Die kooperative Rolle der Methyltransferasen CARM1 und PRMT1 in der Genregulation

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

dem Fachbereich Biologie
der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von
Markus Andreas Kleinschmidt
aus Wuppertal

Marburg/Lahn, November 2006

Vom Fachbereich Biologie
der Philipps-Universität Marburg als Dissertation am 29.11.2006 angenommen.

Erstgutachter: Prof. Dr. Renate Renkawitz-Pohl
Zweitgutachter: Prof. Dr. Uta-Maria Bauer

Weitere Mitglieder der Prüfungskomission:
Prof. Dr. Michael Bölker
Prof. Dr. Uwe Maier

Tag der mündlichen Prüfung am 15.12.2006

Inhaltsverzeichnis

1 Zusammenfassung 1
2 Einleitung 2
2.1 Die Entdeckung der enzymatischen Argininmethylierung 2
2.2 Die biologische Bedeutung der Argininmethylierung 7
2.2.1 Zelluläre Prozesse 7
2.2.2 *Knockout*-Mäuse 10
2.3 Histonmodifikationen 11
2.4 Die kooperative Rolle von CARM1 und PRMT1 als Coaktivatoren der Transkription 12
2.5 CARM1 und PRMT1 als Coaktivatoren für verschiedene Transkriptionsfaktoren 15
2.6 Argininmethyltransferasen in JAK/STAT-Signalwegen 16
2.7 Zielsetzung 20
3 Material 21
3.1 Antikörper 21
3.1.1 Erstantikörper 21
3.1.2 Zweitantikörper 21
3.2 Bakterienstämme 22
3.3 Biochemikalien 22
3.4 cDNA-Chip, human (Microarray) 22
3.5 Chemikalien 23
3.6 Enzyme 23
3.7 Geräte 23
3.8 Kits 24
3.9 Oligonukleotide 24
3.10 Puffer und Medien 26
3.11 Radioaktivität 27
3.12 siRNA 28
3.13 Vektoren 29
3.14 Verbrauchsmaterialien, fest 29
3.15 Zelllinien 30

4 Methoden 31
4.1 Mikrobiologische und Molekularbiologische Methoden 31
4.1.1 Plasmidpräparation aus *E.coli* (Minipräparation) 31
4.1.2 Plasmidpräparation aus *E.coli* (Maxipräparation) 31
4.1.3 Fällung von DNA mit Ethanol/Natriumacetat 32
4.1.4 Fällung von DNA mit Isopropanol 32
4.1.5 Auftrennung der DNA in Agarosegelen 32
4.1.6 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren mit einem Spektralphotometer 33
4.1.7 Sequenzanalysen der DNA 33
4.1.8 Präparation von Gesamt-RNA aus Säugerzellen 33
4.1.9 Auftrennung der RNA in Formaldehyd-Agarosegelen 34
4.1.10 Northern Blot 34
4.1.11 Herstellung einer radiaktiven Sonde und Hybridisierung eines Northern Blots 35
4.1.12 cDNA-Synthese 35
4.1.13 Polymerase-Kettenreaktion (*polymerase chain reaction*, PCR) 36
4.1.14 quantitative Polymerasekettenreaktion (qPCR, "Echtzeit"-PCR) 37
4.1.15 Erstellung eines Genexpressionsprofils (Microarray-Analyse) 39
4.1.16 Herstellung chemisch kompetenter Zellen (*E.coli*) 42
4.1.17 Transformation chemisch kompetenter Zellen (*E.coli*) 42
4.2 Proteinbiochemische Methoden 42
4.2.1 Proteinkonzentrationsbestimmung nach Bradford (Bradford, 1976) 42
4.2.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE) von Proteinen (Laemmli 1970) 43
4.2.3 Färbung von SDS-Gelen mit Coomassie 44
4.2.4 Western Blot, nass 44
4.2.5 Immunfärbung 44
4.2.6 Präparation von Gesamtprotein aus Säugerzellen (IPH-Extrakt) 45
4.2.7 Immunpräzipitation 46
4.2.8 Methyltransferase-Assay (*in vitro*) 46
4.2.9 Luciferase-Assay 47
4.3 Zellbiologische Methoden und Zellkultur 47
4.3.1 Kultivierung von Säugerzellen 47

4.3.2 Transfektion von DNA (Calcium-Phosphat) 48
4.3.3 Transfektion von DNA (Fugene) 49
4.3.4 Transfektion von siRNA (Oligofectamine) 49
4.3.5 Immunfluoreszenz 49
4.3.6 Einfrieren und Auftauen von Zellen 50
5 Ergebnisse 51
5.1 PRMT werden von verschiedenen Zelllinien exprimiert 51
5.2 Subzelluläre Lokalisation von CARM1 und PRMT1 52
5.3 Genexpressionsanalyse von HEK293 Zellen nach Transfektion von siRNA gegen CARM1 52
5.4 Der durch siCARM1 hervorgerufene Phänotyp wird durch CARMER nicht aufgehoben 55
5.5 Der durch siCARM1 hervorgerufene Phänotyp beruht auf einem *off-target* Effekt 57
5.6 Verstärkte Phosphorylierung der MAP-Kinase ERK nach Transfektion von siCARM1 in HEK293 Zellen 58
5.7 Eine neue Strategie für die Identifikation von Zielgenen 60
5.8 Etablierung des Einzel- und Doppel*knockdown* von CARM1 und PRMT1 in HeLa Zellen 61
5.9 CARM1 und PRMT1 kooperieren in der Genregulation 63
5.10 Promotoranalyse gemeinsamer Zielgene von CARM1 und PRMT1 68
5.11 CARM1 und PRMT1 kooperieren in der STAT5 vermittelten Genaktivierung 69
5.12 CARM1 und PRMT1 sind essentiell für die IL-4 vermittelte Zielgenaktivierung in HeLa Zellen 71
6 Diskussion 74
6.1 siRNA können unerwünschte Effekte in der Zelle hervorrufen 74
6.2 Potentielle Effektoren von siCARM1 75
6.3 CARM1 und PRMT1 sind kooperative Coaktivatoren für STAT5 78
6.4 CARM1$^{-/-}$ und IL-7R$^{-/-}$ Mäuse besitzen den gleichen Phänotyp in Bezug auf die Entwicklung von Thymocyten 80
6.5 Gemeinsame Rolle für CARM1 und STAT5 in der Tumorigenese 83
6.6 Nach Verlust von CARM1 und PRMT1 liegt die Hälfte aller Gene im Expressionsprofil hochreguliert vor 84

6.7 Ausblick 85
7 Literaturverzeichnis 87
8 Abkürzungsverzeichnis 98

1 Zusammenfassung

Die Argininmethyltransferasen CARM1 und PRMT1 sind transkriptionelle Coaktivatoren. Die große Mehrzahl bisheriger Publikationen beschreibt jeweils eine der beiden Methyltransferasen als Coaktivator für bestimmte Transkriptionsfaktoren. Für nukleäre Hormonrezeptoren sowie p53 wurde jedoch eine kooperative Rolle beider Enzyme in der Genaktivierung beschrieben.

Um neue Zielgene für CARM1 zu identifizieren, wurde zunächst ein Genexpressionsprofil mittels eines humanen 11552 cDNA-Chips erstellt. Die *immediate early response* Gene Egr1 und c-Fos lagen nach siRNA vermitteltem Verlust von CARM1 in HEK293 Zellen am stärksten dereguliert vor. Die gefundenen Gene ließen sich jedoch nicht als CARM1 abhängige Gene bestätigen, sondern wurden vielmehr von unbekannten Effektoren der siRNA reguliert.

Um solche *off-target* Effekte in weiteren Experimenten erkennen zu können, wurden alle folgenden Analysen mit zwei alternativen siRNA durchgeführt. In einem erweiterten Ansatz wurden Genexpressionsanalysen nach Verlust von jeweils einer sowie beider Methyltransferasen, CARM1 und PRMT1, in HeLa Zellen durchgeführt. Das Fehlen einer Methyltransferase ergab kaum messbare Veränderung im Expressionsprofil. Nach Verlust beider Enzyme lagen jedoch fünfundvierzig Gene mehr als zweifach dereguliert vor. Die Promotoranalyse der Gene, die nach Verlust beider Enzyme schwächer exprimiert wurden, ergab eine Anreicherung von Bindestellen unter anderem für den Transkriptionsfaktor STAT5. In einem Reportergenassay zeigte sich, dass CARM1 und PRMT1 kooperativ in der STAT5 vermittelten Promoteraktivierung wirken.

Interleukin-4 stimuliert die Aktivierung von STAT5 in HeLa Zellen. Nach Verlust beider Enzyme konnten gemeinsame Zielgene von CARM1 und PRMT1 durch Interleukin-4 nicht mehr induziert werden. Die gleichen Zielgene waren durch Serum jedoch weiterhin aktivierbar.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass CARM1 und PRMT1 transkriptionelle Coaktivatoren für STAT5 sind. Die zwischen CARM1 und PRMT1 vorliegenden kooperativen Effekte werden in dieser Arbeit zum ersten Mal in einem Genexpressionsprofil aufgedeckt.

2 Einleitung

2.1 Die Entdeckung der enzymatischen Argininmethylierung

1967 stießen Woon Ki Paik und Sangduk Kim bei ihren Untersuchungen zur Lysinmethylierung von Histonen auf einen bemerkenswerten Fund. Bei der Chromatografie säurehydrolysierter Histone aus Kalbsthymus, die zuvor mit radioaktivem S-Adenosylmethionin inkubiert worden waren, fanden sich vier Signale. Zwei davon ließen sich nach Vergleich mit dem Elutionsprofil einiger basischer Aminosäuren als Methylierungen des Lysins (ε-N-Methyl und ε-N-Dimethyl) bestimmen. Die beiden unbekannten Signale entstammten Fraktionen, die vor und nach einem Arginin eluierten (Paik and Kim, 1967). Paik und Kim belegten, dass es sich bei diesen Signalen tatsächlich um methyliertes Arginin handelte (Paik and Kim, 1968). Es gelang ihnen auch, eine entsprechende Methyltransferaseaktivität anzureichern, die sie Protein Methylase I nannten.
Bald darauf gelang es N^G, N^G- und N^G, N'^G-Dimethylarginine, also asymmetrisch und symmetrisch dimethylierte Arginine, im humanen Urin nachzuweisen (Kakimoto and Akazawa, 1970). Der Dimethylierung der Guanidinogruppe des Arginin geht jedoch der Katalyseschritt der Monomethylierung voraus (Nakajima et al., 1971) (Abb. 1).
1971 entdeckten zwei Arbeitsgruppen die symmetrische Dimethylierung des *myelin basic protein* (MBP) an Arginin 107 (Baldwin and Carnegie, 1971; Brostoff and Eylar, 1971). Myelin spielt bei der Weiterleitung von elektrischen Signalen im Nervensystem eine Rolle. Neuronale Axone werden durch eine sogenannte Myelinscheide isoliert. Es wurde nachgewiesen, dass die Argininmethylierung von MBP für die kompakte Strukturierung des Myelins notwendig ist (Amur et al., 1986; Young et al., 1987). Interessanterweise zeigen Mäuse, die fehlerhaft in Bezug auf die Myelinisierung sind, eine reduzierte Methyltransferaseaktivität für MBP (Kim et al., 1984). Lange vor der Klonierung von Methyltransferasen waren verschiedene Substrate der Argininmethylierung bekannt, darunter Nukleolin, das Ribonukleoprotein hnRNP A1, der Fibroblasten-Wachstumsfaktor bFGF, die *high*

mobility group Proteine HMG-1 und HMG-2 und wie erwähnt MBP (Burgess et al., 1991; Lischwe et al., 1985a; Lischwe et al., 1985b). Überraschenderweise zeigte sich, dass MBP inhibierend auf die Aktivität der Protein Methylase I wirkt (Park et al., 1986). Demnach musste eine weitere Methylase existieren, die sich von der zunächst charakterisierten unterschied.

