

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PRMT1和microtubule相關性 *
* 名稱：探討 *
* ***** ***** *

執行計畫學生：柳宗昀
學生計畫編號：MOST 106-2813-C-040-047-B
研究期間：106年07月01日至107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 107年03月30日

摘要：

PRMT1(protein arginine methyltransferase 1)是屬於第一型的蛋白質精氨酸甲基轉移酶，為產生非對稱雙甲基化的主要酵素。許多PRMT1受質為RNA binding proteins，可幫助結合在核酸上或是調控蛋白質間的交互作用。實驗室博士後研究員李侑蓁學姊用retinoic acid進行人類神經母細胞瘤的誘導分化，發現分化後PRMT1在細胞萃取液中的量下降，但留下的沉澱物中PRMT1 和tubulin的量增加。RA促使神經細胞分化，造成neurite outgrowth時，關鍵為alpha tubulin以及beta tubulin穩定聚集形成微管；因而猜測分化後PRMT1在沉澱中增加可能和微管延長有關。為了釐清PRMT1沉澱的現象是否為神經細胞分特有現象，我在實驗過程中將典型的微管穩定劑taxol加入Neuro-2a細胞株與HeLa細胞株中，促使微管穩定並延長，發現兩者並無太大差異。為了觀察PRMT1沉澱是否為神經細胞分化後的特有現象，我重複一次李侑蓁學姊之前的實驗過程，比較在加入taxol後之細胞萃取液與誘導神經分化後之細胞萃取液，發現和control比較依照比例計算，在細胞處理taxol後， PRMT1會較不易沉澱。而分化後的N2a細胞PRMT1沉澱比例較多，或許是因為促使微管延長的機制不同所導致。在共免疫沉澱的實驗中發現PRMT1沉澱後的sample中有beta-tubulin的訊號，但因為許多的PRMT1受質為RNA binding protein，可能會透過RNA與beta-tubulin結合，故加入RNase後進行共免疫沉澱，發現加入RNase後訊號的含量有些微減少。而在免疫螢光染色的部分，也可觀察到在分化後的細胞中，PRMT1的聚集處也是微管訊號較強的地方，且PRMT1也有隨著微管延伸出去的現象。而在加入taxol後的細胞中，PRMT1訊號較強的地方也有微管聚集的現象，但是相較於分化後的細胞，訊號較微弱。此研究成果應可助於了解PRMT1與微管之間的交互作用關係。

介紹：

蛋白質精氨酸甲基化是一種轉譯後修飾，可藉由蛋白質精氨酸甲基轉移酶（PRMTs）催化，使之在生物中扮演重要的角色並參與訊號傳遞、蛋白質移動、轉錄調節、蛋白質之間的交互作用、mRNA剪接和DNA修補等(Bedford & Clarke, 2009; Y. C. Wang & Li, 2012)。PRMT1(protein arginine methyltransferase 1)在PRMT家族中是屬於第一型的甲基轉移酶，為產生非對稱雙甲基化的主要酵素。許多PRMT1受質為RNA binding proteins，含有RGG/RG motifs可幫助結合在核酸上或是與蛋白質間的交互作用(Thandapani, O'Connor, Bailey, & Richard, 2013)。同時PRMT1也會對和一些DNA damage proteins 進行甲基化，以調控RNA的代謝及維持基因的穩定性(Auclair & Richard, 2013)。

微管(microtubule)是由alpha-和beta-tubulin蛋白形成的heterodimers所組成的空心圓柱結構，主要功能為保持細胞的形狀和運輸一些胞器及蛋白；其參與神經元的早期發育，引導軸突尖端的生長錐的延伸方向，在神經分化軸突延長(neurite outgrowth)扮演重要角色。先前研究已知在神經細胞Neuro-2A

中PRMT1蛋白的減少會影響到軸突的延長；且細胞內beta-tubulin上的精氨酸甲基化可能為PRMT1所催化。PRMT1屬於第一型的蛋白質精氨酸甲基轉移酶，參與訊號傳遞、蛋白質移動、轉錄調節、蛋白質之間的交互作用、mRNA剪接和DNA修補等。

研究動機與研究問題：

有科學家認為蛋白質的精氨酸甲基化會影響到神經細胞的軸突延長(neurite outgrowth)。文獻指出PRMT1會影響Neuro-2A(老鼠神經母細胞瘤)細胞的軸突延長，當PRMT1被knockdown之後無法延長，但不會影響到細胞的生長(Miyata, Mori, & Tohyama, 2008)。之前實驗室博士後研究員李侑蓁學姊用retinoic acid (RA)進行SK-N-SH neuroblastoma cell(人類神經母細胞瘤)的誘導分化，發現分化後，PRMT1在細胞萃取液中的量下降，但製備萃取物時留下的沉澱物中PRMT1的量增加。當RA促使神經細胞分化，造成軸突生長延長(neurite outgrowth)時，關鍵為tubulin蛋白穩定聚集形成微管；學姊的確也偵測到tubulin在沉澱中的量增加，因而猜測PRMT1在沉澱中增加可能和微管延長有關，PRMT1可能會跟微管結合而一起沉澱。Taxol為典型的微管穩定劑，可以促使微管延長。然而用HeLa(子宮頸癌細胞)細胞加入taxol作測試，發現沉澱物中的alpha-tubulin增加了，代表tubulin蛋白穩定聚集，可是沉澱物中PRMT1的量沒有增加。而依照這個結果推斷可能是因為神經細胞的neurite outgrowth時，PRMT1跟著神經細胞生長中特有的微管有某些關聯，所以其他細胞以taxol造成微管延長時，無法觀察到。但上述的實驗有細胞不同以及加藥不同兩種變因，所以首先要確定是否為神經細胞特有。我決定要用實驗室生長較SK-N-SH細胞快速的Neuro-2A neuroblastoma細胞進行實驗，和非神經的HeLa細胞比較，加入taxol，用western blot比較細胞萃取液與沉澱物中PRMT1與微管的變化比例，並觀察PRMT1的在細胞內分布。

RA誘導神經分化時PRMT1可調控cell fate(Simandi et al., 2015)。為了觀察PRMT1與微管的結合是否只會被誘導神經分化影響，所以將誘導分化的Neuro-2A與加入taxol的Neuro-2A進行western blot，觀察非對稱甲基化蛋白的表現是否有差異和比較PRMT1與微管的訊號。為了確認PRMT1與微管的關係，會觀察PRMT1與微管是否有直接結合，也會觀察PRMT1的分布變化，和觀察是否微管有被PRMT1甲基化的現象。

文獻回顧與探討：

微管是由alpha-tubulin和beta-tubulin形成的heterodimers所組成的空心圓柱結構。微管會保持高度動態性，依照細胞週期的階段不同進行延長或縮短。在間期時，微管會聚集在中心體並向細胞周圍延伸，主要是保持細胞的形狀和運輸一些胞器及蛋白(Nogales, 2000)。Tubulin heterodimers 在細胞中也可以液態存在，而當蛋白與其有蛋白間交互作用時可進而調整微管的行為(Nogales, 2000)。

