

Aus dem Institut für Molekularbiologie und Tumorforschung
Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. Rolf Müller

des Fachbereichs Medizin der Philipps-Universität Marburg



Die Rolle der Überexpression von PRMT1 im duktalem Adenokarzinom des Pankreas

Inaugural-Dissertation

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

dem Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg
vorgelegt von

Marc Zeller
aus Buchen

Marburg, 2015

Angenommen vom Fachbereich Medizin
der Philipps-Universität Marburg am: 09.02.2015.

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs

Dekan: Herr Prof. Dr. H. Schäfer

Referent: Frau Prof. Dr. U.-M. Bauer

1. Korreferent: Herr PD Dr. M. Buchholz

2. Korreferent: Herr Prof. Dr. T. Borggreffe

INHALTSVERZEICHNIS

Inhaltsverzeichnis	i
Abbildungsverzeichnis.....	v
Tabellenverzeichnis	vii
Abkürzungsverzeichnis.....	viii
Nomenklatur.....	x
Zusammenfassung	xi
Abstract	xiii
1 Einleitung	1
1.1 Protein-Arginin-Methyltransferasen	1
1.1.1 Funktionen der PRMTs	3
1.1.2 Die Regulation von PRMTs	7
1.1.3 Die Rolle von PRMTs in Tumoren	8
1.2 Das duktales Adenokarzinom des Pankreas	10
1.2.1 Biologie des Pankreas und Epidemiologie des PDAC	10
1.2.2 Entwicklung und Ursprung des PDAC.....	13
1.2.3 Änderungen des Expressionsprogramms im PDAC.....	16
1.2.3.1 KRAS-Mutationen und deregulierte Wachstumsfaktoren	16
1.2.3.2 Deregulationen entwicklungsrelevanter Signalwege.....	18
1.2.3.3 weitere Deregulationen im PDAC.....	20
1.3 Zielsetzung.....	23
2 Material.....	25
2.1 Software	25
2.2 Geräte.....	25
2.3 Verbrauchsmaterial	27
2.4 Kits	28
2.5 Oligonukleotid-Microarray.....	28
2.6 Chemikalien für die Zellkultur	29
2.7 Medien für die Zellkultur	29
2.8 Chemikalien	30
2.9 Standards.....	31
2.10 Bakterien	32
2.11 Puffer.....	32

2.12 Plasmide	33
2.12.1 Plasmide für Bakterien	33
2.12.2 Plasmide für eukaryotische Zellen	34
2.13 Zelllinien	35
2.14 Transfektionsreagenzien	35
2.15 Oligonukleotide.....	35
2.15.1 Primer für die reverse Transkription	35
2.15.2 RT-qPCR Primer, humane Zielsequenz	35
2.15.3 RT-qPCR Primer, murine Zielsequenz.....	38
2.15.4 ChIP-qPCR Primer, humane Zielsequenz	40
2.15.5 siRNA, humane Zielsequenz	40
2.16 Enzyme	42
2.17 Antikörper.....	42
2.17.1 Western Blot-Primärantikörper.....	42
2.17.2 Western Blot-Sekundärantikörper	43
2.17.3 Immunhistochemie- und Immunzytochemie-Primärantikörper	43
2.17.4 Immunzytochemie-Sekundärantikörper	43
2.17.5 (Chromatin-) Immunpräzipitations-Antikörper	44
3 Methoden.....	45
3.1 Zellkultur und proteinbiochemische Methoden	45
3.1.1 Kultivierung adhärenter, eukaryotischer Zellen	45
3.1.2 Zellzählung in der Neubauer-Zählkammer.....	46
3.1.3 Einfrieren und Auftauen von Zelllinien	46
3.1.4 DNA-Transfektion mittels Polyethylenimin (PEI).....	47
3.1.5 RNA-Transfektion eukaryotischer Zellen mittels Lipofectamine RNAiMax	48
3.1.6 FCS-Induktion von Zellen.....	49
3.1.7 Herstellen von Protein-Gesamtzellextrakt durch IPH-Lyse.....	49
3.1.8 Herstellen von Protein-Gesamtzellextrakt durch KPi-Lyse	50
3.1.9 Extraktion von RNA aus eukaryotischen Zellen.....	51
3.1.10 Bestimmung von Proteinkonzentrationen (Bradford-Assay).....	51
3.1.11 Luziferase-Assay	52
3.1.12 Immunpräzipitation und Coimmunpräzipitation	53
3.1.13 Chromatin-Immunpräzipitation (ChIP).....	54
3.1.14 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	58
3.1.15 Coomassie-Färbung.....	60

3.1.16	Western Blot (Nass Blot / Tank Blot)	61
3.1.17	Immunfärbung von PVDF-Membranen.....	62
3.1.18	Immunzytochemie: Antikörperfärbung von eukaryotischen Zellen.....	63
3.1.19	Immunhistochemie: Antikörperfärbung von histologischen Schnitten	64
3.1.20	Wachstumskurve.....	66
3.1.21	Soft-Agar-Assay	67
3.1.22	<i>Pulldown</i>	68
3.1.23	<i>in vitro</i> -Methylierung und Fluorographie.....	69
3.2	Mikrobiologische und Molekularbiologische Methoden.....	70
3.2.1	Transformation kompetenter Bakterien mit Plasmid-DNA	70
3.2.2	Gewinnung von Plasmid-DNA aus <i>E.Coli</i> -Bakterien („MAXI“ Präparation).....	70
3.2.3	Aufreinigung von rekombinanten Proteinen aus <i>E.Coli</i> -Bakterien.....	71
3.2.4	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren (Nano-Drop).....	73
3.2.5	Agarose-Gelelektrophorese	73
3.2.6	RT-qPCR.....	74
4	Ergebnisse	79
4.1	PRMT1 wird in Gang- und Stromazellen des PDAC stark exprimiert	79
4.2	PRMT1 ist für das ankerunabhängige Wachstum von PDAC-Zellen notwendig	83
4.3	PRMT1 ist für die Proliferationsfähigkeit von Tumorzellen essenziell	85
4.4	PRMT1 und der Hedgehog-Signalweg.....	90
4.4.1	Induktion der <i>GLI1</i> -Transkription durch <i>Knockdown</i> von <i>PRMT1</i>	90
4.4.2	PRMT1 als Kofaktor im <i>GLI1</i> -abhängigen Reporter-gen-Assay.....	92
4.4.3	<i>In vitro</i> -Interaktion von <i>GLI1</i> und <i>PRMT1</i>	97
4.4.4	<i>In vivo</i> -Interaktion von <i>GLI1</i> und <i>PRMT1</i>	100
4.4.5	<i>In vitro</i> -Methylierung von <i>GLI1</i> durch <i>PRMT1</i>	101
4.5	PRMT1 und der Transkriptionsfaktor c-MYC	104
4.5.1	Auswirkungen des Transkriptionsfaktors c-MYC auf die <i>PRMT1</i> - Expressionsspiegel.....	104
4.5.2	Abhängigkeit der c-MYC-Expressionsspiegel von <i>PRMT1</i>	106
4.6	Veränderung des Transkriptoms von Panc1-Zellen unter Depletion von <i>PRMT1</i> ...	107
4.7	Validierung der Kandidatengene des Microarrays	114
4.7.1	Technische Validierung aus den RNA-Proben des Microarrays.....	115
4.7.2	Validierung des Microarrays in weiteren Depletionsexperimenten in Panc1-Zellen	119
4.7.3	Validierung der Array-Ergebnisse mittels <i>PRMT1-Knockout</i> in MEF-Zellen	123
4.8	Ergebnisse der Validierungsversuche des Microarrays.....	125

4.9	GLIPR1 ist für die Proliferationsfähigkeit von Panc1-Zellen nicht essenziell	127
4.10	Rekrutierung von PRMT1 an Genbereiche von <i>GLIPR1</i>	130
5	Diskussion.....	134
5.1	Die Überexpression von PRMT1 in Zellen des PDAC	134
5.2	Einflüsse von PRMT1 auf die Proliferation von Zellen.....	135
5.3	Einflüsse von PRMT1 auf das ankerunabhängige Wachstum	137
5.4	Assoziationen von PRMT1 mit dem Transkriptionsfaktor GLI1	138
5.5	Induktion der PRMT1-Expression durch c-MYC	141
5.6	Genexpressions-Microarray in PDAC-Zellen unter <i>PRMT1-Knockdown</i>	143
5.6.1	Validierbarkeit der Zielgene des Microarrays.....	144
5.6.2	Validierte, vom <i>PRMT1-Knockdown</i> regulierte Gene.....	144
5.6.2.1	<i>ANNEXIN A8</i>	145
5.6.2.2	<i>GLIPR1</i>	146
5.6.3	Weitere Kandidatengene.....	149
5.6.4	<i>Off-targets</i> im Array und deren Ursachen.....	149
5.6.5	Alternative Vorgehensweisen bei Durchführung des Genexpressions- Microarrays.....	151
5.6.6	PRMT1 als Repressor der Genexpression.....	152
5.6.7	Gene mit unklarer Regulation im Array	154
5.7	Ausblick	156
6	Literaturverzeichnis	158
7	Anhang	183
7.1	Verzeichnis der akademischen Lehrer.....	183
7.2	Publikationen	184

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1: Schema der verschiedenen Arten der Protein-Arginin-Methylierung	2
Abbildung 2: Histologischer Aufbau des Pankreas.....	12
Abbildung 3: PanINs als Vorstufen des PDAC	14
Abbildung 4: Nachweis der Spezifität des PRMT1-Antikörpers in der Immunzytochemie	81
Abbildung 5: PRMT1-Proteinspiegel in einer Lymphknotenmetastase eines humanen PDAC ...	82
Abbildung 6: Soft-Agar-Assay von Suit007-Zellen im <i>PRMT1-Knockdown</i>	84
Abbildung 7: Etablierung eines Protokolls für die Aufrechterhaltung des <i>PRMT1-Knockdowns</i> im Verlauf einer Wachstumskurve	86
Abbildung 8: Wachstumskurve von Panc1-Zellen im <i>PRMT1-Knockdown</i>	87
Abbildung 9: Wachstumskurven von MiaPaCa2- und HeLa-Zellen im <i>PRMT1-Knockdown</i>	89
Abbildung 10: GLI1-Transkriptspiegel im <i>PRMT1-Knockdown</i>	92
Abbildung 11: GLI1-Reportergeren-Assay in HeLa-Zellen bei ektopischer Expression von PRMT1	94
Abbildung 12: GLI1-Reportergeren-Assay in MiaPaCa2-Zellen bei ektopischer Expression von PRMT1	96
Abbildung 13: <i>Pulldown</i> von GST-GLI1 mit PRMT1	98
Abbildung 14: CoIP von PRMT1 mit HA-GLI1	100
Abbildung 15: <i>In vitro</i> -Methylierung von GST-GLI1 durch GST-PRMT1	102
Abbildung 16: Expressionsänderungen von PRMT1 im <i>Knockdown</i> von <i>c-MYC</i> in Panc1- Zellen	105
Abbildung 17: <i>c-MYC</i> -Expressionsspiegel unter Depletion von PRMT1 nach FCS-Induktion....	107
Abbildung 18: Der zeitliche Verlauf der Depletion von PRMT1 in Panc1-Zellen.....	108
Abbildung 19: Definition spezifisch regulierter Gene des Genexpressions-Microarrays unter Depletion von PRMT1.....	109
Abbildung 20: Schema der Berechnungsgrundlagen des Microarrays	110
Abbildung 21: PRMT1-Depletion in Panc1-Zellen für die Anfertigung eines Microarrays zur Bestimmung des Genexpressionsprofils.....	111
Abbildung 22: Mengendiagramm der regulierten Gene in den Bedingungen des Genexpressionsarrays in Panc1-Zellen unter PRMT1-Depletion	112
Abbildung 23: Technische Validierung von Kandidatengenen aus dem Microarray	115
Abbildung 24: Validierung der Kandidatengene des Microarrays in weiteren Experimenten mit Depletion von PRMT1 in Panc1-Zellen (Teil 1)	120
Abbildung 25: Validierung der Kandidatengene des Microarrays in weiteren Experimenten mit <i>Knockdown</i> von <i>PRMT1</i> in Panc1-Zellen (Teil 2).....	122
Abbildung 26: Induktion eines konditionellen <i>Prmt1-Knockouts</i> in MEF-Zellen.....	124

Abbildung 27: Validierung der Kandidatengene des Microarrays in MEF-Zellen mit <i>Prmt1</i> - <i>Knockout</i>	125
Abbildung 28: Wachstumskurven von Panc1-Zellen im <i>GLIPR1-Knockdown</i>	129
Abbildung 29: PRMT1-ChIP in Panc1-Zellen unter <i>PRMT1-Knockdown</i>	131
Abbildung 30: Unterschiedliche Regulation mehrerer Sonden eines Gens am Beispiel <i>CEACAM1</i>	154

TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1: Auflistung aller Kandidatengene des Microarrays 114

Tabelle 2: Gegenüberstellung der Transkriptspiegel-Regulationen einzelner Kandidatengene
im Microarray mit deren technischer Validierung..... 116

Tabelle 3: Auflistung und Darstellung der Funktionsdetails zu Kandidatengen des
Microarrays, die unterschiedliche Regulationen in mehreren Arraysonden
aufwiesen 119

Tabelle 4: Aufstellung und Funktionsdetails der Kandidatengene des Microarrays, die
erfolgreich validiert werden konnten oder zu denen keine abschließende
Aussage getroffen werden konnte..... 127

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Abkürzungen in englischer Sprache sind gekennzeichnet (engl.). Die komplette Bezeichnung ist dabei - sofern möglich - in deutscher Sprache angegeben.

Abkürzung	Komplette Bezeichnung
α	anti
ABC	Avidin-Biotin-Complex
AG	Arbeitsgruppe
APS	Ammoniumperoxosulfat
β -Gal.	Beta-Galaktosidase
BSA	Bovines Serumalbumin
ca.	zirka
ChIP	Chromatin-Immunpräzipitation
CoIP	Coimmunpräzipitation
Ct (engl.)	<i>Cycle threshold</i>
Cy3	Cyanin 3
Cy5	Cyanin 5
Δ	delta
DAB	Diaminobenzidin
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dCTP	Desoxycytidintriphosphat
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTPs	Desoxyribonukleosid-Triphosphate
DOC	Natriumdeoxycholat
DTT	Dithiothreitol
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
ECL (engl.)	<i>Enhanced chemiluminescence</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EMT	epitheliale-mesenchymale Transition

engl.	englisch
FCS (engl.)	Fötale Kälberserum
GAR (engl.)	Glycin-Arginin-reich
GFP	grün fluoreszierendes Protein
GST	Glutathion-S-Transferase
HA	Hämagglutinin
HBS (engl.)	HEPES-gepufferte Salzlösung
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HRP (engl.)	Meerrettichperoxidase
IgG	Immunglobulin G
IP	Immunpräzipitation
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
KPi (-Puffer)	Kaliumphosphat (-Puffer)
LB (engl.)	<i>lysogeny broth</i>
Nr.	Nummer
OD	Optische Dichte
MEF (engl.)	Embryonale Maus-Fibroblasten
MET	mesenchymale-epitheliale Transition
NCBI (engl.)	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
PBS (engl.)	Phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PEI	Polyethylenimin
PIC (engl.)	Proteaseinhibitor-komplex
PIPES	Piperazin-1,4-bis(2-ethansulfonsäure)
PRMT	Protein-Arginin-Methyltransferase
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
RNA (engl.)	Ribonukleinsäure
RNAiMax	Lipofectamine RNAiMax
rpm (engl.)	Umdrehungen pro Minute
ROS (engl.)	Reaktive Sauerstoffspezies
ROX	6-Carboxy-X-Rhodamin
RT	Raumtemperatur

RT-qPCR	Reverse Transkription-quantitative Polymerase-Kettenreaktion
SAM	S-Adenosyl-L-Methionin
SDS (engl.)	Natriumdodecylsulfat = Natriumlaurylsulfat
SDS-PAGE (engl.)	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese
ssDNA (engl.)	DNA aus Lachssperma
TBS (engl.)	TRIS-gepufferte Salzlösung
TEMED	Tetramethylethyldiamin
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	Gewicht pro Volumen
z. B.	zum Beispiel

NOMENKLATUR

Für die Unterscheidung von Genen / Transkripten und Proteinen wird folgende Nomenklatur verwendet:

Humanes Gen / Transkript: komplette Großschreibung, kursiv ; z. B.: *PRMT1*

Humanes Protein: komplette Großschreibung ; z. B.: PRMT1

Murines Gen / Transkript: erster Buchstabe groß, kursiv ; z. B.: *Prmt1*

Murines Protein: erster Buchstabe groß ; z. B.: Prmt1

ZUSAMMENFASSUNG

Das Ziel dieser Arbeit war die Untersuchung der Rolle von PRMT1 im humanen duktalem Adenokarzinom des Pankreas. Ausgangspunkt hierzu war eine Veröffentlichung, die eine Überexpression von *PRMT1* auf Transkriptebeine im PDAC relativ zu gesundem Gewebe zeigte. Als erste Aufgabe wurde in der vorliegenden Arbeit der Frage nachgegangen, ob auch eine Erhöhung der Proteinspiegel von PRMT1 im PDAC-Gewebe vorliegt. Durch Vorarbeiten im Labor und im Rahmen dieser Arbeit konnte diese Fragestellung durch immunhistochemische Färbungen von Pankreasschnitten positiv beantwortet werden.

Um eine potenzielle Funktion dieser verstärkten *PRMT1*-Expression im PDAC zu untersuchen, wurde die Proliferationsfähigkeit der PDAC-Zelllinien Panc1 und MiaPaCa2 mittels Wachstumskurven bestimmt. Durch siRNA-vermittelte Depletion von PRMT1 in diesen Zellen wurde deutlich, dass das Protein für die Proliferationsfähigkeit essenziell ist. Diese Erkenntnis ließ sich durch eine Wiederholung des Experiments in HeLa-Zellen auch auf weitere Tumorzellen ausweiten. Zudem wurde die Fähigkeit von PDAC-Zellen zum ankerunabhängigen Wachstum in Soft-Agar-Assays untersucht. Nach Depletion von PRMT1 war diese Fähigkeit gehemmt.

In einem weiteren Teil dieser Arbeit wurden zuvor erbrachte Ergebnisse der Arbeitsgruppe bezüglich einer Assoziation des Transkriptionsfaktors GLI1 mit PRMT1 einer Validierung und weiteren Bearbeitung unterzogen. Mit Hilfe von Expressionsanalysen auf Transkriptebeine konnten keine belastbaren Hinweise auf einen Einfluss von PRMT1 auf die *GLI1*-Spiegel festgestellt werden. Eine Interaktion der beiden Proteine konnte weder *in vivo* noch *in vitro* nachgewiesen werden und eine Methylierung von GLI1 durch PRMT1 konnte nicht abschließend verifiziert werden. Eine Rolle von PRMT1 bei der Koaktivierung der GLI1-abhängigen Genexpression bleibt fraglich und bedarf weiterer Untersuchungen.

Dem Transkriptionsfaktor c-MYC wurde in Veröffentlichungen eine steigernde Wirkung auf die Expressionsrate von *PRMT1* im Zuge von Entwicklungsprozessen nachgewiesen. In der vorliegenden Arbeit wurde geprüft, ob dieser Mechanismus auch in Zellen des PDAC existiert. Mit Hilfe von c-MYC-Depletionen konnte bestätigt werden, dass in diesem System ebenfalls eine Regulation der Expression von PRMT1 durch c-MYC sowohl auf Transkript- als auch auf Proteinebene stattfindet.

Durch Hybridisierung eines Oligonukleotid-Microarrays wurde der Einfluss von PRMT1 auf das Transkriptom von Panc1-PDAC-Zellen analysiert. Von den 51 erhaltenen Kandidatengen, die unter siRNA-vermittelter PRMT1-Depletion mehr als zweifach in ihrer Expression reguliert waren, konnten bisher zwei Gene validiert werden. Für die Proteine GLIPR1 und ANXA8, die von diesen Genen kodiert werden, wurden in verschiedenen Publikationen bereits

tumorrelevante Funktionen nachgewiesen. Die weitere funktionelle Charakterisierung dieser Proteine im PDAC wird eine der Aufgaben im künftigen Verlauf des Projekts sein.

ABSTRACT

This thesis aimed to analyze the role of PRMT1 in human pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC). Given that overexpression of *PRMT1* has been reported to occur on transcript level in PDAC relative to healthy tissue, it was investigated here whether an increase of PRMT1 expression in PDAC tissue is also detectable on protein level. Immunohistochemical stainings revealed increased protein levels of PRMT1 in tumor cells as well as tumor stroma cells of the PDAC.

In order to study a potential biological function of this elevated *PRMT1* expression in PDAC, the proliferative capacity of the PDAC cell lines Panc1 and MiaPaCa2 was determined using growth curve assays. siRNA-mediated depletion of PRMT1 in these cells revealed an essential function of the protein for the replicative capacity. A similar growth disadvantage due to PRMT1 depletion was also observed in HeLa cells. Furthermore, the ability of PDAC cells to grow without anchorage was measured in soft agar assays. In conditions with PRMT1 depletion, this ability was inhibited.

In another part of this thesis, data previously generated in the group regarding an association of the transcription factor GLI1 with PRMT1 were validated and further investigated. Expression analyses did not show compelling evidence for an influence of PRMT1 on *GLI1* transcript levels. An interaction of the two proteins could not be confirmed *in vivo* or *in vitro* and methylation of GLI1 by PRMT1 was not conclusively verified. A role of PRMT1 in the coactivation of GLI1-dependent gene expression remains doubtful and needs additional research.

In the literature, it has been shown that the transcription factor c-MYC activates the transcription of the *PRMT1* gene in the course of developmental processes. In this work, the existence of this connection was studied in PDAC cells. Using depletion analysis of c-MYC, it was found that PRMT1 expression is enhanced by c-MYC on transcript as well as on protein level.

The influence of PRMT1 on the transcriptome of Panc1 PDAC cells was analyzed by oligonucleotide microarray-based gene expression profiling of PRMT1-depleted versus control-depleted cells. So far, two of the 51 candidate genes that were more than twofold regulated upon siRNA-mediated PRMT1 depletion could be validated. The corresponding proteins GLIPR1 and ANXA8 have previously been shown to have tumor relevant functions. Further functional characterization of these proteins in PDAC is needed in the future.

1 EINLEITUNG

1.1 PROTEIN-ARGININ-METHYLTRANSFERASEN

Im Jahr 2003 wurde die Entschlüsselung des humanen Genoms 13 Jahre nach Aufnahme der Arbeiten durch das Humangenomprojekt offiziell verkündet. Über die Komplexität des Genoms bestand während der Bearbeitungszeit Unklarheit, wobei die Schätzung anhand von Computeranalysen von 120.000 Genen und mehr ausging, um die vielfältigen Funktionen in humanen Zellen zu steuern. Nach Abschluss der Sequenzierung ist bekannt, dass die Genanzahl mit etwa 22.500 deutlich geringer ist [235], die Sequenzdaten alleine nicht voll aussagekräftig sind und für das Verständnis der Vorgänge in der Zelle nicht nur die Kenntnis der Basenabfolge erforderlich ist, sondern auch die genaue Definition von Genen und die Mechanismen der Umsetzung der Erbinformation in Proteine. Inzwischen ist offensichtlich, dass die Übersetzung der DNA sehr komplex ist und die differenzielle Expression von bestimmten Genen in Form von Isoformen einschließt, ebenso wie die Transkription von RNAs, die regulierende Funktion haben. Eine weitere Ebene der Regulation besteht in der Modifikation der Erbinformation selbst durch DNA-Methylierung. Doch nicht zuletzt werden auch die Genprodukte, also Proteine, vielfach modifiziert und damit in ihrer Funktion feinreguliert.

Eine Familie von Enzymen, die Histone sowie andere Proteine der Zelle modifizieren, sind die Protein-Arginin-Methyltransferasen (PRMTs). Ihre Aktivität besteht darin, mit Hilfe des Methylgruppendonors S-Adenosyl-Methionin (SAM) die kovalente Anknüpfung einer Methylgruppe an terminale Guanidinogruppen von Argininen zu katalysieren. Wie in Abbildung 1 zu sehen ist, existieren zwei grundlegende Arten der Arginin-Methylierung. Die Endprodukte, einerseits asymmetrisches Dimethyl-Arginin (ADMA) bei Typ I-PRMTs und andererseits symmetrisches Dimethyl-Arginin (SDMA) bei Typ II-PRMTs unterscheiden sich dabei in der Verteilung der beiden angefügten Methylgruppen. Bei SDMA ist je eine Methylgruppe pro Guanidinogruppe des Arginins kovalent gebunden, während bei ADMA beide Methylgruppen an derselben Guanidinogruppe gebunden sind. In die Typ II-Klassifikation fällt PRMT5, während PRMT1, PRMT2, PRMT3, PRMT4, PRMT6 und PRMT8 Enzyme des Typs I sind. Für PRMT9 wurde die Frage nach der Aktivität noch nicht schlüssig beantwortet, jedoch gibt es Hinweise, dass GST-aufgereinigtes PRMT9 Methylierungsaktivität besitzt [60]. Für PRMT7 wurden in der Literatur symmetrische Dimethylierungen beschrieben, die jedoch aufgrund methodischer Mängel kritisch diskutiert werden [99,131,165,200,334]. Bislang gilt für PRMT7 lediglich die Katalyse von Monomethyl-Arginin als gesichert, was nahelegt, dass es sich

um eine Arginin-Methyltransferase des Typs III handelt, wo monomethyliertes Arginin (MMA) bereits das Endprodukt ist.

PRMTs - mit Ausnahme von PRMT4 - methylieren bevorzugt GAR (*glycine-arginine-rich*)-Motive, also Sequenzen, die mehrere RG-Motive enthalten [334]. Jedoch können auch Arginine außerhalb solcher Bereiche methyliert werden. PRMTs sind im Allgemeinen ubiquitär exprimiert und meist sowohl im Zytoplasma, als auch im Zellkern zu finden. Die Lokalisation innerhalb der Zelle hängt dabei, beispielsweise im Fall von PRMT1, von der betrachteten Isoform ab [101]. PRMT8 hat als einziger Vertreter der Enzymfamilie eine begrenzte Gewebe-Expression und ist nur im Gehirn exprimiert. Auch seine Lokalisation nimmt eine Sonderrolle ein, da das Enzym an der Membran verankert ist [164].

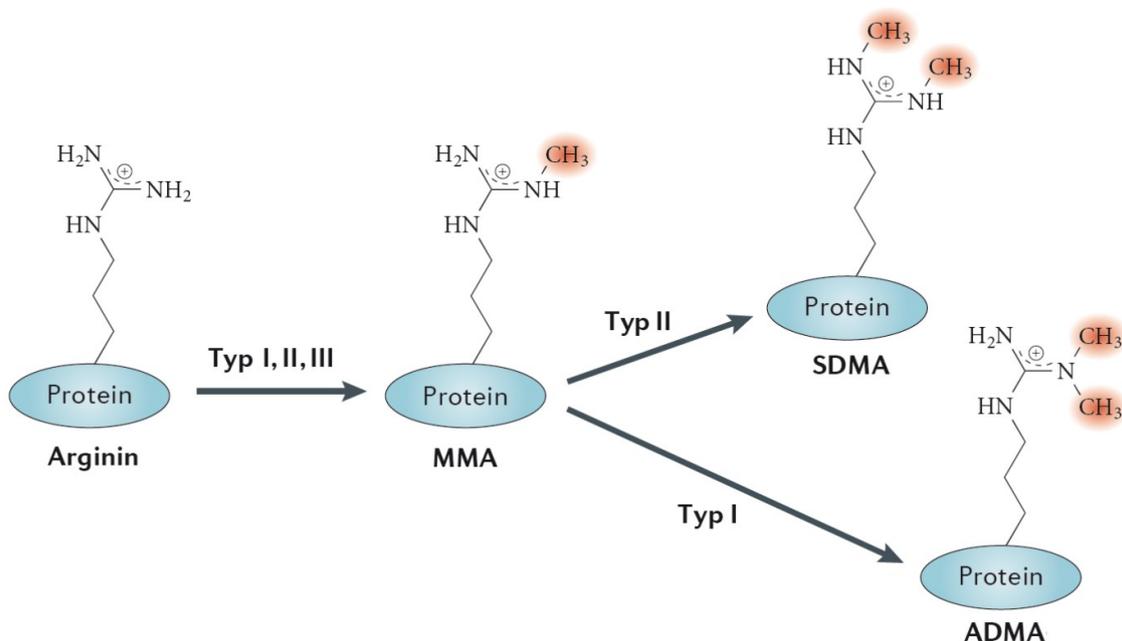


Abbildung 1: Schema der verschiedenen Arten der Protein-Arginin-Methylierung

Modifiziert aus [320]; MMA: Monomethyl-Arginin, SDMA: symmetrisches Dimethyl-Arginin, ADMA: asymmetrisches Dimethyl-Arginin.

Die Methylierung von Argininen in Proteinen verändert entscheidend deren Eigenschaften, wie die Fähigkeit zur Interaktion mit Nukleinsäuren und anderen Proteinen. Jedoch wird durch die Methylierung die positive Ladung der Aminosäure nicht abgeschirmt. Zum einen ändert sich durch die zusätzliche chemische Gruppe der räumliche Bau eines Proteins. Zum anderen wird durch die Methylierung jeweils eine der fünf möglichen Wasserstoffbrückenbindungen unterbunden, die ein Argininrest eingehen kann. Der Einfluss dieser Modifikation ist dabei sehr spezifisch, wie das Beispiel des RNA-bindenden Proteins SAM68 zeigt. Eine Methylierung

dieses Proteins bewirkt, dass seine Interaktion mit SH3-Domänen unterbunden wird, während eine Bindung an WW-Domänen weiterhin möglich ist [19].

Ob und inwieweit Methyl-Arginin *in vivo* demethyliert und damit die Methylierung umgekehrt werden kann, oder ob hierfür eine *de novo*-Proteinsynthese der Methyl-Arginin-tragenden Proteine nötig ist, wird noch untersucht. Es gibt einen ersten Hinweis, dass die Lysin-Demethylase JMJD6 auch zur Demethylierung von Methyl-Arginin befähigt ist [40]. Ein weiterer möglicher Mechanismus ist die Umwandlung von Methyl-Arginin in Citrullin durch die Peptidylarginin-Deiminase PAD4 [63,306]. Bereits in diesen Studien und in darauffolgenden Untersuchungen gab es jedoch Resultate, die nahelegten, dass die Deiminierung präferenziell bei unmethylierten Argininen und weniger bei methylierten stattfindet, sodass die Deiminierung eher einen Schutz vor der Methylierung darstellt [245]. Die Frage zur Umkehrung der Methylierung ist also nicht abschließend geklärt.

1.1.1 FUNKTIONEN DER PRMTS

Während in der Hefe lediglich vier Protein-Arginin-Methyltransferasen bekannt sind, sind es beim Menschen neun PRMTs. Im Verlaufe der Entdeckung von Funktionen der einzelnen Familienvertreter wurde indes klar, dass es sich dabei nicht um redundante Funktionen handelt, sondern, dass die einzelnen PRMTs spezifische Aufgaben erfüllen. Innerhalb der Familie der PRMTs hat PRMT1 hinsichtlich der anteiligen Aktivität eine Schlüsselrolle, denn der Großteil der Arginin-Methylierungsaktivität in murinen Zellen fällt Prmt1 zu [288]. Auch funktionell ist dieses Enzym für Zellen und Organismen essenziell. Mäuse, die einen *Prmt1-Knockout* tragen, sind nicht lebensfähig und sterben bereits am Embryonaltag 6.5 [234]. Mäuse mit einem *Knockout* von Prmt4 sterben bald nach der Geburt [317]. Im Gegensatz dazu sind *Prmt2-* und *Prmt3-Knockout*-Mäuse lebensfähig [285,324]. Ein *Prmt5-Knockout* führt in Mäusen ebenfalls an Embryonaltag 6.5, aufgrund von Defekten im Erhalt der Pluripotenz von ES-Zellen, zum Tod [290]. Mäuse mit *Prmt6-Knockout* sind lebensfähig, jedoch führt dies in MEF-Zellen zu rascher Seneszenz aufgrund erhöhter p53-Spiegel [220].

PRMTs methylieren Histone und Nicht-Histon-Proteine. Hierunter sind Transkriptionsfaktoren und Koaktivatoren der Genexpression. Jedoch werden auch viele weitere Proteine, unter diesen Faktoren von Signalkaskaden, methyliert. Entsprechend groß ist der Umfang an Funktionen in der Zelle, die von der Methylierung durch PRMTs reguliert werden. In der DNA-Schadensantwort methyliert PRMT1 die Exo- und Endonuklease MRE11. Dies ist wichtig für deren Aktivität, die Rekrutierung an Doppelstrangbrüche, die Anzahl der gebildeten γ H2AX-Foci und den Arrest der Zellen nach DNA-Schädigung [29,30]. Auch PRMT6 ist in der

Schadensreparatur involviert, indem es die DNA-Polymerase β methyliert und damit sowohl deren DNA-Bindung als auch die Prozessivität verstärkt [75]. Interessanterweise hat eine Methylierung durch PRMT1 an einem anderen Arginin dieser Polymerase die gegensätzliche Wirkung, indem es die Bindung an das Hilfsprotein PCNA verhindert [74]. PRMTs können also ein bestimmtes Ziel durchaus antagonistisch feinregulieren.

PRMT4 ist auch unter dem Namen CARM1 (*coactivator-associated arginine methyltransferase 1*) bekannt. Es erhielt diesen Namen aufgrund der Entdeckung, dass es ein Koaktivator nukleärer Rezeptoren ist, indem es seinerseits mit p160-Koaktivatoren interagiert [41,42]. Obwohl für die neun Vertreter der PRMT-Familie viele voneinander unabhängige Funktionen nachgewiesen wurden, gibt es Beispiele, bei denen zwei PRMTs Effekte nur oder zumindest verstärkt in Kombination bewirken. PRMT1 und PRMT4 bewirken beispielsweise nur zusammen eine effektive Induktion von STAT5-Zielgenen [152]. Auch NF κ B- und p53-Zielgene werden von PRMT1 und PRMT4 kooperativ in Koaktivator-Komplexen aktiviert [9,111]. PRMT1 und PRMT4 scheinen also oftmals eine gemeinsame koaktivierende Funktion auszuführen.

Zahlreiche weitere Signaltransduktionen in der Zelle sind von verschiedenen Vertretern der PRMT-Familie beeinflusst. Im Interferon-Signalweg verstärkt PRMT1 den wachstumsinhibierenden Effekt von Interferon β durch Bindung an den Interferon-Rezeptor (IFNAR) [1,7]. Durch NGF (*nerve growth factor*)-Stimulation von Zellen wird PRMT1 in seiner Methylierungsaktivität verstärkt [58] und in T-Zellen sind die Methyl-Arginin-Spiegel nach Kostimulation durch den CD28-Rezeptor erhöht [27]. Außerdem verstärkt PRMT1 die Aktivität der Promotoren von Interferon γ und IL-2 und ist wichtig für die Vermittlung von Effekten des T-Zell-Rezeptor-Signalwegs über den Transkriptionsfaktor NFATc2 durch die Methylierung des Kofaktors NIP45 [211].

Nach Insulin-Stimulation ist PRMT1 zunehmend membranständig lokalisiert und verstärkt die Effekte der Bindung von Insulin an den Rezeptor [127]. Im Zusammenhang mit dem Östrogenrezeptor (ER α) hat PRMT1 mehrere Funktionen. Zum einen ist das Enzym für die volle Aktivierung einiger transkriptioneller Zielgene des Rezeptors notwendig. Hierbei wird PRMT1 in zeitlicher Assoziation mit dem Rezeptor an Zielgene rekrutiert [299]. Zum anderen methyliert PRMT1 ER α direkt und ist essenziell für dessen Interaktion mit SRC und die Aktivierung von *Downstream*-Effekten [257]. Bei der Signalkaskade nach Stimulation des Androgenrezeptors haben sowohl PRMT2 als auch PRMT4 eine koaktivierende Wirkung bei der Genexpression [195]. PRMT4 koaktiviert ebenfalls den ER α [42].

Nicht zuletzt haben PRMTs einen Einfluss auf die Genexpression, indem sie Histone methylieren. PRMT1 methyliert H4R3 und PRMT4 die beiden Arginine H3R17 und H3R26 [267].

Die Methylierung von H4R3 hat eine aktivierende Funktion durch eine Förderung der Histon-Acetylierung, indem PCAF rekrutiert wird [170,300], während im Falle der H3R17-Methylierung der PAF1-Komplex rekrutiert wird, der eine Rolle in der Transkriptions-Elongation spielt. Dadurch führt die Methylierung von H3R17 durch PRMT4 zu gesteigerter Expression von Östrogen-Zielgenen [313]. PRMT5, welches eher als Repressor beschrieben wurde, kann H3R8 und wie PRMT1 ebenfalls H4R3 methylieren [227]. Während die Modifikation durch PRMT1 asymmetrisch ist, katalysiert PRMT5 die symmetrische Form. Interessanterweise haben diese beiden Modifikationen eine konträre Wirkung. Erstere ist aktivierender, letztere reprimierender Art. Durch welche Mechanismen diese Wirkung vermittelt wird, ist nicht abschließend geklärt. Es gibt Hinweise, dass die Form der Methylierung von bestimmten Proteinen spezifisch, zumindest in Kombination mit weiteren Modifikationen, ausgelesen wird. So bindet RAG2 trimethyliertes H3K4, was verstärkt wird, wenn symmetrisch dimethyliertes H3R2, nicht aber wenn asymmetrisch dimethyliertes H3R2 vorliegt [246]. Neben dieser Wechselwirkung zwischen vorhandenen Histon-Modifikationen und Histon-Arginin-Methylierungen existieren noch weitere, von denen ein Beispiel die Methylierung von H3R2 durch PRMT6 ist. Diese schließt sich mit der Trimethylierung von H3K4 wechselseitig aus [106,124]. In diesem Fall besteht die repressive Funktion von PRMT6 in der Verhinderung der Rekrutierung von Faktoren, die einen aktivierenden Histon-Status (H3K4-Trimethylierung) setzen. Das Protein TDRD3 kann asymmetrisch dimethylierte Histone mit seiner Tudor-Domäne spezifisch erkennen. Es wird in Abhängigkeit von PRMT4 an den pS2-Promotor rekrutiert und die Tudor-Domäne ist für die Koaktivierung notwendig [321]. Der Domäne kommt somit eine Schlüsselrolle beim Auslesen der Methylierung von Histonen zu.

Es sind auch Fälle bekannt, in denen die Arginin-Methylierung von Nicht-Histon-Proteinen im Zusammenhang mit weiteren posttranslationalen Modifikationen steht. Die Methylierung von FOXO1 durch PRMT1 blockiert die Phosphorylierung des Transkriptionsfaktors durch Akt, verhindert damit seine Degradation und verstärkt die Expression von FOXO1-Zielgenen [319].

PRMT7 interagiert mit CTCFL, einem Insulator-Protein, das unter anderem eine Rolle im *Imprinting* spielt [131]. Beim Gen *IGF2* (*insulin-like growth factor 2*) ist sowohl eine Expression von CTCFL, als auch von PRMT7 nötig, damit die Lokuskontrollregion von *IGF2* in Abhängigkeit von den DNMT3 *de-novo* DNA-Methyltransferasen methyliert wird. Als mechanistische Rolle von PRMT7 wird die Methylierung von H2A diskutiert, die durch Koexpression von CTCFL verstärkt wird. Damit ist auch ein Zusammenhang der Protein-Arginin-Methylierung mit dem Vorgang des *Imprintings* gegeben.

PRMT4 ist mit einem Faktor assoziiert, der eine Rolle im Chromatin-*Remodeling* spielt. Es interagiert mit der Chromatin-*Remodeler*-Familie Mi2, wobei die Aktivitäten beider Enzyme nötig sind, um c-MYB-Zielgene zu induzieren und beide zusammen mit c-MYB an Genbereiche rekrutiert werden [283].

Viele RNA-bindende Proteine, zu denen SAM68 gehört, weisen RG-Motive auf, wodurch sie potenzielle Ziele für PRMTs sind. Für viele dieser Proteine wurden Methylierungen nachgewiesen (Review [325]). Der Bau des Arginins als Donor für Wasserstoffbrückenbindungen erscheint ideal, um das Rückgrat der RNA in bestimmten Tertiärstrukturen zu binden [38]. Die Fähigkeit zur Bindung wird entsprechend durch eine Methylierung, welche die Anzahl an Wasserstoffbrückenbindungen reduziert, beeinflusst. Von der Methylierung der mRNA-bindenden Proteine leiten sich einige der Funktionen von PRMTs in der Zelle, unter anderem im Spleißen von pre-mRNA, ab. Mehrere verschiedene Sm-Proteine, die mRNA-bindende Eigenschaften haben und Bestandteil des Spleißosom sind, werden methyliert [34]. Das SMN-Protein bindet methylierte Sm-Proteine, wobei die Interaktion durch die Tudor-Domäne vermittelt wird. Mit SPF30 und TDRD3 sind zwei weitere Proteine bekannt, die Methyl-Arginine über ihre Tudor-Domäne binden [62]. Nur in methylierter Form kann die Interaktion zwischen SMN und Sm-Proteinen stattfinden, was für den Aufbau und entsprechende Funktionen des Spleißosoms notwendig ist [32,34,99]. Für PRMT4 wurde nachgewiesen, dass die Methylierungsaktivität eine Rolle beim alternativen Splicing spielt, indem sie zum Exon-Skipping führt [48].

Durch die Methylierung von mRNA-bindenden Proteinen haben PRMTs Rollen in zwei weiteren Zellfunktionen. Die sogenannten Keimbahn-Granula, in denen bestimmte RNA-Spezies (piRNA) zusammen mit PIWI-Proteinen und Tudor-Domänen-tragenden Proteinen interagieren, haben eine keimbahnspezifische Funktion im Unterdrücken von Transposons in *Drosophila* (Review [236]). PRMT5 methyliert mehrere PIWI-Proteine, und eine Depletion des Enzyms führt zur Akkumulation von Transposons in *Drosophila* [149]. In Stress-Granula, Orte an denen unter Stressbedingungen nicht korrekt translatierte mRNAs mit Proteinen akkumulieren (Review [11]), sind die Tudor-Proteine SMN und TDRD3 vorhanden. SMN ist für die Bildung der Granula wichtig [121] und für TDRD3 ist nachgewiesen, dass es in Abhängigkeit seiner Tudor-Domäne zu den Granula rekrutiert wird [100].

In mehreren Fällen wurde ein Einfluss der Arginin-Methylierung auf die Lokalisation von Proteinen nachgewiesen. Auch hier sind mRNA-bindende Proteine betroffen, wie beispielsweise Npl3p und Hrp1p (in Hefe), deren Export aus dem Nukleus von Hmt1p, dem Ortholog von humanem PRMT1, abhängig ist und die ohne Hmt1p nukleär vorliegen [270]. Die

Richtung des Einflusses einer Methylierung auf die Lokalisation von Proteinen ist dabei variabel. Beispielweise sind bestimmte Isoformen des Proteins FGF-2 (*fibroblast growth factor 2*) bei fehlender PRMT-Aktivität verstärkt zytoplasmatisch lokalisiert [237].

1.1.2 DIE REGULATION VON PRMTs

Die Regulation von PRMTs kann auf mehreren Ebenen stattfinden. In ihrer Funktion als Enzyme spielt hierbei auch die Kontrolle der katalytischen Aktivität eine große Rolle. Prinzipiell sind PRMTs ohne Bindungspartner konstitutiv aktiv und können Substrate methylieren. Dennoch sind Beispiele bekannt, bei denen die Aktivität der Enzyme durch Bindungspartner im Allgemeinen reguliert oder spezifisch auf bestimmte Substrate gelenkt wird. PRMT5 ist im sogenannten Methylosom, das den Bindungspartner MEP50 enthält, deutlich stärker aktiv [86]. Ein weiteres Beispiel, bei dem die Aktivität einer PRMT verändert wird, ist die Interaktion mit Chromatin-Remodelern. PRMT5 interagiert mit Komponenten des Swi/Snf-Komplexes, wodurch die Methylierungsaktivität auf Histon-Peptiden und Histonen erheblich gesteigert wird [227,229]. Durch den Interaktionspartner COPR5 erfährt PRMT5 eine spezifische Regulation, indem die Aktivität präferenziell auf H4R3, statt auf H3R8 gelenkt wird [159]. Zudem rekrutiert COPR5 die Methyltransferase an einzelne spezifische Zielgene wie *CYCLIN E1*. Im Falle von PRMT1 gibt es Hinweise, dass BTG1 einen verstärkenden Effekt auf die Aktivität von PRMT1 hat [24,173]. Das BTG1-interagierende Protein hCAF1 hat jedoch einen spezifischen Einfluss auf die PRMT1-Aktivität und verändert das Verhältnis der Methylierungsintensitäten verschiedener PRMT-Substrate [255].

Eine Beeinflussung der Aktivität oder der Spezifität von PRMTs durch Dimerisierung mit anderen Vertretern der Proteinfamilie ist noch weitgehend ungeklärt. Dennoch sind mehrere Interaktionen bekannt. PRMT1 wird in seiner Aktivität auf Histon H3 vielfach verstärkt, wenn es PRMT2 oder weitere PRMT1-Moleküle als Interaktionspartner zur Verfügung hat, wobei jeweils keine intakte Methyltransferase-Domäne der zusätzlichen PRMT-Moleküle von Nöten ist [226]. PRMT1 interagiert zudem mit PRMT8 [164]. Dies ist besonders interessant, da durch die Lokalisation von PRMT8 in der Zelle hierdurch eine zusätzliche Art der Regulation möglich ist. PRMT8 ist membranständig und könnte Rekrutierungen durchführen, wie dies bei der bereits erwähnten Rolle von PRMT1 in der Insulin-Signalkaskade diskutiert wird [127].

So wie PRMTs die Aktivität und Funktion anderer Enzyme und Proteine steuern, werden auch sie selbst durch posttranslationale Modifikation feinreguliert. PRMT4 wird automethyliert, was zwar keine Auswirkungen auf die Methyltransferase-Aktivität hat, jedoch für die koaktivierende Wirkung bei der Östrogenrezeptor-abhängigen Genexpression und für den

Einfluss auf das Splicing durch Exon-Skipping notwendig ist [157]. Auch PRMT6 und PRMT8 haben die Fähigkeit zur Automethylierung, und PRMT1 scheint zumindest *in vitro* schwach dazu in der Lage zu sein [84,260]. Im Falle der Automethylierung von PRMT8 wird diskutiert, dass dies ein Mechanismus zur Steigerung der Methylierungsaktivität durch PRMT8 selbst ist [260]. PRMT5 wird durch die JAK2-Kinase phosphoryliert, was die Interaktion mit MEP50 verhindert und die Methylierungsaktivität herabsetzt [177]. PRMT4 wird an den Serinen 217 und 228 phosphoryliert [80,117]. Beide Modifikationen verhindern die Bindung des Methylgruppendonors und damit die Methyltransferase-Aktivität. In letzterem Fall ist zusätzlich die Dimerisierung unterbunden, wodurch auch die Koaktivatorfunktion vermindert ist. Die Phosphorylierung an Serin 217 ist zellzyklusabhängig und treibt das Enzym aus dem Zellkern in das Zytoplasma, sodass die Beeinflussung der Lokalisation eine weitere Ebene der Regulation darstellt. Für PRMT5 wurde in der Immunhistochemie beobachtet, dass es in Prostatakrebszellen im Vergleich zu benignen Zellen verstärkt zytoplasmatisch färbbar ist. Relevanz erhält diese Beobachtung dadurch, dass zellkern-ständiges PRMT5 die Proliferation inhibiert, während zytoplasmatisches PRMT5 eine Induktion der Proliferation bewirkt [104].

Auch microRNAs sind bei der Regulation von PRMTs beteiligt. PRMT5 wird von mehreren dieser RNAs in seiner Expression inhibiert und die Spiegel dieser PRMT5-spezifischen RNAs sind in malignen B-Zellen vermindert [302]. Deren Re-Expression führt zur Repression von PRMT5, welches in B-Zellen auf translationaler Ebene überexprimiert ist und essenzielle Funktionen in der Proliferationsfähigkeit dieser Zellen hat.

Für *PRMT1* wurde eine Regulation auf Ebene der Transkription entdeckt und der zugrundeliegende Mechanismus charakterisiert [89]. Im Zuge der Thyroidhormon-abhängigen Metamorphose in *Xenopus Laevis* wird die Expression der Methyltransferase durch Bindung des Transkriptionsfaktors c-Myc an Genbereiche von *Prmt1* verstärkt. Die Bindestelle für c-MYC ist hierbei auch in der Maus und beim Menschen konserviert.

1.1.3 DIE ROLLE VON PRMTs IN TUMOREN

Als Regulatoren der Genexpression und auch in ihrer Eigenschaft als Koaktivatoren sind PRMTs in verschiedenen Krebsarten an Deregulationen beteiligt. Im Allgemeinen wurden für PRMTs im Gegensatz zu anderen Schlüsselproteinen wie p53 oder KRAS kaum Mutationen in Tumoren gefunden, wie der COSMIC (*catalogue of somatic mutations in cancer*)-Datenbank zu entnehmen ist. Hingegen ist die Überexpression der Enzyme eine häufige Beobachtung. Auch PRMT1 ist von dieser Regulation betroffen und es lassen sich erhöhte Spiegel in Leukämien, sowie in Blasen-, Lungen-, Brust- und Magenkrebs nachweisen [189,323,333]. Das Gen *MLL*

(*mixed-lineage leukaemia*, auch: *KMT2A*) weist in akuten Leukämien Fusionen auf, welche die Aktivität der kodierten Lysin-Methyltransferase konstitutiv aktivieren. Eines dieser Fusionsprodukte ist MLL-EEN, dessen tumorfördernde Eigenschaft im Zusammenhang mit PRMT1 steht, indem es das von PRMT1 methylierte Protein SAM68 binden kann. Funktionelle Versuche haben gezeigt, dass die Wirkung von MLL-EEN über SAM68 und PRMT1 vermittelt wird [51]. In der AML (akute myeloide Leukämie) ist PRMT1 wichtig für die Wirkungen eines weiteren Fusionsproteins, dem AML1-ETO-Protein. In diesem Fall interagiert PRMT1 mit dem Fusionsprotein, methyliert dieses und wird außerdem an Promotoren von Zielgenen rekrutiert, wo es deren Expression durch Methylierung von H4R3 steigert. Letztendlich ist es damit wichtig für die Fähigkeit der Zellen zur Selbsterneuerung [271].

Es wurden Korrelationen zwischen der Malignität von Tumoren und der Expression von PRMT1 festgestellt, wie beim Beispiel des Brustkrebses, wo eine starke Expression der Isoform 1 von *PRMT1* mit einer kürzeren Überlebensdauer korreliert [189]. In diesem Fall ist die Rolle von PRMT1 bereits gut untersucht. PRMT1 methyliert den Östrogenrezeptor, was dessen Interaktion mit SRC-3 verstärkt und für die Aktivierung von AKT und die Beeinflussung des Zellzyklus notwendig ist [257]. Ähnliche Korrelationen zwischen *PRMT1*-Expression und Überleben gibt es auch im Kolonkarzinom [188]. PRMT4 ist im Brustkrebs mit fortschreitendem Tumorgrad zusammen mit dem p160-Koaktivator SRC-3 verstärkt exprimiert, was in einer E2F1-abhängigen Heraufregulation des koaktivierten Zielgens *CYCLIN E1* mündet [194]. SRC-3 rekrutiert dabei PRMT4 an den *E2F1*-Promotor, was zur Methylierung von H3R17 führt und für die Proliferation von MCF7-Brustkrebszellen wichtig ist [88]. Auch PRMT2 ist in dieser Krebsart im Vergleich zu gesundem Gewebe verstärkt exprimiert. Die Häufigkeit der Überexpression ist in Östrogenrezeptor-positiven Tumoren erhöht, was die Rolle von PRMT2 in diesem Signalweg unterstreicht. Dabei reprimiert PRMT2 die Expression von *E-CADHERIN*, einem entscheidenden Gen des epithelialen Expressionsprogramms, in Abhängigkeit von Östrogen und dem koaktivierten *E-CADHERIN*-Repressor SNAIL [330].

PRMT1 ist ein negativer Regulator des WNT-Signalwegs, indem es den β -CATENIN-Repressor AXIN durch Methylierung stabilisiert, was letztendlich zu einer Inhibition des Signalwegs führt [39]. Der WNT-Signalweg ist in Tumoren in vielen Fällen dereguliert, wobei häufig eine Induktion des Signalwegs zu beobachten ist (Review [238]). Im Kolonkarzinom ist PRMT4 überexprimiert. Es interagiert mit β -CATENIN, wird an WNT-Zielgene rekrutiert, beeinflusst deren Expression positiv und erhöht die Proliferationsfähigkeit von Zellen [148,225]. Zudem wird die Expression von Matrixmetalloproteinasen von PRMT4 positiv reguliert [79]. Diese

Proteinasen haben bedeutende Funktion bei der Veränderung der Umgebung von Tumoren im Zuge der Metastasierung (Review [144]).

PRMT5 ist an vielen Regulationen, darunter auch bei tumorrelevanten Funktionen, beteiligt (Review [320]). Es spielt eine Rolle in der EMT (epitheliale-mesenchymale Transition), einem Schlüsselmechanismus der Metastasierung von Tumoren. Das Enzym agiert als Korepressor, wenn es an Genbereiche von *E-CADHERIN* rekrutiert wird [120]. Es ist dabei durch die Methylierung von H4R3 mitverantwortlich für eine Repression von *E-CADHERIN*. Eine Überexpression von Prmt5 führt in Maus-Fibroblasten zu ankerunabhängigem Wachstum [227]. Dieser Umstand scheint von Tumoren genutzt zu werden, da für PRMT5 erhöhte Spiegel in Magenkarzinomen, Lymphomen und Leukämien gefunden wurden [145,228]. PRMT5 methyliert außerdem p53. In Kolonkarzinomzellen führt eine Depletion des Enzyms zu verstärkter p53-abhängiger Apoptose in Folge von DNA-Schaden [129].

PRMT6 ist in Blasen- und Lungenkrebs verstärkt exprimiert und seine Depletion wirkt sich negativ auf die Proliferation entsprechender Zelllinien aus [323]. PRMT6-depletierte Zellen weisen zudem Defekte in der Fähigkeit zur Migration auf, ein Umstand, der auf die Hemmung der Expression des Proteins TSP-1 (THROMBOSPONDIN 1) durch PRMT6 zurückgeführt wird [198]. TSP-1 selbst ist ein negativer Regulator der Angiogenese und Tumorgenese.

Für PRMT7 ist keine definitive Funktion in Tumoren bekannt. Jedoch wurde in einer Meta-Analyse entdeckt, dass die chromosomale Region, die das *PRMT7*-Gen enthält, in metastasierten Brusttumoren gegenüber nicht-metastasierten Tumoren verstärkt exprimiert wird [294].

1.2 DAS DUKTALE ADENOKARZINOM DES PANKREAS

1.2.1 BIOLOGIE DES PANKREAS UND EPIDEMIOLOGIE DES PDAC

Der Pankreaskrebs ist in Deutschland die vierthäufigste Todesursache unter allen Krebserkrankungen. Etwa 95 % aller Fälle betreffen hierbei das duktale Adenokarzinom des Pankreas (PDAC, *pancreatic ductal adenocarcinoma*) und nur wenige Fälle andere maligne Arten des Pankreaskrebses wie das Azinuszell-Karzinom oder endokrine Tumoren. Trotz intensiver Forschungen ist die relative Häufigkeit an Todesfällen beim Pankreaskrebs von 1999 bis 2008 auf ähnlich hohem Niveau geblieben, was auf eine limitierte Erfolgsrate bei neuen Behandlungsmethoden hinweist. Zudem erfolgt die Diagnose meist in späten Tumorstadien, sodass operative Eingriffe nicht mehr ausreichen. Die relative 5-Jahres-Überlebens-

wahrscheinlichkeit liegt bei lediglich 7-8 % (Datenerhebung 2008, aus dem Zentrum für Krebsregisterdaten des Robert-Koch-Instituts). Die Zahl der Neuerkrankungen (Inzidenz) des PDACs ist beständig ansteigend.

Als begünstigend für die Entwicklung eines Pankreastumors gelten unter anderem Lebensumstände wie das Rauchen, ein vorhandener Diabetes vom Typ 2 und übermäßiger Alkoholkonsum [112]. Besondere Bedeutung hat eine chronische Entzündung des Pankreas (Pankreatitis), welche das Risiko, an einem PDAC zu erkranken, deutlich erhöht [187]. Unterstützend zu dieser These steigert die Mutation des Gens *PRSS1* (*TRYPSINOGEN*), was zur Ausbildung einer chronischen Pankreatitis führt, die Wahrscheinlichkeit zur Entwicklung eines PDACs um das 53-fache [183]. Die zuvor genannten Risikofaktoren (Rauchen, Diabetes und Alkohol) führen ebenfalls zu chronischer Pankreatitis, wodurch der Mechanismus der Auslösung eines PDACs durch diese Faktoren gegeben ist (Review [316]). Zusätzlich lässt sich in einigen Fällen eine genetische Prädisposition erkennen, wenn bereits mehrere Familienmitglieder einen Tumor des Pankreas entwickelt hatten.

Das PDAC hat seinen Ursprung im exokrinen Teil des Pankreas. Dieser macht 80 % der Organmasse aus. Funktionell dient er der Produktion von Verdauungsenzymen in Form von inaktiven Zymogenen in den sogenannten Azini (Endstücken) und dem Transport dieser Enzyme durch ein Gangsystem in den Verdauungstrakt. Abbildung 2 verdeutlicht den Bau dieses Organteils schematisch und anhand eines histologischen Präparats.

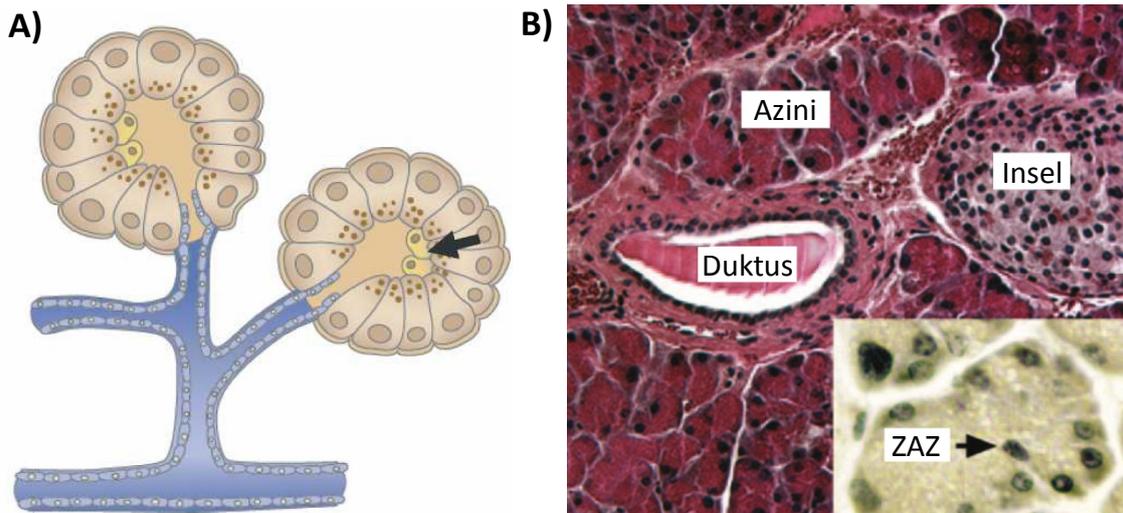


Abbildung 2: Histologischer Aufbau des Pankreas

- (A) Schematische Darstellung zweier Azini (braun gefärbte Zellen), die Verdauungsenzyme produzieren und diese über ausführende Dukti (blau) ausleiten. Der Pfeil kennzeichnet zentroazinäre Zellen, die im Lumen der Azini, meist in Nähe der Ausführgänge, lokalisiert sind. Aus [116].
- (B) Histologisches Bild eines Pankreas-Schnittes. Zu sehen sind mehrere Azini (oberer Bereich), sowie ein größerer Duktus mit flachem Epithel, eingebettet in Bindegewebe (mittig). Eine Langerhans'sche Insel ist rechts in etwas hellerer Anfärbung zu erkennen. Im eingeschobenen Bild (rechts unten) ist in größerer Vergrößerung eine zentroazinäre Zelle (ZAZ) inmitten eines Azinus gekennzeichnet. Modifiziert aus [280].

Mehrere azinäre Zellen formen dabei einen Azinus (Abbildung 2 A, braun), der Enzyme produziert und über die Gänge (Dukti, blau) ausleitet. Zentroazinäre Zellen im Inneren der Azini haben hauptsächlich eine regulierende Funktion auf die Zusammensetzung des gebildeten Sekrets (gelb, Pfeil). Die histologische Färbung in Abbildung 2 B zeigt eine Gruppierung von mehreren Azini sowie einen Duktus mit regelmäßigem, flachem Epithel, in gesundem Pankreasgewebe. Eine Langerhans'sche Insel ist ebenfalls auf dem Schnitt enthalten. In diesem spezialisierten Kompartiment befinden sich Zellen des endokrinen Teils des Pankreas. In ihnen werden die Hormone Glucagon, Insulin, Somatostatin, pankreatisches Polypeptid und Ghrelin produziert, wodurch den Inseln Funktionen in der Regulation des Blutzuckerspiegels, verschiedenen Verdauungsfunktionen und des Hungergefühls zukommen. Der Einschub in Abbildung 2 B zeigt eine zentroazinäre Zelle („ZAZ“) in einem Azinus.

1.2.2 ENTWICKLUNG UND URSPRUNG DES PDAC

Das PDAC entwickelt sich über Vorläuferstadien, die histologische Auffälligkeiten zeigen und Änderungen im Expressionsprogramm aufweisen. Die am besten untersuchten und am häufigsten auftretenden Vorläuferstadien sind die sogenannten PanINs (*pancreatic intraepithelial neoplasias*), die histologisch an veränderte Dukti erinnern. Weitere Vorläuferstadien sind muzinöse zystische Neoplasien (MZN) und intraduktale papilläre muzinöse Neoplasien (IPMN), die mit geringerer Häufigkeit auftreten. Die Entwicklung von PanINs ist geprägt von einer morphologischen Veränderung der Duktus-Epithelzellen, ausgehend von einem flachen hin zu einem säulenförmigen Epithel mit Atypien der Zellen und Zellkerne (Review [186]).

Wie in Abbildung 3 dargestellt, werden drei PanIN-Stadien unterschieden. Die Veränderung der Zellform mit vermehrter Schleimabsonderung charakterisiert das PanIN1-Stadium. Im weiteren Verlauf (über PanIN2) entwickeln sich Atypien der Zellkerne, darunter auch Chromosomenaberrationen, sowie Veränderungen in der gleichmäßigen Anordnung der Zellen in Form von papillären Auffaltungen. Im Stadium PanIN3 schließlich ist das *carcinoma in situ* erreicht, bevor im PDAC Invasionen der entarteten Zellen in das umliegende Gewebe auftreten. Über den gesamten Verlauf der Entwicklung nimmt der Gehalt an umliegendem Bindegewebe zu, wo zudem große Mengen an extrazellulärer Matrix sezerniert werden. Dies wird als Desmoplasie bezeichnet. Sie verdrängt im histologischen Bild zunehmend die normalen Strukturen des Pankreas wie die Azini und Langerhans'schen Inseln.

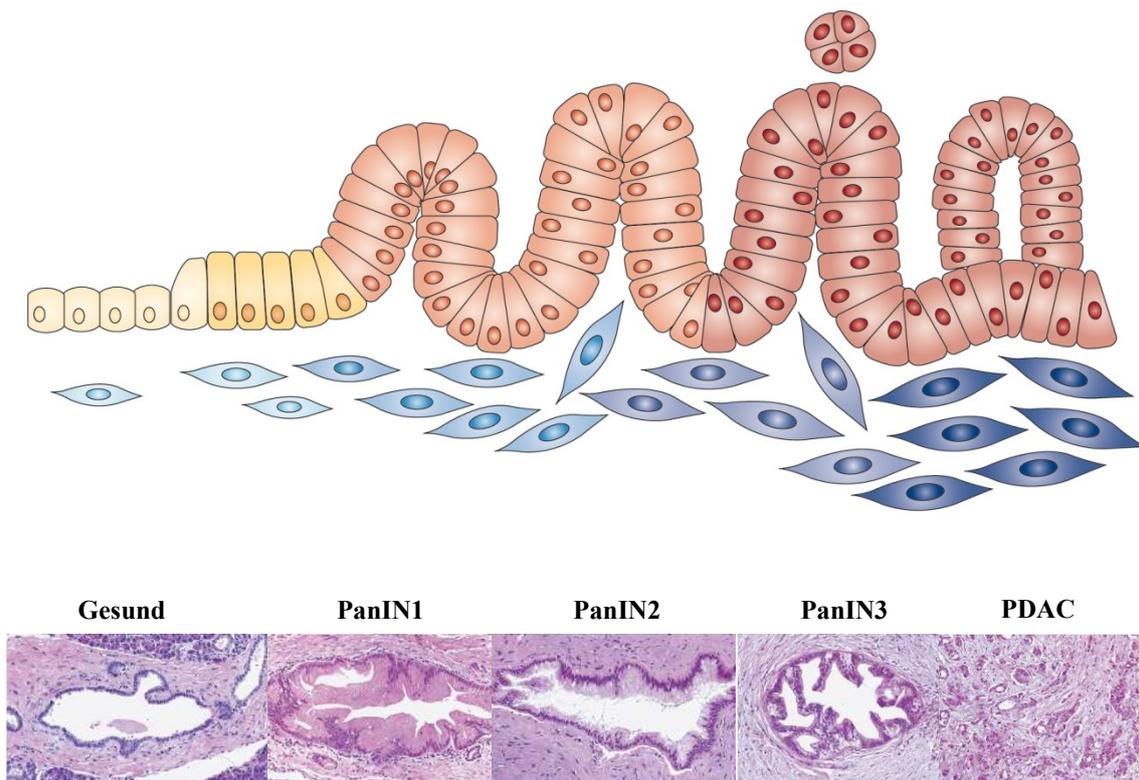


Abbildung 3: PanINs als Vorstufen des PDAC

Die schematische Darstellung (oben) veranschaulicht die grundlegenden Charakteristika von Duktus während der Entwicklung eines PDACs aus gesundem Gewebe über die PanIN-Vorstufen. Modifiziert aus [208].

Im unteren Teil sind histologische Färbungen von Pankreas-Präparaten abgebildet, welche die verschiedenen Stadien der Entwicklung des PDAC zeigen. Modifiziert aus [116]. In beiden Illustrationen ist der steigende Anteil der Desmoplasie zu erkennen.

Die Einteilung in diese drei Klassen an PanINs ist umstritten, da die Eingliederung schwierig und oft nicht reproduzierbar ist (Review [186]). Generell werden PanIN1- und PanIN2-Stadien zu niedriggradigen und PanIN3-Stadien zu hochgradigen Vorläuferstadien gezählt. Niedriggradige PanINs sind eine häufige Beobachtung vor allem in älteren Individuen, auch ohne entwickelten PDAC, und bedürfen keiner Behandlung, während das Auftreten von PanINs der Stufe 3 aufgrund der Progression zum PDAC Behandlungsbedarf anzeigt. Eine Untersuchung, welche die Expression einiger bekannter tumorrelevanter Proteine in PanINs mit Hilfe eines Gewebe-Arrays überprüfte, zeigte, dass klassische Tumormarker, wie p53 und die proliferationsrelevanten Proteine CYCLIN D1 und KI-67, erst im PanIN3-Stadium gesteigert exprimiert sind. In frühen Stadien werden eher Proteine überexprimiert, die beispielsweise Funktionen bei der Schleimproduktion und dem Zellverband haben [185].

Das histologische Bild des PDACs ist von einer umfangreichen Metaplasie geprägt, also dem augenscheinlichen Umwandeln ausdifferenzierter Pankreaszellen und -strukturen, wie den

Azini, in ein von Dukti geprägtes Gewebe. Die Morphologie von PanINs und PDACs hat zu der Annahme geführt, dass diese Läsionen von epithelialen Zellen ausgehen. Neuere und detailliertere Untersuchungen zur Herkunft des PDACs mit Hilfe von Markern zeigen jedoch, dass andere Zelltypen als Quelle für die epithelialen Strukturen in Frage kommen. Eine Behandlung von Explantaten aus Mäusen mit den Wachstumsfaktoren TGF α und HGF bewirkt die Umwandlung azinärer in duktale Strukturen [190]. Durch Sichtbarmachung der Zellen mit einer Markerprotein-Expression unter Kontrolle eines Azinuszell-spezifischen Promotors wurde nachgewiesen, dass eine direkte Transdifferenzierung der azinären Zellen in epitheliale Zellen stattfindet und nicht lediglich eine Depletion azinärer Zellen vorliegt. Dabei lag eine Zellpopulation als Intermediat vor, die sowohl azinäre, als auch epitheliale Markerproteine, zusammen mit einem Markerprotein für exokrine Vorläuferzellen (NESTIN) exprimierte. Dies weist darauf hin, dass azinäre Zellen durch De- oder Transdifferenzierung den Charakter duktaler Zellen annehmen, wenn eine Stimulation durch Wachstumsfaktoren erfolgt. Diese Situation liegt auch bei Gewebereparaturen wie beispielsweise im Zuge der Pankreatitis vor (Review [219]).

Zentroazinäre Zellen sind weitere Kandidaten für den zellulären Ursprung im PDAC. Bei einem *Knockout* von *Pten* proliferieren zentroazinäre Zellen und bilden duktusähnliche Strukturen, welche die azinären Strukturen ersetzen [281]. Ein *Knockout* von *Pten* in azinären Zellen hat diesen Effekt nicht. *Pten* ist ein negativer Regulator des PI3K-Signalwegs. Letzterer wird auch von mutiertem KRAS induziert. Als Ursache wird diskutiert, dass in zentroazinären Zellen im adulten Pankreas das Notch-Zielgen HES1 exprimiert wird, was auf einen aktiven Signalweg hindeutet [203]. *Notch* ist wichtig für den Erhalt des undifferenzierten Status von Vorläuferzellen und die Expression von konstitutiv aktivem Notch1-Rezeptor führt zu einer ausbleibenden Differenzierung exokriner und auch endokriner Pankreas-Zellen mit der Bildung duktusähnlicher Strukturen [215]. Zentroazinäre Zellen könnten daher anfälliger für die Dedifferenzierung oder Transdifferenzierung aufgrund erworbener Mutationen sein.

Erkenntnisse aus PDAC-Modellen beim Hamster deuten an, dass auch Inselzellen Ausgangspunkt für die Entwicklung eines PDAC sein können. Behandlungen mit einem Karzinogen lösen PDACs aus, was jedoch verhindert werden kann, wenn zuvor die β -Zellen des Pankreas depletiert werden [239]. Die Transplantation von Inselzellen löst zudem die Entwicklung von abnormen dukталen Strukturen bei Hamstern an der Stelle der Transplantation aus [240]. Einschränkend muss hier angemerkt werden, dass eine Kontamination mit nicht-Inselzellen nicht ausgeschlossen werden kann.

1.2.3 ÄNDERUNGEN DES EXPRESSIONSPROGRAMMS IM PDAC

1.2.3.1 KRAS-MUTATIONEN UND DEREGULIERTE WACHSTUMSFAKTOREN

Die prominenteste der Veränderungen im Expressionsprogramm, die im PDAC gefunden wird, ist die Mutation von *KRAS*. Bereits im Stadium der chronischen Pankreatitis ist dies nachweisbar. Jedoch werden auch in gesundem Pankreas-Gewebe teilweise bereits *KRAS*-Mutationen detektiert, sodass die Aussagekraft als Tumormarker in frühen Stadien strittig ist [181]. Allerdings steigt die Mutations-Häufigkeit mit fortschreitendem Grad der PanINs stark an und erreicht im PDAC nahezu 100 % der untersuchten Fälle [311]. Zudem wurden in einzelnen Patienten in verschiedenen Neoplasien innerhalb eines Pankreas unterschiedliche *KRAS*-Mutationen nachgewiesen, was ein weiteres Indiz für die Häufigkeit dieser Mutationen ist [210]. Hinweise, dass die *KRAS*-Mutationen funktionell bedeutend sind, wurden unter anderem durch Verwendung einer siRNA-vermittelten Depletion von *KRAS* in PDAC-Zellen gefunden [83]. Hier induzierte der *Knockdown* die Apoptose und verminderte die Proliferationsfähigkeit sowie die Migration von PDAC-Zellen. Auch die Expression von VEGF (*vascular endothelial growth factor*) war verringert.

