

**Charakterisierung der Repressorfunktion von PRMT6
und deren Rolle bei der Differenzierung,
Proliferation und Seneszenz**

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

dem Fachbereich Biologie der



vorgelegt von

Diplom-Biochemikerin

Claudia Stein

aus Freiberg

Marburg/Lahn, Dezember 2010

Vom Fachbereich Biologie der Philipps-Universität Marburg (Hochschulkenziffer: 1180) als
Dissertation am 01.02.2011 angenommen.

Erstgutachter: Prof. Dr. Renate Renkawitz-Pohl

Zweitgutachter: Prof. Dr. Uta-Maria Bauer

Weitere Mitglieder der Prüfungskommission:

Prof. Dr. Uwe Maier

Prof. Dr. Michael Bölker

Tag der mündlichen Prüfung am 18.02.2011.

INHALTSVERZEICHNIS

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	VI
ABBILDUNGSVERZEICHNIS	X
TABELLENVERZEICHNIS	XII
1 EINLEITUNG	1
1.1 HISTONMODIFIKATIONEN: WECHSELWIRKUNGEN UND FUNKTIONEN	1
1.2 ARGININMETHYLIERUNG	3
1.2.1 Die Familie der Protein-Arginin-Methyltransferasen (PRMTs)	3
1.2.2 Struktur und Katalysemechanismus	4
1.2.3 Regulation der Argininmethylierung	6
1.2.4 Substrate und Funktion von PRMT6	7
1.3 LYSINMETHYLIERUNG VON HISTONEN	8
1.4 REGULATION DER <i>HOXA</i> GENE WÄHREND DER DIFFERENZIERUNG	11
1.5 ZELLULÄRE SENESZENZ UND DIE REGULATION VON <i>p16/INK4A</i>	12
1.6 ZIELSETZUNG	14
2 MATERIALIEN	15
2.1 BAKTERIENSTÄMME UND MEDIEN	15
2.2 ZELLINIEN, MEDIEN UND ANTIBIOTIKA	15
2.2.1 Zelllinien	15
2.2.2 Medien und Antibiotika für die verwendeten Zelllinien	16
2.3 TRANSFEKTIONSREAGENZIIEN	16
2.4 OLIGONUKLEOTIDE	17
2.4.1 Sequenzierprimer	17
2.4.2 RT-qPCR Primer (quantitative Echtzeit-PCR)	17
2.4.3 qPCR Primer für ChIP-Analysen	18
2.4.4 Oligonukleotide für shRNA	19
2.4.5 siRNA Oligonukleotide	20

INHALTSVERZEICHNIS

2.5 PLASMIDE	21
2.5.1 Bakterielle Expressionsplasmide	21
2.5.2 Eukaryotische Expressionsplasmide	21
2.5.2.1 Leervektoren	21
2.5.2.2 Expressionsplasmide.....	21
2.5.2.3 Virale Expressionsplasmide.....	23
2.6 ANTIKÖRPER.....	23
2.6.1 Primärantikörper	23
2.6.2 Sekundärantikörper.....	25
2.7 PEPTIDE	25
2.8 SUBSTRATE FÜR <i>IN VITRO</i> METHYLTRANSFERASEASSAYS	26
2.9 RADIOAKTIVE SUBSTANZEN	26
2.10 CHROMATOGRAPHIE-MATERIALIEN	26
2.11 ENZYME, INHIBITOREN UND GRÖßENSTANDARDS	26
2.11.1 Enzyme	26
2.11.2 Inhibitoren	27
2.11.3 Größenstandards	27
2.12 KITS	27
2.13 ALLGEMEINE PUFFER.....	28
2.14 CHEMIKALIEN.....	28
2.15 VERBRAUCHSMATERIALIEN	28
2.16 GERÄTE.....	29
3 METHODEN.....	30
3.1 ZELLBIOLOGISCHE METHODEN	30
3.1.1 Kultivierung eukaryotischer Zellen	30
3.1.2 Einfrieren und Auftauen von Zellen	31
3.1.3 Bestimmung der Zellzahl mittels Neubauer-Zählkammer	31
3.1.4 Erstellen von Wachstumskurven	31
3.1.5 Differenzierung von NT2/D1 Zellen	32
3.1.6 Transfektion eukaryotischer Zellen mit Plasmid-DNA	32
3.1.7 Transfektion eukaryotischer Zellen mit siRNA	33
3.1.8 Herstellen rekombinanter Retroviren und Infektion von Tig3-T Zellen.....	34

3.1.9	Immunfluoreszenzfärbung	36
3.1.10	Seneszenz-assoziierte β -Galaktosidase (SA- β -Gal) Färbung	36
3.1.11	Bestimmung der Klonogenität von Zellen.....	37
3.2	DURCHFLUSSCYTOMETRIE (FACS).....	37
3.2.1	Fixierung von Zellen.....	37
3.2.2	Bestimmung der Zellzyklusverteilung mit Propidiumiodid.....	38
3.3	MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN.....	38
3.3.1	Isolierung und Aufreinigung von Nukleinsäuren.....	38
3.3.2	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	39
3.3.3	Transformation kompetenter Bakterien	40
3.3.4	Restriktionsverdau von Plasmid-DNA	40
3.3.5	Extraktion von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	41
3.3.6	Hybridisierung von Oligonukleotiden	41
3.3.7	Ligation von DNA-Fragmenten.....	41
3.3.8	DNA-Sequenzanalyse.....	41
3.4	EXPRESSIONSANALYSEN	42
3.4.1	Reverse Transkription zur cDNA-Synthese.....	42
3.4.2	quantitative Echtzeit-PCR (qPCR)	42
3.5	PROTEINBIOCHEMISCHE METHODEN.....	44
3.5.1	Herstellung von Gesamtzelllysaten.....	44
3.5.2	Proteinkonzentrationsbestimmung nach Bradford.....	45
3.5.3	Coimmunpräzipitation	45
3.5.4	Analytische und präparative Gelfiltration (Größenausschlusschromatographie).....	46
3.5.5	Konzentrieren von Proteinen mit StrataClean Resin	46
3.5.6	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	47
3.5.7	Coomassie-Färbung von Proteingelen	47
3.5.8	Western Blot Verfahren.....	48
3.5.9	Immundetektion.....	49
3.5.10	Präparation von GST-Fusionsproteinen aus Bakterien.....	49
3.5.11	<i>in vitro</i> Methylierungsassay und Fluorographie	50
3.5.12	Aufreinigung von PRMT6 mittels 2-Schritt <i>Tandem Affinity Purification</i> -Tag Strategie	50
3.5.13	Massenspektrometrische Analyse.....	52
3.5.14	Chromatin-Immunpräzipitation (ChIP)	53
4	ERGEBNISSE	55
4.1	PRMT6 METHYLIERT ARGININE IN DEN N-TERMINI VON HISTONEN	55
4.1.1	Die Methylierung von Arginin 2 am Histon H3 ist spezifisch für PRMT6	55

4.1.2	Charakterisierung der Histon-Methyltransferaseaktivität von PRMT6 <i>in vivo</i>	56
4.1.3	PRMT6 katalysiert vorzugsweise die Dimethylierung	59
4.1.4	Die Regulation der H3R2 Dimethylierung beruht auf der katalytischen Aktivität von PRMT6	60
4.2	WECHSELWIRKUNG VON PRMT6 UND H3R2ME2 MIT DER AKTIVIERENDEN HISTONMODIFIKATION H3K4ME3.....	62
4.2.1	PRMT6 beeinflusst die H3K4 Trimethylierung negativ	62
4.2.2	Charakterisierung der modifikationspezifischen Antikörper H3R2me2 und H3K4me3	63
4.2.3	Die Transkription H3K4me3-regulierter Gene wird durch PRMT6 inhibiert	64
4.2.4	Die katalytische Aktivität von PRMT6 ist für die Zielgen-Repression erforderlich.....	66
4.2.5	PRMT6 reguliert die Expression von <i>HOXA2</i> direkt auf Chromatinebene	66
4.2.6	PRMT6 ist bei der neuronalen Differenzierung von Zellen als Repressor von Bedeutung	68
4.3	DIE WECHSELWIRKUNG VON PRMT6 MIT DEN POLYCOMB REPRESSOR KOMPLEXEN PRC1 UND PRC2.....	70
4.3.1	Das Elutionsprofil von PRMT6 stimmt mit den Elutionsprofilen einiger PcG Proteine überein	71
4.3.2	PRMT6 interagiert mit einigen Untereinheiten von PRC1	72
4.3.3	Die Interaktionen mit PcG Proteinen sind PRMT6-spezifisch	75
4.3.4	PRMT6 interagiert mit EZH2	75
4.3.5	Die <i>HOXA</i> Gene zeigen spezifische Expressionsmuster während der Differenzierung von NT2/D1 Zellen.....	76
4.3.6	Die An- oder Abwesenheit von PRMT6 und PcG Proteinen während der Differenzierung korreliert mit der Expression der <i>HOXA</i> Gene	77
4.3.7	Die Depletion von PRMT6 verändert die <i>HOXA</i> Genexpression während der Differenzierung	79
4.3.8	Die Depletion von PRMT6 hat Veränderungen im Histonmodifikationsmuster am <i>HOXA</i> Locus zur Folge	81
4.4	PRMT6 REGULIERT PROLIFERATION UND SENESZENZ ÄHNLICH WIE POLYCOMB REPRESSOR KOMPLEXE	83
4.4.1	shRNA-vermittelte Depletion in der humanen diploiden Fibroblastenzelllinie Tig3-T	83
4.4.2	Die Depletion von PRMT6 resultiert in verlangsamter Proliferation und Seneszenz von Tig3-T Zellen	85
4.4.3	PRMT6-defiziente Zellen zeigen erhöhte Expressionslevel der Zellzyklusinhibitoren p16/INK4A und p21/CIP1	87
4.4.4	PRMT6 reguliert die Expression von <i>p16/INK4A</i> durch direkte Bindung.....	89
4.4.5	PRMT6 reguliert die Proliferation von Tumorzellen.....	91
4.5	IDENTIFIKATION NEUER INTERAKTIONSPARTNER VON PRMT6	92
4.5.1	PRMT6 ist Bestandteil höhermolekularer Protein-Protein-Interaktionen.....	92
4.5.2	Aufreinigung von TAP-markierter PRMT6 mittels 2-Schritt-Aufreinigungsstrategie	93
4.5.3	Analyse der identifizierten Proteine	97

5	DISKUSSION.....	99
5.1	PRMT6 IST DIE HAUPTMETHYLTRANSFERASE FÜR DIE DIMETHYLIERUNG VON R2 AM HISTON H3.....	99
5.2	PRMT6 ANTAGONISIERT DIE H3K4 TRIMETHYLIERUNG UND DAMIT GENAKTIVIERUNG DURCH DIMETHYLIERUNG VON R2 AM HISTON H3.....	102
5.2.1	H3R2me2 beeinflusst H3K4me3 negativ	102
5.2.2	PRMT6 reprimiert spezifische H3K4me3-regulierte Gene	103
5.2.3	PRMT6 reguliert die Expression von <i>HOXA2</i> und <i>HOXA5</i> während der neuronalen Differenzierung von NT2/D1 Zellen	106
5.2.4	Modell der PRMT6-vermittelten Genrepression	107
5.3	PRMT6 UND H3K27ME3 BEEINFLUSSEN SICH GEGENSEITIG POSITIV.....	108
5.3.1	PRMT6 interagiert mit einigen PcG Proteinen.....	108
5.3.2	PRMT6 spielt eine Rolle bei dem Erhalt der <i>HOXA</i> Genexpressionsmuster während der neuronalen Differenzierung	111
5.3.3	PRMT6 kontrolliert Proliferation und Seneszenz in humanen diploiden Fibroblasten und Tumorzellen.....	113
5.3.4	Modell zur positiven Wechselwirkung zwischen PRMT6 und PcG Proteinen.....	117
5.4	PRMT6 IST BESTANDTEIL HÖHERMOLEKULARER PROTEIN-PROTEIN-INTERAKTIONEN	120
5.5	PRMT6 UND DIE H3R2 DIMETHYLIERUNG IM HISTON-CODE: ERKENNTNISSE UND OFFENE FRAGEN.....	123
6	ZUSAMMENFASSUNG	126
7	SUMMARY.....	128
8	LITERATURVERZEICHNIS	130
	DANKSAGUNG.....	148
	LEBENS LAUF.....	149
	PUBLIKATIONEN	150
	EHRENWÖRTLICHE ERKLÄRUNG	151

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

°C	Grad Celsius
Ak	Antikörper
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure
Ash2	<i>absent, small, or homeotic discs 2</i>
ATP	Adenosintriphosphat
ATRA	all- <i>trans</i> -Retinsäure (<i>all-trans retinoic acid</i>)
bp	Basenpaare
BrdU	Bromdesoxyuridin
BSA	Rinderserumalbumin (bovine serum albumin)
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
Cdk	Cyclin-abhängige Kinase (<i>cyclin-dependent kinase</i>)
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure (<i>complementary deoxyribonucleic acid</i>)
CDS	kodierende Sequenz (<i>coding sequence</i>)
ChIP	Chromatin-Immunpräzipitation
Ct	<i>threshold cycle</i>
d	Tage
Da	Dalton
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (<i>deoxyribonucleic acid</i>)
dNTPs	Desoxyribonukleotidtriphosphat-Gemisch
DTT	Dithiothreitol
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ECL	<i>enhanced chemiluminescence</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EED	<i>embryonic ectoderm development</i>
Ethanol abs.	100% Ethanol
EZH2	<i>enhancer of zeste 2</i>
FACS	Durchflussscytometrie (<i>fluorescence activated cell sorting</i>)
VI	

FBS	Fetales Kälberserum (<i>fetale bovine serum</i>)
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
fl	<i>full length</i>
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase
GAR	Glycin-Arginin-reich
GFP	<i>green fluorescent protein</i>
GST	Glutathion-S-Transferase
h	Stunden
H ₂ O bidest	zweifach destilliertes Wasser
HAT	Histon-Acetyltransferasen
HDAC	Histon-Deacetylasen
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
His	Histidin
HIV	<i>Human Immunodeficiency Virus</i>
HMGA	<i>High Mobility Group A</i>
hnRNP	Heteronukleäres Ribonukleinprotein
HOX	<i>Homeobox</i>
HPC	<i>Human Polycomb</i>
HPH	<i>Human Polyhomeotic</i>
HRP	Meerrettich-Peroxidase (<i>horseradish peroxidase</i>)
IgG	Immunglobulin G
IP	Immunpräzipitation
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid
JMJD6	<i>Jumonji domain-containing protein 6</i>
kb	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
LB	<i>lysogeny broth</i>
me1	Monomethylierung
me2	Dimethylierung
me3	Trimethylierung
min	Minuten
MLL	<i>mixed lineage leukemia</i>
mRNA	Boten-RNA (messenger RNA)
MS	Massenspektrometrie
mut	Mutante
NP-40	Nonidet P-40
OD	optische Dichte

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung (<i>phosphate buffered saline</i>)
PcG Protein	Polycomb Gruppen Protein
PCR	Polymerasekettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)
PI	Propidiumiodid
PI-FACS	Propidiumiodid-Durchflusscytometrie
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
Poly-A	Polyadenylierungssignal
PRC	<i>Polycomb Repressive Complex</i>
PRMT	Protein-Arginin-Methyltransferase
PVDF	Polyvinylidenfluorid
qPCR	quantitative Echtzeit-PCR (<i>real-time PCR</i>)
RbAp	<i>Rb-associated protein</i>
RNA	Ribonukleinsäure (<i>ribonucleic acid</i>)
RNAi	RNA-Interferenz
RT	Raumtemperatur
RT-qPCR	quantitative reverse Transkriptase-PCR
SA- β -Gal	Seneszenz-assoziierte β -Galaktosidase
SDS	Natriumdodecylsulfat (<i>sodium dodecyl sulphate</i>)
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
sec	Sekunden
Set	<i>Su(var)3-9, Enhancer of Zeste, Trithorax</i>
shRNA	short hairpin RNA 191
SILAC	<i>Stable Isotope Labeling by Amino Acids in Cell Culture</i>
siRNA	short interfering RNA
SUMO	<i>Small Ubiquitin-like Modifier</i>
SUZ12	<i>Suppressor of Zeste 12</i>
TAP	<i>Tandem Affinity Purification</i>
Tat	<i>Trans-Activator of Transcription</i>
TBS	Tris-gepufferte Salzlösung (<i>tris buffered saline</i>)
TE	Tris-EDTA
TEMED	Tetramethylethylendiamin
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
Triton X-100	Octylphenoxypolyethoxyethanol
trxG Protein	Trithorax Gruppen Protein
Tween-20	Polyoxyethylen-sorbitan-monolaurat
U	Units (Aktivitätseinheit von Enzymen)
v/v	Volumen pro Volumen (<i>volume per volume</i>)

w/v	Gewicht pro Volumen (weight per volume)
WDR5	<i>WD repeat domain 5</i>
wt	Wildtyp
X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indolyl- β -D-galactopyranosid
z.B.	zum Beispiel
Δ	delta
α	anti

Die Nomenklatur der Maßeinheiten wurde gemäß den allgemeinen IUPAC-Regeln verwendet.

Zur Unterscheidung von Genen, Transkripten und Proteinen wurde in der vorliegenden Arbeit folgende Nomenklatur verwendet.

Kodierende Gene und Transkripte wurden mit dem Gensymbol bezeichnet, z.B. Human: *PRMT6*
Maus: *Prmt6*

Proteine wurden mit dem Proteinsymbol bezeichnet, z.B. Human: PRMT6
Maus: Prmt6

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1: Schematische Darstellung der Methylierung von Argininen durch PRMTs.	4
Abbildung 2: Struktur der Protein-Arginin-Methyltransferasen (PRMTs).	5
Abbildung 3: Signalwege zur Aktivierung replikativer und stressinduzierter Seneszenz.	13
Abbildung 4: PRMT6 besitzt Histon-Methyltransferaseaktivität.	56
Abbildung 5: PRMT6 Überexpression in MCF7 Zellen.	57
Abbildung 6: PRMT6 beeinflusst die globale Menge an H4R3me2 nicht.	58
Abbildung 7: PRMT6 reguliert die H3R2 Dimethylierung <i>in vivo</i> global.	59
Abbildung 8: PRMT6 Überexpression bewirkt keine Änderung der H3R2 Monomethylierung.	60
Abbildung 9: Die katalytische Aktivität von PRMT6 ist für die Regulation der asymmetrischen H3R2 Dimethylierung essentiell.	61
Abbildung 10: PRMT6 beeinflusst die H3K4 Trimethylierung negativ.	63
Abbildung 11: Charakterisierung der modifikationsspezifischen Antikörper.	64
Abbildung 12: PRMT6 inhibiert die Transkription einiger c-Myc-Zielgene in MCF7 Zellen.	65
Abbildung 13: PRMT6 reprimiert spezifische Gene des <i>HOXA</i> Locus in MCF7 Zellen.	65
Abbildung 14: Die katalytische Aktivität von PRMT6 ist für die Repression notwendig.	66
Abbildung 15: PRMT6 bindet an die 5'-Region des <i>HOXA2</i> Gens in MCF7 Zellen.	67
Abbildung 16: Die Rekrutierung von MLL1 und WDR5 an das <i>HOXA2</i> Gen nach PRMT6 Überexpression ist reduziert.	68
Abbildung 17: Expression von <i>HOXA2</i> und <i>HOXA5</i> während der NT2/D1 Differenzierung.	69
Abbildung 18: Veränderungen am Chromatin während der Differenzierung von NT2/D1 Zellen.	70
Abbildung 19: Gelfiltrationselutionsprofile von PRMT6 und PRC1 Komponenten.	71
Abbildung 20: Gelfiltrationselutionsprofile von PRMT6 und EZH2.	72
Abbildung 21: PRMT6 interagiert mit Komponenten des PRC1 Komplexes.	73
Abbildung 22: PRMT6 interagiert mit PRC1 Komponenten in Gelfiltrationsfraktionen.	74
Abbildung 23: Die PRC1 Komponenten BMI1 und HPH2 interagieren nicht mit PRMT1 und PRMT4.	75
Abbildung 24: PRMT6 interagiert mit EZH2.	76
Abbildung 25: Die Expression der <i>HOX</i> Gene ist während der Differenzierung strikt reguliert.	77
Abbildung 26: Veränderung der Chromatinbindung von PRMT6, CBX8 und EZH2 während der ATRA-induzierten Differenzierung von NT2/D1 Zellen.	78
Abbildung 27: Veränderung des Histonmodifikationsmusters während der ATRA-induzierten Differenzierung von NT2/D1 Zellen.	79
Abbildung 28: siRNA-vermittelte Depletion von PRMT6 und CBX8 in NT2/D1 Zellen.	80

Abbildung 29: Verändertes Expressionsmuster der <i>HOXA</i> Gene während der ATRA-induzierten Differenzierung im <i>knockdown</i> von PRMT6 und CBX8.....	81
Abbildung 30: Veränderungen am <i>HOXA</i> Locus auf Chromatinebene nach Depletion von PRMT6. .	82
Abbildung 31: Charakterisierung der Kontroll-shRNAs in Tig3-T Zellen.	84
Abbildung 32: Nachweis der shRNA-vermittelten Depletion von PRMT6 und CBX8.....	85
Abbildung 33: PRMT6-defiziente Zellen proliferieren langsamer und arretieren in der G1-Phase.....	86
Abbildung 34: PRMT6-defiziente Zellen zeigen höhere β -Galaktosidase Aktivität als Kontrollzellen.	87
Abbildung 35: PRMT6 reguliert die Proliferation von humanen diploiden Fibroblasten.....	88
Abbildung 36: <i>p15/INK4B</i> und <i>p14/ARF</i> sind unabhängig von PRMT6 exprimiert.....	89
Abbildung 37: PRMT6 bindet direkt an <i>p16/INK4A</i>	90
Abbildung 38: PRMT6-defiziente Zellen zeigen verminderte Klonogenität.	91
Abbildung 39: PRMT6 ist für die Proliferation von U2OS Zellen notwendig.....	92
Abbildung 40: PRMT6 ist Bestandteil höhermolekularer Protein-Protein-Interaktionen.....	93
Abbildung 41: 2-Schritt-Aufreinigungsstrategie mittels <i>Tandem Affinity Purification (TAP)-Tag</i>	94
Abbildung 42: Colloidale Coomassie-Färbung der TAP-PRMT6 und TAP-LV Aufreinigung für die massenspektrometrische Analyse.	95
Abbildung 43: Elutionsprofile von TAP-PRMT6 und His-PRMT6 nach der Auftrennung über eine Superdex 200 Gelfiltrationssäule.....	96
Abbildung 44: Bekannte Funktionen und Vernetzung der identifizierten Proteine.	98
Abbildung 45: Modell der PRMT6-vermittelten Repression H3K4me3-regulierter Gene.	107
Abbildung 46: Modell der Assoziation von PRMT6 mit Untereinheiten der PRC1 und PRC2 Komplexe.....	110
Abbildung 47: Modell der Genregulation nach ATRA-induzierter Differenzierung von NT2/D1 Zellen.	118
Abbildung 48: PRMT6 reguliert Proliferation und Seneszenz.....	119
Abbildung 49: Übersicht zur Rolle von PRMT6 und H3R2me2 im Wechselspiel mit anderen Histonmodifikationen und Effektorproteinen bei der Genexpressionskontrolle.	124

TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1: Antibiotikakonzentrationen zur Selektion nach Transfektion oder Infektion.	16
Tabelle 2: Übersicht der verwendeten RT-qPCR Primersequenzen.....	17
Tabelle 3: Übersicht der verwendeten qPCR Primersequenzen für CHIP-Analysen.....	18
Tabelle 4: Übersicht der verwendeten 60-mer Oligonukleotide für shRNA-Anwendungen.	19
Tabelle 5: Übersicht der verwendeten spezifischen und unspezifischen (Krtl.) siRNAs.	20
Tabelle 6: Primärantikörper.....	23
Tabelle 7: Sekundärantikörper	25
Tabelle 8: Zusammenstellung der eingesetzten Chromatographie-Materialien und ihre Verwendung.	26
Tabelle 9: Übersicht zur Häufigkeit des Passagierens und zur Verdünnung der Zelllinien.	30
Tabelle 10: Übersicht der massenspektrometrisch identifizierten Proteine aus der TAP-PRMT6 Aufreinigung	97

1 EINLEITUNG

Die DNA (*deoxyribonucleic acid*) wurde als Träger der Erbinformation, in Form des genetischen Codes, identifiziert. Allerdings reichen die DNA-Sequenz und die Organisation der Gene allein nicht aus, um die korrekte Genexpression für die Entwicklung komplexer eukaryotischer Organismen zu steuern. Voraussetzung für die spezifische Regulation der Genexpression ist die Organisation von DNA in Chromosomen. Im Wesentlichen handelt es sich dabei um eine Aneinanderreihung von Nukleosomen, in denen die DNA um Histonoktamere, bestehend aus einem H3/H4-Tetramer und zwei H2A/H2B-Heterodimeren, gewickelt ist. Die Gesamtheit der DNA im Komplex mit Histonen und Nicht-Histon-Proteinen bezeichnet man als Chromatin.

Die Struktur und Dynamik des Chromatins wird durch epigenetische Modifikationen gesteuert, die zur Erweiterung des Informationsgehaltes der DNA und damit u.a. zur Regulation der korrekten Genexpression bei Entwicklungs- und Differenzierungsprozessen beitragen. Epigenetische Regulationsmechanismen, bei denen DNA-Methylierung und Histonmodifikationen eine zentrale Rolle spielen, erlauben eine vererbare, aber reversible Änderung in der Genfunktion und -expression, ohne die DNA-Sequenz selbst zu modifizieren und ergänzen damit den genetischen Code (Wolffe and Matzke 1999).

1.1 HISTONMODIFIKATIONEN: WECHSELWIRKUNGEN UND FUNKTIONEN

Die Struktur und Packung des Chromatins trägt entscheidend zur Regulation verschiedener nukleärer Prozesse, wie Transkription, Replikation oder DNA-Reparatur bei. Dabei wird die Dynamik der Chromatinstruktur direkt durch posttranslationale Modifikationen der ungefalteten N-terminalen Region der Histone geprägt. Diese Modifikationen sind vielzählig und umfassen u.a. Argininmethylierung, Lysinmethylierung, Acetylierung, Phosphorylierung und Ubiquitinierung. Einige Histonmodifikationen, wie zum Beispiel H3K14 und H3K9 Acetylierung oder H3K4 Trimethylierung, kommen hauptsächlich in offenen, aktiv transkribierten Chromatinbereichen vor, während andere, wie H3K9 Trimethylierung oder H3K27 Trimethylierung, den repressiven Chromatinzustand charakterisieren.

Da die Histonmodifikationen einzeln oder in verschiedenen Kombinationen vorkommen und sogenannte Histonmodifikationsmuster bilden, die unterschiedliche zelluläre Prozesse herbeiführen, spricht man dabei vom Histon-Code. Darunter versteht man die gegenseitige Beeinflussung zwischen unterschiedlichen Histonmodifikationen in *cis*, am selben Histon, oder in *trans*, zwischen unterschiedlichen Histonen, die die Bindungsplattform für die Rekrutierung von Effektorproteinen darstellen und darüber aktivierend oder reprimierend auf die Transkription bestimmter Gene wirken können (Imhof and Becker 2001; Jenuwein and Allis 2001; Zhang and Reinberg 2001; Latham and

EINLEITUNG

Dent 2007). Die Rekrutierung von Effektorproteinen und deren Bindung an bestimmte Modifikationen, mittels spezifischer Domänen, stellt den bisher am besten untersuchten Mechanismus zur Wirkung von Histonmodifikationen dar. Methylierungen werden von Chromo-, Tudor-, MBT- und PHD-Domänen Proteinen erkannt, während Acetylierung von Bromo-Domänen und Phosphorylierung von Domänen in 14-3-3 Proteinen erkannt werden (Seet *et al.* 2006). In den letzten Jahren wurde eine Reihe von Proteinen und Proteinkomplexen identifiziert, die an bestimmte Histonmodifikationen rekrutiert werden und aufgrund ihrer enzymatischen Aktivität (z.B. Chromatinremodeller, histonmodifizierende Enzyme) zu spezifischen zellulären Ereignissen beitragen.

Die spezifische Bindung von BPTF (*bromodomain and PHD finger transcription factor*), einer Untereinheit des NURF Chromatinremodelling Komplexes, über seine PHD-Domäne an H3K4me3 ist für die *in vivo* Funktion von NURF notwendig, da dadurch die Bindung der SNF2L/ISWI ATPase Untereinheit an das Chromatin veranlasst wird. Die Daten belegen außerdem, dass H3K4me3 die Assoziation von BPTF/NURF mit dem Chromatin stabilisiert und bei der Expressionskontrolle der *Hox* Gene beteiligt ist. Am Promoter von *HOXC8* resultiert die MLL-vermittelte H3K4 Trimethylierung in der Rekrutierung und Bindung von BPTF/NURF, dessen ATP-abhängige Verschiebung der Nukleosomen zur transkriptionellen Aktivierung beiträgt (Wysocka *et al.* 2006).

Im Gegensatz dazu verursacht die Bindung des PHD-finger Proteins ING2 (*inhibitor of growth*) an H3K4me3 durch die Rekrutierung des repressiven mSin3a-HDAC1 Histon-Deacetylase Komplexes die Repression proliferationsrelevanter Gene als Folge von DNA-Schaden und genotoxischem Stress. Die Daten belegen, dass die identifizierte Bindung von ING2 an H3K4me3 eine entscheidende Rolle bei der DNA-Schadensantwort spielt und bringen damit die H3K4 Trimethylierung zum ersten Mal mit transkriptioneller Repression in Verbindung (Shi *et al.* 2006).

Für WDR5 (*WD repeat containing protein 5*), eine Untereinheit des MLL-Methyltransferase Komplexes wurde die Bindung an H3K4me1/2 gezeigt (Wysocka *et al.* 2005). Allerdings belegen Struktur- und Bindungsanalysen, dass die Rekrutierung von WDR5 weniger auf der Erkennung der H3K4 Methylierung basiert, sondern vielmehr auf der Bindung der benachbarten Aminosäuren A1, T3 und vor allem R2 beruht und vom Methylierungsstatus des R2 abhängt (Couture *et al.* 2006). Es wird daher angenommen, dass WDR5 funktionell dafür verantwortlich ist das Histon-Substrat für die Methylierung durch die katalytische Untereinheit MLL des Histon-Methyltransferase Komplexes zu präsentieren (Ruthenburg *et al.* 2006).

Die H3K27 Trimethylierung rekrutiert die Chromo-Domänen Proteine der CBX-Familie, die im PRC1 (*polycomb repressive complex 1*) Komplex mit H2A-spezifischer Ubiquitin-Ligaseaktivität von Ring1/BMI1 assoziiert sind und transkriptionelle Repression bewirken (Simon and Kingston 2009). Korrelative Studien weisen auf eine gegenseitig negative Wechselwirkung zwischen Lysinacetylierung und Argininmethylierung hin (Pal *et al.* 2003; Pal *et al.* 2004). Hierbei wurde gefunden, dass sich die PRMT5-vermittelte H3R8 Methylierung und die H3K9 Acetylierung gegenseitig negativ beeinflussen. Und obwohl mechanistisch noch nicht bekannt ist, wie RPMT5 die Transkription reprimiert, wird

vermutet, dass die H3R8 Methylierung die Zugänglichkeit von H3K9 für aktivierende Histon-Acetyltransferasen (HATs) sterisch behindert. Dies könnte einen alternativen Mechanismus zum Erhalt von hypoacetyliertem H3K9 und transkriptioneller Repression, neben der Aktivität von Histon-Deacetylasen (HDACs) darstellen (Pal *et al.* 2003; Pal *et al.* 2004). Im Gegensatz dazu veranlasst die PRMT1-abhängige H4R3 Dimethylierung eine Hyperacetylierung am Histon H3, die wiederum die H3R17 Methylierung durch PRMT4 begünstigt und zur Aktivierung Östrogen-regulierter Gene führt (Bauer *et al.* 2002; Daujat *et al.* 2002; Wagner *et al.* 2006).

1.2 ARGININMETHYLIERUNG

1.2.1 DIE FAMILIE DER PROTEIN-ARGININ-METHYLTRANSFERASEN (PRMTs)

Die Proteine der Arginin-Methyltransferase Familie sind von der Hefe, über Insekten (*Drosophila melanogaster*) und Pflanzen bis zum Mensch evolutionär hoch konserviert, kommen jedoch in Bakterien nicht vor. Allerdings variiert die Anzahl der Mitglieder in Abhängigkeit von der Spezies. Zurzeit sind vier Enzyme (Rmt1/Hmt1, Rmt2, Rmt3, Hsl7/Skb1) in Hefe bekannt, wobei Rmt1 die Hauptmethyltransferase zu sein scheint. Außerdem wurden neun PRMT-kodierende Gene in *Drosophila melanogaster* (DART1-9) sowie in *Arabidopsis* identifiziert. Zudem wurden in den bisher untersuchten Spezies mindestens die Homologe zu PRMT1 und PRMT5 gefunden (Boulanger *et al.* 2004; Hung and Li 2004; Paik *et al.* 2007; Pal and Sif 2007; Liu *et al.* 2010). Mit der Ausnahme von *Trypanosoma brucei* wurden bisher keine Homologe von PRMT6 in Genomen einzelliger Eukaryoten entdeckt (Fisk *et al.* 2010). In den letzten beiden Jahrzehnten hat sich die Anzahl bekannter PRMTs in Säugern auf 11 Familienmitglieder erhöht, die bis auf die kürzlich identifizierten putativen PRMTs, PRMT10 und PRMT11, katalytische Aktivität aufweisen (Wolf 2009). PRMTs werden aufgrund ihres Methylierungsendproduktes als TypI oder TypII Enzyme klassifiziert. Beide Typen katalysieren die Monomethylierung des Arginins (MMA) am ω -Stickstoffatom der Guanidinogruppe als Zwischenprodukt. Die TypI PRMTs (PRMT1, PRMT2, PRMT3, CARM1/PRMT4, PRMT6, PRMT8) katalysieren anschließend die asymmetrische Dimethylierung (ADMA) während die Aktivität der TypII PRMTs (PRMT5, PRMT7, PRMT9) zur symmetrischen Dimethylierung (SDMA) führt (Bedford and Richard 2005; Krause *et al.* 2007; Pal and Sif 2007; Wolf 2009). Darüber hinaus werden zwei weitere Typen der Argininmethylierung beschrieben. Dem TypIII wurde PRMT7 zugeordnet, die präferentiell die Monomethylierung des Arginins am ω -Stickstoffatom der Guanidinogruppe katalysiert (Miranda *et al.* 2004; Miranda *et al.* 2006). Da die genaue Funktion dieser Methylierung noch nicht bestimmt werden konnte, könnte es sich auch nur um das Zwischenprodukt für weitere Methylierungsschritte handeln (Gary and Clarke 1998). Die Argininmethylierung am δ -Stickstoffatom

durch TypIV PRMTs konnte bisher nur in Hefe (*Saccharomyces cerevisiae*) beobachtet werden und ist weit weniger häufig als die Methylierung des ω -Stickstoffatoms (Zobel-Thropp *et al.* 1998).

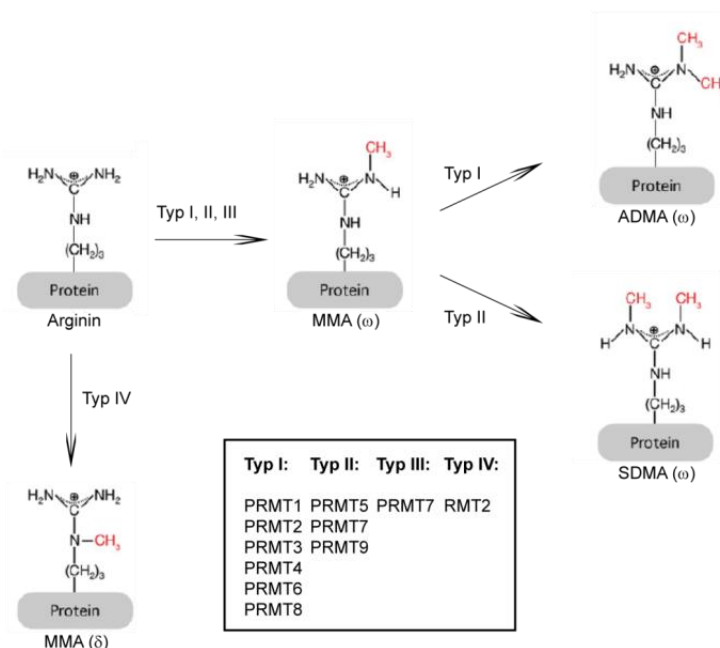


Abbildung 1: Schematische Darstellung der Methylierung von Argininen durch PRMTs.

Modifiziert nach (Bedford and Clarke 2009).

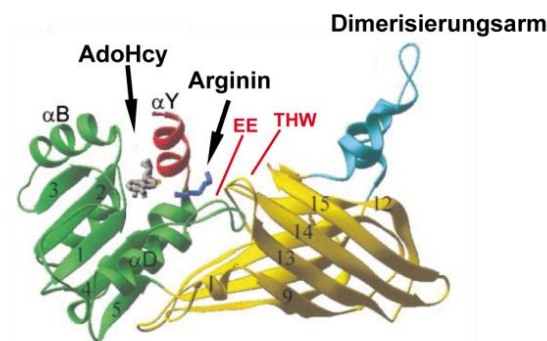
In den letzten Jahren wurden zahlreiche Substrate von PRMTs identifiziert, die sowohl Histone als auch Nicht-Histon-Proteine umfassen und die zur Regulation verschiedener Prozesse wie Signaltransduktion, Proliferation, Transkriptionskontrolle, RNA-Splicing, RNA-Prozessierung und DNA-Reparatur, in Abhängigkeit von der Position der Methylierung und der verantwortlichen PRMT beitragen (Bedford and Richard 2005; Wolf 2009). Trotz der hoch konservierten Methyltransferase-Domäne weisen die PRMTs typische Substratspezifitäten auf (Stallcup 2001; Frankel *et al.* 2002). Während die meisten TypI Enzyme bevorzugt Arginine innerhalb Glycin-Arginin-reicher Sequenzen (GAR-Motif) methylieren, wurde für PRMT4, die keine GAR-Motife methyliert bisher keine Konsensussequenz identifiziert. Die TypII Methyltransferasen hingegen methylieren sowohl isolierte Arginine als auch Arginine in GAR-Motifen (Najbauer *et al.* 1993; Gary and Clarke 1998; Bedford and Richard 2005; Pal and Sif 2007).

1.2.2 STRUKTUR UND KATALYSEMECHANISMUS

Obwohl die humanen PRMTs in ihrer Länge deutlich variieren, enthalten alle die 310 Aminosäuren lange, zweigeteilte zentrale Domäne bestehend aus einer stark konservierten Region (gelb) und einer weniger stark konservierten Region (grün), die zusammen das katalytische Zentrum bilden (siehe Abbildung 2). Zusätzlich zur konservierten zentralen Domäne besitzen die einzelnen PRMTs unterschiedliche N- und C-terminale Domänen.

Die bisher aufgeklärten Kristallstrukturen für Hmt1, PRMT1 und PRMT3 zeigen, dass die zentrale Domäne der PRMTs in drei funktionelle Bereiche eingeteilt werden kann. Der N-terminale Bereich beinhaltet die für AdoMet-abhängige Methyltransferasen typischen Signaturmotife I, postI, II, III und den *double E-loop* (EE). Dieser Bereich weist eine typische Rossmann-Faltung und zwei α -Helices auf und bildet die Bindungsdomäne für den Methylgruppendonor S-Adenosylmethionin (AdoMet-Bindungsdomäne). Die weniger konservierte C-terminale Region bildet eine β -Fass-Struktur aus, die sich auf die AdoMet-Bindungsdomäne zurückfaltet. Der dabei entstehende Spalt fungiert als Substratbindungsstelle und beinhaltet das aktive Zentrum, welches durch den *double E loop* der N-terminalen Region und die THW-Schleife in der C-terminalen Region gebildet wird (siehe Abbildung 2 A). Außerdem wurde in den Kristallstrukturstudien eine Dimerisierungsdomäne identifiziert, die, wie sich in weiteren Untersuchungen herausstellte, für die katalytische Aktivität der PRMTs notwendig ist.

A



B

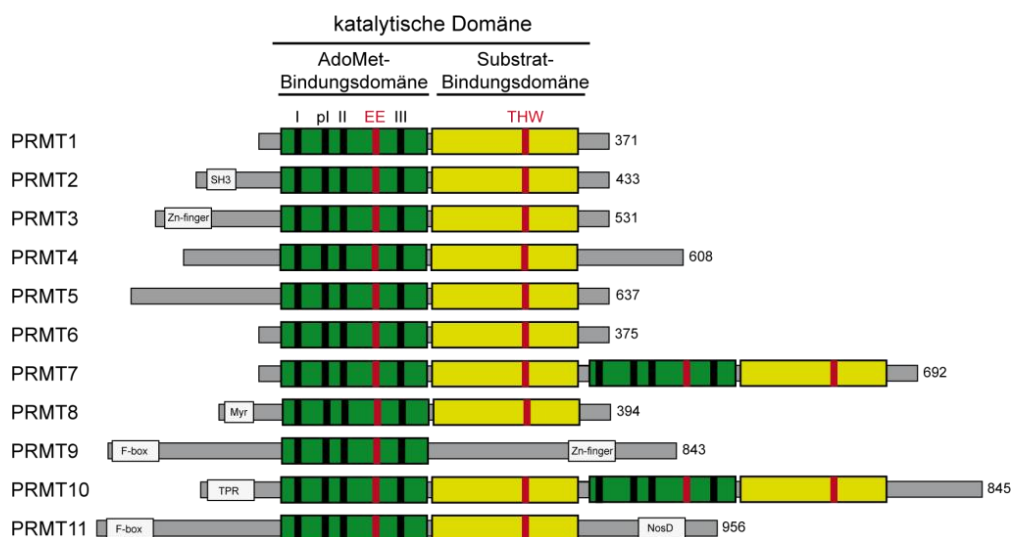


Abbildung 2: Struktur der Protein-Arginin-Methyltransferasen (PRMTs).

(A) Kristallstruktur von monomerem PRMT1 im ternären Komplex mit dem Substrat und S-Adenosylhomocystein (AdoHcy). Die AdoMet-Bindungsdomäne ist in *grün*, die Substrat-Bindungsdomäne in *gelb* und der Dimerisierungsarm in *blau* dargestellt. Der *double E-loop* und der *THW-loop* sind markiert. Aus (Zhang and Cheng 2003). (B) Die längsten Isoformen der verschiedenen PRMTs sind mit ihrer Länge in Aminosäuren dargestellt. Zusätzliche Domänen sind in *hellgrau* gezeigt (modifiziert nach (Pal and Sif 2007)).

Die Dimethylierung von Argininen verläuft über monomethyliertes ω - N^G -Arginin (MMA) als Zwischenprodukt und resultiert, in Abhängigkeit vom Typ der PRMT, entweder in symmetrisch (SDMA) oder asymmetrisch (ADMA) dimethyliertem ω - N^G , N^G -Arginin. Dabei wird die Methylgruppe von S-Adenosylmethionin (AdoMet) unter Bildung von S-Adenosylhomocystein (AdoHcy) als Reaktionsprodukt übertragen. Aufgrund der PRMT-Struktur und der Fähigkeit zur Dimerisierung wurde ein prozessiver Katalysemechanismus angenommen. Allerdings konnten kinetische Studien von PRMT6, PRMT1 und PRMT3 zeigen, dass die Argininmethylierung durch die untersuchten PRMTs in distributiver Weise abläuft (Kolbel *et al.* 2009). Dies wird weiterhin durch Beobachtungen unterstützt, dass PRMT6 die Dimethylierungsreaktion gegenüber der Monomethylierung bevorzugt katalysiert (Hyllus *et al.* 2007; Lakowski and Frankel 2008).

1.2.3 REGULATION DER ARGININMETHYLIERUNG

Obwohl erst angefangen wurde, die Regulationsmechanismen der Argininmethylierung zu erforschen, gibt es bereits einige Beobachtungen, die auf vielseitige Mechanismen hindeuten. Erstens könnte die enzymatische Aktivität der PRMTs durch posttranslationale Modifikationen reguliert werden. Hierzu wurde von zwei Gruppen entdeckt, dass die Phosphorylierung von PRMT4 an zwei unterschiedlichen Serinresten (S217 und S228) während der Mitose die Bindung an AdoMet verhindert und darüber die katalytische Aktivität inhibiert (Higashimoto *et al.* 2007; Feng *et al.* 2009). Zudem verursachte die S217 Phosphorylierung die cytoplasmatische Lokalisation von PRMT4 (Feng *et al.* 2009). In Folge der S217 oder S228 Phosphorylierung war die Transaktivierung der Östrogen-abhängigen Transkription inhibiert (Higashimoto *et al.* 2007). Allerdings beruht dies vermutlich auf zwei unterschiedlichen Mechanismen. Während die S288 Phosphorylierung die Dimerisierung von PRMT4 verhindert, beeinflusst die S217 Phosphorylierung weder die Dimerisierung noch die Interaktion mit anderen Coaktivatoren (Feng *et al.* 2009). Die verantwortliche Kinase wurde bisher noch nicht identifiziert. Außerdem wurde für PRMT6 Automethylierungsaktivität nachgewiesen, deren Funktion noch nicht verstanden ist (Frankel *et al.* 2002).

Zweitens können PRMTs durch direkte Protein-Protein-Interaktionen reguliert werden. Die katalytische Aktivität von PRMT1 gegenüber bestimmten Substraten wird durch Interaktion mit den verwandten Proteinen BTG1 und TIS21/BTG2 verstärkt (Lin *et al.* 1996). Bei der hämatopoetischen Differenzierung von Zellen der myeloiden Linie bewirkt die Interaktion mit BTG2 eine Verstärkung der Methyltransferaseaktivität von PRMT1 gegenüber H4R3 (Passeri *et al.* 2006). Die Substratspezifität von PRMT4 wird durch Assoziation mit dem NUMAC (*nucleosomal methylation activator complex*)-Komplex verändert. In Assoziation mit NUMAC ist PRMT4 in der Lage nukleosomales Histon H3 zu methylieren, wohingegen rekombinantes PRMT4 präferentiell freies Histon H3 methyliert (Xu *et al.* 2004).

Drittens wurde die Inhibition der katalytischen Aktivität von PRMT6 über den Mechanismus der Endprodukt-Hemmung vorgeschlagen, da PRMT6 das Reaktionsprodukt AdoHcy mit höherer Affinität bindet als den Methylgruppendonor AdoMet. In Zellen mit niedrigem Methylierungspotential (Verhältnis AdoMet:AdoHcy) wird die katalytische Aktivität von PRMT6 gehemmt und vermutlich durch spezifische Cofaktoren reguliert. Im Gegensatz dazu bindet PRMT1 AdoMet und AdoHcy mit ähnlicher Affinität (Thomas *et al.* 2010).

Letztendlich kann Argininmethylierung auch durch Entfernung der Modifikation reguliert werden. Dies kann einerseits durch Histon austausch oder Demethylierung realisiert werden (Zhang and Reinberg 2001; Pahlich *et al.* 2006; Lee and Stallcup 2009; Ng *et al.* 2009; Smith and Denu 2009). Zunächst wurde gezeigt, dass monomethylierte und unmodifizierte Arginine in einer Deiminationsreaktion durch die Protein-Arginin-Deiminase 4 (PAD4) zu Citrullin umgewandelt werden können (Cuthbert *et al.* 2004; Wang *et al.* 2004). PAD4 kann jedoch aufgrund sterischer Gründe dimethylierte Arginine nicht in Citrullin umwandeln (Holbert and Marmorstein 2005). Kürzlich wurde die Existenz der Arginin-Demethylase JMJD6 für H3R2 und H4R3 beschrieben. Im Gegensatz zu Deimination durch PAD4 wird die Demethylierung von mono- und dimethylierten Argininen durch JMJD6 über eine Hydroxylierungsreaktion realisiert (Chang *et al.* 2007). Allerdings wird die Rolle von JMJD6 als Arginin-Demethylase in der Literatur kontrovers diskutiert, da JMJD6 als Lysin-Hydroxylase bei der Regulation von alternativem Splicing charakterisiert wurde und die Arginin-Demethylaseaktivität von anderen Gruppen nicht nachgewiesen werden konnte (Webby *et al.* 2009; Hahn *et al.* 2010).

1.2.4 SUBSTRATE UND FUNKTION VON PRMT6

PRMT6 wurde 2002 durch Sequenzhomologievergleiche im humanen Genom gefunden und als nukleär lokalisiertes Enzym charakterisiert. Aufgrund der katalytischen Aktivität wurde PRMT6 dem TypI zugeordnet und katalysiert die asymmetrische Dimethylierung von ω -N^G-Argininen in distributiver Weise (Frankel *et al.* 2002; Lakowski and Frankel 2008). In den folgenden Jahren wurde begonnen die Funktion von PRMT6 zu entschlüsseln. Durch die Entdeckung PRMT6-spezifischer Substrate wie HMGA1a/b (*high-mobility group protein*) (Miranda *et al.* 2005; Sgarra *et al.* 2006), DNA-Polymerase β (El-Andaloussi *et al.* 2006) und HIV Tat Protein (Boulanger *et al.* 2005; Invernizzi *et al.* 2006; Invernizzi *et al.* 2007; Xie *et al.* 2007) wurde PRMT6 mit Transkriptionskontrolle, DNA-Reparatur und der Regulation viraler Transkription in Verbindung gebracht. Des Weiteren wurde PRMT6 als Coaktivator der Steroidhormon-abhängigen Transkription identifiziert und reguliert alternatives Splicing hormonunabhängig (Harrison *et al.* 2010). Obwohl PRMT6 *in vitro* Histon-Methyltransferaseaktivität aufweist, wurde die *in vivo* Relevanz dieser Aktivität bisher noch nicht untersucht. Die *in vitro* Studien zur Histon-Methyltransferaseaktivität von rekombinantem GST-PRMT6 in unserer Gruppe führten zur Identifikation der genauen

Methylierungsstellen in den N-Termini der Histone H2A, H3 und H4. Mittels *in vitro* Methylierungsassay und anschließender Edman-Sequenzierung wurden Arginin 2 (R2) in Histon H3 und Arginin 3 (R3) in den Histonen H4 und H2A als Substrate für PRMT6 identifiziert. Die H3R2 Methylierung durch GST-PRMT6 *in vitro* wurde mittels massenspektrometrischer Analyse verifiziert. Erste Hinweise deuten darauf hin, dass PRMT6 zusammen mit anderen PRMTs Seneszenz und Proliferation von humanen diploiden Lungenfibroblastenzellen reguliert, da sowohl die PRMT Proteinmengen als auch die globale asymmetrische Dimethylierung von Argininen mit Beginn der Seneszenz vermindert werden (Lim *et al.* 2008). Außerdem vermuten kürzlich publizierte Daten eine Rolle von PRMT6 in der Tumorgenese. Durch Repression des natürlichen Angiogenesehemmers *Thrombospondin 1* (TSP-1) könnte PRMT6 zum ungehinderten Tumorwachstum beitragen. Zudem konnte gezeigt werden, dass die Depletion von PRMT6 zu verringerter Migration und Invasion der Zellen führt (Michaud-Levesque and Richard 2009). In Übereinstimmung damit ist PRMT6 in einigen Tumoren überexprimiert und es wird vermutet, dass PRMT6 durch Regulation von RNA-Prozessierung, DNA-Replikation und des G1/S Überganges zur Tumorgenese beiträgt (Yoshimatsu *et al.* 2010).

1.3 LYSINMETHYLIERUNG VON HISTONEN

Ähnlich wie die bereits beschriebene Argininmethylierung kann die Lysinmethylierung von Histonen in Abhängigkeit von der Position und dem Methylierungsgrad (mono-, di-, tri-) entweder aktivierend oder reprimierend auf die Transkription spezifischer Gene wirken. Während H3K4me3 mit aktiver Transkription einhergeht, sind reprimierte Gene mit H3K27me3 markiert (Martin and Zhang 2005). Eine Ausnahme bildet hier das Modifikationsmuster entwicklungsrelevanter Gene in embryonalen Stammzellen, die durch das gleichzeitige Auftreten von H3K4me3 und H3K27me3 gekennzeichnet sind und als bivalente Gene bezeichnet werden. Mechanistisch markiert die Kombination beider Modifikationen reprimierte Gene, die im Verlauf der Differenzierung aktiviert werden sollen und im Zuge dessen H3K27me3 verlieren (Bernstein *et al.* 2006a).

Die Lysinmethylierung wird von einer Enzymfamilie der Histon-Methyltransferasen katalysiert, die eine konservierte SET-Domäne aufweisen. Die SET-Domäne wurde als homologe C-terminale Region der drei Proteine Su(var)3-9, Enhancer of zeste E(z) und Trithorax (Trx) entdeckt (Tschiersch *et al.* 1994). Die gegensätzliche Wirkung der Histonmodifikationen H3K4me3 und H3K27me3, die durch die Trithorax Gruppen (trxG) Proteine bzw. Polycomb Gruppen (PcG) Proteine katalysiert werden, wurde zunächst in *Drosophila melanogaster* bei der Transkriptionskontrolle von *Hox* Genen beobachtet. TrxG und PcG Gene wurden auch in Wirbeltieren identifiziert und übernehmen unter anderem Funktionen bei Proliferation (Martinez and Cavalli 2006), Stammzellidentität und Krebs (Rajasekhar and Begemann 2007), Imprinting und X-Inaktivierung (Heard 2005) sowie zellulärer

Seneszenz (Guney and Sedivy 2006; Bracken *et al.* 2007; Dietrich *et al.* 2007). Während in *Drosophila* PcG und trxG Proteine über Transkriptionsfaktoren an sogenannte PREs (*polycomb responsive elements*) bzw. TREs (*trithorax responsive elements*) rekrutiert werden, sind solche Elemente in Säugern nicht bekannt (Ringrose and Paro 2007).

Die H3K4 Trimethylierung korreliert in vielen eukaryotischen Spezies mit transkriptioneller Aktivität und tritt in Übereinstimmung damit hauptsächlich am Transkriptionsstart (TSS) aktiver Gene auf, wie genomweite Untersuchungen zur Verteilung von Histonmodifikationen belegen (Barski *et al.* 2007; Mikkelsen *et al.* 2007; Ruthenburg *et al.* 2007). Allerdings ist bisher nicht vollständig verstanden, wie die transkriptionelle Aktivierung durch die H3K4 Trimethylierung mechanistisch realisiert wird. Es wurden jedoch verschiedene Proteine identifiziert, die spezifisch an H3K4me3 binden und die Rekrutierung von Aktivator- oder Repressorkomplexen nach sich ziehen, die für die transkriptionelle Aktivität der Gene verantwortlich sind. Dabei wurde herausgefunden, dass H3K4me3 als Bindungsplattform für den basalen Transkriptionsfaktor TFIID fungiert, und dass die Interaktion durch den PHD-finger der TAF3 Untereinheit vermittelt wird. Diese Daten beschreiben eine direkte Verbindung zwischen aktivem Chromatin und der basalen Transkriptionsmaschinerie und erweitern damit das Verständnis, wie die H3K4 Trimethylierung zur Aktivierung der Transkription über TFIID beiträgt (Vermeulen *et al.* 2007).

Als erste beschriebene H3K4-Methyltransferase wurde Set1 in Hefe (*Saccharomyces cerevisiae*) in einem Komplex, der als COMPASS (*Complex Proteins Associated with Set1*) bezeichnet wird, identifiziert (Miller *et al.* 2001). Später wurde gezeigt, dass die Säugerhomologe hSet1A und B sowie MLL1-4 zusammen mit anderen Proteinen in COMPASS-ähnlichen Komplexen vorliegen und H3K4 methylieren können (Hughes *et al.* 2004; Shilatifard 2008; Eissenberg and Shilatifard 2010). Den MLL und SET1 Komplexen in Säugern sind die drei Komponenten RBBP5, Ash2L und WDR5 gemeinsam, die für die Stabilität des Komplexes und die katalytische Aktivität *in vitro* und *in vivo* benötigt werden (Milne *et al.* 2002; Nakamura *et al.* 2002; Wysocka *et al.* 2003; Hughes *et al.* 2004; Dou *et al.* 2006). Die Untereinheit WDR5 bindet die ersten drei Aminosäuren der N-terminalen Region von Histon H3 und präsentiert damit das Substrat (H3K4) der MLL1-Methyltransferase. Außerdem stabilisiert WDR5 die WDR5-Ash2L-RBBP5 Interaktion (Dou *et al.* 2006; Ruthenburg *et al.* 2006; Steward *et al.* 2006; Southall *et al.* 2009). Die Interaktion zwischen MLL1 und der Histon-Acetyltransferase (HAT) MOF bewirkt, zusätzlich zur H3K4 Trimethylierung, die Hyperacetylierung von H4K16, die wiederum zur Genaktivierung beiträgt (Dou *et al.* 2005). Außerdem wurde die H3K27me2/3-spezifische Demethylase UTX im Komplex mit MLL3/4 gefunden. Die Rekrutierung von MLL/UTX bewirkt die Demethylierung von H3K27, die von der H3K4 Methylierung begleitet wird und zur Aktivierung von *HOX* Genen und anderen Zielgenen führt (Agger *et al.* 2007; Lee *et al.* 2007). Die Entdeckung von H3K4-spezifischen Demethylasen belegt, dass auch die H3K4 Methylierung der dynamischen Regulation, durch das Wechselspiel von Methyltransferasen und Demethylasen, unterworfen ist (Klose and Zhang 2007).

EINLEITUNG

Die Demethylierung von H3K4me_{2/3} wird von JmjC-Domänen Proteinen der JARID1 Familie (RBP2/JARID1A, PLU-1/JARID1B, SMCX/JARIDC, SMCY/JARID1D) durch eine Fe(II)/ α -Ketoglutarat-abhängige Hydroxylierung katalysiert (Tsukada *et al.* 2006).

Transkriptionelle Repression ist u.a. durch das Auftreten von H3K27me₃ gekennzeichnet und wird durch das Zusammenspiel von zwei unterschiedlichen Multiproteinkomplexen Polycomb Repressor Komplex 1 und 2 (PRC1 und PRC2) aufrecht erhalten (Kerppola 2009; Schuettengruber and Cavalli 2009). Der PRC2 Komplex beinhaltet die katalytisch aktive Untereinheit EZH2/EZH1 (*enhancer of zeste*), die mit SUZ12 (*suppressor of zeste*) und EED1-4 (*embryonic ectoderm development*) assoziiert ist. In Säugern existieren mehrere PRC2 Komplexe, die unterschiedliche EED Isoformen enthalten (PRC2 = EED1, PRC3 = EED3/4, PRC4 = EED2). Des Weiteren existieren PRC2 Komplexe im Säugersystem in denen die Isoform EZH1 auftritt. Allerdings weist dieser Komplex *in vitro* nur eine geringe katalytische Aktivität auf. In EZH2-defizienten embryonalen Stammzellen (ES) ist der PRC2 (EZH1) Komplex für den Erhalt der H3K27 Trimethylierung verantwortlich und reguliert darüber hinaus Genexpression unabhängig von H3K27me₃ (Margueron *et al.* 2008; Shen *et al.* 2008). Zusätzlich wurden in den letzten Jahren einige Proteine identifiziert, die mit dem PRC2 Komplex biochemisch und funktionell interagieren. Unter anderem beeinflusst die Interaktionen von PHF1 die katalytische Aktivität von EZH2 positiv, während vermutet wird, dass die Assoziation mit den Histonbindungsproteinen RbAp46 und RbAp48 zur Chromatinrekrutierung beiträgt (Kuzmichev *et al.* 2002; Cao *et al.* 2008; Sarma *et al.* 2008). In Übereinstimmung mit der beobachteten Wechselwirkung zwischen dem MLL-Methyltransferase Komplex und der H3K27me₃-spezifischen Demethylase UTX bei der Aktivierung von *HOX* Genen während der Differenzierung (Agger *et al.* 2007; Lee *et al.* 2007) wurde gefunden, dass PRC2 mit der H3K4me_{2/3}-spezifischen Demethylase RBP2 interagiert, die zur Regulation von PcG-Zielgenen beiträgt (Pasini *et al.* 2008).

Der PRC1 Komplex setzt sich aus den Wirbeltierorthologen von Posterior Sex Combs PSC (BMI1, MEL18), Sex Combs Extra SCE (RING1A/B), Polycomb Pc (CBX2, 4, 6, 7, 8) und Polyhomeotic Ph (HPH1-3) zusammen (Levine *et al.* 2002). Eine variable Zusammensetzung des PRC1 Komplexes aus verschiedenen Homologen wurde in Abhängigkeit vom Zelltyp und dem Differenzierungszustand der Zellen entdeckt (Otte and Kwaks 2003; Kerppola 2009). Die Existenz der H3K27me_{2/3}-spezifischen Demethylasen JMJD3 und UTX, die zur Familie der JmjC-Domänen Proteine gehören, gewährleisten die Reversibilität der H3K27 Methylierung (Hong *et al.* 2007; Swigut and Wysocka 2007).

Das derzeitige Modell zum Mechanismus der PcG-vermittelten Repression geht davon aus, dass als initialer Schritt die H3K27 Trimethylierung durch EZH2 im PRC2 Komplex katalysiert wird und sich die Rekrutierung und Bindung von PRC1 über die Chromodomänen Proteine (CBX2, 4, 6, 7, 8) an H3K27me₃ anschließt. Die Ubiquitinierung von H2A an Lysin 119 (H2AK119ub1) (Stock *et al.* 2007) durch die E3-Ligaseaktivität der Untereinheiten RING1B/BMI1 beeinflusst die transkriptionelle Elongation negativ und trägt damit zur Aufrechterhaltung des repressiven Zustandes bei

(Buchwald *et al.* 2006; Schuettengruber and Cavalli 2009; Vidal 2009). Die Tatsache, dass RBP2 mit H3K4me3-angereicherten Promotoren und, dass UTX mit H3K27me3-angereicherten Promotoren assoziiert ist, lässt vermuten, dass deren enzymatische Aktivitäten nicht zur vollständigen Entfernung der Modifikationen dienen, sondern vielmehr für die Feinabstimmung der transkriptionellen Regulation von Zielgenen benötigt wird (Bracken *et al.* 2007; Pasini *et al.* 2008). Diese Erkenntnisse bezüglich der funktionellen und biochemischen Assoziation von Methyltransferasen und Demethylasen verdeutlicht die Komplexität der Regulation von entwicklungs- und differenzierungsrelevanten Genen.

1.4 REGULATION DER *HOXA* GENE WÄHREND DER DIFFERENZIERUNG

Epigenetik spielt eine bedeutende Rolle bei der Regulation von Entwicklung und zellulärer Differenzierung durch die Kontrolle spezifischer Gene. Darunter befindet sich die Familie der *HOX* Gene, die Embryonalentwicklung und Stammzellendifferenzierung regulieren und deren Fehlexpression unter anderem zur Tumorentstehung beiträgt (Barber and Rastegar 2010; Shah and Sukumar 2010). Des Weiteren sind *HOX* Gene für die Segmentierung des Rautenhirns bei der neuronalen Differenzierung wichtig (Narita and Rijli 2009). Die 39 humanen *HOX* Gene sind in vier Clustern A - D, die jeweils neun bis elf Gene enthalten, auf verschiedenen Chromosomen (7p15, 17q21.2, 12q13 und 2q31) angeordnet und kodieren für hoch konservierte Transkriptionsfaktoren, die die zelluläre und räumliche Identität von Zellen entlang der anteriorposterioren Körperachse während der Entwicklung determinieren. Die Expression der *HOX* Gene unterliegt einer strengen, räumlich und zeitlich genau bestimmten Regulation. Außerdem spiegelt sich das Expressionsmuster der *HOX* Gene in deren Lokalisation auf dem Chromosom wieder. Dabei werden die am 3'-Ende lokalisierten Gene eines *HOX* Clusters früher aktiviert als weiter 5'-befindliche Gene, ein Phänomen, das als Kollinearität bezeichnet wird (Kmita and Duboule 2003). Die kollineare Expression der *HOX* Gene im Rautenhirn wird teilweise durch Retinsäure (ATRA), ein Vitamin A Stoffwechselprodukt, kontrolliert (Narita and Rijli 2009). Retinsäure responsive Elemente (RARE = *Retinoic Acid Responsive Element*) wurden unter anderem in den regulatorischen Regionen von *Hoxa1* und *Hoxb1* charakterisiert (Dupe *et al.* 1997). In Abwesenheit von Retinsäure sind Retinsäurerezeptor (RAR)/ Retinsäure-X-Rezeptor (RXR) Heterodimere zusammen mit Corepressoren an RAREs assoziiert. Die Bindung von Retinsäure führt zur Konformationsänderung der RAR/RXR Heterodimere, was wiederum zur Freilassung der Corepressoren und zur Rekrutierung von Coaktivatoren führt (Gillespie and Gudas 2007).

Als Modellsystem zur Untersuchung von Differenzierungsprozessen in Säugern wird die Teratokarzinomzelllinie NT2/D1 eingesetzt. Die Retinsäurebehandlung dieser Zellen, die undifferenzierte pluripotente Zellen repräsentieren, induziert die Differenzierung zu Zellen mit neuronalem Phänotyp (Andrews 1984; Lee and Andrews 1986; Pleasure and Lee 1993; Andrews 1998). Die ATRA-induzierte Differenzierung von NT2/D1 Zellen wird durch die spezifische

Aktivierung der am 3'-Ende lokalisierten Gene (*HOXA1-HOXA5*) und Repression der 5'-lokalisierten Gene (*HOXA9-HOXA13*) des *HOXA* Locus begleitet. Die komplexe Regulation der *HOXA* Genexpression und deren Erhalt während der Entwicklung und Differenzierung lässt sich auf das konzertierte Wechselspiel zwischen den repressiv wirkenden histonmodifizierenden Komplexen PRC1 und PRC2 bzw. dem aktivierenden H3K4-Methyltransferase Komplex zurückführen. Zusätzlich tragen Lysin-Demethylasen, DNA-Methyltransferasen und das Auftreten der Histonvariante macroH2A1/2 zur Regulation der Genexpression bei (Guenther *et al.* 2005; Bracken *et al.* 2006; Agger *et al.* 2007; Buschbeck *et al.* 2009; Barber and Rastegar 2010).

1.5 ZELLULÄRE SENESZENZ UND DIE REGULATION VON *p16/INK4A*

Zelluläre Seneszenz wurde zuerst 1961 beschrieben als Hayflick und Moorhead entdeckten, dass normale humane Fibroblasten in Kultur eine begrenzte Teilungsfähigkeit aufweisen und nach einiger Zeit den Zustand eines permanenten Proliferationsarrestes erreichen, der als replikative Seneszenz bezeichnet wird (Hayflick and Moorhead 1961; Hayflick 1965). Seneszente Zellen arretieren in der G1-Phase des Zellzyklus, bleiben metabolisch aktiv und können durch mitogene Stimuli nicht mehr in den Zellzyklus eintreten. Außerdem weisen seneszente Zellen eine große, flache Zellmorphologie, Seneszenz-assoziierte β -Galaktosidase Aktivität und Resistenz gegenüber Apoptose auf. Einige seneszente Zellen können anhand der Ausbildung Seneszenz-assoziiierter heterochromatischer Foci (SAHFs-*senescence-associated heterochromatic foci*) oder Seneszenz-assoziiierter DNA-Schaden Foci (SDFs-*senescence-associated DNA damage foci*) identifiziert werden (Campisi and d'Adda di Fagagna 2007). In Abhängigkeit von der Ursache, die zur Ausbildung von Seneszenz führt, wird zwischen replikativer (intrinsisch, telomerabhängig) Seneszenz und stressinduzierter (extrinsisch, telomerunabhängig) Seneszenz unterschieden. Die Ausbildung eines Seneszenz-ähnlichen Phänotyps kann auf vielfältige Stimuli, wie die Überexpression von Onkogenen, oxidativen Stress, verschiedene Arten von DNA-Schaden oder *in vitro* Kulturbedingen zurückgeführt werden (Campisi and d'Adda di Fagagna 2007; Zhang 2007).

