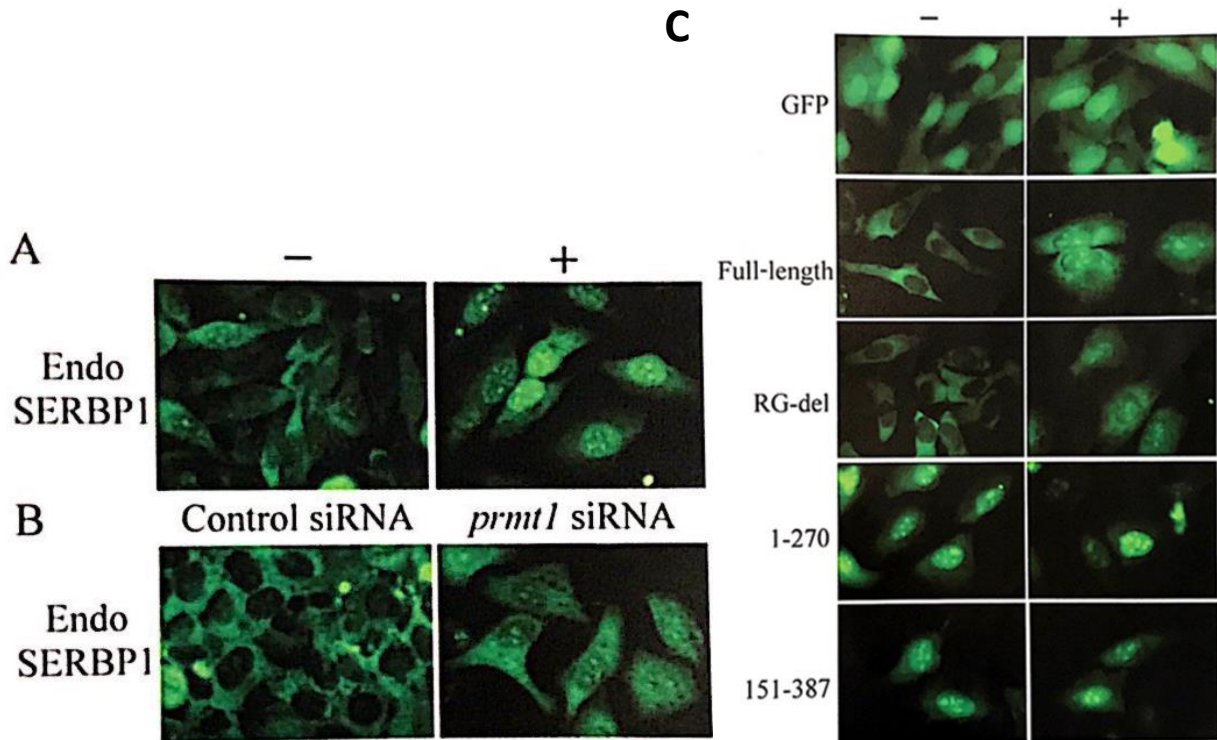
胞，我們測試不同濃度對細胞生長的影响，藉此檢測出不同細胞對藥物濃度敏感的區間。Actinomycin D 能夠有效的抗菌和抗腫瘤活性，因此自從 1954 年便已被廣泛用於臨床，作為治療多種腫瘤的抗癌藥物(Koba and Konopa, 2005)。

2.5 細胞甲基化程度影響 SERBP1 位置

先前實驗室的李侑蓁學姊利用子宮頸癌細胞(HeLa)探討透過蛋白質精胺酸甲基化，細胞中的 SERBP1 蛋白在核仁或核質的堆積現象。SERBP1 是一種會被精胺酸甲基化的 RNA-binding protein，帶有 GAR rich domain(附圖一)，它的修飾作用會影響蛋白質的交互作用和細胞內定位。研究顯示，以亞砷酸鹽(arsenite)處理後，SERBP1 的位置由散佈在細胞質變為集中在核仁。當以甲基化抑制劑 adenosine periodate 處理細胞時，觀察到相似的分佈。不論是以 arsenite 處理，或是以低甲基化處理，都會將 SERBP1 保留在核仁中。結果表明，精胺酸甲基化與 SERBP1 聚集到核仁有關(Lee et al., 2014)。同樣的，李侑蓁學姊以甲基轉移酶抑制劑 AdOx 處理 HeLa 細胞，以及利用 PRMT1 siRNA 抑制細胞內甲基轉移酶表現量，造成 SERBP1 蛋白的不對稱精胺酸甲基化程度降低，實驗發現，當細胞呈現低甲基化時，SERBP1 蛋白表現由原本在細胞質表現為主，變成細胞核內增加或蛋白平均分佈於細胞內，且細胞核中出現明顯顆粒狀結構，應該也是核仁(附圖二)。



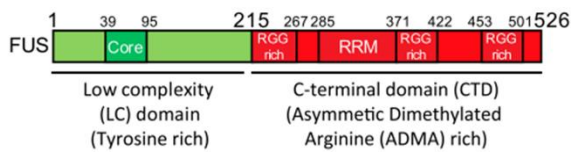
附圖一. SERBP1 protein 全長的序列區域分布圖



附圖二.由 PRMT1 所催化之甲基化修飾會影響內生性 SERBP1 蛋白表現位置。以 anti-SERBP1 抗體進行免疫螢光染色，觀察內生性蛋白表現位置。(A)"+"或"- "指細胞處理或未處理 100 μM AdOx 24 小時；(B)細胞轉植入 PRMT1 siRNA 或 control siRNA 48 小時。(C)比較不同甲基化程度下，不同片段的 SERBP1 蛋白在細胞內的表現情形。"+"或"- "指細胞處理或未處理 100 μM AdOx 24 小時。

2.6 FUS protein

FUS 富含 Arginine、Glycine(GAR)的序列(附圖三)，會被蛋白質精胺酸甲基轉移酶甲基化。FUS 蛋白質精胺酸甲基化研究目前主要是和 ALS 相關，研究重點在神經細胞表現。FUS 是廣泛表現的蛋白質，它是一種 RNA-binding protein，功能包含 RNA 的轉錄調節、剪接、轉運以及 DNA 的損傷修復反應。FUS 會與新生成的 pre-mRNAs 結合，並作為 RNA polymerase II 和 U1 小分子核糖核蛋白之間的分子媒介，從而連結 RNA 的轉錄及剪接。FUS 也會結合自身的 pre-mRNAs，並自動調節它的表達；這類的自動調節機制是由 non-sense-mediated decay 介導的。而 FUS 藉由 DNA 雙股斷裂修復過程中的同源重組及 D-loop 形成，參與了 DNA 修復機制。FUS 在神經細胞中扮演著重要的角色，它參與樹突棘的形成及穩定、RNA 的轉運，還有維持 mRNA 及突觸的穩定態。由全名 Fused In Sarcoma (FUS)、Translocated In Liposarcoma (TLS)或 Oncogene FUS 的名稱都可以知道 FUS protein 和腫瘤出現相關。

