

私立中山醫學大學醫學研究所

Graduate Institute of Medicine

Chung Shan Medical University

碩士論文

Master Thesis

**蛋白質精胺酸甲基轉移？之特性分析及精胺酸甲基接受蛋
白於細胞內分布之研究**

**Characterization of Protein Arginine Methyltransferase and Studies
of the Subcellular Localization of Arginine Methyl-accepting Proteins**

指導教授：李娟 博士 (Chuan Li, Ph.D.)

研究生：陳大晃 (Ta-Huang Chen)

中華民國九十一年七月

July 2002

目錄

中文摘要	..1
英文摘要	..4
序論	..7
材料與方法	..17
結果	..28
討論	..39
參考文獻	..44
圖表	..50

中文摘要

由蛋白質精胺酸甲基轉移酶 (PRMT) 催化的蛋白質精胺酸甲基化是一種轉譯後修飾作用。第一型的甲基轉移酶催化甲基接受蛋白形成單甲基和不對稱型雙甲基化, 而第二型的甲基轉移酶能催化其它的甲基接受蛋白形成單甲基和對稱型雙甲基化。一直到最近定出 6 種不同 PRMT 基因前, 以生化法定出的各種生物來源的第一型和第二型的甲基轉移酶的分子量皆介於 275 kDa 到 500 kDa 之間。而這些 PRMT 單體的分子量卻只在 40 kDa 到 70 kDa 間, 因此 PRMT 單體可能是甲基轉移酶複合體中的催化次單元。

本研究中, 我們使用生化法來純化、分析豬腦中的精胺酸甲基轉移酶。以不同的離心速度將組織蛋白萃取液分 fraction, 所得之上清液和沉澱物分別命名為 S1、S2、S3 和 P1、P2、P3。而以超高速離心得到沉澱物 P3 回溶於含有 0.5 M KCl 的萃取液中再離心一次得到 S4 和 P4。大多數的 PRMT 活性 (以第一型甲基化的受質 fibrillaritin 來做測試) 在 S3 (cytosolic), 而在 S4 fraction 卻有最高的比活性。將淋巴母細胞萃取液或 P3 fraction 加入 0.5 M KCl 後 PRMT 活性亦顯著的增加, 而將 S4 fraction 中的 KCl 透析後則 PRMT 活性下降。因此證實 0.5 M KCl 會影響 PRMT 活性。然而, 在 S3 中卻含有較 S4

大量的 PRMT1 (在哺乳動物系統中最主要的第一型蛋白質精胺酸甲基轉移?) , 且重組的 PRMT1 活性不受 0.5 M KCl 影響。因此有可能高濃度 (0.5 M) 的 KCl 會讓 P3 中與甲基轉移? 結合的抑制者分開而使得 S4 中的甲基轉移? 有較高的比活性。經陰離子交換樹脂 (Mono Q) 分離後兩個 fractions 中的第一型甲基化活性幾乎出現在同樣的位置。因此現在我們試著去純化這兩個 fractions 中的酵素去瞭解它們的成分。

在細胞中含有 RGG motifs (arginin- and glycine-rich) 的 RNA 結合蛋白會被細胞中具專一性的蛋白質精胺酸甲基轉移? 催化形成精胺酸甲基化。我們先前的資料顯示將淋巴母細胞養在含 AdOx (一種間接的甲基轉移? 抑制劑) 的培養基中 , 可獲得大量低甲基化的受質。我們的資料亦顯示蛋白質精胺酸甲基轉移? 及其受質皆廣泛的分布於淋巴母細胞中的不同 fractions 中。最近的資料亦顯示精胺酸甲基化與蛋白間的交互作用及某些甲基接受蛋白於細胞內的分佈有關。在此實驗中我們將淋巴母細胞分為不同的 fractions 來研究含有 RGG 的蛋白 (例如 : FMRP , hnRNP -A1 , 和 hnRNP -A2/B1) 分布情形是否會受甲基轉移? 抑制劑 Adox 影響。運用西方點墨法來分析這些蛋白 , 我們看到 FMRP、hnRNP -A2/B1 及一些甲基接受蛋白在以 AdOx 處理和正常細胞內的分佈情形有所差異。未來我們將進一步以細胞免疫

螢光染色和二維電泳來研究精胺酸甲基接受蛋白的甲基化狀態與其在細胞內分佈情形的相關性，以提出更多關於這方面的資料。

Abstract

Protein arginine methylation is a posttranslation modification catalyzed by protein arginine methyltransferase (PRMT). The type I methyltransferase catalyzes the formation of mono- and asymmetric di-methylarginine and another type II activity can catalyze the formation of mono- and symmetric di-methylarginine on other methylaccepting proteins. Before the identification of five different PRMT genes recently, the type I and II PRMT from various biological resources were biochemically characterized to be of molecular weight from 275 kDa to 500 kDa. All these PRMT monomers are of molecular weight from 40 kDa to 70 kDa, thus are likely to be the catalytic subunit in a methyltransferase complex. In this study, we used the biochemical approach to isolate and analyze the arginine methyltransferase from a natural source porcine brain. We fractionated the lysates by differential centrifugation to obtain the supernatant S1, S2 and S3, as well as the pellet fractions P1, P2 and P3. Part of the P3 was resuspended in lysis buffer with 0.5M KCl and subjected to ultracentrifuge again to obtain S4 and P4. The majority of the PRMT activity (assayed by a type I substrate fibrillarlin) was in the S3 (cytosolic) fraction while the highest specific activity was in the S4 fraction. Addition of KCl increase the arginine methyltransferase activity in the P3 fraction as well as that in the lymphoblastoid cell. Removal of the KCl in the S4 fraction decrease the PRMT activity. It is possible that high KCl concentrate can help to release the PRMT in P4 from associated inhibiting factors, thus increase the

methyltransferase activity.

However, PRMT1, the predominant type I PRMT in the mammalian system is much more abundant in S3 than S4, and the PRMT activities in S3 and recombinant PRMT1 were not affected by 0.5M KCl. Whether the methyltransferase in S3 and S4 were the same or different enzyme is under investigation. The type I activity in both fractions almost eluted at the same position by anion-exchange (Mono Q) column. We are now trying to purify the enzyme in both fractions to understand their identities.

Arginine methylation in RNA-binding proteins containing arginine- and glycine-rich RGG motifs is catalyzed by specific protein arginine *N*-methyltransferase in cells. We previously showed that lymphoblastoid cells grown in the presence of an indirect methyltransferase inhibitor, adenosine dialdehyde (AdOx), accumulated high level of hypomethylated protein substrates. We also demonstrated that protein-arginine methyltransferases as well as their methyl-accepting substrates were widely distributed in different subcellular fractions of lymphoblastoid cells. Recently arginine methylation has been suggested to be related with protein-protein interaction and subcellular localization of some methyl-accepting proteins. Therefore, in this study we fractionated lymphoblastoid cells into different subcellular fractions to study if localization of certain RGG containing proteins such as FMRP, hnRNP-A1, hnRNP-A2/B1, and nucleolin would be interfered upon Adox treatment. By western blot analyses using antibodies against these proteins, we demonstrated that subcellular localization of FMRP and hnRNP-A2/B1 appeared to be different in AdOx-treated and normal cells. Further studies utilizing immunofluorescent staining and 2-dimensional

gel electrophoresis will provide more information of the relationship between the methylation status of arginine methyl-accepting proteins and their subcellular localization.

序論

後基因體時代的一個主要的挑戰就是研究細胞中全部表達出來的蛋白質——也就是蛋白體。轉譯後之修飾使蛋白質的複雜度提昇，不只僅是二十個氨基酸之排列組合而已，而蛋白質精胺酸甲基化 (arginine methylation) 是真核細胞中常見的轉譯後修飾 (posttranslational modification) 作用之一，它和訊號傳遞、RNA splicing、轉錄活化的過程有關。此一反應係由精胺酸甲基轉移酶 (arginine methyltransferase) 所催化進行，以 S-adenosyl- L-methionine (SAM) 作為甲基提供者，將其甲基轉移至精胺酸的 guanidino group 上 (Gary et al., 1996)。迄今，在哺乳動物細胞已發現兩種截然不同的蛋白質精胺酸甲基轉移酶活性 (附圖一)。第一型的甲基轉移酶形成精胺酸單甲基化及不對稱型雙甲基化，其受質包括了許多 RNA 結合蛋白、RNA 運輸蛋白 (Najbauer et al., 1993) 及轉錄因子 (Chen et al., 1999) 等；第二型的甲基轉移酶形成精胺酸單甲基及對稱型雙甲基化，myelin basic protein、small nuclear ribonucleoproteins (Branscombe et al., 2001) 為其受質。關於精胺酸甲基轉移酶，及甲基接受蛋白的一些特性，分述如下：

一、 關於精胺酸甲基轉移？：

蛋白質精胺酸甲基轉移？參與了細胞的分化，訊號傳遞及蛋白質的運輸，迄今已有六種人類蛋白質精胺酸甲基轉移？被發現，依序命名為 PRMT1 (protein arginine-methyltransferase)、PRMT2、PRMT3、PRMT4、JBP1/PRMT5、PRMT6，這些 PRMT 家族具有數個被高度保留的區域，包括：N 端的一對酪胺酸殘基、motif I、post I、II、III 和 C 端的“THW loop”，這些區域會在三度空間會摺疊成一催化核心，和甲基提供者結合進行甲基化的催化反應，而依細胞免疫螢光結果得知：PRMT1 和 PRMT2 位於整個細胞而核內較明顯、PRMT3 和 PRMT5 位於細胞質、PRMT4 和 PRMT6 則位於核內 (Lin et al., 1996；Tang et al., 1998；Frankei et al., 2002)。現依精胺酸甲基轉移？催化受質甲基化的形式分述之：

(一) 第一型甲基轉移？：

廣泛地存在於細胞之中，能夠催化重組的受質（富含 glycine 與 arginine）形成精胺酸單甲基化與不對稱型雙甲基化。目前在於哺乳動物中已知有 PRMT1、PRMT2、PRMT3、PRMT4、PRMT6 五種，而在酵母菌中則有 RMT1 (Gary et al., 1996；Henry et al., 1996)。

PRMT1 的基因位於人體染色體 19q13.3 的位置 (Scorilas et al., 2000)，他催化了 90% 以上的第一型甲基化反應 (Pawlak et al. 2000)；

Tang *et al.* 2000), 而以 PRMT1 cDNA 所推論出的多? 序列計算, PRMT1 的分子量只有 40.5 kDa (Lin *et al.*, 1996), 但以 histone 為受質由細胞萃取液中所測得的第一型精胺酸甲基轉移? 活性及以 PRMT1 抗體測驗經膠體過濾管柱分離的細胞萃取液, 其分子量卻高? 250-400 kDa (Ghosh *et al.*, 1988; Tang *et al.*, 1998), 因此在一般狀況下, 細胞中的 PRMT1 可能是以一較大分子量的複合體形式存在。研究顯示 PRMT1 參與了數項重要的細胞生理機轉, 包括: (1) PRMT1 可與 immediate-early protein TIS21 及 BTG/TOB 蛋白產生交互作用, 推測可能藉此調節細胞的生長及訊息傳遞, 並發現可經由與 TIS21 的作用, 而增強其本身甲基轉移? 的活性 (Lin *et al.*, 1996)。 (2) PRMT1 可與干擾素 α , 受體上的細胞質內區域結合, 而影響干擾素相關的訊息傳遞路徑。當去除 PRMT1 的活性後, 干擾素抵抗病毒及抑制細胞增生的能力會大幅下降 (Abramovich *et al.*, 1997)。 (3) 藉由甲基化位於細胞質中的轉錄因子 STAT1 (signal transducers and activators of transcription) 蛋白而影響干擾素 α , 所誘導的轉錄活性。而在某些癌細胞中, 當抑制 STAT1 protein 甲基化的過量 MTA (methylthioadenosine: 一種甲基轉移? 抑制劑) 堆積時, 可能會使干擾素失去抑制細胞增生的能力 (Mowen *et al.*, 2001)。 (4) PRMT1 可與 ILF3 (interleukin enhancer-binding factor 3) 結合, 可能影響 ILF3

調節轉錄、DNA 修復的能力 (Tang et al., 2000)。 (5) PRMT1 可經由與 p160 coactivator 上的 activation domain 2 (AD2) 結合，再藉 p160 與 nuclear receptors (NRs) 的結合而間接影響了某些基因的表達，可能是甲基化改變了某些蛋白的結構 (如：histone)，而使轉錄反應易於進行 (Koh et al., 2001)。 (6) 以反轉錄病毒將一段 U3betaGeo 基因送入老鼠的 Prmt1 基因中讓 Prmt1 失效，並觀察此基因在胚胎的表?：發現 Prmt1-betaGeo fusion 基因會在神經板中線、head fold 及中樞神經表?，而在胚胎期會在 8.5 天時死亡，顯示 Prmt1 和神經系統及胚胎早期發展有關而不影響細胞的存活 (Pawlak et al. 2000)。 (7) 以 PC12 細胞進行 PRMT1 免疫沉澱的結果顯示 NGF (nerve growth factor) 會被甲基轉移? 活化且 PRMT1 會參與 NGF 的訊息傳遞 (Cimato et al., 2002)。 (8) 研究 PRMT1 和 BTG/TOB 蛋白家族間產生的交互作用發現，只存在 BTG1、BTG2 中的 boxC 序列是產生 PRMT1/BTG protein association 的必要因素。加入 boxC 會干擾 PC12 細胞的神經分化和胚胎幹細胞分化出神經元，因此 PRMT1/BTG proteins 和精胺酸甲基化所調控的訊息傳遞以及神經元的分化有關 (Berthet et al., 2002)。

PRMT3 的 N 端含有一個 zinc-finger domain 可幫助它辨識和 RNA-associated 的甲基接受蛋白 (Frankel et al., 2000)。

CARM1/PRMT4 會和 p160 的 C 端結合，當和 GRIP1

(glucocorticoid receptor interacting protein 1) 或 SRC-1a (steroid receptor coactivator-1) 共同表? 時,可透過 nuclear receptors ? 強轉錄活性。在 *in vitro* 狀態下 CARM1 能甲基化 histone H3, 將 CARM1 和甲基提供者結合的區域突變掉則甲基轉移? 與輔助活化子活性都會下降。因此, CARM1 所催化的蛋白質甲基化可能有助於轉錄調控 (Chen et al., 1999)。CARM1 催化 CBP/p300 的 KIX 區域形成甲基化會讓它失去和 CREB 互相作用的能力。因此, CARM1 在 cAMP 訊息傳遞路徑中扮演共同抑制者的角色 (Xu et al., 2001)。

PRMT6 具有累進式的催化作用每分鐘每毫克的酵素可催化約 144 pmol 的 methyl groups, 且 PRMT6 本身會被甲基化, 而這是現有 PRMT 中唯一會被甲基化的 (Frankel et al., 2002)。

酵母菌中的精胺酸甲基轉移? RMT1, 於 1996 年由 Gary 等人發現其表達基因 OPD1, 屬第一型甲基轉移?, 是由 348 個胺基酸所組成, 分子量約 39.8 kDa。RMT1 與哺乳動物的 PRMT1 在序列上有幾個相似的區域, 高度保留了 methyltransferase motifs I, postI、II、III 等 domains (Weiss et al., 2000)。另外更發現, RMT1 的存在, 對酵母菌的存活為非必須, 但會大幅影響細胞中許多的甲基化反應 (Gary et al., 1996; Henry et al., 1996)。在我們的實驗中, 因為重組的 RMT1 容易取得, 其甲基化的活性又較 PRMT1 穩定, 且不會如 PRMT1 般

與許多其他 protein 發生 interaction 而可能影響其活性，所以我們便以 RMT1 作為進行 *in vitro* 甲基化反應的酵素。

(二) 第二型甲基轉移？：

PRMT5 會催化 MBP (myelin basic protein)，形成精胺酸的單甲基化與對稱型雙甲基化，且 PRMT5 會和 pICln、WD45、p200、Sm D1、D3 等蛋白形成 pICln 複合體催化 Sm D1、D3 形成精胺酸的單甲基化與對稱型雙甲基化，進而調控 SMN (the survival of motor neuron protein) 複合體所參與形成 spliceosomal UsnRNPs 的一連串作用 (Meister et al., 2001)。

我們實驗室在之前以淋巴母細胞為 model 的實驗，已說明了淋巴母細胞中內生性甲基轉移？及甲基接受蛋白的特性，以重組的 fibrillarin 為第一型精胺酸甲基轉移？的受質，可觀察到淋巴母細胞的甲基轉移？活性以 cytosolic fraction 最強，接著是 ribosomal fraction，而以 nuclear fraction 最弱 (Lin et al., 2000)。為了對精胺酸甲基轉移？及甲基接受蛋白的特性有更進一步的了解，所以本實驗室以含有高 PRMT1 活性且易取得的豬腦組織進行有關甲基轉移？的研究。本論文第一部分的研究中，就利用這兩種材料，對不同 fractions 中的甲基轉移？活性，作更全面性深入的探討，並試著純化出組織中的甲基轉移？複合體，以瞭解複合體的組成成份及其細胞內生理機轉。

二、 關於精胺酸甲基轉移? 的甲基接受蛋白：

第一型的甲基接受蛋白通常具有 glycine-arginine rich (GAR) 的特定序列，而精胺酸的甲基化，就發生在這些區域中，如 Arg-Gly-Gly (RGG), Arg-X-Arg (RXR, X 為任意氨基酸) 與 Gly-Arg-Gly (GRG) (Birney et al., 1993; Kim et al., 1997; Smith et al., 1999; Hyun et al., 2000)。而這些被甲基化的蛋白大部分具有和 RNA 結合的能力，例如：hnRNP (heterogeneous nuclear ribonucleoproteins)、fibrillarin、nucleolin、Ewing Sarcoma (EWS) Protein 等，而 nucleolin、Ewing Sarcoma (EWS) Protein 會以被甲基化的形態在細胞核與細胞表面間來回穿梭移動 (Belyanskaya et al., 2001)。

hnRNPs 是 RNA 結合蛋白之一，對 mRNA 的合成、加工與輸出非常重要。當 nascent pre-mRNA 被轉錄出來後，就被 hnRNP 複合體黏合一直到 RNA 的 3' 端加上了 polyadenylation，並運送至核孔複合體 (NPC)。依 Balbiani Ring (BR) mRNA export 的電顯研究結果，顯示 BR mRNA 在通過核孔複合體時是和 hnRNPs (與 hnRNP A1、A2 同源) 結合在一起的 (Visa et al., 1996; Wurtz et al., 1996)。這些研究顯示 hnRNP A1 蛋白在 mRNA export 的過程中扮演一重要角色。

