

科技部補助

大專學生研究計畫研究成果報告

* ***** ***** *
* 計畫：蛋白質精氨酸甲基轉移酶 PRMT6 對肝癌細胞的生長與 *
* 名稱：移動的調控 *
* ***** ***** *

執行計畫學生： 吳佳憲
學生計畫編號： MOST 104-2815-C-040-032-B
研究期間： 104年07月01日至105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 105年03月31日

科技部補助
大專學生研究計畫研究成果報告

* 計畫 蛋白質精氨酸甲基轉移酶 PRMT6 對肝癌細胞的 *
* : 生長與移動的調控 *
* 名稱 *

執行計畫學生：吳佳憲

學生計畫編號：104-2815-C-040-032-B

研究期間：104年7月1日至105年2月底止，計8個月

指導教授：李娟教授

處理方式(請勾選)： 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

執行單位：中山醫學大學
中華民國 105 年 3 月 31 日

摘要

PRMT6(protein arginine methyltransferase 6)在 PRMT 家族中是屬於第一型的甲基轉移酶，PRMT6 會在組蛋白 H3R2 的位置進行不對稱雙甲基化修飾，和活化的組蛋白 H3K4 修飾(H3K4me3)相拮抗，因而會抑制轉錄，藉此調控其他蛋白或基因。文獻中也發現在膀胱癌和肺癌腫瘤中 PRMT6 都有過量的表現，藉由影響細胞週期調控細胞增生。在乳癌細胞中，PRMT6 更直接作用在 p21 啟動子(promoter) H3R2me2a 上，調控細胞週期的進行，降低細胞凋亡和衰老，此一過程屬於 p53-independent。但在另一篇文獻中發現，在胚胎纖維細胞(MEFs)中，PRMT6 藉由 H3R2me2a 調控 Trp53 基因對 p53 表現造成影響，進而造成細胞衰老，屬於 p53-dependent。在不同的細胞株中，PRMT6 的調控機制可能有所不同。而 PRMT6 對肝癌細胞的影響機制尚未明朗，所以我選用三株先天 p53 轉錄情形和 PRMT6 表現都有所差異的肝癌細胞(Huh7、HepG2、Hep3B)觀察 H3R2me2a、H3K4me3 和 p21 表現差異和交互影響機制，也利用 ChIP 瞭解 PRMT6 對 p21 的作用位置。再利用 siRNA 觀察 PRMT6 調控 p21 是否須經由 p53 此路徑。PRMT6 也影響許多癌症移動或轉移因子，像是 thrombospondin-1(TSP-1)、MMP-2 和 MMP-9，而在前列腺癌、乳癌和骨肉瘤中，PRMT6 調控 TSP-1 的機制卻不盡相同，更值得探討

PRMT6 在肝癌細胞移動中扮演何種角色。本計畫研究成果應可助於瞭解 PRMT6 在肝癌細胞中調控生長的機制，在未來加藥處理治療肝癌細胞或活體實驗時，能有個明確的方向，能夠運用基因與蛋白兩種方面一同探討。

緒論

癌症為全球首要死因，造成癌症的原因非常多且複雜，絕大多數癌症的致病機轉不明確，可能自身基因缺陷，發生突變，外界致癌物質的刺激、病毒的感染等因素導致癌症。所以藉由對癌症複雜生理學過程的了解，可以改進癌症的治療方法，也可以提高患者的存活率。

人類癌症主要有六個特性：1. 持續的增生 (sustained proliferative capacity) 2. 避開生長抑制子的影響 (evasion of growth suppressors) 3. 抗凋亡 (resisting death) 4. DNA 無限的複製 (enabling replicative immortality) 5. 擁有血管新生的能力 (inducing angiogenesis) 6. 會侵襲和轉移 (activating invasion and metastasis)。每個特性雖然都不相同，不過都會相互合作造成癌症的生成、發育和轉移。

許多癌症都是由遺傳或表觀遺傳改變所造成的，例如：染色體重組 (chromatin remodeling)、組蛋白的修飾 (histone modification)、基因的表達 (gene expression)。這些改變都有助於降低抑癌基因表現，和造成致癌基因表現增強導致癌症。DNA 甲

基化和染色體重組被視為表觀遺傳的主要調節者。而最近的研究指出蛋白質精氨酸甲基化（一種轉譯後修飾）為癌症的表觀遺傳調節者。

一、蛋白質轉譯後修飾

蛋白質轉譯後修飾 (Post-translational modification, PTM), 使蛋白質在結構上有局部的改變進而調整它的功能, 因此也擴展了蛋白質體的多樣性。蛋白質乙醯化 (acetylation) 和磷酸化 (phosphorylation) 修飾作用已被廣泛的研究, 近年來, 其他重要的蛋白質修飾作用, 包含泛素化 (ubiquitination) 和甲基化 (methylation) 也開始受到重視。而蛋白質甲基化可發生在胺基酸中的離胺酸 (lysine)、精胺酸 (arginine)、組織胺酸 (histidine)、脯胺酸 (proline) 以及羧基等

蛋白質精氨酸甲基化是一種新穎的轉譯後修飾調節細胞過程的多樣性, 包括組蛋白的功能, 蛋白質精氨酸甲基轉移酶

(PRMTs) 參與生物中許多重要的功能, 包含訊息傳遞、蛋白質細胞內的位置、轉錄的調節、蛋白質之間的交互作用、RNA 的處理中和 DNA 的修補等 (Bedford & Clarke, 2009; Wang & Li, 2012)。

二、PRMT 的介紹

先前的研究指出 PRMT 會影響一些細胞內重要生理反應, 例如:

訊息傳遞 (signal transduction)、DNA 修補 (DNA repair)、轉錄調節 (gene transcription)、RNA processing。

1.在訊息傳遞方面

最近的研究都指出蛋白質精胺酸甲基化參與了許多癌症發展的重要途徑。例如: PRMT1 和 CARM1 在 Wnt / β -catenin 途徑中扮演重要的角色 (Bikkavilli et al., 2012; Bikkavilli and Malbon, 2011; Blythe et al., 2010; Cha et al., 2011) ; PRMT1 甲基化轉錄因子 FOXO1 (Forkhead box O 1)時, 會抑制 AKT 對 FOX1 的磷酸化反應, 還會促進 FOXO1 在核內聚集和 transactivation 的活性 (Yamagata et al., 2008) 。也有研究指出 PRMT1 在 rapid estrogen signaling 中扮演重要的角色, 代表 PRMT 也參與不同型式的訊息傳遞路徑 (Le Romancer et al., 2008a) 。

2.在 RNA processing、DNA 修補方面

對基因修復保持基因的完整性, 是預防癌症發展的關鍵。PRMT 可以甲基化參與 RNA processing 的蛋白, 例如: poly (A)-binding protein (Smith and Denu, 2009)、Sam68 (Bedford et al., 2000)、hnRNP A2 (Nichols et al., 2000)等, 以及一些參與 DNA 修補及 checkpoint control 的蛋白, 例如 MRE11 (Boisvert, 2005)、Rad 9 (He et al., 2011)、53BP1 (Boisvert et al., 2005)和 DNA polymerase (El-Andaloussi et al., 2007);