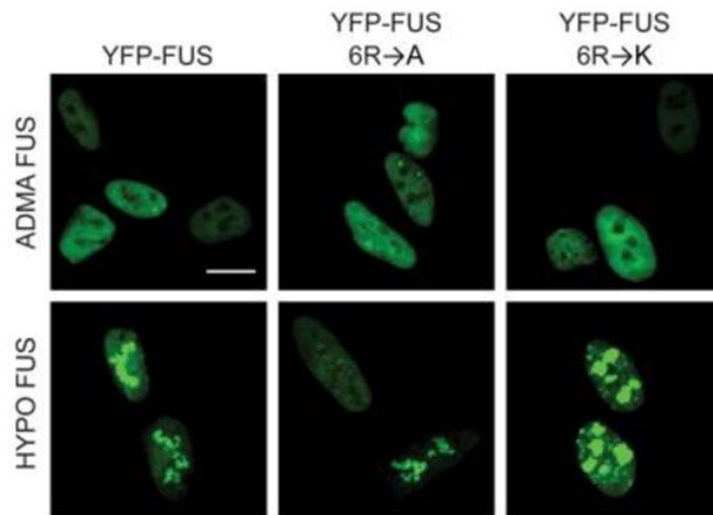


附圖三. FUS protein 的序列區域分布圖

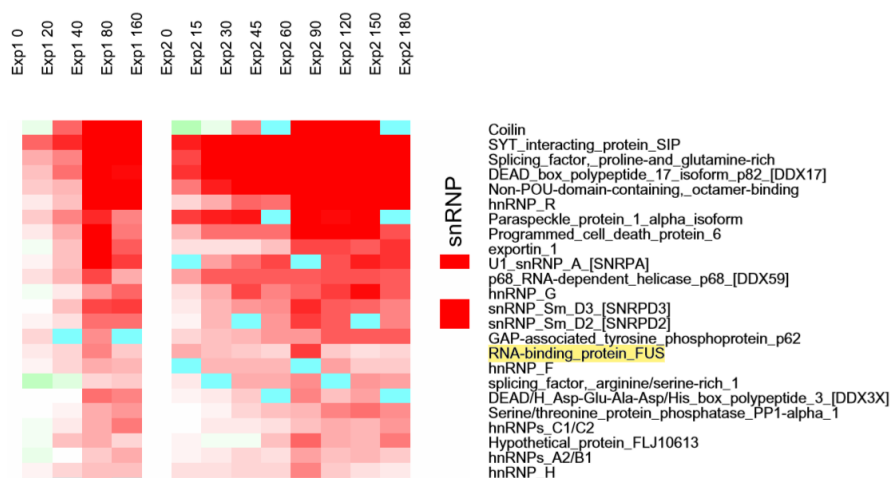
Left: Schematic of domain architecture and location of tyrosine-rich and arginine-rich domains. Right: Arginine methylation species. RRM, RNA recognition motif; RRG, arginine glycine-rich domain.

2.7 低甲基化環境及核仁壓力下 FUS protein 的位置變化

FUS protein 是一種廣泛分布於人體各個器官細胞中的蛋白質，其中大腦是分布相對較多的區域，目前有許多研究顯示肌萎縮性脊髓側索硬化症(ALS)與 FUS 突變有很大的關連性，某些突變之 FUS 位於 C 端的核定位信號 nuclear localization signal (NLS)受到影響，導致 FUS 從細胞核中移出，散布到細胞質中。由於 FUS 的 C 端具有 arginine glycine-rich domain，容易甲基化，有實驗研究顯示以 AdOx 處理 HeLa 細胞，原本因 NLS 區域突變散佈於細胞質中的 FUS，在經過 AdOx 處理後，可集中於細胞核，所以精胺酸甲基化會影響 FUS 在細胞中的位置(Dormann et al., 2012)。另有實驗研究精胺酸甲基化是否會影響 FUS 在細胞中的位置，將 YFP 標示的 FUS 由短暫轉染方式送入人類神經母細胞瘤細胞 (SH-SY5Y)，可形成含非對稱雙甲基精氨酸的 FUS(ADMA-FUS)，另以 AdOx 處理 SH-SY5Y 形成低甲基化的 FUS(Hypo-FUS)。結果顯示控制組以 DMSO 處理的細胞中 FUS 仍可被甲基化而形成 ADMA-FUS，並散佈於核質中；而 AdOx 製造的低甲基化環境，可看出使細胞中的 Hypo-FUS 出現若干於核集中的顆粒(附圖四)(Qamar et al., 2018)。另有相關文獻表示，這類於核集中的顆粒應該是 paraspeckles (PSs)。PSs 是一種會在細胞核形成的 RNA granules，FUS 則是組成 PSs 的主要成分之一。根據核仁蛋白質體研究顯示 Actinomycin D 處理細胞後，FUS 是會增加移至核仁的蛋白質之一，而核仁的 Fibrillarin 變化不大，核糖體蛋白及一些核仁外圍 GC 區域的 NPM1 則明顯移出(附圖五)(Andersen et al., 2005)。



附圖四. Representative confocal images of SH-SY5Y cells expressing YFP-FUS with 6 arginine residues mutated to alanine (6Rthylation species. RRM, RNA recognition motif; AdOx treatment HYPO FUS)



附圖五. Nucleolar proteome dynamics after actinomycin D treatment.(黃底提示標記為 FUS protein)

藉由以上結論，我因此對 FUS 在細胞核分布的調節感到興趣，因為透過上述實驗結果，僅能大致推測出低甲基化處理下的細胞，其 FUS protein 是會於細胞核中聚集的，但是否集中於核仁，抑或這樣的顆粒其實是 paraspeckles，仍需實驗確認，我也想知道若真是集中於核仁，FUS 主要是位於核仁三大結構的哪一區域，藉此近一步了解 FUS 的調節。由於文獻中研究的細胞大部分都是神經細胞，於是我想知道，除了神經細胞，FUS 在其它細胞中，於特定情形下(如:低甲基化環境)和它在核仁中的移動表現或腫瘤細胞的生長是否有關聯。因此我想透過不同的實驗方法製造出低甲基化的環境，並且以不同核仁壓力處理不同的細胞，如 PRMT1 表現量及精胺酸甲基化程度不同的口腔癌細胞株 SAS 及 HSC-3，以及多次出現在上述幾則研究的子宮頸癌細胞株 HeLa，再藉由實驗室之前建立的核仁分析系統，然後透過免疫螢光染色法觀察 FUS、SERBP1、Fibrillarlin 這幾種蛋白質在不同細胞的細胞核中的位置表現，並想透過實驗了解蛋白質精胺酸甲基化程度與核仁壓力對 FUS protein 核仁分布的相關性。

三. 研究方法及步驟

首先，培養 HeLa、SAS、HSC-3 等細胞，雖然 SAS、HSC-3 同為口腔癌細胞株，但有研究發現 PRMT1 和 ADMA 表現量較高的 SAS 生長速率較快，而 PRMT1 和 ADMA 表現量較低的 HSC-3 生長速率則較慢，所以不同的口腔癌細胞 PRMT1 和 ADMA 的表現量與癌細胞的生長均有相關，因此想將兩種細胞一同處理比較。等待細胞生長貼盤，分別繼代三次過後，開始進行細胞處理。主要會透過兩種實驗方法影響細胞的生長。第一種是細胞中 PRMT1 抑制的處理，主要是利用 lentivirus 感染，knockdown 細胞中的 PRMT1，也會使用 PRMT1 的專一性抑制劑 K313 影響細胞中的 PRMT1。第二種是利用 RNA polymerase I inhibitor (如: Actinomycin D 或 CX-5461) 直接對細胞進行加藥處理，影響細胞生長。對細胞進行處理後，於 24h 後使用顯微鏡觀察細胞生長型態的變化，也會利用 MTT assay 製作出細胞生長曲線，以利我們了解細胞在什麼樣的條件下會受到最大的影響。此外也會收取 cell pellet，藉由 western blot 或 RT-PCR 等實驗方法，利用 ADMA 或 ASYM24 等抗體檢測各個細胞中甲基化的表現，藉此觀察基因 knockdown 後的細胞，其 PRMT1 是否有 knockdown 成功。為了瞭解細胞在加藥處理或是 PRMT1 knockdown 前後，細胞核中 FUS、SERBP1、Fibrillarin、NPM1 等蛋白表現位置的變化，透過免疫螢光染色觀察這些蛋白於細胞核中呈現的位置。

3.1 細胞培養

將 SAS、HSC-3、HeLa 分別種植於六孔盤中，各孔的細胞數均為 2×10^5 個/ml。而後送入 Incubator，等待細胞生長貼盤。

中文名稱	細胞	Medium
口腔癌細胞	SAS	DMEM+10%FBS+1%LG+1%PS
	HSC-3	DMEM F-12+10%FBS+1%PS
子宮頸癌細胞	HeLa	MEM+10%CS+1%LG+1%PS

3.2 Lentivirus infection

Lentivirus 屬於反轉錄病毒，可感染分裂中或非分裂的細胞。它可以將外源基因有效鑲嵌到宿主的染色體上，進而達到持久表現、隨世代複製下去的特性。我藉由 lentivirus 感染以 knockdown SAS、HSC-3、HeLa 的 PRMT1，並且 knockdown PRMT1 上不同段的序列，以得到 PRMT1-KD-A1 及 PRMT1-KD-B1 兩種 PRMT1-KD cell。