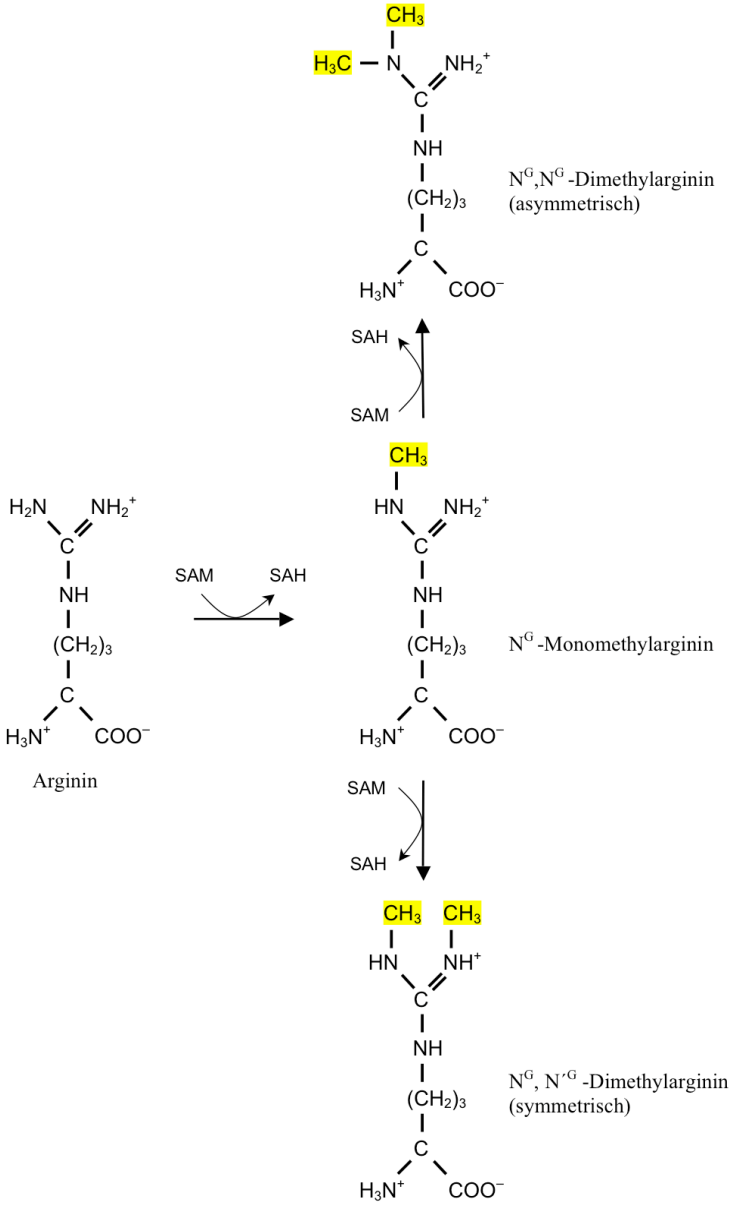


Abb. 1. Reaktionsmechanismus der Argininmethylierung. Zunächst wird ein Stickstoffrest der Guanidinogruppe des Arginins modifiziert. Es entsteht N^G-Monomethylarginin. Eine zweite Methylierung der Guanidinogruppe erfolgt entweder asymmetrisch und symmetrisch. Die Reaktionsprodukte sind entsprechend N^GN^G-Dimethylarginin oder N'^GN^G-Dimethyarginin. S-Adenosylmethionin (SAM) dient als Methylgruppendonor, es entsteht S-Adenosylhomocystein (SAH). Abbildung nach Kim, 1997.

1988 gelang es den beiden Arbeitsgruppen von Kim und Waickus, die für MBP-spezifische Methyltransferaseaktivität aus Kalbshirn aufzureinigen (Ghosh et al., 1988; Young and Waickus, 1988). Paul Young und Cynthia Waickus schlossen aufgrund ihrer Analysen der Gelelektrophorese und Gelfiltration, dass dieses Enzym ein Molekulargewicht zwischen 71 und 74,5 kDa haben musste. Elf Jahre später identifizierten Pestka und Mitarbeiter in einem *yeast two-hybrid screen* ein Janus-Kinase interagierendes Protein dieses Molekulargewichts, das Methyltransferaseaktivität besaß (Pollack et al., 1999). Doch erst die Gruppen von Im und Clarke zeigten 2001, dass es sich bei diesem Protein um die gesuchte MBP spezifische Methyltransferase handelte (Branscombe et al., 2001; Rho et al., 2001). Zu der Zeit war dies bereits die fünfte Argininmethyltransferase, die kloniert vorlag. Entsprechend erhielt sie den Namen *protein arginine (R) methyltransferase 5* (PRMT5). PRMT5 war die erste Methyltransferase, für die gezeigt wurde, dass sie Arginine symmetrisch dimethyliert. Mit PRMT7 und PRMT9/FBXO11 sind heute zwei weitere Enzyme bekannt, die diese Reaktion katalysieren, jedoch eine andere Substratspezifität besitzen (Cook et al., 2006; Lee et al., 2005).
1996 war es den Mitarbeitern von Harvey Hershman und Steven Clarke gelungen, die erste Argininmethyltransferase aus Säugerzellen und ebenso ihr Hefehomolog zu klonieren (Gary et al., 1996; Lin et al., 1996). Sie konnten darlegen, dass es sich dabei um die lange gesuchte Protein Methylase I Aktivität handelte. Sie benannten dieses Enzym *protein arginine methyltransferase 1* (PRMT1). Untersuchungen mit einem GST-Fusionsprotein ergaben, dass PRMT1 die Monomethylierung und asymmetrische Dimethylierung von Argininen in Histonen und dem Ribonukleoprotein hnRNP A1 katalysiert, also den Substraten, die zuvor für die Protein Methylase I charakterisiert worden waren (Rajpurohit et al., 1994). Paik und Kim hatten für ihre Methylase allerdings zwei Untereinheiten der Größen 110 und 75 kDa bestimmt (Ghosh et al., 1988). Dies konnte durch die Klonierung von PRMT1 nicht bestätigt werden, da diese ein Molekulargewicht von 42 kDa besitzt.

Nach der Entdeckung von PRMT1 gelang es durch BLAST-Analysen, weitere Argininmethyltransferasen zu identifizieren (Tab. 1). Jedoch zeigen nicht alle Mitglieder dieser Familie Eigenschaften einer Methyltransferase. Für PRMT2 konnte keine enzymatische Aktivität nachgewiesen werden.

Bezeichnung	Accession	Aktivität	Lokalisierung	Referenz
PRMT1	NM_001536	asymmetrisch	N/C	Lin et al. 1996
PRMT2	NM_206962	-	C/N	Katsanis et al. 1997, Scott et al. 1998
PRMT3	NM_005788	asymmetrisch	C	Tang et al. 1998
CARM1/PRMT4	NM_199141	asymmetrisch	N/C	Chen et al. 1999
PRMT5/JBP1	NM_006109	symmetrisch	C/N	Pollack et al. 1999
PRMT6	NM_018137	asymmetrisch	N	Frankel et al. 2002
PRMT7	NM_019023	symmetrisch	C	Miranda et al. 2004
PRMT8	NM_019854	asymmetrisch	M	Lee et al. 2005
PRMT9/FBXO11	NM_025133	symmetrisch	N/C	Cook et al. 2006

Tab. 1. Die Familie der Argininmethyltransferasen. Abkürzungen: N (Nukleus), C (Cytoplasma), M (Cytoplasmamembran)

PRMT1, PRMT3, CARM1 und PRMT6 sind Enzyme, die Arginine asymmetrisch dimethylieren (Abb. 1, Tab. 1). Sie werden als Methyltransferasen des TypI bezeichnet. TypII Methyltransferasen methylieren Arginine dagegen symmetrisch.
PRMT5 und PRMT7 besitzen, exprimiert in eukaryotischen Zellen, TypII-Aktivität (Branscombe et al., 2001; Lee et al., 2005). Als bakterielle Fusionsproteine jedoch zeigen sie keine bzw. nur eingeschränkte enzymatische Aktivität, was sie von TypI Methyltransferasen unterscheidet (Miranda et al., 2004; Pal et al., 2003). Die Entdeckung von MEP50 als Cofaktor der Methyltransferaseaktivität von PRMT5 liefert eine Erklärung für diesen Befund (Friesen et al., 2002).
Mit Ausnahme der kürzlich identifizierten PRMT9 lassen sich in allen PRMT bestimmte Sequenzmotive wiederfinden (Abb. 2). Diese Motive werden mit I, II, *Double E Loop*, III und *THW Loop* bezeichnet. Das Motiv I enthält die Bindesequenz für SAM, während der *Double-E-Loop* und der *THW-Loop* entscheidend für die katalytische Aktivität des Enzyms ist. Aufgrund von Kristallstrukturanalysen weiß man, dass PRMT monomerisch nicht aktiv sind, sondern als Di- bzw. Oligomere bei der Substratbindung vorliegen (Weiss et al., 2000; Zhang and Cheng, 2003; Zhang et al., 2000).