至於精胺酸甲基化對 hnRNP A 蛋白與其他甲基接受蛋白的影響仍不清楚，而 *in vitro* 的 hnRNP A1 精胺酸甲基化會些許的減少它與

單股核酸形成非特異性結合 (Rajpurohit et al., 1994) , 說明精胺酸的甲基化可能妨礙了 hnRNP A1 與 RNA 間的結合。hnRNP A1 可穿梭於細胞核與細胞質之間 (nucleocytoplasmic shuttling) (Dreyfuss et al., 1993), 並藉其與 mRNA 的結合, 可將 mRNA 攜至細胞質中 (Fischer et al., 1996)。1998 年一篇研究酵母菌 hnRNP 的文獻, 討論了精胺酸甲基化對 hnRNP 排出細胞核至細胞質的影響。他們發現, 酵母菌中的 hnRNP (包括 Npl3p、Hrp1p, 結構與哺乳動物 hnRNP A1 有極高相似性), 在細胞缺乏 RMT1 (為酵母菌中主要的精胺酸甲基轉移?) 而無法被甲基化時, 則 Npl3p 及 Hrp1p 將堆積於細胞核中, 這說明了 RGG motifs 上的精胺酸甲基化作用, 會幫助 hnRNP 自細胞核運送出 (Shen et al., 1998)。另外, 在一篇研究酵母菌中 Npl3p、Hrp1p 精胺酸甲基化反應與該蛋白結合 RNA 能力的文獻中指出, 精胺酸甲基化反應的發生與否, 並不影響它們與 RNA 的結合能力, 但 Npl3p Hrp1p 與 RNA 的結合, 卻會抑制其上精胺酸甲基化反應的進行 (Valentini et al., 1999)。在 *in vitro* 的實驗中若細胞萃取液加入 RNase 處理後, 則 Npl3p Hrp1p 將較未加入 RNase 的具有較高的甲基化現象 (Frankel et al., 1999)。

在第一型精胺酸甲基轉移? 的甲基接受蛋白中, fibrillarlin 亦是一個被廣為研究的受質。Fibrillarlin 是一個分子量約為 34 kDa 的蛋白

質，乃因在利用 scleroderma 病人血清中抗體所做的免疫螢光染色時，被發現存在於細胞核核仁的緻密纖維區 (dense fibrillar component) 而得此名 (Ochs et al., 1985)。之後來自不同種生物的 fibrillarin 亦一一地被提出，發現了一些相似的生物特性：其分子量介於 33 kDa 至 38 kDa 間，等電點呈鹼性 (PI 8.5~10)。在許多物種其 N 端包含了 glycine-arginine rich domain (RGG domain)，而 C 端具催化 pre-rRNA 甲基化 (2'-O-methylation) 的甲基轉移酶區域更是在各物種間被高度保留 (Barneche et al., 2000)。

先前的研究已經證實，fibrillarin 被發現可與 small nucleolar RNAs (snRNA) 的 box C/D 結合，涉及了 pre-rRNA processing、modification 及 ribosome assembly 等作用 (Tollervey et al., 1993)，且已知其 RGG domain 亦可為哺乳動物的 PRMT1 及酵母菌的 RMT1 所催化形成 asymmetric N^G, N^G -dimethylarginine。

因為精胺酸甲基化是屬於 stable reaction，當甲基標上以後即穩定存在蛋白質中，所以必需以一些甲基轉移酶抑制劑來增加胞內低甲基化蛋白以利後續甲基接受蛋白之分析，如 AdOx (adenosine dialdehyde) 抑制了 S-adenosyl-L-homocysteine (AdoHcy) 水解酶的活性後，細胞內的 AdoHcy 就會因持續的累積而增加，進而回饋抑制了甲基轉移酶的作用，導致甲基化反應無法進行 (附圖三)。配合此藥

物的使用，在處理細胞後，細胞內的甲基化反應將被抑制，則低甲基化狀態的甲基接受蛋白就會在細胞中增加。之前已利用AdOx抑制甲基化的機轉在以老鼠 pheochromocytoma cell (PC12) 及人類淋巴母細胞為實驗 model 的研究中證實，約有 90 % 的甲基接受蛋白是屬第一型精胺酸甲基轉移酶的甲基接受蛋白 (Najbauer et al., 1990 ; Li et al., 1998)。

因為酵母菌中的hnRNP，在細胞缺乏RMT1而無法被甲基化時會堆積於細胞核中，hnRNP A2會在肺癌患者的氣管上皮細胞的細胞質中大量表達，且以AdOx抑制淋巴細胞及HEK-293細胞甲基化後hnRNP A2在核中的表達會下降細胞質中的表達則上昇 (Ralph et al., 2000)，顯現出甲基化與否對甲基接受蛋白在不同細胞內的分佈情形之影響並非一成不變的，所以本論文第二部分研究中，我們就利用甲基化抑制劑AdOx處理來研究精胺酸甲基化對hnRNP A1、A2/B1與其它含有RGG domain甲基接受蛋白在003淋巴母細胞內分佈情形的影響。

材料與方法

一、豬腦及細胞株的來源：

- (a) 於台中肉品市場取得新鮮的豬腦，保存於-80 冰箱中，由中山醫學大學生科系洪健仁同學製備成不同 fractions。
- (b) 人類淋巴母細胞株 003 (Lymphoblastoid cell line) 由中山醫學大學醫學科技學院院長李宣佑教授提供。
- (c) HeLa cell line 細胞株來源：ATCC CCL-2。

二、抗體來源：

單株抗體：

- (a) FMRP mouse 單株抗體由 CHEMICON 公司購得。
- (b) PRMT1 mouse 單株抗體由 abcam 公司購得。
- (c) PCMT-II mouse 單株抗體由 Transduction Laboratories 公司購得。
- (d) Sam68 mouse 單株抗體由 Transduction Laboratories 公司購得。
- (e) methyl arginine mouse 單株抗體 (7E6) 由 abcam 公司購得。

多株抗體：

- (f) hnRNP A1 goat 多株抗體 (Y-15) 由 SANTA CRUZ 公司購得。

(g) hnRNP A2/B1 goat 多株抗體 (F-16) 由 SANTA CRUZ 公司購得。

(h) Goat anti-mouse IgG-FITC 多株抗體由 CHEMICON 公司購得。

三、豬腦蛋白萃取液的製備：

取出 5~8 g 的豬腦組織，加入 3 倍體積的 lysis buffer (0.32 M sucrose , 20 mM Tris pH 7.3 , 5 mM MgCl₂ , 1 mM PMSF , 1 µg/ml aprotatin , 1 µg/ml pepstatin , 1 µg/ml leupetin) , 使用均質器將組織磨碎 (S₀)。以不同的離心轉速將蛋白分離：首先將 S₀ 以 800 x g 離心 10 分鐘，分成上清液 S₁ 及沈澱 P₁；S₁ 以 9200 x g 離心 15 分鐘，分成上清液 S₂ 及沈澱 P₂；S₂ 以 130,000 x g 超高速離心 1 小時，分成上清液 S₃ 及沈澱 P₃；將部份的 P₃ 回溶於含有 0.5 M KCl 的 lysis buffer 後，以 130,000 x g 超高速離心 1 小時，分成上清液 S₄ 及沈澱 P₄。

四、淋巴母細胞株、HeLa 細胞株的培養：

將淋巴母細胞株 003 (Lymphoblastiod cell) 培養於含 10 ml 培養液的 25 cm² 培養瓶中，所用的培養液為 90 % RPMI , 10 % FBS , 1 % PSN , 1 % L-glutamine。爾後每兩天換一次細胞培養液，將培養瓶置於 37 °C , 5 % 二氧化碳培養箱。細胞長滿時，將之搖散吸至 15 ml 離

心管以 1500 rpm 離心 10 分鐘，將細胞收下來，用 PBS 洗三次後放置 -80 備用。

將 75 cm²細胞培養皿中長到 8 分滿的 HeLa 細胞，以 1 倍的 PBS 緩衝溶液 10 ml 沖洗一下，將 PBS 緩衝溶液吸出後，加入 1 倍的胰蛋白酶 (trypsin, GIBCO BRL) 0.8 ml，當胰蛋白酶 覆蓋所有細胞後，即馬上吸出且要盡量吸乾，手輕輕拍打培養皿邊緣幫助細胞能完全脫離培養皿，利用顯微鏡 (phase contrast, Nikon) 觀察細胞是否已脫離培養皿，待細胞脫落後，以含有血清的 MEM 細胞培養液 (90 % MEM, 10 % FBS, 1 % PSN, 1 % L-glutamine, 1 % NEAA) 8 ml 沖洗細胞，並以 10 ml 無菌玻璃吸管吸取 4 ml 分別置於兩個 75cm²的細胞培養皿中，再將培養液補至 8 ml。

五、淋巴母細胞株、HeLa 細胞株加藥 (AdOx) 培養：

將淋巴母細胞株 003 (Lymphoblastoid cell) 培養於含 10 ml 培養液的 25 cm² 培養瓶中，所用的培養液為 90 % RPMI, 10 % FBS, 1 % PSN, 1 % L-glutamine。將培養皿置於 37 °C, 5 % 二氧化碳培養箱，每兩天換一次細胞培養液。於細胞長滿時，更換新鮮的培養液並加入 20 μM 的甲基轉移酶抑制劑 AdOx (adenosine periodate oxidized; Sigma)，再放回培養箱中靜置 72 小時，以備抽取蛋白。

將 2 ml HeLa 細胞拆至放有 18×18 mm 玻片的 6 well 培養皿上，將培養皿置於 37 °C，5 % 二氧化碳培養箱。於細胞三分滿時，更換新鮮的培養液並加入 20 μM 的甲基轉移酶抑制劑 AdOx (adenosine periodate oxidized ; Sigma)，再放回培養箱中靜置 72 小時，準備進行細胞免疫螢光實驗。

六、淋巴母細胞質萃取液的製備：

待培養在 25 cm² flask 的細胞長滿後 (約 3-5×10⁶ 個細胞)，將細胞搖散，以 10 ml 無菌玻璃吸管將細胞懸浮液吸到 15 ml 離心管中，以 1500 rpm 離心 (HITACHI O5P21, Japan) 10 分鐘收細胞，倒掉培養液後以滅過菌的 1×PBS 10 ml 清洗 3 次將殘留的培養液洗掉，再將 pellete 回溶於 200-500 μl 的細胞蛋白萃取液 [1 倍 PBS; 5% glycerol ; 1 mM sodium EDTA ; 1 mM sodium EGTA ; 1 mM dithiothreitol (DTT) ; 40 μg/ml leupeptin ; 40 μg/ml aprotinin ; 20 μg/ml pepstatin ; 1 mM PMSF(使用前再加入 phenylmethylsulfonyl fluoride , 因為 PMSF 原液很不穩定，要以很濃的濃度保存在冷凍箱中；一但加入緩衝液中，會在二十分鐘內失去效用) ; 0.5% Triton X-100] 中，混合之後，用超音波震盪器 (MISONIX XL2020, USA) 以頻率 8 連續震盪 20 秒，再置於冰上 30 秒，重複 3 次將細胞震碎，直到細胞液澄清為止。最後

在 4 °C 以 12000 g 離心 20 分鐘 (Beckman AVANTI30, USA) , 取上清液保存於 -20 °C 。

七、淋巴母細胞 Subcellular Fractionation 萃取液的製備：

將 $3-5 \times 10^6$ 個細胞以 PBS 洗三次後加入 1 ml 的 Extraction buffer (10 mM Tris-HCl, pH 7.4 ; 150 mM NaCl ; 1.5 mM MgCl₂ ; 100 mM NaF ; 10 µg/ml aprotinin ; 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride ; 1 mM dithiothreitol/DTT ; 40 µg/ml leupeptin ; 20 µg/ml pepstatin ; 0.5% NP-40) , 混合均勻 , 置於冰水中 10 分鐘後過最小號的針頭 (22 G \times 1¹/₄; 0.7 \times 32 mm) 5-6 次 , 藉以打破細胞 , 再以 3000 g 離心 5 分鐘 , 此時的 pellete 即為 nuclear fraction , 上清液則再以超高速 100,000 g 離心 60 分鐘 , 所得 pellete 即為 ribosome fraction , 上清液為 cytosolic fraction。整個萃取過程維持在 4 °C , 蛋白萃取後保存在 -20 °C , 最後蛋白濃度再以 BCA protein assay (Pierce) 定量。

八、蛋白濃度的測定 (BCA Protein Assay ; Pierce) :

準備不同稀釋倍數 (0、0.2、0.4、1、2、4 µg / 5 µl) 的標準蛋白 (Bovine serum albumin; BSA) 與待測蛋白各 5 µl, 並在各管加入 100 µl

working reagent (BCA reagent A : BCA reagent B = 50 : 1) 混合均勻，於 60 incubate 30 分鐘後，待試管溫度回到室溫，以光度比色儀 (Beckman DU640, USA) 測波長 562 nm 的相對吸光值 (OD_{562})，將得到的數值扣除背景值，再與標準蛋白 BSA 的斜率做比較，就可換算出欲測定蛋白的濃度 ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$)。

九、SDS-聚丙烯醯板膠電泳法：

將要分析的蛋白樣品加入其三分之一體積的 4X sample buffer 之後，然後在 95 (THERMOLYNE 17600, USA) 下煮 5 分鐘使蛋白變性。再將反應後溶液依序加入以 Laemmli (1970) 法配製的緩衝溶液系統之 12.5% 膠體凹槽中 (0.75 mm \times 7 cm resolving gel)，進行 SDS 電泳膠的分析。而 12.5% SDS-聚丙烯醯板膠製備之配方如下表所列：

	Resolving gel	Stacking gel
Acrylamide-bisacrylamide (29:1)	3.125 ml	0.562 ml
1.5 M Tris-Hcl pH8.8	2.5 ml	
0.5 M Tris-Hcl pH6.8		1.25 ml
10% SDS	0.1 ml	0.05 ml
10% ammonium persulfate	75 μl	15 μl
TEMED	15 μl	4 μl
D ₂ H ₂ O	5 ml	3.188 ml

跑膠的條件為：以 100 伏特 (Bio-Rad PAC300)，在 1 倍的電泳

緩衝液 (25 mM Tris , 192 mM Glycine , 0.1 % SDS) 下進行 2 個小時的膠體電泳分析 (Bio-Rad Mini-PROTEAN II , III)。之後將跑完的膠浸泡於染色液 Coomassie blue (0.5 g Coomassie blue R250 溶於 208 ml d₂H₂O ; 208 ml methanol ; 84 ml glacial acetic acid) 中一個小時 , 再以前去染液 (25 % methanol ; 10 % acetic acid) 脫色一個小時。

十、蛋白質甲基化反應 (*in vitro*) :

為了觀察豬腦 fractions 及淋巴母細胞中的內生性甲基轉移? 活性, 我們依定量結果取等量的細胞萃取蛋白 (20 μg) 作為反應酵素, 加入受質後 (甲基接受蛋白 : 重組之 fibrillarlin 5 μg、MBP 5 μg、R9 18.71 n mole) , 以 1.5 μCi ³H-SAM (S-adenosyl-L-[methyl-³H] methionine, Amersham Pharmacia) 為甲基提供者, 於 reaction buffer (50 mM sodium phosphate pH 7.5) 中, 37 反應一個小時後加入 3× SDS sample buffer 終止反應, 於 95 煮 5 分鐘將蛋白 denature 後, 利用 12.5 % 的 SDS-PAGE 進行電泳分析 polyacrylamide gel 於跑完電泳後以 Coomassie blue 染色一個小時, 接著以前去染液 (25 % methanol ; 10 % acetic acid) 去染脫色一個小時, 再將膠體浸泡於 EN³HANCE (Du Pont NEN) 中, 於室溫緩緩搖動一個小時, 之後於 d₂H₂O 中搖 30 分鐘, 將膠 dry 乾後 (Model 583 Gel Dryer, Bio-Rad) 在 -80 下以 X 光

片 (Kodak, MS) 顯影三天。

十一、西方點墨法：

將 SDS-聚丙烯醯板膠電泳分析後的膠體、nitrocellulose paper (Gelman Sciences) 及濾紙 (filter paper,ADVANTEC), 以三明治方式依序夾於 transfer cassette 中, 置於 mini Trans-Blot Cell (Bio-Rad) 加入 transfer buffer (12 mM Tris pH 8.3, 96 mM Glycine, 20 % Methanol), 以 100 伏特電流 (Bio-Rad 200/2.0) 進行轉漬 1 小時或 30 伏特過夜。轉漬後的 membrane 以含 5% 脫脂奶粉的 TTBS buffer (20 mM Tris-HCl pH 7.5 ; 150 mM NaCl ; 0.05% Tween 20) 進行 blocking , 於室溫下溫和搖 30 分鐘或 4 下搖過夜。倒出 blocking buffer , 加入含有第一次 PRMT1 單株抗體 (mouse monoclonal anti-PRMT1/1:500) 的 TTBS Buffer (含 0.5 % 脫脂牛奶), 於 4 下搖過夜後將第一次抗體倒出, 以 TTBS buffer 洗 5 分鐘, 重覆三次, 然後加入含有第二次抗體 Anti-mouse IgG-HRP/1:20000 (Santa Cruz) 的 TTBS Buffer (含 1 % 脫脂牛奶), 於室溫下搖晃 1 小時。倒出第二次抗體, 以 TTBS buffer 洗 5 分鐘, 重覆三次, 然後加入 1:1 的 Working solution (Luminol/Enhancer solution: stable peroxide solution, Pierce), 於室溫下搖 10 分鐘, 倒掉 Working solution , 將 membrane 置於 X 光片 (Bio-Max, Kodak) 下曝光, 先曝光一分鐘洗片後再依訊

號強弱增減曝光時間。

十二、Spot density 定量分析：

將 X 光片上的 data，以化學冷光螢光分析儀 (LAS-1000, FUJIFILM) 存成數位影像圖檔，進入影像分析軟體 (Image Gauge, FUJIFILM)，依形狀框選出欲分析的 spot 範圍後，扣除背景值並設定一基準 spot 後，運算出每個 spot 間的相對量 (spot 範圍 \times spot 濃度)。

十三、以 FPLC 系統分析純化 S₃、S₄ 中的酵素：

為了能分析與純化 S₃、S₄ 中的酵素我們利用 MonoQ (amersham pharmacia biotech) 陰離子交換樹脂管柱中的陽離子 $-\text{CH}_2-\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$ 對 sample 中陰離子的親和性，使得 sample 中吸附力弱的陽離子或中性離子先被析出，再使用高鹽溶液沖洗管柱而將陰離子替換出來。管柱體積 1 ml 使用液相層析儀 (AKTA purifier, amersham pharmacia biotech) 進行管柱層析。將 1~5 ml 蛋白 sample 打入，先使用 buffer A (0.02 M Tris pH 7.5) 沖洗 5 倍管柱體積，接著慢慢加入 buffer B (0.02 M Tris pH 7.5+1 M NaCl) 5 倍管柱體積，形成鹽類濃度梯度 (0~1 M NaCl)，沖出結合之蛋白，最後再使用 buffer A 平衡管柱。條件設定為：