微管透過調節細胞內蛋白的運輸來影響細胞的動態平衡和面對壓力的反應。微管形成支架聚集 stress response protein 後利用細胞骨架重組傳遞壓力訊號，進而調節細胞凋亡途徑(Nogales, 2000)。微管的改變可能會影響到細胞對於化療以及環境壓力的反應，這種改變可用於許多研究，如：化療的抗性、腫瘤的生長與細胞存活(Nogales, 2000)。

此外已知 tubulin 有許多的轉譯後修飾，會被其他的蛋白質辨認，稱之為 tubulin code。這些轉譯後修飾對於 tubulin 結構及功能也有重大影響 (Garnham & Roll-Mecak, 2012; Yu, Garnham, & Roll-Mecak, 2015)。過去 tubulin 轉譯後修飾未有甲基化報導，最近研究發現，SETD2 蛋白質可對 alpha-tubulin 的離氨酸上甲基化(Park et al., 2016)，而另一篇摘要中表示 Neuro-2A 中 beta-tubulin 的 R62 與 R282 位置上有甲基化的情形(Sabine piller 2015)。

PRMT1 為 Type I 的蛋白質精氨酸甲基轉移酶，可催化精氨酸上不對稱雙甲基化。根據學姊之前的研究結果，我認為 PRMT1 跟微管有結合的可能性，甚至更進一步催化上述 beta-tubulin 精氨酸的甲基化形成。

PRMT1 會對 RNA binding proteins 和 DNA damage proteins 進行甲基化，調控 RNA 的代謝及維持基因的穩定性(Auclair & Richard, 2013)。而這些蛋白質 RNA binding protein 如 FMRP 在神經細胞中已知會結合 RNA 後被微管運輸至遠端進行轉譯，而這些蛋白質會被 PRMT1 甲基化(H. Wang et al., 2008)。因此 PRMT1 也有可能透過某些受質 RNA 結合蛋白而間接和微管產生關聯。

已知用 insulin 刺激細胞，PRMT1 會移動到接近細胞膜的地方，在那邊對某些蛋白質進行甲基化(Iwasaki & Yada, 2007)。這說明某些在細胞中 PRMT1 在特定情況下會與微管進行結合並移動。

根據上述的文獻推測，假使 PRMT1 可以與微管結合，就有可能以調整 PRMT1 的方式而影響到細胞的生長，或是 Neuro-2A 細胞影響軸突延長(Miyata, Mori, & Tohyama, 2008)。如果符合猜測，研究結果可以進一步在神經退化性疾病或癌症上提供新的治療方向。

材料方法：

Cell 加藥與誘導分化

將細胞分別 seeding 成 6 盤 10 公分 dish 中有 2.4×10^6 個細胞，以及 6 盤 10 公分 dish 中有 1.2×10^6 個細胞。將三盤有 2.4×10^6 個細胞加入 taxol 100 nM，另外三盤加入等體積的 DMSO，而 6 盤有 1.2×10^6 個細胞的 dish 則加入誘導 medium (MEM、0.1% BSA、2% L-G、1% P-S、1% NEAA、1% pyruvate)。

Supernatant and pellet sample prepare

FIRST WAY: 將細胞 pellet 皆加入 150 μ l 的 hypotonic lysis buffer (20 mM Tris-HCl pH 6.8、1 mM $MgCl_2$ 、2 mM EGTA、1% NP-40、2 mM PMSF、1 μ g/ml aprotinin、2 μ g/ml pepstatin、1X protease inhibitor、0.1

M NaF)後，在室溫的情況下在shaker搖15分鐘後，在37°C的環境下以13000 rpm離心10分鐘。將cell extract的上清液取出，而cell extract的沉澱物用PBS清洗3次後，加入150 µl的hypotonic lysis buffer回溶，並經過超音波震盪後，進行定量。

SECOND WAY:將細胞pellet皆加入150 µl的Flag IP lysis buffer(50Mm Tris-HCl pH7.4、150 mM NaCl、1 mM EDTA、1% Triton X-100、1X protease inhibitor、0.1 M NaF)後，進行超音波震盪，之後在4°C的環境下以13000 rpm離心10分鐘。將cell extract的上清液取出，而cell extract的沉澱物用PBS清洗3次後，加入150 µl的Flag IP lysis buffer回溶，並經過後，進行定量。

蛋白質定量

1. Bradford

將standard依照下表(表一)配置後，加入100 µl 1x Bradford protein quantitation buffer等待五分鐘後，用ELISA reader OD 595進行測量。

	Standard1	Standard2	Standard3	Standard4	Standard5	sample
2µg/µl BSA (µl)	0	0	0	0	1	0
0.2µg/µl BSA (µl)	0	1	2	5	0	0
ddH ₂ O (µl)	5	4	3	0	4	
Total volume (µl)	5	5	5	5	5	5

表一 蛋白質定量之 standard 曲線配置表，依此表配置蛋白質含量 0 µg、0.2 µg、0.4 µg、1 µg、2 µg 之標準容液。

2. BCA

將standard依照上表(表一)配置後，加入100 µl working solution 後，在60°C水浴三十分鐘後，用ELISA reader OD 562進行測量。

免疫螢光染色(ICC)

將細胞用2%PFA固定15分鐘後，用0.1%Triton X-100將細胞穿孔，加入1%BSA blocking將細胞內無蛋白質的部分填滿。加入一抗anti-PRMT1(1:200 in PBS-T)overnight，隔日加入綠螢光二抗anti-rabbit

反應一小時。之後加入螢光一抗anti-alpha tubulin(1:1000 in PBS-T)，再隔日加入紅螢光二抗反應一小時後加入DAPI。處理結束後利用鄭麗螢光顯微鏡觀察。

共免疫沉澱法(CO-IP)