El-Andaloussi et al., 2006)等。

3.在基因轉錄調節方面

PRMT4/CARM1 是首先被認定具有轉錄輔助活化子 (transcriptional coactivator)的作用 (Chen et al., 1999),之後研究也證實 PRMT1 在 nuclear receptors (包含 androgen receptor, AR、estrogen receptor, ER、thyroid hormone receptor, TR 等)所調節的轉錄作用中,也是扮演轉錄輔助活化子的角色 (Matsuda et al., 2009; Wagner et al., 2006; Wang et al., 2001; Xie et al., 2009)。PRMT1 和 PRMT4/CARM1 共同作用,進而調節更多基因的轉錄 (Kleinschmidt et al., 2008)。而 PRMT1 催化 Histone H4 arginine 3 的甲基化,可貢獻於 epigenetic 組蛋白碼 (histone code),是調節轉錄活化的關鍵 (Huang et al., 2005; Wang et al., 2001)。

4. PRMT 家族於各種癌症中扮演角色

每個 PRMT 都可以甲基化各種非組蛋白受質蛋白 (non-histone substrate proteins)包括許多 RNA 結合蛋白。像是和各種癌症相關的蛋白 p53 (Jansson et al., 2008),雌激素受體 (Le Romancer et al., 2008),和 BRCA1 (Guendel et al., 2010)已被報導是透過 PRMTs 被甲基化。

根據以上的功能可以發現 PRMT 和蛋白質精胺酸甲基化在細胞的癌化的許多層面都可能造成影響。

PRMT6 屬於第一型的甲基轉移酶，參與於轉錄調節、DNA 修復和細胞生長等等的過程中。已有文獻指出 PRMT6 會在組蛋白 H3R2 的位置進行不對稱雙甲基化修飾形成 H3R2me2a，和活化的組蛋白 H3K4 修飾(H3K4me3)相拮抗，因而會抑制轉錄(Di Lorenzo & Bedford, 2011; Kirmizis et al., 2007; Waldmann et al., 2011)。然而也有文獻報導 PRMT6 可類似 PRMT1 和 CARM1(PRMT4)做為 co-activator (Di Lorenzo, Yang, Macaluso, & Bedford, 2014; Kleinschmidt, Streubel, Samans, Krause, & Bauer, 2008)。

PRMT1 被發現為混合性白血病 (mixed lineage leukemia; MLL) 重要的致癌基因轉錄複合物 (oncogenic transcriptional complex)，並能調控由 MLL 調節的細胞轉化 (cell transformation) (Cheung et al., 2007)。

在乳癌中 PRMT1 可以催化雌激素受體 (estrogen receptor; ER) 的甲基化，促進雌激素生成核外的 survival signal 並造成細胞的遷移 (migration) (Le Romancer et al., 2008b)。而且乳癌中 PRMT7 會透過基因 promoter 上不同的組蛋白甲基化修飾來抑制 E-cadherin 表達來誘導 EMT 過程 (Yao et al., 2014)。而在乳癌中也可看到 PRMT6 會調控 p21Waf1/Cip1 的表達，並調節乳癌細胞的衰老 (Phalke et al., 2012)。而在乳癌中的 CARM1 會甲基化 Chromatin Remodeling Factor BAF155 造成癌細胞的侵襲 (invasion) 和遷移 (migration) (Wang et al.,

2014)。

而肺癌中可看到 PRMT1 和 CARM1 的過度表達，而且 CARM1/PRMT1 相互作用是重要的，影響癌細胞的遷移和增生 (proliferation) (Elakoum et al., 2014)。也可看到 PRMT1 會調節 Twist1 的甲基化造成 E-cadherin 的抑制，然後誘導 EMT，造成腫瘤的遷移侵襲和轉移 (Morettin et al., 2015)。而在這些研究都指出 PRMT 在癌症中扮演著重要角色。

研究動機與研究問題

之前的研究已經發現許多癌症都有PRMT的過度表現，而且PRMT在癌細胞的增生 (proliferation)、遷移 (migration)、侵襲 (invasion)中都扮演著重要的角色。目前仍然沒有研究指出蛋白質精胺酸甲基化還有PRMT和頭頸癌之間的關聯。在膀胱癌腫瘤組織和肺癌腫瘤組織中，和非腫瘤組織相比之下，同樣為第一型PRMT家族的PRMT1和PRMT6都有顯著較高表現。且PRMT6在增生(proliferation)的肺癌細胞中有過量的表現(Yoshimatsu et al., 2011)，而有趣的是，有另一篇文獻提到，在骨肉瘤，PRMT6的表現會使腫瘤中血管生成和細胞移動抑制的TSP-1蛋白表現量下降 (J. Michaud-Levesque & S. Richard, 2009)，促進腫瘤移動。前列腺癌和乳癌中，PRMT6調控TSP-1的機制卻不盡相同(Kim, Kim, Seo, Han, & Kim, 2013)。而此兩種不同的結果可能因細胞株得不同所造成，在不同細胞株中，PRMT1和PRMT6調控生長和移動的機制也可能不同。

細胞週期(Cell cycle)是一連串有規律的步驟，使細胞成長，而後分裂為兩個子細胞。p21是一種細胞週期抑制蛋白，通過抑制CDKs導致細胞週期停滯，阻止損傷DNA進行複製。p21使細胞週期進行到G1時期時遭到阻滯作用，亦和細胞衰老相關。也因為如此，p21是許多抑癌蛋白的下游標靶。在腫瘤細胞中，p21的表現量也有下調的情

形，細胞週期發生異常，那細胞往往在M期時無法順利進行分裂過程而走向細胞凋亡，只有極少數的細胞可以逃過這個劫難，最後演化成癌細胞。在骨肉瘤細胞中，利用siRNA降低PRMT6的表現，發現同時也會提高p21和p27的表現量，抑制下游CDKs使細胞週期停滯，造成細胞衰老死亡。PRMT6藉由H3R2me2a調控p21的表現，如果抑制PRMT6在乳癌細胞的表現，則p21會大量表現，使細胞週期停滯於G1時期(Markus A. Kleinschmidt 2012 ; Sameer Phalke 2012)，造成細胞衰老。

衰老(Senescence)是因為細胞受到壓力刺激、DNA損傷、氧化壓力、端粒酶短小或者致癌基因的刺激所導致(Larsson, 2011; Rodier & Campisi, 2011)。p53蛋白能夠藉由調控下游蛋白形成細胞凋亡、衰老、週期抑制和DNA修補等等功能。而p53為p21上游調控蛋白，藉由調控p21影響下游CDKs使得細胞停滯於G1時期造成細胞衰老(McConnell, Starborg, Brookes, & Peters, 1998)。正常細胞內p53表現量很低，DNA損傷引起p53表達和活性迅速提高，引起多種基因調控使細胞週期停滯甚至細胞凋亡。而在癌腫瘤中，p53能夠藉由調控Trp53基因上的promotor使細胞週期停滯，更促進細胞衰老，以達到抑制癌細胞生長(Neault, Mallette, Vogel, Michaud-Levesque, & Richard, 2012)。在PRMT6^{-/-}胚胎纖維細胞(MEFs)中會造成細胞生長遲滯甚至衰老