Clone Position In 96-well	plasmid Name	Cloning vector	Target sequences	Symbol
A1	TRCN0000290478	pLKO_TRC005	<u>CCGGCAGTACAAAGACTACAA</u>	PRMT1
B1	TRCN0000290479	pLKO_TRC005	<u>GTGTTCCAGTATCTCTGATTA</u>	PRMT1

3.3 細胞加藥處理

於所有細胞 samples 中，分別投以 CX-5461、K313、Actinomycin D 並於 24h 後，以 MTT assay 觀察細胞存活率，同時以顯微鏡觀察細胞型態的變化。

藥品	濃度
----	----

CX-5461	0 nM、1 nM、10 nM、100 nM、1000 nM、2000 nM / 0 nM、10 nM、100 nM、500 nM、1000 nM、2000 nM
Actinomycin D (Act D)	0 nM、50 nM、100 nM、500 nM、1000 nM、1500 nM

3.4 Western Blot (WB)

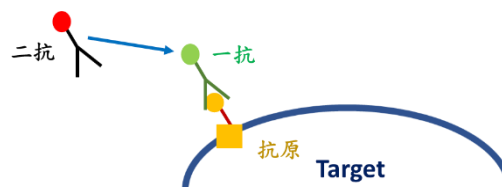
為了瞭解 SAS、HSC-3、HeLa 的 PRMT1 基因 knockdown 後細胞甲基化的表現，因此用 western blot 去比較 KD cell 與 non-KD cell，主要會以非對稱雙甲基精氨酸(ADMA、ASYM24)、PRMT1(abcam)等抗體檢測甲基化的表現，同時也會以帶有 GAR 序列的 FUS 與 FBL 做雙重確認，藉此確認 PRMT1 是否有 knockdown 成功。

3.5 MTT assay 細胞存活率分析

將 Dish 中的 Medium 吸出，將稀釋的 MTT (Medium:MTT=10:1)加入 Dish 中，而後放入 Incubator 反應 4 小時。MTT 會接受氫離子，作用在活細胞粒線體中的琥珀酸去氫酶 (SDH)，在琥珀酸脫氫酶 (SDH)和細胞色素 C 的作用下四氮唑環會打開，生成紫色的 Formazan 結晶，4 小時過後將 MTT 吸出，以 DMSO 將 Formazan 回溶出來後，利用 570nm 吸光值去測定，評估有多少細胞存活。最後利用 Excel 畫出細胞生長的相對比率圖。

3.6 免疫螢光染色(Immunofluorescence (IF))

在抗體上結合螢光或可呈色的化學物質，利用免疫學原理中抗原和抗體間專一性的結合反應，檢測細胞或組織中是否有目標抗原的存在。先用已知未標記的特異抗體（一抗）與抗原標本進行反應，再用 PBS 洗去未反應的抗體，再用標記的螢光抗體（二抗）與抗原標本反應，使之形成抗原—抗體—抗體複合物，再用 PBS 洗去未反應的標記抗體之後就可以進行觀察。我們利用此方法觀察經處理的細胞中，其 RNA-binding protein 的位置變化。



四. 結果與討論

根據文獻，細胞經 Act D 處理後，FUS 是會移至核仁的蛋白質之一，核仁中的 FBL 位置變化不大，位於核仁 GC 區域的 NPM1 則會明顯移出，於是我建構文獻當中設計的 condition，以 Act D 800 nM 處理 HeLa 細胞 2h，再利用免疫螢光染色法觀察。實驗發現，核仁結構有明顯被破壞的情形，原先聚集於核仁外圍結構的 NPM1 蛋白，加藥處理後，確實發散至核質中。而 FBL，經加藥處理後仍是位於核仁內，但由圖可知，FBL 的顆粒明顯變小且聚集於核仁外圍結構，呈現如彎月的形狀。然而，位於核質的 FUS，經加藥處理後核仁結構被破壞，原先較大的核仁孔洞變得細碎零散，雖然沒有出現往核仁集中分布的現象，但是在核質中能觀察到些許 FUS 顆粒的訊號(Fig1-白色箭頭)。

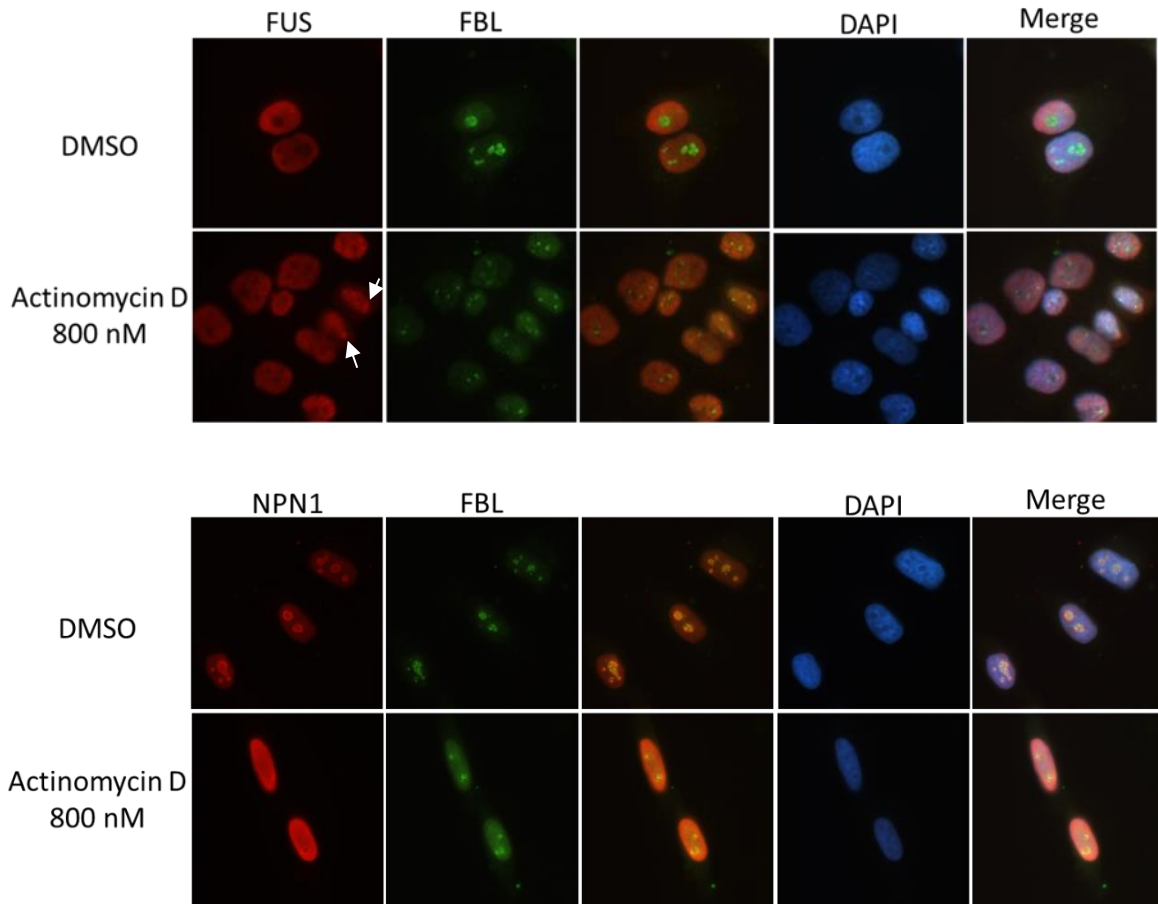


Fig1. HeLa 經 Act D 800 nM 處理 2h，隨後以免疫螢光染色法觀察，核仁壓力下核仁結構變化

接著我想知道，如果細胞處於低甲基化的環境，目標蛋白在核仁的位置會出現哪些變化？於是我利用 lentivirus 建構出 PRMT1-KD-A1 和 PRMT1-KD-B1 兩種 PRMT1-KD 的 HeLa cell。我利用 WB 檢測 PRMT1-KD 的效果(Fig2)，並且在 MTT assay 的結果也能看到 PRMT1-KD cell 的細胞存活率下調(Fig3)。再透過免疫螢光染色，無論是 PRMT1-KD cell 或 PRMT1-non-KD cell，HeLa cell 中目標蛋白 FUS 或 FBL 的分布並沒有明顯差異，但是在 PRMT1-KD-B1 cell 中有出現如 paraspeckles 的訊號(Fig4-白色箭頭)。