Die chronische Pankreatitis ist, wie erwähnt, ein bedeutender Risikofaktor für die Entstehung eines PDACs. Als zugrundeliegender Mechanismus wird diskutiert, dass die Gewebeschädigung durch Freisetzung von Wachstumsfaktoren im Zuge der Gewebereparatur zu einer gesteigerten Proliferation führt und dadurch zur Selektion von Mutationen beiträgt, die auch durch die Freisetzung von reaktiven Sauerstoffspezies aufgrund der Entzündung mitverursacht werden. Im Zuge der Reparatur proliferieren azinäre Zellen und nehmen dabei morphologische Charakteristika von Dukti an und exprimieren zudem Marker wie ZYTOKERATIN 19 (Reviews [116,208]). Dieser Zustand ist nicht von Dauer und nach Abschluss der Reparatur differenzieren die Zellen erneut. Jedoch verhindert eine *Kras*-Mutation die Rückkehr der Zellen zu ihren differenzierten Formen [207]. Durch die Notwendigkeit der Gewebereparatur mit der damit verbundenen Dedifferenzierung in der chronischen Pankreatitis ist damit ein Zustand gegeben, der eine zufällige somatische Mutation von *KRAS* und/oder weiteren Signalwegen selektiert.

Bestandteile der Signalwege von Wachstumsfaktoren über EGF-Rezeptoren sind im PDAC dereguliert. So ist der EGF-Rezeptor ERBB-3 in PDAC-Schnitten überexprimiert und dies korreliert mit einer ungünstigen Prognose [87]. Auch weitere EGF-Rezeptoren (EGFR und HER-2) sowie Wachstumsfaktoren (EGF und TGF α) sind im PDAC relativ zu normalem Gewebe überexprimiert [154,311] und im Tiermodell wurde eine positive Wirkung von EGF und TGF α

auf das Wachstum von Pankreastumoren gezeigt [68]. IGF-1 induziert die Proliferation von PDAC-Zellen, aktiviert die MAPK- und PI3K-Signalwege, und die Aktivität des IGF-1-Rezeptors ist wichtig für die Unterdrückung der Apoptose [217]. Sowohl *IGF-1* als auch sein Rezeptor sind im PDAC auf Transkriptebene überexprimiert [22]. Auch weitere Wachstumsfaktoren haben eine Rolle im PDAC und sind dort verstärkt exprimiert, hierunter HGF und FGF [90,155]. Bedeutend ist, dass KRAS und die nachgeschaltete Signalkaskade durch den EGF-Rezeptor aktiviert wird (Review [275]). Da eine *KRAS*-Mutation unter Depletion des EGF-Rezeptors alleine nicht ausreichend ist, um PDACs zu induzieren, wird diskutiert, dass ein gewisser Schwellenwert an KRAS-Aktivität überschritten werden muss, damit PDACs entstehen. Zusätzlich zur Mutation des Gens könnte das durch weitere deregulierte Signalwege, die KRAS induzieren, erreicht werden. Die Ausschüttung von Wachstumsfaktoren im Zuge der Regeneration wird als eine mögliche Ursache für die Proliferation von Zellen mit Mutationen von *KRAS* durch klonale Selektion gesehen und stellt eine plausible Erklärung für die Rolle der Pankreatitis als Risikofaktor dar.

Mäuse mit mutiertem *Kras* weisen zwar schnell PanINs auf, doch diese entwickeln sich erst nach langen Latenzzeiten zu hochgradigen Läsionen und PDACs [118]. Bei gleichzeitiger Depletion der Tumorsuppressoren $p16^{\text{Ink4a}}$ und $p19^{\text{Arf}}$ durch Deletion des *Cdkn2a*-Gens, das in alternativen Leserastern für beide Proteine kodiert, entwickeln sich im Mausmodell im Gegensatz zum alleinigen *Kras-Knockin* schnell und häufig PDACs mit schlechter Prognose [3]. Funktionell führt die Mutation von *KRAS* zum Austausch bestimmter Aminosäuren vor allem an der Nukleotid-Bindedomäne. Dies befähigt das Protein, aufgrund der Inaktivierung der GTP-Hydrolysefähigkeit, zur dauerhaften Bindung von GTP. Dadurch wird die nachfolgende Signalkaskade aktiviert, ohne dass hierfür das Vorhandensein von Wachstumsfaktoren nötig ist. Die Tatsache, dass die Mutationen inaktivierender Art sind (Verlust der Hydrolysefähigkeit), erschwert die Nutzung des Wissens für therapeutische Zwecke, da hierfür keine klassischen Inhibitoren entwickelt werden können. KRAS führt zur Aktivierung verschiedener Signalwege. Die Hemmung von nachfolgenden Enzymen in diesen Kaskaden stellt dadurch eine Alternative in der Therapie dar. Tatsächlich zeigen Inhibitoren des RAF-MEK-ERK-Signalwegs, der nach KRAS-Aktivierung für den Signalweg essenziell ist, Wirkung auf PDAC-Zellen in Form von reduzierter Proliferation [107]. Auch die Signalkaskade über PI3K und mTor, die ebenfalls durch *Kras* aktiviert wird, vermittelt Effekte der *Kras*-Mutation. Das Wachstum kultivierter Pankreas-Epithelzellen der Maus wird durch mutiertes *Kras* in Abhängigkeit vom PI3K-Signalweg verstärkt, sowie der Verlust der Expression von *E-Cadherin* induziert [2].

1.2.3.2 DEREGULATIONEN ENTWICKLUNGSRELEVANTER SIGNALWEGE

Weitere Signalwege wie *Hedgehog* und *Notch*, die im PDAC dereguliert sind, haben Relevanz in Entwicklungsprozessen. Der *Hedgehog*-Signalweg hat bedeutende Funktionen in der Erhaltung von Stammzellen, der Geweberegeneration sowie in Entwicklungsvorgängen (Reviews [133,208]). Die in Säugern vorhandenen Liganden SHH, DHH und IHH (*sonic*, *desert* und *indian hedgehog*) setzen dabei eine Signalkaskade in Gang, die Einflüsse auf Funktionen wie die Zellproliferation hat. Am Beginn der Kaskade steht die Bindung der Liganden an den Rezeptor PATCHED, der das Transmembranprotein SMOOTHENED hemmt. Nach Ligandenbindung ist diese Hemmung unterbunden. Eine weitere Auswirkung ist die Akkumulation von aktiven Formen der GLI-Transkriptionsfaktoren (GLI1, GLI2 und GLI3). GLI2 und GLI3 können in aktivierender und reprimierender Form vorliegen, wobei bei GLI2 die aktivierende Form stabiler ist und es daher einen aktivierenden Transkriptionsfaktor darstellt, während GLI3 aufgrund der favorisierten repressiven Form eher hemmende Wirkung hat. Die Expression von GLI1, welches nur als Aktivator vorliegt, wird nach Ligandenbindung induziert und verstärkt die aktivierenden Funktionen der Kaskade. Die Aktivität der Transkriptionsfaktoren wird reguliert, indem diese ohne Bindung der Liganden an den Rezeptor zu repressiven Formen degradiert werden. Diese Degradation bleibt nach Ligandenbindung aus und es kommt zusätzlich zu einer Verlagerung der Lokalisation von GLI in den Zellkern. Hedgehog-Zielgene sind unter anderem das *Gli1*-Gen selbst sowie *Cycline* [142], *N-Myc* [199] und das anti-apoptotische Gen *BCL2* [247].

In Tumoren sind verschiedene Bestandteile des Signalwegs dereguliert, beispielsweise durch Depletion von repressiven oder Überexpression von aktivierenden Faktoren des Signalwegs, sowie durch Veränderung der Balance aktivierender zu reprimierenden GLI-Transkriptionsfaktoren [208]. Dem Hedgehog-Signalweg kommt im PDAC auch deshalb eine besondere Bedeutung zu, da für diesen eine parakrine Wirkung auf Zellen nachgewiesen wurde. Der SHH-Ligand ist in PanINs und PDACs im Laufe der Tumor-Entwicklung verstärkt exprimiert und eine Repression des Signalwegs hemmt das Tumorwachstum und induziert die Apoptose [292]. In den Epithelzellen produziertes SHH induziert dabei die Hedgehog-Signalkaskade in Stromazellen, nicht jedoch in den Epithelzellen selbst [322]. Durch eine Depletion von Smoothened in Bindegewebszellen wurde zudem klar, dass eine spezifische Hemmung von Hedgehog im Stroma das Wachstum des gesamten Tumors inhibiert. Neben dem Shh-Protein ist auch das *Gli1*-Transkript im PDAC der Maus überexprimiert [221]. In PDAC-Zellen ist GLI1 wichtig für die Proliferationsfähigkeit und eine Depletion von GLI1 führt zur Auslösung der Apoptose [221]. Interessanterweise wurde durch direkten Vergleich der

Expressionsspiegel erkannt, dass *Gli1* etwa 100-fach stärker im Stroma exprimiert ist, als im Epithel [296]. Unter Einbezug der bereits erwähnten Tatsachen, dass SHH in Epithelzellen überexprimiert ist, aber für die Signalkaskade in eben diesen Zellen nicht essenziell ist [322], stellt sich die Frage, wie die Aktivierung der Zielgenexpression, unter anderem von *GLI1*, in den Epithelzellen stattfindet. In diesem Zusammenhang konnte gezeigt werden, dass sowohl mutiertes *KRAS* als auch die Stimulation mit TGF β die Hedgehog-Signalkaskade in Tumor-Epithelzellen unabhängig vom SMOOTHENED-Rezeptor und damit Liganden-unabhängig induzieren [70,132,162,221]. Warum ein relativ geringer Spiegel an *GLI1* für PDAC-Epithelzellen von Vorteil sein könnte, wurde klar, als entdeckt wurde, dass eine Depletion von *GLI1* in PDAC-Zellen die Expression von E-CADHERIN verringert und zum Verlust weiterer epithelialer Marker sowie zu gesteigerter Motilität führt [135].

Tumor-assoziierte Fibroblasten, sogenannte Myofibroblasten als aktivierte Pankreas-Sternzellen, sind wichtiger Bestandteil des desmoplastischen Stromas in PDACs. Diese Zelltypen sezernieren viel extrazelluläre Matrix und werden als entscheidende Komponenten der Aufrechterhaltung von Tumoren gesehen, unter anderem durch Förderung des Tumorwachstums und der Angiogenese (Reviews [137,208]). SHH führt im PDAC zu vermehrter Rekrutierung und Proliferation von diesen Fibroblasten [15], wodurch eine positive Rückkopplung zwischen verstärkter Desmoplasie und Proliferation der Tumorzellen gegeben ist.

Verschiedene Komponenten des *Notch*-Signalwegs sind im PDAC gegenüber gesundem Gewebe verstärkt exprimiert [203]. Dabei wird die *Notch*-Signalgebung durch TGF α aktiviert. Es wurden auch Zusammenhänge der Überexpression von *Notch*-Bestandteilen mit auftretenden Mutationen von *KRAS* entdeckt, wobei sich diese beiden Umstände bei der Auslösung von PanINs und PDACs verstärken (Review [222]). Die genannten Beispiele machen deutlich, dass die Vielzahl der bekannten Deregulationen im PDAC nicht nur unabhängige Ereignisse sind, sondern ein Netzwerk an Auswirkungen und Interaktionen bilden.

Weiterhin ist die entwicklungsrelevante WNT/ β -CATENIN-Signalkaskade durch verstärkte Aktivierung einzelner Bestandteile im PDAC dereguliert [233]. Neueste Untersuchungen belegen eine essenzielle Rolle dieser im PDAC [328]. Wird diese gehemmt, folgt daraus eine Blockierung der Entwicklung von PanINs und PDACs in *Knockin*-Mäusen, die mutiertes *Kras* exprimieren. Auch die azinäre-duktales Metaplasie wird unterbunden. Zudem ist der Signalweg notwendig für die Proliferation von PDAC-Zellen und eine Blockade induziert die Apoptose [233]. Dies stellt eine Diskrepanz zur Erkenntnis dar, dass die Hemmung von β -Catenin durch mutiertes *Kras* ursächlich für die azinäre-duktales Metaplasie bei der

Regeneration nach Gewebeschädigungen ist [207]. Es scheinen zeitlich gesteuerte Funktionen des Signalwegs vorzuliegen, der für die Tumorentstehung reprimiert und für die Progression induziert vorliegen muss. Auch hier wird die Interaktion verschiedener Signalwege deutlich, denn auch Überexpressionen von GLI-Transkriptionsfaktoren aktivieren die WNT-Aktivität [233].

c-MYC ist ein Zielgen des WNT/ β -CATENIN-Signalwegs [115] mit vielfältigen Funktionen in Zellen, wie beispielsweise die Beeinflussung der Proliferation, aber auch der Differenzierung (Review [276]). Es handelt sich um ein Proto-Onkogen. Während eine mäßig gesteigerte Aktivität von *c-MYC* und die damit einhergehende Proliferation von Zellen toleriert wird, ohne die Apoptose über den $p14^{ARF}$ -MDM2-p53-Weg auszulösen, löst eine starke Erhöhung der Expressionsspiegel die Apoptose aus [213]. Entsprechend tragen die kombinierte Deregulationen der *c-MYC*-Aktivität selbst und die weiterer Faktoren wie $p14^{ARF}$ oder p53 zur Entstehung von malignen Tumoren bei. Bereits in der Entwicklung des Pankreas spielt *c-MYC* eine Rolle. Eine Depletion führt zu einer gestörten Entwicklung sowohl der Azini als auch des Duktus-Systems [33]. Eine Azinuszell-spezifische, konstitutionelle Überexpression von *c-Myc* in Mäusen führt zu einer schnellen Entwicklung von Tumoren, wobei es sich um Azinuszell-Karzinome und nur teilweise um gemischte Azinuszell-/Epithelzell-Karzinome handelt. Diese erinnern histologisch nur teilweise an PDACs und sie weisen bezeichnenderweise keine *Kras*-Mutationen auf, sodass *c-MYC* alleine ausreichend zu sein scheint, um diese Art von Tumoren auszulösen [262].

Die gesteigerte Expression von *c-MYC*, die in humanen PDACs vorhanden ist, korreliert mit der verstärkten Expression von β -CATENIN [171]. Die Überexpression des Transkriptionsfaktors NFATc1 in PDACs ist ein weiterer Mechanismus, über den die Transkription von *c-MYC* erhöht wird [36]. Die proliferationsfördernden Effekte sowieso der positive Effekt auf das ankerunabhängige Wachstum dieser NFAT-Überexpression sind über *c-MYC* vermittelt. Weiterhin hat auch der PI3K-AKT-Signalweg induzierende Wirkung auf *c-MYC* [13]. In diesem Zusammenhang wurde eine verminderte Expression von PTEN als Inhibitor des Signalweges im PDAC entdeckt. Die Auswirkungen von *c-MYC* auf die Proliferation könnten dabei beispielsweise in einer Erhöhung der Expression von E2F1 durch *c-MYC* in Abhängigkeit der PI3K-Signalkaskade begründet liegen [263].

1.2.3.3 WEITERE DEREGLATIONEN IM PDAC

Auch die Signalwege über die Transkriptionsfaktor-Familie NF κ B sind im PDAC dereguliert. Der Vertreter RelA beispielsweise ist in PDAC-Zellen konstitutiv aktiviert [305]. Dies ist von

einem aberrant aktiven IKK-Komplex vermittelt und abhängig von KRAS und dem Rezeptor für EGF [175]. Eine Hemmung des NFkB-Signalwegs führt zur Auslösung der Apoptose und zur Verminderung von ankerunabhängigem Wachstum in PDAC-Zellen.

Der Zellzyklusregulator und Tumorsuppressor $p16^{INK4A}$ ist bereits früh und mit steigender Häufigkeit in den PanIN-Stadien mutiert [311]. Keimbahnmutationen sind mit einer 22-fach erhöhten Wahrscheinlichkeit verbunden, ein PDAC zu entwickeln [97].

Im Mausmodell kooperieren die Faktoren $Kras$, $p16^{Ink4a}$ und $p19^{Arf}$ in der Entwicklung von PDACs [17]. Dabei ist eine Mutation von $Kras$ alleine nicht ausreichend, um PDACs mit hoher Wahrscheinlichkeit und zu frühen Zeitpunkten zu induzieren. Erst durch den zusätzlichen *Knockout* von sowohl $p16^{Ink4a}$ als auch $p19^{Arf}$ sind Karzinome mit einer hohen Rate und frühem Auftreten nachweisbar. Die Funktion von $p16^{INK4A}$ besteht darin, als Tumorsuppressor durch eine gesteigerte Expression auf Stressstimuli und auch auf die Deregulation von Onkogenen wie RAS zu reagieren [268]. Dadurch erklärt sich die Beobachtung, dass die Mutation oder Deletion von $p16^{INK4A}$ eine notwendige Voraussetzung für die Entwicklung von PDACs bei Vorliegen von mutiertem $KRAS$ ist. Übereinstimmend mit dieser Annahme zeigt sich eine Heraufregulation von $p16^{INK4A}$ in Vorstufen des Lungenkarzinoms, während im Karzinom letztendlich eine Depletion feststellbar ist [59]. Eine gleichzeitige Mutation von $Kras$ sowie Deletion von $p16^{Ink4a}$ und $p19^{Arf}$ induziert *Notch*-Liganden und die Expression von *Notch*-Zielgenen. Gleiches gilt für die Induktion von NFkB. Auch diese wird durch Deletion von $p16^{Ink4a}$ und $p19^{Arf}$ verstärkt [307].

Ein weiterer Faktor, der im PDAC häufig Mutationen oder Deletionen unterliegt, ist $SMAD4$ ($DPC4$), ein Bestandteil der TGF- β -Signalkaskade. Er wurde durch Analyse von Deletionen im Chromosom 18 identifiziert, die im PDAC häufig auftreten und ist in 30 % der untersuchten Pankreaskarzinome deletiert, wovon sich der Name ($DPC4$, *deleted in pancreatic carcinoma locus 4*) ableitet [108]. In einigen weiteren PDACs, die nicht von der Deletion betroffen waren, wurden im Zuge dieser Untersuchungen zudem Mutationen des Gens entdeckt. Eine Depletion des Proteins ist dabei erst spät in der Entwicklung ab dem PanIN3-Stadium festzustellen [185,311]. Die Rolle des betroffenen TGF- β -Signalwegs in Krebserkrankungen ist komplex und je nach betrachtetem Gewebe und betroffener Zellart gegenläufig, da TGF- β sowohl tumorfördernde als auch -reprimierende Eigenschaften besitzt (Review [4,76]). Ein Modell, das die Funktion in Tumoren wie dem PDAC zu erklären versucht, ist die Annahme, dass TGF- β eher tumorsuppressive Eigenschaften auf Epithelzellen und tumorfördernde Eigenschaften auf Stromazellen oder Epithelzellen in der EMT hat und damit entscheidende Rollen beim Zusammenspiel epithelialer Tumorzellen mit der Mikroumgebung

des Tumors spielt. Mutationen von einzelnen Bestandteilen der Signalkaskade werden als ursächlich für eine Veränderung der Wirkung von TGF- β von tumorsuppressiver zu onkogener Funktion gesehen. Unterstützend zu dieser Annahme wurde gezeigt, dass sowohl SMAD4-abhängige als auch -unabhängige TGF- β -regulierte Gene existieren [166]. Die Depletion von SMAD4 beeinträchtigt dabei zwar die Induktion des Zellzyklus-Arrestes durch TGF- β , nicht aber die Auslösung der EMT.

Der Tumorsuppressor BRCA2 ist, wie auch in anderen Krebsarten, bei der erblichen Anfälligkeit für die Entwicklung des PDAC relevant [214]. 17 % der untersuchten, familiär gehäuft auftretenden PDAC-Fälle, hatten Mutationen im *BRCA2*-Gen. Das Protein hat wichtige Aufgaben in der genomischen Stabilität (Review [295]). Ein Verlust oder eine Mutation ermöglicht somit im Kontext von weiteren Mutationen wie denen von p53 eine Ansammlung von Aberrationen der DNA. Bei der Untersuchung von PanINs von Patienten mit Keimbahnmutationen eines der beiden *BRCA2*-Allele zeigte sich eine Deletion des zweiten Allels (loss of heterozygosity) erst in späten Stadien (PanIN3). *BRCA2* zählt also zu den Genen, die erst spät in der Entwicklung des PDAC deletiert werden [96].

1.3 ZIELSETZUNG

PRMT1 ist im PDAC auf Transkriptionsebene überexprimiert. In der Arbeitsgruppe konnte gezeigt werden, dass auch die Proteinspiegel von *PRMT1* in Schnitten von humanem PDAC relativ zu gesundem Gewebe erhöht sind. Da in Krebszellen, so auch im PDAC, viele Deregulationen stattfinden, stellt sich dabei grundsätzlich die Frage nach der Relevanz einer solchen Entdeckung hinsichtlich des Verhaltens von Zellen und auch der Entwicklung und Aufrechterhaltung von Tumoren.

In einem ersten Schritt sollte hier überprüft werden, ob die Expression von *PRMT1* für die Proliferation von PDAC-Zellen wichtig ist und ob die tumorrelevante Fähigkeit zum ankerunabhängigen Wachstum durch *PRMT1* beeinflusst ist. Dazu wurden die Verdopplungsraten von Panc1-, sowie MiaPaCa2-PDAC-Zellen und zudem von HeLa-Zellen in Wachstumskurven errechnet und ein Einfluss einer siRNA-vermittelten Depletion von *PRMT1* bestimmt. Die Fähigkeit zum ankerunabhängigen Wachstum wurde in Soft-Agar-Assays gemessen, indem gewachsene Zellkolonien von Suit007-PDAC-Zellen mit und ohne *Knockdown* von *PRMT1* gezählt wurden.

Um die Rolle von *PRMT1* im PDAC mechanistisch zu untersuchen, sollten zudem zuvor gemachte Beobachtungen zur Assoziation von *PRMT1* mit dem Transkriptionsfaktor *GLI1* verifiziert werden. Ein negativer Einfluss von *PRMT1* auf die Expressionsspiegel von *GLI1* wurde mit *Knockdowns* von *PRMT1* überprüft. Auch der Frage einer physischen Interaktion der beiden Proteine sollte durch Coimmunpräzipitationen und *Pulldowns* nachgegangen sowie eine mögliche Methylierung des Transkriptionsfaktors durch *PRMT1* untersucht werden. Eine Modulation der Transaktivierungsfähigkeit wurde zudem in Reportergerätenversuchen mit einem *GLI1*-abhängigen Reporterkonstrukt untersucht.

Eine im Tiermodell (Krallenfrosch) nachgewiesene Induktion der Expression von *Prmt1* durch *c-MYC* wurde auf die Übertragbarkeit auf humane Zellen durch siRNA-vermittelten *Knockdown* von *c-MYC* in PDAC-Zellen untersucht. Zusätzlich wurde einer möglichen reziproken Regulation von *c-MYC* durch *PRMT1* nachgegangen.

In einer zweiten, unvoreingenommenen Herangehensweise sollten Auswirkungen der Expression von *PRMT1* auf das Transkriptom von Panc1-PDAC-Zellen mit Hilfe der Hybridisierung und Auswertung eines Oligonukleotid-Microarrays untersucht werden. Dazu wurden *Knockdowns* von *PRMT1* durchgeführt und die Genexpressionsprofile von *PRMT1*-Depletionen mit Kontroll-Bedingungen verglichen. Hauptaufgabe war danach die Validierung der erhaltenen regulierten Kandidatengene durch biologisch unabhängige Experimente.

Validierte Zielgene sollten ersten mechanistischen Untersuchungen, wie der Rekrutierung von PRMT1 an die entsprechenden Genbereiche, unterzogen werden.

2 MATERIAL

2.1 SOFTWARE

Für die Aufzeichnung und Speicherung der Daten aus qPCR-Läufen wurde die Software MX3000P, v4.10 Build 389, von Stratagene / Agilent verwendet. Berechnungen der relativen Expressionen und die Darstellung in Diagrammen sowie die graphische Darstellung von Reporter-Aktivitäten und Rekrutierungen in der CHIP erfolgten mit Hilfe von Microsoft Excel 2007 / 2010 und mit Adobe Illustrator CS4. Bildbearbeitungen wurden mit Adobe Photoshop CS4 durchgeführt. Diese Arbeit wurde mit Microsoft Word 2010 erstellt und Literaturverweise mit Hilfe von Mendeley Desktop 1.9.2 automatisiert eingefügt. Bilder für die Immunhistochemie wurden mit Leica Application Suite, 2.5.0 R1 Build 975, aufgenommen. Zur Aufnahme von Bildern für die Immunzytochemie wurde PictureFrame 2.3 verwendet.

2.2 GERÄTE

Gerät	Hersteller, Modell
Abzüge	Verschiedene
Autoklaven	Tuttnauer, 5075 ELV und weitere
Bakterienschüttler	Infors HT, Multitron
Binokular	Leica, MZ12.5 mit Kaltlichtquelle Leica, KL 1500 LCD und mit Kamera Leica, DC 300
Expositionskassetten	Amersham Pharmacia Biotech, Hypercassette; Carl Roth, Rotilabo-Röntgenkassette X265.1; Philips, Ampli mit Bleieinlage
Filmentwickler-Automat	Konika Minolta, SRX-101A
Gelelektrophorese-System	BIO-RAD, Mini-PROTEAN Tetra Electrophoresis System
Geltrockner	BioRad, Gel Dryer 583 mit BioRad, Hydro Tech Vacuum Pump
Handdispenser	Eppendorf, Multipette Plus
Heizblock (Aufkochen)	Techne, Dry-Block, DB-3A; Biometra TB1 Thermoblock
Heizblock (ChIP, <i>in vitro</i> Methylierungen)	Eppendorf, Thermocycler Compact; HLC, MHR 23; Bioer, CHB202
Hitzversiegler (Platten für die qPCR)	Thermo Scientific, ALPS 50V
Inkubator (Zellkultur)	Sanyo, MCO-20AIC

Luminometer (für Luziferase-Assays)	Titertek-Berthold, Orion L Luminometer
Magnetrührer	Ikamag, Reo und RCT (mit Heizeinheit)
Mikroskop (Histologie)	Leica, DMLB mit Kamera Leica, DFC 420
Mikroskop (Zellkultur)	Leica, DMIL und Leica, DMIL LED
Mikroskop (Immunzytochemie)	Leica, DMR mit Kamera Intas, QuantiFire XI
pH-Meter	Schott, Handylab 1 mit Elektrode Schott, BlueLine 14 pH
Pipetten, manuell	Gilson, Pipetman (P2,P10,P20,P200,P1000)
Pipetten, programmierbar	Eppendorf, Explorer
Pipettierhilfe	Brand, Accu Jet Pro (verschiedene)
qPCR-Maschine	Agilent / Stratagene, Mx3000P
Sonikator (für die ChIP)	Branson, Digital Sonifier W-250 D mit Mikro-Hornspitze Spitze Branson, 3 mm 1/8Z 101-148-062
Sonikator (für Proteinpräparationen aus BL21-Bakterien)	Bandelin, HD2200 mit Ultraschallwandler UW2200 und Boosterhorn SH 213 G
Spannungsquelle	Consort, E802 und EV202; BioRad, PowerPac 300 und Power Supply 2000/200
Spektrophotometer (Bradford)	Pharmacia Biotech, Ultrospec 2000
Spektrophotometer (Nukleinsäuren)	Thermo Scientific, NanoDrop ND-1000
Sterilbank	Thermo-Scientific, MSC-Advantage
Taumelrollenmischer für Immunfärbungen (Western Blot)	CAT, RM 5
Thermocycler (reverse Transkription)	Biometra, T1 und T3
UV-Transluminator (für die Agarosegelelektrophorese)	BioRad, Mini-Transilluminator mit Kamera Canon,PH6x8 Macro 8-48 und Mitsubishi, P90
Vakuum-Absaugvorrichtung (ChIP)	Qiagen, QIAvac 24 Plus
Verstärkerfolie (Fluorographie)	Kodak, BioMax Transcreen LE
Vortexer	Heidolph, 54117; Bender, G-560
Waage und Feinwaage	Denver Instrument, S-4002 und Sartorius, MB BC 100 sowie weitere
Wasserbad (Bakterieninkubation)	Julabo, U3
Wasserbad (Zellkultur)	Memmert, W 350
Western Blot-System	BIO-RAD, Mini trans-blot cell
Zentrifuge (Bakterien, gekühlt)	DuPont Instruments, Sorvall RC-SB mit Rotor BHG Hermle, A6.9
Zentrifuge (sonstige)	Heraeus, Biofuge 13; Eppendorf, Centrifuge 5415C und 5415S

Zentrifuge (sonstige, gekühlt)	Heraeus, Multifuge 3 S-R mit Rotor Sorvall Heraeus, SN 614
Zentrifuge (Tischzentrifuge)	Thermo Scientific, Pico17
Zentrifuge (Zellkultur)	Heraeus, Megafuge 10 mit Rotor 2705

2.3 VERBRAUCHSMATERIAL

Verbrauchsmaterial	Hersteller
Dialyse-Gefäße	Thermo Scientific, Slide-A-Lyzer MINI 3,5K, 69550
Einfriergefäße für Zellen	Greiner Bio-One, Cryo's 121263
Einmalküvetten	Sarstedt, 67.742
Falcons, 15 ml und 50 ml	Greiner Bio-One, 15 ml Falcon, 188271; Greiner Bio-One, 50 ml Falcon, 227261
Luziferase Assay: 96-Well-Platten	Greiner Bio-One, 651207
Oligonukleotid-Primer für die qPCR	MWG Operon / Eurofins
PVDF-Membran	Millipore, Immobilon-P
qPCR: 96-Well-Platten	Greiner Bio-One, 652250; Sarstedt, 72.1978.202
qPCR: Verschlussfolien	Thermo Scientific, Clear Seal Folie AB-0812; 4titude, Clear Seal 4ti-0541
Reagiergefäße, 1,5 ml und 2 ml und Mikroreagiergefäße, 0,2 ml	Sarstedt, 1,5 ml-Reagiergefäß, 72.690.001; Sarstedt, Safe-Seal-Reagiergefäß 1,5 ml, 72.706; Greiner Bio-One, 2 ml Reagiergefäß, 623201 Sarstedt, Multiply-Pro-Gefäß 0,2 ml, 72.737.002
Röntgenfilme (Fluorographien)	Amersham, Hyperfilm MP
Röntgenfilme (Immunfärbungen)	FujiFilm, Medical X-Ray Film Super RX
siRNA für Transfektionen	Eurogentec; Dharmacon / Thermo Scientific
Sterilfilter	Millipore, Steritop-GP 0,22 µm 500 mL Express Plus 45mm RS BottleTop

2.4 KITS

Kit	Hersteller, Bezeichnung	Verwendung
β-Galaktosidase-Assay-Kit	PJK, 103312	Messungen der β-Galaktosidase-Aktivität
DNA-Aufreinigungskit	Qiagen, QIAquick PCR Purification Kit, 28106	Aufreinigung von DNA-Fragmenten während der Durchführung einer ChIP
DNase-Kit	Peqlab, peqGOLD DNase I Digest Kit, 12-1091-03	Verdau von DNA während der Präparation von Gesamt-RNA aus eukaryotischen Zellen
Immunhistochemie Färbekit	Linaris, VECTASTAIN Elite ABC Kit, Universal, R.T.U., PK-7200	Immunhistologische Färbungen von Gewebeschnitten
Luziferase-Assay-Kit	PJK, 102511	Messungen der Luziferase-Aktivität
Luziferase-Assay-Lysispuffer	Promega, Luciferase Cell Culture Lysis 5X Reagent, #E153A	Lysieren von Zellen für Luziferase-Assays
Plasmid-DNA MAXI-Kit	Genomed, Jet Star MAXI, 220100	Präparation von Plasmid-DNA aus <i>E.Coli</i> -Bakterien
qPCR SYBR-Green-Mix-Kit	Thermo Scientific, Absolute SYBR-Green-Mix mit ROX, AB-1166	Durchführung von qPCR-Läufen
Reverse Transkriptase-Kit	Invitrogen, M-MLV Reverse Transkriptase mit 0,1 M DTT Stock und "First Strand" Puffer 5x Stock, 28025021	Durchführung der reversen Transkription bei der RT-qPCR
RNA-Aufreinigungskit	Seqlab, RNA-Mini-Kit, 87250	Aufreinigung von Gesamt-RNA aus eukaryotischen Zellen

2.5 OLIGONUKLEOTID-MICROARRAY

Alle Vorgänge zur Anfertigung des Oligonukleotid-Microarrays mit Hilfe der bereitgestellten RNA wurden in der Genomics Unit des IMT von Herrn Dr. Michael Krause durchgeführt. Hierfür wurden folgende Geräte und Materialien sowie weitere, hier nicht aufgeführte Geräte (z. B. Heizblöcke) und Materialien (z. B. Aufreinigungskits) verwendet:

Komponente	Hersteller, zusätzliche Angaben
Oligonukleotid-Microarray	Agilent, SurePrint G3 Human GE 8x60k, G4851A (Design ID: 028004)

Labelling Kit	Agilent, Quick-Amp Labelling Kit, Two Color, 5190-0444
Microarray Scanner	Agilent, G2505C
Quantifizierungssoftware	Agilent, Feature Extraction, v10.5.1.1

2.6 CHEMIKALIEN FÜR DIE ZELLKULTUR

Chemikalie	Hersteller, zusätzliche Angaben
Blasticidin	InvivoGen, ant-bl-1
DMSO	AppliChem, A3672,0250
Penicillin / Streptomycin	Invitrogen / Life Technologies, 10.000 Units Penicillin / ml, 10.000 µg Streptomycin / ml, 15140-122
Trypsin-EDTA	Invitrogen / Life Technologies, 0,05 % Trypsin-EDTA (1x), 25300

2.7 MEDIEN FÜR DIE ZELLKULTUR

Medium	Hersteller, zusätzliche Angaben
DMEM	Invitrogen / Life Technologies, Standardisiertes Medium für eukaryotische Zellen, enthält 0,45 % (w/v) Glucose, L-Glutamin und Phenolrot
Einfriermedium	30 % FCS, 10 % DMSO in DMEM
FCS	Life Technologies, Gibco, 10270 (verschiedene Chargen)
OptiMem	Life Technologies, 51985-026
Vollmedium (Kulturmedium für alle humanen Zelllinien)	DMEM, 10 % FCS, 5 % Penicillin / Streptomycin (entspricht 100 Units Penicillin und 100 µg Streptomycin pro Milliliter Kulturmedium)
Vollmedium (für MEF-Zellen)	DMEM, 10 % FCS, 5 % Penicillin / Streptomycin (entspricht 100 Units Penicillin und 100 µg Streptomycin pro Milliliter Kulturmedium), 3 µg/ml Blasticidin als Selektionsmarker

2.8 CHEMIKALIEN

Chemikalie	Hersteller, zusätzliche Angaben
Acrylamid 30 %/Bisacrylamid-Lösung	Biozym, ProtoGel, 900200
Agarose	Lonza, SeaKem Agarose, 50004
Ampicillin	Roth, K029.2
Aprotinin	AppliChem, A2132,0025
APS	AppliChem, A2941,0250
Borsäure	Roth, 6943.1
Bromphenolblau	AppliChem, A1120,0010
BSA	AppliChem, A1391,0500
Coomassie brillant blau G-250	Fluka, 27815
DAB	AppliChem, A0596,0001
DOC	AppliChem, A1531,0100
DTT	Applichem, A2948,0025
EDTA	Roth, 8043.2
Essigsäure (Eisessig)	Roth, 3738.2
Ethanol, rein	Roth, 9065.4
Ethanol, technisch, vergällt mit MEK	Bezug aus dem Chemikalienlager
Formaldehyd	Sigma-Aldrich, F8775-500ML
Glucose (α -D(+)-Glucose Monohydrat)	Roth, 6780.1
Glycerin	AppliChem, A1123,2500
Glycin	Roth, 3908.2
Hämalaun, sauer	Roth, T865.1
Hefeextrakt	AppliChem, A3732,0500
HEPES	AppliChem, A3724.0250
Igepal (NP-40)	Sigma-Aldrich, I8896-50ML
IPTG	Roth, 2316.4
KCl	Roth, 6781.1
K_2HPO_4	Merck, 1.05101.1000
KH_2PO_4	Merck, 4873.1000
Leupeptin	AppliChem, A2183,0025
LiCl	AppliChem, A6286,0250
Luminol	Roth, 4203.1
Methanol	Bezug aus dem Chemikalienlager der Universität Marburg
Milchpulver	Roth, T145.3
Mowiol	Roth, 0713.1
Na_2HPO_4	Roth, T877.1
NaAc	AppliChem, A3900,0500
NaCl	Roth, 3957.2

NaHCO ₃	Merck, 6329.1000
NaOH	Merck, 1.06498.1000
Nukleasefreies Wasser	Invitrogen, 1097703
Orange G	Fluka, 75380
p-Cumarsäure	Roth, 9906.1
PEI	Sigma-Aldrich, 408727
Pepton	AppliChem, A2210,0500
Phosphorsäure	Roth, 9079.1
PIPES	Roth, 9156.2
PMSF	Sigma-Aldrich, P7626
Protein A-Sepharose	GE Healthcare Life Sciences, 17-5280-02
Protein G-Sepharose	AG Brehm, IMT Marburg (Bezug bei GE Healthcare Life Sciences)
RNase-Inhibitor	Fermentas, RiboLock, E00382
¹⁴ C-SAM	Perkin Elmer, NEC363010UC
SDS	Roth, CN30.2
ssDNA-Natriumsalz (sonifiziert)	Appllichem, A2159,0005
Glutathion-Agarose	Macherey-Nagel, 745500.10
TEMED	AppliChem, A1148,0250
TRIS	Roth, 5429.2
Triton X-100	AppliChem, A4975,1000
Tween 20	Roth, 9127.2
Wasserstoffperoxid	Merck, 8.22287.2500
β-Mercaptoethanol	AppliChem, A4338,0250

2.9 STANDARDS

Standard	Verwendung	Hersteller, zusätzliche Angaben
BSA	Als Eichwert für Bradford-Messungen	AppliChem, Albumin Fraktion V, als Lösung mit 1 µg/µl
DNA-Größenstandard	Agarose-Gelelektrophorese	Fermentas, GeneRuler DNA Ladder Mix, #SM0331
Protein-Größenstandard	SDS-PAGE, sowohl für Coomassie-Färbungen als auch Western Blots	Fermentas, PageRuler prestained protein ladder, #SM0672

2.10 BAKTERIEN

Stamm	Verwendung
<i>E.Coli</i> DH5α	Produktion von Plasmid-DNA für MAXI-Präparationen
<i>E.Coli</i> BL21	Produktion rekombinanter Proteine

2.11 PUFFER

Die Angaben sind Endkonzentrationen der Gebrauchslösungen. Zur Lagerung werden teilweise konzentriertere Puffer gelagert, die vor dem Gebrauch mit Wasser auf die Endkonzentrationen verdünnt werden.

Puffer	Zusammensetzung
Blockpuffer (Immunzytochemie)	PBS, 0,1 % Triton X-100, 4 % BSA
Blockpuffer (Immunhistochemie)	PBS, 2 % BSA
Blockpuffer (Western Blot)	TBS, 0,5 % Tween 20, 4 % (w/v) Milchpulver
Bradford-Lösung	0,01 % (w/v) Coomassie brillant blau G-250, 4,75 % Ethanol, 10 % Phosphorsäure (85 %ig)
ChIP Elutionspuffer für Sephrose	1 % SDS, 100 mM NaHCO ₃
ChIP Lysispuffer I	5 mM PIPES pH8, 85 mM KCl, 0,5 % Igepal
ChIP Lysispuffer II	10 mM TRIS pH 7,5, 150 mM NaCl, 1 % Igepal, 1 % DOC, 0,1 % SDS, 1 mM EDTA
ChIP Waschpuffer I	20 mM TRIS pH 8,0, 150 mM NaCl, 2 mM EDTA, 1 % Triton X-100
ChIP Waschpuffer II	20 mM TRIS pH 8,0, 500 mM NaCl, 2 mM EDTA, 1 % Triton X-100
ChIP Waschpuffer III	10 mM TRIS pH 8,0, 1 % Igepal, 1 % DOC, 1 mM EDTA, 250 mM LiCl
Coomassie-Entfärber	25 % Methanol, 10 % Eisessig
Coomassie-Färber	25 % Methanol, 10 % Eisessig, 0,25 % (w/v) Coomassie brillant blau G-250
DNA-Probenpuffer	10 mM TRIS pH 8,0, 5 mM NaAc, 2 mM EDTA, 10 % Glycerin, 0,06 % (w/v) Orange G
ECL-Lösung 1	100 mM TRIS pH 8,0, 1 % (v/v) Luminol (250 mM Stock), 0,444 % (v/v) p-Cumarsäure (90 mM Stock)
ECL-Lösung 2	100 mM TRIS pH 8,0, 0,03 % H ₂ O ₂

HBS	125 mM NaCl, 25 mM HEPES, 0,75 mM Na ₂ HPO ₄ > pH 7,03 (NaOH)
IPH Lysispuffer	50 mM TRIS pH 8,0, 5 mM EDTA, 0,5 % Igepal, NaCl variabel (0-400 mM)
KPi-Lysispuffer	0,2 M K ₂ HPO ₄ , 0,2 M KH ₂ PO ₄ > pH 7,8
LB-Medium	1 % (w/v) Pepton, 0,5 % (w/v) Hefeextrakt, 177 mM NaCl pH 7,0
PBS	137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na ₂ HPO ₄ , 2 mM KH ₂ PO ₄ → pH 7,4 (NaOH)
Permeabilisationspuffer (Immunzytochemie)	PBS, 0,2 % Triton X-100
SDS-Laufpuffer	192 mM Glycin, 25 mM Tris, 0,1 % SDS
SDS-Probenpuffer	62,5 mM TRIS pH 8,0, 0,5 % SDS, 10 % Glycerol, 0,025 % Bromphenolblau, 5 % β-Mercaptoethanol
TBE (für Agarosegele)	89 mM TRIS, 2 mM EDTA, 89 mM Borsäure → pH 8,4 (NaOH)
TBS	10 mM TRIS pH 8,0, 150 mM NaCl → pH 7,9 (HCl)
TE-Puffer	10 mM TRIS pH 8,0, 1 mM EDTA
Waschpuffer (Immunzytochemie)	PBS, 0,1 % Triton X-100
Waschpuffer (Immunhistochemie)	TBS, 0,1 % Tween 20
Waschpuffer (Western Blot)	TBS, 0,5 % Tween 20
Tank Blot-Laufpuffer	2x SDS-Laufpuffer (384 mM Glycin, 50 mM Tris, 0,2 % SDS), 20 % Methanol

2.12 PLASMIDE

2.12.1 PLASMIDE FÜR BAKTERIEN

Alle Plasmide beinhalten ein Gen für die Ausbildung einer Ampicillinresistenz.

Plasmid	Vektorgröße	Erläuterungen
pGEX-2TK-P	5000 bp	Vektor für die Klonierung von cDNAs zur Expression von GST-getagten Fusionsproteinen. Zudem verwendet zur Expression des GST-Tags zu Kontrollzwecken.
HA- <i>GLI1</i> -pGEX	8363 bp	Isoform 1 von humanem <i>GLI1</i> (mit HA-Tag), umkloniert aus HA- <i>GLI1</i> in pGex-2TK-P.

His- <i>GLI1</i> -pRSET	6277 bp	Isoform 1 von humanem <i>GLI1</i> (ohne HA-Tag), umklontiert aus HA- <i>GLI1</i> -pGEX in pRSET C.
GAR-pGEX	5444 bp	Aminosäuren 1-142 von humanem Fibrillarin ([289]). Verwendung als Positivkontrolle bei <i>in vitro</i> Methyltransferase-Reaktionen.
<i>PRMT1</i> -pGEX	6070 bp	Humanes <i>PRMT1</i> , kloniert in pGex-4T-1 ([16]).
<i>Prmt4</i> -pGEX	7324 bp	Murines <i>Prmt4</i> (aus pSG5-HA [41]) kloniert in pGex-4T-1.

2.12.2 PLASMIDE FÜR EUKARYOTISCHE ZELLEN

Plasmid	Vektorgröße	Erläuterungen
8-Gli-Luc	unbekannt	Herkunft: AG Lauth, IMT Marburg. Trägt eine Ampicillinresistenz.
HA- <i>GLI1</i>	unbekannt	Exprimiert die Isoform 1 von humanem <i>GLI1</i> im CMV-5-Vektor mit HA-Tag. Herkunft: [153]. Trägt eine Ampicillinresistenz.
pcDNA3.1	5500 bp	Leervektor. Dient dem Angleichen von DNA-Mengen bei Transfektionen. Trägt eine Ampicillin- und Neomycinresistenz.
pcDNA3.1- <i>PRMT1</i>	6580 bp	Exprimiert humanes <i>PRMT1</i> mit einem Myc-His-Tag. Herkunft: [16]. Trägt eine Ampicillin- und Neomycinresistenz.
pcDNA3- <i>GFP</i>	5400 bp	Exprimiert das Protein GFP (grün fluoreszierendes Protein). Wird verwendet zur optischen Beurteilung der Transfektionseffizienz und zur Anfertigung von Kontrollen, die ein irrelevantes Protein exprimieren. Trägt eine Ampicillin- und Neomycinresistenz.
β -Galaktosidase	7324 bp	Exprimiert β -Galaktosidase. Wird verwendet zur Normalisierung von Luziferaseaktivitäten. Trägt eine Ampicillinresistenz.

2.13 ZELLINIEN

Zelllinie	Beschreibung
HeLa	Aus humanem Zervixkarzinom
Panc1	Aus humanem Pankreaskarzinom
MiaPaCa2	Aus humanem Pankreaskarzinom
MEF, PRMT1 ^{FL/-}	Murine, embryonale Fibroblasten-Zelllinie

2.14 TRANSFEKTIONSREAGENZIEN

Reagenz	Verwendung	Hersteller
Lipofectamine RNAiMax	Transfektion von eukaryotischen Zellen mit siRNA	Invitrogen / Life Technologies
PEI	Transfektion von eukaryotischen Zellen mit Plasmid-DNA	Eigenherstellung

2.15 OLIGONUKLEOTIDE

2.15.1 PRIMER FÜR DIE REVERSE TRANSKRIPTION

Für die Reverse Transkription wird ein oligo-dT-Primer benutzt. Die Länge beträgt 17 Basenpaare (Sequenz TTT TTT TTT TTT TTT TT).

2.15.2 RT-QPCR PRIMER, HUMANE ZIELSEQUENZ

Die angegebenen NCBI-Datenbank-Zugriffsnummern geben die Isoformen an, die von den Primern amplifiziert werden. Es sind nur Isoformen angegeben, die in der NCBI-Gendatenbank aufgeführt sind.

Alle Sequenzangaben in Richtung 5' nach 3'.

Zur Normalisierung verwendete Oligonukleotide

Gen-Name	Isoform Nr.		NCBI- Zugangsnr.	Protein- Produkt	Sequenz: sense antisense
	bekannt	detektiert			
<i>GAPDH</i>	1, 2	1	NM_002046.4	GAPDH	AGCCACATCGCTCAGACAC GCCCAATACGACCAAATCC
<i>RPLP0</i>	1, 2	1, 2	NM_001002.3 NM_053275.3	RPLP0	GTCGGAGGAGTCCGACGAG GCCTTATTTCCTGTTTGCAA
<i>S14 (RPS14)</i>	1, 2, 3	1, 2, 3	NM_001025070.1 NM_005617.3 NM_001025071.1	S14	GGCAGACCGAGATGAATCCTCA CAGGTCCAGGGTCTTGGTCC
β -TUBULIN CLASS I (TUBB)	1	1	NM_178014.2	TUBULIN β -Kette	ATACCTTGAGGCGAGCAAAA TCACTGATCACCTCCAGAAC

Zu evaluierende Zielgene

Isoformen in eckigen Klammern bezeichnen Transkripte ohne Protein-Kodierung.

Gen- Name	Isoformen		NCBI- Zugangsnr.	Protein- Produkt	Sequenz: sense antisense
	bekannt	detektiert			
<i>ABTB1</i>	1, 2	1, 2	NM_032548.3 NM_172027.2	ABTB1	AGCTGTGGGACCTGCTCA ACGTGCCTGGCTTAGACG
<i>ADAP1</i>	1	1	NM_006869.2	ADAP1	CCAGGTCAGCAAGGTGAAGT TTGGACTCAAACCTGGCTCT
<i>AHNAK</i>	1, 2	1, 2	NM_001620.2 NM_024060.3	AHNAK (DESMOYOKIN)	AGCGGAATCCTGCAAAGA AGCCACTACCCTGCCAGTT
<i>ANXA8</i>	1, 2, 3	1, 2, 3	NM_001271702.1 NM_001040084.2 NM_001271703.1	ANXA8	CGGGAGATAATGAAGGCGTA TGTGTCTGCTTGGATGTCT
<i>ANXA8L1</i>	1	1	NM_001098845.1	ANXA8L1	
<i>ANXA8L2</i>	1	1	NM_001630.2	ANXA8L2	
<i>BST2</i>	1	1	NM_004335.2	BST2	AGTGAGATCCAGGAAGCTG GGGAATGTTCAAGCGAAAAG
<i>C10ORF10</i>	1	1	NM_007021.3	DEPP	CCCCAGGTGTTTCAGAAC CAGAACATGGGCTTTGAGG
<i>CAMP</i>	1	1	NM_004345.4	CAMP	TCGGATGCTAACCTTACCG GTCTGGGTCCCCATCCAT
<i>CCL5</i>	1	1	NM_002985.2	CCL5 precursor	TGCCACATCAAGGAGTATTT TTTCGGGTGACAAAGACGA
<i>CEACAM1</i>	1, 2, 3, 4, 5, 6	1, 2, 3, 4, 5, 6	NM_001712.4 NM_001024912.2 NM_001184815.1 NM_001184813.1 NM_001184816.1 NM_001205344.1	CEACAM1 precursor	TACCTGCCACGCCAATAACT AGGCCATTTTCTGTGGTAGAG
<i>CFB</i>	1	1	NM_001710.5	CFB pre- proprotein	TCCACTGCTATGACGGTTACA GCTGTCTGCCACTCCAT

<i>CMPK2</i>	1, 2, 3, [4]	1, 2, 3	NM_207315.3 NM_001256477.1 NM_001256478.1	CMPK2 precursor	TGCCAGACTTGCCCAGTT CCGGGCTTCAGGAATAAAG
<i>c-MYC</i>	1	1	NM_002467.4	c-MYC	GCTGCTTAGACGCTGGATT TAACGTTGAGGGGCATCG
<i>COL6A1</i>	1	1	NM_001848.2	COL6A1 precursor	GAAGAGAAGGCCCGTTG CGGTAGCCTTAGGTCCGATA
<i>CPAMD8</i>	1	1	NM_015692.2	CPAMD8	CCTGGAGAAACCGATTCTG ACGGCCAGATGAAGAGAGG
<i>CX3CL1</i>	1	1	NM_002996.3	FRACTALKIN precursor	TCTGCCATCTGACTGTCTG TGATGTTGCATTCGTACA
<i>CXCL10</i>	1	1	NM_001565.3	CXCL10 precursor	GAAAGCAGTTAGCAAGGAAAGGT GACATATACTCCATGTAGGGAAGTGA
<i>DDX60</i>	1	1	NM_017631.5	DDX60	ACCCATGTGCTGCACTAACA CAAATTTGAAACATGGCATCA
<i>DHX58</i>	1	1	NM_024119.2	DHX58	ATGTGAACCCCAACTTCTCG GACTTTGTTGATACCACAGGA
<i>GLI1</i>	1, 2, 3,	1, 2, 3	NM_005269.2 NM_001160045.1 NM_001167609.1	GLI1	CAGCTACATCAACTCCGCCAATAGGG TGCTGCGGCGTTCAAGAGAGACTG
<i>GLIPR1</i>	1	1	NM_006851.2	GLIPR1 precursor	TCTTTCCAATGGAGCACATTT TCTTATATGGCCAAGTTGGGTAA
<i>GPRIN2</i>	1	1	NM_014696.3	GPRIN2	GGGGCAGGAGAGAGAACATT CTGGAAGAGCTCTGGGACA
<i>GRASP</i>	1, 2	1	NM_181711.3	GRASP	CCGAAAGGGCTCAGGATT TCCTTCTCAACGTCAGCA
<i>HERC5</i>	1	1	NM_016323.3	HERC5	CCATTCTCTTGCCTCTCAAAA GTGTGGTGGTTGAGGGAAAT
<i>HIP1R</i>	1	1	NM_003959.1	HIP1R	TACCTGACCTCCTTGGCAGA ACCGCCATTGATGATGGTAT
<i>HLA-B</i>	1	1	NM_005514.6	HLA-B precursor	CTCAGACGCCGAGATGCT GGGACACGGAGGTGTAGAAA
<i>IFI27</i>	1, 2	1, 2	NM_001130080.1 NM_005532.3	IFI27	CCAAGCTTAAGACGGTGAGG CCGTGGCCTAGAGAGTAAGAGA
<i>IFI44</i>	1	1	NM_006417.4	IFI44	GTGAGCCTGTGAGGTCCAA TCCTTTACAGGGTCCAGCTC
<i>IFIH1</i>	1	1	NM_022168.3	IFIH1	AGGCACCATGGGAAGTGAT GGTAAGGCCTGAGCTGGAG
<i>IFIT1</i>	1, 2, 3, 4(3a), 5(3b)	1, 2, 3, 4(3a), 5(3b)	NM_001548.4 NM_001270927.1 NM_001270928.1 NM_001270929.1 NM_001270930.1	IFIT1	AGAACGGCTGCCTAATTACAG GCTCCAGACTATCCTTGACCTG
<i>IFIT2</i>	1	1	NM_001547.4	IFIT2	TGGTGGCAGAAGAGGAAGAT GTAGGCTGCTCTCCAAGGAA
<i>IFIT3</i>	1, 2	1, 2	NM_001549.4 NM_001031683.2	IFIT3	TCTGAATGCATACTCCGATCTC GGGACTTCTTATTGAATGGTG
<i>INSIG1</i>	1, 2, 3	1, 2, 3	NM_005542.4 NM_198336.2 NM_198337.2	INSIG1	TTTTCTCAGGAGGCGTCACG TGGGGCTTTTCAGGAACACC
<i>IRF1</i>	1	1	NM_002198.2	IRF1	GAGCTGGGCCATTACAC TTGGCCTTCCACGTCTTG
<i>ISG15</i>	1	1	NM_005101.3	ISG15	GCGAACTCATCTTTGCCAGT AGCATCTTACCCTCAGGTC
<i>MFI2</i>	1, 2	1, 2	NM_005929.5 NM_033316.3	MFI2 precursor	TCTATGAGGCGGGAAAGGA CCACGGCGTAATAGGAGGTA

<i>MX1</i>	1, 2	1, 2	NM_001144925.1 NM_002462.3	<i>MX1</i>	GCTACTGTGGCCAGAAAAA GCGCACCTTCTCCTCATACT
<i>NSD1</i>	1, 2	1, 2	NM_172349.2 NM_022455.4	<i>NSD1</i>	CTCATCTGGGCAAATTCAAG GCCTCCGGTTGGAAACTT
<i>OAS2</i>	1, 2, 3	1, 2, 3	NM_016817.2 NM_002535.2 NM_001032731.1	<i>OAS2</i>	TGCAGGGAGTGGCCATAG TCTGATCCTGGAATTGTTTTAAGTC
<i>OASL</i>	1, 2, 3	1, 2, 3	NM_003733.3 NM_198213.2 NM_001261825.1	<i>OASL</i>	CGGGTGCTGAAGGTAGTCA CCTGGAAGCTGTGGAAACA
<i>PAOX</i>	1, 2(4), 4(5)	1, 2(4), 4(5)	NM_152911.2 NM_207128.1 NM_207127.1	<i>PAOX</i>	ACCCACAGCATGGACCTG CATGCAGTTTGTGAGTCCTTG
<i>PARP14</i>	1	1	NM_017554.2	<i>PARP14</i>	GTGTTCTTCTACCCGGAGGA TTCCTTGCCATACCAACTCA
<i>PLEKHA4</i>	1, 2	1, 2	NM_020904.2 NM_001161354.1	<i>PLEKHA4</i>	GTCAGGAGCCCAGAACACAG TGGTCAGCAGCGTATCTGTC
<i>PRMT1</i>	1, [2], 3, 4	1, [2], 3	NM_001536.5 [NR_033397.4] NM_198318.4	<i>PRMT1</i>	CCCCAAACAGCTGGTCAC GGTCTTCCACCTTGACGGTA
<i>RARRES3</i>	1	1	NM_004585.3	<i>RARRES3</i>	CTCCTCTGGCTTCGAGATG AAGGGGAAAATCTCAATCA
<i>RGS2</i>	1	1	NM_002923.3	<i>RGS2</i>	GAAAAGGAAGCTCCAAAAGAGA TTCTGGGCAGTTGTAAGCA
<i>RMND5A</i>	1	1	NM_022780.3	<i>RMND5A</i>	TGGAGTTTGGAAACCAGAAAGA TTATCTGTTGTTTGCTGACGAAG
<i>RSAD2</i>	1	1	NM_080657.4	<i>RSAD2</i>	TGCTTTTGCTTAAGGAAGCTG AGGTATTCTCCCCGGTCTTG
<i>RTP4</i>	1	1	NM_022147.2	<i>RTP4</i>	ACAGAGAGCATTGGCTGGT TGTGGCACAGAATCTGCACT
<i>SBK1</i>	1	1	NM_001024401.2	<i>SBK1</i>	CGTCACCAAGCACTACGAAC AGTGCCATTTTTGTGCCTGT
<i>SLC15A3</i>	1, [2]	1, [2]	NM_016582.2 [NR_027391.1]	<i>SLC15A3</i>	TGCTTAAGCTCGCTCTCCA GCACATTGACGGTCTCTGG
<i>SSC5D</i>	1, 2	1, 2	NM_001144950.1 NM_001195267.1	<i>SSC5D</i> Precursor	AGATGATGTGGGCTGTGTGG AGGGGTCTGAGATGGAGTCC
<i>TTC39B</i>	1, 2, 3, 4, 5	1, 2, 3, 4, 5	NM_152574.2 NM_001168339.1 NM_001168340.1 NM_001168341.1 NM_001168342.1	<i>TTC39B</i>	GGACTCAAATTAGAACAAGTTACCA CACCCCTTCAAACCTCATAGA
<i>XAF1</i>	1, 2, [3], [4], [5]	1, 2, [3], [4], [5]	NM_017523.3 NM_199139.2 [NR_046396.1] [NR_046397.1] [NR_046398.1]	<i>XAF1</i>	CCTGCCGATCCTAAATCAAC TTTCTTTTGTAGGAAGCTAACCA
<i>ZC3HAV1</i>	1, 2	1, 2	NM_020119.3 NM_024625.3	<i>ZC3HAV1</i>	AGGACATCTGCAACAGCAAG TGCCATGTTTCTACGATGTGA

2.15.3 RT-qPCR PRIMER, MURINE ZIELSEQUENZ

Bei murinen Genen, deren Name von der Nomenklatur beim Menschen abweicht, sind die humanen Orthologe in Klammern angegeben.

Die angegebenen NCBI-Datenbank Zugriffsnummern geben die Isoformen an, die von den Primern amplifiziert werden. Es sind nur Isoformen angegeben, die in der NCBI-Datenbank aufgeführt sind.

Alle Sequenzangaben in Richtung 5' nach 3'.

Zur Normalisierung verwendete Oligonukleotide

Gen-Name	Isoform Nr.		NCBI-Zugangsnr.	Protein-Produkt	Sequenz: sense antisense
	bekannt	detektiert			
<i>Gapdh</i>	1	1	NM_008084.2	Gapdh	TGTCCGTCGTGGATCTGAC CCTGCTTCACCACCTTCTTG

Zu evaluierende Zielgene

Gen-Name	Isoformen		NCBI-Accessions	Protein-Produkt	Sequenz: sense antisense
	bekannt	detektiert			
<i>8430408g22rik (hC10ORF10)</i>	1, 2	1, 2	NM_145980.2 NM_001166580.1	Depp	TTAGAGGAGACAGTCTTTACCCATC AGAAGCCGGGACCTCATAG
<i>Anxa8</i>	1	1	NM_013473.3	Anxa8	TCACCAAGAGGAGCAATGTG TCTGACTTTAAGGTCTCAGTGAGGT
<i>Cfb</i>	1, 2	1, 2	NM_008198.2 NM_001142706.1	Cfb precursor	GCTCAACCAAATCAGTTATGAAGA CCCAGCTCATCATGTATACAC
<i>Glipr1</i>	1	1	NM_028608.3	Glipr1	TCCATCTTTTCAGTATCCTCAGC ACTGTCTGCCAAACAACCT
<i>Grasp</i>	1	1	NM_019518.3	Grasp	GACCTTCGTCTGCCGAGTT CGTTGACGCTGGCAATAGT
<i>lfi44</i>	1	1	NM_133871.2	lfi44	CTGATTACAAAAGAAGACATGACAGAC AGGCCAAAACCAAAGACTCCA
<i>Insig1</i>	1	1	NM_153526.5	Insig1	CAGATCCAGCGGAATGTCA GGATACAGTAAACCGACAACAGC
<i>Mfi2</i>	1	1	NM_013900.2	Mfi2 precursor	CACTGTGTATGGACTTCTGGACA CTCGACTGTAGCATCTTTGAA
<i>Paox</i>	1	1	NM_153783.4	Paox	ACCGTTCGGGGAGTATACAGT TCGGTAAGTCTTGGTAGCC
<i>Prmt1</i>	1, 2, 3, [4]	1, 2, 3, [4]	NM_019830.3 NM_001252476.1 NM_001252477.1 [NR_045521.1]	Prmt1	CCGATGCCACAAGAGGAC TGCTTCCAGTGTGTACGG
<i>Rgs2</i>	1	1	NM_009061.4	Rgs2	AAAGCAAACAGCAAACCTTTATCA GGACTTTAAAAACGCCCTGA
<i>Ssc5d</i>	1	1	NM_173008.2	Ssc5d precursor	CACTTTCCTGGGCTACCACT GACTCATAACCTCCCTGGTCA

2.15.4 CHIP-QPCR PRIMER, HUMANE ZIELSEQUENZ

Die angegebenen Namen entsprechen den Bezeichnungen im Kapitel Ergebnisse. Die exakte Position bezeichnet das 5'-Ende des Amplikonbereichs, relativ zur Transkriptionsstartstelle (+1) des jeweiligen Gens.

Name der Region	Exakte Position	Sequenz: sense antisense
<i>GLIPR1</i> , Transkriptionsstart	+76 bp	CAGGCAATCACACTCTCAGAAA GGAGACAAAAGAAACCATCCAG
<i>GLIPR1</i> , Promotor	-1096 bp	TCCATGACACCAGGTATCAAGT TGGCAAGAATAGAGCAAGAACC
<i>GLIPR1</i> , Enhancer	-2005 bp	CACTACATTGATCAAAAAGTTGCCTA TGTCCAGGCTGCCTAATTTTC
<i>GLIPR1</i> , Enhancer_2	-1952 bp	TCAGATTCCTATAATGTAAAGACATGC GCCACACACACAAAATAACCT
<i>GLIPR1</i> , Intron2	+1468 bp	AGAACAGCCTCCAAGAACAG AAAGTCCTATGGGAGAATAGCTG
<i>GLIPR1</i> , Intron4	+12990 bp	TGTCCTGTTGCTTTATTGTGCTG CCAAGACAGTCGGTGAGGTC
<i>GLIPR1</i> , Upstream Kontrollregion	-4109 bp	ACCCAGACAGTCTAATGAACTTGT CTGGACCAGGGGAATGACAC
<i>GLIPR1</i> , Downstream Kontrollregion	+21441 bp	AGTGTGGAGGTAGGAAAGCAC TCAGTGACCTTCCATGCCAT
<i>GLIPR1</i> , far_downstream Kontrollregion	+96675 bp	GTGATGCAGTTACTGTCACTGG CCCTGGGTCCAAATATTCACAG
<i>CITED2</i> , Downstream Kontrollregion	+11166 bp	GGATGAGGTATGTTGGAAAGCAGA CTCAGAAGAGCCCAGTGTAGCA
β - <i>TUBULIN</i> , Kontrollgen	-448 bp	TGTCTTCCCCACCACCCAACCT CAAAGCCTCATCGAGCCTGGC

2.15.5 siRNA, HUMANE ZIELSEQUENZ

Die angegebenen NCBI-Datenbank-Zugriffsnummern geben die Isoformen an, die durch die siRNAs depletiert werden. Es sind nur Isoformen angegeben, die in der NCBI-Gendatenbank aufgeführt sind.

Alle Sequenzangaben in Richtung 5' nach 3'.

Isoformen in eckigen Klammern bezeichnen Transkripte ohne Protein-Kodierung.

Es werden lediglich mRNAs angegeben, die zu 100 % homolog zur kompletten siRNA-Sequenz sind.

Name der siRNA	Depletiertes Gen	Isoformen		NCBI-Accessions	Sequenz: sense antisense
		bekannt	depletiert		
siPRMT1_1	<i>PRMT1</i>	1, [2], 3, 4	1, [2], 3	NM_001536.5 [NR_033397.4] NM_198318.4	CGUGUAUGGCUUCGACAUG CAUGUCGAAGCCAUACACG
siPRMT1_3	<i>PRMT1</i>	1, [2], 3, 4	1, [2], 3	NM_001536.5 [NR_033397.4] NM_198318.4	UCAAAGAUGUGCCAUUAA UUA AUGGCCACAUCUUUGA
siPRMT1_4	<i>PRMT1</i>	1, [2], 3, 4	1, [2], 3, 4	NM_001536.5 [NR_033397.4] NM_198318.4 NM_001207042.2	GCAACUCCAUGUUUCAUAA UUAUGAAACAUGGAGUUGC
siPRMT1_5	<i>PRMT1</i>	1, [2], 3, 4	1, [2], 3, 4	NM_001536.5 [NR_033397.4] NM_198318.4 NM_001207042.2	GCUACUGCCUCUUCUACGA UCGUAGAAGAGGCAGUAGC
siPRMT1_6	<i>PRMT1</i>	1, [2], 3, 4	1, [2], 3, 4	NM_001536.5 [NR_033397.4] NM_198318.4 NM_001207042.2	GGUCAUCGGGAUCGAGUGU ACACUCGAUCCCGAUGACC
siPRMT1_UTR1	<i>PRMT1</i>	1, [2], 3, 4	1, [2], 3, 4	NM_001536.5 [NR_033397.4] NM_198318.4 NM_001207042.2	GUUGCAUUUACGCCAAUAA UUAUUGGCGUAAAUGCAAC
siPRMT1_UTR2	<i>PRMT1</i>	1, [2], 3, 4	1, [2], 3, 4	NM_001536.5 [NR_033397.4] NM_198318.4 NM_001207042.2	GGGAGGGCACAUCGUGACU AGUCACGAUGGCCCUCC
siNon_1	---	---	---	---	UAGCGACUAAACACAUCAA UUGAUGUGUUUAGUCGCUA
siNon_2	---	---	---	---	UAAGGCUAUGAAGAGAUAC GUAUCUCUUCAUAGCCUUA
siNon_3	---	---	---	---	AUGUAUUGGCCUGUAUUAG CUAAUACAGGCCAAUACAU
siNon_4	---	---	---	---	AUGAACGUGAAUUGCUCAA UUGAGCAAUUCACGUUCAU
siNon_5	---	---	---	---	UGGUUUACAUGUCGACUAA UUAGUCGACAUGUAAACCA
siLuciferase	---	---	---	---	GAUUUUGUCCGUUAUGUA UACAUAAACCGACAUAAUC
siScramble	---	---	---	---	CAUAAGCUGAGAUACUUCA UGAAGUAUCUCAGCUUAUG
siGFP	---	---	---	---	GCAAGCUGACCCUGAAGUU AACUUCAGGGUCAGCUUGC
si-c-MYC_1	<i>c-MYC</i>	1	1	NM_002467.4	AACGUUAGCUUCACCAACA UGUUGGUGAAGCUAACGUU
si-c-MYC_2	<i>c-MYC</i>	1	1	NM_002467.4	GGAACU AUGACCUCGACUA UAGUCGAGGUCAUAGUUC
si-c-MYC_3	<i>c-MYC</i>	1	1	NM_002467.4	CUACCAGGUCGCGCAGAA UUUGCGCGCAGCCUGGUG
siGLIPR1_1	<i>GLIPR1</i>	1	1	NM_006851.2	UGGCUGCGAGUUCAUUUU AAAUUGAACUGCGCAGCCA
siGLIPR1_2	<i>GLIPR1</i>	1	1	NM_006851.2	GAUCAGAGGUGAAACCAAC GUUGGUUUCACCUUGAUC
siGLIPR1_3	<i>GLIPR1</i>	1	1	NM_006851.2	UGUCACACUUGCUACAAUA UAUUGUAGCAAGUGUGACA

siGLIPR1_4	GLIPR1	1	1	NM_006851.2	AAUCCAUGUUACCGAUUAUA UAUAUCGGUAACAUGGAUU
------------	--------	---	---	-------------	---

2.16 ENZYME

Enzym	Hersteller, zusätzliche Angaben	Verwendung
RNase A	Applichem, A3832,0250	RNase-Verdau bei ChIPs
Proteinase K	AppliChem, A3830,0100	Protein-Verdau bei ChIPs

2.17 ANTIKÖRPER

2.17.1 WESTERN BLOT-PRIMÄRANTIKÖRPER

Unter Verwendung sind die gebräuchlichsten Verdünnungen aufgeführt. Abweichungen in einzelnen Experimenten sind möglich.

Antikörperbezeichnung (Spezifität)	Antikörpertyp	Herkunft	Verwendung
CDK2	Kaninchen, polyklonale IgG	Santa Cruz, sc-163	1:5000
c-MYC	Maus	AG Eilers	1:1000
GAPDH	Kaninchen, polyklonale IgG	Santa Cruz, sc-25778	1:2000
GLI1	Maus, monoklonale IgG1κ	Cell Signaling, L42B10	1:1000
PRMT1	Kaninchen, polyklonale IgG	Millipore, 07-404	1:2000
Prmt1 (Detektion von murinem Prmt1)	Kaninchen, polyklonale IgG	AG Bauer	1:1000
β-TUBULIN	Maus, monoklonale IgG2b	Millipore, MAB3408	1:20000

2.17.2 WESTERN BLOT-SEKUNDÄRANTIKÖRPER

Antikörperbezeichnung (Spezifität)	Antikörpertyp	Herkunft	Verwendung
α -Kaninchen	Ziege, polyklonale IgG, HRP- gekoppelt	Dako, P0448	1:5000
α -Maus	Ziege, polyklonale IgG, HRP- gekoppelt	Dako, P0447	1:5000

2.17.3 IMMUNHISTOCHEMIE- UND IMMUNZYTOCHEMIE-PRIMÄRANTIKÖRPER

Antikörperbezeichnung (Spezifität)	Antikörpertyp	Herkunft	Verwendung
PRMT1	Kaninchen, polyklonale IgG	AG Bauer	1:100

2.17.4 IMMUNZYTOCHEMIE-SEKUNDÄRANTIKÖRPER

Antikörperbezeichnung (Spezifität)	Antikörpertyp	Herkunft	Verwendung
α -Kaninchen	Ziege, Cy3-gekoppelt	Jackson ImmunoResearch, 111-165-045	1:200

2.17.5 (CHROMATIN-) IMMUNPRÄZIPITATIONS-ANTIKÖRPER

Antikörperbezeichnung (Spezifität)	Antikörpertyp	Herkunft	Verwendung
GLI1 (IP)	Maus, monoklonale IgG1κ	Cell Signaling, L42B10	5 µl pro 500 µg Extrakt
H3 (ChIP)	Kaninchen, polyklonale IgG	Abcam, ab1791	1 µg pro 20 µg Chromatin
HA-Tag (IP)	Maus, monoklonale IgG1	Cell Signaling, 2362	5 µl pro 500 µg Extrakt
Kaninchen IgG (ChIP)	Kaninchen, polyklonale IgG	Sigma-Aldrich, I5006-10MG	5 µg pro 75 µg Chromatin
p53 (ChIP)	Kaninchen, polyklonale IgG	Santa Cruz, sc-6243 (FL-393)	3 µg pro 30 µg Chromatin
PRMT1 (ChIP)	Kaninchen, polyklonale IgG	Millipore, 07-404	5 µg pro 75 µg Chromatin
PRMT1 (ChIP)	Kaninchen, polyklonale IgG	Abcam, ab3768	5 µg pro 75 µg Chromatin

3 METHODEN

3.1 ZELLKULTUR UND PROTEINBIOCHEMISCHE METHODEN

3.1.1 KULTIVIERUNG ADHÄRENTER, EUKARYOTISCHER ZELLEN

Stammkulturen von Zelllinien, die für die durchgeführten Experimente verwendet werden, werden in Zellkulturflaschen bei einer Temperatur von 37 °C und einem CO₂-Gehalt von 5 % in Kultur gehalten. Das Passagieren erfolgt, sobald sich ein optisch dichter Zellrasen gebildet hat. Je nach Wachstumsverhalten der verwendeten Zelllinie, beispielsweise bei Bildung kolonieartiger Zellhaufen, erfolgt dies auch schon vor dem Erreichen einer geschlossenen Wachstumsfläche.