Traditional bead

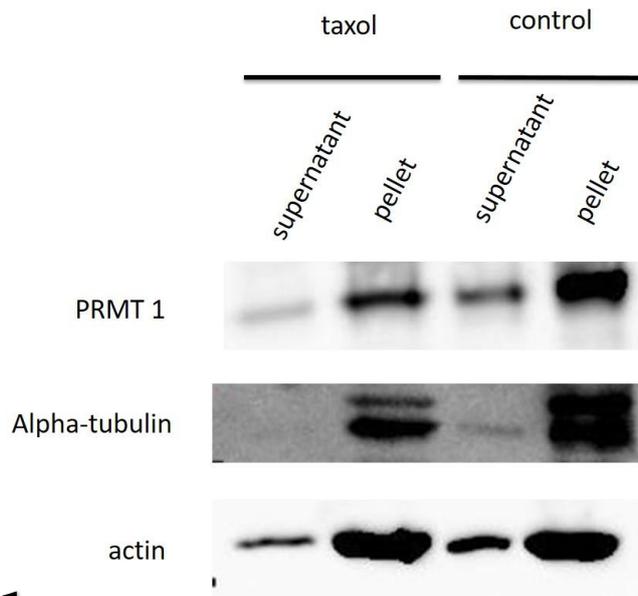
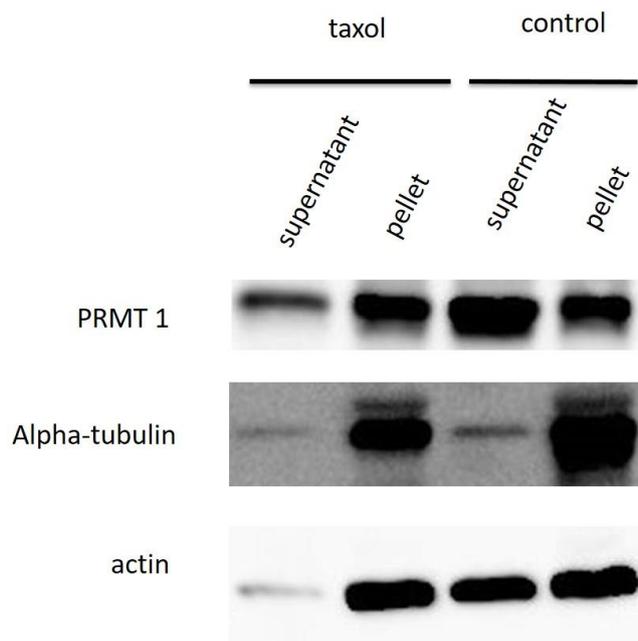
將細胞pellet皆加入250 μ l的Flag lysis buffer後，用超音波震盪儀將細胞震碎取得cell extract。將bead-protein A與bead-protein G以1:1混和成30 μ l bead-protein A/G，並加入5 μ g antibody在4 $^{\circ}$ C反應overnight，將cell extract用BCA定量方式確認濃度後取500 μ g與bead-protein A/G在4 $^{\circ}$ C反應overnight(preclean)。隔日利用13000rpm將bead-protein A/G -antibody沉澱並留下pellet(antibody pellet)，將preclean的magnetic bead沉澱後取出上清液(preclean supernatant)。將antibody pellet與preclean supernatant混和在4 $^{\circ}$ C反應一小時，之後始bead在13000rpm的條件下離心五分鐘，使之沉澱並wash pellet，最後加入elution buffer將antibody-substrate complex與bead分離，並離心將bead沉澱取出上清，再取用5x sample buffer配成總體積15 μ l的sample數管。進行western blot，取15 μ g的cell extract作為input。

Magnetic bead

將細胞pellet皆加入250 μ l的Flag lysis buffer後，用超音波震盪儀將細胞震碎取得cell extract。將magnetic bead-protein A與magnetic bead-protein G以1:1混和成15 μ l magnetic bead-protein A/G，並加入5 μ g antibody在4 $^{\circ}$ C反應overnight，將cell extract用BCA定量方式確認濃度後取500 μ g與magnetic bead-protein A/G在4 $^{\circ}$ C反應overnight(preclean)。隔日將用磁座將magnetic bead-protein A/G -antibody沉澱並留下pellet(antibody pellet)，將preclean的magnetic bead用磁座沉澱後取出上清液(preclean supernatant)。將antibody pellet與preclean supernatant混和在4 $^{\circ}$ C反應一小時，之後用磁座將magnetic bead沉澱並wash，最後加入elution buffer將antibody-substrate complex與magnetic bead分離，並用磁座將magnetic bead沉澱取出上清，再取用5x sample buffer配成總體積15 μ l的sample數管。進行western blot，取15 μ g的cell extract作為input。

結果：

在 HeLa 細胞株與 N2a 細胞株進行加藥後並用第一種方法(hypotonic lysis buffer 室溫搖 15 分鐘，37 $^{\circ}$ C 離心)配置 sample，發現在加入 taxol 後，HeLa 細胞株 PRMT1 與 alpha-tubulin 在 pellet 的比例並未增加 (圖一 a)，N2a 細胞株在加入 taxol 後會發現 PRMT1 在 cell extract supernatant 會減少，而 alpha-tubulin 在 pellet 的比例並未增加(圖一 b)。兩種細胞株的 alpha-tubulin 與 PRMT1 的總量皆有明顯下降，雖然 PRMT1 與 alpha-tubulin 的訊號在兩株細胞中 taxol 處理後皆是 pellet sample 較多，但和 control 比較依照比例計算，並未發現在細胞處理 taxol 後，alpha-tubulin 與 PRMT1 會較容易沉澱。

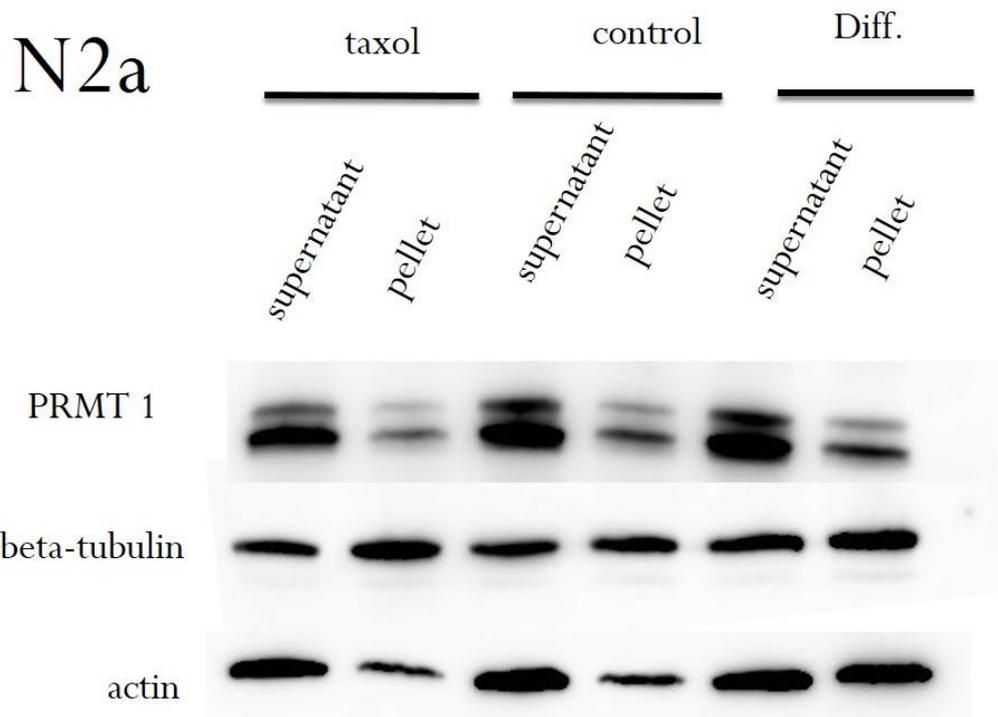
a**HeLa****b****N2a**

圖一 細胞加入 taxol 後對 PRMT1 與 alpha-tubulin 的影響

在 HeLa 細胞株與 N2a 細胞株進行加藥後並用第一種方法(hypotonic lysis buffer 室溫搖 15 分鐘， 37 °C 離心)配置 sample。每個 well 各 load 15 μ g 的蛋白含量 taxol=細胞加入 100 nM taxol、control=細胞加入 DMSO 作為控制組 a)HeLa 細胞株 b) N2a 細胞株

然而上述實驗未能顯現李侑蓁學姊先前實驗時所發現的現象，亦為此計畫最初的研究方向。認為可能加入 taxol 所造成的微管穩定延長與細胞分化所造成的微管穩定延長在本質上有所不同，且有細胞內其他蛋白調控的可能性存在。故用第二種 sample 製備方式重複李侑蓁學姊最初的實驗。(圖

二)