Time (min)	% of buffer A	% of buffer B
Initial	100	0
5	100	0
10	50	50
15	0	100
20	0	100
25	100	0

Flow rate : 1 ml / min
Max pressure : 750 psi

以波長 280 nm 的紫外光來偵測，並由 5 分鐘開始每 30 秒收一管，共收 30 管，所有收下來的 fraction 分別取 11 μ l 進行甲基化反應與 30 μ l 進行銀染分析。

十四、銀染：

將過完 MonoQ HR 5/5 管柱的 sample 以 SDS-聚丙烯醯板膠電泳法分離後，以 Bio-Rad 的銀染試劑進行染色分析，其方法如下：

將 SDS-聚丙烯醯板膠 40 % methanol + 10 % acetic acid 共 100ml 搖 30 分鐘進行 fix 後，加入稀釋 10 倍的 oxidizer (9 ml oxidizer + 81 ml 水) 搖 5 分鐘，以 d_2H_2O 清洗 15 分鐘，每 5 分鐘換一次 d_2H_2O ，再加入稀釋 10 倍的 silver reagent (9 ml silver reagent + 81 ml 水) 搖 30 分鐘，以 d_2H_2O rinse 30 秒，最後加入 developer (8 g 粉末 + 250 ml d_2H_2O) 搖 5 分鐘進行呈色反應 (可重複 2 - 3 次視呈色而定) 並以 5

% acetic acid 終止反應，將膠以玻璃紙 dry 乾後加以分析。

十五、細胞免疫 FITC 螢光染色：

將長在 18×18 mm 玻片上的 HeLa 細胞，以 1 倍 PBS 沖洗 5 分鐘重複 3 次。每個培養皿加 2 ml paraformaldehyde (4 %) fixative solution (附錄一) 固定 20 分鐘，用 PBS 沖洗 5 分鐘重複 3 次。每個培養皿加 2 ml 含 1 % BSA-0.1 % TritonX-100 之 PBS 溶液室溫下作用 25 分鐘，用 PBS 沖洗 5 分鐘重複 3 次。

取 200 μ l, 1:600 倍 PBS 稀釋之 7E6 單株抗體 (ab412, abcam) 於玻片上，再將 parafilm 覆蓋其上 4 作用 16 小時之後用 PBS 沖洗 5 分鐘重複 3 次。取 200 μ l anti-mouse FITC 於玻片上再將 parafilm 覆蓋其上於 37 °C 下作用 30 分鐘，用 PBS 重複沖洗 3 次每 5 分鐘。以自來水沖洗 10 分鐘。用 95 % 酒精脫水作用 1 分鐘，再用 95 % 酒精脫水作用 1 分鐘，最後以 100 % 酒精脫水作用 1 分鐘。用紙巾輕壓拭去水份，待風乾後以 Mounting medium 封片 (Stephens Scientific)。

結果

第一部分 蛋白質精胺酸甲基轉移酶之特性分析

一、豬腦組織中不同 fractions 的甲基轉移酶活性：

根據先前研究結果顯示：淋巴母細胞的三個 subcellular fraction 都具有甲基轉移酶活性，可將 fibrillar in 甲基化。其中 cytosolic fraction 的活性最強，ribosomal fraction 次之，nucleus fraction 最弱（林佳慧碩士論文）。為了進一步分析精胺酸甲基轉移酶的特性，因此我以生科系洪健仁同學製備的豬腦 fractions 來進行甲基化實驗 [將豬腦 lysates 以不同的離心速度分成不同的 fractions (附圖二)。將離心下來的沉澱物 P3 fraction 回溶在含有 0.5 M KCl 的萃取緩衝液中再次離心將之分為 S4 (上清液) 和 P4 (沉澱物)]。

於是從每個 fractions 中取出定量的蛋白進行 *in vitro* 甲基化反應，以重組的酵母菌甲基轉移酶 (RMT) 甲基化 fibrillar in 做為不同批反應的比較標準。以重組的 fibrillar in 做甲基化受質測第一型甲基轉移酶的比活性時：豬腦各 fraction 中內生性甲基轉移酶比活性為： $S4 > S3 > S2 > S1$ ； $P4 = P3 = P1 > P2$ ，且 S4 大於 P3 (圖一)。

而豬腦各部分比活性配合其總蛋白量分析，可發現大部分的甲基轉移？活性是在 S3 (cytosolic) fraction。令人感興趣的是雖然 S4 fraction 的總活性較低，然而此 fraction 的比活性 (specific activity) 卻較其它 fraction 高。除此之外，S4 fraction 的總活性甚至高於 P3 fraction，而 S4 卻是由 P3 製備而來的。

於是本人接著分析，為何 S4 中具有較高的第一型甲基轉移？比活性？

二、KCl 對甲基轉移？活性的功效：

我們將 KCl 加入不同的豬腦 subcellular fractions 中使其終濃度為 0.5 M，然後測試精胺酸甲轉移？的活性。如圖二所示，外加 KCl 後，P3 fraction 的甲基轉移？活性變高而 S3 fraction 的活性則不受影響。因此有可能高濃度 (0.5 M) 的 KCl 會讓 P3 中與甲基轉移？結合的抑制者分開而使得 S4 中的甲基轉移？有較高的比活性 (specific activity)。

接著測試高濃度的 (0.5 M) KCl 是否會活化第一型精胺酸甲基轉移？活性，將重組的 PRMT1 (6.7 μ l) 加入 KCl 使其終濃度為 0.5 M 後，和沒加 KCl 的 PRMT1 (6.7 μ l) 於冰上反應 30 分鐘後，以重組的 fibrillarlin 為甲基接受蛋白進行甲基化反應後，壓片觀察 KCl 對

PRMT1 酵素活性的影響，X 光片上顯示重組的 PRMT1 酵素活性不受 KCl 影響 (圖三)。因此高濃度的 KCl 對重組之 PRMT1 並無強活性之效，同時也較不可能是高濃度的 KCl 使甲基接受蛋白 (重組之 fibrillarín) 較易受甲基轉移作用而增強了甲基化反應。

以上是將 S3、P4 fraction 或重組之 PRMT1 外加入 0.5 M KCl，除 P4 fraction 外未見對第一型甲基轉移受質 fibrillarín 之甲基化能力。接下來以透析法除去 S4 fraction 中高濃度之 KCl 再觀察其活性變化情形。以二次水或 20 mM PH 值 7.3 的磷酸鈉，對 100 μ l 的 S3、S4 fractions 進行透析後，各取 20 μ g 以 fibrillarín 做為受質進行甲基化反應，壓片結果顯示透析過的 S4 甲基轉移活性較未透析的低，而透析並不會影響 S3 fraction 中的甲基轉移活性 (圖四)。此結果顯示 KCl 和 S4 的高甲基轉移活性之關係，可能是因為 S4 中的酵素和 P3 fraction 中的某些抑制因子分開了。透析後在略小於 fibrillarín 處的內生性甲基接受蛋白的甲基化現象大為減弱 (圖四、九)。因此顯示高濃度的 KCl 在 S4 對 fibrillarín 的甲基轉移活性上具有某種功能。

三、以淋巴母細胞測試 KCl 對甲基化反應的影響：

以重組的 fibrillarín 做為甲基接受受質測試淋巴母細胞 total

extract 中的內生性甲基轉移？活性時，結果顯示在加入 0.5 M 的 KCl 後內生性甲基轉移？活性會大大增加，當以 spot density 定量後發現加入 0.5 M KCl 後 fibrillarín 被甲基化的訊號增加了 5.5 倍，而原先在 23 kDa 處被甲基化的蛋白則消失了（圖五）。進一步以淋巴母細胞中不同 subcellular fraction 中的內生性甲基轉移？（各 20 μ g）測試高濃度（0.5 M）KCl 對 fibrillarín 甲基化反應的影響，發現加入 KCl 反而會降低 nuclear、cytosolic fractions 對 fibrillarín 的甲基化，而增加 ribosomal fraction 對 fibrillarín 的甲基化（圖六）。而且，加入 KCl 反而會減少淋巴母細胞 total extract 中內生性甲基轉移？對受質 R9 的甲基化（圖七）。

四 以不同精胺酸甲基接受受質測試 KCl 對甲基轉移？活性之影響：

而以含 RGG 序列之 R9 胜？ [先前實驗室所合成 GGRGRGGGF 的胜？，其序列出自於 fibrillarín 和 fragile X mental retardation 的基因產物，已證實可被 rat、mouse brain extract 的內生性甲基轉移？或重組的 yeast RMT1 甲基化 (Ai et al., 1999)] 做甲基化受質時，對 R9 本身甲基化之情形為： $S1=S2=S3 > S4$ ，且 R9 會競爭掉內生性甲基接受蛋白的甲基化（圖八），此結果與之前淋巴母細胞的實驗結果一致

(林佳慧碩士論文)。接下來以透析法除去 S4 fraction 中高濃度之 KCl 再觀察其活性變化情形。以 20 mM pH 值 7.3 的磷酸鈉，對 100 μ l 的 S3、S4 fractions 進行透析後，以 R9、MBP、fibrillarín 為受質進行甲基化反應，結果顯示透析過的 S3 甲基轉移？活性不受影響，而 S4 對 R9、MBP 的甲基化亦不受透析影響，而 fibrillarín 之甲基化如之前之結果略有下降。而 S4 中內生性受質（如略小於重組 fibrillarín 之多？）之甲基化，則會因加入任何一受質而明顯下降（圖九）。

五 在 S3 fraction 和 S4 fraction 中的甲基轉移？是否相同：

到目前為止在哺乳動物中已找到六種不同的 PRMT 基因，因此探討在不同的 subcellular fractions 中的甲基轉移？是否相同是個相當值得研究且有趣的問題。雖然在 S4 fraction 的甲基轉移？比活性高於其它的 fraction，但當我們使用 anti-PRMT1 的抗體去偵測此酵素時，卻發現 S3 fraction 中含有大量的 PRMT1 蛋白，但在 S4 fraction 則非常稀少（圖十）。此結果顯示我們測得 S4 fraction 中高活性之第一型精胺酸甲基轉移？可能不是以 PRMT1 為主。取生科系洪健仁過完 gel filtration (Superdex S200) 的 sample 進行甲基化反應以分析不同 S3、S4 fractions 中的甲基轉移？活性。S4 和 S3 通過管柱所流出來的 column fractions 的甲基轉移？活性（以 fibrillarín 測試）幾乎出

現在同樣的位置 (分子量大約 250 kD)。然而，即使 S4 和 S3 在第 28 分鐘 eluted 出來的那管活性都最高，第一型甲基轉移？活性在 S3 較 S4 出來得早，而 S4 enzyme 較 S3 enzyme 出來的時間拖得長 (圖十一)。顯示在 S3、S4 中所含的第一型甲基轉移？可能並不相同。以陰離子交換管柱 (Mono Q) 依 PI 值分離 S3 和 S4 fractions，第一型甲基轉移？活性在 S3 較 S4 早出來 (圖十二)。當我們以銀染觀察過完 S200 的 S3、S4 或 Mono Q 的 S3 時，發現這些 sample 中含有許多不同分子量的蛋白、且很難找到和甲基轉移？活性？減而量相對應變化的蛋白 (圖十三)，因此我取 S3 過完 S200 管柱有甲基轉移？活性部分，再去過 Mono Q 管柱，欲得到較純的甲基轉移？複合體，卻發現以兩個管柱純化後的 samples 無法偵測到甲基轉移？活性，因此將來本實驗室將試著以其它方法來純化 S3、S4 fractions 中的甲基轉移？複合體，以更進一步瞭解此一複合體。

六、KCl 對第二型甲基轉移？活性之影響：

我們使用 5 μ g MBP (myelin basic protein：會被第二型甲基轉移？催化形成精胺酸單甲基化及對稱型雙甲基化) 當甲基化受質來分析這些 S3、S4 fractions 中的第二型甲基轉移？活性。我們發現主要的活性在 S3 fraction (圖十四)。而透析與否對 S3 中第二型甲基轉移？

活性沒有影響，而透析後的 S4 對 MBP 的甲基化能力和透析前比較亦沒有變化 (圖六：lane3、lane4)，因此高濃度的 KCl 可能並不影響第二型甲基轉移? 活性。取 S3 經 S200 column 分離後的 sample (生科系洪健仁製備)，以 5 μ g MBP 做受質進行甲基化反應，則第二型甲基轉移? 活性出現在第 30~36 管之間 (分子量 100 kDa 處附近)，因此第二型甲基轉移? 亦是以複合體形式存在 S3 fraction 中 (data not show)。

第二部分 精胺酸甲基接受蛋白於細胞內分布之研究

一、AdOx 對淋巴母細胞不同 subcellular fraction 中蛋白分佈之影響：

為了進一步鑑定甲基化與否對甲基接受蛋白分佈情形的影響，我們在培養淋巴母細胞時以 20 μ M 的 AdOx 處理三天，AdOx 會間接抑制甲基轉移酶的活性，這樣一來淋巴母細胞內的甲基接受蛋白就會呈低甲基化的狀態，再以不同的離心力將淋巴母細胞的萃取液分為 nucleus、ribosomal 和 cytosolic fraction (Corbin et al., 1997)。這些材料拿來做實驗前，由於已知 FMRP 主要會存在核糖體之 fraction (Lin et al., 1996)，所以我們先利用 anti-FMRP 做西方點墨法確立 fraction 分離的效果，結果 FMRP 的確大量出現在 ribosome fraction (圖十五：lane2、4、6)。分離效果好的 subcellular fraction 即可用其它甲基接受蛋白的抗體，鑑定甲基化與否對甲基接受蛋白分佈情形的影響。結果如下所述：

1. 對 FMRP 於淋巴母細胞不同 subcellular fraction 中分佈之影響：

已知 FMRP 為 FMR1 (fragile X mental retardation 1) 基因產物，其含有 2 KH domain 及一 C 端之 RGG 區域，會存在於 ribosomal fraction 中 (Willemsen et al., 1996)，因此以此抗體進行研究。

其結果如圖十五所示:FMRP 的訊號以 ribosomal fraction 最強, 以 AdOx 處理過的細胞其核內的 FMRP 訊號大大增強, ribosomal、cytosolic fractions 則減弱。

2. 對 hnRNP A1 於淋巴母細胞不同 subcellular fraction 中分佈之影響:

hnRNP A1 是典型的甲基接受蛋白之一, 因此以此抗體進行研究。其結果如圖十六所示: hnRNP A1 的訊號主要出現在 ribosomal fraction、核內亦有微弱訊號出現、細胞質則無訊號產生。以 AdOx 處理過的細胞其 hnRNP A1 蛋白於胞內分佈情形沒有改變。

3. 對 hnRNP A2/B1 於淋巴母細胞不同 subcellular fraction 中分佈之影響:

hnRNP A2/B1 是典型的甲基接受蛋白之一, 因此以此抗體進行研究。其結果如圖十七所示: 加 AdOx 的 (N) hnRNP A2/B1 訊號增強, 加 AdOx 的 (R) hnRNP A2/B1 訊號減弱。

4. 對含有 mono/dimethylarginine 的蛋白於淋巴母細胞不同 subcellular fraction 中分佈之影響:

此抗體 (7E6) 能辨識形成精胺酸單甲基或雙甲基化的蛋白, 因此以此抗體進行研究。其結果如圖十八所示: 以 AdOx 處理過的細胞核內 mono/dimethylarginine 訊號增強。

5. 對 FXR2 於淋巴母細胞不同 subcellular fraction 中分佈之影響：

FXR2 和 FMR1 有 50% 相同，且具有 KH 和 RNA 結合 domain。

因此以此抗體進行研究。其結果如圖十九所示：以 Ad0x 處理過的細胞其 FXR2 蛋白於 (N) 訊號增強 (C) 減弱。

6. 對 Sam68 於淋巴母細胞不同 subcellular fraction 中分佈之影響：

Sam68 (Src-associated in mitosis 68 kDa) 蛋白參與有絲分裂，具有 KH RNA 結合 domain 和 RGG box，而其 RGG 序列會受 PRMT1、RMT1 催化形成精胺酸單甲基及雙甲基化 (Bedford et al., 2000)。因此以此抗體進行研究。其結果如圖二十所示：Sam68 的訊號主要出現在細胞質、核內次之、核醣體最弱。以 Ad0x 處理過的細胞其 Sam68 蛋白於核內及核醣體有增加的現象。

7. 對 PRMT1 於淋巴母細胞不同 subcellular fraction 中分佈之影響：

PRMT1 為最主要的第一型蛋白質精胺酸甲基轉移？，因此以此抗體進行研究。其結果如圖二十一所示：以 Ad0x 處理過的細胞其 PRMT1 蛋白在細胞質、核及核醣體的訊號皆稍微增強。

8. 對 nucleolin 於淋巴母細胞不同 subcellular fraction 中分佈之影響：

nucleolin 是核內主要的磷蛋白質，會和 preribosomal RNA 結合，含有 RGG domain 而其 RGG 序列之精胺酸會被修飾為雙甲基化

(Najbauer et al., 1993)。因此以此進行研究。其結果如圖二十二所示：nucleolin 的訊號主要出現在 ribosomal fraction、核內亦有微弱訊號出現、細胞質則無訊號產生。以 AdOx 處理過的細胞其 nucleolin 蛋白於胞內分情形沒有改變。

二、以細胞免疫螢光法進一步觀察 AdOx 對細胞不同 subcellular fraction 中蛋白分佈之影響：

為了直接觀察甲基化與否對細胞內甲基接受蛋白分佈情形的影響，我們在以淋巴母細胞進行實驗時發現細胞會在處理過程中流失，因此改以 HeLa 細胞來實驗，在培養 HeLa 細胞時以終濃度 20 μ M 的 AdOx 處理 72 小時，讓 HeLa 細胞內的甲基接受蛋白呈低甲基化的狀態，再將加 AdOx 處理與未加 AdOx 處理的 HeLa 細胞以 4% paraformaldehyde 固定後，以一次抗體 (7E6、PRMT1、Sam68) 和胞內蛋白結合，加入含有螢光 (FITC) 的二次抗體後以共軛焦顯微鏡觀察，結果螢光散佈在細胞中，而 7E6、PRMT1 核中螢光較明顯，Sam68 主要散佈於胞質中，加 AdOx 的細胞 7E6 螢光明顯降低，但無法看出加 AdOx 處理與否對細胞在蛋白分佈上的差異 (圖二十三)。

討論

第一部分 蛋白質精胺酸甲基轉移？之特性分析

在研究蛋白質精胺酸甲基化機轉的領域中，我們實驗室首度顯示了高濃度的 KCl 可能會？進第一型甲基轉移？對以 fibrillarlin 為受質的活性，包括：在豬腦的 S4 fraction，和淋巴母細胞的 total extract 中 KCl 會大大增加第一型內生性甲基轉移？的比活性，在淋巴母細胞的核中 KCl 卻反而降低了第一型甲基轉移？的比活性，因此在不同細胞內的不同地方細胞可能藉由精胺酸甲基轉移？和膜蛋白等之結合程度（高濃度的 KCl 向來為 strip membrane associated membrane protein 常用的方法），而精密的調控蛋白質精胺酸甲基化的程度，進而影響訊息的傳遞、轉錄調控與蛋白質的運送...等作用，使細胞成功的完成各種精密、複雜的生理功能。而由於 KCl 濃度對甲基轉移？活性有巨大的影響，所以在相關的實驗操作上須考量 KCl 對實驗結果的影響，例如細胞萃取緩衝液內所含的鹽類等。