Material:

- Vollmedium (DMEM mit 10 % FCS und 5 % Penicillin/Streptomycin)
- PBS
- Trypsin-EDTA

Durchführung:

Unter der Sterilbank wird das Kulturmedium mittels einer Unterdruckpumpe von den Zellen gründlich abgesaugt. Zum Entfernen restlichen Mediums wird je nach Größe des Kulturgefäßes ein angemessenes Volumen PBS zugegeben und erneut abgesaugt. Das Waschen wird ein zweites Mal durchgeführt. Zum Ablösen der Zellen von der Wachstumsfläche wird ein Volumen an Trypsin-EDTA zupipettiert, das ausreichend ist, um die Fläche komplett zu benetzen. Das Ablösen der Zellen wird durch Betrachten unter dem Mikroskop überprüft. Der Verdau wird durch Zugabe eines Überschusses an frischem Kulturmedium abgestoppt. Durch wiederholtes Auf- und Ab-pipettieren wird sichergestellt, dass die Zellen vereinzelt sind und nicht in Form von Kolonien auf der Wachstumsfläche neu anwachsen.

Zur Aufrechterhaltung der Stammkultur wird im Folgenden ein bestimmter Teil des Gesamtvolumens der Zellsuspension in das bereits benutzte oder ein neues Zellkulturgefäß zurückgegeben. Der Anteil richtet sich nach dem Wachstumsverhalten der Zellen und der beabsichtigten Zeit bis zum erneuten Passagieren. Er liegt je nach Zelllinie und Umständen zwischen 2 % und 50 % des Gesamtvolumens. Dieses Volumen wird mit Kulturmedium je nach Gefäß angemessen aufgefüllt.

Beim Ausplattieren von Zellen für nachfolgende Experimente erfolgt nach dem Trypsin-Verdau eine Zählung mittels einer Neubauer-Zählkammer (3.1.2). Im Folgenden werden definierte Zellzahlen auf Zellkulturplatten ausgesät und mit Medium auf ein angemessenes Volumen aufgefüllt.

3.1.2 ZELLZÄHLUNG IN DER NEUBAUER-ZÄHLKAMMER

Für die Durchführung von Experimenten wie beispielweise der Erstellung einer Wachstumskurve (3.1.20) werden definierte Zellzahlen ausgesät. Hierfür muss zuvor eine Bestimmung der Zellzahl stattfinden.

Material:

- Zellsuspension, verdünnt
- Vollmedium (DMEM mit 10 % FCS und 5 % Penicillin/Streptomycin)

Durchführung:

Nach Abtrypsinieren der Zellen wie im Kapitel 3.1.1 beschrieben, wird die Zellsuspension zum Erreichen einer sinnvollen Zellzahl während der Auszählung verdünnt. Mindestens vier der acht verfügbaren Großquadrate werden ausgezählt, wobei immer Quadrate beider Hälften verwendet werden. Durch Bildung des Mittelwerts wird die Zellzahl pro Quadrat errechnet und mit 1×10^4 (Zählkammerfaktor) multipliziert. Eine gegebenenfalls zuvor stattgefundenen Verdünnung für die Zählung wird einberechnet. Das Ergebnis gibt die Anzahl der Zellen pro Milliliter Suspension an.

3.1.3 EINFRIEREN UND AUFTAUEN VON ZELLINIEN

Material:

- Einfriermedium (DMEM mit 30 % FCS und 10 % DMSO)
- PBS
- Einfriergefäße für Zellen

Durchführung:

Für das Einfrieren von Zelllinien wird die Zellmenge einer dicht bewachsenen 145 cm²-Zellkulturplatte pro Einfriergefäß verwendet. Die Zellen werden wie bei der

Stammhaltung (3.1.1) von altem Kulturmedium befreit und von der Wachstumsfläche abgelöst. Nach dem Vereinzeln der abgelösten Zellen wird das komplette Volumen in ein Falcon überführt und die Zellen bei 400 g pelletiert. Nach Abnahme des trypsinhaltigen Überstandes wird das Zellpellet in 1,5 ml Einfriermedium resuspendiert. Die Zellsuspension wird in das Einfriergefäß überführt und dieses sofort in einer Styroporbox bei -80 °C gelagert. Hierdurch wird ein langsames und schonendes Einfrieren gewährleistet. Nach diesem Vorgang werden die Zellen für die dauerhafte Lagerung zeitnah in flüssigen Stickstoff umgelagert.

Um die Stammkultur einer Zelllinie zu starten, wird das Einfriergefäß direkt nach Entnahme aus dem Flüssigstickstoff-Tank in ein 37 °C-Wasserbad getaucht. Es soll ein möglichst schnelles Auftauen mit geringen Wartezeiten erreicht werden, um die Kontaktzeit der Zellen mit dem toxischen DMSO bei höheren Temperaturen zu minimieren. Unmittelbar nach Auftauen der Zellsuspension wird diese in ein Falcon überführt, mit Kulturmedium aufgefüllt und bei 400 g zentrifugiert. Der Überstand wird abgenommen, um das DMSO zu entfernen. Das Zellpellet wird in Kulturmedium resuspendiert, in eine 75 cm²-Zellkulturflasche überführt und das Volumen angemessen aufgefüllt.

Die Behandlung von Zellen mit DMSO sowie der Einfriervorgang führen meist zu einem gewissen Grad an Zelltod. Es ist daher wichtig, am Folgetag das Medium zu wechseln, um tote Zellen zu entfernen. Ab diesem Zeitpunkt wird die Stammkultur weiter gehalten.

3.1.4 DNA-TRANSFEKTION MITTELS POLYETHYLENIMIN (PEI)

Diese Methode beruht auf dem Prinzip der Endozytose. PEI bindet DNA in positiv geladenen Partikeln, die nach Bindung an anionische Teile der Zelloberfläche internalisiert werden. Die Methode kommt ohne Verwendung eines Kits aus und wird nur mit Hilfe des verdünnten Polymers PEI durchgeführt.

Material:

- Polyethylenimin, Verdünnung in der Stocklösung 1:1000, pH 7
- Plasmid-DNA
- PBS
- Vollmedium (DMEM mit 10 % FCS und 5 % Penicillin/Streptomycin)

Durchführung:

Plasmid-DNA und PEI werden getrennt voneinander in PBS verdünnt. Für ein *Well* einer 6-*Well*-Platte werden 4,5 µl PEI bzw. 3,25 µg Plasmid-DNA in je 75 µl PBS verdünnt und für fünf Minuten inkubiert. Danach werden die beiden Ansätze vereinigt, vorsichtig vermischt und für weitere 15 Minuten inkubiert. Hierauf erfolgt die Zugabe der Lösung zum Vollmedium. Ein vorheriger Mediumwechsel findet nicht statt. Diese Methode führt zu einem recht hohen Grad an Zelltod, was einen Mediumwechsel nach 5 bis 24 Stunden nötig macht. Die Ernte der Zellen erfolgt 48 bis 72 Stunden nach der Transfektion.

3.1.5 RNA-TRANSFEKTION EUKARYOTISCHER ZELLEN MITTELS LIPOFECTAMINE RNAiMAX

Lipofektionen mittels Lipofectamine RNAiMax werden in dieser Arbeit verwendet, um siRNA in Zellen einzubringen. Dies führt zu einer sequenzspezifischen Degradation von komplementären mRNA-Molekülen in der transfizierten Zelle. Die Translation proteinkodierender mRNA bleibt aus, was in einer Depletion des kodierten Proteins resultiert.

Material:

- Lipofectamine RNAiMax
- OptiMEM
- siRNA
- Vollmedium (DMEM mit 10 % FCS und 5 % Penicillin/Streptomycin)

Durchführung:

Die Transfektion erfolgt weitgehend gemäß Herstellerprotokoll.

Zum Zeitpunkt der Transfektion sollten die Zellen eine Konfluenz von etwa 20 % nicht überschritten haben. Noch geringere Konfluenzen sind von Vorteil (empirische Erfahrungen). Die Prozedur wird drei bis maximal 24 Stunden nach Aussaat der Zellen ohne vorherigen Mediumwechsel in Vollmedium inklusive Antibiotikum durchgeführt. Reagenz und siRNA werden in OptiMEM verdünnt. Es werden 3 µl Lipofectamine RNAiMax pro *Well* einer 6-*Well*-Platte verwendet. Bei größeren Platten findet eine proportionale Erhöhung dieses Volumens statt. Die Endkonzentration an siRNA im Wachstumsmedium beträgt 4,8 pmol/ml. Abweichungen hiervon sind angegeben. Da das Reagenz bei den verwendeten Zelllinien keine

oder eine sehr geringe Toxizität aufweist, wird im Folgenden kein Mediumwechsel durchgeführt. Die Ernte der Zellen erfolgt zwischen zwei und sechs Tage nach der Transfektion.

3.1.6 FCS-INDUKTION VON ZELLEN

Die FCS-Induktion von Zellen wird in dieser Arbeit verwendet, um die Expression von c-MYC zu erhöhen.

Material:

- Vollmedium (DMEM mit 10 % FCS und 5 % Penicillin/Streptomycin)
- DMEM
- DMEM mit 5 % Penicillin/Streptomycin

Durchführung:

Acht Stunden nach erfolgter Transfektion wird das Wachstumsmedium von den Zellen abgesaugt und restliches FCS-haltiges Medium durch zweimaliges Waschen in reinem DMEM entfernt. Zur weiteren Inkubation für drei Tage wird DMEM mit Penicillin/Streptomycin ohne FCS zu den Zellen gegeben. Am dritten Tag werden die Zellen induziert, indem das FCS-freie Medium durch Vollmedium (10 % FCS und Antibiotikum) ersetzt wird. Nicht induzierte Zellen (Null-Stunden-Zeitpunkt) verbleiben im Medium ohne FCS und erhalten keinen Mediumwechsel.

3.1.7 HERSTELLEN VON PROTEIN-GESAMTZELLEXTRAKT DURCH IPH-LYSE

Zur Analyse der Proteinexpression wird in dieser Arbeit Gesamtzellextrakt verwendet, der Proteine aller Zellorganellen enthält, insofern diese löslich sind und nicht in Membranen verankert vorliegen. Der Extrakt kann mit spezifischen Detektionsverfahren wie der Coomassie-Färbung (3.1.15) und der Immunfärbung (3.1.17) weiter untersucht werden.

Material:

- IPH-Puffer (50 mM TRIS pH 8,0, 5 mM EDTA, 0,5 % Igepal) mit variablem Salzgehalt zwischen 150 mM und 400 mM NaCl
- Proteaseinhibitoren: Aprotinin, Leupeptin, PMSF (je 10 µg/µl)
- Glycerin

Durchführung:

Das Kulturmedium wird bis auf ein geringes Restvolumen von den zu erntenden Zellen entfernt. Im verbleibenden Medium erfolgt das Abschaben der Zellen. Nach Überführen der Zellsuspension in ein geeignetes Gefäß erfolgt ein 10-sekündiges Abzentrifugieren bei 17.000 g. Der Überstand wird abgenommen, das Zellpellet in PBS aufgenommen, resuspendiert und erneut unter den gleichen Bedingungen pelletiert. Die Lyse der Zellen erfolgt anschließend durch Lösen des Zellpellets in IPH-Puffer mit je 10 µg/ml (Endkonzentration) der Proteaseinhibitoren Aprotinin, Leupeptin und PMSF. Die verwendete Salzkonzentration variiert je nach Experiment und zu extrahierenden Proteinen zwischen 150 mM und 400 mM NaCl. Um den Aufschluss der Zellen zu unterstützen, wird die Lösung einmalig bei -20 °C eingefroren und anschließend etwa 20 Minuten bei 4 °C unter Rotation inkubiert. Bei Verwendung von Salzkonzentrationen über 200 mM NaCl wird die Konzentration nach Durchführung der Lyse auf 150 mM NaCl verringert. Chromatin und Aggregate werden abschließend bei 13.000 g für zehn Minuten pelletiert und der Gesamtzellextrakt mit dem Überstand gewonnen. Die Lagerung erfolgt bis zur weiteren Verarbeitung bei -20 °C. Falls Extrakte für Coimmunpräzitationen verwendet werden, wird diesen vor dem Einfrieren zur Lagerung 10 % Glycerin (Endkonzentration) zugesetzt. Ein Verdau des Chromatins wird nicht durchgeführt.

3.1.8 HERSTELLEN VON PROTEIN-GESAMTZELLEXTRAKT DURCH KPI-LYSE

Material:

- KPi-Puffer (0,2 M K_2HPO_4 , 0,2 M KH_2PO_4 , pH 7,8)
- Proteaseinhibitoren: Aprotinin, Leupeptin, PMSF (je 10 µg/µl)

Durchführung:

Die Zellernte erfolgt wie bei der Durchführung der IPH-Lyse (3.1.7). Nach den Wasch- und Zentrifugationsschritten wird das Zellpellet in KPi-Puffer mit je 10 µg/ml (Endkonzentration) der Proteaseinhibitoren Aprotinin, Leupeptin und PMSF resuspendiert und das Reagiergefäß in flüssigen Stickstoff getaucht. Nach einigen Sekunden wird das Gefäß in handwarmes Wasser umgelagert, um ein schnelles Auftauen zu erreichen. Der Gefrier- und Auftauvorgang wird noch zwei Mal wiederholt und die Lösung anschließend bei 4 °C unter Rotation inkubiert.

Chromatin und Zellreste werden bei 13.000 g abzentrifugiert, der Extrakt mit dem Überstand gewonnen und bei -20 °C gelagert.

3.1.9 EXTRAKTION VON RNA AUS EUKARYOTISCHEN ZELLEN

Die Gewinnung von RNA aus eukaryotischen Zellen ist fester Bestandteil der Prozeduren, die für die RT-qPCR notwendig sind und wird daher im Kapitel 3.2.6 erklärt.

3.1.10 BESTIMMUNG VON PROTEINKONZENTRATIONEN (BRADFORD-ASSAY)

Mit dieser Methode kann die Gesamt-Proteinkonzentration eines Extraktes gemessen werden. Der verwendete Triphenylmethanfarbstoff Coomassie Brilliant Blau G-250 bindet hierbei an kationische und unpolare Aminosäuren innerhalb von Proteinen, wodurch sein Absorptionsmaximum von 470 nm zu 595 nm verschoben wird. Die Absorption bei 595 nm ist proportional zur Proteinkonzentration, sodass die Intensität linear zur Konzentration zunimmt. Zur quantitativen Berechnung der Gesamt-Proteinkonzentration ist es notwendig, einen Proteinstandard mitzuführen, um erhaltene Absorptionswerte mit Proteinkonzentrationen korrelieren zu können.

Material:

- Bradford-Lösung (0,01 % (w/v) Coomassie brillant blau G-250, 4,75 % Ethanol, 10 % Phosphorsäure (85 %ig))
- BSA Standardlösung (1 mg/ml Stocklösung)

Durchführung:

Pro Probe werden Triplikate zur Messung hergestellt. In einer Einmalküvette werden 100 µl destilliertes Wasser vorgelegt und je nach geernteter Zellzahl und damit je nach zu erwartender Proteinkonzentration zwischen 1,5 µl und 6 µl Zellextrakt hinzugegeben. Innerhalb einer Messreihe werden identische Probenvolumina verwendet. Separat wird eine Standardreihe mit einer BSA-Lösung bekannter Konzentration als Referenz pipettiert. Zuletzt werden 900 µl Bradford-Lösung zugegeben und die Lösung durch Schwenken gemischt. Nach kurzer Inkubation kann die Absorption bei 595 nm im Spektrophotometer gemessen werden. Die Rückrechnung von den erhaltenen Absorptionswerten auf die Proteinkonzentrationen erfolgt anhand einer linearen Regressionsgleichung, die aus der Standardreihe berechnet wurde.

3.1.11 LUZIFERASE-ASSAY

Der Luziferase-Assay gibt die Aktivität eines Promotors oder eines anderen regulatorischen Elements anhand der Expression des Enzyms Luziferase wieder. Eine Änderung dieser Aktivität, beispielsweise durch Manipulation der Expression eines bestimmten Faktors, kann in diesem System mit einfachen Mitteln untersucht werden.

Material:

- Luziferase-Assay-Lysispuffer (Promega) oder KPi-Puffer (0,2 M K_2HPO_4 , 0,2 M KH_2PO_4 , pH 7,8)
- Luziferase-Assay-Kit (PJK)
- β -Galaktosidase-Assay-Kit (PJK)
- Orion L Luminometer

Durchführung:

Für die Durchführung dieser Methode werden Triplikate pro Bedingung verwendet. Diese stammen hierbei aus drei individuellen *Wells* einer 6-*Well*-Platte und werden nur in einfacher Ausführung auf die Messplatte pipettiert. Die PEI-Transfektion findet statt, wie in 3.1.4 erklärt. Für die Ernte werden die Zellen nach Abkippen des Zellkulturmediums in dem verbleibenden Volumen abgeschabt, bei 14.000 g pelletiert und in 100 μ l Luziferase-Assay-Lysispuffer oder 100 μ l KPi-Puffer resuspendiert. Nach 20-minütiger Inkubation unter Rotation bei 4 °C werden Zellreste bei 14.000 g abzentrifugiert und der Zellextrakt mit dem Überstand gewonnen. Von diesem werden 20 μ l in spezielle 96-*Well*-Platten pipettiert. Das Reagenz des Luziferase-Kits wird automatisiert vom Luminometer zugegeben und nach zweisekündiger Wartezeit für eine Sekunde die Lichtintensität gemessen. Aus den technischen Triplikaten wird der Mittelwert mit der Standardabweichung berechnet. Zur Normalisierung der Luziferaseaktivität wird in getrennten Messungen parallel die Aktivität der β -Galaktosidase bestimmt, die in allen Ansätzen transfiziert wurde. Dafür werden 10 μ l des Extrakts pipettiert und manuell die Bestandteile des β -Galaktosidase-Kits nach Anleitung des Herstellers zugegeben. Die Messung erfolgt ebenfalls im Luminometer. Die Normalisierung der Luziferaseaktivität erfolgt zum einen auf die β -Galaktosidaseaktivität und zum anderen in getrennter Kalkulation auf die separat aus dem Zellextrakt bestimmte Proteinkonzentration (3.1.10).

3.1.12 IMMUNPRÄZIPITATION UND COIMMUNPRÄZIPITATION

Die Methode der Immunpräzipitation (IP) wird verwendet, um Proteine aus Extrakten spezifisch anzureichern, indem sie mit Antikörpern gebunden und mit Protein A/G-Sepharose immobilisiert werden. Im Folgenden können die aufkonzentrierten und aufgereinigten Proteine für weitere Assays verwendet werden oder es können interagierende Proteine in der Coimmunpräzipitation detektiert werden.

Material:

- Zellextrakt
- IPH-Puffer (50 mM TRIS pH 8,0, 5 mM EDTA, 0,5 % Igepal) mit variablem Salzgehalt zwischen 0 mM und 400 mM NaCl
- DTT
- spezifischer Primärantikörper
- Protein A/G-Sepharose

Durchführung:

Der Proteinextrakt wird vor Durchführung der Immunpräzipitation einem *Preclearing* unterzogen. Hierdurch wird verhindert, dass später Proteine präzipitiert werden, die unspezifisch mit der Sepharose (direkt oder über andere Proteine) interagieren. Dem kompletten verfügbaren Volumen an Proteinextrakt wird ein angemessenes Volumen Protein A- oder Protein G-Sepharose zupipettiert. Dieses Volumen wird so gewählt, dass die Konzentration an Sepharose in der Lösung der späteren Konzentration während der IP in den einzelnen Ansätzen entspricht. Die Wahl zwischen Protein A- oder Protein G-Sepharose wird je nach Immunglobulin-Subtyp der verwendeten Antikörper anhand der Affinitätsliste des Sepharose-Herstellers getroffen. Werden Antikörper eingesetzt, die verschiedene Arten an Sepharose erfordern, so werden sie zu gleichen Anteilen gemischt.

Die zum *Preclearing* sowie zur eigentlichen Präzipitation benutzte Sepharose wird zuvor durch zweistündige Inkubation mit 200 µg/ml BSA (Endkonzentration) in IPH-Puffer (150 mM NaCl) gesättigt. Freies BSA wird nach dem Sättigungsvorgang durch zweimaliges Waschen mit IPH-Puffer entfernt.

Das *Preclearing* erfolgt für mindestens zwei Stunden bei 4 °C unter Rotation. Danach wird die Sepharose bei 4.000 g pelletiert, der Überstand wird abgenommen und für die Ansätze der Immunpräzipitation weiter verwendet und aufgeteilt. Für diese wird 1 µg Antikörper für eine Menge von 500 µg Proteinextrakt verwendet. Die Volumina der einzelnen Ansätze werden mit

IPH-Puffer auf ein einheitliches Volumen aufgefüllt. Die Bindung der Zielproteine an die Antikörper erfolgt über Nacht bei 4 °C unter Rotation.

Am nächsten Tag werden die Ansätze mit 30 µl der vorbereiteten (mit BSA abgesättigten) Protein A/G-Sepharose versetzt und für zwei Stunden bei 4 °C unter Rotation inkubiert.

Danach wird die Sepharose mit den gebundenen Antikörper-Protein-Komplexen fünf Mal in einem Milliliter IPH-Puffer (150 mM NaCl) gewaschen. Die Zentrifugationen finden für jeweils drei Minuten bei Raumtemperatur und 6.000 g statt. Die Analyse der vorliegenden Proteinkomplexe erfolgt durch Immunfärbungen (3.1.17), wofür die Sepharose in Probenpuffer bei 95 °C aufgekocht und anschließend die Gemische mittels SDS-PAGE aufgetrennt (3.1.14) und auf eine PVDF-Membran übertragen werden (3.1.16).

3.1.13 CHROMATIN-IMMUNPRÄZIPITATION (CHIP)

Die Chromatin-Immunpräzipitation wird verwendet, um die Assoziation von Proteinen mit DNA-Abschnitten zu untersuchen.

Zunächst werden Proteine mit der DNA mittels Formaldehyd quervernetzt, um die in der Zelle vorliegenden Protein-DNA-Komplexe zu konservieren. Im Folgenden muss das Chromatin mit geeigneten Methoden in kleine Bruchstücke (optimal sind etwa 500 Basenpaare) zerteilt werden, um später die Interaktion eines Proteins auf einen möglichst beschränkten Abschnitt der DNA eingrenzen zu können. Während Proteine und DNA noch immer quervernetzt sind, erfolgt eine spezifische Anreicherung des zu untersuchenden Proteins mit Hilfe von Antikörpern. Eventuell vom Protein gebundene DNA wird hierbei mit aufgereinigt und kann nach der enzymatischen und hitzevermittelten Abspaltung vom Protein mit Hilfe spezifischer Primer in der qPCR (3.2.6) nachgewiesen werden.

Material:

- Sonikator
- 36,5 % Formaldehydlösung
- 2,5 M Glycin
- PBS
- ChIP Lysispuffer I (5 mM PIPES pH8, 85 mM KCl, 0,5 % Igepal)
- ChIP Lysispuffer II (10 mM TRIS pH 7,5, 150 mM NaCl, 1 % Igepal, 1 % DOC, 1 mM EDTA) mit 0,3 % / 0,1 % / 0,0 % SDS
- ChIP Waschpuffer I (20 mM TRIS pH 8,0, 150 mM NaCl, 2 mM EDTA, 1 % Triton X-100)

- CHIP Waschpuffer II (20 mM TRIS pH 8,0, 500 mM NaCl, 2 mM EDTA, 1 % Triton X-100)
- CHIP Waschpuffer III (10 mM TRIS pH 8,0, 1 % Igepal, 1 % DOC, 1 mM EDTA, 250 mM LiCl)
- TE-Puffer (10 mM TRIS pH 8,0, 1 mM EDTA)
- CHIP Elutionspuffer für Sepharose (1 % SDS, 100 mM NaHCO₃)
- Reversionspuffer (1,92 M NaCl, 96 mM EDTA, 385 mM Tris pH 6,8, 385 µg/ml Proteinase K, 192 µg/ml RNase A)
- Proteaseinhibitoren Aprotinin, Leupeptin und PMSF (je 10 µg/µl)
- RNase A, 10 mg/ml
- Proteinase K, 20 mg/ml
- Protein A/G-Sepharose
- BSA, 20 mg/ml
- ssDNA-Blocklösung, 4 mg/ml
- DNA-Aufreinigungs kit (Qiagen)
- EDTA, 0,5 M
- NaCl, 5 M
- Tris, pH 6,8, 1M
- Ethidiumbromid-Agarosegel

Durchführung:

Die Durchführung dieser Methode erstreckt sich über mehrere Tage und ist in verschiedene Abschnitte unterteilt:

1. Chromatin-Isolation mit Quervernetzung von Protein und DNA

Da für die Chromatinisolation eine große Anzahl an Zellen benötigt wird, werden pro Kulturbedingung mehrere Schalen verwendet und im Verlauf der Ernte zusammengeführt. Bei dem beschriebenen Erntevorgang wird jeweils eine Schale (identische Wachstumsfläche) pro Bedingung separat geerntet und später für die Herstellung von Protein-Gesamtzellextrakt durch IPH-Lyse (3.1.7) und zur Gewinnung von RNA (3.2.6) verwendet. Diese separate Schale wird keiner Quervernetzung unterzogen. Zusätzlich wird anhand dieser die Zellzahl bestimmt. Sie ist für die Bestimmung der zu verwendenden Volumina für die Zellyse während der Chromatinherstellung entscheidend.

Zur Quervernetzung von Protein und DNA wird Formaldehyd mit einer finalen Konzentration von einem Volumenprozent zugegeben. Die Inkubation erfolgt für zehn Minuten bei 37 °C oder

für 20 Minuten bei Raumtemperatur. Die Reaktion wird durch Zugabe von Glycin mit einer Endkonzentration von 125 mM und fünfminütige Inkubation abgestoppt. Das Medium sowie das enthaltene Formaldehyd werden abgeschüttet und durch zweimaliges Waschen des Zellrasens mit kaltem PBS entfernt. Hierauf werden die Zellen in einem Milliliter PBS abgeschabt und in ein Falcon überführt. Alle Vorgänge ab diesem Zeitpunkt werden auf Eis bzw. in einer Kühlzentrifuge durchgeführt. Die Zellen werden durch Pelletieren bei 400 g vom PBS befreit. Als nächstes wird das Zellpellet in Lysispuffer I resuspendiert, wobei zwei Milliliter Puffer pro fünf Schalen eingesetzt werden. Dieser Puffer bewirkt ein Lysieren der Zellen, ohne jedoch den Zellkern aufzubrechen. Nach mindestens zehnminütiger Inkubation werden die Zellkerne bei 400 g pelletiert und der Überstand verworfen. Die Kerne werden in Lysispuffer II (0,3 % SDS) aufgenommen. Hierbei wird durch Einsetzen eines entsprechenden Volumens die Zellzahl auf 30 Millionen Zellen pro Milliliter eingestellt. Dies ist entscheidend, um die Vergleichbarkeit von Experimenten zu gewährleisten, da die Effizienz der späteren Sonifizierung des Chromatins auch von der Chromatindichte in der Lösung abhängt. In diesem Puffer werden die lysierten Zellen mindestens zehn Minuten, bei Bedarf aber bis zu zwei Tage, gelagert.

Das Protokoll für die Fragmentierung des Chromatins mittels eines Sonikators variiert leicht zwischen den Experimenten, da für die Wahl der Intensität und Häufigkeit der Pulse auch der Zustand der Sonikatorspitze mit einbezogen werden muss. Es werden jedoch bei allen Experimenten Pulse von einer Sekunde Dauer und einer Pause von drei Sekunden zwischen den Pulsen verwendet. Die Anzahl an Fragmentierungspulsen liegt zwischen 50 und 80 Wiederholungen, während die Amplitude zwischen 20 und 30 Prozent des Maximums eingestellt wird. Es werden Aliquots mit einem Volumen von 500 µl in 15 ml-Falcons für die Sonifizierung eingesetzt. Nach der Sonifizierung wird Zelldebris durch 30-minütige Zentrifugation bei 6.900 g pelletiert und das fragmentierte Chromatin mit den Überständen gewonnen und die Ansätze einer Bedingung vereint.

In einem anschließenden Schritt wird die Qualität der Chromatinfragmentierung geprüft. Hierfür werden 50 µl des Chromatins einem Proteinverdau mit einem Mikroliter Proteinase K (20 mg/ml) unterzogen. Zusätzlich wird enthaltene RNA durch Zugabe von zwei Mikrolitern RNase A (10 mg/ml) abgebaut. Der Verdau findet für drei Stunden bei 55 °C mit anschließender Inkubation bei 65 °C für mindestens acht Stunden statt.

Danach wird die DNA mittels Affinitätsäulen nach Herstellerprotokoll (Qiagen) aufgereinigt. Nach DNA-Konzentrationsmessung mittels NanoDrop (3.2.4) werden zwischen 800 und 1500 ng DNA auf ein einprozentiges Agarosegel (3.2.5) aufgetragen. Die Aufteilung der

aufgetrennten DNA auf verschiedene Größenbereiche wird unter UV-Licht beurteilt. Optimal ist eine Akkumulation in einem Bereich von 500 Basenpaaren. Insofern eine Fragmentierung grundsätzlich stattgefunden hat, also nicht ausschließlich Chromatin im hochmolekularen Bereich vorhanden ist, wird das Experiment unabhängig vom erzielten Ergebnis fortgeführt.

2. Immunpräzipitation

Die Immunpräzipitation findet weitgehend wie in Kapitel 3.1.12 erklärt statt. Vor Beginn des *Preclearings* wird die SDS-Konzentration der Chromatinlösung durch Zugabe des zweifachen Volumens an Lysispuffer II (0 % SDS) auf 0,1 % angepasst. Die zum *Preclearing* benutzte Sepharose wird bei dieser Methode zuvor durch zwei- bis zwölfstündige Inkubation mit 1 mg/ml BSA und 400 µg/ml sonifizierter DNA aus Lachssperma (jeweils Endkonzentrationen) in Lysispuffer II (0,1 % SDS) gesättigt. Freies BSA und freie DNA werden nach dem Sättigungsvorgang durch zweimaliges Waschen mit Lysispuffer II entfernt.

Für die Immunpräzipitation werden 5 µg Antikörper pro 75 µg Chromatin verwendet. Für Antikörper, die eine sehr gute Anreicherung zeigen (p53 und H3), wird die Chromatin-Menge auf 30 µg (3 µg α-p53-Antikörper) bzw. 20 µg (1 µg α-H3-Antikörper) reduziert.

Zusätzlich zu den Aliquots für die verschiedenen IPs wird pro Bedingung 1 % des IP-Volumens vom Chromatin (nach *Preclearing*) abgenommen. Dies dient bei der späteren qPCR als Bezugswert für die totale Chromatinmenge vor Durchführung der IP („Input“).

Nach der Übernachtinkubation der Chromatinlösung mit den Antikörpern und der Immobilisierung der Antikörper-Protein-DNA-Komplexe mit Sepharose für drei Stunden, wird die Sepharose mit den gebundenen Komplexen nach folgendem Schema mit je 1 ml Puffer gewaschen:

- Waschpuffer I, 2x
- Waschpuffer II, 2x
- Waschpuffer III, 4x
- Tris/EDTA, pH8, 2x

Das Waschen erfolgt durch zweiminütiges Rotieren. Alle Zentrifugationen finden bei Raumtemperatur und 6.000 g statt.

3. Auflösen der Quervernetzung von Protein und DNA, Nachweis der DNA durch qPCR

Um analysieren zu können, welche DNA-Abschnitte mit dem aufgereinigten Protein verbunden waren, müssen die Protein-DNA-Komplexe zuerst von der Sepharose gelöst und danach die

Proteinkomponente entfernt werden. Aufgrund des hohen SDS-Gehalts des Elutionspuffers müssen die folgenden Schritte bei Raumtemperatur erfolgen.

Dazu wird die Sepharose nach dem Waschen mit 250 µl Elutionspuffer versetzt, stark gevortext und 20 Minuten rotierend inkubiert. Nach Zentrifugation bei 6.000 g und Abnahme des Überstandes wird der Vorgang ein zweites Mal wiederholt. Die beiden Eluate werden vereinigt. Die zuvor abgenommenen Inputs (1 % der Chromatinmenge der IPs) werden parallel behandelt, indem Elutionspuffer zugegeben wird. Um enthaltenes Protein und RNA zu verdauen, werden 52 µl Reversionspuffer zugegeben. Der Verdau erfolgt für drei Stunden bei 55 °C, gefolgt von acht bis zwölf Stunden bei 65 °C. Danach wird die DNA über ein Kit nach Angaben des Herstellers aufgereinigt.

Die DNA, die bei dem Aufreinigungsverfahren gewonnen wurde, wird für den Einsatz in der qPCR in einer Verdünnung von 1:6 bis 1:12 eingesetzt. Von dieser Verdünnung werden 6 µl pro Messung in Triplikaten in eine 96-Well-Platte vorgelegt. Die Bestimmung der DNA-Mengen und die Berechnung der Anreicherungen von Proteinen erfolgt wie im Kapitel 3.2.6 beschrieben.

3.1.14 SDS-POLYACRYLAMID-GELELEKTROPHORESE (SDS-PAGE)

Die SDS-PAGE dient der Auftrennung von Proteingemischen, beispielsweise von eukaryotischen Zellextrakten oder von rekombinanten Proteinen aus Bakterien. Durch die Auftrennung ist sie Ausgangspunkt für weitere Analyseverfahren. Es werden Gele mit einer Gitterstruktur aus Polymeren verwendet, die je nach verwendeter Prozentigkeit des Polymers eine mehr oder weniger dichte Gitterstruktur aufweisen und somit den Proteinen beim Durchlauf einen entsprechenden Widerstand bieten. Dies bewirkt ein schnelleres Durchlaufen von kleinen Proteinen, während größere zurückgehalten werden, was in einer Auftrennung des Proteingemisches resultiert.

Die verwendeten Gele sind zweiteilig, zum einen bestehend aus einem Sammelgel, das ein gleichzeitiges, konzentriertes Einlaufen der geladenen Proteine sicherstellt. Zum anderen findet die eigentliche Auftrennung im Trenngel statt.

Material:

- Acrylamid 30 %/Bisacrylamid-Lösung
- 1 M Tris pH 8,8
- 1 M Tris pH 6,8
- 20 % SDS
- 20 % APS

- TEMED
- Isopropanol
- SDS-Laufpuffer (192 mM Glycin, 25 mM Tris, 0,1 % SDS)
- SDS-Probenpuffer (62,5 mM TRIS pH 8,0, 0,5 % SDS, 10 % Glycerol, 0,025 % Bromphenolblau, 5 % β -Mercaptoethanol)
- Protein-Größenstandard

Durchführung:

Trenn- und Sammelgel werden separat nach folgendem Schema pipettiert, wobei das Volumen an Acrylamid im Trenngel abhängig von der gewünschten Prozentigkeit, also Gitterdicke des Gels ist (Volumina pro Gel mit einer Dicke von 1,5 mm):

Trenngel:

- | | |
|-------------------------------|------------------|
| ➤ Acrylamid 30 %/Bisacrylamid | x ml |
| ➤ Deionisiertes Wasser | 5,3125 ml - x ml |
| ➤ 1 M Tris, pH 8,8 | 2,8 ml |
| ➤ 20 % SDS | 37,5 μ l |
| ➤ 20 % APS | 20 μ l |
| ➤ TEMED | 10 μ l |
| ➤ Gesamtvolumen | 8,18 ml |

Sammelgel:

- | | |
|-------------------------------|------------|
| ➤ Acrylamid 30 %/Bisacrylamid | 0,85 ml |
| ➤ Deionisiertes Wasser | 3,5 ml |
| ➤ 1 M Tris, pH 6,8 | 0,625 ml |
| ➤ 20 % SDS | 25 μ l |
| ➤ 20 % APS | 10 μ l |
| ➤ TEMED | 5 μ l |
| ➤ Gesamtvolumen | 5,015 ml |

Das Trenngel wird zuerst in die dafür vorgesehene Vorrichtung gegossen und sofort mit Isopropanol überschichtet. Dies dient der Herstellung einer geraden Kante zwischen Sammel- und Trenngel sowie der gleichmäßigen Polymerisation, da diese beim Kontakt mit Luft verlangsamt ist. Nach erfolgter Polymerisation wird der Alkohol entfernt, das Sammelgel darüber gegossen und Käbme zum Einfügen von Aussparungen eingebracht.

Nach Abschluss der Polymerisation des gesamten Gels wird dieses in eine Gellaufapparatur eingebaut und die Apparatur mit SDS-Laufpuffer aufgefüllt. Die aufzutrennenden Proben werden vorbereitet. Wenn sich hierbei aufgrund verschiedener Proteinkonzentrationen ungleiche Volumina ergeben, wird mit demselben Puffer auf das maximale Volumen aufgefüllt, mit dem die verwendeten Extrakte hergestellt wurden. Es wird Probenpuffer mit einfacher Endkonzentration zugegeben. Nach fünfminütigem Aufkochen der Proben bei 95 °C erfolgt der Auftrag in die Geltaschen. Nicht besetzte Taschen werden mit demselben Puffer (mit SDS-Probenpuffer) versetzt, der auch in den Proben vorliegt. Dies vermeidet einen ungleichen Lauf der Front an den Gelseiten („Smiley-Effekt“). In eine separate Tasche oder alternativ in eine bereits beladene wird vorgefärbter Protein-Größenstandard aufgeladen.

Der Lauf erfolgt mit einer festen Spannung von 150 Volt für zirka 90 Minuten, bis die Farbstoff-Lauffront aus dem Gel gelaufen ist. Die Gele werden für den Western Blot (3.1.16) oder eine Färbung durch Coomassie-Farbstoff (3.1.15) weiter verwendet.

3.1.15 COOMASSIE-FÄRBUNG

In der Coomassie-Färbung werden der Größe nach aufgetrennte Proteine in einem Polyacrylamidgel sichtbar gemacht. Die Methode dient der Detektion größerer Proteinmengen von mindestens 0,5 µg pro Bande. Sie ist außerdem nur geeignet für aufgereinigte Proteine oder Gemische weniger Proteine, da die Anfärbung mit dem Farbstoff Coomassie Brilliant Blau G-250 unspezifisch erfolgt und die Abschätzung der Spezifität einer Proteinbande nur anhand der Molekülgröße möglich ist.

Material:

- Coomassie-Färber (25 % Methanol, 10 % Eisessig, 0,25 % (w/v) Coomassie brillant blau G-250)
- Coomassie-Entfärber (25 % Methanol, 10 % Eisessig)

Durchführung:

Direkt nach der SDS-PAGE wird das Gel kurz in Wasser gewaschen und dann für 10 bis 20 Minuten in Coomassie-Färber unter Schwenken inkubiert. Die genaue Dauer der Färbung hängt von der Prozentigkeit und der Dicke des Gels ab und wird optisch beurteilt. Nach der Färbung wird überschüssige Lösung abgekippt und mehrmals mit Wasser nachgewaschen.

Danach wird die Hintergrundfärbung des Gels durch mehrmalige Inkubation in jeweils frischem Entfärber entfernt, ohne die angefärbten Proteinbanden zu entfärben.

3.1.16 WESTERN BLOT (NASS BLOT / TANK BLOT)

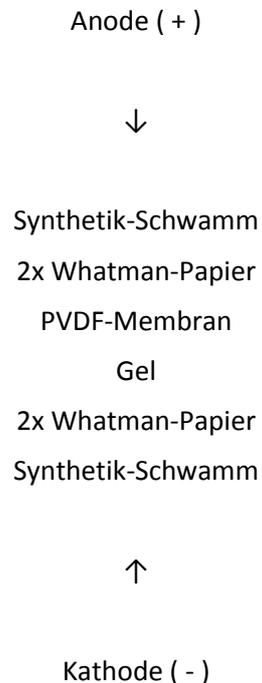
Die Übertragung von Proteinen aus Polyacrylamidgelen auf Membranen dient als Vorbereitung für einen spezifischen Nachweis mittels einer Antikörperfärbung. In dieser Arbeit kommen PVDF-Membranen zum Einsatz.

Material:

- Tank Blot-Laufpuffer (384 mM Glycin, 50 mM Tris, 0,2 % SDS, 20 % Methanol)
- Whatman-Papier
- PVDF-Membran

Durchführung:

Nach Durchführung der SDS-PAGE wird das Gel nach folgendem Schema in die Blot-Apparatur eingebaut:



Die Membran muss zuvor kurz in 100 % Methanol vorbereitet werden, da die Oberfläche äußerst hydrophob ist, was die Übertragung verhindern würde. Alle Komponenten sind mit

Tank Blot-Laufpuffer getränkt und werden in der Apparatur schließlich komplett mit diesem übergossen.

Die Übertragung der Proteine auf die Membran wird durch Anlegen einer Spannung von 45 bis 50 Volt gestartet. Die Dauer beträgt je nach Größe der zu analysierenden Proteine zwischen 45 Minuten und drei Stunden.

3.1.17 IMMUNFÄRBUNG VON PVDF-MEMBRANEN

Proteine, die im Western Blot Verfahren auf eine PVDF-Membran übertragen wurden, können mit Hilfe von Antikörpern spezifisch detektiert werden.

Material:

- Western Blot-Blockpuffer (TBS, 0,5 % Tween 20, 4 % (w/v) Milchpulver)
- Western Blot-Waschpuffer (TBS, 0,5 % Tween 20)
- TBS
- ECL-Lösung 1 (100 mM TRIS pH 8,0, 1 % (v/v) Luminol (250 mM Stock), 0,444 % (v/v) p-Cumarsäure (90 mM Stock))
- ECL-Lösung 2 (100 mM TRIS pH 8,0, 0,03 % H₂O₂)

Durchführung:

Als Vorbereitung für die Antikörperfärbung wird die Membran für mindestens 30 Minuten in Western Blot-Blockpuffer inkubiert, um unspezifische Bindungsstellen abzusättigen. Der gewünschte Primäntikörper mit der entsprechenden Proteinspezifität wird in definierter Verdünnung (2.17.1) in Blockpuffer in einem 50 ml-Falcon vorbereitet. Die Membran wird an die Falconwand angelegt und unter Rotation über Nacht mit der Antikörperlösung inkubiert. Nicht oder schwach gebundene Antikörper werden daraufhin durch dreimalige Inkubation der Membran mit Waschpuffer für zehn Minuten entfernt. In einem weiteren Schritt wird die Membran im Falcon mit einem Peroxidase-gekoppelten Sekundäntikörper benetzt und eine Stunde unter Rotation inkubiert. Schwach gebundener Sekundäntikörper wird wiederum durch dreimaliges Waschen in Waschpuffer für fünf Minuten entfernt. Abschließend wird die Membran einmal mit reinem TBS gewaschen, um restliches Detergenz zu entfernen.

Für die Sichtbarmachung der Proteinbanden werden ECL-Lösung I (enthält das Chromogen Luminol) und ECL-Lösung II (enthält Wasserstoffperoxid als Oxidationsmittel) vereinigt und auf die Membran gegeben. Nach kurzer Inkubation findet die Exposition eines Films auf der

Membran statt. Die Entwicklung des Films erfolgt automatisiert. Für den Größenvergleich der erhaltenen Banden wird die auf der Membran sichtbare Markerleiter auf den Film abgezeichnet.

3.1.18 IMMUNZYTOCHEMIE: ANTIKÖRPERFÄRBUNG VON EUKARYOTISCHEN ZELLEN

In der Immunzytochemie werden Proteine in Zellen, die auf Deckgläschen fixiert sind, mit Hilfe von spezifischen Antikörpern angefärbt. Die Zellen können zuvor in der Zellkultur Behandlungen unterzogen worden sein, deren Auswirkungen auf die Proteinexpression untersucht werden soll.

Material:

- Formaldehydlösung (4 %)
- PBS
- Permeabilisationspuffer (PBS, 0,2 % Triton X-100)
- Blockpuffer (PBS, 0,1 % Triton X-100, 4 % BSA)
- Waschpuffer (PBS, 0,1 % Triton X-100)
- DAPI, 1 mg/ml
- Proteinspezifischer Primärantikörper
- Cy3-gekoppelter Sekundärantikörper
- Mowiol

Durchführung:

Die Zellen werden 24 Stunden vor der Färbung auf Deckgläschen ausgesät, die zuvor auf den Boden von 6-Well-Platten gelegt wurden. Am Tag darauf erfolgt nach zweimaligem Waschen mit PBS die Fixierung der Zellen durch zehnmütige Inkubation in 4 % Formaldehyd bei Raumtemperatur. Anschließend wird das Formaldehyd entfernt und die Zellen vier Mal mit PBS für fünf Minuten gewaschen. Durch einen Inkubationsschritt in Permeabilisationspuffer (enthält 0,2 % Triton X-100) von fünf Minuten Dauer werden die Zellen permeabilisiert und nachfolgend in PBS gewaschen. Eine Inkubation in Blockpuffer (enthält 4 % BSA) für 30 Minuten dient zum Blocken unspezifischer Bindungen. Ungebundenes BSA wird durch Waschen in PBS entfernt. Die Deckgläschen werden aus den *Wells* entnommen und in einer feuchten Kammer mit einem ausreichenden Volumen an Primärantikörperlösung (in Waschpuffer) benetzt. Die Inkubation erfolgt für zwei Stunden bei Raumtemperatur. Überschüssiger Antikörper wird durch Schwenken in einem Behälter mit PBS entfernt. Ein Cy3-gekoppelter

Sekundärantikörper wird verdünnt in Blockpuffer (1:200) auf die Zellen aufgetropft und in der feuchten Kammer für 30 Minuten bei Raumtemperatur im Dunklen inkubiert. Ungebundener Antikörper wird wiederum durch Schwenken in PBS entfernt. Nun werden die Zellkerne durch Anfärbung der DNA mittels DAPI sichtbar gemacht. Hierzu werden die Deckgläschen 2 Minuten mit einer DAPI-Lösung (1:10.000-Verdünnung der 1 mg/ml-Stocklösung in PBS) inkubiert und anschließend zweimal in PBS und einmal in deionisiertem Wasser geschwenkt. Um ein Austrocknen zu verhindern, werden die Zellen durch Auftropfen von 20 µl Mowiol auf Objektträgern eingedeckelt und bis zum Anfertigen der Fotos im Dunkeln kühl gelagert.

3.1.19 IMMUNHISTOCHEMIE: ANTIKÖRPERFÄRBUNG VON HISTOLOGISCHEN SCHNITTEN

In der Immunhistochemie werden Proteine in fixierten Zellen innerhalb von histologischen Schnitten unter Verwendung spezifischer Antikörper angefärbt.

Material:

- Paraffineingebettete Gewebeschnitte
- Zitronensäure
- Wasserstoffperoxid
- Feuchte Kammer
- BSA
- PBS
- TBS
- Blockpuffer (PBS, 2 % BSA)
- Waschpuffer (TBS, 0,1 % Tween 20)
- Proteinspezifischer Primärantikörper
- VECTASTAIN Elite ABC Kit, universal, R.T.U. (Linaris)
- DAB
- 30 % Wasserstoffperoxid
- Hämalaun, sauer
- DEPEX

Durchführung:

Die zu färbenden Schnitte werden auf 60 °C vorgewärmt, um das Entfernen des Paraffins zu erleichtern. Die Deparaffinierung und Hydrierung wird nach folgendem Protokoll durchgeführt:

- 100 % Xylol, 4x 5 Minuten
- 100 % Ethanol, 2 Minuten
- 90 % Ethanol, 2 Minuten
- 80 % Ethanol, 2 Minuten
- 70 % Ethanol, 2 Minuten
- Deionisiertes Wasser, 2 Minuten

Danach erfolgt die Demaskierung der Proteinepitope in den Zellen durch Aufkochen in Zitratpuffer (Endkonzentration 10 mM Zitronensäure) bei pH 6 für 20 Minuten in der Mikrowelle, gefolgt von 30-minütiger Abkühlung. Zum Blockieren endogener Peroxidaseaktivität werden die Schnitte nun für zehn Minuten in einer dreiprozentigen Wasserstoffperoxidlösung inkubiert und anschließend zwei Mal für zwei Minuten in deionisiertem Wasser gewaschen. Unspezifische Bindungsstellen werden durch Inkubation der Schnitte in einer zweiprozentigen BSA-Lösung (in PBS) für eine Stunde abgesättigt. Ab diesem Schritt erfolgen längere Inkubationen in der feuchten Kammer, um ein Austrocknen zu verhindern. Primärantikörper wird in 0,1 % BSA-Lösung (in PBS) verdünnt und die Schnitte über Nacht damit inkubiert. Am darauffolgenden Tag wird überschüssiger Antikörper durch Waschen in Waschpuffer (mit 0,1 % Tween 20) für fünf Minuten entfernt. Jetzt folgt die Inkubation mit dem biotinylierten Sekundärantikörper des Kits, der universell Primärantikörper erkennt, die in Maus oder Kaninchen hergestellt wurden. Nach 30 Minuten werden nicht gebundene Antikörper durch Eintauchen in Waschpuffer für fünf Minuten entfernt. Für weitere 30 Minuten werden die Schnitte nun mit ABC- (Avidin-Biotin-Complex) Reagenz inkubiert. In diesem liegt die Meerrettich-Peroxidase gekoppelt an Biotin vor. Biotin wiederum bindet mit hoher Affinität an Avidin, das vier Bindestellen für Biotin enthält. Dadurch findet eine Kopplung der Peroxidase an den Sekundärantikörper statt, der seinerseits biotinyliert ist. Überschüssiges ABC-Reagenz wird für fünf Minuten durch Inkubation in Waschpuffer entfernt. Zur letztendlichen Anfärbung wird DAB als Substrat für die Peroxidase verwendet. 200 mg werden in 200 ml TBS gelöst und 100 µl Wasserstoffperoxid zugegeben. Die Inkubationsdauer ist variabel und wird anhand des visuellen Färbeeindrucks bestimmt. Die Färbereaktion wird durch Abkippen der DAB-Lösung und Waschen in deionisiertem Wasser abgestoppt. Im Anschluss werden die Zellen des Schnittes mit Hämalaun gegengefärbt. Dazu werden die

Schnitte zuerst für 15 Sekunden in gebrauchsfertige Hämalaunlösung getaucht. Der eigentliche Färbevorgang findet daraufhin unter fließendem Leitungswasser durch pH-Umschlag statt („Bläuen“). Abschließend werden die Schnitte durch Umkehr der oben beschriebenen Xylol- und Alkoholreihe dehydriert, wobei die Anzahl der Inkubationsschritte im Xylol halbiert wird. Zur Konservierung der Färbung erfolgt Eindeckeln mit Hilfe von Deckgläschen, die durch DEPEX-Eindeckmittel fixiert werden.

3.1.20 WACHSTUMSKURVE

Die Erstellung von sogenannten Wachstumskurven dient zur Untersuchung der Proliferationsfähigkeit von Zellen. Hierzu wird in bestimmten Intervallen die Anzahl der vorhandenen Zellen bestimmt und durch Vergleich mit der ursprünglich ausgesäten Zellzahl der Verdopplungswert errechnet. Es wird lediglich die Proliferation der Zellen bestimmt. Eine Messung des Wachstums, also der Größe der Zellen, findet nicht statt.

Material:

- Neubauer Zählkammer
- Vollmedium (DMEM mit 10 % FCS und 5 % Penicillin/Streptomycin)
- Trypsin/EDTA

Durchführung:

Alle Wachstumskurven in der vorliegenden Arbeit werden mit Zellen durchgeführt, die mit siRNA transfiziert wurden. Daher wird das Vorgehen mit dieser Behandlung im Detail beschrieben.

Pro Kulturbedingung werden Triplikate in definierter Zellzahl auf *Wells* einer 6-*Well*-Platte ausgesät. Drei Stunden nach der Aussaat findet die RNA-Transfektion mit LipoRNAiMax statt (3.1.5). Nach drei Tagen in Kultur wird die erste Zählung durchgeführt. Hierfür wird das Medium von den Zellen gründlich abgenommen und das *Well* zwei Mal mit PBS gewaschen und dieses jeweils möglichst restlos abgesaugt. Nachfolgend wird Trypsin zupipettiert und so lange bei 37 °C inkubiert, bis unter dem Mikroskop die Ablösung aller Zellen von der Wachstumsfläche nachweisbar ist. Der Trypsinverdau wird durch Zugabe von Vollmedium abgestoppt und die Zellen durch kräftiges Pipettieren vereinzelt. 90 % des Gesamtvolumens werden in ein Reagiergefäß überführt. Ein eventueller zusätzlicher Verdünnungsfaktor bei zu großer Zelldichte wird in der späteren Rechnung berücksichtigt. Die Zählung erfolgt unter

Zuhilfenahme einer Neubauer Zählkammer durch Auszählung aller zur Verfügung stehender Quadranten (acht Quadranten, 3.1.2). Anhand der ermittelten Zellzahl wird wiederum eine definierte Anzahl auf eine neue 6-Well-Platte ausgesät. Die Verdopplung der Zellen wird bestimmt, indem die ermittelte Zellzahl der *Wells* zu der zuvor ausgesäten ins Verhältnis gesetzt wird. Hierbei werden die Ergebnisse der Triplikate gemittelt.

Die nach der erneuten Aussaat verbliebenen Zellen werden zum Herstellen von Protein- und RNA-Extrakt (3.1.7 und 3.1.9) verwendet. Die neu ausplattierten Zellen werden nach drei Stunden einer weiteren Transfektion mit siRNA unterzogen. Das beschriebene Vorgehen wird für einen zweiten Zählzeitpunkt nach weiteren drei Tagen wiederholt. Auch hier findet eine erneute Transfektion statt. Nach drei Tagen Wartezeit wird ein letztes Mal geerntet und die Zellzahl bestimmt. Nach dieser dritten Bestimmung der Verdopplungsrate ist das Experiment abgeschlossen.

Für die Verdopplungsrate der Zellen wird eine kumulative Darstellung gewählt, da hierdurch eine Verringerung der Zellzahl, beispielsweise durch Apoptose, dargestellt werden kann. Bei einer additiven Darstellung würde diese Verringerung darstellungsbedingt als Anstieg der Kurve ausgegeben werden. Die kumulierte Verdopplungsrate nach Abschluss der dritten Zählung ergibt sich dabei durch Multiplikation aller drei einzelnen errechneten Verdopplungsraten. Die Streuung der Ergebnisse in den Triplikaten wird in Form der positiven und negativen Standardabweichung als Balken im Diagramm angegeben. Die Berechnung erfolgt ohne Fehlerfortpflanzung. Die absolute Standardabweichung des jeweiligen Einzelwertes wird zuerst in einen relativen Wert umgerechnet, um sie im Diagramm in Bezug auf die kumulierten Werte erneut absolut darstellen zu können.

3.1.21 SOFT-AGAR-ASSAY

Im Soft-Agar-Assay wachsen Tumorzellen in einer erhärteten Agarlösung, was indikativ für deren Grad der Entartung gewertet werden kann. Das Agar, welches in 6-Well-Platten eingebracht wird, ist dabei zweischichtig. Die untere Schicht mit 0,5-prozentigem Agar dient als Barriere, sodass die Zellen keinen Kontakt zur Oberfläche des *Wells* erhalten können. Die obere Schicht ist die eigentliche Wachstumsschicht der Zellen und enthält 0,3 % Agarose. Das Agar bleibt im erhärteten Zustand zähflüssig.

Material:

- Agarose
- Vollmedium (DMEM mit 10 % FCS und 5 % Penicillin/Streptomycin)

Durchführung:

Zellen, die die gewünschten Behandlungen erhalten hatten, werden trypsiniert wie bei der Methode Wachstumskurve erklärt (3.1.20) und die Zellzahl in der Neubauer Zählkammer bestimmt (3.1.2). Eine fünfprozentige Agarlösung wird hergestellt und autoklaviert. Diese wird bei 50 °C im Wasserbad gelagert. Vollmedium wird bei 37 °C bereitgehalten.

Für die Herstellung des Wachstumsagars wird die vorbereitete Agarlösung im Verhältnis 1:10 mit Vollmedium verdünnt und sofort zwei Milliliter davon in jedes *Well* einer 6-*Well*-Platte pipettiert. Die Erhärtung wird abgewartet und verbleibendes Wachstumsagar weiter bei 50 °C gelagert. Unterdessen werden 4×10^4 Zellen in einem Milliliter Vollmedium mit zwei Millilitern Wachstumsagar vermischt. Dabei muss beachtet werden, dass die Lösung nicht vor dem Pipettieren in das *Well* (teilweise) erhärtet und gleichzeitig die Zellen nicht durch zu hohe Temperaturen des Wachstumsagars abgetötet werden. Die hergestellte Zell-Agar-Suspension wird sofort auf drei *Wells* aufgeteilt, um ein technisches Triplikat zu erhalten. Pro *Well* werden 750 µl Suspension pipettiert, was 1×10^4 Zellen entspricht. Verbleibende Zellen werden zur Extraktion von Protein und RNA verwendet. Nach Aushärten des Wachstumsagars erfolgt die Inkubation im Brutschrank für zehn Tage. Danach werden die entstandenen Zellkolonien unter dem Binokular fotografiert und computergestützt manuell ausgezählt. Dabei werden feste Schwellenwerte für die Mindestgröße einer Kolonie verwendet. Die Auszählung erfolgt anonymisiert.

3.1.22 PULLDOWN

Im *Pulldown* werden Interaktionen von Proteinen untersucht. Die potenziellen Interaktionspartner können dabei alle in *E.Coli*-Bakterien exprimiert werden. Im Falle einer positiven Interaktion wäre dann gezeigt, dass diese direkt ist und keine weiteren Bestandteile, wie weitere Proteine, benötigt. In dieser Arbeit wird die Methode allerdings dazu verwendet, um große Mengen an Protein (GLI1) durch bakterielle Expression zu produzieren. Die potenziellen Interaktionspartner werden in Form von eukaryotischem Protein-Gesamtzellextrakt eingesetzt.

Material:

- Rekombinantes, bakteriell exprimiertes Protein (3.2.3)
- IPH-Puffer (50 mM TRIS pH 8,0, 5 mM EDTA, 0,5 % Igepal) mit 200 mM NaCl
- Glutathion-Agarose

Durchführung:

Die bakteriell exprimierten, an Agarose gebundenen Proteine werden in 1,5 ml-Reagiergefäße vorgelegt. Das Volumen an Glutathion-Agarose wird in den einzelnen Bedingungen durch Zugabe frischer Agarose auf das höchste vorliegende Volumen aufgefüllt. Alle Ansätze werden durch einstündige Inkubation in 700 µl IPH-Puffer mit 200 µg/ml BSA (Endkonzentration) abgesättigt. Die Agarose wird nachfolgend zweimal in IPH-Puffer gewaschen. Protein-Gesamtzellextrakt wird zugegeben, mit IPH-Puffer auf 700 µl aufgefüllt und über Nacht gekühlt unter Rotation inkubiert. Am nächsten Tag wird die Agarose fünfmal in IPH-Puffer gewaschen (Zentrifugationen bei 4000 g), bei 95 °C aufgeköcht und das Proteingemisch in der SDS-PAGE aufgetrennt (3.1.14) und auf eine PVDF-Membran übertragen (3.1.16).

3.1.23 *IN VITRO*-METHYLIERUNG UND FLUOROGRAPHIE

Die Methode der *in vitro*-Methylierung dient dem Nachweis der posttranslationalen Modifikation eines bestimmten Zielproteins durch eine Methyltransferase. Sowohl Enzym als auch Zielprotein wurden in *E.Coli*-Bakterien produziert und aufgereinigt (3.2.3). Bei der Detektion bedient man sich eines radioaktiven Verfahrens.

Material:

- Aufgereinigte, rekombinante Proteine
- ¹⁴C-markiertes S-Adenosyl-Methionin (SAM)
- PBS

Durchführung:

Rekombinante Proteine (Enzyme eluiert, Zielproteine an Agarose gebunden) werden vereint, 2 µl ¹⁴C-SAM (ca. 0,02 µCi/µl) zugegeben und das Gesamtvolumen der Ansätze durch Zugabe von PBS auf das größte Volumen einer Einzelbedingung angeglichen. Die Methylierungsreaktion erfolgt bei 37 °C unter Schütteln für drei Stunden und wird durch Zugabe von Protein-Probenpuffer (zweifache Endkonzentration) abgestoppt. Danach wird das Proteingemisch in

der SDS-PAGE (3.1.14) aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran übertragen (3.1.16). Um die Detektion der radioaktiv markierten Methylgruppen zu ermöglichen, wird der Membran eine Verstärkerfolie aufgelegt, die die Energie der β -Strahlung in die Aussendung von Energie in Form von Photonen umsetzt und damit die Detektion mit Röntgenfilmen erlaubt (Fluorographie).

3.2 MIKROBIOLOGISCHE UND MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN

3.2.1 TRANSFORMATION KOMPETENTER BAKTERIEN MIT PLASMID-DNA

E.Coli-Bakterien können mit bestimmten Behandlungen kompetenter hinsichtlich der Aufnahmefähigkeit von DNA gemacht werden. Diese Bakterien werden genutzt, um Plasmid-DNA zu amplifizieren, oder auch, um Proteine zu exprimieren und daraufhin aufzureinigen.

Material:

- Kompetente *E.Coli*-Bakterien (DH5 α für Plasmidpräparationen, BL21 für Proteinpräparationen)
- Plasmid-DNA

Durchführung:

Die Bakterien werden von der Lagerung bei -80 °C auf Eis langsam aufgetaut. Etwa 1 μ g Plasmid-DNA wird zupipettiert und vermischt. Nach 20 Minuten Inkubation auf Eis erfolgt ein Hitzeschock bei 42 °C für 120 Sekunden. Nach einer kurzen Abkühlung auf Eis wird die Bakteriensuspension für die weiteren Schritte der Gewinnung von Plasmid-DNA (3.2.2) oder der Aufreinigung von Proteinen (3.2.3) verwendet. Ein „Rescue“ zur Expression des Resistenzgens findet nicht statt.

3.2.2 GEWINNUNG VON PLASMID-DNA AUS *E.COLI*-BAKTERIEN („MAXI“ PRÄPARATION)

Material:

- Transformierte Bakterien (3.2.1)
- LB-Medium (1 % (w/v) Pepton, 0,5 % (w/v) Hefeextrakt, 177 mM NaCl pH 7,0)
- Ampicillin, 50 mg/ml

- Plasmid-DNA MAXI-Kit (Genomed)
- Isopropanol
- NaCl
- Ethanol

Durchführung:

Transformierte DH5 α -Bakterien werden über Nacht in 400 ml LB-Medium und zugesetztem Ampicillin (1:1000) bei 37 °C schwenkend inkubiert. Am nächsten Tag werden die Zellen für zehn Minuten bei 4000 rpm gekühlt pelletiert. Die Lyse der Zellen und die Gewinnung der Plasmid-DNA erfolgen nach Herstellerprotokoll. Das Eluat der verwendeten Säulen wird zur Fällung der DNA mit 15 ml 100 % Isopropanol versetzt, durch Invertieren gemischt und für fünf Minuten (Raumtemperatur) inkubiert. Die DNA wird durch 20-minütige Zentrifugation bei 6.900 g pelletiert, daraufhin in 300 μ l destilliertem Wasser gelöst und mit NaCl versetzt (250 mM Endkonzentration). Eine weitere Fällung erfolgt durch Zugabe von 900 μ l 100 % Ethanol. Die sichtbare DNA-Flocke wird durch Übertragen in ein weiteres Gefäß mit 75 % Ethanol gewaschen. Der Waschvorgang wird ein weiteres Mal wiederholt. Die DNA wird luftgetrocknet und abschließend in einem angemessenen Volumen destilliertem und autoklaviertem Wasser resuspendiert und die Konzentration im Nano-Drop bestimmt (3.2.4).

3.2.3 AUFREINIGUNG VON REKOMBINANTEN PROTEINEN AUS *E. COLI*-BAKTERIEN

Material:

- Transformierte Bakterien (3.2.1)
- LB-Medium (1 % (w/v) Pepton, 0,5 % (w/v) Hefeextrakt, 177 mM NaCl pH 7,0)
- Proteaseinhibitoren: Aprotinin, Leupeptin, PMSF (je 10 μ g/ μ l)
- Ampicillin, 50 mg/ml
- Glucose
- IPTG
- PBS
- Triton X-100
- Glutathion-Agarose
- Glutathion
- 1 M Tris, pH 8,0
- Dialyse-Gefäße
- Glycerin

Durchführung:

Transformierte BL21-Bakterien werden über Nacht in einer Vorkultur bei 37 °C unter Schwenken inkubiert. Enthalten sind 2 % (v/v) Glucose in LB-Medium bei einem Gesamtvolumen von 30 ml. Ampicillin sowie die Proteaseinhibitoren werden jeweils im Verhältnis 1:1000 zugesetzt. Glucose verhindert in den Zellen die vorzeitige Expression des rekombinanten Proteins. Am nächsten Tag wird die optische Dichte der Bakteriensuspension im Spektrophotometer gemessen und eine weitere Kultur mit einer optischen Dichte von 0,1 OD/ml mit der Bakteriensuspension inokuliert. Die Zusammensetzung ist identisch zur Vorkultur und hat ein Volumen von 400 ml. Die Inkubation erfolgt unter Schwenken bei 37 °C. Bei Erreichen einer optischen Dichte von 0,6 OD/ml wird die Expression des rekombinanten Proteins durch Zugabe von 1 mM IPTG (Endkonzentration) gestartet. Die weitere Inkubation erfolgt bei Raumtemperatur. Nach drei Stunden werden die Bakterien durch zehnmündige Zentrifugation bei 4000 rpm unter Kühlung pelletiert. Das Pellet wird in 10 ml PBS mit 1 % Triton X-100 und Proteaseinhibitoren (1:500) resuspendiert. Zur Unterstützung der Lyse wird die Suspension einmal 60 Sekunden, zweimal 30 Sekunden und ein weiteres mal 60 Sekunden sonifiziert. Bakterielle Bestandteile werden für 20 Minuten bei 6.900 g gekühlt abzentrifugiert. Der Überstand mit dem rekombinanten Protein wird in ein 50 ml-Falcon überführt, 400 µl Glutathion-Agarose werden zugegeben und für zwei Stunden unter Kühlung rotierend inkubiert. Danach wird die Agarose viermal in 20 ml PBS mit 1 % Triton und abschließend einmal in reinem PBS gewaschen und dabei jeweils mit 4000 rpm zentrifugiert. Falls die Proteine an Agarose gebunden weiter verwendet werden sollen, werden diese mit 400 µl PBS mit 10 % (v/v) Glycerin überschichtet und bei -20 °C gelagert. Zur Elution der rekombinanten Proteine von der Agarose wird 25 mM Glutathion (Endkonzentration in 50 mM Tris, pH 8,0) zugegeben und für 30 Minuten gekühlt rotiert. Die Agarose wird abzentrifugiert und der Überstand gewonnen. Zum Entfernen des Glutathions erfolgt eine Dialyse der Proteine gegen einen Liter PBS mit 10 % (v/v) Glycerin. Die Lagerung findet bei -20 °C statt.

3.2.4 KONZENTRATIONSBESTIMMUNG VON NUKLEINSÄUREN (NANO-DROP)

Mit Hilfe des Nano-Drop-Gerätes kann die Konzentration von Nukleinsäuren in einer Lösung bestimmt werden. Hierzu wird die Absorption bei 260 nm gemessen.

Material:

- Nukleinsäurehaltige Lösung (Plasmid-DNA, RNA aus Zellextrakt)
- Nano-Drop Spektrophotometer

Durchführung:

Das Gerät wird mit demselben Lösungsmittel, in dem auch die Nukleinsäuren gelöst sind, genullt. Danach findet die Messung der Absorption durch Aufpipettieren von 1,5 µl Lösung statt. Das Gerät gibt die DNA- bzw. RNA-Konzentration aus.

3.2.5 AGAROSE-GELELEKTROPHORESE

Während die SDS-PAGE zum Auftrennen von Proteingemischen dient, werden in der Agarose-Gelelektrophorese DNA- oder RNA-Gemische der Größe nach separiert. Dabei setzt die polymerisierte Agarose den Nukleinsäuresträngen einen Widerstand entgegen, der zur Auftrennung führt, da kleinere Stränge schneller hindurch laufen.

Material:

- TBE
- Agarose

Durchführung:

Je nach gewünschtem Auftrennungsbereich wird eine entsprechende Menge Agarose in einfach konzentriertes TBE eingewogen. Je mehr Agarose verwendet wird, desto dichter ist die Gitterstruktur, was sich besser zum Auftrennen kleiner Größenbereiche eignet. Die übliche Prozentigkeit beträgt 1 %, weshalb folglich 1 g Agarose in 100 ml TBE im Erlenmeyerkolben eingewogen wird. Die Suspension wird durch Erhitzung in der Mikrowelle zum Kochen gebracht, sodass sich das Agarosepulver komplett löst. Nach erfolgter Abkühlung wird 1 µl Ethidiumbromid pro 100 ml Lösung zugegeben und gemischt. Danach erfolgt das Gießen des Gels in eine Kammer, in die ein Kamm zur Aussparung von Vertiefungen eingebracht wird.

Nach komplettem Auspolymerisieren werden die Proben, versetzt mit DNA-Ladepuffer in einfacher Endkonzentration, in die Vertiefungen pipettiert. In eine separate Spur wird DNA-Größenstandard gegeben. Der Lauf erfolgt bei 120 Volt, bis die gewünschte Auftrennung erreicht ist. Dies wird durch Unterbrechung des Laufs und Beurteilung unter UV-Licht entschieden. Unter UV-Licht wird dabei das Ethidiumbromid sichtbar, das sich in die DNA-Stränge eingelagert hat.

3.2.6 RT-qPCR

Mit Hilfe der RT-qPCR (reverse Transkription – quantitative Polymerase-Kettenreaktion) kann die in der Zelle vorliegende Menge einer bestimmten mRNA relativ bestimmt werden. Bei dem hier verwendeten Verfahren werden Mengen bestimmt, die relativ zu einem Bezugswert angegeben werden. So lassen sich beispielsweise Expressionsunterschiede nach einer Stimulation im Vergleich zu unbehandelten Zellen ermitteln.

Material:

- RNA-Aufreinigungskit (Seqlab)
- DNase-Kit (Pqlab)
- Oligo-dT-Primer für die reverse Transkription
- Reverse Transkriptase Kit (Invitrogen) mit 0,1 M DTT Stock und „First Strand“ Reaktionspuffer
- „RiboLock“ RNase-Inhibitor
- dNTPs (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)
- qPCR SYBR-Green-Mix-Kit (Thermo Scientific)
- Nukleasefreies Wasser
- spezifische Primer für die qPCR

Durchführung:

Die Durchführung dieser Methode umfasst mehrere Einzelprotokolle und erfolgt in drei Schritten.

1. Gewinnung der RNA

Das Kulturmedium wird von den adhärennten Zellen abgenommen. In einem Restvolumen werden die Zellen abgeschabt und in ein 1,5 ml-Reagiergefäß überführt. Nach zehnssekündiger

Zentrifugation bei 17.000 g wird das Pellet im Lysispuffer des RNA-Mini-Kits aufgenommen. Ein Waschen der Zellen findet zuvor nicht statt.

Der weitere Ablauf der RNA-Aufreinigung richtet sich nach dem Protokoll des Herstellers. Als zusätzlicher Schritt wird ein DNA-Verdau durchgeführt, sobald die Nukleinsäuren auf den Säulen gebunden wurden. Hierzu wird 1 µl DNase in 45 µl DNase-Verdaupuffer (jeweils aus dem DNase-Kit) pro Säule zugegeben und für 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wird mit den Waschsritten des Protokolls fortgefahren.

Nach Elution der RNA von den Säulen wird diese kurz bei -20 °C eingefroren und nachfolgend die RNA-Konzentration im Nano-Drop gemessen.

Wird bei einem Experiment sowohl Protein, als auch RNA gewonnen, so erfolgt dies grundsätzlich von derselben Platte oder aus demselben *Pool* mehrerer zugleich geernteter Platten. Dabei wird für die RNA-Ernte ein kleiner Teil des Gesamtvolumens abgenommen. Dadurch wird sichergestellt, dass die Ergebnisse beider Methoden (Expressionsspiegel auf Protein- und Transkriptebene) direkt vergleichbar sind.

2. Reverse Transkription

Bei der beschriebenen Extraktionsmethode wird Gesamt-RNA aus den Zellen gewonnen. Der darin enthaltene Anteil an mRNA wird nun mit Hilfe eines oligo-dT-Primers in cDNA umgeschrieben.