情形，且有高程度的p53、p21和PML表現，而如果產生PRMT6^{-/-}；p53^{-/-}的MEFs則會使細胞衰老減緩，這表示PRMT6調控細胞週期和衰老是屬於p53-dependent。PRMT6直接利用H3R2me2a作用於p53 promotor上，達到負調控細胞衰老機制(Neault et al., 2012)。而在另一篇文獻中發現利用siRNA將PRMT6 KD 使p21表現量上升，使細胞週期停滯，進而造成乳癌細胞衰老，此一過程屬於p53-independent，PRMT6利用H3R2me2a 直接作用在p21 promotor上，不經由p53調控p21路徑調控細胞週期，此一調控和p53無關(Phalke et al., 2012)。可能為細胞株的不同，而造成結果不一，而肝癌細胞中，PRMT6調控細胞週期的機制更值得進一步探討。

材料和方法

一、細胞培養

(1) 細胞株:

Huh7 cell line

Hep G2 cell line

Hep 3B cell line

(2) 培養方式

Huh7 細胞培養於 10 cm 培養皿內，以 10 ml 完整 DMEM 培養液提供養份。完整培養液內包含:DMEM medium (12100-046; Gibco/Life Technologies); 10 % calf serum (Hyclone); 2 mM L-glutamine (Hyclone); 100 U/ml penicillin 及 100 µg/ml streptomycin (Hyclone)。

Hep G2 細胞培養於 10 cm 培養皿內，以 10 ml 完整 MEM 培養液提供養份。MEM 培養液再加 10% *Fetal bovine serum* (Hyclone) ; 2 mM L-glutamine (Hyclone); 100 U/ml penicillin 及 100 µg/ml streptomycin (Hyclone) ; 2mM pyruvate (Gibco/Life Technologies)。

Hep 3B 細胞培養於 10 cm 培養皿內，以和 Hep G2 細胞相同的完整培養液培養。

(3) 繼代培養

Huh7: 先將培養培養盤中的培養液去除，用 10 ml PBS [phosphate-buffered saline; 10 mM Na₂HPO₄; 1.8 mM KH₂PO₄; 140

mM NaCl; 2.7 mM KCl pH 7.4] 輕微沖洗細胞。加入 2 ml 25% 胰蛋白酶 (Trypsin; Hyclone) 反應 1 分鐘後立即吸出，置於 37°C 培養箱中反應 3 分鐘。輕拍培養皿以確定細胞已完全脫落，加入培養液 (約 8 ml) 將細胞均勻打散，留下細胞量(約 1/8 體積)以培養液繼續培養。

Hep G2: 先將培養培養盤中的培養液去除，如 Huh7 細胞培養所示，不過 Hep G2 附著力較強，胰蛋白酶反應要 3 分鐘吸出後，置於 37°C 培養箱中反應 5~10 分鐘。留下細胞量(約 1/8 體積)以培養液繼續培養。

Hep 3B: 先將培養培養盤中的培養液去除，如 Huh7 細胞培養所示，不過 Hep 3B 附著力較強，置於 37°C 培養箱中反應 5~10 分鐘。留下細胞量(約 1/8 體積)以培養液繼續培養。

(4) 細胞計數

先培養液去除，用 PBS 輕微沖洗細胞。加入胰蛋白酶置於 37°C 培養箱中反應 5 分鐘後立即加入培養液，輕拍培養皿以確定細胞已完全脫落，將細胞液加到 15 ml 離心管中 3000 轉離心 5 分鐘，並用 10 ml 培養液將細胞均勻打散，取 10 μ l 細胞和 10 μ l trypan blue 混合均勻，利用血球計數器計算出細胞數目。

二、組蛋白(Histone)之萃取

收集細胞於 2ml 微量試管中，加入適當的 lysis buffer，以超音波震

盪機均勻液狀，於 4°C 之低溫 12000 rpm 離心 20 分鐘，去除上清液，沉澱物加入 0.4N 硫酸於 4°C 搖盪 1~2 小時，12000 rpm 離心 10 分鐘，上清液吸至新的微量吸管，再加入 100% 乙醇於 -20°C 沉澱隔夜。以 12000 rpm 離心 15 分鐘，倒去上清液，沉澱物以 100% 乙醇清洗，再以 12000 rpm 離心 10 分鐘，倒去上清液體，沉澱物乾燥，利用 d2H2O 水回溶，將組蛋白存放於 -20°C 冰箱中。

三、短暫性轉染 (Transient transfection)

a. 第一天

在 3.5 cm 培養盤內種入 4×10^5 個細胞，於 37°C 培養箱中培養 12~16 小時。待細胞完全貼附且長到 60~70%，即可進行轉染實驗。

b. 第二天

血清飢餓步驟 (serum starvation)

當細胞貼附到培養皿上時去除原有的培養液，使用不含血清及抗生素的培養液 (serum-free medium) 輕微沖洗細胞後，再放入適量的 serum-free medium 於 37°C 培養箱中進行培養 24 小時。

I. 載體配置 (plasmid):

取 4 μ l lipofectamine 2000 轉染試劑 (Invitrogene) 與 100 μ l serum-free medium 輕微混合均勻 30 秒後於室溫中靜置 5 分鐘。再取 2 μ l 欲轉染載體與 100 μ l serum-free medium 輕微混合均勻 30 秒後，

與含有轉染試劑之培養液輕微混合均勻約 45 秒，然後靜置 30 分鐘，以利 DNA-liposome form。

取 5 μ l lipofectamine 2000 轉染試劑 (Invitrogene) 與 100 μ l serum-free medium 輕微混合均勻 30 秒後於室溫中靜置 5 分鐘。再取 200 μ mol 欲轉染質體與 100 μ l serum-free medium 輕微混合均勻 30 秒後，與含有轉染試劑之培養液輕微混合均勻約 45 秒，然後靜置 30 分鐘。

III. 轉染反應

將培養皿中的培養液去除，加入 500 μ l 的 serum-free medium。吸取 DNA/RNAi-liposome 混合物 200 μ l 加入培養皿內，輕輕搖晃後放入 37°C 培養箱反應 6 小時。隨後加入含有血清的培養液 (不含 penicillin-streptomycin; 血清最終濃度為 20%) 培養至隔天。

c. 第三天

將含有 DNA/RNAi-liposome 去除換成完整培養液，依後續實驗需求進行加藥處理等實驗。

三、甲基轉移酶抑制劑 AdOx 加藥處理

在 10 cm 培養盤內種入 8×10^5 個細胞，於 37°C 培養箱中培養 12~16 小時。待細胞完全貼附且長到 60~70%，將細胞加入 50 μ M AdOx (adenosine periodate; Sigma) 處理，於 37°C 培養箱中培養 24 小時