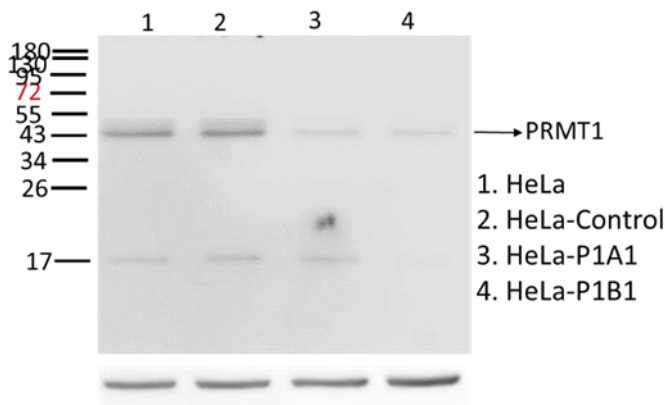


Fig2. 透過 western blot 檢測 HeLa 之 PRMT1-KD cell 或 PRMT1-non-KD cell 的 PRMT1 表現量

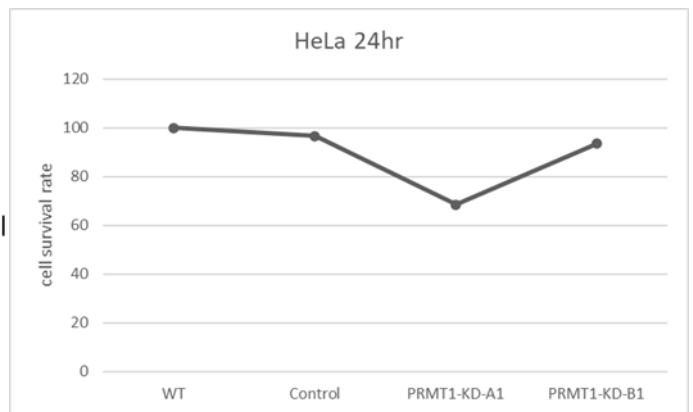


Fig3. HeLa 經 PRMT1-KD 處理後的細胞存活率

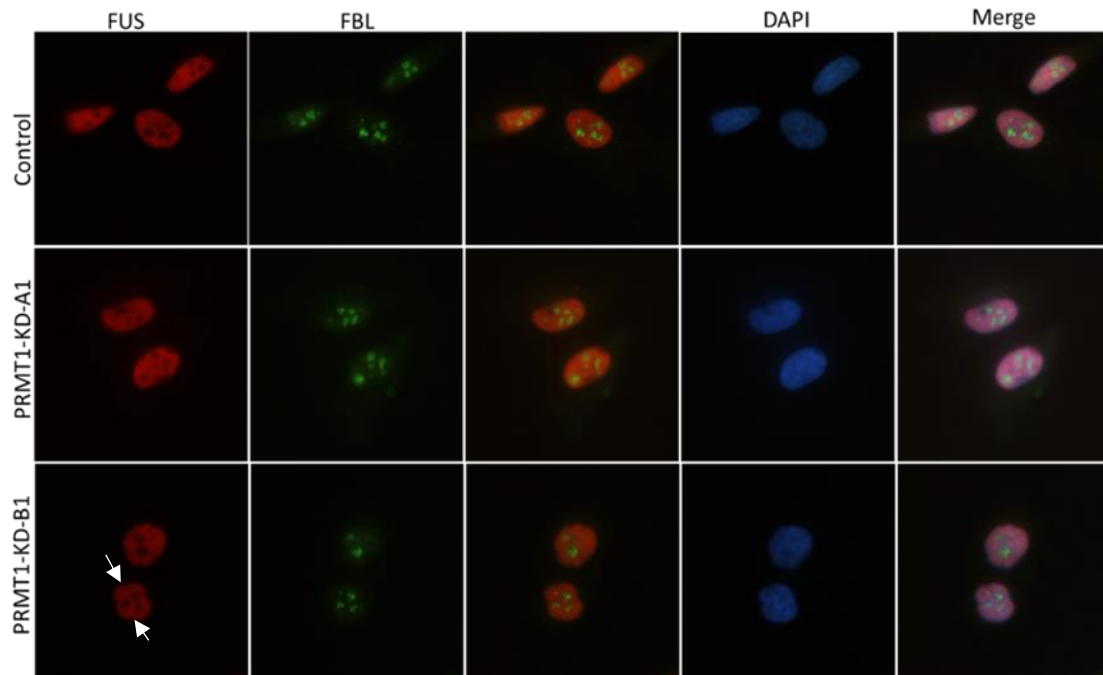


Fig4.透過免疫螢光染色法觀察 HeLa 之 PRMT1-KD cell 或 PRMT1-non-KD cell 的 FUS 分布情形

先前實驗室的李侑蓁學姊利用 HeLa 探討透過低蛋白質精胺酸甲基化，細胞中的 SERPB1 蛋白在核仁或核質的堆積現象。於是我再次建構這個實驗，以 AdOx 對 HeLa 細胞進行加藥處理，除了觀察 SERPB1 在核仁或核質的堆積現象之外，也想觀察目標蛋白 FUS 和 FBL 於核仁中的位置變化。起初，我先選用李侑蓁學姊當時設計實驗時所用的濃度 AdOx 100 μ M，經 24h 處理後，進行免疫螢光染色，我以同樣是檢測非對稱雙甲基精氨酸的抗體-ASYM24 看細胞在加藥前後甲基化有無受到影響，未加藥處理的細胞，其含甲基精氨酸的蛋白質會出現於細胞核，結果如(Fig5a)，而加藥處理後的細胞，ASYM24 可能會散布到細胞質。然而，此時的細胞可能因 AdOx 濃度過高，導致細胞結構不完整，細胞核明顯縮小且幾乎都已凋亡，無法觀察到散布趨勢。右圖則是以 NPM1 觀察核仁結構變化 (Fig5b)，結果表明在 AdOx 100 μ M 的濃度下，細胞核結構幾乎已被破壞，不適合用於探討目標蛋白於細胞核中的位置變化。

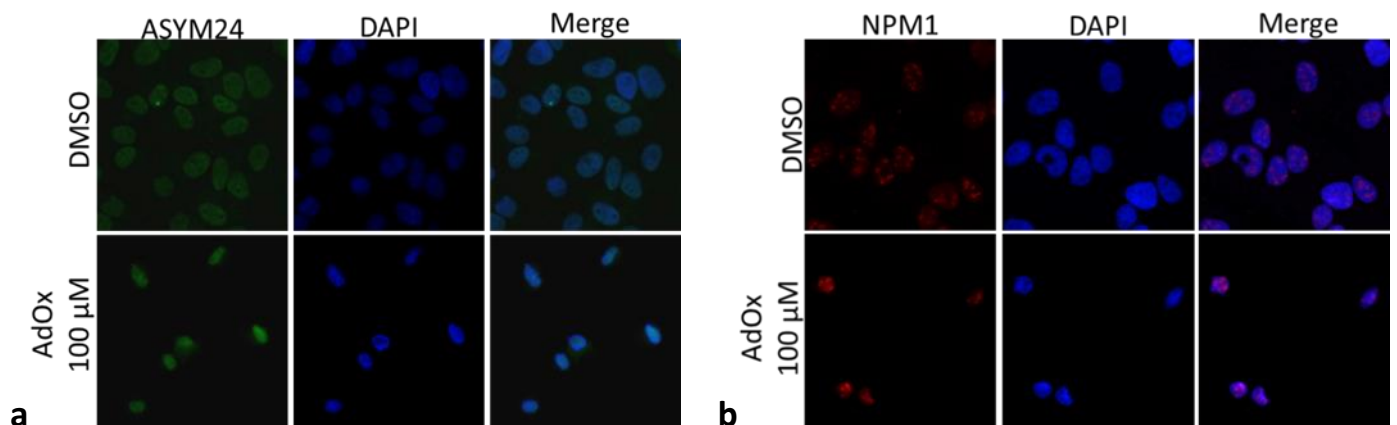


Fig5. (a)透過 IF 觀察加藥處理前後對細胞之甲基化影響 (b)透過 IF 觀察加藥處理前後對細胞之核仁結構影響

由於前面實驗的藥物濃度過高，影響實驗結果，於是我以 MTT assay 檢測，在五種濃度處理下，HeLa 細胞的細胞存活率(Fig6)，找到適合的濃度區間。由圖可知，AdOx 的 LD50 大約是 80-100 μ M，