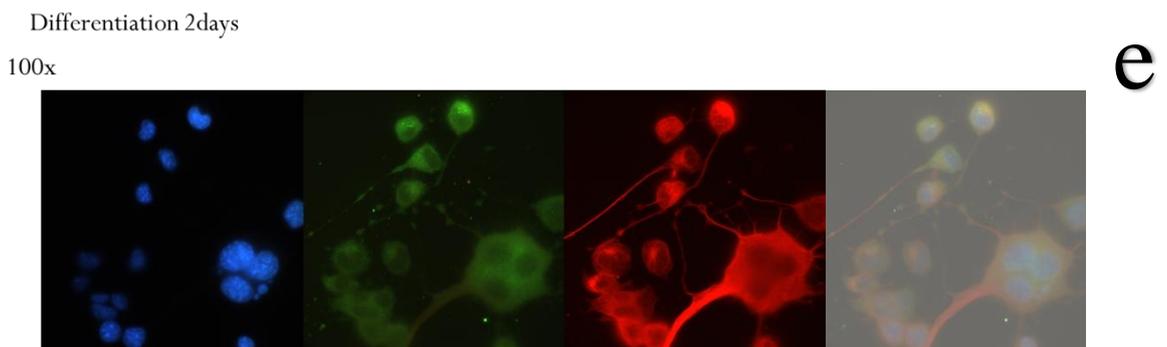
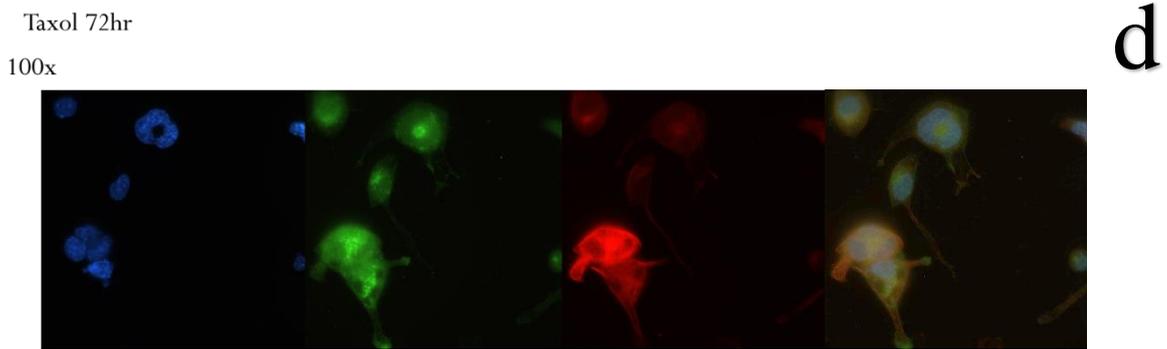
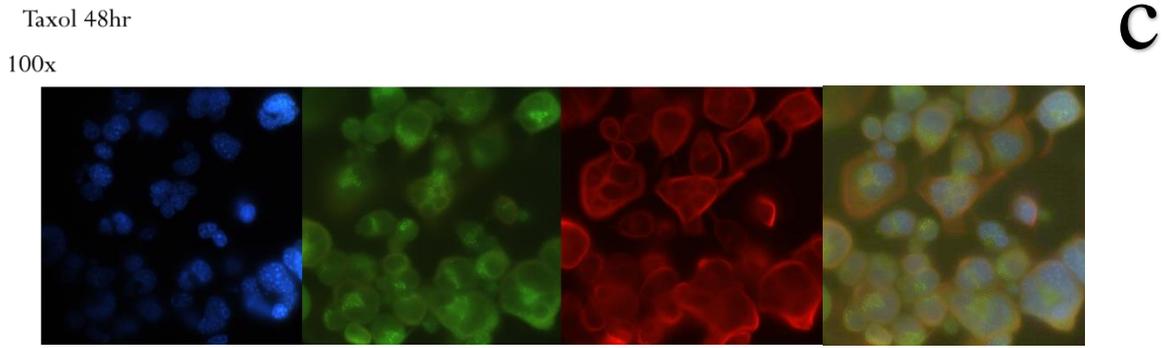
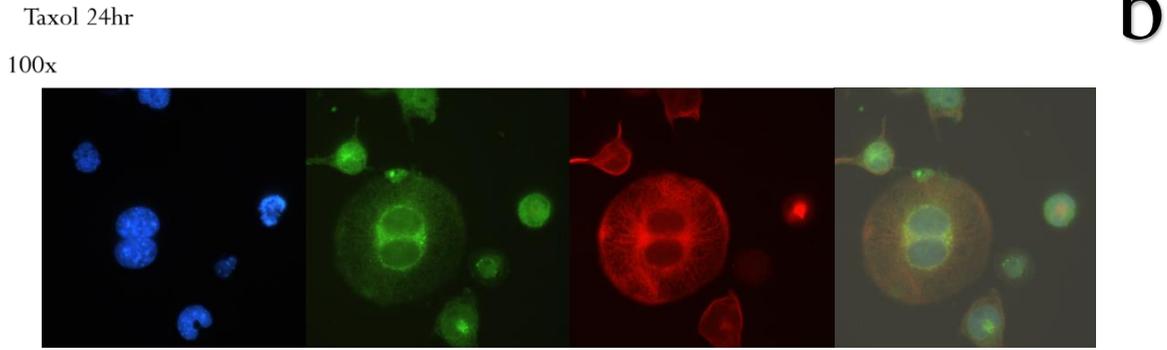
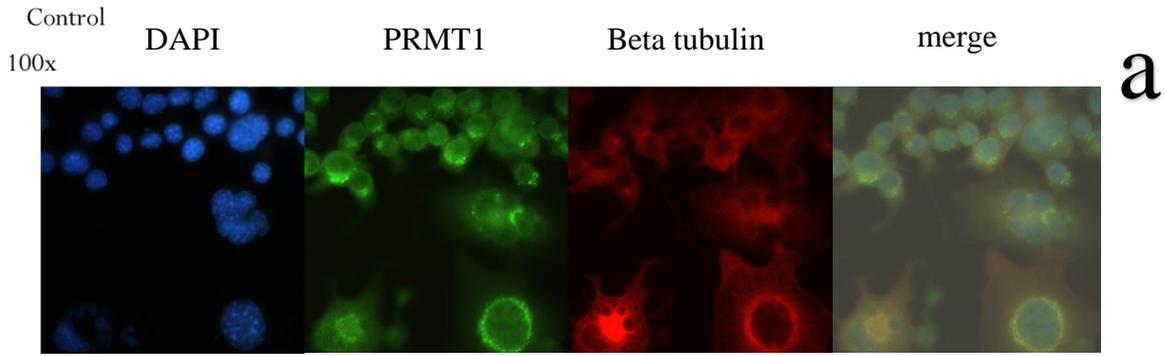


圖二 N2a 細胞做不同處理後對 PRMT1 與 beta-tubulin 的影響

N2a 細胞株進行加藥及誘導分化後，用第二種方法(Flag IP lysis buffer 超音波震盪後，4°C 離心)配置 sample。每個 well 各 load 15 μ g 的蛋白含量 taxol=細胞加入 100 nM taxol、control=細胞加入 DMSO 作為控制組、Diff.=誘導分化的 N2a 細胞。