後，抽取蛋白。

四、萃取蛋白

先去除培養皿中的培養液，以無菌 PBS (4°C)清洗 3 次，再加入 1 ml PBS 於培養皿內，使用酒精擦拭的刮杓 (cell scraper)將細胞完全收下並集中於 1.5 ml tube 內。室溫離心 5500 轉 10 分鐘後，完全去除上清液，隨後加入 150 μ l 細胞萃取液[50 mM Tris-HCl pH7.4; 150 mM NaCl, 1 mM EDTA; 1% Triton X-100; 1x complete protease inhibitor(Roche); 10 mM NaF]將細胞回溶。以探針型超音波震盪機 (Sonic, Vibra Cell)於冰上將細胞完全震碎，設定條件為:開啟 2 秒，關閉 2 秒，總反應時間 30 秒，AMP: 30%。於 4°C 離心 15000 轉 10 分鐘，收集上清液並保存於-20°C。

五、蛋白質濃度定量

BCA Protein Assay (bicinchoninic acid) (Thermo)準備不同稀釋倍數(0、0.2、0.4、1、2 μ g/5 μ l)的標準蛋白 (Bovine serum albumin; BSA)與待測蛋白樣品各 5 μ l，並在各管中加入 100 μ l 反應試劑(BCA reagent A: BCA reagent B=50: 1)混合均勻，於 60°C 反應 30 分鐘，以光度比色儀 (Beckman DU800, USA)測量波長值 562 nm 的吸光值 (OD₅₆₂)，將蛋白樣品測得的數值扣除背景質後，與標準標準蛋白測得的數值的斜率做比較，換算出預測蛋白樣品的濃度 (μ g/ μ l)。

六、SDS-PAGE

將要分析樣品加入體積四分之一的 5X sample buffer (1.5 M Tris pH 6.8 3.3 ml; β -mercaptoethanol 2.5 μ l; 10% SDS 35 ml; 87% glycerol 11.5 ml; bromophenol blue 0.05 g)，於乾浴槽 95°C 加熱 10 分鐘使蛋白質變性。將處理後的樣品溶液依序加入以 Laemmli (1970)法配置的緩衝溶液系統之 12.5% 膠體凹槽中 [(0.75 mm) x 7 cm resolving gel]，進行 SDS 膠體電泳分析。

	Resolving gel	Stacking gel
Acrylamide-bisacrylamide(29:1)(40%)	1.25 ml	0.2225 ml
Lower Tris	1 ml	
Upper Tris		0.5 ml
10% ammonium persulfate	40 μ l	8 μ l
TMEMED	4 μ l	2.4 μ l
D ₂ H ₂ O	1.75 ml	1.275 ml

Lower Tris : 90.85 g Tris; 20 ml 10% SDS-PAGE; pH 8.8 for 500 ml

Upper Tris : 30.3 g Tris; 20 ml 10% SDS-PAGE; pH 6.8 for 500 ml

電泳條件為 : 80 伏特(Bio-Rad 200/2.0)，在 1 倍的電泳緩衝液(25 mM

Tris; 192 mM Glycine; 0.1% SDS)中進行 2 個小時的膠體電泳分析

(Bio-Rad Mini-PROTEAN II, III)。

七、Western blot

將濾紙 (filter paper, ADVANTEC)、SDS-PAGE 電泳完成後的膠體以及 nitrocellulose paper (Gelman Sciences, Amersham Biosciences,)

Hybond-C Extra)依序夾於 transfer cassette 中，置入 mini Trans-Blot Cell (Bio-Rad)內，加入 transfer buffer (12 mM Tris pH 8.3; 96 mM Glycine; 20% Methanol)，以 110 伏特電流 (Bio-Rad 200/2.0)進行轉漬 66 分鐘。轉漬後的 NC paper 以含 7%脫脂奶粉的 TTBS buffer (20 mM Tris-HCl pH 7.5; 150 mM NaCl; 0.05% Tween 20)進行 blocking，在室溫中搖晃 1 小時以去除 non-specific binding。到掉 blocking buffer，加入含有一抗的 TTBS buffer (含有 0.7~3%脫脂奶粉，反應條件如附錄五)，於 4°C 搖過夜然後將一抗吸掉，以 TTBS buffer 洗 5 分鐘並重複三次，在加入含有二及抗體的 TTBS buffer，在室溫中搖晃 1 小時。到二級抗體，以 TTBS buffer 洗 5 分鐘並重複三次，然後加入 1:1 的 Working solution (Western Blotting Detection Kit, advansta)於室溫下進行反應，最後利用冷光儀測定 (LAS1000, Fujifilm)進行拍照分析冷光表現。

八、螢光染色

在 35 mm 培養盤中重入 4×10^5 個細胞，並放入 4 個直徑 12 mm 的圓形玻片，培養 24 小時，將培養液去除並以 PBS 清洗 2 次，加入 1 ml 2% paraformaldehyde/PBS 於室溫下輕搖 15 分鐘，將細胞固定於玻片上，去除 paraformaldehyde 後，以 PBS 清洗細胞並重複 3 次。加入 1 ml 0.5% Triton X-100 後，以 PBS 清洗系細胞並重複 3 次。加入

DAPI 1 $\mu\text{g/ml}$ 避光輕搖 10 分鐘，去除 DAPI 後，以 0.01% Triton X100/PBS1 避光清洗 5 分鐘並重複三次。保持玻片濕潤，於正立螢光顯微鏡 (ZEISS AX ioskop2) 拍攝影像。

結果

一、不同細胞的 PRMT 表現

先前文獻指出 PRMT6 會干擾細胞週期進而影響細胞的增生、衰老和凋亡。所以接下來我們利用三株肝癌細胞先確認 PRMT6 的抗體的專一性。於先前利用 PRMT6 一抗(IMGENEX)以 1:1000 稀釋對三株肝癌細胞(Huh7、Hep G2、Hep 3B)做西方點墨法，能做出和先前實驗室張建評學長相同結果(Fig.1)。

計畫執行後發現，Hep G2 和 Hep 3B 兩株細胞的生長型態和生長速度都出現異常變化，經過許多觀察和檢測後，發現此兩株細胞均受 mycoplasma 影響，我們也試著治療兩株細胞，但一直無法完全去除 mycoplasma，於是我們便決定從美國 ATCC 重新購入 Hep G2 和 Hep 3B 兩株細胞株。確定所有細胞株均正常後，我再利用相同的 PRMT6 一抗(IMGENEX)和另一 PRMT6 一抗(Santa Cruz,1:1000 稀釋)對三株肝癌細胞做西方點墨法，但卻得不到相同的結果(Fig.2)，沒辦法清楚看出三株肝癌細胞 PRMT6 差異。試著排除樣品和技術方面的問題，我利用同一批蛋白，並改用我們實驗室常用的 PRMT1 抗體 (upstate,1:1000 稀釋)利用西方點墨法觀察(Fig.3)，三株細胞均正常表現 PRMT1 和 Actin。