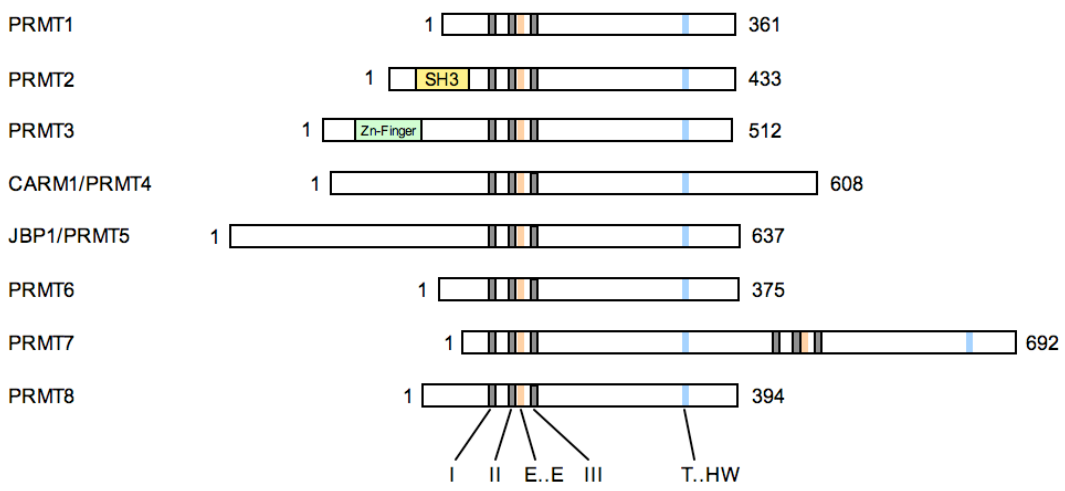


Abb. 2. Die Familie der Argininmethyltransferasen. Schematische Darstellung. Die Sequenzmotive I, II, *Double E Loop*, III und *THW Loop* lassen sich in allen dargestellten PRMT widerfinden. PRMT2 und PRMT3 besitzen im N-Terminus eine SH3- bzw. eine Zinkfingerdomäne (resp.). PRMT7 besteht aus zwei enzymatischen Domänen und ist möglicherweise Resultat eines Gendublikationsereignisses. Die kürzlich identifizierte PRMT9 unterscheidet sich in ihrer Strukur von den dargestellten Mitgliedern und findet daher hier keine Berücksichtigung. Abbildung nach (Zhang and Reinberg, 2001).

Von der Entdeckung der Argininmethylierung bis zur Klonierung von PRMT1 vergingen 29 Jahre. Erst dann war der Startschuss für die intensive Aufklärung mechanistischer Fragestellungen gegeben. Die vorhandenen biochemischen Beschreibungen der Substratmethylierungen wurden als Basis für molekularbiologische Untersuchungen genutzt. Die Fragestellung lautete, durch welche PRMT werden die bekannten Substrate methyliert, welche weiteren Substrate lassen sich identifizieren und - vor allem - welche Rolle spielt diese Modifikation bei zellulären Prozessen.

2.2 Die biologische Bedeutung der Argininmethylierung

2.2.1 Zelluläre Prozesse

Arginin ist eine positiv geladene Aminosäure. Die Methylierung eines Arginins erhöht dessen Hydrophobizität und verhindert die Ausbildung von Wasserstoffbindungen. Dies kann negative Konsequenzen für die Interaktion von Proteinen haben. Beispielsweise wird durch Methylierung von Sam68, einem Adapterprotein für Src-Kinasen, die Bindung dieses Proteins an die SH3-Domäne seiner Partner unterbunden (Bedford et al., 2000).
Jedoch wirkt die Argininmethylierung auch begünstigend auf bestimmte Interaktionen. Es wurde gezeigt, dass symmetrisch dimethylierte Arginine von Tudor-Domänen erkannt werden (Cote and Richard, 2005). Diese etwa 60 Aminosäure großen Domänen kommen häufig in Proteinen vor, die mit Nukleinsäuren assoziiert sind (Ponting, 1997). Lange Zeit blieb ihre Funktion unentdeckt.
Die Argininmethylierung ist in so unterschiedliche Vorgänge wie transkriptionelle Regulation, DNA Reparatur, Signaltransduktion, virale Replikation und RNA Prozessierung involviert. Hier soll anhand weniger Beispiele ein Überblick über die Funktion der Argininmethyltransferasen in diesen Prozessen gegeben werden. Die Rolle der PRMT als Coregulatoren der Transkription sowie ihre Rolle im JAK/STAT-Signalweg werden in späteren Kapiteln detailiert beschrieben.

subzelluläre Lokalisation

Die Methylierung heterogener nukleärer Ribonukleoproteine (hnRNP) an Argininresten war lange bekannt, bevor diesem Mechanismus eine Funktion zugeordnet werden konnte (Shen et al., 1998). HnRNP sind Proteine, die beim Transport und der Prozessierung von pre-mRNA eine Rolle spielen. Nach Verlust von HMT1, dem Homolog aus *Saccharomyces cerevisiae* zu PRMT1, bleiben zwei hnRNP, namentlich Npl3 und Hrb1, konstant im Nukleus lokalisiert. Shen et al. konnten zeigen, dass die Argininmethylierung, insbesondere von Npl3, ein Signal für den nukleocytoplasmatischen Transport ist. Jedoch ist die Argininmethylierung nukleärer Proteine in *Saccharomyces cerevisiae* kein generelles Signal für den Kernexport (Xu et al., 2003).

mRNA-Spleißen

SnRNP sind spleißosomale Komponenten und setzen sich zusammen aus snRNA und Sm-Proteinen. SmD1 und SmD3 werden von PRMT5 symmetrisch dimethyliert, woraufhin diese von SMN, dem Genprodukt des Spinalen Muskelatrophie-Gens, über dessen Tudor-Domäne gebunden werden (Cote and Richard, 2005; Friesen et al., 2001). PRMT5 begünstigt also den Zusammenbau der snRNP für den Assemblierungsfaktor SMN.

mRNA-Stabilität

In neuronalen PC12 Zellen wird die Stabiltät der mRNA für p21, einem Zellzyklusinhibitor, von CARM1 herabgesetzt (Fujiwara et al., 2006). Nach Methylierung des mRNA-Bindeproteins HuD unterbleibt dessen Bindung an das p21-Transkript, was zu einem beschleunigten Abbau dieser mRNA führt. Entsprechend führt der *knockdown* von CARM1 zu einer verlängerten Halbwertszeit des Transkripts. Da die Methylierung von HuD nach Behandlung der PC12 Zellen mit dem neuronalen Wachstumsfaktor NGF abnimmt, ist dies ein möglicher Weg, über den NGF die Ausdifferenzierung neuronaler Zellen steuert.

Initiation der Translation

In *Schizosaccharomyces pombe* fördert PRMT3 den Zusammenbau von Ribosomen (Bachand and Silver, 2004). PRMT3 methyliert das ribosomale S2 Protein, das Teil der 40S Untereinheit ist. Der Verlust von PRMT3 resultiert in einer Anreicherung freier 60S Untereinheiten, was zu einem Ungleichgewicht zwischen freien 40S und 60S Untereinheiten führt. Mark Bedford und Mitarbeiter konnten S2 als Substrat für PRMT3 in Säugerzellen bestätigen, wobei sie zeigten, dass die Zink-Finger-Domäne seitens PRMT3 für die Interaktion beider Proteine verantwortlich ist (Swiercz et al., 2005).

Transkriptionselongation

Die Argininmethylierung des transkriptionellen Elongationsfaktors SPT5 durch PRMT1 und PRMT5 setzt die Bindungskapazität von SPT5 an die RNA-Polymerase II herab (Kwak et al., 2003). Umgekehrt führt die Behandlung mit einem Methyltransferase-Inhibitior zu einer erhöhten Bindung von SPT5 an RNA Polymerase II. Werden die Methylierungsreste in SPT5 mutiert, zeigt sich *in vitro*

eine verstärkte Transkription des HIV-1 LTR Promoters. Die Autoren legen dar, dass die Methylierung von SPT5 ein Mechanismus der basalen Promotoraktivität ist.

DNA-Reparatur

Das Protein MRE11 besitzte eine 3´-5´Exonuklease Funktion und ist involviert in die Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen (Assenmacher and Hopfner, 2004). Boisvert et al. konnten zeigen, dass MRE11 von PRMT1 in seiner Glycin-Arginin reichen (GAR) Domäne methyliert wird, und dass diese Methylierung notwendig für die Exonukleaseaktivität von MRE11 ist (Boisvert et al., 2005b). Zellen, denen PRMT1 fehlt, akkumulieren nach induziertem DNA-Schaden in der S-Phase. Weiterhin konnte nachgewiesen werden, dass MRE11 und PRMT1 in sogenannten PML Nukleärkörperchen assoziiert vorliegen. Im Zuge der DNA-Schadensantwort ist die Methylierung von MRE11 eine Voraussetzung für dessen Rekrutierung an die Reparaturstelle der DNA (Boisvert et al., 2005c). Ähnliches gilt für das p53-Bindeprotein 53BP1, das ebenfalls an DNA-Doppelstrangbrüche bindet (Boisvert et al., 2005d).

virale Replikation

Stefane Richard und Mitarbeiter demonstrierten, dass PRMT6 inhibierend auf die Replikation des HI-Virus in HEK293T-Zellen wirkt (Boulanger et al., 2005). In einem Reportergenassay für das Transaktivatorprotein (Tat) vermindert wildtypisches PRMT6, jedoch nicht eine katalytisch inaktive Form dieses Enzyms, die Aktivierung des Reporters. Eine mögliche mechanistische Erklärung hierfür ergibt sich aus der Methylierung von Tat durch PRMT6.

Die virale Helikase NS3 aus Hepatitis C Virus (HCV) wird durch PRMT1 methyliert. Diese Methylierung inhibiert die Helikaseaktivität (Duong et al., 2005). Heim und Mitarbeiter beobachteten eine verstärkte Expression der Phosphatase PP2A in Hepatitis C Virus (HCV) infizierten Leberzellen (Duong et al., 2004). PP2A interagiert mit PRMT1 und inhibiert dessen enzymatische Aktivität (Duong et al., 2005). Zusammenfassend argumentieren Heim und Mitarbeiter, dass HCV die Expression von PP2A stimuliert, damit diese PRMT1 inhibiert. Dadurch wiederum unterbleibt die Inhibition von NS3, was sich positiv auf die Replikation des Virus auswirkt.

2.2.2 *Knockout*-Mäuse

Die Bedeutung der Argininmethyltransferasen lässt sich anhand der Phänotypen der bisher generierten *knockout*-Mäuse verdeutlichen. Der Verlust von PRMT1 führt zu einer frühen Mortalität am Embryonaltag 6.5 (E6.5). Embryonale Stammzellen (ES) denen dieses Enzym fehlt sind jedoch lebensfähig (Pawlak et al., 2000). Die Gesamtmenge an asymmetrisch dimethyliertem Arginin ist in diesen Zellen um mehr als 50 % reduziert, verglichen mit wildtypischen ES-Zellen. Die PRMT-Aktivität geht auf 15 % zurück. Dies zeigt, dass PRMT1 die vorherrschende Methyltransferase in Säugern ist. In Hefe war dies bereits für das Ortholog gezeigt worden (Gary et al., 1996).