依照之前的研究顯示，甲基轉移？以複合體的型態存在細胞內。甲基轉移？會和不同的蛋白結合、分離以調節其活性。我們的結果支持第一型精胺酸甲基轉移？在細胞中會和抑制因子結合在一起。例如，在 ribosomal/membrane fraction (P3) 中的第一型甲基轉移？非常

有可能被抑制在一複合體中且在高[?]的情形下會被釋出。即使在 S3 和 S4 fractions 中的第一型甲基轉移[?]複合體的分子量 (determined by gel filtration) 和 PI 值相似 (association with anion exchanger), 它們應是不同的複合體。依據 PRMT-1 西方點墨法及管柱色層分析結果顯示, S3 中所含的應是 PRMT-1 複合體, 而 S4 中所含的則可能是其它種的第一型甲基轉移[?]複合體: PRMT-2 複合體? PRMT-3 複合體? PRMT-4 複合體? PRMT-6 複合體? 因此我們希望能純化出 S3、S4 中所含的甲基轉移[?]複合體, 配合 MALDI-TOF-MS 分析此複合體中的組成蛋白成份。

然而在純化甲基轉移[?]複合體的過程中我們卻遇到了極大的困難, 首先我們以陰離子交換管柱 (Mono Q) 色層分析法配合甲基化壓片結果核對膠上銀染的 bands, 結果在銀染的膠上並未找到和甲基轉移[?]活性相對應強弱變化的 bands, 且 PRMT-1 單體所在位置 40.5 kDa 處的 bands 亦與 fibrillarin 甲基化程度不合, 此結果可能是陰離子交換管柱色層分析法的離效果不夠好, 導致甲基轉移[?]的量相對不足, 故以銀染的靈敏度測不出來, 因此我們改變鹽類濃度梯度的條件企圖讓蛋白分離的更好。然而不論如何改變鹽類濃度梯度的條件, 蛋白分離的效果依然不佳, 只能排除 fraction 中約 50% 不具第一型甲基轉移[?]活性的蛋白。

因此我取 S3 過完 S200 管柱有甲基轉移？ 活性部分，再以 Mono Q 陰離子交換管柱分離蛋白，希望能將特定分子量的蛋白，再依其 PI 值分離出較純的第一型甲基轉移？ 蛋白，結果卻發現在過完兩個管柱的 samples 中無法偵測到甲基轉移？ 活性，這可能是因長期在室？ 下以管柱分離蛋白，或因兩種管柱使用了不同鹽類的緩衝液而破壞了 S3 內的甲基轉移？ 活性。接著我提高注入 Mono Q 管柱的 S3？ 本量，欲取得較高濃度的蛋白來進行進一步的純化時，卻發現過多的蛋白會塞住管柱而使得管內壓力大於管柱所能負荷的壓力，所以無法取得高濃度蛋白進行進一步的純化。目前實驗室正試著以其它方法純化出甲基轉移？ 複合體，希望不久的將來能順利突破此一瓶頸，解出此複合體的組成份子。

第二部分 精胺酸甲基接受蛋白於細胞內分布之研究

我們的結果顯示 AdOx 會使部份蛋白從核內 export 的能力下降而使核內訊號增強，例如含精胺酸單甲基/雙甲基化的蛋白、Sam68、FXR2、hnRNP A2/B1，因此甲基化與否對特定蛋白在細胞內的分佈調控極為重要。AdOx 不影響其中部份蛋白的分佈情形，例如：nucleolin、hnRNP A1。PRMT1 在加入 AdOx 後其在細胞質、核及核糖體的訊號皆稍微增強的現象，可能是 AdOx 抑制蛋白質甲基化後使細胞產生負回饋控制的細胞內生理機轉。

然而我們以淋巴母細胞進行hnRNP A2/B1於細胞內分佈情形的研究結果與Nichols等人在2000年以HEK-293 cells、NIH-3T3 cells、lymphocytes等細胞進行研究的結果有明顯的不同，Nichols等人在加入AdOx後核中所含的hnRNP A2/B1蛋白明顯降低、而細胞質中的hnRNP A2/B1增加；當我們以淋巴母細胞從事研究時顯示，原本存在核糖體/membrane fraction而不存在核內的hnRNP A2/B1，在以AdOx處理細胞後核內所含的hnRNP A2/B1蛋白反而些微增加，而這種研究結果上的差異可能是因為分fractions的方法不同或使用不同的細胞進行研究所造成的，因此蛋白質精胺酸甲基化與否對其蛋白於細胞內分布情形的改變可能會隨細胞種類的不同而有不同影響，未來應可透過

多種細胞的實驗找出其在細胞內作用的關聯性。

加入AdOx後核中含有精胺酸單甲基或雙甲基化的蛋白訊號在15 kDa、33 kDa、40 kDa、49 kDa、70kDa、90 kDa附近有增加的現象，而在核糖體 fraction 中加入AdOx後48 kDa附近訊號有增加的現象，33 kDa、40 kDa處則有下降的現象（圖十八），這可能是由於蛋白代謝或運輸效率的改變所造成的。依其分子量大小推論產生分布變化的蛋白是何種蛋白，例如：33 kDa處的蛋白可能是hnRNP A1和hnRNP A2/B1。未來我們將以二維電泳搭配西方點墨法偵測加入AdOx後，各fractions中含有精胺酸單甲基或雙甲基化的蛋白訊號的變化。將訊號強弱不同的點挖下來以MALDI-TOF-MS分析，我們就可知道那些已被甲基化的蛋白分佈會受AdOx影響。

當我們進一步以細胞免疫螢光染色來觀察蛋白的分佈情形時，發現塗以poly-D-lysine的玻片無法讓淋巴母細胞非常穩固的貼在玻片上，在反覆清洗過程中大部分的細胞都會流失，以甲醇在-20 固定二分鐘後情形依舊沒有改善，因此我們改以HeLa細胞進行細胞免疫螢光實驗，果然成功克服細胞流失的問題，但是可能所選的抗體靈敏度不夠，或是以AdOx處理的細胞和未處理的細胞間所產生的蛋白質精胺酸甲基化差異只佔所有被精胺酸甲基化蛋白的一小部分，因此在蛋白分佈上的差異變化不大，所以沒有觀察到明顯的螢光強度差異。

參考文獻

- Abramovich C., Yakobson B., Chebath J., and Revel M. (1997) A protein-arginine methyltransferase binds to the intracytoplasmic domain of the IFNAR1 chain in the type 1 interferon receptor. *EMBO*. **16**, 260-266
- Ai L. S., Lin C. H., Hsieh M., Li C. (1999) Arginine methylation of a glycine and arginine rich peptide derived from sequences of human FMRP and fibrillarin. *Proc. Natl. Sci. Counc. Repub. China. B*. **23**,175-80
- Barneche F., Steinmetz F., and Echeverria M. (2000) Fibrillarin Genes Encode Both a Conserved Nucleolar Protein and a Novel Small Nucleolar RNA Involved in Ribosomal RNA Methylation in *Arabidopsis thaliana* . *J. Biol. Chem.* **275**, 27212-27220
- Bedford M. T., Frankel A., Yaffe M. B., Clarke S., Leder P., Richard S. (2000) Arginine methylation inhibits the binding of proline-rich ligands to Src homology 3, but not WW, domains. *J. Biol. Chem.* **275**,16030-6
- Belyanskaya L. L., Gehrig P. M., and Gehring H. (2001) Exposure on Cell Surface and Extensive Arginine Methylation of Ewing Sarcoma (EWS) Protein. *J. Biol. Chem.* **276**, 18681-18687
- Berthet C., Guehenneux F., Revol V., Samarut C., Lukaszewicz A., Dehay C., Dumontet C., Magaud J. P., Rouault J. P. (2002) Interaction of PRMT1 with BTG/TOB proteins in cell signalling: molecular analysis and functional aspects. *Genes Cells* **7**, 29-39
- Birney E., Kumar S., and Krainer A. R. (1993) Analysis of the RNA-recognition motif and RS and RGG domains: conservation in metazoan pre-mRNA splicing factors. *Nucleic Acids Res.* **21**, 5803-5816

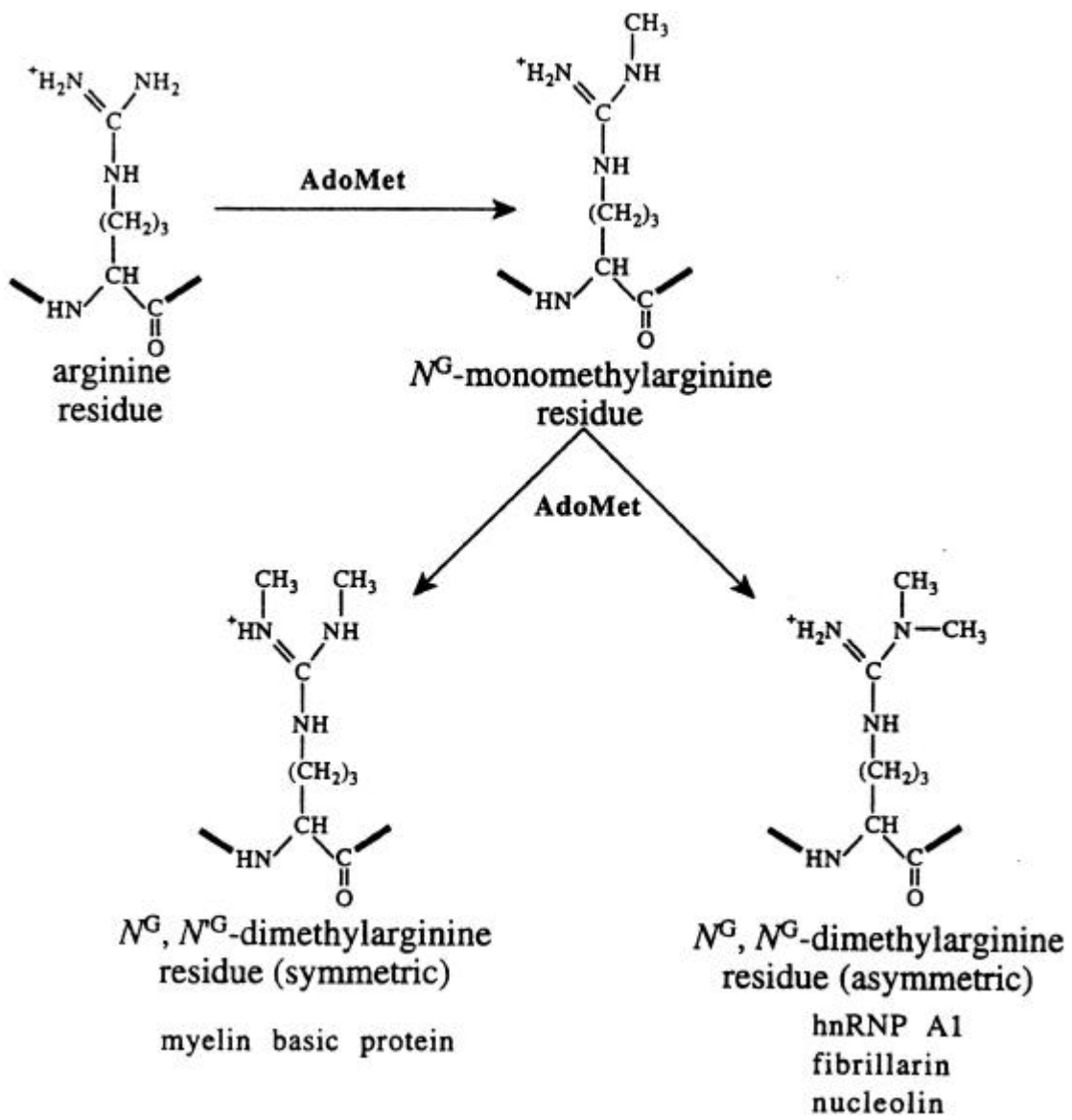
- Branscombe T. L., Frankel A., Lee J. H., Cook J. R., Yang Z., Pestka S., Clarke S. (2001) PRMT5 (Janus kinase-binding protein 1) catalyzes the formation of symmetric dimethylarginine residues in proteins. *J. Biol. Chem.* **276**, 32971-6
- Chen D., Ma H., Hong H., Koh S. S., Huang S. M., Schurter B. T., Aswad D. W., and Stallcup M. R. (1999) Regulation of Transcription by a Protein Methyltransferase. *Science* **284**, 2174-2177
- Chen H. K., Pai C. Y., Huang J. Y., and Yeh N. H. (1999) Human Nopp140, Which Interacts with RNA Polymerase I: Implications for rRNA Gene Transcription and Nucleolar Structural Organization. *Mol. Cell Biol.* **19**, 8536-8546
- Cimato T. R., Tang J., Xu Y., Guarnaccia C., Herschman H. R., Pongor S., Aletta J. M. (2002) Nerve growth factor-mediated increases in protein methylation occur predominantly at type I arginine methylation sites and involve protein arginine methyltransferase 1. *J. Neurosci. Res.* **67**, 435-42
- Corbin F., Bouillon M., Fortin A., Morin S., Rousseau F., Khandjian E. W. (1997) The fragile X mental retardation protein is associated with poly(A)⁺ mRNA in actively translating polyribosomes. *Hum. Mol. Genet.* **6**, 1465-72
- Dreyfuss G., Matunis M. J., Serafin Pinol-Roma, and Burd C. G. (1993) hnRNP Proteins and the biogenesis of mRNA. *Annu. Rev. Biochem.* **62**, 289-321
- Frankel A., and Clarke S. (1999) RNase Treatment of Yeast and Mammalian Cell Extracts Affects *in Vitro* Substrate Methylation by Type I Protein Arginine N-Methyltransferases. *Bioch. and Biophys. Res. Comm.* **259**, 391-400
- Frankel A., and Clarke S. (2000) PRMT3 is a distinct member of the protein arginine N-methyltransferase family. Conferral of substrate specificity by a zinc-finger domain. *J. Biol. Chem.* **275**, 32974-82

- Frankel A., Yadav N., Lee J., Branscombe T. L., Clarke S., and Bedford M. T. (2002) The Novel Human Protein Arginine N-Methyltransferase PRMT6 Is a Nuclear Enzyme Displaying Unique Substrate Specificity. *J. Biol. Chem.* **277**, 3537–3543
- Gary J. D., Lin W. J., Yang M. C., Herschman H. R., and Clarke S. (1996) The Predominant Protein-arginine Methyltransferase from *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* **271**, 12585-12594
- Ghosh S. K., Paik W. K., and Kim S. (1988) Purification and Molecular Identification of Two Protein Methylases I from Calf Brain. *J. Biol. Chem.* **263**, 19024-19033
- Henry M. F., and Silver P. A. (1996) A Novel Methyltransferase (Hmt1p) Modifies Poly(A)⁺-RNA-Binding Proteins. *Mol. Cell Biol.* **16**, 3668-3678
- Hyun Y. L., Lew D. B., Park S. H., Kim C. W., Paik W. K., and Kim S. (2000) Enzymic methylation of arginyl residues in –Gly-Arg-Gly-peptides. *Biochem. J.* **348**, 573-578
- Kim S., Merrill B. M., Rajpurohit R., Kumar A., Stone K. L., Papov V. V., Schneiders J. M., Szer W., Wilson S. H., Paik W. K., and Williams K. R. (1997) Identification of N^G-Methylarginine Residues in Human Heterogeneous RNP Protein A1: Phe/Gly-Gly-Gly-Arg-Gly-Gly-Gly/Phe Is a Preferred Recognition Motif. *Biochemistry* **36**, 5185-5192
- Koh S. S., Chen D., Lee Y. H, and Stallcup M. R. (2001) Synergistic Enhancement of Nuclear Receptor Function by p160 Coactivators and Two Coactivators with Protein Methyltransferase Activities. *J. Biol. Chem.* **276**, 1089-1098
- Li C., Ai L. S., Lin C. H., Hsieh M. L., Li Y. C., and Li S. Y. (1998) Protein N-Arginine Methylation in Adenosine Dialdehyde-Treated Lymphoblastoid Cells. *Arch. of Bioch. and Biophy.* **351**, 53-59

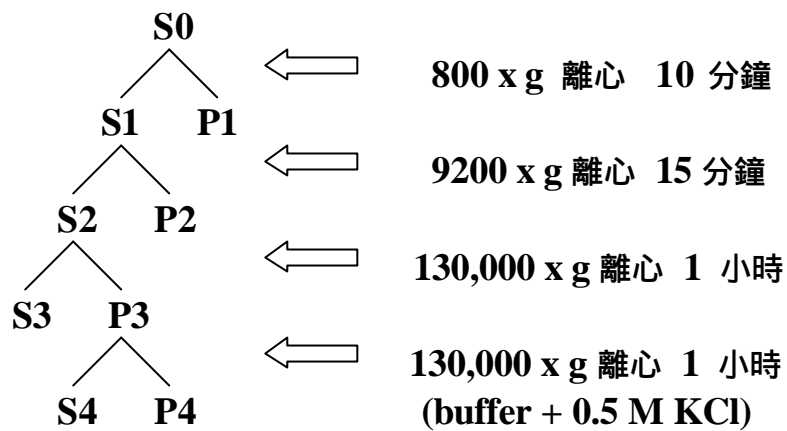
- Lin C. H., Hsieh M. L., Li Y. C., Li S. Y., Pearson D. L., Pollard K. M., and Li C. (2000) Protein N-Arginine Methylation in Subcellular Fractions of Lymphoblastoid Cells. *J. Biochem.* **128**, 493-498
- Lin W. J., Gary J. D., Yang M. C., Clarke S., and Herschman H. R. (1996) The Mammalian Immediate-early TIS21 Protein and the Leukemia-associated BTG1 Protein Interact with a Protein-arginine N-Methyltransferase. *J. Biol. Chem.* **271**, 15034-15044
- Liu Q. and Dreyfuss G. (1995) In Vivo and In Vitro Arginine Methylation of RNA-Binding Proteins. *Mol. Cell Biol.* **15**, 2800-2808
- Meister G, Eggert C, Buhler D., Brahms H, Kambach C, Fischer U. (2001) Methylation of Sm proteins by a complex containing PRMT5 and the putative U snRNP assembly factor pICln. *Curr. Biol.* **11**, 1990-1994
- Mowen K. A., Tang J., Zhu W., Schurter B. T., Shuai K., Herschman H. R., and David M. (2001) Arginine Methylation of STAT1 Modulates IFN γ -Induced Transcription. *Cell* **104**, 731-741
- Najbauer J. and Aswad D. W. (1990) Diversity of Methyl Acceptor Proteins in Rat Pheochromocytoma (PC12) Cells Revealed after Treatment with Adenosine Dialdehyde. *J. Biol. Chem.* **265**, 12717-12721
- Najbauer J., Johnson B. A., Young A. L., and Aswad D. W. (1993) Peptides with Sequences Similar to Glycine, Arginine-rich Motifs in Proteins Interacting with RNA Are Efficiently Recognized by Methyltransferase(s) Modifying Arginine in Numerous Proteins. *J. Biol. Chem.* **268**, 10501-10509
- Nichols R. C., Wang X. W., Tang J., Hamilton B. J., High F. A., Herschman H. R., and Rigby W. F. C. (2000) The RGG Domain in hnRNP A2 Affects Subcellular Localization. *Exp. Cell Res.* **256**, 522-532