Eine weiteres Merkmal zellulärer Seneszenz ist u.a. die veränderte Genexpression von Zellzyklusregulatoren (Zhang *et al.* 2003a; Yoon *et al.* 2004). Seneszenz setzt dafür die Aktivierung der Tumorsuppressorproteine pRb und p53 sowie die Expression von *p16/INK4A* und *CDKN1A* (p21/CIP1) voraus. Dabei wird durch die Stabilisierung von p53 die Expression von *CDKN1A* (p21/CIP1) aktiviert, das durch Hemmung Cyclin-abhängiger Kinasen die Inaktivierung von pRb und damit die Transkription E2F-abhängiger Zielgene verhindert (Narita *et al.* 2003). Zusätzlich ist in vielen seneszenten Zellen die Expression von *p16/INK4A* erhöht, das ebenfalls dazu beiträgt pRb im aktiven, hypophosphorylierten Zustand zu halten (Stein *et al.* 1999; Itahana *et al.* 2003). In humanen Zellen verläuft die telomerabhängige Seneszenz im Allgemeinen über die Aktivierung des

p53-p21-pRb Signalweges ab, während bei der stressinduzierten Seneszenz sowohl der p53-p21-pRb als auch der p16-pRb Signalweg beteiligt ist (siehe Abbildung 3). In Abhängigkeit von der Zelllinie, der Art des Stresses und den Kulturbedingungen tragen die Signalwege entweder parallel oder einzeln und in unterschiedlichem Maße stark zur Ausbildung des seneszenten Phänotyps bei (Beausejour *et al.* 2003; Herbig *et al.* 2004; Itahana *et al.* 2004; Dimri 2005).

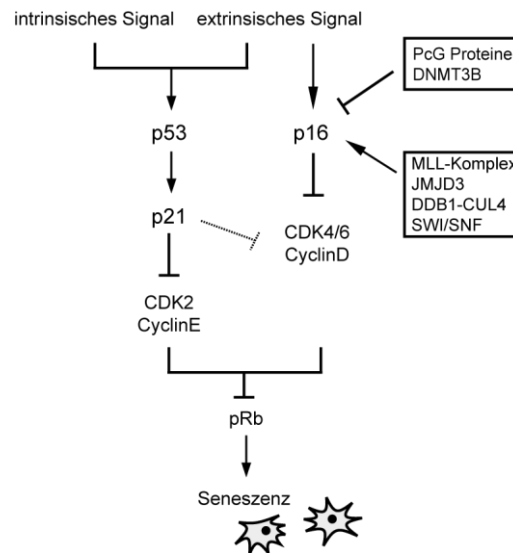


Abbildung 3: Signalwege zur Aktivierung replikativer und stressinduzierter Seneszenz.

Untersuchungen zum mechanistischen Verständnis der transkriptionellen Regulation von *p16/INK4A* führten zur Identifikation mehrerer Proteine, die entweder direkt oder indirekt an der Regulation von *p16/INK4A* beteiligt sind (Gil and Peters 2006). In proliferierenden humanen diploiden Fibroblasten ist *p16/INK4A* durch die direkte Bindung von PcG Proteinen und die Anreicherung der H3K27 Trimethylierung reprimiert. Die Exposition verschiedener Arten von Stress führt zur Rekrutierung des MLL1-Methyltransferase Komplexes, der H3K27me2/3-spezifischen Demethylase JMJD3 und SWI/SNF, deren Aktivitäten Veränderungen des Histonmodifikationsmusters zur Folge haben und die transkriptionelle Aktivierung von *p16/INK4A* herbeiführen (Gil and Peters 2006; Bracken *et al.* 2007; Kotake *et al.* 2007; Agger *et al.* 2009; Agherbi *et al.* 2009). Kürzlich wurden weitere Proteine mit der Aktivierung von *p16/INK4A* in Verbindung gebracht, darunter die Ubiquitin-spezifischen Proteasen 7 und 11 (USP7, USP11) (Maertens *et al.* 2010) sowie die E3-Ligaseaktivität von DDB1-CUL4 (Kotake *et al.* 2009), deren genaue Funktion bisher nicht bekannt ist. Außerdem wurde beobachtet, dass die Expression von Protein-Arginin-Methyltransferasen (PRMTs) während replikativer und stressinduzierter Seneszenz abnimmt und in Übereinstimmung damit die asymmetrische Dimethylierung global herunterreguliert wird (Lim *et al.* 2008). Dies führt zu der Annahme, dass PRMTs durch bisher ungeklärte Mechanismen auf die Regulation von Proliferation und Seneszenz einwirken könnten.

1.6 ZIELSETZUNG

Da in unserem Labor die Histon-Methyltransferaseaktivität von rekombinantem GST-PRMT6 *in vitro* entdeckt und die genauen Methylierungsstellen in den Histonen H3, H4 und H2A identifiziert wurden, sollte im Rahmen dieser Arbeit das Auftreten der H3R2 Dimethylierung zunächst *in vivo* nachgewiesen werden.

Welche Bedeutung die PRMT6-vermittelte H3R2 Dimethylierung *in vivo* innehält, und ob und in welcher Weise diese mit den Nachbar-Modifikationen H3K4me3 und H3K27me3 steht, stand dann im Mittelpunkt der weiteren Untersuchungen dieser Arbeit.

Hierzu wurde zunächst die Frage nach einem potentiellen Antagonismus zwischen H3R2me2 und H3K4me3 bearbeitet. Diesbezüglich sollte analysiert werden, ob PRMT6 die Expression H3K4me3-regulierter Gene beeinflusst. Mittels Chromatin-Immunpräzipitationsanalysen sollte im Anschluss einerseits untersucht werden, ob PRMT6 die identifizierten Zielgene direkt auf Chromatinebene reguliert. Andererseits sollten diese Experimente Aufschluss über den vorliegenden Mechanismus der transkriptionellen Repression durch PRMT6 und des R2me2 - K4me3 Antagonismus geben. Die biologische Relevanz der PRMT6-vermittelten H3R2 Dimethylierung und des Antagonismus zwischen H3R2me2 und H3K4me3 sollte anhand der neuronalen Differenzierung von NT2/D1 Zellen aufgedeckt werden.

Da die katalytische Aktivität von GST-PRMT6 *in vitro* durch eine vorliegende H3K27 Trimethylierung verstärkt wurde, wie dieser Arbeit vorausgehende Experimente zeigen, sollte im Rahmen dieser Arbeit die Frage nach der Existenz und Funktion einer Wechselwirkung zwischen PRMT6 und H3K27me3 geklärt werden. Dafür wurde zunächst analysiert, ob PRMT6 mit Komponenten der Polycomb Repressor Komplexe PRC1 und PRC2 interagieren kann. In weiterführenden Experimenten sollte herausgefunden werden, ob PRMT6 verschiedene zelluläre Prozesse, wie Differenzierung, Proliferation und Seneszenz in ähnlicher Weise wie die Polycomb Gruppen (PcG) Proteine und in Kooperation mit diesen reguliert. Letztlich sollte überprüft werden, ob PRMT6 ähnlich wie PcG Proteine durch die direkte Regulation spezifischer Zielgene eine Rolle bei der Proliferation von Tumorzellen spielt.

Schließlich sollten in einem unvoreingenommenen Versuchsansatz bisher unbekannte Interaktionspartner von PRMT6 ausfindig gemacht werden. Dazu sollte eine 2-Schritt-Aufreinigungsstrategie von TAP (*Tandem Affinity Purification*)-markiertem PRMT6 etabliert und durchgeführt werden. Die coaufgereinigten Interaktionspartner sollten mittels massenspektrometrischer Analyse identifiziert werden. Diese sollten dann als Grundlage für weiterführende funktionelle Untersuchungen von PRMT6 dienen.

2 MATERIALIEN

2.1 BAKTERIENSTÄMME UND MEDIEN

BL21 DE3: *Escherichia coli* Stamm zur Expression rekombinanter Fusionsproteine

DH5 α : *Escherichia coli* Stamm zur Amplifikation von Plasmid-DNA

LB-Medium	1 % (w/v) Baktotrypton 0,5 % (w/v) Hefeextrakt 177 mM NaCl, pH 7,0
LB-Agar	1,5 % (w/v) Agar in LB-Medium
Glukoselösung	20 % (w/v)
Ampicillin	Endkonzentration 50 μ g/ml
Kanamycin	Endkonzentration 25 μ g/ml

2.2 ZELLINIEN, MEDIEN UND ANTIBIOTIKA

2.2.1 ZELLINIEN

HEK293	humane embryonale Nierenzelllinie, adenoviral transformiert
MCF7	humane Brustadenokarzinomzelllinie
MCF7 TAP-LV	MCF7 stabil mit pNTAP-Leervektor (G-418-Resistenzgen) transfiziert, Klon #1 und #5, (Hyllus <i>et al.</i> 2007)
MCF7 TAP-PRMT6	MCF7 stabil mit pNTAP-PRMT6 (G-418-Resistenzgen) transfiziert, Klon #11 und #18, (Hyllus <i>et al.</i> 2007)
NT2/D1	humane embryonale Teratokarzinomzelllinie, Zellen mit embryonalem Phänotyp, die mit all- <i>trans</i> -Retinsäure in neuronale Zellen differenzieren, freundlicherweise von Kristian Helin zur Verfügung gestellt. (Lee and Andrews 1986)
Phoenix ^{Eco}	humane Verpackungszelllinie zur Herstellung <i>ekotropher</i> Retroviren (Grignani <i>et al.</i> 1998)

MATERIALIEN

Tig3-T	humane embryonale diploide Lungenfibroblastenzelllinie, immortalisiert durch hTERT (G-418-Resistenzgen) und stabil mit dem murinen <i>ekotrophen</i> Rezeptor (Hygromycin-Resistenzgen) transfiziert, freundlicherweise von Kristian Helin zur Verfügung gestellt.(Bracken <i>et al.</i> 2007; Dietrich <i>et al.</i> 2007)
U2OS	humane Osteosarkomazelllinie

2.2.2 MEDIEN UND ANTIBIOTIKA FÜR DIE VERWENDETEN ZELLINIEN

Dulbeccos Modified Eagles Medium (DMEM) mit 2 mM L-Glutamin, Phenolrot	Invitrogen
Fetales Kälberserum (FBS)	Invitrogen
Penicillin/ Streptomycin	Invitrogen

Die verwendeten Zelllinien wurden in DMEM, das mit 10 % (v/v) FBS und 1 % (v/v) Penicillin/ Streptomycin versetzt wurde, kultiviert. Die in Tabelle 1 angegebenen Konzentrationen für Antibiotika wurden dem Medium zur Selektion der Zelllinien nach Transfektion oder Infektion zugesetzt. Für die Selektion auf das Neomycin-Resistenzgen wurde das Neomycin-Analogon G-418 verwendet.

Tabelle 1: Antibiotikakonzentrationen zur Selektion nach Transfektion oder Infektion.

Zelllinie	Antibiotikum	Endkonzentration im Medium
MCF7	G-418	250 µg/ml
Tig3-T	G-418	500 µg/ml
	Hygromycin	100 µg/ml
	Puromycin	1 µg/ml

2.3 TRANSFEKTIONSREAGENZNIEN

Polyethylenimin (PEI) 0,1 % (v/v), Sigma

FuGENE HD, Roche

Oligofectamine™, Invitrogen

Lipofectamine™ RNAiMAX, Invitrogen

GeneJuice®, Novagen

2.4 OLIGONUKLEOTIDE

Die verwendeten Primer und shRNA-Oligonukleotide wurden von der Firma MWG-Biotech synthetisiert. SiRNA wurde von den Firmen Eurogentec und Dharmacon (Thermo Fisher Scientific) bezogen. Alle Oligonukleotide wurden für die Anwendung in humanen Zellen entworfen.

2.4.1 SEQUENZIERPRIMER

Sequenzierprimer für pSuper.retro.puro: 5'-pRS GGAAGCCTTGCTTTTG

Zum Sequenzieren anderer Plasmide wurden die entsprechenden Standardprimer verwendet.

2.4.2 RT-QPCR PRIMER (QUANTITATIVE ECHTZEIT-PCR)

Die in Tabelle 2 zusammengefassten Primer wurden mit Hilfe der Universal ProbeLibrary (Roche) entworfen. Wenn möglich wurden die Primer so gewählt, dass Intron-Exon-Grenzen überschritten werden um die Amplifikation genomischer DNA zu vermeiden.

Tabelle 2: Übersicht der verwendeten RT-qPCR Primersequenzen.

fwd = *forward* Primer, rev = *reverse* Primer, bp = Basenpaare.

Bezeichnung/ Gen	Amplifikat- länge	Sequenz 5' → 3'
<i>CBX8</i> (NM_020649)	101 bp	fwd: CTCGCAGCCTTTGAGGAA rev: GTTTTGGCCTTTGCCTTG
<i>CCNA2</i> (NM_001237.3)	514 bp	fwd: ATGAGACCCTGCATTTGGCTG rev: TTGAGGTAGGTCTGGTGAAGG
<i>CDKN1A</i> (NM_078467.1)	72 bp	fwd: GGCAGACCAGCATGACAGATTTTC rev: CGGATTAGGGCTTCCTCTTGG
<i>GAPDH</i> (NM_002046)	66 bp	fwd: AGCCACATCGCTCAGACAC rev: GCCCAATACGACCAA ATCC
<i>GOLPH3</i> (NM_022130.3)	73 bp	fwd: GCTGACCCTGATGGAGGA rev: GTCATTCCAAAATGATGTGTAACC
<i>HOXA1</i> (NM_153620.2)	76 bp	fwd: CAGCCCCTACGCGTTAAAT rev: GGAGAAGATGTCTCCGATGC
<i>HOXA10</i> (NM_018951.3)	61 bp	fwd: TTTCTTCAGTTTCATCCTGCGG rev: CCACCTCACGGACAGACAAGTG
<i>HOXA2</i> (NM_006735.3)	75 bp	fwd: TCTGGAGAGGGAAGGCTACA rev: TCGCCATTGTGTCCATTG
<i>HOXA5</i> (NM_019102.2)	114 bp	fwd: GCGCAAGCTGCACATAAG rev: CGGTTGAAGTGGAACCTCCTT
<i>HOXA6</i> (NM_024014.2)	122 bp	fwd: ATGCAGCGGATGAACTCC rev: AGGTAGCGGTTGAAGTGGA
<i>HOXA9</i> (NM_152739.3)	61 bp	fwd: AACTATGAAACCGCCATTGG rev: GGAAACCCAGATTCATCAAGG
<i>LDHA</i> (NM_005566.3)	93 bp	fwd: GCAGATTTGGCAGAGAGTATAATG rev: GACATCATCCTTTATTCCGTAAAGAC
<i>NUCLEOLIN</i> (NM_005381.2)	101 bp	fwd: AGCAATCAGGCTGGAGTTGC rev: CAGTGGTATCCTCAGACAGGCC

<i>ODC</i> (NM_002539.1)	72 bp	fwd: GCACATCCCAAAGCAAAGTT rev: CACACTGAGACGACAGACTGC
<i>p14ARF</i> (NM_058195.3)	66 bp	fwd: CTAAGGAGGAGCCAGCGTCT rev: CTGCCCATCATCATGACCT
<i>p15/INK4B</i> (NM_004936.3)	105 bp	fwd: GCGGGGACTAGTGGAGAAG rev: CTGCCCATCATCATGACCT
<i>p16/INK4A</i> (NM_000077.3)	100 bp	fwd: CCCCTTGCTGGAAAGATAC rev: AGCCCCTCCTCTTTCTTCCT
<i>PRMT6</i> (NM_018137)	86 bp	fwd: AGACACGGACGT TTCAGGAG rev: CCACTTTGTAGCGCAGCAG
<i>PTMA</i> (NM_002823.4)	77 bp	fwd: GCTCCGAAATCACCACCA rev: AGGGGCGTCTCTTCATT
<i>S14</i> (NM_001025070)	142 bp	fwd: GGCAGACCGAGATGA ATCCTCA rev: CAGGT CAGGGGTCTTGGTCC
<i>TERT</i> (NM_198253.2)	61 bp	fwd: GCCTTCAAGAGCCACGTC rev: CCACGAACTGTCGCATGT

2.4.3 QPCR PRIMER FÜR CHIP-ANALYSEN

Die in Tabelle 3 zusammengefassten Primer für Chromatin-Immunpräzipitationsanalysen (ChIP) wurden mit dem Programm Primer3 entworfen.

Tabelle 3: Übersicht der verwendeten qPCR Primersequenzen für ChIP-Analysen.

Die Primer sind mit der Amplifikatlänge, der Position relativ zur Transkriptionsstartseite (TSS) und der Bezeichnung der amplifizierten Region angegeben. fwd = *forward* Primer, rev = *reverse* Primer, kb = Kilobasenpaare, RARE = *Retinoic Acid Response Element*, ORF = *Open Reading Frame*.

Bezeichnung/ Gen	Amplifikat- länge	Position	Sequenz 5' → 3'
<i>HOXA1</i> (RARE)	268 bp	+3,0 kb	fwd: TCTTGCTTTGGCTCTGAAGTCT rev: GAGCTCAGATAAACTGCTGGGACT
<i>HOXA10</i> (TSS)	82 bp	+0,1 kb	fwd: CGCAAATTATCCCACAACAATGTC rev: CCCGAGCTGATGAGCGAGTC
<i>HOXA2</i> (5'-Bereich)	344 bp	+0,3 kb	fwd: CGGTCCCACATACGGCTGTA rev: CAGGCTGGGAATGGTCTGCT
<i>HOXA2</i> (Promoter)	138 bp	-0,3 kb	fwd: GAACTTATGTGGCTGGGACGCAG rev: GGACTGTTCGGGAAGACGCCT
<i>HOXA5</i> (Promoter)	194 bp	-0,1 kb	fwd: CTCCACCAACTCCCCTATTAGTG rev: GTGCGTCTATAGCACCCCTTGC
<i>HOXA9</i> (Promoter)	82 bp	-0,5 kb	fwd: CCTGTGTGGCTTCTGAAACA rev: CAAATCGCATTGTCGCTCTA
<i>p15/INK4B</i> (Promoter) #1	125 bp	-0,5 kb	fwd: GGCAGTGGTGAACATTCC rev: GCCCAAAGATGCTAGGAC
<i>p16/INK4A</i> (Promoter) #2	104 bp	-0,5 kb	fwd: AGGGGAAGGAGAGAGCAGTC rev: CTACCCCCTCAACCCTTGAT
<i>p16/INK4A</i> #3 (TSS)	100 bp	+0,1 kb	fwd: CCCCTTGCTGGAAAGATAC rev: AGCCCCTCCTCTTTCTTCCT
<i>p16/INK4A</i> #4 (ORF)	132 bp	+0,5 kb	fwd: TCAGGTAGCGCTTCGATTCT rev: GGCTCCTCATTCCTCTTCCT
<i>p16/INK4A</i> #5 (ORF)	98 bp	+1,0 kb	fwd: CCCTTCACTTTGGGAGATCA rev: CCCCCGGCTACTTTTTGTAT
<i>p16/INK4A</i> #6 (ORF)	139 bp	+1,5 kb	fwd: GGGGAAATGATGTTGGCTTA rev: AGGATGCTTAAACCCATTGA

2.4.4 OLIGONUKLEOTIDE FÜR SHRNA

Die DNA-Oligonukleotide zur Klonierung der shRNA-Vektoren wurden nach den Herstellerangaben des verwendeten Vektorsystem pSuper.retro.puro (OligoEngine) entworfen. Die Zielsequenzen entsprechen spezifischen, publizierten Sequenzen gegen die humane mRNA.

Tabelle 4: Übersicht der verwendeten 60-mer Oligonukleotide für shRNA-Anwendungen.

Die Oligos wurden mit einer BglII-Schnittstelle am 5'-Ende des sense Oligos (GATC) und mit einer HindIII-Schnittstelle am 5'-Ende des antisense Oligos (AGCT) entworfen.

Bezeichnung	Sequenz
shLuciferase (Krtl.) (sense)	5'-GATCCCCGATTATGTCCGGTTATGTATTCAA GAGATACATAACCGGACATAATCTTTTTA-3'
shLuciferase (Krtl.) (antisense)	5'-AGCTTAAAAAGATTATGTCCGGTTATGTATC TCTTGAATACATAACCGGACATAATCGGG-3'
shScrambled (sense)	5'- GATCCCCCATAAGCTGAGATACTTCATTCAA GAGATGAAGTATCTCAGCTTATGTTTTTA-3'
shScrambled (antisense)	5'- AGCTTTTCCAAAAACATAAGCTGAGATACTTCATC TCTTGAATGAAGTATCTCAGCTTATGGGG-3'
shPRMT6_1 (sense)	5'-GATCCCCGAGCAAGACACGGACGTTTTTCAA GAGAAAACGTCCGTGTCTTGCTCTTTTTA-3'
shPRMT6_1 (antisense)	5'-AGCTTAAAAAGAGCAAGACACGGACGTTTTC TCTTGAAAACGTCCGTGTCTTGCTCGGG-3'
shPRMT6_2 (sense)	5'-GATCCCCGCAAGACACGGACGTTTCATTCAA GAGATGAAACGTCCGTGTCTTGCTTTTTA -3'
shPRMT6_2 (antisense)	5'-AGCTTAAAAAGCAAGACACGGACGTTTCATC TCTTGAATGAAACGTCCGTGTCTTGCGGG-3'
shPRMT6_5 (sense)	5'-GATCCCCGGAGGGAGAGTGACTTCATTTCAA GAGAATGAAGTCACTCTCCCTCCTTTTTA-3'
shPRMT6_5 (antisense)	5'-AGCTTAAAAAGGAGGGAGAGTGACTTCATTC TCTTGAATGAAGTCACTCTCCCTCCGGG-3'
shCBX8 (sense)	5'- GATCCCCGTACCAGCAGAGTGGATGATTCAA GAGATCATCCACTCTGCTGGTACTTTTTA-3'
shCBX8 (antisense)	5'- AGCTTAAAAAGTACCAGCAGAGTGGATGATC TCTTGAATCATCCACTCTGCTGGTACGGG-3'

2.4.5 siRNA OLIGONUKLEOTIDE

Die angegebenen siRNAs bewirken die Depletion des jeweiligen humanen Proteins.

Tabelle 5: Übersicht der verwendeten spezifischen und unspezifischen (Krtl.) siRNAs.

Bezeichnung	Position	Sequenz 5' → 3'	Referenz
siLuciferase (siKrtl.) (unspezifisch in H.s.)	/	sense: GAUUAUGUCCGGUUAUGUA antisense: UACAUAACCGGACAUAUUC	Dharmacon
siNontarget (siKrtl.) (unspezifisch in H.s.)	/	sense: UAAGGCUAUGAAGAGAUAC antisense: GUAUCUCUUCAUAGCCUUA	Dharmacon
siScrambled (siKrtl.) (unspezifisch in H.s.)	/	sense: CAUAAGCUGAGAUACUUCA antisense: UGAAGUAUCUCAGCUUAUG	AG Eilers
siPRMT6_1 (NM_018137)	923 - 941	sense: GAGCAAGACACGGACGUUU antisense: AAACGUCCGUGUCUUGCUC	Dharmacon
siPRMT6_2 (NM_018137)	882 - 900	sense: GCAAGACACGGACGUUUCA antisense: UGAAACGUCCGUGUCUUGC	Dharmacon
siPRMT6_4 (NM_018137)	925 - 943	sense: GGAAACAGGCGCUCCUCUA antisense: UAGAGGAGCGCCUGUUUCC	Dharmacon
siCBX8 (NM_020649)	635 - 653	sense: GUACCAGCAGAGUGGAUGA antisense: UCAUCCACUCUGCUGGUAC	
siSUZ12_1 (NM_015355)	1787 - 1805	sense: GAACACCUAUCACACAUAU antisense: AUAUGUGUGAUAGGUGUUC	Dharmacon
siSUZ12_2 (NM_015355)	1876 - 1894	sense: GAACAGCAAAGAACAUAUA antisense: UAUAUGUUCUUGCUGUUC	Dharmacon
siSUZ12_3 (NM_015355)	2172 - 2190	sense: GAAUUUAUGUCGAAACUUC antisense: GAAGUUUCGACAUAUUUUC	Dharmacon

2.5 PLASMIDE

2.5.1 BAKTERIELLE EXPRESSIONSPLASMIDE

pGex-4T1- <i>PRMT1</i>	prokaryotischer Vektor zur Expression eines Fusionsproteins aus humaner PRMT1 und GST (N-terminal). (Scott <i>et al.</i> 1998)
pGex-4T1- <i>Prmt4</i>	prokaryotischer Vektor zur Expression eines Fusionsproteins aus muriner <i>Prmt4</i> (ORF und 1400 bp 3'-UTR) und GST (N-terminal). (Chen <i>et al.</i> 1999)
pGex-2.1- <i>PRMT6</i>	prokaryotischer Vektor zur Expression eines Fusionsproteins aus humaner PRMT6 (1125 bp, BamHI und EcoRI) und GST (N-terminal). (Hyllus <i>et al.</i> 2007)

2.5.2 EUKARYOTISCHE EXPRESSIONSPLASMIDE

2.5.2.1 LEERVEKTOREN

pSuper.retro.puro	eukaryotischer retroviraler Expressionsvektor für shRNAs mit RNA-Polymerase III-abhängigem H1-RNA-Promotor und einem Puromycin-Resistenzgen. (Brummelkamp <i>et al.</i> 2002)
pNTAP-B	eukaryotischer Expressionsvektor mit CMV Promoter zur Expression eines Proteins mit N-terminalem TAP (<i>Tandem Affinity Purification Tag</i>), bestehend aus Streptavidin-Bindungspeptid (SBP) und Calmodulin-Bindungspeptid (CBP). Neomycin- und Kanamycin-Resistenzgen. Kontrollvektor zu pNTAP- <i>PRMT6</i> . (Stratagene)

2.5.2.2 EXPRESSIONSPLASMIDE

pNTAP- <i>PRMT6</i>	eukaryotischer Vektor zur Expression von TAP- <i>PRMT6</i> unter der Kontrolle eines CMV Promoters. Wurde über (5') BamHI und (3') EcoRI in das pNTAP-B Plasmid kloniert. (Hyllus <i>et al.</i> 2007)
pMyc- <i>PRMT6</i> wt	eukaryotischer Vektor zur Expression von <i>PRMT6</i> wt fusioniert mit einem Myc-Tag unter Kontrolle eines CMV Promoters. Ursprungsvektor: pVAX. Freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Stéphane Richard. (Boulangier <i>et al.</i> 2005)

MATERIALIEN

pMyc- <i>PRMT6</i> : VLD-KLA	eukaryotischer Vektor zur Expression von <i>PRMT6</i> mut fusioniert mit einem Myc-Tag unter Kontrolle eines CMV Promoters. Ursprungsvektor: pVAX. Freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Stéphane Richard. (Boulanger <i>et al.</i> 2005)
pCDNA3.1- <i>Mph1</i>	eukaryotischer Vektor zur Expression von <i>Mph1</i> ohne Tag. Freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Yoshihiro Takihara. (Nomura <i>et al.</i> 1994)
pCDNA-Myc- <i>Mph2</i>	eukaryotischer Vektor zur Expression von <i>Mph2</i> . Freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Haruhiko Koseki.
pVenus- <i>CBX2</i>	eukaryotischer Vektor zur Expression von <i>CBX2</i> . Die kodierende Sequenz von <i>CBX2</i> ist N-Terminal an die kodierende Sequenz des <i>Venus fluorescent protein</i> in pCDNA3.1(+) fusioniert. Freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Tom Kerppola. (Ren <i>et al.</i> 2008)
pVenus- <i>CBX4</i>	eukaryotischer Vektor zur Expression von <i>CBX4</i> . Die kodierende Sequenz von <i>CBX4</i> ist N-Terminal an die kodierende Sequenz des <i>Venus fluorescent protein</i> in pCDNA3.1(+) fusioniert. Freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Tom Kerppola. (Ren <i>et al.</i> 2008)
pVenus- <i>CBX8</i>	eukaryotischer Vektor zur Expression von <i>CBX8</i> . Die kodierende Sequenz von <i>CBX8</i> ist N-Terminal an die kodierende Sequenz des <i>Venus fluorescent protein</i> in pCDNA3.1(+) fusioniert. Freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Tom Kerppola. (Ren <i>et al.</i> 2008)
pEGFP- <i>MEL-18</i>	eukaryotischer Vektor zur Expression von <i>MEL-18</i> . Freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Kevin D. Sarge. (Zhang <i>et al.</i> 2008)
pMyc- <i>Ring1A</i>	eukaryotischer Vektor zur Expression von <i>Ring1A</i> . Freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Miguel Vidal. (Schoorlemmer <i>et al.</i> 1997)
pMyc- <i>Ring1B</i>	eukaryotischer Vektor zur Expression von <i>Ring1B</i> . Freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Jun-ichi-Miyazaki. (Niwa <i>et al.</i> 1991)
pCMV4-Flag- <i>Ezh2</i>	eukaryotischer Vektor zur Expression von <i>Ezh2</i> . Freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Danny Reinberg.

2.5.2.3 VIRALE EXPRESSIONSPLASMIDE

Für die Expression der shRNAs wurde der eukaryotische retrovirale Expressionsvektor pSuper.retro.puro (OligoEngine) mit einem RNA-Polymerase III-abhängigem H1-RNA-Promotor und einem Puromycin-Resistenzgen (Brummelkamp *et al.* 2002) verwendet.

pBABE H2B-GFP eukaryotischer retroviraler Expressionsvektor mit LTR-Promotor zur Expression eines Fusionskonstruktes aus humanem Histon H2B und GFP.

2.6 ANTIKÖRPER

2.6.1 PRIMÄRANTI-KÖRPER

Tabelle 6: Primärantikörper

Die verwendeten Primärantikörper für Western Blot-Analysen (WB), FACS-Analysen, Immunpräzipitationen (IP), Chromatin-Immunpräzipitationen (ChIP) und Immunfärbungen (IF) sind mit der Antikörperbezeichnung/erkanntes Protein, der Herkunft/ Artikelbezeichnung des Herstellers und der Verwendung angegeben und erkennen humane Proteine.

Antikörperbezeichnung	Antikörpertyp	Herkunft	Verwendung
BMI-1	Maus, monoklonal IgG1	von K. Helin	WB: 1:1000
CBX8	Kaninchen, polyklonal	von T. Kerppola (Ren <i>et al.</i> 2008; Vincenz and Kerppola 2008)	ChIP: 2 µl/IP WB: 1:1000
CDK2 (M2)	Kaninchen, polyklonal	Santa Cruz(sc-163)	WB: 1:1000
c-Myc (9E10)	Maus, monoklonal	von M. Eilers	IF: 1:500 WB: 1:1000
EZH2	Maus, monoklonal	von K. Helin	ChIP: 30 µl/IP WB: 1:500
Flag	Maus, monoklonal IgG1	Sigma-Aldrich (F3165)	WB: 1:1000
GFP	Maus, monoklonal	Sigma-Aldrich (G6539)	WB: 1:1000
GST (B-14)	Maus, monoklonal IgG1	Santa Cruz (sc-138)	WB: 1:5000
H3	Maus, monoklonal	Millipore (05-499)	WB: 1:1000
H3K27me3	Kaninchen, polyklonal	Millipore (07-449)	ChIP: 2 µg/IP WB: 1:1000
H3K4me3	Kaninchen, polyklonal	Millipore (07-473)	ChIP: 4 µg/IP
H3K4me3	Kaninchen, monoklonal	Cell Signaling (9751)	ChIP: 10 µl/IP
H3K4me3	Kaninchen, polyklonal	Abcam (ab8580)	IF: 1:2000
H3R2me1	Kaninchen, polyklonal	Abcam (ab8046)	WB: 1:1000

MATERIALIEN

H3R2me2asym	Kaninchen, polyklonal	Upstate (07-585)	ChIP: 4µg/IP WB: 1:1000
H3R2me2asym	Kaninchen, polyklonal	Abcam (ab8046)	IF: 1:1600
H4R3me2asym	Kaninchen, polyklonal	Upstate (07-213)	WB: 1:1000
HPH1	Kaninchen, polyklonal	von H. Koseki	WB: 1:1000
HPH2	Maus, monoklonal	von H. Koseki	WB: 1:50
IgG	Kaninchen	Sigma-Aldrich (I5006)	ChIP
IgG	Kaninchen	Pierce	IP
IgG	Maus	Sigma-Aldrich I5381	ChIP, IP
MLL1 (C-terminal)	Kaninchen, polyklonal	von J. Hsieh (Hsieh <i>et al.</i> 2003)	ChIP: 1,5 µl
MLL1 (N-terminal)	Kaninchen, polyklonal	von J. Hsieh (Hsieh <i>et al.</i> 2003)	ChIP: 1,5 µl
PRMT1	Kaninchen, polyklonal	affinitätsgereinigt (AG Bauer)	IP: 20 µl/mg Protein
PRMT1	Kaninchen, polyklonal	Millipore (07-404)	WB: 1:1000
PRMT4	Kaninchen, polyklonal	affinitätsgereinigt (AG Bauer)	IP: 12 µl/mg Protein WB: 1:1000
PRMT6 (AS 60-375)	Kaninchen, polyklonal	Rohserum	ChIP: 10 µl/IP IP: 10-15 µl/mg Protein
PRMT6 (AS 60-375)	Kaninchen, polyklonal	affinitätsgereinigt (AG Bauer)	ChIP: 75 µl WB: 1:500
PRMT6 (AS 60-375)	Kaninchen, polyklonal	Präimmunserum (PI)	ChIP: 10 µl/IP IP: 10-15 µl/mg Protein
PRMT6 (C-terminal)	Kaninchen, polyklonal	Rohserum	ChIP: 15 µl/IP
PRMT6 (C-terminal)	Kaninchen, polyklonal	affinitätsgereinigt (AG Bauer)	ChIP: 100 µl/IP IF: 1:100 WB: 1:200/ 1:500
PRMT6 (C-terminal)	Kaninchen, polyklonal	Präimmunserum (PI)	ChIP: 15µl/IP
Ring1A	Kaninchen, polyklonal	von M. Vidal (Schoorlemmer <i>et al.</i> 1997)	WB: 1:1000
Ring1B	Maus, monoklonal	von H. Koseki	WB: 1:100
SUZ12	Maus, monoklonal IgG1K	Millipore (04-046)	WB: 1:1000
WDR5	Kaninchen, polyklonal	von W. Herr (Wysocka <i>et al.</i> 2003)	ChIP: 10 µl
β-Tubulin	Maus, monoklonal IgG2b	MAB3408 (Millipore)	WB: 1:10.000
Mel-18	Ziege, polyklonal	von K.D. Sarge (Zhang <i>et al.</i> 2008)	WB: 1:1000
CyclinA2	Kaninchen polyklonal	Santa Cruz (sc-751)	WB: 1:1000

p16INK4a	Maus, monoklonal	Santa Cruz (sc-65224)	WB: 1:100
p21/Cip1 (N-20)	Kaninchen, polyklonal	Santa Cruz (sc-469)	WB: 1:500
p53	Maus, monoklonal	DO-I	WB: 1:1000

2.6.2 SEKUNDÄRANTIKÖRPER

Tabelle 7: Sekundärantikörper

Die verwendeten Sekundärantikörper für die Immundetektion sind mit der erkannten Spezies, der Herkunft und der Anwendung beschrieben.

Antikörper	Beschreibung	Verdünnung/ Anwendung
anti-Kaninchen	Esel-anti-Kaninchen IgG an HRP gekoppelt, NA934 (GE Healthcare)	1:5000 für Western Blot
anti-Maus	Schaf-anti-Maus IgG an HRP gekoppelt, NXA931 (GE Healthcare)	1:5000 für Western Blot
anti-Ziege	Esel-anti-Ziege IgG an HRP gekoppelt, sc-2020 (Santa Cruz Biotechnology)	1:10.000 für Western Blot
speziesunabhängig	Clean-Blot™ IP Detection Reagent HRP gekoppelt, 21230 (Thermo Scientific)	1:500 für Western Blot
anti-Kaninchen-Cy3	Ziege-anti-Kaninchen IgG an Cy3 gekoppelt, 111-165-045 (Jackson Immunoresearch)	1:200 für Immunfluoreszenz
anti-Maus-FITC	Ziege-anti-Maus IgG an Fluorescein (FITC) gekoppelt, 115-095-065 (Jackson Immunoresearch)	1:200 für Immunfluoreszenz
Streptavidin-HRP		1:1000 für Western Blot

2.7 PEPTIDE

Zur Charakterisierung der modifikationsspezifischen Antikörper für R2me2 und K4me3 am Histon H3 wurden vormodifizierte, an Biotin gekoppelte Peptide (Global Peptide) verwendet, die freundlicherweise von Bruno Amati und Ernesto Guccione zur Verfügung gestellt wurden.

H3-Peptidsequenz AS 1 - 16: ARTKQTARKSTGGKAP-Biotin

Peptidmodifikation	Länge in AS	Konzentration in µg/ µl	C-terminus
H3 R2me2	1 - 16	2 µg/µl	Biotin
H3 K4me3	1 - 16	2 µg/µl	Biotin
H3 R2me2/K4me3	1 - 16	2 µg/µl	Biotin

2.8 SUBSTRATE FÜR *IN VITRO* METHYLTRANSFERASEASSAYS

Rekombinante Histone (aufgereinigt aus *E.coli*)

- H3 (1 µg/µl)
- H4 (1 µg/µl)

2.9 RADIOAKTIVE SUBSTANZEN

¹⁴C-SAM: S-Adenosyl-L-[methyl- ¹⁴C]-Methionin GE Healthcare

2.10 CHROMATOGRAPHIE-MATERIALIEN

Tabelle 8: Zusammenstellung der eingesetzten Chromatographie-Materialien und ihre Verwendung.

Material/ Herkunft	Anwendung
Superose6, HR10/30 GE Healthcare	Analytische Größenausschlusschromatographie (Gelfiltration)
Superose6, HR16/50 GE Healthcare	Präparative Größenausschlusschromatographie (Gelfiltration)
Superdex 200, HR 10/30 GE Healthcare	Analytische Größenausschlusschromatographie (Gelfiltration)
Glutathion-Sepharose 4B Machery-Nagel	Aufreinigung von GST-Fusionsproteinen
Protein A und Protein G Sepharose GE Healthcare	Bindung von Immunkomplexen bei der Immunpräzipitation
Streptavidin-Sepharose HP GE Healthcare	Tandem-Affinitätsaufreinigung (TAP) (1. Schritt)
Calmodulin-Sepharose 4B GE Healthcare	Tandem-Affinitätsaufreinigung (TAP) (2. Schritt)

2.11 ENZYME, INHIBITOREN UND GRÖßENSTANDARDS

2.11.1 ENZYME

Benzonase Nuklease 250 U/µl	Novagen
M-MLV-Reverse Transkriptase, 200 U/µl	Invitrogen
Proteinase K 20 µg/µl	Appllichem
Ribonuklease A (DNase frei) 10 µg/µl	Appllichem
T4-DNA-Ligase 30 U/µl	Fermentas
BglII 10 U/µl	Fermentas
HindIII 10 U/µl	Fermentas

2.11.2 INHIBITOREN

Aprotinin 10 µg/µl in H ₂ O (Serin- Protease-Inhibitor)	Applichem
Leupeptin 10 µg/µl in H ₂ O (Serin- und Cystein-Protease-Inhibitor)	Applichem
PMSF 10 µg/µl in Isopropanol (Serin- und Cystein-Protease-Inhibitor)	Sigma-Aldrich
Protease-Inhibitor-Cocktail-Tabletten	Roche
RiboLock 40 U/µl (Ribonuklease-Inhibitor)	Fermentas

2.11.3 GRÖßENSTANDARDS

Proteinstandards

PageRuler™ Prestained Protein Ladder	Fermentas
PageRuler™ Unstained Protein Ladder	Fermentas

DNA-Standard

GeneRuler™ DNA Ladder Mix	Fermentas
---------------------------	-----------

2.12 KITS

RNA-Isolierung	RNA-Mini-Kit, Seqlab
DNase I Verdau Kit	peqGOLD DNase I Digest Kit (RNase frei), Peqlab
qRT-PCR Mix	ABsolute™ QPCR SYBR Green Mix, Thermo Scientific
Gel-Aufreinigung	Jet Quick Gel Extraction Spin Kit, Genomed
DNA-Aufreinigung	QIAquick PCR Purification Kit, Qiagen
Maxi-DNA-Präparation	JETSTAR Plasmid Purification MAXI Kit, Genomed

2.13 ALLGEMEINE PUFFER

PBS	137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na ₂ HPO ₄ , 2 mM KH ₂ HPO ₄ , pH 7,4
TBS	50 mM Tris pH 7,6, 150 mM NaCl

2.14 CHEMIKALIEN

DABCO (1,4-Diazabicyclo[2.2.2]octane)	Sigma-Aldrich
MOWIOL-4-88	Roth
K ₃ Fe(CN) ₆ (50 mM in H ₂ O)	Sigma-Aldrich
K ₄ Fe(CN) ₆ (50 mM in H ₂ O)	Sigma-Aldrich
DAPI (1 mg/ml) (4',6-Diamidino-2-phenylindole dihydrochloride)	Sigma-Aldrich
X-Gal (1 mg/ml in DMF) (5-Brom-4-chlor-3-indoxyl-β-D-galactosid)	Roth
Propidiumiodid (1 mg/ml)	Sigma-Aldrich
all- <i>trans</i> -Retinsäure (10 mM in DMSO)	Sigma-Aldrich
Polybrene (4 mg/ml in H ₂ O)	Sigma-Aldrich

Nicht aufgeführte Chemikalien und Substanzen wurden in Analysequalität von den Firmen AppliChem, Merck, Roth und Sigma-Aldrich bezogen.

2.15 VERBRAUCHSMATERIALIEN

Amersham Hyperfilm MP	GE Healthcare
ClearSeal Diamond Heat Sealing Film	Thermo Scientific
FACS Röhrchen (5 ml)	Sarstedt
Fuji Medical X-Ray Film für ECL	Fuji Foto Film
Intensifying Screen Biomax Transcreen LE	Kodak
PVDF Transfer Membran	Millipore
StrataClean Resin	Agilent Technologies
Whatman-Filterpapier	Schleicher und Schuell

Nicht gesondert aufgeführte Plastik- und Einmalverbrauchsmaterialien wurden von den Firmen Eppendorf, Greiner, Kimberley-Clark und Sarstedt bezogen.

2.16 GERÄTE

Äkta™ Purifier 10 System	GE Healthcare
Blot- und Gelelektrophorese-Apparatur	Bio-Rad
CO ₂ -Inkubatoren	SANYO
Durchflussscytometer FACSCalibur	BD Biosciences
Durchlichtmikroskop Leitz DMIL	Leica
Filmentwicklermaschine X-Omat-2000	Kodak
Fluoreszenzmikroskop und Software	Leica, DMLB, Leica Application Suite
	Zeiss, Axioskop 2
Heat Sealer ALPS™50V	Thermo Scientific
NanoDrop ND-1000 Spektrophotometer	Thermo Scientific
Neubauer-Zählkammer improved	
Photometer Ultraspec 2000	Pharmacia Biotech
Real Time qPCR System und Software	Mx3000P, Stratagene
Schüttelinkubator (Bakterienkulturen)	Infors, Multitron
Sonifikator W-250 D	Branson
Sterilarbeitsbank	Thermo Scientific
Thermoblock TB1	Biometra
Thermocycler T3	Biometra
UV-Tisch Transilluminator	Bio-Rad
Zentrifugen	Sorvall RC-5B, Rotor: A6.9, DuPont Instruments
	Heraeus, Multifuge 3 S-R, Rotor: Sorvall SN610
	Tischzentrifuge, Thermo Scientific

3 METHODEN

3.1 ZELLBIOLOGISCHE METHODEN

3.1.1 KULTIVIERUNG EUKARYOTISCHER ZELLEN

Die verschiedenen adhärenenten Zelllinien wurden in den entsprechenden Vollmedien (siehe 2.2.2) auf Gewebekulturschalen oder -flaschen bei 37°C, 5 % CO₂ und 100 % relativer Luftfeuchtigkeit im Inkubator kultiviert. In Abhängigkeit von der Zelllinie und ihren Wachstumseigenschaften erfolgte ein regelmäßiges Passagieren bei 70 - 100 %iger Bedeckung der Oberfläche (Konfluenz). Dazu wurde das Medium abgesaugt, die Zellen mit PBS gewaschen und mit Trypsinlösung solange inkubiert, bis sich die Zellen von den Gewebekulturgefäßen ablösten. Die verwendete Menge Trypsin richtete sich nach der Größe des Gewebekulturgefäßes (1 - 3 ml). Die Aktivität von Trypsin wurde durch Zugabe von serumhaltigem Medium gestoppt und die Zellen durch mehrfaches Auf- und Abpipettieren vereinzelt. Anschließend wurden die Zellen, in einer der Zelllinie entsprechenden Verdünnung (siehe Tabelle 9), in frischem Vollmedium auf ein neues Gewebekulturgefäß ausplattiert. Um Reste der Trypsinlösung zu entfernen wurde bei der Subkultivierung von NT2/D1 und Tig3-T Zellen die Zellsuspension vor dem Ausplattieren bei 300 x g für 3 min zentrifugiert und das Zellpellet in frischem Vollmedium resuspendiert. Zum Aussäen für einen Versuch wurde die Zellzahl mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. Die Anzahl der ausgesäten Zellen richtete sich zum einen nach der Größe des Gewebekulturgefäßes und zum anderen nach der Art des geplanten Versuches.

Tabelle 9: Übersicht zur Häufigkeit des Passagierens und zur Verdünnung der Zelllinien.

Zelllinie	Verdünnung/ Häufigkeit	Zellzahl pro 9,6 cm² (6-well) Wachstumsfläche/ Versuch
HEK293	1:10 alle 2 - 3 Tage	1,9 x 10 ⁵ / Überexpression/ <i>knockdown</i>
MCF7	1:4 - 1:5 alle 3 Tage	2,0 x 10 ⁵ / Überexpression 1,5 x 10 ⁵ / Immunfärbung
U2OS	1:10 alle 2 - 3 Tage	2,0 x 10 ⁵ / <i>knockdown</i> 400/ Kolonie-Assay
Phoenix ^{Eco}	1:5 - 1:10 alle 2 - 3 Tage	1,0 x 10 ⁶ / Retrovirus-Herstellung
NT2/D1	1:3 - 1:5 alle 2 - 3 Tage	2,0 x 10 ⁵ / <i>knockdown</i> / Differenzierung
Tig3-T	1:3 alle 4 Tage	2,0 x 10 ⁵ / <i>knockdown</i> 1,5 x 10 ⁵ / Wachstumskurve/ FACS

3.1.2 EINFRIEREN UND AUFTAUEN VON ZELLEN

Zum Einfrieren wurden Zellen einer 145 cm² Gewebekulturschale, wie unter 3.1.1 beschrieben, trypsiniert, in 10 ml Vollmedium resuspendiert und bei 300 x g für 5 min pelletiert. Anschließend wurde das Zellpellet in 1 ml kaltem Einfriermedium aufgenommen und in ein Einfrierröhrchen überführt. Nachdem die Zellen für einige Tage bei -80°C lagerten, wurden sie schließlich zur Langzeitaufbewahrung in flüssigen Stickstoff überführt.

Einfriermedium: 10 % DMSO, 30 % FBS, 70 % DMEM

Das Auftauen von Zellen erfolgte schnell bei 37°C im Wasserbad, um Schädigungen der Zellen zu vermeiden. Die aufgetauten Zellen wurden in 10 ml Vollmedium aufgenommen und bei 300 x g für 5 min zentrifugiert, um das DMSO zu entfernen. Das Zellpellet wurde in frischem Vollmedium resuspendiert und in ein Gewebekulturgefäß überführt.

3.1.3 BESTIMMUNG DER ZELLZAHL MITTELS NEUBAUER-ZÄHLKAMMER

Die Zellzahl einer Zellsuspension wurde mit einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. Zur Unterscheidung von abgestorbenen und vitalen Zellen wurde 1 Volumenteil der Zellsuspension zu 4 Volumenteil einer 0,5 % (w/v) Trypanblaulösung gegeben und 5 min bei RT inkubiert. Der Farbstoff Trypanblau konnte nur von abgestorbenen Zellen aufgenommen werden, während vitale Zellen keine Färbung zeigten. Die Berechnung der Zellzahl pro ml erfolgte unter Berücksichtigung folgender Formel:

$$\text{Zellzahl pro ml} = \left(\frac{\text{Zellzahl}}{\text{Anzahl der gezählten Großquadrate}} \right) \times 10^4$$

3.1.4 ERSTELLEN VON WACHSTUMSKURVEN

Um das Wachstum von Tig3-T Zellen nach Depletion bestimmter Proteine zu untersuchen, wurden die Zellen mit den entsprechenden shRNA-Vektoren infiziert (siehe 3.1.8) und für 3 Tage mit 1 µg/ml Puromycin selektioniert. Nach erfolgreicher Selektion wurden 1,5 x 10⁵ Zellen in Triplikaten auf 9,6 cm²-Kulturplatten (6-well-Platte) ausgesät. Über einen Zeitraum von 9 Tagen wurden die Zellen alle 3 Tage trypsiniert und nach Bestimmung der Zellzahl erneut, mit einer Dichte von 1,5 x 10⁵ Zellen pro Vertiefung, ausgesät. Aus den Mittelwerten der Triplikate wurden die Verdopplungsraten berechnet und in einer kumulativen Darstellung gegen die Zeit (in Tagen) aufgetragen. Die Standardabweichung der Triplikate wurde ebenso ermittelt.

3.1.5 DIFFERENZIERUNG VON NT2/D1 ZELLEN

Die pluripotente humane embryonale Karzinom (EC) Zelllinie NT2/D1 differenziert durch Behandlung mit all-*trans*-Retinsäure (ATRA) in neuronale Zellen aus (Andrews 1984). Während dieser Differenzierung werden verschiedene Gene, die die Zelldifferenzierung beeinflussen, reguliert, u.a. auch die des *HOXA* Locus (Stornaiuolo *et al.* 1990; Simeone *et al.* 1991). Veränderungen im Differenzierungsverhalten, z.B. unter *knockdown* Bedingungen, wurden in dieser Arbeit an der differenziellen Regulation der *HOXA* Gene untersucht.

Die NT2/D1 Zellen wurden auf Gewebekulturschalen mit einer Konfluenz von 50 % (siehe 3.1.1) ausplattiert und mit Retinsäure (ATRA) (Endkonzentration 0,1 - 1,0 μM) behandelt. Unbehandelte Kontrollzellen und behandelte Zellen wurden über einen Zeitraum von 2 - 12 Tagen unter ständiger Anwesenheit von Retinsäure passagiert und zum gewünschten Zeitpunkt für Expressionsstudien und ChIP-Analysen geerntet.

Für die Untersuchung der Differenzierung unter *knockdown* Bedingungen wurden die Zellen wie unter 3.1.7 beschrieben mit siRNA transfiziert und zur Etablierung der Depletion für 48 h kultiviert. Dann wurden die Zellen mit einer Verdünnung von 1:2 - 1:3 auf neue Gewebekulturschalen verteilt und mit Retinsäure behandelt. Unbehandelte Kontrollzellen und behandelte Zellen wurden 2 Tage nach Zugabe von Retinsäure für Expressions-, ChIP- und proteinbiochemische Analysen geerntet.

3.1.6 TRANSFEKTION EUKARYOTISCHER ZELLEN MIT PLASMID-DNA

Die Mengen für DNA und Transfektionsreagenz richten sich nach der Größe der Gewebekulturschale. Die im Folgenden angegebenen Mengen wurden für 21 cm^2 Gewebekulturschalen (6 cm Schale) optimiert und anhand der Fläche an Gewebekulturschalen verschiedener Größen angepasst. Zum Überprüfen der Transfektionseffizienz wurde eine separate Kontrollplatte mit einem eGFP- (*enhanced Green Fluorescent Protein*) Konstrukt transfiziert.

GeneJuice[®]

Das Einbringen von Plasmid-DNA in NT2/D1 Zellen erfolgte mit dem Transfektionsreagenz GeneJuice[®], das aufgrund seiner Zusammensetzung weniger toxisch wirkt. 24 h vor der Transfektion wurden 4×10^5 Zellen in 5 ml Vollmedium ausplattiert. Die Durchführung der Transfektion erfolgte nach den Herstellerangaben im Verhältnis 2:1 (GeneJuice[®]:DNA). Ein Mediumwechsel wurde 2-8 h nach der Transfektion durchgeführt. Die Ernte der Zellen für Expressions- und proteinbiochemische Analysen erfolgte 48 h nach der Transfektion.

Transfektionsmischung: 200 μl Opti-MEM[®] I (serumfreies Medium)
 4 μl GeneJuice[®]
 2 μg DNA

METHODEN

gegeben. Vor Zugabe der Transfektionsmischung wurde das Medium durch 4 ml Vollmedium ohne Antibiotika ersetzt. Aufgrund der eingesetzten Volumina an siRNA-Transfektionsmischung und Medium wurde eine siRNA-Konzentration von 60 nM im Medium erreicht. 48 h nach der Transfektion wurden die Zellen geerntet oder für weitere Experimente ausgesät (siehe 3.1.5). Eine signifikante Depletion der gewünschten mRNA war über einen Zeitraum von 2 bis 5 Tagen nach der Transfektion etabliert und stabil.

Transfektionsmischung:

Ansatz A 500 µl Opti-MEM + 15 µl siRNA

Ansatz B 500 µl Opti-MEM + 10 µl LipofectamineTMRNAiMAX

OligofectamineTM

Zur transienten Transfektion von HEK293 Zellen mit synthetischen siRNAs wurde OligofectamineTM gemäß den Angaben des Herstellers verwendet. Einen Tag vor der Transfektion wurden 4×10^5 Zellen ausplattiert. Zur Transfektion wurden zwei Ansätze vorbereitet (Ansatz A und Ansatz B) und für 5 min bei RT inkubiert. Anschließend wurden beide Ansätze vereinigt, durch Pipettieren gemischt und weitere 20 min bei RT inkubiert. In der Zwischenzeit wurde das Medium durch 1,5 ml Medium ohne FBS und ohne Antibiotika ersetzt. Schließlich wurde die Transfektionsmischung tropfenweise zugegeben und nach 4-stündiger Inkubation wurde mit Vollmedium auf 5 ml aufgefüllt. Die Zellen wurden 48 h nach Transfektion für proteinbiochemische Analysen geerntet.

Transfektionsmischung:

Ansatz A 350 µl Opti-MEM + 15 µl siRNA

Ansatz B 30 µl Opti-MEM + 7 µl OligofectamineTM

3.1.8 HERSTELLEN REKOMBINANTER RETROVIREN UND INFEKTION VON TIG3-T ZELLEN

Die Infektion von Zellen mit rekombinanten Retroviren ist eine effiziente Methode um Fremd-DNA bzw. shRNA-Konstrukte in schwer transfizierbare Zellen einzubringen. Die in dieser Arbeit verwendete humane Zelllinie Tig3-T exprimiert stabil den *ekotrophen* Rezeptor, der die Infektion humaner Zellen mit (murinen) *ekotrophen* Viren ermöglicht. Zur Herstellung rekombinanter Retroviren wurde die Verpackungszelllinie Phoenix^{Eco} verwendet, die von HEK293 Zellen abstammt. Diese Zelllinie exprimiert stabil, unter Verwendung der Resistenzen gegen Diphtheria-Toxin und Hygromycin, die viralen Genbereiche *gag*, *env* und *pol*, welche für essentielle Komponenten der Virusverpackung kodieren. Damit sind Phoenix^{Eco} Zellen in der Lage durch Transfektion eingeschleuste DNA in Viruspartikel zu verpacken und in das Medium abzugeben. Die Transfektion

erfolgte durch Calcium-Phosphat-Präzipitation (Chen and Okayama 1987; Swift *et al.* 2001). Hierbei bilden sich unter definierten Pufferbedingungen Präzipitate aus Calcium-Kationen und den anionischen Phosphatgruppen der DNA. Diese Präzipitate können von den Zellen phagozytiert werden (Loyter *et al.* 1982).

Herstellen rekombinanter Retroviren mit Hilfe der Phoenix^{Eco} Zellen

Phoenix^{Eco} Zellen wurden 24 h vor Transfektion mit einer Zelldichte von $5,5 \times 10^6$ Zellen pro 10 cm Schale ausplattiert. Die zu transfizierende DNA (26 µg pro 10 cm Schale) wurde mit TE (1:10) auf 450 µl aufgefüllt und mit 50 µl einer 2,5 M CaCl₂-Lösung versetzt. Anschließend wurden unter vortexen 500 µl 2 x HBS zugetropft. Nach einer Inkubation von 15 min wurde die Transfektionsmischung tropfenweise zu den Zellen gegeben. Nach ungefähr 20 h wurden die Präzipitate durch zweimaliges, vorsichtiges Waschen mit PBS entfernt und die Zellen mit 6 ml frischem Vollmedium weitere 24 h kultiviert, um den Virus anzukonzentrieren. Der Virusüberstand wurde abgenommen, bei 300 x g zentrifugiert, aliquotiert und nach dem Schockgefrieren in flüssigem Stickstoff bei -80°C gelagert. Es wurde erneut frisches Vollmedium (6 ml) zu den Zellen gegeben und nach weiteren 24 h der zweite Virusüberstand geerntet. Für die Infektion wurde der Virus direkt vor der Infektion bei 37°C im Wasserbad aufgetaut.

Lösungen: 1:10 Verdünnung TE (1 mM Tris pH 8,0, 0,1 mM EDTA, steril filtriert)
CaCl₂ (2,5 M, steril filtriert)
2 x HBS (50 mM HEPES, 250 mM NaCl, 1,5 mM Na₂HPO₄, pH 7,01, steril filtriert)

Infektion von Tig3-T Zellen

Zur Infektion von Tig3-T Zellen mit pSuper.retro.puro (shRNA) wurden diese einen Tag vor der Infektion mit einer Zelldichte von $1,2 \times 10^6$ pro 10 cm Schale ausplattiert. Zunächst wurden 3 ml Virusüberstand mit 2 ml Vollmedium und zur Erhöhung der Infektionseffizienz mit 8 µg/ml Polybrene gemischt. Anschließend wurde das Medium der Zellen abgenommen und durch 5 ml Infektionsmischung ersetzt. Nach 12-16 h Inkubation wurde der Virusüberstand entfernt und mit frischer Infektionsmischung für 8-10 h inkubiert. Anschließend wurden weitere 5 ml frisches Vollmedium zugegeben und die Zellen weiter kultiviert. Die Selektion erfolgreich infizierter Zellen begann 48 h nach der ersten Infektion mit 1 µg/ml Puromycin für 3 Tage. Als Kontrolle für eine erfolgreich abgeschlossene Selektion dienten Zellen, die mit einem Konstrukt ohne Puromycin-Resistenzgen infiziert wurden. Tag 3 der Selektion entspricht Tag 0 der Depletionsdauer.

3.1.9 IMMUNFLUORESCENZFÄRBUNG

MCF7 und U2OS Zellen wurden wie unter 3.1.6 beschrieben, transfiziert und 24 h später mit einer Dichte von $1,5 \times 10^5$ Zellen auf sterilen Deckgläschen (in $9,6 \text{ cm}^2$ Gewebekulturplatten) ausgesät. Weitere 24 h später wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und in eiskaltem Methanol für 10 min bei -20°C fixiert. Zum Rehydrieren wurden die Zellen dreimal mit PBS gewaschen und entweder sofort für die Immunfluoreszenzfärbung verwendet oder in PBS bei 4°C aufbewahrt. Alle weiteren Inkubationsschritte erfolgten bei RT. Als erstes wurden die Zellen durch eine 5-minütige Inkubation in PBS/ 0,2 % Triton X-100 permeabilisiert. Nach dreimaligem Waschen mit PBS für je 5 min wurden die Zellen für mindestens 30 min in 4 % BSA/ PBS/ 0,1 % Triton X-100 geblockt. Es folgte eine 2-stündige Inkubation mit dem Primärantikörper in PBS/ 0,1 % Triton X-100 (siehe 2.6.1). Nach dreimaligem Waschen mit PBS folgte eine 30-minütige Inkubation mit dem der Spezies entsprechenden Fluoreszenz-gekoppelten Sekundärantikörper in PBS/ 0,1 % Triton X-100 (siehe 2.6.2) unter Lichtausschluss. Es folgten wiederum drei Waschschrte mit PBS bevor die Zellkerne für 2 min mit DAPI (1:10.000 in PBS) gefärbt wurden. Abschließend wurde zweimal mit PBS und einmal mit H_2O bidest gewaschen und mit Mowiol auf Objektträgern luftblasenfrei eingedeckelt.

Lösungen: PBS, 0,1 % Triton X-100
 PBS, 0,2 % Triton X-100
 4 % BSA in PBS, 0,1 % Triton X-100
 DAPI (Stammlösung: 1 mg/ml in H_2O bidest.)
 Mowiol 4-88 mit DAPCO (25 mg/ml)

3.1.10 SENESZENZ-ASSOZIIERTE β -GALAKTOSIDASE (SA- β -GAL) FÄRBUNG

Die Expression von Seneszenz-assoziiertes- β -Galaktosidase kann anhand der Hydrolyse von X-Gal (5-Brom-4-chlor-3-indoxyl- β -D-galactopyranosid) zu Galaktose und dem blauen, wasserunlöslichen Farbstoff 5-Brom-4-chlorindol bei pH 6,0 detektiert werden (Dimri *et al.* 1995; Itahana *et al.* 2007).

Tig3-T Zellen wurden nach einer 7-tägigen Depletion bestimmter Proteine auf die Aktivität von Seneszenz-assoziiertes- β -Galaktosidase untersucht. Dazu wurden 24 h vor der Fixierung $1,5 \times 10^5$ Zellen in die Vertiefung einer $9,6 \text{ cm}^2$ Gewebekulturplatte ausgesät. Zunächst wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und für 3 min mit 3 % Formaldehyd/ PBS bei RT fixiert. Anschließend wurden die Zellen erneut zweimal mit PBS gewaschen. Schließlich wurden 2 ml der Färbelösung pro Vertiefung zu den Zellen gegeben. Die Platten wurden mit Parafilm luftdicht abgeschlossen und bei 37°C (ohne CO_2) inkubiert. Die nach 12 - 24 h auftretende Blaufärbung der Zellen wurde fotografisch dokumentiert.

Färbelösung: 1 mg/ml X-Gal
5 mM $K_4Fe(CN)_6$
5 mM $K_3Fe(CN)_6$
150 mM NaCl
2 mM $MgCl_2$
40 mM Citric Acid/ Na_2HPO_4 pH 6,0

3.1.11 BESTIMMUNG DER KLONOGENITÄT VON ZELLEN

Die Klonogenität von U2OS Zellen nach siRNA vermittelter Depletion bestimmter Proteine wurde anhand der Fähigkeit Kolonien zu bilden, gemessen. Die als *colony formation assay* oder *clonogenic assay* bezeichnete Methode basiert auf dem Vermögen sehr dünn ausgesäter Zellen Kolonien durch unbegrenzte Teilung zu bilden.

U2OS Zellen wurden wie unter 3.1.7 beschrieben mit siRNA transfiziert. 48 h nach der Transfektion wurden 200 Zellen pro $9,6\text{ cm}^2$ Wachstumsfläche ausgesät und für 10 - 14 Tage kultiviert. Anschließend wurde das Medium abgeschüttet und die Zellen ü.N. bei 4°C in 70 % Ethanol fixiert. Nach zweimaligem Waschen mit PBS wurden die Zellen für 20 min mit Kristallviolettlösung (0,1 % (w/v) in 20 % Ethanol) gefärbt und schließlich gründlich mit H_2O bidest gewaschen. Nach dem Lufttrocknen wurden die Kolonien gezählt und die Platten fotografisch dokumentiert.

3.2 DURCHFLUSSCYTOMETRIE (FACS)

Das Prinzip der Durchflusszytometrie (*fluorescence-activated cell sorting*, FACS) basiert auf der separaten Detektion von Streu- und Fluoreszenzlicht, das erzeugt wird, wenn eine Zelle in einem Flüssigkeitsstrom durch einen Laserstrahl tritt. Dabei können gleichzeitig mehrere physikalische Parameter wie Granularität und Größe aber auch Fluoreszenz Parameter wie Fluoreszenzintensität und -weite einer Zelle in einer Zellpopulation quantitativ bestimmt werden.

3.2.1 FIXIERUNG VON ZELLEN

Die Zellen wurden zunächst mit PBS gewaschen, mit Trypsin von den Gewebekulturschalen abgelöst und in 10 ml Vollmedium für 5 min bei $300 \times g$ zentrifugiert. Das Zellpellet wurde mit PBS gewaschen, erneut pelletiert, in $500\ \mu\text{l}$ PBS resuspendiert und anschließend in ein Reaktionsgefäß mit 2 ml eiskaltem Ethanol (100 %) unter Vortexen getropft. Zur vollständigen Fixierung und Permeabilisierung wurden die Zellen mindestens ü.N. bei -20°C gelagert.

3.2.2 BESTIMMUNG DER ZELLYKLUSVERTEILUNG MIT PROPIDIUMIODID

Bei der Zellteilung durchlaufen normale diploide Zellen drei deutlich voneinander abgrenzbare Phasen, die unterschiedliche, charakteristische DNA-Gehalte aufweisen. Zu Beginn des Zellzyklus, in der G1-Phase, weisen die Zellen einen DNA-Gehalt von 2N auf. Während der S-Phase wird die gesamte nukleäre DNA repliziert und der DNA-Gehalt verändert sich zu 4N. Anschließend geht die Zelle in die G2/M-Phase über. Der DNA-Gehalt bleibt bei 4N, bis sich die Zelle in zwei Tochterzellen mit je 2N geteilt hat. Zur Zellzyklusanalyse eignet sich die Bestimmung des DNA-Gehaltes durch Interkalation von Propidiumiodid in die DNA. Propidiumiodid fluoresziert nach einer Anregung mit 488 nm mit einer Wellenlänge von 617 nm. Dabei korreliert die Stärke des Fluoreszenzsignals mit dem DNA-Gehalt der Zelle.

Die fixierten Zellen wurden zunächst bei 300 x g für 10 min bei 4°C pelletiert und anschließend mit PBS gewaschen. Nach 5-minütiger Zentrifugation bei 4°C und 300 x g wurde das Zellpellet in 400 µl Natriumcitratpuffer (38 mM) mit 12 µl RNase A (10 µg/µl) und 15 µl Propidiumiodid (1 µg/µl) für 30 min bei 37°C im Dunkeln inkubiert und zur Messung in FACS Röhrchen transferiert. Die Messung der Proben erfolgte an einem FACSCalibur der Firma BD Biosciences unter Verwendung eines Argon-Lasers und einer Anregungswellenlänge von 488 nm. Das vom Propidiumiodid bei einer Wellenlänge von 617 nm emittierte Licht wurde mit einem 585 ± 21 nm Bandpassfilter (Detektor FL2) detektiert. Zur Analyse der Zellzyklusverteilung wurde das Programm ModFit LT verwendet.

3.3 MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN

Molekularbiologische Standardmethoden wurden im Rahmen dieser Arbeit entsprechend den angegebenen Protokollen durchgeführt und sind deshalb nicht detailliert beschrieben. Die Verwendung kommerzieller Kits erfolgte, sofern nicht anders beschrieben, nach den Angaben des Herstellers und wird deshalb nicht näher erklärt.

3.3.1 ISOLIERUNG UND AUFREINIGUNG VON NUKLEINSÄUREN

Isolierung von Plasmid-DNA im analytischen Maßstab (Mini-Plasmidpräparation)

Für die Mini-Plasmidpräparation wurde eine 1,5 ml Übernachtskultur bei 17000 x g für 5 min zentrifugiert und das Pellet wie im Jet Star Plasmid Maxi Kit Protokoll von Genomed beschrieben, behandelt. Nach erfolgreicher Lyse, Denaturierung und Neutralisation der Bakterien wurde der erhaltene Überstand mit 500 µl 100 % Ethanol versetzt und gewissenhaft invertiert. Nach 5-minütiger Zentrifugation bei 17000 x g wurde das Pellet in 200 µl H₂O bidest gelöst, mit 200 µl 9 M LiCl-Lösung versetzt, für 20 min bei -20°C inkubiert und erneut für 5 min zentrifugiert. Zur Präzipitation der im Überstand gelösten DNA wurden 300 µl Isopropanol zugegeben, invertiert und bei -20°C für

15 min inkubiert. Das nach erneuter Zentrifugation erhaltene Pellet wurde je einmal mit 70 % und 100 % Ethanol gewaschen und nach dem Lufttrocknen in 50 µl H₂O bidest gelöst.