因實驗目的主要是想看核仁壓力下目標蛋白的位置變化，於是我選擇以 AdOx 50 μ M 進行加藥處理 24h，隨後再以 IF 觀察。實驗發現，加藥處理後，SERBP1 確實有在核質堆積的現象出現(Fig7a)，而 FUS 仍是位於核質(Fig7b)。

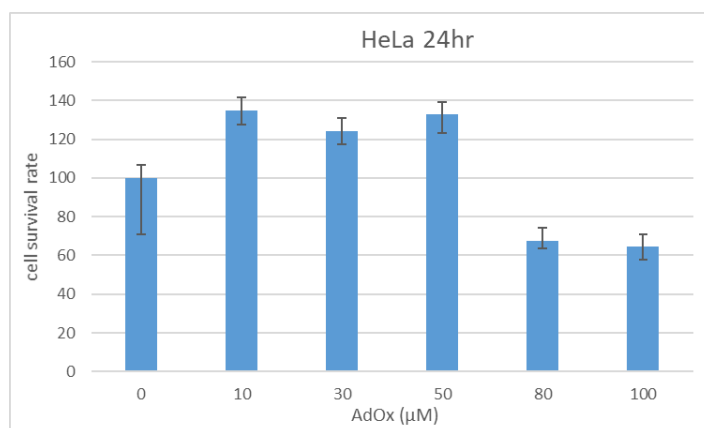


Fig6. HeLa 以 AdOx 0、10、30、50、80、100 μ M 處理 24h 的細胞存活率

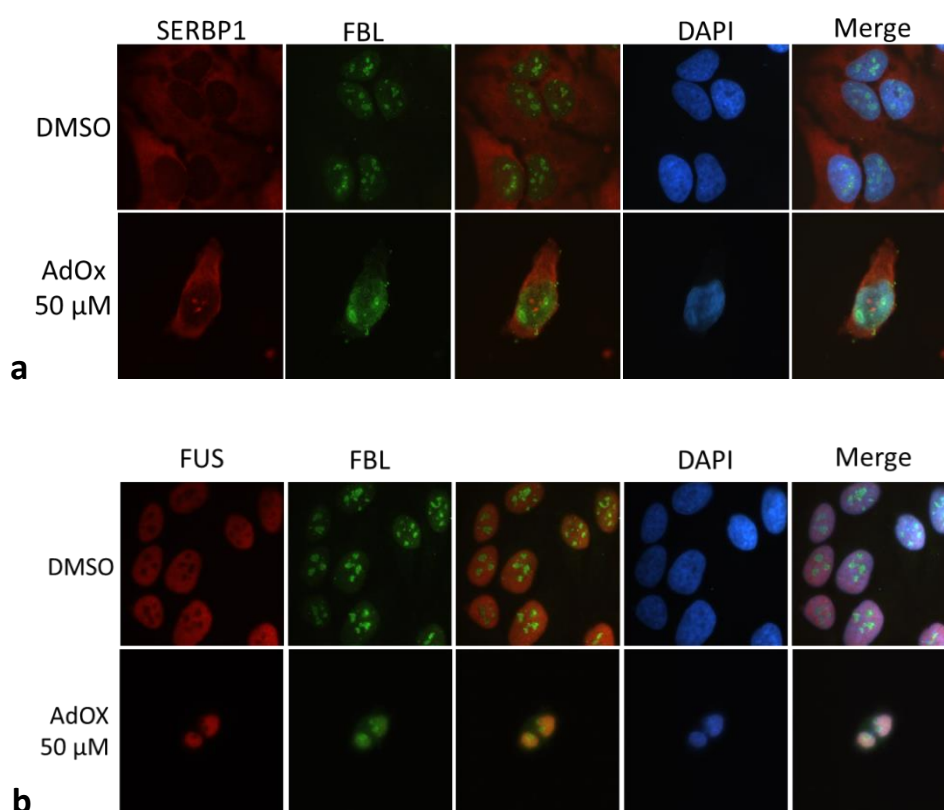


Fig7. 透過 IF 觀察 (a) SERBP1 的位置變化 (b) FUS 的位置變化

由於在 HeLa 細胞的實驗中，遲遲沒有看到，細胞在低甲基化環境下或是經核仁壓力藥物處理後，FUS protein 有如文獻所說，發生往核仁集中的現象，甚至連聚集的情形也沒有出現過，於是我決定選用其他細胞，繼續進行「蛋白質精胺酸甲基化程度與核仁壓力對 FUS 蛋白質核仁分布」的探討。因為本實驗室曾以口腔鱗狀細胞癌細胞(SAS, HSC-3)來探討蛋白質精胺酸甲基化和頭頸癌的關聯，實驗發現，SAS 的 PRMT1 和 ADMA 表現量都比 HSC-3 來得高，且 SAS 的生長速率也較快，這顯示不同口腔癌細胞的 PRMT1 和 ADMA 表現量與癌細胞的生長都有相關，由於 FUS protein 的序列帶有 GAR domain 是會被 PRMT1 甲基化的區域，於是我想看看 SAS 及 HSC-3 這兩種 PRMT1 及 ADMA 表現量有

差異的口腔癌細胞，對於 FUS 在細胞核中位置分布的影響是否會有所不同。

首先我想知道，核仁壓力藥物-CX5461 以及 PRMT1 專一性抑制劑-K313，對 SAS、HSC-3 細胞的生長是否會有不同的影響，於是我分別以 5 種不同濃度處理 24h，MTT assay 的結果說明，CX-5461、K313 都會影響兩者的細胞存活率，造成細胞凋亡，且 HSC-3 在 CX-5461 濃度為 10 nM 時細胞存活率就開始下降，而 SAS 則是要到 CX-5461 1000 nM 時，細胞存活率才下降，表示 HSC-3 對藥物較 SAS 敏感(Fig8a)；以 K313 處理的 HSC-3 細胞存活率下降的幅度較大。可能是因為 HSC-3 的 PRMT1、ADMA 表現量較低，所以對藥物的敏感度才還比 SAS 高(Fig8b)。MTT assay 結果顯示不同口腔癌細胞的 PRMT1 和 ADMA 表現量與癌細胞的生長有相關。