Nach der Messung der RNA-Konzentration im Nano-Drop (3.2.4) werden zwischen 0,2 und 2 µg Gesamt-RNA in ein Mikroreagiergefäß pipettiert. Pro Ansatz wird nach folgendem Schema pipettiert:

- 0,2 - 2 µg RNA (gemäß Nano-Drop)
- ad 10 µl nukleasefreies Wasser
- 5 µl dNTP/oligo-dT-Mix
 - bestehend aus: 1 µl dNTPs (10 mM je dNTP)
 - 1 µl oligo-dT-Primer (0,5 µg/µl Stocklösung)
 - 4 µl nukleasefreies Wasser

Nach Vermischen dieser Komponenten wird für fünf Minuten auf 65 °C erwärmt, um Sekundärstrukturen aufzubrechen und anschließend auf 4 °C abgekühlt, wobei die Anlagerung der Primer stattfindet. Die Ansätze werden aus dem Thermocycler entnommen und weitere Komponenten zugegeben. Die Zugabe der reversen Transkriptase muss nach dem Anlagern der Primer stattfinden, da das Enzym nicht hitzestabil ist. Den Ansätzen werden 10 µl Mix mit

folgenden Einzelkomponenten zugegeben (Angaben pro Ansatz, teilweise aus dem Kit für die reverse Transkription):

- 0,7 µl reverse Transkriptase
- 0,5 µl „RiboLock“ RNase-Inhibitor
- 5 µl „First Strand“ Reaktionspuffer
- 2 µl DTT (0,1 M Stocklösung)
- 2 µl nukleasefreies Wasser

Die reverse Transkriptase, der „First Strand“ Reaktionspuffer und DTT stammen aus dem reverse Transkriptase Kit (Invitrogen). Die Ansätze werden für eine bis zwei Stunden bei 37 °C und anschließend für 15 Minuten bei 75 °C inkubiert. Nach Abschluss des Prozesses wird die cDNA im Verhältnis 1:12 mit nukleasefreiem Wasser verdünnt und bei -20 °C gelagert.

3. qPCR Lauf

Von der verdünnten cDNA werden jeweils 6 µl pro Bedingung in Triplikaten in die Vertiefungen einer 96-Well-Platte vorgelegt. Zuletzt werden 19 µl des folgenden Mixes zugegeben:

- 1 µl Primer-Mix (enthält *sense* und *antisense* primer, mit jeweils 50 pmol/l)
- 8 µl nukleasefreies Wasser
- 12 µl SYBR-Green-Mix (enthält dNTPs, SYBR-Green, Polymerase und Hilfsstoffe)
- ROX Referenzfarbstoff (aus dem qPCR-Reaktionskit) im Volumenverhältnis 1:30.000

Nach luftdichtem Verschluss der Platte durch Hitzeverklebung wird der Lauf im qPCR-Cycler mit folgendem Temperaturprogramm gestartet:

- | | | |
|---|--------------------|------------|
| ➤ Aktivierung der Polymerase: | 95 °C, 15 Minuten | |
| ➤ Auftrennung der DNA-Doppelstränge: | 95 °C, 20 Sekunden | } X Zyklen |
| ➤ Primeranlagerung und Strang-Polymerisation: | 60 °C, 30 Sekunden | |

Die Messung der Absorptionen von SYBR-Green und ROX erfolgt am Ende jedes Polymerisationsvorgangs. Je nach eingesetzten Primern werden zwischen 25 und 55 Zyklen verwendet. Bei jedem Lauf wird eine Schmelzkurve (55 °C bis 95 °C) zur Beurteilung der Primerspezifität angefertigt.

Bei der Messung der Absorption durch SYBR-Green besteht ein Hintergrundrauschen, das erst ab einem bestimmten Zyklus klar überschritten wird. Dieser Zyklus-Wert wird Ct-Wert (*cycle threshold*) genannt und von der Software des qPCR-Gerätes anhand einer Amplifikationskurve

errechnet, welche die Absorption in Abhängigkeit von der Zyklenzahl darstellt. Je früher der Messhintergrund überschritten wird, also je geringer der Ct-Wert ist, desto mehr Moleküle der betreffenden mRNA haben entsprechend in der Probe zu Beginn der Amplifikation vorgelegen. Vergleicht man die Ct-Werte zwischen zwei Behandlungszuständen einer Zelllinie, so kann ein eventueller Expressionsunterschied der betrachteten mRNA errechnet werden.

Geringe Abweichungen in den eingesetzten Mengen an cDNA (beispielsweise durch Pipettierungenauigkeiten oder unterschiedliche Effizienzen bei der reversen Transkription) werden durch Einbezug eines Normalisierungsgens verrechnet. Dabei wird die $\Delta\Delta Ct$ -Methode verwendet, um Expressionsunterschiede zwischen verschiedenen Bedingungen zu errechnen, wobei gleichzeitig die Normalisierung, z. B. auf das Gen GAPDH, einbezogen wird:

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct(\text{Bedingung 2}) - \Delta Ct(\text{Bedingung 1})$$

mit: $\Delta Ct = Ct(\text{untersuchtes Gen}) - Ct(\text{Normalisierungsgen})$

Hierbei wird Bedingung 2 auf Bedingung 1 bezogen. Die Expression von Bedingung 1 wird bei der graphischen Darstellung zur Vereinfachung meist als 1 definiert. Die Differenz der Ct-Werte in Form des $\Delta\Delta Ct$ -Wertes wird in eine fache Induktion der Expression umgerechnet. Es wird hierbei vereinfachend davon ausgegangen, dass durch eine Primereffizienz von 100 % (wird nicht nachgewiesen) eine Verdopplung der cDNA-Menge pro Zyklus erreicht wird:

$$\text{Fache Expression} = 2^{\Delta\Delta Ct}$$

Für die Berechnungen werden die Ct-Mittelwerte der Messtriplikate verwendet.

Die Fehlerwerte in Form der Standardabweichung des Mittelwerts werden als Balken in den Diagrammen angegeben. Da die Ergebnisse zweier Messungen (untersuchtes Gen und Normalisierungsgen) einbezogen werden, erfolgt eine Verrechnung der beiden einzelnen Standardabweichungen nach dem Prinzip der Fehlerfortpflanzung gemäß folgender Formel:

$$\text{Stabw} = 2^{\Delta\Delta Ct} * \ln 2 * \sqrt{\text{Stabw}(\text{untersuchtes Gen})^2 + \text{Stabw}(\text{Normalisierungsgen})^2}$$

Die Standardabweichungen der einzelnen Gene werden dabei jeweils aus den Messtriplikaten ermittelt.

Berechnung der Anreicherung eines Proteins an einem Bereich der DNA (bei der CHIP)

Um eine Aussage über die Anreicherung eines Proteins an einer bestimmten DNA-Region (3.1.13) treffen zu können, wird die totale Menge dieser Region im Input, also in der Chromatinlösung vor Durchführung der IP, ebenfalls in der qPCR gemessen. Da die DNA hier deutlich höher konzentriert ist, wird lediglich 1 % der Chromatinmenge der IPs eingesetzt. Dieser Umstand wird bei den späteren Berechnungen berücksichtigt.

Die Differenz zwischen den Ct-Werten des Inputs und einer IP-Bedingung wird nach folgender Formel in einen prozentualen Wert umgerechnet und graphisch dargestellt:

$$\text{Anreicherung in \%} = 2^{Ct(\text{Input})-Ct(\text{IP})}$$

Diese Formel gilt bei Einsatz von einem Prozent Input zur Durchführung der qPCR. Die eingesetzten Ct-Werte entsprechen den Mittelwerten der Triplikate. Die Standardabweichungen werden in der graphischen Darstellung als positive und negative Fehlerbalken angegeben und analog zur RT-qPCR nach folgender Formel berechnet:

$$\text{Stabw} = 2^{Ct(\text{Input})-Ct(\text{IP})} * \ln 2 * \sqrt{\text{Stabw}(\text{Input})^2 + \text{Stabw}(\text{IP})^2}$$

Für die RT-qPCR und die CHIP-qPCR gilt, dass in Einzelfällen offensichtliche Fehlmessungen aus den Triplikaten ausgeschlossen werden und die Mittelwerte sowie Standardabweichungen aus den verbliebenen beiden Werten berechnet werden. Ein Ausschluss eines Wertes erfolgt nur bei eindeutiger Abweichung nach durchgängig einheitlich angewandten Beurteilungsgrundlagen.

4 ERGEBNISSE

4.1 PRMT1 WIRD IN GANG- UND STROMAZELLEN DES PDAC STARK EXPRIMIERT

Von den Protein-Arginin-Methyltransferasen PRMT1 und PRMT6 ist bekannt, dass sie in mehreren humanen Tumoren im Vergleich zu gesunden Geweben in ihrer Genexpression dereguliert sind [323]. Während die gesteigerte Expression der beiden Enzyme beispielsweise in Blasen Tumoren sowohl auf Transkript- als auch auf Proteinebene gezeigt wurde, liegen für die Expression von *PRMT1* im PDAC nur Daten auf Ebene der mRNA vor. In 10 von 16 untersuchten Tumorproben wurde hierbei eine mehr als zweifache Heraufregulation gegenüber gesundem Pankreasgewebe ermittelt. In der Bachelorarbeit von Anna Lena Merkel (AG Bauer, 2010) wurde mit Hilfe von immunhistochemischen Färbungen PRMT1 auch auf Proteinebene in humanen PDAC-Gewebeschnitten nachgewiesen. In allen 13 gefärbten PDAC-Schnitten lagen deutlich erhöhte Expressionsspiegel von PRMT1 in den Zellen der Gangsysteme (Ducti) vor, während in den Ducti von Pankreasschnitten fünf gesunder Personen keinerlei PRMT1-Färbung vorhanden war, wobei in letzteren leichte Färbungen des Proteins in Zellen der Azini und der Langerhans-Inseln nachweisbar waren. Zusätzlich zu den Epithelzellen der Ducti zeigte sich, dass auch vereinzelt Zellen im Stroma eine Färbung für PRMT1 aufwiesen. Eine Möglichkeit der Interpretation dieses Ergebnisses war die Annahme, dass sich Zellen aus dem Epithelverband herauslösen (EMT) und durch die gesteigerte Invasivität zur Metastasierung befähigt werden. Diese Zellen könnten dann in entsprechende Zielgewebe einwandern und durch Umkehrung der EMT wiederum epitheliale Strukturen ausbilden.

Um die Rolle von PRMT1 auch in späten Tumorstadien beurteilen zu können, stellte sich daher die Frage, ob nach Metastasierung in entfernte Organsysteme ähnliche PRMT1-Expressionsspiegel und Verteilungsmuster erhalten bleiben. Für weitere Färbungen wurde im Vorfeld der affinitätsaufgereinigte Antikörper gegen PRMT1 in der Immunzytochemie auf Spezifität getestet. Abbildung 4 (A) zeigt die Färbeergebnisse in Panc1-Zellen, die unbehandelt waren oder einer Transfektion mit siRNA unterzogen wurden. Sowohl in der unbehandelten als auch der kontrolltransfizierten Bedingung (siGFP) ist eine deutliche Färbung von PRMT1 zu erkennen. Diese ist im Zellkern am stärksten, jedoch auch im Zytoplasma vorhanden. Nach *Knockdown* von *PRMT1* (siPRMT1) verschwinden die Signale in der PRMT1-Färbung zum Großteil. Die Gegenfärbung mit DAPI dient dem Sichtbarmachen von DNA und belegt das Vorhandensein von Zellen in der *Knockdown*-Bedingung. In Abbildung 4 (B) ist die Depletion von PRMT1 auf Ebene des Proteins in der Immunfärbung gezeigt. Es sind noch geringe Spiegel von PRMT1 vorhanden, was erklärt, dass einige Zellen in der Immunzytochemie färbbar

blieben.

Aufgrund der reduzierten Färbung im *Knockdown* von *PRMT1* kann der Antikörper als spezifisch in der Immunzytochemie und daher auch in der Immunhistochemie angesehen werden. Weitere Spezifitätsnachweise in Form von Kontrollen eventueller Hintergrundfärbungen durch den Sekundärantikörper wurden zuvor von Anna Lena Merkel erbracht und in dieser Arbeit nicht erneut durchgeführt.

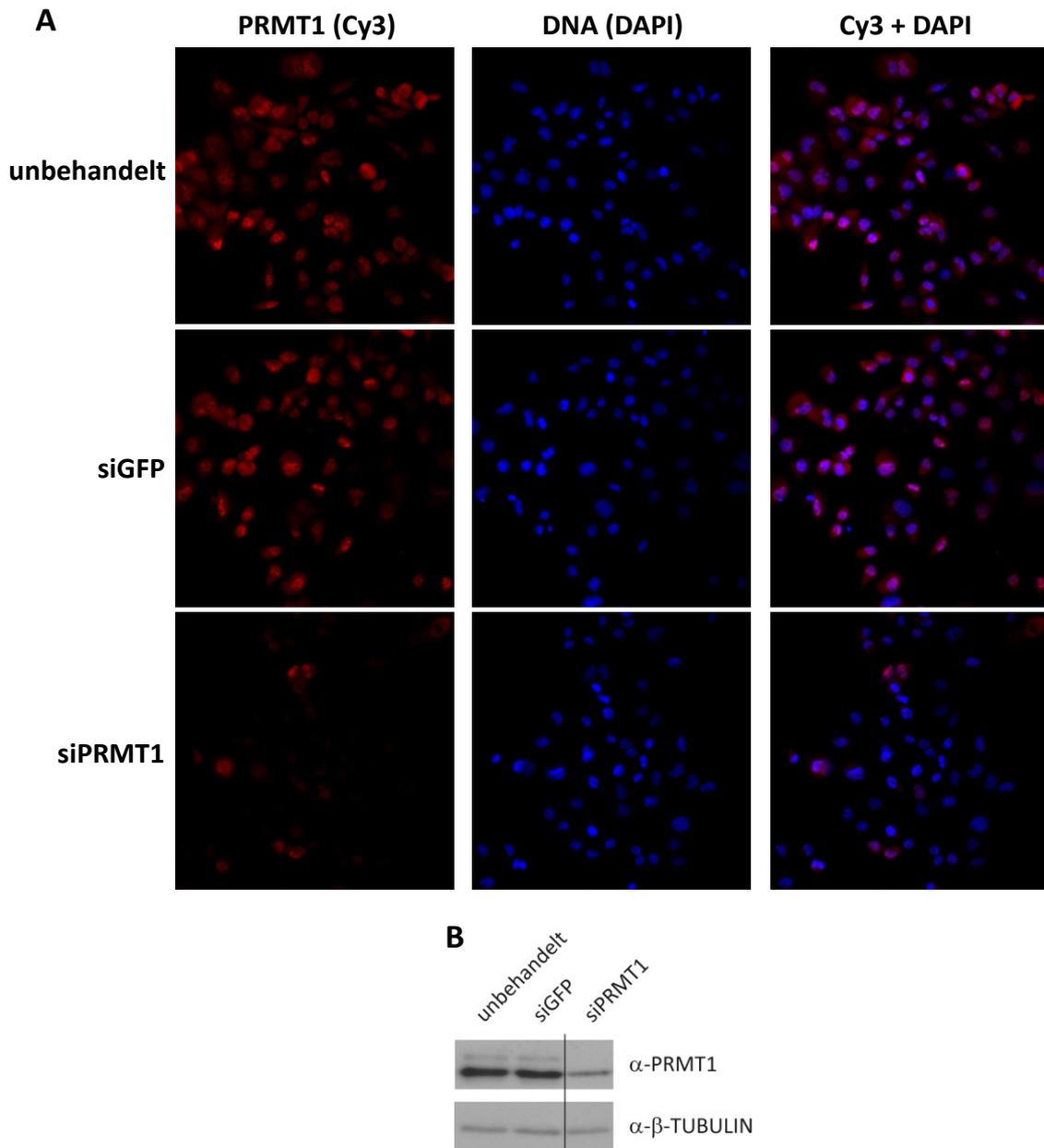


Abbildung 4: Nachweis der Spezifität des PRMT1-Antikörpers in der Immunzytochemie

Panc1-Zellen wurden mit den angegebenen siRNAs transfiziert (LipoRNAiMax) oder untransfiziert belassen. Drei Tage nach der Transfektion wurden die Zellen auf Deckgläschen replattiert und erneut transfiziert. Einen weiteren Tag später wurden die Zellen mit PRMT1-Primärantikörper und Cy3-gekoppeltem Sekundärantikörper sowie mit DAPI gefärbt. Protein-Gesamtzellextrakt (IPH-Lyse) wurde aus separaten *Wells* gewonnen.

- (A) *Immunzytochemie*. PRMT1 wurde mit einem spezifischen Antikörper gebunden und im Anschluss dieser Antikörper mit Hilfe eines Cy3-gekoppelten Sekundärantikörpers sichtbar gemacht. DAPI dient der Färbung von DNA und ermöglicht die Lokalisation von Zellen und deren Zellkernen.
- (B) *Immunfärbung*. Protein-Gesamtzellextrakt wurde per SDS-PAGE aufgetrennt, im Western Blot auf eine PVDF-Membran übertragen und diese durch Immunfärbung mit Antikörpern gegen PRMT1 bzw. β -TUBULIN als Ladekontrolle angefärbt. Der vertikale Strich kennzeichnet eine Stelle, an der das Bild zum Entfernen zusätzlicher Bedingungen geschnitten wurde.

Um die Frage zu klären, ob PRMT1 in entfernten Metastasen ebenfalls erhöhte Expressionsspiegel aufweist, wurde eine PDAC-Metastase in einem Lymphknoten mit dem PRMT1-spezifischen Antikörper gefärbt. Abbildung 5 zeigt diese immunhistochemische Färbung eines paraffin-eingebetteten Schnittes.

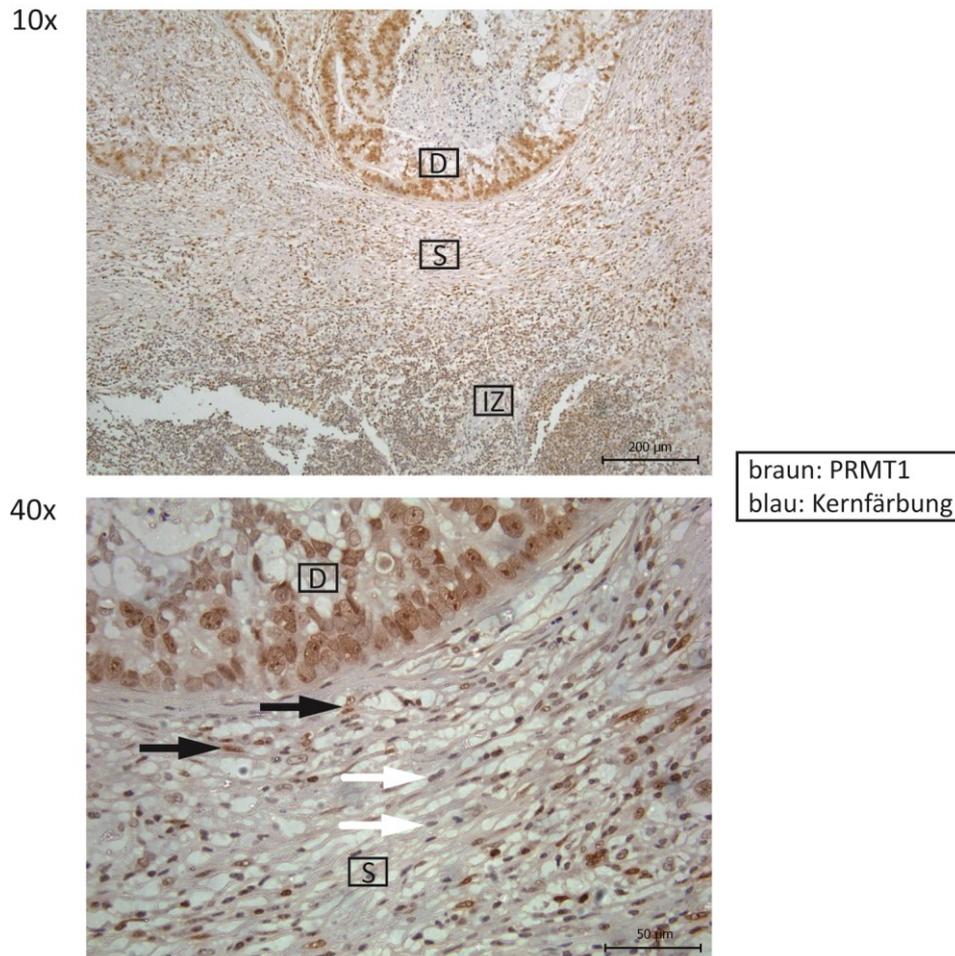


Abbildung 5: PRMT1-Proteinspiegel in einer Lymphknotenmetastase eines humanen PDAC

Immunhistochemie. Ein Paraffinschnitt eines menschlichen Lymphknotens, der eine Metastase eines PDAC enthält, wurde mit einem PRMT1-spezifischen Antikörper gefärbt. Zwei verschiedene Vergrößerungen derselben Färbung sind gezeigt. D: Ducti, IZ: Immunzellen, S: Stroma, weiße Pfeile: PRMT1-negative Stromazellen, schwarze Pfeile: PRMT1-positive Stromazellen.

Der abgebildete Lymphknoten ist von der PDAC-Metastase fast gänzlich eingenommen. Lediglich am unteren Rand (zehnfache Vergrößerung) sind Reststrukturen mit einer Ansammlung von Immunzellen (IZ) erkennbar. Zudem sind ein stark vergrößerter und aufgefalteter Ductus (D) sowie der hohe Anteil an Tumorstroma (S), das die Ducti umgibt, gut zu erkennen.

PRMT1-positive Zellen sind an der Braunfärbung (DAB) zu erkennen. Regionen besonders großer Färbungsintensität sind Bereiche mit Ducti sowie der untere Randbereich (zehnfache Vergrößerung). Die dort befindlichen Immunzellen sind zumindest teilweise positiv für PRMT1 (nicht genauer gezeigt) und vermitteln aufgrund ihrer vergleichsweise geringen Größe und dem geringen Anteil an Zytoplasma einen starken Färbeeindruck, da PRMT1 in der vorliegenden Färbung vorwiegend kernständig ist.

In der 40-fachen Vergrößerung lassen sich die deutlich angefärbten Epithelzellen des Ductus erkennen. Der Zellkern ist dabei stärker angefärbt als das Zytoplasma, wie es auch in der Immunzytochemie in Abbildung 4 der Fall war. Zudem ist sichtbar, dass auch im Stroma einzelne Zellen positiv für PRMT1 sind (schwarze Pfeile), während andere Stromazellen keine detektierbaren PRMT1-Expressionsspiegel haben (weiße Pfeile). Um zu klären, um welchen Zelltyp es sich bei den färbbaren Stromazellen handelt, wurden im Rahmen der Vorarbeiten und in der vorliegenden Arbeit Kofärbungen von PRMT1 mit Markerproteinen durchgeführt. CD68 diente als Marker für Monozyten und Makrophagen [232] und VIMENTIN als mesenchymaler Marker für epitheliale Zellen, die sich in der EMT befinden [327]. Beide Färbungen ergaben keine klar überlappenden Muster (nicht gezeigt). Auch wurde durch Kofärbung von ZYTOKERATIN 8/18 als Marker für Epithelzellen geprüft, ob es sich um epitheliale Zellen handelt, die sich aus dem Verband herausgelöst haben. Dies ließ sich nicht bestätigen. Bisher konnte die Identität dieses Zelltyps somit nicht geklärt werden.

Die immunhistochemische Färbung in Abbildung 5 zeigt, dass PRMT1 auch im metastasierten PDAC in den gleichen Zellen und in vergleichbarer Stärke wie im Pankreas-Primärtumor exprimiert bleibt (Vergleich mit Färbungen von Anna Lena Merkel, nicht gezeigt).

4.2 PRMT1 IST FÜR DAS ANKERUNABHÄNGIGE WACHSTUM VON PDAC-ZELLEN NOTWENDIG

Die Tatsache, dass PRMT1 im PDAC im Vergleich zu gesundem Pankreas-Gewebe verstärkt exprimiert wird und bereits in PanINs färbbar ist (Versuche im Rahmen der Bachelorarbeit von Anna Lena Merkel), lässt eine Bedeutung dieses Enzyms in der Tumorpromotion und/oder der Tumorprogression vermuten. Ein Kennzeichen entarteter Krebszellen, vor allem hinsichtlich der Metastasierung, ist die Fähigkeit sich unabhängig von vorhandenen Ankerstrukturen zu vermehren [57,206]. Um zu untersuchen, ob PRMT1 eine Funktion im ankerunabhängigen Wachstum von Pankreas-Tumorzellen hat, wurden Suit007-PDAC-Zellen einem Soft-Agar-Assay unterzogen. Bei diesem Experiment wachsen Zellen in einer erhärteten Agarlösung, ohne dabei Kontakt zur Oberfläche der Zellkulturschale erhalten zu können. In Abbildung 6 wurden die

Auswirkungen einer Depletion von PRMT1 auf Suit007-Zellen im Soft-Agar-Assay untersucht.

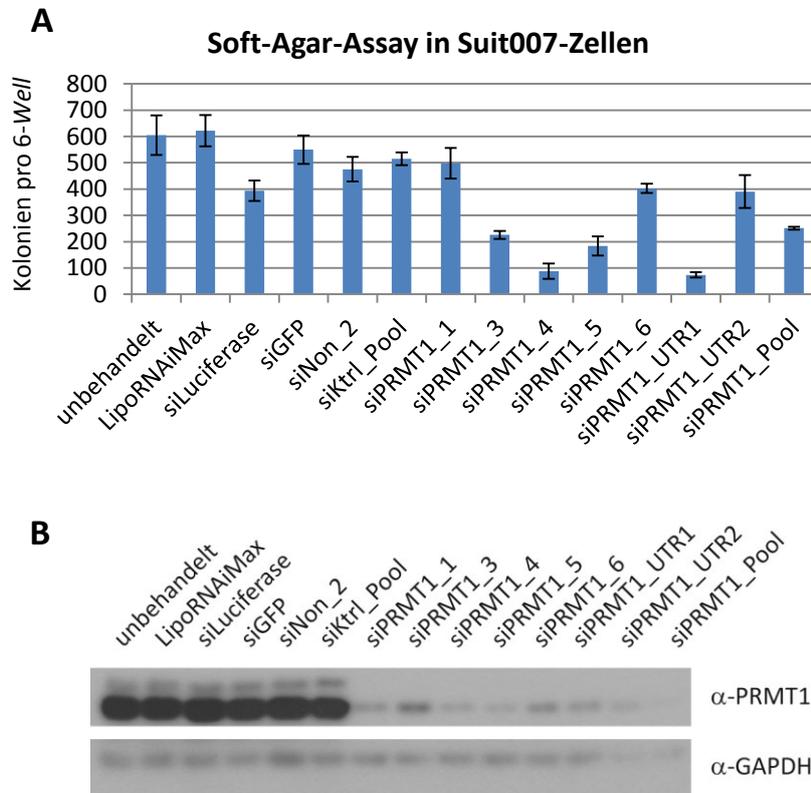


Abbildung 6: Soft-Agar-Assay von Suit007-Zellen im PRMT1-Knockdown

Suit007-PDAC-Zellen wurden mittels Transfektion der angegebenen siRNAs mit LipoRNAiMax einem *PRMT1-Knockdown* unterzogen. Zwei Tage nach der Transfektion wurden die Zellen gezählt und 1×10^5 Zellen pro *Well* auf eine 6-*Well*-Platte ausplattiert. Nach Erhärten der verwendeten Agarlösung erfolgte die Inkubation für zehn Tage bei 37 °C. Pro Bedingung wurden Triplikate ausgesät.

(A) *Soft-Agar-Assay*. Nach zehn Tagen Inkubation im Soft-Agar wurden die Zellkolonien pro *Well* gezählt. Fehlerbalken geben die Standardabweichung der Triplikat-Mittelwerte an.

(B) *Immunfärbung*. Zwei Tage nach Transfektion, zum Zeitpunkt der Aussaat der Zellen in das Soft-Agar, wurde ein Teil der Zellen geerntet und die Protein-Gesamtzellextrakte (20 μ g) wurden nach der Auftrennung in der SDS-PAGE und Übertragung auf eine PVDF-Membran im Western Blot auf die Depletion von PRMT1 überprüft.

Hier und bei weiteren Versuchen werden konstante Bezeichnungen für die einzelnen *PRMT1*-spezifischen siRNAs verwendet. Dadurch ergeben sich, wenn nicht alle siRNAs verwendet wurden, unter Umständen nicht-durchgängige Benennungen.

Als Bezugsbedingungen wurden unbehandelte sowie kontrolltransfizierte Zellen gewählt. Um einen Effekt des Transfektionsreagenz auf das ankerunabhängige Wachstum auszuschließen, wurde zusätzlich eine Bedingung eingeschlossen, bei der ohne Zugabe von siRNA lediglich mit dem Transfektionsreagenz LipoRNAiMax behandelt wurde. Bei Verwendung von siRNA mit

irrelevanter Spezifität (siLuciferase, siGFP, siNon_2) oder dem Transfektionsreagenz allein zeigen sich nur geringe Effekte auf das Wachstum im Soft-Agar. Bei Verwendung von sieben verschiedenen siRNAs gegen *PRMT1* zeigt sich bei vier Sequenzen (siPRMT1_3, 4, 5, UTR1) eine deutliche und bei zwei weiteren (siPRMT1_6, UTR2) eine moderate Inhibition der Fähigkeit zum ankerunabhängigen Wachstum. Lediglich siPRMT1_1 zeigt keinen Effekt, der über den der Kontrollen hinausgeht. Beim Mischen jeweils aller Kontroll- und *PRMT1*-spezifischen siRNAs zu gleichen Teilen (*Pools*) zeigt sich ebenfalls deutlich ein Einfluss der PRMT1-Depletion auf das Entstehen von Zellkolonien (siPRMT1_*Pool* im Vergleich zu siKtrl_*Pool*). Abbildung 6 (B) zeigt in der Immunfärbung die Depletion des PRMT1-Proteins durch die spezifischen siRNAs. Es sind lediglich geringe Restmengen an PRMT1 festzustellen. Die eingesetzten Kontrollen beeinflussen die PRMT1-Spiegel nicht.

4.3 PRMT1 IST FÜR DIE PROLIFERATIONSFÄHIGKEIT VON TUMORZELLEN ESSENZIELL

Es ist bekannt, dass in PDAC-Zellen bestimmte Schlüsselfaktoren dereguliert sind, die in der Kontrolle der Zellproliferation eine Rolle spielen. Hierzu zählt unter anderem die gesteigerte Expression von Zyklinen. Dementsprechend führt eine Depletion dieser Faktoren zu einer Verlangsamung der Proliferationsfähigkeit, beispielsweise von Panc1-Zellen [5,243]. Da PRMT1 in Epithelzellen des Pankreaskarzinoms eine verstärkte Expression aufweist, wurde ein möglicher Einfluss auf die Proliferationsfähigkeit von PDAC-Zellen in Wachstumskurven untersucht. *PRMT1* wurde dazu mit Hilfe mehrerer verschiedener siRNAs depletiert.

Zur Anfertigung einer Wachstumskurve ist eine lange Inkubationsdauer mit Replattierungen der Zellen von Nöten, weshalb im Vorfeld ein Protokoll für den *Knockdown* etabliert werden musste. Die entscheidende Fragestellung war dabei, ob eine erneute Transfektion nach Replattierung der Zellen erforderlich ist, um die Depletion des Proteins stabil zu halten. Da eine Behandlung von Zellen generell zu unerwünschten Nebeneffekten führen kann, wäre eine einmalige Transfektion wünschenswert gewesen. Daher wurden in einem Etablierungsexperiment die Proteinspiegel von PRMT1 in Zellen untersucht, die trotz zweimaliger Replattierung nur eine einmalige Transfektion zu Beginn des Experiments erhalten hatten. Diese wurden mit den Proteinspiegeln verglichen die vorlagen, wenn die Zellen nach jeder Replattierung erneut transfiziert wurden. Die Erkenntnisse dieses Versuchs sind in Abbildung 7 dargestellt.

Die Proteinspiegel von PRMT1 verändern sich durch die Kulturhaltung und Replattierung im unbehandelten Zustand nicht (Bedingungen 1 und 2). Bei beiden verwendeten siRNAs mit Spezifität für *PRMT1* ist bei einmaliger Transfektion nach drei Tagen eine effiziente Depletion

zu sehen (Bedingungen 3 und 6). Werden die Zellen ohne erneute Transfektion zweimal passagiert (Bedingungen 4 und 7), sind zum Zeitpunkt der Ernte bereits annähernd die Ausgangsspiegel von PRMT1 wiederhergestellt, die vor der Transfektion vorhanden waren. Werden die Zellen nach der erneuten Aussaat wieder transfiziert (Bedingungen 5 und 8), bleibt der *Knockdown* auf Proteinebene jedoch bestehen. Aufgrund dieser Ergebnisse wurde für die Erstellung aller Wachstumskurven ein Protokoll mit Transfektion nach jeder Replattierung gewählt.

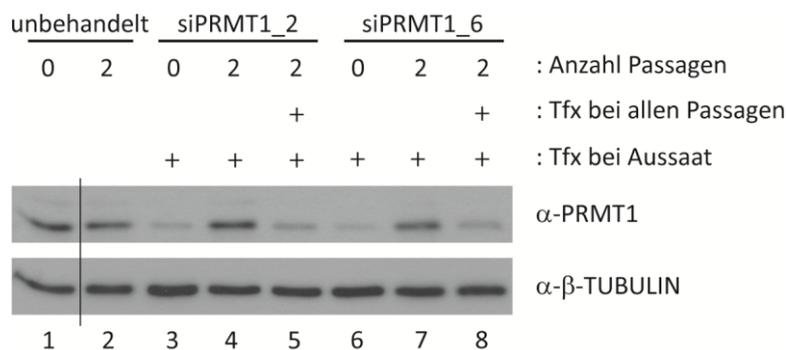


Abbildung 7: Etablierung eines Protokolls für die Aufrechterhaltung des *PRMT1*-Knockdowns im Verlauf einer Wachstumskurve

1,5x10⁵ Panc1-Zellen wurden mit siPRMT1_2 oder siPRMT1_6 transfiziert oder untransfiziert belassen („unbehandelt“). Nach drei Tagen wurden die Zellen entweder geerntet (Bedingungen 1, 3, 6) oder abtrypsiniert und in definierter Zellzahl neu ausplattiert (passagiert). Letztere Zellen wurden entweder ohne erneute Transfektion weiter inkubiert (Bedingungen 2, 4, 7) oder erneut transfiziert (Bedingungen 5, 8). An Tag 6 wurde die Replattierung mit gleichbleibendem Protokoll wiederholt. An Tag 9, also drei Tage nach letzter Replattierung, wurden alle verbleibenden Bedingungen geerntet. Auch im Falle der komplett untransfizierten Zellen wurde eine Bedingung mit mehreren Passagen mitgeführt (Bedingung 2), um eine eventuelle Veränderung der PRMT1-Proteinspiegel im Verlauf der normalen Inkubation ausschließen zu können.

Immunfärbung. Von allen Bedingungen wurde Gesamtzellextrakt hergestellt (IPH-Lyse), 10 µg hiervon in der SDS-PAGE aufgetrennt und per Western Blot auf eine PVDF-Membran übertragen. Die Detektion von PRMT1 erfolgte durch Verwendung eines spezifischen Antikörpers. Die Anfärbung von β-TUBULIN dient als Beleg gleichmäßiger Beladung. Der senkrechte Strich kennzeichnet eine Stelle, an der das Bild zum Entfernen zusätzlicher Bedingungen geschnitten wurde. Alle gezeigten Abschnitte entstammen demselben Expositionsvorgang.

Für die Erstellung der Wachstumskurve wurde *PRMT1* mit Hilfe von siRNA depletiert, nachdem eine definierte Zahl an Zellen ausgesät worden war. Nach drei Tagen Inkubation fand die erste Zählung der Zellen mit darauffolgender erneuter Aussaat einer definierten Zellzahl statt. Um die Depletion von PRMT1 stabil zu halten, erfolgte erneut eine siRNA-Transfektion. An sechsten Tag nach der ursprünglichen Aussaat wurde die Zähl- und Transfektionsprozedur ein weiteres Mal wiederholt, worauf an Tag 9 eine abschließende Bestimmung der Zellzahlen stattfand. Für die Darstellung der ermittelten Verdopplungsraten wurde eine kumulierte

(multiplikative) Verrechnung gewählt, um einen Rückgang der Zellzahlen adäquat darstellen zu können. In additiven Darstellungen würde eine Verringerung der Zellzahl verfälschend als Anstieg der Kurve ausgegeben werden.

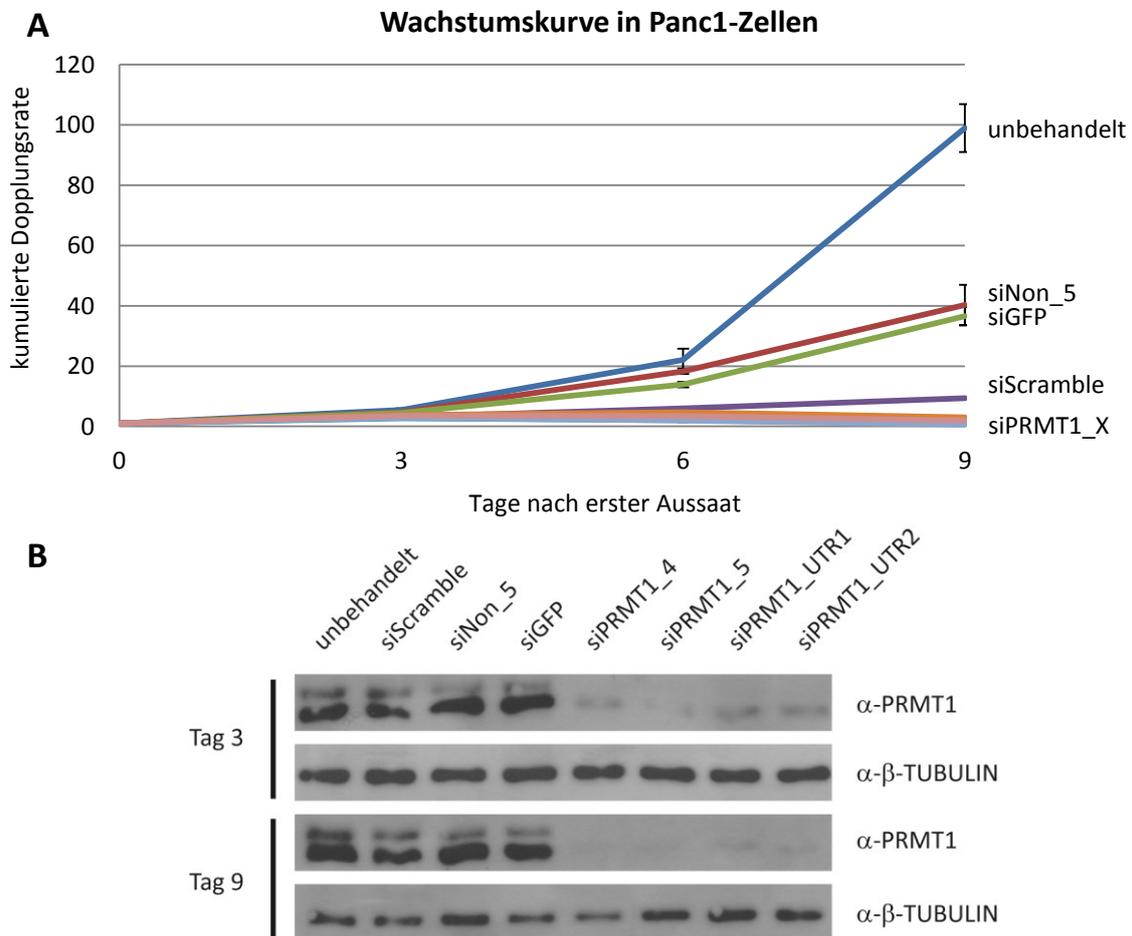


Abbildung 8: Wachstumskurve von Panc1-Zellen im PRMT1-Knockdown

$1,5 \times 10^5$ Panc1-Zellen wurden pro *Well* einer 6-*Well*-Platte ausplattiert (Tag 0) und mit den angegebenen siRNAs transfiziert (LipoRNAiMax). Nach dreitägiger Inkubation wurde die Zellzahl pro *Well* ermittelt und die Dopplungsrate daraus errechnet. Die Zellen wurden sofort auf eine neue 6-*Well*-Platte ausplattiert ($1,5 \times 10^5$ Zellen), nochmals transfiziert und weiter inkubiert. An Tag 6 erfolgte eine weitere Zählung, nochmaliges Ausplattieren und erneute Transfektion. An Tag 9 wurde das Experiment mit der letzten Zählung abgeschlossen.

(A) *Wachstumskurve*. Dargestellt sind die kumulierten Dopplungswerte, die sich durch Multiplikation der Einzelwerte an Tag 3, 6 und 9 ergeben. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung des Mittelwertes an, der aus der Auszählung dreier individueller Wells ermittelt wurde. Die Berechnung erfolgte ohne Fehlerfortpflanzung.

(B) *Immunfärbung*. Um eine durchgehend stabile Depletion von PRMT1 zu zeigen, wurden an Tag 3 und Tag 9 Protein-Gesamtzellextrakte aus Zellen gewonnen, die nach Aussaat zur Verfügung blieben. Nach Auftrennung von 10 μ g dieser Extrakte in der SDS-PAGE und Western Blot erfolgte Anfärbung die von PRMT1 und zudem von β -TUBULIN als Ladekontrolle durch Immunfärbung mit spezifischen Antikörpern.

Abbildung 8 (A) zeigt die Ergebnisse einer Wachstumskurve in Panc1-PDAC-Zellen. Alle drei verwendeten siRNA Kontrollen (siScramble, siNon_5, siGFP) zeigen einen hemmenden Effekt auf die Proliferationsfähigkeit der Zellen gegenüber fehlender Behandlung, welcher bei siScramble am stärksten ist. Dies ist auf einen Effekt der verwendeten siRNA-Moleküle zurückzuführen, da in weiteren Experimenten eine Behandlung der Zellen mit dem Transfektionsreagenz LipoRNAiMax allein keine Veränderung des Verhaltens im Vergleich zu unbehandelten Zellen aufwies (nicht gezeigt). Die vier verwendeten *PRMT1*-spezifischen siRNAs (siPRMT1_1, 5, UTR1, UTR2) zeigen einen sehr stark hemmenden Effekt auf die Teilungsrate der Zellen. Es findet nur eine Vermehrung während der ersten drei Tage statt, die zwischen Tag 3 und Tag 6 stagniert und schließlich bis Tag 9 in einem Rückgang der Zellzahl endet. Dieser starke Effekt ist bei keiner der Kontrollen zu beobachten. Durch die geringe Wachstumsrate liegen die Kurven aller *PRMT1*-*Knockdown*-Bedingungen so nahe beieinander, dass eine Unterscheidung der einzelnen Bedingungen nicht möglich ist. Daher sind diese zusammen mit „siPRMT1_X“ bezeichnet. Abbildung 8 (B) zeigt die effiziente Depletion von *PRMT1* bei Verwendung aller vier spezifischen siRNAs bereits an Tag 3 und noch verstärkt an Tag 9, während die Kontrollen keinen Einfluss auf die *PRMT1*-Spiegel haben.

Um zu überprüfen, ob es sich bei der Inhibition der Proliferation um einen zelltypspezifischen Effekt handelt, wurden MiaPaCa2-PDAC-Zellen und HeLa-Cervixkarzinomzellen ebenfalls für die Erstellung von Wachstumskurven herangezogen. Durch die Verwendung von HeLa-Zellen konnte zudem der Frage nachgegangen werden, ob auch Tumorzellen, die nicht aus dem PDAC stammen, in ihrer Proliferation von *PRMT1* abhängig sind. Aus Abbildung 9 (A) ist ersichtlich, dass MiaPaCa2-Zellen ähnlich wie Panc1-Zellen auf die Depletion von *PRMT1* reagieren. Während bei Transfektion von Kontroll-siRNA eine Vermehrung der Zellen zu verzeichnen ist, weisen drei der vier verwendeten *PRMT1*-spezifischen siRNAs (siPRMT1_5, 6, UTR1) einen deutlichen Rückgang der Proliferationsfähigkeit bis zum völligen Ausbleiben auf. Lediglich bei siPRMT1_UTR2 ist kein Effekt nachweisbar, der über den der am stärksten wachstumshemmenden Kontrolle (siNon_4) hinausgeht. Abbildung 9 (B) zeigt für HeLa-Zellen ebenfalls eine deutliche Abnahme der Vermehrung von Zellen. Dieser Zelltyp weist in den Kontrolltransfektionen eine sehr hohe Verdopplungsrate auf, wodurch der inhibierende Effekt durch den *Knockdown* von *PRMT1* noch prominenter erscheint. Die einzelnen Kurven der individuellen *PRMT1*-Depletionen liegen auch hier sehr nahe beieinander, sodass die Beschriftung mit „siPRMT1_X“ zusammengefasst ist. In der Immunfärbung wird der effiziente Depletion von *PRMT1* in MiaPaCa2- (Abbildung 9 (C)) und HeLa-Zellen (Abbildung 9 (D)) bestätigt.

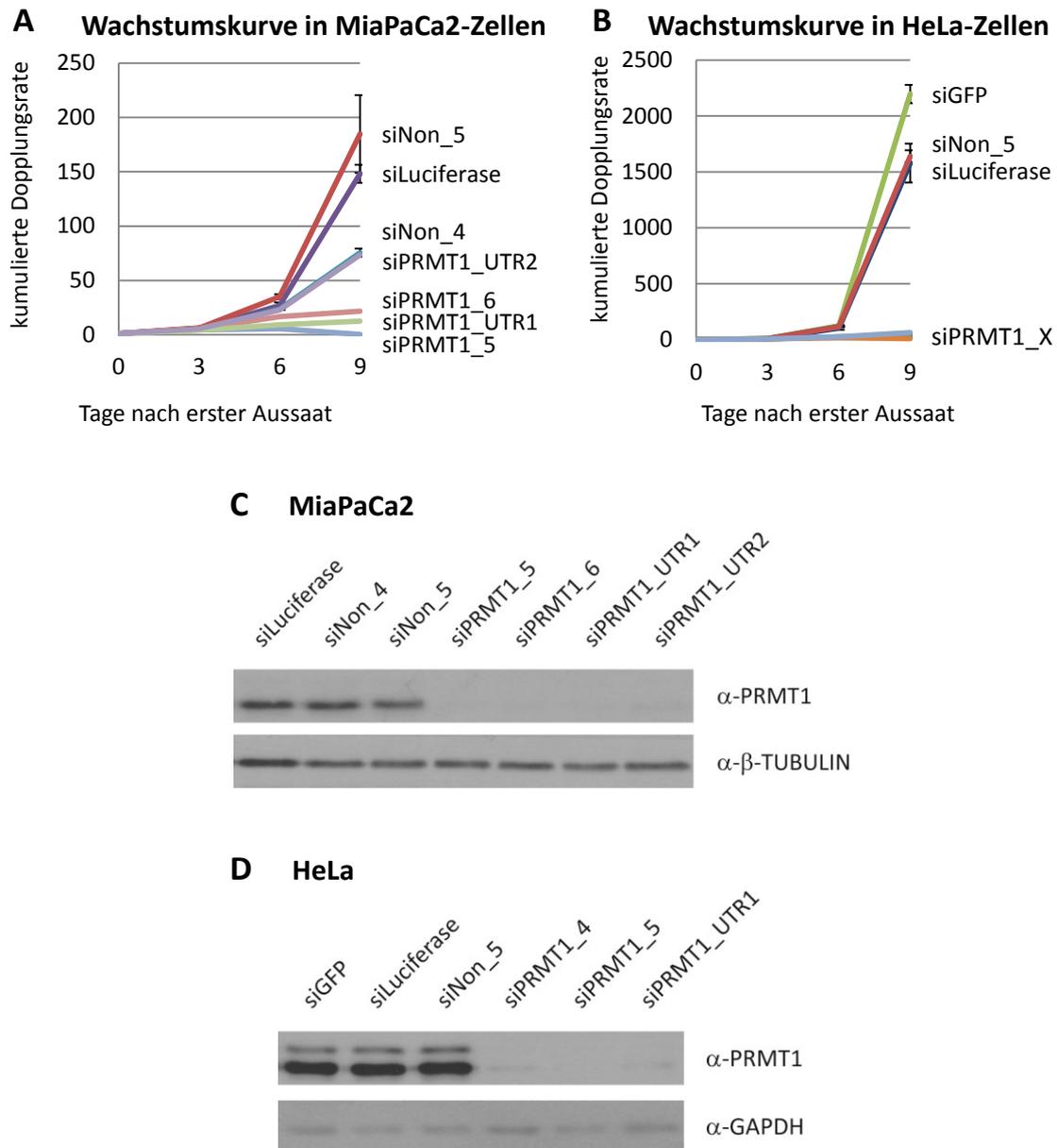


Abbildung 9: Wachstumskurven von MiaPaCa2- und HeLa-Zellen im PRMT1-Knockdown

(A) und (C) MiaPaCa2- bzw. (B) und (D) HeLa-Zellen wurden an Tag 0, 3 und 6 nach Ausplattieren von $1,5 \times 10^5$ Zellen jeweils Transfektionen mit den angegebenen siRNAs (LipoRNAiMax) unterzogen. An Tag 3, 6 und 9 fanden Zählungen der Zellzahlen statt. Das Vorgehen ist analog zur Beschreibung in Abbildung 8.

(A) und (B) *Wachstumskurve*. Dargestellt sind die kumulierten Dopplungsraten, die durch Multiplikation der ermittelten Werte an Tag 3, 6 und 9 errechnet wurden. Fehlerbalken geben die Standardabweichung des Mittelwerts an, der sich aus der Auszählung dreier unabhängiger Wells ergab. Die Berechnung erfolgte ohne Fehlerfortpflanzung.

(C) und (D) *Immunfärbung*. Um die Depletion von PRMT1 zu zeigen, wurde an Tag 3 Proteinganzeltextrakt aus Zellen gewonnen, die nach Aussaat zur Verfügung blieben. Nach Auftrennung von 50 μg (MiaPaCa2) bzw. 20 μg (HeLa) dieser Extrakte in der SDS-PAGE und Übertragung auf eine PVDF-Membran im Western Blot erfolgte die Anfärbung von PRMT1 und von GAPDH als Ladekontrolle durch Immunfärbung mit spezifischen Antikörpern.

Bei Anfertigung einer Wachstumskurve muss generell beachtet werden, dass die verbleibenden Zellen während der Auszählung einzelner Bedingungen weiter proliferieren. Insbesondere bei Zellen mit hoher Proliferationsrate kann dieser Umstand zu Verfälschungen bei den ermittelten Ergebnissen führen. Aus den ermittelten Werten in Abbildung 9 (B) ergibt sich eine rechnerische Generationszeit von etwa 20 Stunden. Liegen bei der Auszählung vier Stunden zwischen den Auszählungen zweier Bedingungen, so ergibt sich hier bereits ein signifikanter systematischer Fehler. Um diese Problematik zu umgehen, wurden immer möglichst alle Bedingungen gleichzeitig geerntet und gezählt. Aufgrund des Zeitaufwandes und der Tatsache, dass die Zellen lebensfähig bleiben müssen, ist dadurch die Anzahl der maximalen Bedingungen pro Experiment begrenzt. Daher wurde pro Experiment eine begrenzte Anzahl an siRNA-Kontrollen gewählt. Um aber auszuschließen, dass einzelne Kontrollen abweichende Effekte auf die Proliferationsfähigkeit haben, wurden diese zwischen den Experimenten teils gewechselt.

4.4 PRMT1 UND DER HEDGEHOG-SIGNALWEG

Der Hedgehog-Signalweg zählt zu den Signalwegen, die im PDAC häufig Mutationen oder Deregulationen erfahren [134]. Insbesondere konnte gezeigt werden, dass er entscheidend für das Ausmaß an Desmoplasie ist [15]. Für den Transkriptionsfaktor *GLI1* ist eine Rolle bei der Inhibition der epithelial-mesenchymalen Transition bekannt [135].

4.4.1 INDUKTION DER *GLI1*-TRANSKRIPTION DURCH *KNOCKDOWN* VON *PRMT1*

Bei Vorarbeiten in der Arbeitsgruppe war gezeigt worden, dass eine Depletion von *PRMT1* zu einer Induktion der Transkription von *GLI1* und ebenfalls zu erhöhten *GLI1*-Proteinspiegeln führt (Diplomarbeit Patrick Schopohl). Diese Experimente stützten sich zum Großteil auf *PRMT1-Knockdowns* mit Hilfe von *Pools* aus siRNA, die aus mehreren für *PRMT1*-spezifischen siRNAs bestanden. Der Nachweis der *GLI1*-Spiegel war auf Transkript- sowie Proteinebene geführt worden.

In dieser Arbeit sollte eine Validierung dieser Ergebnisse durch Verwendung einzelner siRNAs in getrennten Ansätzen durchgeführt werden. Dadurch sollte ausgeschlossen werden, dass unspezifische Effekte von einzelnen siRNAs das Ergebnis im *Pool* verfälschen. Hierfür wurden Panc1-Zellen mit einer großen Auswahl an siRNA-Kontrollen und *PRMT1*-spezifischen siRNAs transfiziert und nach drei Tagen Inkubation RNA aus den Zellen extrahiert. Durch reverse Transkription wurde mRNA in cDNA übersetzt und diese in der qPCR verwendet, um die

Mengen an *GLI1*-mRNA in den *PRMT1-Knockdowns* relativ zu den Kontrollbedingungen zu ermitteln. Die zusätzliche Verwendung von *PRMT1-siRNA-Pools* diente dazu, eine Auswirkung der Effekte einzelner siRNAs auf den *Pool* beurteilen zu können.

Abbildung 10 (A) zeigt die Ergebnisse der qPCR mit Primern, die spezifisch *GLI1*-cDNA amplifizieren. Die Darstellung erfolgt normalisiert auf ein Bezugsgen. Um auszuschließen, dass ein Bezugsgen verwendet wird, welches selbst eine Regulation durch die gewählte siRNA erfährt, sind die *GLI1*-Spiegel auf zwei verschiedene Referenzgene (hier: *RPLP0* und *GAPDH*) normalisiert angegeben. Alle Ergebnisse aus qPCRs wurden in dieser Arbeit durch getrennte Normalisierung auf mindestens zwei Referenzgene abgesichert, auch wenn dies aus Gründen der Übersichtlichkeit im Weiteren meist nicht dargestellt wird.

Wie aus Abbildung 10 (A) ersichtlich wird, ist die Expression von *GLI1* auf mRNA-Ebene von der Transfektion mit siRNA sowohl herauf- als auch herunterreguliert. Dabei zeigen siScramble, siNon_3 und siNon_4 leichte Erhöhungen der *GLI1*-Spiegel. Bei Verwendung *PRMT1*-spezifischer siRNAs liegen hierbei die Ausmaße der Heraufregulationen durch siPRMT1_4 und siPRMT1_6 in etwa im Bereich der Regulation durch die unspezifischen Kontrollen. Jedoch zeigt siPRMT1_5 einen deutlich höheren Anstieg der *GLI1*-Transkriptspiegel (4,5-fach). Da nur eine spezifische siRNA eine deutlich stärkere Regulation zeigt als die Kontrollen, und zudem lediglich drei der sieben verwendeten *PRMT1*-siRNAs (siPRMT1_4, 5 und 6) eine Heraufregulation von *GLI1* gegenüber der unbehandelten Bedingung zeigen, kann nicht von einem spezifischen Effekt ausgegangen werden. Obwohl nur eine der sieben *PRMT1*-spezifischen siRNAs eine starke positive Veränderung der *GLI1*-Spiegel zeigt, bleibt der Effekt bei einem relativen Anteil dieser siRNA von lediglich 14,3 % des Gesamtansatzes bei Verwendung von siPRMT1_Pool_II zu einem großen Teil erhalten (3,5-fache Heraufregulation gegenüber der unbehandelten Bedingung). Abbildung 10 (B) dient dem Nachweis der erfolgreichen Depletion von *PRMT1* auf Transkriptebene. Durch alle *PRMT1*-spezifischen siRNAs wird eine Reduktion der *PRMT1*-Spiegel von mindestens 90 % erreicht. Die Kontrollen führen zwar zu leichten Schwankungen, welche aber deutlich schwächer sind als die erzielte Reduktion durch den *PRMT1-Knockdown*.

Die Proteinspiegel von *GLI1* konnten nicht untersucht werden, da kein Antikörper zur Verfügung stand, der endogene Spiegel des Proteins zuverlässig detektierte.

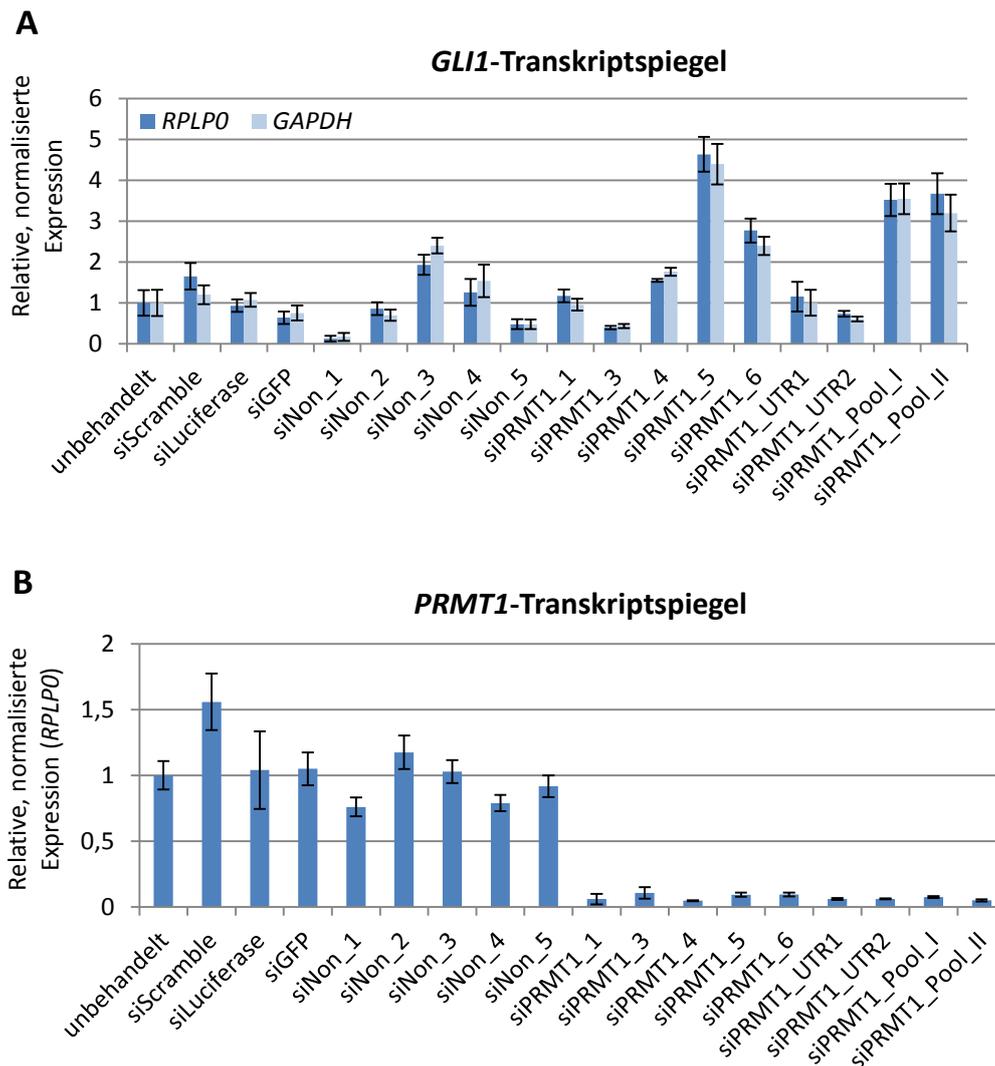


Abbildung 10: GLI1-Transkriptspiegel im PRMT1-Knockdown

qPCR. Panc1-Zellen wurden mit den angegebenen siRNAs transfiziert (LipoRNAiMax). siRNA-Pools sind zusammengesetzt aus je gleichen Teilen siPRMT1_1, 3, 4, 5, 6 (*Pool_I*) bzw. aus je gleichen Teilen siPRMT1_1, 3, 4, 5, 6, UTR1, UTR2 (*Pool_II*). Die Gesamtmenge an siRNA ist bei allen einzelnen und gepoolten Ansätzen identisch. Nach drei Tagen Inkubation wurden die Zellen geerntet, RNA extrahiert, in cDNA revers transkribiert und in der qPCR der Nachweis von *GLI1*-cDNA (A) bzw. *PRMT1*-cDNA (B) mit Hilfe spezifischer Primer geführt. Die Expression in unbehandelten Zellen ist jeweils als 1 definiert. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung des Mittelwerts an, der aus einem Messtriplikat errechnet wurde. Die Normalisierung erfolgt auf die Expressionswerte zweier Referenzgene (A) bzw. eines Referenzgens (B).

4.4.2 PRMT1 ALS KOFAKTOR IM GLI1-ABHÄNGIGEN REPORTERGEN-ASSAY

Bei weiteren Vorarbeiten (Diplomarbeit Patrick Schopohl) war der Frage nachgegangen worden, ob es eine funktionelle Interaktion zwischen dem GLI1- und PRMT1-Protein gibt. Mit Hilfe von Reporter-gen-Versuchen wurde untersucht, ob PRMT1 einen Einfluss auf die Transak-

tivierungsfähigkeit von GLI1 hat. Bei Verwendung eines Reporterplasmids mit Bindestellen für GLI1, das nach einer Aktivierung das Enzyms Luziferase exprimiert, war festgestellt worden, dass eine ektopische Expression von PRMT1 zu einem Rückgang der Luziferaseaktivität führt.

Abbildung 11 zeigt die Ergebnisse eines Reporteragen-Assays in HeLa-Zellen. Die Zellen wurden hierfür mit einem Reporterplasmid transfiziert, das acht hintereinanderliegende Bindestellen für GLI1 enthält und bei einer Aktivierung die Luziferase exprimiert. Es wurden sowohl Bedingungen ohne zusätzliche (Bedingungen 1-3) als auch mit zusätzlicher Transfektion (Bedingungen 4-8) von *GLI1*-Plasmid gewählt. Bei diesen beiden Grundbedingungen wurde außerdem PRMT1 in steigenden Mengen koexprimiert, um einen Effekt der ektopischen Expression auf die Transaktivierungsfähigkeit von GLI1 beurteilen zu können. Die Bedingungen 7 und 8 dienen als Kontrolle. Hier wurde GFP an Stelle von PRMT1 koexprimiert, um auszuschließen, dass allein die Expression eines weiteren beliebigen Proteins einen Effekt auf die Transaktivierungsfähigkeit von GLI1 hat. Bei der Darstellung der Ergebnisse wurde Bedingung 1 (endogene GLI1- und PRMT1-Spiegel) als 1 definiert und die weiteren Bedingungen als fache Luziferaseaktivität angegeben.

Die Normalisierung der Ergebnisse erfolgte in Abbildung 11 (A) auf die Aktivität der β -Galaktosidase und in Abbildung 11 (C) auf die Gesamt-Proteinkonzentration des Extraktes.

In Abbildung 11 (A) ist sowohl bei endogenen Spiegeln von GLI1 (Bedingungen 1-3), als auch bei dessen ektopischer Expression (Bedingungen 4-6) ein leichter Rückgang der Luziferaseaktivität zu verzeichnen, wenn PRMT1 koexprimiert wird. Dieser Rückgang tritt nicht auf, wenn GFP anstelle von PRMT1 koexprimiert wird (Bedingungen 7-8). Allerdings war bei der Auswertung dieser und früherer Luziferase-Assays aufgefallen, dass die Aktivität der β -Galaktosidase von der Expression von PRMT1 beeinflusst sein kann. Daher sind in Abbildung 11 (B) die Rohwerte der β -Galaktosidaseaktivität dargestellt. Bei Koexpression von PRMT1 zeigen sich leichte Induktionen dieser Aktivität, weshalb die Normalisierungsart in diesem Fall als weniger geeignet angesehen werden muss.

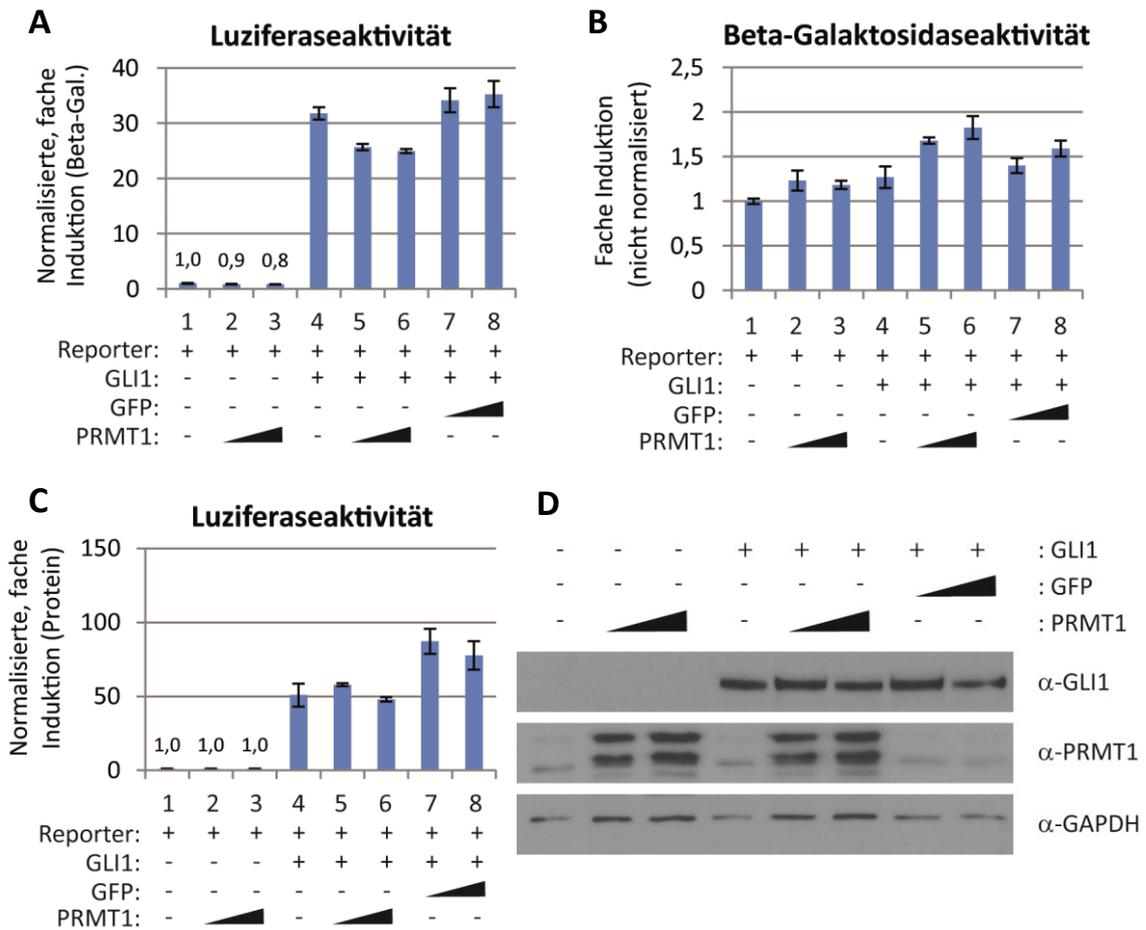


Abbildung 11: GLI1-Reportergen-Assay in HeLa-Zellen bei ectopischer Expression von PRMT1

HeLa-Zellen wurden mit den angegebenen Plasmiden transfiziert (PEI), wobei die Gesamtmenge an Plasmid-DNA pro Bedingung stets konstant gehalten wurde. Zwei Tage später erfolgte die Herstellung von Protein-Gesamtzell-extrakt durch KPi-Lyse.

(A) - (C) *Reportergen-Assay*. Mit Hilfe eines Luziferase-Kits wurde die Aktivität der Luziferase unter Verwendung eines Spektrophotometers in Form von relativen Lichteinheiten gemessen. Zur Normalisierung wurde aus denselben Proben die Aktivität der β -Galaktosidase ebenfalls im Spektrophotometer ermittelt. Für eine weitere Normalisierung wurde zudem die Gesamt-Proteinkonzentration der Proben mit Hilfe eines Bradford-Assays bestimmt. (A) zeigt die Normalisierung der Luziferaseaktivität auf die Aktivität der β -Galaktosidase, (B) zeigt die Rohwerte der β -Galaktosidaseaktivität, (C) zeigt die Normalisierung der Luziferaseaktivität auf die Gesamt-Proteinkonzentration. (A) - (C) Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung des Mittelwerts, der aus der technisch einfachen Bestimmung von je drei getrennt hergestellten Proben (Ernte dreier *Wells*) errechnet wurde.

(D) *Immunfärbung*. Durch KPi-Lyse erhaltene Extrakte (5 μ g) wurden in der SDS-PAGE aufgetrennt, per Western Blot auf eine PVDF-Membran übertragen und mit GLI1- bzw. PRMT1-spezifischem Antikörper gefärbt. Als Ladekontrolle wurde GAPDH gewählt.

Bei Normalisierung auf die Gesamt-Proteinkonzentration zeigt sich in Abbildung 11 (C), dass in diesem Versuch keine Beeinflussung der GLI1-Transaktivierungsaktivität vorlag, wenn PRMT1 koexprimiert wird (Bedingungen 1-3 und 4-6). Die Proteinkonzentrationen sind dabei durch die Expression von PRMT1 nicht beeinflusst (nicht gezeigt). Bei Expression von GFP lässt sich eine

Erhöhung der normierten Luziferaseaktivität feststellen (Bedingungen 7-8). Dies kann darauf zurückzuführen sein, dass die Expression von GFP einen starken Einfluss auf die Zellteilungsrate hatte und daher zu größeren Schwankungen in der Proteinausbeute, die zur Normalisierung herangezogen wurde, geführt hat. Die Interpretation, dass die GLI1-getriebene Genexpression unter den gewählten Bedingungen nicht von PRMT1 beeinflusst ist, wird durch die nicht-normalisierten Rohwerte der Luziferaseaktivität unterstützt (nicht gezeigt).

Eine zuverlässige Interpretation der Ergebnisse des Experiments wird durch die Tatsache erschwert, dass die β -Galaktosidaseaktivität in HeLa-Zellen durch eine Expression von PRMT1 beeinflusst ist. Da aber im Hinblick auf die bekannten Deregulationen des Hedgehog-Signalwegs Effekte von PRMT1 in PDAC-Zelllinien besonders interessant sind, wurden die Reporter-Gen-Versuche in MiaPaCa2-Zellen wiederholt. Abbildung 12 zeigt die Luziferaseaktivität des 8xGli-Reporters in Abhängigkeit von der Expression steigender Mengen an GLI1 und PRMT1.

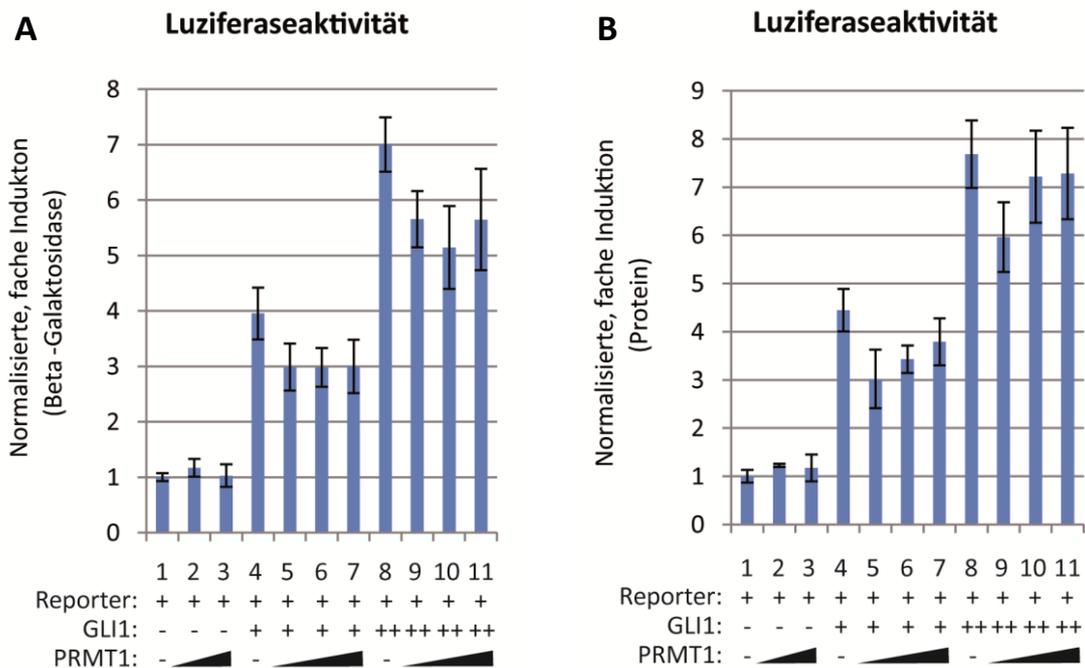


Abbildung 12: GLI1-Reporter-Gen-Assay in MiaPaCa2-Zellen bei ectopischer Expression von PRMT1

MiaPaCa2-Zellen wurden mit den angegebenen Plasmiden transfiziert (PEI), wobei die Gesamtmenge an Plasmid-DNA pro Bedingung stets konstant gehalten wurde. Zwei Tage später erfolgte die Lyse der Zellen in Cell Culture Lysis Buffer für die Bestimmung der Luziferase- und β -Galaktosidaseaktivität mit Hilfe eines Kits.