Lösungen: Puffer E1 - E3 (Jet Star Plasmid Maxi Kit, Genomed)
Isopropanol
Ethanol p.a. (70 % (v/v) und 100 % (v/v))
9 M LiCl

Isolierung von Plasmid-DNA im präparativen Maßstab (Maxi-Plasmidpräparation)

Die Isolierung von DNA aus einer 300 ml Übernachtskultur erfolgte mit dem Jet Star Plasmid Maxi Kit von Genomed gemäß den Herstellerangaben. Das aufgereinigte Plasmid wurde in 300 µl H₂O bidest gelöst und mit 15 µl NaCl-Lösung (5 M) versetzt. Nach langsamer Zugabe von 900 µl 100 % Ethanol und vorsichtigem Schütteln bildete sich eine DNA-Flocke, die zweimal mit 70 % Ethanol gewaschen wurde. Das luftgetrocknete Pellet wurde in 200 - 400 µl H₂O bidest gelöst und die Konzentration wie unter 3.3.2 beschrieben, bestimmt.

Lösungen: Puffer E1 - E6 (Jet Star Plasmid Maxi Kit, Genomed)
Isopropanol
Ethanol p.a. (70 % (v/v) und 100 % (v/v))
5 M NaCl

Isolierung von Gesamt-RNA aus eukaryotischen Zellen

Die Isolierung und Aufreinigung von RNA aus eukaryotischen Zellen erfolgte mit dem RNA-Mini-Kit (Seqlab) und wurde nach den Herstellerangaben durchgeführt. Um Kontaminationen durch DNA zu vermeiden, wurden die Proben auf der Säule zusätzlich einer DNase I-Behandlung unterzogen. Diese erfolgte mit dem peqGOLD DNase I Digest Kit (Peqlab) ebenfalls nach den Angaben des Herstellers. Die Bestimmung der RNA-Konzentration erfolgte wie unter 3.3.2 beschrieben.

3.3.2 KONZENTRATIONSBESTIMMUNG VON NUKLEINSÄUREN

Zur Bestimmung der RNA- oder DNA-Konzentration wurde die Absorption bei 260 nm von 1,5 µl der unverdünnten nukleinsäurehaltigen Lösung mit dem Nanodrop[®]ND-1000 gemessen. Der Berechnung der Konzentration lag dabei zugrunde, dass für eine Schichtdicke von 1 cm und einer OD von 1 eine Konzentration von 50 µg/ml für doppelsträngige DNA und 40 µg/ml für RNA gilt. Zur Ermittlung der Reinheit der Nukleinsäure wurde zusätzlich die Absorption von Proteinen bei 280 nm gemessen und das Verhältnis von A₂₆₀ zu A₂₈₀ gebildet. Eine ausreichende Reinheit liegt vor, wenn der ermittelte Wert bei 1,8 für DNA und bei 2,0 für RNA liegt.

3.3.3 TRANSFORMATION KOMPETENTER BAKTERIEN

Die Transformation der chemisch kompetenten Bakterienstämme *E.coli* DH5 α und *E.coli* BL21 DE3 erfolgte durch Hitzeschock. Die Bakterien wurden langsam auf Eis aufgetaut und nach Zugabe von 50 ng - 1 μ g DNA oder 5 - 10 μ l eines Ligationsansatzes für 20 min auf Eis inkubiert. Der Hitzeschock erfolgte für 1,5 min bei 42°C. Anschließend wurde die Bakteriensuspension sofort für 2 min auf Eis gekühlt. Nach Zugabe von 400 μ l LB-Medium (ohne Antibiotika) wurde die Bakteriensuspension für 30 min bei 37°C inkubiert. Die Transformationsansätze wurden entweder auf LB-Agar-Platten ausgestrichen oder zum Animpfen einer Übernachtskultur (siehe 3.3.1 und 3.5.10) verwendet.

3.3.4 RESTRIKTIONSVERDAU VON PLASMID-DNA

Zur sequenzspezifischen Spaltung von DNA wurden Restriktionsendonukleasen in dem vom Hersteller angegebenen Reaktionspuffer verwendet. Zur Berechnung der einzusetzenden Enzymmenge wurde folgende Formel angewendet, die darauf beruht, dass 1 Unit Enzym 1 μ g Lambda-DNA (42 kb) in einer Stunde schneidet.

$$\text{Enzymmenge in U} = x \mu\text{g Plasmid} \times \frac{\text{Schnittstellen im Plasmid} \times \text{Größe Lambda}}{\text{Schnittstellen in Lambda} \times \text{Größe Plasmid}}$$

Außerdem wurden die Volumina der Reaktionsansätze so gewählt, dass die Enzymmenge 10 % vom Gesamtvolumen nicht übersteigt. Die Inkubation der Reaktion erfolgte bei 37°C für 2 - 4 h. Die präparative Restriktion von pSuper.retro.puro mit den Enzymen BglII und HindIII, für die Herstellung von shRNA-Vektoren, erfolgte nacheinander. Es wurden folgende Ansätze verwendet.

Restriktionsansatz 1:

20 μ g Plasmid-DNA
4 μ l Enzym (HindIII 10 U/ μ l)
5 μ l 10 x Restriktionspuffer
ad 50 μ l H₂O bidest

Restriktionsansatz 2:

Restriktionsansatz 1
4 μ l Enzym (BglII 10 U/ μ l)
3 μ l 10 x Restriktionspuffer
ad 80 μ l H₂O bidest

Für eine analytische Restriktion wurde in der Regel 0,5 - 1 μ g Plasmid-DNA eingesetzt und das Reaktionsvolumen auf 15 μ l reduziert.

3.3.5 EXTRAKTION VON DNA-FRAGMENTEN AUS AGAROSEGELEN

Die Agarose-Gelelektrophorese als Methode zur Auftrennung von DNA anhand ihrer Größe wurde nach Standardprotokoll durchgeführt (Sambrook 1989). Die Aufreinigung von DNA-Fragmenten aus einem Agarosegel erfolgte mit dem Jet Quick Gel Extraktion Spin Kit (Genomed) gemäß den Herstellerangaben.

6 x Orange G Ladepuffer 60 mM Tris pH 7,5, 30 mM NaAc, 12 mM EDTA,
60 % (w/v) Glycerin, 0,36 % (w/v) Orange G

3.3.6 HYBRIDISIERUNG VON OLIGONUKLEOTIDEN

Für die Herstellung von shRNA-Vektoren wurden Einzelstrang DNA-Oligonukleotide vor der Ligation hybridisiert. Dazu wurde 1 nmol je Oligonukleotid in 50 µl Hybridisierungspuffer für 10 min auf 95°C erhitzt und anschließend langsam auf RT abgekühlt.

Hybridisierungspuffer: 100 mM NaCl, 20 mM Tris pH 7,5

3.3.7 LIGATION VON DNA-FRAGMENTEN

Zur kovalenten Verknüpfung von DNA-Fragmenten (shRNA-Oligonukleotide) mit einem linearisierten Vektor (pSuper.retro.puro) wurde die T4-DNA-Ligase verwendet. Zur Ligation wurden in 10 µl Gesamtvolumen 20 ng Vektor-DNA, 1 µl Fragment-DNA, 1 µl 10 x Ligase-Puffer und 1 µl T4-DNA-Ligase (1 U/µl) eingesetzt. Die Ligation erfolgte im Wasserbad bei 16°C ü.N. und wurde durch 10 min Inkubation bei 80°C gestoppt. Anschließend konnte der Ligationsansatz in kompetente *E. coli* DH5α transformiert werden (siehe 3.3.3).

3.3.8 DNA-SEQUENZANALYSE

Die Sequenzierungen von Plasmiden wurden von der Firma AGOWA Genomics unter Verwendung des 5' pRS Primers (siehe 2.4.1) durchgeführt.

3.4 EXPRESSIONSANALYSEN

3.4.1 REVERSE TRANSKRIPTION ZUR CDNA-SYNTHESE

Die Gewinnung von cDNA aus RNA-Proben erfolgte durch Reverse Transkription mit Hilfe von OligodT₁₇-Primern, die an den Poly-A-Schwanz der mRNA binden, und einer RNA-abhängigen DNA-Polymerase (M-MLV-Reverse Transkriptase, Invitrogen). Dafür wurden 0,5 µg - 2 µg Gesamt-RNA mit nukleasefreiem Wasser auf 10 µl aufgefüllt und mit 5 µl des Reaktionsansatzes 1 versetzt. Um Sekundärstrukturen aufzulösen und das Anlagern der Primer zu ermöglichen, folgte eine 5-minütige Inkubation bei 65°C und anschließend kurzes Abkühlen auf Eis. Schließlich wurden 10 µl Reaktionsansatz 2 zugegeben. Die cDNA-Synthese erfolgte für 60 min bei 37°C im Thermocycler und wurde durch 15 min Inkubation bei 75°C gestoppt. Die cDNA wurde bei -20°C gelagert und für Expressionsanalysen mittels RT-qPCR verdünnt (siehe 3.4.2).

Reaktionsansatz 1 für eine Probe:

1 µl dNTP-Mix (je 10 mM)
1 µl OligodT₁₇ (0,5 µg/µl)
3 µl nukleasefreies H₂O

Reaktionsansatz 2 für eine Probe:

2 µl DTT (0,1M)
0,5 µl RiboLock (RNase-Inhibitor)
5 µl First Strand buffer (5 x)
0,5 µl M-MLV-RT (200 U/µl)
2 µl nukleasefreies H₂O

3.4.2 QUANTITATIVE ECHTZEIT-PCR (QPCR)

Die hierfür benötigten Komponenten waren alle im ABsolute™QPCR SYBR®Green Mix (Thermo Fisher Scientific) enthalten. Für die RT-qPCR wurden 0,5 µl cDNA (siehe 3.4.1) in 6 µl H₂O (20 - 80 ng/Reaktion) und für die ChIP-qPCR 0,6 µl aufgereinigtes Chromatin in 6 µl H₂O (siehe 3.5.14) eingesetzt. Der Mix wurde nach Herstellerangaben unter Verwendung von 5 pmol jedes Primers (fwd und rev) pro Reaktion in einem Gesamtreaktionsvolumen von 25 µl eingesetzt. Die Durchführung der PCR erfolgte im 96-Lochplatten-Format mit dem Mx3000 (Stratagene). Jede Probe wurde grundsätzlich in Triplikaten gemessen. Die initiale Aktivierung der *hot-start*-Polymerase erfolgte für 15 min bei 95°C. Es schlossen sich 30 - 45 Zyklen des folgenden Temperaturprogrammes an: 15 sec 95°C, 20 sec 60°C, 15 sec 72°C. Die PCR endete mit der Aufnahme der Schmelzkurve über einen Temperaturbereich von 55 - 95°C.

Die Ct-Werte wurden durch die MxPro-Software (Stratagene) ermittelt. Als Ct-Wert (*cycle of threshold*) wird der Wert bezeichnet, bei dem die Fluoreszenz den Schwellenwert (*threshold*) überschreitet. Die relative Quantifizierung der Daten erfolgte anhand der $\Delta\Delta$ Ct-Methode (Livak and Schmittgen 2001; Pfaffl 2001). Hierbei erfolgte die Normierung der Zielgen-Expression jeder Probe auf die eines nicht regulierten, konstant exprimierten Haushaltsgens (*GAPDH*, *S14*).

Um verschiedene Experimente miteinander vergleichen zu können, wurde aus den ΔCt -Werten beider Bedingungen (z.B. *knockdown* und Kontrolle) der $\Delta\Delta Ct$ -Wert gebildet. Der Expressionsunterschied (relative Expression zur Kontrolle) zwischen beiden Bedingungen ergibt sich aus $2^{-\Delta\Delta Ct}$.

$$\Delta Ct = Ct_{Zielgen} - Ct_{Haushaltsgen}$$

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{knockdown} - \Delta Ct_{Kontrolle}$$

$$relative\ Expression = 2^{-\Delta\Delta Ct}$$

Die Fehlerberechnung der Messung erfolgte nach dem Fehlerfortpflanzungsgesetz und wurde als relative Standardabweichung ($s_{relativ}$) mit der angegebenen Formel bestimmt.

$$s_{relativ} = 2^{-\Delta\Delta Ct} \times \ln 2 \times \sqrt{(s_{knockdown}^2 + s_{Kontrolle}^2)}$$

Der Anteil an immunpräzipitiertem Chromatin wurde entweder relativ zur eingesetzten Chromatinmenge (% Input) oder relativ zu einem Kontrollantikörper (relative Anreicherung IgG) angegeben und errechnete sich unter der Voraussetzung von 1 % Input und gleichen Verdünnungen der Proben wie folgt.

$$\% Input = \frac{1}{2^{(Ct_{Probe} - Ct_{Input})}}$$

$$relative\ Anreicherung\ IgG = \frac{1}{2^{(Ct_{Probe} - Ct_{IgG})}}$$

Die Ermittlung der Standardabweichung erfolgte anhand folgender Berechnung.

$$s_{relativ} = \% Input \times \ln 2 \times \sqrt{(s_{Probe}^2 + s_{Input}^2)}$$

$$s_{relativ} = relative\ Anreicherung\ IgG \times \ln 2 \times \sqrt{(s_{Probe}^2 + s_{IgG}^2)}$$

3.5 PROTEINBIOCHEMISCHE METHODEN

3.5.1 HERSTELLUNG VON GESAMTZELLYSATEN

Isolierung von Gesamtprotein für Coimmunpräzipitation und Western Blot-Analysen (IPH-Extrakt)

Die folgenden Angaben beziehen sich auf die Zellmenge einer konfluenten 145 cm² Gewebekulturschale. Zunächst wurden die Zellen zweimal mit kaltem PBS gewaschen, anschließend mit einem Zellschaber abgeschabt und bei 300 x g für 5 min bei 4°C pelletiert. Das Pellet wurde in 400 µl IPH-Puffer mit Protease-Inhibitoren resuspendiert und bei 4°C unter Rotation für 30 min lysiert. Anschließend wurde für 15 min bei 17000 x g zentrifugiert, der Überstand in einem neuen Reaktionsgefäß mit 10 % Glycerin versetzt und bei -20°C aufbewahrt. Für Protein-Protein-Interaktionsstudien wurde vor der Zentrifugation ein Benzonaseverdau durchgeführt.

Dafür wurde der Extrakt mit 125 - 250 U Benzonase und 10 mM MgCl₂ versetzt und für 2 h bei 4°C unter Rotation inkubiert und anschließend zentrifugiert.

IPH-Puffer: 50 mM Tris pH 8,0; 150 mM NaCl; 5 mM EDTA; 0,5 % NP-40

Isolierung von Gesamtprotein und Histonen für Western Blot-Analysen (FT-Lyse)

Für den Nachweis Chromatin-assoziiierter Proteine (Histone) wurden die Proteine im FT-Lyse-Puffer und mit Hilfe von schnellem Einfrieren und Auftauen extrahiert (FT = *freeze and thaw lysis*). Die folgenden Angaben beziehen sich auf die Zellmenge einer konfluenten 21 cm² Gewebekulturschale. Die Zellen wurden zweimal mit kaltem PBS gewaschen, mit einem Zellschaber abgeschabt und bei 4°C und 10000 x g pelletiert. Das Zellpellet wurde je nach Größe in 40 - 80 µl FT-Lyse-Puffer mit Protease-Inhibitoren resuspendiert und gevortext. Nun wurden die Lysate in flüssigem Stickstoff eingefroren, auf Eis aufgetaut und gevortext. Dieser Vorgang wurde noch zweimal wiederholt. Anschließend wurden 10 mM MgCl₂ und 125 - 250 U Benzonase zugegeben und bei RT für 30 - 45 min inkubiert. Nach abschließender Zentrifugation für 2 min bei 17000 x g und 4°C wurden die Lysate bei -20°C gelagert.

FT-Lyse-Puffer: 600 mM NaCl, 20 mM Tris pH 7,8, 20 % Glycerin

3.5.2 PROTEINKONZENTRATIONSBESTIMMUNG NACH BRADFORD

Für eine Proteinkonzentrationsbestimmung wurde die Methode nach Bradford angewendet (Bradford 1976). Dabei korreliert die Verschiebung des Absorptionsmaximums von Coomassie Brilliant Blau von 470 nm nach 595 nm mit der Bindung an Proteine. In Halbmikroküvetten wurden 100 µl H₂O bidest vorgelegt und 1 µl der Proteinprobe hinzupipettiert. Nach Zugabe von 900 µl Bradford-Lösung wurde die Absorption bei 595 nm photometrisch nach Abgleich mit einer Probe ohne Protein bestimmt. Mit Hilfe einer, anhand von bekannten BSA-Konzentrationen erhaltenen, Eichgerade wurde die Proteinkonzentration der Proben berechnet.

Bradford-Lösung: 0,01 % (w/v) Coomassie Brilliant Blau G-250, 4,75 % (v/v) Ethanol abs.,
8,5 % (v/v) Phosphorsäure

3.5.3 COIMMUNPRÄZIPITATION

Für die Untersuchung von Protein-Protein-Interaktionen wurde eine Coimmunpräzipitation durchgeführt. Dabei wurde ein Protein durch den spezifischen Antikörper gebunden und anschließend mittels Protein A und G Sepharose präzipitiert. Im Anschluss an eine SDS-PAGE konnte das präzipitierte Protein und potentielle Interaktionspartner mittels Western Blot-Analyse nachgewiesen werden. Als Negativkontrolle wurde parallel eine Immunpräzipitation mit einem Kontrollantikörper (IgG) der gleichen Spezies durchgeführt.

Zunächst wurden die Zellen wie unter 3.5.1 beschrieben, lysiert und einem Benzonaseverdau unterzogen um DNA vermittelte Interaktionen auszuschließen. Anschließend wurde pro Immunpräzipitation 1 mg Extrakt eingesetzt und bei unterschiedlichen Proteinkonzentrationen das Volumen mit IPH-Puffer angeglichen. Das Gesamtvolumen eines Ansatzes betrug jedoch mindestens 600 µl. Bei Coimmunpräzipitationen aus präparativen Gelfiltrationsläufen wurden jeweils 90 % (≈ 5 ml) der gesammelten Fraktionen (siehe 3.5.4) eingesetzt und die Pufferbedingungen an IPH-Puffer angepasst. Nach Zugabe der Antikörper (1 - 4 µg/mg Protein) (siehe 2.6.1) erfolgte die Bindung an das Zielprotein ü.N. unter Rotation bei 4°C. Außerdem wurde die für die Bindung und Präzipitation des Antikörpers nötige Protein A und G Sepharose zur Verminderung unspezifischer Bindungen ü.N. mit 200 µg/ml BSA in IPH-Puffer abgesättigt. Es wurden 10 - 20 µl der geblockten Sepharose zu jedem Ansatz gegeben und für 2 h bei 4°C rotierend inkubiert. Danach wurde die Sepharose pelletiert und fünfmal mit IPH-Puffer gewaschen. Schließlich wurde die Sepharose in 4 x SDS-Probenpuffer aufgenommen, um die gebundenen Proteine zu eluieren, die dann mittels SDS-PAGE und Western Blot analysiert wurden (siehe 3.5.6 und 3.5.8 und 3.5.9).

3.5.4 ANALYTISCHE UND PRÄPARATIVE GELFILTRATION (GRÖßENAUSSCHLUSSCHROMATOGRAPHIE)

Aufgrund des Prinzips der Größenausschlusschromatographie oder Gelfiltration eignet sich diese Methode zur Untersuchung von Proteinkomplex- und Proteingrößen. Im Rahmen dieser Arbeit wurden Säulen aus Superose6 im analytischen und präparativen Maßstab genutzt. Dieses Material weist eine gute Trennleistung im Molekulargewichtsbereich von 5 kDa bis 5 MDa auf. Zur besseren Auftrennung im Molekulargewichtsbereich von 10 bis 900 kDa wurde eine präparative Superdex 200 Gelfiltrations-säule verwendet.

Um die Säulen nicht zu verstopfen wurden hochmolekulare Nukleinsäuren durch Benzonaseverdau entfernt und die Extrakte vor dem Beladen der Säule für 15 min bei 17000 x g zentrifugiert. Zusätzlich wurden alle Puffer und Lösungen vor Gebrauch mit einem *bottle-top* Filter (Porengröße 0,22 µm) filtriert. Vor den Gelfiltrationsläufen wurden die Säulen mit zwei Säulenvolumina Gelfiltrationspuffer äquilibriert.

Um eine optimale Auflösung bei der Auftrennung zu erhalten, sollte das Volumen der aufzutragenden Probe 2 % vom Säulenvolumen nicht übersteigen. Die analytischen Säulen (24 ml) wurden mit 100 µl Probe und einem 100 µl Probenloop beladen, während für die Beladung der präparativen Säule (120 ml) 2 ml Probe, unter Nutzung eines 2 ml Probenloops, eingesetzt wurden. Die Konzentration der Proteinlysate lag zwischen 3 und 5 mg/ml. Die Gelfiltrationsläufe der analytischen Säulen erfolgten bei einer Flussrate von 0,3 - 0,5 ml/min, bei einem Druck von 1,2 MPa, wobei der Maximaldruck der Säule bei 1,5 MPa lag. Es wurden die Fraktionen 8 bis 18 mit einem Volumen von 1 ml gesammelt und 50 % davon zur Analyse ankonzentriert (siehe 3.5.5). Die Gelfiltrationsläufe mit der präparativen Säule erfolgten bei einer Flussrate von 0,7 ml/min und einem Druck von 0,3 MPa, wobei hier der Maximaldruck bei 0,4 MPa lag. Die Fraktionsgrößen betragen 6 ml, wovon 5 % pro Fraktion zur Western Blot-Analyse ankonzentriert und 90 % für Coimmunpräzipitationen eingesetzt wurden.

Gelfiltrationspuffer: 20 mM Tris pH 8,0, 10 % Glycerin, 175 mM NaCl,
0,5 mM DTT, 1 mM PMSF

3.5.5 KONZENTRIEREN VON PROTEINEN MIT STRATACLEAN RESIN

Die Proteinlösung wurde mit der nötigen Menge StrataClean Resin (max. Bindungskapazität 10 µg/µl Resin) versetzt und 20 min bei RT rotierend inkubiert. Anschließend wurde die Probe für 2 min bei 2900 x g zentrifugiert, der Überstand verworfen und die Beads in SDS-Probenpuffer aufgenommen.

METHODEN

Coomassie-Färbung

Der Farbstoff Coomassie Brilliant Blau kann, durch Bindung an basische und aromatische Seitenketten von Aminosäuren, die mittels SDS-PAGE aufgetrennten Proteine anfärben (Neuhoff *et al.* 1988). Im Anschluss an die Elektrophorese wurde das Gel für 1 h in der Färbelösung bei RT inkubiert. Zum Entfärben des Gels wurde diese solange in Entfärbelösung geschwenkt, bis der Hintergrund vollständig entfärbt war.

Färbelösung: 25 % (v/v) Ethanol, 10 % (v/v) Essigsäure,
0,25 % (w/v) Coomassie Brilliant Blau G-250

Entfärbelösung: 25 % (v/v) Ethanol, 10 % (v/v) Essigsäure

3.5.8 WESTERN BLOT VERFAHREN

Nach der Auftrennung der Proteine mittels SDS-PAGE wurden diese elektrophoretisch auf eine PVDF-Membran übertragen und nichtkovalent immobilisiert. Die Membran wurde dafür zunächst für 15 sec in Methanol und anschließend für 5 min in Transferpuffer äquilibriert. Der Transfer erfolgte im Nass- oder Halbtrocken-Verfahren. Beim Aufbau war darauf zu achten, dass sich zwischen den einzelnen Komponenten keine Luftblasen bildeten.

Nass (Tank)-Blot Verfahren

Der Aufbau des Blots erfolgte in einem Plastikrahmen von der Anode (+) zur Kathode (-) in folgender Reihenfolge: 1 Schwamm, 2 Whatman-Papiere, PVDF-Membran, Gel, 2 Whatman-Papiere, 1 Schwamm. Der Transfer erfolgte in einer Blot-Kammer des Mini-Protean Systems von Bio-Rad in Transferpuffer bei 45 V für 90 min. Die Blot-Dauer für Histone wurde auf 45 min verkürzt.

Transfer-Puffer: 20 % (v/v) 10 x SDS-Laufpuffer (siehe 3.5.6), 20 % (v/v) Methanol

Halbtrocken (Semi-Dry)-Blot Verfahren

Diese Methode wurde bei Proteingelen eingesetzt, die wegen ihrer Größe nicht für das Mini-Protean System geeignet waren. Hierbei erfolgte der Aufbau horizontal von der Anode (Basis) zur Kathode (Deckel) des Semi-Dry-Blot-Gerätes (Roth) wie folgt: 3 Whatman-Papiere, PVDF-Membran, Gel, 3 Whatman-Papiere. Der Transfer wurde bei 1 - 2 mA pro cm² Gelfläche für 90 min durchgeführt.

Transfer-Puffer: 25 mM Tris, 150 mM Glycin, 10 % (v/v) Methanol, pH 8,3

3.5.9 IMMUNDETEKTION

Diese Methode dient der Detektion von Proteinen auf der Membran mit Hilfe spezifischer Antikörper. Zuerst wurden unspezifische Bindungsstellen auf der Membran durch Inkubation in Blockierlösung für 1 h abgesättigt. Anschließend wurde die Membran mit dem Primärantikörper (siehe 2.6.1, Verdünnung in Blockierlösung) für 2 h bei Raumtemperatur oder ü.N. bei 4°C inkubiert. Es folgten drei Waschschrte mit TBS-T für je 10 min um nicht gebundenen Antikörper zu entfernen. Die Membran wurde mit dem entsprechenden HRP-konjugierten Sekundärantikörper (1:5000 Verdünnung in Blockierlösung) für 1 h bei RT inkubiert. Nach weiteren drei Waschschrten mit TBS-T und einem Waschschrte mit TBS erfolgte die Detektion der Proteine durch Chemilumineszenz mittels selbst hergestellter ECL (*enhanced chemiluminescence*)-Lösung. Dazu wurden 10 ml Lösung 1 und 10 ml Lösung 2 vor dem Entwickeln gemischt und die Membran darin für 1 min inkubiert. Die Oxidation von Luminol zu einem instabilen Zwischenprodukt, welches unter Abgabe von Licht zerfällt, konnte mit einem Röntgenfilm detektiert und in einem X-Omat 2000 (Kodak) entwickelt werden.

Blockierlösung: 4 % Milchpulver in TBS, 0,5 % (v/v) Tween 20

TBS-T: TBS, 0,5 % (v/v) Tween 20

ECL-Lösung 1: 100 mM Tris pH 8,5, 0,03 % H₂O₂

ECL-Lösung 2: 100 mM Tris pH 8,5, 0,4 mM β-Coumarsiurelösung (90 mM in DMSO),
2,5 mM Luminollösung (250 mM in DMSO)

3.5.10 PRÄPARATION VON GST-FUSIONSPROTEINEN AUS BAKTERIEN

Diese Methode zur Aufreinigung von GST-Fusionsproteinen wurde zur Gewinnung von Enzymen für den Einsatz in Methylierungsassays angewendet. Nach Transformation des relevanten Plasmids in *E.coli* BL21 DE3 wurden diese in einer 25 ml LB/Glukose-Übernacktkultur kultiviert. Aus dieser wurde eine 400 ml Kultur in LB/Glukose-Medium mit einer OD₆₀₀ von 0,1 angeimpft und diese bei 37°C im Bakterienackttler kultiviert bis eine OD von 0,6 erreicht war. Nun wurde die Expression des GST-Fusionsproteins durch Zugabe von 1 mM IPTG induziert. Nach weiteren 3 h Kultivierung im Bakterienackttler wurden die Bakterien für 20 min bei 4°C und 3000 x g pelletiert und in 10 ml PBS/Triton X-100 mit Protease-Inhibitoren resuspendiert. Zum Aufschließen der Bakterien wurde die Suspension fünfmal für 30 sec mit einer Amplitude von 20 % sonifiziert und dabei auf Eis gekühlt. Die Zellrückmer wurden bei 2000 x g für 15 min abzentrifugiert und der Überstand in einem neuen Reaktionsgefäß mit 300 µl Glutathion-Sepharose versetzt für 2 h bis ü.N. bei 4°C unter Rotation inkubiert. Die Sepharose wurde bei 300 x g für 5 min bei 4°C pelletiert und viermal mit je 20 ml PBS/Triton X-100 und einmal mit 20 ml PBS gewaschen. Zur Elution wurde die Sepharose mit 300 µl

METHODEN

Elutionspuffer versetzt und für 30 min bei 4°C unter Rotation inkubiert. Der Überstand wurde anschließend bei 4°C ü.N. gegen PBS mit 10 % Glycerin dialysiert und dann bei -80°C aufbewahrt.

LB/Glukose-Medium: LB (siehe 2.1) mit 2 % Glukose und Antibiotika (Ampicillin 50 µg/ml)

PBS/Triton X-100: 1 x PBS mit 1 % Triton X-100

Elutionspuffer: 50 mM Tris pH 8,0, 25 mM Glutathion, pH 8,0

3.5.11 *IN VITRO* METHYLIERUNGSASSAY UND FLUOROGRAPHIE

Der *in vitro* Methylierungsassay diente der Charakterisierung der enzymatischen Aktivität von Protein-Arginin-Methyltransferasen (PRMTs) bezüglich verschiedener Substrate. Als Methylgruppendifferenzierung wurde radioaktiv markiertes S-Adenosyl-L-[methyl-¹⁴C]-Methionin (¹⁴C-SAM) eingesetzt, wobei die Übertragung der Methylgruppe auf ein Substrat (z.B. Histon) fluorographisch nachgewiesen werden konnte. Als Enzymquelle dienten rekombinante PRMTs aus *E.coli* (siehe 3.5.10). Ein Methylierungsassay folgender Zusammensetzung erfolgte bei 30°C im Wasserbad für 2 h und wurde durch Zugabe von 4 x SDS-Probenpuffer (siehe 3.5.6) gestoppt.

Methylierungsansatz: 10 µg Histon rek. (Substrat)
2 µl ¹⁴C-SAM (Methylgruppendifferenzierung)
20 µl PRMT (dialysiertes Enzym)
ad 40 µl PBS

Nach gelelektrophoretischer Auftrennung der methylierten Proteine mit SDS-PAGE wurden diese auf eine PVDF-Membran übertragen. Die Membran wurde anschließend getrocknet und in einer Filmkassette mit einem Intensifying Screen wurde ein Röntgenfilm (Amersham Hyperfilm MP) für 1 - 4 Tage exponiert und danach in einem X-Omat 2000 (Kodak) entwickelt.

3.5.12 AUFREINIGUNG VON PRMT6 MITTELS 2-SCHRITT *TANDEM AFFINITY PURIFICATION*-TAG STRATEGIE

Zur Identifikation von Interaktionspartnern von PRMT6 wurde die im Folgenden beschriebene 2 - Schritt Aufreinigungsstrategie über einen sogenannten *Tandem Affinity Purification* (TAP)-Tag angewandt. Der TAP-Tag besteht aus einem Streptavidin-Bindungspeptid (SBP) und einem Calmodulin-Bindungspeptid (CBP). Für die Aufreinigung von TAP-PRMT6 aus MCF7 Zellen, die TAP-PRMT6 stabil überexprimieren, wurden Zellen von 40 Gewebekulturschalen (145 cm²) eingesetzt. Diese wurden in Pellets zu je 10 Gewebekulturschalen bei -80°C bis zum Tag der Aufreinigung aufbewahrt. Parallel erfolgte die Aufreinigung aus Kontrollzellen ohne PRMT6

Überexpression, mit der gleichen Zellmenge als Ausgangsmaterial. Das Protokoll wurde in Anlehnung an (Keefe *et al.* 2001) und (Zheng *et al.* 1997) und basierend auf Arbeiten der Diplomarbeit von Kristin Schnabel optimiert.

1. Schritt: Aufreinigung durch Bindung an Streptavidin-Sepharose

Zunächst wurden je vier Zellpellets (4 x 10 Gewebekulturschalen 145 cm²) aus MCF7 pNTAP-PRMT6 #11 und MCF7 pNTAP-LV #5 auf Eis aufgetaut, in je 6 ml Lysepuffer resuspendiert und 10 min auf Eis inkubiert. Der Zellaufschluss wurde durch 20-maliges Pottern mit der Pistille Typ A vervollständigt. Anschließend wurde das Lysat mit 500 U Benzonase und 5 mM MgCl₂ bei 4°C unter Rotation für 1 h inkubiert. Zelltrümmer wurden bei 2000 x g und 4°C für 15 min pelletiert. Der Überstand wurde mit 500 µl Streptavidin-Sepharose, die zweimal mit Waschpuffer gewaschen wurde, und 5 mM β-Mercaptoethanol versetzt. Die Bindung der SBP-gekoppelten Proteine an Streptavidin-Sepharose erfolgte ü.N. bei 4°C unter Rotation. Anschließend wurde bei 300 x g für 5 min abzentrifugiert, der Überstand zur Kontrolle der Depletion aufbewahrt und das Sepharose-Pellet mit den daran gebundenen Proteinen achtmal mit je 1 ml Waschpuffer gewaschen. Nun wurde durch die Zugabe von 1 ml Elutionspuffer und 15 min Inkubation unter Rotation bei 4°C die Bindung zwischen dem Streptavidin-Bindungspeptid und Streptavidin-Sepharose gelöst. Dabei wurde durch die hochaffine Bindung von Biotin an Streptavidin-Sepharose das SBP-gekoppelte Protein verdrängt und freigesetzt. Anschließend wurde die Streptavidin-Sepharose abzentrifugiert und der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Der Elutionsschritt wurde zweimal wiederholt und die Eluate vereinigt (3 ml). Die Eluate dienten als Ausgangsmaterial für den 2. Schritt der Aufreinigung über Calmodulin-Sepharose.

Lysepuffer: 50 mM Tris pH 7,5, 300 mM KCl, 2 mM MgCl₂, 1 mM EDTA, 0,5 % NP40,
0,1 % Triton X-100, frisch: Protease-Inhibitoren, 5 mM β-Mercaptoethanol

Waschpuffer: 50 mM Tris pH 7,5, 300 mM KCl, 0,1 % Triton X-100,
frisch: 5mM β-Mercaptoethanol

Elutionspuffer: 50 mM Tris pH 7,5, 300 mM KCl, 0,1 % Triton X-100, 2 mM Biotin,
frisch: 5 mM β-Mercaptoethanol

2. Schritt: Aufreinigung durch Bindung an Calmodulin-Sepharose

Die Eluate aus dem 1. Aufreinigungsschritt wurden zunächst durch Zugabe des gleichen Volumens an CBP-Auffüllpuffer auf neue Pufferbedingungen (50 mM Tris pH 7,5, 150 mM KCl, 1 mM MgCl₂, 2 mM CaCl₂, 10 mM β-Mercaptoethanol) eingestellt. Anschließend wurde zu jedem Ansatz 250 µl Calmodulin Sepharose, die zuvor zweimal mit Waschpuffer 1 gewaschen wurde, zugegeben. Die

METHODEN

Bindung der TAP-konjugierten Proteine über das Calmodulin-Bindungspeptid an Calmodulin-Sepharose erfolgte für 2 h bei 4°C unter Rotation. Anschließend wurde die Sepharose bei 300 x g zentrifugiert, der Überstand für Western Blot-Analysen aufbewahrt und das Calmodulin-Sepharose-Pellet mit den gebundenen Proteinen zuerst zweimal mit je 1 ml Waschpuffer 1 und danach dreimal mit je 1 ml Waschpuffer 2 gewaschen. Die Elution erfolgte durch Zugabe von 500 µl Elutionspuffer und 20 min Inkubation unter Rotation. Dieser Schritt wurde einmal wiederholt und die Eluate vereinigt (1 ml). Dabei wurde die durch Calcium stabilisierte Bindung des Calmodulin-Bindungspeptids mit Calmodulin-Sepharose durch Zugabe des Calcium-Chelators EGTA zerstört.

Die vereinigten Eluate wurden mit je 30 µl StrataClean Resin (siehe 3.5.5) ankonzentriert und nach Zugabe von 4 x SDS-Probenpuffer mittels SDS-PAGE in einem großen Gel bei 45 mA für 4 h aufgetrennt (siehe 3.5.6).

CBP-Auffüllpuffer: 50 mM Tris pH 7,5, 2 mM MgCl₂, 4 mM CaCl₂,
15mM β-Mercaptoethanol

Waschpuffer 1: 50 mM Tris pH 7,5, 150 mM KCl, 1 mM MgCl₂, 2 mM CaCl₂,
frisch: 10 mM β-Mercaptoethanol

Waschpuffer 2: 50 mM Tris pH 7,5, 150 mM KCl, 1 mM MgCl₂, 0,1 mM CaCl₂,
frisch: 10 mM β-Mercaptoethanol

Elutionspuffer: 50 mM Tris pH 7,5, 150 mM KCl, 1 mM MgCl₂, 2 mM EGTA,
frisch: 10mM β-Mercaptoethanol

3.5.13 MASSENSPEKTROMETRISCHE ANALYSE

Für die massenspektrometrische Identifikation potentieller Interaktionspartner wurden schmale Banden aus einem colloidal Coomassie gefärbten Gel ausgeschnitten und in 0,2 ml H₂O bidest bis zur Analyse bei -20°C aufbewahrt. Dafür wurde der zu untersuchende Gelabschnitt in 66 schmale Banden aufgeteilt. Alle weiteren Schritte und die Analyse wurden von Dr. Eberhard Krause am Leibniz-Institut für Molekulare Pharmakologie in Berlin mittels NanoLC-ESI-MS/MS (LTQ Orbitrap LX) durchgeführt. Die Zusammenfassung und Auswertung der Ergebnisse für die TAP-PRMT6-Aufreinigung erfolgte mit Scaffold 2.1.03 und mit Scaffold 2.2.1 für die Kontroll-Aufreinigung (www.proteomesoftware.com).

3.5.14 CHROMATIN-IMMUNPRÄZIPITATION (CHIP)

Mittels Chromatin-Immunpräzipitation kann die Bindung von Proteinen an bestimmte DNA-Abschnitte nachgewiesen werden. Zur ChIP-Analyse wurden die Zellen auf 145 cm² Gewebekulturschalen kultiviert und entsprechend des experimentellen Vorhabens, wie unter 3.1.5 und 3.1.7 beschrieben, behandelt.

Vernetzung und Chromatinpräparation: Zunächst wurde die DNA mit den gebundenen Proteinen durch Zugabe von 1 % Formaldehyd für 10 min bei RT kovalent verknüpft. Die Vernetzung (*Crosslinking*) wurde durch die Zugabe von 125 mM M Glycin für 5 min bei RT abgestoppt. Die Zellen wurden zweimal mit kaltem PBS gewaschen, in 1 ml PBS abgeschabt und für 5 min bei 300 x g pelletiert. Anschließend wurde das Zellpellet in Lysepuffer 1 (1 ml für 3 x 145 cm² Schalen) resuspendiert, für 20 min auf Eis inkubiert und anschließend erneut zentrifugiert. Das Zellkern-Pellet wurde in Lysepuffer 2 (1 ml für 3 x 145 cm² Schalen) aufgenommen, 10 min auf Eis inkubiert und in 15 ml Reaktionsgefäßen zu je 1 ml aliquotiert. Anschließend wurde das Chromatin durch Sonifizieren fragmentiert. Die Bedingungen beim Sonifizieren wurden für die verwendeten Zelllinien optimiert.

MCF7	60 x 1 sec mit 3 sec Pause, Amplitude 20 %
NT2/D1	80 x 1 sec mit 3 sec Pause, Amplitude 20 %
Tig3-T	100 x 1 sec mit 3 sec Pause, Amplitude 30 %

Um zu starkes Erwärmen des Chromatins zu vermeiden, wurden die Proben in einem Eis-Wassergemisch gekühlt. Das Chromatin wurde ü.N. auf Eis aufbewahrt. Zum Überprüfen der Chromatin-Fragmentgröße wurden die Fraktionen wieder vereinigt, je 50 µl davon mit 20 µg RNase A und 20 µg Proteinase K versetzt und das *Crosslinking* unter folgenden Bedingungen revertiert: 3 h bei 55°C und weitere 2 h für 65°C. Anschließend wurden 10 µl des Chromatins in einem 1 %igen Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt. Die Größe der DNA-Fragmente sollte zwischen 200 und 1000 bp liegen. Um die DNA-Konzentrationen der Proben zu bestimmen (siehe 3.3.2), wurden 30 µl mittels QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen) aufgereinigt.

Absättigen der Protein-A/G-Sepharose: Pro Chromatin-Immunpräzipitation wurden 50 µl einer 1:1 Mischung aus Protein A und Protein G Sepharose benötigt. Die Gesamtmenge an Sepharose für ein Experiment wurde zweimal mit 10 ml Lysepuffer 2 gewaschen und mit 1 mg/ml BSA und 0,4 mg/ml Lachssperma-DNA ü.N. bei 4°C unter Rotation abgesättigt. Die Sepharose wurde dann zweimal mit Lysepuffer 2 gewaschen.

Vorreinigen des Chromatins: Um den Hintergrund bei der Immunpräzipitation zu minimieren, wurde das Chromatin mit der abgesättigten Sepharose (20 µl pro IP) versetzt und eine Stunde bei 4°C inkubiert (*Preclearing*). Danach wurde die Sepharose bei 300 x g für 5 min pelletiert und das Chromatin für die Immunpräzipitation verwendet.

METHODEN

Immunpräzipitation (IP): Das vorgereinigte Chromatin wurde gleichmäßig auf 1,5 ml Reaktionsgefäße verteilt (20 µg pro IP für Histonmodifikationen, 60 – 80 µg für alle anderen IPs) und die Antikörper dazupipettiert (siehe 2.6.1). Das Gesamtvolumen pro Immunpräzipitation sollte mindestens 500 µl betragen. Außerdem wurde pro Bedingung dreimal 1 % des eingesetzten Chromatins als *Input* abgenommen und auf Eis aufbewahrt. Die Immunpräzipitationsansätze wurden ü.N. bei 4°C rotierend inkubiert. Danach wurden 30 µl der abgesättigten Sepharose zu jeder IP gegeben und weitere 2 h rotierend bei 4°C inkubiert.

Waschen der IPs: Die Sepharose mit den gebundenen Proteinen wurde bei 300 x g zentrifugiert, der Überstand verworfen und anschließend zweimal mit Waschpuffer 1, zweimal mit Waschpuffer 2, zweimal mit Waschpuffer 3 und zweimal mit TE pH 8,0 gewaschen.

Elution des Chromatins und Aufhebung der Vernetzung: Um das Chromatin von der Sepharose zu lösen, wurde diese in 250 µl frischen Elutionspuffer aufgenommen und 15 min bei RT rotiert. Nach Zentrifugation der Sepharose wurden die Überstände in neue 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt. Die Elution wurde einmal wiederholt und die Überstände beider Elutionsschritte vereinigt. Die *Inputs* wurden ebenfalls mit 500 µl Elutionspuffer versetzt. Um die Quervernetzung zwischen den Proteinen und der DNA wieder aufzuheben wurde jede Probe mit 52 µl, frisch angesetztem Reversionspuffer versetzt und erst für 3 Stunden bei 55°C und dann ü.N. bei 65°C inkubiert.

Aufreinigung der DNA und PCR: Die DNA wurde mit dem QIAquick PCR Purification Kit von Qiagen gemäß den Herstellerangaben aufgereinigt. Die Elution erfolgte in 50 µl Qiagen EB-Puffer. Die ChIP-DNA wurde bei -80°C aufbewahrt. Die Auswertung der ChIP erfolgte mittels qPCR wie unter 3.4.2 beschrieben. Es wurden 0,6 µl DNA pro PCR-Reaktion eingesetzt.

<u>Glycin:</u>	2,5 M (pH nicht einstellen)
<u>Lysepuffer 1:</u>	5 mM PIPES pH 8,0, 85 mM KCl, 0,5 % (v/v) NP-40, Protease-Inhibitoren
<u>Lysepuffer 2:</u>	10 mM Tris pH 7,5, 150 mM NaCl, 1 % (v/v) NP-40, 1 % (w/v) Na-Deoxycholat, 0,1 % (w/v) SDS, 1 mM EDTA, Protease-Inhibitoren
<u>Waschpuffer 1:</u>	20 mM Tris pH 8,0, 150 mM NaCl, 2 mM EDTA, 0,1 % (w/v) SDS, 1 % (v/v) Triton X-100
<u>Waschpuffer 2:</u>	20 mM Tris pH 8,0, 500 mM NaCl, 2 mM EDTA, 0,1 % (w/v) SDS, 1 % (v/v) Triton X-100
<u>Waschpuffer 3:</u>	10 mM Tris pH 8,0, 250 mM LiCl, 1 mM EDTA, 1 % (v/v) NP-40, 1 % (w/v) Na-Deoxycholat
<u>TE-Puffer:</u>	10 mM Tris pH 8,0, 1 mM EDTA
<u>Elutionspuffer:</u>	100 mM Natriumhydrogencarbonat, 1 % (v/v) SDS
<u>Reversionspuffer:</u>	400 mM Tris pH 6,8, 2 M NaCl, 100 mM EDTA, 20 µg Proteinase K, 10 µg RNase A
<u>Lachssperma-DNA:</u>	4 - 6 mg/ml, sonifiziert

4 ERGEBNISSE

4.1 PRMT6 METHYLIERT ARGININE IN DEN N-TERMINI VON HISTONEN

Protein-Arginin-Methyltransferasen (PRMT) weisen vielseitige Substratspezifitäten auf und für einige Mitglieder dieser Enzymfamilie wurden bereits Methylierungsstellen in Histonen mit verschiedenen Funktionen beschrieben (Chen *et al.* 1999; Ma *et al.* 2001; Schurter *et al.* 2001; Strahl *et al.* 2001; Wang *et al.* 2001; Bauer *et al.* 2002; Pal *et al.* 2004; Lee *et al.* 2005a; Cook *et al.* 2006; Jelinic *et al.* 2006). Die Arbeiten von Dawin Hyllus aus unserer Gruppe führten zur Identifikation der genauen Methylierungsstellen von PRMT6 in den N-Termini der Histone H2A, H3 und H4. Mittels *in vitro* Methylierungsassay und anschließender Edman-Sequenzierung wurden Arginin 2 (R2) in Histon H3 und Arginin 3 (R3) in den Histonen H4 und H2A als Substrat für PRMT6 identifiziert. Die ermittelten Methylierungsstellen sollten im Rahmen dieser Arbeit hinsichtlich Spezifität und funktioneller Relevanz *in vivo* untersucht werden.

4.1.1 DIE METHYLIERUNG VON ARGININ 2 AM HISTON H3 IST SPEZIFISCH FÜR PRMT6

Zwei der identifizierten Arginine, die durch PRMT6 modifiziert werden, überlappen mit der Substratspezifität von anderen PRMTs. Es wurde gezeigt, dass PRMT1 R3 am Histon H4 asymmetrisch dimethyliert (Strahl *et al.* 2001; Wang *et al.* 2001) und für PRMT4 wurde auf eine geringe Methylierungsaktivität gegenüber dem R2 am Histon H3 geschlossen (Schurter *et al.* 2001). Um zwischen gemeinsamen Methylierungsstellen und PRMT6-spezifischen Methylierungsstellen zu unterscheiden, wurde ein *in vitro* Methylierungsassay mit rekombinanten GST-gekoppelten PRMTs als Enzymquelle durchgeführt. Als Substrat für PRMT4 und PRMT6 diente rekombinantes Histon H3 und für PRMT1 und PRMT6 rekombinantes Histon H4. Diese wurden zusammen mit dem radioaktivmarkierten Methylgruppendonor ^{14}C -SAM in der Methylierungsreaktion eingesetzt. Als Negativkontrollen wurden Methylierungsansätze ohne Substrat (Histon) mitgeführt. Die Ansätze wurden anschließend mittels SDS-PAGE aufgetrennt und mit verschiedenen Detektionsmethoden analysiert (siehe Abbildung 4). Die Coomassie-Färbung diente als Ladekontrolle für die eingesetzten Mengen an rekombinanten Histonen. Die Detektion mittels Autoradiographie (siehe Abbildung 4 oben) beweist, dass sowohl PRMT4 als auch PRMT6 rekombinantes Histon H3 *in vitro* methylieren, während in den Kontrollen kein Signal nachgewiesen werden konnte. Genau wie PRMT1 methyliert auch PRMT6 rekombinantes Histon H4 *in vitro*. Das heißt, dass die verwendeten PRMTs katalytisch aktiv waren. Die anschließende Western Blot-Analyse (Abbildung 4 Mitte), bei der die Methylierungsstellen mit Hilfe von spezifischen Antikörpern für die asymmetrische Dimethylierung

am R2 in Histon H3 (H3R2me2) und die asymmetrische Dimethylierung am R3 in Histon H4 (H4R3me2) nachgewiesen wurden, ergab, dass es sich bei der asymmetrischen R2 Dimethylierung am Histon H3 um eine spezifische Methylierungsstelle für PRMT6 handelt. Die Immundetektion des Methylierungsproduktes von PRMT4 ergab kein nachweisbares Signal, wobei das Methylierungsprodukt von PRMT6 deutlich detektierbar war. Im Gegensatz dazu handelt es sich bei der asymmetrischen Dimethylierung von R3 am Histon H4 um eine gemeinsame Methylierungsstelle von PRMT6 und PRMT1, da der spezifische Antikörper für H4R3me2 beide Produkte detektierte.

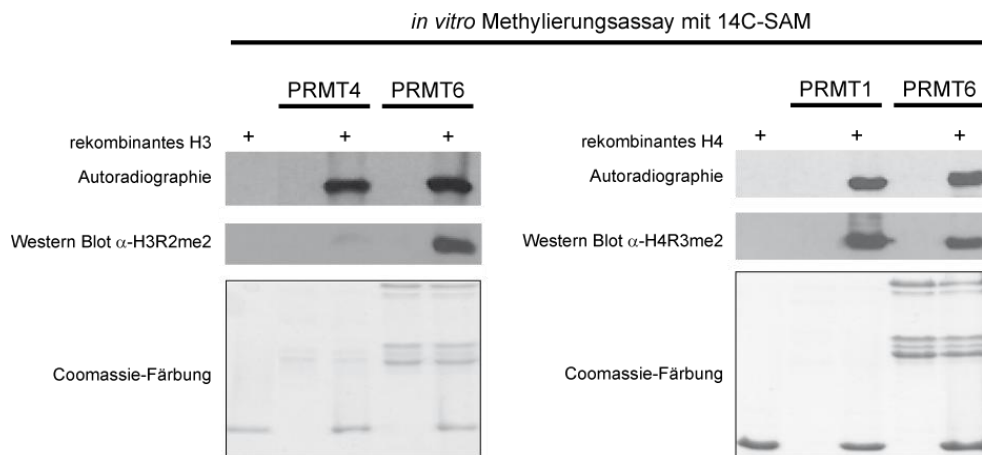


Abbildung 4: PRMT6 besitzt Histon-Methyltransferaseaktivität.

In vitro Methylierungsassay mit GST-PRMTs, rekombinanten Histonen als Substrat und ¹⁴C-markiertem SAM als Methylgruppendonor. Die Detektion der Methylierung erfolgte autoradiographisch und die Charakterisierung der Modifikation durch Western Blot-Analyse und Detektion mit Methylierungsstellen-spezifischen Antikörpern gegen H3R2me2 und H4R3me2. Die Coomassie-Färbung diente als Ladekontrolle für die eingesetzten Mengen an rekombinanten Histonen. Als Kontrolle für den Hintergrund der Methylierung wurden Methylierungsansätze ohne Substrat mitgeführt.

4.1.2 CHARAKTERISIERUNG DER HISTON-METHYLTRANSFERASEAKTIVITÄT VON PRMT6 *IN VIVO*

Im Folgenden sollte geklärt werden, ob es sich bei den identifizierten Methylierungsstellen für PRMT6 um relevante, funktionelle Modifikationen *in vivo* handelt. Dazu wurden MCF7 Zellen, die PRMT6 stabil überexprimieren (MCF7 TAP-PRMT6) mit Kontrollzellen (MCF7 TAP-Leervektor (LV)) verglichen. Da es sich bei dem Zellsystem um selektionierte Zelllinien handelt, wurden die Western Blot-Analysen, Immunfluoreszenzfärbungen, Genexpressions- und ChIP-Studien mit je zwei unterschiedlichen Zelllinien für die PRMT6 Überexpression (TAP-PRMT6 #11 und #18) und für die Kontrollzellen (TAP-LV #1 und #5) durchgeführt, um selektionsbedingte Effekte auszuschließen. Zunächst wurde die Überexpression von PRMT6 im verwendeten MCF7 Zellsystem auf Western Blot-Ebene unter Zuhilfenahme eines spezifischen Antikörpers gegen PRMT6 nachgewiesen (siehe Abbildung 5 A). Weiterhin konnte mittels RT-qPCR ein 20 - 60-facher Anstieg der relativen mRNA-Level für PRMT6 in den TAP-PRMT6 (#11, #18) Zellen im Vergleich zu den Kontrollzellen (#1, #5)

detektiert werden (siehe Abbildung 5 B). Außerdem zeigte sich bei der Detektion von PRMT6 mit Immunfluoreszenzfärbung unter Nutzung eines Cy3-gekoppelten Sekundärantikörpers (siehe Abbildung 5 C) eine moderate, gleichmäßige Überexpression von PRMT6 (rot), während die Kontrollzellen eine schwächere Färbung (rot), die endogenes PRMT6 repräsentiert, aufwiesen. Die DAPI-Färbung der DNA (blau) diente zur Detektion der Zellkerne.

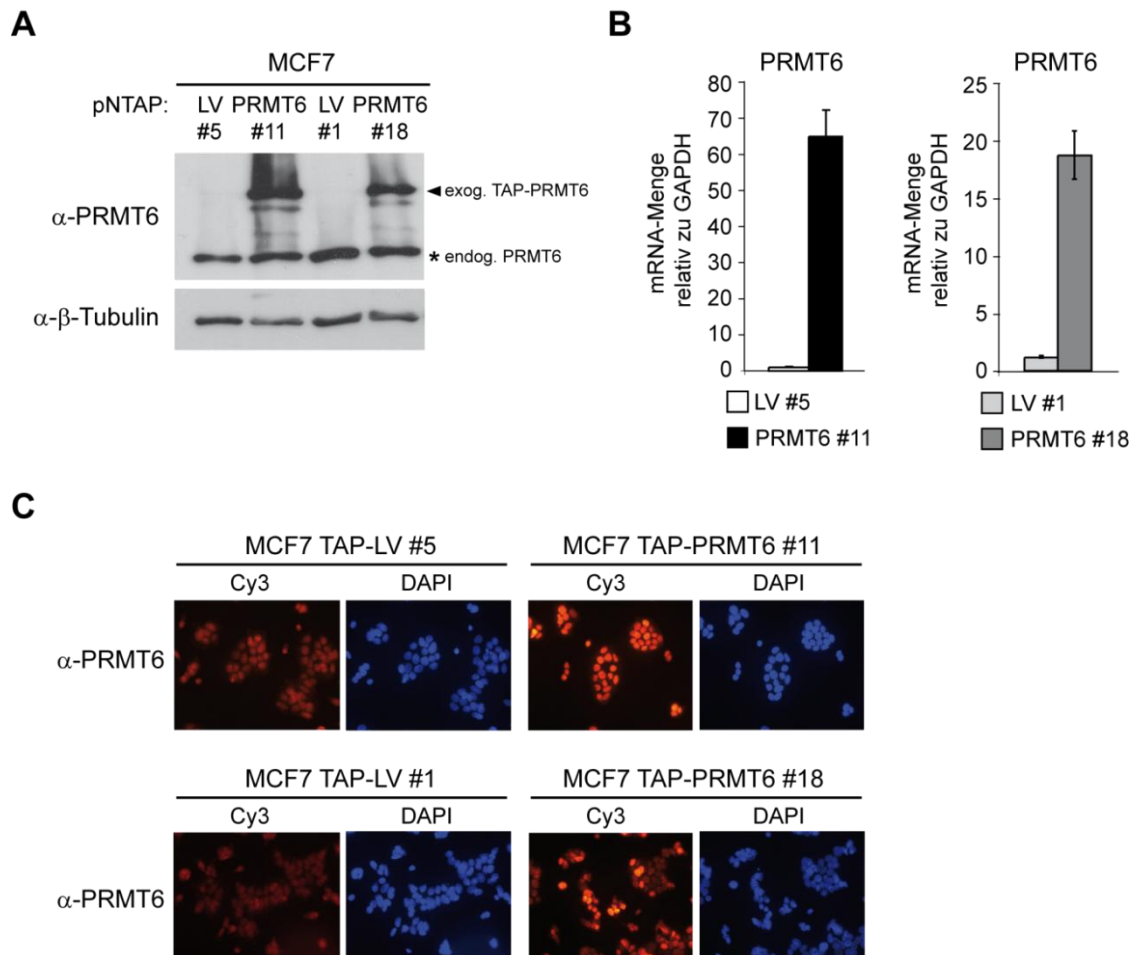


Abbildung 5: PRMT6 Überexpression in MCF7 Zellen.

Als Zellsystem für die Charakterisierung der Histon-Methyltransferaseaktivität *in vivo* dienten MCF7 Zellen die PRMT6 stabil überexprimieren MCF7 TAP-PRMT6 #11 oder #18 und die dazugehörigen Kontrollzellen MCF7 TAP-LV #5 oder #1. Die Überexpression wurde mittels Western Blot-Analyse (A), RT-qPCR (B) und Immunfluoreszenzfärbung (C), unter Verwendung der gleichen Vergrößerung (40-fach) und der gleichen Belichtungszeiten bei der Aufnahme der Bilder, überprüft.

Im Folgenden wurde das beschriebene Zellsystem verwendet, um zu untersuchen, ob die Überexpression von PRMT6 zu Veränderungen der Histonmodifikationen führt. Dazu wurden MCF7 TAP-PRMT6 (#11 und #18) und Kontrollzellen (#1 und #5) für Western Blot-Analysen mittels SDS-PAGE aufgetrennt und die globale H4R3 Dimethylierung mit dem spezifischen Antikörper visualisiert (siehe Abbildung 6). Hierbei konnten keine Unterschiede zwischen PRMT6 überexprimierenden Zellen und Kontrollzellen hinsichtlich der Mengen an H4R3me2 beobachtet werden.

ERGEBNISSE

Die Überexpression von PRMT6 hat, unter den gegebenen experimentellen Bedingungen, demzufolge keinen Einfluss auf die globale H4R3me2 Menge.

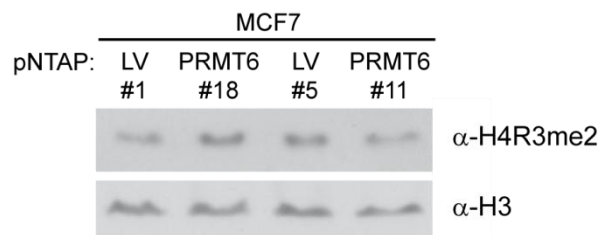


Abbildung 6: PRMT6 beeinflusst die globale Menge an H4R3me2 nicht.

Zur Untersuchung der H4R3me2 Spiegel in MCF7 TAP-PRMT6 und Kontrollzellen wurden 30 μ g FT-Lysat zur Western Blot-Analyse eingesetzt. Die Detektion erfolgte mit einem H4R3me2-spezifischen Antikörper. Die Färbung von H3 diente als Ladekontrolle.

Im Gegensatz dazu führte die Überexpression von PRMT6 (TAP-PRMT6 #11 und #18) zur Verstärkung der asymmetrischen H3R2 Dimethylierung im Vergleich zu Kontrollzellen (TAP-LV #1 und #5), wie die Western Blot-Analyse in Abbildung 7 A zeigt. Diese Beobachtung konnte durch Immunfluoreszenzfärbungen bestätigt werden. Hierbei wurden die fixierten Kontrollzellen (MCF7 TAP-LV #1 und #5) und die PRMT6 überexprimierenden Zellen (MCF7 TAP_PRMT6 #11 und #18) mit einem H3R2me2-spezifischen Primärantikörper und mit einem Cy3-gekoppelten Sekundärantikörper zur späteren Visualisierung (rot) inkubiert. Zur Detektion der Zellkerne wurde die DNA mit DAPI-angefärbt (blau). Unter Verwendung der gleichen Vergrößerung und gleicher Belichtungszeiten zeigte sich eine leicht verstärkte Färbung für die Dimethylierung am R2 (rot) am Histon H3 in den PRMT6 überexprimierenden Zellen (siehe Abbildung 7 B). Als nächstes sollte die Auswirkung einer siRNA-vermittelten Depletion von PRMT6 auf die H3R2 Dimethylierung überprüft werden. Hierzu wurden HEK293 Zellen 48 h nach Transfektion mit einer Kontroll-siRNA oder einer spezifischen siRNA gegen PRMT6 für Western Blot-Analysen lysiert. Die Depletion von PRMT6 auf Proteinebene und die damit einhergehende Reduktion der globalen asymmetrischen H3R2 Dimethylierung, verglichen mit Kontroll-transfizierten Zellen, ist in Abbildung 7 C gezeigt. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass PRMT6 die Hauptmethyltransferase für die asymmetrische Dimethylierung von R2 am Histon H3 ist.

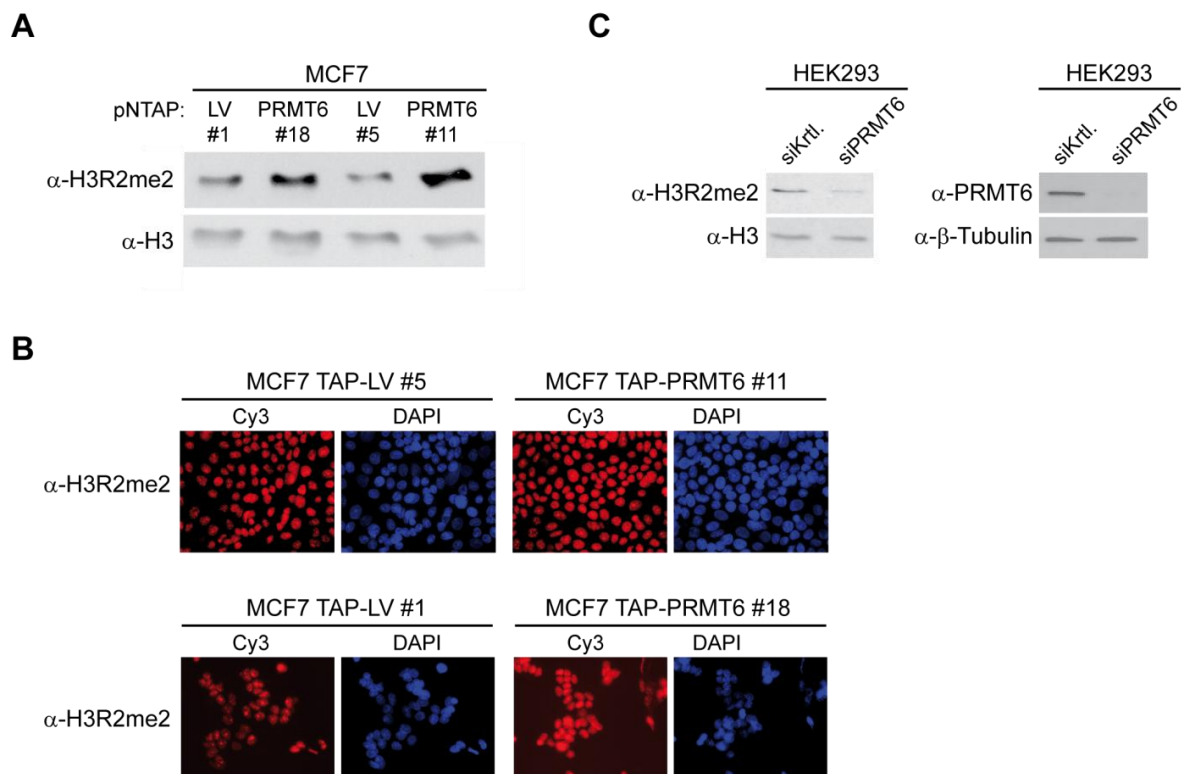


Abbildung 7: PRMT6 reguliert die H3R2 Dimethylierung *in vivo* global.

Zur Untersuchung der H3R2me2 Spiegel nach Überexpression von PRMT6 wurden (A) die Histone aus MCF7 TAP-PRMT6 und Kontrollzellen mittels FT-Lyse extrahiert und 30 µg zur Western Blot-Analyse eingesetzt. Die Detektion der Methylierung erfolgte mit dem H3R2me2-spezifischen Antikörper. Eine H3-Färbung diente als Ladekontrolle. (B) Immunfluoreszenzfärbung von MCF7 TAP-LV #5 und #1 und TAP-PRMT6 #11 und #18 Zellen mit einem H3R2me2-spezifischen Primärantikörper und einem Cy3-gekoppelten Sekundärantikörper für die Detektion. Die Aufnahme der Färbungen erfolgte bei einer 40-fachen Vergrößerung und bei gleichen Belichtungszeiten. (C) HEK293 Zellen wurden 48 h nach Transfektion mit siRNA gegen PRMT6 bzw. Kontroll-siRNA für Western Blot-Analysen geerntet. 30 µg FT-Lysat wurden zum Nachweis der Depletion von PRMT6 und der H3R2me2 eingesetzt. β-Tubulin und H3 dienten als Ladekontrollen.

4.1.3 PRMT6 KATALYSIERT VORZUGSWEISE DIE DIMETHYLIERUNG

Aufgrund der Tatsache, dass PRMTs sowohl die Monomethylierung als auch die Dimethylierung von Argininen katalysieren können, sollte die enzymatische Aktivität von PRMT6 diesbezüglich charakterisiert werden (Bedford and Richard 2005). Die Western Blot-Analyse von MCF7 Zellen mit einem Antikörper, der spezifisch die Monomethylierung von R2 am Histon H3 (H3R2me1) erkennt, ergab keine Veränderung dieser Modifikation durch die Überexpression von PRMT6 (siehe Abbildung 8). Dies deutet darauf hin, dass PRMT6 *in vivo* bevorzugt die Übertragung der zweiten Methyl-Gruppe an monomethyliertes H3R2 katalysiert.

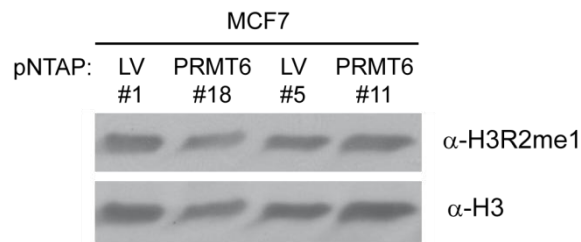


Abbildung 8: PRMT6 Überexpression bewirkt keine Änderung der H3R2 Monomethylierung.

Der Einfluss von PRMT6 auf die Monomethylierung von R2 am Histon H3 wurde mittels Western Blot-Analyse von 30 μ g FT-Lysat aus MCF7 TAP-PRMT6 und Kontrollzellen untersucht. Die Detektion der Methylierung erfolgte mit einem spezifischen Antikörper gegen die Monomethylierung von R2 am Histon H3. Die H3-Färbung diente als Ladekontrolle.

Diese Beobachtung wurde durch parallel durchgeführte *in vitro* Studien von Dawin Hyllus in unserer Gruppe bestätigt (Hyllus *et al.* 2007). Dabei konnte gezeigt werden, dass PRMT6 in *in vitro* Methylierungsassays eine verstärkte Aktivität gegenüber einem am R2 monomethylierten H3-Peptid, im Vergleich zum unmodifizierten Peptid aufwies. In Übereinstimmung damit wurde massenspektrometrisch nur dimethyliertes Produkt nachgewiesen, wenn das mit der Monomethylierung an R2 vormodifizierte Peptid als Substrat vorlag. Die Ergebnisse sprechen dafür, dass es sich bei der Dimethylierung am H3R2 durch PRMT6 eher um einen distributiven als einen prozessiven Mechanismus handelt.

4.1.4 DIE REGULATION DER H3R2 DIMETHYLIERUNG BERUHT AUF DER KATALYTISCHEN AKTIVITÄT VON PRMT6

Um zu testen, ob die katalytische Aktivität von PRMT6 für die Regulation der H3R2 Dimethylierung notwendig ist, wurden MCF7 und U2OS Zellen transient mit pMyc-PRMT6 wt, pMyc-PRMT6 mut und Kontrollvektor transfiziert und 24 h nach der Transfektion für Western Blot-Analysen bzw. auf Deckgläschen ausgesät. Weitere 24 h später wurden die Zellen geerntet bzw. fixiert. Während die Überexpression von PRMT6 wt zur Erhöhung der H3R2 Dimethylierung führte, resultierte die Überexpression der katalytisch inaktiven Mutante (PRMT6 mut) in H3R2me2 Spiegeln vergleichbar mit denen der Leervektorkontrolle (siehe Abbildung 9 A). Die Notwendigkeit der katalytischen Aktivität für die Erhöhung der H3R2 Dimethylierung wurde auch durch Immunfluoreszenzfärbungen bestätigt (siehe Abbildung 9 B). Zellen die PRMT6 wt überexprimieren (grün) weisen eine stärkere H3R2me2 (rot) -Färbung auf. Während die Überexpression der katalytisch inaktiven Mutante zu keiner Veränderung der H3R2 Dimethylierung verglichen mit nicht-transfizierten Zellen führte.