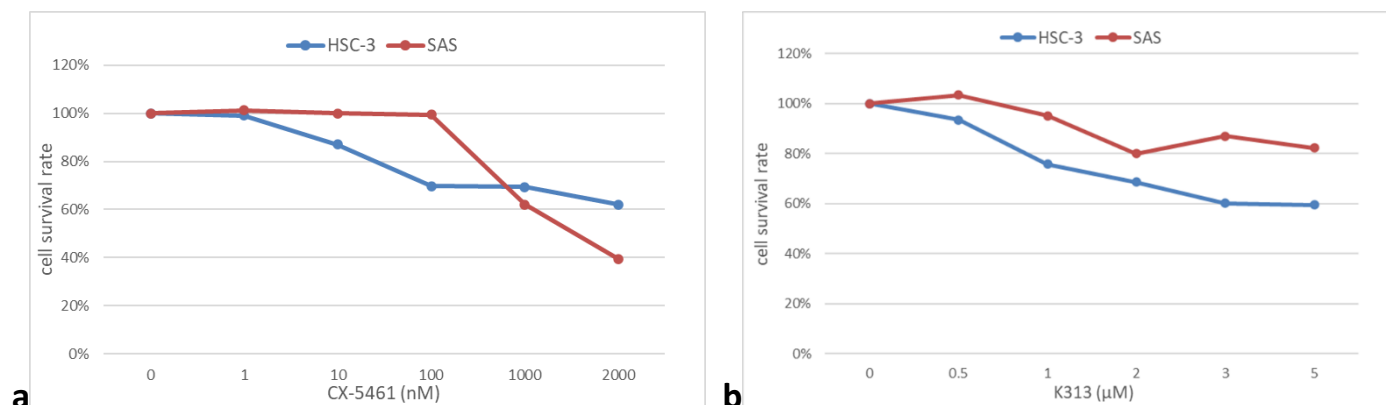


Fig8. HSC-3 及 SAS 經 CX-5461、K313 處理 24h 的細胞存活率

(a) CX-5461 0、1、10、100、1000、2000 nM (b) K313 0、0.5、1、2、3、5 μM

先前實驗室的張建評學長曾利用 K313 於細胞建構出低甲基化的環境，於是我同樣利用此方法建構出低甲基化狀態的 SAS cell，透過前面 MTT assay 的實驗，我選擇以 K313 2μM 處理，建構出低甲基化環境，再分別以 CX-5461 200 nM、1000 nM 處理 2 小時。由 IF 的結果，比較 WT 及 K313 treatment 兩組細胞。在 CX-5461 導致的核仁壓力下，造成核仁結構被破壞，使得 FBL、FUS 均勻的散佈於整個細胞核，FBL 並沒有像前面的實驗結果一樣，聚集於核仁外圍結構，呈現如彎月的形狀，FUS 雖然沒有出現往核仁移動的現象，但從圖中可以觀察到顆粒狀聚集的訊號(Fig9)。

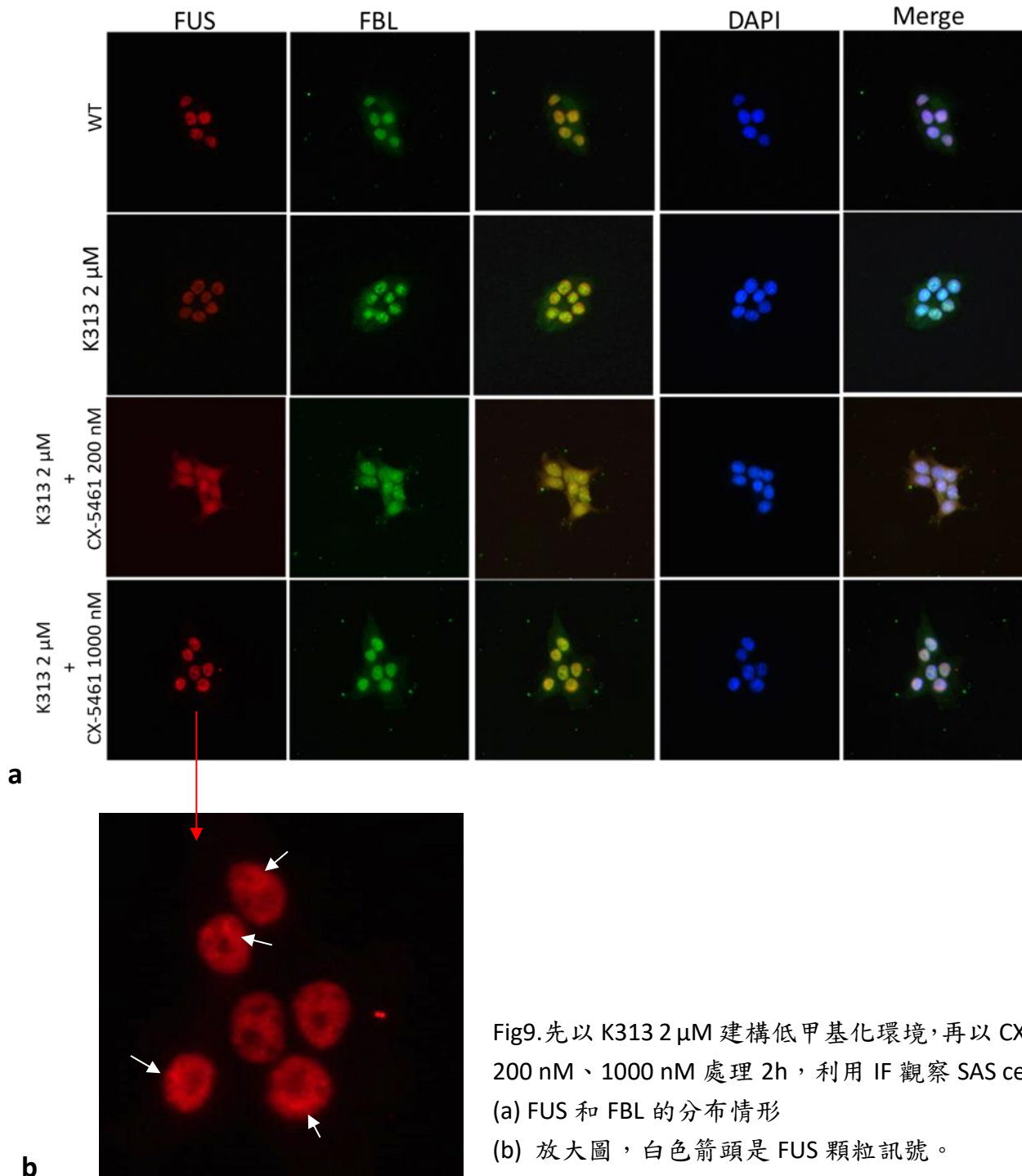


Fig9.先以 K313 2 μ M 建構低甲基化環境,再以 CX-5461 200 nM、1000 nM 處理 2h,利用 IF 觀察 SAS cell
 (a) FUS 和 FBL 的分布情形
 (b) 放大圖,白色箭頭是 FUS 顆粒訊號。

前述的實驗,以 K313 建構低甲基化的細胞環境,然而這樣的方法建構出的低甲基化時效並不長。因此,後續的實驗我改以 Lentivirus knockdown 細胞中的 PRMT1。以 lentivirus 處理完經過一個禮拜後,以 WB 檢測 PRMT1-KD 的效果,結果顯示 PRMT1-KD cell (Fig10a-3、6)其 PRMT1 的表現量明顯降低,由於 SAS 細胞的結果沒有如 HSC-3 cell 清楚明確,於是評估非對稱雙甲基精氨酸(ADMA)的表現量,因為 PRMT1 是催化 ADMA 生成的蛋白質精氨酸甲基轉移酶,所以利用 WB 檢測 ADMA 的表現量,結果顯示 PRMT1-KD cell (Fig10b-2、5),其 ADMA 表現量明顯被下調,如此得以證實這個 lentivirus 感染系統對於 PRMT1-KD 有明確效果。

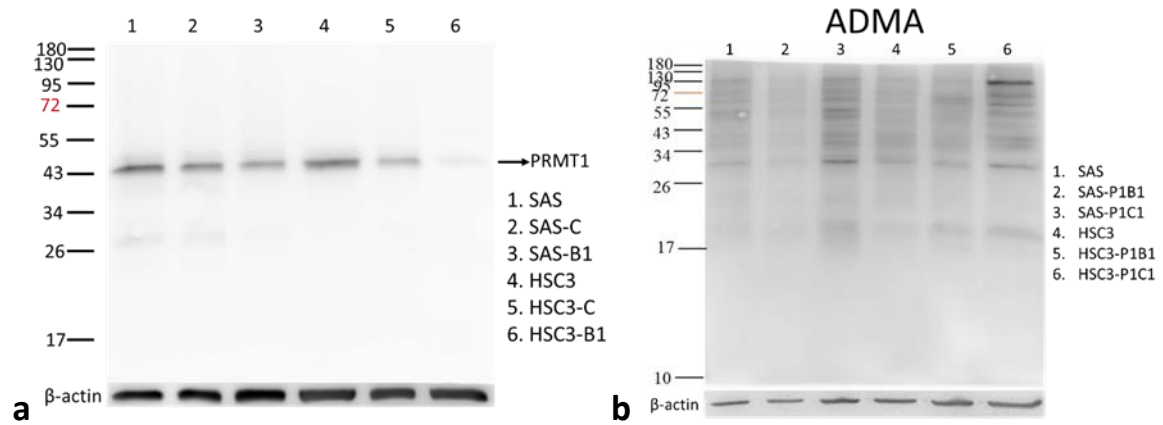


Fig10.透過 western blot 檢測 SAS、HSC-3 之 PRMT1-KD cell 或 PRMT1-non-KD cell 的 PRMT1 (a) / ADMA (b) 表現量