(A) - (B) *Reporter-Gen-Assay*. Die Aktivität der Luziferase wurde mit Hilfe eines Spektrophotometers in Form von relativen Lichteinheiten gemessen. Zur Normalisierung wurde aus denselben Proben die Aktivität der β -Galaktosidase ebenfalls im Spektrophotometer ermittelt. Für eine weitere Normalisierung wurde zudem die Gesamt-Proteinkonzentration der Proben mit Hilfe eines Bradford-Assays bestimmt. (A) zeigt die Normalisierung der Luziferaseaktivität auf die Aktivität der β -Galaktosidase, (B) zeigt die Normalisierung der Luziferaseaktivität auf die Gesamt-Proteinkonzentration. (A) und (B) Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung des Mittelwerts, der aus der technisch einfachen Bestimmung von je drei getrennt hergestellten Proben (Ernte dreier *Wells*) errechnet wurde.

In Abbildung 12 (A) ist eine Normalisierung auf die β -Galaktosidaseaktivität gezeigt, während in Abbildung 12 (B) die Gesamt-Proteinkonzentration zur Normalisierung verwendet wurde. In beiden Fällen ist kein Einfluss von PRMT1 auf die Reporteraktivität beim Vorliegen endogener GLI1-Spiegel festzustellen (Bedingungen 1-3). Bei geringen Mengen an transfiziertem GLI1 lässt sich unabhängig von der gewählten Normalisierung ein leichter Rückgang der Luziferaseaktivität durch Expression von PRMT1 ersehen. Bei größeren Mengen an GLI1 ist das Bild uneinheitlich (Bedingungen 8-11). Während bei Bezug auf β -Galaktosidase bei allen gewählten PRMT1-Mengen ein Rückgang festzustellen ist, weist die Luziferaseaktivität bei Bezug auf die Proteinspiegel nur in der Bedingung mit geringen PRMT1-Mengen einen Rückgang auf (Bedingungen 4-7). Nicht gezeigt sind hier die Rohwerte der

β -Galaktosidaseaktivität. Wie auch bei HeLa-Zellen (Abbildung 11) sind diese durch Expression von PRMT1 stets erhöht. Dennoch zeigt die Normalisierung auf Gesamt-Protein in diesem Fall in einigen Bedingungen eine Regulation der GLI1-Transaktivierungsaktivität durch vorhandene Überexpression von PRMT1. In einem weiteren, nicht gezeigten Versuch wurden ähnliche Ergebnisse erzielt.

4.4.3 IN VITRO-INTERAKTION VON GLI1 UND PRMT1

Die im Abschnitt 4.4.2 aufgezeigten Einflüsse von PRMT1 auf die Transaktivierungsaktivität von GLI1 lassen eine physische Interaktion der beiden Proteine als möglich erscheinen. Da die Detektion endogener GLI1-Mengen aufgrund der geringen Expressionsspiegel schwierig ist, wurde ein *in vitro*-Pull-down-Versuch durchgeführt, bei dem bakteriell exprimiertes GLI1 verwendet wurde. Dieses ist mit einem GST-Tag versehen, über den eine Aufreinigung stattfinden kann. Abbildung 13 (A) zeigt steigende Mengen an aufgereinigtem, bakteriellem GST-Tag neben GST-GLI1. Dies dient dazu, die einzusetzende Menge an GST-Tag als Kontrolle so zu wählen, dass die enthaltene Menge an Proteinhintergrund dem in der Präparation von GST-GLI1 entspricht. Eine spezifische Bande für GST-GLI1 ist in der Coomassie-Färbung aufgrund zu geringer Expression nicht sichtbar. Für den Pull-down wurde GST-GLI1 in steigenden Mengen an Agarose gebunden eingesetzt, um Proteine aus Zellextrakt zu binden. Gebundenes Protein wurde in Abbildung 13 (B) durch Anfärbung mit spezifischen Antikörpern in der Immunfärbung detektiert. Die Färbung von GLI1 belegt den Einsatz steigender Mengen für den *Pull-down*. Im Zellextrakt sind die endogenen Spiegel des Proteins, auch bei längerer Exposition (nicht gezeigt), nicht nachweisbar.

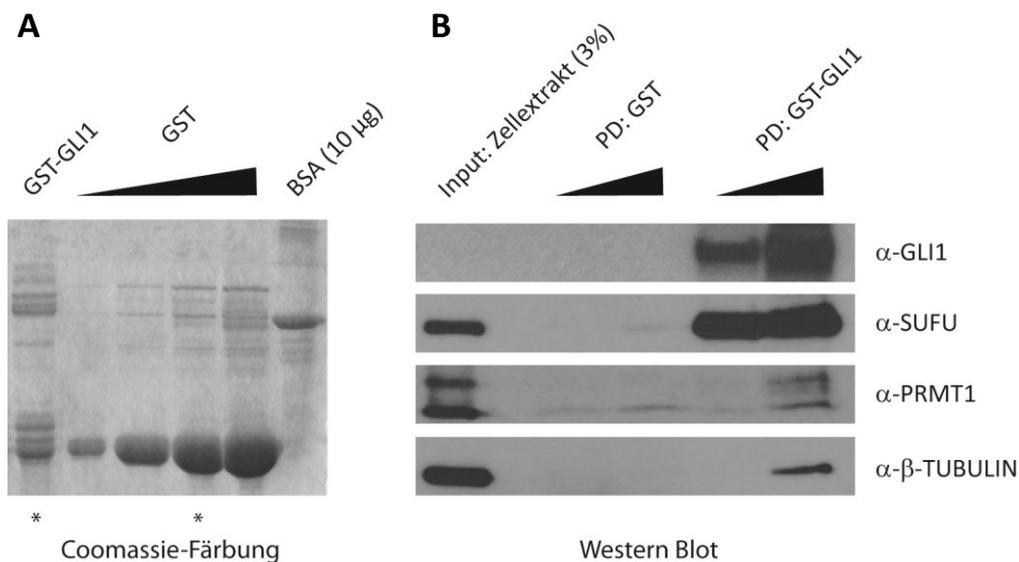


Abbildung 13: Pulldown von GST-GLI1 mit PRMT1

GST-Tag bzw. GST-getagtes GLI1 wurde in BL21-Bakterien durch Transformation mit den entsprechenden Plasmiden exprimiert. Die Aufreinigung erfolgte über die Bindung an Glutathion-Agarose.

(A) *Coomassie-Färbung*. Aufgereinigtes GST-GLI1 (10 µl) und steigende Mengen (0,5 µl, 2 µl, 5 µl und 10 µl) an aufgereinigtem GST-Tag wurden neben 10 µg BSA zum Mengenabgleich aufgetragen. Eine spezifische Bande für GST-GLI1 ist aufgrund der schwachen Expression in der Coomassie-Färbung nicht sichtbar. Diese Färbung dient hier der Bestimmung geeigneter Mengen an einzusetzendem GST-Tag anhand des vorhandenen Proteinhintergrundes. Das für den *Pulldown* eingesetzte Mengenverhältnis von GST-GLI1 zu GST ist gekennzeichnet (*).

(B) *Immunfärbung*. Steigende Mengen GST-Tag (2 µl / 10 µl) bzw. GST-GLI1 (10 µl / 50 µl), gebunden an Agarose, wurden mit 1 mg Gesamtzellextrakt aus HeLa-Zellen inkubiert. Gebundenes Protein wurde nach Auftrennung in der SDS-PAGE und Übertragung auf eine PVDF-Membran mittels Western Blot mit den angegebenen Antikörpern detektiert.

Beim Einsatz großer Mengen an GLI1 zeigen sich in Abbildung 13 (B) Banden in der PRMT1-Färbung, die bei Verwendung von GST-Tag alleine nicht auftreten. Bei Durchführung des Experiments war jedoch beim Einsatz großer Mengen GST-GLI1 (50 µl Agarose) offensichtlich, dass eine Proteinaggregation stattfand. Um zu untersuchen, ob eine artifizielle Interaktion aufgrund zu großer Proteinmengen aufgetreten war, wurde β-TUBULIN als weiteres Protein gefärbt. Auch dieses zeigt eine deutliche Interaktion mit GLI1 bei Verwendung großer Proteinmengen. Es muss daher von einer unspezifischen Interaktion durch Aggregation ausgegangen werden. Das Problem zeigte sich bei Verwendung von hohen Mengen an GLI1 auch bei Färbung des Proteins STAT1 als weitere Kontrolle (nicht gezeigt) und in weiteren, unabhängigen Experimenten unter Verwendung angepasster Pufferbedingungen.

Bei den in Abbildung 13 (B) verwendeten geringeren Mengen an GLI1 (10 µl Agarose) trat dieser unerwünschte Effekt nicht optisch in Erscheinung. Bei dieser Bedingung ist die Färbung

auf interagierendes PRMT1 schwächer. Zwar zeigt sich die unterste der drei PRMT1-Banden, deren Stärke jedoch nicht über dem Hintergrund der GST-Kontrolle liegt. Die Kontrollfärbung mit β -TUBULIN ist frei von Hintergrund.

Bakteriell exprimiertes GLI1 könnte eine Fehlfaltung aufweisen, wodurch eine normale Funktion und damit Interaktion mit anderen Proteinen verhindert wäre. Um dies auszuschließen, wurde als Positivkontrolle die Färbung gegen SUFU (suppressor of fused) mit geführt. Für SUFU ist die Interaktion mit GLI1 bekannt [71]. Während die Kontrolle, in Form eines *Pulldowns* durch GST-Tag allein, nur ein sehr schwaches Hintergrundsignal für SUFU bei großen Mengen GST zeigt, ist die Interaktion von SUFU bei Verwendung von GST-GLI1 sehr stark. Die Interaktion von SUFU mit GLI1 verdeutlicht, dass bakteriell exprimiertes, GST-getagtes GLI1 die Fähigkeit zur Proteininteraktion hat und die gewählten Pufferbedingungen diese zulassen. Dennoch ist eine spezifische Interaktion von GLI1 mit PRMT1 nicht feststellbar.

4.4.4 *IN VIVO*-INTERAKTION VON GLI1 UND PRMT1

Aufgrund der bereits erwähnten geringen Expressionsspiegel von GLI1 wurde eine Coimmunpräzipitation (CoIP) von GLI1 und PRMT1 in HeLa-Zellen sowohl mit endogenen Spiegeln von GLI1, als auch mit ektopischer Expression von HA-getagtem GLI1 durchgeführt. Wie in Abbildung 14 zu sehen ist, wurde eine Immunpräzipitation mit GLI1-spezifischem oder Tag-spezifischem Antikörper durchgeführt.

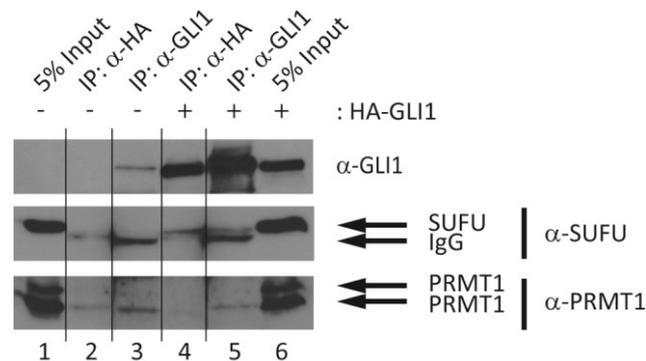


Abbildung 14: CoIP von PRMT1 mit HA-GLI1

Immunfärbung. HeLa-Zellen wurden mit Expressionsplasmiden, die für HA-GLI1 (+) oder GFP (-) kodieren, transfiziert. Zwei Tage später wurden die Zellen in IPH-Puffer (150 mM NaCl, ohne DNA-Verdau) geerntet. Aus 500 µg beider Extrakte erfolgte die Immunpräzipitation mit 1 µg α-HA- bzw. α-GLI1-Antikörper. Die Antikörper mit den affinitätsgebundenen Proteinen wurden an Sepharose gebunden, aufgereinigt und die erhaltenen Komplexe per SDS-PAGE aufgetrennt, im Western Blot auf eine PVDF-Membran übertragen und mit den angegebenen Antikörpern angefärbt. Die geladenen Inputs repräsentieren 5 % (25 µg) der für die IP verwendeten Extraktmengen. Vertikale Striche kennzeichnen Stellen, an denen das Bild zum Entfernen zusätzlicher Bedingungen geschnitten wurde. Alle gezeigten Abschnitte entstammen demselben Expositionsvorgang.

Der Vergleich der beiden Inputs (Bedingungen 1 und 6) belegt die Überexpression von HA-GLI1. Sowohl die Immunpräzipitation bei Verwendung von HA- als auch von GLI1-Antikörper führt zu einer Anreicherung von HA-GLI1 (Bedingungen 4 und 5). In beiden Fällen ist eine Interaktion von GLI1 und SUFU feststellbar, die in den Kontrollbedingungen ohne ektopische Expression von HA-GLI1 (Bedingungen 2 und 3) nicht auftritt. In der SUFU-Färbung ist eine Bande sichtbar, die im Vergleich zur SUFU-Bande des Inputs tiefer läuft und die schwere Kette der verwendeten Antikörper darstellt. Zwar gelingt mit dem GLI1-Antikörper auch die Anreicherung endogener Mengen von GLI1, doch diese reichen nicht aus, um eine Coimmunpräzipitation von SUFU zu zeigen (Bedingung 3).

Die Färbung gegen PRMT1 ergibt schwache Signale in allen Immunpräzipitationen. Da die Banden allerdings auch bei der HA-IP aus Zellextrakt ohne Expression von

HA-GLI1 (Bedingung 2) auftreten, müssen sie als unspezifisch gewertet werden. Eine spezifische Interaktion von PRMT1 mit GLI1 ist unabhängig vom verwendeten Antikörper bei den gewählten IP-Bedingungen nicht nachweisbar. Eine weitere Coimmunpräzipitation in Panc1-Zellen mit ektopischer Expression von HA-GLI1 zeigte ebenfalls keinen Hinweis auf eine Interaktion von PRMT1 und GLI1 (nicht gezeigt).

4.4.5 *IN VITRO*-METHYLIERUNG VON GLI1 DURCH PRMT1

Es ließ sich keine spezifische Interaktion von GLI1 mit PRMT1 *in vitro* (Abschnitt 4.4.3) sowie *in vivo* (Abschnitt 4.4.4) zeigen. Jedoch ist eine Methylierung von GLI1 durch PRMT1 auch bei einer sehr transienten und daher schwer nachweisbaren Interaktion der beiden Proteine denkbar. Um dieser Frage nachzugehen, wurde ein *in vitro*-Methylierungsassay durchgeführt. Hierbei wurden sowohl das Enzym PRMT1 als auch GLI1 in Bakterien exprimiert und mittels GST-Tag aufgereinigt. Bei dieser Methode werden beide Proteine in Gegenwart von S-Adenosyl-Methionin als Methylgruppendedonator inkubiert, der eine radioaktive Markierung am Kohlenstoffatom des Methylrestes enthält. Nach SDS-PAGE und Western Blot kann eine erfolgte Methylierung durch Auflegen eines Röntgenfilms auf die PVDF-Membran durch Fluorographie sichtbar gemacht werden (Details zur Methode in 3.1.23). Die Einschätzung der Spezifität einer erhaltenen Bande in der Fluorographie muss dabei auch vom Molekulargewicht abhängig gemacht werden. Dazu wird die Membran nach Aufnahme des radioaktiven Bildes mit spezifischem Antikörper gefärbt und die Laufhöhe der erhaltenen spezifischen Bande in der Immunfärbung mit dem Signal aus der Fluorographie verglichen. Das für die Proteinproduktion verwendete Konstrukt führt zur Expression eines rekombinanten Proteins, das sich auf einer Höhe von etwa 200 kDa spezifisch mit GLI1-Antikörper anfärben lässt (Abbildung 15 (C) und nicht gezeigte Färbungen).

Abbildung 15 (A) zeigt eine Coomassie-Färbung der Proteinpräparationen, was dem Abgleich der relativen Proteinmengen vor allem hinsichtlich des Protein-Hintergrundes dient. GST-GLI1 kann hier aufgrund niedriger Expressionsspiegel jedoch nicht sichtbar gemacht werden. Da das Fusionsprotein eine hohe Abbauraten oder Abspaltungsrate des Tags aufzuweisen scheint, wurde eine entsprechend große Menge an GST-Tag zur Kontrolle eingesetzt (vergleiche Bedingungen 7 und 9). Aufgrund der starken Expression des GST-Tags wurde weniger Agarose als bei GST-GLI1 eingesetzt, was einen geringeren allgemeinen Proteinhintergrund zur Folge hat.

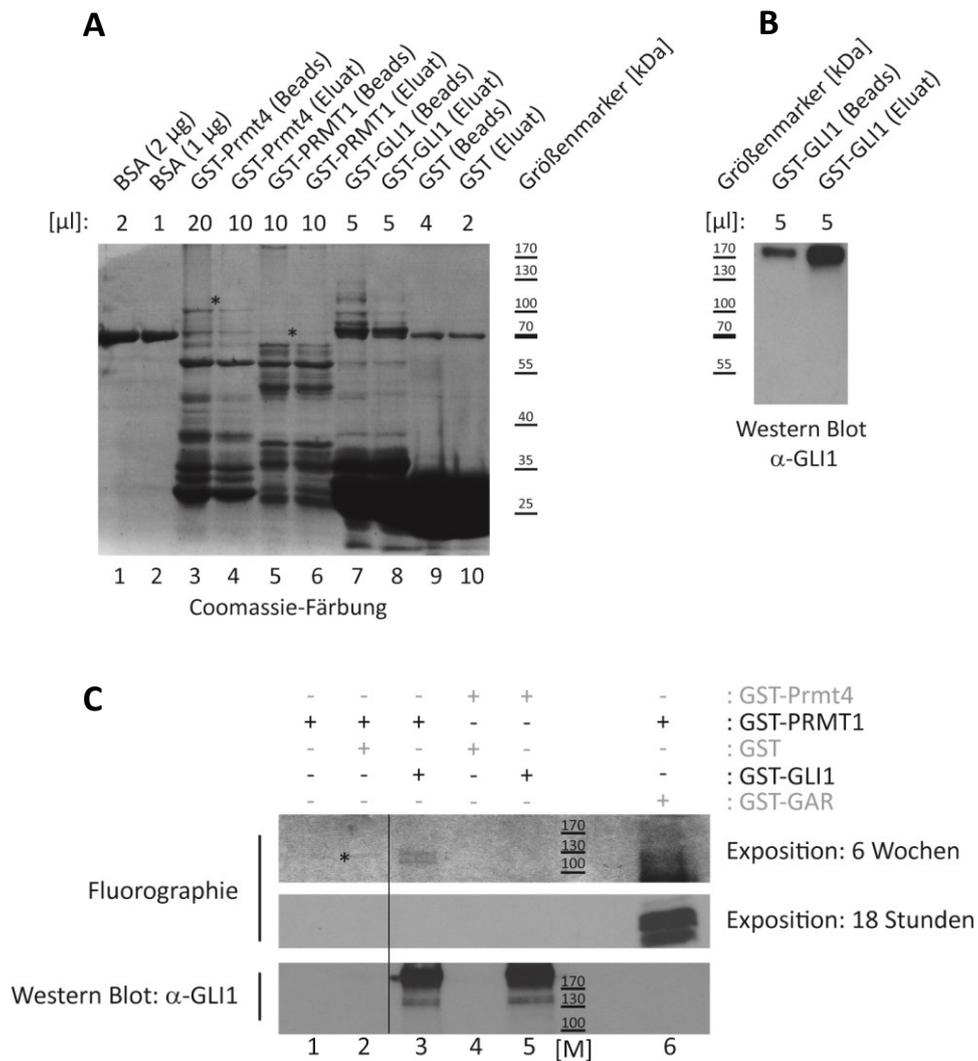


Abbildung 15: *In vitro*-Methylierung von GST-GLI1 durch GST-PRMT1

GST, GST-GAR, GST-GLI1, GST-PRMT1 oder GST-Prmt4 wurden in *E.Coli*-Bakterien (BL21) exprimiert und über die Interaktion ihrer GST-Tags mit Glutathion-Agarose aufgereinigt.

- (A) *Coomassie-Färbung*. Die angegebenen Volumina an Proteinpräparationen wurden an Agarose gebunden sowie nach Elution von der Agarose per SDS-PAGE aufgetrennt. Anschließend wurden die enthaltenen Proteine durch Coomassie-Färbung sichtbar gemacht. Der Auftrag von BSA dient der Mengenabschätzung. (*) markiert spezifische Banden der volle-Länge-Proteine.
- (B) *Immunfärbung*. Aliquots der Präparation von GST-GLI1 wurden per SDS-PAGE aufgetrennt und im Western Blot auf eine PVDF-Membran übertragen. Die Färbung erfolgte mit GLI1-spezifischem Antikörper.
- (C) *Fluorographie*. GST-PRMT1 (25 µl Eluat, nur 10 µl in Kombination mit GST-GAR) oder GST-Prmt4 (30 µl Eluat) wurde mit GST (6 µl), GST-GLI1 (30 µl) oder GST-GAR (1 µl, jeweils Agarosegebunden) in Anwesenheit von radioaktiv markiertem Methylgruppendonor (¹⁴C-SAM) für drei Stunden bei 37 °C unter Schütteln inkubiert. Nach Auftrennung per SDS-PAGE und Übertragung auf eine PVDF-Membran im Western Blot erfolgte die Exposition eines Röntgenfilms unter Zuhilfenahme einer Verstärkerfolie zur Umwandlung der Radioaktivität in Lichtpulse (Fluorographie). Der vertikale Strich kennzeichnet eine Stelle, an der das Bild zum Entfernen zusätzlicher Bedingungen geschnitten wurde. Alle gezeigten Abschnitte entstammen denselben Expositionsvorgängen. [M]=Größenstandard, (*) unspezifische Bande

Da, wie in Abbildung 15 (B) zu sehen, GST-GLI1 an Agarose gebunden stärker konzentriert ist als im Eluat, was auch für die GST-PRMT-Präparationen gilt (nicht gezeigte Immunfärbungen), wurden im Folgenden die Agarose-gebundenen Formen weiter verwendet. Um im Falle eines positiven Ergebnisses eine spezifische Funktion für PRMT1 untersuchen zu können, wurde Prmt4 (murin) als weiteres Enzym in der Methylierungsreaktion eingeschlossen. Prmt4 wurde dabei relativ zu den Mengen an PRMT1 im Überschuss eingesetzt (abgeschätzt anhand der Western Blot-Färbung des GST-Tags, nicht gezeigt).

Die Methylierung von GST-getagtem GAR, einer Domäne des Proteins FIBRILLARIN mit 14 Argininen, dient als Positivkontrolle [289]. Für Sequenzen mit RGG-Motiven wie in Fibrillarlin ist eine starke Methylierung bekannt [218]. In Bedingung 6 zeigt die Fluorographie bereits nach 18-stündiger Exposition sehr starke Signale, die methyliertes GAR anzeigen. Es kann daher davon ausgegangen werden, dass GST-PRMT1 funktionell exprimiert ist und Zielproteine prinzipiell methylieren kann.

In Abbildung 15 (C) sind die Ergebnisse der Methylierungsreaktion von GST-GLI1 durch GST-PRMT1 in der Fluorographie gezeigt. In Bedingung 3 ist die Methylierung von GST-GLI1 durch GST-PRMT1 zu sehen. Es zeigen sich hier bei einer Expositionsdauer von sechs Wochen zwei Banden. Zwar halten sich diese in einem hohen Molekularbereich von etwa 130 kDa auf, allerdings zeigt der direkte Vergleich mit der Laufhöhe von GST-GLI1 in der Immunfärbung (etwa 200 kDa) einen deutlichen Unterschied der Größenbereiche der Banden. In der Immunfärbung treten Abbaubanden auf, von denen jedoch keine im Bereich der Banden der Fluorographie liegt. Zudem tritt in der Kontrolle, die GST-Tag anstatt GST-GLI1 enthält, auf gleicher Höhe ebenfalls eine Methylierungsbande auf (Bedingung 2 (*), diese war auf dem Gel von Bedingung 3 durch zwei weitere Kontroll-Spuren abgetrennt).

Die Methylierungsreaktion durch GST-Prmt4 führte zu keiner Detektion in der Fluorographie (Bedingungen 4 und 5). Die Aktivität von GST-Prmt4 wurde durch Methylierung von Histonen überprüft (nicht gezeigt). Auch bei Inkubation von PRMT1 alleine, ohne Zugabe weiterer Agarose, tritt kein Methylierungssignal auf (Bedingung 1). Bei Reproduktionsversuchen zeigte sich bei einer Inkubation von GST-GLI1 mit GST-PRMT1 stets die beschriebene Doppelbande. Dabei bestätigte sich ausnahmslos das zu geringe Molekulargewicht der Banden in der GST-GLI1/PRMT1-Bedingung in der Fluorographie im Vergleich mit der Immunfärbung.

4.5 PRMT1 UND DER TRANSKRIPTIONSFAKTOR C-MYC

Der Transkriptionsfaktor c-MYC ist als Proto-Onkoprotein bekannt und in vielen humanen Tumoren aufgrund verschiedenster Mechanismen in seiner Expression oder Aktivität dereguliert. Dies ist in Tumorzellen beispielsweise durch eine Amplifikation des Genlocus erreicht (Review [67], und [23]). Kürzlich wurde entdeckt, dass c-MYC während der Entwicklung des Krallenfrosches an regulatorische Bereiche des *PRMT1*-Gens bindet und dort für die Aktivierung des Promotors wichtig ist [89]. Im PDAC sind Deregulationen von c-MYC in Form von Überexpressionen bekannt [36,265]. Aufgrund dieser Gegebenheiten wurde im Folgenden ein möglicher Zusammenhang der Expression von PRMT1 und c-MYC im PDAC untersucht.

4.5.1 AUSWIRKUNGEN DES TRANSKRIPTIONSFAKTORS C-MYC AUF DIE PRMT1-EXPRESSIONSSPIEGEL

Eine mögliche Induktion der Expression von PRMT1 durch c-MYC war aufgrund der geschilderten Kenntnisse eine naheliegende Vermutung. Um dieser Frage nachzugehen, wurde *c-MYC* in Panc1-Zellen mittels siRNA depletiert und die Auswirkungen auf die Transkript- und Proteinspiegel von PRMT1 untersucht.

Die Depletion von *c-MYC* ist in Abbildung 16 (A) auf Ebene des Transkriptes nachgewiesen. Die Normalisierung der Spiegel musste in diesem Experiment abweichend von den bisher benutzten Bezugsgenen auf alternative Gene wie β -*TUBULIN* erfolgen. Grund hierfür war, dass sich ribosomale Gene wie *S14* und *RPLP0* von einem *Knockdown* von *c-MYC* als stark beeinflusst erwiesen hatten (nicht gezeigt) und aufgrund dieser spezifischen Regulation nicht zur Normalisierung in Frage kamen. Eine Beeinflussung durch c-MYC ist für Gene, die an der Translation beteiligt sind, bekannt. Zum einen werden ribosomale Bestandteile durch c-MYC in ihrer Expression verstärkt [147] und zum anderen ist eine Rolle von c-MYC bei der Induktion der Translation einer Vielzahl von Genen durch eine Heraufregulation allgemeiner Translationsfaktoren wie eIF4E nachgewiesen (Review [266]). Die in diesem Experiment ermittelten Expressionsdaten wurden unabhängig voneinander auf mehrere Gene normalisiert, die selbst keine Regulation durch den *Knockdown* aufwiesen (nicht gezeigt). Alle diese Normalisierungen zeigten vergleichbare Ergebnisse wie die in Abbildung 16 dargestellten.

In Abbildung 16 (B) wird deutlich, dass die mRNA-Spiegel von *PRMT1* unter *c-MYC-Knockdown* eine Reduktion aufweisen. Dieser Effekt ist spezifisch für die siRNAs gegen *c-MYC* und bei allen

drei verwendeten Sequenzen vorhanden. Die Kontrollen verursachen diese Beeinflussung nicht.

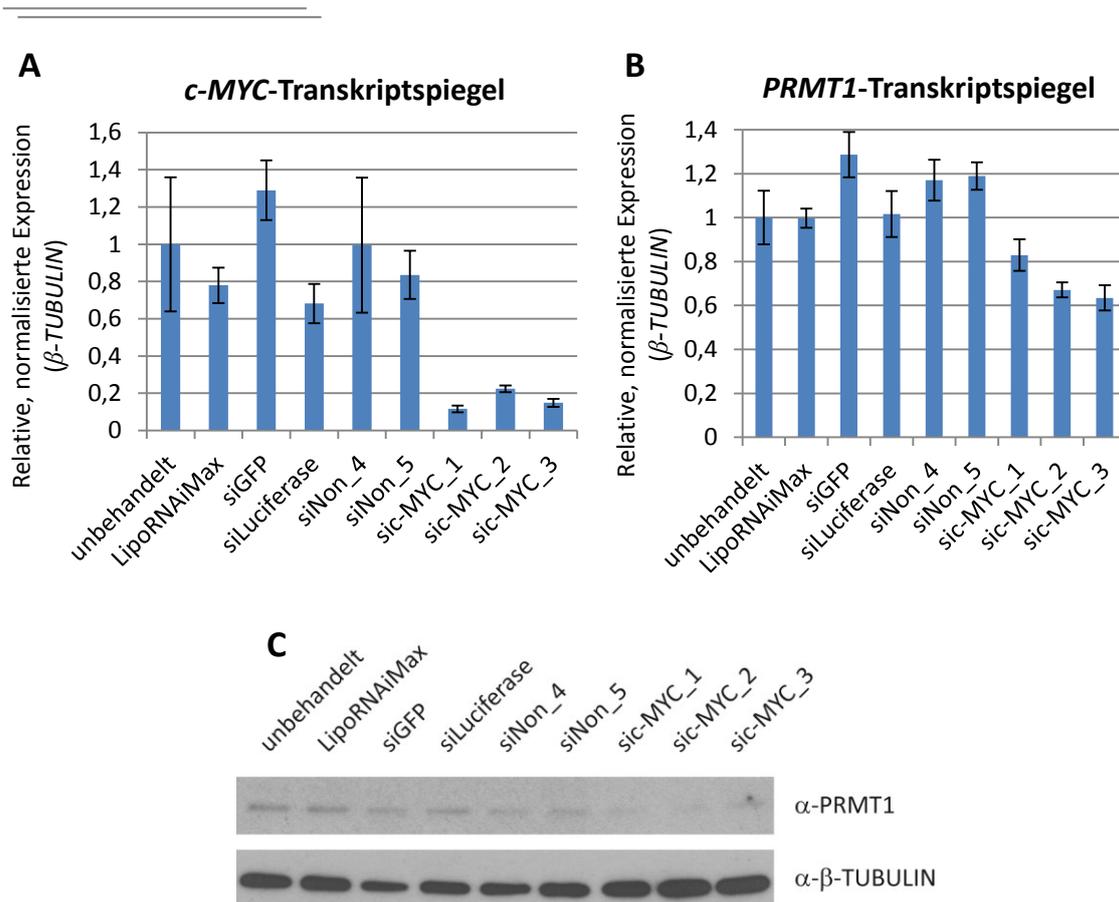


Abbildung 16: Expressionsänderungen von PRMT1 im Knockdown von c-MYC in Panc1-Zellen

Panc1-Zellen wurden mit den angegebenen siRNAs transfiziert (LipoRNAiMax, abweichend vom Standardprotokoll mit einer siRNA-Endkonzentration von 40 pmol/ml und 20 μ l LipoRNAiMax pro 6 cm-Platte) und ohne Durchführung eines Mediumwechsels oder einer Replattierung nach fünf Tagen Inkubation geerntet. RNA (Kit) und Protein-Gesamtzell-extrakt (IPH-Lyse) wurden von derselben Platte geerntet.

(A) – (B) *qPCR*. Die Transkriptspiegel von *PRMT1* und *c-MYC* wurden nach Umschrieb präparierter RNA in cDNA mit Hilfe spezifischer Primer bestimmt. Die Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung des Mittelwerts, der aus einem Messtriplikat gebildet wurde.

(C) *Immunfärbung*. Protein-Gesamtzell-extrakt wurde in der SDS-PAGE aufgetrennt, per Western Blot auf eine PVDF-Membran übertragen und mit Antikörper gefärbt, der für PRMT1 spezifisch ist. β -TUBULIN dient als Ladekontrolle.

Die Immunfärbung in Abbildung 16 (C) zeigt, dass auch die Proteinspiegel von PRMT1 leicht reduziert sind, wenn *c-MYC* herunterreguliert ist. Abgebildet ist eine sehr kurze Exposition der Immunfärbung für PRMT1, da diese Färbung aufgrund sehr großer Proteinmengen zur Sättigung neigt. Der Effekt bleibt auch bei längerer Exposition sichtbar und konnte in einem

weiteren Experiment reproduziert werden. Gleiches gilt für die Transkriptspiegel von *PRMT1*. Die Ladekontrolle in Form der Immundetektion von β -TUBULIN belegt, dass der Rückgang der *PRMT1*-Spiegel nicht in einer geringeren Beladung begründet liegt.

4.5.2 ABHÄNGIGKEIT DER c-MYC-EXPRESSIONSSPIEGEL VON *PRMT1*

Die bereits erwähnte Überexpression von c-MYC im PDAC wird zumindest teilweise von einer gesteigerten Aktivität des Calcineurin-NFAT-Signalwegs induziert [36]. Für die Aktivität des Transkriptionsfaktors NFAT wiederum wurde gezeigt, dass *PRMT1* in T-Zellen eine koaktivierende Funktion hat, indem es eine Methylierung des NFAT-interagierenden Proteins NIP45 katalysiert. Dies bedingt eine Induktion von NFAT-Zielgenen [211]. Kombiniert mit den Ergebnissen aus 4.5.1 ist eine positive Rückkopplung der Expressionen von *PRMT1* und c-MYC daher denkbar.

Um einen Einfluss von *PRMT1* auf die Expression von c-MYC zu prüfen, wurden Panc1-PDAC-Zellen einem *Knockdown* von *PRMT1* mittels siRNA unterzogen. Um die Detektierbarkeit von c-MYC in der Immunfärbung zu erleichtern, wurden die Zellen nachfolgend in Medium inkubiert, das kein FCS enthielt. Es ist bekannt, dass nach einigen Tagen unter diesen Bedingungen die erneute Zugabe von FCS eine Induktion der Proteinspiegel von c-MYC auslöst [69]. Die Induktion mit FCS fand für eine Stunde, zwei oder vier Stunden statt. Als Vergleich wurden Zellen uninduziert belassen.

Abbildung 17 zeigt die Ergebnisse des Versuchs. Beim beschriebenen Experiment wurden fünf verschiedene siRNAs gegen *PRMT1* und zwei Kontroll-siRNAs sowie Transfektionsreagenz alleine verwendet. Zwei siRNAs sind beispielhaft abgebildet. Um einen direkten Vergleich zu ermöglichen, wurden Proteinaliquots der beiden *Knockdown*-Bedingung jeweils neben Extrakt untransfizierter Zellen aufgetragen. Weder die kaum detektierbaren c-MYC-Proteinspiegel ohne FCS-Induktion, noch die erhöhten Spiegel in den induzierten Zeitpunkten waren von einer Depletion von *PRMT1* im Vergleich zu den unbehandelten Bedingungen beeinflusst.

Die weiteren *PRMT1*-Depletionen zeigten ein uneinheitliches Bild. Bei zwei siRNAs lagen leichte Erhöhungen der c-MYC Spiegel nach Induktion vor, während eine weitere siRNA eine Reduktion zeigte (nicht gezeigt). In einem weiteren, unabhängigen Experiment mit FCS-Induktion nach *PRMT1*-Depletion konnte ebenfalls kein Einfluss des *Knockdowns* auf die Transkriptspiegel von c-MYC nach Induktion nachgewiesen werden (nicht gezeigt). Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass die c-MYC-Expressionsspiegel in Panc1-Zellen unter den gewählten Bedingungen, also einer Induktion mit Hilfe von FCS, nicht durch eine Depletion von *PRMT1* reguliert sind.

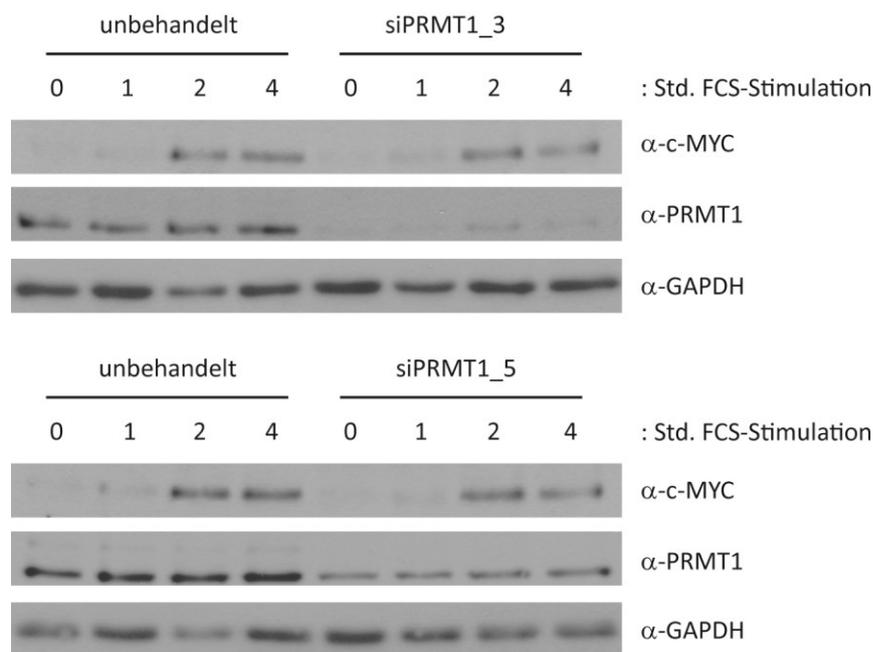


Abbildung 17: c-MYC-Expressionsspiegel unter Depletion von PRMT1 nach FCS-Induktion

Panc1-Zellen wurden mit den angegebenen siRNAs transfiziert (LipoRNAiMax). Nach acht Stunden wurde das Medium gegen Medium mit 0 % FCS ausgetauscht. Danach erfolgte Inkubation für drei Tage. Am dritten Tag wurde bei den zu induzierenden Zellen das Medium gegen solches mit 10 % FCS ausgetauscht. Separate Kulturschalen wurden nach den entsprechenden Zeitpunkten geerntet und Protein-Gesamtzellextrakt (IPH-Lyse, 400 mM NaCl) geerntet. Dieser wurde in der SDS-PAGE aufgetrennt, im Western Blot auf eine PVDF-Membran übertragen und in der Immunfärbung angefärbt. GAPDH dient als Ladekontrolle.

4.6 VERÄNDERUNG DES TRANSKRIPTOMS VON PANC1-ZELLEN UNTER DEPLETION VON PRMT1

Für eine unvoreingenommene Untersuchung der Einflüsse von PRMT1 auf Zellen des PDAC wurde eine Analyse des Transkriptoms von Panc1-Zellen unter Verwendung eines Oligonukleotid-Microarrays durchgeführt. Um die bestmöglichen Ergebnisse zu erzielen, wurden Bedingungen gewählt, bei denen das PRMT1-Protein möglichst effizient depletiert wurde, ohne dass dabei die Inkubationsdauer zu lange war. Eine zu lange Inkubation hätte zum in Abschnitt 4.3 beschriebenen Proliferationsdefekt geführt, durch den wahrscheinlich sekundäre Effekte entstanden wären. Folglich hätten gemessene Änderungen der Transkription unter Umständen nicht dem eigentlich *Knockdown* zugeschrieben werden können. Abbildung 18 zeigt die Kinetik der Depletion von PRMT1 nach Transfektion von Panc1-Zellen mit spezifischer siRNA für eine Zeitspanne zwischen einem und vier Tagen.

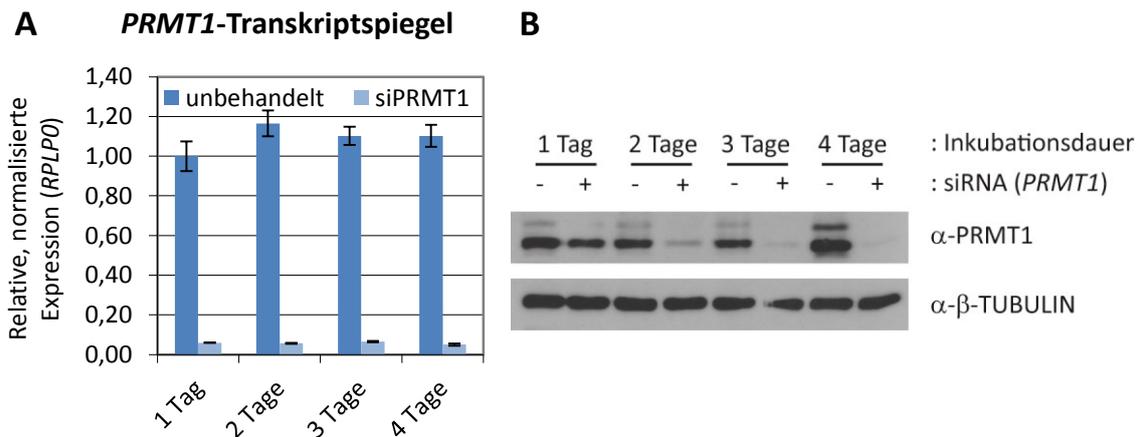


Abbildung 18: Der zeitliche Verlauf der Depletion von PRMT1 in Panc1-Zellen

Panc1-Zellen wurden mit *PRMT1*-spezifischen siRNAs transfiziert (LipoRNAiMax) oder untransfiziert belassen. Nach einem, zwei, drei oder vier Tagen Inkubation ohne Durchführung eines Mediumwechsels oder einer Replattierung erfolgte die Ernte von RNA (Kit) und Protein-Gesamtzellextrakt (IPH-Lyse) aus demselben *Well*.

(A) *qPCR*. Die Transkriptspiegel von *PRMT1* wurden nach Umschrieb präparierter RNA in cDNA mit Hilfe spezifischer Primer bestimmt. Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung des Mittelwerts, der aus einem Messtriplikat gebildet wurde.

(B) *Immunfärbung*. Protein-Gesamtzellextrakte wurden in der SDS-PAGE aufgetrennt, per Western Blot auf eine PVDF-Membran übertragen und mit einem Antikörper gefärbt, der für PRMT1 spezifisch ist. β-TUBULIN dient als Ladekontrolle.

Abbildung 18 (A) gibt die Transkriptspiegel von *PRMT1* wieder. Diese sind bereits nach einem Tag sehr stark gesenkt, was über die gesamte Zeit des Experimentes stabil bleibt. Auf Proteinebene hingegen ist PRMT1 nach einem Tag noch nahezu vollständig vorhanden, wie in Abbildung 18 (B) abgebildet. Erst nach zwei Tagen ist eine starke Reduktion der PRMT1-Proteinspiegel festzustellen, die jedoch an Tag 3 noch deutlicher ist. Zwar ist nach vier Tagen nochmals ein leichter Rückgang zu sehen, jedoch sind auch hier noch geringe Restmengen an PRMT1 vorhanden. Aufgrund dieser Ergebnisse wurde eine Inkubationsdauer von drei Tagen nach Transfektion für die Anfertigung des Genexpressions-Microarrays gewählt.

Der Microarray war mit 60-meren Oligonukleotiden besetzt, die als Sonden für die Hybridisierung mit den fluoreszenz-markierten cDNAs dienen. Die cDNA war zuvor aus der RNA umgeschrieben worden, die aus Panc1-Zellen gewonnen wurde. Für die Gewinnung der RNA wurden zwei getrennte Transfektionen mit siRNA (siPRMT1_6 und siPRMT1_UTR1) durchgeführt, um *PRMT1* spezifisch zu depletieren. Die Sonden des Arrays deckten 28.000 Gen-RNAs und 7.500 linc-RNAs des menschlichen Genoms ab. Die Expressionsspiegel einzelner RNAs in den PRMT1-Depletionsbedingungen wurden mit den Spiegeln in zwei Vergleichsbedingungen abgeglichen. Hierzu dienten zwei separate Transfektionen mit den Kontroll-siRNAs siLuciferase und siNon_5. Das Depletionsexperiment in Panc1-Zellen wurde in einem

zeitlichen Abstand von einer Woche in gleicher Weise wiederholt, um ein biologisches Duplikat für den Einsatz im Array zur Verfügung zu haben.

Als Referenzwert für die Expression in einer siRNA-Bedingung wurde eine Mischreferenz gebildet, also eine mittlere Expression in allen vier benutzten Transfektionen beider Experiment-Replikate. Die Mischreferenz wurde dabei durch Vereinen aller acht RNA-Proben zu gleichen Teilen und der Hybridisierung der daraus hergestellten cDNA mit dem Array gebildet. Die Mischreferenz war Cy3-markiert, während die Einzelbedingungen Cy5-markiert waren.

Es wurden nur solche Gene als spezifisch reguliert angesehen, die in beiden siPRMT1-Bedingungen jeweils versus beide siRNA-Kontrollbedingungen herauf- bzw. herunterreguliert waren. Der Schwellenwert für die Signifikanz wurde dabei auf eine 2-fache Regulation gesetzt. Nur solche Expressionsänderungen wurden als gesichert erachtet, die in beiden Experimenten in gleicher Richtung über 2-fach reguliert waren. Abbildung 19 fasst die Definition spezifisch regulierter Gene des Arrays schematisch zusammen.

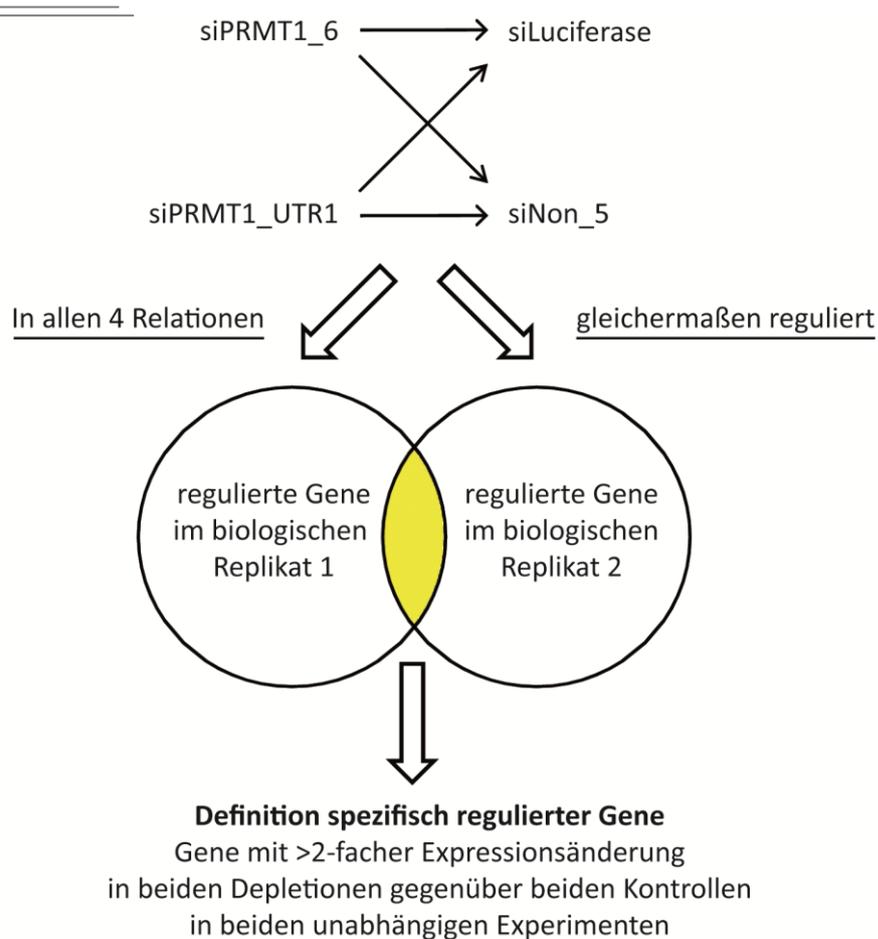
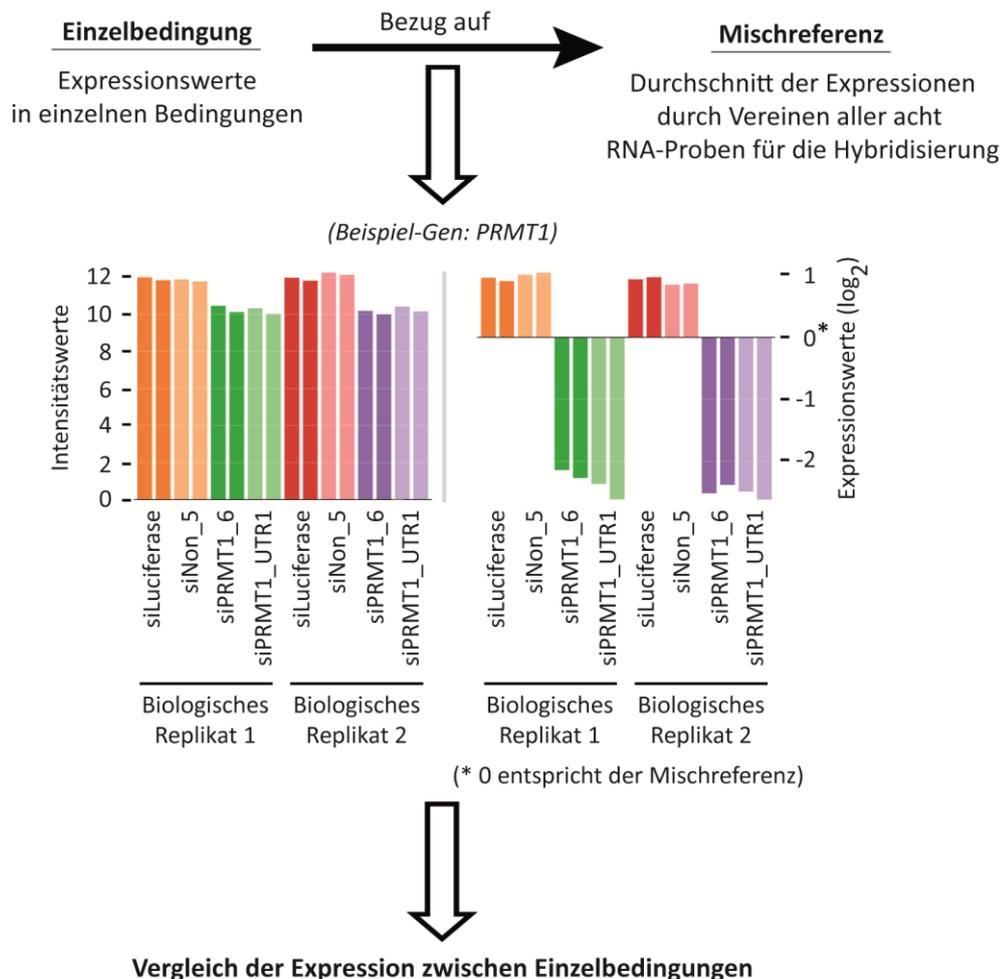


Abbildung 19: Definition spezifisch regulierter Gene des Genexpressions-Microarrays unter Depletion von PRMT1

Abbildung 20 verdeutlicht die Berechnungsgrundlagen der Auswertung des Arrays schematisch anhand der Expressionswerte von *PRMT1*. Die Intensitäten der Messwerte liegen in allen Bedingungen über dem geforderten Schwellenwert von 5. Mehrere Balken pro Bedingung zeigen an, dass die betreffende Sonde auf dem Array an mehreren Stellen (hier zweifach) gespottet war.



Veränderte Expression von *PRMT1* in siPRMT1_6 vs. siLuciferase:

$$2^{(\text{Differenz der logarithmischen Expressionswerte})} \approx 2^{(-2-1)} \approx 2^{-3} \approx 0,125$$

Abbildung 20: Schema der Berechnungsgrundlagen des Microarrays

Die ermittelten Expressionen von *PRMT1* in den verschiedenen siRNA-Transfektionen dienen der Veranschaulichung. Die Angaben stellen vereinfachte, ungefähre Zahlenwerte dar. Der Schwellenwert für eine Auswertbarkeit wurde auf einen Intensitätswert von 5 festgelegt. Mehrere Balken in derselben Bedingung spiegeln das Vorliegen der entsprechenden Anzahl an Spots für die gegebene Sequenz auf dem Array wieder (hier: 2).

Die Transkriptmenge des *PRMT1*-Gens ist in allen Depletionen von PRMT1 annähernd gleichermaßen herunterreguliert. Die Tatsache, dass sich die Mischreferenz (entsprechend einem logarithmischen Expressionswert von 0) nicht exakt in der Mitte aller Einzelwerte befindet, lässt sich durch Sättigungseffekte der Hybridisierung erklären, auf die hier nicht näher eingegangen wird. Die letztendliche Ermittlung der Expressionsdifferenz zwischen zwei Bedingungen wird durch Bilden der Differenz der logarithmischen Expressionswerte durchgeführt, wie in Abbildung 20 erklärt.

In Abbildung 21 ist eine Immunfärbung dargestellt, welche die erfolgreiche Depletion von PRMT1 in den Bedingungen des Arrays belegt. In beiden biologischen Replikaten ist nach drei Tagen Inkubation ein deutlicher Rückgang, allerdings kein komplettes Verschwinden, der PRMT1-Doppelbande ersichtlich.

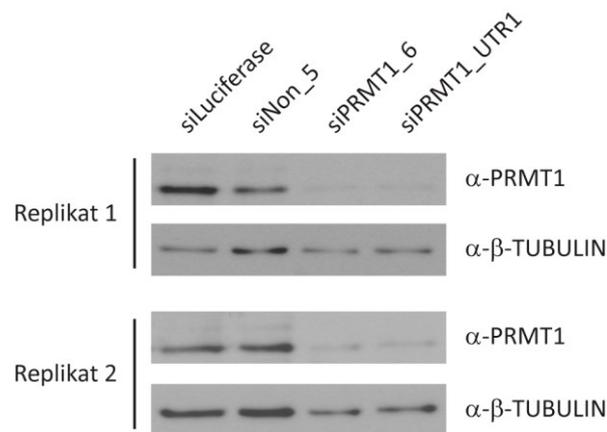


Abbildung 21: PRMT1-Depletion in Panc1-Zellen für die Anfertigung eines Microarrays zur Bestimmung des Genexpressionsprofils

Immunfärbung. Panc1-Zellen wurden mit den angegebenen siRNAs transfiziert (LipoRNAiMax). Nach drei Tagen Inkubation wurden die Zellen für die Herstellung von RNA (Kit) und Protein-Gesamtzellextrakt (IPH-Lyse) geerntet. Die Ernte erfolgte nach Auftrennung des Zellpellets aus demselben *Well*. Die RNA wurde für den Microarray verwendet. Die Proteine wurden in der SDS-PAGE aufgetrennt, per Western Blot auf eine PVDF-Membran übertragen und mit PRMT1-spezifischem Antikörper angefärbt. Als Kontrollfärbung dient β -TUBULIN. Die Inputs beider biologischen Replikate sind gezeigt.

Abbildung 22 listet in einem Mengendiagramm die Anzahl regulierter Gene des Arrays in den beiden Depletionen von PRMT1 relativ zu den siRNA-Kontrollen auf. In Abbildung 22 (A) ist die Anzahl der herunterregulierten Gene angegeben, während Abbildung 22 (B) die heraufregulierten Gene angibt. Hierbei geben die Bedingungen A bis D die Anzahlen an Genen an, die in den entsprechenden Relationen differenziell exprimiert sind, wie in der Abbildung erklärt.

Bei diesen Angaben sind bereits lediglich die Regulationen gelistet, die in beiden durchgeführten biologischen Replikaten gleichermaßen auftreten. Die per Definition als spezifisch reguliert angenommenen Gene befinden sich in der Schnittmenge der Bedingungen A, B, C und D. Daraus ergibt sich eine Gesamtzahl von 49 Genen, die heraufreguliert, und von 6 Genen (inklusive *PRMT1*), die herunterreguliert sind. Die Tatsache, dass nur ein geringer Prozentsatz der regulierten Gene der einzelnen Relationen letztendlich in der Schnittmenge erhalten bleibt, deutet auf ein großes Maß an individuellen Regulationen durch die verwendeten siRNAs hin.

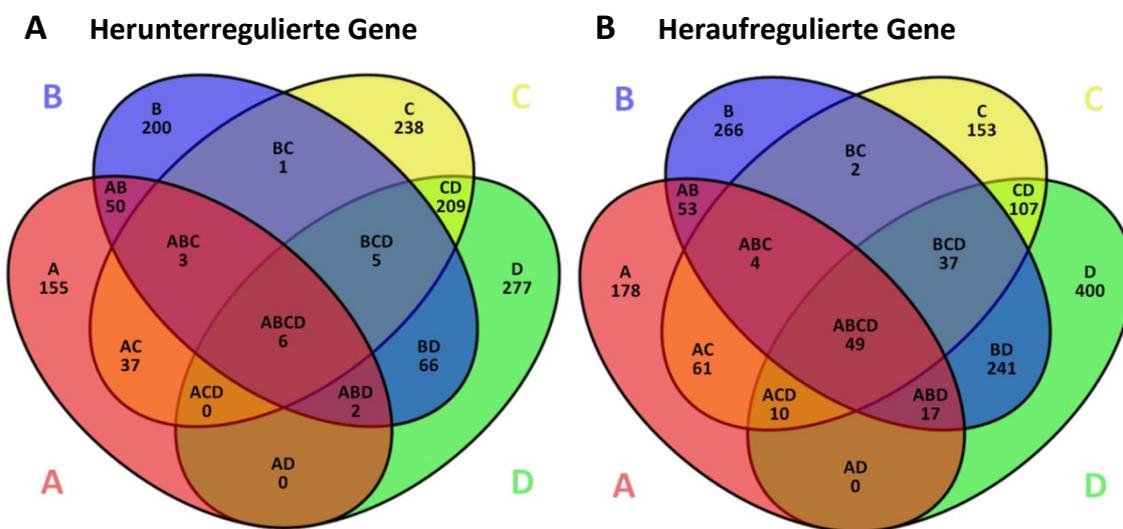


Abbildung 22: Mengendiagramm der regulierten Gene in den Bedingungen des Genexpressionsarrays in Panc1-Zellen unter PRMT1-Depletion

Angegeben sind die Anzahlen der deregulierten Gene in den PRMT1-Depletionen gegenüber den jeweiligen Bezugsbedingungen. Es wurden nur Gene berücksichtigt, die in beiden biologischen Replikaten reguliert sind. (A) gibt die herunterregulierten und (B) die heraufregulierten Gene an. Die Relationen sind:

- A: siPRMT1_6 vs. siLuciferase
- B: siPRMT1_6 vs. siNon5
- C: siPRMT1_UTR1 vs. siLuciferase
- D: siPRMT1_UTR1 vs. siNon_5

Die Kombinationen (AB, CD, usw.) geben diejenigen Gene an, die in allen betreffenden Relationen gleichermaßen dereguliert sind (jeweils über 2-fach in die gleiche Richtung). Die Kombination ABCD repräsentiert die Gene, die gemäß den Definitionen des Experiments als spezifisch angesehen werden.

Tabelle 1 listet die regulierten Gene in alphabetischer Reihenfolge, getrennt nach Richtung der Regulation, auf. Alle Gene sind proteinkodierend. Da die Gene *ANXA8*, *ANXA8L1* und *ANXA8L2* von derselben Sonde detektiert werden, wird für die Validierungsversuche lediglich *ANXA8*

untersucht. Das Gen *XXbac-BPG116M5.17* wird nicht untersucht, da ein Nachweis der Expression hier nur auf Transkriptebene existiert und die Sonde zudem identisch zu der Sonde für *CFB* ist. *PRMT1* wird als Positivkontrolle von der Liste der herunterregulierten Gene gestrichen. Somit ergibt sich eine Gesamtheit von 51 Kandidatengenen für die Validierung. Auffällig ist, dass 26 (51 %) dieser Gene experimentell als induzierbar durch Typ I und/oder Typ II Interferone identifiziert wurden [18,37,49,54,55,93,94,103,110,126,163,180,182,204, 291,297,303,309,312]. Für die Gene *RTP4* und *SLC15A3* wurde dies nur im bovinen System nach Induktion mit IFN-Tau nachgewiesen, einem Interferon ohne humanes Homolog, das allerdings zur Gruppe der Typ I Interferone mit entsprechender Rezeptor-Bindung gehört. Daher werden diese Gene als Interferon-induzierbar gewertet. Die Validierung der potenziellen *PRMT1*-Zielgene des Arrays erfolgt jedoch unabhängig von ihrer Regulation durch Interferone.

Herauf-reguliertes Gen	Kodiertes Protein
<i>ABTB1</i>	ankyrin repeat and BTB (POZ) domain containing 1
<i>ADAP1</i>	ArfGAP with dual PH domains 1
<i>ANXA8</i>	annexin A8
<i>ANXA8L1</i>	annexin A8-like 1
<i>ANXA8L2</i>	annexin A8-like 2
<i>BST2*</i>	bone marrow stromal cell antigen 2
<i>C10ORF10</i>	chromosome 10 open reading frame 10
<i>CAMP*</i>	cathelicidin antimicrobial peptide
<i>CCL5*</i>	chemokine (C-C motif) ligand 5
<i>CEACAM1*</i>	carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 1 (biliary glycoprotein)
<i>CFB*</i>	complement factor B
<i>CMPK2</i>	cytidine monophosphate (UMP-CMP) kinase 2, mitochondrial
<i>COL6A1</i>	collagen, type VI, alpha 1
<i>CPAMD8</i>	C3 and PZP-like, alpha-2-macroglobulin domain containing 8
<i>CX3CL1*</i>	chemokine (C-X3-C motif) ligand 1
<i>DDX60*</i>	DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 60
<i>DHX58</i>	DEXH (Asp-Glu-X-His) box polypeptide 58
<i>GPRIN2</i>	G protein regulated inducer of neurite outgrowth 2
<i>GRASP</i>	GRP1 (general receptor for phosphoinositides 1)-associated scaffold protein
<i>HERC5*</i>	hect domain and RLD 5
<i>HIP1R</i>	huntingtin interacting protein 1 related
<i>HLA-B*</i>	major histocompatibility complex, class I, B
<i>IFI27*</i>	interferon, alpha-inducible protein 27
<i>IFI44*</i>	interferon-induced protein 44
<i>IFIH1*</i>	interferon induced with helicase C domain 1
<i>IFIT1*</i>	interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 1
<i>IFIT2*</i>	interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 2

<i>IFIT3*</i>	interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 3
<i>ISG15*</i>	ISG15 ubiquitin-like modifier
<i>KCNH2</i>	potassium voltage-gated channel, subfamily H (eag-related), member 2
<i>MFI2</i>	antigen p97 (melanoma associated) identified by monoclonal antibodies 133.2
<i>MX1*</i>	myxovirus (influenza virus) resistance 1, interferon-inducible protein p78 (mouse)
<i>OAS2*</i>	2'-5'-oligoadenylate synthetase 2, 69/71kDa
<i>OASL*</i>	2'-5'-oligoadenylate synthetase-like
<i>PAOX</i>	polyamine oxidase (exo-N4-amino)
<i>PARP14</i>	poly (ADP-ribose) polymerase family, member 14
<i>PLEKHA4</i>	pleckstrin homology domain containing, family A (phosphoinositide binding specific) member 4
<i>PPP2R2B</i>	protein phosphatase 2, regulatory subunit B, beta
<i>RARRES3*</i>	retinoic acid receptor responder (tazarotene induced) 3
<i>RMND5A</i>	required for meiotic nuclear division 5 homolog A (<i>S. cerevisiae</i>)
<i>RSAD2*</i>	radical S-adenosyl methionine domain containing 2
<i>RTP4*</i>	receptor (chemosensory) transporter protein 4
<i>SBK1</i>	SH3-binding domain kinase 1
<i>SLC15A3*</i>	solute carrier family 15, member 3
<i>SSC5D</i>	scavenger receptor cysteine rich domain containing (5 domains)
<i>TTC39B</i>	tetratricopeptide repeat domain 39B
<i>XAF1*</i>	XIAP associated factor 1
<i>XXbac-BPG116M5.17</i>	Uncharacterized protein, cDNA FLJ55673, highly similar to Complement factor B
<i>ZC3HAV1*</i>	zinc finger CCCH-type, antiviral 1
Herunter-reguliertes Gen	Kodiertes Protein
<i>AHNAK</i>	AHNAK nucleoprotein
<i>GLIPR1</i>	GLI pathogenesis-related 1
<i>INSIG1</i>	insulin induced gene 1
<i>NSD1</i>	nuclear receptor binding SET domain protein 1
<i>PRMT1</i>	protein arginine methyltransferase 1
<i>RGS2*</i>	regulator of G-protein signaling 2, 24kDa

Tabelle 1: Auflistung aller Kandidatengene des Microarrays

Die Tabelle listet alle Kandidatengene des Microarrays auf. Angegeben sind die Gennamen sowie die Bezeichnung der jeweiligen Proteinprodukte. (*) markiert Interferon-induzierbare Gene.

4.7 VALIDIERUNG DER KANDIDATENGENE DES MICROARRAYS

Im Folgenden wurden die im Microarray erhaltenen Gene, die von der Depletion des PRMT1-Proteins in ihrer Expression beeinflusst waren und als spezifisch reguliert angenommen wurden, einer individuellen Validierung über mehrere Schritte unterzogen.

4.7.1 TECHNISCHE VALIDIERUNG AUS DEN RNA-PROBEN DES MICROARRAYS

In einem ersten Validierungsschritt sollte überprüft werden, ob sich die Art und das Ausmaß der Regulationen der Gene reproduzieren lässt. Dafür wurden die RNA-Proben des Arrays für die Durchführung individueller Bestimmungen der Expressionsspiegel pro Gen in der qPCR herangezogen. Hierzu wurde mRNA aus den RNA-Proben in cDNA umgeschrieben und in der qPCR unter Verwendung spezifischer Primer die Expressionsspiegel für einzelne Gene bestimmt.

Anders als bei der Berechnung im Microarray erfolgte die Berechnung der Spiegel hier unter Bezug auf Referenzgene. Die Expression in der Bedingung siLuciferase wird jeweils als 1 definiert. Abbildung 23 (A) und Abbildung 23 (B) zeigen beispielhaft die Auswertungen zweier Kandidatengene des Microarrays. *CCL5*, das im Microarray eine Heraufregulation zeigte, weist auch hier in allen Relationen eine deutliche Erhöhung der Transkriptspiegel auf. *RGS2*, ein Gen das im Microarray durch PRMT1-Depletion weniger stark exprimiert war, ist auch in der technischen Validierung herunterreguliert. Wie auch im Microarray (nicht gezeigt) sind hier einzelne Relationen, wie siPRMT1_6 zu siNon5, nur knapp über der Signifikanzschwelle reguliert.

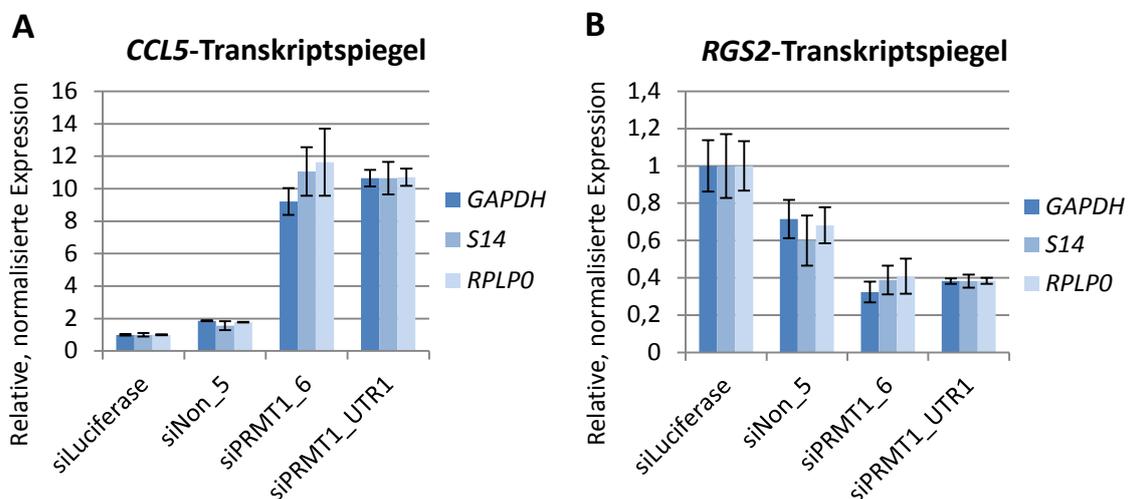


Abbildung 23: Technische Validierung von Kandidatengenen aus dem Microarray

Die RNA-Proben des Arrays (Abbildung 21) wurden in einer reversen Transkription in cDNA umgeschrieben und daraus die relativen Transkriptmengen in der qPCR mit Hilfe spezifischer Primer bestimmt. Die Spiegel sind relativ zu denen in der Bedingung siLuciferase angegeben. Zur Normalisierung wurden *GAPDH* als Gen des Energiestoffwechsels der Zelle und *S14* und *RPLP0* als ribosomale Bestandteile verwendet. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung des Mittelwerts an, der aus einem Messtriplikat errechnet wurde.

Tabelle 2 listet die stichprobenartige technische Validierung von Kandidatengenen des Microarrays auf und stellt die absoluten Regulationen im Array denen gegenüber, die in den qPCRs ermittelt wurden. Auf die Durchführung dieser Validierung für alle Kandidatengene des Microarrays wurde zugunsten weiterer, biologisch unabhängiger Experimente verzichtet. Mit Ausnahme der Gene *AHNAK* und *NSD1* decken sich die Ergebnisse der qPCRs gut mit den Expressionswerten, wie sie im Array ermittelt worden waren. Bei den heraufregulierten Genen weichen lediglich die absoluten Werte ab, was vermutlich in den Gegebenheiten der qPCR-Methode begründet liegt. Beispielsweise führt die Tatsache, dass die Primereffizienzen von 100 Prozent abweichen können, zu über- oder unterrepräsentierten Expressionsänderungen. Die Effizienz der Primer wurde im Experiment allerdings nicht bestimmt und entsprechend fand keine Korrekturberechnung dahingehend statt. Zudem resultiert der Bezug auf die Mischreferenz im Array notwendigerweise in leicht abweichenden Regulationen in der RT-qPCR, da in letzterer zwei Expressionen direkt miteinander verglichen werden, ohne sich dabei auf eine durchschnittliche Expression zu beziehen.

Gen	Fache Regulation im Microarray	Fache Regulation in technischer Validierung (qPCR)
<i>AHNAK</i> *	0,4	0,9
<i>CCL5</i>	8,5	10,7
<i>GLIPR1</i>	0,3	0,3
<i>HERC5</i>	8,5	10,6
<i>IFI44</i>	4,1	5,5
<i>ISG15</i>	3,3	5,6
<i>NSD1</i> *	0,1	1,3
<i>PRMT1</i>	0,1	0,1
<i>RGS2</i>	0,4	0,4

Tabelle 2: Gegenüberstellung der Transkriptspiegel-Regulationen einzelner Kandidatengene im Microarray mit deren technischer Validierung

Neun Kandidatengene des Microarrays wurden stichprobenartig einer technischen Validierung mittels qPCR unterzogen, wie in Abbildung 23 gezeigt. Die dritte Spalte listet die Ergebnisse in der Relation siPRMT1_UTR1 zu siLuciferase bei Normalisierung auf *RPLP0* auf. Die zweite Spalte zeigt die Regulationen im Microarray in derselben Relation unter Verwendung der Mischreferenz als Bezug, wie in Abbildung 20 dargestellt. (*) markiert Kandidatengene, deren technische Validierung von den Ergebnissen des Microarrays stark abweicht.