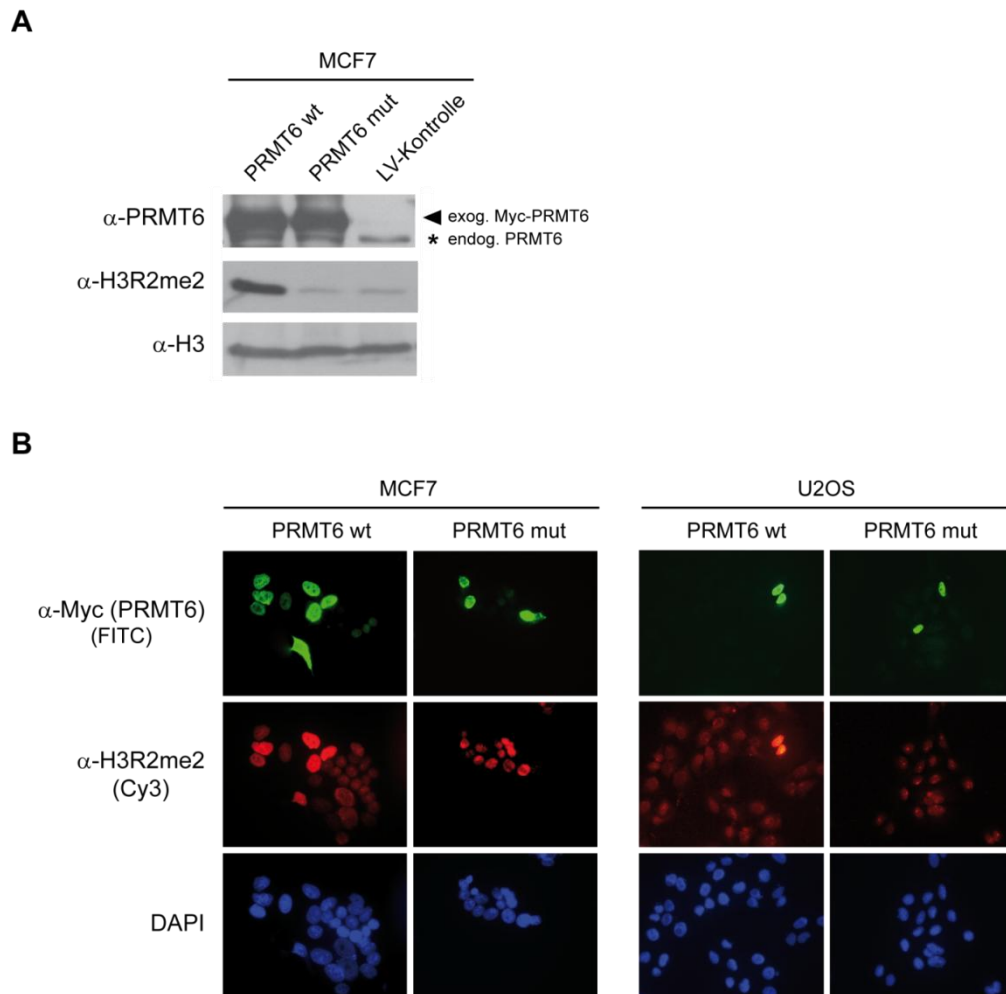


Abbildung 9: Die katalytische Aktivität von PRMT6 ist für die Regulation der asymmetrischen H3R2 Dimethylierung essentiell.

(A) MCF7 Zellen wurden mit pMyc-PRMT6 wt, pMyc-PRMT6 mut und einem Kontrollvektor transfiziert und 48 h später im Western Blot analysiert. Es wurden 15 µg FT-Lysat aufgetragen und PRMT6 (* endogen, ◄ exogen) mit einem PRMT6-spezifischen Antikörper nachgewiesen. Die Methylierung wurde mit Hilfe eines H3R2me2-spezifischen Antikörpers nachgewiesen. Die H3-Färbung diente als Ladekontrolle.

(B) MCF7 und U2OS Zellen wurden mit pMyc-PRMT6 wt, pMyc-PRMT6 mut und einem Kontrollvektor transfiziert und 24 h später auf Deckgläschen ausgesät. Nach weiteren 24 h wurden die Zellen für eine Immunfluoreszenzfärbung fixiert. Die Färbung für PRMT6 (grün) erfolgte mit einem Myc-Antikörper und einem FITC-gekoppelten Sekundäntikörper. Die Cofärbung der Methylierung (rot) erfolgte mit einem H3R2me2-spezifischen Antikörper und einem Cy3-gekoppeltem Sekundäntikörper. Die DNA wurde mit DAPI (blau) angefärbt. Die Bilder wurden mit 40-facher Vergrößerung und gleicher Belichtungszeit aufgenommen.

4.2 WECHSELWIRKUNG VON PRMT6 UND H3R2ME2 MIT DER AKTIVIERENDEN HISTONMODIFIKATION H3K4ME3

Posttranslationale Modifikationen an Histon N-Termini definieren abhängig von ihrer Art und Position aber auch von ihrer Kombination den Chromatinzustand und tragen damit zu unterschiedlichen transkriptionellen Ergebnissen, wie Repression oder Aktivierung, bei. Die unterschiedlichen Modifikationsmuster sind Resultat der katalytischen Aktivität von histonmodifizierenden Enzymen, und bilden den sogenannten Histon-Code (Imhof and Becker 2001; Jenuwein and Allis 2001). Genomweite Studien bezüglich der Verteilung von Histonmodifikationen (Guccione *et al.* 2006) belegen, dass sich die H3R2 Dimethylierung und H3K4 Trimethylierung, als Markierung aktiver Gene, an Promotoren gegenseitig ausschließen. Außerdem haben Strukturanalysen gezeigt, dass die Bindung von WDR5, einer Untereinheit des MLL-Komplexes, welche die H3K4 Trimethylierung durch Bindung des Histon N-Terminus begünstigt, nicht binden kann, wenn H3R2 dimethyliert vorliegt (Couture *et al.* 2006). Zusätzlich konnte Dawin Hyllus zeigen, dass die Methyltransferaseaktivität sowohl von MLL als auch von PRMT6 vermindert war, wenn als Substrat ein H3-Peptid mit der jeweils anderen Modifikation vorlag (Hyllus *et al.* 2007). Zusammen deuten die Daten auf eine gegenseitige negative Beeinflussung von H3R2 Dimethylierung und H3K4 Trimethylierung hin. Daher lag der Schluss nahe, dass H3R2me2 und PRMT6 im Gegensatz zur H3K4me3 repressive Funktionen hat. Ziel war es nun diese negative Wechselwirkung sowohl hinsichtlich ihrer Funktion, bezüglich transkriptioneller Effekte, aber auch mechanistisch näher zu untersuchen.

4.2.1 PRMT6 BEEINFLUSST DIE H3K4 TRIMETHYLIERUNG NEGATIV

Zunächst sollte untersucht werden, ob die *in vitro* beeinträchtigte Methyltransferaseaktivität des MLL-Komplexes global auch *in vivo* durch eine asymmetrische H3R2 Dimethylierung beeinflusst wird. Dazu wurde die Menge an H3K4 Trimethylierung in PRMT6 überexprimierenden MCF7 Zellen mit den Mengen in Kontrollzellen verglichen. Die Western Blot-Analyse dieser Zellen mit einem H3K4me3-spezifischen Antikörper bestätigte, dass die H3K4 Trimethylierung in Anwesenheit von exogener PRMT6 (TAP-PRMT6 #11 und #18) im Vergleich zu Kontrollzellen (TAP-LV #1 und #5) global abnimmt (siehe Abbildung 10 A). Umgekehrt bewirkte die siRNA-vermittelte Depletion von PRMT6 in HEK293 Zellen eine Erhöhung der H3K4 Trimethylierung verglichen mit Kontrolltransfizierten Zellen (siehe Abbildung 10 B). Zusätzlich unterstützt wurden diese Ergebnisse durch Immunfluoreszenzfärbungen, wobei die H3K4 Trimethylierung mit einem H3K4me3-spezifischen Antikörper einem Cy3-gekoppelten Sekundärantikörper detektiert wurde. Die Zellkerne wurden durch Anfärben der DNA mit DAPI sichtbar gemacht. Wie Abbildung 10 C zeigt, wiesen die Kontrollzellen (TAP-LV #1 und #5) im Vergleich zu den PRMT6 überexprimierenden Zellen (TAP-PRMT6 #11 und #18) höhere Spiegel an H3K4 Trimethylierung auf.

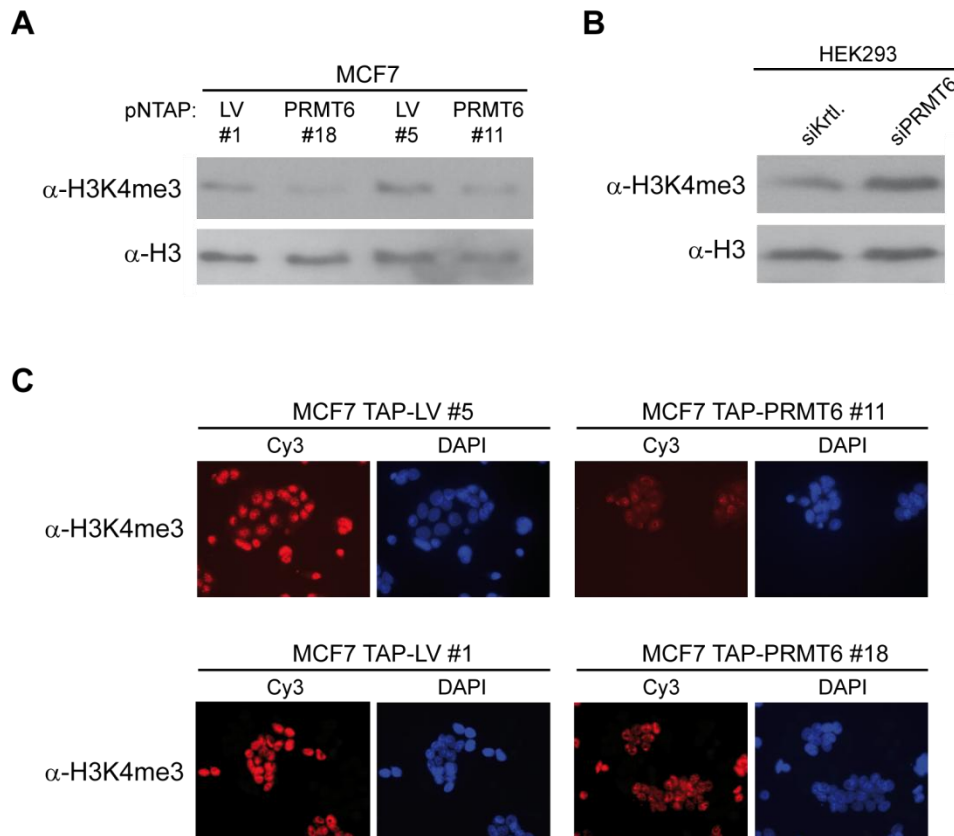


Abbildung 10: PRMT6 beeinflusst die H3K4 Trimethylierung negativ.

(A) Western Blot-Analyse von 30 μ g FT-Lysat aus MCF7 TAP-PRMT6 Zellen und Kontrollzellen. Der Nachweis der K4 Trimethylierung erfolgte mit einem H3K4me3-spezifischen Antikörper. Die H3 Färbung diente als Ladekontrolle. (B) HEK293 Zellen wurden 48 h nach Transfektion mit siRNA gegen PRMT6 bzw. Kontroll-siRNA für Western Blot-Analysen geerntet. 30 μ g FT-Lysat wurden zum Nachweis der H3K4 Trimethylierung mit dem modifikationsspezifischen Antikörper eingesetzt. Die Detektion von H3 diente als Ladekontrolle. (C) Immunfluoreszenzfärbung von MCF7 TAP-LV #1 und #5 und TAP-PRMT6 #11 und #18 Zellen erfolgte mit einem H3K4me3-spezifischen Primärantikörper und einem Cy3-gekoppelten Sekundärantikörper. Die Aufnahme der Färbungen erfolgte bei einer 40-fachen Vergrößerung und bei gleichen Belichtungszeiten.

Die hier gezeigten Ergebnisse, zusammen mit den *in vitro* Daten, die aus der Arbeit von Dawin Hyllus hervorgegangen sind, sowie den Erkenntnissen aus der Literatur (Couture *et al.* 2006; Guccione *et al.* 2006) unterstützen die Hypothese einer negativen Wechselwirkung zwischen H3R2me2 und H3K4me3.

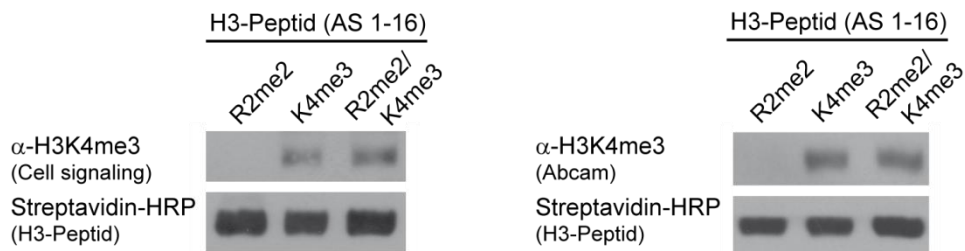
4.2.2 CHARAKTERISIERUNG DER MODIFIKATIONSSPEZIFISCHEN ANTIKÖRPER H3R2ME2 UND H3K4ME3

Um auszuschließen, dass es sich bei der beobachteten negativen Wechselwirkung zwischen der H3R2 Dimethylierung und H3K4 Trimethylierung um Effekte handelt, die aus einer Epitop-Verdeckung des Antikörpers resultieren, wurden die verwendeten modifikationsspezifischen Antikörper dahingehend getestet, ob sie in der Lage sind ein doppelt-modifiziertes Peptid (R2me2/ K4me3) zu erkennen.

ERGEBNISSE

Wie Abbildung 11 zeigt, erkannten beide Antikörper die entsprechende Modifikation sowohl einzeln (R2me2 und K4me3) als auch die Kombination (R2me2/ K4me3) beider Modifikationen in gleichem Maße gut. Zusammenfassend heißt das, dass die verwendeten Antikörper ihr Epitop auch in Anwesenheit der benachbarten Modifikation erkennen würden und die beobachtete negative Wechselwirkung von Bedeutung ist.

A



B

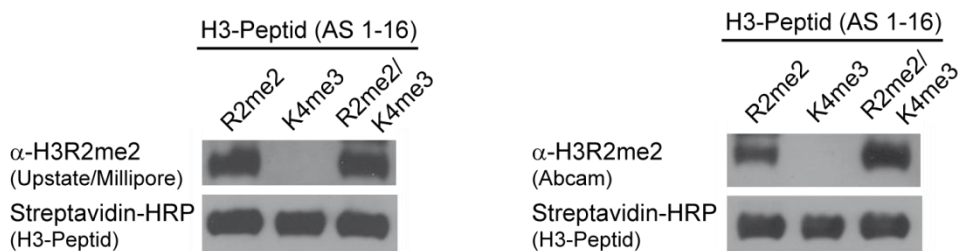


Abbildung 11: Charakterisierung der modifikationsspezifischen Antikörper.

Die vormodifizierten Biotin-gekoppelten Peptide (je 1 μ g) wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und geblottet. Die Detektion erfolgte mit den angegebenen Antikörpern gegen (A) H3K4me3 von Cell Signaling und Abcam sowie gegen (B) H3R2me2 von Millipore und Abcam. Der Nachweis des gekoppelten Biotins mittels Streptavidin-HRP diente als Ladekontrolle.

4.2.3 DIE TRANSKRIPTION H3K4ME3-REGULierter GENE WIRD DURCH PRMT6 INHIBIERT

Aufgrund der bisher erlangten Erkenntnisse zur negativen Beeinflussung der H3K4 Trimethylierung durch PRMT6 lag die Vermutung nahe, dass sich diese Effekte auf die transkriptionelle Aktivierung H3K4me3-regulierter Genen auswirken. Für c-Myc-Zielgene wurde gezeigt, dass deren transkriptionelle Aktivierung mit der Bindung von c-Myc und dem Vorhandensein der H3K4 Trimethylierung in der Promoterregion korrelierte. Im Gegensatz dazu war in diesen Bereichen keine H3R2 Dimethylierung detektierbar (Guccione *et al.* 2006). Expressionsanalysen von MCF7 Zellen, die PRMT6 überexprimieren wiesen reduzierte mRNA-Level der c-Myc-Zielgene *TERT*, *NUCLEOLIN*, *GOLPH3* und *PTMA* auf, während *ODC* und *LDHA* unabhängig von der PRMT6-Menge in der Zelle exprimiert wurden (siehe Abbildung 12).

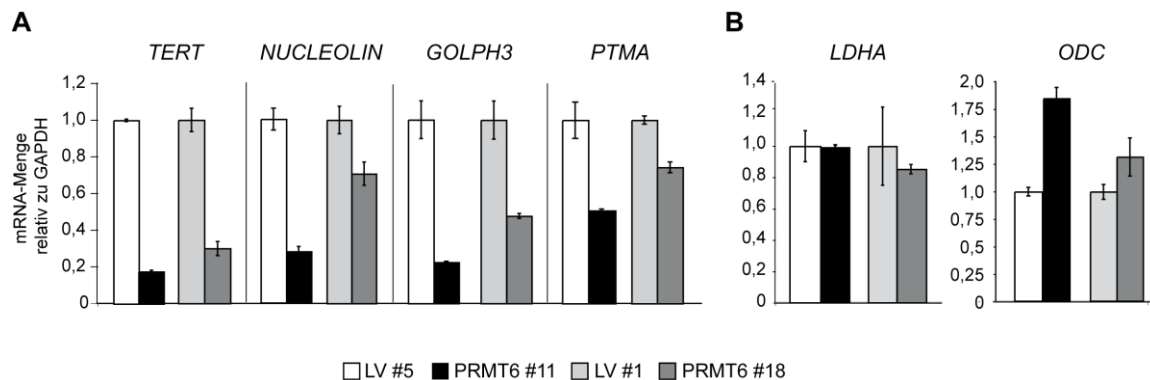


Abbildung 12: PRMT6 inhibiert die Transkription einiger c-Myc-Zielgene in MCF7 Zellen.

Die relativen mRNA-Mengen der gezeigten c-Myc-Zielgene in MCF7 Zellen in Anwesenheit von exogener PRMT6 (TAP-PRMT6 #11 und #18) im Vergleich zu Kontrollzellen (TAP-LV #1 und #5) wurden mittels RT-qPCR ermittelt. Die Normalisierung erfolgte auf *GAPDH* als Haushaltsgen. Die MCF7 TAP-PRMT6 Zellen sind in schwarz (#11) und dunkelgrau (#18) und die MCF7 TAP-LV Zellen in weiß (#5) und hellgrau (#1) dargestellt. (A) zeigt die durch PRMT6 reprimierten Gene *TERT*, *NUCLEOLIN*, *GOLPH3* und *PTMA*. In (B) sind die unabhängigen Gene *LDHA* und *ODC* dargestellt.

Weiterhin wurden die Gene des *HOXA* Locus, die beschriebene Zielgene von MLL1 und der H3K4 Trimethylierung sind, auf Veränderung in der Transkription nach Überexpression von PRMT6 analysiert (Milne *et al.* 2002; Nakamura *et al.* 2002). Dazu wurden die mRNA-Mengen verschiedener *HOXA* Gene in MCF7 Zellen, die PRMT6 überexprimieren mit denen von Kontrollzellen verglichen. Die PRMT6 Überexpression in MCF7 Zellen resultierte in verringerten Transkriptmengen für *HOXA2* und *HOXA10*, während die Expressionen von *HOXA5* und *HOXA6* nicht beeinflusst waren (siehe Abbildung 13).

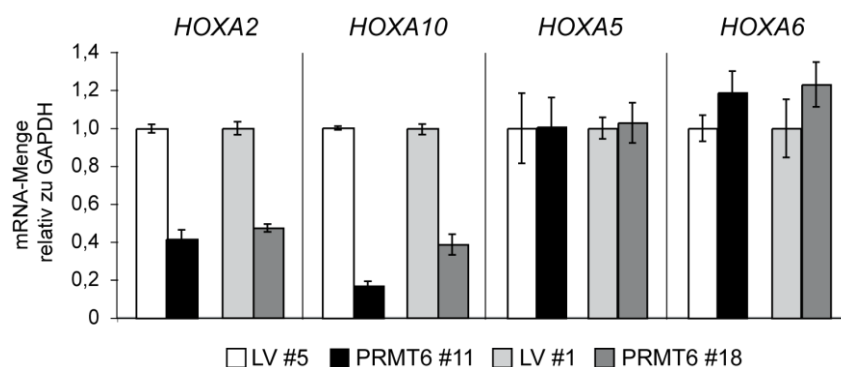


Abbildung 13: PRMT6 reprimiert spezifische Gene des HOXA Locus in MCF7 Zellen.

Die relativen mRNA-Mengen der untersuchten *HOXA* Gene *HOXA2*, *HOXA10*, *HOXA5* und *HOXA6* in MCF7 Zellen in Anwesenheit von exogener PRMT6 (TAP-PRMT6 #11 und #18) im Vergleich zu Kontrollzellen (TAP-LV #1 und #5) wurden mittels RT-qPCR ermittelt. Die Normalisierung erfolgte auf *GAPDH* als Haushaltsgen. Die MCF7 TAP-PRMT6 Zellen sind in schwarz (#11) und dunkelgrau (#18) und die MCF7 TAP-LV Zellen in weiß (#5) und hellgrau (#1) dargestellt.

4.2.4 DIE KATALYTISCHE AKTIVITÄT VON PRMT6 IST FÜR DIE ZIELGEN-REPRESSION ERFORDERLICH

Um zu überprüfen, ob die katalytische Aktivität von PRMT6 für die Repressorfunktion notwendig ist, wurden NT2/D1 Zellen mit pMyc-PRMT6 wt, pMyc-PRMT6 mut und einem Kontrollvektor transfiziert und 48 h nach Transfektion für Expressionsanalysen mittels RT-qPCR geerntet. Während auch die transiente Überexpression von PRMT6 wt zur Repression von *HOXA2*, nicht aber *HOXA5* beitrug, bewirkte die Überexpression der katalytisch inaktiven Mutante von PRMT6 keine veränderte Genexpression verglichen mit den Kontrollzellen (siehe Abbildung 14 A und B). Die Kontrolle der transienten Überexpression von PRMT6 auf Western Blot-Ebene in Abbildung 14 C zeigt außerdem, dass vergleichbare Mengen PRMT6 wt und PRMT6 mut überexprimiert wurden.

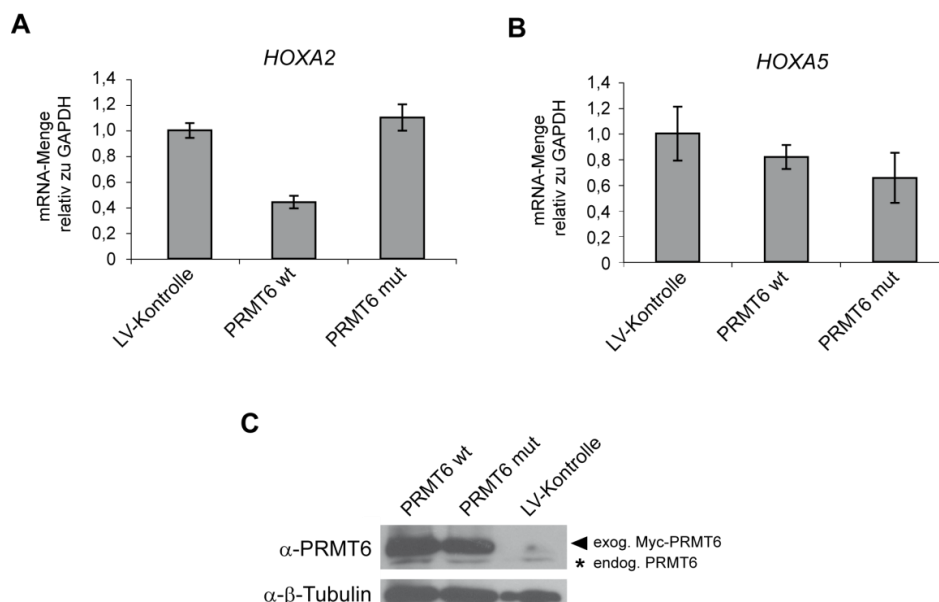


Abbildung 14: Die katalytische Aktivität von PRMT6 ist für die Repression notwendig.

NT2/D1 Zellen wurden mit pMyc-PRMT6 wt, pMyc-PRMT6 mut und einem Kontrollvektor transfiziert, 48 h später für RT-qPCR Analysen geerntet und die relativen mRNA-Mengen von (A) *HOXA2* und (B) *HOXA5* ermittelt. Zur Kontrolle der transienten Überexpression wurde PRMT6 (* endogen, ◀ exogen) mit einem PRMT6-spezifischen Antikörper mittels Western Blot-Analyse nachgewiesen. Die β -Tubulin-Färbung diente als Ladekontrolle.

4.2.5 PRMT6 REGULIERT DIE EXPRESSION VON *HOXA2* DIREKT AUF CHROMATINEBENE

Die bisherigen Ergebnisse zeigten, dass PRMT6 die H3R2 Dimethylierung katalysiert und damit die H3K4 Trimethylierung verhindert. Dies hat zur Folge, dass spezifische *HOXA* Gene und c-Myc-Zielgene reprimiert werden. Erste Hinweise zum Mechanismus der PRMT6-vermittelten Repression spezifischer H3K4me3-regulierter Gene wurden aus *in vitro* Studien von Dawin Hyllus erhalten. In

einem *in vitro* Pulldown von WDR5 mit vormodifizierten Peptiden zeigte sich, dass WDR5 nicht an das Peptid binden konnte, wenn H3R2 dimethyliert vorlag. Außerdem war die katalytische Aktivität des MLL1-Komplexes deutlich reduziert, wenn als Substrat ein H3-Peptid mit der R2 Dimethylierung im *in vitro* Methylierungsassay eingesetzt wurde (Hyllus *et al.* 2007). MCF7 Zellen, die PRMT6 überexprimieren und die dazugehörigen Kontrollzellen wurden in ChIP-Analysen eingesetzt, um herauszufinden, welchem Mechanismus die Repression durch PRMT6 *in vivo* unterliegt und ob es sich bei den *HOXA* Genen um direkte Zielgene von PRMT6 handelt. Dazu wurden Chromatin-Immunpräzitationen mit spezifischen Antikörpern gegen PRMT6, H3R2me2 und H3K4m3 durchgeführt und deren Präsenz am *HOXA2* und *HOXA5* Gen ermittelt. Im Vergleich zu den mitgeführten Kontrollantikörpern (IgG und PI) war PRMT6 an die 5'-Region von *HOXA2* in den Kontrollzellen leicht rekrutiert. Die Rekrutierung wurde durch Überexpression von PRMT6 stark erhöht. Die verstärkte Anreicherung von PRMT6 an *HOXA2* ging mit erhöhtem H3R2me2-Spiegel einher. Im Gegensatz dazu war H3K4me3 nach PRMT6 Überexpression im Vergleich zu Kontrollzellen reduziert. Diese Änderungen bezüglich der Rekrutierung von PRMT6 und der Anwesenheit von H3R2me2 und H3K4me3 wurden am 5'-Bereich des *HOXA5* Gens, welches transkriptionell unabhängig von PRMT6 ist, nicht beobachtet (siehe Abbildung 15).

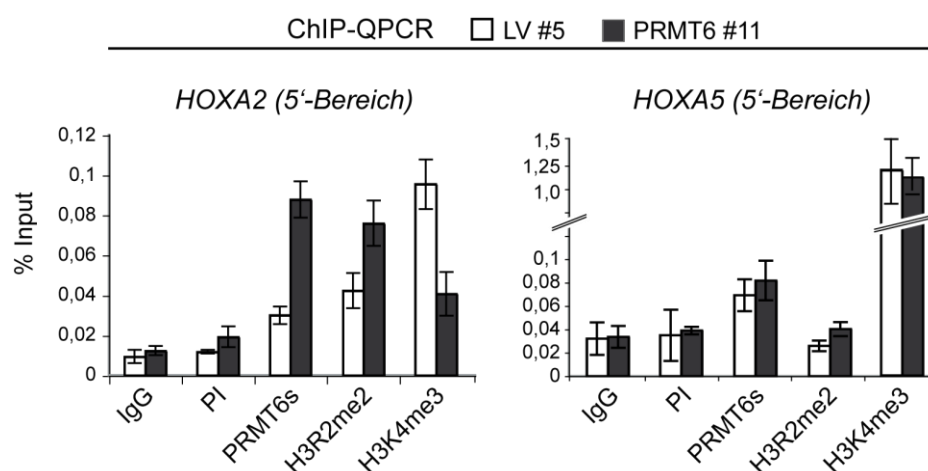


Abbildung 15: PRMT6 bindet an die 5'-Region des *HOXA2* Gens in MCF7 Zellen.

In MCF7 TAP-PRMT6 #11 und MCF7 TAP-LV #5 Zellen wurden mittels ChIP Analysen die spezifische Anreicherung von PRMT6, H3R2me2 und H3K4me3 am *HOXA2* und *HOXA5* Gen untersucht. Die Anreicherungen der präzipitierten Proteine in den Kontrollzellen werden von den *weißen* und die in den PRMT6 überexprimierenden Zellen von den *schwarzen* Balken repräsentiert. IgG und Präimmenserum (PI) wurden als unspezifische Kontrollantikörper mitgeführt. Die ChIP-qPCR wurde bezogen auf die eingesetzte Chromatinmenge (Input) ausgewertet und in % ausgedrückt.

In Übereinstimmung mit den beschriebenen *in vitro* Daten führte die Überexpression von PRMT6 zu verminderter Bindung von MLL1 und WDR5 an die 5'-Region von *HOXA2* verglichen mit Kontrollzellen und erklärt damit die verminderte H3K4 Trimethylierung. Dagegen war die Bindung

von MLL1 an die 5'-Region von *HOXA5* von der PRMT6 Überexpression nicht beeinträchtigt. Wohingegen die Bindung von WDR5 sogar leicht verstärkt war (siehe Abbildung 16).

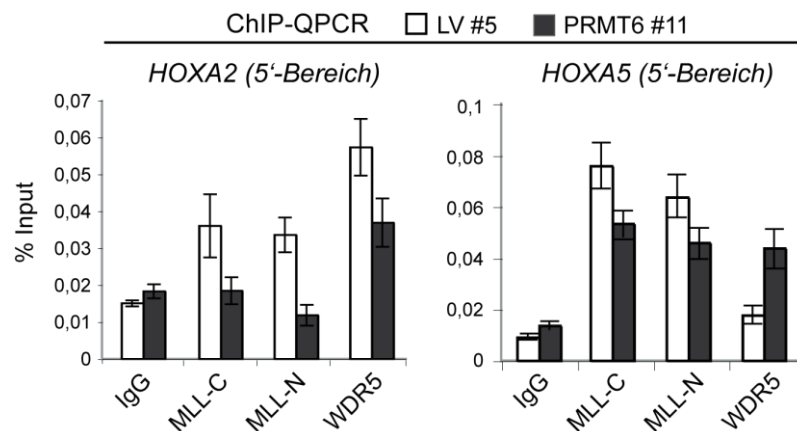


Abbildung 16: Die Rekrutierung von MLL1 und WDR5 an das *HOXA2* Gen nach PRMT6 Überexpression ist reduziert.

In MCF7 TAP-PRMT6 #11 und MCF7 TAP-LV #5 Zellen wurden mittels ChIP Analysen die spezifische Anreicherung von MLL (Antikörper gegen den C-Terminus MLL-C und gegen den N-Terminus MLL-N) und WDR5 am *HOXA2* und *HOXA5* Gen untersucht. Die Anreicherungen der präzipitierten Proteine in den Kontrollzellen werden von den *weißen* und die in den PRMT6 überexprimierenden Zellen von den *schwarzen* Balken repräsentiert. IgG wurde als unspezifischer Kontrollantikörper mitgeführt. Die ChIP-qPCR wurde bezogen auf die eingesetzte Chromatinmenge (Input) ausgewertet und in % ausgedrückt.

Diese Daten deuten darauf hin, dass die Repression spezifischer Gene durch die PRMT6-vermittelte H3R2 Dimethylierung realisiert wird, die wiederum die Rekrutierung von MLL1 und WDR5 verhindert und so zur Reduktion der H3K4 Trimethylierung beiträgt.

4.2.6 PRMT6 IST BEI DER NEURONALEN DIFFERENZIERUNG VON ZELLEN ALS REPRESSOR VON BEDEUTUNG

Mit Hilfe eines Zellmodells für neuronale Differenzierung, den NT2/D1 Zellen (Lee and Andrews 1986), sollte die Wirkung von PRMT6 auf die Expression von *HOXA2* und *HOXA5* in einem biologisch relevanten System untersucht werden. Frühere Studien haben gezeigt, dass die *HOXA* Gene während der ATRA-induzierten Differenzierung genauen Regulationsmustern folgen (Simeone *et al.* 1990; Houldsworth *et al.* 2002; Bracken *et al.* 2006), von denen u.a. *HOXA2* und *HOXA5* aktiviert werden.

Zunächst sollte hier die transkriptionelle Aktivierung von *HOXA2* und *HOXA5* nach ATRA-induzierter Differenzierung in NT2/D1 Zellen verifiziert werden. Dazu wurden die Zellen über einen Zeitraum von 3 und 12 Tagen differenziert und mittels RT-qPCR analysiert. Unbehandelte Zellen stellten den undifferenzierten Zustand der Zellen dar und sind mit 0d gekennzeichnet.

Wie in Abbildung 17 zu sehen ist, nehmen die relativen mRNA-Mengen von *HOXA2* und *HOXA5* während der Differenzierung deutlich zu während die Gene im undifferenzierten Zustand (0d) nicht exprimiert bzw. stark reprimiert sind. Im Folgenden wurde nun mit Hilfe von ChIP-Analysen überprüft, ob PRMT6 in diesem Zellsystem während der Differenzierung an der Regulation der Genexpression beteiligt ist.

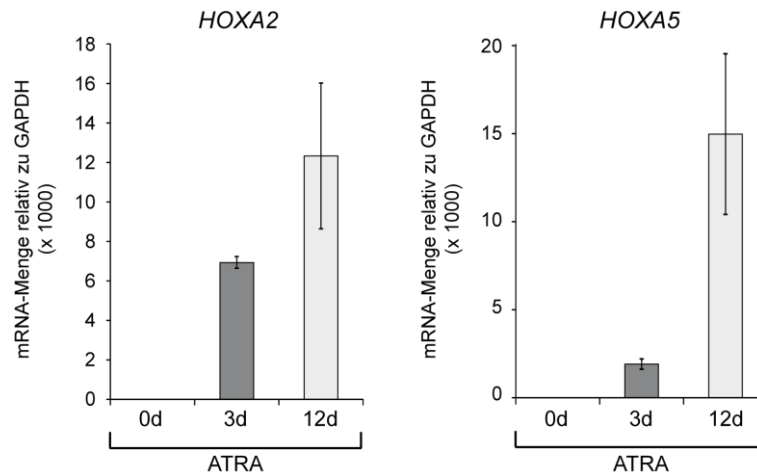


Abbildung 17: Expression von *HOXA2* und *HOXA5* während der NT2/D1 Differenzierung.

NT2/D1 Zellen wurden über einen Zeitraum von 3 oder 12 Tagen mit 1 μ M Retinsäure (ATRA) behandelt und für RT-qPCR Analysen geerntet. Die unbehandelten Kontrollzellen sind mit 0d bezeichnet. Es wurde die Aktivierung von *HOXA2* und *HOXA5* auf mRNA-Ebene überprüft, auf das Haushaltsgen *GAPDH* normalisiert und als relative Änderung dargestellt.

Um die PRMT6 Bindung, sowie die Anreicherungen der Histonmodifikationen H3R2me2 und H3K4me3 an *HOXA2* und *HOXA5* während der Differenzierung zu erforschen wurden NT2/D1 Zellen über einen Zeitraum von 3 und 12 Tagen differenziert und im Vergleich zu undifferenzierten Zellen (0d) für Chromatin-Immünpräzipitationen mit spezifischen Antikörpern gegen PRMT6, H3R2me2 und H3K4me3 eingesetzt (siehe Abbildung 18). Diese ChIP-Analysen ergaben, dass PRMT6 am stärksten in undifferenzierten Zellen an *HOXA2* und *HOXA5* bindet und dass diese Bindung mit der Zeit der Differenzierung abnimmt. Das Bindungsverhalten von PRMT6 korrelierte mit der Stärke der H3R2 Dimethylierung, die ebenso wie PRMT6 während der Differenzierung abnahm. Im Gegensatz dazu erhöhte sich die H3K4 Trimethylierung während der ATRA-induzierten neuronalen Differenzierung an *HOXA2* und *HOXA5* stark, was wiederum mit der, in Abbildung 17 gezeigten, transkriptionellen Aktivierung übereinstimmt. Diese Effekte wurden am Promoter des unbeeinflussten Kontrollgens *GAPDH* nicht beobachtet (siehe Abbildung 18).

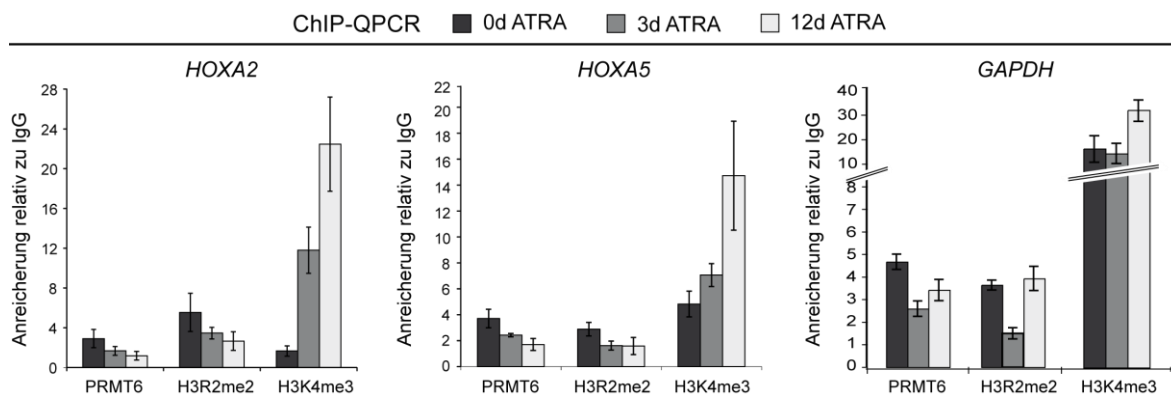


Abbildung 18: Veränderungen am Chromatin während der Differenzierung von NT2/D1 Zellen.

NT2/D1 Zellen wurden über einen Zeitraum von 3 oder 12 Tagen mit 1 μ M Retinsäure (ATRA) behandelt und für ChIP-Analysen geerntet. Die unbehandelten Kontrollzellen sind mit 0d bezeichnet. Unter Verwendung spezifischer Antikörper gegen PRMT6, H3R2me2 und H3K4me3 für die Immunpräzipitation wurden deren Anreicherungen am *HOXA2* und *HOXA5* Gen mittels ChIP-qPCR analysiert. Als Kontrollgen wurde die Promoterregion von *GAPDH* analysiert. Die Auswertung erfolgte relativ zur Anreicherung mit einem unspezifischen Antikörper (IgG) und wurde daher als Anreicherung relativ zu IgG angegeben. Die undifferenzierten Zellen sind in *schwarz*, 3 Tage differenzierte Zellen in *dunkelgrau* und 12 Tage differenzierte Zellen in *hellgrau* abgebildet.

4.3 DIE WECHSELWIRKUNG VON PRMT6 MIT DEN POLYCOMB REPRESSOR KOMPLEXEN PRC1 UND PRC2

Neben der vorher beschriebenen negativen Wechselwirkung zwischen Histonmodifikationen gab es Hinweise, aus der Literatur und aus *in vitro* Studien von Dawin Hyllus, darauf, dass die H3R2 Dimethylierung in positiver Wechselwirkung mit der H3K27 Trimethylierung, die als repressive Markierung beschrieben wurde, steht (Jenuwein *et al.* 1998; Cao and Zhang 2004). Genomweite Studien haben ergeben, dass das Auftreten der H3R2 Dimethylierung mit der H3K27 Trimethylierung an c-Myc-Zielgenen überlappt (Guccione *et al.* 2006). Außerdem wurde die katalytische Aktivität von PRMT6 *in vitro* von vorhandener H3K27 Trimethylierung des Substrates (H3-Peptid) positiv beeinflusst (Hyllus *et al.* 2007). Zudem spielen die Polycomb Repressor Komplexe eine wichtige Rolle bei der Kontrolle der *HOXA* Genexpression während der Entwicklung und sind an der Regulation der *HOXA* Gene während der ATRA-induzierten neuronalen Differenzierung von NT2/D1 Zellen beteiligt (Bracken *et al.* 2006). Diese Beobachtungen dienten als Ausgangspunkt der im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen, mit dem Ziel mögliche funktionelle und mechanistische Zusammenhänge zwischen PRMT6 und der H3R2 Dimethylierung auf der einen Seite und den Polycomb Repressor Komplexen und der H3K27 Trimethylierung auf der anderen Seite zu identifizieren und zu charakterisieren.

4.3.1 DAS ELUTIONSPROFIL VON PRMT6 STIMMT MIT DEN ELUTIONSPROFILN EINIGER PCG PROTEINE ÜBEREIN

Zu Beginn der Erforschung einer möglichen positiven Wechselwirkung sollte überprüft werden, ob PRMT6 mit den Proteinen der Polycomb Repressor Komplexe interagieren kann (Kuzmichev *et al.* 2002; Levine *et al.* 2002). Dazu wurde als erstes eine Gelfiltrationsanalyse durchgeführt. Damit sollte überprüft werden ob das Elutionsprofil von PRMT6 mit dem der Polycomb Gruppen (PcG) Proteine übereinstimmt. Hierfür wurden die Proteinkomplexe aus einem Gesamtzelllysate aus HEK293 Zellen unter Verwendung einer präparativen Superose6 Gelfiltrationssäule nach ihrer Größe aufgetrennt. Zur Ermittlung des Elutionsverhaltens von PRMT6 und der PcG Proteine wurden die gesammelten Fraktionen mittels Western Blot-Analyse unter Verwendung spezifischer Antikörper auf Vorhandensein von PRMT6 und einigen PcG Proteinen (siehe Abbildung 19 und Abbildung 20) analysiert. Zur Bestimmung der Komplexgrößen wurden die Elutionsprofilen von Eichproteinen herangezogen.

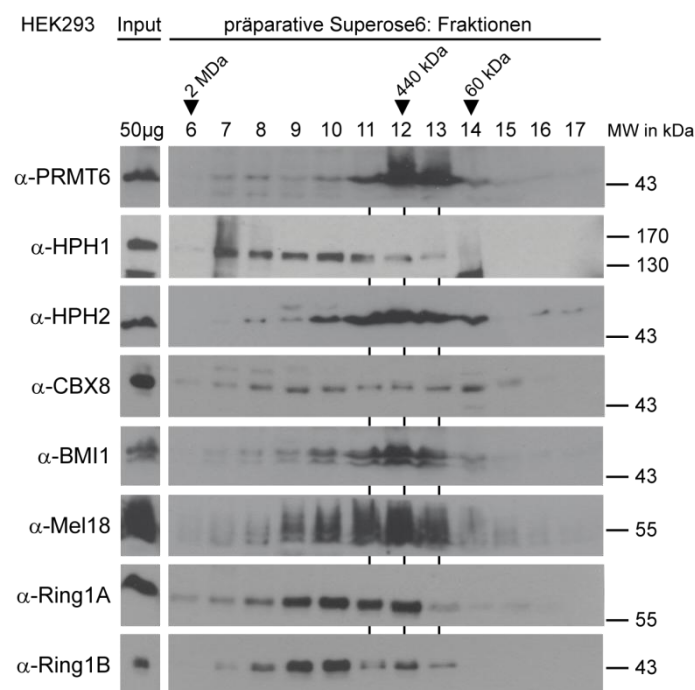


Abbildung 19: Gelfiltrationselutionsprofile von PRMT6 und PRC1 Komponenten.

Proteinkomplexe aus 6 mg in 2 ml Gesamtzelllysate aus HEK293 Zellen wurden mittels präparativer Gelfiltration (Supersose6) nach ihrer Größe aufgetrennt und in Fraktionen (je 6 ml) gesammelt. Je 5 % pro Fraktion wurden mit StrataClean Resin eingeeengt, mittels SDS-PAGE aufgetrennt und die Proteine mit den angegebenen Antikörpern detektiert. Die angegebenen Proteingrößen für die einzelnen Fraktionen (▼) wurden anhand von Eichproteinen ermittelt.

Die Gelfiltrationsanalysen ergaben, dass PRMT6 hauptsächlich in den Fraktionen 12 und 13 vorlag, was einem Größenbereich von 150 - 440 kDa entspricht (siehe Abbildung 19 und Abbildung 20). Da rekombinantes His-PRMT6 Protein hauptsächlich im Molekulargewichtsbereich von 60 kDa eluiert

ERGEBNISSE

(siehe Abbildung 43, S.96), kann ausgeschlossen werden, dass es sich hier um PRMT6-Aggregate handelt. Weiterhin zeigt Abbildung 19, dass PRMT6 mit den PRC1 Komponenten HPH2, BMI1, MEL18 und CBX8 hauptsächlich in den Fraktionen 11 - 13 coeluiert, während die Elutionsprofile von HPH1, Ring1A und Ring1B zu höhermolekularen Fraktionen verschoben sind. Das Elutionsprofil von CBX8 wies eine gleichmäßige Verteilung zwischen den Fraktionen 8 und 14 auf. Dies könnte darauf hindeuten, dass CBX8 Bestandteil vieler unterschiedlicher Interaktionen ist. Abbildung 20 zeigt das Elutionsprofil von EZH2, welches im Vergleich zum Elutionsprofil von PRMT6 leicht zu höhermolekularen Fraktionen verschoben ist und mit PRMT6 in den Fraktionen 11 und 12 überlappt.

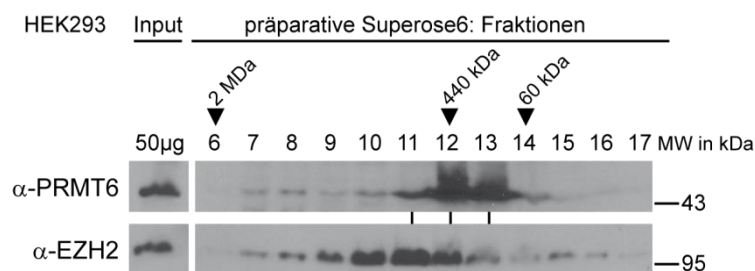


Abbildung 20: Gelfiltrationselutionsprofile von PRMT6 und EZH2.

Proteinkomplexe aus 6 mg in 2 ml Gesamtzelllysate aus HEK293 Zellen wurden mittels präparativer Gelfiltration (Superose6) nach ihrer Größe aufgetrennt und in Fraktionen (je 6 ml) gesammelt. Je 5 % pro Fraktion wurden mit StrataClean Resin eingeeengt, mittels SDS-PAGE aufgetrennt und die Proteine mit den angegebenen Antikörpern detektiert. Die angegebenen Proteingrößen für die einzelnen Fraktionen (▼) wurden anhand von Eichproteinen ermittelt.

4.3.2 PRMT6 INTERAGIERT MIT EINIGEN UNTEREINHEITEN VON PRC1

Da die Erkenntnisse aus den Gelfiltrationsanalysen jedoch keine Schlussfolgerungen auf Interaktionen zwischen PRMT6 und den PcG Proteinen zulassen, sollte nun mittels Coimmunpräzipitationen dieser Frage nachgegangen werden. Um zu überprüfen ob und mit welchen Komponenten PRMT6 interagiert, wurden Coimmunpräzipitationen von PRMT6 (endogen), mit einem PRMT6-spezifischen Antikörper (Rohserum - PRMT6s) und Präimmunserum (PI) als Kontrolle, aus HEK293 Gesamtzelllysate durchgeführt. Die PcG Proteine wurden dazu, mit Ausnahme von BMI1, in HEK293 Zellen überexprimiert (siehe Abbildung 21). Die Coimmunpräzipitationen machten deutlich, dass PRMT6 mit spezifischen Homologen der untersuchten PRC1 Komponenten assoziiert sein kann. Die Interaktion zwischen PRMT6 und Mph1 bzw. Mph2 (siehe Abbildung 21 A) wurde mit den humanen Homologen HPH1 bzw. HPH2 auf endogener Proteinebene verifiziert (siehe Abbildung 21 E). Zudem interagiert PRMT6 mit CBX4 und CBX8, aber nicht mit CBX2 (siehe Abbildung 21 B) und weder mit Mel18 noch mit Ring1A und Ring1B (siehe Abbildung 21 C und D). Außerdem wurde die endogene Interaktion zwischen PRMT6 und BMI1 detektiert (siehe Abbildung 21 E).

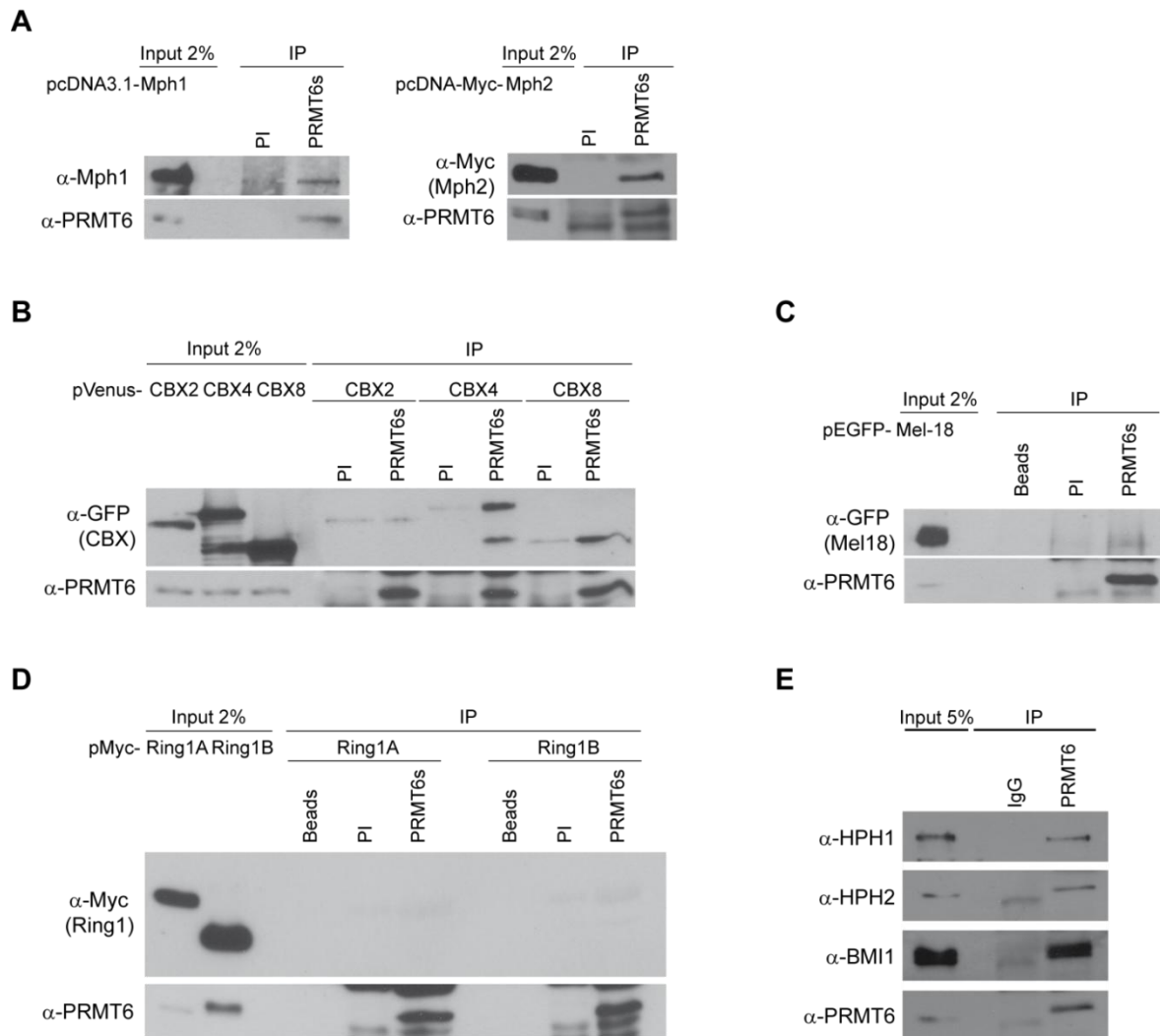


Abbildung 21: PRMT6 interagiert mit Komponenten des PRC1 Komplexes.

HEK293 Zellen wurden mit den angegebenen Plasmiden, die für PcG Proteine von PRC1 kodieren, transfiziert und 48 h nach Transfektion für Coimmunpräzipitationen lysiert. Die Immunpräzipitation von PRMT6 (endogen) aus 1 mg Lysat und 2 % Input wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und die Detektion möglicher Interaktionspartner erfolgte unter Verwendung proteinspezifischer oder gegen den Epitop-Tag gerichteter Antikörper. (A) Immunpräzipitation von PRMT6 (endogen) und Detektion von Mph1 mit einem Mph1-spezifischen Antikörper und von Mph2 mit einem gegen den Epitop-Tag gerichteten α -Myc Antikörper.

(B) Immunpräzipitation von PRMT6 (endogen) und Detektion von CBX2, CBX4 und CBX8 mit einem α -GFP Antikörper. (C) Immunpräzipitation von PRMT6 (endogen) und Detektion von Mel18 mit einem gegen den Epitop-Tag gerichteten α -GFP Antikörper. (D) Immunpräzipitation von PRMT6 und Detektion von Ring1A und Ring1B mit einem gegen den Epitop-Tag gerichteten α -Myc Antikörper. (E) Immunpräzipitation von PRMT6 und Detektion der endogenen Proteine HPH1, HPH2 und BMI1. Die Detektion von PRMT6 diente als Kontrolle für die Immunpräzipitationen. Beads, Präimmenserum (PI) oder IgG wurden als Negativkontrollen mitgeführt.

Um zu testen, ob die Interaktionen auch nach einer Gelfiltration stabil waren, wurden HEK293 Zellen mit pcDNA-Myc-Mph2 und pVenus-CBX8 transfiziert und 48 h nach Transfektion für eine präparative Gelfiltration (Superose6) geerntet. Abbildung 22 A zeigt die Inputgele der Gelfiltrationsläufe für PRMT6, Mph2 und CBX8, wobei auch die Elutionsprofile der überexprimierten Proteine mit dem von PRMT6 in den Fraktionen 12 und 13 coeluierten. Im Anschluss an die Gelfiltration wurde PRMT6 in allen Fraktionen immunpräzipitiert.

ERGEBNISSE

Die Immunpräzipitationen wurden mittels Western Blot-Analyse unter Verwendung der angegebenen Antikörper analysiert. Als Positivkontrolle für die Interaktion wurden Immunpräzipitationen mit Präimmunserum (PI) und Rohserum gegen PRMT6 (PRMT6s) aus Gesamtzelllysat mitgeführt (siehe Abbildung 22 B). Die Immunpräzipitationen für PRMT6 aus den Gelfiltrationsfraktionen zeigt eine Anreicherung für CBX8 in Fraktion 12 und für Mph2 in Fraktion 12 und 13. In den Fraktionen 12 und 13 wurde auch PRMT6 am stärksten immunpräzipitiert (siehe Abbildung 22).

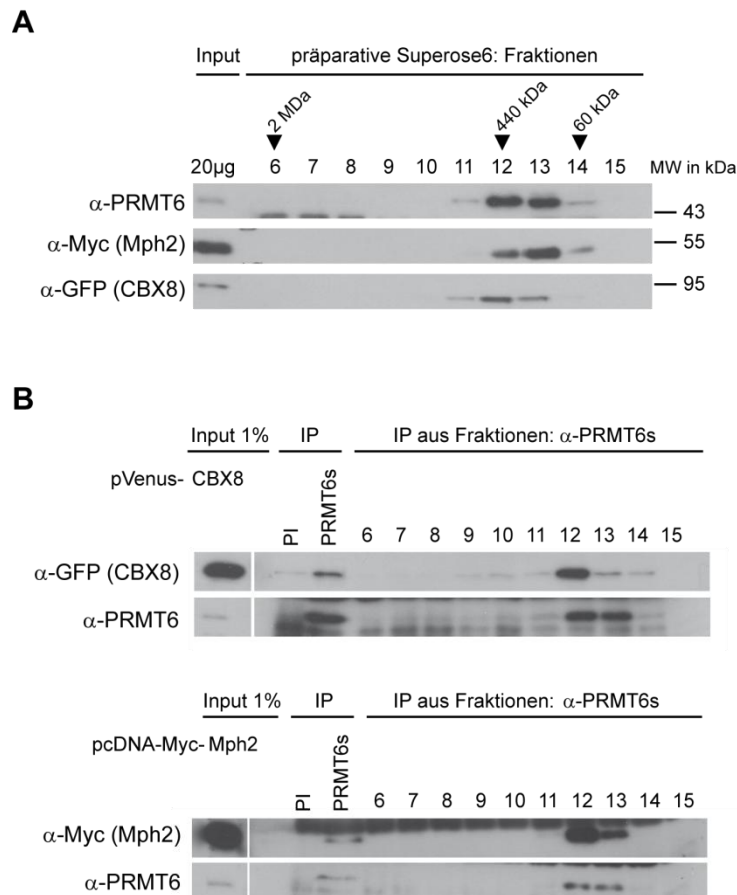


Abbildung 22: PRMT6 interagiert mit PRC1 Komponenten in Gelfiltrationsfraktionen.

HEK293 Zellen wurden mit Plasmiden, die für CBX8 und Mph2 kodieren, transfiziert und 48 h nach Transfektion für die präparative Gelfiltration mit anschließender Immunpräzipitation lysiert. Es wurden 6 mg Proteinlysate in 2 ml für den Gelfiltrationslauf eingesetzt und Fraktionen 6 - 15 mit je 6 ml gesammelt. (A) 5 % der gesammelten Fraktionen wurden zur Kontrolle der Elutionsprofile mittels SDS-PAGE aufgetrennt und mit Antikörpern gegen PRMT6, Myc-Tag und GFP-Tag gefärbt. (B) Aus 90 % der gesammelten Fraktionen wurde PRMT6 (endogen) immunpräzipitiert. Die Immunpräzipitationen wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und auf Interaktion mit CBX8 und Mph2 mit den angegebenen Antikörpern untersucht. Als Positivkontrolle für die Interaktion wurde eine Immunpräzipitation von PI und PRMT6 aus Gesamtzelllysate mitgeführt. Die Färbung für PRMT6 diente als Kontrolle der Immunpräzipitation.

4.3.3 DIE INTERAKTIONEN MIT PCG PROTEINEN SIND PRMT6-SPEZIFISCH

Im Folgenden wurde am Beispiel von BMI1 und HPH2 untersucht, ob es sich bei den Interaktionen von PRMT6 mit den Komponenten des PRC1 Komplexes um spezifische Interaktionen für PRMT6 handelt, oder ob auch andere PRMTs in der Lage sind mit PRC1 Komponenten zu interagieren. Dazu wurden PRMT1 (endogen) und PRMT4 (endogen) aus Gesamtzelllysat von HEK293 Zellen immunpräzipitiert. Anschließend wurden die Immunpräzipitationen auf Interaktionen mit BMI1 und HPH2 untersucht. Wie in Abbildung 23 dargestellt, kann weder PRMT1 noch PRMT4 die untersuchten Komponenten BMI1 und HPH2 copräzipitieren. Die Interaktionen von PRMT6 mit den Komponenten des PRC1 Komplexes scheinen für PRMT6 spezifisch zu sein.

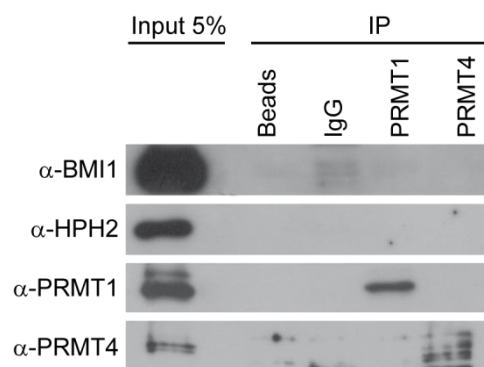


Abbildung 23: Die PRC1 Komponenten BMI1 und HPH2 interagieren nicht mit PRMT1 und PRMT4.

Coimmunpräzipitationen aus je 1 mg HEK293 Gesamtzelllysat. Die Immunpräzipitationen von PRMT1 (endogen) und PRMT4 (endogen) wurden mit 5 % Input mittels SDS-PAGE aufgetrennt und auf Interaktion mit BMI1 und HPH2 untersucht. Die Färbung für PRMT1 und PRMT4 dienten als Kontrolle für die Immunpräzipitation. Beads und IgG wurden als Negativkontrollen mitgeführt.

4.3.4 PRMT6 INTERAGIERT MIT EZH2

Da PRMT6 mit einigen spezifischen Komponenten des PRC1 Komplexes assoziiert sein kann (siehe 4.3.2 S.72), stellte sich die Frage, ob PRMT6 auch mit dem Polycomb Repressor Komplex 2 interagieren kann. Wie in Abbildung 20 gezeigt ist, coeluiert PRMT6 mit der katalytischen Untereinheit des PRC2 Komplexes EZH2 im Größenbereich von 440 kDa. Die Immunpräzipitation von PRMT6 (endogen) aus HEK293 oder HEK293, die Flag-Ezh2 überexprimieren, ergab, dass PRMT6 sowohl endogenes als auch exogenes EZH2 copräzipitieren konnte (siehe Abbildung 24). Für die beiden anderen Untereinheiten des PRC2 Komplexes SUZ12 und EED wurde, in hier nicht gezeigten Untersuchungen, unter den experimentellen Bedingungen keine Interaktion mit PRMT6 gefunden. Zusammenfassend könnte man vermuten, dass PRMT6 mit EZH2, unabhängig vom PRC2 Komplex, interagiert.

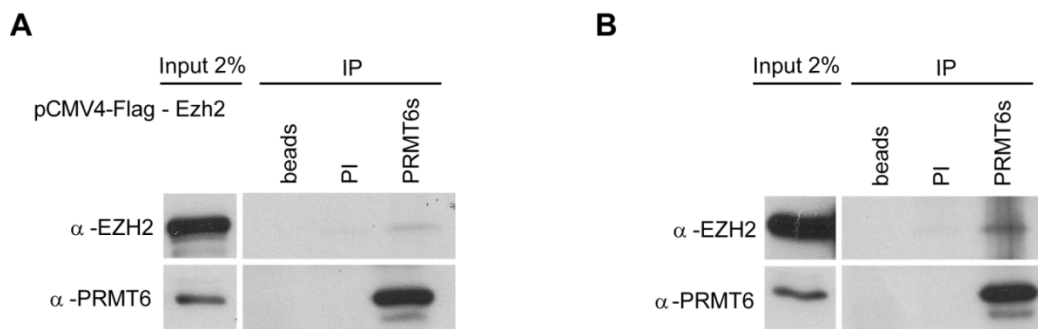


Abbildung 24: PRMT6 interagiert mit EZH2.

(A) HEK293 Zellen wurden mit pCMV4-Flag-*Ezh2* transfiziert und 48 h nach Transfektion für Coimmunpräzipitationen lysiert. Die Immunpräzipitation von PRMT6 (endogen) aus 1 mg Gesamtzelllysate und 2 % Input wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und die Detektion von EZH2 erfolgte mit einem EZH2-spezifischen Antikörper. Die Färbung für PRMT6 diente als Kontrolle für die Immunpräzipitation. Beads und Präimmunserum (PI) wurden als Negativkontrollen mitgeführt. (B) Die Immunpräzipitation von PRMT6 aus 1 mg HEK293-Gesamtzelllysate mit 2 % Input mittels SDS-PAGE aufgetrennt und auf Interaktion mit EZH2 unter Verwendung eines EZH2-spezifischen Antikörpers untersucht. Die Färbung für PRMT6 diente als Kontrolle für die Immunpräzipitation. Beads und Präimmunserum (PI) wurden als Negativkontrollen mitgeführt.

4.3.5 DIE *HOXA* GENE ZEIGEN SPEZIFISCHE EXPRESSIONSMUSTER WÄHREND DER DIFFERENZIERUNG VON NT2/D1 ZELLEN

Zur Erforschung der möglichen funktionellen Wechselwirkung zwischen PRMT6 und den PcG Proteinen wurde das NT2/D1 Zellmodell verwendet. Diese Zellen wurden gewählt, da sowohl PRMT6 (Hyllus *et al.* 2007) als auch die PcG Proteine (Bracken *et al.* 2006) als Regulatoren zur Aufrechterhaltung der *HOXA* Expressionsmuster während der Differenzierung beschrieben sind. Die *HOX* Gene kodieren für DNA bindende Proteine der Homöodomänenfamilie und sind in Clustern auf dem Chromosom angeordnet. Dabei entspricht die serielle Anordnung der Gene im Chromosom der ebenfalls seriellen Expression entlang der Kopf-Schwanz-Körperachse (anterioposteriore Körperachse) (Deschamps and van Nes 2005; Soshnikova and Duboule 2009).

Während der ATRA-induzierten Differenzierung von NT2/D1 Zellen werden die Gene am 3'-Ende des Locus (frühe *HOX* Gene: *HOXA1-5*) aktiviert und die Gene am 5'-Ende des Locus (späte *HOX* Gene: *HOXA9-13*) reprimiert (Bracken *et al.* 2006). Im Rahmen dieser Arbeit sollte zunächst das Differenzierungsverhalten der NT2/D1 Zellen verifiziert werden. Die Abbildung 25 B zeigt am Beispiel von *HOXA1*, *HOXA2* und *HOXA5* die Aktivierung der frühen *HOXA* Gene, die in undifferenzierten Zellen nicht exprimiert werden, im Verlauf der ATRA-induzierten Differenzierung. Im Gegensatz dazu sind die späten *HOXA* Gene in undifferenzierten Zellen aktiv und werden mit fortschreitender Differenzierung reprimiert, wie am Beispiel von *HOXA9* und *HOXA10* in Abbildung 25 B dargestellt. Allerdings führte die Transfektion von siRNA zur Veränderung des

Differenzierungsverhaltens in Bezug auf die späten Gene, deren Expression dann entweder unbeeinflusst oder schwach induziert war (siehe Abbildung 29. S.81).

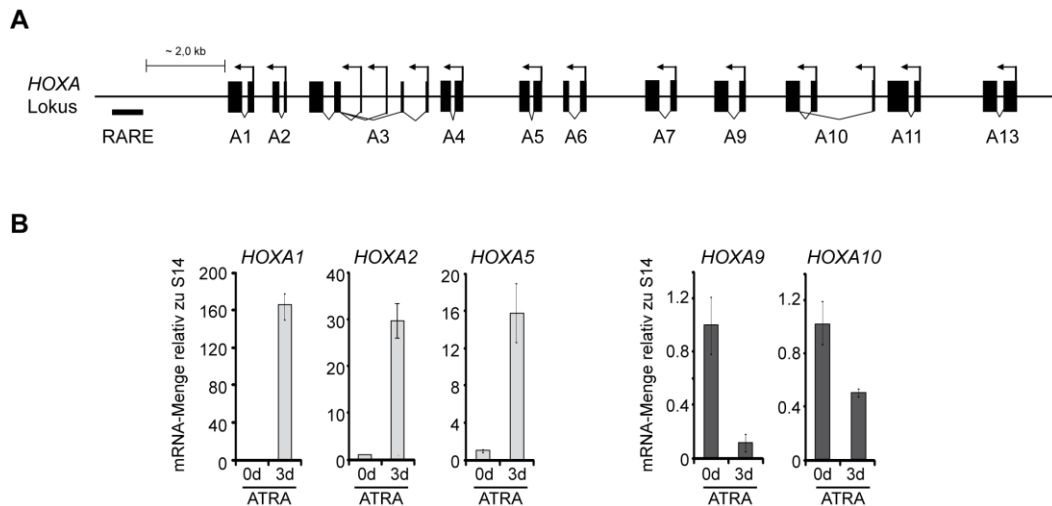


Abbildung 25: Die Expression der HOX Gene ist während der Differenzierung strikt reguliert.