已有文獻指出 PRMT6 會在組蛋白 H3R2 的位置進行不對稱雙甲基化修飾形成 H3R2me2a，和活化的組蛋白 H3K4 修飾(H3K4me3)相拮抗，因而會抑制轉錄。我利用組蛋白萃取方法萃取出組蛋白後，利用西方點墨法對三株肝癌細胞觀察 H3R2me2a 表現情形 (H3R2me2a,1:2000,upstate)，並且以 H3(upstate,1:2000)當控制組。在三株肝癌細胞中，也難看出 H3R2me2a 的表現差異(Fig.4)。

二、不同肝癌細胞的生長曲線

在培養盤中種入口腔細胞 (Huh7、Hep G2 和 Hep 3B)，培養 24、48 和 72 小時計算細胞數目，並畫出細胞的生長曲線，PRMT6 表現較多的 HepG2 細胞生長速率最慢，PRMT6 表現最少的 Huh7 細胞生長速率最快(Fig. 5)。

三、間接甲基抑制劑 AdOx 對細胞精胺酸甲基化的影響

PRMT1 是最主要的精胺酸甲基轉移酶，和 PRMT6 同屬於第一型精胺酸甲基轉移酶，利用相同的細胞蛋白測試 PRMT1 抗體 (upstate,1:1000 稀釋)，發現三株肝癌細胞中，PRMT1 的差異雖然不大(Fig.3)，但在許多文獻中，對 PRMT1 有著濃厚的興趣。

接著我們探討當甲基化被抑制後，對細胞的影響。PRMT 屬於 Ado-Met (S-adenosyl-L-methionine)依賴型的甲基轉移酶家族，PRMT

會把 Ado-Met 當作甲基提供者，當 Ado-Met 提供甲基後會形成 AdoHcy (S-adenosylhomocysteine)，而 AdoHcy 會被 AdoHcy 水解酶水解成 adenosine 和 homocysteine。Adenosine-2',3'-dialdehyde (AdOx) 是一種 AdoHcy 水解酶的抑制劑，能增加抑制甲基轉移酶的 AdoHcy 水平，進而抑制甲基化 (Fig.5)。觀察 AdOx 加藥處理後，肝癌細胞株的 PRMT1 表現是否有變化。三株肝癌細胞(Huh7、Hep G2、Hep 3B) 以甲基抑制劑 AdOx (50 μ M)處理，24 小時以後，三株肝癌細胞均有明顯的降低 PRMT1 的表現(Fig.6)

四、建立高表現 PRMT6 的 Huh7 細胞株

利用 lipofectamine 2000 轉染試劑 (Invitrogene) 將 control GFP-質體和 GFP-PRMT6 質體送入 Huh7 細胞中，於正立螢光顯微鏡 (ZEISS AX ioskop2)拍攝觀察螢光影像表現。觀察螢光發現，轉殖的效率並不高，大約只有 3 成左右(Fig.7)，也由於效率過低便無法建立過表現 PRMT6 Huh7 細胞株。

討論

最近的研究指出蛋白質精胺酸甲基化和癌症的生成和轉移有關 (Yang and Bedford, 2013)。很多癌症中都可以看到蛋白質精胺酸甲基轉移酶 (PRMT) 的失調，包括乳癌，前列腺癌，結腸直腸癌，膀胱癌和白血病 (Yang and Bedford, 2013)。本論文主要研究 PRMT 和蛋白質精胺酸甲基化在肝癌細胞的表現，甲基抑制劑 AdOx 對 PRMT 家族的影響。

PRMT6 在之前的研究中已報導在肺癌和膀胱癌中都會過度表現 (Yoshimatsu et al., 2011)，而且最近研究指出 PRMT6 高度表達會抑制 *P53* 和 *P21* 這些抑癌基因的表現促進細胞增生 (proliferation)，而當 PRMT6 被抑制時會降低細胞的增生並造成細胞的衰老 (Phalke et al., 2012)，這些都表示 PRMT6 有調控造成致癌的能力。實驗室張建評學長在對不同癌細胞株中各 PRMTs 表現分析時發現在三株肝癌細胞 Huh7、Hep3B 和 HepG2 中，PRMT6 的表現量有明顯的不同 (Fig.1)，在 HepG2 中表現最多，Huh7 則最少，而 Hep3B 次之。我利用市售不同的 PRMT6 抗體對這三株肝癌細胞做 western blot，得到相同結果，肯定此一觀察。

但因為發現了 mycoplasma 存在於 Hep G2 和 Hep 3B 中，所以重

新從美國 ATCC 購買此兩株肝癌細胞，再利用相同的 PRMT6 一抗 (IMGENEX)和另一 PRMT6 一抗(Santa Cruz,1:1000 稀釋)卻得不到相同的結果(Fig.2)，沒辦法清楚看出三株肝癌細胞 PRMT6 差異。也利用 PRMT1 抗體確認三株肝癌細胞樣品(Fig.3)，確認三株樣品蛋白正常，可以繼續接下來實驗。

轉染反應中，利用 lipofectamine 2000 轉染試劑 (Invitrogene)對 Huh7 細胞進行轉染，但轉染效率卻只有三成左右(Fig.7)，效率過低以至於無法建立 GFP-control 和 GFP-PRMT6 細胞品系。而我另利用聚乙炔亞胺 (Polyethylenimine, PEI) 轉染技術試著提高轉染效率，以 DNA:PEI=1 μ g:3 μ l 進行轉染，並且做了 5、24、48 小時三個時間點觀察轉染效率(Fig.9)。於 48 小時時，細胞似乎因為 PEI 毒性而產生變形甚至死亡，反應時間較短的 5 小時和 24 小時的轉染效率也沒有較利用 lipofectamine 2000 轉染高。

而在乳癌細胞(MCF7)中，PRMT6 直接作用在 p21 啟動子(promoter) H3R2me2a 上，調控細胞週期的進行，降低細胞凋亡和衰老(Phalke et al., 2012)，使得乳癌細胞能夠大量生長。在不同細胞株中，PRMT6 利用 p21 調控細胞週期的情形可能有所不同。我也利用西方點墨法觀察三株肝癌細胞 p21 的表現(Fig.10)，但卻很難看到 21kDa 的位置上有訊號顯示，抗體的穩定度還需再釐清。