Die Reproduktion kann auf dieser Ebene als erfolgreich angesehen werden. Für die beiden nicht validierbaren Gene *AHNAK* und *NSD1* gilt, dass in beiden Fällen mehrere verschiedene Sondensequenzen auf dem Array gespottet waren. Eine Auswertung dieser hat ergeben, dass jeweils nur eine der vorhandenen Sonden eine Expressionsänderung anzeigte, die zur Klassifizierung des Gens als reguliert führte. Die verbleibenden Sonden wiesen keine Veränderung der Spiegel auf, so wie es auch in der technischen Validierung nicht der Fall war. Das Gen wurde in solchen Fällen vorerst als nicht reguliert angenommen. Die Gründe und Konsequenzen dieser Gegebenheiten werden im Kapitel Diskussion erläutert.

Tabelle 3 enthält eine komplette Auflistung von Kandidatengenen, die in verschiedenen Sonden teils widersprüchliche Expressionswerte im Microarray aufwiesen. Die meisten dieser Gene wurden von der weiteren Validierung in dieser Arbeit ausgeschlossen. Es sind die Funktionen der jeweiligen Genprodukte sowie Angaben zu den Gegebenheiten im Array aufgeführt. Bei *KCNH2* und *PPP2R2B* wies die Auswertung der Arraydaten Auffälligkeiten bezüglich der Expressionswerte auf. Hierbei befanden sich alle Expressionen der Einzelbedingungen unterhalb der Mischreferenz. In Absprache mit dem zuständigen Bioinformatiker Florian Finkernagel wurden diese Regulationen als unspezifisch angesehen. Da jedoch keine Erklärung für das Phänomen gegeben werden kann, sollten diese Gene von zukünftigen Validierungen nicht ausgeschlossen werden.

Gen	Regulation im Microarray	Funktion des Proteins	Quellen	Ergebnisse verschiedener Sonden
<i>AHNAK</i>	Herunter	<ul style="list-style-type: none"> • Zell-Zell-Adhäsion • Interaktion mit ANNEXIN A2 • Positive Regulation von Invasion und Migration • Regulation von E-CADHERIN 	[8,21,269,273]	3 Sonden; 1 Sonde mit Regulation, 2 Sonden ohne Regulation
<i>CEACAM1</i>	Herauf	<ul style="list-style-type: none"> • Interferon-induzierbar • Adhäsionsmolekül • Interaktion mit ANNEXIN A2 • In vielen Tumoren dereguliert • Faktor für Metastasierung 	[37,81,138,150,293]	2 Sonden; 1 Sonde mit Regulation, 1 Sonde ohne Regulation
<i>CMPK2</i>	Herauf	Nukleotidsynthese	[315]	2 Sonden; 1 Sonde mit Regulation, 1 Sonde ohne Regulation
<i>GPRIN2</i>	Herauf	<ul style="list-style-type: none"> • Rolle in G-Protein-Signalgebung • Interagiert mit HOXA1 (im Yeast Two-Hybrid-System) 	[43,125,161]	3 Sonden; 1 Sonde mit Regulation, 2 Sonden ohne Regulation

<i>GRASP</i>	Herauf	<ul style="list-style-type: none"> • Guanidin-Austauschfaktor • Reguliert Signalgebung durch ARF-GTPasen • Wichtig für Zellmotilität 	[151,167,310]	2 Sonden; 1 Sonde mit Regulation, 1 Sonde ohne Regulation
<i>HIP1R</i>	Herauf	<ul style="list-style-type: none"> • Wichtig in CLATHRIN-vermittelter Endozytose • Essenziell für Chromosomen-Segregation • Induziert Apoptose über BAK/CASPASE 9 • Rolle im EGFR-Recycling 	[77,146,156,230]	4 Sonden; 1 Sonde mit Regulation, 2 Sonden mit schwacher Regulation, 1 Sonde ohne Regulation
<i>KCNH2</i>	Herauf	<ul style="list-style-type: none"> • Kalium Ionenkanal • Verstärkte Expression in Karzinomen • Pro-proliferativ in Leukämien 	[130,278,279]	Unklare Regulation bei beiden vorhandenen Sonden
<i>MFI2</i>	Herauf	<ul style="list-style-type: none"> • Wichtig für Invasivität und Metastasierung von Melanomen • Chemotaxisfaktor für Endothelzellen • Fördert Angiogenese • Induziert durch VEGF • Pro-proliferativ 	[25,72,197,256,259,284]	2 Sonden; 1 Sonde mit Regulation, 1 Sonde ohne Regulation
<i>NSD1</i>	Herunter	<ul style="list-style-type: none"> • Durch H3K36-Methylierung Einfluss auf Acetylierung von HoxA Genen und Proto-Onkogenen • Induziert Leukämien • Rolle in Rekrutierung und Phosphorylierung der RNA Polymerase II • Einfluss auf Serumabhängigkeit des Zellwachstums 	[91,184,318]	3 Sonden; 1 Sonde mit Regulation, 2 Sonden ohne Regulation
<i>PPP2R2B</i> (B55β UE von PP2A)	Herauf	<ul style="list-style-type: none"> • Holoenzym inhibiert die PRMT1-Aktivität • Pro-apoptotisch • Dephosphoryliert CHK2 bei DNA-Schaden • Rolle in Zell-Zell-Adhäsion • Dephosphoryliert Mdm2 und HDM2 • Gen ist in Brustkrebs methyliert • Inhibiert Eintritt in Mitose • Destabilisiert c-MYC 	[65,73,172,205,212,224,286,287]	2 Sonden; 1 Sonde mit Regulation aber mit Auffälligkeiten, 1 Sonde ohne Regulation
<i>RSAD2</i> (Viperin)	Herauf	Interferon-induzierbar	[82]	2 Sonden; 1 Sonde mit Regulation, 1 Sonde ohne Regulation
<i>SSC5D</i>	Herauf	<ul style="list-style-type: none"> • Glykoprotein, mutmaßliche Funktion in angeborener Immunantwort • Maus-Homolog wird in Pankreas-Azinus-Zellen exprimiert 	[98,201]	2 Sonden; 1 Sonde mit Regulation, 1 Sonde ohne Regulation
<i>TTC39B</i>	Herauf	Keine Funktionen bekannt. SNP-Analyse zeigte Assoziation mit Blutcholesterin-Konzentration.	[141]	2 Sonden; 1 Sonde mit Regulation, 1 Sonde mit schwacher Regulation

<i>XAF1</i>	Herauf	<ul style="list-style-type: none"> • Rolle in Interferon-induzierter Apoptose • In Pankreaskrebs und mehreren anderen Tumorarten herunterreguliert • Aktiviert p53 Transaktivierungsaktivität • Zellzykluskontrolle, induziert G2/M-Arrest • Inhibiert Angiogenese und Migration 	[14,46,56, 122,163, 176,196, 242,301, 332]	2 Sonden; 1 Sonde mit Regulation, 1 Sonde ohne Regulation
-------------	--------	---	--	---

Tabelle 3: Auflistung und Darstellung der Funktionsdetails zu Kandidatengenens des Microarrays, die unterschiedliche Regulationen in mehreren Arraysonden aufwiesen

Die Tabelle listet alle Kandidatengene des Microarrays auf, für die unklare Daten im Microarray vorlagen (siehe Text und Diskussion).

4.7.2 VALIDIERUNG DES MICROARRAYS IN WEITEREN DEPLETIONSEXPERIMENTEN IN PANC1-ZELLEN

Um die Ergebnisse des Microarrays in unabhängigen Experimenten zu überprüfen, wurden Panc1-Zellen weiteren siRNA-vermittelten *Knockdowns* von *PRMT1* unterzogen. Hierbei konnte, im Gegensatz zu den limitierten Möglichkeiten des Arrays, eine größere Anzahl an *PRMT1*-spezifischen und Kontroll-siRNAs verwendet werden. Dadurch war es möglich, der Frage nachzugehen, in wie weit die ermittelten Kandidatengene tatsächlich auf die Depletion von *PRMT1* als solches zurückzuführen sind, oder ob im Einzelfall eine Regulation in Effekten der Transfektion mit siRNA begründet liegt.

In Abbildung 24 wurden Panc1-Zellen Transfektionen mit einer größeren Auswahl an siRNAs unterzogen. Der Nachweis der Depletion von *PRMT1* ist in Abbildung 24 (A) auf Ebene des Proteins erbracht. Alle im Array als spezifisch definierten Gene wurden in diesem Experiment dem Versuch der Validierung unterzogen. Abbildung 24 (B) und Abbildung 24 (C) zeigen mit den beiden Kandidatengenens *CCL5* und *IFI44* zwei Beispiele, die eindeutig als off-target eingestuft wurden. Im Fall von *CCL5* heben sich die beiden im Microarray verwendeten *PRMT1*-spezifischen siRNAs durch eine deutliche Induktion der Expression ab. Die weiteren Depletionen zeigen diesen Effekt jedoch nicht, sondern bewegen sich innerhalb der Regulationen, die unspezifisch durch die Kontrollen auftreten. Bei *IFI44* ist das Resultat sehr ähnlich. Da hier in den Kontrollen weniger Abweichungen auftreten, ist die Klassifizierung als off-target jedoch noch eindeutiger. Kandidatengene, die ein vergleichbares Bild zeigten, wurden unmittelbar aus der Liste möglicher, durch *PRMT1* regulierter Gene, entfernt. Gemäß dieser exemplarisch dargestellten Kriterien mussten 19 der Kandidatengene als *off-target* klassifiziert werden. Bei den übrigen Genen war aufgrund von teils unterschiedlichen Effekten verschiedener siRNAs durch dieses Experiment noch keine eindeutige Aussage zu treffen.

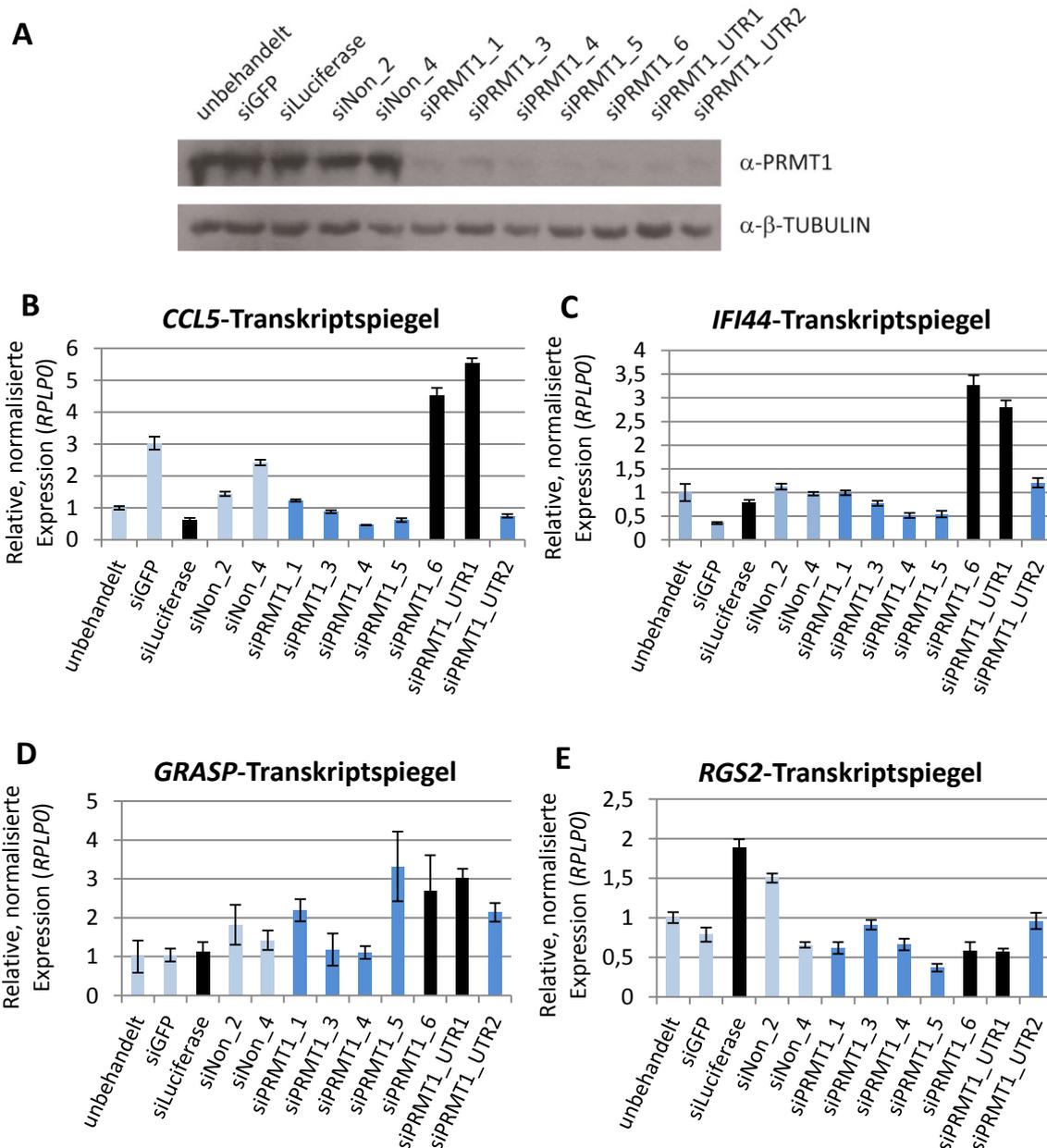


Abbildung 24: Validierung der Kandidatengene des Microarrays in weiteren Experimenten mit Depletion von PRMT1 in Panc1-Zellen (Teil 1)

Panc1-Zellen wurden mit den angegebenen siRNAs transfiziert (LipoRNAiMax). Drei Tage nach der Transfektion wurden die Zellen geerntet. Das Zellpellet wurde für die Protein-Ernte (KPi-Lyse) und die RNA-Ernte (Kit) aufgeteilt.

(A) *Immunfärbung*. Protein-Gesamtzellextrakte wurden per SDS-PAGE aufgetrennt, mittels Western Blot auf eine PVDF-Membran übertragen und mit einem PRMT1-spezifischen Antikörper gefärbt. Die Spiegel von β -TUBULIN dienen als Ladekontrolle.

(B) - (E) *qPCR*. RNA wurde in cDNA revers transkribiert und die Transkriptspiegel der angegebenen Gene in der qPCR unter Verwendung spezifischer Primer bestimmt. Die Spiegel in der unbehandelten Bedingung sind jeweils als 1 definiert. Kontrollen werden in hellblau dargestellt, Depletionen von PRMT1 in dunkelblau. siRNAs, die im Microarray verwendet wurden, sind zur direkten Sichtbarkeit in schwarz gehalten. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung des Mittelwerts an, der aus einem Messtriplikat errechnet wurde.

Abbildung 24 (D) und Abbildung 24 (E) führen hierzu zwei Beispiele in Form der Gene *GRASP* (im Array heraufreguliert) und *RGS2* (im Array herunterreguliert) auf. Die Genexpression von *GRASP* ist bei drei der *PRMT1*-Depletionen (siPRMT1_5, 6 und UTR1) klar induziert. Zwei weitere *Knockdown*-Bedingungen (siPRMT1_1 und UTR2) lassen eine leichte Heraufregulation erkennen. Lediglich bei zwei der sieben verwendeten *PRMT1*-spezifischen siRNAs ist kein Effekt erkennbar (siPRMT1_3 und 4). Da jedoch weniger als die Hälfte der Sequenzen ein eindeutiges Ergebnis zeigt, wurde das Gen zu diesem Zeitpunkt noch nicht als definitiv reguliert angesehen. Bei *RGS2* fällt das Urteil noch schwerer. Lediglich eine der *PRMT1*-siRNAs (siPRMT1_5) ist deutlicher nach unten reguliert als die Kontrollen.

Bei diesem uneinheitlichen Bild an Regulationen kann keine eindeutige Aussage getroffen werden. Daher wurden weitere Kontrollbedingungen benötigt. Für die Gruppe von Kandidatengenen, bei denen noch keine Aussage getroffen werden konnte, wurde ein weiteres Depletionsexperiment in Panc1-Zellen durchgeführt. Bei diesem wurden alle zur Verfügung stehenden Kontroll- und *PRMT1*-spezifischen siRNAs verwendet.

Abbildung 25 zeigt erneut exemplarisch die Ergebnisse dieses Versuches. Die Depletion von *PRMT1* wurde hier in Abbildung 25 (A) auf Transkriptebene nachgewiesen. Alle spezifischen siRNAs depletieren *PRMT1* zuverlässig, während die Schwankungen in den Kontroll-Transfektionen minimal sind. In Abbildung 25 (B) sind die Transkriptspiegel des Gens *GLIPR1* (*glioma pathogenesis-related 1*) dargestellt, welches im Microarray unter *Knockdown* von *PRMT1* schwächer exprimiert war. Wie an den Kontrollen erkennbar ist, scheint das Gen in seiner Transkriptionsrate sehr empfindlich auf die Transfektion mit siRNA zu reagieren, da sowohl sehr starke Herauf- als auch Herabregulationen zu verzeichnen sind.

In den *PRMT1-Knockdowns* jedoch sind in vier der sieben Bedingungen geringere Spiegel von *GLIPR1* nachweisbar (siPRMT_1, 4, 5 und UTR1). Eine Bedingung zeigt einen leichten Rückgang (siPRMT1_6), eine weitere ist gegenüber der unbehandelten Kontrolle nicht reguliert (siPRMT1_UTR2) und die siebte ist stark heraufreguliert (siPRMT1_3). Es scheint sich hier eine verringerte Expression des Kandidatengens im *PRMT1-Knockdown* abzuzeichnen, die von unspezifischen siRNA-Effekten in einzelnen Bedingungen überdeckt wird. In Abbildung 25 (C) ist mit *ANXA8* (*Annexin A8*) ein Beispiel für ein heraufreguliertes Gen abgebildet. Die Regulationen in den Einzelbedingungen der Kontrollen sind hier nicht ganz so stark, sodass sich eine gesteigerte Expression von *ANXA8* unter *PRMT1-Knockdown* einfacher erkennen lässt. Jedoch zeigen auch hier drei der sieben spezifischen siRNAs (siPRMT1_1, 3 und UTR2) nicht diesen Effekt.

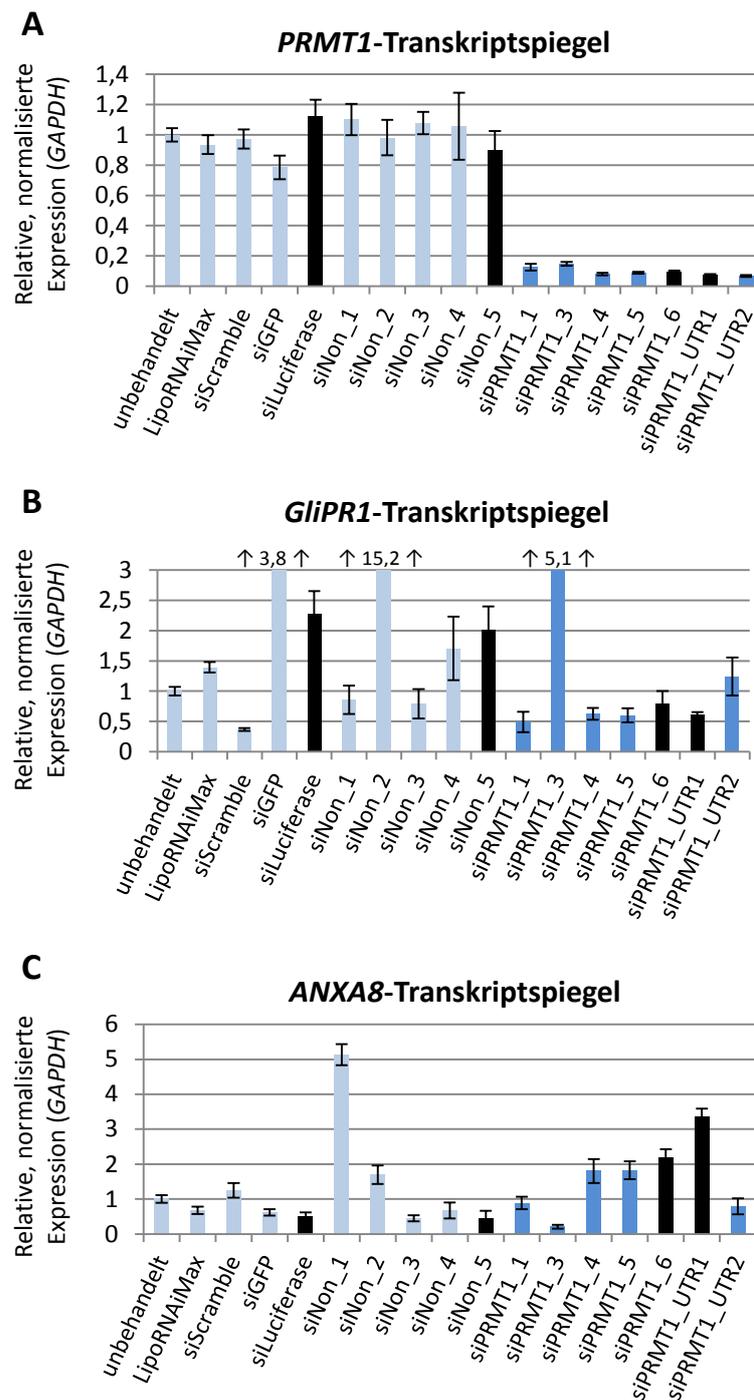


Abbildung 25: Validierung der Kandidatengene des Microarrays in weiteren Experimenten mit *Knockdown* von *PRMT1* in Panc1-Zellen (Teil 2)

Panc1-Zellen wurden mit den angegebenen siRNAs transfiziert (LipoRNAiMax). Drei Tage nach Transfektion wurden die Zellen geerntet. RNA wurde mit Hilfe eines Kits aufgereinigt.

(A) - (C) *qPCR*. RNA wurde in cDNA revers transkribiert und die Transkriptspiegel der angegebenen Gene in der *qPCR* unter Verwendung spezifischer Primer bestimmt. Die Spiegel in der unbehandelten Bedingung sind jeweils als 1 definiert. Kontrollen werden in hellblau dargestellt, *Knockdowns* von *PRMT1* in dunkelblau. siRNAs, die im Microarray verwendet wurden, sind zur direkten Sichtbarkeit in schwarz gehalten. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung des Mittelwerts an, der aus einem Messtriplikat errechnet wurde.

An diesem Punkt mussten weitere acht Gene als unspezifisch reguliert klassifiziert werden. Hierbei wurden Gene, die in Tabelle 3 (unklare Daten im Microarray) aufgeführt sind, nicht von der Kandidatengengliste gestrichen. Die Gründe werden im Kapitel Diskussion besprochen. Kandidatengene, die wie *GLIPR1* und *ANXA8* im *PRMT1-Knockdown* vielversprechende Regulationen zeigten, wurden abschließend einer Validierung in einem MEF-Zellmodell unterzogen.

4.7.3 VALIDIERUNG DER ARRAY-ERGEBNISSE MITTELS *PRMT1-KNOCKOUT* IN MEF-ZELLEN

Wie in Abbildung 24 und Abbildung 25 ersichtlich wurde, stellt die Reaktion von Zellen auf Transfektionen mit siRNA in Form von Änderungen der Genexpression ein offensichtlich generelles Problem dar. Dies erschwert die Beurteilung der Spezifität von Effekten erheblich. Um die verbliebenen, potenziell spezifisch regulierten Kandidatengene des Microarrays mit Hilfe einer von siRNA unabhängigen Methode zu überprüfen, wurden für weitere Experimente murine embryonale Fibroblasten (MEF-Zellen) verwendet. Diese tragen eine heterozygote Deletion des *Prmt1*-Gens, wobei die verbleibende Kopie von *loxP*-Bindestellen flankiert wird. Diese werden vom Enzym Cre-Rekombinase erkannt und die zwischen ihnen liegende Sequenz durch Ausschneiden aus der DNA entfernt. Die Zellen exprimieren die Rekombinase konstitutiv in einer inaktiven Form, die im Zytoplasma vorliegt. Erst nach Zugabe von 4-OHT (4-Hydroxytamoxifen) findet eine Aktivierung und Relokalisation der Cre-Rekombinase in den Zellkern statt, was zu einem konditionellen, induzierbaren *Knockout* von *Prmt1* führt [45,326]. Für die Durchführung des Experiments wurden MEF-Zellen mit 4-OHT oder dem Lösungsmittel (100 % Ethanol) behandelt. Nach zwei, drei, vier und sieben Tagen wurden jeweils beide Bedingungen geerntet und der *Knockout* von *Prmt1* auf Transkript- sowie Proteinebene überprüft. Abbildung 26 (A) zeigt die Ergebnisse der qPCR. Bereits nach zwei Tagen ist eine Verringerung der Transkriptmengen von *Prmt1* sichtbar, die nahe der Detektionsgrenze liegt. In Abbildung 26 (B) wurden die Proteinmengen in der Immunfärbung untersucht. An allen Tagen ist eine klare Verminderung der Mengen des *Prmt1*-Proteins ersichtlich. Am siebten Tag sind keine Restspuren mehr zu erkennen. Bei der Darstellung der Transkriptmengen von *Prmt1* in Abbildung 26 (A) und auch für alle weiteren qPCR-Ergebnisse von MEF-Zellen wurden die Expressionsspiegel an den einzelnen Tagen bei den unbehandelten Zellen als 1 definiert. Somit werden zwar Schwankungen in der Expression der Gene bei fortschreitender Inkubation im unbehandelten Zustand unbeachtet gelassen. Jedoch sollen die Änderungen durch *Knockout* von *Prmt1* betrachtet werden, weshalb diese übersichtlichere Darstellungsart gewählt wurde.

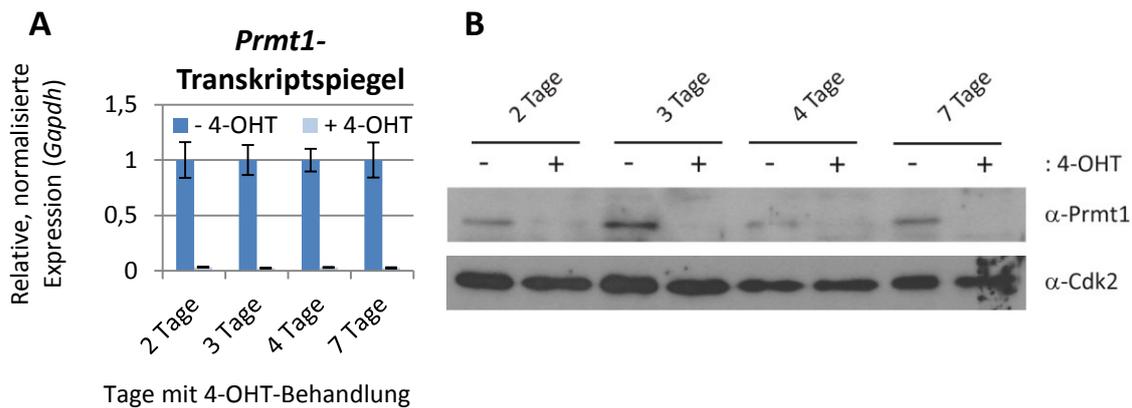


Abbildung 26: Induktion eines konditionellen *Prmt1*-Knockouts in MEF-Zellen

MEF-Zellen wurden direkt bei der Ausplattierung an Tag 0 mit 4-OHT („+4-OHT“) behandelt oder erhielten Lösungsmittel (100 % Ethanol, „-4-OHT“). Die Zellen wurden ohne weitere Passage weiter inkubiert. Verschiedene Zellkulturschalen wurden an Tag 2, 3, 4 und 7 geerntet und aus jeder Schale wurde Protein-Gesamtzellextrakt (IPH-Lyse) und RNA (Kit) gewonnen.

(A) *qPCR*. Nach Umschrieb präparierter RNA in cDNA wurde der Nachweis von *Prmt1* mit Hilfe spezifischer Primer erbracht. Alle nicht mit 4-OHT behandelten Bedingungen an den verschiedenen Tagen sind als 1 definiert. Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung des Mittelwerts in den Messtriplikaten.

(B) *Immunfärbung*. Gesamtzellextrakt wurde per SDS-PAGE aufgetrennt, mittels Western Blot auf eine PVDF-Membran übertragen und diese mit *Prmt1*-Antikörper oder mit *Cdk2*-Antikörper als Ladekontrolle gefärbt.

Die schnelle, vollständige Depletion von *Prmt1* im MEF-Zellmodell macht dieses zu einer guten Alternative, um Effekte eines Verlustes von *Prmt1* auf potenzielle Zielgene zu untersuchen. Durch Verwendung mehrerer Zeitpunkte bietet sich die Möglichkeit, Auswirkungen in zeitlicher Entwicklung darzustellen und gleichzeitig Replikate in einem Experiment zu erhalten. In Abbildung 27 sind beispielhaft vier Gene dargestellt, die der Validierung in MEF-Zellen unterzogen wurden. In Abbildung 27 (A) ist mit *Ifi44* ein Kandidatengen gezeigt, das zuvor bereits als off-target ausgeschlossen wurde. Es weist auch in diesem Modell keine Regulation durch die Depletion von *Prmt1* auf. Das Gen *Grasp* war zuvor nicht klar validierbar. In Abbildung 27 (B) zeigt es hier keinerlei Änderung der Expression beim *Prmt1*-Knockout. Zwei Gene, die in diesem Zellmodell erfolgreich validiert werden konnten, sind in Abbildung 27 (C) und (D) abgebildet. *Glipr1*, das im Microarray unter *Prmt1*-Knockdown schwächer exprimiert war, zeigt diese Reaktion auch hier. Interessanterweise wird das Ausmaß im zeitlichen Verlauf des Experiments verstärkt, was die Spezifität noch untermauert. *Anxa8* ist, wie auch im Microarray, unter Depletion von *Prmt1* verstärkt exprimiert. Der Effekt ist bis zu Tag drei sehr schwach, setzt an Tag vier sichtbar ein und ist an Tag sieben noch leicht verstärkt.

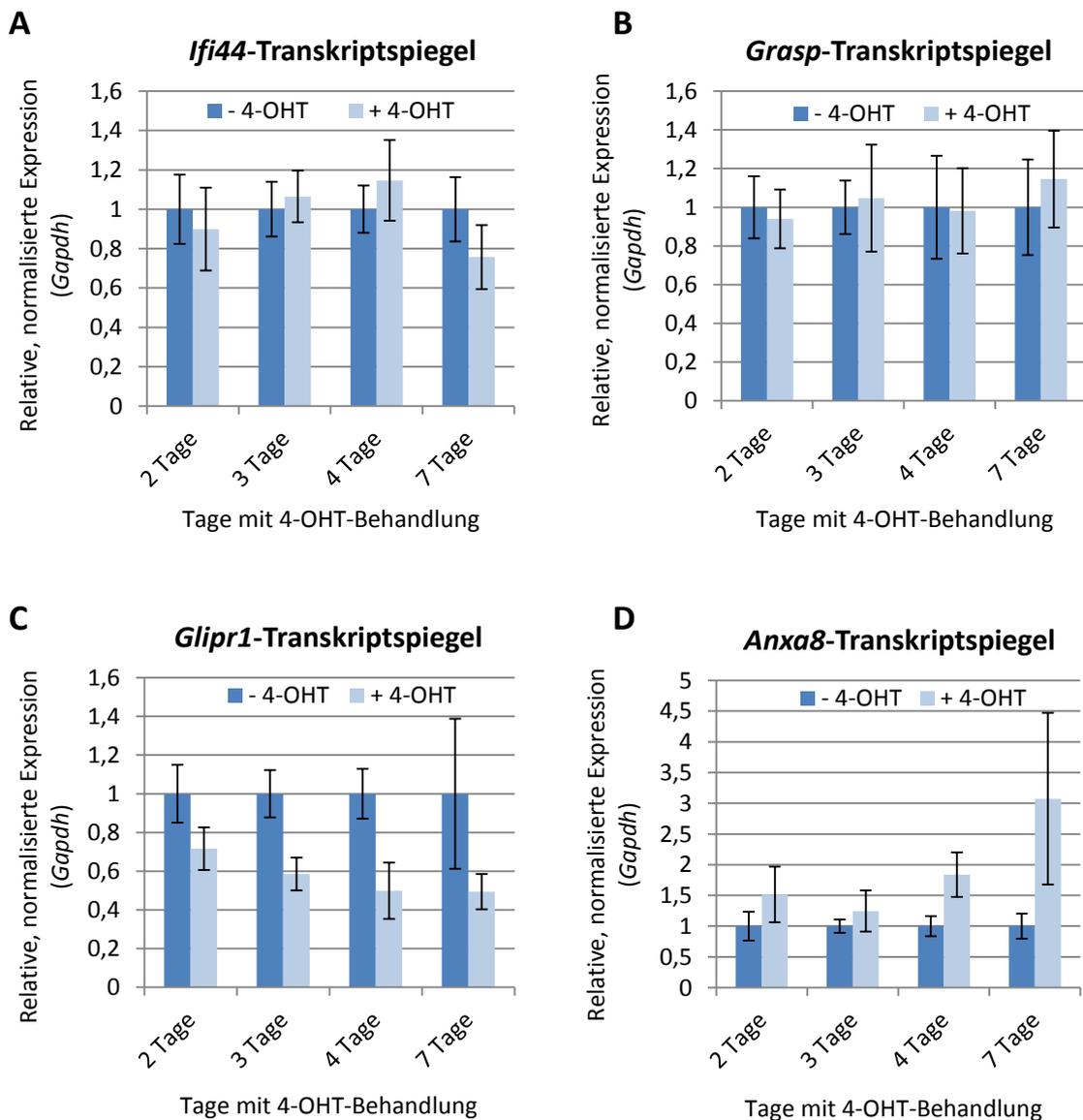


Abbildung 27: Validierung der Kandidatengene des Microarrays in MEF-Zellen mit *Prmt1*-Knockout

qPCR. RNA-Proben des Experiments, das in Abbildung 26 beschrieben wurde, wurden für Bestimmungen der Transkriptspiegel der angegebenen murinen Gene verwendet. An allen Tagen sind die Spiegel in den nicht 4-OHT-behandelten Bedingungen als 1 definiert. Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung des Mittelwerts in den Messtriplikaten.

4.8 ERGEBNISSE DER VALIDIERUNGSVERSUCHE DES MICROARRAYS

Wie bereits erklärt, konnten einige Kandidatengene durch Experimente in PDAC-Zellen nicht eindeutig validiert werden. Für diese Gene wurde eine weitere Validierung in MEF-Zellen mit konditionellem *Knockout* durchgeführt, wie in Abbildung 27 dargestellt. Tabelle 4 listet die

Gene auf, die erfolgreich validiert werden konnten oder die bis zum Abschluss dieser Arbeit nicht mit letzter Sicherheit validiert oder ausgeschlossen werden konnten.

Gen	Regulation im Microarray	Funktion des Proteins	Quellen	Validierung in den Knockdowns	Validierung im MEF-Knockout
<i>ANXA8</i>	herauf	<ul style="list-style-type: none"> • Anti-Koagulans • Repressor im EGF-Signalweg • Im Brustkrebs heraufreguliert und mit schlechter Prognose korreliert • Im Pankreaskrebs teilweise in Epithelzellen verstärkt exprimiert • In PDAC-Zellen positive Regulation der Migration. Rolle im Verhalten der Zellen bei Nährstoffmangel über Induktion von HIF1α 	[95,102, 113,114, 139,282]	Validiert	Validiert
<i>C10ORF10</i>	herauf	<ul style="list-style-type: none"> • Progesteron-Induziert • Reprimiert durch Insulin • Aktiviert ELK1-Transkriptionsfaktor • Induziert durch Hypoxie, abhängig von FOXO • Rolle in Angiogenese diskutiert • Gewebsspezifische Expression, u. A. in Inselzellen des Pankreas 	[44,50, 158,244, 272,308]	Mögliches Target	Ausstehend
<i>CFB</i>	herauf	<ul style="list-style-type: none"> • Interferon-induzierbar • Faktor des Komplementsystems 	[18]	Ausstehend	Ausstehend
<i>GLIPR1</i>	herunter	<ul style="list-style-type: none"> • p53-Zielgen • Tumorsuppressor in mehreren Krebsarten, induziert die Bildung von ROS und führt so zu Apoptose • Induziert Degradation von c-MYC • Herunterreguliert in Prostatakrebs und AML • Heraufreguliert in Wilms-Tumoren • Wichtig für die Proliferation, Invasivität und Migration von Gliomazellen 	[53,168, 169,248, 258,314, 331]	Validiert	Validiert
<i>GPRIN2</i>	herauf	<ul style="list-style-type: none"> • Rolle in G-Protein-Signalgebung • Interagiert mit HOXA1 (im Yeast Two-Hybrid-System) 	[43,125, 161]	Mögliches Target	Ausstehend
<i>GRASP</i>	herauf	<ul style="list-style-type: none"> • Guanidin-Austauschfaktor • Reguliert Signalgebung durch ARF-GTPasen • Wichtig für Zellmotilität 	[151,167, 310]	Mögliches Target	Kein Target
<i>HLA-B</i>	herauf	<ul style="list-style-type: none"> • Interferon-induzierbar • Antigenpräsentation, Schlüsselrolle bei angeborener Immunität und Tumormunität • In Tumoren häufig herunterreguliert 	[6,92,94, 191,241]	Mögliches Target	Ausstehend

<i>MF12</i>	herauf	<ul style="list-style-type: none"> • Wichtig für Invasivität und Metastasierung von Melanomen • Chemotaxisfaktor für Endothelzellen • Fördert Angiogenese • Induziert durch VEGF • Pro-proliferativ 	[25,72, 197,256, 259,284]	Mögliches Target	Ausstehend
<i>SSC5D</i>	herauf	<ul style="list-style-type: none"> • Glykoprotein, mutmaßliche Funktion in angeborener Immunantwort • Maus-Homolog wird Pankreas-Azinus-Zellen exprimiert 	[98,201]	Mögliches Target	Kein Target

Tabelle 4: Aufstellung und Funktionsdetails der Kandidatengene des Microarrays, die erfolgreich validiert werden konnten oder zu denen keine abschließende Aussage getroffen werden konnte

Die Gene *GPRIN2*, *GRASP* und *MF12* wurden aufgrund der unklaren Datenlage im Microarray bereits in Tabelle 3 aufgeführt. *CFB* konnte aufgrund von technischen Problemen bei der qPCR bisher nicht bearbeitet werden.

Abschließend kann festgehalten werden, dass von den 51 potenziell regulierten Genen des Microarrays bisher zwei Gene (*ANXA8* und *GLIPR1*) erfolgreich validiert werden konnten. Sieben weitere Gene (Tabelle 4) sind wahrscheinlich von PRMT1 reguliert, konnten aber nicht mit letzter Sicherheit validiert werden. Zwölf Gene bedürfen bei zukünftigen Experimenten einer genaueren Betrachtung aufgrund von unklaren Daten im Microarray (Tabelle 3). Bei den übrigen 30 Kandidatengenen handelt es sich um *off-targets*.

4.9 GLIPR1 IST FÜR DIE PROLIFERATIONSFÄHIGKEIT VON PANC1-ZELLEN NICHT ESSENZIELL

In Abschnitt 4.2 wurde gezeigt, dass PRMT1 eine bedeutende Rolle in der Proliferationsfähigkeit von Tumorzellen spielt. Es stellt sich die Frage, durch welche Funktionen in der Zelle diese Rolle ausgeführt wird. Die Kandidatengene des Microarrays sind prinzipiell denkbare Mediatoren. Zudem ist für einzelne Gene und deren Genprodukt in der Literatur bereits eine Funktion in der Proliferation beschrieben worden. Für GLIPR1 beispielsweise ist in Gliomen eine pro-proliferative Wirkung einer ektopischen Expression des Proteins nachgewiesen worden [258]. Um der Frage nachzugehen, ob der pro-proliferative Effekt von PRMT1 über GLIPR1 vermittelt sein könnte, wurde in Abbildung 28 ein *Knockdown* von *GLIPR1* mittels siRNA durchgeführt und die Fähigkeit der Zellen zur Proliferation in Wachstumskurven bestimmt. Da wie bereits zuvor erwähnt bei Transfektionen mit siRNA eine Hemmung der proliferativen Kapazität von Zelllinien zu beobachten ist, werden in Abbildung 28 (A) und Abbildung 28 (B)

zwei biologisch unabhängige Experimente dargestellt. Hierdurch soll geklärt werden, ob Effekte spezifisch durch den *Knockdown* von *GLIPR1* zustande kommen oder in der siRNA-Transfektion als solche begründet liegen. In beiden Fällen wurden siRNA-Negativkontrollen und *PRMT1*-spezifische siRNAs als Positivkontrollen für eine Inhibition der Proliferation mitgeführt. In Abbildung 28 (A) zeigt sich, dass die vier verschiedenen *Knockdowns* von *GLIPR1* eine Wirkung auf das Zellwachstum ausüben, die einer großen Streuung unterliegt. Diese liegt sowohl oberhalb als auch unterhalb der Effektstärke, die die Kontrollen zeigen, jedoch immer deutlich entfernt von der Positivkontrolle (siPRMT1). Im zweiten Experiment in Abbildung 28 (B) zeichnet sich ein ähnliches Bild ab. Auch hier liegen die Effekte der *GLIPR1-Knockdowns* zwischen den beiden verwendeten Kontrollen. Der negative Effekt von siNon_4 ist hier zudem besonders ausgeprägt, reicht allerdings nicht an die Ausmaße der Positivkontrolle heran. Abschließend kann keine klare Inhibition der Proliferation durch den *Knockdown* von *GLIPR1* festgestellt werden. In Abbildung 28 (C) ist der *Knockdown* für *GLIPR1* auf Transkriptebene abgebildet. Alle siRNA-Sequenzen führen zu einem deutlichen Rückgang der Spiegel, auch wenn siGLIPR1_4 erst nach neun Tagen die volle Depletion zeigte. Interessanterweise bestätigte sich hier wiederum, dass *GLIPR1* durch *PRMT1-Knockdown* eine Verringerung der Expression erfährt, die sich im Verlauf des Experiments noch erheblich verstärkt. Dieser Effekt wurde im zweiten Experiment in gleicher Weise beobachtet (nicht gezeigt). Eine Überprüfung der Proteinspiegel von GLIPR1 war aus Ermangelung eines qualitativ hochwertigen Antikörpers nicht möglich. Der erfolgreiche *Knockdown* von *PRMT1* wurde auf Transkriptebene nachgewiesen (nicht gezeigt).

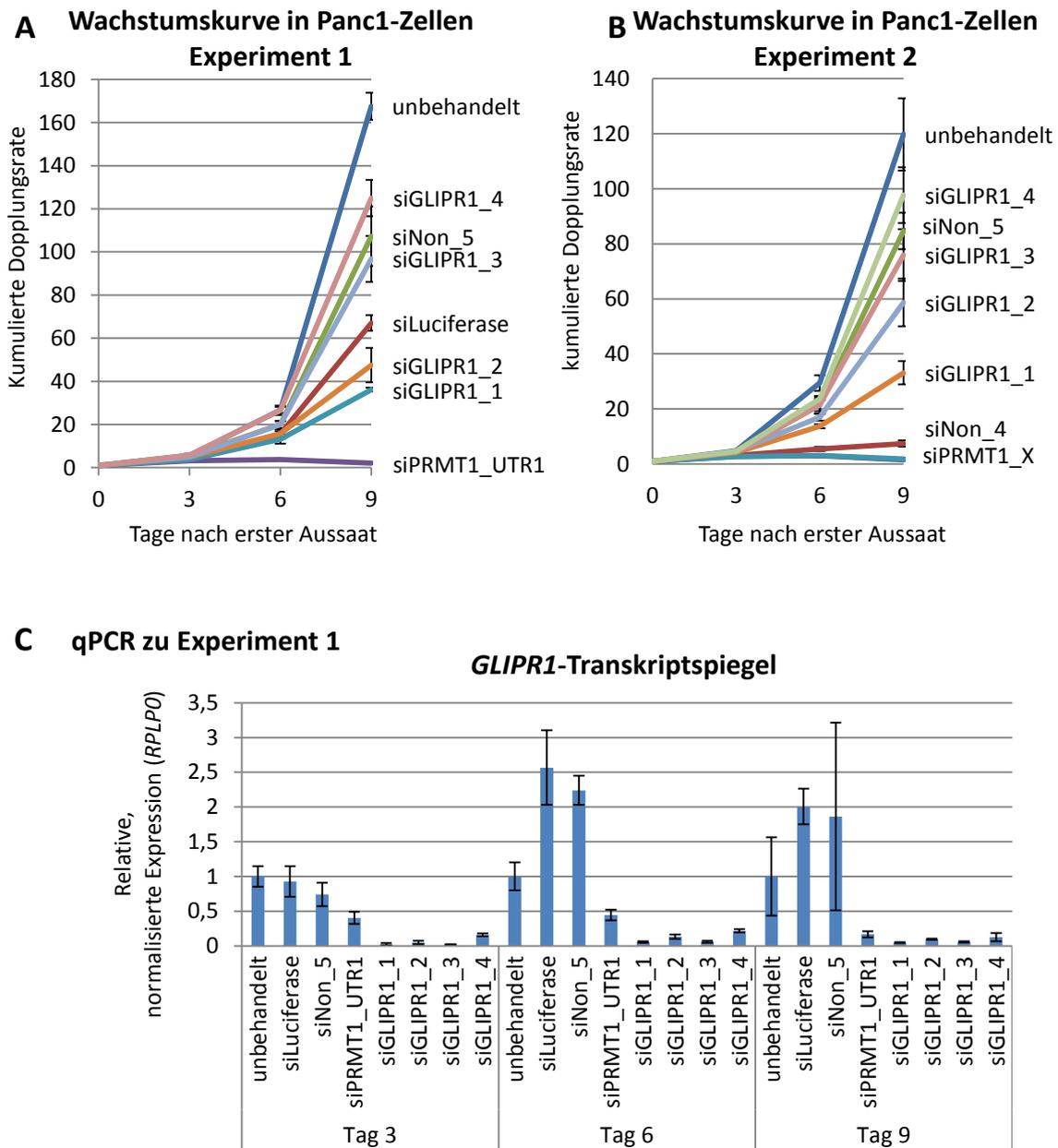


Abbildung 28: Wachstumskurven von Panc1-Zellen im *GLIPR1*-Knockdown

Panc1-Zellen wurden an den Tagen 0, 3 und 6 nach dem jeweiligen Ausplattieren von $1,5 \times 10^5$ Zellen zu allen drei Zeitpunkten Transfektion mit den angegebenen siRNAs (LipoRNAiMax) unterzogen. An Tag 3, 6 und 9 fanden Zählungen der Zellzahlen statt. Das Vorgehen ist analog zur Beschreibung in Abbildung 8.

(A) und (B) *Wachstumskurve*. Dargestellt sind die kumulierten Dopplungsraten, die durch Multiplikation der ermittelten Werte an Tag 3, 6 und 9 errechnet wurden. Fehlerbalken geben die Standardabweichung des Mittelwerts an, der sich aus der Auszählung dreier unabhängiger *Wells* ergab. Die Berechnung erfolgte ohne Fehlerfortpflanzung.

(C) *qPCR*. Die Abbildung zeigt die Kontrolle des *Knockdowns* von *GLIPR1* zu den Ergebnissen in (A). Zu allen Zählzeitpunkten wurde RNA aus Zellen gewonnen, die nach Aussaat zur Verfügung blieben. Nach reverser Transkription erfolgte die Detektion der Transkriptspiegel von *GLIPR1* mit Hilfe spezifischer Primer.

4.10 REKRUTIERUNG VON PRMT1 AN GENBEREICHE VON *GLIPR1*

Es ist bekannt, dass PRMT1 zur Regulation bzw. Co-Regulation der Genexpression an Bereiche von Zielgenen rekrutiert sein kann [152]. Daher wurde der Möglichkeit einer Rekrutierung von PRMT1 an das *GLIPR1*-Gen nachgegangen.

Um die Spezifität der eingesetzten PRMT1-Antikörper beurteilen zu können, wurde im Experiment ein *Knockdown* von *PRMT1* mit Hilfe von siRNA durchgeführt. Bei vorliegender Spezifität der Antikörper sollte im *Knockdown* aufgrund der Depletion des Proteins ein Verlust der Rekrutierung resultieren. Abbildung 29 zeigt die Ergebnisse der qPCRs aus dem erhaltenen Chromatin nach Immunpräzipitation mit Antikörpern die gegen das PRMT1-Protein gerichtet sind (ChIP). Die Verwendung von Antikörpern gegen Histon H3 dient als Positivkontrolle, da dieses sehr stark mit DNA assoziiert ist. Als Negativkontrolle wurde zusätzlich mit speziesspezifischem Kontroll-Antikörper („IgG“) immunpräzipitiert. Aufgrund fehlender Spezifität sollte in dieser Bedingung keine oder eine geringe Anreicherung von DNA-Bereichen stattfinden. Da es sich bei *GLIPR1* um ein p53-induzierbares Gen handelt [248], wurde zudem eine IP mit Antikörper gegen p53 eingeschlossen, um eine eventuell geänderte Anlagerung dieses Transkriptionsfaktors an Genbereiche von *GLIPR1* in Abhängigkeit von den PRMT1-Spiegeln untersuchen zu können. Abbildung 29 (A) belegt die erfolgreiche Depletion von *PRMT1* auf Transkriptebene. In Abbildung 29 (B) wird ersichtlich, dass auch in diesem Experiment ein Rückgang der *GLIPR1*-Transkriptspiegel unter *Knockdown* von *PRMT1* zu verzeichnen ist. Abbildung 29 (C) zeigt die Ergebnisse der qPCR mit Primern, die einen Bereich des Gens amplifizieren, der zwei Kilobasen stromaufwärts der Transkriptionsstartstelle (TSS) liegt (Enhancerbereich). Unter Verwendung des ersten PRMT1-Antikörpers (Millipore) ist in diesem Bereich eine klare Rekrutierung in der unbehandelten und der kontrolltransfizierten Bedingung vorhanden. Diese reduziert sich durch den *Knockdown* von *PRMT1* annähernd auf die Hintergrundspiegel, die in der IP mit allgemeinen IgG-Antikörpern vorliegen. Im Falle des zweiten PRMT1-spezifischen Antikörpers (Abcam) ist zwar die Rekrutierung insgesamt geringer, jedoch ist auch hier eine Depletion von PRMT1 auf Chromatinebene zu erkennen. p53 zeigt keine klare Beeinflussung seiner Rekrutierung durch geänderte Mengen an PRMT1. Das Ausmaß an assoziiertem Histon H3 ist unbeeinflusst von einer Depletion von PRMT1. Für einen Bereich innerhalb des Promotors von *GLIPR1* (1 kb stromaufwärts der TSS) waren in einer weiteren qPCR ähnliche Rekrutierungen vorhanden (nicht gezeigt).

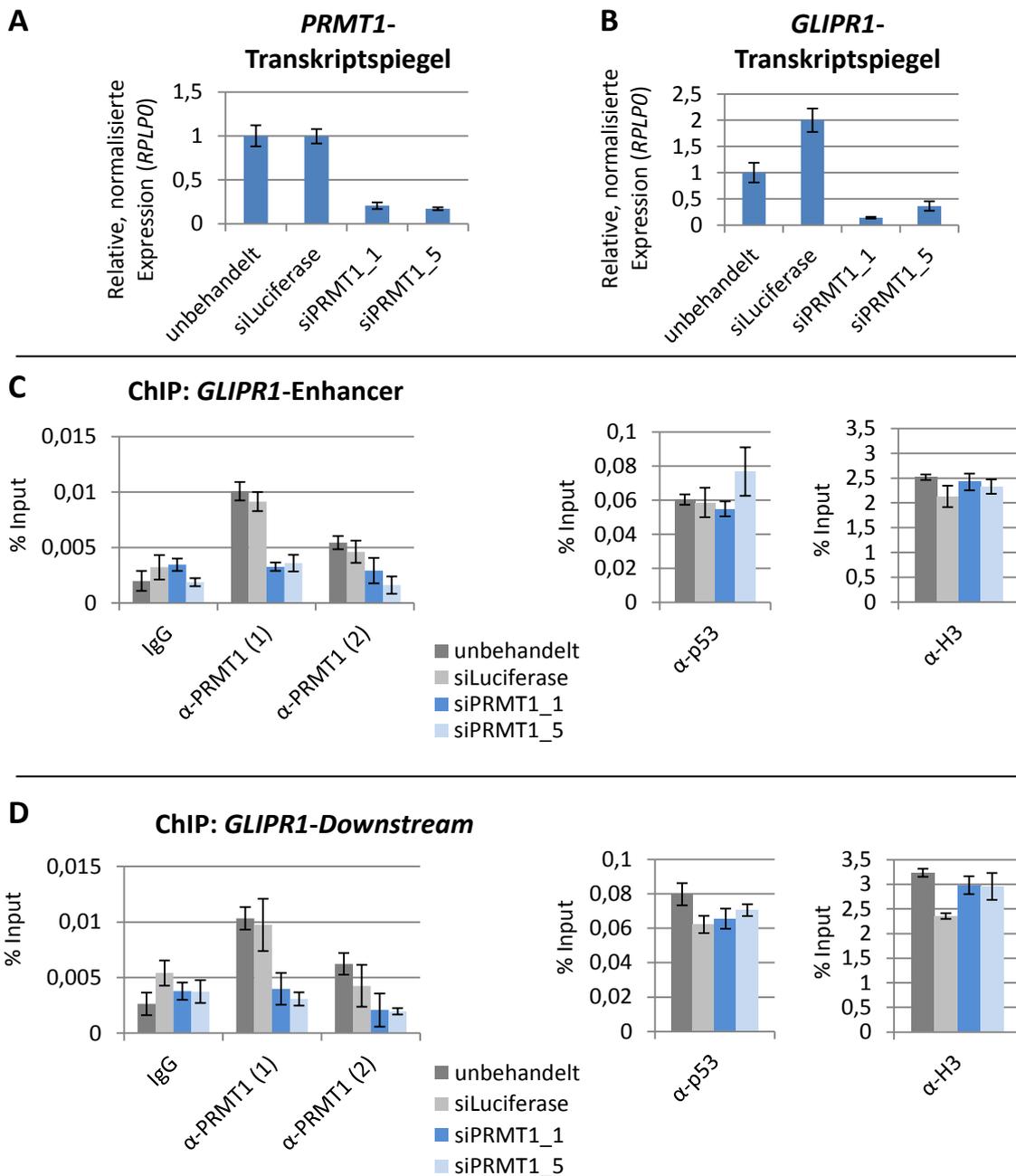


Abbildung 29: PRMT1-ChIP in Panc1-Zellen unter PRMT1-Knockdown

Panc1-Zellen wurden mit den angegebenen siRNAs transfiziert (LipoRNAiMax) und nach sechs Tagen Inkubation für die Präparation von RNA (Kit) und für Chromatinextrakt geerntet.

(A) – (B) *qPCR*. Nach reverser Transkription erfolgte die Bestimmung der Transkriptspiegel von *PRMT1* und *GLIPR1* mit Hilfe spezifischer Primer.

(C) *qPCR nach ChIP*. Die Menge an DNA, die nach der Immunpräzipitation mit den angegebenen Antikörpern aufkonzentriert worden war, wurde in der *qPCR* mit Hilfe von Primern bestimmt, die spezifisch einen bestimmten Genbereich detektieren („Enhancer“: 2 kb stromaufwärts der TSS, „Downstream“: 22 kb stromabwärts der TSS).

Die Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung des Mittelwerts eines Messtriplikats.

Durch die bisher beschriebenen Kontrollen lässt sich nicht ausschließen, dass die ermittelten Rekrutierungen von Proteinen artifiziell zustande kommen. Bei der verwendeten Quervernetzung durch Formaldehyd ist prinzipiell denkbar, dass in der Zelle auch Moleküle vernetzt werden, die in nativer Form keine Assoziation miteinander eingehen. Daraus würde eine Rekrutierung in der ChIP-qPCR resultieren, die zwar durch Depletion des Proteins vermindert ist, aber dennoch keine spezifische Assoziation anzeigt.

Eine bewährte Methode, um unspezifische Effekte auszuschließen, stellt bei dieser Fragestellung die Untersuchung von Kontrollregionen dar. DNA-Bereiche, die weit stromaufwärts (5', *upstream*) oder stromabwärts (3', *downstream*) der Transkriptionsstartstelle gelegen sind, werden im Allgemeinen dazu verwendet, eine geringere Assoziation von Faktoren zu belegen. Auch Gene die keine bekannte Regulation durch den untersuchten Faktor aufweisen, können als Kontrollregionen verwendet werden.

Die Ermittlung der Rekrutierungen von PRMT1, p53 und H3 an einer Kontrollregion des *GLIPR1*-Gens selbst ist in Abbildung 29 (D) dargestellt. Die untersuchte Region liegt 22 Kilobasen stromabwärts der TSS bzw. 237 Basenpaare stromabwärts der Polyadenylierungsstelle. Das Bild der Rekrutierungen aller verwendeten Antikörper gleicht den Ergebnissen, die für die Enhancerregion ermittelt wurden. Da nicht auszuschließen ist, dass auch stromabwärts der TSS regulatorische Bereiche vorliegen, wurden weitere qPCRs durchgeführt (nicht gezeigt). Alle untersuchten Bereiche, auch solche anderer Gene, waren in vergleichbarem Maß mit PRMT1 und auch mit p53 assoziiert. Bei einzelnen Bereichen, beispielweise stromabwärts des Kontrollgenes *CITED2*, war eine Verringerung der Assoziation festzustellen. Jedoch muss in diesen Fällen davon ausgegangen werden, dass dies auf größeren Abweichungen der Primereffizienzen und damit einen systematischen Fehler bei Durchführung der qPCR zurückgeführt ist. Begründet ist diese Annahme in einer starken Abweichung der H3-Rekrutierung und des Hintergrundes bei der IgG-IP, für die keine andere Erklärung als eine abweichende Primereffizienz gegeben werden kann.

Zusammenfassend konnten die ermittelten Rekrutierungen mit der angewandten Methodik nicht verifiziert werden, obwohl die Spezifität der verwendeten Antikörper gegen PRMT1 bei der Durchführung der ChIP als gesichert angesehen werden kann, da sich die Depletion des Proteins (Abbildung 29 (A)) auf Ebene des Chromatins widerspiegelt (Abbildung 29 (B)). Das abgebildete Ergebnis, bei dem PRMT1 unter PRMT1-Depletion nicht mehr an Chromatinbereiche rekrutiert ist, wurde nach Etablierung des *Knockdown*-Protokolls einmalig durchgeführt. Die Rekrutierung von PRMT1 (ohne Depletion des Proteins) war zuvor in

mehreren Versuchen an *GLIPR1*-Genbereichen vorhanden. Allerdings erwies sich PRMT1 auch hier stets an allen Kontrollregionen als gleich stark rekrutiert.

5 DISKUSSION

5.1 DIE ÜBEREXPRESSION VON PRMT1 IN ZELLEN DES PDAC

PRMT1 ist in verschiedenen humanen Tumoren verstärkt exprimiert [323]. Auch wenn eine Funktion dieser Überexpressionen nicht immer geklärt ist, so ist beim Brustkrebs bekannt, dass die erhöhten PRMT1-Spiegel eine tumorrelevante Funktion haben. In diesem Fall ist eine Methylierung des zytoplasmatischen Östrogenrezeptors durch PRMT1 notwendig, damit dieser einen aktivierenden Komplex mit weiteren Proteinen bilden kann, um seine proliferationsfördernden Wirkungen über den AKT-Signalweg auszuüben [257]. Für das Verständnis der Ursachen und Konsequenzen einer Überexpression von PRMT1 im PDAC und in anderen Tumoren sowie für eine eventuelle Nutzung dieses Wissens für therapeutische Zwecke ist es essenziell, die mechanistischen Grundlagen und die Auswirkungen auf das Verhalten von Tumorzellen auch im PDAC zu kennen. Die erste Fragestellung hierzu war, ob PRMT1 auf Protein-Ebene im PDAC gegenüber gesundem Gewebe verstärkt exprimiert wird. In den durchgeführten Immunfärbungen konnte bestätigt werden, dass dies der Fall ist (nicht gezeigte Färbungen in Mitarbeit von Anna Lena Merkel). Diese Erkenntnis auf Protein-Ebene steht im Einklang mit zuvor publizierten Ergebnissen, die diese Verstärkung auf Ebene der mRNA gezeigt hatten [323].

In Mausmodellen, die infolge von mutiertem *Kras* Neoplasien des Pankreas entwickeln, war eine Expression von Prmt1 bereits in Epithelzellen der PanINs nachweisbar (Bachelorarbeit Anna Lena Merkel), was darauf hindeutet, dass das Enzym bereits im frühen Stadium der Entartung eine Rolle spielen könnte. Auch in humanen Gewebeschnitten waren bereits in PanINs hohe PRMT1-Spiegel färbbar. Das frühe Auftreten veränderter PRMT1-Spiegel lässt mutmaßen, dass diese Veränderung nicht erst im Zuge massiver Genomveränderungen des fortgeschrittenen Tumors zufällig als Nebeneffekt erfolgt, sondern durch einen Selektionsdruck aufgrund der zellulären Funktionen von PRMT1 getrieben ist, der dem entwickelnden Tumor einen Entwicklungsvorteil verschafft. Durch die Färbung einer Lymphknotenmetastase (Abbildung 5) wurde klar, dass die starke Expression von PRMT1 auch in sehr späten Stadien des PDAC erhalten bleibt. Es ist nicht abwegig anzunehmen, dass das Enzym aufgrund seiner zahlreichen zellulären Funktionen zu verschiedenen Zeitpunkten der Tumorentwicklung auch verschiedene Aufgaben, beispielsweise bei der Proliferation und bei der EMT oder MET (mesenchymale-epitheliale Transition) erfüllen könnte.

5.2 EINFLÜSSE VON PRMT1 AUF DIE PROLIFERATION VON ZELLEN

Vor der Klärung der molekularbiologischen Auswirkungen einer verstärkten Expression von PRMT1 war es von Interesse zu überprüfen, ob tatsächlich eine essenzielle Rolle des Proteins auf das Verhalten der PDAC-Zellen vorliegt.

Die Proliferationsfähigkeit aller untersuchten Zelllinien (Panc1, MiaPaCa2 und HeLa) war durch eine Depletion von PRMT1 stark vermindert (Abbildung 8 und Abbildung 9). Dies untermauert die Annahme, dass die Überexpression keine zufällige Begleiterscheinung der Akkumulation von DNA-Schäden ist, sondern eine funktionell wichtige Änderung im Expressionsprofil der Zelle darstellt. Zusätzlich wird aber auch klar, dass es kein für PDAC-Zellen spezifischer Effekt ist. Vielmehr scheint PRMT1 Funktionen auszuführen, von denen mehrere Arten von Tumorzellen einen Selektionsvorteil durch eine verstärkte Expression erlangen.

Die Kinetik des Rückgangs der Fähigkeit der Zellen zur Proliferation ist in den gezeigten Wachstumskurven ein wichtiges Indiz, welches bestätigt, dass der beobachtete Effekt tatsächlich auf die Depletion des PRMT1-Proteins zurückzuführen ist. Wie in Abbildung 18 dargestellt, bleiben in der siRNA-vermittelten Depletion in Panc1-Zellen bis Tag 3 nach der Transfektion die Proteinspiegel von PRMT1 in der Immunfärbung nachweisbar. Erst ab diesem Tag ist das Protein stark depletiert. Aus den Rohdaten zu Abbildung 8 lässt sich errechnen, dass zu diesem Zeitpunkt (Tag 3) die Proliferationsrate der Depletionsbedingungen noch über 50 % der Kontrollbedingungen beträgt. Erst zwischen Tag 3 und Tag 6 sinkt die Proliferation auf ca. 25 % der Kontrollen. Zwischen Tag 6 und Tag 9 beträgt die Wachstumsrate noch 10 bis 15 %. Aufgrund der Verwendung mehrerer Kontrollen und spezifischer siRNAs kann zusammenfassend davon ausgegangen werden, dass die Hemmung der Proliferationsfähigkeit tatsächlich auf das Fehlen von PRMT1 zurückzuführen ist.

Die in dieser Arbeit gezeigte Rolle von PRMT1 in der Proliferationsfähigkeit von Zellen steht in Einklang mit den Daten einer Veröffentlichung von Yu *et al.*, in der sich Prmt1 als essenziell für die Proliferation von MEF-Zellen herausgestellt hatte [326]. Dies war in Zellen mit einem konditionellen *Prmt1-Knockout* demonstriert worden, sodass diese Effekte nicht durch Einflüsse einer siRNA auf die Zellen erklärbar sind. In dieser Veröffentlichung wurde zudem gezeigt, dass der Verlust des Proteins Defekte in der DNA-Reparatur und genomische Instabilität hervorruft sowie einen Zellzyklus-Arrest der Zellen induziert, während es zudem für die Aktivierung der G2/M- und G1/S-Checkpoints nach Auslösung eines DNA-Schadens notwendig ist. Eine gesteigerte Apoptose konnte hierbei nicht festgestellt werden. Auch weisen Zellen unter Prmt1-Depletion eine höhere Rate an spontanen DNA-Schäden auf. Zumindest zum Teil erklärt wurde dies durch ein Ausbleiben der Rekrutierung des Rad51-Proteins an die Orte der

Schädigung. Unklar bleibt hierbei, ob die Hemmung der Proliferation ursächlich in der DNA-Schädigung begründet liegt oder ein unabhängiges durch den *Prmt1-Knockout* ausgelöstes Phänomen ist.

Im Zusammenhang mit der Signalgebung bei DNA-Schäden ist ebenfalls bekannt, dass PRMT1 das Protein MRE11 methyliert [29]. Dieses hat eine 3'-5'-Exonuklease-Aktivität, welche durch eine Mutation des methylierten Arginins behindert ist. 53BP1 ist ein weiteres Protein dieser Zellfunktion, das von PRMT1 posttranslational modifiziert wird [31]. Diese Modifikation ist notwendig zur Bindung von DNA. Zur Rekrutierung des Faktors an DNA-Schäden ist zudem eine intakte Tudor-Domäne notwendig, wobei sich die Rekrutierung in einer weiteren Studie als abhängig von einer Lysin-Methylierung an H3K79 erwiesen hatte [123]. Eine definitive Rolle von PRMT1 in der Rekrutierung des Proteins wurde nicht erwiesen, da hierfür unspezifische Methyltransferase-Inhibitoren verwendet wurden. Ein Einfluss von PRMT1 auf die Rekrutierung von 53BP1 an DNA-Schäden wurde in einer weiteren Studie durch Yu *et al.* widerlegt [326]. Die Diskrepanz ist eventuell durch eine Histon-Methylierung durch andere PRMTs erklärbar, die durch den verwendeten, allgemeinen Methyltransferase-Inhibitor verhindert wird, was beim spezifischen *Knockdown* jedoch nicht auftritt. Offensichtlich jedoch bleibt der Einfluss von PRMT1 auf die Signalgebung von DNA-Schäden und auf die Rate dieser Schäden. Auch ist PRMT1 essenziell für die Aufrechterhaltung der Telomerlängen. Ein Fehlen des Enzyms bzw. die Mutation des methylierten Arginins im Zielprotein TRF2, welches Telomere bindet, führt zur Instabilität der Telomere und der Auslösung der Seneszenz der Tumorzellen [202].

Die Tatsache, dass PRMT1 als positiver Regulator dieser DNA-Reparaturmechanismen im PDAC verstärkt exprimiert ist, steht augenscheinlich im Widerspruch zur Beobachtung, dass Tumorzellen Signalwege außer Kraft setzen, die DNA-Schäden detektieren und reparieren. Jedoch müssen auch Tumorzellen eine allzu starke Schädigung der DNA verhindern, um lebensfähig zu bleiben. Zudem spielt PRMT1 weitere Rollen in einer Vielzahl von zellulären Funktionen, sodass eine Überexpression des Proteins Folgen für mehrere dieser Funktionen hat. Einzelne Signalwege wie beispielsweise die DNA-Reparatur können durch weitere, unabhängige Deregulationen verändert sein. Daher kann PRMT1 unabhängig von der Rolle in der DNA-Schadensregulation die Proliferationsrate regulieren, was im Verlauf der Arbeiten an der Rolle von PRMT1 im PDAC weiter untersucht werden muss.

5.3 EINFLÜSSE VON PRMT1 AUF DAS ANKERUNABHÄNGIGE WACHSTUM

Beim Soft-Agar-Assay in Suit007-Zellen (Abbildung 6) zeichnete sich ein weniger einheitliches Bild ab als bei der Messung der Proliferation. Nicht alle *Knockdown*-Bedingungen von *PRMT1* bildeten weniger Kolonien als die Kontrollen. Hierfür sind verschiedene Erklärungen denkbar. Zwar scheint die Effizienz der Depletion von *PRMT1* zum Zeitpunkt der Aussaat in das Soft-Agar nicht im direkten Zusammenhang mit der Anzahl gebildeter Kolonien zu stehen (Vergleich der Proteinspiegel mit den gezählten Kolonien). Jedoch war es bei diesem Experiment nicht möglich, die Spiegel von *PRMT1* zum Ende der Inkubation, also zum Zeitpunkt der Zählung der Kolonien, zu bestimmen. Grund hierfür ist, dass bei dieser Methodik nur sehr wenige Zellen vorliegen und diese zudem in einer erhärteten Lösung eingebettet sind, von der sie nicht extrahiert werden können. Es ist daher nicht auszuschließen, dass verschiedene siRNAs zu unterschiedlich stabilen Depletionen führen. In einzelnen Bedingungen könnte im Verlauf des Experiments wieder genug *PRMT1* gebildet werden, um die Entstehung von Kolonien zu ermöglichen. Dieser Frage könnte in Zukunft durch die Verwendung stabiler *Knockdowns* oder *Knockouts* nachgegangen werden. Ebenfalls denkbar sind weitere Effekte der siRNAs auf die Spiegel anderer Proteine, die den spezifischen Effekt von *PRMT1* überdecken (*off target*-Effekte). Es wurde versucht, dieser Frage durch *Rescue*-Experimente nachzugehen, in denen die *PRMT1*-Spiegel nach siRNA-vermitteltem *Knockdown* durch ektoxische Expression wiederhergestellt wurden. Die Behandlung mit mehreren Transfektionsreagenzien führte bei diesem Experiment jedoch zu einer sehr starken Inhibition des Koloniewachstums aller Versuchsbedingungen. Dieses war daher aufgrund von offensichtlich zu großen Stressfaktoren für die Zellen nicht auswertbar.

Die Fähigkeit von Zellen, sich unabhängig von vorhandenen Ankerstrukturen zu teilen, ist abhängig von einem Überkommen der sogenannten Anoikis, einer Form der Apoptose (Reviews [52,105]). Die Auslösung der Anoikis wird gesteuert von einem Gleichgewicht an pro- und anti-apoptotischen Faktoren, wobei deren Aktivität und Expressionsspiegel wiederum abhängig ist vom Vorliegen von Stimuli wie Wachstumsfaktoren, aber auch von Kontaktstimuli der extrazellulären Matrix und von direkten Zell-Zell-Interaktionen. Viele Gene, die Funktionen im Ausbilden von Zell-Kontakten oder auch in der Apoptose oder der Invasion haben, sind im PDAC dereguliert [134]. Es ist durchaus denkbar, dass *PRMT1* wichtige Aufgaben in Zellfunktionen hat, die die Steuerung der Anoikis regulieren und dass entsprechend eine verstärkte Expression von *PRMT1* der Zelle dazu verhilft, trotz fehlender Ankerstrukturen zu überleben. Die Unabhängigkeit von diesen Strukturen bedeutet im zellulären Kontext beim Vorliegen weiterer Veränderungen auch eine Befähigung zur Metastasierung. In weiteren

Versuchen könnte in Zukunft untersucht werden, ob PRMT1 bei der Metastasierung eine Rolle spielt. Neben dem Tierversuch ist hier auch die Bestimmung der Invasivität von PDAC-Zellen interessant. Diese kann in der Matrigel-Methode untersucht werden. Die Fähigkeit von Zellen, in ein dreidimensionales (dickes) Matrigel einzuwandern, ist ein Zeichen für deren Invasivität und wäre zusammen mit der bereits bestimmten Fähigkeit zum ankerunabhängigen Wachstum ein Indiz für eine erworbene Fähigkeit der Zellen zur Metastasierung.