與控制組相比，在細胞誘導分化後，目測beta-tubulin在pellet的比例增加，且在總量亦增加。而實際上的變化以及沉澱趨勢尚需經過定量計算方能確定。然而PRMT1總含量的變化尚須定量後方能進行比較。而PRMT1在細胞加入taxol後未能有明顯沉澱的現象，但beta-tubulin在pellet的比例有增加的情況。此次實驗亦發現beta-tubulin在細胞處理taxol後亦有較易沉澱的現象，然而總含量亦須定量後才能比較，而PRMT1方面卻有在加入taxol後總含量稍微減少的現象，這部分尚須做後續實驗確認原因。而actin作為internal control的部分尚有疑慮，因為未能確認此實驗方法能對actin的影響，故上述的結果比較皆不將actin的訊號做為參考。

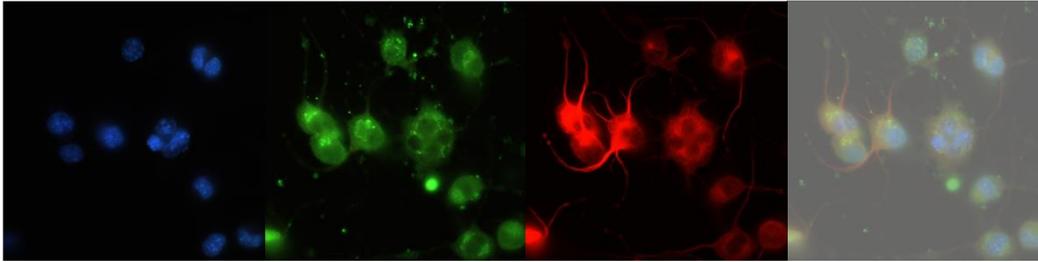
為了觀察在分化後以及加入taxol後，細胞中與microtubule的分布狀況以及關係，利用免疫螢光染色觀察分化兩天以及三天的N2a細胞和加藥處理taxol後24小時、48小時、72小時的N2a細胞。



Differentiation 3days

100x

f



圖三 N2a 細胞株在做不同處理後 PRMT1 與 beta-tubulin 的分布螢光圖

利用免疫螢光染色觀察分化兩天以及三天的 N2a 細胞和加藥處理 taxol 後 24 小時、48 小時、72 小時的 N2a 細胞。a)細胞株未做任何處理 b)在加入 taxol 後一天 c 和 d) 當入 taxol 兩天及三天 e 和 f)誘導 N2a 細胞分化後

FITC:ADMA、Rhodamine:beta-tubulin

在未做任何處理時，PRMT1 訊號較強處會與 beta-tubulin 的聚集處重疊 (圖三 a)，在加入 taxol 後一天的細胞可發現細胞週期被限制住，然而 PRMT1 與 beta-tubulin 的訊號重疊並圍繞在細胞核周圍 (圖三 b) 當加入 taxol 兩天及三天後發現細胞漸漸地萎縮成一顆圓形，而只有少部分的 PRMT1 會與 beta-tubulin 重疊，大部分的 beta-tubulin 訊號在細胞膜周圍 (圖三 c 和 d)。在誘導 N2a 細胞分化後發現 PRMT1 不僅存在於細胞本體中，亦存在神經突觸中，且 PRMT1 與 beta-tubulin 會聚集在 neurite outgrowth 的位置，PRMT1 亦會隨著 neurite 延伸出去聚集在圖處節點的部分，也是 beta-tubulin 訊號較強的部份 (圖三 e 和 f)。

因為觀察到 PRMT1 的訊號有與 microtubule 重疊的現象，這說明兩種可能性，其一是 PRMT1 隨著 microtubule 運輸後在細胞各處進行蛋白質的甲基化，其二則是 PRMT1 對 microtubule 有實質上的影響。為了探索此現象的原由，故觀察 PRMT1 的受質在 N2a 細胞中的分布情形。