Carm1$^{-/-}$ Mäuse sterben spätestens bei der Geburt aufgrund eines Lungendefekts (Yadav et al., 2003). Erste Letalität setzt jedoch bereits ab E18.5 ein. Embryonen dieses Tages besitzen einen fünf bis zehnfach kleineren Thymus verglichen mit wildtypischen Embryonen (Kim et al., 2004). Ursächlich dafür ist das Verharren der thymocytischen Vorläuferzellen in einem frühen Entwicklungsstadium.

Unpublizierten Daten der Gruppe von Stephane Richard zufolge sterben *Prmt5*$^{-/-}$ Mäuse ebenfalls während der Embryogenese (Boisvert et al., 2005a). *Prmt2 knockout*-Mäuse sind lebensfähig und zeigen keine phänotypischen Veränderungen (Yoshimoto et al., 2006).

2.3 Histonmodifikationen

Die DNA ist der Träger des Erbguts. Die von ihr codierten Gene unterliegen einem geordneten Ablauf von Aktivierung und Inaktivierung. Solche Vorgänge werden beeinflusst durch die strukturelle Organisation der DNA im Chromatin. Das Nukleosom ist die Grundeinheit des Chromatins. Es besitzt 147 Basen DNA, die fast zweimal um ein Histonoktamer gewunden sind. Das Oktamer besteht aus einem zentralen Heterotetramer, aufgebaut aus den Histonen H3 und H4, sowie zwei flankierenden Heterodimeren H2A und H2B.

Histone werden präferentiell an ihren N- und C-terminalen Extensionen mit chemischen Gruppen posttranslational modifiziert. Ebenso wie Arginine (R) werden Lysine (K) methyliert, jedoch unterliegen letztere einer Vielzahl weiterer Modifikationen wie Acetylierung, Ubiqutininierung und Sumoylierung. Serine (S) und Threonine werden phosphoryliert.

Die Kombination bestimmter Modifikationen hat lokalen Einfluss auf die Chromatinstruktur. Beispielsweise findet man an Promotoren, die für Transkriptionsmaschinerien zugänglich sind, häufig Acetylierung an H4K8 und H3K14 sowie Phosphorylierung von H3S10. Trimethylierung an H3K9 und Verlust von acetyliertem H3 und H4 korrelieren dagegen mit inaktivem, kondensiertem Chromatin.

Auch die Argininmethylierung spielt eine Rolle bei Chromatin vermittelten Ereignissen. Die asymmetrischen Dimethylierungen von H4R3 durch PRMT1 und H3R17 durch CARM1 sind Ereignisse, die im Zusammenhang transkriptioneller Aktivierung stehen (siehe Kapitel 2.4). Die symmetrischen Dimethylierungen von H4R3, H2AR3 sowie H3R8 durch PRMT5 sind dagegen Kennzeichen transkriptioneller Repression (Ancelin et al., 2006; Pal et al., 2004).

In murinen primordialen Keimzellen liegen der Differenzierungsfaktor BLIMP1 und PRMT5 komplexiert vor (Ancelin et al., 2006). Die Translokation dieses Komplexes aus dem Zellkern ins Cytoplasma am Embryonaltag E12.5 führt zu einem Verlust der Argininmethylierung an H4 und H2A. Dhx3, ein Zielgen von PRMT5, wird daraufhin verstärkt exprimiert.

Said Sif und Mitarbeiter zeigten, dass PRMT5 die Tumorsuppressor-Gene ST7 und NM23 reprimiert (Pal et al., 2004). Dabei liegt PRMT5 assoziiert mit Komponeneten des SWI/SNF-Komplexes vor. Der Verlust von PRMT5 führt zu einer verstärkten

Expression von ST7 und NM23 sowie einer Abnahme der H3R8 Methylierung an deren Promotoren.

2.4 Die kooperative Rolle von CARM1 und PRMT1 als Coaktivatoren der Transkription

1999 beschrieben Michael Stallcup und Mitarbeiter die Funktion einer Argininmethyltransferase in der transkriptionellen Aktivierung (Chen et al., 1999). Diese Methyltransferase wurde bei der Suche nach Interaktionspartnern für GRIP1 in einem *yeast two-hybrid screen* gefunden. GRIP1 gehört zur Familie der p160 Proteine, die Coaktivatoren für nukleäre Hormonrezeptoren sind. Daher erhielt das gefundene Enzym die Bezeichung *Coactivator-associated arginine (R) methyltransferase 1* (CARM1). Es wurde gezeigt, dass die Methyltransferaseaktivität dieses Enzyms dafür verantwortlich ist, dass es selbst als Coaktivator für den Androgen-, Thyroid- sowie Estrogenrezeptor (AR, TR, ER resp.) dienen kann. Desweiteren wurde experimentell belegt, dass CARM1 *in vitro* eine Aktivität für die Methylierung von Histon H3 besitzt. Später charakterisierte man die Argininreste (R) 17 und 26 als die bevorzugt von CARM1 methylierten Aminosäuren in H3 (Schurter et al., 2001). Mit Hilfe eines spezifischen Antikörpers konnte *in vivo* gezeigt werden, dass die Methylierung von R17 am Promotor des pS2 Gens zunimmt, wenn es durch Estrogen induziert wird (Bauer et al., 2002). Weitere Untersuchungen ergaben, dass die Aktivität von CARM1 in der Genregulation einem geordneten Ablauf von Histonmodifikationen unterliegt, bei dem die Acetylierungen durch CBP/p300 an Lysin (K) 18 und 23 der R17 Methylierung vorausgehen (Daujat et al., 2002).

Zum Zeitpunkt der Entdeckung von CARM1 waren bereits drei weitere Argininmethyltransferasen bekannt, denen man die Bezeichnung PRMT1, PRMT2 und PRMT3 gegeben hatte (Lin et al., 1996; Scott et al., 1998; Tang et al., 1998). Da mit CARM1 also das vierte Enzym in der Familie der PRMT vorliegt, wird dieses Enzym in der Literatur mitunter auch PRMT4 bezeichnet.

Obwohl bereits 1996 entdeckt (Gary et al., 1996), wurde für PRMT1 erst vier Jahre später die Funtion eines transkriptionellen Coaktivators beschrieben (Stallcup et al., 2000). Dabei zeigte sich, dass PRMT1 ebenso wie CARM1 mit der C-terminalen

Aktivatordomäne 2 (AD2) von p160-Proteinen interagiert (Koh et al., 2001). In der durch nukleäre Hormonrezeptoren regulierten Transkription ist die Bindung von CARM1 und PRMT1 an AD2 essentiell für deren Coaktivatorfunktion. David Allis und Mitarbeiter indentifizierten R3 als die ausschließliche Methylierungsstelle für PRMT1 in Histon H4 und belegten das Vorkommen von methyliertem R3 *in vivo* (Strahl et al., 2001). Auch diese Modifikation steht im Kontext transkriptioneller Aktivierung. Sie wirkt stimulierend auf die Acetylierung von Lysinresten an H4 (Wang et al., 2001). Da die Methylierung von R3 ein frühes Ereignis der Transkriptionsaktivierung darstellt, untersuchten Felsenfeld und Mitarbeiter, welche Bedeutung diese Modifikation für nachfolgende Veränderungen des Chromatin besitzt (Huang et al., 2005). Als Modelsystem diente der β-Globin Lokus des Huhns. Gemäß der Erwartung unterbleibt nach siRNA vermitteltem *knockdown* von PRMT1 die Methylierung von H4R3. Überraschenderweise zeigt sich daraufhin eine Abnahme der Acetylierung sowohl von H4 als auch von H3. Eine detailierte Analyse zeigte, dass die H4R3 Methylierung insbesondere eine Voraussetzung für die Acetylierung an H4K5 sowie H4K12 jedoch nicht für H4K8 ist. Die Markierungen der Repression, methyliertes H3K9 und H3K27, sind nach Verlust von PRMT1 am Lokus stärker vertreten. In diesem System stellte die Methylierung von H4R3 eine Voraussetzung sowohl für nachfolgende Modifikationen wie auch die transkriptionelle Aktivierung des Lokus dar.

Diese Ergebnisse fügen sich ein in das Bild, das Robert Roeder und Mitarbeiter von der p53 abhängigen Transkription entworfen hatten (An et al., 2004). In einem *in vitro* System konnte gezeigt werden, dass p53 die Transkription effizient aktiviert, wenn dem Ansatz zunächst PRMT1 und danach p300 und CARM1 zugegeben werden. Eine Veränderung der Reihenfolge vermindert die Aktivierbarkeit des Systems deutlich. Anders als bei der Regulierung durch nukleäre Rezeptoren ist hier keine Zugabe des p160 Coaktivators notwendig. PRMT1, p300 und CARM1 interagieren direkt mit p53. Jedoch bestätigte sich auch in diesem System, dass die H4R3 Methylierung die Acetylierung von H4 und H3 durch p300 begünstigt. Anschließend erfolgt die Methylierung durch CARM1 an H3.

Dass die Argininmethylierung direkten Einfluss auf die Transkriptionsaktivität besitzt, zeigte sich bei Untersuchungen mit mutierten Histonen. Wenn die durch CARM1 methylierbaren Argininreste in H3 gegen Glutamine ausgetauscht werden, ergibt sich eine um 75 % reduzierte Transkriptionsaktivität. Der Austausch von H4R3

zu Glutamin zeigt dagegen lediglich einen moderaten Effekt. Allerdings wird gleichzeitig eine Zunahme der H2A Methylierung beobachtet, die als eine mögliche Kompensation der H4R3 Methylierung diskutiert wurde. Unterstützung fand diese Hypothese durch die Beobachtung, dass PRMT1 vermittelte Transkription nur dann vollständig verlorengeht, wenn die N-terminalen Extensionen beider Histone H4 und H2A deletiert werden.

Kürzlich wurden erste mechanistische Daten vorgelegt, die klären, welche Voraussetzungen für die Funktion von PRMT1 bei der Genaktivierung erfüllt sein müssen. Am uninduzierten Promotor des pS2 Gens sorgt das Protein SET dafür, dass Histone deacetyliert vorliegen (Wagner et al., 2006). Der Verlust von SET führt zu einer verfrühten Acetylierung von H4 im Zuge der Genaktivierung, wohingegen die H4R3 Methylierung nicht mehr stattfindet. Dies resultiert in einer verminderten Transkriptrate des pS2 Gens *in vivo* (Abb. 3).