Einen Unsicherheitsfaktor für die Auswertung und Beurteilung des in dieser Arbeit durchgeführten Soft-Agar-Assays bildet die Tatsache, dass PRMT1 wie bereits diskutiert einen sehr deutlichen negativen Effekt auf die Proliferationsrate der untersuchten Panc1-Zellen hatte (Abbildung 8). Zudem ist es schwierig zu beurteilen, inwieweit die Depletion des Proteins nach Aussaat in das Agar stabil blieb. Es ist davon auszugehen, dass aufgrund der geringen Zellteilungsrate in diesem Assay die Stabilität der Depletion bis zum Ende der Inkubation gegeben war. Da die verwendete Agar/Medium-Mischung jedoch keine siRNA mehr enthielt, kann das nicht sicher geschlossen werden. Letztendlich kann bei der Beurteilung des negativen Effekts auf die Koloniebildung nicht klar zwischen einem Einfluss auf das ankerunabhängige Wachstum und einer Verminderung der Proliferationsfähigkeit unterschieden werden. Eine Verringerung der Proliferationsrate hat zwangsläufig eine Verringerung der Zahl an Kolonien, die den Schwellenwert der Koloniegröße überschreiten, zur Folge.

Als Interpretation muss festgehalten werden, dass eine Rolle von PRMT1 im ankerunabhängigen Wachstum möglich ist, aber dass dies im vorliegenden Fall aufgrund der Auswirkungen des Proteins auf die Zellteilungsrate mit Soft-Agar-Assays nicht schlüssig bewiesen werden kann.

5.4 ASSOZIATIONEN VON PRMT1 MIT DEM TRANSKRIPTIONSFAKTOR GLI1

Bei Vorarbeiten in der Gruppe (Diplomarbeit Patrick Schopohl) hatte sich gezeigt, dass der Transkriptionsfaktor GLI1 nach einer Depletion von PRMT1 auf Transkript- und auf Proteinebene verstärkt exprimiert wird. Dabei war überwiegend mit *Pools* der *PRMT1*-spezifischen sowie der Kontroll-siRNAs gearbeitet worden.

In der vorliegenden Arbeit konnte der Effekt des *PRMT1-Knockdowns* auf *GLI1* nicht bestätigt werden. Bei Verwendung individueller siRNAs stellte sich heraus, dass lediglich eine einzelne der verwendeten Sequenzen einen klaren Effekt auf die *GLI1*-Transkriptspiegel hatte (Abbildung 10). Dieser blieb in den eingesetzten *Pools* trotz geringem anteiligem Vorliegen der betreffenden Sequenz unerwartet stark erhalten. Bei den durchgeführten biologischen Replikaten dieses Experiments zeigte sich eine gewisse Variabilität in den Transkriptspiegeln

von *GLI1* in Abhängigkeit von der Expression von PRMT1. Jedoch wiesen niemals mehr als 50 % der eingesetzten *PRMT1*-siRNAs einen Effekt auf. In einem nicht abgebildeten Experiment konnten in MEF-Zellen nach Induktion eines *Prmt1-Knockouts* bezüglich der *Gli1*-Transkriptionsspiegel keine Veränderungen festgestellt werden. Abschließend kann daher nur festgehalten werden, dass PRMT1 unter den gewählten Bedingungen keinen Einfluss auf die *GLI1*-Transkriptspiegel hat.

Patrick Schopohl konnte zusätzlich eine Induktion der Proteinspiegel von GLI1 nach *PRMT1-Knockdown* erkennen. Der von ihm verwendete Antikörper stand herstellerbedingt für weitere Experimente nicht mehr in identischer Qualität zur Verfügung. Bei weiteren Immunfärbungen mit nachfolgenden Chargen des Antikörpers konnte in keinem Fall eine eindeutige Veränderung der GLI1-Spiegel nach PRMT1-Depletion festgestellt werden. Zudem resultierte eine Immunfärbung mit dem Antikörper im Auftreten mehrerer Banden im Bereich des Molekulargewichtes von GLI1, die jedoch im siRNA-vermittelten *Knockdown* von *GLI1* nicht vermindert waren, obwohl die mRNA-Spiegel stark depletiert waren (Immunfärbungen zu GLI1 sind nicht gezeigte Experimente). Eine Überexpression des Proteins wurde vom Antikörper zuverlässig erkannt. Jedoch zeigten sich keine Induktionen von GLI1 nach *Knockdown* von *PRMT1*, wobei die Interpretation aufgrund der erwähnten nicht gesicherten Bandenspezifität zusätzlich erschwert wurde. Abschließend muss der Einfluss von PRMT1 auf die GLI1-Proteinspiegel als vorläufig nicht validierbar angesehen werden.

In vivo konnte keine Interaktion von PRMT1 mit GLI1 nachgewiesen werden. Hierzu wurden Coimmunpräzipitationen sowohl in dieser Arbeit (Abbildung 14), als auch von Patrick Schopohl durchgeführt. Mit Hilfe von *in vitro*-Experimenten (*Pulldowns*) konnte ebenfalls keine Interaktion der beiden Proteine festgestellt werden (Abbildung 13). Aufgrund der Tendenz von GLI1, als bakteriell exprimiertes Protein zu aggregieren, waren die *Pulldowns* erschwert. Jedoch konnte gezeigt werden, dass keine starke Interaktion mit PRMT1 vorliegt, während die publizierte Interaktion von GLI1 mit SUFU sehr deutlich nachweisbar war.

Der Möglichkeit einer Proteininteraktion war nachgegangen worden, weil bei den Vorarbeiten aufgefallen war, dass GLI1 bei ektopischer Expression in einigen Experimenten verminderte Überexpressions-Spiegel aufwies, wenn zeitgleich *PRMT1* überexprimiert wurde. Erklärbar wäre dies beispielsweise durch eine Methylierung von GLI1 durch PRMT1, was Einfluss auf die Stabilität des Transkriptionsfaktors haben könnte. Ähnliche Mechanismen wurden für den Koaktivator nukleärer Rezeptoren (SRC-3) nach Methylierung durch PRMT4 gezeigt [216]. Im Falle einer stattfindenden Methylierung wäre es unter Umständen möglich gewesen, eine Interaktion der beiden Proteine zu zeigen, insofern diese nicht zu transient ist.

Die Untersuchung einer möglichen Methylierung von GLI1 durch PRMT1 ergab, dass GST-getagtes PRMT1 in Kombination mit GST-GLI1 zu mehreren Methylierungsbanden in der Fluorographie führte (Abbildung 15). Diese hatten jedoch Molekulargewichte, die nicht denen der Immunfärbung von GLI1 entsprachen. Die denkbaren Gründe hierfür sind vielfältig. Möglicherweise wird nicht das Protein in voller Länge, sondern ein Spaltprodukt bevorzugt methyliert, das jedoch in der Immunfärbung nicht detektiert werden kann. Hierbei könnte es sich auch um eine verkürzte Form aufgrund der Abspaltung des GST-Tags handeln. Außerdem könnte die Methylierung ein weiteres Protein anzeigen, das mit GST-GLI1 aufgereinigt wird. Für die Detektion eines weiteren Proteins spricht die Tatsache, dass auch die Kontrollbedingung mit GST-Tag allein eine Bande auf ähnlicher Höhe zeigte. Es konnte nicht klar geschlossen werden, dass GLI1 von PRMT1 methyliert wird. Sollte dieser Frage in Zukunft weiter nachgegangen werden, müsste dies mit anderen Methoden, beispielsweise einer Massenspektrometrie, weiter untersucht werden.

In weiteren Vorarbeiten war mit Hilfe von Reporter-Gen-Expression auch untersucht worden, ob die GLI1-getriebene Genexpression durch PRMT1 beeinflusst ist. Die in dieser Arbeit durchgeführten Experimente hierzu lieferten unklare Ergebnisse. Es zeigte sich, dass die zuvor verwendete Normalisierung auf die Aktivität der β -Galaktosidase im gegebenen Fall nicht geeignet ist, da diese selbst durch die Expression von PRMT1 beeinflusst ist (Abbildung 11). Bei einer geeigneten Normalisierung (Gesamt-Proteinkonzentration) konnten lediglich in einzelnen Versuchsbedingungen Effekte der PRMT1-Expression auf die GLI1-Transaktivierungsfähigkeit festgestellt werden, die außerdem zwischen biologischen Replikaten stark schwankten und teils gänzlich fehlten.

Zusammenfassend muss festgehalten werden, dass mit den durchgeführten Experimenten eine funktionelle oder physische Assoziation von PRMT1 mit GLI1 nicht schlüssig nachgewiesen werden konnte. Einzelne Ergebnisse (Banden in der Methylierungsreaktion, teilweise erhöhte *GLI1*-Transkriptspiegel und einzelne regulierte Reporter-Gen-Expression-Bedingungen) lassen eine Assoziation jedoch weiterhin möglich erscheinen. Falls dieser Frage in Zukunft weiter nachgegangen wird, so sollte dabei beachtet werden, dass es sich beim Hedgehog-Signalweg um eine induzierbare Kaskade handelt. Es könnte nötig sein, diese zu induzieren, um Interaktionen von GLI1 mit PRMT1 zu ermöglichen. Ein Grund hierfür ist, dass der Transkriptionsfaktor im uninduzierten Zustand im Komplex mit dem Repressor SuFu und gebunden an Mikrotubuli eventuell nicht als Interaktionsziel zur Verfügung steht ([254] (Daten aus *Drosophila*) und [153]). Zudem sind die Proteinspiegel von GLI1 nach Induktion mit Hedgehog-Ligand aufgrund der Induktion der Transkription durch GLI3 erhöht [66], was unter

Umständen die Nachweisbarkeit in der Immunfärbung erleichtert und die Interaktion verstärkt bzw. ermöglicht.

5.5 INDUKTION DER PRMT1-EXPRESSION DURCH C-MYC

Im Krallenfrosch bindet c-Myc an regulatorische Genbereiche von *Prmt1* und induziert dessen Expression [89]. Abbildung 16 konnte auch im humanen PDAC zeigen, dass c-MYC als Aktivator der PRMT1-Expression fungiert.

Diese Beobachtung ist interessant, da sich die Frage stellt, durch welche Mechanismen die Überexpression von PRMT1 im PDAC bewerkstelligt wird. c-MYC ist im PDAC häufig überexprimiert, beispielweise durch Amplifikation des Genlokus [265], und es ist bereits in einigen untersuchten PanIN-Stadien auf Protein-Ebene verstärkt exprimiert [265]. Eine weitere Studie, im murinen System, bestätigte das Vorhandensein von c-MYC-Überexpressionen bereits in frühen PanIN-Stadien [174]. PRMT1 war in histologischen Färbungen im Rahmen der Bachelorarbeit von Anna Lena Merkel ebenfalls bereits in frühen Stadien färbbar. Ein kausaler Zusammenhang ist daher sowohl aufgrund der mechanistischen als auch aufgrund der Daten bezüglich der Zeitpunkte der Expressionen von PRMT1 und c-MYC denkbar.

In Versuchen im Mausmodell könnte in Zukunft untersucht werden, ob PRMT1 essenziell für die Entwicklung und - unabhängig davon - für die Aufrechterhaltung des PDAC oder auch dessen Metastasierung ist. Dies könnte durch Transplantation/Injektion PRMT1-depletierter PDAC-Zellen in Mäuse durchgeführt werden. Um weiter auf einen Zusammenhang der PRMT1-Expression mit c-MYC und den daraus resultierenden biologischen Effekten einzugehen, könnte man sich c-MYC-depletierter Zellen bedienen, deren PRMT1-Spiegel durch geeignete Methoden auf normaler oder verstärkter Expression gehalten werden. Hierzu muss einschränkend angemerkt werden, dass der Einfluss eines *Knockdowns* von c-MYC auf die PRMT1-Transkriptspiegel eher schwach ist (ca. 20 bis 40 Prozent, Abbildung 16). Es ist daher nicht auszuschließen, dass die Überexpression von PRMT1 von weiteren Faktoren getrieben wird, auch wenn für eine Beurteilung dieser Annahme die Kenntnis quantitativer Daten zur Überexpression von PRMT1 im Vergleich zu nicht-PDAC-Zellen nötig wäre.

Auch für die verstärkte Expression von c-MYC stellt sich die Frage nach der Ursache dieser Regulation. In 43,9 Prozent der von Schleger *et al.* untersuchten Fälle (PDAC-Primärtumore und Metastasen) sind Amplifikationen des c-MYC-Gens oder des Chromosoms 8 (enthält das c-MYC-Gen) vorhanden [265]. 40,9 Prozent der untersuchten Fälle zeigten zwar eine verstärkte Bildung des Proteins, doch diese Fälle überlappten nur zu 23,2 Prozent mit denjenigen, die eine c-MYC-Amplifikation hatten. Die restlichen Fälle wiesen eine Amplifikation ohne erhöhte

Proteinspiegel bzw. gesteigerte Proteinspiegel ohne vorhandene Gen-Amplifikation oder keine der beiden Gegebenheiten auf. Dies deutet auf weitere Mechanismen zur Überexpression von c-MYC hin. Buchholz *et al.* haben nachgewiesen, dass c-MYC von NFATc1 in seiner Transkriptionsrate erhöht wird [36]. Interessanterweise war bereits zuvor in einer weiteren Publikation gezeigt worden, dass PRMT1 eine Rolle in der NFATc2-Signalgebung spielt. In T-Zellen methyliert PRMT1 den NFAT-Kofaktor NIP45, was eine verstärkte Expression von NFAT-Zielgenen bewirkt [211]. In einer weiteren Studie wurde gezeigt, dass eben dieser Signalweg – experimentell teilweise induziert durch Ionomycin – im Leberzellkarzinom eine Rolle spielt [304]. Hierbei induziert der aktivierte Signalweg über NFATc1 das pro-proliferativ wirksame c-MYC. Zudem erwiesen sich NFATc1 und NFATc2 auch im PDAC als essenziell für die Induktion von c-MYC, wobei in diesem Fall die TGF- β -Signalgebung untersucht wurde [274]. Bei der zusammenfassenden Betrachtung der genannten Studienergebnisse lässt sich eine zelltyp-übergreifende Funktion von NFAT-Proteinen in der Induktion von c-MYC in mehreren Signalwegen formulieren. Eine Rolle für die Methylierungsaktivität von PRMT1 im NFAT-Signalweg wurde zwar nur für einen bestimmten Zelltyp (T-Zellen) unter Ionomycin-Stimulation beschrieben, könnte jedoch auch auf eine generelle Funktion von PRMT1 in NFAT-Signalwegen hindeuten.

Die in dieser Arbeit durchgeführten Versuche unter FCS-Stimulation konnten keine klar veränderten c-MYC-Proteinspiegel nach Depletion von PRMT1 belegen (Abbildung 17). Dieser Frage sollte in Zukunft dennoch mit Hilfe weiterer Protokolle nachgegangen werden. Die Induktion mit FCS mit den vielen darin enthaltenen Faktoren könnte durch die Auslösung unzähliger Signalkaskaden die Beeinflussung einzelner Kaskaden durch PRMT1 überdecken. Insbesondere im Hinblick auf die NFAT-Signalgebung stehen spezifischere Stimulantien wie der Aktivator Ionomycin (induziert Calcineurin und damit NFAT durch Erhöhung der intrazellulären Calcium-Konzentration) oder der Inhibitor Cyclosporin A (inhibiert Calcineurin und damit die Aktivierung von NFAT) zur Verfügung [178].

Die Fähigkeit von c-MYC, die Proteinspiegel von PRMT1 zu erhöhen, würde im Falle einer ebensolchen Regulation von c-MYC durch PRMT1 eine positive Rückkopplung bedeuten. Unterstützend zu dieser These ist bekannt, dass *PRMT1* nach Induktion der NFAT-Signalgebung (nach Stimulation des T-Zell-Rezeptors) auf mRNA-Ebene verstärkt exprimiert wird [211], NFAT in PDAC-Schnitten verstärkt exprimiert ist [36] und wie bereits erwähnt, NFAT-Transkriptionsfaktoren die Expression von c-MYC induzieren [274].

5.6 GENEXPRESSIONS-MICROARRAY IN PDAC-ZELLEN UNTER *PRMT1*-KNOCKDOWN

Um Gene zu identifizieren, die in PDAC-Zellen von *PRMT1* in ihrer Expression reguliert werden, wurde die Hybridisierung eines Oligonukleotid-Microarrays durchgeführt. Der Array deckte nicht nur 28.000 Gene, sondern auch 7.500 linc-RNAs ab. Kleine RNAs wie microRNAs waren aufgrund der Oligonukleotidlängen (60-mere) nicht vertreten. Um die Wahrscheinlichkeit von *off-targets* in den erhaltenen regulierten Genen zu minimieren, wurden jeweils zwei verschiedene siRNAs eingesetzt, die spezifisch *PRMT1* depletieren bzw. die als Kontrollen keine bekannte komplementäre Sequenz im humanen Transkriptom haben. Zur Erhöhung der Aussagekraft wurde zudem ein biologisches Duplikat der Transfektion angefertigt. Nur Gene, die in beiden Replikaten gleichsam reguliert waren, wurden als spezifische Treffer gewertet (Abbildung 19).

Die Ergebnisliste an regulierten Genen, die zur Validierung verfügbar waren, umfasste 51 potenzielle *PRMT1*-Zielgene (Tabelle 1). Die recht geringe Anzahl an mehr als 2-fach regulierten Genen lässt vermuten, dass *PRMT1* kein starker Regulator der Genexpression ist. Dies ist insoweit zu erwarten, als dass *PRMT1* selbst kein Transkriptionsfaktor ist. Das Protein ist lediglich als Kofaktor bei der Regulation der Genexpression bekannt und hat zudem in einigen Fällen Funktionen bei der Vermittlung von Effekten nach Induktionen, wie etwa bei der Koaktivierung von Farnesoid X-Rezeptor-Zielgenen und beim Gen *CITED2* (hier nur bei gleichzeitigem *Knockdown* von *PRMT4*) nach Interleukin-Stimulation [152,253]. Auch in Fällen, bei denen keine direkte Aktivierung der Genexpression durch Rekrutierung des Enzyms an das Chromatin stattfindet, waren Induktionen nötig oder verstärkten die Effekte erheblich [211,257]. Im durchgeführten Versuch für die Erstellung des Arrays wurden die PDAC-Zellen in einem uninduzierten Zustand verwendet, und es wurden daher nur Gene erfasst, die von *PRMT1* in diesem Zustand reguliert werden. Zudem war in der Arbeitsgruppe bereits zuvor erkannt worden, dass *PRMT1* alleine keine starken Regulationen der Genexpression bewirkt, da in einem Array für die Ermittlung von Zielgenen zusätzlich die Depletion von *PRMT4* nötig war [152].

Ein weiterer Grund für die geringe Anzahl an potenziellen Zielgenen von *PRMT1* ist das Design des Experiments. Es wurde bewusst eine möglichst kurze Zeitspanne für die Inkubation der Zellen in siRNA-haltigem Medium gewählt. Sobald ein *Knockdown* erreicht war (an Tag 3, Abbildung 18), wurden die Zellen geerntet, auch wenn die Depletion in den folgenden Tagen noch effizienter geworden wäre. Die Depletion war also zu diesem Zeitpunkt noch nicht komplett. Der Grund für diese Vorgehensweise war, dass bei den Versuchen zur Proliferationsfähigkeit von verschiedenen Tumorzellen offensichtlich wurde, dass die Zellen bald nach der

Transfektion mit *PRMT1*-spezifischer siRNA einen Wachstumsdefekt aufweisen (beginnend bereits an Tag 3, Abbildung 8). Es ist davon auszugehen, dass sich infolgedessen die Anzahl deregulierter Gene, die nicht direkt im Zusammenhang mit der *PRMT1*-Depletion stehen, erhöht (sekundäre Effekte). Dies sollte vermieden werden.

5.6.1 VALIDIERBARKEIT DER ZIELGENE DES MICROARRAYS

Alle potenziellen Zielgene wurden einer mehrstufigen Validierung in verschiedenen Zelllinien und unabhängigen Experimenten unterzogen. Unter Verwendung der gleichen siRNAs, die auch im Microarray verwendet wurden, ließ sich der Großteil der Treffer in biologisch unabhängigen Experimenten validieren (Abbildung 24, schwarze Balken). Eine Ausnahme bildeten hierbei lediglich die Gene, die auf dem Array mit mehreren Sondern vertreten waren und die verschiedene Regulationen zeigten. Hierauf wird später noch genauer eingegangen. Zwischen dem Microarray und diesen Validierungs-Experimenten wurde eine neue Charge Zellen aufgetaut, sodass geschlossen werden kann, dass der Ermittlung dieser Gene als transkriptionelles Ziel von *PRMT1* kein bestimmter, momentaner Zustand der Zellen in der Zellkultur zugrunde lag.

Vor dem Hintergrund der Erfahrungen, die bei den Arbeiten an dem potenziell *PRMT1*-regulierten Gen *GLI1* gemacht worden waren (4.4), wurden bei den biologischen Replikaten zur Validierung jedoch weitere spezifische sowie Kontroll-siRNAs eingeschlossen, um sicherzustellen, dass das Vorliegen von siRNA-bedingten *off-target*-Effekten ausgeschlossen werden kann. Nach Auswertung dieser umfangreicheren Experimente mussten viele der Gene (30 von 51) bei Einbezug weiterer Kontroll- und *PRMT1*-spezifischer siRNAs klar als *off-targets* ausgeschlossen werden.

5.6.2 VALIDIERTE, VOM *PRMT1*-KNOCKDOWN REGULIERTE GENE

In einer Gene Set Enrichment-Analyse (GSEA) zeigten sich keine Gen-Sets, die unter Depletion von *PRMT1* reguliert waren.

Jedoch befinden sich unter den validierten und potenziellen Genen der Ergebnisliste (Tabelle 4) mehrere Vertreter, die Funktionen ausführen, die in deregulierter Form einen Selektionsvorteil für Zellen darstellen würden oder für die bereits tumor-relevante Funktionen publiziert sind.

5.6.2.1 ANNEXIN A8

Das Gen *ANNEXIN A8* (*ANXA8*) war im Microarray unter PRMT1-Depletion verstärkt exprimiert. Im Umkehrschluss ist PRMT1 bei seiner verstärkten Expression im PDAC als Repressor der Expression von *ANNEXIN A8* zu sehen. Die Betrachtung der bekannten Funktionen des Genprodukts, wie sie in Tabelle 4 aufgezählt wurden, ergibt dafür auf den ersten Blick eine Problematik. *ANNEXIN A8* hat sich im PDAC als überexprimiert erwiesen [139], was widersprüchlich zur ebenfalls gesteigerten Expression von PRMT1 in seiner vermuteten Funktion als Repressor der *ANNEXIN A8*-Expression erscheint. Zwar ist diese Überexpression von *ANNEXIN A8* in der genannten Publikation unter anderem in den PDAC-Epithelzellen präsent, jedoch lediglich fokal lokalisiert, während PRMT1 in dieser Arbeit eher in allen Gang-Epithelzellen färbbar war. Zudem ist *ANNEXIN A8* erst im PDAC und nicht bereits in den PanIN-Stadien verstärkt exprimiert [139]. Somit handelt es sich bei dessen Heraufregulation möglicherweise um einen weiteren, von PRMT1 unabhängigen Mechanismus. Unabhängig davon ist anhand der relativen Regulation durch einen einzelnen Faktor wie PRMT1 nicht notwendigerweise eine Aussage für die absoluten Expressionsspiegel eines Proteins im Kontext aller Regulationsmechanismen der Zelle und des Zellverbandes im Gewebe möglich. PRMT1 kann also, auch bei starker Expression von *ANNEXIN A8*, eine negativ regulierende Funktion auf die Spiegel von *ANNEXIN A8* ausüben. Zudem muss prinzipiell beachtet werden, dass die Regulation von *ANNEXIN A8* in dieser Arbeit lediglich auf Transkriptebene gezeigt wurde und veränderte Transkriptspiegel nicht unbedingt in veränderten Proteinspiegeln resultieren müssen. Hier können zusätzliche Regulationsmechanismen bei der Translation oder der Steuerung der Proteinstabilität stattfinden.

Interessanterweise ist für *ANNEXIN A8* eine Funktion im Recycling des EGF-Rezeptors in späten Endosomen gezeigt. Diese sind nach Herunterregulation von *ANNEXIN A8* verkleinert und die Degradation des Rezeptors wird verlangsamt, was zu einer verlängerten Signalgebung und Aktivierung von MEK-Kinasen führt [95]. In diesem Zusammenhang wurde deutlich, dass die im PDAC in fast allen Fällen vorhandene Mutation des KRAS-Proteins alleine nicht ausreichend ist, um die tumorinitiierende Wirkung des deregulierten MEK-Signalwegs zu bedingen. In einem Mausmodell mit mutiertem *Kras* kam es zwar zur raschen Entwicklung von PanINs, aber nur zum langsamen Auftreten von Karzinomen [118]. In weiteren Untersuchungen wurde entdeckt, dass eine Heraufregulation der EGF-Rezeptor-Expression nötig ist und eine Aktivierung des Rezeptors gegenüber gesundem Gewebe sehr früh, bereits vor der Entwicklung von PanINs nachweisbar ist [12]. Die frühe Heraufregulation des EGF-Rezeptors sowie frühe Überexpression von PRMT1 lassen einen Zusammenhang in Verbindung mit einer

Regulation von *ANNEXIN A8* als möglich erscheinen. Die Rolle von *ANNEXIN A8* im PDAC ist jedoch nicht ohne Kontroversen. In [113] wurde in Panc1- und BxPC3-PDAC-Zellen eine Beteiligung von *ANNEXIN A8* bei der Reaktion von Zellen auf Nährstoffentzug festgestellt. Eine Überexpression des Proteins befähigte die Zellen verstärkt zum Überleben unter diesen Bedingungen. Zudem ist es notwendig für die Migration (Invasion).

Ergänzend muss darauf hingewiesen werden, dass zwei hochgradig homologe Gene (*ANXA8L1* und *ANXA8L2*) existieren. Die im Array verwendete Sonde und die Primer bei den Validierungsversuchen haben zwischen diesen Genen nicht unterschieden. Falls nur eines der Gene reguliert wird, könnte durch Verwendung spezifischer Primer, insofern ein Design möglich ist, eventuell eine deutlichere Regulation nachgewiesen werden.

5.6.2.2 *GLIPR1*

Das zweite von *PRMT1* beeinflusste Gen, das verifiziert werden konnte, ist *GLIPR1*. In diesem Fall scheint *PRMT1* ein Aktivator der Expression zu sein, da *GLIPR1* unter *PRMT1*-Depletion schwächer exprimiert wird. Die Literatur zu den Rollen dieses Proteins in Tumoren ist kontrovers. In Prostatakrebs-Zellen wurde eine klare Rolle als Tumorsuppressor nachgewiesen, unter anderem, indem das Protein zu einer Verringerung der Transkriptionsrate von *c-MYC* und einer Erhöhung der Abbaurate des *c-MYC*-Proteins führt. Ein zusätzlicher Mechanismus ist aber auch eine Reduktion der Spiegel an β -Catenin, was seinerseits zu einer Reduktion der Transkription von *c-MYC* führt [169]. In dieser Tumorart wird *GLIPR1* jedoch durch Methylierung des Lokus inaktiviert [249]. Auch in der AML (akute myeloische Leukämie) ist *GLIPR1* durch DNA-Methylierung in seiner Expression blockiert [314].

β -Catenin spielt in der Entwicklung des PDAC eine gewichtige Rolle. Es ist in der Regeneration von Pankreasgewebe essenziell. Wird die Signalgebung über β -Catenin (Wnt-Signaling) beispielsweise durch mutiertes *Kras* inhibiert, verbleiben die Zellen im Zuge der Proliferation nach einer Verletzung in einem dedifferenzierten epithelialen Zustand, was die Entwicklung von PanINs begünstigt oder gar erst ermöglicht [207]. Inwiefern *GLIPR1* auch im PDAC einen Einfluss auf die β -Catenin-Spiegel hat, ist nicht bekannt. Die oben erwähnte, im Prostatakrebs beschriebene Regulation von β -Catenin durch *GLIPR1*, ist negativer Art. Falls *GLIPR1*, das durch *PRMT1* verstärkt exprimiert wird, auch im PDAC die β -Catenin-Spiegel herunterreguliert und damit die Redifferenzierung verhindert, wäre eine ursächliche Beteiligung an der Tumorentstehung gegeben. Im diesem Zusammenhang könnten die immunhistochemischen Färbungen für *PRMT1* auch in Schnitten mit chronischer Pankreatitis wiederholt werden, um festzustellen, ob hier bereits eine Veränderung der Expression feststellbar ist.

Im Gegensatz dazu ist *GLIPR1* im Wilms Nieren-Tumor hypomethyliert und damit verstärkt exprimiert [53]. Zudem ist auch in Gliomen eine Überexpression nachweisbar, wobei das Protein als Onkogen fungiert, indem es die Proliferation, das Überleben und die Invasion positiv reguliert. Dies wird mit gesteigerten Proteinspiegeln von BCL-2 sowie erhöhter Aktivierung der Matrix-Metalloprotease 2 erklärt [258]. Die Funktion von *GLIPR1* in Tumorzellen entweder als Tumorsuppressor oder als Onkogen scheint von weiteren Faktoren abhängig zu sein.

Dies wurde bereits für andere Proteine, beispielweise für p53, gezeigt. p53 übt in den meisten Zellen unabdingbare Funktionen als Tumorsuppressor aus, indem es beispielsweise die Apoptose steuert und den Zellzyklus reguliert, vor allem auch im Kontext von DNA-Schäden [298]. Erst im Zusammenhang mit Veränderungen in der Tumorzelle und nicht zuletzt durch Mutation des p53-Proteins selbst kann es auch tumorfördernde Funktionen ausführen. Auch im PDAC ist dies der Fall. Dort führt mutiertes p53 zu gesteigerter Metastasierung gegenüber dem Verlust von p53 [209].

Bei *GLIPR1* handelt es sich um ein p53-Zielgen, das beim Vorliegen von DNA-Schaden jedoch auch unabhängig von p53 induziert werden kann [248,250]. Interessanterweise stellte sich bei der Untersuchung von Wilms-Tumoren heraus, dass diese hohe Spiegel an p53 aufweisen, aber nur selten von p53-Mutationen betroffen sind, die Expression von p53 jedoch dennoch mit einer schlechten Prognose korreliert [160]. Die verstärkte Expression von *GLIPR1* in diesen Tumoren könnte darauf hin deuten, dass die tumorfördernden Funktionen von p53 zumindest teilweise über *GLIPR1* mit seinen onkogenen Eigenschaften gemittelt sind.

Die Frage, wann *GLIPR1* als Tumorsuppressor und wann als Onkogen fungiert, wird vermutlich nicht allein von den Expressionsspiegeln von p53 abhängen. Im mutierten Zustand ändert der Transkriptionsfaktor sein Profil induzierter Zielgene und damit auch die Wirkung auf das Verhalten von Zellen [192,298], womit auch die Art der Expression von p53 eine Rolle bei der Induktion der *GLIPR1*-Expression spielen könnte. p53 ist im PDAC häufig mutiert und liegt in immunhistochemisch deutlich färbbaren Spiegeln in den epithelialen Tumorzellen vor [261]. Nicht zuletzt kann die Art der Wirkung von *GLIPR1* auch von weiteren Faktoren entscheidend beeinflusst sein.

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass *GLIPR1* in Tumorzellen sehr verschiedene Rollen einnehmen kann. Ob das Protein dabei als Onkogen oder als Tumorsuppressor wirkt, hängt sicherlich noch von weiteren Faktoren ab, von denen der p53-Status nur ein Beispiel ist. Insoweit sind die Widersprüche in der Literatur erklärbar und *GLIPR1* bleibt ein relevanter, im PDAC von PRMT1 regulierter Faktor.

Aufgrund der Funktionen, die für *GLIPR1* bereits bekannt sind, handelt es sich um ein vielversprechendes von PRMT1 reguliertes Gen. In weiteren Versuchen kann beispielsweise eine Rolle von GLIPR1 im ankerunabhängigen Wachstum oder der Invasivität von PDAC-Zellen untersucht werden. Dabei sollte sich auch die Frage klären lassen, ob das Protein in dieser Tumorart als Onkogen oder Tumorsuppressor wirkt.

Ein Einfluss von GLIPR1 auf die Proliferationsfähigkeit von Panc1-Zellen konnte in ersten Versuchen nicht festgestellt werden (Abbildung 28). Bei der Interpretation dieser Ergebnisse muss beachtet werden, dass die eingesetzten siRNAs auch ohne spezifische Depletion einen teils starken Effekt auf die Fähigkeit der Zellen zur Proliferation hatten. Dies kann in einer Auslösung der Interferon-Antwort aufgrund der Transfektion mit siRNA begründet liegen (siehe Kapitel 5.6.4). Eine Wirkung von Interferonen auf Zellen ist die Inhibition des Zellzyklus und damit die Hemmung der Proliferationsrate (*Review* [20]). Es ist von daher nicht überraschend, dass sich beim Verwenden mehrerer siRNAs Einflüsse in Wachstumskurven zeigen. Problematisch ist dies dann, wenn der spezifische Effekt der Depletion eines Proteins nicht über die Effekte der Interferon-Antwort hinausgeht. Ob dies hier der Fall ist, kann nur spekuliert werden. Eine Wiederholung mit anderen Methoden zur Depletion von GLIPR1 könnte dieser Fragestellung in Zukunft weiter nachgehen.

Der Nachweis einer direkten Regulation der Expression des *GLIPR1*-Gens sollte durch die Detektion einer Rekrutierung von PRMT1 an dieses Gen mittels ChIP erfolgen (Abbildung 29). Obwohl die eingesetzten PRMT1-Antikörper eine Anreicherung des Proteins auf Ebene des Chromatins zeigten, konnte nicht verifiziert werden, ob die ermittelte Rekrutierung spezifisch ist. Grund hier ist, dass keine Kontrollregionen gefunden werden konnten, an denen PRMT1 in geringerem Ausmaß gebunden ist, als an den Promotor- und Enhancerbereichen von *GLIPR1*. Es ist natürlich möglich, dass PRMT1 an weiten Bereichen des Chromatins rekrutiert ist und daher eine umfangreichere Suche nach Kontrollregionen nötig ist. Bei den vorliegenden Ergebnissen kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass die Rekrutierung ein unspezifisches Ereignis anzeigt. Aufgrund der angewandten Methodik sind denkbare Gründe hierfür beispielsweise eine allgemeine Quervernetzung von Proteinen mit DNA, die folglich eine Assoziation anzeigen, die in der Zelle unter nativen Bedingungen nicht vorliegt. Zudem ist die Rekrutierung von PRMT1 unter Umständen zu schwach, um sie vom Hintergrund zu unterscheiden. Abhilfe könnten hier eventuell mildere Arten der Chromatinfragmentierung wie ein enzymatischer Verdau anstatt der Sonifizierung schaffen. Die Anpassung der Versuchsbedingungen der ChIP wird hier ein notwendiger Punkt weiterer Untersuchungen sein.

5.6.3 WEITERE KANDIDATENGENE

Tabelle 4 enthält weitere Kandidatengene des Arrays, die noch nicht abschließend validiert werden konnten. Gene, die nach Validierungsversuchen mit *Knockdowns* in Panc1-Zellen nicht sicher als *target* oder *off-target* klassifiziert werden konnten, wurden einer weiteren Validierung in MEF-*Knockout*-Zellen unterzogen. Dieses Verfahren geht über die ursprüngliche Fragestellung, welche Rolle PRMT1 spezifisch im PDAC ausführt, hinaus. Dies bedeutet, dass Gene, die auch in MEF-Zellen durch Depletion von Prmt1 reguliert sind, möglicherweise als zelltypunabhängige Zielgene bezeichnet werden können. Im Umkehrschluss deutet eine ausbleibende Regulation im MEF-Zellmodell jedoch nicht zwangsläufig darauf hin, dass das Gen nicht dennoch in PDAC-Zellen oder speziell in Panc1-Zellen reguliert werden kann. In diesem Fall kann die Validierung nur durch Verwendung zusätzlicher PDAC-Zelllinien geklärt werden.

Die Gene *CFB* und *HLA-B* sind Interferon-induzierbar und daher mit gewisser Wahrscheinlichkeit durch die Transfektion mit siRNA heraufreguliert. Vor allem im Fall von *HLA-B* sind jedoch tumorrelevante Funktionen bekannt, wodurch dieses zu einem interessanten potenziellen Zielgen wird. Im Zuge der Tumorprogression ist es unerlässlich für Zellen, die Erkennung und Abtötung durch das angeborene Immunsystem zu unterdrücken. Ein Mechanismus durch den dies bewerkstelligt wird, ist die Mutation oder Herunterregulation von HLA Typ I-Genen wie *HLA-B*, wodurch der Regulation durch PRMT1 eine Schlüsselrolle zukommen könnte (Reviews [6,92]).

Weitere Gene wie *SSC5D* und *GPRIN2* sind bisher wenig detailliert charakterisiert. Im Falle einer positiven Validierung stellt sich demnach die Frage nach der biologischen Funktion.

Für die Gene *C10ORF10*, *GRASP* und *MF12* sind eher Rollen in Zellfunktionen beschrieben, die im Falle einer Überexpression und nicht bei einer Repression durch PRMT1 einen Vorteil in der Tumorentwicklung darstellen würden (Tabelle 4). Dennoch sollten diese Kandidatengene von einer weiteren Betrachtung nicht ausgeschlossen werden und auch hier mögliche, bisher unbekannte oder zellspezifische Funktionen in Betracht gezogen werden.

5.6.4 OFF-TARGETS IM ARRAY UND DEREN URSACHEN

Bei den meisten Genen wie beispielsweise *IFI44* lässt sich die Klassifikation als *off-target* dadurch erklären, dass sie Interferon-induzierbar sind und sie daher potenziell durch die Abwehrreaktion der Zellen auf Transfektion mit doppelsträngiger RNA heraufreguliert werden. In der Vergangenheit haben Studien ergeben, dass eine Aktivierung der angeborenen

Immunität, beispielsweise über *toll-like*-Rezeptoren, insbesondere nach kationischer Einbringung von siRNA über den endosomalen Weg (wie im Falle von Lipofectamine RNAiMax), möglich ist. Das trifft nicht nur auf Immunzellen sondern auch nicht-Immunzellen zu (Review [264]). Ein Weg, über den solche Effekte gemittelt werden, ist die Erkennung durch den TLR3 (*toll-like*-Rezeptor 3), was nicht sequenzspezifisch ist [140]. Auch über den TLR7 wurden Aktivierungen der Interferonantwort nach siRNA-Behandlung nachgewiesen, was im untersuchten Fall sequenzabhängig war [119]. Zwar wurde dies in dendritischen Zellen durchgeführt, jedoch ist der Rezeptor auch in PDAC-Zellen stark exprimiert [223]. Die Auslösung der Interferon-Antwort benötigt dabei nur äußerst geringe Konzentrationen an siRNA, ähnlich den 4,8 nMol die in dieser Arbeit verwendet wurden (1-10 nMol, [277]). Hierunter waren beispielsweise auch die in dieser Arbeit gefundenen Gene OAS2 und IFIT2 (bei 10 nMol). In einzelnen Untersuchungen wurden spezifische Motive gefunden, die eine Immunantwort auslösen [136]. Es ist jedoch davon auszugehen, dass nicht endgültig und umfassend geklärt ist, welche Sequenzen von siRNAs der Auslösung einer ungewünschten Immunantwort zugrunde liegen. Durch das Zusammenspiel mehrerer Rezeptoren wie TLR3 und TLR7, die verschiedene Signalgebungen induzieren und zur Ausschüttung unterschiedlicher Zytokine führen ist allerdings eine sehr differenzierte, auch siRNA-sequenzspezifische Regulation von Interferon-induzierten Genen denkbar.

Von den 51 Genen, die nach Durchführung des Arrays für eine Validierung zur Verfügung standen, sind 26 (51 %) Interferon-induzierbar (Tabelle 1). Auch diese Gene wurden der Validierung unterzogen. Es war wahrscheinlich, dass diese aufgrund der Behandlung der Zellen mit doppelsträngiger RNA und der daraus folgenden Immunantwort reguliert waren. Jedoch sollten in einem unvoreingenommenen Versuch, neue Zielgene zu entdecken, keine Gengruppen im Vorfeld ausgenommen werden. Zudem ist im Zusammenhang mit der Interferon-Antwort bereits eine Funktion von PRMT1 bekannt. So bindet das Protein an den zytoplasmatischen Teil des Interferon-Rezeptors 1 (IFNAR1) und verstärkt durch seine Methylierung dessen Signalgebung [1,7].

Die unwahrscheinlich erscheinende Tatsache, dass beispielweise beim Gen *IFI44* (Abbildung 24) ausgerechnet die beiden im Microarray verwendeten PRMT1-spezifischen siRNAs eine Induktion auslösen, die restlichen jedoch nicht, ist erklärbar und liegt in den Berechnungsgrundlagen des Arrays begründet. Abbildung 22 ist zu entnehmen, dass beispielsweise 333 differenziell regulierte Gene bei der Relation siPRMT1_6 vs. siLuciferase vorliegen. Da lediglich 51 Gene vor der Validierung als spezifisch definiert wurden, ergibt sich daraus eine hohe Anzahl an *off-targets* in dieser und auch den anderen Relationen. Bei bestimmten

Gengruppen, wie den Interferon-induzierbaren Genen ist davon auszugehen, dass sie überproportional häufig von unerwünschten Regulationen durch die siRNA-Behandlung betroffen sind. Es ist aufgrund der hohen Rate an Regulationen und dem Vorliegen präferenziell regulierter Gengruppen daher nicht unwahrscheinlich, dass zwei siRNAs einzelne überlappende *off-targets* hervorrufen. Eben diese Überschneidungen werden vom Algorithmus des Arrays herausgefiltert. Dargestellt neben den Expressionswerten weiterer siRNA-Behandlungen in Validierungs-Experimenten (die dieser Filterung nicht unterzogen wurden, da sie nicht im Array-Versuch enthalten waren), ergibt sich damit unter Umständen ein unwahrscheinlich erscheinendes Bild.

Bei den *off-targets*, die nicht Interferon-induzierbar sind, liegen andere Mechanismen für die Regulation zugrunde. In Studien wurde klar, dass die Depletion einer mRNA auch beim Vorliegen einer eher geringen Komplementarität der siRNA mit einer Ziel-mRNA stattfinden kann. Die Toleranz an Fehlpaarungen beträgt vier Basenpaare bei fast unveränderter Effizienz und bis zu acht Basenpaare mit sinkender Effizienz [109]. Insbesondere die 3'-Region (bezogen auf den siRNA-Leitstrang) toleriert ein hohes Maß an Fehlpaarungen. Es wird vermutet, dass diese Region eher für den katalytischen Prozess als für die komplementäre Paarung wichtig ist. Nur ein Abschnitt am 5'-Ende scheint für die Erkennung der Ziel-RNA essenziell zu sein. In dieser Region werden weniger Fehlpaarungen für eine erfolgreiche Spaltung toleriert (maximal fünf). Ein Bereich dieser Region wird als *seed*-Region bezeichnet. Untersuchungen haben ergeben, dass (Fehl-) Paarungen der *seed*-Region mit *off-target* mRNAs vor allem mit der 3'UTR-Region der mRNAs stattfinden [26].

Die angesprochenen Erkenntnisse machen klar, dass eine standardmäßige Überprüfung der Spezifität einer siRNA mittels „Blast“-Suche nicht aussagekräftig ist, um *off-targets* auszuschließen oder vorherzusagen. Der vom Programm verwendete Algorithmus vermag in transkriptomweiten Suchen eine geringe Komplementarität einer kurzen Teilsequenz nicht zu detektieren [26]. Der Ausschluss von *off-targets* muss somit durch experimentelle Validierung erfolgen.

5.6.5 ALTERNATIVE VORGEHENSWEISEN BEI DURCHFÜHRUNG DES GENEXPRESSIONS-MICROARRAYS

Unter Einbezug der besprochenen Fakten und Erkenntnisse nach Auswertung des Experiments stellt sich die Frage, welches alternative Vorgehen und welche Anpassungen bei weiteren ähnlichen Versuchen sinnvoll wären. Die Verwendung zusätzlicher siRNAs könnte wahrscheinlich die Rate an falsch-positiven Treffern (*off-targets*) verringern. Hierbei muss

allerdings beachtet werden, dass selbst bei den erfolgreich validierten Genen *ANXA8* und *GLIPR1* einzelne siRNAs den regulierenden Effekt nicht zeigten (Abbildung 25). Durch die Berechnungen des Arrays würde dieser Umstand zwangsläufig zu einer steigenden Zahl an entgangenen Regulationen (falsch-negative Resultate) führen. Bei der ohnehin geringen Anzahl an potenziellen Genen wäre dies im vorliegenden Fall kein erstrebenswertes Ergebnis.

Ebenfalls denkbar wäre ein anderer Weg der Einbringung von RNA, wie beispielsweise eine shRNA-Transfektion. Jedoch gibt es Hinweise, dass die Auslösung von *off-targets* aufgrund einer Immunstimulation hierbei ebenfalls stattfindet, da die intrazellulären Abläufe ähnlich zu denen bei der Verwendung von siRNA sind. Eine Untersuchung ergab, dass es eine gemeinsame Teilmenge an *off-targets* durch shRNA und siRNA gibt, wobei deren Anzahl bei shRNA geringer war [128]. Eine Einbringung mittels lentiviraler Vektoren induziert die Interferon-Antwort ebenfalls aufgrund der eingebrachten shRNA [35,143]. Geeigneter wären induzierbare *Knockout*-Zellen wie die in dieser Arbeit verwendeten MEF-Zellen, auch wenn ein *Knockout* in einer PDAC-Zelllinie wünschenswerter wäre, um PRMT1-Ziele speziell im Pankreaskarzinom zu untersuchen.

Die Schwelle, ab der ein Gen als reguliert angesehen wird, wurde bei der Auswertung auf 2,0-fach gesetzt. Um weitere potenzielle Zielgene für zusätzliche Validierungen zu erhalten, könnte diese Schwelle auf 1,8-fach gesenkt werden. Vor dem Hintergrund, dass bereits bei einem Wert von 2,0 der Großteil der Gene *off-targets* waren, lässt es jedoch als unwahrscheinlich erscheinen, dass aus einer weniger stringenten Definition validierbare Gene resultieren. Zumindest ist mit einer noch höheren Rate an falsch-positiven Treffern zu rechnen. Die versuchsweise Auswertung des Arrays mit einem Schwellenwert von 1,8-fach ergab zusätzliche 31 heraufregulierte und 4 herunterregulierte Gene. Diese stehen für weitere Untersuchungen zur Verfügung. Es wird hier jedoch nicht näher auf diese eingegangen.

5.6.6 PRMT1 ALS REPRESSOR DER GENEXPRESSION

Die überwiegende Mehrzahl der Gene ist im Array von PRMT1 reprimiert (im *PRMT1-Knockdown* induziert). Dies ist insofern überraschend, als dass alle bisher bekannten Funktionen von PRMT1 von aktivierender Art sind. Es sind keine Beispiele bekannt, in denen PRMT1 (direkt) als Repressor wirkt. Auch in Fällen, in denen PRMT1 unabhängig von einer Histonmodifikation die Genexpression beeinflusst, ist dies mit aktivierender Funktion verbunden. Ein Beispiel ist die Methylierung des Faktors RUNX1. In diesem Fall führt eine Methylierung von RUNX1 zu einem Ausbleiben der Interaktion mit SIN3A, einem Repressor.

Letztendlich folgt daraus die Induktion der RUNX1-abhängigen Transkription als Folge der Methylierung durch PRMT1 [329].

Im Gegensatz zu PRMT1 sind für PRMT5 in der Literatur repressive Funktionen gezeigt [10,120,227,229]. Unter anderem hat diese Methyltransferase durch die Inhibition der Expression von CYCLIN E1 hemmenden Einfluss auf die Proliferationsfähigkeit von Zellen [78]. Im Fall von PRMT5 sind jedoch auch zwei Beispiele bekannt, in denen das Enzym entgegen seiner angenommenen Funktion als allgemeiner Repressor der Genaktivität als Aktivator fungiert, nämlich indem es für die MyoD-abhängige Genexpression bei der Muskeldifferenzierung essenziell ist und außerdem in der IL2-abhängigen Genexpression eine aktivierende Rolle spielt [64,252].

Im Allgemeinen bewirkt die Methylierung von Proteinen neben einer Änderung des räumlichen Baus durch die angehängte Methylgruppe eine eingeschränkte Fähigkeit, Wasserstoffbrückenbindungen einzugehen [38]. Damit ist die Fähigkeit von Proteinen, Interaktionen mit anderen Proteinen einzugehen, von einer Methylierung beeinträchtigt. Dies lässt vermuten, dass aus der methylierungsbedingten Regulation sehr allgemeiner Proteineigenschaften eine Vielzahl möglicher Auswirkungen resultiert. Zwar haben Histon-Modifikationen durch PRMTs eher generelle Funktion auf die Genexpression im Sinne eines entweder aktivierenden oder reprimierenden Effekts, jedoch bringt die Methylierung von nicht-Histon-Proteinen eine große Komplexität in die möglichen Auswirkungen der Aktivität von PRMTs. Wie schon im Fall von PRMT5 sollte auch für PRMT1 keinesfalls ausgeschlossen werden, dass das Enzym auch Funktionen als Repressor der Genexpression haben könnte, vor allem in Kombination mit weiteren Faktoren. Die Annahme, eine Arginin-Methyltransferase habe nur entweder aktivierende oder reprimierende Funktion, ist nicht schlüssig begründbar. Im Hinblick auf den Einbezug weiterer Faktoren darf beim durchgeführten Array nicht außer Acht gelassen werden, dass es sich bei den ermittelten Kandidatengen auch um indirekt regulierte Gene handeln könnte. Die ausbleibende Induktion eines Repressors durch PRMT1 oder auch eine fehlende Methylierung eines Transkriptionsfaktors könnte in sekundären Effekten resultieren, die eine Aktivierung von Genen unter *PRMT1-Knockdown* bewirken.

5.6.7 GENE MIT UNKLARER REGULATION IM ARRAY

Bei der Auflistung der Kandidatengene des Arrays wurde bereits darauf hingewiesen, dass einzelne Treffer vorerst nicht weiter validiert wurden, weil mehrere Sonden auf dem Array widersprüchliche Ergebnisse lieferten (Tabelle 3). Im Folgenden wird dies anhand des Beispiels *CEACAM1* verdeutlicht. Abbildung 30 zeigt die Regulationen in den beiden unterschiedlichen Sonden, die auf dem Array vorhanden waren.

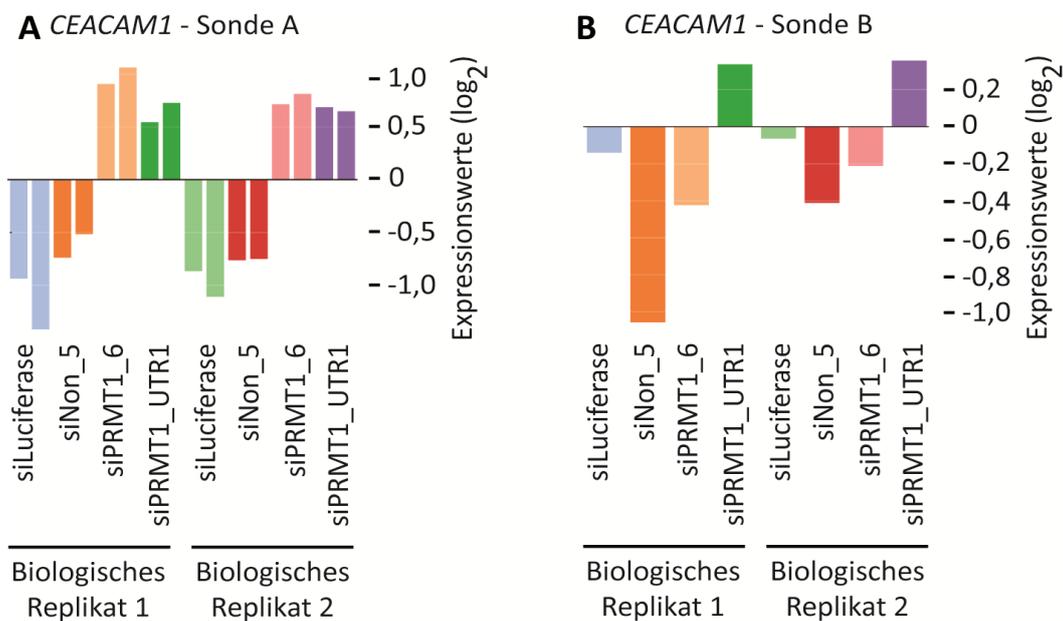


Abbildung 30: Unterschiedliche Regulation mehrerer Sonden eines Gens am Beispiel *CEACAM1*

Abgebildet sind die Expressionswerte in den einzelnen Bedingungen für die beiden Sonden auf dem Array, die *CEACAM1* detektieren.

Im abgebildeten Fall erkennt Sonde A mehrere, aber nicht alle, proteinkodierenden Isoformen von *CEACAM1* und zeigt eine Regulation durch PRMT1-Depletion an. Sonde B detektiert alle sechs proteinkodierenden Isoformen, zusätzlich jedoch auch ein Transkript von *CEACAM5* (>90 % Homologie) und ist nicht klar reguliert. Der Grund für die unterschiedliche Regulation kann im Erkennen der zusätzlichen Isoform durch Sonde B, aber auch im Erkennen von *CEACAM5* liegen. *CEACAM5* ist bei der spezifischen Sonde, die ebenfalls auf dem Array vorhanden war, nicht reguliert. Die Expression von *CEACAM5* überdeckt eventuell die Regulation von *CEACAM1*. An diesem Beispiel wird verdeutlicht, dass die Spezifität der Sonden für die erhaltenen Kandidatengene immer überprüft werden sollte.

Die Gene *AHNAK*, *CMPK2*, *KCNH2* und *MFI2* weisen in den Hybridisierungsergebnissen unterschiedliche Regulationen von verschiedenen proteinkodierenden Isoformen auf (verschiedene Sonden detektierten dabei bestimmte Isoformen oder verschiedene Kombinationen von Isoformen). Bei den vorliegenden Validierungsversuchen in der qPCR wurden Primer eingesetzt, die jeweils alle Isoformen zugleich detektieren. Das bedeutet, dass die Regulation einer einzelnen Isoform übersehen werden kann. Liegt eine zweite Isoform unreguliert, aber mit stärkerer Expression im Vergleich zur ersten Isoform vor, so würde diese die Regulation der ersten Isoform überdecken.

Ein Beispiel dafür, dass verschiedene Isoformen eines Gens unterschiedliche Funktionen ausführen können, ist das Gen *BCL2-LIKE 1 (BCL2L1)*. Der kürzeren Isoform BCL-X_S wurden pro-apoptotische Funktionen nachgewiesen, während die längere Isoform BCL-X_L ein anti-apoptotisches Protein kodiert [28,85,193]. Auch für PRMT1 sind verschiedene Rollen für die bekannten Isoformen gezeigt. Zum einen liegen sie in verschiedenen Zellkompartimenten vor, und sie haben abweichende Aktivitätsspiegel und Substrat-Spezifitäten [101]. Zudem sind einzelne Isoformen in Zellen bestimmter Gewebe verstärkt exprimiert. Beispielsweise wird PRMT1 nicht nur allgemein verstärkt in Brustkrebszellen exprimiert, sondern es ändern sich auch die relativen Verhältnisse der einzelnen Isoformen. Eine genauere Betrachtung der Regulation einzelner Isoformen ist im Allgemeinen daher durchaus gerechtfertigt und von Interesse.

Überraschend wäre ein spezifischer Einfluss einer Protein-Arginin-Methyltransferase auf die Expression unterschiedlicher Isoformen eines Gens nicht. Tatsächlich waren die ersten Substrate, die für PRMTs identifiziert wurden, mRNA-bindende Proteine [179]. In Hefezellen hat das PRMT1-Ortholog Hmt1 eine Rolle beim Spleißen von pre-mRNA, wobei hier interessanterweise nur bestimmte mRNAs von einer Depletion von Hmt1 betroffen sind [47]. Eine Regulation der Expression nur einzelner Isoformen oder gar der gezielten Favorisierung einer Isoform ist damit eine denkbare generelle Aufgabe der PRMTs, und für PRMT4 wurde bereits nachgewiesen, dass seine Methylierungsaktivität zum Exon-Skipping führt [48]. Zudem wurde für SAM68 nachgewiesen, dass es das alternative Spleißen von *BCL2L1* (hin zu BCL-X_S) steuert und damit direkt Einfluss auf die Entscheidung hat, ob die Expression des Gens pro- oder anti-apoptotische Wirkung hat [231]. Diese Funktion von SAM68 ist dabei abhängig von einer posttranslationalen Modifikation, nämlich einer Phosphorylierung des Proteins. Die Tatsache, dass SAM68 durch PRMT1 methyliert wird [61], was einen inhibierenden Einfluss auf die Bindung von SAM68 an mRNA hat [251], lässt auch einen Einfluss von PRMT1 und seiner Methylierungsaktivität auf das alternative Spleißen als möglich erscheinen.

Die übrigen unklar regulierten Gene, die in Tabelle 3 aufgeführt sind, erklären sich durch andere Gründe. *NSD1* ist in zwei Sonden nicht reguliert. Die dritte Sonde, die eine Regulation anzeigt, stellte sich bei eingehender manueller Prüfung als zu ebenfalls 84 % spezifisch für humanes *PRMT1* heraus. Bei einer derart hohen Homologie ist von einer Fehlpaarung mit der *PRMT1*-Sequenz auszugehen. Unterstützend zu dieser Annahme gleicht das Profil der Regulation dieser Sonde der eigentlichen Sonde für *PRMT1* auffällig genau. Eine Regulation von *NSD1* ist daher auf dem Array nie vorhanden gewesen.

Bei *XAF1* und *SSC5D* detektieren beide Sonden jeweils dieselbe Isoform. Dennoch deutet je nur eine Sonde auf eine Regulation hin. Dafür liegt keine offensichtliche Erklärung vor. Bei den restlichen Genen liegen die Gründe für abweichende Ergebnisse in verschiedenen Sonden beim Erkennen nicht gesichert exprimierter Isoformen, der Detektion einer Sequenz des Gegenstrangs oder von Sequenzen außerhalb der Genbereiche. Auf die Einzelheiten wird nicht näher eingegangen.

Gene, die im Array verschiedene Regulationen bei einzelnen Isoformen zeigten, sollten in Zukunft, unabhängig davon ob diese proteinkodierend sind, genauer untersucht werden, indem zur Bestimmung der Expressionsspiegel in der RT-qPCR Isoform-spezifische Primer verwendet werden.

5.7 AUSBLICK

Die Feststellung, dass *PRMT1* im PDAC auf Proteinebene gegenüber gesundem Gewebe überexprimiert ist, war Ausgangspunkt für die Untersuchungen hinsichtlich einer biologischen Relevanz. Im Weiteren wurden Gene gesucht, die in Pankreaskarzinomzellen transkriptionell von *PRMT1* beeinflusst werden. Zwei Gene (*ANNEXIN A8* und *GLIPR1*) konnten bisher validiert werden. Diese stellen geeignete Proteine für weitere funktionelle Untersuchungen dar, da für sie bereits tumorrelevante Funktionen publiziert wurden. Aber auch weitere Gene, deren abschließende Validierung noch aussteht, haben Bezüge zu Krebsarten und sind daher vielversprechend. Es wird eine interessante Aufgabe sein zu bestimmen, welche unterschiedlichen Signalwege und Zellfunktionen von *PRMT1* insbesondere im PDAC durch Regulation der Transkription beeinflusst werden. Ebenso ist die Frage nicht geklärt, ob diese Regulation beispielsweise im Fall von *GLIPR1* direkt erfolgt. Das Protokoll zur Durchführung einer ChIP ist hinsichtlich der *Knockdown*-Bedingungen optimiert, jedoch müssen die Quervernetzung sowie die Sonifizierungsbedingungen weiter angepasst werden, um der Frage der Rekrutierung in Zukunft nachzugehen.

Der Assoziation von PRMT1 mit c-MYC kann in Zukunft weiter nachgegangen werden. Die Überprüfung einer Regulation von c-MYC durch PRMT1 steht noch aus. Zudem könnte in biologischen Assays ergründet werden, inwieweit c-MYC für die Effekte von PRMT1 auf die Zellen notwendig ist, und umgekehrt.

Auf der Seite der biologischen Relevanz der Überexpression von PRMT1 ist weiterhin von Interesse zu bestimmen, welcher Zelltyp neben den Tumorepithelzellen eine verstärkte Expression des Enzyms zeigt. Weitere Kofärbungen könnten diese Frage in Zukunft klären. Als Beispiel ist hier das Protein α SMA (α -smooth muscle actin) zu nennen, das als Marker für aktivierte Tumor-assoziierte Fibroblasten dienen kann (Review [137]). Einflüsse auf die Invasivität und die Metastasierung sollten mit spezialisierten Zellkulturmethoden wie beispielsweise dem Matrigel-Assay und nicht zuletzt im Mausmodell sowohl für PRMT1 selbst als auch für validierte Zielgene untersucht werden.

6 LITERATURVERZEICHNIS

- [1] C. Abramovich, B. Yakobson, J. Chebath, M. Revel, A protein-arginine methyltransferase binds to the intracytoplasmic domain of the IFNAR1 chain in the type I interferon receptor., *The EMBO Journal*. 16 (1997) 260–6.
- [2] C. Agbunag, D. Bar-Sagi, Oncogenic K-ras drives cell cycle progression and phenotypic conversion of primary pancreatic duct epithelial cells, *Cancer Research*. (2004) 5659–5663.
- [3] A. Aguirre, N. Bardeesy, M. Sinha, Activated Kras and Ink4a/Arf deficiency cooperate to produce metastatic pancreatic ductal adenocarcinoma, *Genes & Development*. 17 (2003) 3112–3126.
- [4] R.J. Akhurst, R. Derynck, TGF-beta signaling in cancer--a double-edged sword., *Trends in Cell Biology*. 11 (2001) S44–51.
- [5] M.M. Al-Aynati, N. Radulovich, J. Ho, M.-S. Tsao, Overexpression of G1-S cyclins and cyclin-dependent kinases during multistage human pancreatic duct cell carcinogenesis., *Clinical Cancer Research : an Official Journal of the American Association for Cancer Research*. 10 (2004) 6598–605.
- [6] I. Algarra, A. García-Lora, T. Cabrera, F. Ruiz-Cabello, F. Garrido, The selection of tumor variants with altered expression of classical and nonclassical MHC class I molecules: implications for tumor immune escape., *Cancer Immunology, Immunotherapy : CII*. 53 (2004) 904–10.
- [7] L. Altschuler, J.O. Wook, D. Gurari, J. Chebath, M. Revel, Involvement of receptor-bound protein methyltransferase PRMT1 in antiviral and antiproliferative effects of type I interferons., *Journal of Interferon & Cytokine Research : the Official Journal of the International Society for Interferon and Cytokine Research*. 19 (1999) 189–95.
- [8] M. Amagai, A mystery of AHNAK/desmoyokin still goes on., *The Journal of Investigative Dermatology*. 123 (2004) xiv–xv.
- [9] W. An, J. Kim, R.G. Roeder, Ordered cooperative functions of PRMT1, p300, and CARM1 in transcriptional activation by p53., *Cell*. 117 (2004) 735–48.
- [10] K. Ancelin, U.C. Lange, P. Hajkova, R. Schneider, A.J. Bannister, T. Kouzarides, et al., Blimp1 associates with Prmt5 and directs histone arginine methylation in mouse germ cells., *Nature Cell Biology*. 8 (2006) 623–30.
- [11] P. Anderson, N. Kedersha, Stress granules: the Tao of RNA triage., *Trends in Biochemical Sciences*. 33 (2008) 141–50.
- [12] C.M. Ardito, B.M. Grüner, K.K. Takeuchi, C. Lubeseder-Martellato, N. Teichmann, P.K. Mazur, et al., EGF receptor is required for KRAS-induced pancreatic tumorigenesis., *Cancer Cell*. 22 (2012) 304–17.
- [13] T. Asano, Y. Yao, J. Zhu, D. Li, J.L. Abbruzzese, S. a G. Reddy, The PI 3-kinase/Akt signaling pathway is activated due to aberrant Pten expression and targets transcription factors NF-kappaB and c-Myc in pancreatic cancer cells., *Oncogene*. 23 (2004) 8571–80.

- [14] Y. Bai, U. Ahmad, Y. Wang, J.H. Li, J.C. Choy, R.W. Kim, et al., Interferon-gamma induces X-linked inhibitor of apoptosis-associated factor-1 and Noxa expression and potentiates human vascular smooth muscle cell apoptosis by STAT3 activation., *The Journal of Biological Chemistry*. 283 (2008) 6832–42.
- [15] J. Bailey, B. Swanson, T. Hamada, Sonic hedgehog promotes desmoplasia in pancreatic cancer, *Clinical Cancer Research : an Official Journal of the American Association for Cancer Research*. 14 (2008) 5995–6004.
- [16] B. Balint, A. Szanto, A. Madi, Arginine methylation provides epigenetic transcription memory for retinoid-induced differentiation in myeloid cells, *Molecular and Cellular Biology*. 25 (2005) 5648–5663.
- [17] N. Bardeesy, A. Aguirre, Both p16Ink4a and the p19Arf-p53 pathway constrain progression of pancreatic adenocarcinoma in the mouse, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 103 (2006) 5947–5952.
- [18] S.R. Barnum, Y. Ishii, a Agrawal, J.E. Volanakis, Production and interferon-gamma-mediated regulation of complement component C2 and factors B and D by the astrogloma cell line U105-MG., *The Biochemical Journal*. 287 (Pt 2 (1992) 595–601.
- [19] M.T. Bedford, a Frankel, M.B. Yaffe, S. Clarke, P. Leder, S. Richard, Arginine methylation inhibits the binding of proline-rich ligands to Src homology 3, but not WW, domains., *The Journal of Biological Chemistry*. 275 (2000) 16030–6.
- [20] J. Bekisz, S. Baron, C. Balinsky, A. Morrow, K.C. Zoon, Antiproliferative Properties of Type I and Type II Interferon., *Pharmaceuticals (Basel, Switzerland)*. 3 (2010) 994–1015.
- [21] C. Benaud, B.J. Gentil, N. Assard, M. Court, J. Garin, C. Delphin, et al., AHNAK interaction with the annexin 2/S100A10 complex regulates cell membrane cytoarchitecture., *The Journal of Cell Biology*. 164 (2004) 133–44.
- [22] U. Bergmann, H. Funatomi, M. Yokoyama, Insulin-like growth factor I overexpression in human pancreatic cancer: evidence for autocrine and paracrine roles, *Cancer Research*. (1995) 2007–2011.
- [23] R. Beroukhim, C. Mermel, D. Porter, The landscape of somatic copy-number alteration across human cancers, *Nature*. 463 (2010) 899–905.
- [24] C. Berthet, F. Guéhenneux, V. Revol, C. Samarut, A. Lukaszewicz, C. Dehay, et al., Interaction of PRMT1 with BTG/TOB proteins in cell signalling: molecular analysis and functional aspects., *Genes to Cells : Devoted to Molecular & Cellular Mechanisms*. 7 (2002) 29–39.
- [25] Y. Bertrand, M. Demeule, J. Michaud-Levesque, R. Béliveau, Melanotransferrin induces human melanoma SK-Mel-28 cell invasion in vivo., *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 353 (2007) 418–23.
- [26] A. Birmingham, E. Anderson, 3' UTR seed matches, but not overall identity, are associated with RNAi off-targets, *Nature Methods*. 3 (2006) 199–204.

- [27] F. Blanchet, A. Cardona, F. a Letimier, M.S. Hershfield, O. Acuto, CD28 costimulatory signal induces protein arginine methylation in T cells., *The Journal of Experimental Medicine*. 202 (2005) 371–7.
- [28] L. Boise, M. González-García, C. Postema, bcl-x, a bcl-2-related gene that functions as a dominant regulator of apoptotic cell death, *Cell*. 74 (1993) 597–606.
- [29] F. Boisvert, U. Déry, Arginine methylation of MRE11 by PRMT1 is required for DNA damage checkpoint control, *Genes & Development*. 19 (2005) 671–676.
- [30] F. Boisvert, M. Hendzel, J. Masson, S. Richard, Methylation of MRE11 regulates its nuclear compartmentalization, *Cell Cycle*. (2005) 981–989.
- [31] F. Boisvert, A. Rhie, S. Richard, A. Doherty, The GAR motif of 53BP1 is arginine methylated by PRMT1 and is necessary for 53BP1 DNA binding activity, *Cell Cycle*. 4 (2005) 1834–1841.
- [32] F.-M. Boisvert, J. Cote, M.-C. Boulanger, P. Cleroux, F. Bachand, C. Autexier, et al., Symmetrical dimethylarginine methylation is required for the localization of SMN in Cajal bodies and pre-mRNA splicing., *The Journal of Cell Biology*. 159 (2002) 957–69.
- [33] C. Bonal, F. Thorel, A. Ait-Lounis, W. Reith, A. Trumpp, P.L. Herrera, Pancreatic inactivation of c-Myc decreases acinar mass and transdifferentiates acinar cells into adipocytes in mice., *Gastroenterology*. 136 (2009) 309–319.e9.
- [34] H. Brahm's, L. Meheus, V. de Brabandere, Symmetrical dimethylation of arginine residues in spliceosomal Sm protein B/B' and the Sm-like protein LSm4, and their interaction with the SMN protein., *Rna*. 7 (2001) 1531–1542.
- [35] A.J. Bridge, S. Pebernard, A. Ducraux, A.-L. Nicoulaz, R. Iggo, Induction of an interferon response by RNAi vectors in mammalian cells., *Nature Genetics*. 34 (2003) 263–4.
- [36] M. Buchholz, A. Schatz, M. Wagner, P. Michl, T. Linhart, G. Adler, et al., Overexpression of c-myc in pancreatic cancer caused by ectopic activation of NFATc1 and the Ca²⁺/calcineurin signaling pathway., *The EMBO Journal*. 25 (2006) 3714–24.
- [37] J.S. C. Chen, T. Lin, Role of Interferon Regulatory Factor-1 in the Induction of Biliary Glycoprotein (Cell CAM-1) by Interferon-gamma, *Journal of Biological Chemistry*. 271 (1996) 28181–28188.
- [38] B.J. Calnan, B. Tidor, S. Biancalana, D. Hudson, A.D. Frankel, Arginine-mediated RNA recognition: the arginine fork, *Science*. 252 (1991) 1167–1171.
- [39] B. Cha, W. Kim, Y.K. Kim, B.N. Hwang, S.Y. Park, J.W. Yoon, et al., Methylation by protein arginine methyltransferase 1 increases stability of Axin, a negative regulator of Wnt signaling., *Oncogene*. 30 (2011) 2379–89.
- [40] B. Chang, Y. Chen, Y. Zhao, R.K. Bruick, JMJD6 is a histone arginine demethylase., *Science (New York, N.Y.)*. 318 (2007) 444–7.
- [41] D. Chen, Regulation of Transcription by a Protein Methyltransferase, *Science*. 284 (1999) 2174–2177.

- [42] D. Chen, S. Huang, M. Stallcup, Synergistic, p160 coactivator-dependent enhancement of estrogen receptor function by CARM1 and p300, *Journal of Biological Chemistry*. (2000) 40810–40816.
- [43] L.T. Chen, a G. Gilman, T. Kozasa, A candidate target for G protein action in brain., *The Journal of Biological Chemistry*. 274 (1999) 26931–8.
- [44] S. Chen, J. Gai, Y. Wang, H. Li, FoxO regulates expression of decidual protein induced by progesterone (DEPP) in human endothelial cells., *FEBS Letters*. 585 (2011) 1796–800.
- [45] T. Chen, S. Hevi, F. Gay, N. Tsujimoto, T. He, B. Zhang, et al., Complete inactivation of DNMT1 leads to mitotic catastrophe in human cancer cells., *Nature Genetics*. 39 (2007) 391–6.
- [46] Y. Chen, J. Shu, W. Yang, L. Shi, X. Guo, XAF1 as a prognostic biomarker and therapeutic target in squamous cell lung cancer, *Chinese Medical Journal*. 124 (2011) 3238–3243.
- [47] Y.-C. Chen, E.J. Milliman, I. Goulet, J. Côté, C. a Jackson, J. a Vollbracht, et al., Protein arginine methylation facilitates cotranscriptional recruitment of pre-mRNA splicing factors., *Molecular and Cellular Biology*. 30 (2010) 5245–56.
- [48] D. Cheng, J. Côté, S. Shaaban, M.T. Bedford, The arginine methyltransferase CARM1 regulates the coupling of transcription and mRNA processing., *Molecular Cell*. 25 (2007) 71–83.
- [49] H. Cheon, G.R. Stark, Unphosphorylated STAT1 prolongs the expression of interferon-induced immune regulatory genes., *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 106 (2009) 9373–8.
- [50] H.S. Cheong, H.C. Lee, B.L. Park, H. Kim, M.J. Jang, Y.M. Han, et al., Epigenetic modification of retinoic acid-treated human embryonic stem cells., *BMB Reports*. 43 (2010) 830–5.
- [51] N. Cheung, L.C. Chan, A. Thompson, M.L. Cleary, C.W.E. So, Protein arginine-methyltransferase-dependent oncogenesis., *Nature Cell Biology*. 9 (2007) 1208–15.
- [52] P. Chiarugi, E. Giannoni, Anoikis: a necessary death program for anchorage-dependent cells., *Biochemical Pharmacology*. 76 (2008) 1352–64.
- [53] L. Chilukamarri, A.L. Hancock, S. Malik, J. Zabkiewicz, J. a. Baker, A. Greenhough, et al., Hypomethylation and Aberrant Expression of the Glioma Pathogenesis–Related 1 Gene in Wilms Tumors, *Neoplasia*. 9 (2007) 970–978.
- [54] K.C. Chin, P. Cresswell, Viperin (cig5), an IFN-inducible antiviral protein directly induced by human cytomegalovirus., *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 98 (2001) 15125–30.
- [55] I. Chrobak, S. Lenna, L. Stawski, M. Trojanowska, Interferon- γ promotes vascular remodeling in human microvascular endothelial cells by upregulating endothelin (ET)-1 and transforming growth factor (TGF) β 2., *Journal of Cellular Physiology*. 228 (2013) 1774–83.
- [56] S.-K. Chung, M.-G. Lee, B.-K. Ryu, J.-H. Lee, J. Han, D.-S. Byun, et al., Frequent alteration of XAF1 in human colorectal cancers: implication for tumor cell resistance to apoptotic stresses., *Gastroenterology*. 132 (2007) 2459–77.