參考文獻

- Asch, A. S., Silbiger, S., Heimer, E., & Nachman, R. L. (1992). Thrombospondin sequence motif (CSVTCG) is responsible for CD36 binding. *Biochem Biophys Res Commun*, *182*(3), 1208-1217.
- Bedford, M. T., & Clarke, S. G. (2009). Protein arginine methylation in mammals: who, what, and why. *Mol Cell*, *33*(1), 1-13. doi: 10.1016/j.molcel.2008.12.013
- Dawson, D. W., Pearce, S. F., Zhong, R., Silverstein, R. L., Frazier, W. A., & Bouck, N. P. (1997). CD36 mediates the In vitro inhibitory effects of thrombospondin-1 on endothelial cells. *J Cell Biol*, *138*(3), 707-717.
- Di Lorenzo, A., & Bedford, M. T. (2011). Histone arginine methylation. *FEBS Lett*, *585*(13), 2024-2031. doi: 10.1016/j.febslet.2010.11.010
- Di Lorenzo, A., Yang, Y., Macaluso, M., & Bedford, M. T. (2014). A gain-of-function mouse model identifies PRMT6 as a NF-kappaB coactivator. *Nucleic Acids Res*, *42*(13), 8297-8309. doi: 10.1093/nar/gku530
- Kim, N. H., Kim, S. N., Seo, D. W., Han, J. W., & Kim, Y. K. (2013). PRMT6 overexpression upregulates TSP-1 and downregulates MMPs: its implication in motility and invasion. *Biochem Biophys Res Commun*, *432*(1), 60-65. doi: 10.1016/j.bbrc.2013.01.085
- Kirmizis, A., Santos-Rosa, H., Penkett, C. J., Singer, M. A., Vermeulen, M., Mann, M., . . . Kouzarides, T. (2007). Arginine methylation at histone H3R2 controls deposition of H3K4 trimethylation. *Nature*, *449*(7164), 928-932. doi: 10.1038/nature06160
- Kleinschmidt, M. A., Streubel, G., Samans, B., Krause, M., & Bauer, U. M. (2008). The protein arginine methyltransferases CARM1 and PRMT1 cooperate in gene regulation. *Nucleic Acids Res*, *36*(10), 3202-3213. doi: 10.1093/nar/gkn166
- Larsson, L. G. (2011). Oncogene- and tumor suppressor gene-mediated suppression of cellular senescence. *Semin Cancer Biol*, *21*(6), 367-376. doi: 10.1016/j.semcancer.2011.10.005
- Lin, Y. L., Tsai, Y. J., Liu, Y. F., Cheng, Y. C., Hung, C. M., Lee, Y. J., . . . Li, C. (2013). The critical role of protein arginine methyltransferase prmt8 in zebrafish embryonic and neural development is non-redundant with its paralogue prmt1. *PLoS One*, *8*(3), e55221. doi: 10.1371/journal.pone.0055221
- Lo Sardo, A., Altamura, S., Pegoraro, S., Maurizio, E., Sgarra, R., & Manfioletti, G. (2013). Identification and Characterization of New Molecular Partners for the Protein Arginine Methyltransferase 6 (PRMT6). *PLoS One*, *8*(1), e53750. doi: 10.1371/journal.pone.0053750
- McConnell, B. B., Starborg, M., Brookes, S., & Peters, G. (1998). Inhibitors of

- cyclin-dependent kinases induce features of replicative senescence in early passage human diploid fibroblasts. *Curr Biol*, 8(6), 351-354.
- Michaud-Levesque, J., & Richard, S. (2009). Thrombospondin-1 Is a Transcriptional Repression Target of PRMT6. *The Journal of Biological Chemistry*, 284(32), 21338-21346. doi: 10.1074/jbc.M109.005322
- Neault, M., Mallette, F. A., Vogel, G., Michaud-Levesque, J., & Richard, S. (2012). Ablation of PRMT6 reveals a role as a negative transcriptional regulator of the p53 tumor suppressor. *Nucleic Acids Res*, 40(19), 9513-9521. doi: 10.1093/nar/gks764
- Pahlich, S., Zakaryan, R. P., & Gehring, H. (2006). Protein arginine methylation: Cellular functions and methods of analysis. *Biochim Biophys Acta*, 1764(12), 1890-1903. doi: 10.1016/j.bbapap.2006.08.008
- Phalke, S., Mzoughi, S., Bezzi, M., Jennifer, N., Mok, W. C., Low, D. H., . . . Guccione, E. (2012). p53-Independent regulation of p21Waf1/Cip1 expression and senescence by PRMT6. *Nucleic Acids Res*, 40(19), 9534-9542. doi: 10.1093/nar/gks858
- Rodier, F., & Campisi, J. (2011). Four faces of cellular senescence. *J Cell Biol*, 192(4), 547-556. doi: 10.1083/jcb.201009094
- Steeg, P. S. (2003). Metastasis suppressors alter the signal transduction of cancer cells. *Nat Rev Cancer*, 3(1), 55-63. doi: 10.1038/nrc967
- Tsai, Y. J., Pan, H., Hung, C. M., Hou, P. T., Li, Y. C., Lee, Y. J., . . . Li, C. (2011). The predominant protein arginine methyltransferase PRMT1 is critical for zebrafish convergence and extension during gastrulation. *Febs j*, 278(6), 905-917. doi: 10.1111/j.1742-4658.2011.08006.x
- Waldmann, T., Izzo, A., Kamieniarz, K., Richter, F., Vogler, C., Sarg, B., . . . Schneider, R. (2011). Methylation of H2AR29 is a novel repressive PRMT6 target. *Epigenetics Chromatin*, 4, 11. doi: 10.1186/1756-8935-4-11
- Wang, Y. C., & Li, C. (2012). Evolutionarily conserved protein arginine methyltransferases in non-mammalian animal systems. *FEBS J*, 279(6), 932-945. doi: 10.1111/j.1742-4658.2012.08490.x
- Yoshimatsu, M., Toyokawa, G., Hayami, S., Unoki, M., Tsunoda, T., Field, H. I., . . . Hamamoto, R. (2011). Dysregulation of PRMT1 and PRMT6, Type I arginine methyltransferases, is involved in various types of human cancers. *Int J Cancer*, 128(3), 562-573. doi: 10.1002/ijc.25366

圖表

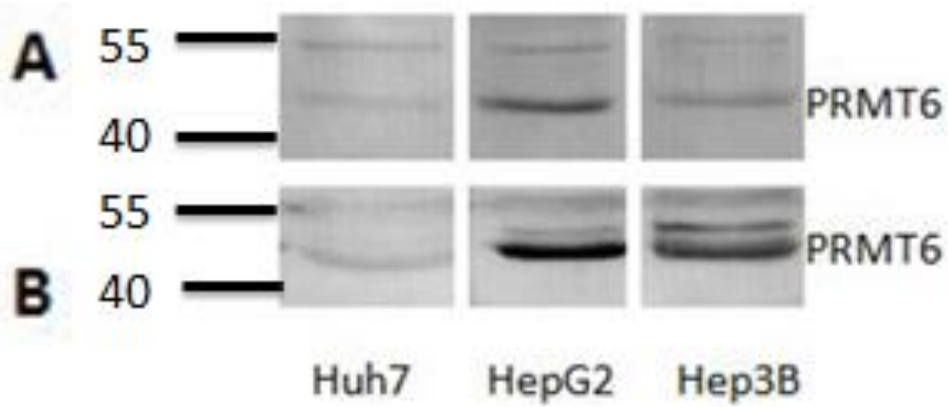


Fig.1: 上圖 A 為實驗室張建評學長利用 Western blot(PRMT6 一抗,IMGENEX, 以 1:1000 稀釋), 發現 PRMT6 在 HepG2 中表現最多, Huh7 則最少, 而 Hep3B 次之。下圖 B, 我利用市售不同的 PRMT6 抗體(PRMT6 一抗, Santa Cruz, 1:1000 稀釋) 對這三株肝癌細胞做 western blot。PRMT6 分子量約 42kDa。

