

# 行政院國家科學委員會專題研究計畫 成果報告

胜瀰精胺酸脫亞氨蕪的免疫細胞功能探究：類風濕性關節  
炎致病機轉探討(第3年)  
研究成果報告(完整版)

計畫類別：個別型

計畫編號：NSC 96-2314-B-040-008-MY3

執行期間：98年08月01日至99年07月31日

執行單位：中山醫學大學免疫學研究所

計畫主持人：劉光耀

報告附件：出席國際會議研究心得報告及發表論文

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

中華民國 99年10月03日

行政院國家科學委員會補助專題研究計畫  成果報告  
 期中進度報告

(計畫名稱)

胜肽精胺酸脫亞氨酶的免疫細胞功能探究：類風濕性關節炎致病機轉探討

計畫類別： 個別型計畫  整合型計畫

計畫編號：NSC 96-2314-B-040-008-MY3

執行期間：2009 年 08 月 01 日至 2010 年 07 月 31 日

執行機構及系所：中山醫學大學免疫學研究所

計畫主持人：劉光耀

成果報告類型(依經費核定清單規定繳交)： 精簡報告  完整報告

本計畫除繳交成果報告外，另須繳交以下出國心得報告：

- 赴國外出差或研習心得報告
- 赴大陸地區出差或研習心得報告
- 出席國際學術會議心得報告
- 國際合作研究計畫國外研究報告

處理方式：除列管計畫及下列情形者外，得立即公開查詢

涉及專利或其他智慧財產權， 一年  二年後可公開查詢

中 華 民 國 99 年 09 月 14 日

## 摘要

胜肽精胺酸脫亞氨酶 (Peptidylarginine deiminase; PADI) 的作用為蛋白質的轉譯後修飾，可將蛋白質帶正電的精胺酸胜肽 (peptidylarginine) 轉換成不帶電的瓜胺酸胜肽 (peptidylcitrulline)，其在免疫細胞的細胞凋亡中扮演了重要的角色。在我們先前的研究中，已證明第四型胜肽精胺酸給予 Ion 之後能夠增加第四型胜肽精胺酸脫亞氨酶單倍體的酵素活性，並引發細胞的計畫性死亡，所以我們繼續研究看是否第二型的胜肽精胺酸脫亞氨酶也具有相同的功能。過去的研究中顯示，T 細胞在給予 TPA 和 Ion 後，會使 T 細胞活化，並走向計畫性的死亡。這裡我們在 T 細胞活化的過程中，發現第二型胜肽精胺酸脫亞氨酶蛋白表現量增加，酵素活性也上升，隨後並伴隨了細胞凋亡的發生。我們建立了以四環素起始的 Tet-On 系統 Jurkat T 細胞，在四環素誘發第二型胜肽精胺酸脫亞氨酶的基因的過度表現後，再給予 TPA 與 Ion 來活化細胞，其中第二型胜肽精胺酸脫亞氨酶基因型所誘發的細胞凋亡也高於第二型胜肽精胺酸脫亞氨酶野生型。而 Vimentin 屬於細胞骨架的結構蛋白之一，極可能是胜肽精胺酸脫亞氨酶在瓜胺化蛋白質過程中作用的對象。我們以大量純化出的 vimentin 蛋白，於細胞活化的過程中補充 Vimentin 蛋白質後，發現在相當程度上減緩了第二型胜肽精胺酸脫亞氨酶誘發的細胞凋亡，減少了細胞的死亡。隨後我們短暫性的轉染 vimentin 基因至已建立的 Jurkat-Tet-On-PADI2 表現細胞中，當 vimentin 基因的表現後，讓細胞增加 vimentin 蛋白的表現時，亦能減少第二型胜肽精胺酸脫亞氨酶誘發的細胞凋亡，並增加了細胞存活的能力，這提供了一個第二型胜肽精胺酸脫亞氨酶在 T 細胞活化後，誘發細胞凋亡可能的相關線索。

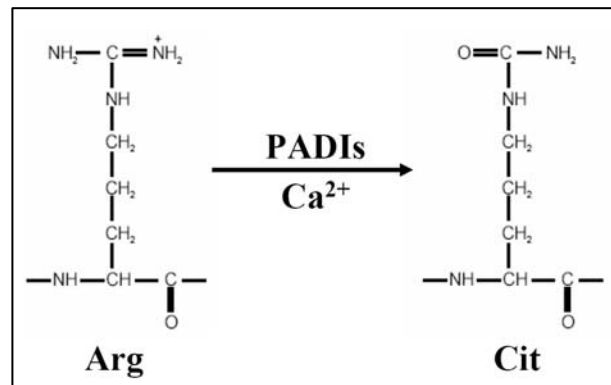
## 研究目的

類風濕性關節炎 (Rheumatoid arthritis, RA) 是常見的一種自體免疫疾病，發病比率約為 1%，而發生的原因是因身體的免疫功能發生障礙，引發免疫系統對於人體關節的免疫攻擊而形成的一種慢性炎症。大多數 RA 病患的主要特徵是具有血清的自體抗體，其中除了類風濕性因子外又以抗瓜胺酸的蛋白抗體 (anti-citrullinated protein antibody) 最引起科學家在臨床與病理研究的興趣。因為一般類風濕性因子在臨床診斷上的專一性低，但抗瓜胺酸抗體在患有類風濕性關節炎的患者身上卻有八成的診出率，而對於沒有患有類風濕性關節炎的患者身上則極少測出此種蛋白抗體，專一性在九成以上。尤其在早期患者的身上便能偵察的到，因此對於其機制的了解將對於類風濕性關節炎的診斷甚至治療，將有極大的幫助。而一般而言，瓜胺酸的形成是透過脬肽精胺酸亞氨酶 (PADIs; Protein-arginine deiminase) 將精胺酸脬肽 (peptidylarginine) 轉換成瓜胺酸脬肽 (peptidylcitrulline)，在我們實驗室過去的研究中，已發現第四型的脬肽精胺酸脫亞氨酶對於造成細胞凋亡有著相當程度的影響，而對於同一家族的第二型脬肽精胺酸脫亞氨酶我們則想進一步了解其功能機制，是否對於瓜胺酸蛋白的後修飾亦影響了細胞凋亡，進而找出其作用的機轉並了解其可能的病理意義。

## 前言 (Introduction)

### 胜肽精胺酸脫亞氨酶

胜肽精胺酸脫亞氨酶 (PADIs; Protein-arginine deiminase, EC 3.5.3.15) 為一種鈣離子依賴性的酵素，可催化蛋白質中的精胺酸胜肽轉變為瓜胺酸胜肽，並伴隨著氨的產生。胜肽精胺酸脫亞氨酶座落在染色體1p36的位置。胜肽精胺酸脫亞氨酶和瓜胺酸蛋白質與人類疾病包括類風濕性關節炎、多發性硬化症、牛皮癬、老人疾病和阿滋海默症具有密切的相關 (Ishida-Yamamoto et



al., 2000; Ishigami et al., 2005; Maruyama and Ishigami, 2005; Suzuki et al., 2003; Tommasi et al., 2006; Vossenaar et al., 2003b)。

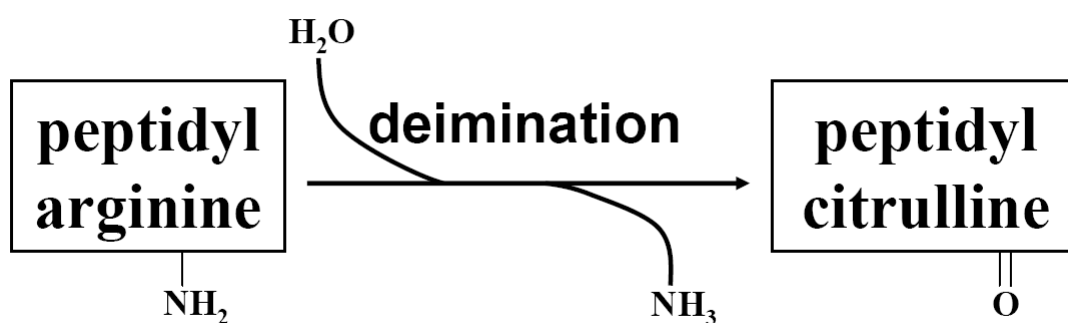
### 胜肽精胺酸脫亞氨酶家族

胜肽精胺酸脫亞氨酶有五種分型，為第一型胜肽精胺酸脫亞氨酶至第四型及第六型胜肽精胺酸脫亞氨酶。各有其特性及不同的組織特異性 (Chavanas et al., 2004; Guerrin et al., 2003; Ishigami et al., 2002; Kanno et al., 2000; Nakashima et al., 1999)。第一型胜肽精胺酸脫亞氨酶被發現於子宮及皮膚表面。第二型胜肽精胺酸脫亞氨酶發現在不同的組織包括腦、骨骼肌、脊椎神經、寡樹突細胞、子宮、胰腺、唾腺、腦下垂體、汗腺、脾臟、骨髓和白血球。第三型胜肽精胺酸脫亞氨酶位於在毛囊。第四型胜肽精胺酸脫亞氨酶主要表現在顆粒球、淋巴球、內皮細胞、單核球和巨噬細胞。第六型胜肽精胺酸脫亞氨酶存在特別，並表現於卵母細胞和胚胎幹細胞 (Chang et al., 2005b; Liu et al., 2006; Nijenhuis et al., 2004)。

目前文獻指出，在類風濕性關節炎的滑液組織發現第二型胜肽精胺酸脫亞氨酶和第四型胜肽精胺酸脫亞氨酶大量表現。儘管胜肽精胺酸脫亞氨酶家族各個成員具有相同的功能及相似蛋白構造，但還是有不同處。目前已知第四型胜肽精胺

酸脫亞氨酶具有NLS (NLS; Nuclear localization signal, 一段可進入核內的序列), 但第二型胜肽精胺酸脫亞氨酶沒有, 因此只有第四型胜肽精胺酸脫亞氨酶可在細胞核及細胞質被偵測到 (Vossenaar et al., 2003b), 而第二型胜肽精胺酸脫亞氨酶則只在細胞質被偵測到。第二型胜肽精胺酸脫亞氨酶的表現位於體內各處組織, 而第四型胜肽精胺酸脫亞氨酶則具專一的表現在白血球 (Suzuki et al., 2003)。因此第二型和第四型胜肽精胺酸脫亞氨酶分別具不同組織的分佈、轉錄及轉譯作用。

#### 胜肽精胺酸脫亞氨酶的去亞氨化反應



蛋白質的去亞氨化發生在細胞凋亡的過程中。增加細胞內鈣離子的濃度(例如打開鈣離子通道)能活化第四型胜肽精胺酸脫亞氨酶酵素活性並產生死亡訊息, 在核內其主要的受質為組織蛋白 (H2A、H3和H4) 以及nucleophosmin/B23 (Hagiwara et al., 2005; Hagiwara et al., 2002; Hingorani et al., 2000; Okuda, 2002; Takemura et al., 2002)。蛋白質的去亞氨化造成帶正電的精胺酸改變為不帶電的瓜胺酸, 影響蛋白質內與蛋白質間的連接, 造成蛋白質失去摺疊的作用。組織蛋白帶有大量的精胺酸所產生的正電荷, 構造及帶電同時受到去亞氨化改變的組織蛋白, 可能造成nucleosome的開啟, 使去氧核糖核酸更易被降解。因此胜肽精胺酸脫亞氨酶可能於細胞凋亡時造成去氧核糖核酸片段化具有一決定性的機制。在細胞凋亡的過程中, 細胞質內的細胞中間絲蛋白被去亞氨化, 使得其去聚合作用。這樣的作用與細胞凋亡中形態改變具有密切關係。在類風濕性關節炎的病患發現

大量的造血母細胞產生細胞凋亡 (Liu and Pope, 2003), 這可能與細胞中間絲蛋白被去亞氨化有關。

### 瓜胺酸化後修飾蛋白的種類與可能角色

胜肽精胺酸脫亞氨酶可催化蛋白中的精胺胜肽轉變為瓜胺胜肽而這過程稱為瓜胺酸化。在體內許多蛋白質例如：角素 (keratin) (Senshu et al., 1999a)、聚角蛋白微絲蛋白 (filaggrin) (Ishida-Yamamoto et al., 2002)、trychohyalin (Tarcsa et al., 1996)、細胞中間絲蛋白 (vimentin) (Vossenaar et al., 2004)、髓素基蛋白 (myelin basic proteins ;MBPs) (Moscarello et al., 1994)、組織蛋白 (histones) (Cuthbert et al., 2004; Wang et al., 2004)、纖維素原 (fibrinogen) (Vossenaar et al., 2003a)、纖維蛋白 (fibrins) (Masson-Bessiere et al., 2001)、第一型膠原 (collagen type I) (Suzuki et al., 2005)、alpha-enolase (Kinloch et al., 2005)、抗凝血素 (antithrombin) (Chang et al., 2005a)和轉譯起始因子4G1 (translation initiation factor 4G1 ;eIF 4G1) (Okazaki et al., 2006)已被證實，能讓胜肽精胺酸脫亞氨酶將它們瓜胺酸化。不過關於胜肽精胺酸脫亞氨酶如何具體影響蛋白受質了解不多。

先前研究顯示，在巨噬細胞中當有鈣離子湧入時，細胞中間絲蛋白會產生特異性瓜胺酸化。在老鼠的腹膜巨噬細胞的研究，並沒有說明那一型的胜肽精胺酸脫亞氨酶造成細胞中間絲蛋白的瓜胺酸化作用 (Asaga et al., 1998)。巨噬細胞包含第二型胜肽精胺酸脫亞氨酶和第四型胜肽精胺酸脫亞氨酶，前者位於細胞質，而後者主要位於細胞核。細胞中間絲蛋白為蛋白間的細胞間絲，且位於細胞質。這可說明第二型胜肽精胺酸脫亞氨酶可能與細胞中間絲蛋白在細胞質中產生瓜胺酸化作用有關。另外，當給予ionomycin使得單核球和巨噬細胞的細胞質中有很高量的鈣離子存在，使得細胞核片斷化並釋放第四型胜肽精胺酸脫亞氨酶至細胞質，進而誘發細胞死亡 (Asaga et al., 1998)。

在健康的細胞中，細胞骨架的細胞中間絲蛋白具有動態性聚合與去聚合作用

調節細胞骨架，對於各種生物功能上扮演重要角色。在生理條件上，這個作用受到細胞中間絲蛋白的胺端處有一個特殊的區域能夠進行可逆性磷酸反應之影響 (Inagaki et al., 1987)。在細胞凋亡過程中，細胞中間絲蛋白形成的網狀構造產生裂解，並向核周圍聚集，而有兩個機制可幫助裂解作用。第一，胜肽精胺酸脫亞氨酶誘導細胞中間絲蛋白產生瓜胺酸化。第二，細胞中間絲蛋白在早期細胞凋亡的過程中受創酶所裂解 (Byun et al., 2001; Muller et al., 2001)。儘管並沒有實驗證據證實這可能的相互關係，但一般蛋白質的瓜胺酸化作用造成蛋白的未摺疊，將更易受到蛋白質水解作用 (Cao et al., 1999)。

在類風濕性關節炎患者的滑液組織有大量的巨噬細胞，在類風濕性關節炎滑液內襯細胞處於活化態有80-100%類似巨噬細胞，20-30%類似正常細胞 (Cutolo et al., 1993)。短期性活化的巨噬細胞能夠防禦自身的細胞凋亡，而長期性活化的巨噬細胞（大於24小時）則傾向細胞死亡 (Rodenburg et al., 2000)。因此，在垂死巨噬細胞中發現鈣離子的湧入造成活化胜肽精胺酸脫亞氨酶，進而促使細胞中間絲蛋白瓜胺酸化作用。此外，胜肽精胺酸脫亞氨酶由死亡細胞中洩漏出，可使細胞外蛋白質例如纖維蛋白 (Vossenaar et al., 2003a)被瓜胺酸化。這也可能就是在類風濕病的滑液發生細胞中間絲蛋白或纖維蛋白等瓜胺酸化，造成了類風濕性關節炎的潛在自體抗原之原因。有趣的是，經由抗體去偵測Sa抗原（可能為瓜胺酸化細胞中間絲蛋白 (Menard et al., 2000)對於類風濕性關節炎病患有很高的特異性，並大約有50%類風濕性關節炎患者可偵測到 (Despres et al., 1994)。

簡而言之，胜肽精胺酸脫亞氨酶酵素造成蛋白質產生瓜胺酸化經由轉錄、轉譯和活化這三個層面的調控。在巨噬細胞中當鈣離子湧入造成細胞中間絲蛋白特異的瓜胺酸化，而瓜胺酸化的細胞中間絲蛋白是類風濕性關節炎一個重要自體抗原的候選者。造成類風濕性關節炎患者的滑液蛋白瓜胺酸化最有可能是胜肽精胺酸脫亞氨酶家族的第二型及第四型胜肽精胺酸脫亞氨酶。