- Ochs R. L., Lischwe M. A., Spohn W. H., Busch H. (1985) Fibrillarin: a new protein of the nucleolus identified by autoimmune sera. *Biol. Cell* **54**, 123-33
- Pawlak M. R., Scherer C. A., Chen S. J., Roshon M. J., and Ruley H. E. (2000) Arginine N-Methyltransferase 1 Is Required for Early Postimplantation Mouse Development, but Cells Deficient in the Enzyme Are Viable. *Mol. Cell Biol.* **20**, 4859-4869
- Rajpurohit R., Lee S. O., Park J. O., Paik W. K., and Kim S. (1994) Enzymatic Methylation of Recombinant Heterogeneous Nuclear RNP Protein A1. *J. Biol. Chem.* **269**, 1075-1082
- Rajpurohit R., Paik W. K., and Kim S. (1994) Effect of enzymic methylation of heterogeneous ribonucleoprotein particle A1 on its nucleic-acid binding and controlled proteolysis. *Biochem. J.* **304**, 903-909
- Scorilas A., Black M. H., Talieri M., and Diamandis E. P. (2000) Genomic Organization, Physical Mapping, and Expression Analysis of the Human Protein Arginine Methyltransferase 1 Gene. *Bioch. and Biophys. Res. Comm.* **278**, 349-359
- Shen E. C., Henry M. F., Weiss V. H., Valentini S. R., Silver P. A., and Lee M. S. (1998) Arginine methylation facilitates the nuclear export of hnRNP proteins. *Genes and Dev.* **12**, 679-691
- Smith J. J., Rucknagel K. P., Schierhorn A., Tang J., Nemeth A., Linder M., Herschman H. R., and Wahle E. (1999) Unusual Sites of Arginine Methylation in Poly(A)-binding Protein II and in vitro Methylation by Protein Arginine Methyltransferases PRMT1 and PRMT3. *J. Biol. Chem.* **274**, 13229-13234
- Tang J., Frankel A., Cook R. J., Kim S., Paik W. K., Williams K. R., Clarke S., and Herschman H. R. (2000) PRMT1 Is the Predominant Type I Protein Arginine Methyltransferase in Mammalian Cells. *J. Biol. Chem.* **275**, 7723-7730

- Tang J., Gary J. D., Clarke S., and Herschman H. R. (1998) PRMT3, a Type I Protein Arginine N-Methyltransferase That Differs from PRMT1 in Its Oligomerization, Subcellular Localization, Substrate Specificity, and Regulation. *J. Biol. Chem.* **273**, 16935-16945
- Tang J., Kao P. N., Herschman H. R. (2000) Protein-arginine Methyltransferase I, the Predominant Protein-arginine Methyltransferase in Cells, Interacts with and Is Regulated by Interleukin Enhancer-binding Factor 3. *J. Biol. Chem.* **275**, 19866-19876
- Tockman M. S., Erozan Y. S., Gupta P., Piantadosi S., Mulshine J. L., and Ruckdeschel J. C. (1994) The early detection of second primary lung cancers by sputum immunostaining. *Chest* **106**, 385S-390S
- Tollervey D., Lehtonen H., Jansen R., Kern H., and Hurt E. C. (1993) Temperature-sensitive mutations demonstrate roles for yeast fibrillarin in pre-rRNA processing, pre-rRNA methylation, and ribosome assembly. *Cell* **72**,443-457.
- Valentini S. R., Weiss V. H., and Silver P. A. (1999) Arginine methylation and binding of Hrp1p to the efficiency element for mRNA 3'-end formation. *RNA* **5**, 272-280
- Weiss V. H., McBride A. E., Soriano M. A., Filman D. J., Silver P. A., and James M. H. (2000) The structure and oligomerization of the yeast arginine methyltransferase, Hmt1. *Nature Structural Biology* **7**, 1165-1171
- Willemsen R., Bontekoe C., Tamanini F., Galjaard H., Hoogeveen A., Oostra B. (1996) Association of FMRP with ribosomal precursor particles in the nucleolus. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **225**, 27-33
- Xu W., Chen H., Du K., Asahara H., Tini M., Emerson B. M., Montminy M., Evans R. M. (2001) A transcriptional switch mediated by cofactor methylation. *Science* **294**,2507-11

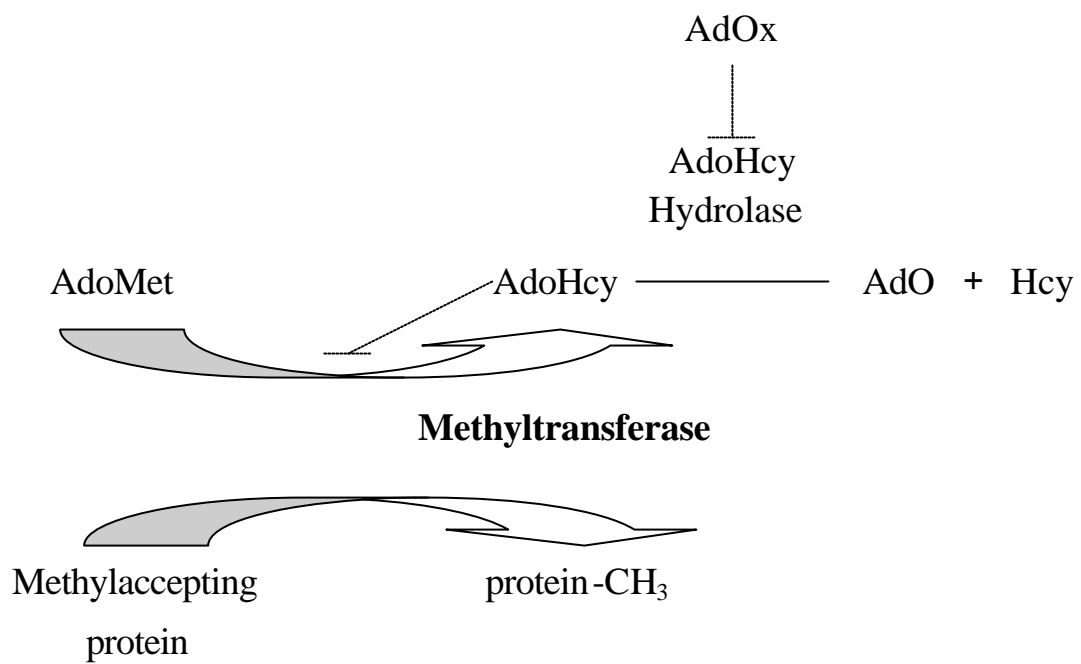


附圖一、精胺酸甲基化之結構示意圖



附圖二、將豬腦組織分成不同的 fraction

將 8 克的豬腦均質化後加入萃取緩衝液 (0.32 M Sucrose, 20 mM Tris, pH 7.3, 5 mM MgCl₂, 1 mM PMSF, 1 µg/ml each aprotinin, leupeptin, pepstatin)。將均質化後的豬腦以不同轉速離心分 fractions。P3 回溶於含 0.5 M KCl 的萃取緩衝液後以相同轉速 (130,000 x g) 再次離心得得到 S4 和 P4。分層後產物如上圖所示, S 代表上清液 (supernatant)、P 表示沉澱物 (pellet)。



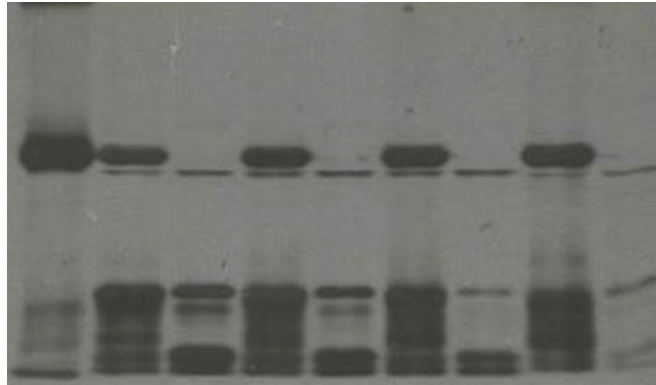
AdoMet : *S*-adenosyl-*L*-methionine

AdoHcy : *S*-adenosyl-*L*-homocysteine

AdOx : Adenosine dialdehyde

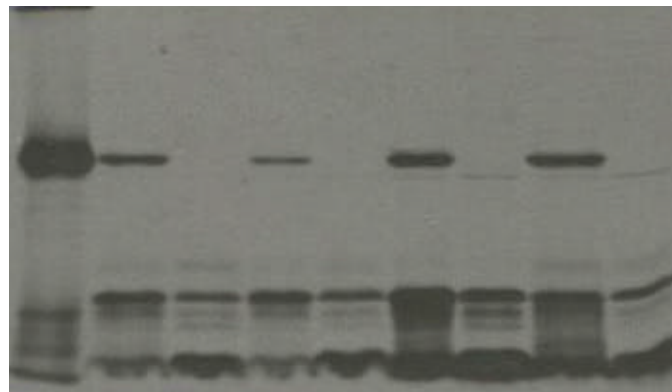
附圖三、AdOx 抑制細胞內甲基化的作用機制

RMT S1+ S1- S2+ S2- S3+ S3- S4+ S4-



fibrillarín

RMT P1+ P1- P2+ P2- P3+ P3- P4+ P4-



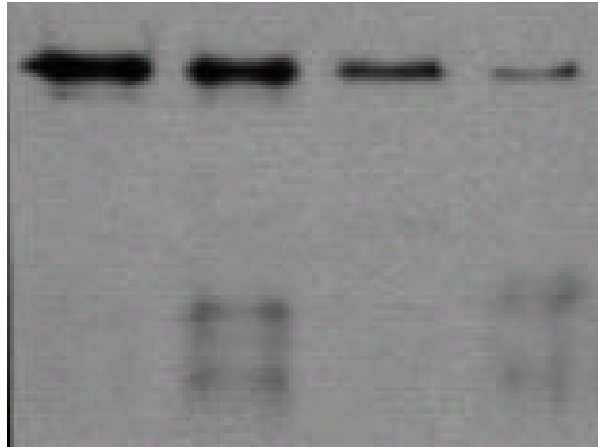
fibrillarín

1 2 3 4 5 6 7 8 9

圖一、豬腦各 fractions 中的第一型甲基轉移酶活性

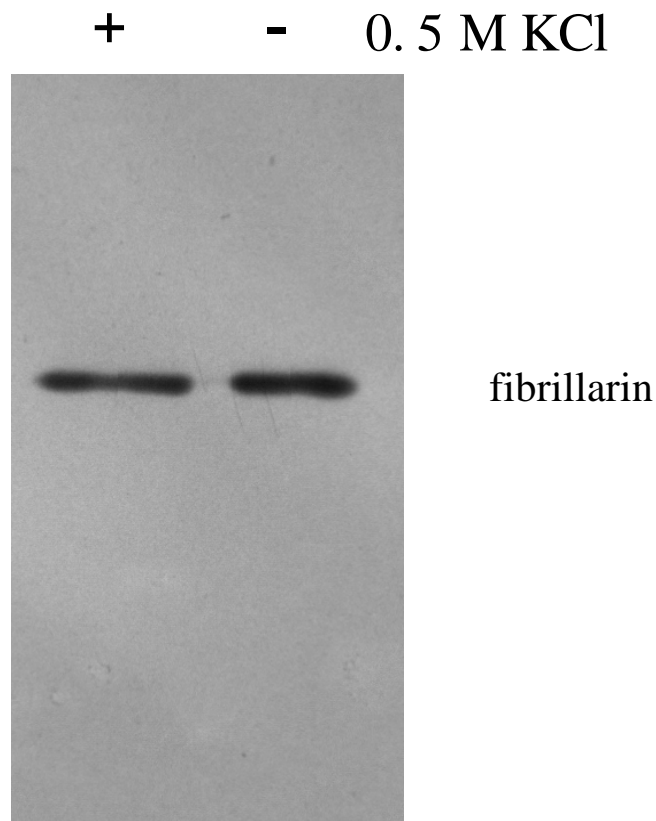
從每個 fractions 取 20 μg 的蛋白進行 in vitro 甲基化反應，以 1.5 μCi 的 $[^3\text{H}]\text{AdoMet}$ 為甲基提供者，在 15 μl 的終體積中分成有加（以 “+” 表示）或沒加（以 “-” 表示）5 μg 精胺酸甲基接受受質 fibrillarín。以重組的酵母菌甲基轉移酶 RMT 甲基化 fibrillarín (lane 1) 做為不同批的反應的比較標準。

S3+ S3- P3+ P3-



圖二、高濃度 KCl 對 S3、P3 fractions 中第一型甲基轉移酶活性影響

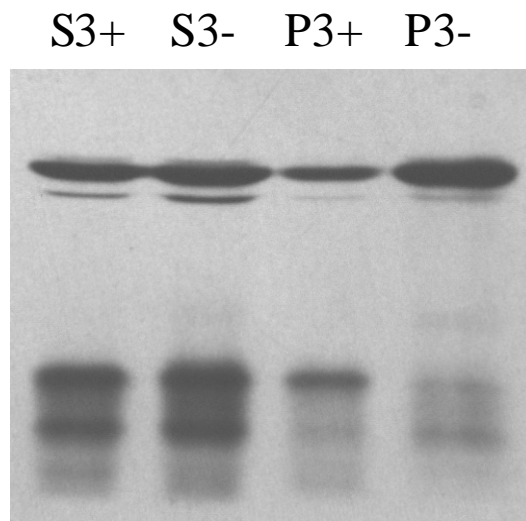
S3 和 P3 fraction 外加 0.5 M KCl 於冰上反應 30 分鐘後。以 fibrillaritin 為受質進行 *in vitro* 蛋白甲基化反應，方法如前所述。 ”+” 表示外加 0.5 M KCl。



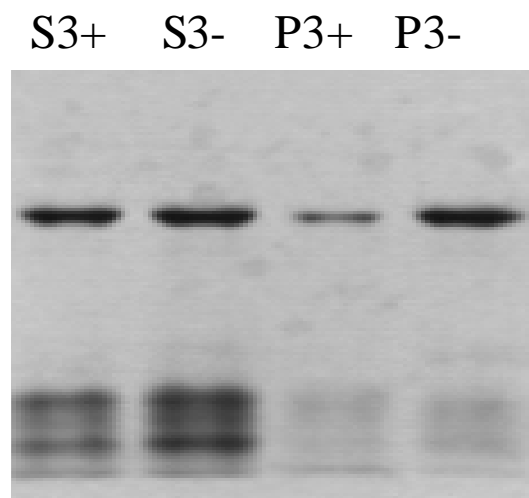
圖三、測試高濃度的 (0.5 M) KCl 是否會活化第一型精胺酸甲基轉移
? 活性

將重組的 PRMT1 (6.7 μ l) 加入 KCl 使其終濃度為 0.5 M 後，和沒加 KCl 的 PRMT1 (6.7 μ l) 於冰上反應 30 分鐘後，以重組的 fibrillar 為甲基接受蛋白進行甲基化反應後，壓片觀察 KCl 對 PRMT1 酵素活性的影響。

(A)

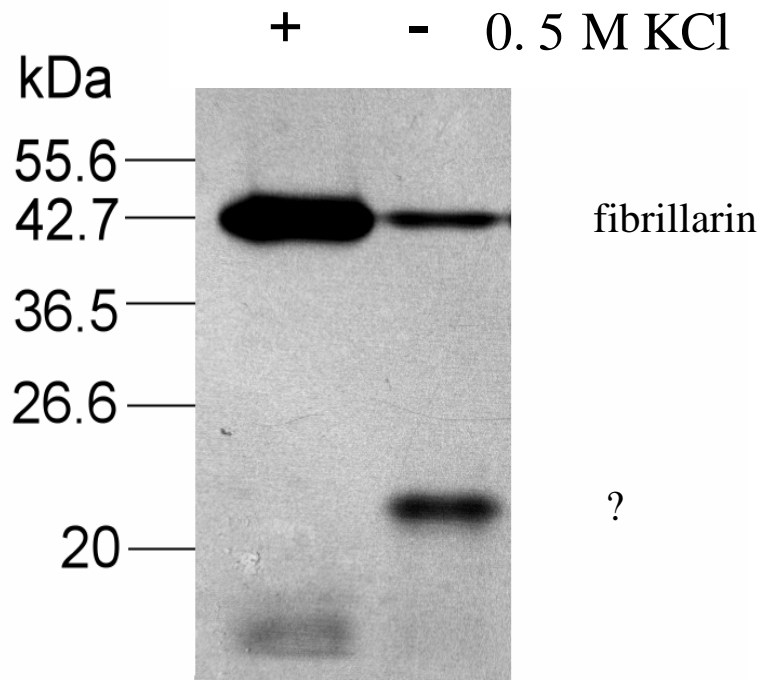


(B)