(A) Schematische Darstellung des *HOXA* Lokus mit dem *Retinoic Acid Response Element* (RARE) downstream von *HOXA1*. Die Gene am 3'-Ende (*anterior*) des Lokus (*HOXA1-5*) werden durch die ATRA-induzierte Differenzierung stark aktiviert, während die Gene am 5'-Ende (*posterior*) (*HOXA9-13*) in undifferenzierten Zellen exprimiert und nach Behandlung mit ATRA reprimiert werden. (B) NT2/D1 Zellen wurden mit 0,1 μ M ATRA für 3 Tage differenziert und für RT-qPCR Analysen verwendet. Unbehandelte/undifferenzierte Zellen sind mit 0d bezeichnet. Die relativen mRNA-Menge der gezeigten *HOXA* Gene in undifferenzierten (0d) und 3 Tage differenzierten (3d) Zellen wurden durch Normalisierung auf *S14*, als Haushaltsgen, ermittelt.

4.3.6 DIE AN- ODER ABWESENHEIT VON PRMT6 UND PCG PROTEINEN WÄHREND DER DIFFERENZIERUNG KORRELIERT MIT DER EXPRESSION DER HOXA GENE

Die Aufrechterhaltung der räumlich begrenzten Expressionsmuster der *HOX* Gene wird durch das Wechselspiel von Polycomb Gruppen (PcG) Proteinen und Trithorax Gruppen (trxG) Proteinen und der daraus resultierenden Histonmodifikationsmuster realisiert. Um Veränderungen der Chromatinbindung von PcG Proteinen und PRMT6 sowie der Histonmodifikationsmuster im Verlauf der Differenzierung zu untersuchen, wurden NT2/D1 Zellen ChIP-Analysen unterzogen. Dafür wurden die Zellen zunächst nicht (0d), 2 Tage (2d) und 6 Tage (6d) mit ATRA differenziert. Die Immunpräzipitationen erfolgten unter Verwendung spezifischer Antikörper gegen PRMT6, CBX8 (PRC1), EZH2 (PRC2), H3R2me2, H3K4me3 und H3K27me3. Die Anreicherung der untersuchten Proteine und Modifikationen wurde mittels ChIP-qPCR Analyse der Promoterregionen, nahe der Transkriptionsstartseite (TSS), der in Abbildung 26 dargestellten *HOXA* Gene ermittelt. Wie in Abbildung 26 gezeigt, waren PRMT6, CBX8 und EZH2 in undifferenzierten Zellen (schwarze Balken) an die frühen *HOXA* Gene (*HOXA1*, *HOXA2* und *HOXA5*) rekrutiert und verließen im Verlauf

ERGEBNISSE

der Differenzierung (hellgraue und weiße Balken) diese Bereiche. Wohingegen PRMT6, CBX8 und EZH2 unabhängig vom Differenzierungsstatus der Zelle an die Promotoren der späten *HOXA* Gene (*HOXA9* und *HOXA10*) rekrutiert waren und nur schwache Veränderungen detektiert wurden (siehe Abbildung 26).

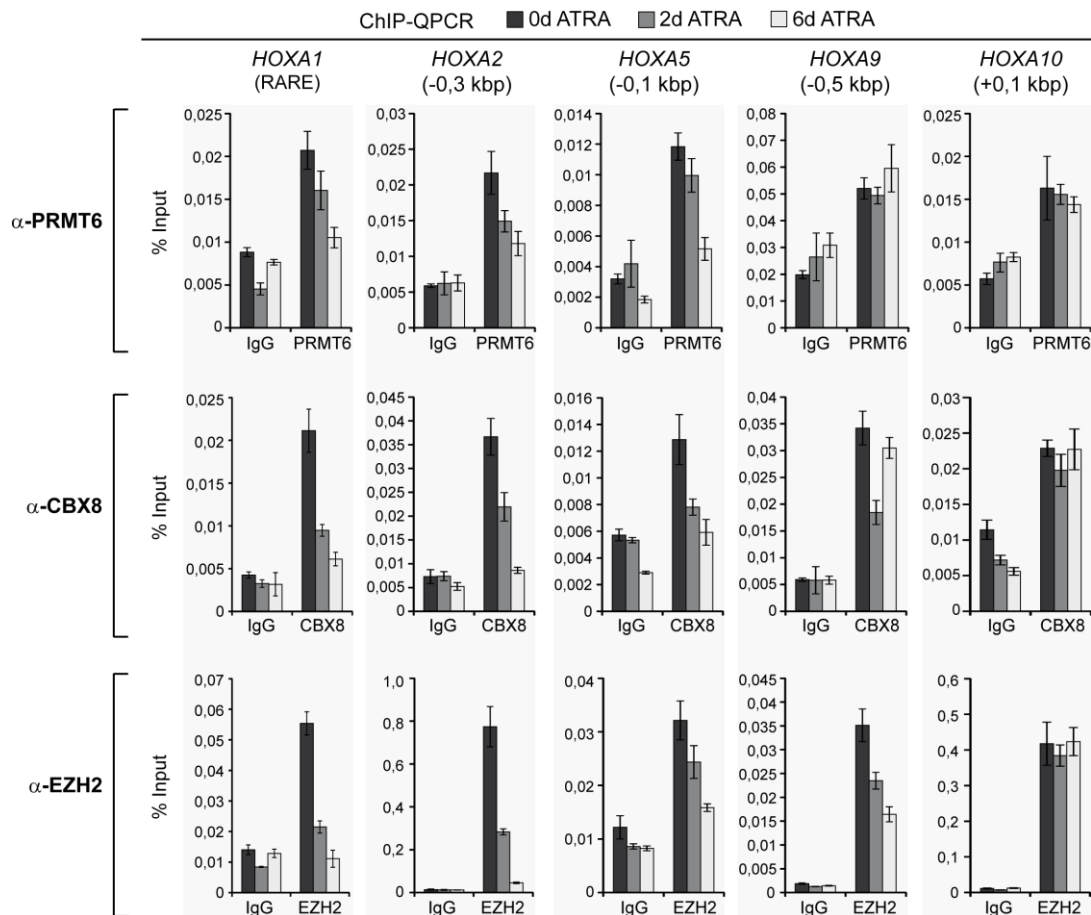


Abbildung 26: Veränderung der Chromatinbindung von PRMT6, CBX8 und EZH2 während der ATRA-induzierten Differenzierung von NT2/D1 Zellen.

NT2/D1 Zellen wurden nicht (0d), 2 Tage (2d) oder 6 Tage (6d) mit 0,1 μ M ATRA differenziert und für ChIP-Analysen eingesetzt. Unter Verwendung spezifischer Antikörper gegen PRMT6, CBX8 und EZH2 für die Immunpräzipitation wurden deren Anreicherungen an den gezeigten *HOXA* Genen mittels ChIP-qPCR analysiert. Die ChIP-qPCR wurde bezogen auf die eingesetzte Chromatinmenge (Input) ausgewertet und in % ausgedrückt. IgG wurde als unspezifischer Kontrollantikörper mitgeführt. Die undifferenzierten Zellen sind in schwarz, 2 Tage differenzierte Zellen in dunkelgrau und 6 Tage differenzierte Zellen in hellgrau abgebildet.

Die Histonmodifikationsmuster (siehe Abbildung 27) an den Genbereichen der frühen *HOXA* Gene korrelierten zum einen mit der Anwesenheit von PRMT6, CBX8 und EZH2 und zum anderen mit der Expression der Gene nach ATRA-induzierter Differenzierung (siehe Abbildung 25 und Abbildung 26). Die beiden repressiven Histonmodifikationen H3R2me2 und H3K27me3 besetzten die Promotoren der frühen *HOXA* Gene von undifferenzierten Zellen (schwarze Balken). Während der Differenzierung gingen beide Markierungen schnell verloren (hellgraue und weiße Balken). Im Gegensatz dazu wurde die H3K4 Trimethylierung im Verlauf der Differenzierung angereichert, was

mit der Aktivierung der Gene einhergeht. Die späten *HOXA* Gene hingegen wiesen kaum Änderungen der H3R2me2 und H3K27me3 Anreicherungen im Verlauf der Differenzierung auf. Allerdings zeigte sich nach 6 Tagen (weißer Balken) Differenzierung ein Verlust der H3K4 Trimethylierung an beiden Genen, wodurch die Repression der Genexpression erklärt werden kann.

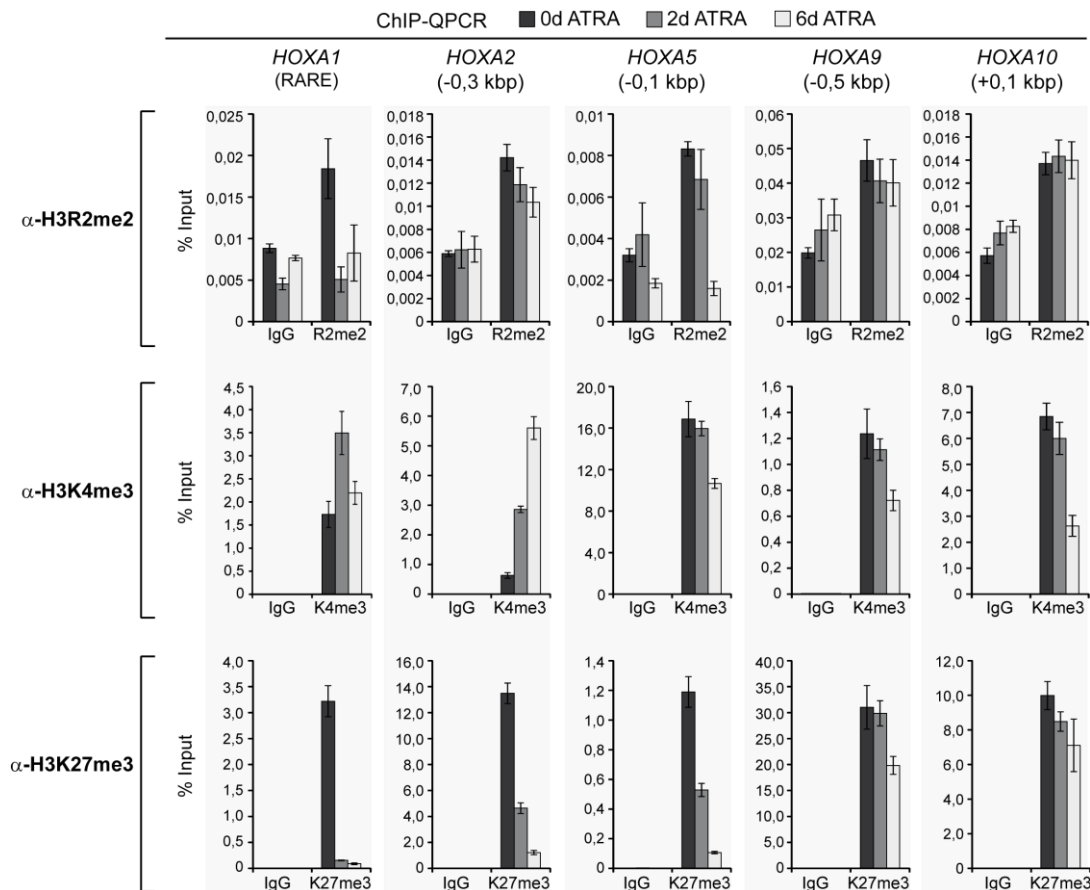


Abbildung 27: Veränderung des Histonmodifikationsmusters während der ATRA-induzierten Differenzierung von NT2/D1 Zellen.

NT2/D1 Zellen wurden nicht (0d), 2 Tage (2d) oder 6 Tage (6d) mit 0,1 μ M ATRA differenziert und für ChIP-Analysen eingesetzt. Unter Verwendung spezifischer Antikörper gegen H3R2me2, H3K4me3 und H3K27me3 für die Immunpräzipitation wurden deren Anreicherungen an den gezeigten *HOXA* Genen mittels ChIP-qPCR analysiert. Die ChIP-qPCR wurde bezogen auf die eingesetzte Chromatinmenge (Input) ausgewertet und in % ausgedrückt. IgG wurde als unspezifischer Kontrollantikörper mitgeführt. Die undifferenzierten Zellen sind in schwarz, 2 Tage differenzierte Zellen in dunkelgrau und 6 Tage differenzierte Zellen in hellgrau abgebildet.

4.3.7 DIE DEPLETION VON PRMT6 VERÄNDERT DIE *HOXA* GENEXPRESSION WÄHREND DER DIFFERENZIERUNG

Um zu überprüfen, ob die Depletionen von PRMT6 und CBX8 veränderte *HOXA* Genexpression bewirken, wurde eine siRNA-vermittelte Depletion der Proteine in NT2/D1 Zellen etabliert. Dazu wurden NT2/D1 Zellen mit den angegebenen spezifischen siRNAs transfiziert und 48 h später

ERGEBNISSE

trypsiniert und auf neue Gewebekulturschalen verteilt. Weitere 48 h später wurden die Zellen lysiert, um mittels Western Blot-Analyse die spezifische Depletion von PRMT6 und CBX8 nachzuweisen (siehe Abbildung 28). Wie aus Abbildung 28 hervorgeht, ist der *knockdown* beider Proteine auch nach Subkultivierung über den experimentellen Zeitraum stabil.

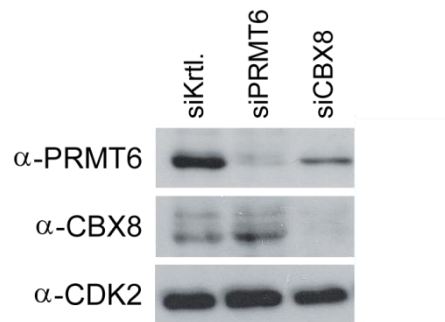


Abbildung 28: siRNA-vermittelte Depletion von PRMT6 und CBX8 in NT2/D1 Zellen.

NT2/D1 Zellen wurden mit einer Mischung spezifischer siRNA gegen PRMT6 bzw. einer einzelnen siRNA gegen CBX8 und mit einer Mischung aus Kontroll- (Krtl.) siRNA transfiziert. 48 h nach der Transfektion wurden die Zellen trypsiniert, auf neue Gewebekulturschalen verteilt und für weitere 48 h kultiviert. Anschließend wurden 30 µg FT-Lysat für Western Blot-Analysen, zum Nachweis der spezifischen Depletion auf Proteinebene, eingesetzt. Die Detektion erfolgte mit einem PRMT6- und CBX8- spezifischen Antikörper. Die Färbung von CDK2 diente als Ladekontrolle.

Nachfolgend wurden NT2/D1 Zellen wie oben beschrieben transfiziert. Die Differenzierung mit ATRA wurde 48 h nach Transfektion für 3 Tage begonnen. Unbehandelte Zellen wurden mit 0d bezeichnet und repräsentieren den undifferenzierten Zustand der Zellen. Die Ergebnisse der relativen mRNA-Analyse sind in Abbildung 29 für *HOXA2* und *HOXA5* als Beispiele für frühe *HOXA* Gene und *HOXA9* und *HOXA10* als Vertreter der späten *HOXA* Gene dargestellt. *HOXA2* und *HOXA5* waren in undifferenzierten Zellen (0d) nicht exprimiert und wurden durch die Depletion von PRMT6 und CBX8 nicht beeinflusst. Wie in Abbildung 25 gezeigt und in der Literatur beschrieben (Bracken *et al.* 2006) wurden die frühen *HOXA* Gene im Verlauf der Differenzierung in den Kontroll-transfizierten Zellen (siKrtl) aktiviert (siehe Abbildung 29 A). Die relativen mRNA-Mengen waren 15-fach für *HOXA2* und 5-fach für *HOXA5* induziert. Die Depletion von PRMT6 und CBX8 bewirkte eine verstärkte Aktivierung der Gene, welche im Fall von *HOXA2* dreimal und im Fall von *HOXA5* zweimal stärker war als in den Kontrollzellen. Die späten *HOXA* Gene wurden im undifferenzierten Zustand (0d) ähnlich wie die frühen Gene vom *knockdown* kaum beeinflusst. Nach Induktion der Differenzierung zeigte sich in den Kontrollzellen (siKrtl.) eine leichte Aktivierung. Allerdings führte die Depletion von PRMT6 und CBX8 zu einer für *HOXA9* 2-fach und für *HOXA10* 5-fach stärkeren Expression als in den Kontrollzellen (siehe Abbildung 29 B).

Zusammenfassend resultierten die Depletionen von PRMT6 und CBX8 in veränderten *HOXA* Genexpressionsmustern, die sich in einer Hyperaktivierung der frühen (anterior) *HOXA* Gene und

einer Derepression der späten (posterior) *HOXA* Gene widerspiegelte. Damit deuten die Ergebnisse darauf hin, dass PRMT6 und CBX8 für die korrekte Expressionsregulation der Gene des *HOXA* Locus während der ATRA-induzierten Differenzierung von NT2/D1 Zellen notwendig sind.

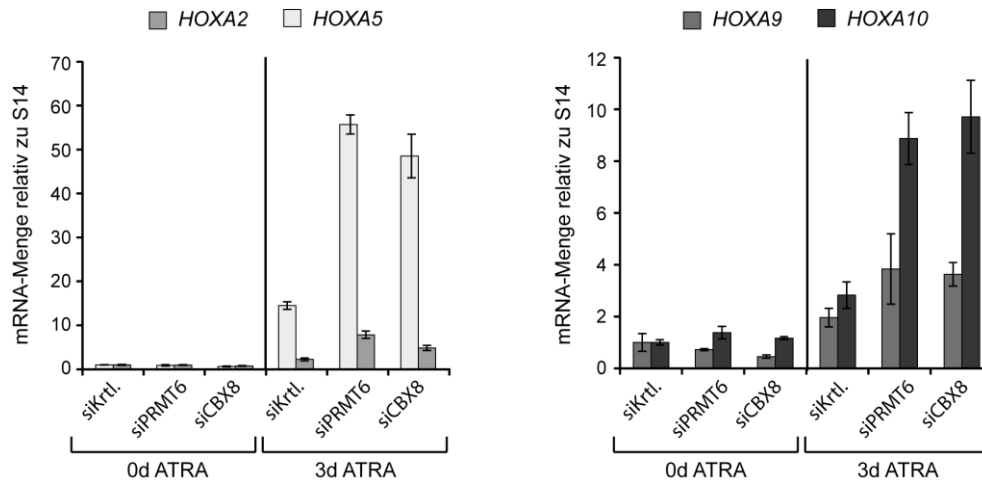


Abbildung 29: Verändertes Expressionsmuster der *HOXA* Gene während der ATRA-induzierten Differenzierung im *knockdown* von PRMT6 und CBX8.

NT2/D1 Zellen wurden mit einer Mischung spezifischer siRNA gegen PRMT6 bzw. einer einzelnen siRNA gegen CBX8 und mit einer Mischung aus Kontroll- (Krtl.) siRNA transfiziert. 48 h nach der Transfektion wurden die Zellen trypsiniert, auf neue Gewebekulturschalen verteilt und die Differenzierung mit 0,1 μ M ATRA begonnen. 72 h später wurden die Zellen für RT-qPCR Analysen geerntet und die *HOXA* Genexpression von undifferenzierten (0d) und 3 Tage differenzierten (3d) Zellen, in Abhängigkeit von der spezifischen Depletion von PRMT6 und CBX8, verglichen. Die relativen mRNA-Mengen wurden durch Normalisierung auf *S14* ermittelt.

4.3.8 DIE DEPLETION VON PRMT6 HAT VERÄNDERUNGEN IM HISTONMODIFIKATIONSMUSTER AM *HOXA* LOKUS ZUR FOLGE

Um zu analysieren, ob die Depletion von PRMT6 das Histonmodifikationsmuster der *HOXA* Gene beeinflusst, wurden undifferenzierte PRMT6-defiziente und 2 Tage differenzierte PRMT6-defiziente NT2/D1 Zellen in ChIP-Analysen hinsichtlich der Anreicherungen von H3K4me3 und H3K27me3 verglichen. Wie in Abbildung 30 A gezeigt, bindet PRMT6 in den Kontroll-transfizierten (siKrtl.) Zellen an die untersuchten Genbereiche. Diese Bindung ist in den PRMT6-defizienten Zellen reduziert. Bezüglich der Histonmodifikationen bewirkte die Depletion von PRMT6 in undifferenzierten Zellen (graue Balken: 0d siKrtl und 0d siPRMT6) keine Veränderung der H3K4 Trimethylierung oder H3K27 Trimethylierung (siehe Abbildung 30 B). Jedoch führte die Abwesenheit von PRMT6 während der ATRA-induzierten Differenzierung zur Verstärkung der H3K4 Trimethylierung an allen untersuchten *HOXA* Genen. Im Gegensatz dazu reduzierte sich die Anreicherung der repressiven Modifikation H3K27me3 nach Depletion von PRMT6 am *HOXA2*, *HOXA5*, *HOXA9* und *HOXA10*. Diese Veränderungen im Histonmodifikationsmuster korrelierten mit

ERGEBNISSE

der in Abbildung 29 dargestellten Genaktivierung nach Induktion der Differenzierung mit ATRA. Nur auf die Anreicherung der H3K27 Trimethylierung an der RARE-Region *downstream* von *HOXA1* Gen hatte die Depletion von PRMT6 keinen Einfluss (siehe Abbildung 30 B).

PRMT6 beeinflusst, während der ATRA-induzierten Differenzierung von NT2/D1 Zellen, einerseits die H3K27 Trimethylierung positiv und andererseits die H3K4 Trimethylierung negativ an den Genen des *HOXA* Lokus.

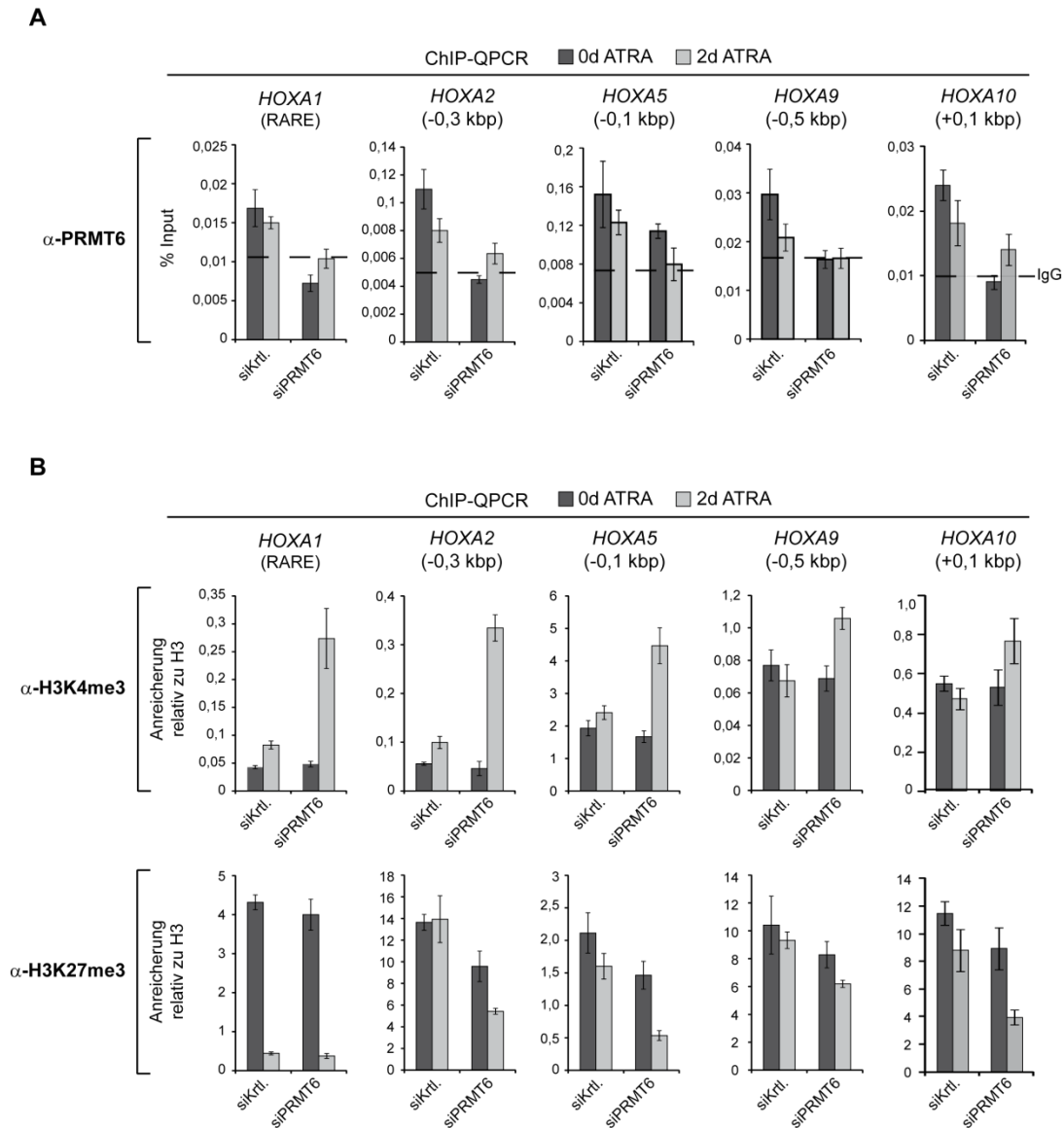


Abbildung 30: Veränderungen am *HOXA* Lokus auf Chromatinebene nach Depletion von PRMT6.

NT2/D1 Zellen wurden mit einer Mischung spezifischer siRNA gegen PRMT6 bzw. einer einzelnen siRNA gegen CBX8 und mit einer Mischung aus Kontroll- (Krtl.) siRNA transfiziert. 48 h nach der Transfektion wurden die Zellen trypsinisiert, auf neue Gewebekulturschalen verteilt und die Differenzierung mit 0,1 μ M ATRA begonnen. 48 h später wurden die Zellen für ChIP-Analysen eingesetzt. Für die Immunpräzipitation wurden die spezifischen Antikörper gegen PRMT6, H3K4me3 und H3K27me3 verwendet. Die Anreicherungen an den gezeigten *HOXA* Genen wurde mittels ChIP-qPCR analysiert, bezogen auf die eingesetzte Chromatinmenge (Input) ausgewertet und in % ausgedrückt. IgG wurde als unspezifischer Kontrollantikörper mitgeführt.

4.4 PRMT6 REGULIERT PROLIFERATION UND SENESZENZ ÄHNLICH WIE POLYCOMB REPRESSOR KOMPLEXE

BMI1 und CBX8, Komponenten des PRC1 Komplex und die drei Hauptkomponenten des PRC2 Komplex EZH2, SUZ12 und EED sind für die Proliferation von humanen diploiden Fibroblasten essentiell (Jacobs *et al.* 1999; Bracken *et al.* 2003; Pasini *et al.* 2004; Liu *et al.* 2006; Dietrich *et al.* 2007). Außerdem wurde gezeigt, dass die Polycomb Gruppen (PcG) Proteine BMI1 und CBX8 durch die Repression des *INK4A-ARF* Lokus den Beginn der Seneszenz in murinen und humanen embryonalen Fibroblasten hinauszögern können (Jacobs *et al.* 1999; Dietrich *et al.* 2007). Da PRMT6 mit PcG Proteinen interagieren kann (siehe 4.3.2 und 4.3.4) und die Differenzierung von NT2/D1 Zellen in ähnlicher Weise reguliert, wie die PcG Proteine (siehe 4.3.6), sollte nun untersucht werden, ob PRMT6 auch für Proliferation sowie Regulation von Seneszenz zusammen mit den PcG Proteinen wichtig ist.

4.4.1 SHRNA-VERMITTELTE DEPLETION IN DER HUMANEN DIPLOIDEN FIBROBLASTENZELLINIE TIG3-T

Die Untersuchung zur Funktion von PRMT6 bezüglich Proliferation und Seneszenz wurde in der embryonalen diploiden Lungenfibroblastenzelllinie Tig3-T durchgeführt. Dazu sollte die Depletion mittels RNA-Interferenz etabliert werden. Die Tig3-T Zellen exprimieren stabil den *ekotrophen* Rezeptor, was die retrovirale Infektion mit shRNA-Vektoren ermöglichte. Die von dem H1-RNA Promoter exprimierte shRNA wird dann durch zelluläre Enzyme in eine funktionelle siRNA konvertiert und ermöglicht so einen permanenten Abbau der Ziel-mRNA. Ein weiterer Vorteil der Nutzung von shRNA-vermittelter Depletion ist die Möglichkeit die Zellen mit Antibiotika auf die Expression der shRNA zu selektionieren. Zu diesem Zweck wurden zunächst Oligonukleotide für shRNAs in den retroviralen Expressionsvektor pSuper.retro.puro kloniert (Brummelkamp *et al.* 2002). Danach wurde der Einfluss der Kontroll-shRNAs auf das Wachstum und Cyclin A2, als Regulator der G1/S und G2/M Übergänge im Zellzyklus, getestet. Dazu wurden Tig3-T Zellen mit pRSleer, pRSshLuc und pRSshScr infiziert. Aus Abbildung 31 A geht hervor, dass schon die Anwesenheit einer unspezifischen shRNA (pRSshLuc und pRSshScr) zu verlangsamtem Wachstum im Vergleich zum Leervektor ohne shRNA (pRSleer) führte. Die Infektion von pRSshScr resultierte nach 9 Tagen sogar in einem kompletten Proliferationsarrest, der mit reduzierter *CCNA2* Expression und deutlich verminderter Cyclin A2 Proteinmenge, verglichen mit pRSleer und pRSshLuc, einherging. Aufgrund der Ergebnisse war davon auszugehen, dass es sich hierbei um Nebeneffekte (*off-target-effect*) handelte. pRSshScr war für folgende Experimente als Kontrolle nicht geeignet. Im Folgenden wurden deshalb pRSleer und pRSshLuc (bezeichnet als pRSshKrtl.) als Kontrollen mitgeführt.

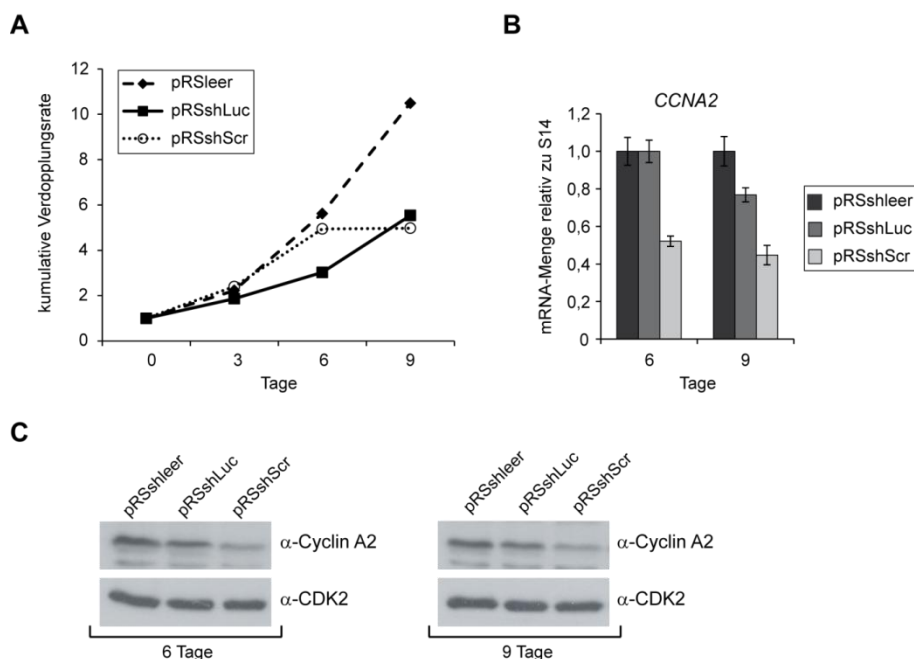


Abbildung 31: Charakterisierung der Kontroll-shRNAs in Tig3-T Zellen.

Tig3-T Zellen wurden mit den Kontroll-shRNA-Vektoren pRSleer, pRSshLuc und pRSshScr infiziert und 48 h nach Infektion für 3 Tage mit 1 µg/ml Puromycin selektioniert. Tag 3 der Selektion entspricht Tag 0 des *knockdowns*. (A) Die selektionierten Zellen wurden mit einer Zelldichte von $1,5 \times 10^5$ Zellen pro 6-well in Triplikaten ausgesät, über einen Zeitraum von 9 Tagen alle drei Tage gezählt und erneut mit der Anfangszellzahl ausplattiert. Die daraus berechneten Verdopplungsraten wurden kumulativ gegen die Zeit (in Tagen) aufgetragen. Die Standardabweichung der Triplikate wurde ebenso ermittelt. (B) Die Zellen wurden nach einer Depletionsdauer von 6 und 9 Tagen für RT-qPCR Analysen geerntet und die relative Expression von *CCNA2* durch Normalisierung auf *S14* ermittelt. (C) Die Zellen wurden nach einer Depletionsdauer von 6 und 9 Tagen für Western Blot-Analysen geerntet und 40 µg Lysat mittels SDS-PAGE aufgetrennt und zur Detektion mit einem spezifischen Antikörper gegen Cyclin A2 gefärbt. Die CDK2 Färbung diente als Ladekontrolle.

4.4.2 DIE DEPLETION VON PRMT6 RESULTIERT IN VERLANGSAMTER PROLIFERATION UND SENESZENZ VON TIG3-T ZELLEN

Die Depletion von PRMT6 in Tig3-T Zellen wurde mit drei verschiedenen Zielsequenzen für PRMT6 in shRNA-Vektoren (pRSshPRMT6_1, _2, _5) etabliert, um sequenzunspezifische Nebeneffekte auszuschließen. Zunächst wurden die verwendeten shRNA-exprimierenden Vektoren auf ihre Fähigkeit einen effizienten *knockdown* zu etablieren, überprüft. Die Effizienz der Depletions wurde sowohl auf Protein- als auch auf mRNA-Ebene kontrolliert. Wie in Abbildung 32 A gezeigt, führten alle eingesetzten shRNA-Konstrukte gegen PRMT6 zum effizienten Verlust des Proteins. Auch die shRNA gegen CBX8 bewirkte dessen Depletion. Die Expression auf mRNA-Ebene von PRMT6 war um 80 % und die von CBX8 um 70 %, verglichen mit den Kontrollen, reduziert (siehe Abbildung 32 B).

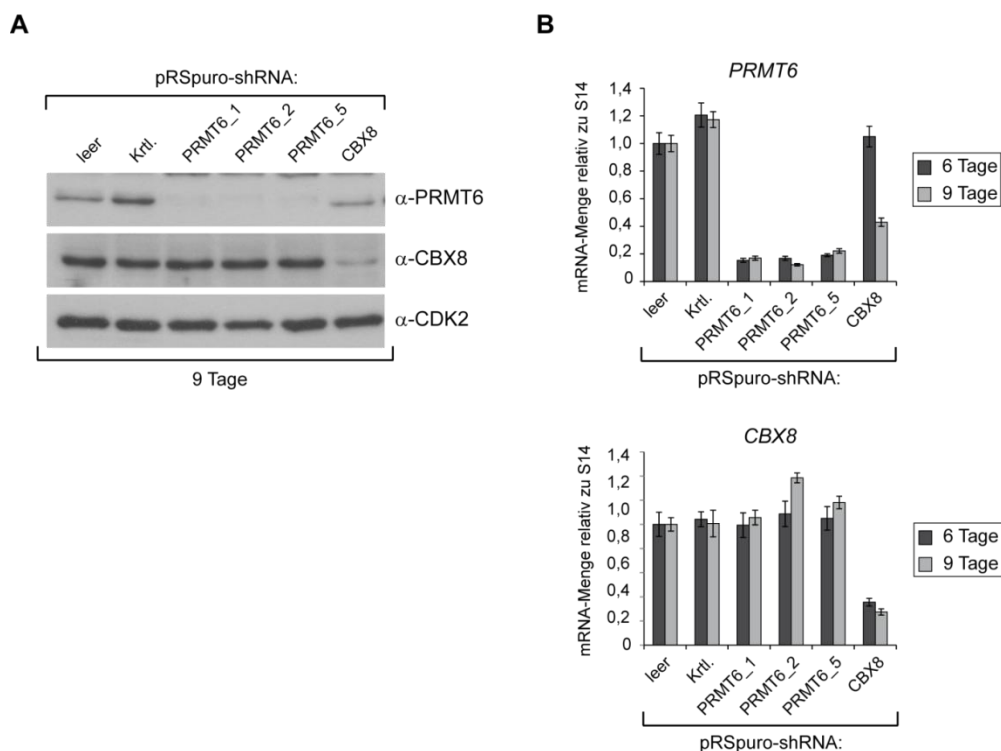


Abbildung 32: Nachweis der shRNA-vermittelten Depletion von PRMT6 und CBX8.

Tig3-T Zellen wurden mit den angegebenen shRNA-Vektoren infiziert und 48 h nach Infektion für 3 Tage mit 1 µg/ml Puromycin selektioniert. Tag 3 der Selektion entspricht Tag 0 des *knockdowns*. (A) Die Zellen wurden nach einer Depletionsdauer von 9 Tagen für Western Blot-Analysen lysiert. 40 µg FT-Lysat wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und die Depletion mit Antikörpern gegen PRMT6 und CBX8 nachgewiesen. Die CDK2 Färbung diente als Ladekontrolle. (B) Die Kontrolle der Depletion von PRMT6 und CBX8 auf mRNA-Ebene wurde mittels RT-qPCR durchgeführt. Dazu wurden Zellen nach 6 und 9 Tagen Depletionsdauer analysiert. Die Normalisierung erfolgte auf *S14* und wurde als relative Änderung dargestellt.

Da für CBX8 aus der Literatur bereits bekannt war (Dietrich *et al.* 2007), dass es für die Proliferation humaner Fibroblasten nötig ist, diente die Depletion von CBX8 in den folgenden Experimenten als Positivkontrolle. Aus der Wachstumskurve in Abbildung 33 A geht hervor, dass die Proliferation der PRMT6-defizienten Zellen ebenso deutlich verlangsamt war, wie die von CBX8-defizienten Zellen. Auch hier wurde beobachtet, dass sich schon die Infektion von pRSshKrtl. im Vergleich zu pRSleer verlangsamernd auf die Proliferation der Tig3-T Zellen auswirkte. Zusätzlich ergaben FACS-Analysen zur Zellzyklusverteilung von Tig3-T Zellen, dass die Depletion von PRMT6 ebenso wie die von CBX8 zur Akkumulation der Zellen in der G1-Phase führte. Die Zellzahl in der G1-Phase des Zellzyklus nahm im *knockdown* von PRMT6 um 7 - 19 % und im *knockdown* von CBX8 um 14 %, bezogen auf die pRSleer infizierten Zellen zu (siehe Abbildung 33 B).

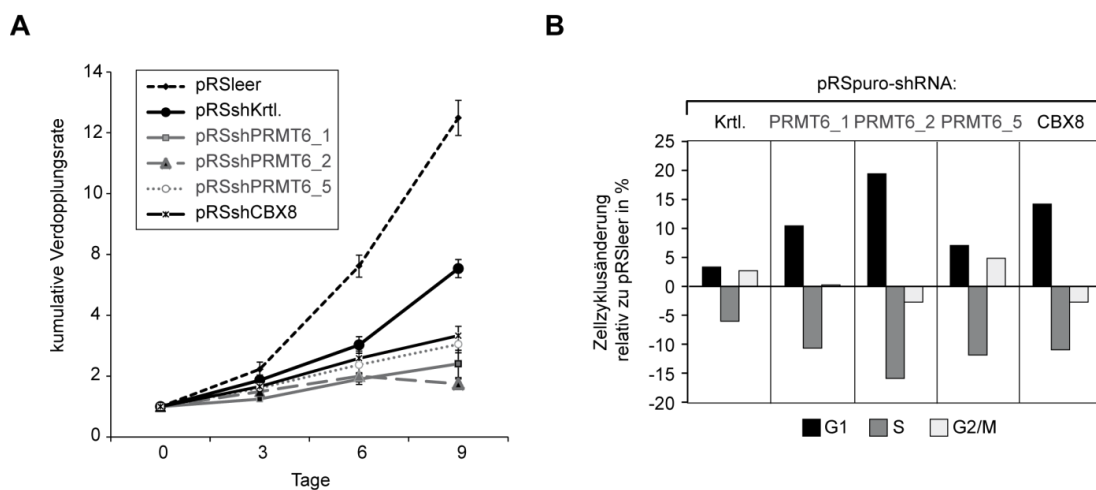


Abbildung 33: PRMT6-defiziente Zellen proliferieren langsamer und arretieren in der G1-Phase.

Tig3-T Zellen wurden mit den angegebenen shRNA-Vektoren infiziert und 48 h nach Infektion für 3 Tage mit 1 $\mu\text{g/ml}$ Puromycin selektioniert. Tag 3 der Selektion entspricht Tag 0 des *knockdowns*.

(A) Die selektionierten Zellen wurden mit einer Zelldichte von $1,5 \times 10^5$ Zellen pro 6-well in Triplikaten ausgesät, über einen Zeitraum von 9 Tagen alle drei Tage gezählt und erneut mit der Anfangszellzahl ausplattiert. Die daraus berechneten Verdopplungsraten wurden kumulativ gegen die Zeit (in Tagen) aufgetragen. Die Standardabweichung der Triplikate wurde ebenso ermittelt.

(B) Die Zellen wurden nach 7 Tagen Depletion von PRMT6 und CBX8 fixiert, mit Propidiumiodid gefärbt und die Zellzyklusverteilung mittels FACS-Analysen bestimmt. Die Daten der FACS-Analyse sind als Änderung relativ zur pRSleer-Kontrolle dargestellt.

Um herauszufinden, ob die verlangsamte Proliferation und die Akkumulation der Zellen in der G1-Phase des Zellzyklus daraus resultierten, dass die Zellen seneszent wurden, wurden die PRMT6-defizienten Zellen und CBX8-defizienten Zellen im Vergleich zu Kontrollzellen hinsichtlich Seneszenz-assoziiierter Merkmale untersucht. Eine Eigenschaft seneszenter Zellen ist das Auftreten erhöhter β -Galaktosidase Aktivität bei pH 6,0 (Dimri *et al.* 1995). Selektionierte Tig3-T Zellen, die über einen Zeitraum von 7 Tagen von PRMT6 und CBX8 depletiert waren, wurden auf ihre

Seneszenz-assoziierte β -Galaktosidase Aktivität untersucht. Ungefähr 16 h nach Zugabe der Färbelösung, die X-Gal als Substrat enthielt, trat in den PRMT6- und CBX8-defizienten Zellen eine deutlich stärkere Blaufärbung auf als in den Kontrollzellen, die keine oder nur eine leichte Blaufärbung aufwiesen (siehe Abbildung 34). Diese Daten belegen, dass PRMT6 sowohl für die Proliferation von humanen diploiden Fibroblasten notwendig ist, als auch bei der Kontrolle zellulärer Seneszenz eine Rolle spielt.

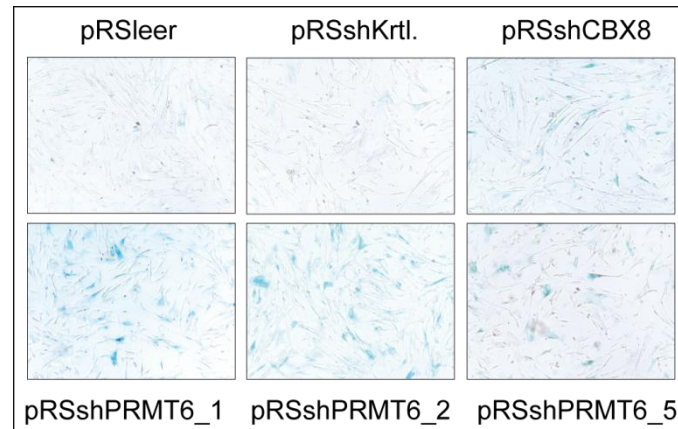


Abbildung 34: PRMT6-defiziente Zellen zeigen höhere β -Galaktosidase Aktivität als Kontrollzellen.

Tig3-T Zellen wurden mit den angegebenen shRNA-Vektoren infiziert und 48 h nach Infektion für 3 Tage mit 1 μ g/ml Puromycin selektioniert. Nach 7-tägiger Depletion von PRMT6 und CBX8 wurden die Zellen auf die Aktivität von Seneszenz-assoziiierter β -Galaktosidase untersucht.

4.4.3 PRMT6-DEFIZIENTE ZELLEN ZEIGEN ERHÖHTE EXPRESSIONSLEVEL DER ZELLYKLUSINHIBITOREN P16/INK4A UND P21/CIP1

Die Ausbildung des Seneszenz-assoziierten Phänotyps wird von vielen Änderungen in der Genexpression begleitet. Von besonderer Bedeutung ist hier die Induktion der Zellzyklusinhibitoren *p16/INK4A* und *CDKN1A* (p21/CIP1) (Ben-Porath and Weinberg 2005; Zhang 2007).

Wie in der Literatur beschrieben (Dietrich *et al.* 2007), führte der *knockdown* von CBX8 zu erhöhten Expressionsleveln von p16/INK4A und p21/CIP1 sowohl auf Proteinebene als auch auf mRNA-Ebene und zur Reduktion der *CCNA2* Transkript- sowie Cyclin A2 Proteinmenge (siehe Abbildung 35 A und B). Die Depletion von PRMT6 in Tig3-T Fibroblasten verursachte ebenfalls erhöhte Proteinmengen von p16/INK4A und p21/CIP1, während Cyclin A2 abnahm (siehe Abbildung 35 A). Wie auch in der Literatur erwähnt, waren die p53 Proteinlevel in seneszenten Zellen größtenteils unbeeinflusst. Die Regulation der Proteine spiegelte sich auch auf mRNA-Ebene im *knockdown* von PRMT6 wider. Die Depletion von PRMT6 begünstigte die Expression von *p16/INK4A* und *CDKN1A* (p21/CIP1) während die Expression von *CCNA2* vermindert war (siehe Abbildung 35 C).

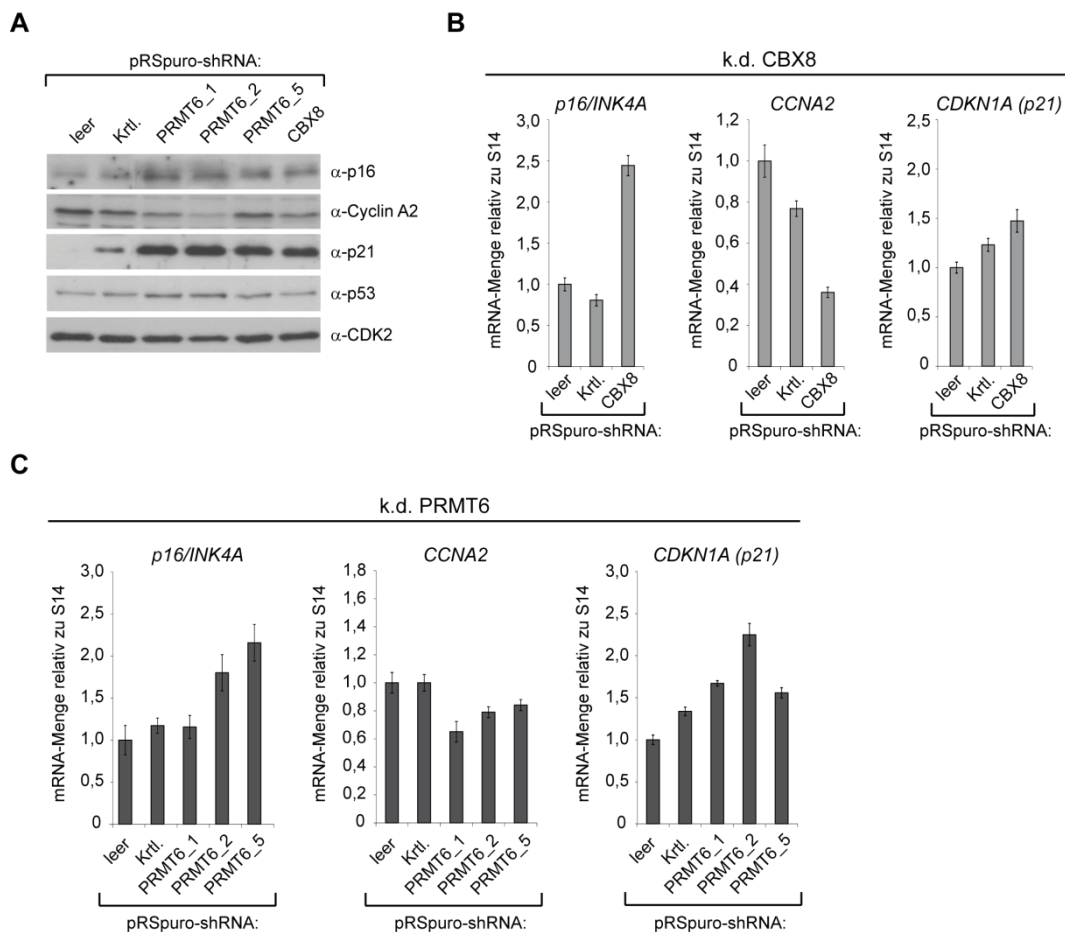


Abbildung 35: PRMT6 reguliert die Proliferation von humanen diploiden Fibroblasten.

Tig3-T Zellen wurden mit den angegebenen shRNA-Vektoren infiziert und 48 h nach Infektion für 3 Tage mit 1 µg/ml Puromycin selektiert. Nach 6-tägiger Depletion von PRMT6 und CBX8 wurden die Zellen (A) in Western Blot-Analysen zur Untersuchung der p16, p21, Cyclin A2 und p53 Level eingesetzt. Die Färbung von CDK2 diente als Ladekontrolle. Die Analysen der *p16/INK4A*, *CCNA2* und *CDKN1A* (p21/CIP1) mRNA im *knockdown* (k.d.) von CBX8 in (B) und PRMT6 in (C) wurden mittels RT-qPCR durchgeführt und auf *S14* normalisiert angegeben.

Die beiden anderen Transkripte des untersuchten Lokus, *p15/INK4B* und *p14/ARF* waren weder durch die Depletion von CBX8 (siehe Abbildung 36 A) noch durch die von PRMT6 (siehe Abbildung 36 B) in ihrer Expression beeinflusst. Die Daten deuten darauf hin, dass PRMT6 ähnlich wie CBX8 in Tig3-T Zellen *p16/INK4A* aber nicht *p14/ARF* oder *p15/INK4B* reprimiert.

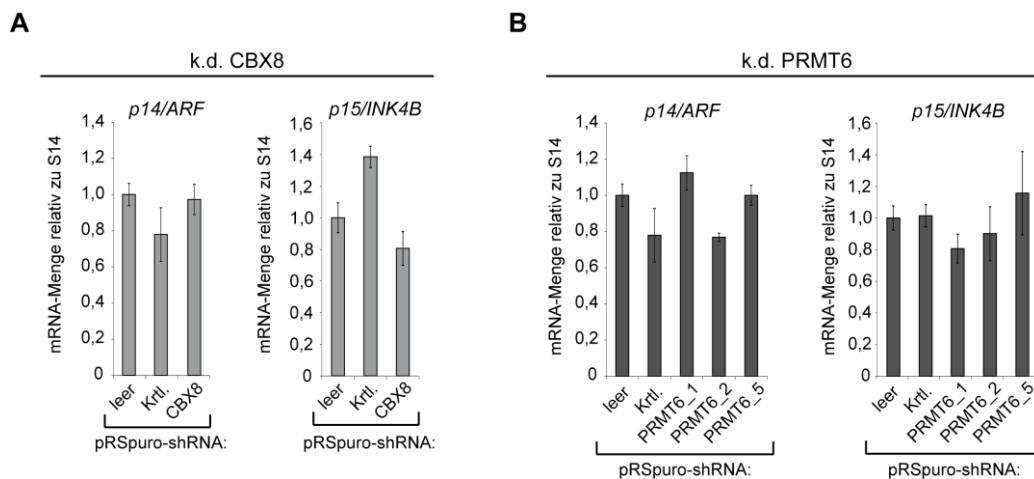


Abbildung 36: *p15/INK4B* und *p14/ARF* sind unabhängig von PRMT6 exprimiert.

Tig3-T Zellen wurden mit den angegebenen shRNA-Vektoren infiziert und 48 h nach Infektion für 3 Tage mit 1 µg/ml Puromycin selektioniert. Nach 6-tägiger Depletion von PRMT6 und CBX8 wurden die Zellen mittels RT-qPCR auf die *p14/ARF* und *p15/INK4B* mRNA-Level untersucht. Die Normalisierung erfolgte auf *S14*.

4.4.4 PRMT6 REGULIERT DIE EXPRESSION VON *p16/INK4A* DURCH DIREKTE BINDUNG

Ob die Repression von *p16/INK4A* durch direkte Bindung von PRMT6 realisiert wird, sollte mit Hilfe von Chromatin-Immunpräzipitationen untersucht werden. Dafür wurden Tig3-T Fibroblastenzellen hinsichtlich der Bindung von PRMT6 mit der Anreicherung von H3K27me3 über den *INK4A-ARF-INK4B* Locus verglichen. Die Analyse der Chromatin-Immunpräzipitation zeigt, dass PRMT6 mehrere Regionen des *INK4A* Locus bindet. Die stärksten Anreicherungen für PRMT6 wurden in der untersuchten Promoterregion von *p16/INK4A* (Primer 2) und in dem Bereich nach dem ersten Exon (Primer 4 und 6) detektiert. Im Gegensatz dazu war PRMT6 am *p15/INK4B* Promoter (Primer 1) nicht über Hintergrund detektierbar (siehe Abbildung 37).

Diese Daten und die Tatsache, dass das Bindungsmuster von PRMT6 am *INK4A* Locus, dem von H3K27me3 (siehe Abbildung 37 und (Bracken *et al.* 2007)) entspricht, unterstützen die Theorie, dass PRMT6 zusammen mit den PcG Proteinen Proliferation und Seneszenz, u.a. durch die Repression von *p16/INK4A*, regulieren könnte.

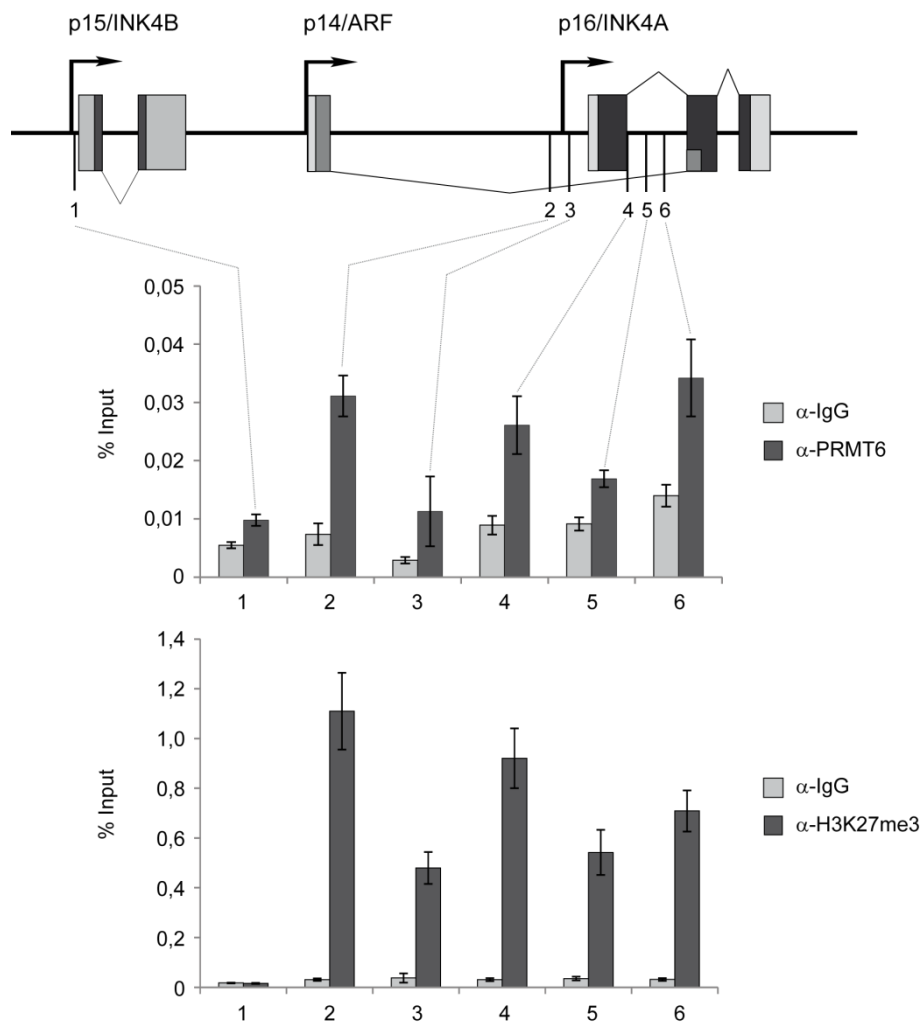


Abbildung 37: PRMT6 bindet direkt an p16/INK4A.

ChIP-Analyse des *INK4B* Locus und des *INK4A-ARF* Locus in Tig3-T Fibroblasten. Die mit α -PRMT6 oder α -H3K27me3 präzipitierte DNA wurde mittels ChIP-qPCR unter Verwendung spezifischer Primer (1 - 6) der gekennzeichneten Regionen amplifiziert. Die Anreicherungen wurden relativ zur eingesetzten Chromatinmenge (Input) berechnet und in % ausgedrückt. Als Kontrollantikörper für die Immunpräzipitation wurde IgG verwendet. Die Lokalisation der verwendeten Primer ist schematisch im oberen Teil der Abbildung dargestellt.

4.4.5 PRMT6 REGULIERT DIE PROLIFERATION VON TUMORZELLEN

Der Verlust des funktionsfähigen ARF-p53 Signaltransduktionsweges führt zur Immortalisierung von Zellen und zur Fähigkeit Kolonien aus Einzelzellen (Klonogenität) zu bilden. Um herauszufinden welche Auswirkung der Verlust von PRMT6 auf die Klonogenität von Tumorzellen hat, wurde das klonogene Potential von U2OS Zellen, in denen der *INK4A-ARF* Locus durch DNA-Methylierung stillgelegt ist (Park *et al.* 2002), im *knockdown* von PRMT6 untersucht. Dazu wurden U2OS Zellen mit zwei verschiedenen PRMT6-spezifischen siRNAs und Kontroll-siRNA transfiziert und 48 h nach Transfektion dünn ausgesät. Die Effizienz der Depletion wurde mittels Western Blot-Analyse kontrolliert (siehe Abbildung 38 A). Zwei Wochen nach dem Ausplattieren wurden die Zellen mit Krystallviolett gefärbt und die Anzahl der gebildeten Kolonien quantifiziert (Abbildung 38 B und C). Die Depletion von PRMT6 führte mit beiden alternativen siRNAs zu einer deutlichen Verringerung der Koloniezahl von mindestens 40 % im Vergleich zu Kontrollzellen (siehe Abbildung 38 B und C). Daten aus der Literatur, die belegen, dass auch CBX8 und SUZ12 die Proliferation von Tumorzellen unabhängig von *INK4A-ARF* regulieren, konnten reproduziert werden (siehe Abbildung 38, (Pasini *et al.* 2004; Dietrich *et al.* 2007)).

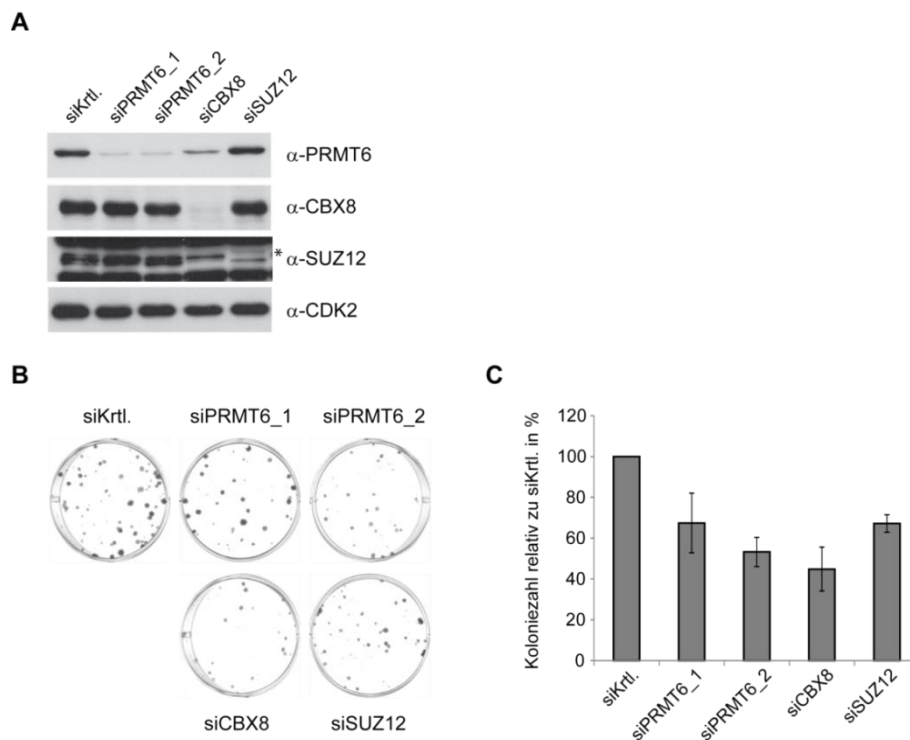


Abbildung 38: PRMT6-defiziente Zellen zeigen verminderte Klonogenität.

U2OS Zellen wurden mit spezifischer siRNA gegen PRMT6, CBX8 und SUZ12 transfiziert. (A) Die Western Blot-Analyse zeigt die effiziente Depletion von PRMT6, CBX8 und SUZ12 auf Proteinebene. (B) 48 h nach Transfektion wurden 400 Zellen pro 9,6 cm² Wachstumsfläche ausplattiert und die Kolonien nach 2 Wochen mit Kristallviolett gefärbt. Dargestellt ist ein repräsentatives Ergebnis. (C) Quantifizierung der gebildeten Kolonien aus vier verschiedenen Ansätzen. Die gezählten Kolonien wurden relativ zur Kolonieanzahl in den Kontrollzellen berechnet und in % angegeben.

Die parallel durchgeführten Genexpressionsanalysen im *knockdown* von PRMT6, CBX8 und SUZ12 ergaben eine Reduktion der *CCNA2* mRNA (siehe Abbildung 39 A) und die Induktion von *CDKN1A* (p21/CIP1) (siehe Abbildung 39 B), wodurch u.a. die Proliferationseffekte erklärt werden können. Diese Ergebnisse zeigen, dass die Proliferation von Tumorzellen in ähnlicher Weise von PRMT6 und PcG Proteinen beeinflusst wird.

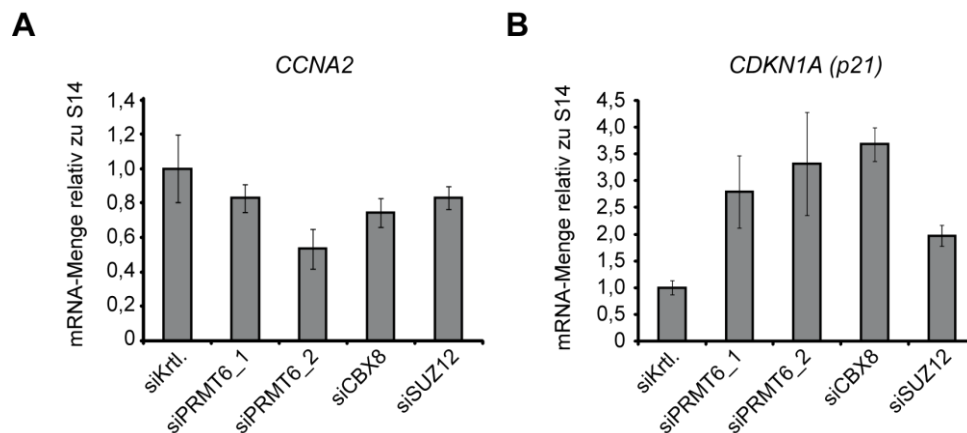


Abbildung 39: PRMT6 ist für die Proliferation von U2OS Zellen notwendig.

U2OS Zellen wurden mit spezifischer siRNA gegen PRMT6, CBX8 und SUZ12 transfiziert und für RT-qPCR Analysen verwendet. Die relativen mRNA-Mengen für (A) *CCNA2* und (B) *CDKN1A* (p21/CIP1) wurden auf *S14* normalisiert.

4.5 IDENTIFIKATION NEUER INTERAKTIONSPARTNER VON PRMT6

Ein weiterer, unvoreingenommener Ansatz zur funktionellen Charakterisierung von PRMT6 war die Aufreinigung und Identifizierung interagierender Proteine. Zu diesem Zweck wurde TAP-modifiziertes PRMT6 aus MCF7 Zellen aufgereinigt und die interagierenden Proteine mittels massenspektrometrischer Analyse identifiziert.

4.5.1 PRMT6 IST BESTANDTEIL HÖHERMOLEKULARER PROTEIN-PROTEIN-INTERAKTIONEN

Um zu überprüfen, ob überexprimiertes TAP (*Tandem Affinity Purification*)-Tag PRMT6 im gleichen Molekulargewichtsbereich eluiert wie endogenes PRMT6 Protein, wurden Gelfiltrationsanalysen mit einer analytischen Superose6 Säule, die ein breites Trennspektrum im Größenbereich von 5 - 5000 kDa aufweist, durchgeführt. Zu diesem Zweck wurden MCF7-TAP-PRMT6 Zellen lysiert, einem Benzonaseverdau unterzogen und anschließend mit Ethidiumbromid versetzt, um DNA-assoziierte Aggregationen auszuschließen. Das in Abbildung 40 dargestellte Elutionsprofil für PRMT6

zeigt deutlich, dass TAP-PRMT6 (exogen) in den gleichen Fraktionen wie PRMT6 (endogen) angereichert war. PRMT6 eluierte vorwiegend in den Fraktionen 14 bis 16 die den Größenbereich von 70 - 440 kDa repräsentieren. Zusätzlich war PRMT6 auch in den Fraktionen 17 und 18, die den Dimer- und Monomerbereich beinhalten, deutlich angereichert. Ein geringerer, aber trotzdem deutlich detektierbarer Anteil von PRMT6 eluierte in den Fraktionen 8 und 9, die den Größenbereich von 1 - 2 MDa umfassen. Aufgrund des Elutionsverhaltens von PRMT6 in der Gelfiltrationsanalyse, kann geschlussfolgert werden, dass PRMT6 assoziiert mit anderen Proteinen vorliegt.

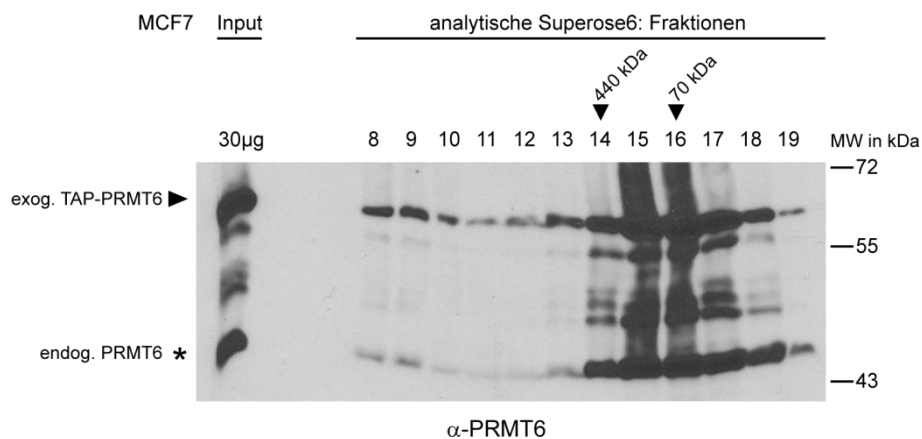


Abbildung 40: PRMT6 ist Bestandteil höhermolekularer Protein-Protein-Interaktionen

Es wurden 100 µl MCF7-TAP-PRMT6 #11 Proteinlysat (≈ 1 mg) mit einer analytischen Gelfiltrationssäule (Superose6) aufgetrennt, fraktioniert (1 ml pro Fraktion) und 20 % jeder Fraktion mittels Western Blot-Analyse auf das Vorkommen von PRMT6 untersucht. Um DNA-vermittelte Interaktionen auszuschließen, wurde das Lysat mit Benzonase behandelt und mit EtBr (100 µg/ml) versetzt. Die Detektion mit einem spezifischen Antikörper gegen PRMT6 erlaubte den Nachweis von exogenem (▶) und endogenem (*) PRMT6. Die angegebenen Proteingrößen für die einzelnen Fraktionen (▼) wurden anhand von Eichproteinen ermittelt.