### 抗瓜胺酸蛋白抗體



在類風濕性關節炎患者的血清中，含有多種的自體免疫抗體可直接作用於多種的自體抗原。廣為大眾所知與類風濕性關節炎有關的自體抗體為類風濕性因子，抗體直接作用於IgG的Fc部分。在類風濕性關節炎的患者中，有75%可以測得到類風濕性因子，但一些風濕病、發炎反應甚至是健康的年長者亦偵測得到 (Masters, 1993) ，這對於診斷類風濕性關節炎的專一性是受到限制的。能夠直接偵測瓜胺酸蛋白的自體抗體對類風濕性關節炎診斷更具專一性 (van Boekel et al., 2002)。這些自體抗體成員包含了抗週邊核因子 (Nienhuis and Mandema, 1964)、抗角素抗體 (antikeratin)、antifilaggrin (Sebbag et al., 1995; Simon et al., 1993)和抗瓜胺酸蛋白抗體 (Schellekens et al., 2000) ，它們會辨認非典型的瓜胺酸抗體之抗原決定位且更易於偵測。更敏感的分析方法 (CCP2)，抗瓜胺酸蛋白抗體可偵測到類風濕性關節炎的80%，特異性更高達98% (van Venrooij et al., 2002; Vasishtha, 2002)。除了對類風濕性關節炎的特異性之外，抗瓜胺酸蛋白抗體可於疾病的初期偵測並預測臨床疾病的結果 (Kroot et al., 2000; Visser et al., 2002)，因此對於臨床醫師診斷而言是一個有效的工具。此外，利用抗瓜胺酸蛋白抗體篩選發炎的類風濕性關節炎滑液，其結果顯示在類風濕性關節炎的滑膜液存在瓜胺酸蛋白 (Reparon-Schuijt et al., 2001)，並造成發炎區域中具抗瓜胺酸蛋白特異性B細胞的成熟。類風濕性關節炎滑液膜包含了大量活化的巨噬細胞 (Cutolo et al., 1993)，在這些的細胞可發現胜肽精胺酸脫亞氨酶的表現和瓜胺酸蛋白的存在 (Cutolo et al., 1993)，這成為滑液中產生瓜胺酸化抗原的重要可能因素。

在單核球 (第四型胜肽精胺酸脫亞氨酶) 和巨噬細胞 (第二型胜肽精胺酸脫亞氨酶和第四型胜肽精胺酸脫亞氨酶) 的胜肽精胺酸脫亞氨酶未活化的，並未測到瓜胺酸蛋白。因為正常生理條件下細胞質和細胞核中鈣離子濃度較低，無法活化胜肽精胺酸脫亞氨酶。給予Ion或thapsigargin提升細胞質和細胞核內鈣離子的濃度，誘發活化胜肽精胺酸脫亞氨酶，使得細胞內蛋白質產生瓜胺酸化作用。利用打開鈣離子通道使胜肽精胺酸脫亞氨酶的活化已被報導過，包括在老鼠的巨噬細胞 (Asaga et al., 1998)、大鼠的角素細胞以及人類的HL-60顆粒球細胞

(Hagiwara et al., 2002) ，而且細胞質鈣離子濃度的增加對於誘導細胞凋亡是重要的 (Sasamura et al., 2002; Tombal et al., 2002)。在細胞凋亡的過程中，細胞膜鈣離子幫浦 (PMCA) 會被創酶 (Caspase) 裂解，湧入鈣離子就無法可使細胞膜鈣離子幫浦短效但高效率的清除。這可說明為什麼當鈣離子失去平衡時，體內的瓜胺酸作用發生在細胞死亡和細胞分化的晚期。例如 filaggrin 的瓜胺酸化和角素在角質細胞分化的晚期 (Senshu et al., 1999b; Senshu et al., 1996)。

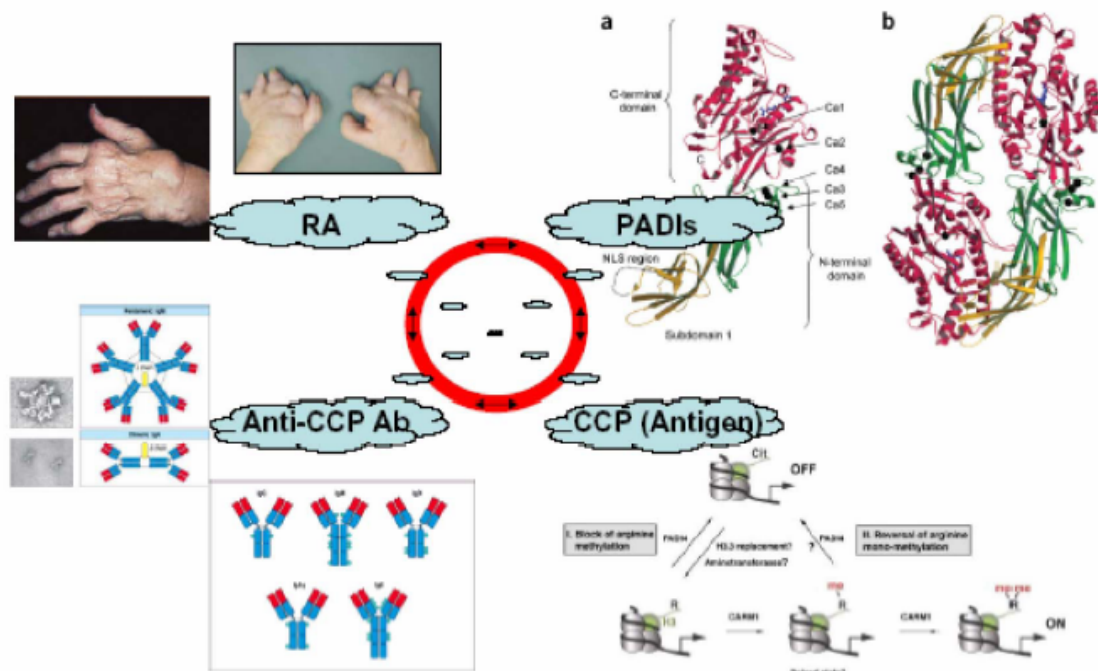
### 類風濕性關節炎

類風濕性關節炎是一常見的自體免疫疾病，侵襲全球約百分之一的族群。典型的類風濕性關節炎的症狀為慢性、對稱性多關節炎、蹠骨關節、腕關節、肘關節、足踝關節和膝關節具有晨間僵硬症狀。更嚴重者會造成病患關節的破壞和不可復原的畸狀，並造成國家經濟上的重大負擔。過半數的類風濕性關節炎的族群有一個主要的特色即為在血清中產生特異的自體抗體，此外引起臨床關注且眾所皆知的類風濕性因子，為抗瓜胺酸蛋白抗體，會特異的增高。這些抗體已知包括抗週邊核因子抗體、抗角素抗體和 antifilaggrin 抗體 (Girbal et al., 1993; Hoet et al., 1991; Nienhuis and Mandema, 1964)。這些自體抗體皆會攻擊後轉譯機制的胜肽精胺酸脫亞氨酶作用的蛋白質中精胺胜肽轉變為瓜胺胜肽的特異抗原決定位 (Girbal-Neuhauser et al., 1999; Schellekens et al., 1998)，且對類風濕性關節炎具高特異性 (Sondag-Tschroots et al., 1979; Vincent et al., 1989; Youinou et al., 1985) 藉由偵測這些形成瓜胺酸受質的自體抗體 (Girbal-Neuhauser et al., 1999; Schellekens et al., 1998; Schellekens et al., 2000; Union et al., 2002) 可成為 ACPAs (Anti-citrullinated peptide autoantibodies) 為一新的檢測工具。

除應用此這特性之外，近來臨床研究發現 ACPAs 的間接證據對於形成類風濕性關節炎的生理病程是重要的。首先，ACPs 可於類風濕性關節炎的早期發現 (Dubucquoi et al., 2004; Grootenboer-Mignot et al., 2004; Kastbom et al., 2004; Soderlin et al., 2004)，之後才開始有臨床症狀 (Nielen et al., 2004;

Rantapaa-Dahlqvist et al., 2003)。第二，當ACPAs的出現通常伴隨多處關節毀損與疾病的活化 (Forslind et al., 2004; Kastbom et al., 2004; Vallbracht et al., 2004)，可作為疾病活化時檢測 (Kastbom et al., 2004; Pinheiro et al., 2003; Vallbracht et al., 2004)的一項重要預測指標 (Forslind et al., 2004; Kastbom et al., 2004; Nielen et al., 2004)。第三，近來的研究發現藉由ACPAs可追溯類風濕性關節炎的起源 (Hueber et al., 2005; Huizinga et al., 2005)和攻擊基因與環境之間的作用。在類風濕性關節炎患者HLA-DR部分的抗原決定位和抽煙會造成ACPA陽性而非ACPA陰性 (Klareskog et al., 2006)。第四，在CIA的老鼠發現，組織受損造成ACPA增加。更重要的是在老鼠的耐受性測試監測靜脈的瓜胺酸纖維蛋白原的瓜胺酸修飾特異的抗體CCP2抗體增加。

## The Potential Relationship Between PADI5 and RA



### 波狀蛋白 (Vimentin)

目前已知的細胞骨架纖維包含三類微絲 (microfilament)、中間絲 (intermediate filaments) 與微管 (microtubule)，其中中間絲是最穩定的細胞骨架成份，而vimentin又是中間絲含量最高的成份蛋白。中間絲可分成六型，而

vimentin屬於其中的第三型，大多數存在起源於中胚層的間葉細胞株中，如內皮細胞和纖維母細胞 (Franke et al.,1978)。單體的vimentin是53KD大小的多肽，由326個胺基酸構成的長棒構造，並包含了一個77個殘基的頭端和61個殘基的尾端。而兩個單體會互相纏繞構成coiled-coil的螺旋構造雙聚體，在中間絲中的vimentin是以二聚體連結的反平行非極性結構。

在過去的研究中顯示vimentin蛋白與細胞的許多功能相關，例如癌細胞的侵襲遷移能力 (Zhao Yan et al., 2008)、肌肉細胞的信號傳導 (Li QF et al.,2006)、神經細胞修復的信號傳導 (PerlsonE et al.,2005)、細胞粒腺體DNA的形態活性 (Bannikova S et al.,2005)、幫助抗炎作用 (Gharbi S et al.,2007)、促進引發細胞的不死化 (Tolstonog GV et al.,2005)等，而在細胞凋亡方面，也有研究指出vimentin的裂解小體能夠促進其發生 (ByunY et al.,2001)。

Vimentin 其聚合與去聚合的動態性質提供了細胞一個靈活的特性。一般來說，它被公認是細胞骨架成份維持了細胞的完整性，並支持和維繫了細胞胞器定位於細胞質，附著在細胞核，內質網，線粒體。

## 材料與方法(Materials and methods)

### 細胞培養 (Cell culture and chemical materials)

Jurkat T細胞、Jurkat-Tet-On細胞、JK-Tet-On-Vector細胞和JK-Tet-On-PADI2細胞都以90%的RPMI 1640營養液和加入10%的胚胎牛血清來培養於37度C恆溫的培養箱中，並保持5%二氧化碳的濃度。而所使用的Ribonuclease A (RNase A), acridine orange, propidium iodide (PI), doxycycline (Dox) and ionomycin (*Ion*)都來自於廠商Sigma (St Louis, MO)。

### 細胞存活率與吡啶橙染色 (Cell viability and acridine-orange staining)

細胞數的計算我們使用的是椎藍排除法 (trypan blue exclusion assay)，細胞存活的百分比是以計算實驗組的細胞來比較沒有加藥的對照組。而鑑定細胞凋亡特性則使用吡啶橙 (acridine orange) 染色， $5 \times 10^4$ 細胞取約1.5 ml的細胞懸浮液，以1500 rpm離心10分鐘後置於室溫，吸乾上清液，加入10  $\mu$ l的acridine orange，並置於暗處2分鐘後，取10  $\mu$ l至玻片上，然後以螢光顯微鏡於500-525 nm波長下觀察綠色螢光。

### DNA片段化分析 (DNA fragmentation analysis)

將細胞 ( $5 \times 10^6$ )用PBS溶液wash後，離心除去PBS並收集細胞，然後以digestion buffer在55 °C中溶解細胞，然後作用overnight (其中digestion buffer包含0.5% sarkosyl, 0.5 mg/ml proteinase K, 50 mM Tris-HCl, pH 8.0 and 10 mM EDTA)。隨後，細胞加入2 $\mu$ l的RNase作用2小時。以等體積的phenol-chloroform-isoamyl alcohol萃取DNA後，以2%的瓊脂糖凝膠在50 volts的條件下電泳30分鐘後，於UV下觀察和分析。

### 西方點墨法 (Immunoblotting, IB)

為了純化和收集細胞的total proteins，將細胞用冰的PBS洗過後，離心去除PBS溶液留下細胞，再將細胞加入cold lysis buffer中作用(包含10% v/v glycerol, 1% v/v Triton X-100, 1 mM sodium orthovanadate, 1 mM EGTA, 10 mM NaF, 1 mM sodium pyrophosphate, 20 mM Tris, pH 7.9, 100  $\mu$ M  $\beta$ -glycerophosphate, 137 mM NaCl, 5 mM EDTA, 1 mM PMSF, 10  $\mu$ g/ml aprotinin and 10  $\mu$ g/ml leupeptin)並置於冰上每十分鐘vortex一次，一共三次，30分鐘，再以12000 rpm離心30分鐘，取上清液，此即whole cell lysate的蛋白萃取液。將所取的蛋白萃取物和protein assay dye混合並以螢光測定儀做定量分析後，取適量sample用適當濃度的SDS-PAGE做電泳分析。而經過blotting之後，將轉漬膜分別浸潤於anti-PADI2、anti-vimentin、anti-citrulline、anti-actin的抗體中約8至12小時後，再以帶有horseradish-peroxidase二抗結合作用2小時後，用enhanced chemiluminescence (ECL)法來呈現。

### **免疫沉澱法 (Immunoprecipitation, IP)**

細胞離心後取 sample 上清液加入 1-5  $\mu$ g ( $\mu$ l)的 polyclonal antibody，然後移至 rocking platform 在 4 °C 下作用 1 小時。之後加入 30  $\mu$ l protein A/G 作用 overnight。取出 sample 以 6000 r.p.m 於 4°C 下離心 10 分鐘，離心下後的 Pellet 加入 50  $\mu$ l 的 IP lysis buffer(包含 10 mM Tris pH7.5、150 mM NaCl、1 % Triton X-100、1mM EDTA、0.5 % NP40、1 mM DTT、1 mM PMSF、0.2 mM  $\text{Na}_3\text{VO}_4$  (Sodium orthovanadate) 和 1 mM EGTA)。之後加入 6X 的 sample buffer 於 95°C 煮 10 分鐘後，即可進行蛋白電泳分析。

### **螢光顯微鏡觀察 (Fluorescence microscopy)**

將細胞 ( $1 \times 10^6$ ) 固定在 2 % 的 paraformaldehyde 於室溫 15 分鐘，然後加入 70 % 的 methanol 在 4°C 作用一個小時使細胞通透，再用 PBS 溶液 wash 後，將細胞 cytospin 到玻片上固定。接著用 3 % 的胎牛血清於室溫中 blocking 2 小時，用 vimentin 抗體於 4 °C 作用 overnight，再用 PBS 溶液 wash，並結合上附有 rhodamine 抗體的 goat

anti-mouse IgG(Santa Cruz) ，於37 °C下作用兩小時後，將玻片置於顯微鏡下觀察。

### **PADI酵素活性測定 (Assay of PADI enzyme activity)**

PADI的酵素活性測定是利用呈色法，其中反應混合物包含了100 mM Tris-HCl, pH 7.5, 10 mM CaCl<sub>2</sub>, 2.5 mM DTT, 10 mM BAEE 以及適量的細胞 (5 mg/sample)，最後合計總共50 µl的反應體積，置於37 °C恆溫水浴槽中作用一小時。酵素反應由加入12.5 µl的5 M perchloric acid來終止。反應物樣品以12000 rpm 離心10分鐘後，取出溶解上清液移至新管，然後加入150 µl的carbidino detection reagent(包含一份0.5% diacetyl monoximine 、 0.01% thiosemicarbazide的混合液A 與一份包含0.25 mg FeCl<sub>3</sub>/ml 、 24.5% sulfuric acid (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) 、 17% phosphoric acid (H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>)混合液B，其中混合液A與B的比例為1:2)在105 °C中反應10分鐘，取200ul樣品至96 well的孔盤中，以540nm波長於多孔式螢光讀取儀測反應呈色的吸光值。