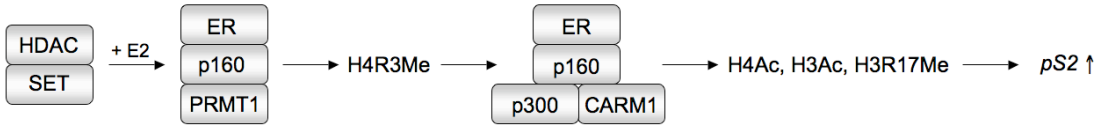


Abb. 3. Modell der Estrogen vermittelten Induktion des pS2 Gens. SET liegt assoziiert mit Histondeacetylasen (HDAC) vor und sorgt für die Hypoacetylierung des Promotors. Nach Estrogenstimulus wird PRMT1 über p160 an den ER rekrutiert und methyliert R3 an H4. Nachfolgend acetyliert p300/CBP H4 und H3 an verschiedenen Lysinresten, bevor die Methylierung von H3R17 durch CARM1 erfolgt.

2.5 CARM1 und PRMT1 als Coaktivatoren für verschiedene Transkriptionsfaktoren

Die Histonmethylierung ist kein ausschließlicher Vorgang im Zuge der Genaktivierung durch PRMT1 und CARM1. Michael David und Mitarbeiter konnten zeigen, dass die Methylierung des Cofaktors NIP45 durch PRMT1 aktivierend auf die NFAT vermittelte Transkription in T-Zellen wirkt (Mowen et al., 2004). Die Gruppe um Laurence Vandel fand heraus, dass die Methylierung bestimmter Argininreste von CBP durch CARM1 notwendig für die hormoninduzierte Genaktivierung ist (Chevillard-Briet et al., 2002).

Transkriptionsfaktor	CARM1	PRMT1
ATF6	-	Baumeister et al. 2005
AR	Chen et al. 1999	Koh et al. 2001
CIITA	Zika et al. 2005	-
β-Catenin	Koh et al. 2002	-
E2F	Messaoudi et al. 2006	-
ER	Chen et al. 1999	Koh et al. 2001
FXR	-	Rizzo et al. 2005
GR	Xu et al. 2004	Teyssier et al. 2005
LEF1	Koh et al. 2002	-
MEF2	Chen et al. 2002	-
NFAT	-	Mowen et al. 2004
NF-κB	Covic et al. 2005	-
Nrf2	Lin et al. 2006	Lin et al. 2006
p53	An et al. 2004	An et al. 2004
RAR	Xu et al. 2001	Passeri et al. 2006
STAT5	*diese Arbeit*	*diese Arbeit*
Tax	Jeong et al. 2006	-
TR	Chen et al. 1999	Koh et al. 2001
USF	-	Huang et al. 2005
YY1	-	Rezai-Zadeh et al. 20003

Tab. 2. Transkriptionsfaktoren, die auf CARM1 oder PRMT1 bei der Genaktivierung zurückgreifen.

Die große Mehrzahl der vorhandenen Publikationen beschreibt die Funktion nur einer der beiden Methyltransferasen als transkriptionellen Coaktivator (Tab. 2). Da sich für nukleäre Hormonrezeptoren sowie für p53 eine kooperative Funktion von CARM1 und PRMT1 herausgestellt hat, ist es denkbar, dass andere Transkriptionsfaktoren ebenso auf beide Methyltransferasen angewiesen sind. Kürzlich wurde anhand eines Reportergenassays gezeigt, dass CARM1 und PRMT1 Coaktivatoren für Nrf2, einem Faktor der oxidativen Stressantwort, sind. Da jedoch beide Methyltransferasen nicht zeitgleich exprimiert wurden, gibt diese Arbeit keinen Aufschluss über die Kooperation beider Methyltransferasen (Lin et al., 2006).

2.6 Argininmethyltransferasen in JAK/STAT-Signalwegen

JAK/STAT-Signalwege werden über Ligandbindung von Interleukinen und Interferonen an membranständige Rezeptoren stimuliert. Mit STAT1, STAT2, STAT3, STAT4, STAT5A, STAT5B und STAT6 existieren sieben Mitglieder der Familie der *signal transducer and activator of transcription*, die über verschiedene Kinasen der Janus-Familie aktiviert werden. Die Phosphorylierung der STAT ermöglicht deren Dimersierung und Kernlokalisation. STAT spielen als transkriptionelle Aktivatoren eine Rolle bei der Immunantwort auf bakterielle und virale Infektionen, sowie bei unterschiedlichen Differenzierungsereignissen (Decker et al., 2005; Paukku and Silvennoinen, 2004).
Die vorliegende Arbeit belegt, dass CARM1 und PRMT1 Coaktivatoren für STAT5 sind. Daher werden nachfolgend die bisher bekannten Funktionen der PRMT in JAK/STAT-Signalwegen beschrieben.

PRMT1
Rezeptoren, die durch Interferone vom TypI (Interferon α und β) induziert werden, besitzen eine sogenannte IFNAR1-Kette, auf deren cytoplasmatischer Seite Kinasen binden (Abb. 4). PRMT1 interagiert in einem *yeast two-hybrid screen* mit der intracytoplasmatische Domäne (IC) der IFNAR1-Kette (Abramovich et al., 1997). Nach Zugabe eines *antisense* Oligonukleotids gegen PRMT1 zeigen U266 Zellen einen Verlust der PRMT1-Aktivität und widerstehen einer Interferon-β (IFN-β)

induzierten Wachstumsinhibition. Die Anwesenheit von PRMT1 ist also notwendig für einen geordneten Ablauf dieses Signalwegs.

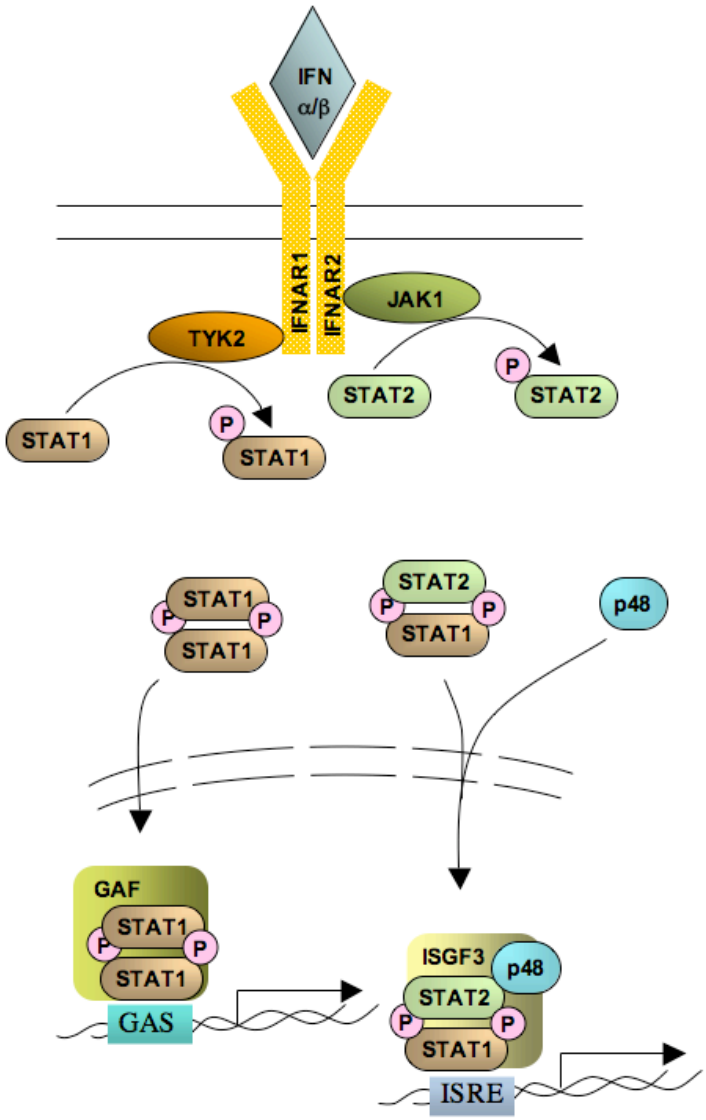


Abb. 4. Schematische Darstellung der Aktivierung des JAK/STAT-Signalwegs durch TypI-Interferone. Es erfolgt die Bindung von Janus Kinasen (JAK) an die Rezeptordimere, die daraufhin Proteine der STAT-Familie phosphorylieren. Diese Modifikation der STAT wirkt positiv auf deren Dimersierung und Kernlokalsiation. STAT-Dimere binden im ternären Komplex mit anderen regulatorischen Faktoren an Konsensussequenzen im Bereich der Promotoren ihrer Zielgene.

Altschuler et al. erbrachten einen weiteren Beleg dafür, dass PRMT1 in die Vermittlung von Interferon abhängigen Signalen involviert ist (Altschuler et al., 1999). HeLa Zellen mit reduzierter PRMT1 Expression sind nach Zugabe von IFN-β nicht mehr in der Lage, die Replikation des Vesikulären Stomatitisvirus (VSV) effizient zu verhindern. In diesen Klonen ist ebenso der antiproliferative Effekt von

IFN-β um das fünfache reduziert. Interessanterweise bleibt die IFN-γ induzierte Wachstumsinhibition unbeeinflusst.

Michael David und Mitarbeiter wiesen 2001 ebenfalls eine Rolle für PRMT1 im Interferon-α/β getriebenen STAT-Signalweg nach (Mowen et al., 2001). Danach wird STAT1 von PRMT1 an Arginin 31 methyliert. Ein Austausch von Arginin 31 zu Alanin oder Glutamat, einer hydrophoben und einer negativ geladenen Aminosäure, führt zu einer vielfach verstärkten Aktivierung eines Reportergens verglichen zum wildtypischen STAT1. Daraus schlossen die Autoren, dass die Argininmethylierung die STAT1 vermittelte Transaktivierung positiv beeinflusst. Weitere funktionelle Analysen wurden mit dem allgemeinen Methyltransferaseinhibitor MTA gemacht. MTA hat keinen Einfluss auf die STAT-Phosphorylierung, jedoch liegt STAT1 verstärkt assoziiert mit PIAS vor, was eine Bindung von STAT1 an die DNA verhindert.

Heim und Mitarbeiter sehen in der Methylierung von STAT1 einen therapeutischen Ansatz bei viralen Infekten (Duong et al., 2006). Eine HCV Infektion wirkt inhibierend auf den JAK/STAT-Signalweg. In der Zellkultur konnte gezeigt werden, dass die Behandlung mit SAM und Betain die STAT1 Methylierung nach HCV-Infektion wiederherstellt. Dieses Expreiment suggeriert, dass ein Überangebot von Methylgruppendonoren die teilweise Inhibition der PRMT1 durch PP2A antagonisiert.