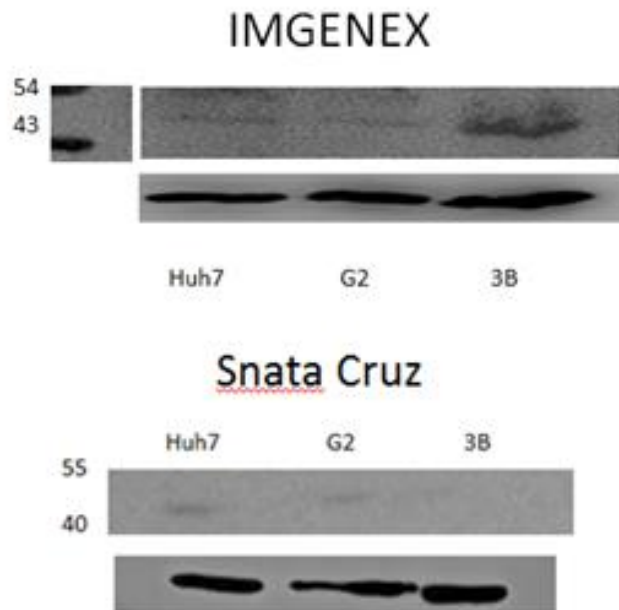


Fig.2: 上圖為利用 PRMT6 一抗, IMGENEX, 以 1:1000 稀釋對三株肝癌細胞做觀察。下圖為利用 PRMT6 一抗, Santa Cruz, 1:1000 稀釋對三株肝癌細胞做觀察。

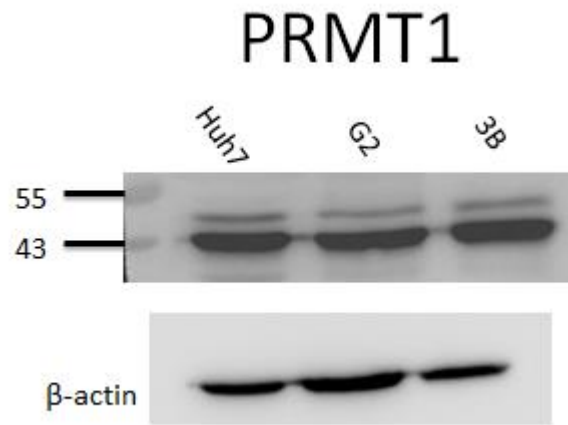


Fig.3: 利用三株肝癌細胞蛋白測試PRMT1抗體(upstate,1:1000稀釋)。

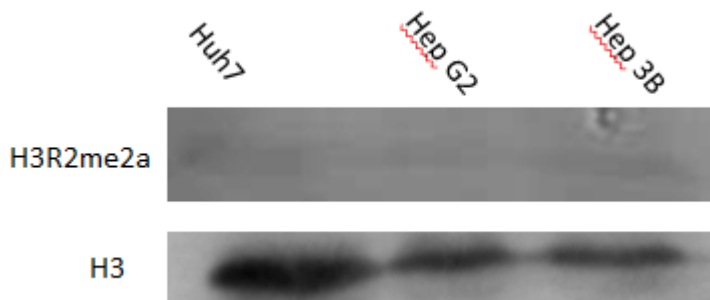


Fig.4:利用 H3R2me2a 抗體觀察三株肝癌細胞表現程度，並用 H3 作為 control

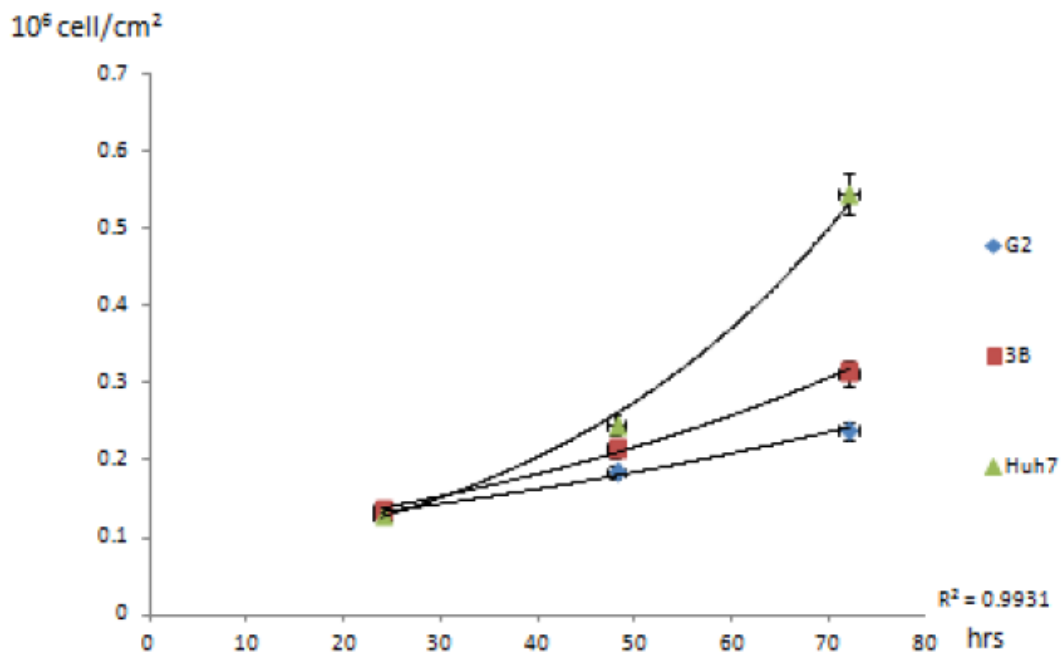
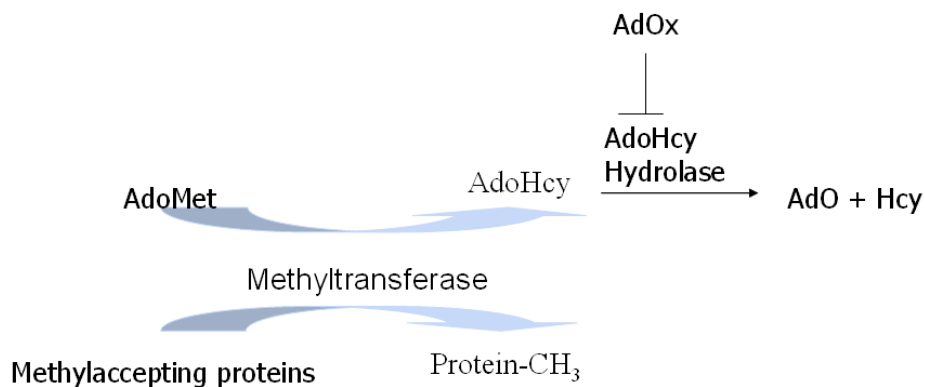