### **統計分析 (Statistical analysis)**

在實驗組與對照組之間顯著差異的統計分析以學生 T 檢定來評估。

## 結果

### Jurkat cell 活化過程中，PADI2 蛋白與活性的上升

根據過去的研究指出，T 細胞在使用 TPA 與 Ion 後，會使 T 細胞活化，然後走向細胞計畫性的死亡 (Hee-Kyoung Shon, et al., 2003)。在我們培養了 Jurkat cell 後，每盤  $1 \times 10^5$ /cc 的細胞中，分別加入 TPA (15 ng/ml) 和 Ion (1  $\mu$ M) 後，在 12 小時和 24 小時觀察並施以細胞計數，觀察到細胞開始死亡的現象 (Fig .1)。之後我們在 12 小時收集細胞，以吖啶橙 (acridine orange) 螢光染色，分別在螢光顯微鏡和光學顯微鏡下作觀察，亦發現了凋亡小體的存在 (Fig .2A)。最後我們收集細胞以 DNA 片段化的方法，於 2% 的瓊膠中做電泳分析，相同的也發現了 DNA 片段化的現象 (Fig .2B)。這說明了 Jurkat cell 在加上 TPA 與 Ion 活化後，確實有走向細胞計畫性死亡的現象。而在相同的條件下，Jurkat cell 加入 TPA 與 Ion 後，我們在 0、3、6 小時分別收集細胞，然後以 Western Blot 法做蛋白的電泳分析，以 anti-PADI2 為二抗，分別在 3 小時與 6 小時發現 PADI2 的蛋白表現量比沒加入 TPA 與 Ion 的細胞對照組要高 (Fig .3)，接著我們收集 6 小時的細胞，以呈色法測定 PADI2 的蛋白酵素活性，發現有加入 TPA 與 Ion 的細胞組，其蛋白酵素活性也確實比沒有加入 TPA 與 Ion 的細胞對照組來的高 (Fig .4)。這說明了在 Jurkat cell 在加入 TPA 與 Ion 後的活化過程中，PADI2 的蛋白量與蛋白酵素活性都有上升的現象。

### Jurkat-Tet-On-PADI2 與 Jurkat-Tet-On-Vector 細胞的建立

我們以可以用四環素 (Doxycycline) 起始作用的 Jurkat-Tet-On 細胞為基礎，分別轉殖 PADI2 與 Vector 的 Plasmid DNA 進入 Jurkat-Tet-On 細胞中，再以抗生素 hygromycin 持續篩選培養細胞數週，淘汰未轉殖成功死去的細胞，直到細胞能穩定存活與繼代培養。之後，我們在培養的 Jurkat-Tet-On-PADI2 細胞中加入 50  $\mu$ m 的 Dox 作用六小時之後，再加入 TPA 與 Ion 作用之後，離心收集細胞，並



以西方點墨法分析，與沒有加入 Dox/TPA/Ion 的對照組比較，我們發現有加 Dox 來 induction 並活化的 Jurkat-Tet-On-PADI2 細胞組，PADI2 的蛋白表現量確實比較高。而同時比較 Jurkat-Tet-On-PADI2 與 Jurkat-Tet-On-Vector 兩組細胞，相同的加入 Dox 與 TPA 和 Ion 後，收集細胞以西方點墨法分析，亦發現 Jurkat-Tet-On-PADI2 細胞組的 PADI2 表現量確實比 Jurkat-Tet-On-Vector 細胞組來的高 (Fig .5)。此結果證明已建立的 Jurkat-Tet-On-PADI2 與 Jurkat-Tet-On-Vector 細胞株確實是有效的。

### **Jurkat-Tet-On-PADI2 細胞株的細胞計畫性死亡**

由於之前已發現 Jurkat cell 在加入 TPA 與 Ion 後，細胞會在活化後走向計畫性的死亡。所以我們想證實是否在 Jurkat-Tet-On-PADI2 細胞中，會有相同或者更明顯的表現。因此，首先我們比較 Jurkat-Tet-On-PADI2 與 Jurkat-Tet-On-Vector 兩組細胞中，加入不同濃度的 Dox 來 induction，並分別施以相同濃度的 TPA 與 Ion 後，最後以細胞計數來觀察兩組細胞的存活率。我們發現 Jurkat-Tet-On-Vector 加入 Dox 後 induction，不管有沒有加入 TPA 與 Ion 活化細胞，細胞都能維持原來的生長曲線，不會有太多的死亡。反觀 Jurkat-Tet-On-PADI2 細胞組，加入 Dox induction 細胞後，若沒有加入 TPA 與 Ion 活化細胞，那麼此時細胞的生長速率與 Jurkat-Tet-On-Vector 細胞組的表現相同而差異不大。但加入 TPA 與 Ion 活化後，細胞死亡的程度也會增加 (Fig .6)。接著我們將 Jurkat-Tet-On-PADI2 與 Jurkat-Tet-On-Vector 兩組細胞，在有無加入 TPA 與 Ion 的情況下，以吖啶橙 (acridine orange) 螢光染色後，於螢光顯微鏡下觀察，發現 Jurkat-Tet-On-Vector 不管有沒有加入 TPA 與 Ion 來活化細胞，細胞型態都完整而健康。反之，觀察 Jurkat-Tet-On-PADI2 細胞組，若沒有加入 TPA 與 Ion 活化，其在顯微鏡下的細胞型態健康而完整，與 Jurkat-Tet-On-Vector 細胞組表現相同，但在加入了 TPA 與 Ion 活化後，細胞則大量死亡並且發現了許多凋亡小體。這結果也與之前的細胞計數相符合，也說明了 Jurkat-Tet-On-PADI2 細胞在活化後確實有走向細胞計畫

性死亡的結果 (Fig .7A)。隨後我們以 DNA 的片段化分析 Jurkat-Tet-On-PADI2 與 Jurkat-Tet-On-Vector 兩個細胞組，不管有沒有加入 TPA 與 Ion 活化細胞，DNA 都看不見片段化的表現，反之觀察 Jurkat-Tet-On-PADI2 細胞組，只有在加入 TPA 與 Ion 活化細胞後，Jurkat-Tet-On-PADI2 的細胞才有 DNA 片段化的表現 (Fig .7B)。而我們以西方點墨法分析 Jurkat-Tet-On-PADI2 與 Jurkat-Tet-On-Vector 兩組細胞，分別在有 TPA 與 Ion 活化與否的情況下，發現只有 Jurkat-Tet-On-PADI2 且加入 TPA 與 Ion 活化後的細胞組，發現有 Caspase-3 與 PARP 的表現，且 PARP 有被切的現象 (Fig .8)。

### **在活化的 T 細胞中胜肽精胺酸脫亞氨酶瓜氨酸化 vimentin**

我們已經知道胜肽精胺酸脫亞氨酶在細胞的作用為將精胺酸胜肽轉變為瓜氨酸胜肽，因此我們比較 Jurkat-Tet-On-PADI2 與 Jurkat-Tet-On-Vector 兩組細胞，如同之前的實驗，分別給予和不給予 Dox 來 induction 細胞，並且在 induction 之後再分別使用與不使用 TPA 與 Ion 來活化細胞。之後我們收集細胞，並且以西方點墨蛋白電泳分析，我們發現只有 Jurkat-Tet-On-PADI2 在經過 Dox 來 induction 後，並且以 TPA 和 Ion 來活化的細胞組，表現出較多瓜氨酸化的蛋白質 (Fig .9A)。接著我們想知道在這些瓜氨酸化的蛋白中，有可能是哪些蛋白質。我們以免疫沉澱法從蛋白質中先特異性的結合 vimentin，再以西方點墨蛋白電泳給予 anti-citrulline 的二抗結合後，我們發現在這些瓜氨酸化的蛋白中，確實有 vimentin 的存在，而且只有在 Jurkat-Tet-On-PADI2 細胞經過 Dox 來 induction，並加上用 TPA 與 Ion 來活化細胞的細胞組，其被瓜氨酸化的 vimentin 有最高量的表現 (Fig .9B)。然後我們以 Dox 來 induction 細胞並加以 TPA 與 Ion 來活化細胞，在此相同條件下，比較 Jurkat-Tet-On-PADI2 與 Jurkat-Tet-On-Vector。我們先將細胞以離心方式 cytopsin 到玻片上，然後以組織免疫螢光染色法，以 anti-vimentin 為一抗抗體作用後，用 PBS 溶液 wash，再接上 Rhodamine-conjugated anti-mouse secondary antibody，然後在微分干涉差顯微鏡 (differential interference

contrast, DIC) 與螢光顯微鏡下觀察，我們發現只有 Jurkat-Tet-On-PADI2 細胞有紅色螢光顯示，而 merge 兩者圖像之後，我們發現這些紅色螢光都表現在細胞膜的周圍。這說明 vimentin 作為細胞骨架蛋白，有可能出現在細胞膜周圍並在此發生作用 (Fig .10)。接著，我們於 Jurkat-Tet-On-PADI2 與 Jurkat-Tet-On-Vector 兩組細胞中以 Dox 來 induction，並以 TPA 和 Ion 來活化細胞後，但離心之後只收集細胞的上清液，並以選擇性管柱來加以濃縮上清液，然後以西方點墨蛋白電泳分析，我們在 12、24 小時的細胞組的細胞上清液中，發現了 vimentin 和 Cit-vimentin 的存在 (Fig .11A)。而將蛋白表現定量化之後，我們以 Jurkat-Tet-On-Vector 為基準，比較其 ratio 值(PADI2/vector)後可以發現，vimentin 的比值由 5 變成 1/5，而 Cit-vimentin 的比值則由 1/5 變成 5，這說明了 vimentin 蛋白質表現下降，而 Cit-vimentin 蛋白則增多，這表示 vimentin 被瓜胺酸化的程度上升 (Fig .11B)。

### 補充內生性與外生性 Vimentin 來減緩細胞計畫性死亡

我們想知道 vimentin 蛋白在 Jurkat-Tet-On-PADI2 與 Jurkat-Tet-On-Vector 細胞中，是否真的影響細胞程式性死亡。我們首先抽大量 plasmid，然後養菌純化出 vimentin 蛋白。接著我們在 Jurkat-Tet-On-PADI2 與 Jurkat-Tet-On-Vector 兩組細胞中以 Dox 來 induction 並以 TPA 與 Ion 活化後，分別補充加入 75 ng/ $\mu$ l 的 vimentin 蛋白，我們可以發現沒有補充加入 vimentin 的 Jurkat-Tet-On-PADI2 細胞組對照組，有較多細胞走向死亡，反之，有補充 vimentin 的 Jurkat-Tet-On-PADI2 細胞組，細胞雖然會死亡，但死亡的程度則明顯下降。這說明補充外源性的 vimentin 蛋白可以讓細胞走向計畫性死亡的程度減輕 (Fig .12)。

接著我們以 Jurkat-Tet-On-PADI2 與 Jurkat-Tet-On-Vector 兩組細胞為基礎，短暫性轉染 vimentin 表現基因至細胞內 24 小時後，再以 Dox 來 induction 細胞，並加入 TPA 與 Ion 來活化，然後分別收集有 induction 和活化的實驗組與沒有 induction 和活化的對照組細胞後，以西方點墨蛋白電泳分析來看 vimentin 和 anti-cilltrulline

的表現變化。我們發現有轉染 vimentin 表現基因的 Jurkat-Tet-On-PADI2 與 Jurkat-Tet-On-Vector 的細胞實驗組相較於沒有轉染的細胞對照組，其 Vimentin 蛋白表現量較高，而其中 Jurkat-Tet-On-PADI2 轉染 vimentin 後，細胞中的 anti-citrulline 的表現程度也高 (Fig .13)。這說明了我們轉染 vimentin 進入細胞表現後，其表現出來蛋白提供了 PADI2 酵素蛋白更多可以作用的受質，而表現出更多瓜氨酸化的蛋白呈現。

## 討論

在我們之前的研究中已經發現第四型胜肽精胺酸脫亞氨酶會使得免疫細胞走向細胞的計畫性死亡 (Liu et al., 2006 Apoptosis)。此外，也證明在 Tet-On 系統的 Jurkat T 細胞，當加入四環素 (Doxycycline) 起始 Tet-On 系統，並加入 Ionomycin (Ion) 後發現第四型胜肽精胺酸脫亞氨酶單核苷酸多型性單倍體的酵素活性高於第四型胜肽精胺酸脫亞氨酶單倍體 (第四型胜肽精胺酸脫亞氨酶野生型)，在此同時也會使得 Bcl-xL 蛋白減少而 Bax 蛋白增加，並造成細胞色素 C 蛋白會從粒線體釋放至細胞質。這說明了第四型胜肽精胺酸脫亞氨酶單核苷酸多型性單倍體在給予 Ion 後，因為酵素活性的上升而增加了細胞凋亡，且是經由粒線體途徑。而在本篇研究中，我們要看是否第二型的胜肽精胺酸脫亞氨酶，在造成細胞凋亡上與第四型的胜肽精胺酸脫亞氨酶具有相同的功能。首先，過去的研究顯示 Jurkat T 細胞在加入 TPA 與 Ion 後，會活化 Jurkat T 細胞並使得細胞走向計畫性死亡 (Hee-Kyoung Shon et al., 2003)。我們在 Jurkat T 細胞中，加入 TPA 與 Ion 活化後，在 12 小時看見部分的 Jurkat T 細胞開始死亡 (Fig.1)，在螢光顯微鏡下亦發現了凋亡小體 (Fig.2A)，並以 DNA 片段化分析法於 2% 的瓊脂電泳分析，發現了 DNA 片段化的現象 (Fig.2B)，這說明 Jurkat T 細胞在加入 TPA 與 Ion 活化後細胞凋亡的現象。而 Jurkat T 細胞在加了 TPA 與 Ion 之後，我們收集第三小時與第六小時的細胞，以西方墨點法蛋白分析，發現在活化的過程中第二型胜肽精胺酸脫亞氨酶蛋白的表現量有顯著上升 (Fig.3)。而於第六個小時收集細胞，以胜肽精胺酸脫亞氨酶酵素活性呈色法分析，也發現了第二型胜肽精胺酸脫亞氨酶蛋白酵素活性的提高 (Fig.4)。這說明了 Jurkat T 細胞在活化的過程中，第二型的胜肽精胺酸脫亞氨酶的蛋白表現量不但提升，而且酵素活性亦升高。

為了進一步探討與觀察第二型胜肽精胺酸脫亞氨酶對於細胞的影響，我們以 Jurkat-Tet-On 細胞為基礎，建立了以四環素起始的 Jurkat-Tet-On-PADI2 細胞與

Jurkat-Tet-On-Vector 細胞，讓細胞在加入四環素之後，能大量的表現第二型胜肽精胺酸脫亞氨酶蛋白。首先我們比較在 Jurkat-Tet-On-PADI2 有加入與不加入四環素來起始細胞，以西方墨點法分析可以發現有加入四環素的 Jurkat-Tet-On-PADI2，能夠表現更多的第二型胜肽精胺酸脫亞氨酶蛋白。而比較 Jurkat-Tet-On-PADI2 與 Jurkat-Tet-On-Vector 兩組細胞，在同時加入四環素起始後，西方墨點法蛋白分析中，我們發現 Jurkat-Tet-On-PADI2 細胞也確實比 Jurkat-Tet-On-Vector 表現了更多的第二型胜肽精胺酸脫亞氨酶蛋白 (Fig.5)。而在 Jurkat-Tet-On-PADI2 與 Jurkat-Tet-On-Vector 兩組細胞中，我們以四環素起始細胞後，再加入 TPA 與 Ion 來活化細胞，以細胞計數來比較細胞的死亡狀況，我們發現只有 Jurkat-Tet-On-PADI2 細胞，在同時以四環素起始並且加入 TPA 與 Ion 活化的組別，才會造成細胞更多的死亡 (Fig.6)。這說明細胞的死亡不但需要第二型胜肽精胺酸脫亞氨酶蛋白的表現也需要細胞在活化的狀態下。而我們在光學與螢光顯微鏡下也可看見只有 Jurkat-Tet-On-PADI2 同時以四環素起始並加入 TPA 和 Ion 後，才觀察到凋亡小體的存在 (Fig.7A)。隨後以 DNA 片段化分析法在 2%的瓊脂電泳中分析，亦看見了 DNA 片段化的現象 (Fig.7B)。所以，在以四環素起始表現大量的第二型胜肽精胺酸脫亞氨酶蛋白後，還需要加入 TPA 和 Ion 來活化細胞，進而使得細胞凋亡。而於西方墨點法分析中，我們也發現了 Jurkat-Tet-On-PADI2 細胞組有 caspase-3 和 PARP 的表現變化 (Fig.8)。其中 caspase-3 為影響參與細胞凋亡重要的酵素之一，而 PARP 為 caspase-3 作用的基質，caspase-3 可直接或透過間接活化 caspase-7 來切 PARP，說明其可能是細胞凋亡所進行的路徑。