Zwei Arbeitsgruppen publizierten 2004, dass sie die Methylierung von STAT1 nicht reproduzieren konnten (Komyod et al., 2005; Meissner et al., 2004). David und Mitarbeiter räumten daraufhin die Möglichkeit ein, erhaltene Daten der Massenspektrometrie falsch interpretiert zu haben. Somit ist es unklar, welcher PRMT1 vermittelte Mechanismus der Regulation der TypI-Interferon-Signalgebung zugrunde liegt.

CARM1

B-Zellen und Makrophagen präsentieren fremde Antigene gegenüber $CD4^+$ Helfer-T-Zellen. Dabei liegt das Antigen seitens der präsentierenden Zelle assoziert an MHC-Moleküle der Klasse II vor. Zika et al konnten zeigen, dass CARM1 über den Transkriptionsfaktor CIITA in die IFN-γ induzierte Aktivierung der MHC-II Gene involviert ist (Zika et al., 2005).

PRMT5

PRMT5 wurde in einem *yeast two-hybrid screen* als ein Protein identifiziert, das mit der Janus Kinase 2 (JAK2) interagiert (Pollack et al., 1999). Die Autoren benannten dieses Enzym JBP1 (*engl.* JAK-binding protein 1), jedoch konnte sich diese Nomenklatur nicht durchsetzen.

PRMT5 wird für eine geregelte Expression IL-2 in T-Lymphocyten benötigt (Richard et al., 2005). Eine humane leukämische T-Zelllinie (Jurkat) zeigt eine um 35 % reduzierte IL-2 Sekretion nach Behandlung mit siRNA gegen PRMT5.

Argininmethylierung von STAT6

STAT6 wird an R27 methyliert (Chen et al., 2004). Wenn dieser Aminosäurerest zu Alanin mutiert wird, unterbleibt die Phosphorylierung sowie die Translokation von STAT6 in den Zellkern nach Stimulation durch IL-4. Gleiche Egebnisse erbrachten Versuche mit dem Methyltransferaseinhibitor MDA. Hershey und Mitarbeiter schlossen daher, dass die Methylierung von STAT6 ein wichtiges Ereignis für dessen Aktivierung ist (Chen et al., 2004).

2.7 Zielsetzung

Untersuchungen zur Rolle von CARM1 und PRMT1 in der Genregulation beschränken sich bisher weitestgehend auf den Einfluss einer der beiden Methyltransferasen. Für Gene, die durch nukleäre Hormonrezeptoren und p53 aktiviert werden, wurde exemplarisch eine kooperative Rolle beider Enzyme beschrieben.
Ziel dieser Arbeit war es, neue Zielgene für CARM1 und PRMT1 zu identifizieren. Weiterhin sollten Transkriptionsfaktoren aufgedeckt werden, die auf CARM1 und PRMT1 bei der Genaktivierung zurückgreifen. Schließlich sollte die Frage beantwortet werden, ob sich die kooperative Funktion beider Methyltransferasen in einem Genexpressionsprofil darstellen lässt.

Im Einzelnen sollte zunächst die Expression von CARM1 und PRMT1 in gängigen Zellkultursystemen untersucht werden. Danach sollte in einer Zelllinie der siRNA basierte *knockdown* dieser Enzyme etabliert werden. Mittels eines 11552 cDNA-Chips sollten Genexpressionsprofile nach Verlust von jeweils einer Methyltransferase erstellt werden, um die individuelle Funktion eines Enzyms zu untersuchen. Zusätzlich sollte in einem Doppel*knockdown* die kooperative Funktion beider Enzyme in der Genregulation analysiert werden. Ermittelte Zielgene sollten weiterhin mittels RTqPCR validiert werden.
Die Promotoren der Zielgene sollten auf ihre Bindestellen für Transkriptionsfaktoren hin untersucht werden. Dazu sollte die Internetressource CREME herangezogen werden, um evolutionär konservierte Promotorelemente zu identifizieren. Transkriptionsfaktoren, deren Bindestellen angereichert vorliegen, sollten in Reportergenassays auf die Coaktivierbarkeit durch CARM1, PRMT1 oder beide Enzyme hin analysiert werden. Schließlich sollte Bestätigung finden, dass diese Methyltransferasen *in vivo* über gerichtete zellulären Signalwege Einfluss auf die Regulation der gefundenen Zielgene nehmen.

3 Material

3.1 Antikörper

3.1.1 Erstantikörper

Bezeichnung	Quelle	Spezifität	Hersteller	Reaktivität
Anti-CARM1	Kaninchen, polyklonal	CARM1	Upstate	Mensch, Maus, Ratte
Anti-HA	Maus, monoklonal	HA-Peptid	Roche	Influenza (human), Hämagglutininprotein
Anti-PRMT1	Kaninchen, polyklonal	PRMT1	Upstate	Mensch, Maus, Ratte
ERK1 (K23)	Kaninchen, polyklonal	ERK1, ERK2	Santa Cruz	Mensch, Maus, Ratte, Huhn, Frosch
p-ERK	Maus, monoklonal	Phospho-Tyrosin 204, ERK	Santa Cruz	Mensch, Maus, Ratte
Mouse Anti-β-Tubulin Monoclonal Antibody	Maus, monoklonal	β-Tubulin	Chemicon	Schleimpilze, Hefen, Pilze, Pflanzen, Insekten, Nematoden, Parasiten, Säuger
P4-2	Kaninchen, polyklonal	CARM1	*eigene Herstellung*	Mensch, Maus, Ratte (bisher getestet)
Phospho-c-Raf (Ser 338)	Kaninchen, monoklonal	c-Raf, Serin 338	Cell Signaling	Mensch, Maus, Ratte, Affe
Phospho-MEK1/2	Kaninchen, polyklonal	Phospho-MEK1/2, Serin 217/221	Cell Signaling	Mensch, Maus, Ratte
Phospho-Stat5 (Tyr694)	Kaninchen, monoklonal	STAT5A, STAT5B	Cell Signaling	Mensch, Maus, Ratte, (Rind)
Stat5 (C-17)	Kaninchen, polyklonal	STAT5A, STAT5B	Santa Cruz	Mensch, Maus, Ratte

3.1.2 Zweitantikörper

Bezeichnung	Quelle	Hersteller
Mouse IgG, HRP-linked Whole AB	Schaf	Amersham
Rabbit Ig, HRP-linked Ab	Esel	Amersham

3.2 Bakterienstämme

Bezeichnung	Anbieter	Vedrwendungszweck
BL21(DE3)	Stratagene	Proteinexpression
DH5α	Invitrogen	Plasmidpreparation, Klonierung

3.3 Biochemikalien

Bezeichnung	Hersteller	Anwendung/Beschreibung
DMSO	Merck	Zellkultur
dNTP Set	Fermentas	PCR
Dulbeccos modified Eagles Vollmedium (DMEM) mit L-Glutamin	Cambrex	Zellkulturmedium
Fugene 6	Roche	Transfektionsmittel
Interleukin-4, recombinant human	Strathmann	Zellkultur, Induktion von Signalkaskaden
Oligofectamine	Invitrogen	Transfektionsmittel
Passive Lysis Bufffer, 5x	Promega	Reportergenassay
Penicillin/Streptomycin	Cambrex	Zellkultur
Prestained Protein Ladder, ~10-180kDa	Fermentas	Proteinmarker
Protein A Sepharose 4 Fast Flow	Amersham	Immunpräzipitation
Protein A Sepharose 4 Fast Flow	Amersham	Immunpräzipitation
RNaseOUT	Invitrogen	cDNA-Synthese, Ribonuklease-Inhibitor
TPA (12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate)	Sigma	Zellkultur, Induktion von Signalkaskaden
Triton X 100	Serva	Zellaufschluss, Detergenz
1x Trypsin/EDTA	Cambrex	Zellkultur
Tween 20	Serva	Immunfärbung, Emulgator

3.4 cDNA-Chip, human (Microarray)

Auf dem cDNA-Chip waren 11552 humane cDNA fixiert worden. Die cDNA entstammten den sequenzverifizierten Unigene Sets gf200, gf201 und gf202 (ResGen/Invitrogen; Cat.No. 97001.V).

3.5 Chemikalien

Nicht gesondert aufgeführte Chemikalien wurden von den Firmen Roth (Karlsruhe), Applichem (Darmstadt) und Merck (Darmstadt) bezogen.

3.6 Enzyme

Bezeichnung	**Hersteller**	**Anwendung**
High Prime	Roche	radioaktive Markierung von DNA (Klenow-Polymerase)
ImmoMix + SybrGreen	Bioline	qPCR (DNA-Polymerase, hitzeaktivierbar)
M-MLV Reverse Transcriptase	Invitrogen	cDNA-Synthese
RNase-Free DNase Set	Qiagen	Aufreinigung von RNA
Taq DNA Polymerase, recombinant	Invitrogen	PCR
Restriktionsenzyme	Fermentas	Hybridisierungssonde Northern Blot

3.7 Geräte

Bezeichnung	**Hersteller**	**Erläuterung**
3000 Junior	Fröbel	elektrisches Drehrad
BP 110 S	Sartorius	Feinwaage
BSB4	Gelaire	Werkbank
accu-jet	Brand	Pipettierhilfe, elektrisch
Centrifuge 5415 C	Eppendorf	Tischzentrifuge
Cytoperm	Heraeus	Brutschrank
DM IL	Leitz	Lichtmikroskop
handylab 1	Schott	pH-Meter
IKAMAG RCT	IKA	Magnetrührer, beheizbar
julabo U3	Julabo	Wasserbad, beheizbar
Lumat LB 9507	Berthold	Luminometer
Mx3000P	Stratagene	qPCR-System
ND-1000	NanoDrop	Spektrophotometer
ScanArray Express	PerkinElmer	Microarray Scanner
Sonifier W-250 D	Branson	Sonikator

Fortsetzung Geräte

Bezeichnung	Hersteller	Erläuterung
T3 Thermocycler	Biometra	Thermocycler
TB1 Thermoblock	Biometra	Heizblock
Thermomixer compact	Eppendorf	Thermomixer
Ultrospec 2000	Pharmacia	Spectrophotometer

3.8 Kits

Bezeichnung	Hersteller	Anwendung
CyScribe cDNA Post Labelling Kit	Amersham	cDNA-Markierung, Microarray
JETStar Plasmid Purification MAXI Kit	Gemomed	Maxiprep, Plamid-DNA
Message Amp aRNA Kit	Ambion	Amplifikation von mRNA, Microarray
PCR-Purifications-Kit	Quiagen	DNA-Aufreinigung
peqGOLD Total RNA Kit	Peqlab	RNA-Aufreinigung