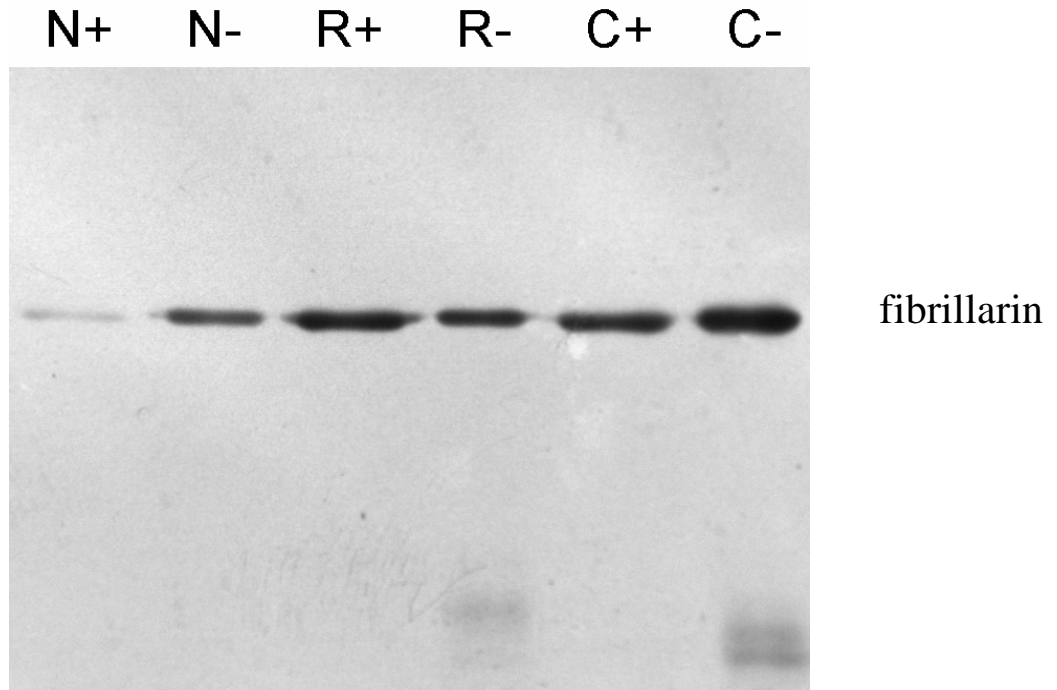
圖四、S3、S4 fraction 透析後甲基轉移？活性的變化

在 S3、S4 fraction 進行 (in vitro) 甲基化反應前，以一升的二次水 (A) 及 20 mM NaH_2PO_4 ，PH 7.3 的 buffer (B) 進行透析反應三次。“+”代表此 sample 已被透析。



圖五、以淋巴母細胞萃取蛋白測試 KCl 對甲基轉移? 活性影響

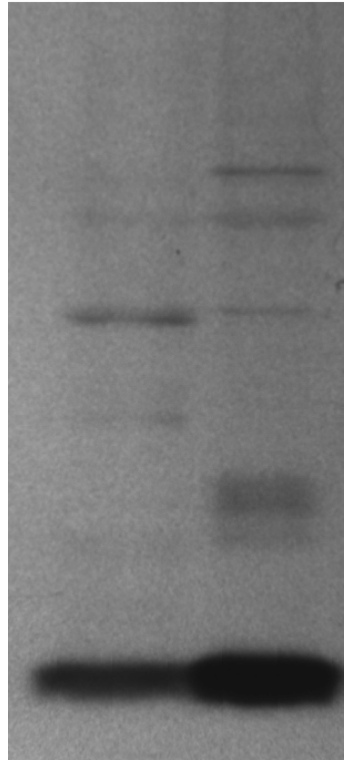
取 30 μg 的淋巴母細胞萃取液以重組的 fibrillarín 做為甲基接受受質, $\pm 0.5 \text{ M}$ 的 KCl 於冰上反應 30 分鐘測試淋巴母細胞的 total extract 活性的變化。箭頭標示處為 fibrillarín, 23 kDa 處為內生性甲基接受蛋白。



圖六、KCl 對淋巴母細胞不同 fraction 內的甲基轉移? 活性影響

將分好 fractions 的淋巴母細胞萃取液，N (nuclear)、R (ribosomal)、C (cytosolic) 各取 20 μ g 以重組的 fibrillar protein 做為甲基接受受質，測試 0.5 M KCl 對淋巴母細胞各 fractions 的甲基轉移? 活性影響。箭頭標示處為：fibrillar protein。

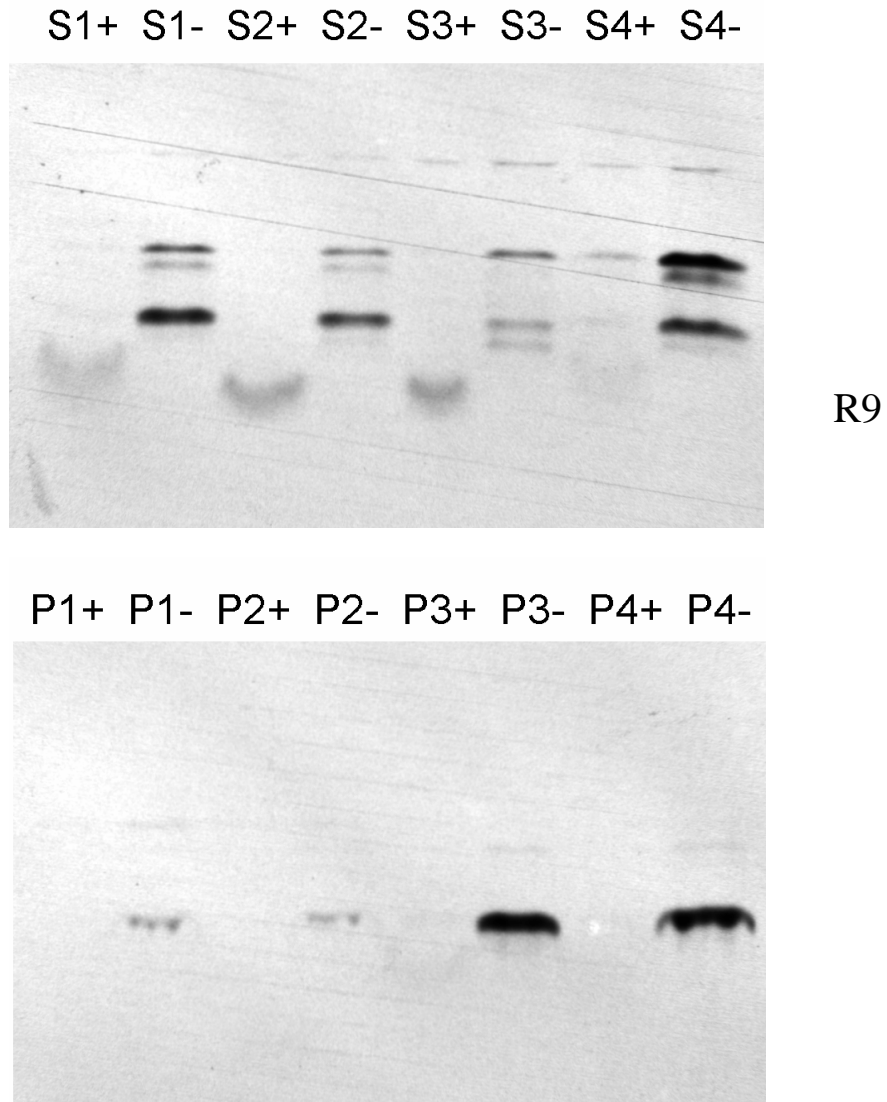
+ - 0.5 M KCl



R9

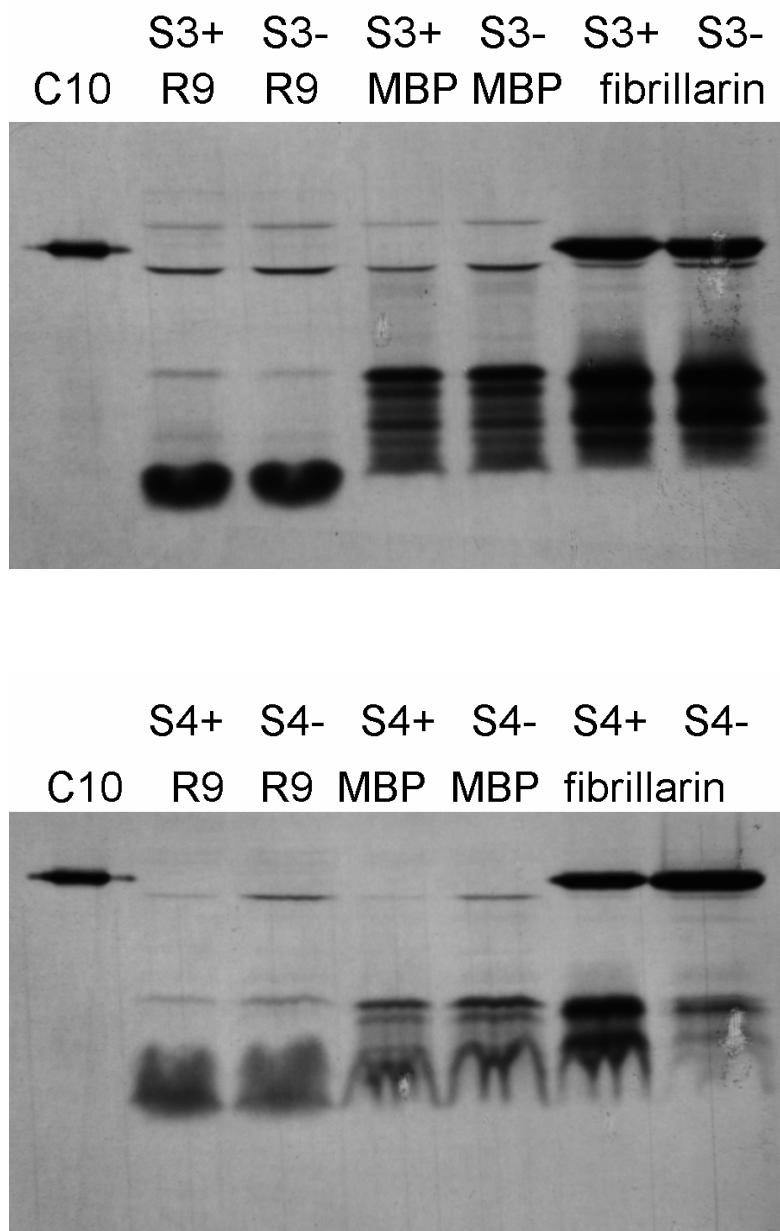
圖七、以 R9 為受質測 KCl 對淋巴母細胞內的甲基轉移？ 活性影響

將 20 μg 的淋巴母細胞萃取液，與 0.5 M KCl 在冰上反應 30 分鐘後，以 R9 為受質測 KCl 對淋巴母細胞內的甲基轉移？ 活性影響，箭頭標示處為：R9。



圖八、以 R9 為甲基接受蛋白測試豬腦各 fractions 中的甲基轉移？活
性

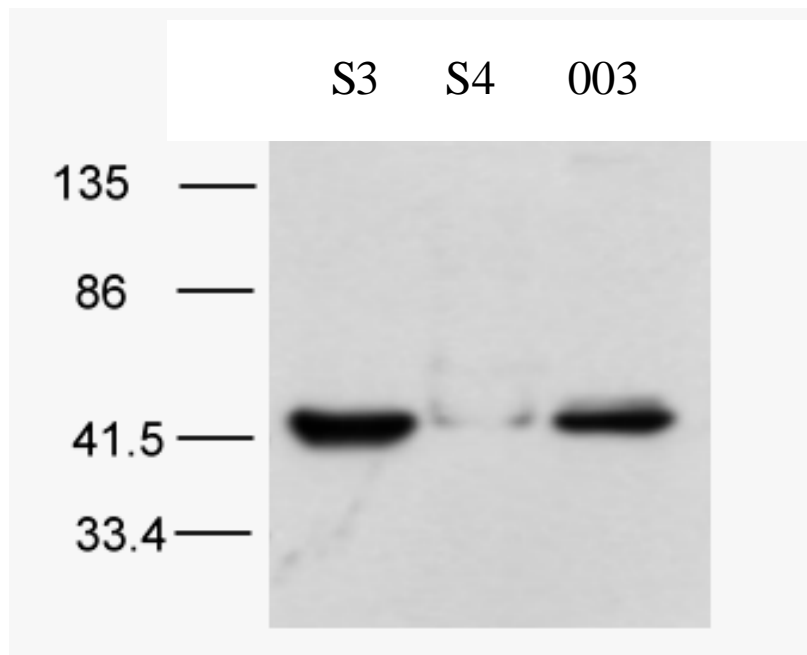
從每個 fractions 取 20 μg 的蛋白進行甲基化反應，每組 fractions 皆分成有加 (以”+”表示) 或沒加 (以”-”表示) 1 μl 精胺酸甲基接受受質 R9 (18.71 mM)。



圖九、以不同 (R9、MBP、fibrillar) 受質觀察 S3、S4 fraction

透析後甲基轉移？活性的變化

在 S3 S4 fraction 進行 (*in vitro*) 甲基化反應前以一升 20 mM NaH_2PO_4 , PH 7.3 的 buffer 進行透析反應三次。“+”代表此 sample 已被透析。透析後以 R9、MBP、fibrillar 為受質觀察甲基轉移？
活性變化。

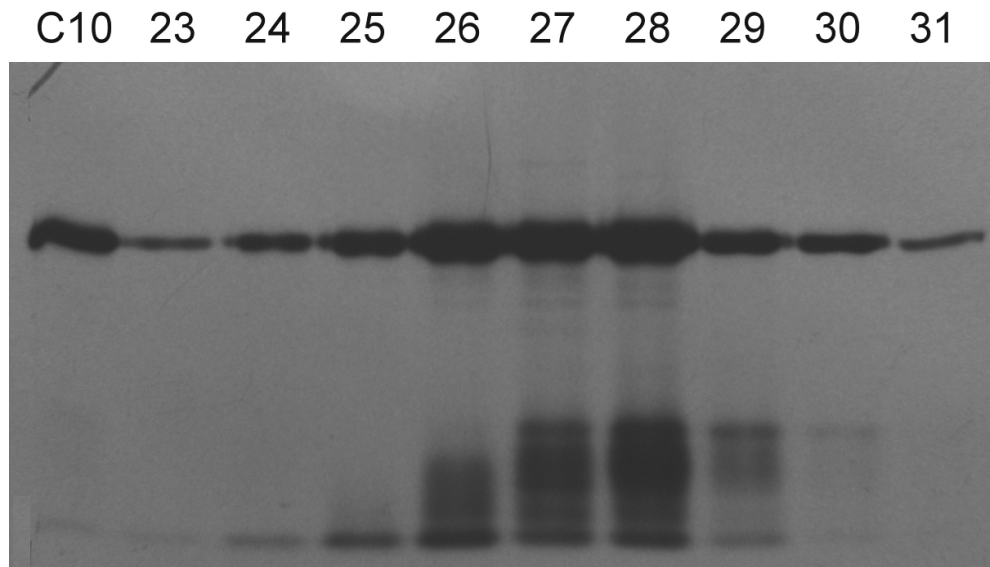


圖十、利用 PRMT1 抗體檢測 S3, S4 fractions 和 003 淋巴母細胞中的 PRMT1 含量

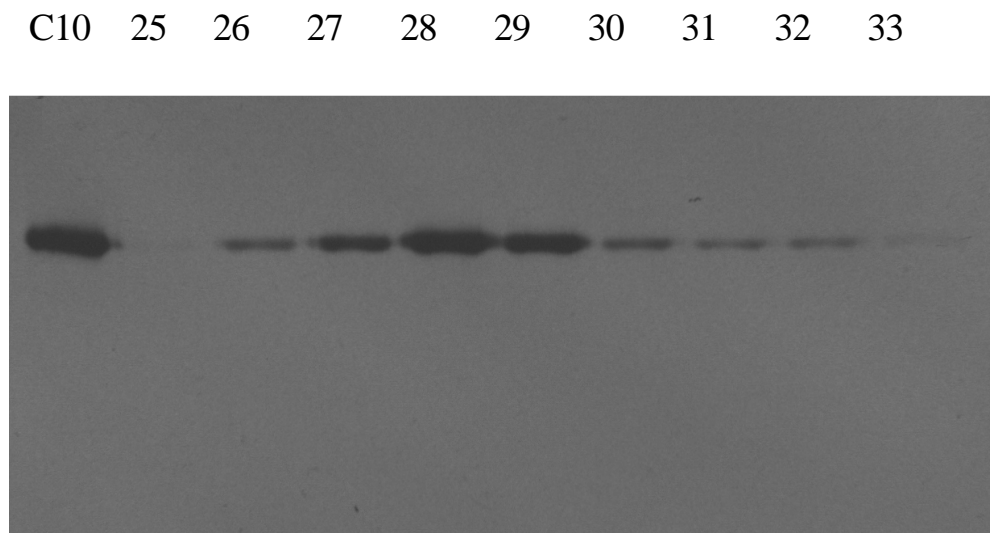
分別取 30 μg 的豬腦萃取蛋白 (S3, S4 fractions) 和淋巴母細胞萃取蛋白，以西方點墨法進行分析所得的結果，所用抗體為 mouse anti-PRMT1。

(A)

C10 23 24 25 26 27 28 29 30 31



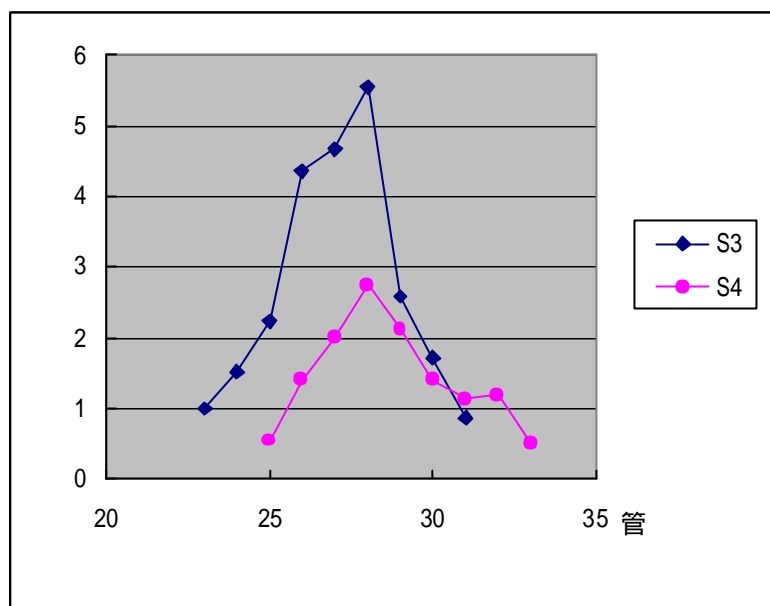
(B)



圖十一、分析過完 gel filtration 色層分析法的 S3 和 S4 fractions 的
 甲基轉移? 活性

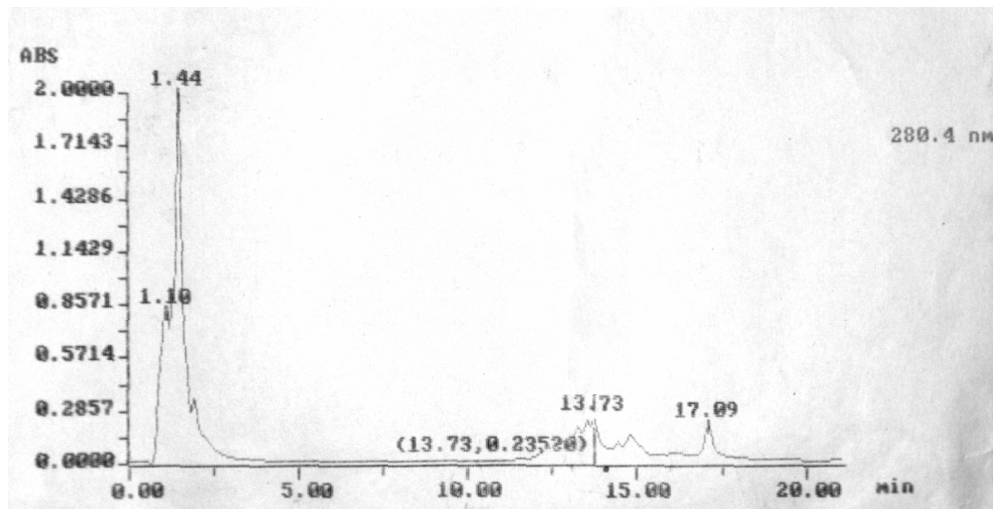
250 μ l Samples 打入 superdex 200HR gel filtration 管柱 (24 ml)。管柱以 20mM NaH_2PO_4 (PH 7.3, 流速 0.4 ml/min) 進行平衡和 eluted , 取 S3 和 S4 的 column fractions 每管各 11 μ l 分析甲基轉移? 活性如圖 A. B.所示。