由於第二型胜肽精胺酸脫亞氨酶蛋白主要的作用為將精胺酸胜肽轉換為瓜胺酸胜肽，我們想看在 Jurkat-Tet-On-PADI2 與 Jurkat-Tet-On-Vector 兩組細胞中，是否會因為胜肽精胺酸脫亞氨酶蛋白的表現而使得細胞蛋白的瓜胺酸化有程度上的不同。於是我們在 Jurkat-Tet-On-PADI2 與 Jurkat-Tet-On-Vector 兩組細胞中分

別給予或不給予 Dox 來起始細胞，並且在給予 Dox 起始的細胞組中再分別加入與不加入 TPA 和 Ion 之後，離心收集各組的細胞，以西方墨點法來觀察蛋白的瓜胺酸化程度，之後我們發現以 Dox 起始 Jurkat-Tet-On-PADI2 的細胞組再加入 TPA 與 Ion 活化細胞後，細胞蛋白的瓜胺酸化程度表現最高 (Fig.9A)。這結果表示了當第二型胜肽精胺酸脫亞氨酶蛋白在細胞中表現增加時，細胞蛋白也被其大量的瓜胺酸化。而 vimentin 蛋白極可能是第二型胜肽精胺酸脫亞氨酶蛋白作用的對象，於是我們在 Jurkat-Tet-On-PADI2 的細胞組中，將這些蛋白先以免疫沉澱法用 anti-vimentin 特異性的結合 vimentin 後收集，然後在以西方墨點法用 anti-citrulline 來分析其瓜胺酸化的程度，也確實發現只有在以 Dox 起始並加入 TPA 和 Ion 活化細胞的 Jurkat-Tet-On-PADI2 細胞組，vimentin 有最高程度的瓜胺酸化 (Fig.9B)。

Vimentin 作為細胞骨架中間絲重要的成分蛋白，曾有研究指出 vimentin 會被巨噬細胞分泌釋放出來並瓜胺酸化，與細胞凋亡有關 (Mor-Vaknin N et al.,2003)，另外 vimentin 也會暴露在人類凋亡中的 T 細胞的細胞表面 (Eric Boilard et al., 2003)。於是我們在將 Jurkat-Tet-On-PADI2 細胞在用 Dox 來起始並加入 TPA 和 Ion 來活化後，將細胞 cytopsin 到玻片上，並以免疫螢光法結合 vimentin 接 Rhodamine 二抗觀察紅色螢光，當與 Jurkat-Tet-On-Vector 細胞比較時，我們可以在 Jurkat-Tet-On-PADI2 細胞膜的表面看見有 vimentin 的存在 (Fig. 10)。這說明細胞在凋亡的過程中 vimentin 有可能大量表現在細胞膜表面。同時收集細胞離心後的上清液，以濃縮管離心濃縮之後，用免疫沉澱法先結合抓下 vimentin 再以西方點墨法偵測上清液中的 vimentin 和 cit-vimentin。我們也確實在細胞外的上清液中發現有被分泌出來的 vimentin 且這些 vimentin 中有被瓜胺酸化的現象 (Fig.11A)。當我們將其量化，以 Jurkat-Tet-On-Vector 當做基準，比較 12hr 與 24hr 中 vimentin 和 cit-vimentin 數值的變化趨勢，可以發現在細胞上清液中被分泌出來的 vimentin 減少，而相反的 cit-vimentin 則呈增加趨勢，可能這些分泌出

來的 vimentin 會被瓜胺酸化。

由於 vimentin 可能是影響了細胞凋亡極重要的分子，且其為第二型胜肽精酸脫亞氨酶瓜胺酸的對象，因此我們預想是否由外直接補細胞的 vimentin 蛋白或者轉染 vimentin 基因至細胞內讓其過度表現，之後，細胞藉此能獲得更好的保護與生存能力。首先我們先養菌並大量純化得到 vimentin 的蛋白之後，在培養

Jurkat-Tet-On-PADI2 與 Jurkat-Tet-On-Vector 兩組細胞時，用 Dox 起始並加入 TPA 與 Ion 來活化細胞後，同時加入外源性的 vimentin 蛋白，我們發現在補充了 vimentin 蛋白的 Jurkat-Tet-On-PADI2 細胞，在相當程度上減輕了細胞凋亡的程度，這可能是因為在補充了 vimentin 蛋白之後，取代了原本會讓第二型胜肽精酸脫亞氨酶瓜胺酸化的 vimentin (Fig.12)。此外，除了由外補充 vimentin 蛋白，同時我們在基因層面轉染 vimentin 基因至細胞內表現後，再比較

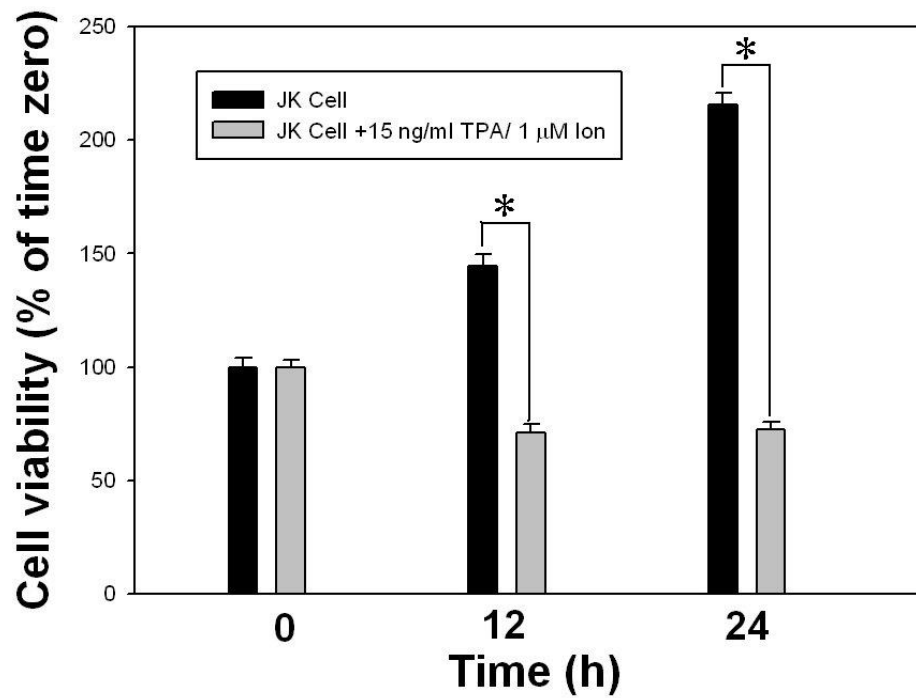
Jurkat-Tet-On-PADI2 與 Jurkat-Tet-On-Vector 兩組細胞，我們發現在轉染了 vimentin 基因的 Jurkat-Tet-On-PADI2 細胞組，除了表現更多的 vimentin 蛋白之外，蛋白質也有較高程度的瓜胺酸化表現 (Fig.13A)，但相對的細胞存活率卻較高 (Fig.13B)。這也說明了若細胞能額外提供 vimentin 讓第二型胜肽精酸脫亞氨酶作用，確實能使細胞獲得更好的存活，並減輕細胞凋亡的程度。

因此，我們相信第二型胜肽精酸脫亞氨酶在細胞內表現之後，其功能與第四型胜肽精酸脫亞氨酶是同樣重要的，其瓜胺酸化 vimentin 蛋白的作用可能對於細胞走向細胞凋亡有著相當程度的影響，而至於 vimentin 蛋白真正如何在細胞內作用與調控，其詳細的分子機制，則需在未來做更進一步的研究和探討。



**Figure 1**

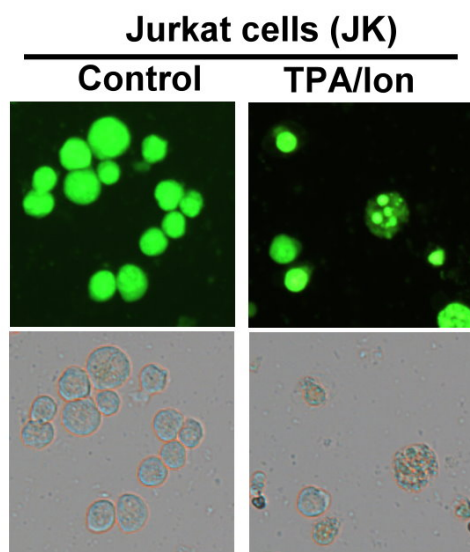
Cell viability by treating TPA and Ion. Jurkat (JK) cells were treated with TPA at 15 ng/ml and Ion at 1  $\mu$ M for 12 hr. Cell viability was determined by trypan blue exclusion assay at indicated time.



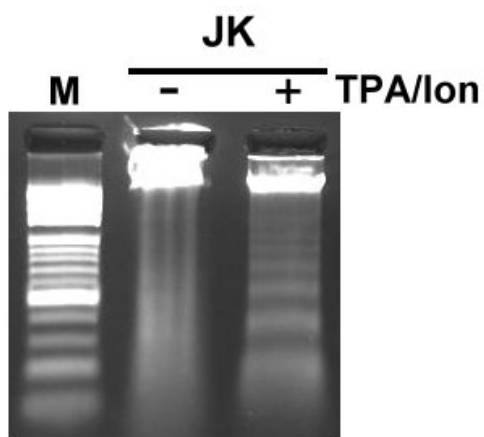
**Figure 2**

Jurkat cells were treated with TPA at 15 ng/ml and Ion at 1  $\mu$ M for 12 h. (A) Cells were stained with acridine orange and then analyzed by light microscope and fluorescent microscope. (B) DNA fragmentation was detected by DNA gel electrophoresis.

(A)

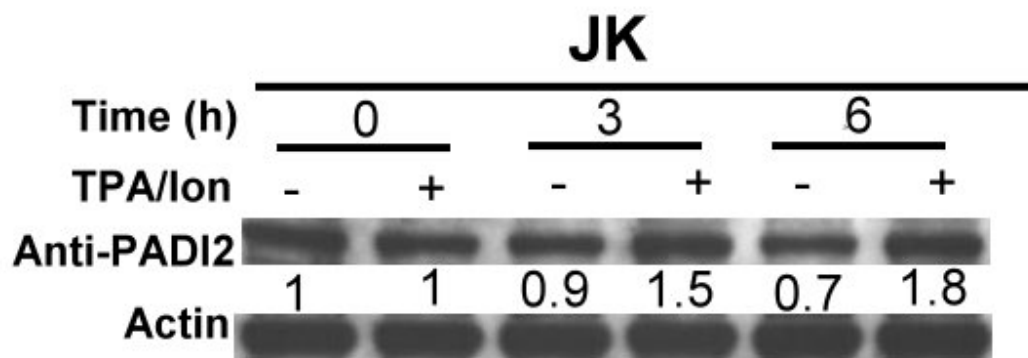


(B)



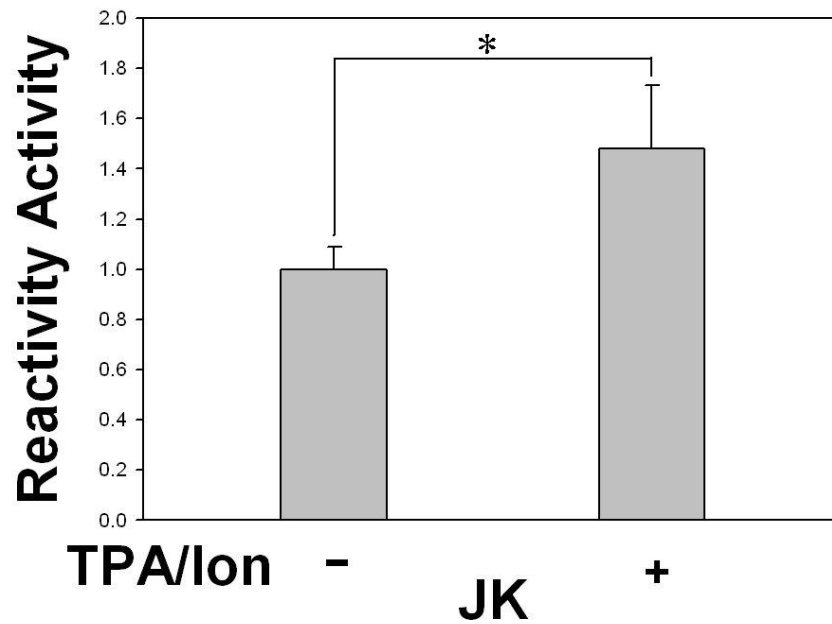
**Figure 3**

The expressive profiles of PADI2 in Jurkat cells. Following 15 ng/ml TPA and 1  $\mu$ M Ion treatment, Jurkat cell were harvested for the indicated time, total protein were extracted and analyzed by immunoblotting with PADI2 and actin antibodies.



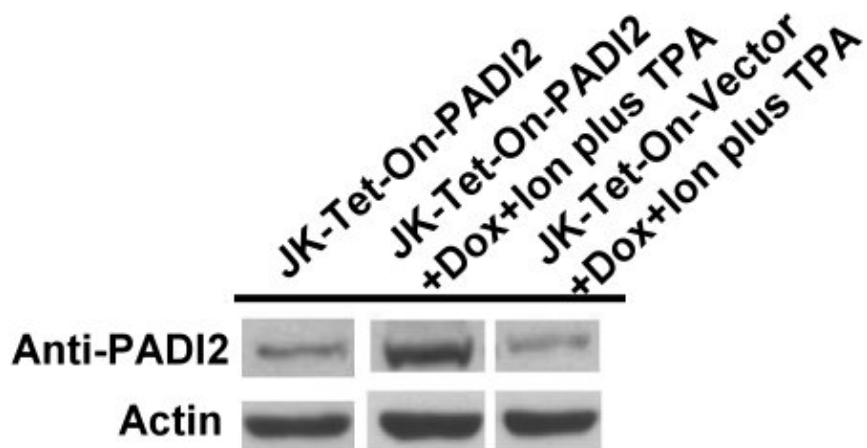
**Figure 4**

Jurkat cells were treated with TPA 15 ng/ml and 1  $\mu$ M Ion for 6 h, and harvested cell. PADI2 protein activity was detected by peptidylarginine deiminase activity assay (colorimetric).



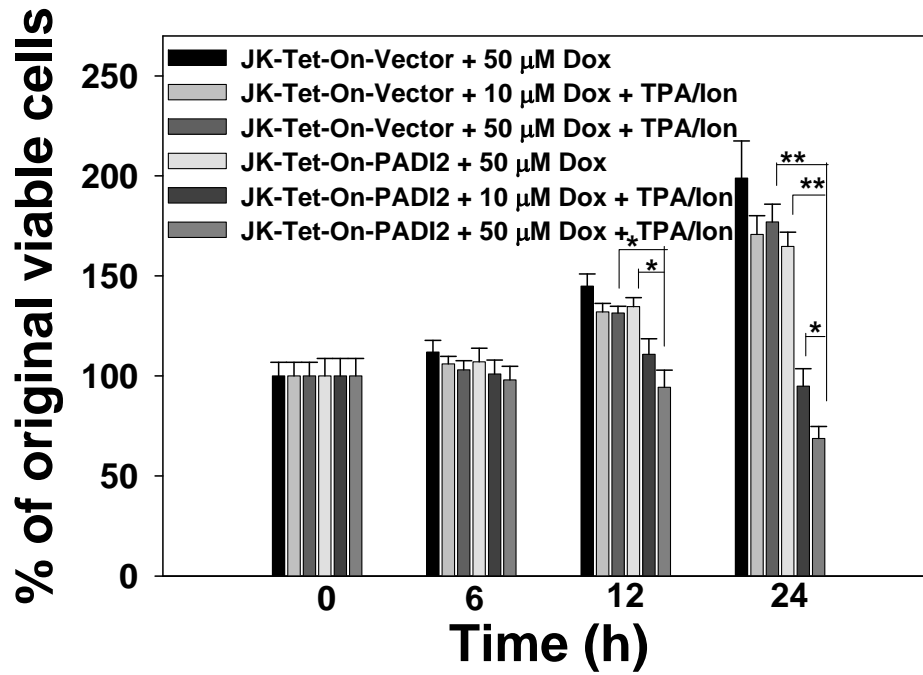
### Figure 5

The expressive profiles of PADI2 in JK-Tet-On PADI2 cells. JK-Tet-On PADI2 cells were treated with different concentrations (50, 0  $\mu$ M) of doxycycline (Dox) for 6 h and then treated with TPA 15 ng/ml / Ion 1  $\mu$ M . PADI2 protein was detected by immunoblotting with anti-PADI2 antibody. JK-Tet-On PADI2 and JK-Tet-On Vector were treated with Dox 50  $\mu$ M for 6 h and then treated with TPA 15 ng/ml / Ion 1  $\mu$ M. PADI2 protein was detected by immunoblotting with anti-PADI2 antibody.