HSC-3、SAS cell 經 lentivirus 處理後，利用顯微鏡觀察 HSC-3、SAS 之 PRMT1-KD cell 與 PRMT1-non-KD cell 的細胞型態，由圖 Fig11 可知，有無 PRMT1 KD 對細胞型態並沒有影響(Fig13)。

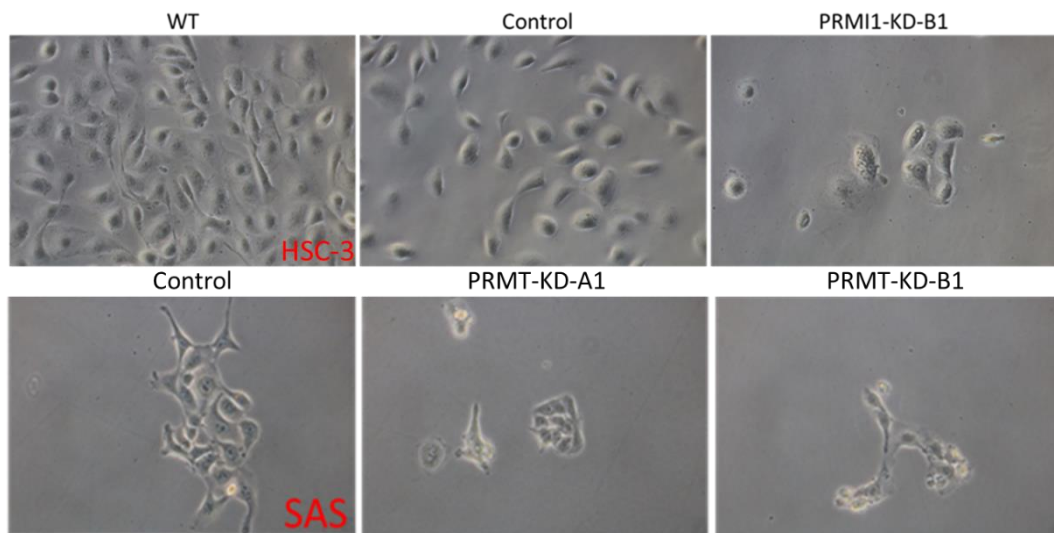


Fig11. HSC-3、SAS 之 PRMT1-KD cell 與 PRMT1-non-KD cell 的細胞型態觀察

經過前面的實驗，我發現受 lentivirus 感染的細胞，其 PRMT1-KD 的效果僅能維持大約一個月。於是，我再次利用 Lentivirus 感染另一批 SAS 及 HSC-3 cell，藉由 knockdown PRMT1 的不同序列，得到 PRMT1-KD-A1 和 PRMT1-KD-B1 兩種細胞，再以五種不同濃度的 CX-5461 處理，最後透過 MTT assay 比較出 PRMT1-KD cell 與 PRMT1-non-KD cell 的生長速率是否有差異。同樣的，在進行加藥處理實驗之前，我先以 WB 檢測 SAS、HSC-3 cell 中 PRMT1 的表現量，確認 PRMT1 有無被 knockdown(Fig12)。

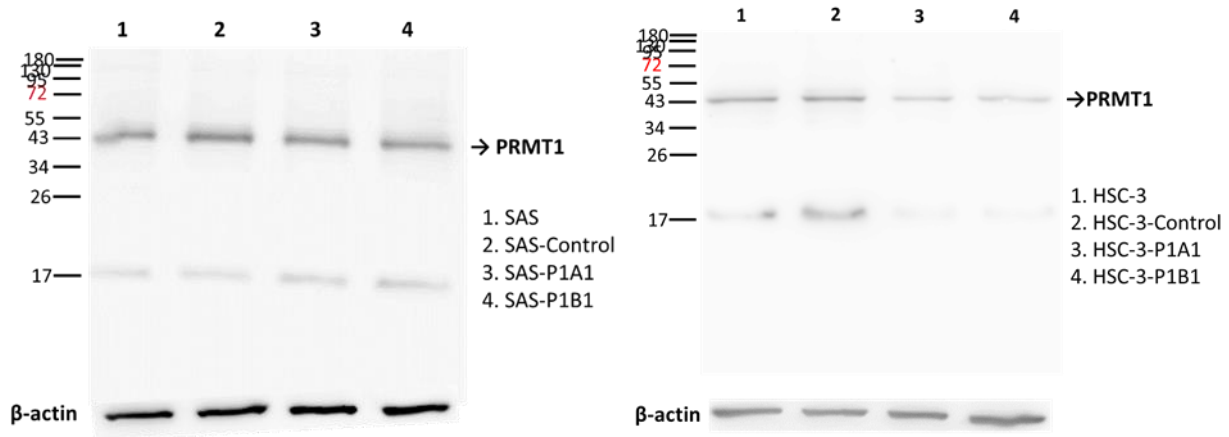


Fig12.透過 western blot 檢測 SAS、HSC-3 的 PRMT1-KD 效果

確認各細胞的 PRMT1 有確實被 KD 後，我接續進行核仁壓力的實驗，以兩種核仁壓力藥物 CX-5461、Act D 各取五種不同濃度，對細胞處理 24h。MTT assay 的結果表示，CX-5461 對於影響細胞存活率不見得有效，或許還會促進細胞生長。由 Fig13 可知，SAS、HSC-3 的 WT 與 PRMT1-KD-B1 cell 兩者的細胞存活率曲線幾近相同，而 Control、PRMT1-KD-A1 cell 的細胞存活率甚至出現上調的情形。這樣的結果似乎與 WB 的結果相呼應，無論是 SAS 或 HSC-3 的 Control cell，其 PRMT1 的表現量相較於 WT 都是比較高的。

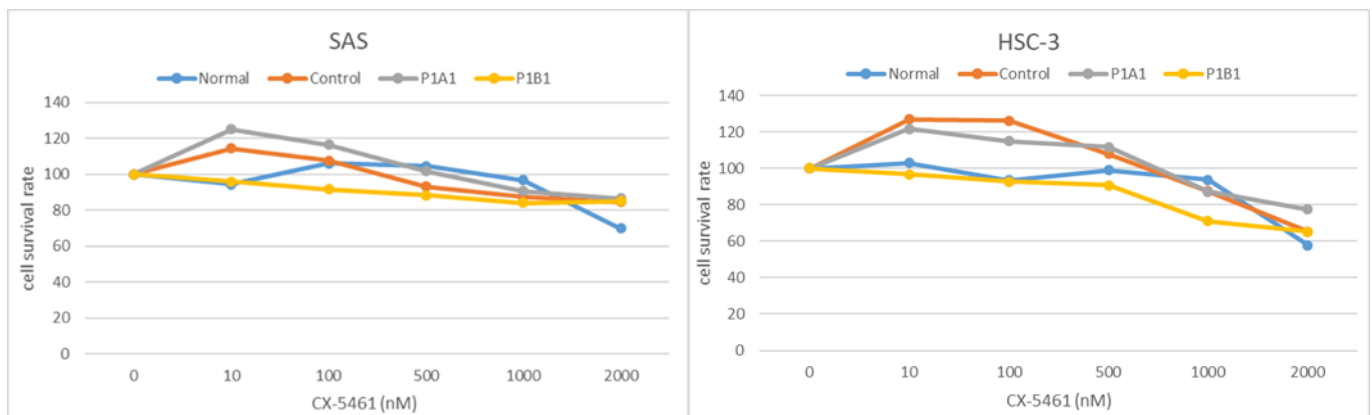


Fig13. CX-5461(0、10、100、500、1000、2000 nM)處理 SAS、HSC-3 之 PRMT1-KD cell 與 PRMT1-non-KD cell 24h 的細胞存活率