(C)

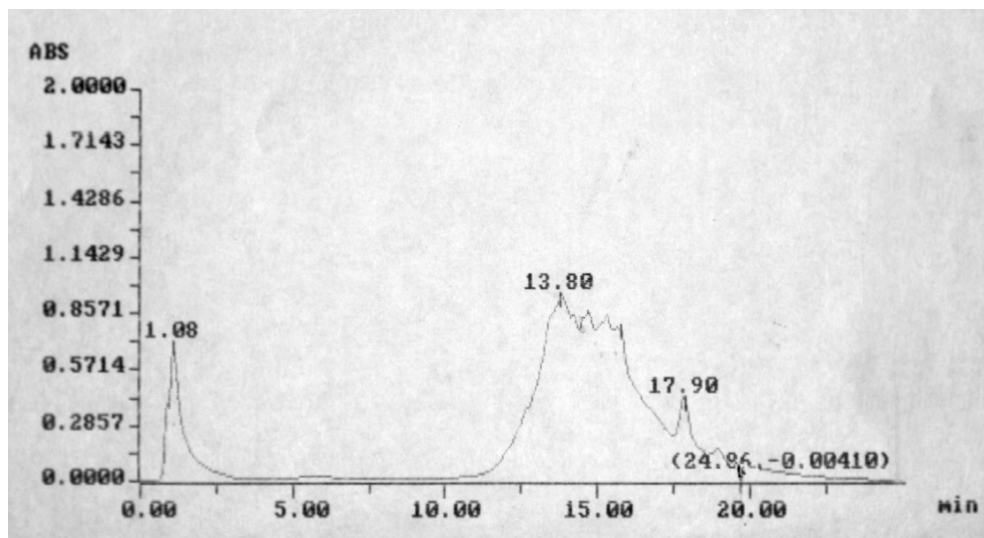


(C) 將 S3 和 S4 的 column fractions 所得的甲基轉移? 活性壓片結果，以數位影像分析儀定出每管 column fractions 的相對強度。

(A)



(B)

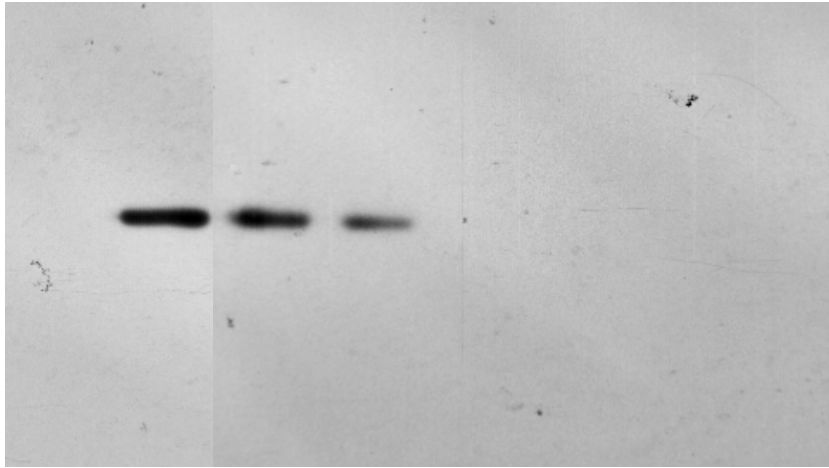


圖十二、以 Mono Q 陰離子交換色層分析法分析 S3 和 S4 fractions

取 1000 μ l S3 和 S4 Samples 打入 Mono Q 陰離子交換管柱。管柱 0~5 分鐘時以 100% buffer A (0.02M Tris PH 7.5 流速 1 ml/min) , 5~15 分鐘時 buffer 由 A 慢慢轉換為 B , 15~20 分鐘時以 100% buffer B (0.02M Tris 、 1 M NaCl PH 7.5 流速 1 ml/min) 進行 eluted , S3 和 S4 在波長 A_{280} 下的色層分析結果如圖 A. B.所示。

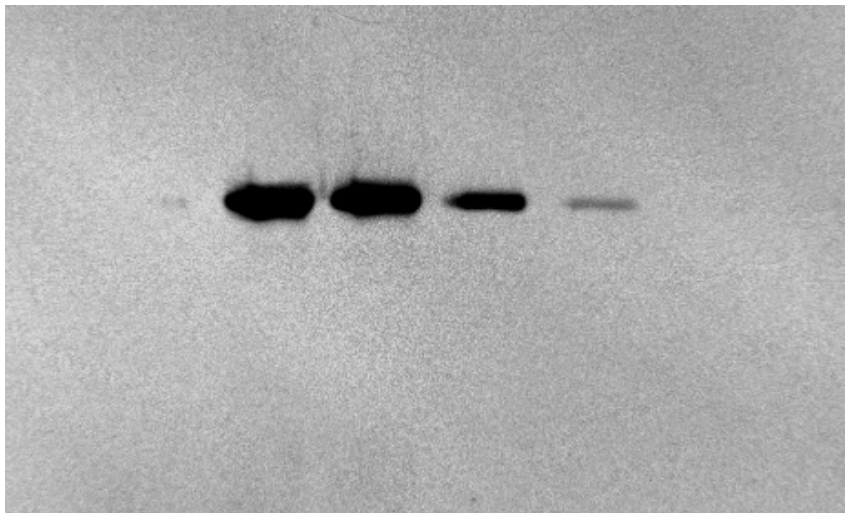
(C)

13 14 15 16 17 18 19 20



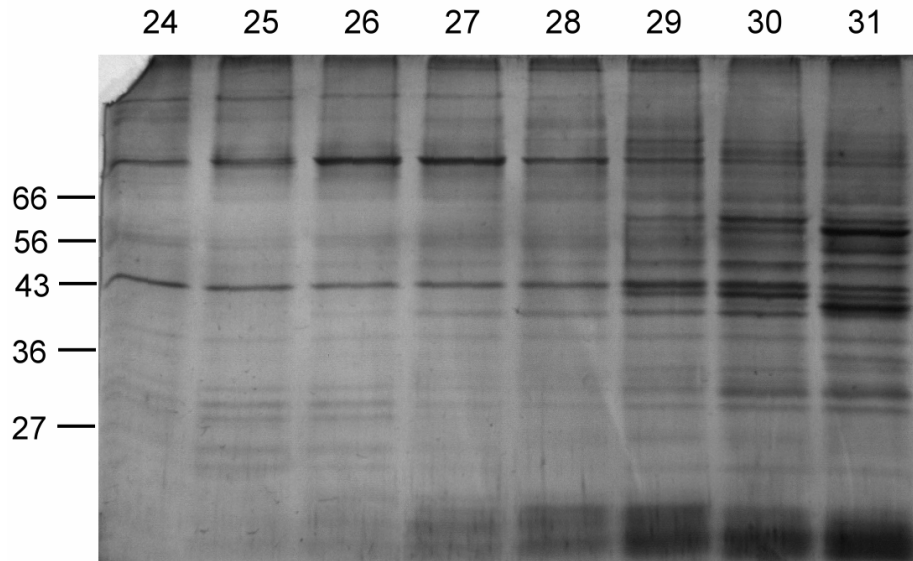
(D)

13 14 15 16 17 18 19 20

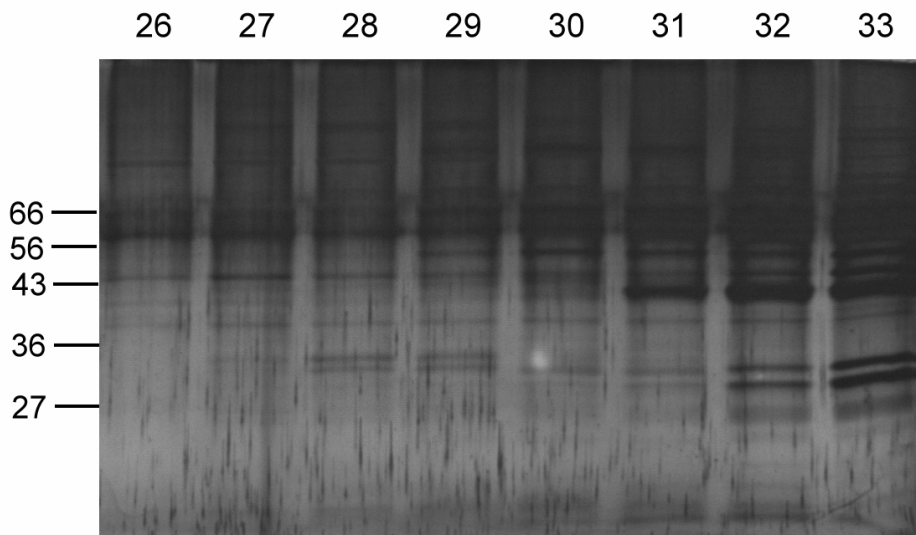


(C) 取 S3 的 column fractions 每管各 11 μ l 分析甲基轉移? 活性。 (D) 取 S4 的 column fractions 每管各 11 μ l 分析甲基轉移? 活性。

(A)



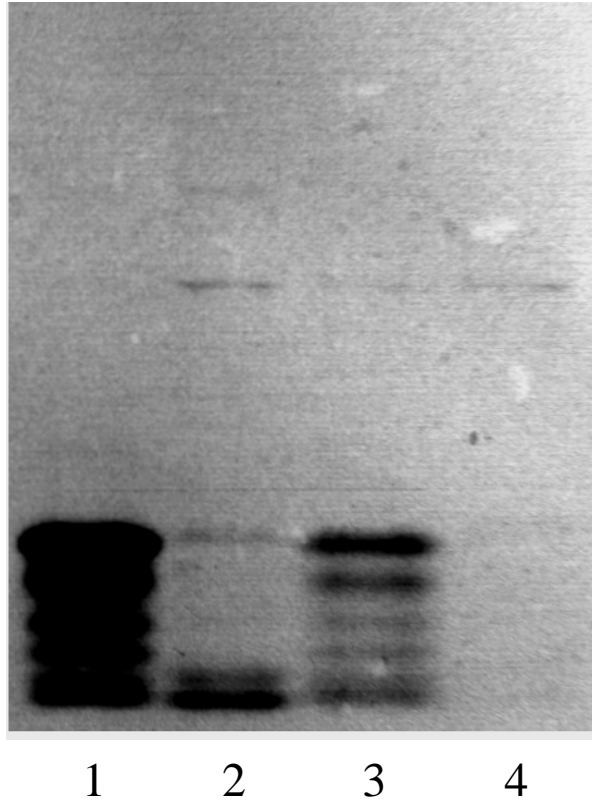
(B)



圖十三、以銀染分析過完 gel filtration 色層分析法的 S3 和 S4 fractions 中所含的蛋白

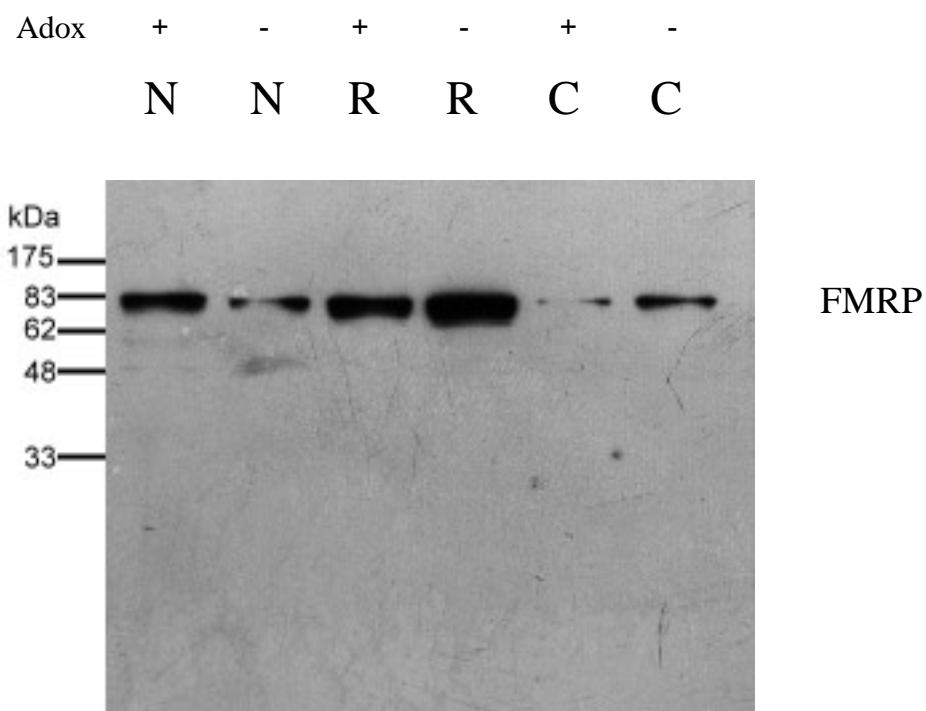
250 μ l Samples 打入 superdex 200HR gel filtration 管柱 (24 ml)。管柱以 20 mM NaH_2PO_4 (PH 7.3, 流速 0.4 ml/min) 進行平衡和 eluted , 取 S3 和 S4 的 column fractions 每管各 30 μ l 進行銀染。如圖 A (S3)、B (S4) 所示。

S3+ S3- S4+ S4-



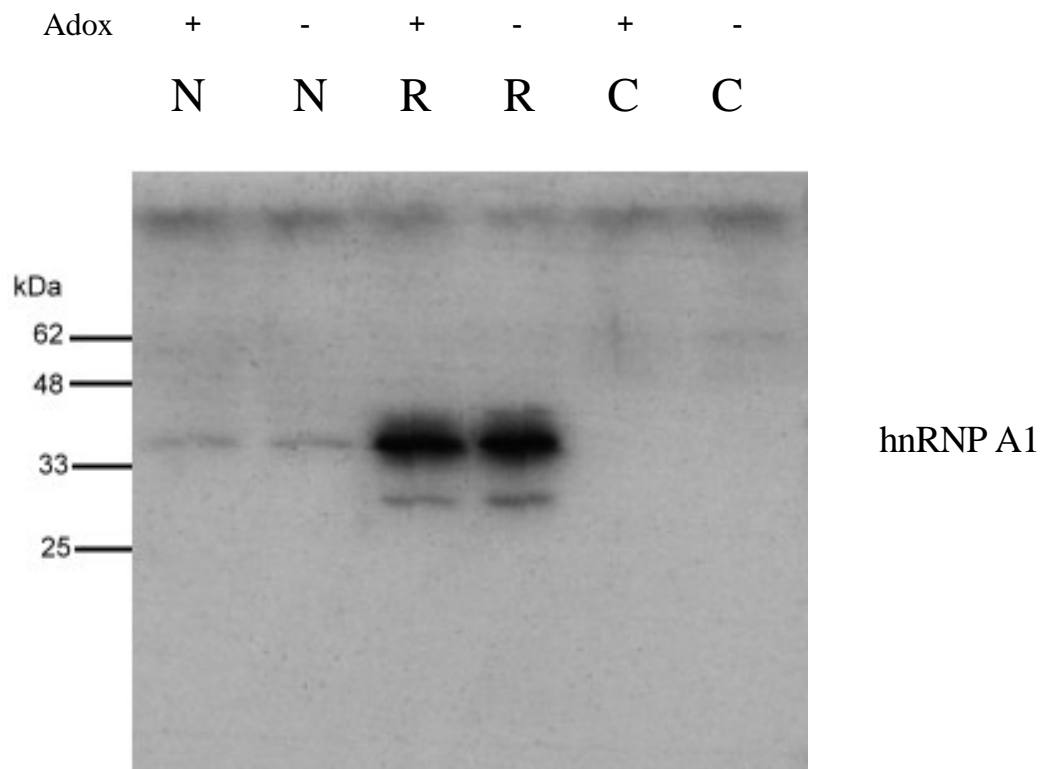
圖十四、以 MBP 分析 S3 和 S4 fractions 中所含的第二型甲基轉移
? 活性

以 5 μg 的第二型甲基接受蛋白 MBP 做受質 (lane 1、3) , 和 20 μg 的 S3、S4 fractions 進行甲基化反應後 , 壓片三天所得結果。 ”+” 表示有加 MBP。



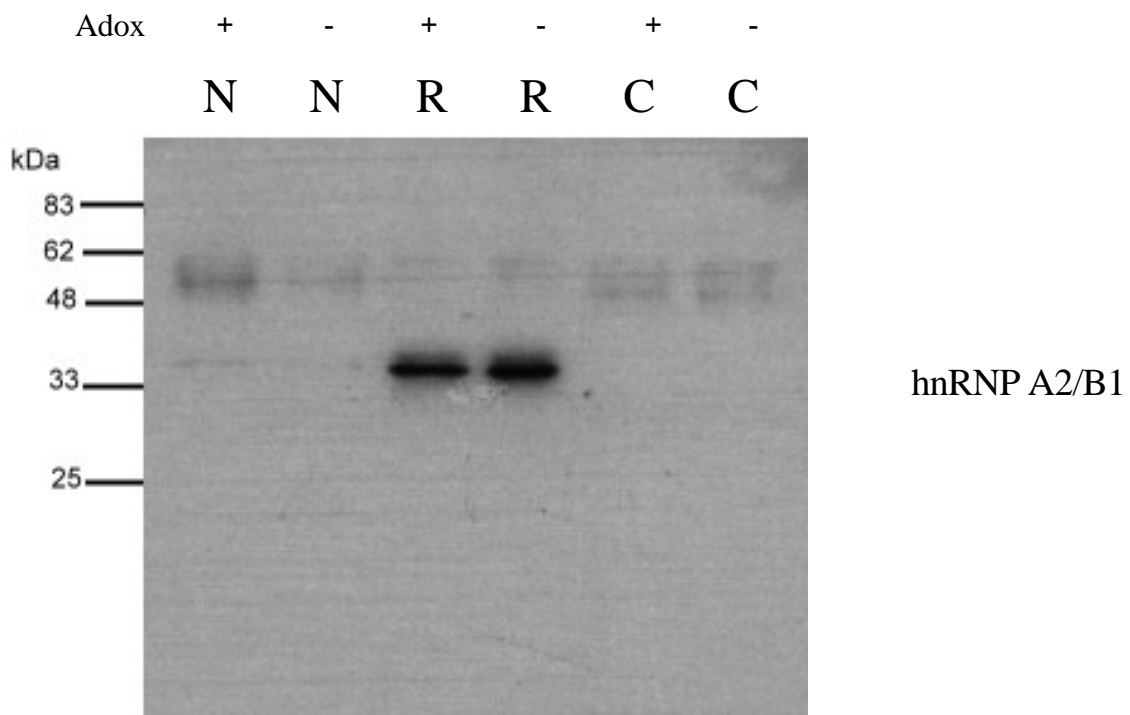
圖十五、分析加入 AdOx 後 FMRP 在細胞內的分佈變化

淋巴母細胞分別培養在有加沒加 AdOx 的培養液中72小時後分為 cytosolic (C)、ribosomal (R) 和nuclear (N) fractions。取等量的蛋白 (30 μ g) 以12.5% SDS-PAGE將蛋白分離後以西方點墨法分析。抗體為 anti-FMRP (CHEMICON, 1:5000)。箭頭所標示處為FMRP。