**Figure 6**

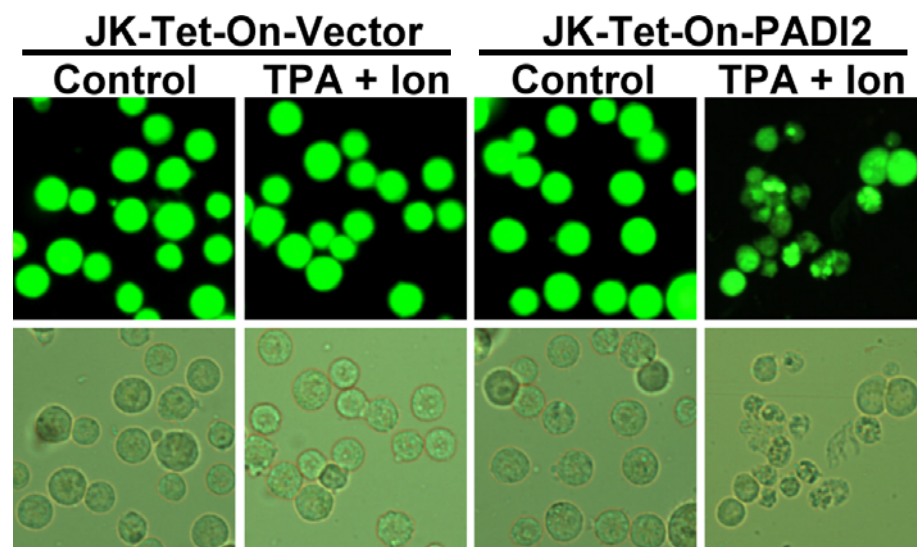
Cell viability of JK-Tet-On-Vector and JK-Tet-On-PADI2 cells. JK-Tet-On-Vector and JK-Tet-On-PADI2 were pretreated with Dox for 6 h, treated with or without TPA/Ion and then cell viability was determined by trypan blue exclusion assay.



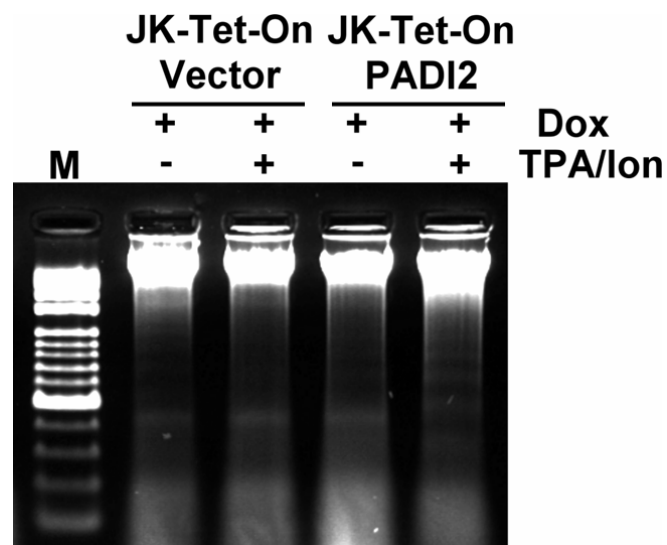
**Figure 7**

JK-Tet-On-Vector and JK-Tet-On-PADI2 were pretreated with Dox for 6h , treated with or without TPA/Ion. (A) Cell were stained with acridine orange and analyzed by light microscope and fluorescent microscope. (B) DNA fragmentation was detected by DNA gel electrophoresis.

(A)

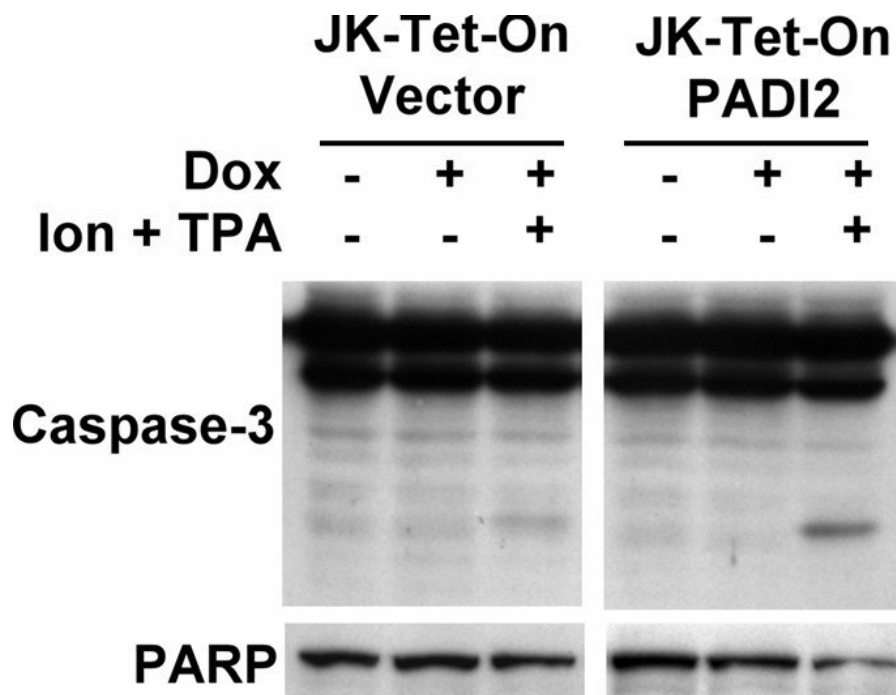


(B)



**Figure 8**

JK-Tet-On-Vector and JK-Tet-On-PADI2 were pretreated with or without Dox for 6 h, treated with or without TPA/Ion. Cells were harvested and total protein were extracted for immunoblotting with anti-Caspase-3,PARP antibody.

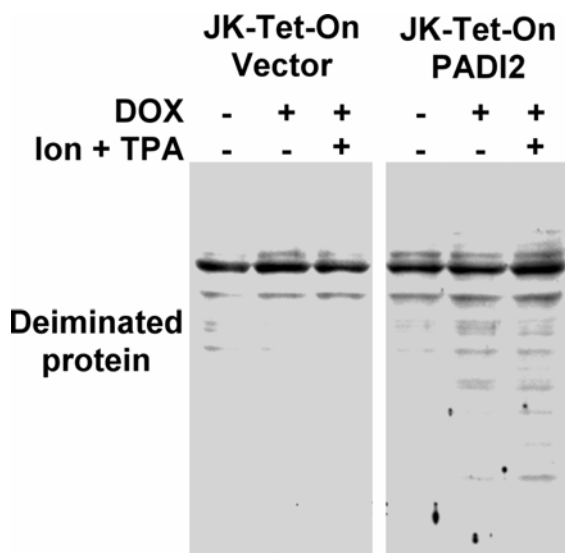




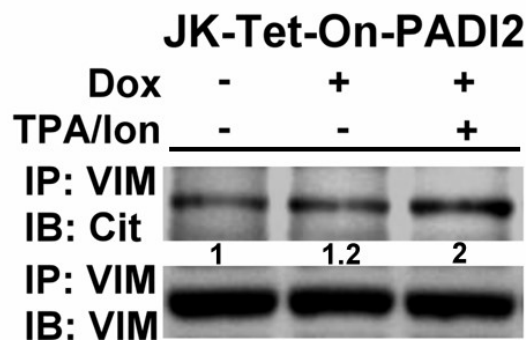
**Figure 9**

PADI2 citrullinated vimentin in T cell activation. The expression levels of citrullinated proteins in Jurkat-Tet-On PADI2 Cells. (A) JK-Tet-On-Vector and JK-Tet-On-PADI2 were pretreated with or without Dox for 6 h , treated with or without TPA/Ion. Cells were harvested and total protein were extracted for immunoblotting with anti-citrulline (anti-cit). (B) The cells were lysed, and the lysates were immunoprecipitated with anti-vimentin (anti-vim). The immunoprecipitates were analyzed by immunoblot with anti-vim and citrulline.

(A)

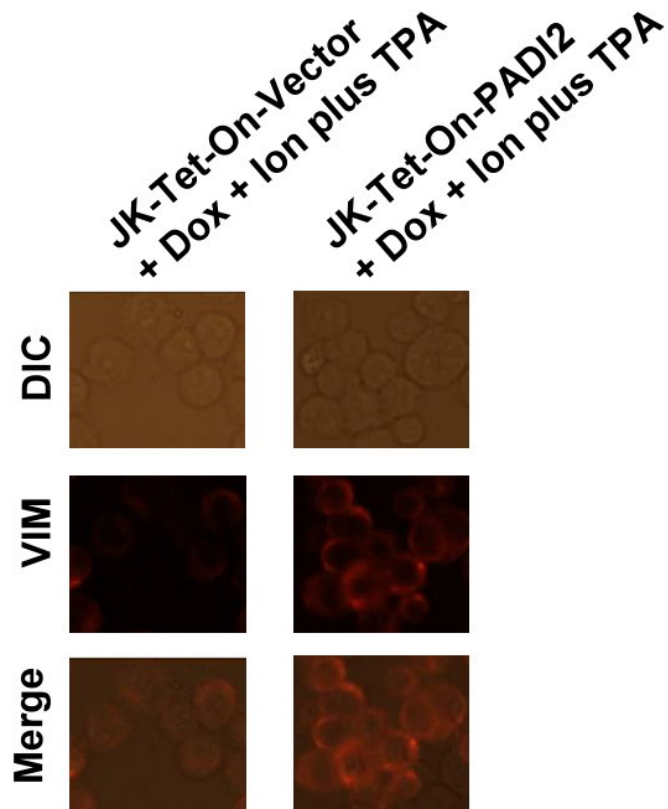


(B)



**Figure 10**

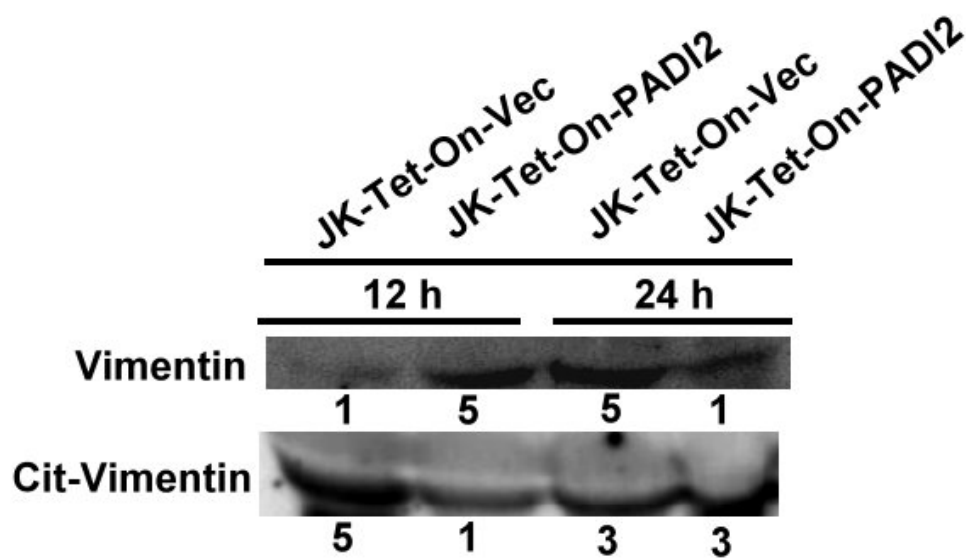
PADI2 enhanced the expression of vimentin on cellular surface after T cell activation. JK-Tet-On-Vector and JK-Tet-On-PADI2 cells were stained with anti-vimentin antibody, followed by rhodamine-conjugated anti-mouse secondary antibody (red). Confocal merge of anti-vimentin showed location of vimentin on cells.



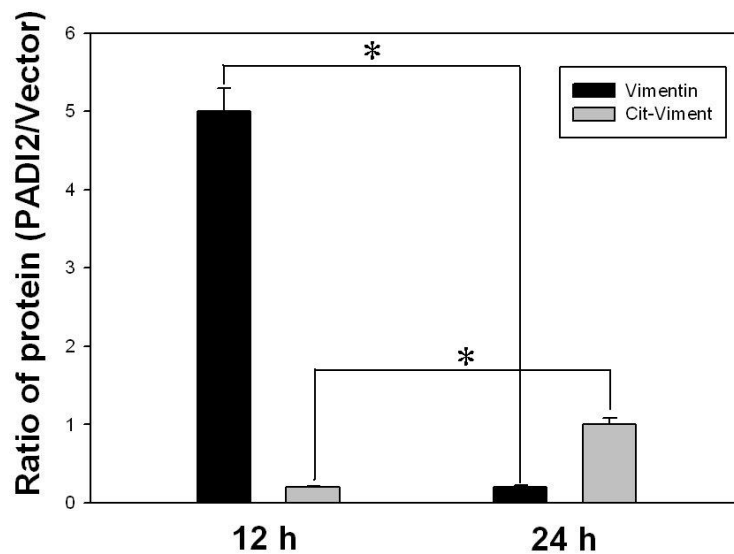
**Figure 11**

Vimentin and Cit-vimentin were secreted to supernatant after T cell activation. (A) The supernatants were immunoprecipitated with anti-vimentin (anti-vim). The immunoprecipitates were analyzed by immunoblot with anti-vim and citrulline. (B) The ratio (PADI2/Vector) of vimentin and Cit-vimentin.

(A)

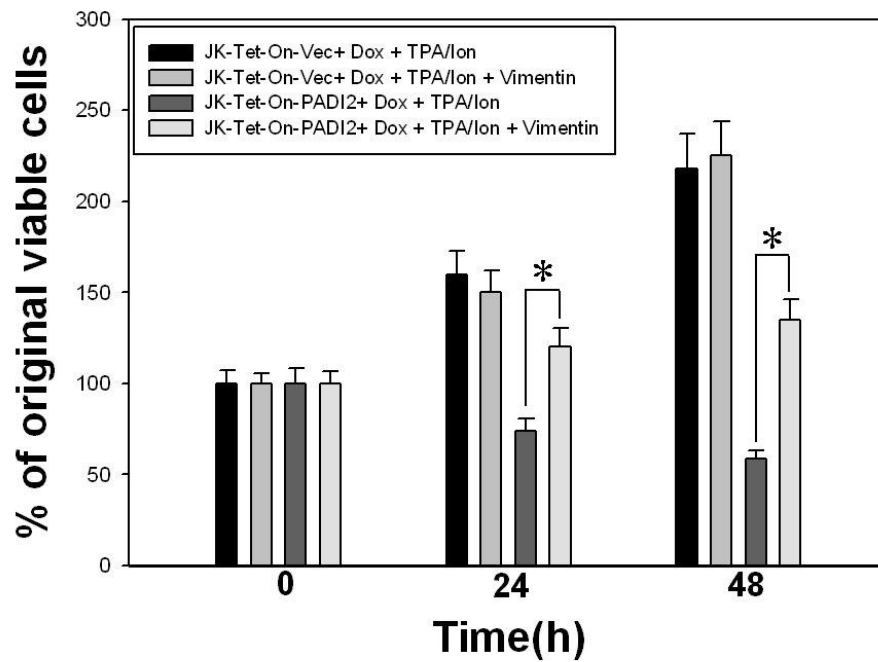


(B)



**Figure 12**

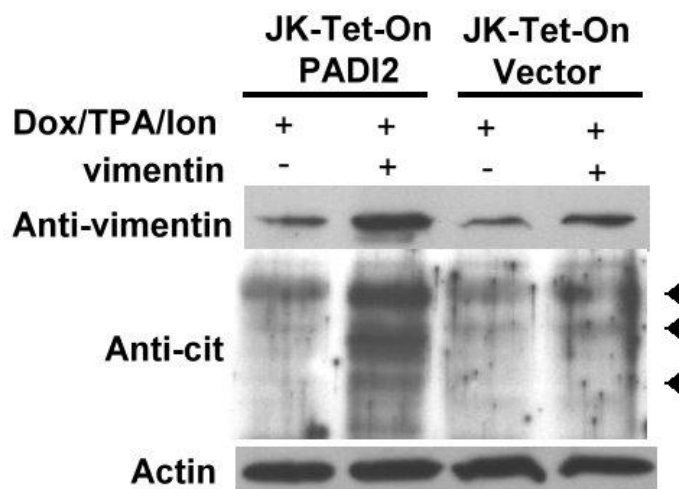
Effects of protein (vimentin) on cell viability of JK-Tet-On cells. JK-Tet-On-Vector and JK-Tet-On-PADI2 were pretreated with Dox for 6h, treated with TPA/Ion/vimentin. Cell viability was determined by trypan blue exclusion assay.