Control

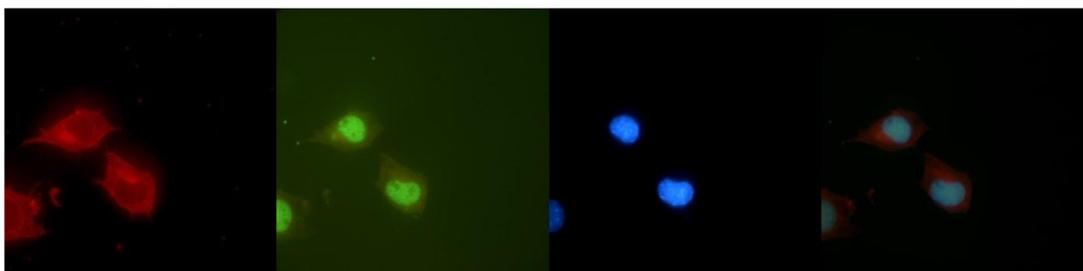
beta-tubulin

ADMA

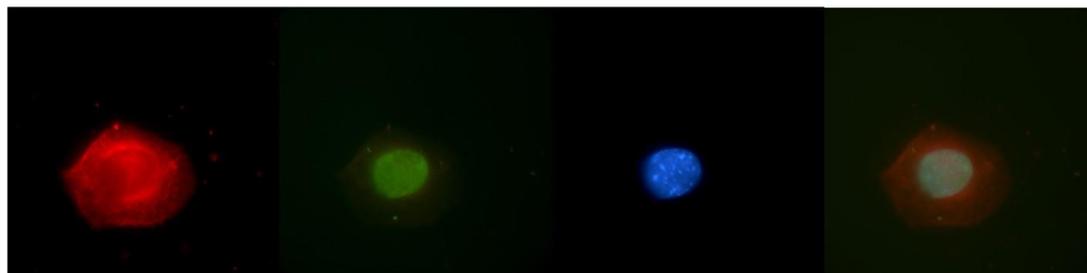
DAPI

merge

a



Taxol 24hr



b

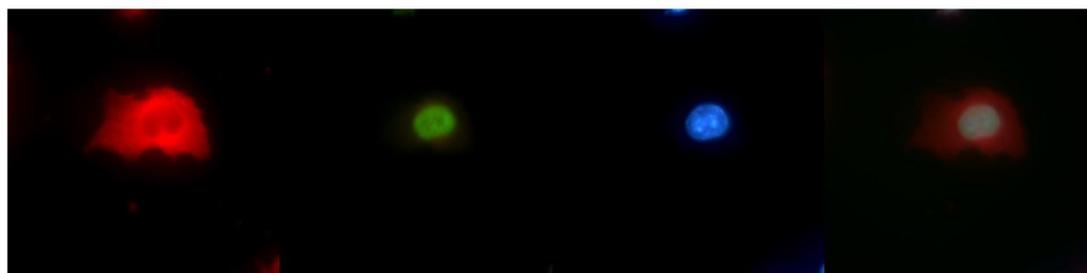
Taxol 48hr

beta-tubulin

ADMA

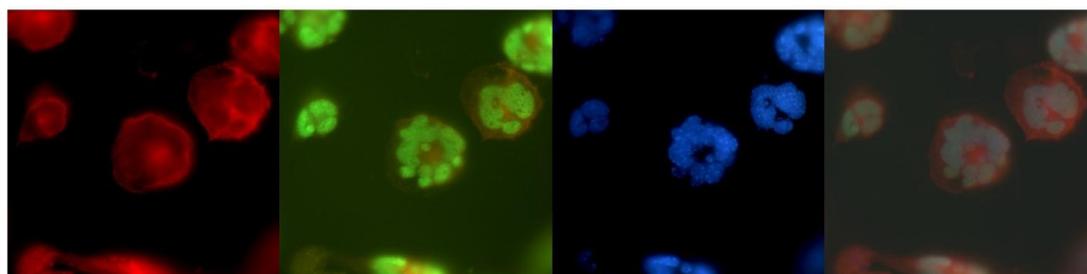
DAPI

merge



c

Taxol 72hr



d

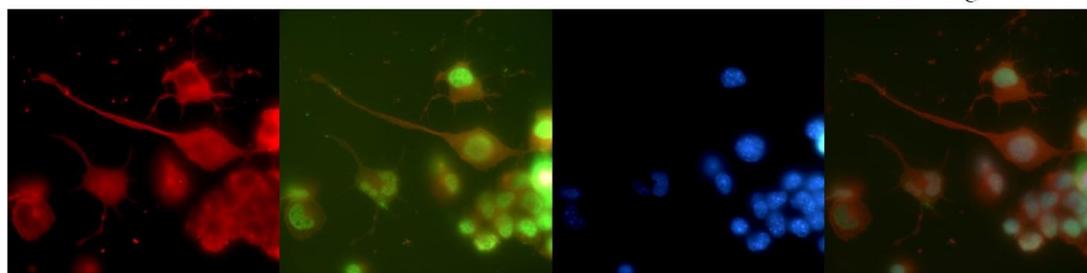
Differentiation 2days

beta-tubulin

ADMA

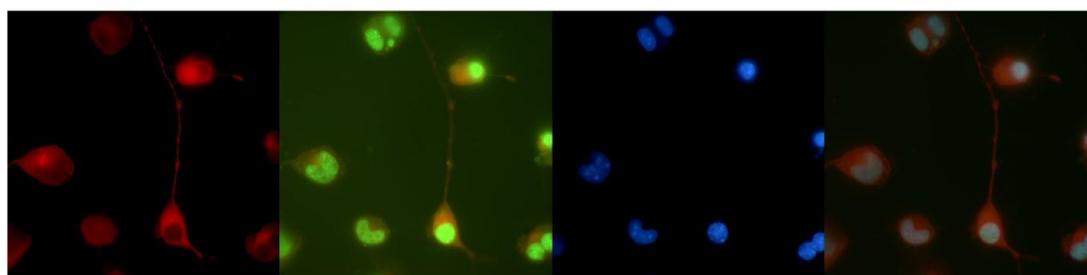
DAPI

merge



e

Differentiation 3days



f

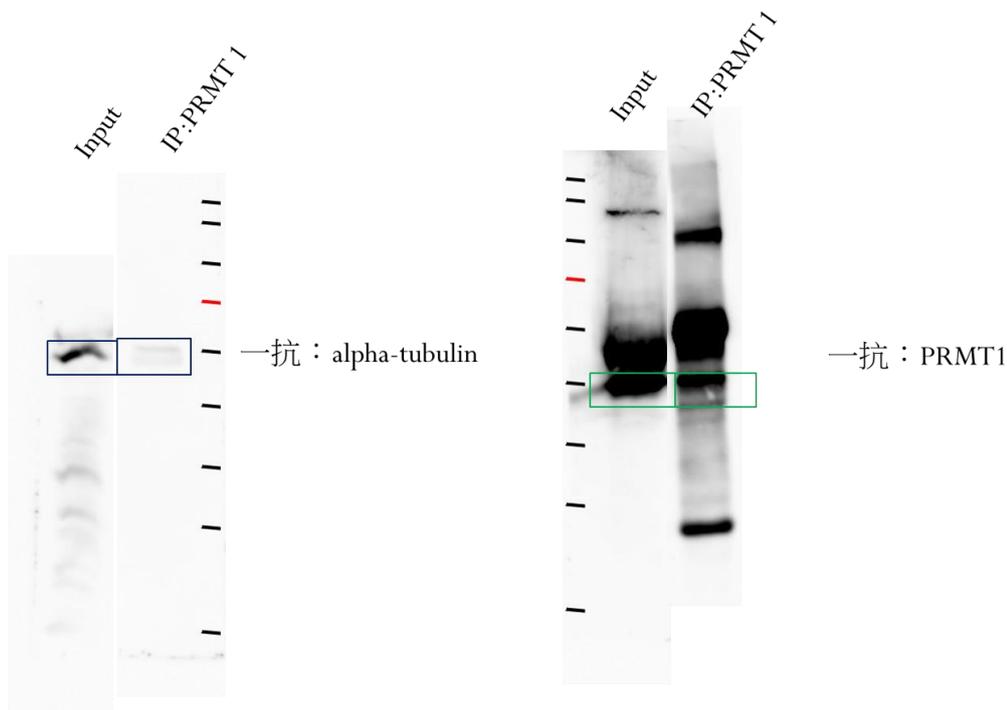
圖四 N2a 細胞株在做不同處理後非對稱甲基化蛋白與 beta-tubulin 的分布螢光圖

利用免疫螢光染色觀察分化兩天以及三天的 N2a 細胞和加藥處理 taxol 後 24 小時、48 小時、72 小時的 N2a 細胞。a)細胞株未做任何處理時 b) 當加入 taxol 後 24 小時 c) 當加入 taxol 後 48 小時 d) 當加入 taxol 後 72 小時 e 和 f)將細胞誘導分化後兩天及三天

FITC:ADMA、Rhodamine:beta-tubulin

細胞株在未做任何處理時的螢光染色圖(圖四 a)，可觀察到非對稱甲基化蛋白會聚集在細胞核內，而 beta-tubulin 會圍繞著細胞核。當 N2a 細胞加入 taxol 後的不同時段(圖四 b、c 和 d)觀察到細胞漸漸地萎縮成一顆圓形並黏在一起，而非對稱甲基化蛋白與控制組類似，未有移出細胞核的現象。從圖中(圖四 e 和 f)可以觀察到由此抗體所辨認的 PRMT1 受質只有少部分會存在於神經突觸中，亦為 beta-tubulin 聚集所造成之節點位置。大部分被這抗體所辨認的 PRMT1 受質存在於細胞核的部分。比對之前的螢光染色圖，可以發現 PRMT1 的分布於神經突觸中只有少部分是因為其受所影響，然而根據其他文獻顯示另外一種抗體 ASYM 24 亦可辨認 PRMT1 的受質，而使用此抗體做成之螢光染色圖顯示，有許多 PRMT1 受質亦存在於神經突觸中。故無法解釋 PRMT1 與 microtubule 之間是否有交互作用的關係。