- [57] M. a Cifone, I.J. Fidler, Correlation of patterns of anchorage-independent growth with in vivo behavior of cells from a murine fibrosarcoma., *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 77 (1980) 1039–43.
- [58] T. Cimato, J. Tang, Y. Xu, Nerve growth factor-mediated increases in protein methylation occur predominantly at type I arginine methylation sites and involve protein arginine methyltransferase 1., *Journal of Neuroscience Research*. 442 (2002) 435–442.
- [59] M. Collado, J. Gil, A. Efeyan, C. Guerra, A.J. Schuhmacher, M. Barradas, et al., Tumour biology: senescence in premalignant tumours., *Nature*. 436 (2005) 642.
- [60] J. Cook, J. Lee, Z. Yang, C. Krause, FBXO11/PRMT9, a new protein arginine methyltransferase, symmetrically dimethylates arginine residues, *Biochemical and ...* 342 (2006) 472–481.
- [61] J. Côté, M. Boulanger, Sam68 RNA binding protein is an in vivo substrate for protein arginine N-methyltransferase 1, *Molecular Biology of the Cell*. 14 (2003) 274–287.
- [62] J. Côté, S. Richard, Tudor domains bind symmetrical dimethylated arginines., *The Journal of Biological Chemistry*. 280 (2005) 28476–83.
- [63] G. Cuthbert, S. Daujat, Histone deimination antagonizes arginine methylation, *Cell*. 118 (2004) 545–553.
- [64] C.S. Dacwag, Y. Ohkawa, S. Pal, S. Sif, A.N. Imbalzano, The protein arginine methyltransferase Prmt5 is required for myogenesis because it facilitates ATP-dependent chromatin remodeling., *Molecular and Cellular Biology*. 27 (2007) 384–94.
- [65] R.K. Dagda, R. a Merrill, J.T. Cribbs, Y. Chen, J.W. Hell, Y.M. Usachev, et al., The spinocerebellar ataxia 12 gene product and protein phosphatase 2A regulatory subunit Bbeta2 antagonizes neuronal survival by promoting mitochondrial fission., *The Journal of Biological Chemistry*. 283 (2008) 36241–8.
- [66] P. Dai, Sonic Hedgehog-induced Activation of the Gli1 Promoter Is Mediated by GLI3, *Journal of Biological Chemistry*. 274 (1999) 8143–8152.
- [67] C. V Dang, MYC on the path to cancer., *Cell*. 149 (2012) 22–35.
- [68] N. Davies, P. Kapur, J. Gillespie, P. Guillou, G. Poston, Transforming growth factor alpha is trophic to pancreatic cancer in vivo., *Gut*. (1993) 1097–1098.
- [69] M. Dean, R. Levine, W. Ran, Regulation of c-myc transcription and mRNA abundance by serum growth factors and cell contact., *Journal of Biological Chemistry*. 261 (1986) 9161–9166.
- [70] S. Dennler, J. André, I. Alexaki, A. Li, T. Magnaldo, P. ten Dijke, et al., Induction of sonic hedgehog mediators by transforming growth factor-beta: Smad3-dependent activation of Gli2 and Gli1 expression in vitro and in vivo., *Cancer Research*. 67 (2007) 6981–6.
- [71] M. Dunaeva, P. Michelson, P. Kogerman, R. Toftgard, Characterization of the physical interaction of Gli proteins with SUFU proteins., *The Journal of Biological Chemistry*. 278 (2003) 5116–22.

- [72] L.L. Dunn, E.O. Sekyere, Y. Suryo Rahmanto, D.R. Richardson, The function of melanotransferrin: a role in melanoma cell proliferation and tumorigenesis., *Carcinogenesis*. 27 (2006) 2157–69.
- [73] F. Duong, V. Christen, J. et al. Berke, Upregulation of protein phosphatase 2Ac by hepatitis C virus modulates NS3 helicase activity through inhibition of protein arginine methyltransferase 1, *Journal of Virology*. 79 (2005) 15342–15350.
- [74] N. El-Andaloussi, T. Valovka, M. Toueille, P.O. Hassa, P. Gehrig, M. Covic, et al., Methylation of DNA polymerase beta by protein arginine methyltransferase 1 regulates its binding to proliferating cell nuclear antigen., *FASEB Journal : Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 21 (2007) 26–34.
- [75] N. El-Andaloussi, T. Valovka, M. Toueille, R. Steinacher, F. Focke, P. Gehrig, et al., Arginine methylation regulates DNA polymerase beta., *Molecular Cell*. 22 (2006) 51–62.
- [76] R.L. Elliott, G.C. Blobe, Role of transforming growth factor Beta in human cancer., *Journal of Clinical Oncology : Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*. 23 (2005) 2078–93.
- [77] Å.E.Y. Engqvist-goldstein, C.X. Zhang, S. Carreno, C. Barroso, J.E. Heuser, D.G. Drubin, RNAi-mediated Hip1R Silencing Results in Stable Association between the Endocytic Machinery and the Actin Assembly Machinery, *Molecular Biology of the Cell*. 15 (2004) 1666–1679.
- [78] E. Fabbriozio, S. El Messaoudi, J. Polanowska, C. Paul, J.R. Cook, J.-H. Lee, et al., Negative regulation of transcription by the type II arginine methyltransferase PRMT5., *EMBO Reports*. 3 (2002) 641–5.
- [79] L. Fauquier, C. Duboé, C. Joré, D. Trouche, L. Vandiel, Dual role of the arginine methyltransferase CARM1 in the regulation of c-Fos target genes., *FASEB Journal : Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 22 (2008) 3337–47.
- [80] Q. Feng, B. He, S.-Y. Jung, Y. Song, J. Qin, S.Y. Tsai, et al., Biochemical control of CARM1 enzymatic activity by phosphorylation., *The Journal of Biological Chemistry*. 284 (2009) 36167–74.
- [81] C.M. Fiori Valentina, Magnani Mauro, The expression and modulation of cEAcAM1 and tumor cell transformation, *Ann Ist Super Sanita*. (2012) 161–171.
- [82] K. a Fitzgerald, The interferon inducible gene: Viperin., *Journal of Interferon & Cytokine Research : the Official Journal of the International Society for Interferon and Cytokine Research*. 31 (2011) 131–5.
- [83] J. Fleming, G. Shen, S. Holloway, Molecular consequences of silencing mutant K-ras in pancreatic cancer cells: justification for K-ras-directed therapy, *Molecular Cancer Research*. (2005) 413–423.
- [84] A. Frankel, N. Yadav, J. Lee, T.L. Branscombe, S. Clarke, M.T. Bedford, The novel human protein arginine N-methyltransferase PRMT6 is a nuclear enzyme displaying unique substrate specificity., *The Journal of Biological Chemistry*. 277 (2002) 3537–43.

- [85] J.S. Fridman, J. Parsels, a Rehemtulla, J. Maybaum, Cytochrome c depletion upon expression of Bcl-XS., *The Journal of Biological Chemistry*. 276 (2001) 4205–10.
- [86] W.J. Friesen, A. Wyce, S. Paushkin, L. Abel, J. Rappsilber, M. Mann, et al., A novel WD repeat protein component of the methylosome binds Sm proteins., *The Journal of Biological Chemistry*. 277 (2002) 8243–7.
- [87] H. Friess, Y. Yamanaka, M.S. Kobrin, D. a Do, M.W. Büchler, M. Korc, Enhanced erbB-3 expression in human pancreatic cancer correlates with tumor progression., *Clinical Cancer Research : an Official Journal of the American Association for Cancer Research*. 1 (1995) 1413–20.
- [88] S. Fietze, M. Lupien, P. a Silver, M. Brown, CARM1 regulates estrogen-stimulated breast cancer growth through up-regulation of E2F1., *Cancer Research*. 68 (2008) 301–6.
- [89] K. Fujimoto, K. Matsuura, E. Hu-Wang, R. Lu, Y.-B. Shi, Thyroid hormone activates protein arginine methyltransferase 1 expression by directly inducing c-Myc transcription during *Xenopus* intestinal stem cell development., *The Journal of Biological Chemistry*. 287 (2012) 10039–50.
- [90] T. Furukawa, W. Duguid, Hepatocyte growth factor and Met receptor expression in human pancreatic carcinogenesis., *The American Journal of Pathology*. 147 (1995) 889–895.
- [91] M.P.P.& M.P.K. Gang G. Wang, Ling Cai, NUP98–NSD1 links H3K36 methylation to Hox-A gene activation and leukaemogenesis, *Nature Cell Biology*. 9 (2007) 804–812.
- [92] F. Garrido, F. Ruiz-Cabello, T. Cabrera, J.J. Pérez-Villar, M. López-Botet, M. Duggan-Keen, et al., Implications for immunosurveillance of altered HLA class I phenotypes in human tumours., *Immunology Today*. 18 (1997) 89–95.
- [93] C. a Gifford, a M. Assiri, M.C. Satterfield, T.E. Spencer, T.L. Ott, Receptor transporter protein 4 (RTP4) in endometrium, ovary, and peripheral blood leukocytes of pregnant and cyclic ewes., *Biology of Reproduction*. 79 (2008) 518–24.
- [94] J. Girdlestone, C. Milstein, Differential expression and interferon response of HLA class I genes in thymocyte lines and response variants., *European Journal of Immunology*. 18 (1988) 139–43.
- [95] V. Goebeler, M. Poeter, D. Zeuschner, V. Gerke, U. Rescher, Annexin A8 regulates late endosome organization and function., *Molecular Biology of the Cell*. 19 (2008) 5267–78.
- [96] M. Goggins, R.H. Hruban, S.E. Kern, BRCA2 is inactivated late in the development of pancreatic intraepithelial neoplasia: evidence and implications., *The American Journal of Pathology*. 156 (2000) 1767–71.
- [97] A. Goldstein, M. Fraser, Increased risk of pancreatic cancer in melanoma-prone kindreds with p16 INK4 mutations, *The New England Journal of Medicine*. 333 (1995) 970–974.
- [98] C.M. Gonçalves, M. a a Castro, T. Henriques, M.I. Oliveira, H.C. Pinheiro, C. Oliveira, et al., Molecular cloning and analysis of SSc5D, a new member of the scavenger receptor cysteine-rich superfamily., *Molecular Immunology*. 46 (2009) 2585–96.

- [99] G.B. Gonsalvez, L. Tian, J.K. Ospina, F.-M. Boisvert, A.I. Lamond, a G. Matera, Two distinct arginine methyltransferases are required for biogenesis of Sm-class ribonucleoproteins., *The Journal of Cell Biology*. 178 (2007) 733–40.
- [100] I. Goulet, S. Boisvenue, S. Mokas, R. Mazroui, J. Côté, TDRD3, a novel Tudor domain-containing protein, localizes to cytoplasmic stress granules., *Human Molecular Genetics*. 17 (2008) 3055–74.
- [101] I. Goulet, G. Gauvin, S. Boisvenue, J. Côté, Alternative splicing yields protein arginine methyltransferase 1 isoforms with distinct activity, substrate specificity, and subcellular localization., *The Journal of Biological Chemistry*. 282 (2007) 33009–21.
- [102] T. Grewal, C. Enrich, Annexins — Modulators of EGF receptor signalling and trafficking, *Cellular Signalling*. 21 (2009) 847–858.
- [103] A.E. Groebner, I. Rubio-Aliaga, K. Schulke, H.D. Reichenbach, H. Daniel, E. Wolf, et al., Increase of essential amino acids in the bovine uterine lumen during preimplantation development., *Reproduction (Cambridge, England)*. 141 (2011) 685–95.
- [104] Z. Gu, Y. Li, P. Lee, T. Liu, C. Wan, Z. Wang, Protein arginine methyltransferase 5 functions in opposite ways in the cytoplasm and nucleus of prostate cancer cells., *PloS One*. 7 (2012) e44033.
- [105] M.C. Guadamillas, A. Cerezo, M. a Del Pozo, Overcoming anoikis--pathways to anchorage-independent growth in cancer., *Journal of Cell Science*. 124 (2011) 3189–97.
- [106] E. Guccione, C. Bassi, F. Casadio, F. Martinato, M. Cesaroni, H. Schuchlantz, et al., Methylation of histone H3R2 by PRMT6 and H3K4 by an MLL complex are mutually exclusive., *Nature*. 449 (2007) 933–7.
- [107] S. Gysin, S. Lee, N. Dean, M. McMahon, Pharmacologic inhibition of RAF→ MEK→ ERK signaling elicits pancreatic cancer cell cycle arrest through induced expression of p27Kip1, *Cancer Research*. (2005) 4870–4880.
- [108] S. Hahn, M. Schutte, A. Hoque, DPC4, a candidate tumor suppressor gene at human chromosome 18q21. 1, *Science*. 107247 (1996) 21–24.
- [109] B. Haley, P.D. Zamore, Kinetic analysis of the RNAi enzyme complex., *Nature Structural & Molecular Biology*. 11 (2004) 599–606.
- [110] R. Hartmann, H. Olsen, p59OASL, a 2'–5' oligoadenylate synthetase like protein: a novel human gene related to the 2'–5' oligoadenylate synthetase family, *Nucleic Acid Research*. 26 (1998) 4121–4127.
- [111] P.O. Hassa, M. Covic, M.T. Bedford, M.O. Hottiger, Protein arginine methyltransferase 1 coactivates NF-kappaB-dependent gene expression synergistically with CARM1 and PARP1., *Journal of Molecular Biology*. 377 (2008) 668–78.
- [112] M. Hassan, M. Bondy, Risk factors for pancreatic cancer: case-control study, *The American Journal of Gastroenterology*. 102 (2007) 2696–2707.

- [113] H. Hata, M. Tatemichi, T. Nakadate, Involvement of Annexin A8 in the properties of pancreatic cancer., *Molecular Carcinogenesis*. (2012) 1–5.
- [114] R. Hauptmann, I.M.I. Edeltraud, G.B.O.D. I, H. Andree, C.P.M. Reutelingspergbr, Vascular anticoagulant beta: a novel human Ca²⁺/phospholipid binding protein that inhibits coagulation and phospholipase A2 activity. Its molecular cloning, expression and comparison with VAC-alpha., *J Biol Chem*. 264 (1989) 63–71.
- [115] T. He, Identification of c-MYC as a Target of the APC Pathway, *Science*. 281 (1998) 1509–1512.
- [116] A.F. Hezel, A.C. Kimmelman, B.Z. Stanger, N. Bardeesy, R. a Depinho, Genetics and biology of pancreatic ductal adenocarcinoma., *Genes & Development*. 20 (2006) 1218–49.
- [117] K. Higashimoto, P. Kuhn, D. Desai, X. Cheng, W. Xu, Phosphorylation-mediated inactivation of coactivator-associated arginine methyltransferase 1., *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 104 (2007) 12318–23.
- [118] S.R. Hingorani, E.F. Petricoin, A. Maitra, V. Rajapakse, C. King, M. a Jacobetz, et al., Preinvasive and invasive ductal pancreatic cancer and its early detection in the mouse., *Cancer Cell*. 4 (2003) 437–50.
- [119] V. Hornung, M. Guenther-Biller, C. Bourquin, A. Ablasser, M. Schlee, S. Uematsu, et al., Sequence-specific potent induction of IFN-alpha by short interfering RNA in plasmacytoid dendritic cells through TLR7., *Nature Medicine*. 11 (2005) 263–70.
- [120] Z. Hou, H. Peng, K. Ayyanathan, K.-P. Yan, E.M. Langer, G.D. Longmore, et al., The LIM protein AJUBA recruits protein arginine methyltransferase 5 to mediate SNAIL-dependent transcriptional repression., *Molecular and Cellular Biology*. 28 (2008) 3198–207.
- [121] Y. Hua, J. Zhou, Survival motor neuron protein facilitates assembly of stress granules., *FEBS Letters*. 572 (2004) 69–74.
- [122] J. Huang, W. Yao, Q. Zhu, S. Tu, F. Yuan, H. Wang, et al., XAF1 as a prognostic biomarker and therapeutic target in pancreatic cancer., *Cancer Science*. 101 (2010) 559–67.
- [123] Y. Huyen, O. Zgheib, R. a Ditullio, V.G. Gorgoulis, P. Zacharatos, T.J. Petty, et al., Methylated lysine 79 of histone H3 targets 53BP1 to DNA double-strand breaks., *Nature*. 432 (2004) 406–11.
- [124] D. Hyllus, C. Stein, K. Schnabel, PRMT6-mediated methylation of R2 in histone H3 antagonizes H3 K4 trimethylation, *Genes & Development*. (2007) 3369–3380.
- [125] K.T. Iida N, Identification and biochemical analysis of GRIN1 and GRIN2., *Methods Enzymol*. 390 (2004) 475–83.
- [126] T. Imaizumi, T. Matsumiya, Interferon-γ stimulates the expression of CX3CL1/fractalkine in cultured human endothelial cells, *The Tohoku Journal of Experimental Medicine*. 127 (2000) 127–139.
- [127] H. Iwasaki, T. Yada, Protein arginine methylation regulates insulin signaling in L6 skeletal muscle cells., *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 364 (2007) 1015–21.

- [128] A. Jackson, J. Burchard, J. Schelter, B. Chau, Widespread siRNA “off-target” transcript silencing mediated by seed region sequence complementarity, *Rna*. 12 (2006) 1179–1187.
- [129] M. Jansson, S.T. Durant, E.-C. Cho, S. Sheahan, M. Edelman, B. Kessler, et al., Arginine methylation regulates the p53 response., *Nature Cell Biology*. 10 (2008) 1431–9.
- [130] J. Jehle, P. a Schweizer, H. a Katus, D. Thomas, Novel roles for hERG K(+) channels in cell proliferation and apoptosis., *Cell Death & Disease*. 2 (2011) e193.
- [131] P. Jelinic, J.-C. Stehle, P. Shaw, The testis-specific factor CTCFL cooperates with the protein methyltransferase PRMT7 in H19 imprinting control region methylation., *PLoS Biology*. 4 (2006) e355.
- [132] Z. Ji, F. Mei, J. Xie, X. Cheng, Oncogenic KRAS activates hedgehog signaling pathway in pancreatic cancer cells., *The Journal of Biological Chemistry*. 282 (2007) 14048–55.
- [133] J. Jiang, C.-C. Hui, Hedgehog signaling in development and cancer., *Developmental Cell*. 15 (2008) 801–12.
- [134] S. Jones, X. Zhang, D.W. Parsons, J.C.-H. Lin, R.J. Leary, P. Angenendt, et al., Core signaling pathways in human pancreatic cancers revealed by global genomic analyses., *Science (New York, N.Y.)*. 321 (2008) 1801–6.
- [135] S. Joost, L. Almada, V. Rohhalter, P. Holz, GLI1 inhibition promotes epithelial-to-mesenchymal transition in pancreatic cancer cells, *Cancer Research*. 72 (2012) 88–99.
- [136] A.D. Judge, V. Sood, J.R. Shaw, D. Fang, K. McClintock, I. MacLachlan, Sequence-dependent stimulation of the mammalian innate immune response by synthetic siRNA., *Nature Biotechnology*. 23 (2005) 457–62.
- [137] R. Kalluri, M. Zeisberg, Fibroblasts in cancer., *Nature Reviews. Cancer*. 6 (2006) 392–401.
- [138] R. Kammerer, R. Riesenberger, C. Weiler, J. Lohrmann, J. Schleypen, W. Zimmermann, The tumour suppressor gene CEACAM1 is completely but reversibly downregulated in renal cell carcinoma., *The Journal of Pathology*. 204 (2004) 258–67.
- [139] Z. Karanjawala, P. Illei, New markers of pancreatic cancer identified through differential gene expression analyses: claudin 18 and annexin A8, *The American Journal of Surgical Pathology*. 32 (2008) 188–196.
- [140] K. Karikó, P. Bhuyan, J. Capodici, D. Weissman, Small interfering RNAs mediate sequence-independent gene suppression and induce immune activation by signaling through toll-like receptor 3., *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*. 172 (2004) 6545–9.
- [141] S. Kathiresan, C. Willer, G. Peloso, Common variants at 30 loci contribute to polygenic dyslipidemia, *Nature Genetics*. 41 (2008) 56–65.
- [142] a M. Kenney, D.H. Rowitch, Sonic hedgehog promotes G(1) cyclin expression and sustained cell cycle progression in mammalian neuronal precursors., *Molecular and Cellular Biology*. 20 (2000) 9055–67.

- [143] R. Kenworthy, D. Lambert, F. Yang, N. Wang, Z. Chen, H. Zhu, et al., Short-hairpin RNAs delivered by lentiviral vector transduction trigger RIG-I-mediated IFN activation., *Nucleic Acids Research*. 37 (2009) 6587–99.
- [144] K. Kessenbrock, V. Plaks, Z. Werb, Matrix metalloproteinases: regulators of the tumor microenvironment, *Cell*. 141 (2010) 52–67.
- [145] J. Kim, H. Sohn, S. Yoon, J. Oh, Identification of Gastric Cancer–Related Genes Using a cDNA Microarray Containing Novel Expressed Sequence Tags Expressed in Gastric Cancer Cells, *Clinical Cancer ...* (2005) 473–482.
- [146] J. Kim, S. Yoon, M. Won, S. Sim, HIP1R interacts with a member of Bcl-2 family, BCL2L10, and induces BAK-dependent cell death, *Cellular Physiology and Biochemistry*. 836 (2009).
- [147] S. Kim, Q. Li, C. V Dang, L. a Lee, Induction of ribosomal genes and hepatocyte hypertrophy by adenovirus-mediated expression of c-Myc in vivo., *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 97 (2000) 11198–202.
- [148] Y.-R. Kim, B.K. Lee, R.-Y. Park, N.T.X. Nguyen, J. a Bae, D.D. Kwon, et al., Differential CARM1 expression in prostate and colorectal cancers., *BMC Cancer*. 10 (2010) 197.
- [149] Y. Kirino, N. Kim, M. de Planell-Saguer, Arginine methylation of Piwi proteins catalysed by dPRMT5 is required for Ago3 and Aub stability, *Nature Cell Biology*. 11 (2009) 652–658.
- [150] J. Kirshner, D. Schumann, J.E. Shively, CEACAM1, a cell-cell adhesion molecule, directly associates with annexin II in a three-dimensional model of mammary morphogenesis., *The Journal of Biological Chemistry*. 278 (2003) 50338–45.
- [151] J. Kitano, Y. Yamazaki, K. Kimura, T. Masukado, Y. Nakajima, S. Nakanishi, Tamalin is a scaffold protein that interacts with multiple neuronal proteins in distinct modes of protein-protein association., *The Journal of Biological Chemistry*. 278 (2003) 14762–8.
- [152] M. a Kleinschmidt, G. Streubel, B. Samans, M. Krause, U.-M. Bauer, The protein arginine methyltransferases CARM1 and PRMT1 cooperate in gene regulation., *Nucleic Acids Research*. 36 (2008) 3202–13.
- [153] P. Kogerman, T. Grimm, L. Kogerman, D. Krause, a B. Undén, B. Sandstedt, et al., Mammalian suppressor-of-fused modulates nuclear-cytoplasmic shuttling of Gli-1., *Nature Cell Biology*. 1 (1999) 312–9.
- [154] M. Korc, B. Chandrasekar, Y. Yamanaka, H. Friess, M. Buchier, H.G. Beger, Overexpression of the epidermal growth factor receptor in human pancreatic cancer is associated with concomitant increases in the levels of epidermal growth factor and transforming growth factor alpha., *The Journal of Clinical Investigation*. 90 (1992) 1352–60.
- [155] M. Kornmann, T. Ishiwata, H.G. Beger, M. Korc, Fibroblast growth factor-5 stimulates mitogenic signaling and is overexpressed in human pancreatic cancer: evidence for autocrine and paracrine actions., *Oncogene*. 15 (1997) 1417–24.

- [156] K. Kowanzetz, K. Husnjak, CIN85 associates with multiple effectors controlling intracellular trafficking of epidermal growth factor receptors, *Molecular Biology of the Cell*. 15 (2004) 3155–3166.
- [157] P. Kuhn, R. Chumanov, Y. Wang, Y. Ge, R.R. Burgess, W. Xu, Automethylation of CARM1 allows coupling of transcription and mRNA splicing., *Nucleic Acids Research*. 39 (2011) 2717–26.
- [158] Y. Kuroda, H. Kuriyama, S. Kihara, K. Kishida, N. Maeda, T. Hibuse, et al., Insulin-mediated regulation of decidual protein induced by progesterone (DEPP) in adipose tissue and liver., *Hormone and Metabolic Research = Hormon- Und Stoffwechselforschung = Hormones et Métabolisme*. 42 (2010) 173–7.
- [159] M. Lacroix, S. El Messaoudi, G. Rodier, A. Le Cam, C. Sardet, E. Fabrizio, The histone-binding protein COPR5 is required for nuclear functions of the protein arginine methyltransferase PRMT5., *EMBO Reports*. 9 (2008) 452–8.
- [160] C. Lahoti, P. Thorner, Immunohistochemical detection of p53 in Wilms' tumors correlates with unfavorable outcome., *The American Journal of Pathology*. 148 (1996) 1577–1589.
- [161] B. Lambert, J. Vandeputte, S. Remacle, I. Bergiers, N. Simonis, J.-C. Twizere, et al., Protein interactions of the transcription factor Hoxa1., *BMC Developmental Biology*. 12 (2012) 29.
- [162] M. Lauth, A. Bergström, T. Shimokawa, U. Tostar, Q. Jin, V. Fendrich, et al., DYRK1B-dependent autocrine-to-paracrine shift of Hedgehog signaling by mutant RAS., *Nature Structural & Molecular Biology*. 17 (2010) 718–25.
- [163] D.W. Leaman, M. Chawla-Sarkar, K. Vyas, M. Rehemian, K. Tamai, S. Toji, et al., Identification of X-linked inhibitor of apoptosis-associated factor-1 as an interferon-stimulated gene that augments TRAIL Apo2L-induced apoptosis., *The Journal of Biological Chemistry*. 277 (2002) 28504–11.
- [164] J. Lee, J. Sayegh, J. Daniel, S. Clarke, M.T. Bedford, PRMT8, a new membrane-bound tissue-specific member of the protein arginine methyltransferase family., *The Journal of Biological Chemistry*. 280 (2005) 32890–6.
- [165] J.-H. Lee, J.R. Cook, Z.-H. Yang, O. Mirochnitchenko, S.I. Gunderson, A.M. Felix, et al., PRMT7, a new protein arginine methyltransferase that synthesizes symmetric dimethylarginine., *The Journal of Biological Chemistry*. 280 (2005) 3656–64.
- [166] L. Levy, C.S. Hill, Smad4 Dependency Defines Two Classes of Transforming Growth Factor Beta (TGF-Beta) Target Genes and Distinguishes TGF-Beta-Induced Epithelial-Mesenchymal Transition from Its Antiproliferative and Migratory Responses, 25 (2005) 8108–8125.
- [167] J. Li, A.W. Malaby, M. Famulok, H. Sabe, D.G. Lambright, V.W. Hsu, Grp1 plays a key role in linking insulin signaling to glut4 recycling., *Developmental Cell*. 22 (2012) 1286–98.
- [168] L. Li, E. Abdel Fattah, G. Cao, C. Ren, G. Yang, A. a Goltsov, et al., Glioma pathogenesis-related protein 1 exerts tumor suppressor activities through proapoptotic reactive oxygen species-c-Jun-NH2 kinase signaling., *Cancer Research*. 68 (2008) 434–43.

- [169] L. Li, C. Ren, G. Yang, E.A. Fattah, A. a Goltsov, S.M. Kim, et al., GLIPR1 suppresses prostate cancer development through targeted oncoprotein destruction., *Cancer Research*. 71 (2011) 7694–704.
- [170] X. Li, X. Hu, B. Patel, Z. Zhou, S. Liang, R. Ybarra, et al., H4R3 methylation facilitates beta-globin transcription by regulating histone acetyltransferase binding and H3 acetylation., *Blood*. 115 (2010) 2028–37.
- [171] Y. Li, Z. Wei, Y. Meng, X. Ji, b-Catenin up-regulates the expression of cyclinD1, c-myc and MMP-7 in human pancreatic cancer: relationships with carcinogenesis and metastasis, *World J Gastroenterol*. 11 (2005) 2117–2123.
- [172] X. Liang, E. Reed, J.J. Yu, Protein phosphatase 2A interacts with Chk2 and regulates phosphorylation at Thr-68 after cisplatin treatment of human ovarian cancer cells., *International Journal of Molecular Medicine*. 17 (2006) 703–8.
- [173] W. Lin, J.D. Gary, M.C. Yang, S. Clarke, H.R. Herschman, The Mammalian Immediate-early TIS21 Protein and the Leukemia-associated BTG1 Protein Interact with a Protein-arginine N-Methyltransferase, *Journal of Biological Chemistry*. 271 (1996) 15034–15044.
- [174] W. Lin, N. Rajbhandari, C. Liu, K. Sakamoto, Q. Zhang, A. a Triplett, et al., Dormant cancer cells contribute to residual disease in a model of reversible pancreatic cancer., *Cancer Research*. 73 (2013) 1821–30.
- [175] S. Liptay, L. Ludwig, Mitogenic and anti-apoptotic role of constitutive NF-kB/Rel activity in pancreatic cancer, *Int. J. Cancer*. 746 (2002) 735–746.
- [176] P. Liston, W.G. Fong, N.L. Kelly, S. Toji, T. Miyazaki, D. Conte, et al., Identification of XAF1 as an antagonist of XIAP anti-Caspase activity., *Nature Cell Biology*. 3 (2001) 128–33.
- [177] F. Liu, X. Zhao, F. Perna, L. Wang, P. Koppikar, O. Abdel-Wahab, et al., JAK2V617F-mediated phosphorylation of PRMT5 downregulates its methyltransferase activity and promotes myeloproliferation., *Cancer Cell*. 19 (2011) 283–94.
- [178] J. Liu, J.F. Jr, W. Lane, J. Friedman, Calcineurin is a common target of cyclophilin-cyclosporin A and FKBP-FK506 complexes, *Cell*. 66 (1991) 807–815.
- [179] Q. Liu, G. Dreyfuss, In vivo and in vitro arginine methylation of RNA-binding proteins., *Molecular and Cellular Biology*. 15 (1995) 2800–2808.
- [180] K.R. Loeb, a L. Haas, The interferon-inducible 15-kDa ubiquitin homolog conjugates to intracellular proteins., *The Journal of Biological Chemistry*. 267 (1992) 7806–13.
- [181] M. Löhr, G. Klöppel, P. Maisonneuve, A.B. Lowenfels, J. Lüttges, Frequency of K-ras mutations in pancreatic intraductal neoplasias associated with pancreatic ductal adenocarcinoma and chronic pancreatitis: a meta-analysis., *Neoplasia (New York, N.Y.)*. 7 (2005) 17–23.
- [182] K. Lotz, T. Kellner, M. Heitmann, I. Nazarenko, A. Noske, A. Malek, et al., Suppression of the TIG3 tumor suppressor gene in human ovarian carcinomas is mediated via mitogen-activated kinase-dependent and -independent mechanisms., *International Journal of Cancer. Journal International Du Cancer*. 116 (2005) 894–902.

- [183] W.D. Lowenfels AB, Maisonneuve P, DiMagno EP, Elitsur Y, Gates LK Jr, Perrault J, Hereditary pancreatitis and the risk of pancreatic cancer. International Hereditary Pancreatitis Study Group., *Journal of the National Cancer Institute*. 89 (1997) 442–446.
- [184] A.K. Lucio-Eterovic, M.M. Singh, J.E. Gardner, C.S. Veerappan, J.C. Rice, P.B. Carpenter, Role for the nuclear receptor-binding SET domain protein 1 (NSD1) methyltransferase in coordinating lysine 36 methylation at histone 3 with RNA polymerase II function., *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 107 (2010) 16952–7.
- [185] A. Maitra, N.V. Adsay, P. Argani, C. Iacobuzio-Donahue, A. De Marzo, J.L. Cameron, et al., Multicomponent analysis of the pancreatic adenocarcinoma progression model using a pancreatic intraepithelial neoplasia tissue microarray., *Modern Pathology : an Official Journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc*. 16 (2003) 902–12.
- [186] A. Maitra, N. Fukushima, Precursors to invasive pancreatic cancer, *Advances in Anatomic Pathology*. 12 (2005) 81–91.
- [187] D. Malka, P. Hammel, F. Maire, P. Rufat, I. Madeira, F. Pessione, et al., Risk of pancreatic adenocarcinoma in chronic pancreatitis., *Gut*. 51 (2002) 849–52.
- [188] K. Mathioudaki, A. Papadokostopoulou, A. Scorilas, D. Xynopoulos, N. Agnanti, M. Talieri, The PRMT1 gene expression pattern in colon cancer, *British Journal of Cancer*. 99 (2008) 2094–2099.
- [189] K. Mathioudaki, A. Scorilas, A. Ardavanis, P. Lymberi, E. Tsiambas, M. Devetzi, et al., Clinical evaluation of PRMT1 gene expression in breast cancer., *Tumour Biology : the Journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine*. 32 (2011) 575–82.
- [190] A.L. Means, I.M. Meszoely, K. Suzuki, Y. Miyamoto, A.K. Rustgi, R.J. Coffey, et al., Pancreatic epithelial plasticity mediated by acinar cell transdifferentiation and generation of nestin-positive intermediates., *Development (Cambridge, England)*. 132 (2005) 3767–76.
- [191] R. Mendez, N. Aptsiauri, A. Del Campo, I. Maleno, T. Cabrera, F. Ruiz-Cabello, et al., HLA and melanoma: multiple alterations in HLA class I and II expression in human melanoma cell lines from ESTDAB cell bank., *Cancer Immunology, Immunotherapy : CII*. 58 (2009) 1507–15.
- [192] D. Menendez, A. Inga, M.A. Resnick, The Biological Impact of the Human Master Regulator p53 Can Be Altered by Mutations That Change the Spectrum and Expression of Its Target Genes, *Molecular and Cellular Biology*. 26 (2006) 2297–2308.
- [193] D.R. Mercatante, J.L. Mohler, R. Kole, Cellular response to an antisense-mediated shift of Bcl-x pre-mRNA splicing and antineoplastic agents., *The Journal of Biological Chemistry*. 277 (2002) 49374–82.
- [194] S. El Messaoudi, Coactivator-associated arginine methyltransferase 1 (CARM1) is a positive regulator of the Cyclin E1 gene, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 103 (2006) 13351–13356.
- [195] R. Meyer, S.S. Wolf, M. Obendorf, PRMT2, a member of the protein arginine methyltransferase family, is a coactivator of the androgen receptor., *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*. 107 (2007) 1–14.

- [196] O.C. Micali, H.H. Cheung, S. Plenchette, S.L. Hurley, P. Liston, E.C. LaCasse, et al., Silencing of the XAF1 gene by promoter hypermethylation in cancer cells and reactivation to TRAIL-sensitization by IFN-beta., *BMC Cancer*. 7 (2007) 52.
- [197] J. Michaud-Levesque, M. Demeule, R. Béliveau, In vivo inhibition of angiogenesis by a soluble form of melanotransferrin., *Carcinogenesis*. 28 (2007) 280–8.
- [198] J. Michaud-Levesque, S. Richard, Thrombospondin-1 is a transcriptional repression target of PRMT6., *The Journal of Biological Chemistry*. 284 (2009) 21338–46.
- [199] P. Mill, R. Mo, M.C. Hu, L. Dagnino, N.D. Rosenblum, C.-C. Hui, Shh controls epithelial proliferation via independent pathways that converge on N-Myc., *Developmental Cell*. 9 (2005) 293–303.
- [200] T.B. Miranda, M. Miranda, A. Frankel, S. Clarke, PRMT7 is a member of the protein arginine methyltransferase family with a distinct substrate specificity., *The Journal of Biological Chemistry*. 279 (2004) 22902–7.
- [201] C. Miró-Julià, S. Roselló, V.G. Martínez, D.R. Fink, C. Escoda-Ferran, O. Padilla, et al., Molecular and functional characterization of mouse S5D-SRCRB: a new group B member of the scavenger receptor cysteine-rich superfamily., *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*. 186 (2011) 2344–54.
- [202] T.R.H. Mitchell, K. Glenfield, K. Jeyanthan, X.-D. Zhu, Arginine methylation regulates telomere length and stability., *Molecular and Cellular Biology*. 29 (2009) 4918–34.
- [203] Y. Miyamoto, A. Maitra, B. Ghosh, U. Zechner, P. Argani, C. a Iacobuzio-Donahue, et al., Notch mediates TGF alpha-induced changes in epithelial differentiation during pancreatic tumorigenesis., *Cancer Cell*. 3 (2003) 565–76.
- [204] M. Miyashita, H. Oshiumi, M. Matsumoto, T. Seya, DDX60, a DEXD/H box helicase, is a novel antiviral factor promoting RIG-I-like receptor-mediated signaling., *Molecular and Cellular Biology*. 31 (2011) 3802–19.
- [205] S. Mochida, S. Ikeo, J. Gannon, T. Hunt, Regulated activity of PP2A-B55 delta is crucial for controlling entry into and exit from mitosis in *Xenopus* egg extracts., *The EMBO Journal*. 28 (2009) 2777–85.
- [206] S. Mori, J.T. Chang, E.R. Andrechek, N. Matsumura, T. Baba, G. Yao, et al., Anchorage-independent cell growth signature identifies tumors with metastatic potential., *Oncogene*. 28 (2009) 2796–805.
- [207] J.P. Morris, D.A. Cano, S. Sekine, S.C. Wang, H. Matthias, β -catenin blocks Kras-dependent reprogramming of acini into pancreatic cancer precursor lesions in mice, *The Journal of Clinical Investigation*. 120 (2010) 508–520.
- [208] J.P. Morris, S.C. Wang, M. Hebrok, KRAS, Hedgehog, Wnt and the twisted developmental biology of pancreatic ductal adenocarcinoma., *Nature Reviews. Cancer*. 10 (2010) 683–95.

- [209] J.P. Morton, P. Timpson, S. a Karim, R. a Ridgway, D. Athineos, B. Doyle, et al., Mutant p53 drives metastasis and overcomes growth arrest/senescence in pancreatic cancer., *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 107 (2010) 246–51.
- [210] C. Moskaluk, R. Hruban, S. Kern, p16 and K-ras gene mutations in the intraductal precursors of human pancreatic adenocarcinoma, *Cancer Research*. (1997) 2140–2143.
- [211] K. a Mowen, B.T. Schurter, J.W. Fathman, M. David, L.H. Glimcher, Arginine methylation of NIP45 modulates cytokine gene expression in effector T lymphocytes., *Molecular Cell*. 15 (2004) 559–71.
- [212] A. Muggerrud, J. Rønneberg, Frequent aberrant DNA methylation of ABCB1, FOXC1, PPP2R2B and PTEN in ductal carcinoma in situ and early invasive breast cancer, *Breast Cancer Research : BCR*. (2010) 1–10.
- [213] D. Murphy, M. Junttila, L. Pouyet, Distinct thresholds govern Myc's biological output in vivo, *Cancer Cell*. 14 (2008) 447–457.
- [214] K. Murphy, K. Brune, C. Griffin, Evaluation of Candidate Genes MAP2K4, MADH4, ACVR1B, and BRCA2 in Familial Pancreatic Cancer Deleterious BRCA2 Mutations in 17%, *Cancer Research*. 62 (2002) 3789–3793.
- [215] L.C. Murtaugh, B.Z. Stanger, K.M. Kwan, D. a Melton, Notch signaling controls multiple steps of pancreatic differentiation., *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 100 (2003) 14920–5.
- [216] H. Naeem, D. Cheng, Q. Zhao, C. Underhill, M. Tini, M.T. Bedford, et al., The activity and stability of the transcriptional coactivator p/CIP/SRC-3 are regulated by CARM1-dependent methylation., *Molecular and Cellular Biology*. 27 (2007) 120–34.
- [217] P.N. Nair, D.T. De Armond, M.L. Adamo, W.E. Strodel, J.W. Freeman, Aberrant expression and activation of insulin-like growth factor-1 receptor (IGF-1R) are mediated by an induction of IGF-1R promoter activity and stabilization of IGF-1R mRNA and contributes to growth factor independence and increased survival of the panc, *Oncogene*. 20 (2001) 8203–14.
- [218] J. Najbauer, B. a Johnson, a L. Young, D.W. Aswad, 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., *The Journal of Biological Chemistry*. 268 (1993) 10501–9.
- [219] D. Nandy, D. Mukhopadhyay, Growth Factor Mediated Signaling in Pancreatic Pathogenesis, *Cancers*. 3 (2011) 841–871.
- [220] M. Neault, F. a Mallette, G. Vogel, J. Michaud-Levesque, S. Richard, Ablation of PRMT6 reveals a role as a negative transcriptional regulator of the p53 tumor suppressor., *Nucleic Acids Research*. 40 (2012) 9513–21.
- [221] O. Nolan-Stevaux, J. Lau, M.L. Truitt, G.C. Chu, M. Hebrok, M.E. Fernández-Zapico, et al., GLI1 is regulated through Smoothed-independent mechanisms in neoplastic pancreatic ducts and mediates PDAC cell survival and transformation., *Genes & Development*. 23 (2009) 24–36.

- [222] J.D. La O, L. Murtaugh, Notch and Kras in pancreatic cancer: at the crossroads of mutation, differentiation and signaling, *Cell Cycle*. 8 (2009) 1860–1864.
- [223] A. Ochi, C. Graffeo, Toll-like receptor 7 regulates pancreatic carcinogenesis in mice and humans, *The Journal of Clinical Investigation*. 122 (2012) 4118–4129.
- [224] K. Okamoto, H. Li, M.R. Jensen, T. Zhang, Y. Taya, S.S. Thorgeirsson, et al., Cyclin G recruits PP2A to dephosphorylate Mdm2., *Molecular Cell*. 9 (2002) 761–71.
- [225] C. Ou, M. LaBonte, P. Manegold, A coactivator role of CARM1 in the dysregulation of β -catenin activity in colorectal cancer cell growth and gene expression, *Molecular Cancer Research*. 9 (2011) 660–670.
- [226] M.L. Pak, T.M. Lakowski, D. Thomas, M.I. Vhuiyan, K. Hüsecken, A. Frankel, A protein arginine N-methyltransferase 1 (PRMT1) and 2 heteromeric interaction increases PRMT1 enzymatic activity., *Biochemistry*. 50 (2011) 8226–40.
- [227] S. Pal, Human SWI/SNF-associated PRMT5 methylates histone H3 arginine 8 and negatively regulates expression of ST7 and NM23 tumor suppressor genes, *Molecular and Cellular Biology*. 24 (2004) 9630–9645.
- [228] S. Pal, R. a Baiocchi, J.C. Byrd, M.R. Grever, S.T. Jacob, S. Sif, Low levels of miR-92b/96 induce PRMT5 translation and H3R8/H4R3 methylation in mantle cell lymphoma., *The EMBO Journal*. 26 (2007) 3558–69.
- [229] S. Pal, R. Yun, A. Datta, mSin3A/histone deacetylase 2-and PRMT5-containing Brg1 complex is involved in transcriptional repression of the Myc target gene cad, *Molecular and Cellular Biology*. 23 (2003) 7475–7487.
- [230] S.J. Park, Huntingtin-interacting protein 1-related is required for accurate congression and segregation of chromosomes., *BMB Reports*. 43 (2010) 795–800.
- [231] M.P. Paronetto, T. Achsel, A. Massiello, C.E. Chalfant, C. Sette, The RNA-binding protein Sam68 modulates the alternative splicing of Bcl-x., *The Journal of Cell Biology*. 176 (2007) 929–39.
- [232] M. Parwaresch, H. Radzun, Monocyte/macrophage-reactive monoclonal antibody Ki-M6 recognizes an intracytoplasmic antigen., *The American Journal of Pathology*. 125 (1986) 141–51.
- [233] M. Pasca di Magliano, A. V Biankin, P.W. Heiser, D. a Cano, P.J. a Gutierrez, T. Deramaudt, et al., Common activation of canonical Wnt signaling in pancreatic adenocarcinoma., *PLoS One*. 2 (2007) e1155.
- [234] M.R. Pawlak, C.A. Scherer, J. Chen, J. Michael, H.E. Ruley, Arginine N-Methyltransferase 1 Is Required for Early Postimplantation Mouse Development , but Cells Deficient in the Enzyme Are Viable Arginine N-Methyltransferase 1 Is Required for Early Postimplantation Mouse Development , but Cells Deficient in the Enz, *Molecular and Cellular Biology*. 20 (2000) 4859–4869.
- [235] M. Pertea, S.L. Salzberg, Between a chicken and a grape: estimating the number of human genes., *Genome Biology*. 11 (2010) 206.

- [236] R.S. Pillai, S. Chuma, piRNAs and their involvement in male germline development in mice., *Development, Growth & Differentiation*. 54 (2012) 78–92.
- [237] G. Pintucci, N. Quarto, D.B. Rifkin, Methylation of high molecular weight fibroblast growth factor-2 determines post-translational increases in molecular weight and affects its intracellular distribution., *Molecular Biology of the Cell*. 7 (1996) 1249–58.
- [238] P. Polakis, Wnt signaling in cancer., *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*. 4 (2012).
- [239] P. Pour, K. Kazakoff, K. Carlson, Inhibition of streptozotocin-induced islet cell tumors and N-nitrosobis (2-oxopropyl) amine-induced pancreatic exocrine tumors in Syrian hamsters by exogenous, *Cancer Research*. (1990) 1634–1639.
- [240] P.M. Pour, L. Weide, G. Liu, K. Kazakoff, M. Scheetz, I. Toshkov, et al., Experimental evidence for the origin of ductal-type adenocarcinoma from the islets of Langerhans., *The American Journal of Pathology*. 150 (1997) 2167–80.
- [241] A.G.M.T. Powell, P.G. Horgan, J. Edwards, The bodies fight against cancer: is human leucocyte antigen (HLA) class 1 the key?, *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*. 138 (2012) 723–8.
- [242] L. Qiao, Q. Gu, Y. Dai, Z. Shen, X. Liu, R. Qi, et al., XIAP-associated factor 1 (XAF1) suppresses angiogenesis in mouse endothelial cells., *Tumour Biology : the Journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine*. 29 (2008) 122–9.
- [243] N. Radulovich, N.-A. Pham, D. Strumpf, L. Leung, W. Xie, I. Jurisica, et al., Differential roles of cyclin D1 and D3 in pancreatic ductal adenocarcinoma., *Molecular Cancer*. 9 (2010) 24.
- [244] B.T. Ragel, W.T. Couldwell, D.L. Gillespie, R.L. Jensen, Identification of hypoxia-induced genes in a malignant glioma cell line (U-251) by cDNA microarray analysis., *Neurosurgical Review*. 30 (2007) 181–7; discussion 187.
- [245] R. Raijmakers, A.J.W. Zendman, W.V. Egberts, E.R. Vossenaar, J. Raats, C. Soede-Huijbregts, et al., Methylation of arginine residues interferes with citrullination by peptidylarginine deiminases in vitro., *Journal of Molecular Biology*. 367 (2007) 1118–29.
- [246] S. Ramón-Maiques, A.J. Kuo, D. Carney, A.G.W. Matthews, M. a Oettinger, O. Gozani, et al., The plant homeodomain finger of RAG2 recognizes histone H3 methylated at both lysine-4 and arginine-2., *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 104 (2007) 18993–8.
- [247] G. Regl, M. Kasper, H. Schnidar, T. Eichberger, Activation of the BCL2 promoter in response to Hedgehog/GLI signal transduction is predominantly mediated by GLI2, *Cancer Research*. (2004) 7724–7731.
- [248] C. Ren, L. Li, A. Goltsov, mRTP-1, a novel p53 target gene with proapoptotic activities, ... and *Cellular Biology*. 22 (2002) 3345–3357.
- [249] C. Ren, L. Li, G. Yang, T. Timme, A. Goltsov, RTP-1, a tumor suppressor inactivated by methylation in prostate cancer, *Cancer Research*. (2004) 969–976.

- [250] C. Ren, C.-H. Ren, L. Li, A. Goltsov, T.C. Thompson, Identification and characterization of RTVP1/GLIPR1-like genes, a novel p53 target gene cluster., *Genomics*. 88 (2006) 163–72.
- [251] J. Rho, S. Choi, C.-R. Jung, D.-S. Im, Arginine methylation of Sam68 and SLM proteins negatively regulates their poly(U) RNA binding activity., *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 466 (2007) 49–57.
- [252] S. Richard, M. Morel, P. Cl  roux, Arginine methylation regulates IL-2 gene expression: a role for protein arginine methyltransferase 5 (PRMT5)., *The Biochemical Journal*. 388 (2005) 379–86.
- [253] G. Rizzo, B. Renga, E. et al. Antonelli, The methyl transferase PRMT1 functions as co-activator of farnesoid X receptor (FXR)/9-cis retinoid X receptor and regulates transcription of FXR responsive genes, *Molecular Pharmacology*. 68 (2005) 551–558.
- [254] D.J. Robbins, K.E. Nybakken, R. Kobayashi, J.C. Sisson, J.M. Bishop, P.P. Th  ron, Hedgehog elicits signal transduction by means of a large complex containing the kinesin-related protein costal2., *Cell*. 90 (1997) 225–34.
- [255] Y. Robin-Lespinasse, S. Sentis, C. Kolytcheff, M.-C. Rostan, L. Corbo, M. Le Romancer, hCAF1, a new regulator of PRMT1-dependent arginine methylation., *Journal of Cell Science*. 120 (2007) 638–47.
- [256] Y. Rolland, M. Demeule, R. B  liveau, Melanotransferrin stimulates t-PA-dependent activation of plasminogen in endothelial cells leading to cell detachment., *Biochimica et Biophysica Acta*. 1763 (2006) 393–401.
- [257] M. Le Romancer, I. Treilleux, N. Leconte, Y. Robin-Lespinasse, S. Sentis, K. Bouchekioua-Bouzaghoul, et al., Regulation of estrogen rapid signaling through arginine methylation by PRMT1., *Molecular Cell*. 31 (2008) 212–21.
- [258] T. Rosenzweig, A. Ziv-Av, C. Xiang, W. Lu, S. Cazacu, D. Taler, et al., Related to testes-specific, vespid, and pathogenesis protein-1 (RTVP-1) is overexpressed in gliomas and regulates the growth, survival, and invasion of glioma cells., *Cancer Research*. 66 (2006) 4139–48.
- [259] R. Sala, W. Jefferies, B. Walker, J. Yang, J. Tiong, S.K.A. Law, et al., The human melanoma associated protein melanotransferrin promotes endothelial cell migration and angiogenesis in vivo., *European Journal of Cell Biology*. 81 (2002) 599–607.
- [260] J. Sayegh, K. Webb, D. Cheng, M.T. Bedford, S.G. Clarke, Regulation of protein arginine methyltransferase 8 (PRMT8) activity by its N-terminal domain., *The Journal of Biological Chemistry*. 282 (2007) 36444–53.
- [261] a Scarpa, P. Capelli, K. Mukai, G. Zamboni, T. Oda, C. Iacono, et al., Pancreatic adenocarcinomas frequently show p53 gene mutations., *The American Journal of Pathology*. 142 (1993) 1534–43.
- [262] B.K. Schaeffer, P.G. Terhune, D.S. Longnecker, Pancreatic carcinomas of acinar and mixed acinar/ductal phenotypes in Ela-1-myc transgenic mice do not contain c-K-ras mutations., *The American Journal of Pathology*. 145 (1994) 696–701.

- [263] C. Schild, M. Wirth, M. Reichert, R.M. Schmid, D. Saur, G. Schneider, PI3K signaling maintains c-myc expression to regulate transcription of E2F1 in pancreatic cancer cells., *Molecular Carcinogenesis*. 48 (2009) 1149–58.
- [264] M. Schlee, V. Hornung, G. Hartmann, siRNA and isRNA: two edges of one sword., *Molecular Therapy : the Journal of the American Society of Gene Therapy*. 14 (2006) 463–70.
- [265] C. Schleger, C. Verbeke, R. Hildenbrand, H. Zentgraf, U. Bleyl, c-MYC activation in primary and metastatic ductal adenocarcinoma of the pancreas: incidence, mechanisms, and clinical significance., *Modern Pathology : an Official Journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc.* 15 (2002) 462–9.
- [266] E. V Schmidt, The role of c-myc in regulation of translation initiation., *Oncogene*. 23 (2004) 3217–21.
- [267] B.T. Schurter, S.S. Koh, D. Chen, G.J. Bunick, J.M. Harp, B.L. Hanson, et al., Methylation of histone H3 by coactivator-associated arginine methyltransferase 1., *Biochemistry*. 40 (2001) 5747–56.
- [268] M. Serrano, A. Lin, M. McCurrach, D. Beach, S. Lowe, Oncogenic ras Provokes Premature Cell Senescence Associated with Accumulation of p53 and p16 INK4a, *Cell*. 88 (1997) 593–602.
- [269] J. Shankar, A. Messenberg, J. Chan, T.M. Underhill, L.J. Foster, I.R. Nabi, Pseudopodial actin dynamics control epithelial-mesenchymal transition in metastatic cancer cells., *Cancer Research*. 70 (2010) 3780–90.
- [270] E.C. Shen, M.F. Henry, V.H. Weiss, S.R. Valentini, P. a Silver, M.S. Lee, Arginine methylation facilitates the nuclear export of hnRNP proteins., *Genes & Development*. 12 (1998) 679–91.
- [271] W.-J. Shia, A.J. Okumura, M. Yan, A. Sarkeshik, M.-C. Lo, S. Matsuura, et al., PRMT1 interacts with AML1-ETO to promote its transcriptional activation and progenitor cell proliferative potential., *Blood*. 119 (2012) 4953–62.
- [272] D. Shin, D.J. Anderson, Isolation of arterial-specific genes by subtractive hybridization reveals molecular heterogeneity among arterial endothelial cells., *Developmental Dynamics : an Official Publication of the American Association of Anatomists*. 233 (2005) 1589–604.
- [273] E. Shtivelman, F.E. Cohent, J.M. Bishop, A human gene (AHNAK) encoding an unusually large protein with a 1.2- μ m polyionic rod structure, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 89 (1992) 5472–5476.
- [274] G. Singh, S.K. Singh, A. König, K. Reutlinger, M.D. Nye, T. Adhikary, et al., Sequential activation of NFAT and c-Myc transcription factors mediates the TGF-beta switch from a suppressor to a promoter of cancer cell proliferation., *The Journal of Biological Chemistry*. 285 (2010) 27241–50.
- [275] J.T. Siveke, H.C. Crawford, KRAS above and beyond - EGFR in pancreatic cancer., *Oncotarget*. 3 (2012) 1262–3.
- [276] A. Skoudy, I. Hernández-Muñoz, P. Navarro, Pancreatic ductal adenocarcinoma and transcription factors: role of c-Myc., *Journal of Gastrointestinal Cancer*. 42 (2011) 76–84.

- [277] C. a Sledz, M. Holko, M.J. de Veer, R.H. Silverman, B.R.G. Williams, Activation of the interferon system by short-interfering RNAs., *Nature Cell Biology*. 5 (2003) 834–9.
- [278] G. a M. Smith, H.-W. Tsui, E.W. Newell, X. Jiang, X.-P. Zhu, F.W.L. Tsui, et al., Functional up-regulation of HERG K⁺ channels in neoplastic hematopoietic cells., *The Journal of Biological Chemistry*. 277 (2002) 18528–34.
- [279] C.S. and J.M.G.-P. Sofía T Menéndez, Juan P Rodrigo, Saúl Álvarez-Teijeiro, M Ángeles Villaronga, Eva Allonca, Aitana Vallina, Aurora Astudillo, Francisco Barros, Role of HERG1 potassium channel in both malignant transformation and disease progression in head and neck carcinomas, *Modern Pathology*. 25 (2012) 1069–1078.
- [280] B. Stanger, Y. Dor, Dissecting the cellular origins of pancreatic cancer, *Cell Cycle*. 5 (2006) 43–46.
- [281] B.Z. Stanger, B. Stiles, G.Y. Lauwers, N. Bardeesy, M. Mendoza, Y. Wang, et al., Pten constrains centroacinar cell expansion and malignant transformation in the pancreas., *Cancer Cell*. 8 (2005) 185–95.
- [282] T. Stein, K.N. Price, J.S. Morris, V.J. Heath, R.K. Ferrier, A.K. Bell, et al., Annexin A8 is up-regulated during mouse mammary gland involution and predicts poor survival in breast cancer., *Clinical Cancer Research : an Official Journal of the American Association for Cancer Research*. 11 (2005) 6872–9.
- [283] G. Streubel, C. Bouchard, H. Berberich, M.S. Zeller, S. Teichmann, J. Adamkiewicz, et al., PRMT4 Is a Novel Coactivator of c-Myb-Dependent Transcription in Haematopoietic Cell Lines, *PLoS Genetics*. 9 (2013) e1003343.
- [284] Y. Suryo Rahmanto, L.L. Dunn, D.R. Richardson, The melanoma tumor antigen, melanotransferrin (p97): a 25-year hallmark--from iron metabolism to tumorigenesis., *Oncogene*. 26 (2007) 6113–24.
- [285] R. Swiercz, D. Cheng, D. Kim, M.T. Bedford, Ribosomal protein rpS2 is hypomethylated in PRMT3-deficient mice., *The Journal of Biological Chemistry*. 282 (2007) 16917–23.
- [286] K. Takahashi, E. Nakajima, K. Suzuki, Involvement of protein phosphatase 2A in the maintenance of E-cadherin-mediated cell-cell adhesion through recruitment of IQGAP1., *Journal of Cellular Physiology*. 206 (2006) 814–20.
- [287] J. Tan, P.L. Lee, Z. Li, X. Jiang, Y.C. Lim, S.C. Hooi, et al., B55 β -associated PP2A complex controls PDK1-directed myc signaling and modulates rapamycin sensitivity in colorectal cancer., *Cancer Cell*. 18 (2010) 459–71.
- [288] J. Tang, PRMT1 Is the Predominant Type I Protein Arginine Methyltransferase in Mammalian Cells, *Journal of Biological Chemistry*. 275 (2000) 7723–7730.
- [289] J. Tang, J.D. Gary, S. Clarke, H.R. Herschman, PRMT 3, a type I protein arginine N-methyltransferase that differs from PRMT1 in its oligomerization, subcellular localization, substrate specificity, and regulation., *The Journal of Biological Chemistry*. 273 (1998) 16935–45.

- [290] W. Tee, M. Pardo, T. Theunissen, Prmt5 is essential for early mouse development and acts in the cytoplasm to maintain ES cell pluripotency, *Genes & Development & Development*. (2010) 2772–2777.
- [291] R.M.B. Teles, T.G. Graeber, S.R. Krutzik, D. Montoya, M. Schenk, D.J. Lee, et al., Type I interferon suppresses type II interferon-triggered human anti-mycobacterial responses., *Science (New York, N.Y.)*. 339 (2013) 1448–53.
- [292] S.P. Thayer, M.P. di Magliano, P.W. Heiser, C.M. Nielsen, D.J. Roberts, G.Y. Lauwers, et al., Hedgehog is an early and late mediator of pancreatic cancer tumorigenesis., *Nature*. 425 (2003) 851–6.
- [293] a. Thies, CEACAM1 Expression in Cutaneous Malignant Melanoma Predicts the Development of Metastatic Disease, *Journal of Clinical Oncology*. 20 (2002) 2530–2536.
- [294] M. Thomassen, Q. Tan, T. a Kruse, Gene expression meta-analysis identifies chromosomal regions and candidate genes involved in breast cancer metastasis., *Breast Cancer Research and Treatment*. 113 (2009) 239–49.
- [295] T. Thorslund, S.C. West, BRCA2: a universal recombinase regulator., *Oncogene*. 26 (2007) 7720–30.
- [296] H. Tian, C. a Callahan, K.J. DuPree, W.C. Darbonne, C.P. Ahn, S.J. Scales, et al., Hedgehog signaling is restricted to the stromal compartment during pancreatic carcinogenesis., *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 106 (2009) 4254–9.
- [297] M. Ueta, T. Kawai, N. Yokoi, S. Akira, S. Kinoshita, Contribution of IPS-1 to polyI:C-induced cytokine production in conjunctival epithelial cells., *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 404 (2011) 419–23.
- [298] K.H. Vousden, C. Prives, Blinded by the Light: The Growing Complexity of p53., *Cell*. 137 (2009) 413–31.
- [299] S. Wagner, S. Weber, M. a Kleinschmidt, K. Nagata, U.-M. Bauer, SET-mediated promoter hypoacetylation is a prerequisite for coactivation of the estrogen-responsive pS2 gene by PRMT1., *The Journal of Biological Chemistry*. 281 (2006) 27242–50.
- [300] H. Wang, Z.Q. Huang, L. Xia, Q. Feng, H. Erdjument-Bromage, B.D. Strahl, et al., Methylation of histone H4 at arginine 3 facilitating transcriptional activation by nuclear hormone receptor., *Science (New York, N.Y.)*. 293 (2001) 853–7.
- [301] J. Wang, Q. Gu, M. Li, W. Zhang, M. Yang, B. Zou, et al., Identification of XAF1 as a novel cell cycle regulator through modulating G2/M checkpoint and interaction with checkpoint kinase 1 in gastrointestinal cancer, *Carcinogenesis*. 30 (2009) 1507–1516.
- [302] L. Wang, S. Pal, S. Sif, Protein arginine methyltransferase 5 suppresses the transcription of the RB family of tumor suppressors in leukemia and lymphoma cells., *Molecular and Cellular Biology*. 28 (2008) 6262–77.

- [303] N. Wang, Q. Dong, J. Li, R. Jangra, Viral induction of the zinc finger antiviral protein is IRF3-dependent but NF- κ B-independent, *Journal of Biological Chemistry*. 285 (2010) 6080–6090.
- [304] S. Wang, X. Kang, S. Cao, H. Cheng, D. Wang, J. Geng, Calcineurin/NFATc1 pathway contributes to cell proliferation in hepatocellular carcinoma., *Digestive Diseases and Sciences*. 57 (2012) 3184–8.
- [305] W. Wang, J. Abbruzzese, D. Evans, The nuclear factor- κ B RelA transcription factor is constitutively activated in human pancreatic adenocarcinoma cells, *Clinical Cancer Research : an Official Journal of the American Association for Cancer Research*. (1999) 119–127.
- [306] Y. Wang, J. Wysocka, J. Sayegh, Y.-H. Lee, J.R. Perlin, L. Leonelli, et al., Human PAD4 regulates histone arginine methylation levels via demethyliminination., *Science (New York, N.Y.)*. 306 (2004) 279–83.
- [307] Z. Wang, S. Banerjee, A. Ahmad, Y. Li, A.S. Azmi, J.R. Gunn, et al., Activated K-ras and INK4a/Arf deficiency cooperate during the development of pancreatic cancer by activation of Notch and NF- κ B signaling pathways., *PLoS One*. 6 (2011) e20537.
- [308] H. Watanabe, K. Nonoguchi, T. Sakurai, T. Masuda, K. Itoh, J. Fujita, A novel protein Depp, which is induced by progesterone in human endometrial stromal cells activates Elk-1 transcription factor., *Molecular Human Reproduction*. 11 (2005) 471–6.
- [309] M.G. Wathélet, J. Szpirer, C.B. Nols, I.M. Clauss, L. De Wit, M.Q. Islam, et al., Cloning and chromosomal location of human genes inducible by type I interferon., *Somatic Cell and Molecular Genetics*. 14 (1988) 415–26.
- [310] D. White, K. McShea, GRASP and IPCEF promote ARF-to-Rac signaling and cell migration by coordinating the association of ARNO/cytohesin 2 with Dock180, *Molecular Biology of the Cell*. 21 (2010) 562–571.
- [311] R. Wilentz, C. Iacobuzio-Donahue, Loss of expression of Dpc4 in pancreatic intraepithelial neoplasia: evidence that DPC4 inactivation occurs late in neoplastic progression, *Cancer Research*. (2000) 2002–2006.
- [312] J.J.Y. Wong, Y.F. Pung, N.S.-K. Sze, K.-C. Chin, HERC5 is an IFN-induced HECT-type E3 protein ligase that mediates type I IFN-induced ISGylation of protein targets., *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 103 (2006) 10735–40.
- [313] J. Wu, W. Xu, Histone H3R17me2a mark recruits human RNA polymerase-associated factor 1 complex to activate transcription., *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 109 (2012) 5675–80.
- [314] Y.-H. Xiao, X.-H. Li, T. Tan, T. Liang, H. Yi, M.-Y. Li, et al., Identification of GLIPR1 tumor suppressor as methylation-silenced gene in acute myeloid leukemia by microarray analysis., *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*. 137 (2011) 1831–40.
- [315] Y. Xu, M. Johansson, A. Karlsson, Human UMP-CMP kinase 2, a novel nucleoside monophosphate kinase localized in mitochondria., *The Journal of Biological Chemistry*. 283 (2008) 1563–71.

- [316] D. Yadav, A.B. Lowenfels, The epidemiology of pancreatitis and pancreatic cancer., *Gastroenterology*. 144 (2013) 1252–61.
- [317] N. Yadav, J. Lee, J. Kim, J. Shen, M.C.-T. Hu, C.M. Aldaz, et al., Specific protein methylation defects and gene expression perturbations in coactivator-associated arginine methyltransferase 1-deficient mice., *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 100 (2003) 6464–8.
- [318] M.N. Yamada-Okabe T, Decreased serum dependence in the growth of NIH3T3 cells from the overexpression of human nuclear receptor-binding SET-domain-containing protein 1 (NSD1) or fission yeast su(var)3-9, enhancer-of-zeste, trithorax 2 (SET2)., *Cell Biochemistry and Function*. 26 (2008) 146–150.
- [319] K. Yamagata, H. Daitoku, Y. Takahashi, K. Namiki, K. Hisatake, K. Kako, et al., Arginine methylation of FOXO transcription factors inhibits their phosphorylation by Akt., *Molecular Cell*. 32 (2008) 221–31.
- [320] Y. Yang, M.T. Bedford, Protein arginine methyltransferases and cancer., *Nature Reviews. Cancer*. 13 (2013) 37–50.
- [321] Y. Yang, Y. Lu, A. Espejo, J. Wu, W. Xu, TDRD3 is an effector molecule for arginine-methylated histone marks, *Molecular Cell*. 40 (2010) 1016–1023.
- [322] R.L. Yauch, S.E. Gould, S.J. Scales, T. Tang, H. Tian, C.P. Ahn, et al., A paracrine requirement for hedgehog signalling in cancer., *Nature*. 455 (2008) 406–10.
- [323] M. Yoshimatsu, G. Toyokawa, S. Hayami, M. Unoki, T. Tsunoda, H.I. Field, et al., Dysregulation of PRMT1 and PRMT6, Type I arginine methyltransferases, is involved in various types of human cancers., *International Journal of Cancer. Journal International Du Cancer*. 128 (2011) 562–73.
- [324] T. Yoshimoto, M. Boehm, M. Olive, M.F. Crook, H. San, T. Langenickel, et al., The arginine methyltransferase PRMT2 binds RB and regulates E2F function., *Experimental Cell Research*. 312 (2006) 2040–53.
- [325] M.C. Yu, The Role of Protein Arginine Methylation in mRNP Dynamics., *Molecular Biology International*. 2011 (2011) 163827.
- [326] Z. Yu, T. Chen, J. Hébert, E. Li, S. Richard, A mouse PRMT1 null allele defines an essential role for arginine methylation in genome maintenance and cell proliferation., *Molecular and Cellular Biology*. 29 (2009) 2982–96.
- [327] M. Zeisberg, E. Neilson, Biomarkers for epithelial-mesenchymal transitions, *The Journal of Clinical Investigation*. 119 (2009) 1429–1437.
- [328] Y. Zhang, J.P. Morris, W. Yan, H.K. Schofield, A. Gurney, D.M. Simeone, et al., Canonical Wnt Signaling Is Required for Pancreatic Carcinogenesis., *Cancer Research*. 73 (2013) 4909–4922.
- [329] X. Zhao, V. Jankovic, A. Gural, Methylation of RUNX1 by PRMT1 abrogates SIN3A binding and potentiates its transcriptional activity, *Genes & Development*. 22 (2008) 640–653.

- [330] J. Zhong, R.-X. Cao, X.-Y. Zu, T. Hong, J. Yang, L. Liu, et al., Identification and characterization of novel spliced variants of PRMT2 in breast carcinoma., *The FEBS Journal*. 279 (2012) 316–35.
- [331] A. Ziv-Av, D. Taller, M. Attia, C. Xiang, H.K. Lee, S. Cazacu, et al., RTVP-1 expression is regulated by SRF downstream of protein kinase C and contributes to the effect of SRF on glioma cell migration., *Cellular Signalling*. 23 (2011) 1936–43.
- [332] B. Zou, C.S. Chim, R. Pang, H. Zeng, Y. Dai, R. Zhang, et al., XIAP-associated factor 1 (XAF1), a novel target of p53, enhances p53-mediated apoptosis via post-translational modification., *Molecular Carcinogenesis*. 51 (2012) 422–32.
- [333] L. Zou, H. Zhang, C. Du, X. Liu, S. Zhu, W. Zhang, et al., Correlation of SRSF1 and PRMT1 expression with clinical status of pediatric acute lymphoblastic leukemia., *Journal of Hematology & Oncology*. 5 (2012) 42.
- [334] C.I. Zurita-Lopez, T. Sandberg, R. Kelly, S.G. Clarke, Human protein arginine methyltransferase 7 (PRMT7) is a type III enzyme forming ω -NG-monomethylated arginine residues., *The Journal of Biological Chemistry*. 287 (2012) 7859–70.

7 ANHANG

7.1 VERZEICHNIS DER AKADEMISCHEN LEHRER

Meine akademischen Lehrer in Marburg waren:

Dr.	Adamkiewicz	Prof. Dr.	Lill
Prof. Dr.	Bastians	Prof. Dr.	Liss
Prof. Dr.	Bauer	PD Dr.	Löffler
Prof. Dr.	Becker	Prof. Dr.	Lohoff
PD Dr.	Bette	PD Dr.	Lüers
Prof. Dr.	Brehm	Prof. Dr.	Maisner
Prof. Dr.	Daut	Dr.	Mühlenhoff
Prof. Dr.	Eilers	Prof. Dr.	Müller
Prof. Dr.	Elsässer	PD Dr.	Müller-Brüsselbach
PD Dr.	Fritz	Dr.	Nain
PD Dr.	Garn	Dr.	Oeffner
Prof. Dr.	Garten	Prof. Dr.	Petz
Prof. Dr.	Gemsa	Prof. Dr.	Renkawitz-Pohl
Prof. Dr.	Grzeschik	Prof. Dr.	Röhm
Dr.	Hasilik	Prof. Dr.	Röper
Prof. Dr.	Hassel	Dr.	Rosenplänter
Prof. Dr.	Hinz	PD Dr.	Schrader
PD Dr.	Huber	Prof. Dr.	Schwarz
Prof. Dr.	Jacob	Prof. Dr.	Suske
Prof. Dr.	Jakob	PD Dr.	Westermann
Prof. Dr.	Jungclas	Dr.	Wrocklage
Prof. Dr.	Koolman	Dr.	Yu
Prof. Dr.	Krebber		

7.2 PUBLIKATIONEN

Bornholdt D, Oeffner F, König A, Happle R, Alanay Y, et al. (2009) PORCN mutations in focal dermal hypoplasia: coping with lethality. *Human mutation* 30: E618–28.

Streubel G, Bouchard C, Berberich H, Zeller MS, Teichmann S, et al. (2013) PRMT4 Is a Novel Coactivator of c-Myb-Dependent Transcription in Haematopoietic Cell Lines. *PLoS Genetics* 9: e1003343.