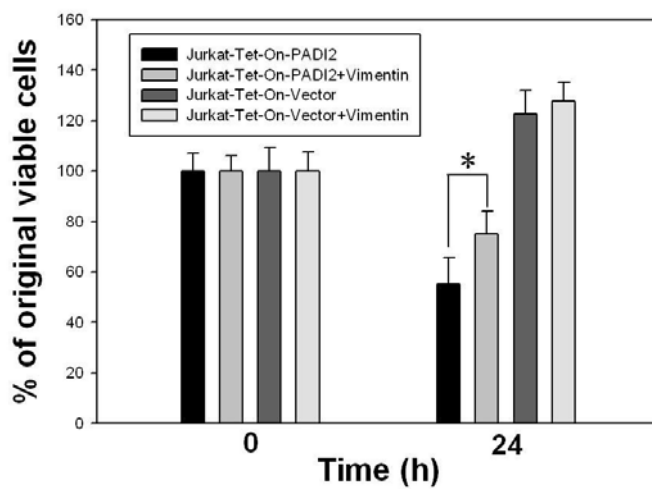
**Figure 13**

The effect of transient transfection on JK-Tet-On-PADI2 T cell. (A) JK-Tet-On-Vector and JK-Tet-On-PADI2 cells were transfected with vimentin for 24 h, then treated with Dox for 6 h and treated with TPA/Ion for 24 h. Cells were harvested and total protein were extracted for immunoblotting with anti-vimentin and anti-citrulline (anti-cit). (B) Cell viability was determined by trypan blue exclusion assay.

(A)



(B)



## References

**Appella, E. and Anderson, C. W.** (2000). Signaling to p53: breaking the posttranslational modification code. *Pathol Biol* (Paris) 48, 227-45.

**Arita, K., Hashimoto, H., Shimizu, T., Nakashima, K., Yamada, M. and Sato, M.** (2004). Structural basis for Ca(2+)-induced activation of human PAD4. *Nat Struct Mol Biol* 11, 777-83.

**Asaga, H., Yamada, M. and Senshu, T.** (1998). Selective deimination of vimentin in calcium ionophore-induced apoptosis of mouse peritoneal macrophages. *Biochem Biophys Res Commun* 243, 641-6.

**Bannikova S, Zorov DB, Shoeman RL, Tolstonog GV, Traub P.**(2005).Stability and association with the cytomatrix of mitochondrial DNA in spontaneously immortalized mouse embryo fibroblasts containing or lacking the intermediate filament protein vimentin. *DNA Cell Biol.* 24(11):710-35.

**Byun, Y., Chen, F., Chang, R., Trivedi, M., Green, K. J. and Cryns, V. L.** (2001). Caspase cleavage of vimentin disrupts intermediate filaments and promotes apoptosis. *Cell Death Differ* 8, 443-50.

**Cao, L., Goodin, R., Wood, D., Moscarello, M. A. and Whitaker, J. N.** (1999). Rapid release and unusual stability of immunodominant peptide 45-89 from citrullinated myelin basic protein. *Biochemistry* 38, 6157-63.

**Chang, X., Yamada, R., Sawada, T., Suzuki, A., Kochi, Y. and Yamamoto, K.** (2005a). The inhibition of antithrombin by peptidylarginine deiminase 4 may contribute to pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Rheumatology* (Oxford) 44, 293-8.

**Chang, X., Yamada, R., Suzuki, A., Sawada, T., Yoshino, S., Tokuhira, S. and Yamamoto, K.** (2005b). Localization of peptidylarginine deiminase 4 (PADI4) and citrullinated protein in synovial tissue of rheumatoid arthritis. *Rheumatology* (Oxford) 44, 40-50.

**Chavanas, S., Mechin, M. C., Takahara, H., Kawada, A., Nachat, R., Serre, G. and Simon, M.** (2004). Comparative analysis of the mouse and human peptidylarginine deiminase gene clusters reveals highly conserved non-coding segments and a new human gene, PADI6. *Gene* 330, 19-27.

**Cheng, W. H., Quimby, F. W. and Lei, X. G.** (2003). Impacts of glutathione peroxidase-1 knockout on the protection by injected selenium against the pro-oxidant-induced liver aponecrosis and signaling in selenium-deficient mice. *Free Radic Biol Med* 34, 918-27.

**Chipuk, J. E., Kuwana, T., Bouchier-Hayes, L., Droin, N. M., Newmeyer, D. D., Schuler, M. and Green, D. R.** (2004). Direct activation of Bax by p53 mediates

mitochondrial membrane permeabilization and apoptosis. *Science* 303, 1010-4.

**Cuthbert, G. L., Daujat, S., Snowden, A. W., Erdjument-Bromage, H., Hagiwara, T., Yamada, M., Schneider, R., Gregory, P. D., Tempst, P., Bannister, A. J. et al.** (2004). Histone deimination antagonizes arginine methylation. *Cell* 118, 545-53.

**Cutolo, M., Sulli, A., Barone, A., Seriola, B. and Accardo, S.** (1993). Macrophages, synovial tissue and rheumatoid arthritis. *Clin Exp Rheumatol* 11, 331-9.

**Denny, M. F., Chandaroy, P., Killen, P. D., Caricchio, R., Lewis, E. E., Richardson, B. C., Lee, K. D., Gavalchin, J. and Kaplan, M. J.** (2006). Accelerated macrophage apoptosis induces autoantibody formation and organ damage in systemic lupus erythematosus. *J Immunol* 176, 2095-104.

**Despres, N., Boire, G., Lopez-Longo, F. J. and Menard, H. A.** (1994). The Sa system: a novel antigen-antibody system specific for rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* 21, 1027-33.

**Dubucquoi, S., Solau-Gervais, E., Lefranc, D., Marguerie, L., Sibia, J., Goetz, J., Dutoit, V., Fauchais, A. L., Hachulla, E., Flipo, R. M. et al.** (2004). Evaluation of anti-citrullinated filaggrin antibodies as hallmarks for the diagnosis of rheumatic diseases. *Ann Rheum Dis* 63, 415-9.

**Forslind, K., Ahlmen, M., Eberhardt, K., Hafstrom, I. and Svensson, B.** (2004). Prediction of radiological outcome in early rheumatoid arthritis in clinical practice: role of antibodies to citrullinated peptides (anti-CCP). *Ann Rheum Dis* 63, 1090-5.

**Franke, W.W., Schmid, E., Osborn, M., Weber, K.,** 1978. DiVerent intermediate-sized Wlaments distinguished by immunoXuorescence microscopy. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75, 5034–5038.

**Gharbi S, Garzón B, Gayarre J, Timms J, Pérez-Sala D.**(2007). Study of protein targets for covalent modification by the antitumoral and anti-inflammatory prostaglandin PGA1: focus on vimentin. *J Mass Spectrom.* 2007 Nov;42(11):1474-84.

**Girbal, E., Sebbag, M., Gomes-Daudrix, V., Simon, M., Vincent, C. and Serre, G.** (1993). Characterisation of the rat oesophagus epithelium antigens defined by the so-called 'antikeratin antibodies', specific for rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 52, 749-57.

**Girbal-Neuhauser, E., Durieux, J. J., Arnaud, M., Dalbon, P., Sebbag, M., Vincent, C., Simon, M., Senshu, T., Masson-Bessiere, C., Jolivet-Reynaud, C. et al.** (1999). The epitopes targeted by the rheumatoid arthritis-associated antifilaggrin autoantibodies are posttranslationally generated on various sites of (pro)filaggrin by deimination of arginine residues. *J Immunol* 162, 585-94.

**Grootenboer-Mignot, S., Nicaise-Roland, P., Delaunay, C., Meyer, O.,**

**Chollet-Martin, S. and Labarre, C.** (2004). Second generation anti-cyclic citrullinated peptide (anti-CCP2) antibodies can replace other anti-filaggrin antibodies and improve rheumatoid arthritis diagnosis. *Scand J Rheumatol* 33, 218-20.

**Grossmann, J.** (2002). Molecular mechanisms of "detachment-induced apoptosis--Anoikis". *Apoptosis* 7, 247-60.

**Guerrin, M., Ishigami, A., Mechin, M. C., Nachat, R., Valmary, S., Sebbag, M., Simon, M., Senshu, T. and Serre, G.** (2003). cDNA cloning, gene organization and expression analysis of human peptidylarginine deiminase type I. *Biochem J* 370, 167-74.

**Hagiwara, T., Hidaka, Y. and Yamada, M.** (2005). Deimination of histone H2A and H4 at arginine 3 in HL-60 granulocytes. *Biochemistry* 44, 5827-34.

**Hagiwara, T., Nakashima, K., Hirano, H., Senshu, T. and Yamada, M.** (2002). Deimination of arginine residues in nucleophosmin/B23 and histones in HL-60 granulocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 290, 979-83.

**Shon HK, Cho KJ, Chung AS.**(2003). Survivin reduces activation-induced T cell death in G1 phase. *Mol Cells*. 2003 Oct 31;16(2):147-53.

**Hingorani, K., Szebeni, A. and Olson, M. O.** (2000). Mapping the functional domains of nucleolar protein B23. *J Biol Chem* 275, 24451-7.

**Hoet, R. M., Voorsmit, R. A. and Van Venrooij, W. J.** (1991). The perinuclear factor, a rheumatoid arthritis-specific autoantigen, is not present in keratohyalin granules of cultured buccal mucosa cells. *Clin Exp Immunol* 84, 59-65.

**Huang, C. C., Hsu, P. C., Hung, Y. C., Liao, Y. F., Liu, C. C., Hour, C. T., Kao, M. C., Tsay, G. J., Hung, H. C. and Liu, G. Y.** (2005). Ornithine decarboxylase prevents methotrexate-induced apoptosis by reducing intracellular reactive oxygen species production. *Apoptosis* 10, 895-907.

**Hueber, W., Kidd, B. A., Tomooka, B. H., Lee, B. J., Bruce, B., Fries, J. F., Sonderstrup, G., Monach, P., Drijfhout, J. W., van Venrooij, W. J. et al.** (2005). Antigen microarray profiling of autoantibodies in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 52, 2645-55.

**Huizinga, T. W., Amos, C. I., van der Helm-van Mil, A. H., Chen, W., van Gaalen, F. A., Jawaheer, D., Schreuder, G. M., Wener, M., Breedveld, F. C., Ahmad, N. et al.** (2005). Refining the complex rheumatoid arthritis phenotype based on specificity of the HLA-DRB1 shared epitope for antibodies to citrullinated proteins. *Arthritis Rheum* 52, 3433-8.

**Inagaki, M., Nishi, Y., Nishizawa, K., Matsuyama, M. and Sato, C.** (1987). Site-specific phosphorylation induces disassembly of vimentin filaments in vitro. *Nature* 328, 649-52.

**Inagaki, M., Takahara, H., Nishi, Y., Sugawara, K. and Sato, C.** (1989).



Ca<sup>2+</sup>-dependent deimination-induced disassembly of intermediate filaments involves specific modification of the amino-terminal head domain. *J Biol Chem* 264, 18119-27.

**Ishida-Yamamoto, A., Senshu, T., Eady, R. A., Takahashi, H., Shimizu, H., Akiyama, M. and Iizuka, H.** (2002). Sequential reorganization of cornified cell keratin filaments involving filaggrin-mediated compaction and keratin 1 deimination. *J Invest Dermatol* 118, 282-7.

**Ishida-Yamamoto, A., Senshu, T., Takahashi, H., Akiyama, K., Nomura, K. and Iizuka, H.** (2000). Decreased deiminated keratin K1 in psoriatic hyperproliferative epidermis. *J Invest Dermatol* 114, 701-5.

**Ishigami, A., Ohsawa, T., Asaga, H., Akiyama, K., Kuramoto, M. and Maruyama, N.** (2002). Human peptidylarginine deiminase type II: molecular cloning, gene organization, and expression in human skin. *Arch Biochem Biophys* 407, 25-31.

**Ishigami, A., Ohsawa, T., Hiratsuka, M., Taguchi, H., Kobayashi, S., Saito, Y., Murayama, S., Asaga, H., Toda, T., Kimura, N. et al.** (2005). Abnormal accumulation of citrullinated proteins catalyzed by peptidylarginine deiminase in hippocampal extracts from patients with Alzheimer's disease. *J Neurosci Res* 80, 120-8.

**Itoh, K., Hase, H., Kojima, H., Saotome, K., Nishioka, K. and Kobata, T.** (2004). Central role of mitochondria and p53 in Fas-mediated apoptosis of rheumatoid synovial fibroblasts. *Rheumatology* (Oxford) 43, 277-85.

**Kang, C. P., Lee, H. S., Ju, H., Cho, H., Kang, C. and Bae, S. C.** (2006). A functional haplotype of the PADI4 gene associated with increased rheumatoid arthritis susceptibility in Koreans. *Arthritis Rheum* 54, 90-6.

**Kanno, T., Kawada, A., Yamanouchi, J., Yosida-Noro, C., Yoshiki, A., Shiraiwa, M., Kusakabe, M., Manabe, M., Tezuka, T. and Takahara, H.** (2000). Human peptidylarginine deiminase type III: molecular cloning and nucleotide sequence of the cDNA, properties of the recombinant enzyme, and immunohistochemical localization in human skin. *J Invest Dermatol* 115, 813-23.

**Kastbom, A., Strandberg, G., Lindroos, A. and Skogh, T.** (2004). Anti-CCP antibody test predicts the disease course during 3 years in early rheumatoid arthritis (the Swedish TIRA project). *Ann Rheum Dis* 63, 1085-9.

**Kinloch, A., Tatzer, V., Wait, R., Peston, D., Lundberg, K., Donatien, P., Moyes, D., Taylor, P. C. and Venables, P. J.** (2005). Identification of citrullinated alpha-enolase as a candidate autoantigen in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther* 7, R1421-9.

**Klareskog, L., Stolt, P., Lundberg, K., Kallberg, H., Bengtsson, C., Grunewald, J., Ronnelid, J., Harris, H. E., Ulfgren, A. K., Rantapaa-Dahlqvist, S. et al.** (2006). A new model for an etiology of rheumatoid arthritis: smoking may

trigger HLA-DR (shared epitope)-restricted immune reactions to autoantigens modified by citrullination. *Arthritis Rheum* 54, 38-46.

**Kroot, E. J., de Jong, B. A., van Leeuwen, M. A., Swinkels, H., van den Hoogen, F. H., van't Hof, M., van de Putte, L. B., van Rijswijk, M. H., van Venrooij, W. J. and van Riel, P. L.** (2000). The prognostic value of anti-cyclic citrullinated peptide antibody in patients with recent-onset rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 43, 1831-5.

**Levine, B.** (2005). Eating oneself and uninvited guests: autophagy-related pathways in cellular defense. *Cell* 120, 159-62.

**Li QF, Spinelli AM, Wang R, Anfinogenova Y, Singer HA, Tang DD.**(2006). Critical role of vimentin phosphorylation at Ser-56 by p21-activated kinase in vimentin cytoskeleton signaling. *J Biol Chem.* 2006 Nov 10;281(45):34716-24. Epub 2006 Sep 20.

**Liao, Y. F., Hsieh, H. C., Liu, G. Y. and Hung, H. C.** (2005). A continuous spectrophotometric assay method for peptidylarginine deiminase type 4 activity. *Anal Biochem* 347, 176-81.

**Liu, G. Y., Hung, Y. C., Hsu, P. C., Liao, Y. F., Chang, W. H., Tsay, G. J. and Hung, H. C.** (2005). Ornithine decarboxylase prevents tumor necrosis factor alpha-induced apoptosis by decreasing intracellular reactive oxygen species. *Apoptosis* 10, 569-81.

**Liu, G. Y., Liao, Y. F., Chang, W. H., Liu, C. C., Hsieh, M. C., Hsu, P. C., Tsay, G. J. and Hung, H. C.** (2006). Overexpression of peptidylarginine deiminase IV features in apoptosis of haematopoietic cells. *Apoptosis* 11, 183-96.

**Liu, H. and Pope, R. M.** (2003). The role of apoptosis in rheumatoid arthritis. *Curr Opin Pharmacol* 3, 317-22.

**Lum, J. J., Bauer, D. E., Kong, M., Harris, M. H., Li, C., Lindsten, T. and Thompson, C. B.** (2005). Growth factor regulation of autophagy and cell survival in the absence of apoptosis. *Cell* 120, 237-48.

**Maruyama, N. and Ishigami, A.** (2005). [Pathophysiological significances of citrullinated proteins in geriatric diseases]. *Nippon Ronen Igakkai Zasshi* 42, 519-22.

**Masson-Bessiere, C., Sebbag, M., Durieux, J. J., Nogueira, L., Vincent, C., Girbal-Neuhauser, E., Durroux, R., Cantagrel, A. and Serre, G.** (2000). In the rheumatoid pannus, anti-filaggrin autoantibodies are produced by local plasma cells and constitute a higher proportion of IgG than in synovial fluid and serum. *Clin Exp Immunol* 119, 544-52.