為了釐清此關係在實驗後半段使用共免疫沉澱法觀察。首次實驗目的為測試抗體對共免疫沉澱法的可行性。

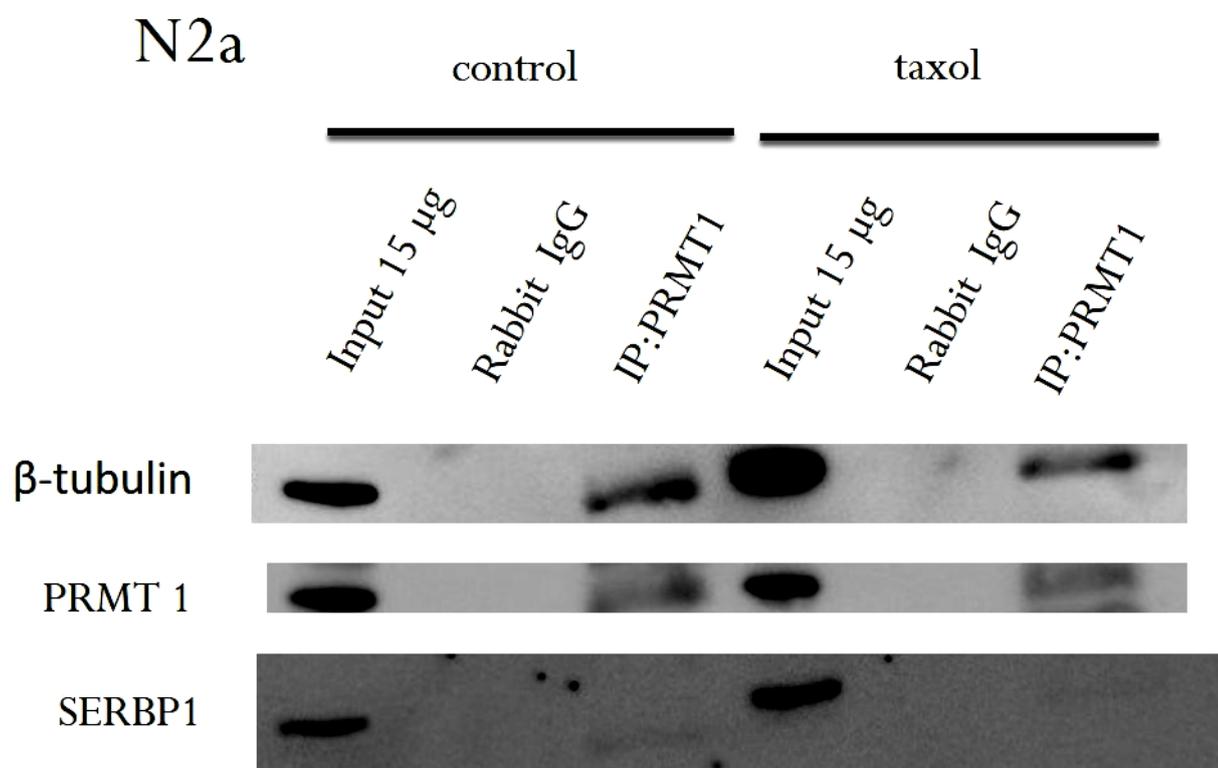


圖五 測試 Anti-PRMT1 antibody 進行 IP 的可行性

使用傳統的 IP 方法，用離心的方式沉澱 bead，Input load 15 μ g 蛋白含量

圖片(圖五)顯示出在 IP PRMT1 後的 sample 有 alpha-tubulin 存在的可能，且確認此次 IP 有實際沉澱 PRMT1，此結果顯示使用 PRMT1 抗體可進行免疫沉澱，且能確認與 PRMT1 結合蛋白，故之後使用此抗體進行免疫沉澱。然而此次實驗缺乏 positive control 以及 negative control，且此次方法是用傳統的 protein A/G bead，需使用離心的方式才可沉澱 bead，而透過之先前研究得知單純的離心力是有可能將 microtubule 進行沉澱。故此後的共免疫沉澱實驗使用磁珠，利用磁力即可對 bead 進行沉澱，減少外力因素。先前有研究指出 SERBP1 為 PRMT1 的受質之一，故之後使用 SERBP1 作為 positive control。

之後選擇 PRMT1 抗體結合磁珠作共免疫沉澱測試，結果如圖所示：



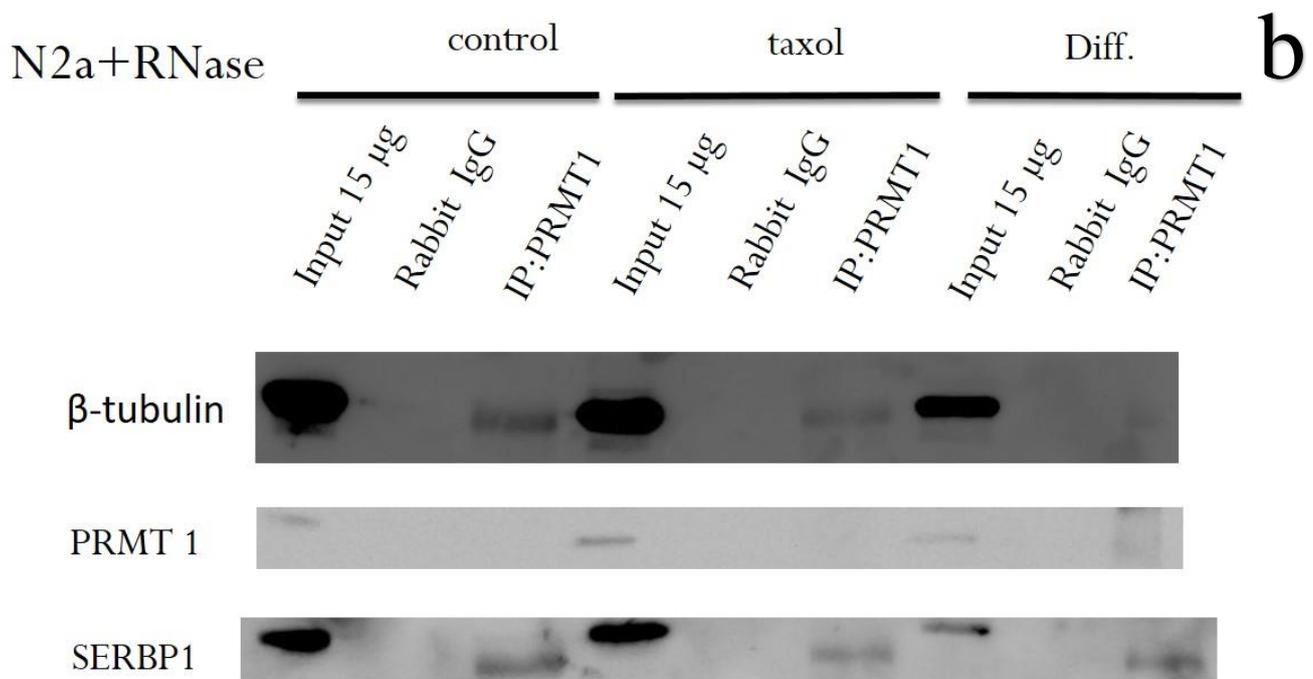
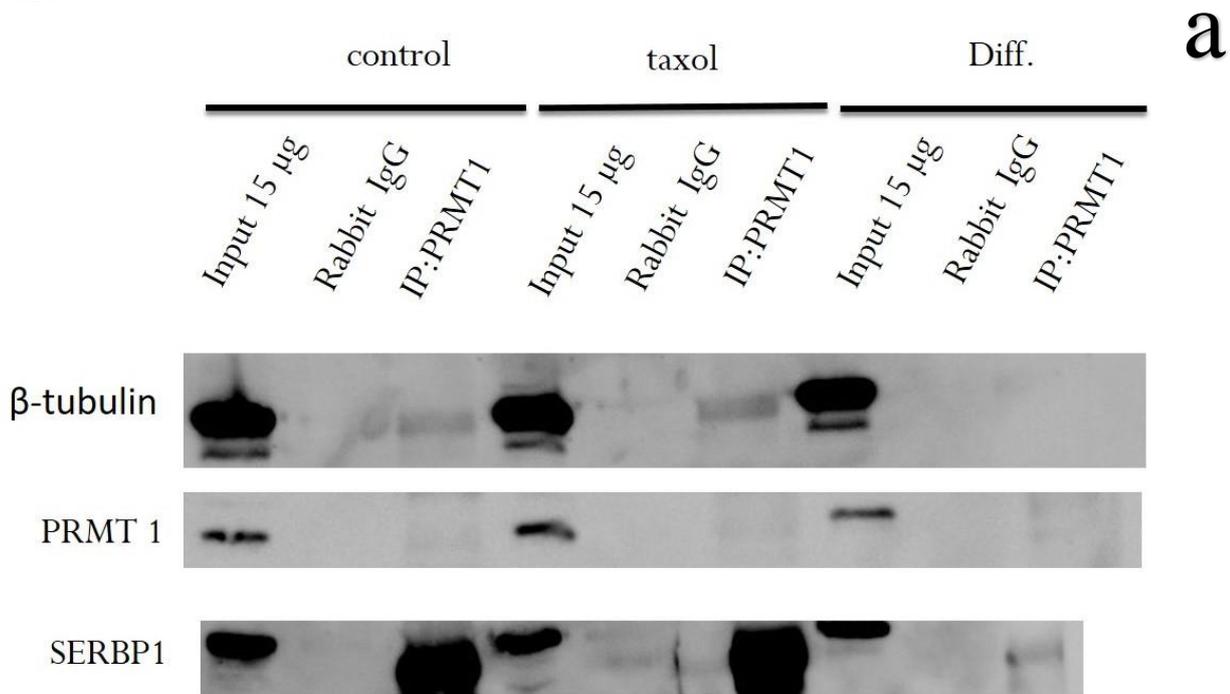
圖六 比較 N2a 細胞做不同處理後免疫沉澱的差異