3.9 Oligonukleotide

Bezeichnung	Sequenz (5´ → 3´)	Funktion
hAKR1C1_q_fwd	CGG GGT GTC CAA CTT CAA	RTqPCR
hAKR1C1_q_rev	TCT GGT TGA AGT AAG GAT GAC ATT	RTqPCR
hCARM1_fwd	TCT TTA GAT ACA CGG GCA CAA C	RT-PCR
hCARM1_rev	CTA AAG GAA TCA GGT TGT TGT GG	RT-PCR
mCARM_fwd	TCT TCA GGT ACA CAG GTA CAA C	RT-PCR
mCARM1_q_fwd	CAC ACC GAC TTC AAG GAC AA	RTqPCR
mCARM1_q_rev	AAA AAC GAC AGG ATC CCA GA	RTqPCR
mCARM_rev	CTA AGG GAA TCA GGT TGT TGT GA	RT-PCR
hCREG_fwd2	GGA GCT TCC TAC TCA TGT TG	RT-PCR
hCBFB_q_fwd	TTC ACA GCT GCT GGC AGT AA	RTqPCR
hCBFB_q_rev	GCT GTG CTA TTA ATT AAC GAA GTT TG	RTqPCR
hCITED2_q_fwd	TCA CTT TCA AGT TGG CTG TCC	RTqPCR
hCITED2_q_rev	CAT TCC ACA CCC TAT TAT CAT CTG T	RTqPCR

Fortsetzung Oligonukleotide

Bezeichnung	**Sequenz (5´ → 3´)**	**Funktion**
hCREG_rev2	GAT TGT AGC AGC ACT AGA AGC	RT-PCR
hEgr1_fwd	GAA CAA CGA GAA GGT GCT GG	RT-PCR
hEgr1_rev	GTT GGG GTA CTT GCG CAT GC	RT-PCR
hEIF2C2_q_fwd	TGT AGT CAC GCT GGC ATC C	RTqPCR
hEIF2C2_q_rev	TCT GGT TGA AGT AAG GAT GAC ATT	RTqPCR
h_cFos_fwd	CTG ATA CAC TCC AAG CGG AG	RT-PCR
h_cFos_rev	GTC TTC AGC TCC ATG CTG C	RT-PCR
hGABARAP_q_fwd	GCT CCC AAA GCT CGG ATA G	RTqPCR
hGABARAP_q_rev	TCC GGA TCA AGA AGT AGA ACT GA	RTqPCR
hGAPDH_fwd	ACC ACA GTC CAT GCC ATC AC	RT-PCR
hGAPDH_rev	TCC ACC ACC CTG TTG CTG TA	RT-PCR
hGAPDH_q_fwd	AGC CAC ATC GCT CAG ACA C	RTqPCR
hGAPDH_q_rev	GCC CAA TAC GAC CAA ATC C	RTqPCR
hIER3_fwd	TCC TGA GAT CTT CAC CTT CG	RT-PCR
hIER3_rev	TGA GCA GCA GAA AGA GAA GC	RT-PCR
hIGFBP7_q_fwd	TGT CCT CAT CTG GAA CAA GGT	RTqPCR
hIGFBP7_q_rev	TCT GAA TGG CCA GGT TGT C	RTqPCR
OligodT	TTT TTT TTT TTT TTT TT	RT
hPrickle2_fwd	CAT TGA CAG TTT CCT GAG TGG	RT-PCR
hPrickle2_rev	CAT CCA CAT TCT CAG CCAA GAG	RT-PCR
hPRMT1_q_fwd	GAG AAT TTT GTA GCC ACC TTG G	RTqPCR
hPRMT1_q_rev	CCT GGC CAC AGG ACA CTT	RTqPCR
hRRAD_q_fwd	AGC GTT TAC AAG GTG CTG CT	RTqPCR
hRRAD_q_rev	AAT GGA GCG ATC ATA GGT GTG	RTqPCR
hSLC2A14_q_fwd	GCG CGG GTG TGG TTA ATA	RTqPCR
hSLC2A14_q_rev	TCC CTC CAA GGC CTA TCA T	RTqPCR
hTDG_q_fwd	AAC CTT GTG GCT TCT CTT CAA A	RTqPCR
hTDG_q_rev	GTC ATC CAC TGC CCA TTA GG	RTqPCR
hTMCO1_q_fwd	CCA AGG ACT GTC TCA TCG AAA	RTqPCR
hTMCO1_q_rev	GGC CGA GAA TCT TCT GAA TG	RTqPCR
hYRDC_q_fwd	TGT TTG AGG GTC CGC TTG	RTqPCR

Fortsetzung Oligonukleotide

Bezeichnung	**Sequenz (5´ → 3´)**	**Funktion**
hYRDC_q_rev	ACA ACT GAG GCC AGA GAT CC	RTqPCR

Alle Oligonukleotide wurden synthetisiert von MWG (Ebersberg).

3.10 Puffer und Medien

Bezeichnung	**Zusammensetzung**
Agarplatten	1,5% (w/v) Agar; LB-Medium
ATP-Lösung (Luciferase-Assay)	5 mM Glycylglycin, pH 7,8; 2 mM ATP; 10 mM $MgSO_4$
Blot-Puffer (Western)	20% (v/v) 10x SDS-Laufpuffer**;** 20% (v/v) Methanol
Bradford-Reagenz	0,01% (w/v) Coomassie Brilliant Blau G-250; 4,75% (v/v) Ethanol; 8,5% (v/v) Phosphorsäure
6x DNA-Probenpuffer	0,25% (w/v) Bromphenolblau; 0,25% (w/v) Xylencyanol; 50% (v/v) Gylcerin; 1 mM EDTA
E1	50 mM Tris; 10 mM EDTA; pH 8,0; RnaseA
E2	200 mM NaOH; 1% SDS
E3	3 M KOAc; pH 5,5
E4	600 nM NaCl; 100 nM NaOAc; 0,15% Triton X-100, pH 5,0
E5	800 mM NaCl; 100 mM NaOAc, pH 5,0
E6	1,25 M NaCl; 100 mM Tris, pH 8,5
ECL-Lösung 1	100 mM Tris pH 8,5; 30‰ H_2O_2
ECL-Lösung 2	100 mM Tris pH 8,5%; 0,444% (v/v) ß-Coumarsäure (90 mM in DMSO); 1% (v/v) Luminol (250 mM in DMSO)
Hybridisierungspuffer (Northern)	50 mM Pipes pH 7,0; 100 mM NaCl; 50 mM NaPhosphat pH 7,0; 1 mM EDTA; 5 % SDS; 60 µg/ml Heringssperma, denaturiert
IPH	50 mM Tris, pH 8,0; 5 mM EDTA; 150 mM NaCl; 0,5 % IGEPAL
LB-Medium	1% (w/v) Trypton; 0,5% (w/v) Hefeextrakt; 177 mM NaCl; pH 7,0
Luciferin-Lösung	1 mM D-Luziferin; 25 mM Glycylglycin, pH 7,8 im Verhältnis 1: 4,5 (v/v)

Fortsetzung Puffer und Medien

Bezeichnung	Zusammensetzung
10x MOPS	0,2 M MOPS, pH 7,0; 0,02 M Na-Acetat; 0,01 M EDTA
PBS	137 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 10 mM Na_2HPO_4; 2 mM KH_2PO_4; pH 7,4
RF1	100 mM KCl; 50 mM $MnCl_2$; 30 mM KAc; 10 mM $CaCl_2$; 15%% (v/v) Glycerin; pH 5,8 einstellen, sterilfiltrieren
RF2	10 mM MOPS; 10 mM KCl; 75 mM $CaCl_2$; 15% (v/v) Glycerin; pH 6,8 einstellen, sterilfiltrieren
10x PCR-Puffer (Invitrogen)	200 mM Tris-HCl (pH 8,4); 500 mM KCl
1x RNA-Probenpuffer	50% Formamid; 1,8 M Formaldehyd; 0,025% (w/v) Bromphenolblau; 30% Glycerin in 1x MOPS
S1	50 mM Tris, pH 8,0; 10 mM EDTA; 100 µg/µl RNase A
S2	200 mM NaOH; 1% SDS
S3	2,8 M Na-Acetat, pH 5,1
4x SDS-Ladepuffer	250 mM Tris-HCl pH 6,8; 2% SDS (w/v); 40 % (v/v) Glycerol; 0,1 % (w/v) Bromphenolblau; 20 % (v/v) β-Mercaptoethanol
10x SDS-Laufpuffer	1920 mM Glycin; 250 mM Tris; 1% (w/v) SDS
20x SSC	3 M NaCl; 0,3 M NaCitrat pH 7,0
1x TBE	89 mM Tris; 0,9 mM EDTA; 89 mM Borsäure; pH 8,4
1x TBS	50 mM Tris pH 7,6; 150 mM NaCl
TBS/Tween	0,5% (v/v) Tween 20 in TBS
TBS/Tween/Milch	0,5% (v/v) Tween 20; 4% (w/v) Milchpulver in TBS

3.11 Radioaktivität

Bezeichnung	Spezifische Aktivität	Konzentration	Hersteller
S-Adenosyl-L-[*methyl*-^{14}C]methionine	53 - 60 mCi/mmol	25 µCi/mL	Amersham
[α-^{32}P]dCTP	~ 6000 Ci/mmol	10 mCi/mL	Amersham

3.12 siRNA

Bezeichnung	Gen	Zielsequenz	Antisense-Sequenz	3´ Chemie	Literatur, beschrieben von
siCARM1	CARM1, human	CGG CGA GAU CCA GCG GCA C	GUG CCG CUG GAU CUC GCC G	dTdT	Chevillard-Briet et al., 2002
siCARM1_1	CARM1, human	CAU GAU GCA GGA CUA CGU G	CAC GUA GUC CUG CAU CAU G	dTdT	*diese Arbeit*
siCARM1_2	CARM1, human	GGA CAU GUC UGC UUA UUG C	GCA AUA AGC AGA CAU GUC C	dTdT	Dharmacon
siCARM1_3	CARM1, human	UGG AGC CGG AUC UAA GAU G	CAU CUU AGA UCC GGC UCC A	dTdT	*diese Arbeit*
siGFP	EGFP	GCA AGC UGA CCC UGA AGU U	AAC UUC AGG GUC AGC UUG C	dTdT	Caplen et al., 2001
siNon-Targeting			UAG CGA CUA AAC ACA UCA A	dTdT	Dharmacon
siPRMT1_1	PRMT1, human	CGU GUA UGG CUU CGA CAU G	CAU GUC GAA GCC AUA CAC G	dTdT	*diese Arbeit*
siPRMT1_2	PRMT1, human	UCA AAG AUG UGG CCA UUA A	UUA AUG GCC ACA UCU UUG A	dTdT	Dharmacon

siRNA wurden von Dharmacon (Chicago, USA) oder Eurogentec (Seraing, Belgien) bezogen.