**Masson-Bessiere, C., Sebbag, M., Girbal-Neuhauser, E., Nogueira, L., Vincent, C., Senshu, T. and Serre, G.** (2001). The major synovial targets of the rheumatoid arthritis-specific antifilaggrin autoantibodies are deiminated forms of the

alpha- and beta-chains of fibrin. *J Immunol* 166, 4177-84.

**Masters, E. J.** (1993). Erythema migrans. Rash as key to early diagnosis of Lyme disease. *Postgrad Med* 94, 133-4, 137-42.

**Menard, H. A., Lapointe, E., Rochdi, M. D. and Zhou, Z. J.** (2000). Insights into rheumatoid arthritis derived from the Sa immune system. *Arthritis Res* 2, 429-32.

**Meredith, J., Walley, B. and Meredith, J. W.** (1980). A simple technique for thrombectomy of vein grafts in the arterial system. *Surg Gynecol Obstet* 151, 424-5.

**Mizoguchi, M., Manabe, M., Kawamura, Y., Kondo, Y., Ishidoh, K., Kominami, E., Watanabe, K., Asaga, H., Senshu, T. and Ogawa, H.** (1998). Deimination of 70-kD nuclear protein during epidermal apoptotic events in vitro. *J Histochem Cytochem* 46, 1303-9.

**Moscarello, M. A., Wood, D. D., Ackerley, C. and Boulias, C.** (1994). Myelin in multiple sclerosis is developmentally immature. *J Clin Invest* 94, 146-54.

**Muller, K., Dulku, S., Hardwick, S. J., Skepper, J. N. and Mitchinson, M. J.** (2001). Changes in vimentin in human macrophages during apoptosis induced by oxidised low density lipoprotein. *Atherosclerosis* 156, 133-44.

**Munoz-Alonso, M. J., Acosta, J. C., Richard, C., Delgado, M. D., Sedivy, J. and Leon, J.** (2005). p21Cip1 and p27Kip1 induce distinct cell cycle effects and differentiation programs in myeloid leukemia cells. *J Biol Chem* 280, 18120-9.

**Nakashima, K., Hagiwara, T., Ishigami, A., Nagata, S., Asaga, H., Kuramoto, M., Senshu, T. and Yamada, M.** (1999). Molecular characterization of peptidylarginine deiminase in HL-60 cells induced by retinoic acid and 1alpha,25-dihydroxyvitamin D(3). *J Biol Chem* 274, 27786-92.

**Nakashima, K., Hagiwara, T. and Yamada, M.** (2002). Nuclear localization of peptidylarginine deiminase V and histone deimination in granulocytes. *J Biol Chem* 277, 49562-8.

**Nielen, M. M., van Schaardenburg, D., Reesink, H. W., van de Stadt, R. J., van der Horst-Bruinsma, I. E., de Koning, M. H., Habibuw, M. R., Vandenbroucke, J. P. and Dijkmans, B. A.** (2004). Specific autoantibodies precede the symptoms of rheumatoid arthritis: a study of serial measurements in blood donors. *Arthritis Rheum* 50, 380-6.

**Nienhuis, R. L. and Mandema, E.** (1964). A New Serum Factor in Patients with Rheumatoid Arthritis; the Antiperinuclear Factor. *Ann Rheum Dis* 23, 302-5.

**Nijenhuis, S., Zendman, A. J., Vossenaar, E. R., Pruijn, G. J. and vanVenrooij, W. J.** (2004). Autoantibodies to citrullinated proteins in rheumatoid arthritis: clinical performance and biochemical aspects of an RA-specific marker. *Clin Chim Acta* 350, 17-34.

**Norbury, C. J. and Zhivotovsky, B.** (2004). DNA damage-induced apoptosis.

*Oncogene* 23, 2797-808.

**Okazaki, Y., Suzuki, A., Sawada, T., Ohtake-Yamanaka, M., Inoue, T., Hasebe, T., Yamada, R. and Yamamoto, K.** (2006). Identification of citrullinated eukaryotic translation initiation factor 4G1 as novel autoantigen in rheumatoid arthritis. *Biochem Biophys Res Commun* 341, 94-100.

**Okuda, M.** (2002). The role of nucleophosmin in centrosome duplication. *Oncogene* 21, 6170-4.

**Perlson E, Hanz S, Ben-Yaakov K, Segal-Ruder Y, Seger R, Fainzilber M.** (2005) Vimentin-dependent spatial translocation of an activated MAP kinase in injured nerve. *Neuron*;45(5):715-26.

**Pinheiro, G. C., Scheinberg, M. A., Aparecida da Silva, M. and Maciel, S.** (2003). Anti-cyclic citrullinated peptide antibodies in advanced rheumatoid arthritis. *Ann Intern Med* 139, 234-5.

**Rantapaa-Dahlqvist, S., de Jong, B. A., Berglin, E., Hallmans, G., Wadell, G., Stenlund, H., Sundin, U. and van Venrooij, W. J.** (2003). Antibodies against cyclic citrullinated peptide and IgA rheumatoid factor predict the development of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 48, 2741-9.

**Reparon-Schuijt, C. C., van Esch, W. J., van Kooten, C., Schellekens, G. A., de Jong, B. A., van Venrooij, W. J., Breedveld, F. C. and Verweij, C. L.** (2001). Secretion of anti-citrulline-containing peptide antibody by B lymphocytes in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 44, 41-7.

**Rodenburg, R. J., Ganga, A., van Lent, P. L., van de Putte, L. B. and van Venrooij, W. J.** (2000). The antiinflammatory drug sulfasalazine inhibits tumor necrosis factor alpha expression in macrophages by inducing apoptosis. *Arthritis Rheum* 43, 1941-50.

**Salmon, M., Scheel-Toellner, D., Huissoon, A. P., Pilling, D., Shamsadeen, N., Hyde, H., D'Angeac, A. D., Bacon, P. A., Emery, P. and Akbar, A. N.** (1997). Inhibition of T cell apoptosis in the rheumatoid synovium. *J Clin Invest* 99, 439-46.

**Sasamura, S., Furukawa, K., Shiratori, M., Motomura, S. and Ohizumi, Y.** (2002). Antisense-inhibition of plasma membrane Ca<sup>2+</sup> pump induces apoptosis in vascular smooth muscle cells. *Jpn J Pharmacol* 90, 164-72.

**Schellekens, G. A., de Jong, B. A., van den Hoogen, F. H., van de Putte, L. B. and van Venrooij, W. J.** (1998). Citrulline is an essential constituent of antigenic determinants recognized by rheumatoid arthritis-specific autoantibodies. *J Clin Invest* 101, 273-81.

**Schellekens, G. A., Visser, H., de Jong, B. A., van den Hoogen, F. H., Hazes, J. M., Breedveld, F. C. and van Venrooij, W. J.** (2000). The diagnostic properties of rheumatoid arthritis antibodies recognizing a cyclic citrullinated peptide. *Arthritis*

*Rheum* 43, 155-63.

**Schuler, M. and Green, D. R.** (2005). Transcription, apoptosis and p53: catch-22. *Trends Genet* 21, 182-7.

**Sebbag, M., Simon, M., Vincent, C., Masson-Bessiere, C., Girbal, E., Durieux, J. J. and Serre, G.** (1995). The antiperinuclear factor and the so-called antikeratin antibodies are the same rheumatoid arthritis-specific autoantibodies. *J Clin Invest* 95, 2672-9.

**Senshu, T., Akiyama, K., Ishigami, A. and Nomura, K.** (1999a). Studies on specificity of peptidylarginine deiminase reactions using an immunochemical probe that recognizes an enzymatically deiminated partial sequence of mouse keratin K1. *J Dermatol Sci* 21, 113-26.

**Senshu, T., Akiyama, K., Nagata, S., Watanabe, K. and Hikichi, K.** (1989). Peptidylarginine deiminase in rat pituitary: sex difference, estrous cycle-related changes, and estrogen dependence. *Endocrinology* 124, 2666-70.

**Senshu, T., Akiyama, K. and Nomura, K.** (1999b). Identification of citrulline residues in the V subdomains of keratin K1 derived from the cornified layer of newborn mouse epidermis. *Exp Dermatol* 8, 392-401.

**Senshu, T., Kan, S., Ogawa, H., Manabe, M. and Asaga, H.** (1996). Preferential deimination of keratin K1 and filaggrin during the terminal differentiation of human epidermis. *Biochem Biophys Res Commun* 225, 712-9.

**Simon, M., Girbal, E., Sebbag, M., Gomes-Daudrix, V., Vincent, C., Salama, G. and Serre, G.** (1993). The cytokeratin filament-aggregating protein filaggrin is the target of the so-called "antikeratin antibodies," autoantibodies specific for rheumatoid arthritis. *J Clin Invest* 92, 1387-93.

**Soderlin, M. K., Kastbom, A., Kautiainen, H., Leirisalo-Repo, M., Strandberg, G. and Skogh, T.** (2004). Antibodies against cyclic citrullinated peptide (CCP) and levels of cartilage oligomeric matrix protein (COMP) in very early arthritis: relation to diagnosis and disease activity. *Scand J Rheumatol* 33, 185-8.

**Sondag-Tschroots, I. R., Aaij, C., Smit, J. W. and Feltkamp, T. E.** (1979). The antiperinuclear factor. 1. The diagnostic significance of the antiperinuclear factor for rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 38, 248-51.

**Suzuki, A., Yamada, R., Chang, X., Tokuhira, S., Sawada, T., Suzuki, M., Nagasaki, M., Nakayama-Hamada, M., Kawaida, R., Ono, M. et al.** (2003). Functional haplotypes of PADI4, encoding citrullinating enzyme peptidylarginine deiminase 4, are associated with rheumatoid arthritis. *Nat Genet* 34, 395-402.

**Suzuki, A., Yamada, R., Ohtake-Yamanaka, M., Okazaki, Y., Sawada, T. and Yamamoto, K.** (2005). Anti-citrullinated collagen type I antibody is a target of autoimmunity in rheumatoid arthritis. *Biochem Biophys Res Commun* 333, 418-26.

**Takemura, M., Ohoka, F., Perpelescu, M., Ogawa, M., Matsushita, H., Takaba, T., Akiyama, T., Umekawa, H., Furuichi, Y., Cook, P. R. et al.** (2002). Phosphorylation-dependent migration of retinoblastoma protein into the nucleolus triggered by binding to nucleophosmin/B23. *Exp Cell Res* 276, 233-41.

**Tarcsa, E., Marekov, L. N., Mei, G., Melino, G., Lee, S. C. and Steinert, P. M.** (1996). Protein unfolding by peptidylarginine deiminase. Substrate specificity and structural relationships of the natural substrates trichohyalin and filaggrin. *J Biol Chem* 271, 30709-16.

**Tolstonog GV, Belichenko-Weitzmann IV, Lu JP, Hartig R, Shoeman RL, Traub U, Traub P.**(2005) Spontaneously immortalized mouse embryo fibroblasts: growth behavior of wild-type and vimentin-deficient cells in relation to mitochondrial structure and activity. *DNA Cell Biol.* 2005 Nov;24(11):680-709.

**Tombal, B., Denmeade, S. R., Gillis, J. M. and Isaacs, J. T.** (2002). A supramicromolar elevation of intracellular free calcium ( $[Ca^{2+}]_i$ ) is consistently required to induce the execution phase of apoptosis. *Cell Death Differ* 9, 561-73.

**Tommasi, C., Petit-Teixeira, E., Cournu-Rebeix, I., Caponi, L., Pierlot, C., Fontaine, B., Cornelis, F. and Migliorini, P.** (2006). PADI4 gene in multiple sclerosis: A family-based association study. *J Neuroimmunol* 177, 142-5.

**Union, A., Meheus, L., Humbel, R. L., Conrad, K., Steiner, G., Moereels, H., Pottel, H., Serre, G. and De Keyser, F.** (2002). Identification of citrullinated rheumatoid arthritis-specific epitopes in natural filaggrin relevant for antifilaggrin autoantibody detection by line immunoassay. *Arthritis Rheum* 46, 1185-95.

**Vallbracht, I., Rieber, J., Oppermann, M., Forger, F., Siebert, U. and Helmke, K.** (2004). Diagnostic and clinical value of anti-cyclic citrullinated peptide antibodies compared with rheumatoid factor isotypes in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 63, 1079-84.

**van Boekel, M. A., Vossenaar, E. R., van den Hoogen, F. H. and van Venrooij, W. J.** (2002). Autoantibody systems in rheumatoid arthritis: specificity, sensitivity and diagnostic value. *Arthritis Res* 4, 87-93.

**van Venrooij, W. J., Hazes, J. M. and Visser, H.** (2002). Anticitrullinated protein/peptide antibody and its role in the diagnosis and prognosis of early rheumatoid arthritis. *Neth J Med* 60, 383-8.

**Vasishta, A.** (2002). Diagnosing early-onset rheumatoid arthritis: the role of anti-CCP antibodies. *Am Clin Lab* 21, 34-6.

**Vincent, C., Serre, G., Lapeyre, F., Fournie, B., Ayrolles, C., Fournie, A. and Soleilhavoup, J. P.** (1989). High diagnostic value in rheumatoid arthritis of antibodies to the stratum corneum of rat oesophagus epithelium, so-called 'antikeratin antibodies'. *Ann Rheum Dis* 48, 712-22.

**Visser, H., le Cessie, S., Vos, K., Breedveld, F. C. and Hazes, J. M.** (2002). How to diagnose rheumatoid arthritis early: a prediction model for persistent (erosive) arthritis. *Arthritis Rheum* 46, 357-65.

**Vossenaar, E. R., Nijenhuis, S., Helsen, M. M., van der Heijden, A., Senshu, T., van den Berg, W. B., van Venrooij, W. J. and Joosten, L. A.** (2003a). Citrullination of synovial proteins in murine models of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 48, 2489-500.

**Vossenaar, E. R., Radstake, T. R., van der Heijden, A., van Mansum, M. A., Dieteren, C., de Rooij, D. J., Barrera, P., Zendman, A. J. and van Venrooij, W. J.** (2004). Expression and activity of citrullinating peptidylarginine deiminase enzymes in monocytes and macrophages. *Ann Rheum Dis* 63, 373-81.

**Vossenaar, E. R., Zendman, A. J., van Venrooij, W. J. and Pruijn, G. J.** (2003b). PAD, a growing family of citrullinating enzymes: genes, features and involvement in disease. *Bioessays* 25, 1106-18.

**Wang, Y., Wysocka, J., Sayegh, J., Lee, Y. H., Perlin, J. R., Leonelli, L., Sonbuchner, L. S., McDonald, C. H., Cook, R. G., Dou, Y. et al.** (2004). Human PAD4 regulates histone arginine methylation levels via demethylination. *Science* 306, 279-83.

**Wood, D. D., Bilbao, J. M., O'Connors, P. and Moscarello, M. A.** (1996). Acute multiple sclerosis (Marburg type) is associated with developmentally immature myelin basic protein. *Ann Neurol* 40, 18-24.

**Wright, P. W., Bolling, L. C., Calvert, M. E., Sarmiento, O. F., Berkeley, E. V., Shea, M. C., Hao, Z., Jayes, F. C., Bush, L. A., Shetty, J. et al.** (2003). ePAD, an oocyte and early embryo-abundant peptidylarginine deiminase-like protein that localizes to egg cytoplasmic sheets. *Dev Biol* 256, 73-88.

**Youinou, P., Le Goff, P., Colaco, C. B., Thivolet, J., Tater, D., Viac, J. and Shipley, M.** (1985). Antikeratin antibodies in serum and synovial fluid show specificity for rheumatoid arthritis in a study of connective tissue diseases. *Ann Rheum Dis* 44, 450-4.

**Zhao Y, Yan Q, Long X, Chen X, Wang Y.**(2008) Vimentin affects the mobility and invasiveness of prostate cancer cells. *Cell Biochem Funct.*;26(5):571-7.