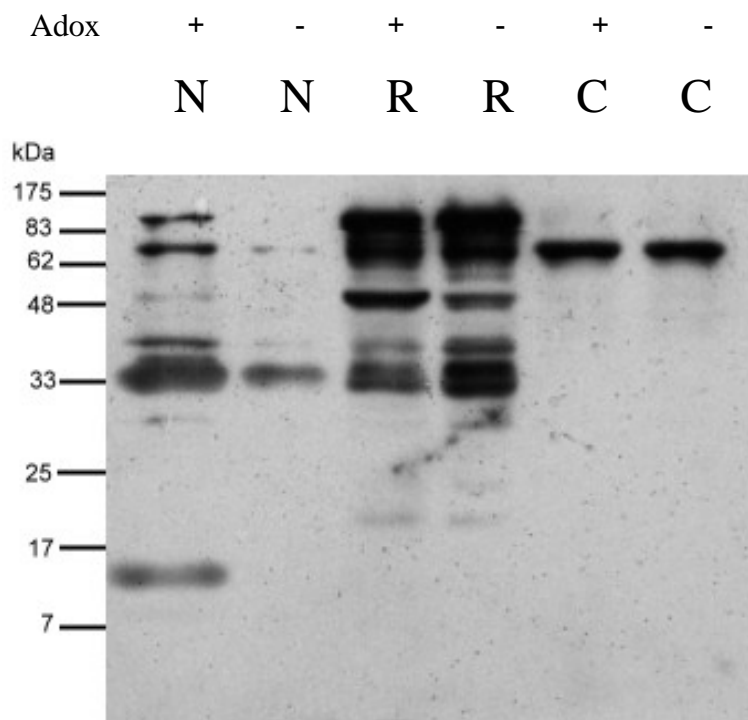
圖十六、分析加入AdOx後hnRNP A1在細胞內的分佈變化

淋巴母細胞分別培養在有加沒加AdOx的培養液中72小時後分為 cytosolic (C) ribosomal (R) 和nuclear (N) fractions。取等量的蛋白 (30 μg) 以 12.5% SDS-PAGE將蛋白分離後以西方點墨法分析。抗體為 anti- hnRNP A1 antibodies (Santa Cruze, 1:800)。箭頭標示處為hnRNP A1。



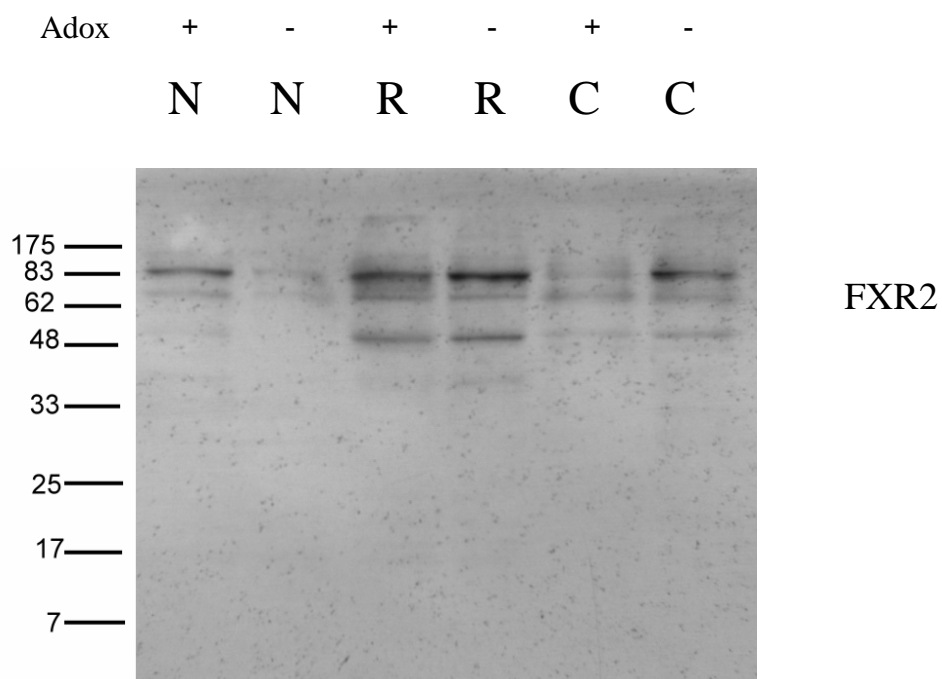
圖十七、分析加入 AdOx 後 hnRNP A2/B1 在細胞內的分佈變化

淋巴母細胞分別培養在有加沒加AdOx的培養液中72小時後，藉由不同的離心力分為（參照材料與方法）cytosolic (C)、ribosomal (R) 和 nuclear (N) 等三個 fractions。取等量的蛋白 (30 μ g) 以 12.5% SDS-PAGE 將蛋白分離後以西方點墨法分析。抗體為 anti-hnRNP A2/B1 (Santa Cruze, 1:800)。箭頭標示處為 hnRNP A2/B1 (36 kDa)。



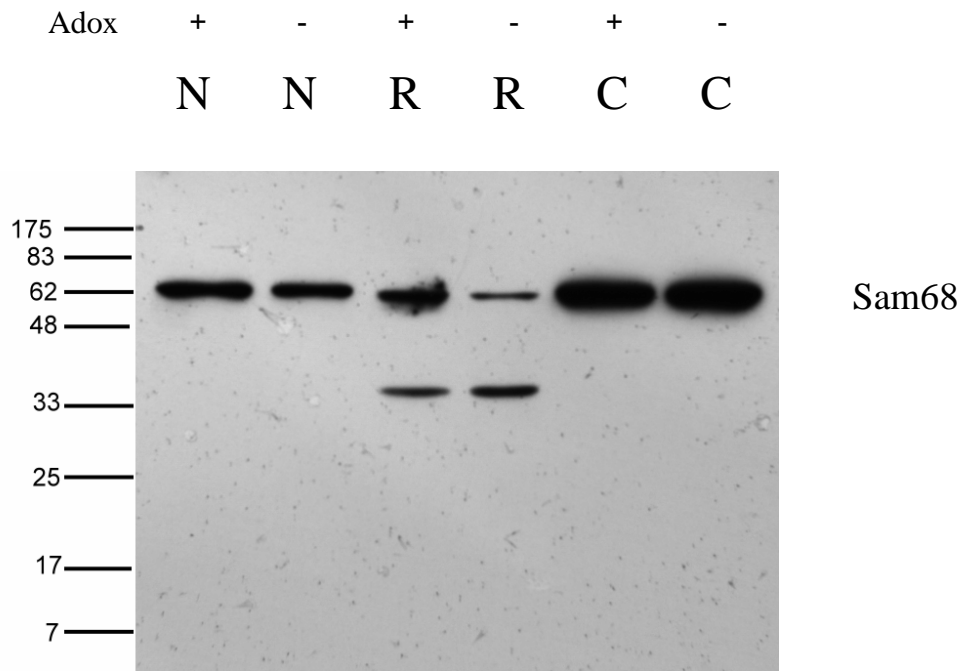
圖十八、分析加入 AdOx 後含有 mono/dimethylarginine 的蛋白在細胞內的分佈變化

淋巴母細胞分別培養在有加沒加 AdOx 的培養液中 72 小時後，藉由不同的離心力分為 (參照材料與方法) cytosolic (C)、ribosomal (R) 和 nuclear (N) 等三個 fractions。取等量的蛋白 (30 μ g) 以 12.5% SDS-PAGE 將蛋白分離後以西方點墨法分析。抗體為 anti-methyl arginine antibodies (abcam, 1:200)。



圖十九、分析加入 AdOx 後 FXR2 蛋白在細胞內的分佈變化

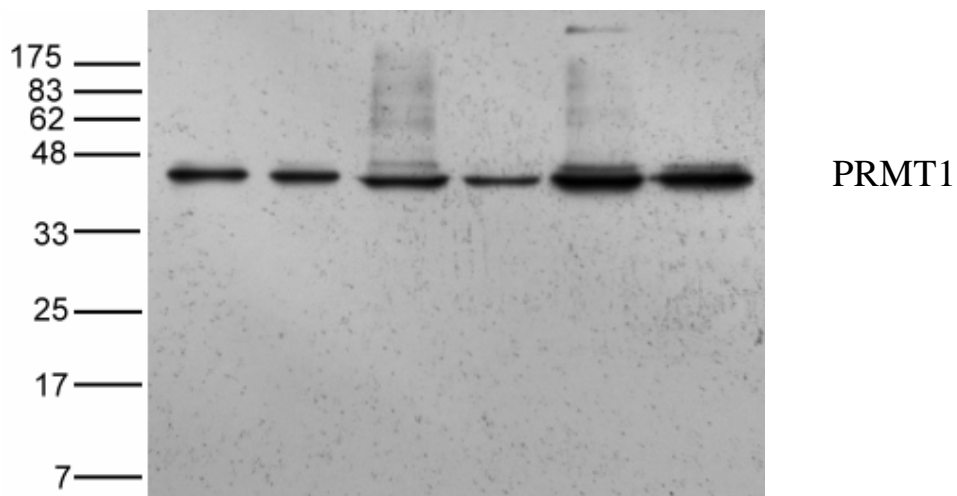
淋巴母細胞分別培養在有加沒加 AdOx 的培養液中72小時後，藉由不同的離心力分為（參照材料與方法）cytosolic (C)、ribosomal (R) 和 nuclear (N) 等三個 fractions。取等量的蛋白 (30 μ g) 以 12.5% SDS-PAGE 將蛋白分離後以西方點墨法分析。抗體為 anti-FXR2 antibodies。箭頭標示處為 FXR2 (95 kDa)。



圖二十、分析加入 AdOx 後 Sam68 蛋白在細胞內的分佈變化

淋巴母細胞分別培養在有加沒加 AdOx 的培養液中72小時後，藉由不同的離心力分為 (參照材料與方法) cytosolic (C)、ribosomal (R) 和 nuclear (N) 等三個 fractions。取等量的蛋白 (30 μ g) 以 12.5% SDS-PAGE 將蛋白分離後以西方點墨法分析。抗體為 anti-Sam68 antibodies (1:10000)。箭頭標示處為 Sam68 (68 kDa)。

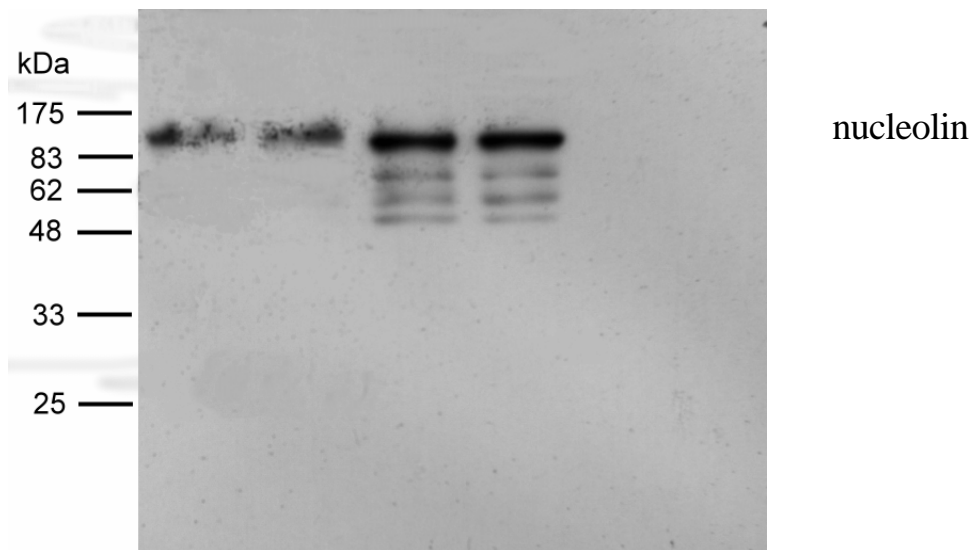
Adox	+	-	+	-	+	-
	N	N	R	R	C	C



圖二十一、分析加入 AdOx 後 PRMT1 蛋白在細胞內的分佈變化

淋巴母細胞分別培養在有加沒加 AdOx 的培養液中72小時後，藉由不同的離心力分為 (參照材料與方法) cytosolic (C)、ribosomal (R) 和 nuclear (N) 等三個 fractions。取等量的蛋白 (30 μ g) 以 12.5% SDS-PAGE 將蛋白分離後以西方點墨法分析。抗體為 anti-PRMT1 antibodies (1:600)。箭頭標示處為 PRMT1 (40.5 kDa)。

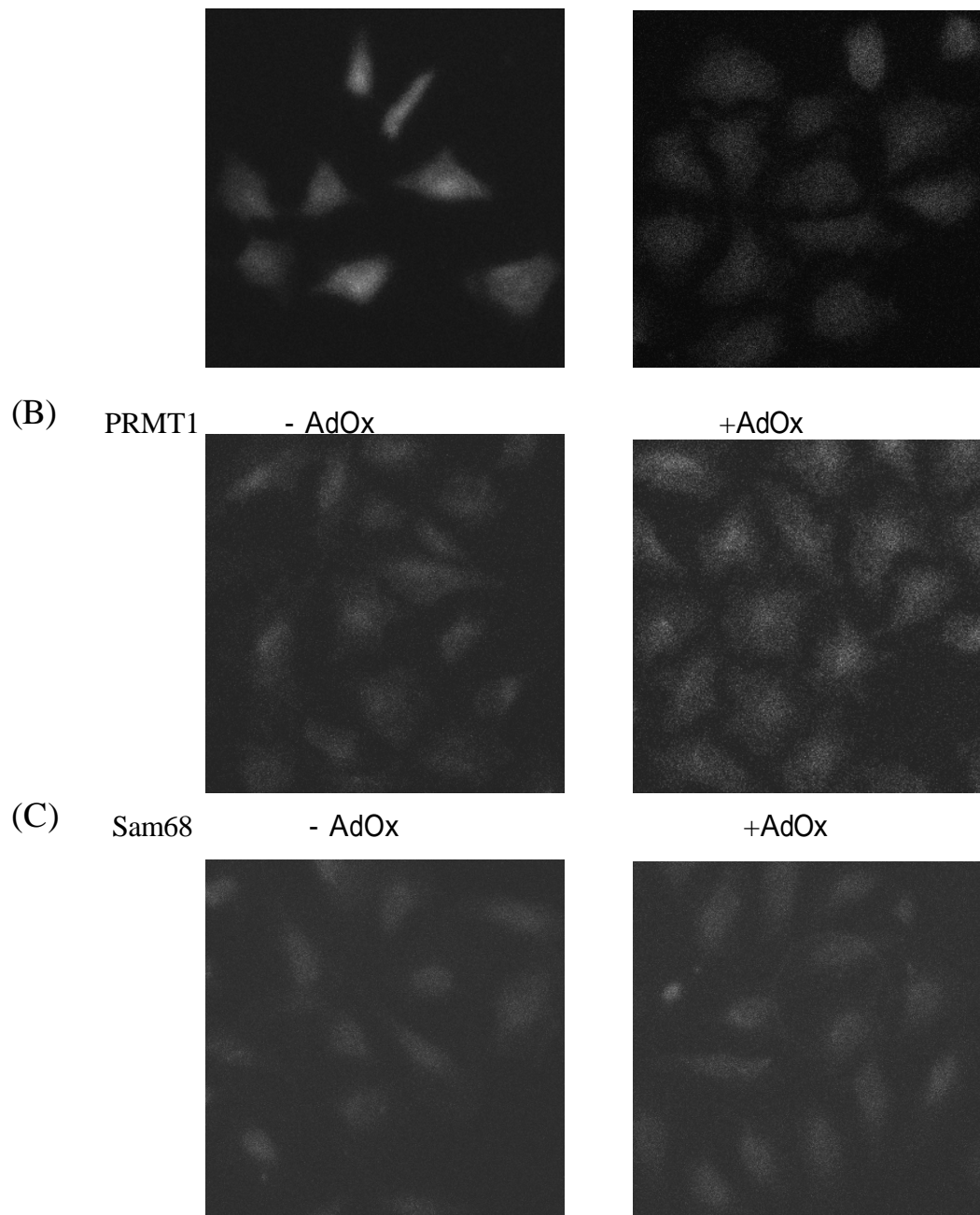
Adox	+	-	+	-	+	-
	N	N	R	R	C	C



圖二十二、分析加入 AdOx 後 nucleolin 蛋白在細胞內的分佈變化

淋巴母細胞分別培養在有加沒加 AdOx 的培養液中72小時後，藉由不同的離心力分為（參照材料與方法）cytosolic (C)、ribosomal (R) 和 nuclear (N) 等三個 fractions。取等量的蛋白 (30 μ g) 以 12.5% SDS-PAGE將蛋白分離後以西方點墨法分析。抗體為 anti-nucleolin (1:4)。箭頭標示處為 nucleolin (100 kDa)。

(A) 7E6 - AdOx +AdOx



圖二十三、以共軛焦顯微鏡觀察 HeLa 細胞中蛋白的分佈情形

以抗體 (A)anti-7E6 (B)anti-PRMT1 (C)anti-Sam68 和細胞內特定蛋白結合後，加入二次抗體 anti-FITC 後以波長 488 nm 雷射光激發後所得結果。左排細胞：未加 AdOx；右排細胞：以 AdOx 處理三天。

附錄

一、 paraformaldehyde (4 %) fixative solution :

1. 將 4 g 的 paraformaldehyde 溶入 50 ml 的 d_2H_2O 中,然後加入 1ml 的 1M NaOH。
2. 於 65 °C 水浴緩緩攪拌至 paraformaldehyde 完全溶解。
3. 加入 10 倍的 PBS 10 ml 混合後冷卻至室溫? 再以 1 M HCl 調 PH = 7.4 補水至 100 ml。
4. 以 0.45 μm 濾紙過濾後貯存於 - 20 °C 。