使用磁珠的 IP 方法，用磁力的方式沉澱 bead，Input load 15 µg 蛋白含量

rabbit IgG=negative control、taxol=細胞加入 100 nM taxol、control=細胞加入 DMSO 作為控制組。

實驗結果(圖六)發現 beta-tubulin 在透過共免疫沉澱後以些許訊號，且 positive control 證明此免疫沉澱法的可行性，然而在此衍生出 PRMT1 與 microtubule 結合的兩種可能，第一種是兩者有直接的結合，且 PRMT1 可能對 microtubule 有甲基化的修飾。然而第二種可能是 PRMT1 與受質結合，而其中的受質有些許為 RNA binding protein，並結合著 RNA 透過 microtubule 運輸。為了釐清此兩種可能，我將 cell extract 加入 RNase 並與未加入 RNase 的 cell extract 做比對。

N2a



圖七 觀察 PRMT1 是否透過 RNA binding-protein 與 beta-tubulin 的結合

使用磁珠的 IP 方法，用磁力的方式沉澱 bead，Input load 15 μ g 蛋白含量 a)未經處理的 N2a cell extract b)N2a cell extract 加入 50 μ g RNase A

rabbit IgG=negative control、taxol=細胞加入 100 nM taxol、control=細胞加入 DMSO 作為控制組、Diff.=誘導分化後的 N2a

此實驗結果(圖七)顯示，在在 cell extract 加入 50 μ g RNase A 後還是有些許的 beta-tubulin 訊號，

因此認為 PRMT1 與 microtubule 結合有些是透過 PRMT1 的受質，而兩者直接結合的可能性還是存在。

討論：

上述實驗結果顯示 PRMT1 與 microtubule 似乎有些許異於一般單純運輸關係，然而兩者是否有酵素與受質上的關係，還需做 PRMT1 活性的實驗，亦或者 microtubule 的分析，然而礙於實驗進度上的關係，這些實驗未能如期操作。若是兩者有實質上的酵素與受質關係，可用於未來研究調控微管的方式，有益於細胞生長的調控。

參考文獻：

- Auclair, Y., & Richard, S. (2013). The role of arginine methylation in the DNA damage response. *DNA Repair (Amst)*, 12(7), 459-465. doi:10.1016/j.dnarep.2013.04.006
- 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
- Garnham, C. P., & Roll-Mecak, A. (2012). The chemical complexity of cellular microtubules: tubulin post-translational modification enzymes and their roles in tuning microtubule functions. *Cytoskeleton (Hoboken)*, 69(7), 442-463. doi:10.1002/cm.21027
- Iwasaki, H., & Yada, T. (2007). Protein arginine methylation regulates insulin signaling in L6 skeletal muscle cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 364(4), 1015-1021. doi:10.1016/j.bbrc.2007.10.113
- Matamoros, A. J., & Baas, P. W. (2016). Microtubules in health and degenerative disease of the nervous system. *Brain Res Bull*, 126(Pt 3), 217-225. doi:10.1016/j.brainresbull.2016.06.016
- Miyata, S., Mori, Y., & Tohyama, M. (2008). PRMT1 and Btg2 regulates neurite outgrowth of Neuro2a cells. *Neurosci Lett*, 445(2), 162-165. doi:10.1016/j.neulet.2008.08.065
- Nogales, E. (2000). Structural insights into microtubule function. *Annu Rev Biochem*, 69, 277-302. doi:10.1146/annurev.biochem.69.1.277
- Park, I. Y., Chowdhury, P., Tripathi, D. N., Powell, R. T., Dere, R., Terzo, E. A., . . . Walker, C. L. (2016). Methylated alpha-tubulin antibodies recognize a new microtubule modification on mitotic microtubules. *MAbs*, 8(8), 1590-1597. doi:10.1080/19420862.2016.1228505
- Sabine piller, N. J., Leila Hejazi, Roland Gamsjaeger, Nikolaus Sucher. (2015). Protein Arginine Methylation of Tubulin Beta Decreases Binding of Taxol in Neuro2a Cells. *THE FASEB JOURNAL*.
- Simandi, Z., Czipa, E., Horvath, A., Koszeghy, A., Bordas, C., Poliska, S., . . . Nagy, L. (2015). PRMT1 and

PRMT8 regulate retinoic acid-dependent neuronal differentiation with implications to neuropathology. *Stem Cells*, 33(3), 726-741. doi:10.1002/stem.1894

Thandapani, P., O'Connor, T. R., Bailey, T. L., & Richard, S. (2013). Defining the RGG/RG motif. *Mol Cell*, 50(5), 613-623. doi:10.1016/j.molcel.2013.05.021

Wang, H., DICTENBERG, J. B., KU, L., LI, W., BASSELL, G. J., & FENG, Y. (2008). Dynamic association of the fragile X mental retardation protein as a messenger ribonucleoprotein between microtubules and polyribosomes. *Mol Biol Cell*, 19(1), 105-114. doi:10.1091/mbc.E07-06-0583

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

Yu, I., Garnham, C. P., & Roll-Mecak, A. (2015). Writing and Reading the Tubulin Code. *J Biol Chem*, 290(28), 17163-17172. doi:10.1074/jbc.R115.637447