4.5.2 AUFREINIGUNG VON TAP-MARKIERTER PRMT6 MITTELS 2-SCHRITT-AUFREINIGUNGSSTRATEGIE

Zur Identifizierung neuer Interaktionspartner von PRMT6, die zur Aufklärung der Funktion von PRMT6 beitragen sollen, wurde TAP-PRMT6 mit Hilfe einer 2-Schritt-Aufreinigung über die Bindung an den *Tandem Affinity Purification* (TAP)-Tag durchgeführt. Die Aufreinigungsstrategie ist schematisch in Abbildung 41 A dargestellt. Zunächst wurden die Zelllysate aus MCF7 TAP-PRMT6 und TAP-Leervektor (LV) (Kontrollzellen) für den 1. Schritt der Aufreinigung mit Streptavidin-Sepharose inkubiert. Die Depletion von PRMT6 aus dem Lysat wurde mittels Western Blot-Analyse des Überstandes nach der Bindung an Streptavidin-Sepharose im Vergleich zum eingesetzten Protein (Input) ermittelt. Wie Abbildung 41 B zeigt, war die Bindung von TAP-PRMT6 an Streptavidin-Sepharose vollständig, da TAP-PRMT6 im Überstand nicht mehr detektierbar war. Im Anschluss an die Waschschrte wurden die an Streptavidin-Sepharose gebundenen Proteine durch die Zugabe von Biotin-haltigem Puffer aus der Bindung zur Sepharose verdrängt und freigesetzt.

ERGEBNISSE

Die Effizienz der Elution wurde ebenso auf Western Blot-Ebene überprüft. Auch hier macht Abbildung 41 B deutlich, dass die Elution nahezu vollständig war. Der Anteil von gebundenem PRMT6 an die Sepharose (Beads) nach der Elution war im Vergleich zu gebundener PRMT6 vor der Elution erheblich reduziert und war stattdessen deutlich im Eluat detektierbar. Danach folgte die Bindung an Calmodulin-Sepharose über das Calmodulin-Bindungspeptid am TAP-PRMT6. Wie die Western Blot-Analyse in Abbildung 41 B zeigt, war auch hier die Bindung nahezu komplett, da nur ein geringer Teil von TAP-PRMT6 im Überstand detektierbar blieb. Nach dem Waschen der Sepharose (Beads) erfolgte die Elution mit EGTA-haltigem Puffer, was die Destabilisierung und damit die Freisetzung von TAP-PRMT6 und gebundener Proteine zur Folge hatte. Die Elution war weit weniger effizient als die für Streptavidin-Sepharose gezeigte (siehe Abbildung 41 B). Auch mehrfache Wiederholungen der Elution führten nicht zur vollständigen Aufhebung der Bindung (nicht gezeigt).

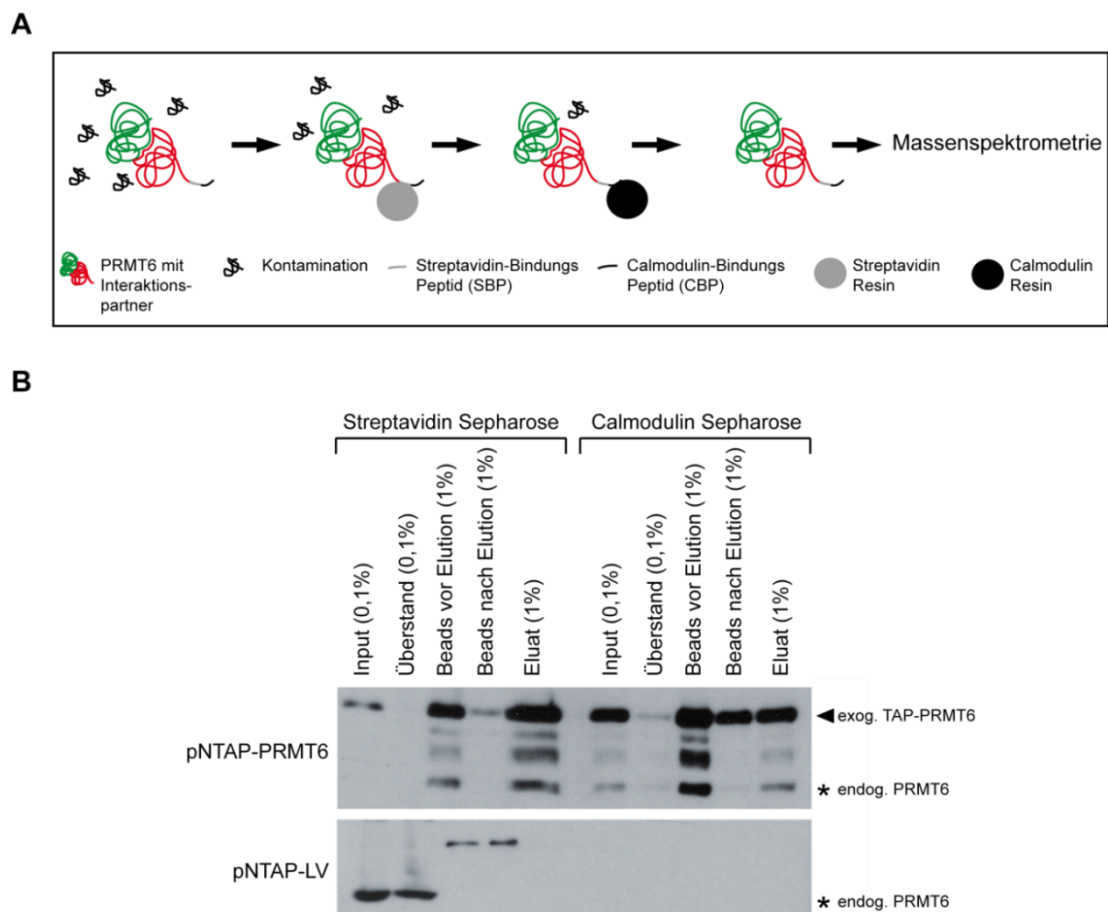


Abbildung 41: 2-Schritt-Aufreinigungsstrategie mittels Tandem Affinity Purification (TAP)-Tag

Die Aufreinigung von PRMT6 aus MCF7 TAP-LV #5 und MCF7 TAP-PRMT6 #11 erfolgte wie in (A) schematisch dargestellt zunächst über die Bindung an Streptavidin-Sepharose und im 2. Aufreinigungsschritt über die Bindung an Calmodulin-Sepharose. (B) Die aufeinanderfolgenden Aufreinigungsschritte wurden durch die Detektion von PRMT6 mittels Western Blot- Analyse kontrolliert. Die Aufreinigung aus MCF7 TAP-PRMT6 #11 ist im oberen Teil und die Kontrollaufreinigung aus MCF7 TAP-LV #5 im unteren Teil abgebildet.

Das erhaltene Eluat wurde mittels StrataClean Resin ankonzentriert und mit SDS-PAGE elektrophoretisch aufgetrennt. Die aufgereinigten Proteine wurden mit colloidaler Coomassie-Färbung sichtbar gemacht (siehe Abbildung 42). Die Anreicherung von TAP-PRMT6 ist mit ◀ gekennzeichnet. Die Kontrollaufreinigung aus TAP-LV Zellen zeigte keine colloidal gefärbten Proteinbanden, die auf unspezifische Bindungen während der Aufreinigung hindeuten würden. Im Gegensatz dazu wurden zusammen mit PRMT6 verschiedene Proteine aufgereinigt, die allerdings in nahezu allen Fällen nicht stöchiometrisch sind. Dies deutet darauf hin, dass es sich wahrscheinlich nicht um starke Assoziationen in einem Proteinkomplex sondern um dynamische oder transiente Interaktionen handelt. Die Spuren der TAP-LV und TAP-PRMT6 Aufreinigung wurden komplett ausgeschnitten und in 66 schmale Banden (1 - 66) für die massenspektrometrische Analyse aufgeteilt. Die massenspektrometrische Analyse der Proteine in den ausgeschnittenen Banden wurde am Leibniz-Institut für Molekulare Pharmakologie (FMP) in Berlin von Dr. Eberhard Krause durchgeführt.

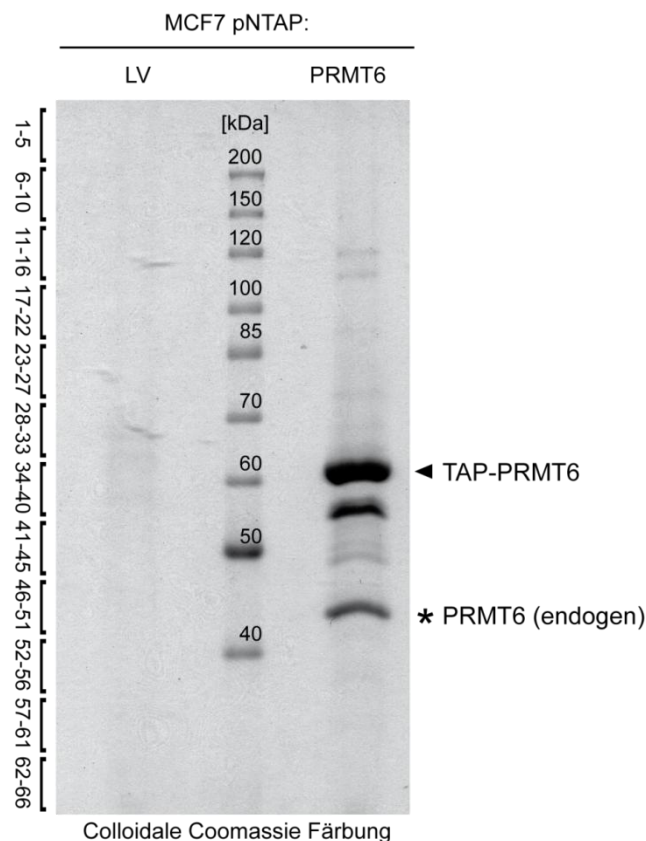


Abbildung 42: Colloidale Coomassie-Färbung der TAP-PRMT6 und TAP-LV Aufreinigung für die massenspektrometrische Analyse.

Im Anschluss an den zweiten Aufreinigungsschritt wurden die Eluate aus der TAP-PRMT6 und der TAP-LV Aufreinigung mit StrataClean Resin ankonzentriert und mittels SDS-PAGE elektrophoretisch aufgetrennt. Anschließend wurden die Proteine mit colloidaler Coomassie-Färbung sichtbar gemacht. Zum Größenvergleich wurde ein *Unstained Proteinmarker* aufgetragen. Die Spuren für beide Aufreinigungen, LV-Kontroll-Aufreinigung und TAP-PRMT6 Aufreinigung, wurden komplett in 66 Banden zerschnitten, wobei jede Bande nummeriert wurde. Dies diente dazu, die identifizierten Proteine anhand ihres Molekulargewichts auf Spezifität zu prüfen. Die Anreicherung von TAP-PRMT6 ist markiert (◀).

ERGEBNISSE

Um auszuschließen, dass PRMT6 neben Homodimeren auch Homooligomere bilden kann, wurden die Elutionsprofile von TAP-PRMT6 und von rekombinant aufgereinigtem His-PRMT6 verglichen. Um eine bessere Auftrennung der Proteine im Molekulargewichtsbereich zwischen 40 und 600 kDa zu erhalten, wurden die Analysen mit einer analytischen Superdex 200 Gelfiltrationssäule durchgeführt, die im Molekulargewichtsbereich von 10 bis 900 kDa eine bessere Trennschärfe aufweist als die Superose6 Gelfiltrationssäule. Nach dem ersten Aufreinigungsschritt über Streptavidin-Sepharose eluierte PRMT6 hauptsächlich in den Fraktionen 9 - 11, die einem Molekulargewichtsbereich von 150 - 500 kDa entsprechen (siehe Abbildung 43 A). Im Gegensatz dazu eluierte das verwendete His-PRMT6 hauptsächlich im Monomerebereich mit einem Peak in Fraktion 16 (siehe Abbildung 43 B). Die Ergebnisse der Gelfiltrationsanalysen ergaben, dass PRMT6 überwiegend in Komplexgrößen zwischen 150 und 500 kDa vorkommt. Laut Literatur können PRMTs Homo-Dimere bilden (Yue *et al.* 2007; Thomas *et al.* 2010), die für PRMT6 einer Größe von 85 kDa entsprechen würden. Dies lässt vermuten, dass PRMT6 zusätzlich zur Interaktion mit sich selbst, mit anderen Proteinen assoziiert vorliegt.

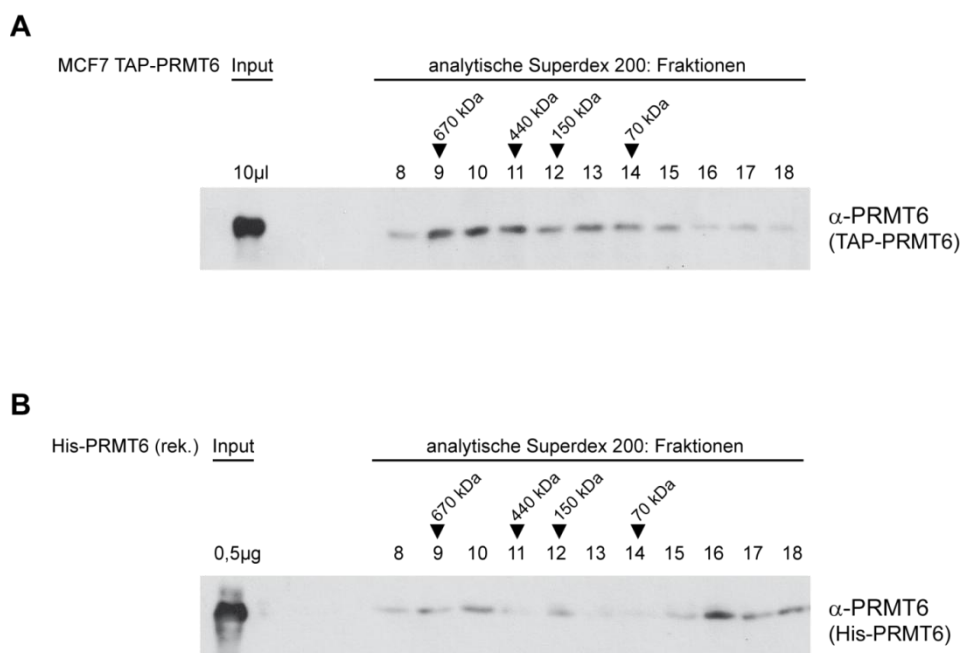


Abbildung 43: Elutionsprofile von TAP-PRMT6 und His-PRMT6 nach der Auftrennung über eine Superdex 200 Gelfiltrationssäule.

(A) Es wurden 100 µl Eluat nach dem 1. Schritt der TAP-Aufreinigung über eine analytische Superdex 200 Gelfiltrationssäule aufgetrennt und das Elutionsprofil für TAP-PRMT6 mittels Western Blot analysiert. (B) Es wurden 2,5 µg rekombinantes His-PRMT6 über eine analytische Superdex 200 Gelfiltrationssäulen aufgetrennt und das Elutionsprofil für His-PRMT6 mittels Western Blot analysiert. Die angegebenen Proteingrößen für die einzelnen Fraktionen (▼) wurden anhand von Eichproteinen ermittelt.

4.5.3 ANALYSE DER IDENTIFIZIERTEN PROTEINE

Mittels massenspektrometrischer Analyse der TAP-PRMT6 Aufreinigung konnten 226 Proteine identifiziert werden. Zunächst wurde das Vorkommen der identifizierten Proteine in der jeweiligen Bande anhand des Molekulargewichts beurteilt. Anschließend wurden die Proteine entfernt, die auch in der TAP-LV Kontrollaufreinigung identifiziert wurden. Die verbliebenen 43 Proteine sind in Tabelle 10 mit ihrer Bezeichnung, der Anzahl der identifizierten Peptide, der erhaltenen Sequenzabdeckung und ihrem Molekulargewicht zusammengefasst. Verunreinigungen mit PRMT6 konnten in nahezu jeder Bande detektiert werden. Jedoch wurde PRMT6 mit den meisten Peptiden und der größten Sequenzabdeckung im Bereich von TAP-PRMT6 und PRMT6 (endogen) detektiert (siehe Abbildung 42).

Tabelle 10: Übersicht der massenspektrometrisch identifizierten Proteine aus der TAP-PRMT6 Aufreinigung.

Protein		Anzahl identifizierter Sequenzabdeckung		Molekulargewicht
		Peptide	in %	
ILF3	Interleukin enhancer-binding factor 3	33	33%	95 kDa
DHX9	ATP-dependent RNA helicase A	21	15%	141 kDa
STAU2	Double-stranded RNA-binding protein Stau1 homolog 2	19	36%	63 kDa
MCM7	DNA replication licensing factor MCM7	18	26%	81 kDa
ILF2	Interleukin enhancer-binding factor 2	18	35%	43 kDa
EF1A1	Elongation factor 1-alpha 1	9	18%	50 kDa
BAG3	BAG family molecular chaperone regulator 3	8	14%	62 kDa
NPM	Nucleophosmin	8	22%	33 kDa
RUVB2	RuvB-like 2	8	20%	51 kDa
WDR18	WD repeat-containing protein 18	7	14%	47 kDa
AFG32	AFG3-like protein 2	7	9%	89 kDa
RUVB1	RuvB-like 1	6	15%	50 kDa
RBM14	RNA-binding protein 14	6	10%	70 kDa
NUP93	Nuclear pore complex protein Nup93	6	8%	93 kDa
YLPM1/ ZAP3	YLP motif-containing protein 1	5	3%	220 kDa
SNW1	SNW domain-containing protein 1	5	10%	62 kDa
RBP56/ TAF15	TATA-binding protein-associated factor 2N	5	8%	62 kDa
RBBP7/ RbAp46	Histone-binding protein RBBP7	4	10%	48 kDa
TIF1B/ TRIM28	Transcription intermediary factor 1-beta	4	4%	89 kDa
SMCA5	SWI/SNF-related matrix-associated actin-dependent regulator of chromatin subfamily A member 5	4	4%	122 kDa
DBP1	DNA damage-binding protein 1	4	3%	127 kDa
TRPS1	Zinc finger transcription factor Trps1	4	4%	142 kDa
UBR5	E3 ubiquitin-protein ligase UBR5	3	1%	309 kDa
RRP15	RRP15-like protein	3	12%	31 kDa
HAX1	HCLS1-associated protein X-1	3	12%	32 kDa
MLF2	Myeloid leukemia factor 2	3	13%	28 kDa
DBPA	DNA-binding protein A	2	16%	40 kDa
MYST2	Histone acetyltransferase MYST2	2	4%	71 kDa
AURKB	Serine/threonine-protein kinase 12	2	8%	39 kDa
MTERF1	mTERF domain-containing protein 1	2	6%	48 kDa
PCNA	Proliferating cell nuclear antigen	2	10%	29 kDa
CQ085	Uncharacterized protein C17orf85	9	15%	71 kDa
CS021	Uncharacterized protein C19orf21	3	5%	75 kDa
HNRL2	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein U-like protein 2	57	52%	85 kDa
HNRPM/ hnRNP M	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein M	19	26%	78 kDa
HNRPG/ hnRNP G	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein G	14	32%	42 kDa
HNRH1/ hnRNP H	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H	13	34%	49 kDa
HNRPC/ hnRNP C	Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins C1/C2	11	37%	34 kDa
HNRPF/ hnRNP F	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein F	9	28%	46 kDa
ATPB	ATP synthase subunit beta, mitochondrial	12	29%	57 kDa
K6PP	6-phosphofructokinase type C	11	17%	86 kDa
PGAM5	Phosphoglycerate mutase family member 5	8	26%	32 kDa
HXK1	Hexokinase-1	3	3%	102 kDa

Als nächstes wurden die gefundenen Proteine anhand ihrer bekannten Funktionen mit Hilfe der Proteindatenbank *Uniprot* gruppiert. Dabei konnte ein Protein auch mehreren Gruppen mit verschiedenen Funktionen zugeordnet werden. Die prozentuale Darstellung der Gruppierung macht deutlich, dass die meisten Proteine in der Transkriptionskontrolle und bei der Regulation von

ERGEBNISSE

Proliferation und Zellzyklus eine Rolle spielen (siehe Abbildung 44 A). Mit Hilfe der Datenbank STRING (*Search Tool for the Retrieval of Interacting Genes/Proteins*, string.embl.de) konnten die gefundenen Proteine hinsichtlich ihrer Assoziation untereinander dargestellt werden. Die STRING Datenbank ermittelt die Beziehung der Proteine zueinander, indem Informationen aus vielen verschiedenen Quellen verglichen und integriert werden. Bekannte Verbindungen zwischen den identifizierten Proteinen, die die Grundlage zur Untersuchung der Funktion von PRMT6 bilden können sind in Abbildung 44 B dargestellt.

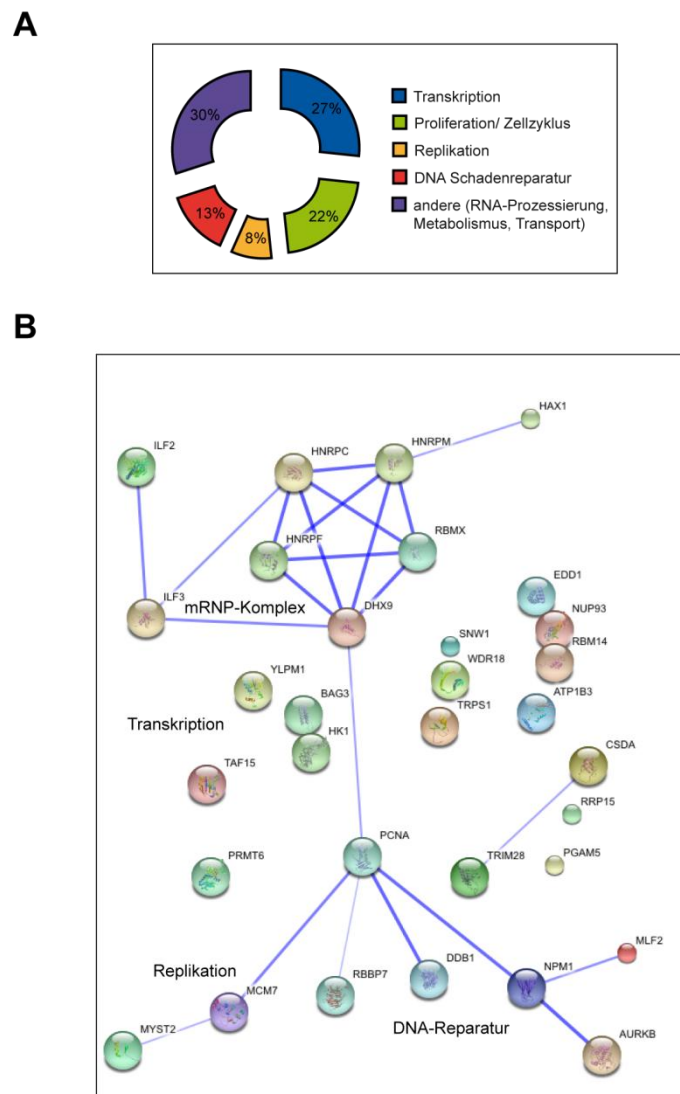


Abbildung 44: Bekannte Funktionen und Vernetzung der identifizierten Proteine.

(A) Die identifizierten Proteine wurden mit Hilfe der Annotationen in der Proteindatenbank *Uniprot* (<http://www.uniprot.org>) nach bereits bekannten Funktionen gruppiert. Die prozentuale Verteilung der Proteinfunktionen ist dargestellt. Dabei konnten einem Protein auch mehrere Funktionen zugeordnet werden. (B) Die Assoziation der gefundenen Proteine untereinander, die direkt (Interaktion) oder indirekt (Funktion) sein kann, wurde unter Verwendung der Datenbank STRING dargestellt. Die Stärke der blauen Linien korreliert mit der Anzahl der Hinweise.

5 DISKUSSION

Kovalente Modifikationen von Histon N-Termini spielen eine wesentliche Rolle bei der Regulation von Chromatinstruktur und -funktion (Martin and Zhang 2005; Volkel and Angrand 2007). Die Entdeckung der Beziehung zwischen Histonmodifikationen und Regulation der Genexpression führte zur Aufstellung der Hypothese des „Histon-Codes“ (Strahl and Allis 2000; Turner 2000; Jenuwein and Allis 2001). In Abhängigkeit von der Art und Position oder auch dem gleichzeitigen Vorhandensein verschiedener Histonmodifikationen bestimmen diese einerseits die Chromatinstruktur und Zugänglichkeit. Andererseits stellen sie eine Bindungsplattform für Effektorproteine dar. Die spezifische Bindung bestimmter Effektorproteine führt dann zu unterschiedlichen transkriptionellen Ergebnissen, wie Aktivierung oder Repression. Neben funktionell weitgehend gut untersuchten Histonmodifikationen, wie Phosphorylierung, Acetylierung und Lysinmethylierung, ist die Argininmethylierung von Histonen noch relativ unerforscht.

Für einige Mitglieder der Familie der Protein-Arginin-Methyltransferasen (PRMT), die Histone modifizieren, ist bereits bekannt, dass sie mittels dieser enzymatischen Aktivität an der transkriptionellen Regulation verschiedener Gene beteiligt sind (Chen *et al.* 1999; Ma *et al.* 2001; Strahl *et al.* 2001; Wang *et al.* 2001; Bauer *et al.* 2002). In unserer Arbeitsgruppe wurde die *in vitro* Histon-Methyltransferaseaktivität für PRMT6 entdeckt und die Methylierungsstellen identifiziert (Hyllus *et al.* 2007). Welche Bedeutung die Histon-Methyltransferaseaktivität von PRMT6 in Bezug auf Genregulation hat, und ob und in welcher Weise PRMT6 zur Rekrutierung von Effektorproteinen oder der Wechselwirkung mit anderen Modifikationen beiträgt, wurde im Rahmen dieser Arbeit untersucht. Im Fokus der Forschung stand dabei einerseits die Untersuchung einer potentiellen negativen Wechselwirkung zwischen der durch PRMT6 katalysierten H3R2 Dimethylierung und der H3K4 Trimethylierung. Andererseits sollte die Frage nach der Existenz einer positiven Wechselwirkung zwischen der H3R2 Dimethylierung und der H3K27 Trimethylierung geklärt werden.

Um weitere bisher unbekannt Funktionen von PRMT6 zu erforschen, wurden im Rahmen dieser Arbeit in einem unvoreingenommenen Ansatz Interaktionspartner von PRMT6 aufgereinigt und identifiziert.

5.1 PRMT6 IST DIE HAUPTMETHYLTRANSFERASE FÜR DIE DIMETHYLIERUNG VON R2 AM HISTON H3

PRMT6 wurde als nukleäre Arginin-Methyltransferase entdeckt, welche die asymmetrische Dimethylierung von Argininen katalysiert und zu den TypI Arginin-Methyltransferasen zugeordnet

wurde (Frankel *et al.* 2002). Obwohl begonnen wurde Substrate von PRMT6 zu identifizieren und die Bedeutung von PRMT6 zu erforschen, ist dazu bisher nur wenig bekannt (Boulanger *et al.* 2005; Miranda *et al.* 2005; El-Andaloussi *et al.* 2006; Michaud-Levesque and Richard 2009). In Vorarbeiten von Dawin Hyllus aus unserer Gruppe wurde die *in vitro* Histon-Methyltransferaseaktivität von PRMT6 identifiziert und die genauen Methylierungsstellen in den Histonen H3, H4 und H2A mittels rekombinantem PRMT6-Enzym und anschließender Edman-Sequenzierung beschrieben (Hyllus *et al.* 2007).

Die *in vitro* Experimente zeigten, dass PRMT6 Histon H3 am R2 und die Histone H2A und H4 am R3 methyliert. Aus der Literatur sind bereits Methylierungsstellen in Histonen durch andere PRMTs beschrieben, die mit der Substratspezifität von PRMT6 überlappen. Zum Beispiel führt die H4R3 Methylierung durch PRMT1 während der nukleären Hormonrezeptor-regulierten Transkription zur Genaktivierung (Strahl *et al.* 2001; Wang *et al.* 2001; Wagner *et al.* 2006). Im Gegensatz dazu geht die symmetrische H4R3 Dimethylierung durch PRMT5 zum einen mit der transkriptionellen Repression von c-Myc- und E2F-Zielgenen einher (Fabrizio *et al.* 2002; Pal *et al.* 2003) und trägt zum anderen durch Rekrutierung der DNA-Methyltransferase 3A (DNMT3A) zur Repression des β -Globin Locus bei (Zhao *et al.* 2009). Für PRMT4, die hauptsächlich R17 und R26 am Histon H3 (Ma *et al.* 2001; Bauer *et al.* 2002) methyliert, wurde eine geringe Methylierungsaktivität gegenüber H3R2 angenommen (Schurter *et al.* 2001).

Da die H4R3 Dimethylierung in gleichem Maße gut von PRMT6 und von PRMT1 *in vitro* katalysiert wird, wie durch diese Arbeit gezeigt wurde (siehe Abbildung 4, S.56), handelt es sich hier um eine gemeinsame Methylierungsstelle von mehreren PRMTs zumindest *in vitro*. Dagegen konnte nach der Überexpression von PRMT6 global keine Veränderung der H4R3 Dimethylierung detektiert werden (siehe Abbildung 6, S.58). Es ist deshalb davon auszugehen, dass diese Modifikation *in vivo* nicht hauptsächlich von PRMT6 reguliert wird. Aus diesem Grund wurde die Untersuchung der H4R3 Dimethylierung durch PRMT6 nicht weiter verfolgt.

In der vorliegenden Arbeit konnte jedoch gezeigt werden, dass es sich bei der H3R2 Dimethylierung um eine PRMT6-spezifische Methylierungsstelle handelt (siehe 4.1, S.55). Während in der *in vitro* Methylierungsreaktion von Histon H3 durch PRMT6 die H3R2 Dimethylierung detektiert werden konnte, war diese Modifikation nach einer Methylierungsreaktion mit PRMT4 nicht nachweisbar (siehe Abbildung 4, S.56). In Übereinstimmung damit ging eine Überexpression von katalytisch aktiver PRMT6 in humanen Zellen mit erhöhter H3R2 Dimethylierung einher, während die siRNA-vermittelte Depletion von PRMT6 global zu verminderter H3R2 Dimethylierung führte. Diese Ergebnisse identifizierten PRMT6 als die Hauptmethyltransferase der H3R2 Dimethylierung *in vitro* und *in vivo*. Parallel zu den Erkenntnissen dieser Arbeit wurden Daten publiziert, die die gezeigten Ergebnisse unterstützen. So wurde PRMT6 von zwei weiteren Arbeitsgruppen ebenfalls als die Hauptmethyltransferase der H3R2 Dimethylierung beschrieben (Guccione *et al.* 2007; Iberg *et al.* 2008).

Studien in Mausembryonen von Torres-Padilla *et al.* (2007) führten zu dem Schluss, dass die Argininmethylierung am Histon H3 entscheidend zur Erhaltung der Pluripotenz beiträgt, da deren Verlust zu veränderter Chromatinstruktur führte und die Embryonalentwicklung beeinträchtigte. In diesem Zusammenhang wurden in *Prmt4*-null Maus embryonalen Fibroblasten (MEF) neben stark verringerter H3R26 Dimethylierung auch reduzierte Mengen an H3R2 Dimethylierung detektiert (Torres-Padilla *et al.* 2007). Zusätzlich beeinträchtigt die Verringerung der Histon-Argininmethylierung in Zygoten durch die Injektion des Arginin-Methyltransferase Inhibitors AMI-1, der allerdings nicht spezifisch für PRMT4 ist, sondern die katalytische Aktivität aller getesteten PRMTs (PRMT1, 3, 4 und 6) inhibierte, (Cheng *et al.* 2004) die Entwicklung. Da weder die Expression von PRMT6 in der frühen Embryonalentwicklung noch der Einfluss der PRMT4 Depletion auf die Expression von PRMT6 untersucht wurden, wäre es möglich, dass in Abhängigkeit vom Zelltyp, Entwicklungsstadium und der Spezies, PRMT4 die H3R2 Dimethylierung indirekt reguliert. Es wird angenommen, dass die Methylierung von Argininen in zwei aufeinanderfolgenden Schritten erfolgt, wobei zuerst eine Methylgruppe auf das Stickstoffatom eines Arginins übertragen wird und in einem zweiten Schritt die Übertragung einer weiteren Methylgruppe zum symmetrisch oder asymmetrisch dimethylierten Endprodukt führt. Bisher wurde für die meisten PRMTs vermutet, dass die Dimethylierung durch zwei aufeinanderfolgende Schritte katalysiert wird (Bedford and Richard 2005). Studien von Dawin Hyllus aus unserer Gruppe ließen erste Schlussfolgerungen zum Katalysemechanismus von PRMT6 zu, der sich von der genannten Annahme unterscheidet. Seine Autoradiographie-Daten zeigten, dass die *in vitro* Aktivität von PRMT6 verstärkt wird, wenn als Substrat monomethyliertes H3R2 anstelle von unmodifiziertem Substrat vorlag. Diese Ergebnisse wurden durch die massenspektrometrische Analyse der *in vitro* Methylierungsprodukte von PRMT6 unterstützt, die ergaben, dass dimethyliertes R2 nur identifiziert werden konnte, wenn als Substrat das monomethylierte H3-Peptid vorlag. Dies deutete darauf hin, dass PRMT6 die Übertragung der zweiten Methylgruppe präferiert. Darauf folgend wurde eine Studie zur enzymatischen Aktivität von PRMT6 veröffentlicht, die ebenfalls belegt, dass PRMT6 präferentiell die Dimethylierung katalysiert. Außerdem wurde für PRMT6 ein distributiver Katalysemechanismus beschrieben (Lakowski and Frankel 2008). Aufgrund der beschriebenen Ergebnisse könnte man vermuten, dass PRMT6 keinen Einfluss auf die Monomethylierung von R2 am Histon H3 *in vivo* ausübt. In Übereinstimmung mit diesen *in vitro* Daten führte in der vorliegenden Arbeit die Überexpression von PRMT6 in MCF7 Zellen nicht zu veränderten H3R2me1 Spiegeln (siehe 4.1.3, S. 59). Im Gegensatz zu PRMT6 katalysiert PRMT7 hauptsächlich die Monomethylierung von Argininen (Miranda *et al.* 2004; Lee *et al.* 2005b). Aufgrund der Ergebnisse dieser Arbeit, den Studien von Dawin Hyllus und Daten aus der Literatur könnte vermutet werden, dass PRMTs existieren, welche bevorzugt die Monomethylierung von Argininen katalysieren, die dann das Substrat für Dimethyltransferasen, wie PRMT6, darstellen.

5.2 PRMT6 ANTAGONISIERT DIE H3K4 TRIMETHYLIERUNG UND DAMIT GENAKTIVIERUNG DURCH DIMETHYLIERUNG VON R2 AM HISTON H3

5.2.1 H3R2ME2 BEEINFLUSST H3K4ME3 NEGATIV

Anhaltspunkte für die Existenz einer negativen Wechselwirkung zwischen H3R2me2 und H3K4me3, gehen auf Studien der globalen H3K4me3 Mengen nach Überexpression oder Depletion von PRMT6, die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführt wurden, zurück. Hierbei wurde entdeckt, dass die Überexpression von PRMT6 in MCF7 Zellen in der globalen Abnahme der H3K4 Trimethylierung resultierte. Im Gegensatz dazu zeigten PRMT6-defiziente Zellen erhöhte H3K4me3 Spiegel (siehe 4.2.1). In Übereinstimmung damit, zeigen die Ergebnisse einer genomweiten Untersuchung in humanen Zellen zur Verteilung von Histonmodifikationen an c-Myc-Zielgenpromotoren, dass die H3R2me2 nicht mit Bereichen überlappt, in denen H3K4me3 als Markierung transkriptionell aktiver Gene vorkommt (Santos-Rosa *et al.* 2002; Sims *et al.* 2003; Schneider *et al.* 2004; Bernstein *et al.* 2005; Martin and Zhang 2005). Aufgrund dieser Beobachtungen wäre es denkbar, dass sich die beiden Modifikationen, auch bedingt durch ihre räumliche Nähe, gegenseitig ausschließen und negativ beeinflussen (Guccione *et al.* 2006). Ähnliche Ergebnisse wurden aus genomweiten Studien zur Verteilung von H3R2me2 in Hefezellen (*Saccharomyces cerevisiae*) erhalten. Während H3K4me3 vorrangig am 5'-Ende von aktiven Genen auftrat, war H3R2me2 hauptsächlich in heterochromatischen Bereichen, an inaktiven euchromatischen Genen sowie am 3'-Ende von gering exprimierten Genen angereichert. In allen Fällen schlossen sich aber die Verteilungsmuster der H3R2 Dimethylierung und der H3K4 Trimethylierung gegenseitig aus (Kirmizis *et al.* 2007).

Hinweise auf die negative Wechselwirkung zwischen H3R2me2 und H3K4me3 wurden auch durch *in vitro* Methylierungsstudien sowie Pulldown Experimente aus unserer und anderen Arbeitsgruppen gegeben. Daten aus unserer Arbeitsgruppe zeigen, dass die H3R2 Dimethylierung die Bindung von WDR5 in Pulldown Experimenten vollständig verhindert und die katalytische Aktivität von MLL1 gehemmt wurde und liefern damit mögliche Erklärungen zum Mechanismus der negativen Beeinflussung durch PRMT6 (Hyllus *et al.* 2007). In Übereinstimmung damit wurde gezeigt, dass WDR5 notwendig zur Ausführung der Trimethylierung ist (Dou *et al.* 2005; Wysocka *et al.* 2005), da die Depletion von WDR5 global zur Reduktion der H3K4 Trimethylierung führte. Außerdem wurde gefunden, dass obwohl WDR5 für die Trimethylierung essentiell ist, die Rekrutierung von MLL1 nicht von WDR5 abhängig ist. Allerdings wurde WDR5 in Abwesenheit von MLL1 nicht rekrutiert. WDR5 stellt eine Plattform zur stabilen Assemblierung des Histon-Methyltransferase Komplexes dar, die das Zueinanderkommen des H3-Substrates und der katalytischen SET-Domäne und damit die Trimethylierung ermöglicht (Dou *et al.* 2006). Ein Jahr später wurden, parallel von vier Arbeitsgruppen, Theorien zur Struktur von WDR5 und dessen Bindung an Histon H3 publiziert (Couture *et al.* 2006; Han *et al.* 2006; Ruthenburg *et al.* 2006; Schuetz *et al.* 2006). Kristallstrukturanalysen von WDR5 mit gebundenem H3-Substrat haben ergeben, dass die ersten drei

Aminosäuren (Alanin-Arginin-Threonin) am Histon H3 maßgeblich an der Interaktion mit WDR5 beteiligt sind. Dabei wurde R2, dessen Seitenketten in die Bindungstasche von WDR5, die aus sieben WD40-Domänen gebildet wird, hineinragen, als der bestimmende Faktor für die spezifische Bindung von WDR5 an sein Substrat identifiziert. Darüber findet eine Vielzahl der Wechselwirkungen zu WDR5, über Wasserstoffbrückenbindungen und hydrophobe Wechselwirkungen statt (Han *et al.* 2006). Diese Daten wurden auch durch Bindungsstudien bestätigt in denen Peptide durch die Mutation von R2 zu A2 keine Bindung zu WDR5 zeigten und auch Modifikationen am R2 die Interaktion mit WDR5 vollständig unterbunden haben (Couture *et al.* 2006; Schuetz *et al.* 2006). Außerdem wurde herausgefunden, dass WDR5 bei der Substraterkennung nicht zwischen verschiedenen Methylierungsgraden von H3K4 unterscheiden kann, wie vorher angenommen (Wysocka *et al.* 2005; Couture *et al.* 2006), sondern vielmehr dafür verantwortlich ist das Substrat für die Methyltransferase (MLL1) zugänglich zu machen und damit die Trimethylierung zu ermöglichen (Couture *et al.* 2006; Ruthenburg *et al.* 2006).

Daraufhin stellte sich die Frage, ob die R2 Dimethylierung auch die katalytische Aktivität anderer SET-Domänen Histon-Methyltransferasen hemmt. Interessanterweise wurde die katalytische Aktivität der H3K4-Monomethyltransferase Set7/9 durch die Modifikation am H3R2, anders als bei MLL1, nicht verhindert (Hyllus *et al.* 2007). Diese Beobachtung kann anhand struktureller Unterschiede in der Substratbindung und im Katalysemechanismus erklärt werden. Denn im Gegensatz zur Methylierung durch MLL erfolgt die Bindung von H3K4 durch SET7/9 direkt in der tiefen, schmalen Bindungstasche, wo schließlich der Kontakt mit dem Methylgruppendonor *S-adenosyl-L-methionine* (AdoMet) hergestellt werden kann (Xiao *et al.* 2003; Zhang *et al.* 2003b).

Letztlich liefern die gezeigten Ergebnisse zusammen mit den Erkenntnissen aus der Literatur erste Indizien dafür wie die H3R2 Dimethylierung mechanistisch zur Regulation der H3K4 Trimethylierung beiträgt. Die H3R2 Dimethylierung verhindert die Bindung von WDR5 an das Histon H3 und hemmt dadurch die katalytische Aktivität von MLL1, was zur Verhinderung der H3K4 Trimethylierung führt (Hyllus *et al.* 2007). Zusammenfassend unterstützen die Daten die Vermutung, dass sich die H3R2me2 und die H3K4me3 gegenseitig ausschließen und negativ beeinflussen.

5.2.2 PRMT6 REPRIMIERT SPEZIFISCHE H3K4ME3-REGULIERTE GENE

Die bisher diskutierten Ergebnisse lassen vermuten, dass PRMT6 und die H3R2 Dimethylierung Auswirkungen auf die H3K4me3-vermittelte Genexpression haben. Eine Deregulation von einigen *HOX* Genen und *c-Myc*-Zielgenen, die von MLL und der H3K4 Trimethylierung reguliert werden, wurde u.a. in verschiedenen Brustkrebszelllinien und Mammakarzinomen gefunden und beschrieben (Liao and Dickson 2000; Milne *et al.* 2002; Nakamura *et al.* 2002; Guccione *et al.* 2006; Martinato *et al.* 2008).

DISKUSSION

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Genexpression verschiedener c-Myc-Zielgene in der humanen Brustkrebszelllinie MCF7 nach Überexpression von PRMT6 analysiert. Interessanterweise scheint die Regulation der Genexpression durch die katalytische Aktivität von PRMT6 trotz der starken globalen Effekte auf die H3R2 Dimethylierung genspezifisch zu erfolgen. Die Überexpression von PRMT6 resultierte in verringerten Transkriptmengen der c-Myc-Zielgene *TERT* (*Telomerase*), *NCL* (*Nucleolin*), *Golph3* (*Golgi Phosphoprotein 3*) und *PTMA* (*Prothymosin α*) (siehe Abbildung 12, S.65), die in einer Vielzahl humaner Krebszellen überexprimiert sind und durch anti-apoptotische oder pro-proliferative Wirkung zur Erhaltung des transformierten Phänotyps und zur Immortalisierung von Zellen beitragen (Grinstein and Wernet 2007; Scott *et al.* 2009; Wyatt *et al.* 2010). Interessanterweise scheint PRMT6 jedoch Gene des Glukosestoffwechsels, wie z.B. *LDHA* (*Lactatdehydrogenase*), deren Expression während der Tumorentwicklung durch c-Myc aktiviert wird und dadurch den Glukosestoffwechsel verändert (Dang *et al.* 2009), nicht zu beeinflussen (siehe Abbildung 12, S.65). Auch die Expression von *ODC* (*Ornithindecaboxylase*) wurde durch PRMT6 nicht reprimiert. Da Krebszellen große Mengen an Polyaminen synthetisieren und aufnehmen, ist ODC als wichtiges Enzym im Polyamin-Biosyntheseweg oft in Krebszellen überexprimiert (Keren-Paz *et al.* 2007).

Aus der Literatur ist bekannt, dass sowohl die PRMT6-abhängigen als auch die PRMT6-unabhängigen c-Myc-Zielgene in verschiedenen Krebszellen überexprimiert sind. Aufgrund ihrer Funktion hat sich herausgestellt, dass sie geeignete Ziele für die anti-Tumorthérapie darstellen könnten. Ob es sich bei den reprimierten Genen um direkte Zielgene von PRMT6 handelt, muss in zukünftigen Experimenten analysiert werden. Anhand der erhaltenen Daten aus der Brustkrebszelllinie MCF7 würde man vermuten, dass sich die PRMT6 Überexpression, die die Repression einiger pro-proliferativer und anti-apoptotischer Gene bewirkt, negativ auf die Tumorentstehung auswirkt. Allerdings widersprechen Untersuchungen von Tumorgewebe und Serum von Krebspatienten dieser Theorie. Laut dieser Studien sind PRMT6 und PRMT1 in vielen Tumoren im Vergleich zu gesundem Gewebe überexprimiert. In Übereinstimmung damit wurden signifikant erhöhte Spiegel an asymmetrischer Dimethylierung im Serum von Krebspatienten detektiert (Yoshimatsu *et al.* 2010). Außerdem wurde *Thrombospondin-1* (*TSP-1*) als reprimiertes Zielgen von PRMT6 mit Hilfe einer Microarray-Analyse in der Osteosarkomazelllinie U2OS identifiziert. TSP-1 gilt als natürlicher Angiogenesehemmer und verhindert damit Tumorwachstum und Migration. Aufgrund der Tatsache, dass PRMT6-defiziente Zellen stark verringerte Migration aufwiesen, schlägt diese Studie den therapeutischen Einsatz spezifischer PRMT6 Inhibitoren zur Hemmung von Tumorwachstum und Migration vor (Michaud-Levesque and Richard 2009).

Als typische Zielgene von MLL1 und der H3K4 Trimethylierung sind die Gene des *HOXA* Lokus beschrieben, die bei der Kontrolle der Embryonalentwicklung und der zellulären Differenzierung eine bedeutende Rolle spielen (Guenther *et al.* 2005; Barber and Rastegar 2010). *HOX* Gene sind in adulten Zellen gewebespezifisch exprimiert (Svingen and Tonissen 2003). Während die *HOX* Genexpression in der adulten Lunge auf 11 aus 39 Genen beschränkt ist, wurde z.B. die Expression von 29 Genen im

adulten Darm und 30 Gene in der Niere detektiert, wohingegen nur 17 Gene in normalem Brustgewebe exprimiert wurden (Cillo *et al.* 1992; De Vita *et al.* 1993; Tiberio *et al.* 1994; Cantile *et al.* 2003). Die Deregulation der *HOX* Gene führt zu Fehlbildungen während der Entwicklung oder zu Krebs in adulten Zellen (Cillo *et al.* 1999).

Auch die Analyse der *HOXA* Genexpression in MCF7 Zellen zeigte, dass die Regulation der Expression durch PRMT6 genspezifisch ist. Während die Überexpression von PRMT6 zur Repression von *HOXA2* und *HOXA10* führte, blieben die Transkriptmengen von *HOXA5* und *HOXA6* von der PRMT6 Überexpression unbeeinflusst (siehe Abbildung 13, S.65). Zusammen mit aus der Literatur bekannten Daten könnte man spekulieren, dass keine Repression von *HOXA5* durch die Überexpression von PRMT6 beobachtet wurde, da *HOXA5* in Brustkrebszellen bereits herunterreguliert ist (Raman *et al.* 2000) und die zusätzliche PRMT6 Expression keine weitere Repression möglich machte. Die Expression von *HOXA10* hingegen konnte sowohl in normalen Brustgewebezellen als auch in Brustkrebszellen detektiert werden. Die Repression von *HOXA10*, als positiver Regulator von p53, könnte darüber zur Tumorentwicklung beitragen (Chu *et al.* 2004). Die Identifikation und Charakterisierung der H3K4-Demethylase PLU-1 als transkriptioneller Repressor von Tumorsuppressorgenen, wie *HOXA5* oder *BRCA1*, in MCF7 Zellen lässt die Vermutung zu, dass PRMT6 mit anderen Repressorproteinen kooperieren könnte und die PRMT6-vermittelte Repression durch vorangehende Demethylierung der H3K4 Trimethylierung begünstigt wird (Yamane *et al.* 2007). Die Gesamtheit der Ergebnisse macht deutlich, dass die PRMT6-vermittelte Genregulation Bestandteil komplexer Regulationsnetzwerke ist, und, dass das existierende Wissen bisher noch nicht ausreicht, um die Funktion von PRMT6 in Bezug auf die Tumorentstehung und die Proliferation von verschiedenen Tumorzellen eindeutig zu erklären.

Um weitere Hinweise zum Mechanismus der PRMT6-vermittelten Repression zu erhalten und zu überprüfen, ob PRMT6 vor allem direkt am Chromatin wirkt, wurden ChIP-Analysen am *HOXA2* Gen durchgeführt. Diese Experimente belegen, dass PRMT6 spezifisch an die 5'-Region des *HOXA2* Gens rekrutiert wurde. Diese Anreicherung von PRMT6 in der analysierten Region wurde nach PRMT6 Überexpression noch verstärkt und ging mit der Zunahme von H3R2me2 einher. Die Präsenz der H3K4 Trimethylierung hingegen verhielt sich gegensätzlich und war in Folge der PRMT6 Überexpression deutlich reduziert (siehe Abbildung 15, S.67). In Übereinstimmung mit der aufgestellten Hypothese einer gegenseitigen negativen Wechselwirkung und den *in vitro* Daten zur Bindung und zum Katalysemechanismus von WDR5-MLL1 verhinderte die PRMT6 Überexpression sowohl die Rekrutierung von WDR5 als auch von MLL1 an das *HOXA2* Gen (siehe Abbildung 16, S.68). An einem PRMT6-unabhängigen Gen, *HOXA5*, hingegen wurden diese Beobachtungen nicht gemacht (siehe Abbildung 15 und Abbildung 16, S.67). Da Ergebnisse aus der Literatur zeigen, dass für die Rekrutierung von MLL1 die Untereinheit WDR5 nicht notwendig ist (Wysocka *et al.* 2005; Dou *et al.* 2006; Wysocka *et al.* 2006), sprechen diese Daten dafür, dass die Rekrutierung von MLL1 direkt durch die H3R2 Dimethylierung gehemmt wird. Allerdings ist für die Rekrutierung von WDR5

die katalytische Untereinheit MLL1 notwendig (Dou *et al.* 2006) und die Anwesenheit von WDR5 am Chromatin ist notwendig für die Katalyse der Trimethylierung durch MLL1 (Hyllus *et al.* 2007).

Neben der Beeinflussung von WDR5 wurde auch für andere Effektorproteine eine bedeutende Rolle von R2 hinsichtlich der Erkennung und Bindung vom Histon H3 entdeckt. Unter anderem ist das R2 am Histon H3 wichtig für die Erkennung und Bindung von CHD1 (*chromo-ATPase/ helicase-DNA-binding*) an K4 methyliertes Histon H3 (Flanagan *et al.* 2005). CHD1 wurde in humanen Zellen, in *Drosophila* und Hefe aufgrund der Bindung an H3K4me3 und der Präsenz an transkriptionell aktivem Chromatin mit aktiver Transkription in Verbindung gebracht. Dabei wurde gezeigt, dass die Bindungsaffinität von CHD1 an Histon H3 durch die Anwesenheit der H3R2 Dimethylierung deutlich reduziert wurde (Stokes *et al.* 1996; Pray-Grant *et al.* 2005). Außerdem verhindert die H3R2 Dimethylierung die Bindung des basalen Transkriptionsfaktors TFIID an die H3K4 Trimethylierung über den PHD (*plant homeodomain*)-finger von TAF3 und hemmt darüber die transkriptionelle Aktivität der Gene (Vermeulen *et al.* 2007; van Ingen *et al.* 2008).

Zusammenfassend deuten die Daten darauf hin, dass die PRMT6-vermittelte H3R2 Dimethylierung durch verschiedene funktionelle Konsequenzen zur Repression von Genen beiträgt. Zum einen verhindert die H3R2 Dimethylierung die Rekrutierung von MLL1 an das Chromatin. Das hat wiederum zur Folge, dass die Rekrutierung von WDR5 nicht stattfinden kann. Andererseits inhibiert die H3R2 Dimethylierung aufgrund struktureller Gegebenheiten die Bindung von WDR5 an Histon H3, was zur Hemmung der katalytischen Aktivität von MLL1 führt. Letztendlich führen diese Vorgänge zum Verlust der H3K4 Trimethylierung und Repression der Gene.

5.2.3 PRMT6 REGULIERT DIE EXPRESSION VON *HOXA2* UND *HOXA5* WÄHREND DER NEURONALEN DIFFERENZIERUNG VON NT2/D1 ZELLEN

Zur Untersuchung der Funktion von PRMT6 während der Differenzierung wurden NT2/D1 Zellen verwendet, die in Folge einer ATRA-Behandlung zu neuronalen Zellen ausdifferenzieren (Andrews 1984). Im Verlauf der Differenzierung erfolgt die Expression der Gene des *HOXA* Locus nach genauen Mustern und obliegt der Kontrolle der gegensätzlichen Wirkungsweisen von PcG (*polycomb group*) Proteinen und trxG (*trithorax group*) Proteinen, die u.a. für die Erhaltung von Repression oder Aktivierung der *HOX* Gene verantwortlich sind (Simeone *et al.* 1990; Houldsworth *et al.* 2002; Bracken *et al.* 2006). Im Verlauf der ATRA-induzierten neuronalen Differenzierung von NT2/D1 Zellen wird die Expression von *HOXA2* und *HOXA5*, die in undifferenzierten Zellen reprimiert sind, stark induziert (siehe Abbildung 17, S.69). Die Chromatin-Immunpräzipitationsexperimente, die im Rahmen der vorliegenden Arbeit durchgeführt wurden, ergaben, dass PRMT6 in undifferenzierten Zellen am Promoter von *HOXA2* und *HOXA5* angereichert ist. Damit einhergehend war H3R2me2 angereichert. In Folge der ATRA-induzierten Differenzierung wurden beide Gene transkriptionell aktiviert und sowohl PRMT6 als auch die H3R2 Dimethylierung gingen an den Promotoren von

HOXA2 und *HOXA5* verloren. In Übereinstimmung mit der transkriptionellen Aktivität und gegensätzlich zu PRMT6 und der H3R2 Dimethylierung nahm die Anreicherung der H3K4 Trimethylierung im Verlauf der Differenzierung stark zu (siehe Abbildung 18, S.70). Diese Daten unterstützen zum einen die negative Wechselwirkung von H3R2me2 und H3K4me3 in der Genexpressionskontrolle und zeigen des Weiteren die Dynamik und Bedeutung der PRMT6-vermittelten Genexpression während der neuronalen Differenzierung auf.

5.2.4 MODELL DER PRMT6-VERMITTELTEN GENREPRESSION

Anhand der Daten, die im Rahmen dieser Arbeit zur Repressorfunktion von PRMT6 erhalten wurden, kann das in Abbildung 45 gezeigte Modell für die PRMT6-vermittelte Repression spezifischer H3K4me3-regulierter Gene (*HOXA* Gene und c-Myc-Zielgene) gezeichnet werden. Zusammen mit bekannten Regulationsmechanismen der H3K4 Methylierung durch Demethylierung (Shi *et al.* 2004; Lee *et al.* 2005c; Klose *et al.* 2007; Yamane *et al.* 2007) könnte PRMT6 zur Repression spezifischer Zielgene beitragen.

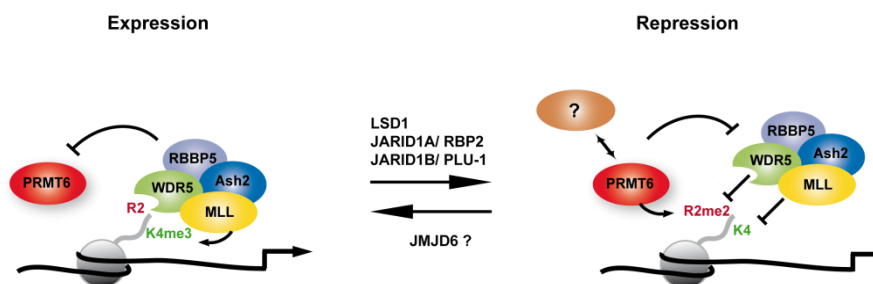


Abbildung 45: Modell der PRMT6-vermittelten Repression H3K4me3-regulierter Gene.

Wenn Gene aktiv transkribiert werden, sind deren Promotoren als Resultat der katalytischen Aktivität des H3K4-Methyltransferase Komplexes mit H3K4 Trimethylierung angereichert. Diese Markierung führt dazu, dass die katalytische Aktivität von PRMT6 *in vitro* inhibiert wird (Hyllus *et al.* 2007). Im Zuge der Genrepression wird die H3K4 Trimethylierung wahrscheinlich durch die Aktivität von Demethylasen entfernt (siehe Abbildung 45, Protein „?“). Die Katalyse der H3R2 Dimethylierung durch PRMT6 ist nun möglich und führt zur Repression der Gene durch verschiedene Auswirkungen. Einerseits verhindert H3R2me2 die Erkennung und Bindung von WDR2 an Histon H3. Andererseits wird sowohl die katalytische Aktivität von MLL1 gehemmt, als auch dessen Rekrutierung unterbunden. Dies führt letztendlich zum Verlust der H3K4 Trimethylierung an PRMT6-regulierten Genen und zur Repression. Die gezeigten und diskutierten Daten bestätigen den Antagonismus zwischen Arginin- und Lysinmethylierung von Histonen bei der Expressionskontrolle spezifischer differenzierungs- und proliferationsrelevanter Gene (*HOXA* Gene und c-Myc-Zielgene).

5.3 PRMT6 UND H3K27ME3 BEEINFLUSSEN SICH GEGENSEITIG POSITIV

Daten aus der Literatur belegen, dass H3R2me2 und H3K27me3 zusammen an reprimierten Genen vorkommen (Guccione *et al.* 2007). Außerdem wurde die katalytische Aktivität von PRMT6 durch das Vorhandensein der H3K27 Trimethylierung im *in vitro* Methylierungsassay von Dawin Hyllus in unserer Arbeitsgruppe begünstigt (Hyllus *et al.* 2007). Zusätzlich konnte im Rahmen dieser Arbeit nachgewiesen werden, dass PRMT6, wie auch die PcG Proteine (Bracken *et al.* 2006), bei der Genexpressionsregulation differenzierungsrelevanter Gene während der neuronalen Differenzierung von NT2/D1 Zellen beteiligt ist (siehe Abbildung 18, S.70). Diese Hinweise und die Tatsache, dass auch eine negative Wechselwirkung zwischen H3K4me3 und H3K27me3 aufgedeckt wurde, lässt vermuten, dass PRMT6 (H3R2me2) und die PcG Proteine (H3K27me3) bei der Repression spezifischer Gene kooperieren (Papp and Muller 2006; Schuettengruber *et al.* 2007).

5.3.1 PRMT6 INTERAGIERT MIT EINIGEN PCG PROTEINEN

Die Polycomb Gruppen (PcG) Proteine agieren als Komponenten der Polycomb Komplexe (*Polycomb Repressive Complex PRC*), die als PRC1 und PRC2 bezeichnet werden (Kuzmichev *et al.* 2002; Levine *et al.* 2002). Der PRC1 Komplex enthält vier stöchiometrisch vorkommende Hauptkomponenten, die Homolog zu den *Drosophila* Komponenten Polycomb (Pc), Polyhomeotic (Ph), Sex combs extra (Sce) und Posterior sex combs (Psc) sind. In Vertebraten existieren mehrere Homologe jeder Gruppe, die entsprechend als CBX-, HPH-, RING1- und BMI1/MEL18-Familie bezeichnet werden. Aufgrund der Vielzahl homologer Proteine existieren zahlreiche PRC1 Komplexe mit unterschiedlicher Zusammensetzung, die alternative Funktionen in unterschiedlichen Geweben, während der Differenzierung und Entwicklung ausüben (Otte and Kwaks 2003; Kerppola 2009).

Im Rahmen dieser Arbeit wurde gezeigt, dass PRMT6 mit spezifischen Homologen der PRC1 Untereinheiten interagiert und in Gelfiltrationsanalysen coeluiert (siehe Abbildung 21, S.73). Hierbei wurde gefunden, dass PRMT6 in Coimmunpräzipitationen mit den Chromodomänenproteinen CBX4 und CBX8, nicht aber mit CBX2 interagiert. Zusätzlich zeigten Gelfiltrationsanalysen, dass CBX8 und PRMT6 in Fraktionen, die einem Molekulargewichtsbereich von 200 bis 440 kDa entsprechen, coeluiieren und interagieren (siehe 4.3.1, S.71 und 4.3.2, S.72). Obwohl die Chromo-Domänen hoch konserviert sind, weisen diese verschiedene Bindungsspezifitäten gegenüber modifiziertem Histon H3 auf. Während CBX2 als einziges CBX-Protein eine klare Präferenz für die H3K27 Trimethylierung aufweist, ist CBX4 in der Lage sowohl H3K9me3 als auch H3K27me3 zu binden (Bernstein *et al.* 2006b; Kaustov *et al.* 2010). Außerdem wurde für CBX8 nur eine sehr geringe Bindungsaffinität für beide Modifikationen detektiert. In Übereinstimmung damit, dass für die Chromatinrekrutierung von CBX8 weder die Chromo-Domäne noch die H3K27 Trimethylierung nötig ist (Vincenz and Kerppola 2008), vermutet eine andere Gruppe, dass CBX8 methylierungsabhängig auch Nicht-Histon-Proteine

binden und der PRC1 Komplex darüber an spezifische Chromatinbereiche rekrutiert werden kann (Kaustov *et al.* 2010). Darauf basierend, könnte man sich vorstellen, dass über diese Art der Bindung auch andere Proteine, wie PRMT6, mit PRC1 assoziiert und an der Genregulation beteiligt sein könnten.

Des Weiteren wird durch die unterschiedlichen Bindungseigenschaften der CBX Proteine und den daraus resultierenden individuellen Funktionen auch die Spezifität von PRMT6 gegenüber bestimmten Homologen erklärbar. Außerdem wurde in Coimmunpräzipitationen die Bindung von PRMT6 an BMI1 nachgewiesen, wohingegen keine Interaktion mit MEL18 stattfand (siehe 4.3.1, S.71 und 4.3.2, S.72). BMI1 wurde als Onkoprotein identifiziert, das mit c-Myc kooperiert und die Bildung von B-Zell-Lymphomen induziert (van Lohuizen *et al.* 1991). Zudem sind BMI1 und CBX8 bei der Expressionskontrolle des *INK4B-ARF-INK4A* Locus beteiligt und wichtig für die Proliferation von Tumorzellen und Fibroblasten (Itahana *et al.* 2003; Gil and Peters 2006; Bracken *et al.* 2007; Dietrich *et al.* 2007). Ob PRMT6 ähnlich wie die PcG Proteine BMI1 und CBX8 eine Rolle bei der Proliferation von Fibroblasten und Tumorzellen spielt und welche Gene dabei reguliert werden, wurde im Rahmen dieser Arbeit untersucht und im Abschnitt 5.3.3 diskutiert.

PRMT6 interagiert auch mit den Polyhomeotic Homologen HPH1 und HPH2, die im Mausmodell synergistisch agieren, um die Repression der *Hox* Gene während der Embryonalentwicklung zu erhalten (Isono *et al.* 2005). Eine Interaktion von PRMT6 mit den Proteinen der RING1-Familie konnte nicht detektiert werden, was darauf hindeutet, dass PRMT6 an der Monoubiquitinierung von Histon H2A am Lysin119 (H2AK119ub1) durch die E3-Ligase RING1B nicht direkt beteiligt ist. Aufgrund der Beobachtung, dass die PRC1 Komponenten nicht in der Lage sind PRMT6 zu präzipitieren, kann man schlussfolgern, dass PRMT6 kein stabiler Bestandteil des PRC1 Komplexes ist und es sich wahrscheinlich um einen Subkomplex der PcG Proteine in Assoziation mit PRMT6 handelt.

Der PRC2 Komplex ist für die H3K27 Di- und Trimethylierung durch die katalytische Aktivität von EZH2 (*enhancer of zeste homologe 2*), einer SET-Domänen Methyltransferase verantwortlich. Für die Methyltransferaseaktivität muss EZH2 mit zwei weiteren Untereinheiten SUZ12 (*suppressor of zeste 12*) und EED (*embryonic ectoderm development*) assoziiert vorliegen (Cao *et al.* 2002; Pasini *et al.* 2004). In den letzten Jahren wurden weitere Proteine identifiziert und charakterisiert, die mit dem PRC2 Komplex biochemisch und funktionell interagieren. Darunter befinden sich u.a. die Histonbindungsproteine RbAp46 und RbAp48 (*retinoblastoma-associated protein*), PHF1 (*Polycomb like protein*) (Cao *et al.* 2008; Sarma *et al.* 2008), JARID2 (Li *et al.*) und die H3K4-Demethylase RBP2 (JARID1 oder KDM5A) (Pasini *et al.* 2008). Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Assoziation von PRMT6 mit EZH2 gefunden. Im Gegensatz dazu konnte unter den angewandten Bedingungen keine Interaktion von PRMT6 mit SUZ12 oder EED nachgewiesen werden. Da nach Immunpräzipitation von EZH2 kein PRMT6 detektiert wurde, kann man schlussfolgern, dass wahrscheinlich nur ein geringer Anteil von EZH2 mit PRMT6 assoziiert ist. Außerdem deuten die

gezeigten Daten daraufhin, dass PRMT6 kein integraler Bestandteil des PRC2 Komplexes ist. Vielmehr könnte die PRMT6-EZH2 Interaktion transient sein und durch die Assoziation mit dem Chromatin stabilisiert werden.

Ähnliche Beobachtungen wurden bei der Identifikation der PHF1-EZH2 Interaktion gemacht. Es handelt sich dabei sehr wahrscheinlich ebenfalls um eine transiente Interaktion, an der nur ein geringer Anteil von EZH2 beteiligt ist, da auch hier EZH2 nicht in der Lage ist endogenes PHF1 zu präzipitieren. Allerdings konnte gezeigt werden, dass die Anwesenheit von PHF1 die katalytische Aktivität von EZH2 positiv beeinflusst (Cao *et al.* 2008; Sarma *et al.* 2008).

Zusammenfassend zeigen die hier erhaltenen Ergebnisse, dass PRMT6 spezifisch mit einigen Untereinheiten des PRC1 Komplexes und mit EZH2 interagiert. Diese Daten legen nahe, dass PRMT6 kein integraler Bestandteil der PRC Proteinkomplexe ist, sondern dass es sich um transiente Assoziationen mit bisher unbekannter Funktion handelt.

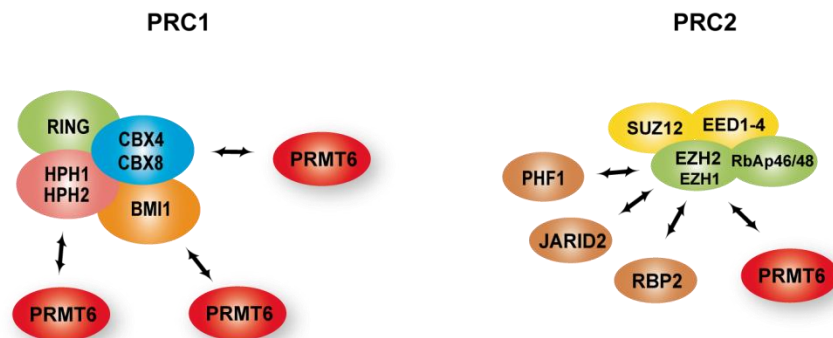


Abbildung 46: Modell der Assoziation von PRMT6 mit Untereinheiten der PRC1 und PRC2 Komplexe.