## 出席國際學術會議心得報告

計畫編號	96-2314-B-040-008-MY3
計畫名稱	The peptidylarginine deiminases function in the immune system: discuss the pathogenesis of rheumatoid arthritis
出國人員姓名 服務機關及職稱	劉光耀；中山醫學大學免疫學研究所；教授兼所長
會議時間地點	20010/02/04~2010/02/07；凡吐拉市，加州，美國；Ventura, CA, USA
會議名稱	(中文) 戈登研究研討會：生物無機化學 (英文) Gordon Research Conferences, Conference Program: Bioinorganic Chemistry
相關內容	The calcium function of peptidylarginine deiminases in the immune disease: rheumatoid arthritis

### 一、參加會議經過

此次會議於美國西岸加州凡吐拉市海岸城市舉行，冬季氣候陰濕，海岸風強，太陽日出日落正常，然而美國西岸晝夜溫差仍大，雖說如此，凡吐拉市鎮樸實而且寧靜，極適合研究研討會的舉辦。凡吐拉市有許多的古蹟、教堂與古老街道，非常漂亮，交通較不便利，較少舉行國際會議的地方，由其城市到洛杉磯有段距離，自行開車較易熟悉閒暇的小鎮。

戈登研究研討會：生物無機化學於美國凡吐拉市 (Bioinorganic Chemistry *Gordon Research Seminar* February 4-7, 2010 Four Points Sheraton / Holiday Inn Express, Ventura, CA)舉行，自2010年2月4日起至2月7日止，為期四天，共有來自世界各地學者、學生與廠商逾三~四百人與會，會中壁報展示的時間2月4日起至2月7日止。議程包括專題演講與壁報展示，其中的專題演講如下；由相關領域頂尖學者提供研究上的第一手資訊和與會研究者分享。本會議之基本架構在於透過學術研討會的活動模式，發表各領域學者專家為生物無機化學成份生物功能及其設計的成果。透過研討會中各種專題演講、論文發表、討論會及壁報發表等機會，相互切磋學習，提供與會人員多元且豐富的資訊。本次會議討論的主題相當多元，包括：

1. Coordinated radicals in biology and transition metal chemistry
2. Metal Homeostasis and Transport
3. The interplay between zinc and manganese homeostasis in *Streptococcus*
4. Ni(II)-binding properties of the metallochaperone, SlyD
5. Biophysical probes of iron metabolism in yeast mitochondria
6. Characterization of key players in the mitochondrial Fe-S cluster assembly pathway
7. Spectroscopic studies of copper binding to N-terminal hCtr1 model peptides
8. Biomineralization and Bioinspired Materials



9. Directed laboratory evolution of biomineralizing enzymes
10. Metal directed protein dimerization through hybrid coordination motifs
11. Metalloenzyme Kinetics and Mechanisms
12. Crystallographic studies of CO to CO interconversion at a NiFeS cluster
13. Studies on the water-oxidizing mechanism in Photosystem II with inhibitory zwitterions
14. How aliphatic halogenases prevent competing hydroxylation
15. Implications for intramolecular electron transfer rates and steady state kinetics of human sulfite oxidase in probing the role of aromatic residues in the active site
16. Chemical and structural consequences of heme distortion in H-NOX proteins"
17. Metals in Medicine and Metallodrug Design
18. Hydrolytic behavior and cytotoxicity of bis(phenolato) Ti(IV) complexes
19. Dinuclear supramolecular rhodium (III) diimine complexes as DNA-binding cytotoxic Drugs
20. Biomimetic Renewable Energy
21. Characterisation and Application of the H<sub>2</sub>-oxidising enzymes from *Escherichia coli*
22. Redox chemistry of metalloproteins: using protein film voltammetry to examine electron transfer in multiheme cytochromes
23. Kinetic and synthetic studies on the reductive chemistry of Co- and Fe-based dimethylglyoxime systems
24. Biomimetic studies of Ni-Fe hydrogenases
25. Manipulating the Secondary Coordination Sphere to Tune the Reduction Potential of a Single Cupredoxin

生物無機化學包含Ca, Ni, Fe, Cu, S, Halogens, Ti, Co等成份在生物上之應用與功能研究，研究學者專研內容滿足我們瞭解無機化學成份可能影響功能性基因表達蛋白與細胞功能和人類疾病病因聯結，非常值得參與。參與不僅提供互相觀摩的機會，會後連絡也很有學術討論價值。

## 二、與會心得

本人共出席四天的壁報論文展示，大部分參與的都是年輕的研究人員或博士班學生，來自不同的大學及研究機構，展示他們最新的研究成果。為期四天的專題研討會議，用心聆聽及透過與會學者專家們的熱烈分享，受益良多。從這些主演講者中清楚知道他們對於研究的執著與努力，這些都是值得筆者效法的。很高興有這樣的機會參與這次的研討盛會，各國傑出科學家齊聚一堂，分享經驗，一同成長，為生物科技發展之藍圖更添色彩。此外，讓筆者聯想到自己所研究的 PADI<sub>s</sub>，其與 RA 相關的重要酵素，也說明與人類疾病的相關，發展抑制酵素此方面的藥物，治療疾病，這是未來可能進行的研究。

## 三、建議

與國際性學術會議對於研究者能夠增廣見聞，同時吸收新知，更能和研究同一領域或不同方向之外國學者互相討論切磋，提升研究的廣度，以能應用治療疾病。希望國科會對於參加此類國際知名大型會議的學者，更加大力支持，以增進研究的國際競爭力。

#### 四、攜回資料名稱及內容

此次會議攜回會議論文集一本及相關期刊數種單行本，內容包括全部演講與壁報論文之題目和摘要。

#### 五、其他

這次研討會筆者多停留兩至三天於洛杉磯，研討會結束後，筆者起程至舊金山，到充滿藍天白雲精緻休閒氛圍的酒莊與柏克萊大學參訪，給予筆者享受美國酒文化及柏克萊大學自由學風的洗禮，並釋放多日的辛勞。

## 六、大會議程

### **Gordon Research Conferences**

Conference Program

#### **Application Deadline**

Applications are no longer being accepted for this meeting. If you have been instructed to apply by the Conference Chair, please contact your **Conference Coordinator** for further instructions.

#### **Related Meeting Information**

The Bioinorganic Chemistry Gordon Research Seminar will be held in conjunction with the **Metals In Biology Gordon Research Conference**. Those interested in attending both meetings must submit an application for the GRC in addition to an application for the GRS. Please refer to the Metals In Biology GRC web page for more information. The Gordon Research Seminar (GRS) in Bioinorganic Chemistry was originally developed in response to the annual over-subscription of the parent Metals in Biology Gordon Research Conference. Since its start in 1996, this GRS has become one of the leading forums for graduate students and postdoctoral researchers in bioinorganic chemistry to share their research and discuss the latest advancements in the field. This conference has gained considerable international recognition and attracts students and postdocs from all over the world. The unique overlapping session between the Bioinorganic GRS and the Metals in Biology GRC allows students and young researchers to interact with the leading principal investigators in the field. Bioinorganic chemistry encompasses a wide range of topics including metal transport and homeostasis, metalloprotein structure and function, applications of metals in medicine and sensing, and metals in the environment. We invite and encourage students from any sub-discipline in Bioinorganic Chemistry to submit abstracts for poster or oral presentations. To be considered for an oral presentation for this meeting, please submit your application by **October 5, 2009**.

**Note:** This year, we would like to encourage all conference participants to bring their own coffee mugs to reduce the use of paper cups.

#### **Contributors**

##### **Bioinorganic Chemistry**

*Gordon Research Seminar*

February 4-7, 2010

Four Points Sheraton / Holiday Inn Express

Ventura, CA

Chair:

**Kathryn E. Cole**

Vice Chair:

**Christine M. Phillips**

#### **THURSDAY**

4:00 pm - 8:00 pm Arrival and Check-in (Office Closed 6:00 pm - 7:00 pm)

6:00 pm Dinner

7:30 pm - 8:45 pm **Joint Session with the Metals in Biology GRC**

7:30 pm - 8:30 pm **Karl Wieghardt** (Max Plank Institute, Mülheim)

"Coordinated radicals in biology and transition metal chemistry"

8:30 pm - 8:45 pm Discussion

8:45 pm Joint Poster Session (presented by the Bioinorganic Chemistry GRS)

## **FRIDAY**

7:30 am - 8:30 am Breakfast

8:30 am Group Photo

9:00 am - 12:30 pm **Metal Homeostasis and Transport**

Discussion Leader: **Pamela Riggs-Gelasco** (College of Charleston)

9:15 am - 9:45 am **Faith Jacobsen** (Indiana University)

"The interplay between zinc and manganese homeostasis in *Streptococcus Pneumoniae*"

9:45 am - 9:50 am Discussion

9:50 am - 10:20 am **Harini Kaluarachchi** (University of Toronto)

"Ni(II)-binding properties of the metallochaperone, SlyD"

10:20 am - 10:25 am Discussion

10:25 am - 10:45 am Coffee Break

10:45 am - 11:15 am **Gregory Holmes-Hampton** (Texas A&M University)

"Biophysical probes of iron metabolism in yeast mitochondria"

11:15 am - 11:20 am Discussion

11:20 am - 11:50 am **Swati Rawat** (Wayne State University)

"Characterization of key players in the mitochondrial Fe-S cluster assembly pathway"

11:50 am - 11:55 am Discussion

11:55 am - 12:25 pm **Kathryn Haas** (Duke University)

"Spectroscopic studies of copper binding to N-terminal hCtr1 model peptides"

12:25 pm - 12:30 pm Discussion

12:30 pm Lunch

1:30 pm - 4:00 pm Free Time

4:00 pm - 6:00 pm Poster Session

6:00 pm Dinner

7:30 pm - 8:55 pm **Biom mineralization and Bioinspired Materials**

Discussion Leader: **Trevor Douglas** (Montana State University)

7:45 pm - 8:15 pm **Lukmann Bawazer** (University of California, Santa Barbara)

"Directed laboratory evolution of biom mineralizing enzymes"

8:15 pm - 8:20 pm Discussion

8:20 pm - 8:50 pm **Robert Radford** (University of California, San Diego)

"Metal directed protein dimerization through hybrid coordination motifs"

8:50 pm - 8:55 pm Discussion

8:55 pm - 9:30 pm **Data Blitz**

A series of 5-minute presentations

**Rebecca Metzler** (University of Wisconsin)

**Olga Makhlynets** (Tufts University)

**Cesar Masitas Castillo** (University of Louisville)

**Shawn McGlynn** (Montana State University)

**Eric Smolensky** (University of Minnesota)

## **SATURDAY**

7:30 am - 8:30 am Breakfast

9:00 am - 12:30 pm **Metalloenzyme Kinetics and Mechanisms**

Discussion Leader: **Squire Booker** (Pennsylvania State University)

9:15 am - 9:45 am **Yan Kung** (Massachusetts Institute of Technology)

"Crystallographic studies of CO to CO interconversion at a NiFeS cluster"

9:45 am - 9:50 am Discussion

9:50 am - 10:20 am **Gözde Ulas** (Yale University)

"Studies on the water-oxidizing mechanism in Photosystem II with inhibitory zwitterions"

10:20 am - 10:25 am Discussion

10:25 am - 10:45 am Coffee Break

10:45 am - 11:15 am **Megan Matthews** (Pennsylvania State University)

"How aliphatic halogenases prevent competing hydroxylation"

11:15 am - 11:20 am Discussion

11:20 am - 11:50 am **Asha Rajapakshe** (University of Arizona)

"Implications for intramolecular electron transfer rates and steady state kinetics of human sulfite oxidase in probing the role of aromatic residues in the active site"

11:50 am - 11:55 am Discussion

11:55 am - 12:25 pm **Charles Olea** (Berkeley University)

"Chemical and structural consequences of heme distortion in H-NOX proteins"

12:25 pm - 12:30 pm Discussion

12:30 pm Lunch

1:30 pm - 4:00 pm Free Time

4:00 pm - 6:00 pm Poster Session

6:00 pm Dinner

7:00 pm - 7:30 pm Business Meeting

(Nominations for the next Vice Chair; Fill out Conference Evaluation Forms; Discuss future Site & Scheduling preferences; Election of the next Vice Chair)

7:30 pm - 8:55 pm **Metals in Medicine and Metallodrug Design**

Discussion Leader: **Debbie Crans** (Colorado State University)

7:45 pm - 8:15 pm **Dani Peri** (Hebrew University of Jerusalem)

"Hydrolytic behavior and cytotoxicity of bis(phenolato) Ti(IV) complexes"

8:15 pm - 8:20 pm Discussion

8:20 pm - 8:50 pm **Susana Vitorino** (University of Birmingham)

"Dinuclear supramolecular rhodium (III) diimine complexes as DNA-binding cytotoxic drugs"

8:50 pm - 8:55 pm Discussion

8:55 pm - 9:30 pm **Data Blitz**

A series of 5-minute presentations.

**Setshaba Khanye** (University of Cape Town)

**Eric Null** (University of Illinois)

**Hugo Vazquez** (Material Research Institute of the National Autonomous University of Mexico)

**Chris Bergstrom** (Princeton University)

2

**Muhammad Hanif** (University of Vienna)

## **SUNDAY**

7:30 am - 8:30 am Breakfast

9:00 am - 12:30 pm **Biomimetic Renewable Energy**

Discussion Leader: **Gary Brudvig** (Yale University)

9:15 am - 9:45 am **Alison Parkin** (Oxford University)

"Characterisation and Application of the H<sub>2</sub>-oxidising enzymes from *Escherichia coli*"

9:45 am - 9:50 am Discussion

9:50 am - 10:20 am **Mackenzie Firer-Sherwood** (Boston University)

"Redox chemistry of metalloproteins: using protein film voltammetry to examine electron transfer in multiheme cytochromes"

10:20 am - 10:25 am Discussion

10:25 am - 10:45 am Coffee Break

10:45 am - 11:15 am **Mike Rose** (CalTech)

"Kinetic and synthetic studies on the reductive chemistry of Co- and Fe-based dimethylglyoxime systems"

11:15 am - 11:20 am Discussion

11:20 am - 11:50 am **Arnab Dutta** (Arizona State University)

"Biomimetic studies of Ni-Fe hydrogenases"

11:50 am - 11:55 am Discussion

11:55 am - 12:25 pm **Nick Marshall** (University of Illinois)

"Manipulating the Secondary Coordination Sphere to Tune the Reduction Potential of a Single Cupredoxin Beyond the Natural Range"

12:25 pm - 12:30 pm Discussion

12:30 pm Lunch

1:30 pm Depart

無研發成果推廣資料

96 年度專題研究計畫研究成果彙整表

計畫主持人：劉光耀		計畫編號：96-2314-B-040-008-MY3				計畫名稱：胜溫精胺酸脫亞氨羰的免疫細胞功能探究：類風濕性關節炎致病機轉探討	
成果項目		量化			單位	備註（質化說明：如數個計畫共同成果、成果列為該期刊之封面故事...等）	
		實際已達成數（被接受或已發表）	預期總達成數（含實際已達成數）	本計畫實際貢獻百分比			
國內	論文著作	期刊論文	0	0	100%	篇	
		研究報告/技術報告	0	0	100%		
		研討會論文	2	2	100%		
		專書	0	0	100%		
	專利	申請中件數	0	0	100%	件	
		已獲得件數	1	1	100%		
	技術移轉	件數	0	0	100%	件	
		權利金	0	0	100%	千元	
	參與計畫人力（本國籍）	碩士生	3	3	100%	人次	
		博士生	1	1	100%		
		博士後研究員	0	0	100%		
		專任助理	1	1	100%		
國外	論文著作	期刊論文	2	2	100%	篇	
		研究報告/技術報告	0	0	100%		
		研討會論文	2	2	100%		
		專書	0	0	100%	章/本	
	專利	申請中件數	0	0	100%	件	
		已獲得件數	0	0	100%		
	技術移轉	件數	0	0	100%	件	
		權利金	0	0	100%	千元	
	參與計畫人力（外國籍）	碩士生	0	0	100%	人次	
		博士生	0	0	100%		
		博士後研究員	0	0	100%		
		專任助理	0	0	100%		



<p style="text-align: center;">其他成果</p> <p>(無法以量化表達之成果如辦理學術活動、獲得獎項、重要國際合作、研究成果國際影響力及其他協助產業技術發展之具體效益事項等，請以文字敘述填列。)</p>	無
---	---

	成果項目	量化	名稱或內容性質簡述
科 教 處 計 畫 加 填 項 目	測驗工具(含質性與量性)	0	
	課程/模組	0	
	電腦及網路系統或工具	0	
	教材	0	
	舉辦之活動/競賽	0	
	研討會/工作坊	0	
	電子報、網站	0	
	計畫成果推廣之參與(閱聽)人數	0	



## 國科會補助專題研究計畫成果報告自評表

請就研究內容與原計畫相符程度、達成預期目標情況、研究成果之學術或應用價值（簡要敘述成果所代表之意義、價值、影響或進一步發展之可能性）、是否適合在學術期刊發表或申請專利、主要發現或其他有關價值等，作一綜合評估。

1. 請就研究內容與原計畫相符程度、達成預期目標情況作一綜合評估

達成目標

未達成目標（請說明，以 100 字為限）

實驗失敗

因故實驗中斷

其他原因

說明：

2. 研究成果在學術期刊發表或申請專利等情形：

論文： 已發表  未發表之文稿  撰寫中  無

專利： 已獲得  申請中  無

技轉： 已技轉  洽談中  無

其他：（以 100 字為限）

3. 請依學術成就、技術創新、社會影響等方面，評估研究成果之學術或應用價值（簡要敘述成果所代表之意義、價值、影響或進一步發展之可能性）（以 500 字為限）