前面兩項實驗，WB 及 MTT assay 的結果皆顯示，HSC-3 cell 面對核仁壓力和低甲基化這兩種環境壓力的反應，都比 SAS cell 來得敏感，於是我選用 HSC-3 cell，進行後續免疫螢光染色的實驗，觀察目標蛋白的位置變化。在免疫螢光染色的觀察下，研究發現，HSC-3 的 PRMT1-KD cell 核質中產生 FUS 顆粒，而 WT cell 經 CX-5461 處理後也有看到 FUS 的顆粒狀訊號，初步推測這類的顆粒可能是 paraspeckles，這個現象在 HeLa cell 實驗中也有出現。此外，實驗也發現無論是 PRMT1-KD cell 或 PRMT1-non-KD cell 經 CX-5461 1000 nM 處理 24h 後，在 PRMT1-KD cell 中核仁的 FBL 分布範圍擴大，且 FBL 的顆粒數量也變少，FBL 表現的螢光亮度明顯較 WT cell 暗許多(Fig14)。

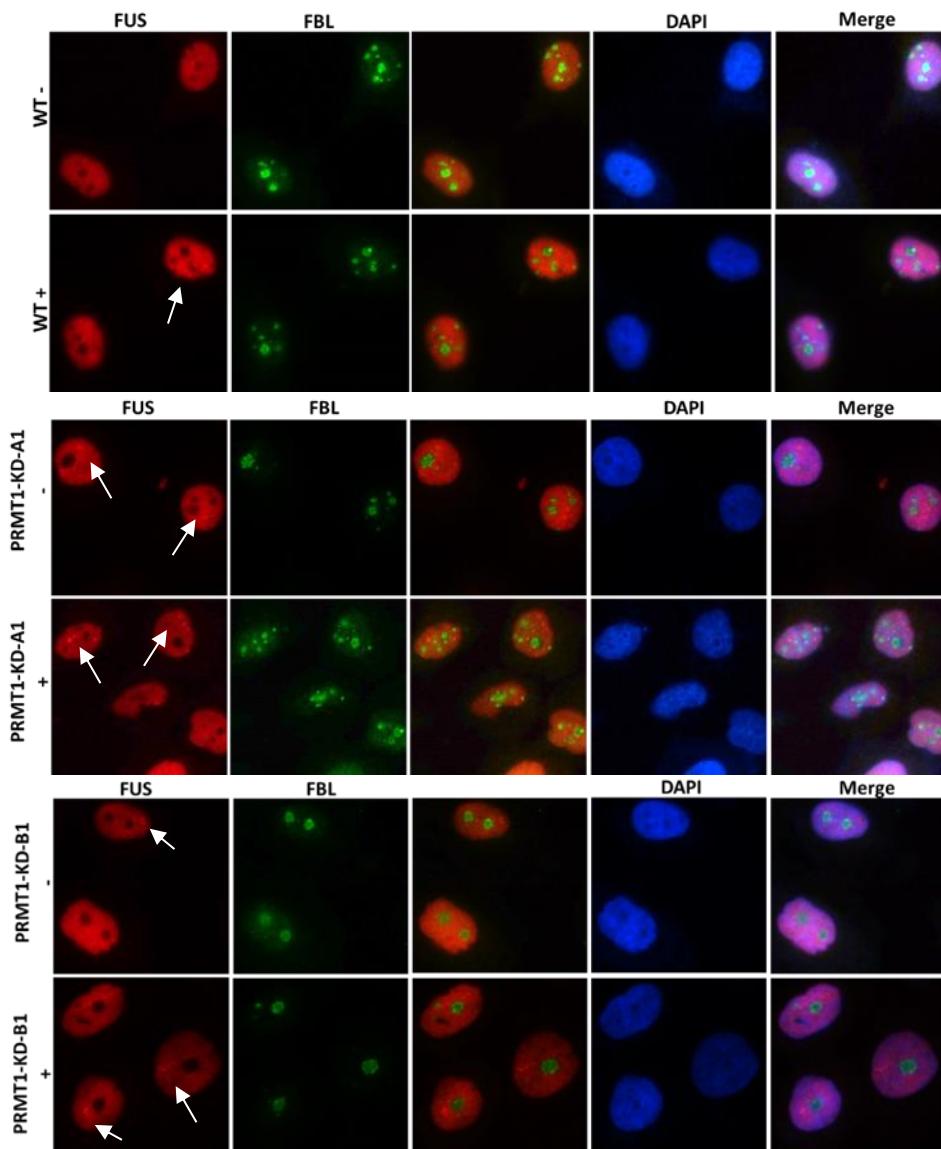


Fig14.透過免疫螢光染色觀察 HSC-3 之 PRMT1-KD cell 與 PRMT1-non-KD cell 中 FUS 的分布情形

綜合以上的實驗結果，我發現無論是 SAS cell 還是 HSC-3 cell，在經過 PRMT1-KD 與核仁壓力藥物處理之後，都可以觀察到細胞中出現 FUS 的明顯亮點，而這些亮點並未與 FBL 的訊號相重疊，這表示 SAS 和 HSC-3 這兩種細胞內的 FUS 沒有往核仁移動的情形發生。而這樣的亮點近似於 paraspeckles 的訊號。因此，後續我想針對這些細胞中出現的亮點進行研究，想要透過其他與 paraspeckles 相關的 marker protein 確認以上實驗出現的 FUS 訊號是否真的是 paraspeckles，如果真的是 paraspeckles，我也想進一步探討它對細胞生長的影響。

五. 參考文獻

- Andersen, J.S., Lam, Y.W., Leung, A.K., Ong, S.E., Lyon, C.E., Lamond, A.I., and Mann, M. (2005). Nucleolar proteome dynamics. *Nature* 433, 77-83.
- Chuang, C.Y., Chang, C.P., Lee, Y.J., Lin, W.L., Chang, W.W., Wu, J.S., Cheng, Y.W., Lee, H., and Li, C. (2017). PRMT1 expression is elevated in head and neck cancer and inhibition of protein arginine methylation by adenosine dialdehyde or PRMT1 knockdown downregulates proliferation and migration of oral cancer cells. *Oncology reports* 38, 1115-1123.

Dormann, D., Madl, T., Valori, C.F., Bentmann, E., Tahirovic, S., Abou-Ajram, C., Kremmer, E., Ansorge, O., Mackenzie, I.R., Neumann, M., *et al.* (2012). Arginine methylation next to the PY-NLS modulates Transportin binding and nuclear import of FUS. *EMBO J* 31, 4258-4275.

El Hassouni, B., Mantini, G., Immordino, B., Peters, G.J., and Giovannetti, E. (2019). CX-5461 Inhibits Pancreatic Ductal Adenocarcinoma Cell Growth, Migration and Induces DNA Damage. *Molecules (Basel, Switzerland)* 24.

Koba, M., and Konopa, J. (2005). [Actinomycin D and its mechanisms of action]. *Postepy higieny i medycyny doswiadczalnej (Online)* 59, 290-298.

Lee, J.H., Cook, J.R., Yang, Z.H., Mirochnitchenko, O., Gunderson, S.I., Felix, A.M., Herth, N., Hoffmann, R., and Pestka, S. (2005). PRMT7, a new protein arginine methyltransferase that synthesizes symmetric dimethylarginine. *J Biol Chem* 280, 3656-3664.

Lee, Y.J., Chang, W.W., Chang, C.P., Liu, T.Y., Chuang, C.Y., Qian, K., Zheng, Y.G., and Li, C. (2019). Downregulation of PRMT1 promotes the senescence and migration of a non-MYCN amplified neuroblastoma SK-N-SH cells. *Sci Rep* 9, 1771.

Lee, Y.J., Wei, H.M., Chen, L.Y., and Li, C. (2014). Localization of SERBP1 in stress granules and nucleoli. *FEBS J* 281, 352-364.

Qamar, S., Wang, G., Randle, S.J., Ruggeri, F.S., Varela, J.A., Lin, J.Q., Phillips, E.C., Miyashita, A., Williams, D., Strohl, F., *et al.* (2018). FUS Phase Separation Is Modulated by a Molecular Chaperone and Methylation of Arginine Cation-pi Interactions. *Cell* 173, 720-734.e715.

Raposo, A.E., and Piller, S.C. (2018). Protein arginine methylation: an emerging regulator of the cell cycle. *Cell division* 13, 3.

Wang, Y.C., and Li, C. (2012). Evolutionarily conserved protein arginine methyltransferases in non-mammalian animal systems. *The FEBS journal* 279, 932-945.