PRMT6 ist kein integraler Bestandteil der PRC-Komplexe, sondern geht vielmehr transiente Assoziationen mit einzelnen Untereinheiten der Komplexe ein. PRMT6 interagiert mit PRC1 wahrscheinlich unabhängig von RING. PRMT6 ist mit der katalytischen Untereinheit EZH2 von PRC2 assoziiert.

Da sowohl für PRC1 als auch für PRC2 Regulatorfunktionen bei der Genexpression während der neuronalen Differenzierung von NT2/D1 Zellen beschrieben wurden (Bracken *et al.* 2006) und beide Komplexe mit Proliferation und der Kontrolle des *INK4B-ARF-INK4A* Lokus in Tumorzellen und Fibroblasten in Verbindung gebracht wurden (Pasini *et al.* 2004; Bracken *et al.* 2007; Dietrich *et al.* 2007; Kia *et al.* 2008), sollte die Funktion von PRMT6 anhand dieser Zellmodelle untersucht und charakterisiert werden.

5.3.2 PRMT6 SPIELT EINE ROLLE BEI DEM ERHALT DER *HOXA* GENEXPRESSIONSMUSTER WÄHREND DER NEURONALEN DIFFERENZIERUNG

Die im vorangegangenen Kapitel diskutierten Interaktionen zwischen PRMT6 und PcG Proteinen wurden auf funktionelle Konsequenzen während der ATRA-induzierten neuronalen Differenzierung von NT2/D1 Zellen untersucht. Aus der Literatur war bereits bekannt, dass NT2/D1 Zellen durch Behandlung mit ATRA zu neuronalen Zellen ausdifferenzieren (Andrews *et al.* 1984; Simeone *et al.* 1990; Stornaiuolo *et al.* 1990; Simeone *et al.* 1991; Houldsworth *et al.* 2002). Die Differenzierung geht mit spezifischen Änderungen der Genexpression des *HOXA* Locus einher. Während die anterior (5'-Ende) lokalisierten *HOXA* Gene (frühe Gene: *HOXA1* – *HOXA5*) in undifferenzierten Zellen reprimiert sind und nach ATRA-Behandlung exprimiert werden, werden die weiter posterior (3'-Ende) gelegenen *HOXA* Gene (späte Gene: *HOXA9* – *HOXA13*) im Verlauf der Differenzierung reprimiert (Bracken *et al.* 2006). Dabei ist die Stärke der Expression abhängig von der ATRA-Konzentration und der Dauer der Behandlung.

Zunächst wurde gezeigt, dass sich die NT2/D1 Zellen hinsichtlich der *HOXA* Genexpression nach ATRA-induzierter Differenzierung wie in der Literatur beschrieben verhalten. Nach ATRA-induzierter Differenzierung wurde die Expression von *HOXA1*, *HOXA2* und *HOXA5*, als Vertreter der frühen *HOXA* Gene induziert, während die späten Gene *HOXA9* und *HOXA10* reprimiert wurden (siehe Abbildung 25, S.77). Allerdings wurde beobachtet, dass die Repression der späten *HOXA* Gene nicht immer wie in der Literatur beschrieben und in Abbildung 25, S.77 gezeigt, detektiert werden konnte. Vor allem in siRNA-transfizierten Zellen wurde gefunden, dass sich im untersuchten Zeitfenster der Differenzierung die Expression von *HOXA9* und *HOXA10* nicht änderte oder leicht (2- bis 3-fach) induziert war (siehe Abbildung 29, S.81). Dies wurde auch im Zuge der Untersuchung von macroH2A während der Differenzierung von NT2/D1 Zellen beobachtet (Buschbeck *et al.* 2009). Die Abbildung 26, S.78 zeigt, dass PRMT6 ähnlich wie die PcG Proteine CBX8 und EZH2 an alle untersuchten *HOXA* Gene in undifferenzierten Zellen rekrutiert war. In Folge der ATRA-induzierten Differenzierung reduzierten sich die Anreicherungen von PRMT6 und den PcG Proteinen an den Promotoren der frühen *HOXA* Gene, während die Besetzung der späten *HOXA* Gene unbeeinflusst blieb oder nur eine geringe Reduktion bezüglich der Proteinrekrutierungen detektiert wurde. Die Reduktion von PRMT6, EZH2 und CBX8 an *HOXA1*, *HOXA2* und *HOXA5* wurde durch die Abnahme der repressiven Histonmodifikationen H3R2me2 und H3K27me3 sowie durch die Zunahme von H3K4me3 als Markierung aktiver Gene begleitet und korrelierte mit induzierter Genexpression. Im Gegensatz dazu änderte sich das Histonmodifikationsmuster von H3R2me2 und H3K27me3 an den späten *HOXA* Genen kaum und die Anreicherung von H3K4me3 war in Übereinstimmung mit der Repression der Gene reduziert (siehe Abbildung 27, S.79). Diese Daten lassen die Vermutung zu, dass PRMT6 zusammen mit PcG Proteinen die Expression von Genen reguliert, die sensitiv gegenüber einer Signal-vermittelten Aktivierung, z.B. durch Retinsäure, sind.

Diese Annahme wird vor allem durch Ergebnisse unterstützt, die nach Depletion von PRMT6 erhalten wurden. Einerseits war die Depletion von PRMT6 in undifferenzierten Zellen nicht ausreichend für die Aktivierung der *HOXA* Gene. Andererseits erhöhte die Depletion von PRMT6 die Sensitivität für ATRA und resultierte damit in einer Hyperaktivierung der frühen und Derepression der späten *HOXA* Gene (siehe Abbildung 29, S.81). In Übereinstimmung mit den erhöhten Transkriptmengen nach Beginn der Differenzierung in PRMT6-defizienten Zellen nahm die Anreicherung der aktiven Modifikation H3K4me3 an allen *HOXA* Genen stärker zu als in den Kontrollzellen, während H3K27me3 stärker reduziert wurde als in Kontrollzellen (siehe Abbildung 30, S.82). Diese Daten zeigen, dass PRMT6 die H3K27 Trimethylierung über einen bisher ungeklärten Mechanismus reguliert. Aufgrund der gezeigten Interaktion zwischen PRMT6 und PcG Proteinen wäre es möglich, dass eine Methylierung von PcG Proteinen durch PRMT6 die Katalyse oder den Erhalt der H3K27 Trimethylierung reguliert. Es wäre aber auch denkbar, dass die Regulation von H3K27me3 auf der Ebene der PRMT6-vermittelten H3R2 Dimethylierung abläuft, die als Bindungsplattform für PcG Proteine dienen könnte.

Zusammenfassend sprechen die Ergebnisse dafür, dass PRMT6 zusammen mit PcG Proteinen im Verlauf der neuronalen Differenzierung für die Feinabstimmung der Genexpression verantwortlich ist und im Wechselspiel mit den trxG Proteinen die Erhaltung eines transkriptionellen Zustandes reguliert. Die Komplexität dieser Art der Regulation entwicklungs- und differenzierungsrelevanter Gene wird deutlich, wenn zusätzlich zu den Ergebnissen dieser Arbeit die Findungen aus der Literatur als Diskussionsgrundlage herangezogen werden. Ähnlich wie PRMT6 sind auch die Histonvarianten macroH2A1 und macroH2A2 für den Erhalt der *HOXA* Genexpressionsmuster während der ATRA-induzierten Differenzierung von NT2/D1 Zellen wichtig (Buschbeck *et al.* 2009).

Die Frage nach der Dynamik der H3K27 Trimethylierung im Zuge der Aktivierung von Genen wurde in vier parallel veröffentlichten Studien adressiert, in denen die H3K27me_{2/3}-Demethylasen UTX und JMJD3 identifiziert und charakterisiert wurden (Agger *et al.* 2007; De Santa *et al.* 2007; Lan *et al.* 2007; Lee *et al.* 2007). Es stellte sich heraus, dass UTX an die *HOXA* Gene rekrutiert ist und in Folge der ATRA-induzierten Differenzierung verstärkt angereichert wird, was mit dem Verlust von H3K27me₃ und Genaktivierung einhergeht. Außerdem wurde gefunden, dass UTX mit dem MLL-Komplex interagieren kann (Agger *et al.* 2007; Cho *et al.* 2007; Issaeva *et al.* 2007; Lee *et al.* 2007). Die Studien haben gezeigt, dass die koordinierte Regulation der H3K27 Demethylierung und H3K4 Methylierung zur Erhaltung der transkriptionellen Aktivität benötigt wird. Andere Ergebnisse zeigen, dass die Genexpression durch die Interaktion von PRC2 mit der H3K4-Demethylase RBP2 kontrolliert wird (Pasini *et al.* 2008). Auf der Basis der bisherigen Erkenntnisse wäre es denkbar, dass auch PRMT6 an der PRC2-RBP2-Interaktion beteiligt ist und die H3R2 Dimethylierung katalysieren kann, nachdem die H3K4 Trimethylierung durch RBP2 entfernt wurde. Diese Hypothese bedarf weiterführender Untersuchungen zum genauen Verständnis der Wechselwirkungen zwischen den genannten Histonmodifikationen und deren Dynamik.

5.3.3 PRMT6 KONTROLLIERT PROLIFERATION UND SENESZENZ IN HUMANEN DIPLOIDEN FIBROBLASTEN UND TUMORZELLEN

In diesem Abschnitt wird eine bisher nicht beschriebene Rolle von PRMT6 diskutiert, die im Rahmen dieser Arbeit untersucht wurde. PRMT6 verhindert die Ausbildung von Seneszenz durch Repression der Zellzyklusinhibitoren *p16/INK4A* und *CDKN1A* (p21/CIP1) und ist für die Proliferation von diploiden humanen Fibroblasten und Tumorzellen notwendig. Unter zellulärer Seneszenz versteht man den irreversiblen Arrest von Zellen als Antwort auf verschiedene Arten von Stress (oxidativer Stress, DNA-Schaden, verkürzte Telomere, Expression von Onkogenen). Die Zellen befinden sich in einem metabolisch aktiven Zustand, der durch morphologische Veränderungen gekennzeichnet ist. So zeichnen sich seneszenten Zellen durch eine große und flache Morphologie aus und können durch mitogene Signale nicht mehr in den Zellzyklus eintreten (Ben-Porath and Weinberg 2005). Damit stellt die Seneszenz eine natürliche Barriere für die ungehinderte Proliferation von Tumorzellen dar (Serrano and Blasco 2007; Prieur and Peepers 2008). Nach dem heutigen Erkenntnisstand wird zelluläre Seneszenz auf molekularer Ebene hauptsächlich durch die pRb und p53 Tumorsuppressor-Signalwege kontrolliert. Die Zellzyklusinhibitoren p16/INK4A und p21/CIP1 verhindern hierbei, durch Inhibition Cyclin-abhängiger Kinasen (CDKs), die Phosphorylierung von pRb. Hypophosphoryliertes pRb vermittelt den Zellzyklusarrest über die Hemmung der E2F-Zielgenexpression (Dotto 2000; Narita *et al.* 2003). Allerdings existieren aufgrund bisheriger Studien mehrere Theorien bezüglich der Etablierung der Seneszenz in humanen Zellen über die p53/p21 und p16/pRb Signalwege (Itahana *et al.* 2004). Basierend auf der Herkunft des Seneszenzsignals (intrinsisch bzw. extrinsisch) wird zwischen replikativer und stressinduzierter Seneszenz unterschieden. Erstere ist telomerabhängig und läuft vorwiegend über den p53/p21 Signalweg ab, während letztere telomerunabhängig (stressinduziert) ist und durch den p16/pRb Signalweg vermittelt wird. Allerdings wird mittlerweile vermutet, dass in Abhängigkeit vom Zelltyp, den Kulturbedingungen und des Stressausmaßes beide Signalwege (p53/p21/pRb und p16/pRb) allein oder aber auch zusammen zur Seneszenz beitragen (Zhang 2007). Es wird davon ausgegangen, dass p21/CIP1 hauptsächlich den Zellzyklusarrest und damit die Initiation der Seneszenz bewirkt und p16/INK4A für den Erhalt der Seneszenz verantwortlich ist (Stein *et al.* 1999; Itahana *et al.* 2001).

Es gab nun mehrere Gründe zu erforschen, ob PRMT6 wichtig für Proliferation und die Kontrolle der Seneszenz humaner Fibroblasten ist. Erstens interagiert PRMT6 mit PcG Proteinen, die durch Regulation des *INK4B-ARF-INK4A* Locus für die Kontrolle von Proliferation und Seneszenz wichtig sind (Jacobs *et al.* 1999; Pasini *et al.* 2004; Bracken *et al.* 2007; Dietrich *et al.* 2007). Zweitens antagonisiert PRMT6 die MLL1-vermittelte H3K4 Trimethylierung, die zur Aktivierung des *INK4B-ARF-INK4A* Locus nötig ist (Kia *et al.* 2008). Drittens wird PRMT6, neben PRMT1 und PRMT4, während der replikativen und stressinduzierten Seneszenz in humanen diploiden Fibroblasten herunterreguliert, was mit einer globalen Abnahme der asymmetrischen Dimethylierung einhergeht (Lim *et al.* 2008).

Ob PRMT6 wie EZH2, SUZ12, BMI1 und CBX8 als Regulator von Proliferation und Seneszenz fungiert, wurde in der vorliegenden Arbeit in der humanen diploiden Fibroblasten Zelllinie TIG3-T und in der Osteosarkomazelllinie U2OS untersucht. Die Depletion von PRMT6 in TIG3-T Zellen bewirkte einen Proliferationsarrest unter stressbedingten Kulturbedingungen. Ähnliche Ergebnisse wurden durch die Depletion von CBX8 erhalten und auch für SUZ12, EZH2 und BMI1 in der Literatur beschrieben (Jacobs *et al.* 1999; Bracken *et al.* 2003; Pasini *et al.* 2004; Dietrich *et al.* 2007). Darüber hinaus ergab die Untersuchung der Zellzyklusverteilung eine Akkumulation der PRMT6-defizienten Zellen in der G1-Phase, die auch durch verminderte Proteinmengen von CyclinA2 gekennzeichnet war (siehe Abbildung 33, S.86 und Abbildung 35, S.88).

Da bereits gezeigt wurde, dass PcG Proteine die Proliferation durch Repression des *INK4B-ARF-INK4A* Lokus beeinflussen (Jacobs *et al.* 1999; Bracken *et al.* 2007; Kotake *et al.* 2007), sollte herausgefunden werden, ob PRMT6 am selben Lokus wirkt. Der *INK4B-ARF-INK4A* Lokus kodiert für die drei Gene *ARF*, *p15/INK4B* und *p16/INK4A*, die als Tumorsuppressoren wirken und oft in humanen Krebszellen mutiert oder stillgelegt sind (Gil and Peters 2006; Sparmann and van Lohuizen 2006; Jones and Baylin 2007). Die Depletion von PRMT6 führte mit zwei der drei verwendeten shRNA-Vektoren spezifisch zur Aktivierung der *p16/INK4A* Expression, wohingegen die Transkriptmengen von *ARF* und *p15/INK4B* von PRMT6 unabhängig waren (siehe Abbildung 35, S.88 und Abbildung 36, S.89). Ähnliche Ergebnisse wurden in CBX8-defizienten Zellen erhalten. In Übereinstimmung mit Daten aus der Literatur konnte gezeigt werden, dass H3K27me3 am *p16/INK4A* Genbereich angereichert ist, während am *p15/INK4B* Promoter nur geringe Mengen an H3K27me3 detektiert werden konnten (siehe Abbildung 37, S.90 und (Bracken *et al.* 2007; Kia *et al.* 2008)). Bemerkenswerterweise verhielt sich das Rekrutierungsmuster von PRMT6 an *p15/INK4B* und *p16/INK4A* ähnlich dem, der H3K27 Trimethylierung und identifizierte *p16/INK4A* als direktes Zielgen von PRMT6 (siehe Abbildung 37, S.90). Diese Ergebnisse geben erste Hinweise zu einer kooperativen Regulation des *INK4B-ARF-INK4A* Lokus durch PRMT6 und die PcG Proteine.

Die Hauptfunktion von p16/INK4A ist die Induktion von Seneszenz als Schutz vor unbegrenzter Proliferation von Zellen (Gil and Peters 2006). Ob die Abwesenheit von PRMT6 in TIG3-T Zellen zu Seneszenz führt, sollte anhand der Aktivität von Seneszenz-assoziiierter β -Galaktosidase, als Biomarker für seneszente Zellen, herausgefunden werden. Die Depletion von PRMT6 bewirkte mit allen drei shRNA-Vektoren in gleichem Maße die Ausbildung eines seneszenten Phänotyps, der durch die Blaufärbung der Zellen detektiert wurde. Dies war insofern bemerkenswert, da nach Depletion von PRMT6 mit pRSshPRMT6_1 in mehreren Experimenten keine oder nur eine sehr schwache Aktivierung von *p16/INK4A* beobachtet werden konnte. Es stellte sich demzufolge die Frage, was in diesem Fall zur Auslösung der Seneszenz führte. Neben der Hochregulation von *p16/INK4A* spielt auch die p53-abhängige und -unabhängige Aktivierung von *CDKN1A* (p21/CIP1) eine Rolle bei der Seneszenz (Noda *et al.* 1994; Itahana *et al.* 2004). Die Untersuchung der *CDKN1A* (p21/CIP1)

Transkriptmengen zeigte, dass die Expression von *CDKN1A* (p21/CIP1) in PRMT6-defiziente Zellen aktiviert wurde. Interessanterweise verhalten sich die Expressionsstärken von *CDKN1A* (p21/CIP1) und *p16/INK4A* in den PRMT6-defizienten Zellen gegensätzlich. Obwohl alle drei verwendeten shRNA-Zielsequenzen eine effiziente Depletion von PRMT6 bewirkten (siehe Abbildung 32, S.85), führt der Einsatz von pRSshPRMT6_5 zur stärkeren Aktivierung von *p16/INK4A* im Vergleich zu *CDKN1A* (p21/CIP1), während der Einsatz der anderen beiden shRNA-Konstrukte die *CDKN1A* (p21/CIP1) Expression stärker aktiviert (siehe Abbildung 35, S.88). Erklärungsansätze hierfür liefern verschiedene Beobachtungen aus der Literatur. Hierbei wurde entdeckt, dass einige Zellen einer Zellpopulation verstärkt *p16/INK4A* exprimieren, während andere verstärkt *CDKN1A* (p21/CIP1) aktivieren und wieder andere gleichzeitig beide Signalwege aktivieren und damit zur Seneszenz der Zellpopulation beitragen. Es wird vermutet, dass dies darauf beruht, dass eine Population von Zellen in Kultur verschiedenen Arten von Stress ausgesetzt ist (Beausejour *et al.* 2003; Itahana *et al.* 2003; Herbig *et al.* 2004; Ben-Porath and Weinberg 2005; Chen *et al.* 2006).

Außerdem wurde herausgefunden, dass die Stärke der *p16/INK4A* Hochregulation vom Zelltyp und dessen Ursprung abhängig ist. In einigen Fibroblastenzelllinien, wie der WI-38 Fibroblastenzelllinie, ist *p16/INK4A* deutlich hochreguliert, während in anderen Zelllinien, wie den BJ-Fibroblasten, kaum eine *p16/INK4A* Expression detektierbar ist. Es wird vermutet, dass auch Zelltypen existieren, die eine *p16/INK4A* Hochregulation aufweisen, die zwischen den sich gegensätzlich verhaltenden Zelltypen BJ und WI-38 liegt (Itahana *et al.* 2003). Es ist außerdem zu erwähnen, dass die genannten Unterschiede hauptsächlich auf die Herkunft und die unterschiedliche Lebensdauer der Fibroblasten zurückzuführen sind. Während WI-38 Zellen aus der Lunge stammen und eine relativ kurze replikative Lebensdauer im Vergleich zu BJ Zellen aufweisen, kommen BJ-Fibroblasten aus der Haut. Wahrscheinlich verhalten sich Tig3-T Zellen in Bezug auf die *p16/INK4A* Expression ähnlich wie WI-38 Zellen, da auch Tig3-T Zellen aus der Lunge stammen.

Als Merkmal irreversibler Seneszenz wurde die Bildung sogenannter Seneszenz-assoziiierter heterochromatischer Foci (SAHF-*senescence-associated heterochromatic foci*) beobachtet, die durch die Rekrutierung von heterochromatischen Proteinen und pRb an E2F-responsive Promotoren gekennzeichnet ist und in der stabilen Repression von E2F-Zielgenen resultiert (Narita *et al.* 2003). SAHF wurden allerdings nur in Fibroblasten mit hoher *p16/INK4A* Expression detektiert und korrelieren mit irreversibler Seneszenz (Beausejour *et al.* 2003). Die Fragestellung, ob die Seneszenz in TIG3-T Zellen mit dem Auftreten von SAHF einhergeht und ob die Depletion von PRMT6 ausreichend für die Etablierung des Zustandes der irreversiblen Seneszenz ist, konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht untersucht werden und bleibt offen. Um herauszufinden, wie PRMT6 die Seneszenz in anderen humanen Fibroblastenzellen oder in murinen Zellen reguliert, bedarf es weiterführender Experimente in verschiedenen Zellsystemen. Interessanterweise wiesen PRMT6^{-/-}MEFs, aus der kürzlich als lebensfähig beschriebenen PRMT6 *knockout* Maus, in Übereinstimmung mit den Ergebnissen in TIG3-T Zellen, ebenfalls sowohl erhöhte *p16/INK4A* Spiegel als auch

verstärkte Seneszenz-assoziierte β -Galaktosidase Aktivität auf, was auf seneszente Zellen hindeutet (Vogel *et al.* 2010, Poster, Meeting in Arizona). Diese Daten bestätigen die Rolle von PRMT6 als Regulator der Seneszenz durch Repression von *p16/INK4A*, die im Rahmen dieser Arbeit in humanen diploiden Fibroblasten beschrieben wurde.

Die Untersuchungen im Rahmen dieser Arbeit identifizierten PRMT6 nicht nur als Regulator für Proliferation und Seneszenz von diploiden humanen Fibroblasten, sondern deckten auch eine Rolle bei der Proliferation von Tumorzellen auf. Ein Markenzeichen zellulärer Immortalisierung ist die Fähigkeit ohne parakrine Signale zu proliferieren und Kolonien aus Einzelzellen zu bilden. Die Fähigkeit zur Koloniebildung nach Depletion verschiedener Proteine wurde in der Osteosarkomazelllinie U2OS untersucht. Die Tatsache, dass die Depletion von PRMT6 zur Verminderung des klonogenen Potentials von U2OS Zellen und damit zur Reduktion der Koloniezahl im Vergleich zu Kontrollzellen führte, macht deutlich, dass PRMT6 für die Proliferation von Tumorzellen benötigt wird (siehe Abbildung 38, S.91). Zusätzlich kann man daraus schlussfolgern, dass PRMT6 die Expression weiterer Gene, zusätzlich zu *p16/INK4A*, kontrolliert, die eine Rolle bei der zellulären Stressantwort spielen, da der *INK4a-ARF* Locus in U2OS Zellen durch DNA-Methylierung stillgelegt ist (Park *et al.* 2002). Ähnliche Ergebnisse wurden für CBX8 und SUZ12 erhalten (siehe Abbildung 38, S.91 und (Pasini *et al.* 2004; Dietrich *et al.* 2007)). In Übereinstimmung mit Ergebnissen aus Tig3-T Zellen ist der Proliferationsarrest durch die Abnahme von *CCNA2* gekennzeichnet, welche auf ein Arretieren in der G1-Phase hindeutet. Da auch in den U2OS Zellen die Depletion von PRMT6 zur verstärkten Expression von *CDKN1A* (p21/CIP1) führte (siehe Abbildung 39, S.92), kann man spekulieren, dass es sich hierbei um ein zelltypunabhängiges Zielgen von PRMT6 handelt. Außerdem haben Chromatin-Immunpräzipitationsanalysen von Stefanie Riedl aus unserer Arbeitsgruppe bestätigt, dass es sich bei *CDKN1A* (p21/CIP1) um ein direktes Zielgen von PRMT6 in TIG3-T Zellen handelt.

Zusammenfassend zeigen die Daten, dass PRMT6 sowohl für die Proliferation von diploiden humanen Fibroblasten als auch von Tumorzellen eine Rolle spielt. Da analoge Funktionen für einzelne PcG Proteine gefunden wurden und PRMT6 mit PcG Proteinen biochemisch interagiert, wäre es denkbar, dass PRMT6 mit den PcG Proteinen bei der Kontrolle von Proliferation und Seneszenz kooperiert. Um weitere Ergebnisse hinsichtlich der Zielgenspezifität und des Mechanismus dieser positiven Wechselwirkung zu erhalten, sind zukünftig genomweite Analysen zur Lokalisation von PRMT6 und H3K27me2 im Vergleich zur Rekrutierung der PcG Proteine und des Auftretens von H3K27me3 unabdingbar. Die Ergebnisse dieser Studien müsste dann mit genomweiten Expressionsanalysen verglichen werden um erste Rückschlüsse auf weitere gemeinsam regulierte Zielgene ziehen zu können.

5.3.4 MODELL ZUR POSITIVEN WECHSELWIRKUNG ZWISCHEN PRMT6 UND PcG PROTEINEN

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass PRMT6 mit einigen PcG Proteine der PRC1 und PRC2 Komplexe interagiert und zum Erhalt spezifischer Expressionsmuster der Gene des *HOXA* Locus während der neuronalen Differenzierung von NT2/D1 Zellen beiträgt (siehe Abbildung 47). Des Weiteren wurde gezeigt, dass PRMT6 für die Proliferation von Tumorzellen und diploiden Fibroblasten nötig ist und Seneszenz von diploiden Fibroblasten in ähnlicher Weise reguliert, wie die PcG Proteine. Mechanistische Details zur Kooperation von PRMT6 und PcG Proteinen am *INK4B-ARF-INK4B* Locus konnten im Rahmen dieser Arbeit nicht aufgeklärt werden. Die in Abbildung 48 gezeichnete Übersicht basiert auf dem bisherigen Wissensstand der Literatur in Verbindung mit den Erkenntnissen, die im Zuge dieser Arbeit erlangt wurden.

In undifferenzierten NT2/D1 Zellen liegen die 5'-lokalisierten frühen *HOXA* Gene (*HOXA1* - *HOXA5*) im reprimierten Zustand vor und die Promoterregionen sind durch die Rekrutierung von PRMT6 und den PcG Proteinen (EZH2 und CBX8) gekennzeichnet. Dies geht einher mit verstärkter Anreicherungen von H2R2me2 und H3K27me3 als Markierung für transkriptionell inaktive Gene. Im Verlauf der ATRA-induzierten Differenzierung verlassen die Repressorproteine die Promotoren der frühen *HOXA* Gene. Damit einher geht die Abnahme der repressiven Histonmodifikationen, die durch die Zunahme der H3K4 Trimethylierung ersetzt werden und die transkriptionellen Aktivierung der Gene ermöglicht. Damit wird die gegenseitige negative Wechselwirkung zwischen der aktiven Histonmodifikation H3K4me3 und den beiden repressiven Histonmarkierungen H3R2me2 und H3K27me3 deutlich. Um den schnellen Wechsel zum transkriptionell aktiven Chromatinstatus zu ermöglichen, ist die Existenz von Demethylasen erforderlich. Kürzlich wurde die Lysin-Demethylase UTX identifiziert, welche die Demethylierung von H3K27me2/3 katalysiert. Interessanterweise wurde gefunden, dass UTX mit dem MLL-Komplex interagiert und zur Aktivierung der *HOX* Gene in NT2/D1 Zellen beiträgt (Agger *et al.* 2007; Lee *et al.* 2007). Inwiefern die Demethylierung von H3R2me2 durch die kürzlich identifizierte Demethylase JMJD6 realisiert wird, bleibt offen, da diese Aktivität von anderen Gruppen nicht nachgewiesen werden konnte (Chang *et al.* 2007; Webby *et al.* 2009).

Mechanistisch haben die Untersuchungen dieser Arbeit ergeben, dass im undifferenzierten Zustand die H3K4 Trimethylierung durch die Anwesenheit von PRMT6 und H3R2me2 in mehrfacher Hinsicht verhindert und die Repression der Gene aufrechterhalten wird. Die H3R2 Dimethylierung inhibiert die Bindung von WDR5 an Histon H3, hemmt die katalytische Aktivität von MLL und verhindert die Rekrutierung des MLL-Komplexes an das Chromatin. Der Erhalt des repressiven Zustandes wird ferner durch die Anwesenheit von PRC1 und PRC2 und der daraus resultierenden H3K27 Trimethylierung gewährleistet. Die Tatsache, dass die Depletion der Repressorproteine allein nicht ausreichend ist, um die Genexpression zu aktivieren, bestätigt die Vermutung, dass sowohl die PcG Proteine als auch PRMT6 im gegenseitigen Wechselspiel mit den trxG Proteinen für den Erhalt

bestimmter Expressionszustände (Repression oder Aktivierung) der *HOXA* Gene verantwortlich sind. Allerdings führte die frühzeitige Depletion der Repressorproteine und die Induktion der Differenzierung mit ATRA zur Fehlregulation der *HOXA* Gene (siehe Abbildung 29, S.81).

Im Zustand der aktiven Transkription hingegen verhindert die H3K4 Trimethylierung das Auftreten der repressiven Histonmodifikationen. Einerseits wird die katalytische Aktivität von PRMT6 durch die Anwesenheit der H3K4 Trimethylierung inhibiert (Hyllus *et al.* 2007), andererseits wird die Bindung von EZH2 an Histon H3 durch H3K4me3 vermindert (*Drosophila* Experimente, Poster EMBL-Transkriptions-Meeting, Heidelberg 2010, Jürg Müller). Die 3'-lokalisierten *HOXA* Gene (*HOXA9* - *HOXA13*) werden im Verlauf der ATRA-induzierten Differenzierung von NT2/D1 Zellen reprimiert. Interessanterweise sind die Promoterregionen dieser Gene in gleichem Maße sowohl im undifferenzierten Zustand als auch nach Beginn der Differenzierung von PRMT6 und den PcG Proteinen besetzt. Das bedeutet, dass die Repression dieser Gene nicht allein durch Anwesenheit der Repressorproteine realisiert wird. Über den genauen Mechanismus der Repression ist bisher nichts bekannt. Es wäre denkbar, dass die Regulation der Genexpression entweder auf der gegenseitigen posttranslationalen Modifizierung von PRMT6 und den PcG Proteinen beruht, oder dass diese von anderen Proteinen modifiziert werden. Es wäre auch möglich, dass weitere Proteine, wie z.B. DNA-Methyltransferasen nach Induktion der Differenzierung rekrutiert werden, die zur transkriptionellen Inaktivierung führen. Es wäre aber auch denkbar, dass die Rekrutierung einer H3K4me3-Demethylase und die Entfernung der H3K4 Trimethylierung als Signal für die Repression notwendig sind. Die H3K4me3-Demethylase RBP2 wurde kürzlich als Interaktionspartner von PRC2 identifiziert und könnte diese Rolle in dem vorgeschlagenen Modell übernehmen (Pasini *et al.* 2008).

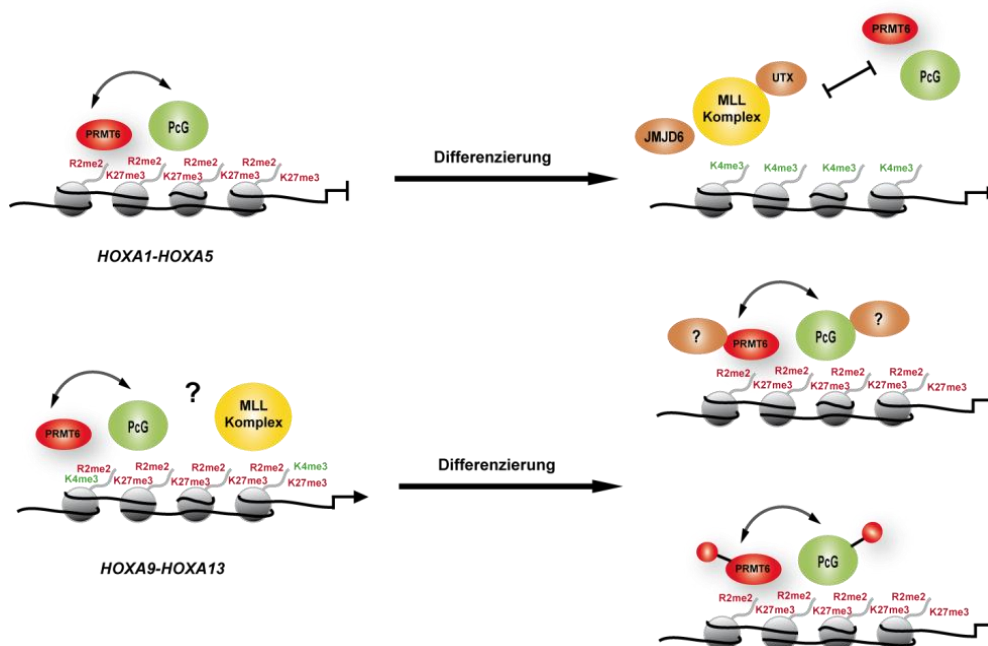


Abbildung 47: Modell der Genregulation nach ATRA-induzierter Differenzierung von NT2/D1 Zellen.

5.4 PRMT6 IST BESTANDTEIL HÖHERMOLEKULARER PROTEIN-PROTEIN-INTERAKTIONEN

Gelfiltrationsanalysen haben gezeigt, dass PRMT6 in Fraktionen eluiert, die einem Molekulargewichtsbereich von 200 bis 440 kDa entsprechen. Aus der Literatur ist bereits bekannt, dass PRMTs Homodimere bilden. Bisher wurden PRMT1 (Ratte), PRMT3 (Ratte), PRMT4 und RMT1/HMT1 (Hefe) kristallisiert. Bemerkenswerterweise spiegelt sich trotz unterschiedlicher Bedingungen bei den Strukturanalysen eine strukturelle Konservierung der katalytischen Domäne wider. (Weiss *et al.* 2000; Zhang *et al.* 2000; Teyssier *et al.* 2002; Troffer-Charlier *et al.* 2007; Yue *et al.* 2007). Außerdem wurde in unabhängigen Studien die Bedeutung der Homodimerisierung für die katalytische Aktivität der PRMTs hervorgehoben (Weiss *et al.* 2000; Zhang *et al.* 2000; Teyssier *et al.* 2002; Zhang and Cheng 2003; Troffer-Charlier *et al.* 2007; Yue *et al.* 2007). Diese Beobachtungen unterstützen die Ansicht, dass die Bildung von Homodimeren für PRMTs konserviert und für die katalytische Aktivität nötig ist. Obwohl neben der Möglichkeit zur Homodimerisierung auch die Bildung von Homooligomeren, u.a. bei der Kristallisation von Rmt1p (Hefe) beschrieben ist, bleibt deren Existenz *in vivo* unwahrscheinlich (Weiss *et al.* 2000; Thomas *et al.* 2010). Für PRMT6 wurde die Homodimerisierung beschrieben und mittels Förster Resonanz Energie Transfer (FRET) nachgewiesen. Allerdings gibt es bisher keine Hinweise darauf, dass PRMT6 Homooligomere bildet (Thomas *et al.* 2010). Da das Molekulargewicht potentieller PRMT6-Dimere ungefähr 85 kDa betragen würde, kann man aus den Ergebnissen der Gelfiltrationsanalyse schließen, dass PRMT6 *in vivo* mit anderen Proteinen assoziiert vorliegt.

In der vorliegenden Arbeit wurden in einem unvoreingenommenen Versuchsansatz neue Interaktionspartner von PRMT6 aus MCF7 Zellen aufgereinigt und mittels massenspektrometrischer Analyse identifiziert (siehe 4.5, S.92). Mit Hilfe dieser Strategie wurden 43 potentielle Interaktionspartner von PRMT6 gefunden. Jedoch wurde schon anhand der colloidalen Coomassie-Färbung deutlich, dass es sich bei den möglichen PRMT6 Interaktionspartnern wahrscheinlich nicht um einen oder mehrere stabile Proteinkomplexe handelt, da die meisten Proteine substöchiometrisch bezogen auf die PRMT6 Menge vorhanden waren (siehe Abbildung 42, S.95). Es wäre aber denkbar, dass die Assoziation von PRMT6 mit anderen Proteinen nach bestimmten Signalen am Chromatin stattfindet oder durch RNA stabilisiert wird. Allerdings kann aufgrund der Heterogenität der analysierten Proteine geschlossen werden, dass PRMT6 viele unterschiedliche Interaktionen eingeht, deren funktionelle Konsequenzen weiterer Untersuchungen bedürfen. Zunächst wurden die gefundenen Proteine anhand ihrer Funktion gruppiert. Die meisten der identifizierten Proteine spielen eine Rolle in der Transkriptionskontrolle, Proliferation, DNA-Reparatur und Replikation. Mit Hilfe der Datenbank STRING konnten bereits bekannte Interaktionen zwischen den identifizierten Proteinen dargestellt werden. Anhand dieser Ergebnisse und Recherchen in der Literatur, wurden einige interessante Proteine gefunden, deren spezifische Interaktionen mit PRMT6 im nächsten Schritt

mittels Coimmunpräzipitationen verifiziert werden müssen, bevor Untersuchungen zur Funktion angestellt werden. Bei der Aufreinigung von Proteinen, die mit TAP-PRMT6 assoziiert waren, wurden keine PcG Proteine identifiziert. Da bereits in den Coimmunpräzipitationsanalysen herausgefunden wurde, dass es sich bei der Assoziation von PRMT6 mit PcG Proteinen wahrscheinlich um transiente Interaktionen handelt, wobei nur ein geringer Anteil der PcG Proteine mit PRMT6 interagiert, wäre es denkbar, dass die Anreicherung der PcG Proteine so gering war, dass sie unter der massenspektrometrischen Nachweisgrenze lagen, oder durch andere Proteine verdeckt wurden.

Interessanterweise wurden mehrere der identifizierten Proteine bereits mit Argininmethylierung in Verbindung gebracht. Unter anderem wurde die Argininmethylierung des nukleären RNA Bindungsproteins TAF15 durch PRMT1 an mehreren *RGG-Repeats* identifiziert. Dabei ist die Argininmethylierung von TAF15, welches mit TFIID und RNA Polymerase II assoziiert ist, essentiell für die nukleäre Lokalisation und notwendig für die Expression endogener TAF15-Zielgene (Jobert *et al.* 2009). Ob PRMT1 und PRMT6 redundante Funktionen bei der Methylierung und funktionellen Regulation von TAF15 besitzen, oder ob die Methylierungen Arginin-spezifisch mit verschiedenen Auswirkungen ablaufen, könnte Gegenstand der weiteren Erforschung dieser Interaktion sein.

Auch der nukleäre Import der ATP-abhängigen RNA Helikase A (DHX9, RHA) wird durch PRMT1-vermittelte Argininmethylierung der RGG-reichen NTD (*nuclear transport domain*) reguliert (Smith *et al.* 2004). Die Studien der letzten Jahre haben verschiedene Funktionen von DHX9 in der Transkription auch unabhängig von der Helikaseaktivität aufgedeckt. DHX9 wurde als Coaktivator der CBP-abhängigen Transkription gefunden und trägt als Interaktionspartner der p65 Untereinheit von NF- κ B zur Verstärkung der NF- κ B-abhängigen Transkription bei. Außerdem wurde gezeigt, dass DHX9 an eine spezifische Promotersequenz von *p16/INK4A* bindet und damit wahrscheinlich zur Aktivierung des Gens beiträgt (Myohanen and Baylin 2001; Fullerton *et al.* 2007). In welcher Weise die Interaktion mit PRMT6 diese transkriptionellen Funktionen moduliert, ist bisher nicht untersucht. Bemerkenswert ist jedoch, dass im Rahmen dieser Arbeit PRMT6 als Repressor von *p16/INK4A* identifiziert wurde. Dies lässt die Spekulation zu, dass die Interaktion mit PRMT6 und eine mögliche Argininmethylierung die Bindung von DHX9 an den Promoter unterbindet und somit die Coaktivatorfunktion inhibiert. Bezüglich der Chromatinrekrutierung von PRMT6 sollte untersucht werden, ob DHX9 eine solche Funktion unter bestimmten Bedingungen übernehmen könnte. Aufgrund der Entdeckung, dass PRMT6 als Coaktivator der Hormon-vermittelten Steroidhormonrezeptor-abhängigen Transkription wirkt und hormonunabhängig alternatives Splicing reguliert (Harrison *et al.* 2010), könnte man spekulieren, dass PRMT6 zusammen mit DHX9 als Coaktivator weiterer Transkriptionsfaktoren auftritt. Gegenstand anschließender Untersuchungen sollte auch die Rolle von PRMT1 sein. Dabei stellt sich erneut die Frage nach einer möglichen Redundanz zwischen PRMT6 und PRMT1.

Der Transkriptionsfaktor ILF2 (*Interleukin enhancer binding factor 2*) wurde in einer proteomweiten Analyse Arginin-methylierter Proteine als asymmetrisch dimethyliertes Protein identifiziert (Boisvert

et al. 2003) und stellt damit ein potentielles Substrat für PRMT6 dar. ILF2 tritt hauptsächlich als Heterodimer im Komplex mit ILF3, das ebenfalls als möglicher Interaktionspartner von PRMT6 im Rahmen dieser Arbeit identifiziert wurde, auf. Interessanterweise wurden ILF2 und ILF3 zusammen mit DHX9 und ZAP3 (YLPM1), welches auch bei der TAP-PRMT6 Aufreinigung gefunden wurde, als Bestandteile eines mRNP (*messenger ribonucleoprotein*)-Komplexes gefunden. Die mRNP-Komplexe bestehen aus einem Transkript, welches durch eine sich verändernde Zusammensetzung verschiedener Proteine gebunden wird, die die posttranskriptionellen Effekte der Genexpression vermitteln (Hieronymus and Silver 2004). Fragestellungen, die im Fokus weiterführender Experimente stehen könnten, wären folgende: Ist PRMT6 die verantwortliche PRMT für die bereits beschriebene Argininmethylierung von ZAP3 (Ulke-Lemee *et al.* 2007), DHX9 und IL2 (Boisvert *et al.* 2003) und wie reguliert diese im Zusammenhang mit mRNP-Komplexen die Genexpression? Weitere zu adressierende Fragen betreffen die Zusammensetzung potentieller PRMT6-haltiger mRNP-Komplexe und deren Transkriptspezifität.

Interessanterweise wurde im Zuge der TAP-PRMT6 Aufreinigung DDB1 (*damaged DNA binding protein*), das zunächst im Zusammenhang mit DNA-Reparatur beschrieben wurde, als potentieller Interaktionspartner von PRMT6 gefunden (Lee and Zhou 2007). Neueste Erkenntnisse deckten Funktionen des WD40-Repeat Proteins als Adaptorprotein der Ubiquitin-Ligase CUL4 bei der Regulation von DNA-Reparatur und Proliferation durch gerichtete Ubiquitinierung wichtiger Regulatoren auf (Lee and Zhou 2007). Außerdem bindet DDB1-CUL4 direkt an *p16/INK4A* und ist in Kooperation mit dem MLL1-Komplex zur Aktivierung von *p16/INK4A* in seneszenten Zellen notwendig (Kotake *et al.* 2009). Unter der Voraussetzung, dass die Interaktion von PRMT6 mit DDB1 spezifisch ist, könnte man sich verschiedene Konsequenzen dieser Interaktion vorstellen. Einerseits könnte die Assoziation mit DDB1 die Degradation von PRMT6 durch Ubiquitinierung bewirken. Andererseits könnte diese Interaktion zu einem alternativen Mechanismus der PRMT6-vermittelten Repression H3K4me3-regulierter Gene beitragen. Es wäre aber auch denkbar, dass PRMT6 zusammen mit DDB1 eine Rolle bei der Nukleotidexzisionsreparatur (NER) spielt, da eine frühere Veröffentlichung PRMT6 bereits als Regulator der Basenexzisionsreparatur (BER) beschrieben hat (El-Andaloussi *et al.* 2006). Diese Mutmaßungen sind allerdings spekulativ und müssen in zukünftigen Experimenten belegt oder widerlegt werden.

Da PRMT6 selbst nicht direkt an das Chromatin binden kann, war das durch Aufreinigung von PRMT6 gefundene Histonbindungsprotein RBBP7 (RbAp46 - *retinoblastoma suppressor associated protein 46*) von besonderem Interesse. Die Interaktion zwischen PRMT6 und RbAp46 konnte in der vorliegenden Arbeit durch unabhängige Coimmunpräzipitationen verifiziert werden. Zusätzlich wurde gefunden, dass PRMT6 auch mit dem Homolog RbAp48 interagieren kann (Daten nicht gezeigt). RbAp46 und RbAp48 fungieren als Histonbindungsuntereinheiten, die Chromatinremodeller (NuRD Komplex), Histon-Acetyltransferasen, Deacetylasen (mSin3 *Histone Deacetylase* Komplex) und den Histon-Methyltransferase Komplex PRC2 an ihre Histonsubstrate am Chromatin dirigieren (Loyola

and Almouzni 2004). Die Vermutung liegt hier nahe, dass PRMT6 durch die Assoziation mit RbAp46/48 an spezifische Chromatinregionen rekrutiert wird. Bisher wurde dieser Fragestellung experimentell noch nicht nachgegangen ebenso wenig wie der Möglichkeit, dass diese Interaktion als Brückeninteraktion zu Proteinkomplexen dienen könnte.

Am Beginn zukünftiger Arbeiten sollte die Verifizierung der Interaktionen mittels unabhängiger Coimmunpräzipitationsanalysen stehen. Anschließend können funktionelle Fragen im Mittelpunkt der Untersuchungen stehen. Interessanterweise konnten hier, auf der Grundlage von Literaturdaten und Ergebnissen dieser Arbeit, bereits funktionelle Verbindungen zwischen den identifizierten Proteinen und PRMT6, die im Rahmen der vorliegenden Arbeit entdeckt wurden, aufgezeigt werden. Damit stellen die aus dieser Strategie gewonnenen Ergebnisse eine Grundlage zur weiteren funktionellen Charakterisierung von PRMT6 dar.

5.5 PRMT6 UND DIE H3R2 DIMETHYLIERUNG IM HISTON-CODE: ERKENNTNISSE UND OFFENE FRAGEN

Mit der Charakterisierung der funktionellen Relevanz der H3R2 Dimethylierung *in vivo*, der Aufdeckung der negativen Wechselwirkung zwischen H3R2me₂ und H3K4me₃ sowie der Beschreibung erster Hinweise, die auf Kooperativität zwischen PRMT6 und den PcG Proteinen hindeuten, trägt die vorliegende Arbeit zur Einordnung der H3R2 Dimethylierung als wichtige Modifikation im Histon-Code und von PRMT6 als Repressor spezifischer Gene bei. Das in Abbildung 49 dargestellte Modell soll als Übersicht der bisherigen Erkenntnisse dienen, die einerseits im Rahmen der vorliegenden Arbeit erhalten wurden. Andererseits wird das Modell durch Hinweise aus der Literatur ergänzt.

PRMT6 wurde in der vorliegenden Arbeit als Histon-Methyltransferase verantwortlich für die Katalyse der asymmetrischen H3R2 Dimethylierung *in vivo* identifiziert, die die H3K4 Trimethylierung antagonisiert. Die Katalyse der H3R2 Dimethylierung resultierte in der Repression spezifischer H3K4me₃-regulierter Gene durch Hemmung der katalytischen Aktivität von MLL1 und durch Verhinderung der Rekrutierung von MLL1 und WDR5 an das Chromatin. Damit einher ging der Verlust der aktiven Markierung H3K4me₃, und die Gene wurden reprimiert. Im Zustand aktiver Transkription verhinderte die Präsenz der H3K4 Trimethylierung die Dimethylierung von H3R2 durch Hemmung der katalytischen Aktivität von PRM6 (Hyllus *et al.* 2007). Die Repressorfunktion von PRMT6 und der Katalysemechanismus wurden parallel zu den hier gezeigten Arbeiten durch drei weitere Arbeitsgruppen beschrieben. Welches Enzym für die H3R2 Dimethylierung in Hefezellen verantwortlich ist, wurde bisher noch nicht herausgefunden (Guccione *et al.* 2007; Kirmizis *et al.* 2007; Iberg *et al.* 2008; Lakowski and Frankel 2008).

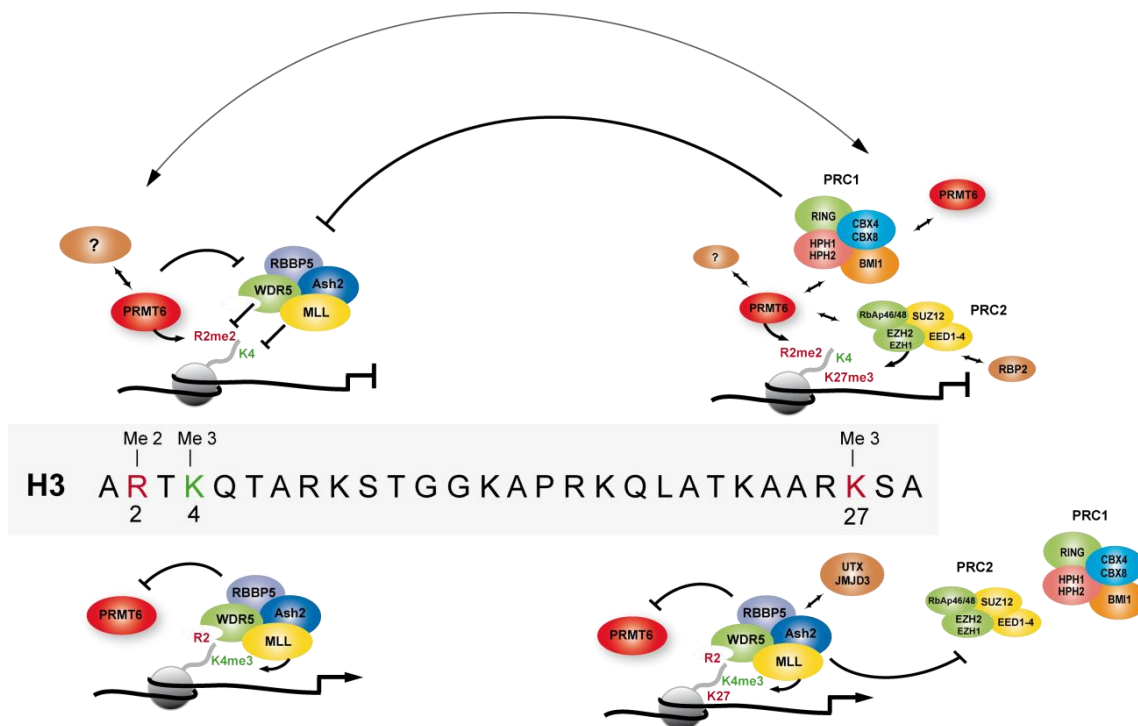


Abbildung 49: Übersicht zur Rolle von PRMT6 und H3R2me2 im Wechselspiel mit anderen Histonmodifikationen und Effektorproteinen bei der Genexpressionskontrolle.

Neben dem Antagonismus zwischen H3R2me2 und H3K4me3 gab es Hinweise auf eine positive Wechselwirkung zwischen PRMT6 (H3R2me2) und PcG Proteinen (H3K27me3). Diesbezüglich wurde gefunden, dass PRMT6 mit einigen PcG Proteinen interagiert und die Differenzierung von NT2/D1 Zellen in ähnlicher Weise wie die PcG Proteine reguliert. Es hat sich gezeigt, dass PRMT6 und die PcG Proteine im gegensätzlichen Wechselspiel mit trxG Proteinen zum Erhalt des transkriptionellen Zustandes (Repression oder Aktivierung) der *HOXA* Gene beitragen. Des Weiteren wurde PRMT6 zusammen mit PcG Proteinen als Repressor von *p16/INK4A* beschrieben und kontrolliert damit Proliferation und Seneszenz. Die Regulation des *INK4B-ARF-INK4A* Lokus erfolgt durch ein komplexes Regulationsnetzwerk, in dem neben der Wirkung von PRMT6 auch Chromatinremodelling, Lysinmethylierung und Demethylierung und DNA-Methylierung eine Rolle spielen (Itahana *et al.* 2003; Gil and Peters 2006; Sparmann and van Lohuizen 2006; Vire *et al.* 2006; Bracken *et al.* 2007; Kotake *et al.* 2007; Kia *et al.* 2008; Agger *et al.* 2009). Um den dynamischen Wechsel der auftretenden Histonmodifikationen bei der Aktivierung oder Repression von Genen zu gewährleisten, ist die Existenz von Demethylasen unabdingbar. In den letzten Jahren wurden mehrere Lysin-Demethylasen entdeckt (Klose *et al.* 2006; Shi and Whetstone 2007). Mechanistische Untersuchungen haben gezeigt, dass die H3K4-Demethylase RBP2 mit PRC2 interagiert und durch die Entfernung der H3K4 Trimethylierung die H3K27 Trimethylierung begünstigt (Pasini *et al.* 2008). Interessanterweise wurde aber auch ein funktionelles Zusammenspiel zwischen dem MLL-Methyltransferase Komplex und den H3K27-Demethylasen UTX und JMJD3 beobachtet (Agger *et al.* 2007; De Santa *et al.* 2007). Diese Ergebnisse lassen auf einen Mechanismus schließen, bei dem die

koordinierte Regulation epigenetischer Markierungen durch das direkte funktionelle Zusammenspiel von Methyltransferasen und Demethylasen erreicht wird. Ob Argininmethylierung durch eine Demethylase Reaktion rückgängig gemacht werden kann, wird gegenwärtig in der Literatur kontrovers diskutiert. Die Transformation von ummethylierten oder monomethylierten Argininen zu Citrullin in einer Deiminationsreaktion wurde für die Peptidylarginin Deiminase PAD4 beschrieben (Thompson and Fast 2006). Zusätzlich wurde vermutet, dass die Demethylierung der Arginin-Dimethylierung von einer zweiten Enzymfamilie, der JmjC (*Jumonji domain-containing*) Proteine, die ursprünglich als Lysin-Demethylasen identifiziert wurden, katalysiert werden kann. Die Identifikation und Darstellung von JMJD6 als Demethylase für H3R2me2 und H4R3me3 (Chang *et al.* 2007) wurde allerdings in Zweifel gestellt, da andere Gruppen die gezeigte Aktivität nicht nachweisen konnten (Webby *et al.* 2009; Hahn *et al.* 2010). Es bleibt also wichtig herauszufinden, ob zusätzliche Enzyme für die Regulation der Argininmethylierung durch Demethylierung existieren. Außerdem stellt sich die Frage, ob PRMT6 zur Etablierung eines repressiven Zustandes, ähnlich wie PRC2, mit Lysin-Demethylasen kooperiert.

Weitere offene Fragen PRMT6 betreffend beziehen sich auf deren Regulation und Rekrutierung. Bisher ist nicht bekannt wie die katalytische Aktivität von PRMT6 reguliert wird. Frühere Untersuchungen in unserem Labor ergaben, dass PRMT6 sumoyliert werden kann. Die Findung in dieser Arbeit, dass PRMT6 mit dem PcG Protein CBX4 interagiert, das als E3-Ligase für Sumoylierung identifiziert wurde (Kagey *et al.* 2003), legt die Vermutung nahe, dass die PRMT6 Aktivität möglicherweise über Sumoylierung reguliert wird, ähnlich wie es auch für die DNA-Methyltransferase DNMT3A gezeigt wurde (Li *et al.* 2007). Eine weitere Möglichkeit zur Regulation der enzymatischen Aktivität wurde aufgrund der Dissoziationskonstanten (K_D) von PRMT6 in An- oder Abwesenheit von AdoMet bzw. AdoHcy vorgeschlagen. Diese Experimente zeigten, dass die Aktivität von PRMT6 aufgrund der Tatsache, dass PRMT6 mit höherer Affinität an *S-adenosyl-L-homocysteine* (AdoHcy) bindet als an *S-adenosyl-L-methionine* (AdoMet), in Zellen mit geringerem Methylierungspotential (ausgedrückt als Verhältnis von AdoMet zu AdoHcy) inhibiert wird, und wahrscheinlich durch Cofaktoren reguliert wird (Thomas *et al.* 2010). Hinsichtlich der Rekrutierung von PRMT6 können Hinweise aus dieser Arbeit gewonnen werden, die aber in weiterführenden Experimenten auf Richtigkeit überprüft werden müssen. Die Interaktionen von PRMT6 mit Histon- und Chromatin-bindenden Proteinen (RbAp46/48) oder Proteinkomplexen (PRC1/PRC2) könnten dafür sorgen, dass PRMT6 an spezifische Bereiche am Chromatin rekrutiert wird.

Genomweite Studien zur globalen Verteilung von PRMT6, aber auch zur Regulation der Transkription könnten dahingehend Aufschluss geben die Repressorfunktion von PRMT6 noch detaillierter zu verstehen und zusätzliche Hinweise bezüglich einer aktivierenden Rolle zu finden. Außerdem könnten diese Art von Studien die Kooperativität von PRMT6 und PcG Proteinen in differenzierten und undifferenzierten Zellen über die Regulation der *HOXA* Gene erweitern, aber auch unabhängige Regulationsmechanismen aufdecken.

6 ZUSAMMENFASSUNG

PRMT6 gehört zur Familie der Protein-Arginin-Methyltransferasen und wurde 2002 durch genomweite Suche nach neuen PRMT Mitgliedern anhand der konservierten katalytischen Domäne gefunden und als nukleär lokalisiertes Enzym identifiziert. Obwohl bereits einige Substrate von PRMT6 beschrieben wurden, ist über die genaue Funktion des Enzyms wenig bekannt. Die vorliegende Arbeit hatte zum Ziel neue Chromatinfunktionen von PRMT6 aufzudecken und zu charakterisieren.

In der vorliegenden Arbeit wurden zunächst das Vorkommen und die Relevanz der PRMT6-vermittelten H3R2 Dimethylierung *in vivo* nachgewiesen. Es wurde gezeigt, dass die H3R2 Dimethylierung durch PRMT6 die aktive Histonmodifikation H3K4me3 antagonisiert und darüber die Repression einiger *HOXA* Gene und c-Myc-Zielgene erreicht wird. In nachfolgenden Untersuchungen wurde der Antagonismus zwischen H3R2me2 und H3K4me3 am *HOXA2* Gen mechanistisch aufgeklärt. Die PRMT6-vermittelte H3R2 Dimethylierung inhibiert die H3K4 Trimethylierung, indem die Chromatinrekrutierung der Untereinheiten des H3K4-Methyltransferase Komplexes MLL1 und WDR5 verhindert wird. Es wurde gezeigt, dass die transkriptionelle Repression von *HOXA2* durch PRMT6 auch bei der neuronalen Differenzierung von NT2/D1 Zellen von Bedeutung ist.

Weitere Untersuchungen im Rahmen dieser Arbeit beschäftigten sich mit der Aufklärung einer potentiellen positiven Wechselwirkung zwischen PRMT6 und PcG Proteinen. Dabei wurde gefunden, dass PRMT6 mit PcG Proteinen interagiert und ähnlich wie die PcG Proteine zum Erhalt des spezifischen Expressionsmusters der *HOXA* Gene während der neuronalen Differenzierung beiträgt. Ähnlich wie die Depletion von PcG Proteinen führte die Depletion von PRMT6 zur Hyperaktivierung der anterior lokalisierten *HOXA* Gene und zur Derepression der posterior lokalisierten *HOXA* Gene nach Induktion der Differenzierung in NT2/D1 Zellen mit ATRA. Diese Fehlregulation der *HOXA* Gene als Folge der PRMT6 Depletion ging mit einem veränderten Histonmodifikationsmuster einher. PRMT6-defiziente Zellen wiesen eine Zunahme der aktiven Histonmodifikation H3K4me3 und einen Verlust der repressiven Histonmodifikation H3K27me3 auf. Zusammenfassend identifizieren diese Daten PRMT6 als transkriptionellen Repressor durch die Katalyse der H3R2 Dimethylierung. Diesem Repressionsmechanismus liegt die Wechselwirkung zwischen Histon-Argininmethylierung und Histon-Lysinmethylierung zugrunde.

Aufgrund der Tatsache, dass PcG Proteine durch direkte Regulation des *INK4B-ARF-INK4A* Locus mit der Regulation von Proliferation und Seneszenz in Verbindung gebracht werden, wurde im Folgenden untersucht, ob PRMT6 den *INK4B-ARF-INK4A* Locus ebenfalls reguliert. Der Verlust von PRMT6 in humanen diploiden Fibroblasten (TIG3-T) führte zu einem Proliferationsarrest, der durch

eine Akkumulation von G1-Phase Zellen gekennzeichnet war. Darüber hinaus resultierte die Depletion von PRMT6 in zellulärer Seneszenz, die durch die Aktivität von Seneszenz-assoziiierter β -Galaktosidase nachgewiesen wurde, und in einer Hochregulation der CDK-Inhibitoren *p16/INK4A* und *CDKN1A* (p21/CIP1). In Übereinstimmung damit führte eine Depletion von PRMT6 in Tumorzellen zur Reduktion des klonogenen Potentials. Zusammenfassend weisen diese Daten darauf hin, dass PRMT6 für die Proliferation von humanen diploiden Fibroblasten und Tumorzellen benötigt wird und durch transkriptionelle Regulation wichtiger Zellzyklusregulatoren Seneszenz inhibiert.

Abschließend wurde ein unvoreingenommener Ansatz zur Aufreinigung neuer Interaktionspartner von PRMT6 unter Verwendung von TAP (*Tandem Affinity Purification*)-markiertem PRMT6 etabliert. Die coaufgereinigten Interaktionspartner wurden mittels massenspektrometrischer Analyse identifiziert und mit Hilfe der Datenbank STRING sowie Literaturrecherche auf publizierte Zusammenhänge zwischen den möglichen Interaktionspartnern, Argininmethylierung und PRMT6 analysiert. Diese Ergebnisse können als Ausgangspunkt für die zukünftige Erforschung von PRMT6 dienen und zur Erweiterung des Verständnisses weiterer nukleärer Funktionen von PRMT6 beitragen.

7 SUMMARY

PRMT6 belongs to the enzyme family of protein arginine methyltransferases and was identified in 2002 by sequence homology search in the human genome using the conserved catalytic domain. The enzyme is predominantly localized in the nucleus. Although some PRMT6 substrates have been described, the precise function of this enzyme still remains elusive. The aim of this work was the identification and characterization of novel chromatin functions of PRMT6.

At first the *in vivo* existence and relevance of the H3R2 dimethylation catalyzed by PRMT6 was verified. It was shown that the PRMT6-mediated H3R2 dimethylation counteracts the active histone modification H3K4me3 and thereby represses the expression of a subset of *HOXA* genes and c-Myc target genes. In the following the underlying mechanism of this antagonism between H3R2me2 and H3K4me3 was uncovered at the *HOXA2* gene. PRMT6-mediated H3R2 dimethylation inhibits H3K4 trimethylation by preventing the chromatin recruitment of the components MLL1 and WDR5 of the H3K4 methyltransferase complex. This repressive function of PRMT6 was also found to be relevant for *HOXA2* gene expression during neuronal differentiation in the NT2/D1 cell model.

In the further course of this work a potential positive cross-talk between PRMT6 and polycomb group proteins was studied. PRMT6 was shown to interact with a subset of PcG proteins and similar to PcGs to be involved in the maintenance of the specific expression pattern of the entire *HOXA* gene locus during neuronal differentiation. Similar to the depletion of PcG proteins, depletion of PRMT6 was accompanied by hyperactivation of the anterior-localized *HOXA* genes and derepression of the posterior-localized *HOXA* genes following ATRA-induced differentiation of NT2/D1 cells. This deregulation of the *HOXA* genes upon loss of PRMT6 coincided with enhanced enrichment of the active histone modification H3K4me3 and decreased amounts of the repressive histone modification H3K27me3. In summary, these findings identify PRMT6 as a novel transcriptional repressor depending on its H3R2 methyltransferase activity and reveal as molecular mechanism of this repression a cross-talk between histone arginine methylation and lysine methylation.

Since PcG proteins have been linked to the regulation of proliferation and senescence by repressing the *INK4B-ARF-INK4A* locus, it was investigated next whether PRMT6 would similarly control the *INK4B-ARF-INK4A* expression. The loss of PRMT6 in human embryonic fibroblasts resulted in a proliferation block, which was characterized by an accumulation of G1-phase cells. Moreover, depletion of PRMT6 caused cellular senescence indicated by β -galactosidase positive cells and led to the upregulation of the CDK-inhibitors *p16/INK4A* as well as *CDKN1A* (p21/CIP1). In agreement with these results, the clonogenic growth potential of tumor cells was reduced in PRMT6-depleted cells. In conclusion, these data suggest that PRMT6 is necessary for the proliferation of both human diploid

fibroblasts and tumor cells and inhibits cellular senescence as indicated here by controlling the expression of important cell cycle regulators.

Finally, an unbiased screen for novel interaction partners of PRMT6 was established using overexpression of TAP (*tandem affinity purification*)-tagged PRMT6. Subsequent to affinity purification of exogenous PRMT6, co-purifying proteins were identified by mass spectrometry and analyzed by the database STRING and literature search to uncover published connections between the putative interactors, arginine methylation and PRMT6. These results will serve as a starting point for future research extending our knowledge on further nuclear functions of PRMT6.

8 LITERATURVERZEICHNIS

- Agger, K., P. A. Cloos, J. Christensen, D. Pasini, S. Rose, J. Rappsilber, I. Issaeva, E. Canaani, A. E. Salcini and K. Helin (2007) UTX and JMJD3 are histone H3K27 demethylases involved in HOX gene regulation and development. *Nature*. **449**, 731-4.
- Agger, K., P. A. Cloos, L. Rudkjaer, K. Williams, G. Andersen, J. Christensen and K. Helin (2009) The H3K27me3 demethylase JMJD3 contributes to the activation of the INK4A-ARF locus in response to oncogene- and stress-induced senescence. *Genes Dev*. **23**, 1171-6.
- Agherbi, H., A. Gaussmann-Wenger, C. Verthuy, L. Chasson, M. Serrano and M. Djabali (2009) Polycomb mediated epigenetic silencing and replication timing at the INK4a/ARF locus during senescence. *PLoS One*. **4**, e5622.
- Andrews, P. W. (1984) Retinoic acid induces neuronal differentiation of a cloned human embryonal carcinoma cell line in vitro. *Dev Biol*. **103**, 285-93.
- Andrews, P. W. (1998) Teratocarcinomas and human embryology: pluripotent human EC cell lines. Review article. *APMIS*. **106**, 158-67; discussion 167-8.
- Andrews, P. W., I. Damjanov, D. Simon, G. S. Banting, C. Carlin, N. C. Dracopoli and J. Fogh (1984) Pluripotent embryonal carcinoma clones derived from the human teratocarcinoma cell line Tera-2. Differentiation in vivo and in vitro. *Lab Invest*. **50**, 147-62.
- Barber, B. A. and M. Rastegar (2010) Epigenetic control of Hox genes during neurogenesis, development, and disease. *Ann Anat*. **192**, 261-74.
- Barski, A., S. Cuddapah, K. Cui, T. Y. Roh, D. E. Schones, Z. Wang, G. Wei, I. Chepelev and K. Zhao (2007) High-resolution profiling of histone methylations in the human genome. *Cell*. **129**, 823-37.
- Bauer, U. M., S. Daujat, S. J. Nielsen, K. Nightingale and T. Kouzarides (2002) Methylation at arginine 17 of histone H3 is linked to gene activation. *EMBO Rep*. **3**, 39-44.
- Beausejour, C. M., A. Krtolica, F. Galimi, M. Narita, S. W. Lowe, P. Yaswen and J. Campisi (2003) Reversal of human cellular senescence: roles of the p53 and p16 pathways. *EMBO J*. **22**, 4212-22.
- Bedford, M. T. and S. G. Clarke (2009) Protein arginine methylation in mammals: who, what, and why. *Mol Cell*. **33**, 1-13.
- Bedford, M. T. and S. Richard (2005) Arginine methylation an emerging regulator of protein function. *Mol Cell*. **18**, 263-72.
- Ben-Porath, I. and R. A. Weinberg (2005) The signals and pathways activating cellular senescence. *Int J Biochem Cell Biol*. **37**, 961-76.
- Bernstein, B. E., M. Kamal, K. Lindblad-Toh, S. Bekiranov, D. K. Bailey, D. J. Huebert, S. McMahon, E. K. Karlsson, E. J. Kulbokas, 3rd, T. R. Gingeras, S. L. Schreiber and E. S. Lander (2005) Genomic maps and comparative analysis of histone modifications in human and mouse. *Cell*. **120**, 169-81.