Fig.5: 將三株肝癌細胞分別培養於完全培養基 24、48 和 72 小時，先培養液去除，用 PBS 輕微沖洗細胞。加入胰蛋白酶置於 37°C 培養箱中反應 5 分鐘後立即加入培養液，輕拍培養皿以確定細胞已完全脫落，將細胞液加到 15 ml 離心管中 3000 轉離心 5 分鐘，並用 10 ml 培養液將細胞均勻打散，取 10 μ l 細胞和 10 μ l trypan blue 混合均勻，利用血球計數器計算出細胞數目。收集每個時間點的細胞並計數，並繪製出生長曲線。



AdoMet : *S*-adenosyl-*L*-methionine (SAM)

AdoHcy : *S*-adenosyl-*L*-homocysteine (SAH)

AdOx : adenosine periodate oxidized

Fig.6: 當 Ado-Met 提供甲基後會形成 AdoHcy (*S*-adenosylhomocysteine)，而 AdoHcy 會被 AdoHcy 水解酶水解成 adenosine 和 homocysteine。Adenosine-2',3'-dialdehyde (AdOx)是一種 AdoHcy 水解酶的抑制劑，能增加抑制甲基轉移酶的 AdoHcy 水平，進而抑制甲基化

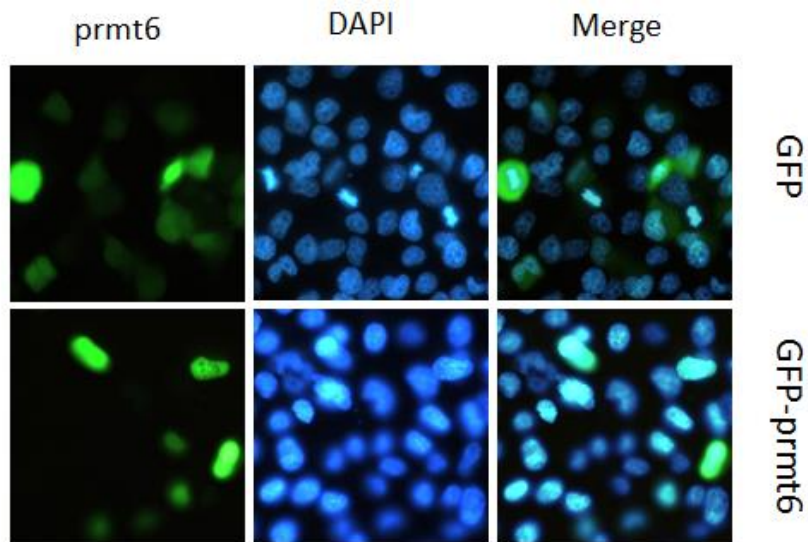


Fig.7:利用 lipofectamine 2000 轉染試劑 (Invitrogene)對 Huh7 細胞進行轉染，試著建立 GFP-control 和 GFP-PRMT6 Huh7 細胞品系。



Fig.8: 在 10 cm 培養盤內種入 8×10^5 個細胞，於 37°C 培養箱中培養 12~16 小時。待細胞完全貼附且長到 60~70%，將細胞加入 $50 \mu\text{M}$ AdOx(adenosine periodate; Sigma)處理，於 37°C 培養箱中培養 24 小時後，抽取蛋白。利用 western blot (PRMT1 一抗,upstate,1:2500 稀釋)觀察三株肝癌細胞加了 AdOx 後 PRMT1 的表現情形。

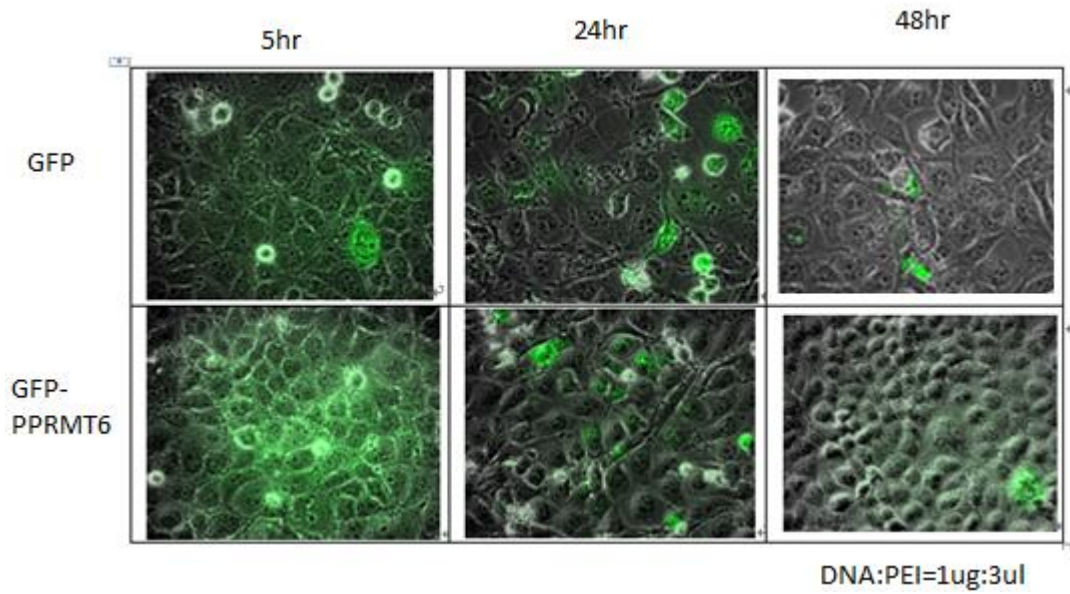


Fig.9: 利用聚乙炔亞胺 (Polyethylenimine, PEI) 轉染技術試著提高轉染效率，以 DNA:PEI=1 μ g:3 μ l 進行轉染，並且做了 5、24、48 小時三個時間點觀察轉染效率。

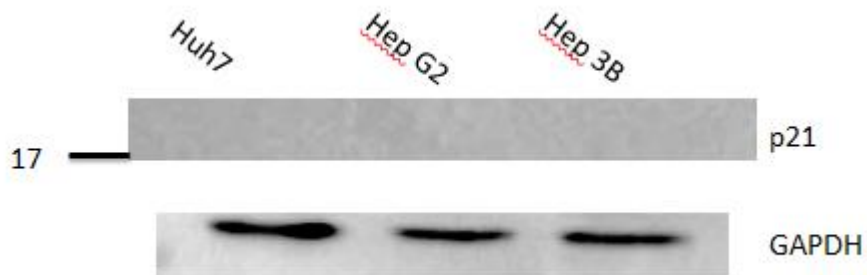


Fig.10: 利用西方點墨法觀察三株肝癌細胞 p21 的表現，但卻很難看到 21kDa 的位置上有訊號顯示。以 GAPDH 作為 control。