- Bernstein, B. E., T. S. Mikkelsen, X. Xie, M. Kamal, D. J. Huebert, J. Cuff, B. Fry, A. Meissner, M. Wernig, K. Plath, R. Jaenisch, A. Wagschal, R. Feil, S. L. Schreiber and E. S. Lander (2006a) A bivalent chromatin structure marks key developmental genes in embryonic stem cells. *Cell*. **125**, 315-26.
- Bernstein, E., E. M. Duncan, O. Masui, J. Gil, E. Heard and C. D. Allis (2006b) Mouse polycomb proteins bind differentially to methylated histone H3 and RNA and are enriched in facultative heterochromatin. *Mol Cell Biol*. **26**, 2560-9.
- Boisvert, F. M., J. Cote, M. C. Boulanger and S. Richard (2003) A proteomic analysis of arginine-methylated protein complexes. *Mol Cell Proteomics*. **2**, 1319-30.
- Boulanger, M. C., C. Liang, R. S. Russell, R. Lin, M. T. Bedford, M. A. Wainberg and S. Richard (2005) Methylation of Tat by PRMT6 regulates human immunodeficiency virus type 1 gene expression. *J Virol*. **79**, 124-31.
- Boulanger, M. C., T. B. Miranda, S. Clarke, M. Di Fruscio, B. Suter, P. Lasko and S. Richard (2004) Characterization of the Drosophila protein arginine methyltransferases DART1 and DART4. *Biochem J*. **379**, 283-9.
- Bracken, A. P., N. Dietrich, D. Pasini, K. H. Hansen and K. Helin (2006) Genome-wide mapping of Polycomb target genes unravels their roles in cell fate transitions. *Genes Dev*. **20**, 1123-36.
- Bracken, A. P., D. Kleine-Kohlbrecher, N. Dietrich, D. Pasini, G. Gargiulo, C. Beekman, K. Theilgaard-Monch, S. Minucci, B. T. Porse, J. C. Marine, K. H. Hansen and K. Helin (2007) The Polycomb group proteins bind throughout the INK4A-ARF locus and are disassociated in senescent cells. *Genes Dev*. **21**, 525-30.
- Bracken, A. P., D. Pasini, M. Capra, E. Prosperini, E. Colli and K. Helin (2003) EZH2 is downstream of the pRB-E2F pathway, essential for proliferation and amplified in cancer. *EMBO J*. **22**, 5323-35.
- Bradford, M. M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*. **72**, 248-54.
- Brummelkamp, T. R., R. Bernards and R. Agami (2002) Stable suppression of tumorigenicity by virus-mediated RNA interference. *Cancer Cell*. **2**, 243-7.
- Buchwald, G., P. van der Stoop, O. Weichenrieder, A. Perrakis, M. van Lohuizen and T. K. Sixma (2006) Structure and E3-ligase activity of the Ring-Ring complex of polycomb proteins Bmi1 and Ring1b. *EMBO J*. **25**, 2465-74.
- Buschbeck, M., I. Uribealago, I. Wibowo, P. Rue, D. Martin, A. Gutierrez, L. Morey, R. Guigo, H. Lopez-Schier and L. Di Croce (2009) The histone variant macroH2A is an epigenetic regulator of key developmental genes. *Nat Struct Mol Biol*. **16**, 1074-9.
- Campisi, J. and F. d'Adda di Fagagna (2007) Cellular senescence: when bad things happen to good cells. *Nat Rev Mol Cell Biol*. **8**, 729-40.
- Cantile, M., G. Pettinato, A. Procino, I. Feliciello, L. Cindolo and C. Cillo (2003) In vivo expression of the whole HOX gene network in human breast cancer. *Eur J Cancer*. **39**, 257-64.
- Cao, R., H. Wang, J. He, H. Erdjument-Bromage, P. Tempst and Y. Zhang (2008) Role of hPHF1 in H3K27 methylation and Hox gene silencing. *Mol Cell Biol*. **28**, 1862-72.

LITERATURVERZEICHNIS

- Cao, R., L. Wang, H. Wang, L. Xia, H. Erdjument-Bromage, P. Tempst, R. S. Jones and Y. Zhang (2002) Role of histone H3 lysine 27 methylation in Polycomb-group silencing. *Science*. **298**, 1039-43.
- Cao, R. and Y. Zhang (2004) The functions of E(Z)/EZH2-mediated methylation of lysine 27 in histone H3. *Curr Opin Genet Dev*. **14**, 155-64.
- Chang, B., Y. Chen, Y. Zhao and R. K. Bruick (2007) JMJD6 is a histone arginine demethylase. *Science*. **318**, 444-7.
- Chen, C. and H. Okayama (1987) High-efficiency transformation of mammalian cells by plasmid DNA. *Mol Cell Biol*. **7**, 2745-52.
- Chen, D., H. Ma, H. Hong, S. S. Koh, S. M. Huang, B. T. Schurter, D. W. Aswad and M. R. Stallcup (1999) Regulation of transcription by a protein methyltransferase. *Science*. **284**, 2174-7.
- Chen, J., X. Huang, D. Halicka, S. Brodsky, A. Avram, J. Eskander, N. A. Bloomgarden, Z. Darzynkiewicz and M. S. Goligorsky (2006) Contribution of p16INK4a and p21CIP1 pathways to induction of premature senescence of human endothelial cells: permissive role of p53. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. **290**, H1575-86.
- Cheng, D., N. Yadav, R. W. King, M. S. Swanson, E. J. Weinstein and M. T. Bedford (2004) Small molecule regulators of protein arginine methyltransferases. *J Biol Chem*. **279**, 23892-9.
- Cho, Y. W., T. Hong, S. Hong, H. Guo, H. Yu, D. Kim, T. Guszczynski, G. R. Dressler, T. D. Copeland, M. Kalkum and K. Ge (2007) PTIP associates with MLL3- and MLL4-containing histone H3 lysine 4 methyltransferase complex. *J Biol Chem*. **282**, 20395-406.
- Chu, M. C., F. B. Selam and H. S. Taylor (2004) HOXA10 regulates p53 expression and matrigel invasion in human breast cancer cells. *Cancer Biol Ther*. **3**, 568-72.
- Cillo, C., P. Barba, G. Freschi, G. Bucciarelli, M. C. Magli and E. Boncinelli (1992) HOX gene expression in normal and neoplastic human kidney. *Int J Cancer*. **51**, 892-7.
- Cillo, C., A. Faiella, M. Cantile and E. Boncinelli (1999) Homeobox genes and cancer. *Exp Cell Res*. **248**, 1-9.
- Cook, J. R., J. H. Lee, Z. H. Yang, C. D. Krause, N. Herth, R. Hoffmann and S. Pestka (2006) FBXO11/PRMT9, a new protein arginine methyltransferase, symmetrically dimethylates arginine residues. *Biochem Biophys Res Commun*. **342**, 472-81.
- Couture, J. F., E. Collazo and R. C. Trievel (2006) Molecular recognition of histone H3 by the WD40 protein WDR5. *Nat Struct Mol Biol*. **13**, 698-703.
- Cuthbert, G. L., S. Daujat, A. W. Snowden, H. Erdjument-Bromage, T. Hagiwara, M. Yamada, R. Schneider, P. D. Gregory, P. Tempst, A. J. Bannister and T. Kouzarides (2004) Histone deimination antagonizes arginine methylation. *Cell*. **118**, 545-53.
- Dang, C. V., A. Le and P. Gao (2009) MYC-induced cancer cell energy metabolism and therapeutic opportunities. *Clin Cancer Res*. **15**, 6479-83.
- Daujat, S., U. M. Bauer, V. Shah, B. Turner, S. Berger and T. Kouzarides (2002) Crosstalk between CARM1 methylation and CBP acetylation on histone H3. *Curr Biol*. **12**, 2090-7.

- De Santa, F., M. G. Totaro, E. Prosperini, S. Notarbartolo, G. Testa and G. Natoli (2007) The histone H3 lysine-27 demethylase Jmjd3 links inflammation to inhibition of polycomb-mediated gene silencing. *Cell*. **130**, 1083-94.
- De Vita, G., P. Barba, N. Odartchenko, J. C. Givel, G. Freschi, G. Bucciarelli, M. C. Magli, E. Boncinelli and C. Cillo (1993) Expression of homeobox-containing genes in primary and metastatic colorectal cancer. *Eur J Cancer*. **29A**, 887-93.
- Deschamps, J. and J. van Nes (2005) Developmental regulation of the Hox genes during axial morphogenesis in the mouse. *Development*. **132**, 2931-42.
- Dietrich, N., A. P. Bracken, E. Trinh, C. K. Schjerling, H. Koseki, J. Rappsilber, K. Helin and K. H. Hansen (2007) Bypass of senescence by the polycomb group protein CBX8 through direct binding to the INK4A-ARF locus. *EMBO J*. **26**, 1637-48.
- Dimri, G. P. (2005) What has senescence got to do with cancer? *Cancer Cell*. **7**, 505-12.
- Dimri, G. P., X. Lee, G. Basile, M. Acosta, G. Scott, C. Roskelley, E. E. Medrano, M. Linskens, I. Rubelj, O. Pereira-Smith and et al. (1995) A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **92**, 9363-7.
- Dotto, G. P. (2000) p21(WAF1/Cip1): more than a break to the cell cycle? *Biochim Biophys Acta*. **1471**, M43-56.
- Dou, Y., T. A. Milne, A. J. Ruthenburg, S. Lee, J. W. Lee, G. L. Verdine, C. D. Allis and R. G. Roeder (2006) Regulation of MLL1 H3K4 methyltransferase activity by its core components. *Nat Struct Mol Biol*. **13**, 713-9.
- Dou, Y., T. A. Milne, A. J. Tackett, E. R. Smith, A. Fukuda, J. Wysocka, C. D. Allis, B. T. Chait, J. L. Hess and R. G. Roeder (2005) Physical association and coordinate function of the H3 K4 methyltransferase MLL1 and the H4 K16 acetyltransferase MOF. *Cell*. **121**, 873-85.
- Dupe, V., M. Davenne, J. Brocard, P. Dolle, M. Mark, A. Dierich, P. Chambon and F. M. Rijli (1997) In vivo functional analysis of the Hoxa-1 3' retinoic acid response element (3'RARE). *Development*. **124**, 399-410.
- Eissenberg, J. C. and A. Shilatifard (2010) Histone H3 lysine 4 (H3K4) methylation in development and differentiation. *Dev Biol*. **339**, 240-9.
- El-Andaloussi, N., T. Valovka, M. Toueille, R. Steinacher, F. Focke, P. Gehrig, M. Covic, P. O. Hassa, P. Schar, U. Hubscher and M. O. Hottiger (2006) Arginine methylation regulates DNA polymerase beta. *Mol Cell*. **22**, 51-62.
- Fabrizio, E., S. El Messaoudi, J. Polanowska, C. Paul, J. R. Cook, J. H. Lee, V. Negre, M. Rousset, S. Pestka, A. Le Cam and C. Sardet (2002) Negative regulation of transcription by the type II arginine methyltransferase PRMT5. *EMBO Rep*. **3**, 641-5.
- Feng, Q., B. He, S. Y. Jung, Y. Song, J. Qin, S. Y. Tsai, M. J. Tsai and B. W. O'Malley (2009) Biochemical control of CARM1 enzymatic activity by phosphorylation. *J Biol Chem*. **284**, 36167-74.
- Fisk, J. C., C. Zurita-Lopez, J. Sayegh, D. L. Tomasello, S. G. Clarke and L. K. Read (2010) TbPRMT6 is a type I protein arginine methyltransferase that contributes to cytokinesis in *Trypanosoma brucei*. *Eukaryot Cell*. **9**, 866-77.

- Flanagan, J. F., L. Z. Mi, M. Chruszcz, M. Cymborowski, K. L. Clines, Y. Kim, W. Minor, F. Rastinejad and S. Khorasanizadeh (2005) Double chromodomains cooperate to recognize the methylated histone H3 tail. *Nature*. **438**, 1181-5.
- Frankel, A., N. Yadav, J. Lee, T. L. Branscombe, S. Clarke and M. T. Bedford (2002) The novel human protein arginine N-methyltransferase PRMT6 is a nuclear enzyme displaying unique substrate specificity. *J Biol Chem*. **277**, 3537-43.
- Fullerton, S. W., M. Blaschke, B. Coutard, J. Gebhardt, A. Gorbalenya, B. Canard, P. A. Tucker and J. Rohayem (2007) Structural and functional characterization of sapovirus RNA-dependent RNA polymerase. *J Virol*. **81**, 1858-71.
- Gary, J. D. and S. Clarke (1998) RNA and protein interactions modulated by protein arginine methylation. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol*. **61**, 65-131.
- Gil, J. and G. Peters (2006) Regulation of the INK4b-ARF-INK4a tumour suppressor locus: all for one or one for all. *Nat Rev Mol Cell Biol*. **7**, 667-77.
- Gillespie, R. F. and L. J. Gudas (2007) Retinoid regulated association of transcriptional co-regulators and the polycomb group protein SUZ12 with the retinoic acid response elements of Hoxa1, RARbeta(2), and Cyp26A1 in F9 embryonal carcinoma cells. *J Mol Biol*. **372**, 298-316.
- Grignani, F., T. Kinsella, A. Mencarelli, M. Valtieri, D. Riganelli, L. Lanfrancone, C. Peschle, G. P. Nolan and P. G. Pelicci (1998) High-efficiency gene transfer and selection of human hematopoietic progenitor cells with a hybrid EBV/retroviral vector expressing the green fluorescence protein. *Cancer Res*. **58**, 14-9.
- Grinstein, E. and P. Wernet (2007) Cellular signaling in normal and cancerous stem cells. *Cell Signal*. **19**, 2428-33.
- Guccione, E., C. Bassi, F. Casadio, F. Martinato, M. Cesaroni, H. Schuchlantz, B. Luscher and B. Amati (2007) Methylation of histone H3R2 by PRMT6 and H3K4 by an MLL complex are mutually exclusive. *Nature*. **449**, 933-7.
- Guccione, E., F. Martinato, G. Finocchiaro, L. Luzi, L. Tizzoni, V. Dall' Olio, G. Zardo, C. Nervi, L. Bernard and B. Amati (2006) Myc-binding-site recognition in the human genome is determined by chromatin context. *Nat Cell Biol*. **8**, 764-70.
- Guenther, M. G., R. G. Jenner, B. Chevalier, T. Nakamura, C. M. Croce, E. Canaani and R. A. Young (2005) Global and Hox-specific roles for the MLL1 methyltransferase. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **102**, 8603-8.
- Guney, I. and J. M. Sedivy (2006) Cellular senescence, epigenetic switches and c-Myc. *Cell Cycle*. **5**, 2319-23.
- Hahn, P., I. Wegener, A. Burrells, J. Bose, A. Wolf, C. Erck, D. Butler, C. J. Schofield, A. Bottger and A. Lengeling (2010) Analysis of Jmjd6 cellular localization and testing for its involvement in histone demethylation. *PLoS One*. **5**, e13769.
- Han, Z., L. Guo, H. Wang, Y. Shen, X. W. Deng and J. Chai (2006) Structural basis for the specific recognition of methylated histone H3 lysine 4 by the WD-40 protein WDR5. *Mol Cell*. **22**, 137-44.
- Harrison, M. J., Y. H. Tang and D. H. Dowhan (2010) Protein arginine methyltransferase 6 regulates multiple aspects of gene expression. *Nucleic Acids Res*. **38**, 2201-16.

- Hayflick, L. (1965) The Limited in Vitro Lifetime of Human Diploid Cell Strains. *Exp Cell Res.* **37**, 614-36.
- Hayflick, L. and P. S. Moorhead (1961) The serial cultivation of human diploid cell strains. *Exp Cell Res.* **25**, 585-621.
- Heard, E. (2005) Delving into the diversity of facultative heterochromatin: the epigenetics of the inactive X chromosome. *Curr Opin Genet Dev.* **15**, 482-9.
- Herbig, U., W. A. Jobling, B. P. Chen, D. J. Chen and J. M. Sedivy (2004) Telomere shortening triggers senescence of human cells through a pathway involving ATM, p53, and p21(CIP1), but not p16(INK4a). *Mol Cell.* **14**, 501-13.
- Hieronimus, H. and P. A. Silver (2004) A systems view of mRNP biology. *Genes Dev.* **18**, 2845-60.
- Higashimoto, K., P. Kuhn, D. Desai, X. Cheng and W. Xu (2007) Phosphorylation-mediated inactivation of coactivator-associated arginine methyltransferase 1. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **104**, 12318-23.
- Holbert, M. A. and R. Marmorstein (2005) Structure and activity of enzymes that remove histone modifications. *Curr Opin Struct Biol.* **15**, 673-80.
- Hong, S., Y. W. Cho, L. R. Yu, H. Yu, T. D. Veenstra and K. Ge (2007) Identification of JmjC domain-containing UTX and JMJD3 as histone H3 lysine 27 demethylases. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **104**, 18439-44.
- Houldsworth, J., S. C. Heath, G. J. Bosl, L. Studer and R. S. Chaganti (2002) Expression profiling of lineage differentiation in pluripotential human embryonal carcinoma cells. *Cell Growth Differ.* **13**, 257-64.
- Hsieh, J. J., P. Ernst, H. Erdjument-Bromage, P. Tempst and S. J. Korsmeyer (2003) Proteolytic cleavage of MLL generates a complex of N- and C-terminal fragments that confers protein stability and subnuclear localization. *Mol Cell Biol.* **23**, 186-94.
- Hughes, C. M., O. Rozenblatt-Rosen, T. A. Milne, T. D. Copeland, S. S. Levine, J. C. Lee, D. N. Hayes, K. S. Shanmugam, A. Bhattacharjee, C. A. Biondi, G. F. Kay, N. K. Hayward, J. L. Hess and M. Meyerson (2004) Menin associates with a trithorax family histone methyltransferase complex and with the hoxc8 locus. *Mol Cell.* **13**, 587-97.
- Hung, C. M. and C. Li (2004) Identification and phylogenetic analyses of the protein arginine methyltransferase gene family in fish and ascidians. *Gene.* **340**, 179-87.
- Hyllus, D., C. Stein, K. Schnabel, E. Schiltz, A. Imhof, Y. Dou, J. Hsieh and U. M. Bauer (2007) PRMT6-mediated methylation of R2 in histone H3 antagonizes H3 K4 trimethylation. *Genes Dev.* **21**, 3369-80.
- Iberg, A. N., A. Espejo, D. Cheng, D. Kim, J. Michaud-Levesque, S. Richard and M. T. Bedford (2008) Arginine methylation of the histone H3 tail impedes effector binding. *J Biol Chem.* **283**, 3006-10.
- Imhof, A. and P. B. Becker (2001) Modifications of the histone N-terminal domains. Evidence for an "epigenetic code"? *Mol Biotechnol.* **17**, 1-13.
- Invernizzi, C. F., B. Xie, F. A. Frankel, M. Feldhammer, B. B. Roy, S. Richard and M. A. Wainberg (2007) Arginine methylation of the HIV-1 nucleocapsid protein results in its diminished function. *AIDS.* **21**, 795-805.

- Invernizzi, C. F., B. Xie, S. Richard and M. A. Wainberg (2006) PRMT6 diminishes HIV-1 Rev binding to and export of viral RNA. *Retrovirology*. **3**, 93.
- Isono, K., Y. Fujimura, J. Shinga, M. Yamaki, O. W. J, Y. Takihara, Y. Murahashi, Y. Takada, Y. Mizutani-Koseki and H. Koseki (2005) Mammalian polyhomeotic homologues Phc2 and Phc1 act in synergy to mediate polycomb repression of Hox genes. *Mol Cell Biol*. **25**, 6694-706.
- Issaeva, I., Y. Zonis, T. Rozovskaia, K. Orlovsky, C. M. Croce, T. Nakamura, A. Mazo, L. Eisenbach and E. Canaani (2007) Knockdown of ALR (MLL2) reveals ALR target genes and leads to alterations in cell adhesion and growth. *Mol Cell Biol*. **27**, 1889-903.
- Itahana, K., J. Campisi and G. P. Dimri (2004) Mechanisms of cellular senescence in human and mouse cells. *Biogerontology*. **5**, 1-10.
- Itahana, K., J. Campisi and G. P. Dimri (2007) Methods to detect biomarkers of cellular senescence: the senescence-associated beta-galactosidase assay. *Methods Mol Biol*. **371**, 21-31.
- Itahana, K., G. Dimri and J. Campisi (2001) Regulation of cellular senescence by p53. *Eur J Biochem*. **268**, 2784-91.
- Itahana, K., Y. Zou, Y. Itahana, J. L. Martinez, C. Beausejour, J. J. Jacobs, M. Van Lohuizen, V. Band, J. Campisi and G. P. Dimri (2003) Control of the replicative life span of human fibroblasts by p16 and the polycomb protein Bmi-1. *Mol Cell Biol*. **23**, 389-401.
- Jacobs, J. J., K. Kieboom, S. Marino, R. A. DePinho and M. van Lohuizen (1999) The oncogene and Polycomb-group gene bmi-1 regulates cell proliferation and senescence through the ink4a locus. *Nature*. **397**, 164-8.
- Jelinic, P., J. C. Stehle and P. Shaw (2006) The testis-specific factor CTCFL cooperates with the protein methyltransferase PRMT7 in H19 imprinting control region methylation. *PLoS Biol*. **4**, e355.
- Jenuwein, T. and C. D. Allis (2001) Translating the histone code. *Science*. **293**, 1074-80.
- Jenuwein, T., G. Laible, R. Dorn and G. Reuter (1998) SET domain proteins modulate chromatin domains in eu- and heterochromatin. *Cell Mol Life Sci*. **54**, 80-93.
- Jobert, L., M. Argentini and L. Tora (2009) PRMT1 mediated methylation of TAF15 is required for its positive gene regulatory function. *Exp Cell Res*. **315**, 1273-86.
- Jones, P. A. and S. B. Baylin (2007) The epigenomics of cancer. *Cell*. **128**, 683-92.
- Kagey, M. H., T. A. Melhuish and D. Wotton (2003) The polycomb protein Pc2 is a SUMO E3. *Cell*. **113**, 127-37.
- Kaustov, L., H. Quyang, M. Amaya, A. Lemak, N. Nady, S. Duan, G. Wasney, Z. Li, M. Vedadi, M. Schapira, J. Min and C. H. Arrowsmith (2010) Recognition and specificity determinants of the human Cbx chromodomains. *J Biol Chem*.
- Keefe, A. D., D. S. Wilson, B. Seelig and J. W. Szostak (2001) One-step purification of recombinant proteins using a nanomolar-affinity streptavidin-binding peptide, the SBP-Tag. *Protein Expr Purif*. **23**, 440-6.
- Keren-Paz, A., Z. Bercovich and C. Kahana (2007) Antizyme inhibitor: a defective ornithine decarboxylase or a physiological regulator of polyamine biosynthesis and cellular proliferation. *Biochem Soc Trans*. **35**, 311-3.

- Kerppola, T. K. (2009) Polycomb group complexes--many combinations, many functions. *Trends Cell Biol.* **19**, 692-704.
- Kia, S. K., M. M. Gorski, S. Giannakopoulos and C. P. Verrijzer (2008) SWI/SNF mediates polycomb eviction and epigenetic reprogramming of the INK4b-ARF-INK4a locus. *Mol Cell Biol.* **28**, 3457-64.
- Kirmizis, A., H. Santos-Rosa, C. J. Penkett, M. A. Singer, M. Vermeulen, M. Mann, J. Bahler, R. D. Green and T. Kouzarides (2007) Arginine methylation at histone H3R2 controls deposition of H3K4 trimethylation. *Nature.* **449**, 928-32.
- Klose, R. J., E. M. Kallin and Y. Zhang (2006) JmjC-domain-containing proteins and histone demethylation. *Nat Rev Genet.* **7**, 715-27.
- Klose, R. J., Q. Yan, Z. Tothova, K. Yamane, H. Erdjument-Bromage, P. Tempst, D. G. Gilliland, Y. Zhang and W. G. Kaelin, Jr. (2007) The retinoblastoma binding protein RBP2 is an H3K4 demethylase. *Cell.* **128**, 889-900.
- Klose, R. J. and Y. Zhang (2007) Regulation of histone methylation by demethylination and demethylation. *Nat Rev Mol Cell Biol.* **8**, 307-18.
- Kmita, M. and D. Duboule (2003) Organizing axes in time and space; 25 years of colinear tinkering. *Science.* **301**, 331-3.
- Kolbel, K., C. Ihling, K. Bellmann-Sickert, I. Neundorf, A. G. Beck-Sickinger, A. Sinz, U. Kuhn and E. Wahle (2009) Type I Arginine Methyltransferases PRMT1 and PRMT-3 Act Distributively. *J Biol Chem.* **284**, 8274-82.
- Kotake, Y., R. Cao, P. Viatour, J. Sage, Y. Zhang and Y. Xiong (2007) pRB family proteins are required for H3K27 trimethylation and Polycomb repression complexes binding to and silencing p16INK4alpha tumor suppressor gene. *Genes Dev.* **21**, 49-54.
- Kotake, Y., Y. Zeng and Y. Xiong (2009) DDB1-CUL4 and MLL1 mediate oncogene-induced p16INK4a activation. *Cancer Res.* **69**, 1809-14.
- Krause, C. D., Z. H. Yang, Y. S. Kim, J. H. Lee, J. R. Cook and S. Pestka (2007) Protein arginine methyltransferases: evolution and assessment of their pharmacological and therapeutic potential. *Pharmacol Ther.* **113**, 50-87.
- Kuzmichev, A., K. Nishioka, H. Erdjument-Bromage, P. Tempst and D. Reinberg (2002) Histone methyltransferase activity associated with a human multiprotein complex containing the Enhancer of Zeste protein. *Genes Dev.* **16**, 2893-905.
- Laemmli, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* **227**, 680-5.
- Lakowski, T. M. and A. Frankel (2008) A kinetic study of human protein arginine N-methyltransferase 6 reveals a distributive mechanism. *J Biol Chem.* **283**, 10015-25.
- Lan, F., P. E. Bayliss, J. L. Rinn, J. R. Whetstone, J. K. Wang, S. Chen, S. Iwase, R. Alpatov, I. Issaeva, E. Canaani, T. M. Roberts, H. Y. Chang and Y. Shi (2007) A histone H3 lysine 27 demethylase regulates animal posterior development. *Nature.* **449**, 689-94.
- Latham, J. A. and S. Y. Dent (2007) Cross-regulation of histone modifications. *Nat Struct Mol Biol.* **14**, 1017-1024.

LITERATURVERZEICHNIS

- Lee, J., J. Sayegh, J. Daniel, S. Clarke and M. T. Bedford (2005a) PRMT8, a new membrane-bound tissue-specific member of the protein arginine methyltransferase family. *J Biol Chem.* **280**, 32890-6.
- Lee, J. and P. Zhou (2007) DCAFs, the missing link of the CUL4-DDB1 ubiquitin ligase. *Mol Cell.* **26**, 775-80.
- Lee, J. H., J. R. Cook, Z. H. Yang, O. Mirochnitchenko, S. I. Gunderson, A. M. Felix, N. Herth, R. Hoffmann and S. Pestka (2005b) PRMT7, a new protein arginine methyltransferase that synthesizes symmetric dimethylarginine. *J Biol Chem.* **280**, 3656-64.
- Lee, M. G., R. Villa, P. Trojer, J. Norman, K. P. Yan, D. Reinberg, L. Di Croce and R. Shiekhattar (2007) Demethylation of H3K27 regulates polycomb recruitment and H2A ubiquitination. *Science.* **318**, 447-50.
- Lee, M. G., C. Wynder, N. Cooch and R. Shiekhattar (2005c) An essential role for CoREST in nucleosomal histone 3 lysine 4 demethylation. *Nature.* **437**, 432-5.
- Lee, V. M. and P. W. Andrews (1986) Differentiation of NTERA-2 clonal human embryonal carcinoma cells into neurons involves the induction of all three neurofilament proteins. *J Neurosci.* **6**, 514-21.
- Lee, Y. H. and M. R. Stallcup (2009) Minireview: protein arginine methylation of nonhistone proteins in transcriptional regulation. *Mol Endocrinol.* **23**, 425-33.
- Levine, S. S., A. Weiss, H. Erdjument-Bromage, Z. Shao, P. Tempst and R. E. Kingston (2002) The core of the polycomb repressive complex is compositionally and functionally conserved in flies and humans. *Mol Cell Biol.* **22**, 6070-8.
- Li, B., J. Zhou, P. Liu, J. Hu, H. Jin, Y. Shimono, M. Takahashi and G. Xu (2007) Polycomb protein Cbx4 promotes SUMO modification of de novo DNA methyltransferase Dnmt3a. *Biochem J.* **405**, 369-78.
- Li, G., R. Margueron, M. Ku, P. Chambon, B. E. Bernstein and D. Reinberg Jarid2 and PRC2, partners in regulating gene expression. *Genes Dev.* **24**, 368-80.
- Liao, D. J. and R. B. Dickson (2000) c-Myc in breast cancer. *Endocr Relat Cancer.* **7**, 143-64.
- Lim, Y., E. Lee, J. Lee, S. Oh and S. Kim (2008) Down-regulation of asymmetric arginine methylation during replicative and H₂O₂-induced premature senescence in WI-38 human diploid fibroblasts. *J Biochem.* **144**, 523-9.
- Lin, W. J., J. D. Gary, M. C. Yang, S. Clarke and H. R. Herschman (1996) The mammalian immediate-early TIS21 protein and the leukemia-associated BTG1 protein interact with a protein-arginine N-methyltransferase. *J Biol Chem.* **271**, 15034-44.
- Liu, C., F. Lu, X. Cui and X. Cao (2010) Histone methylation in higher plants. *Annu Rev Plant Biol.* **61**, 395-420.
- Liu, L., L. G. Andrews and T. O. Tollefsbol (2006) Loss of the human polycomb group protein BMI1 promotes cancer-specific cell death. *Oncogene.* **25**, 4370-5.
- Livak, K. J. and T. D. Schmittgen (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{-ΔΔC_T} Method. *Methods.* **25**, 402-8.

- Loyola, A. and G. Almouzni (2004) Histone chaperones, a supporting role in the limelight. *Biochim Biophys Acta*. **1677**, 3-11.
- Loyter, A., G. Scangos, D. Juricek, D. Keene and F. H. Ruddle (1982) Mechanisms of DNA entry into mammalian cells. II. Phagocytosis of calcium phosphate DNA co-precipitate visualized by electron microscopy. *Exp Cell Res*. **139**, 223-34.
- Ma, H., C. T. Baumann, H. Li, B. D. Strahl, R. Rice, M. A. Jelinek, D. W. Aswad, C. D. Allis, G. L. Hager and M. R. Stallcup (2001) Hormone-dependent, CARM1-directed, arginine-specific methylation of histone H3 on a steroid-regulated promoter. *Curr Biol*. **11**, 1981-5.
- Maertens, G. N., S. El Messaoudi-Aubert, S. Elderkin, K. Hiom and G. Peters (2010) Ubiquitin-specific proteases 7 and 11 modulate Polycomb regulation of the INK4a tumour suppressor. *EMBO J*. **29**, 2553-65.
- Margueron, R., G. Li, K. Sarma, A. Blais, J. Zavadil, C. L. Woodcock, B. D. Dynlacht and D. Reinberg (2008) Ezh1 and Ezh2 maintain repressive chromatin through different mechanisms. *Mol Cell*. **32**, 503-18.
- Martin, C. and Y. Zhang (2005) The diverse functions of histone lysine methylation. *Nat Rev Mol Cell Biol*. **6**, 838-49.
- Martinato, F., M. Cesaroni, B. Amati and E. Guccione (2008) Analysis of Myc-induced histone modifications on target chromatin. *PLoS One*. **3**, e3650.
- Martinez, A. M. and G. Cavalli (2006) The role of polycomb group proteins in cell cycle regulation during development. *Cell Cycle*. **5**, 1189-97.
- Michaud-Levesque, J. and S. Richard (2009) Thrombospondin-1 is a transcriptional repression target of PRMT6. *J Biol Chem*. **284**, 21338-46.
- Mikkelsen, T. S., M. Ku, D. B. Jaffe, B. Issac, E. Lieberman, G. Giannoukos, P. Alvarez, W. Brockman, T. K. Kim, R. P. Koche, W. Lee, E. Mendenhall, A. O'Donovan, A. Presser, C. Russ, X. Xie, A. Meissner, M. Wernig, R. Jaenisch, C. Nusbaum, E. S. Lander and B. E. Bernstein (2007) Genome-wide maps of chromatin state in pluripotent and lineage-committed cells. *Nature*. **448**, 553-60.
- Miller, T., N. J. Krogan, J. Dover, H. Erdjument-Bromage, P. Tempst, M. Johnston, J. F. Greenblatt and A. Shilatifard (2001) COMPASS: a complex of proteins associated with a trithorax-related SET domain protein. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **98**, 12902-7.
- Milne, T. A., S. D. Briggs, H. W. Brock, M. E. Martin, D. Gibbs, C. D. Allis and J. L. Hess (2002) MLL targets SET domain methyltransferase activity to Hox gene promoters. *Mol Cell*. **10**, 1107-17.
- Miranda, T. B., M. Miranda, A. Frankel and S. Clarke (2004) PRMT7 is a member of the protein arginine methyltransferase family with a distinct substrate specificity. *J Biol Chem*. **279**, 22902-7.
- Miranda, T. B., J. Sayegh, A. Frankel, J. E. Katz, M. Miranda and S. Clarke (2006) Yeast Hsl7 (histone synthetic lethal 7) catalyses the in vitro formation of omega-N(G)-monomethylarginine in calf thymus histone H2A. *Biochem J*. **395**, 563-70.
- Miranda, T. B., K. J. Webb, D. D. Edberg, R. Reeves and S. Clarke (2005) Protein arginine methyltransferase 6 specifically methylates the nonhistone chromatin protein HMGA1a. *Biochem Biophys Res Commun*. **336**, 831-5.

LITERATURVERZEICHNIS

- Myohanen, S. and S. B. Baylin (2001) Sequence-specific DNA binding activity of RNA helicase A to the p16INK4a promoter. *J Biol Chem.* **276**, 1634-42.
- Najbauer, J., B. A. Johnson, A. L. Young and D. W. Aswad (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**, 10501-9.
- Nakamura, T., T. Mori, S. Tada, W. Krajewski, T. Rozovskaia, R. Wassell, G. Dubois, A. Mazo, C. M. Croce and E. Canaani (2002) ALL-1 is a histone methyltransferase that assembles a supercomplex of proteins involved in transcriptional regulation. *Mol Cell.* **10**, 1119-28.
- Narita, M., S. Nunez, E. Heard, A. W. Lin, S. A. Hearn, D. L. Spector, G. J. Hannon and S. W. Lowe (2003) Rb-mediated heterochromatin formation and silencing of E2F target genes during cellular senescence. *Cell.* **113**, 703-16.
- Narita, Y. and F. M. Rijli (2009) Hox genes in neural patterning and circuit formation in the mouse hindbrain. *Curr Top Dev Biol.* **88**, 139-67.
- Neuhoff, V., N. Arold, D. Taube and W. Ehrhardt (1988) Improved staining of proteins in polyacrylamide gels including isoelectric focusing gels with clear background at nanogram sensitivity using Coomassie Brilliant Blue G-250 and R-250. *Electrophoresis.* **9**, 255-62.
- Ng, S. S., W. W. Yue, U. Oppermann and R. J. Klose (2009) Dynamic protein methylation in chromatin biology. *Cell Mol Life Sci.* **66**, 407-22.
- Niwa, H., K. Yamamura and J. Miyazaki (1991) Efficient selection for high-expression transfectants with a novel eukaryotic vector. *Gene.* **108**, 193-9.
- Noda, A., Y. Ning, S. F. Venable, O. M. Pereira-Smith and J. R. Smith (1994) Cloning of senescent cell-derived inhibitors of DNA synthesis using an expression screen. *Exp Cell Res.* **211**, 90-8.
- Nomura, M., Y. Takihara and K. Shimada (1994) Isolation and characterization of retinoic acid-inducible cDNA clones in F9 cells: one of the early inducible clones encodes a novel protein sharing several highly homologous regions with a Drosophila polyhomeotic protein. *Differentiation.* **57**, 39-50.
- Otte, A. P. and T. H. Kwaks (2003) Gene repression by Polycomb group protein complexes: a distinct complex for every occasion? *Curr Opin Genet Dev.* **13**, 448-54.
- Pahlich, S., R. P. Zakaryan and H. Gehring (2006) Protein arginine methylation: Cellular functions and methods of analysis. *Biochim Biophys Acta.* **1764**, 1890-903.
- Paik, W. K., D. C. Paik and S. Kim (2007) Historical review: the field of protein methylation. *Trends Biochem Sci.* **32**, 146-52.
- Pal, S. and S. Sif (2007) Interplay between chromatin remodelers and protein arginine methyltransferases. *J Cell Physiol.* **213**, 306-15.
- Pal, S., S. N. Vishwanath, H. Erdjument-Bromage, P. Tempst and S. Sif (2004) Human SWI/SNF-associated PRMT5 methylates histone H3 arginine 8 and negatively regulates expression of ST7 and NM23 tumor suppressor genes. *Mol Cell Biol.* **24**, 9630-45.
- Pal, S., R. Yun, A. Datta, L. Lacomis, H. Erdjument-Bromage, J. Kumar, P. Tempst and S. Sif (2003) mSin3A/histone deacetylase 2- and PRMT5-containing Brg1 complex is involved in transcriptional repression of the Myc target gene cad. *Mol Cell Biol.* **23**, 7475-87.

- Papp, B. and J. Muller (2006) Histone trimethylation and the maintenance of transcriptional ON and OFF states by trxG and PcG proteins. *Genes Dev.* **20**, 2041-54.
- Park, Y. B., M. J. Park, K. Kimura, K. Shimizu, S. H. Lee and J. Yokota (2002) Alterations in the INK4a/ARF locus and their effects on the growth of human osteosarcoma cell lines. *Cancer Genet Cytogenet.* **133**, 105-11.
- Pasini, D., A. P. Bracken, M. R. Jensen, E. Lazzerini Denchi and K. Helin (2004) Suz12 is essential for mouse development and for EZH2 histone methyltransferase activity. *EMBO J.* **23**, 4061-71.
- Pasini, D., K. H. Hansen, J. Christensen, K. Agger, P. A. Cloos and K. Helin (2008) Coordinated regulation of transcriptional repression by the RBP2 H3K4 demethylase and Polycomb-Repressive Complex 2. *Genes Dev.* **22**, 1345-55.
- Passeri, D., A. Marcucci, G. Rizzo, M. Billi, M. Panigada, L. Leonardi, F. Tirone and F. Grignani (2006) Btg2 enhances retinoic acid-induced differentiation by modulating histone H4 methylation and acetylation. *Mol Cell Biol.* **26**, 5023-32.
- Pfaffl, M. W. (2001) A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* **29**, e45.
- Pleasure, S. J. and V. M. Lee (1993) NTera 2 cells: a human cell line which displays characteristics expected of a human committed neuronal progenitor cell. *J Neurosci Res.* **35**, 585-602.
- Pray-Grant, M. G., J. A. Daniel, D. Schieltz, J. R. Yates, 3rd and P. A. Grant (2005) Chd1 chromodomain links histone H3 methylation with SAGA- and SLIK-dependent acetylation. *Nature.* **433**, 434-8.
- Prieur, A. and D. S. Peeper (2008) Cellular senescence in vivo: a barrier to tumorigenesis. *Curr Opin Cell Biol.* **20**, 150-5.
- Rajasekhar, V. K. and M. Begemann (2007) Concise review: roles of polycomb group proteins in development and disease: a stem cell perspective. *Stem Cells.* **25**, 2498-510.
- Raman, V., S. A. Martensen, D. Reisman, E. Evron, W. F. Odenwald, E. Jaffee, J. Marks and S. Sukumar (2000) Compromised HOXA5 function can limit p53 expression in human breast tumours. *Nature.* **405**, 974-8.
- Ren, X., C. Vincenz and T. K. Kerppola (2008) Changes in the distributions and dynamics of polycomb repressive complexes during embryonic stem cell differentiation. *Mol Cell Biol.* **28**, 2884-95.
- Ringrose, L. and R. Paro (2007) Polycomb/Trithorax response elements and epigenetic memory of cell identity. *Development.* **134**, 223-32.
- Ruthenburg, A. J., C. D. Allis and J. Wysocka (2007) Methylation of lysine 4 on histone H3: intricacy of writing and reading a single epigenetic mark. *Mol Cell.* **25**, 15-30.
- Ruthenburg, A. J., W. Wang, D. M. Graybosch, H. Li, C. D. Allis, D. J. Patel and G. L. Verdine (2006) Histone H3 recognition and presentation by the WDR5 module of the MLL1 complex. *Nat Struct Mol Biol.* **13**, 704-12.
- Sambrook, J., Russel D.W. (1989) *Molecular cloning, a laboratory manual*, Cold Spring Harbor Press

LITERATURVERZEICHNIS

- Santos-Rosa, H., R. Schneider, A. J. Bannister, J. Sherriff, B. E. Bernstein, N. C. Emre, S. L. Schreiber, J. Mellor and T. Kouzarides (2002) Active genes are tri-methylated at K4 of histone H3. *Nature*. **419**, 407-11.
- Sarma, K., R. Margueron, A. Ivanov, V. Pirrotta and D. Reinberg (2008) Ezh2 requires PHF1 to efficiently catalyze H3 lysine 27 trimethylation in vivo. *Mol Cell Biol*. **28**, 2718-31.
- Schneider, R., A. J. Bannister, F. A. Myers, A. W. Thorne, C. Crane-Robinson and T. Kouzarides (2004) Histone H3 lysine 4 methylation patterns in higher eukaryotic genes. *Nat Cell Biol*. **6**, 73-7.
- Schoorlemmer, J., C. Marcos-Gutierrez, F. Were, R. Martinez, E. Garcia, D. P. Satijn, A. P. Otte and M. Vidal (1997) Ring1A is a transcriptional repressor that interacts with the Polycomb-M33 protein and is expressed at rhombomere boundaries in the mouse hindbrain. *EMBO J*. **16**, 5930-42.
- Schuettengruber, B. and G. Cavalli (2009) Recruitment of polycomb group complexes and their role in the dynamic regulation of cell fate choice. *Development*. **136**, 3531-42.
- Schuettengruber, B., D. Chourrout, M. Vervoort, B. Leblanc and G. Cavalli (2007) Genome regulation by polycomb and trithorax proteins. *Cell*. **128**, 735-45.
- Schuetz, A., A. Allali-Hassani, F. Martin, P. Loppnau, M. Vedadi, A. Bochkarev, A. N. Plotnikov, C. H. Arrowsmith and J. Min (2006) Structural basis for molecular recognition and presentation of histone H3 by WDR5. *EMBO J*. **25**, 4245-52.
- Schurter, B. T., S. S. Koh, D. Chen, G. J. Bunick, J. M. Harp, B. L. Hanson, A. Henschen-Edman, D. R. Mackay, M. R. Stallcup and D. W. Aswad (2001) Methylation of histone H3 by coactivator-associated arginine methyltransferase 1. *Biochemistry*. **40**, 5747-56.
- Scott, H. S., S. E. Antonarakis, M. D. Lalioti, C. Rossier, P. A. Silver and M. F. Henry (1998) Identification and characterization of two putative human arginine methyltransferases (HRMT1L1 and HRMT1L2). *Genomics*. **48**, 330-40.
- Scott, K. L., O. Kabbarah, M. C. Liang, E. Ivanova, V. Anagnostou, J. Wu, S. Dhakal, M. Wu, S. Chen, T. Feinberg, J. Huang, A. Saci, H. R. Widlund, D. E. Fisher, Y. Xiao, D. L. Rimm, A. Protopopov, K. K. Wong and L. Chin (2009) GOLPH3 modulates mTOR signalling and rapamycin sensitivity in cancer. *Nature*. **459**, 1085-90.
- Seet, B. T., I. Dikic, M. M. Zhou and T. Pawson (2006) Reading protein modifications with interaction domains. *Nat Rev Mol Cell Biol*. **7**, 473-83.
- Serrano, M. and M. A. Blasco (2007) Cancer and ageing: convergent and divergent mechanisms. *Nat Rev Mol Cell Biol*. **8**, 715-22.
- Sgarra, R., J. Lee, M. A. Tessari, S. Altamura, B. Spolaore, V. Giancotti, M. T. Bedford and G. Manfioletti (2006) The AT-hook of the chromatin architectural transcription factor high mobility group A1a is arginine-methylated by protein arginine methyltransferase 6. *J Biol Chem*. **281**, 3764-72.
- Shah, N. and S. Sukumar (2010) The Hox genes and their roles in oncogenesis. *Nat Rev Cancer*. **10**, 361-71.
- Shen, X., Y. Liu, Y. J. Hsu, Y. Fujiwara, J. Kim, X. Mao, G. C. Yuan and S. H. Orkin (2008) EZH1 mediates methylation on histone H3 lysine 27 and complements EZH2 in maintaining stem cell identity and executing pluripotency. *Mol Cell*. **32**, 491-502.

- Shi, X., T. Hong, K. L. Walter, M. Ewalt, E. Michishita, T. Hung, D. Carney, P. Pena, F. Lan, M. R. Kaadige, N. Lacoste, C. Cayrou, F. Davrazou, A. Saha, B. R. Cairns, D. E. Ayer, T. G. Kutateladze, Y. Shi, J. Cote, K. F. Chua and O. Gozani (2006) ING2 PHD domain links histone H3 lysine 4 methylation to active gene repression. *Nature*. **442**, 96-9.
- Shi, Y., F. Lan, C. Matson, P. Mulligan, J. R. Whetstine, P. A. Cole and R. A. Casero (2004) Histone demethylation mediated by the nuclear amine oxidase homolog LSD1. *Cell*. **119**, 941-53.
- Shi, Y. and J. R. Whetstine (2007) Dynamic regulation of histone lysine methylation by demethylases. *Mol Cell*. **25**, 1-14.
- Shilatifard, A. (2008) Molecular implementation and physiological roles for histone H3 lysine 4 (H3K4) methylation. *Curr Opin Cell Biol*. **20**, 341-8.
- Simeone, A., D. Acampora, L. Arcioni, P. W. Andrews, E. Boncinelli and F. Mavilio (1990) Sequential activation of HOX2 homeobox genes by retinoic acid in human embryonal carcinoma cells. *Nature*. **346**, 763-6.
- Simeone, A., D. Acampora, V. Nigro, A. Faiella, M. D'Esposito, A. Stornaiuolo, F. Mavilio and E. Boncinelli (1991) Differential regulation by retinoic acid of the homeobox genes of the four HOX loci in human embryonal carcinoma cells. *Mech Dev*. **33**, 215-27.
- Simon, J. A. and R. E. Kingston (2009) Mechanisms of polycomb gene silencing: knowns and unknowns. *Nat Rev Mol Cell Biol*. **10**, 697-708.
- Sims, R. J., 3rd, K. Nishioka and D. Reinberg (2003) Histone lysine methylation: a signature for chromatin function. *Trends Genet*. **19**, 629-39.
- Smith, B. C. and J. M. Denu (2009) Chemical mechanisms of histone lysine and arginine modifications. *Biochim Biophys Acta*. **1789**, 45-57.
- Smith, W. A., B. T. Schurter, F. Wong-Staal and M. David (2004) Arginine methylation of RNA helicase a determines its subcellular localization. *J Biol Chem*. **279**, 22795-8.
- Soshnikova, N. and D. Duboule (2009) Epigenetic regulation of vertebrate Hox genes: a dynamic equilibrium. *Epigenetics*. **4**, 537-40.
- Southall, S. M., P. S. Wong, Z. Odho, S. M. Roe and J. R. Wilson (2009) Structural basis for the requirement of additional factors for MLL1 SET domain activity and recognition of epigenetic marks. *Mol Cell*. **33**, 181-91.
- Sparmann, A. and M. van Lohuizen (2006) Polycomb silencers control cell fate, development and cancer. *Nat Rev Cancer*. **6**, 846-56.
- Stallcup, M. R. (2001) Role of protein methylation in chromatin remodeling and transcriptional regulation. *Oncogene*. **20**, 3014-20.
- Stein, G. H., L. F. Drullinger, A. Soulard and V. Dulic (1999) Differential roles for cyclin-dependent kinase inhibitors p21 and p16 in the mechanisms of senescence and differentiation in human fibroblasts. *Mol Cell Biol*. **19**, 2109-17.
- Steward, M. M., J. S. Lee, A. O'Donovan, M. Wyatt, B. E. Bernstein and A. Shilatifard (2006) Molecular regulation of H3K4 trimethylation by ASH2L, a shared subunit of MLL complexes. *Nat Struct Mol Biol*. **13**, 852-4.

LITERATURVERZEICHNIS

- Stock, J. K., S. Giadrossi, M. Casanova, E. Brookes, M. Vidal, H. Koseki, N. Brockdorff, A. G. Fisher and A. Pombo (2007) Ring1-mediated ubiquitination of H2A restrains poised RNA polymerase II at bivalent genes in mouse ES cells. *Nat Cell Biol.* **9**, 1428-35.
- Stokes, D. G., K. D. Tartof and R. P. Perry (1996) CHD1 is concentrated in interbands and puffed regions of *Drosophila* polytene chromosomes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **93**, 7137-42.
- Stornaiuolo, A., D. Acampora, M. Pannese, M. D'Esposito, F. Morelli, E. Migliaccio, M. Rambaldi, A. Faiella, V. Nigro, A. Simeone and et al. (1990) Human HOX genes are differentially activated by retinoic acid in embryonal carcinoma cells according to their position within the four loci. *Cell Differ Dev.* **31**, 119-27.
- Strahl, B. D. and C. D. Allis (2000) The language of covalent histone modifications. *Nature.* **403**, 41-5.
- Strahl, B. D., S. D. Briggs, C. J. Brame, J. A. Caldwell, S. S. Koh, H. Ma, R. G. Cook, J. Shabanowitz, D. F. Hunt, M. R. Stallcup and C. D. Allis (2001) Methylation of histone H4 at arginine 3 occurs in vivo and is mediated by the nuclear receptor coactivator PRMT1. *Curr Biol.* **11**, 996-1000.
- Svingen, T. and K. F. Tonissen (2003) Altered HOX gene expression in human skin and breast cancer cells. *Cancer Biol Ther.* **2**, 518-23.
- Swift, S., J. Lorens, P. Achacoso and G. P. Nolan (2001) Rapid production of retroviruses for efficient gene delivery to mammalian cells using 293T cell-based systems. *Curr Protoc Immunol.* **Chapter 10**, Unit 10 17C.
- Swigut, T. and J. Wysocka (2007) H3K27 demethylases, at long last. *Cell.* **131**, 29-32.
- Teyssier, C., D. Chen and M. R. Stallcup (2002) Requirement for multiple domains of the protein arginine methyltransferase CARM1 in its transcriptional coactivator function. *J Biol Chem.* **277**, 46066-72.
- Thomas, D., T. M. Lakowski, M. L. Pak, J. J. Kim and A. Frankel (2010) Forster resonance energy transfer measurements of cofactor-dependent effects on protein arginine N-methyltransferase homodimerization. *Protein Sci.* **19**, 2141-51.
- Thompson, P. R. and W. Fast (2006) Histone citrullination by protein arginine deiminase: is arginine methylation a green light or a roadblock? *ACS Chem Biol.* **1**, 433-41.
- Tiberio, C., P. Barba, M. C. Magli, F. Arvelo, T. Le Chevalier, M. F. Poupon and C. Cillo (1994) HOX gene expression in human small-cell lung cancers xenografted into nude mice. *Int J Cancer.* **58**, 608-15.
- Torres-Padilla, M. E., D. E. Parfitt, T. Kouzarides and M. Zernicka-Goetz (2007) Histone arginine methylation regulates pluripotency in the early mouse embryo. *Nature.* **445**, 214-8.
- Troffer-Charlier, N., V. Cura, P. Hassenboehler, D. Moras and J. Cavarelli (2007) Functional insights from structures of coactivator-associated arginine methyltransferase 1 domains. *EMBO J.* **26**, 4391-401.
- Tschiersch, B., A. Hofmann, V. Krauss, R. Dorn, G. Korge and G. Reuter (1994) The protein encoded by the *Drosophila* position-effect variegation suppressor gene Su(var)3-9 combines domains of antagonistic regulators of homeotic gene complexes. *EMBO J.* **13**, 3822-31.

- Tsukada, Y., J. Fang, H. Erdjument-Bromage, M. E. Warren, C. H. Borchers, P. Tempst and Y. Zhang (2006) Histone demethylation by a family of JmjC domain-containing proteins. *Nature*. **439**, 811-6.
- Turner, B. M. (2000) Histone acetylation and an epigenetic code. *Bioessays*. **22**, 836-45.
- Ulke-Lemee, A., L. Trinkle-Mulcahy, S. Chaulk, N. K. Bernstein, N. Morrice, M. Glover, A. I. Lamond and G. B. Moorhead (2007) The nuclear PP1 interacting protein ZAP3 (ZAP) is a putative nucleoside kinase that complexes with SAM68, CIA, NF110/45, and HNRNP-G. *Biochim Biophys Acta*. **1774**, 1339-50.
- van Ingen, H., F. M. van Schaik, H. Wienk, J. Ballering, H. Rehmann, A. C. Dechesne, J. A. Kruijzer, R. M. Liskamp, H. T. Timmers and R. Boelens (2008) Structural insight into the recognition of the H3K4me3 mark by the TFIID subunit TAF3. *Structure*. **16**, 1245-56.
- van Lohuizen, M., S. Verbeek, B. Scheijen, E. Wientjens, H. van der Gulden and A. Berns (1991) Identification of cooperating oncogenes in E mu-myc transgenic mice by provirus tagging. *Cell*. **65**, 737-52.
- Vermeulen, M., K. W. Mulder, S. Denissov, W. W. Pijnappel, F. M. van Schaik, R. A. Varier, M. P. Baltissen, H. G. Stunnenberg, M. Mann and H. T. Timmers (2007) Selective anchoring of TFIID to nucleosomes by trimethylation of histone H3 lysine 4. *Cell*. **131**, 58-69.
- Vidal, M. (2009) Role of polycomb proteins Ring1A and Ring1B in the epigenetic regulation of gene expression. *Int J Dev Biol*. **53**, 355-70.
- Vincenz, C. and T. K. Kerppola (2008) Different polycomb group CBX family proteins associate with distinct regions of chromatin using nonhomologous protein sequences. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **105**, 16572-7.
- Vire, E., C. Brenner, R. Deplus, L. Blanchon, M. Fraga, C. Didelot, L. Morey, A. Van Eynde, D. Bernard, J. M. Vanderwinden, M. Bollen, M. Esteller, L. Di Croce, Y. de Launoit and F. Fuks (2006) The Polycomb group protein EZH2 directly controls DNA methylation. *Nature*. **439**, 871-4.
- Volkel, P. and P. O. Angrand (2007) The control of histone lysine methylation in epigenetic regulation. *Biochimie*. **89**, 1-20.
- Wagner, S., S. Weber, M. A. Kleinschmidt, K. Nagata and U. M. Bauer (2006) SET-mediated promoter hypoacetylation is a prerequisite for coactivation of the estrogen-responsive pS2 gene by PRMT1. *J Biol Chem*. **281**, 27242-50.
- Wang, H., Z. Q. Huang, L. Xia, Q. Feng, H. Erdjument-Bromage, B. D. Strahl, S. D. Briggs, C. D. Allis, J. Wong, P. Tempst and Y. Zhang (2001) Methylation of histone H4 at arginine 3 facilitating transcriptional activation by nuclear hormone receptor. *Science*. **293**, 853-7.
- Wang, Y., J. Wysocka, J. Sayegh, Y. H. Lee, J. R. Perlin, L. Leonelli, L. S. Sonbuchner, C. H. McDonald, R. G. Cook, Y. Dou, R. G. Roeder, S. Clarke, M. R. Stallcup, C. D. Allis and S. A. Coonrod (2004) Human PAD4 regulates histone arginine methylation levels via demethylination. *Science*. **306**, 279-83.
- Webby, C. J., A. Wolf, N. Gromak, M. Dreger, H. Kramer, B. Kessler, M. L. Nielsen, C. Schmitz, D. S. Butler, J. R. Yates, 3rd, C. M. Delahunty, P. Hahn, A. Lengeling, M. Mann, N. J. Proudfoot, C. J. Schofield and A. Bottger (2009) Jmjd6 catalyses lysyl-hydroxylation of U2AF65, a protein associated with RNA splicing. *Science*. **325**, 90-3.

LITERATURVERZEICHNIS

- Weiss, V. H., A. E. McBride, M. A. Soriano, D. J. Filman, P. A. Silver and J. M. Hogle (2000) The structure and oligomerization of the yeast arginine methyltransferase, Hmt1. *Nat Struct Biol.* **7**, 1165-71.
- Wolf, S. S. (2009) The protein arginine methyltransferase family: an update about function, new perspectives and the physiological role in humans. *Cell Mol Life Sci.* **66**, 2109-21.
- Wolffe, A. P. and M. A. Matzke (1999) Epigenetics: regulation through repression. *Science.* **286**, 481-6.
- Wyatt, H. D., S. C. West and T. L. Beattie (2010) InTERTpreting telomerase structure and function. *Nucleic Acids Res.* **38**, 5609-22.
- Wysocka, J., M. P. Myers, C. D. Laherty, R. N. Eisenman and W. Herr (2003) Human Sin3 deacetylase and trithorax-related Set1/Ash2 histone H3-K4 methyltransferase are tethered together selectively by the cell-proliferation factor HCF-1. *Genes Dev.* **17**, 896-911.
- Wysocka, J., T. Swigut, T. A. Milne, Y. Dou, X. Zhang, A. L. Burlingame, R. G. Roeder, A. H. Brivanlou and C. D. Allis (2005) WDR5 associates with histone H3 methylated at K4 and is essential for H3 K4 methylation and vertebrate development. *Cell.* **121**, 859-72.
- Wysocka, J., T. Swigut, H. Xiao, T. A. Milne, S. Y. Kwon, J. Landry, M. Kauer, A. J. Tackett, B. T. Chait, P. Badenhorst, C. Wu and C. D. Allis (2006) A PHD finger of NURF couples histone H3 lysine 4 trimethylation with chromatin remodelling. *Nature.* **442**, 86-90.
- Xiao, B., C. Jing, J. R. Wilson, P. A. Walker, N. Vasisht, G. Kelly, S. Howell, I. A. Taylor, G. M. Blackburn and S. J. Gamblin (2003) Structure and catalytic mechanism of the human histone methyltransferase SET7/9. *Nature.* **421**, 652-6.
- Xie, B., C. F. Invernizzi, S. Richard and M. A. Wainberg (2007) Arginine methylation of the human immunodeficiency virus type 1 Tat protein by PRMT6 negatively affects Tat Interactions with both cyclin T1 and the Tat transactivation region. *J Virol.* **81**, 4226-34.
- Xu, W., H. Cho, S. Kadam, E. M. Banayo, S. Anderson, J. R. Yates, 3rd, B. M. Emerson and R. M. Evans (2004) A methylation-mediator complex in hormone signaling. *Genes Dev.* **18**, 144-56.
- Yamane, K., K. Tateishi, R. J. Klose, J. Fang, L. A. Fabrizio, H. Erdjument-Bromage, J. Taylor-Papadimitriou, P. Tempst and Y. Zhang (2007) PLU-1 is an H3K4 demethylase involved in transcriptional repression and breast cancer cell proliferation. *Mol Cell.* **25**, 801-12.
- Yoon, I. K., H. K. Kim, Y. K. Kim, I. H. Song, W. Kim, S. Kim, S. H. Baek, J. H. Kim and J. R. Kim (2004) Exploration of replicative senescence-associated genes in human dermal fibroblasts by cDNA microarray technology. *Exp Gerontol.* **39**, 1369-78.
- Yoshimatsu, M., G. Toyokawa, S. Hayami, M. Unoki, T. Tsunoda, H. I. Field, J. D. Kelly, D. E. Neal, Y. Maehara, B. A. Ponder, Y. Nakamura and R. Hamamoto (2010) Dysregulation of PRMT1 and PRMT6, Type I arginine methyltransferases, is involved in various types of human cancers. *Int J Cancer.*
- Yue, W. W., M. Hassler, S. M. Roe, V. Thompson-Vale and L. H. Pearl (2007) Insights into histone code syntax from structural and biochemical studies of CARM1 methyltransferase. *EMBO J.* **26**, 4402-12.
- Zhang, H. (2007) Molecular signaling and genetic pathways of senescence: Its role in tumorigenesis and aging. *J Cell Physiol.* **210**, 567-74.

- Zhang, H., K. H. Pan and S. N. Cohen (2003a) Senescence-specific gene expression fingerprints reveal cell-type-dependent physical clustering of up-regulated chromosomal loci. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **100**, 3251-6.
- Zhang, J., M. L. Goodson, Y. Hong and K. D. Sarge (2008) MEL-18 interacts with HSF2 and the SUMO E2 UBC9 to inhibit HSF2 sumoylation. *J Biol Chem*. **283**, 7464-9.
- Zhang, X. and X. Cheng (2003) Structure of the predominant protein arginine methyltransferase PRMT1 and analysis of its binding to substrate peptides. *Structure*. **11**, 509-20.
- Zhang, X., Z. Yang, S. I. Khan, J. R. Horton, H. Tamaru, E. U. Selker and X. Cheng (2003b) Structural basis for the product specificity of histone lysine methyltransferases. *Mol Cell*. **12**, 177-85.
- Zhang, X., L. Zhou and X. Cheng (2000) Crystal structure of the conserved core of protein arginine methyltransferase PRMT3. *EMBO J*. **19**, 3509-19.
- Zhang, Y. and D. Reinberg (2001) Transcription regulation by histone methylation: interplay between different covalent modifications of the core histone tails. *Genes Dev*. **15**, 2343-60.
- Zhao, Q., G. Rank, Y. T. Tan, H. Li, R. L. Moritz, R. J. Simpson, L. Cerruti, D. J. Curtis, D. J. Patel, C. D. Allis, J. M. Cunningham and S. M. Jane (2009) PRMT5-mediated methylation of histone H4R3 recruits DNMT3A, coupling histone and DNA methylation in gene silencing. *Nat Struct Mol Biol*. **16**, 304-11.
- Zheng, C. F., T. Simcox, L. Xu and P. Vaillancourt (1997) A new expression vector for high level protein production, one step purification and direct isotopic labeling of calmodulin-binding peptide fusion proteins. *Gene*. **186**, 55-60.
- Zobel-Thropp, P., J. D. Gary and S. Clarke (1998) delta-N-methylarginine is a novel posttranslational modification of arginine residues in yeast proteins. *J Biol Chem*. **273**, 29283-6.

DANKSAGUNG

Ich möchte an dieser Stelle allen danken, die mich während meiner Doktorarbeit wissenschaftlich und freundschaftlich begleitet und unterstützt haben.

Dabei gilt mein erster Dank Uta-Maria Bauer für die Bereitstellung des Themas und die wissenschaftliche Betreuung meiner Doktorarbeit. Aber auch für die kontinuierliche Unterstützung sowie die zahlreichen Diskussionen und hilfreichen Anregungen während der Bearbeitung dieser Dissertation möchte ich mich bedanken.

Frau Prof. Dr. Renate Renkawitz-Pohl danke ich für die Begutachtung meiner Dissertation und die Betreuung seitens des Fachbereichs Biologie.

Ich danke ebenfalls Prof. Dr. Alexander Brehm und Prof. Dr. Martin Eilers für die interessanten Diskussionen und ihre wertvollen Ratschläge im *Thesis Committee*.

Ich möchte mich bei meinen ehemaligen und derzeitigen Kollegen der AG Bauer für die angenehme Arbeitsatmosphäre und die gute Zusammenarbeit sowie für die inspirierenden, fachlichen und spaßigen, nicht-fachlichen Diskussionen bedanken. Besonders danke ich Gundula, Dawin, Sophia, Marc und Steffi, auf die ich mich in allen Labor- und Lebenslagen verlassen konnte.

Bei den Mitarbeitern des IMTs bedanke ich mich für Ratschläge und gegenseitige Unterstützung bei praktischen und theoretischen Fragen.

Der letzte und herzlichste Dank gilt meiner Familie und vor allem meinen Eltern, meinem Bruder und Jens für ihr Interesse an meiner Arbeit, ihre Geduld und ihr Verständnis und dafür, dass sie immer für mich da waren und sind. Der größte Dank gebührt meinen Eltern für ihre bedingungslose Unterstützung, ihr Vertrauen und die vielen aufmunternden Worte.

LEBENS LAUF

Allgemeine Daten

Name: Claudia Stein
Geburtsdatum: 16.06.1982
Geburtsort: Freiberg

Promotion

07/2006 – 01/2011 Bearbeitung und Anfertigung der Dissertation in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Uta-Maria Bauer am Institut für Molekularbiologie und Tumorforschung (IMT) der Philipps-Universität Marburg
Thema der Arbeit: „*Charakterisierung der Repressorfunktion von PRMT6 und deren Rolle bei der Differenzierung, Proliferation und Seneszenz*“

Studium

10/2001 – 03/2006 Studium der Biochemie mit dem Wahlpflichtfach Biotechnologie, Universität Leipzig
Abschluss: Diplom

10/2005 – 03/2006 Bearbeitung und Anfertigung der Diplomarbeit in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Andrea Robitzki am Biotechnologisch-Biomedizinischen Zentrum (BBZ) der Universität Leipzig, Abteilung Molekularbiologisch-Biochemische Prozesstechnik
Thema der Arbeit: „*Etablierung eines zell- und gewebebasierten Tumorsensors für das Screening von Wirkstoffen und die Entwicklung neuer Therapieansätze*“

03/2005 – 06/2005 Bearbeitung und Anfertigung der Projektarbeit in der Arbeitsgruppe von Dr. Colin Berry an der Cardiff School of Biosciences, Universität Cardiff
Thema der Arbeit: „*Transcriptional analysis of the toxin coding plasmid pBtoxis from Bacillus thuringiensis subsp. israelensis*“

Schulausbildung

09/1993 – 06/2001 Geschwister Scholl Gymnasium in Freiberg
Abschluss: Abitur

PUBLIKATIONEN

Teile der vorliegenden Arbeit gehen in folgende wissenschaftliche Veröffentlichungen ein:

Hyllus*, D., Stein*, C., Schnabel, K., Schiltz, E., Imhof, A., Dou, Y., Hsieh, J., Bauer, U.M. (2007), PRMT6-mediated methylation of R2 in histone H3 antagonizes H3 K4 trimethylation. *Genes & Development* **21**(24): 3369-3380. (* geteilte Erstautorenschaft)

Stein, C., Riedl, S., Nötzold, R.R., Bauer, U.M., The arginine methyltransferase PRMT6 cooperates with Polycomb repressive proteins and regulates cellular senescence. *Manuscript in preparation*.

Die in der vorliegenden Arbeit nicht beschriebenen Ergebnisse zur Rolle von Fop bei der Östrogen-abhängigen Genaktivierung in MCF7 Zellen sind in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Sjaak Philipsen (Dep. Cell Biology/Erasmus MC, Rotterdam) entstanden und sind Bestandteil der folgenden wissenschaftlichen Veröffentlichung:

van Dijk TB, Gillemans N, Stein C, Fanis P, Demmers J, van de Corput M, Essers J, Grosveld F, Bauer UM, Philipsen S. (2010), Friend of Prmt1, a novel chromatin target of protein arginine methyltransferases. *Molecular and Cellular Biology* **30** (1): 260-272.

EHRENWÖRTLICHE ERKLÄRUNG

Hiermit versichere ich, Claudia Stein, dass ich die vorgelegte Dissertation

Charakterisierung der Repressorfunktion von PRMT6 und deren Rolle bei der Differenzierung, Proliferation und Seneszenz

unter Leitung von Prof. Dr. Uta-Maria Bauer am Institut für Molekularbiologie und Tumorforschung selbständig, ohne unerlaubte Hilfe angefertigt und mich dabei keiner anderen als der von mir ausdrücklich angegebenen Quellen und Hilfen bedient habe.

Die Dissertation wurde in der jetzigen oder einer ähnlichen Form noch bei keiner anderen Hochschule eingereicht und hat noch keinen sonstigen Prüfungszwecken gedient.

Marburg, den 17. Dezember 2010

Claudia Stein