3.13 Vektoren

Bezeichnung	Beschreibung	tag	Promotor	Herkunft
pcDNA3-HA	eukaryotischer Expressionsvektor	HA (N-terminal)	CMV	Invitrogen, Tony Kouzarides (HA-tag)
pcDNA3-CARMER	Expressionskonstrukt für CARM1 aus Drosophila	HA (N-terminal)	CMV	Sharad Kumar, umkloniert
pcDNA3-CARMUT	Expressionskonstrukt für katalytisch inaktives CARM1 aus Drosophila	HA (N-terminal)	CMV	Sharad Kumar, umkloniert
pcDNA3.1	eukaryotischer Expressionsvektor	Myc-Hexahis (C-terminal)	CMV	Invitrogen
pcDNA3.1-hPRMT1	Expressionskonstrukt für humanes PRMT1	Myc-Hexahis (C-terminal)	CMV	Michael Stallcup
pECE-STAT5B	Expressionskonstrukt für murines PRMT1	-	SV40	Ingrid Behrmann
pGL3-6GAS	Luciferase-Reporter	-	sechsfache Kopie der *γ-activated site* des β-Casein Promotors	Ingrid Behrmann
pSG5-mCARM1	Expressionskonstrukt für murines PRMT1	HA (N-terminal)	SV40	Uta-Maria Bauer

3.14 Verbrauchsmaterialien, fest

Bezeichnung	Hersteller	Erläuterung/Anwendung
AMPLIseal, Transparente Microplatten Abdeckfolie	Greiner	qPCR
Immobilon-P Transfer Membrane	Millipore	Proteintransfer, PVDF-Membran
Multiply-Pro Gefäß 0,2ml, PP	Sarstedt	PCR

Fortsetzung Verbrauchsmaterialien, fest

Bezeichnung	**Hersteller**	**Erläuterung/Anwendung**
PP-PCR-Platte, 96well	Greiner	PCR
Protran	Schleicher + Schüll	Proteintransfer, Nitrocellulose-Membran
Reaktionsgefäß, 1,5 ml	Greiner	
Reaktionsgefäß, 2,0 ml	Greiner	
Safe-Twist 1,7 ml	Eppendorf	Schraubdeckelgefäß
Strips of 8 Thermo-Tubes + Clear Caps	ABgene	Gefäße für die qPCR
Zellkulturschalen und -flaschen	Greiner	

3.15 Zelllinien

Bezeichnung	**Zelltyp**	**Organ**	**Organismus**
BJ	Fibroblast	Vorhaut	Homo sapiens
C2C12	Myoblast	Muskel	Mus musculus
HEK293	embryonale Zelllinie	embryonale Niere	Homo sapiens
HeLa	Epithelzelle	Cervixkarzinom	Homo sapiens
MCF7	Epithelzelle	Milchdrüse	Homo sapiens
NIH3T3	Fibroblast	Embryo	Mus musculus

4 Methoden

4.1 Mikrobiologische und Molekularbiologische Methoden

4.1.1 Plasmidpräparation aus *E.coli* (Minipräparation)

Eine 3 ml Übernachtkultur in LB-Medium wurde bei 13000 UpM für 5 Minuten zentrifugiert und das Pellet in 150 µl eiskaltem S1 resuspendiert. Zur Lyse wurden 150 µl S2 zugegeben und vorsichtig gemischt. Nach einer Inkubation für 5 Minuten bei Raumtemperatur (RT) wurde die Suspension mit 150 µl S3 neutralisiert. Es wurde 5 Minuten auf Eis inkubiert und danach für 10 Minuten bei 13000 UpM zentrifugiert. Der Überstand wurde mit zwei Volumenanteilen 100%igem Ethanol versetzt, geschwenkt und für 10 Minuten bei 13000 UpM bei 4°C zentrifugiert. Das Pellet wurde mit 500 µl 70%igem Ethanol gewaschen, anschließend getrocknet und in 20 - 50 µl Aqua bidest gelöst.

4.1.2 Plasmidpräparation aus *E.coli* (Maxipräparation)

Die Präparation erfolgte mit dem Jet Star Plasmid Maxi Kit von Genomed. Eine Übernachtkultur E.coli (300 ml) wurde 10 min bei 4000 UpM (4°C) zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 10 ml kaltem E1 gelöst. Nach 5 Minuten Inkubation bei RT wurden 10 ml E2 zugegeben und leicht gemischt, erneut für 5 Minuten bei RT inkubiert, 10 ml E3 zugegeben und 5x geschwenkt. Nach einer Inkubation für 20 min auf Eis wurde für 30 min bei 14000 UpM zentrifugiert (4°C). Der Überstand der lysierten Bakterien wurde durch eine Mullkompresse auf eine mit 30 ml E4 äquilibrierte Säule gegeben. Nach Auftrag des Lysats wurde die Säule mit 60 ml Waschpuffer E5 gewaschen. Die DNA wurde mit 15 ml E6 eluiert und mit 10 ml Isopropanol versetzt. Es folgte eine Zentrifugation bei 4°C für 20-30 min bei 4800 UpM. Der Überstand wurde vorsichtig dekantiert und das luftgetrocknete Pellet in 300 µl Aqua bidest gelöst. Die DNA wurde in ein Reaktionsgefäß mit 15 µl 5 M NaCl pipettiert (0,25 M NaCl-Endkonzentration) und gut gemischt. Die Lösung wurde mit

900 µl 100% Ethanol gemischt, bis sich ein sichtbares Präzipitat (ausgefallene DNA) bildete. Die DNA wurde in ein Reaktionsgefäß mit 900 µl 75% Ethanol überführt. Dieser Schritt wurde wiederholt. Dann wurde die DNA in ein leeres Reaktionsgefäß gegeben. Das luftgetrocknete Pellet wurde je nach Größe in ca. 100-400 µl Aqua bidest aufgenommen.

4.1.3 Fällung von DNA mit Ethanol/Natriumacetat

Die zu fällende Probe wurde mit 1/10 Volumenanteil 3 M Na-Acetat pH 5,2 (Endkonzentration 0,3 M) versetzt und gemischt. Nach der Zugabe von zwei Volumenanteilen 100% Ethanol wurde die Probe durchmischt und bei 13000 UpM für 15 Minuten bei 4°C zentrifugiert. Das Pellet wurde mit 500 µl 70% Ethanol gewaschen und erneut für 10 Minuten bei 13000 UpM bei 4°C zentrifugiert. Das Pellet wurde an der Luft oder mit Hilfe einer Vakuumzentrifuge getrocknet. Danach wurde die DNA in Aqua bidest aufgenommen.

4.1.4 Fällung von DNA mit Isopropanol

DNA wurde mit 0.7 Volumenanteil Isopropanol gefällt (Vorgehensweise siehe 4.1.3.) und in Wasser gelöst. Optional wurde die Effizienz der Fällung durch Zugabe von 0,1 Volumenanteil 3 M Natriumacetat und 100 µg/ml Glycogen erhöht.

4.1.5 Auftrennung der DNA in Agarosegelen

Die Gelelektrophorese dient dem Nachweis und der Größenauftrennung von DNA. Dabei wird eine interkalierende Substanz, Ethidiumbromid, verwendet, die durch UV-Licht zur Fluoreszenz im sichtbaren Bereich angeregt wird. Die Konzentration der Agarose betrug 0,8 - 3 % in 1x TBE, der ebenfalls als Elektrophoresepuffer diente. DNA Proben wurden mit entsprechenden Volumen des sechsfachen Probenpuffers

versetzt und in die Taschen des Gels geladen. Die Auftrennung erfolgte bei einer Feldstärke von 6V/cm.

4.1.6 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren mit einem Spektralphotometer

Bei einer Wellenlänge von 260 nm und der Schichtdicke einer Küvette von 1 cm entspricht eine OD 1 einer Konzentration von 50 µg/ml doppelsträngiger DNA und 40 µg/ml RNA. Als Maß für die Reinheit der Nukleinsäuren diente der Quotient aus den Wellenlängen 260 nm und 280 nm. Für reine Nukleinsäuren sollte der Wert nicht niedriger als 1,8 liegen, da dies auf Verunreinigung durch Proteine hinweist.
Bei Messungen der Nukleinsäurekonzentration mit einem NanoDrop-Spektralphotometer wurde auf die Verwendung von Küvetten verzichtet. Die Berechnungen (Konzentrationsbestimmung; 260 nm/280 nm) fanden automatisiert statt.

4.1.7 Sequenzanalysen der DNA

Die Sequenzierungen erfolgten durch die Firma Sequence Laboratories, Göttingen.

4.1.8 Präparation von Gesamt-RNA aus Säugerzellen

Die RNA-Präparation wurde mit dem peqGOLD Total RNA Kit von Peqlab laut Herstellerangaben durchgeführt. Prinzip dieser Aufreinigung ist die Bindung der RNA nach Zelllyse an eine Silicamembran. Um eine Verunreinigung durch genomische DNA zu vermeiden, wurde die an die Membran gebundene Nukleinsäure einem DNase-Verdau unterzogen. Die Elution erfolgte mit 30 - 60 µl des beigefügten RNase-freien Wassers.

4.1.9 Auftrennung der RNA in Formaldehyd-Agarosegelen

Ein Gel dessen Volumen 100 ml betrug wurde wie folgt gegossen. 1,2 g Agarose wurden in 72 ml Aquq bidest aufgekocht. Danach wurden unter dem Abzug 18 ml 37 % Formaldehyd und 10 ml 10x MOPS-Puffer hinzugegeben. Schließlich wurden 5 µl einer 1 %igen Ethidiumbromid-Lsg untergemischt. Die RNA-Lösung wurde mit 1x RNA-Probenpuffer versetzt, für 10 Minuten bei 65°C inkubiert und auf das Gel aufgetragen. Die Auftrennung erfolgte bei einer Feldstärke von 6V/cm. Als Elektophoresepuffer diente 1x MOPS.

4.1.10 Northern Blot

Ein Formaldehyd-Agarosegel wurde für 20 min in 0,05 M NaOH, danach für 20 min in Wasser und anschließend für 20 min in 20x SSC gebadet. Der Blot wurde von oben nach unten folgendermaßen aufgebaut:

Gewicht (~ 500 g)
Papiertücher
3MM Papier (2 Stück)
Nylonmembran
Gel (die Taschen nach unten zeigend)
3MM Papier (2 Stück)
3MM-Brücke (taucht an den Enden in 20x SSC)
Auflagefläche
Plastikwanne mit 20x SSC

Der Transfer erfolgte über Nacht. Am nächsten Tag wurde die RNA mittels UV-Licht auf der Membran vernetzt.

4.1.11 Herstellung einer radiaktiven Sonde und Hybridisierung eines Northern Blots

Um eine Hybridisierungsprobe zu generieren, musste zunächst ein Vektor gespalten werden, der eine der verwendeten PRMT enthielt. Entsprechende Restriktionsendonukleasen wurden unter den vom Hersteller empfohlenen Pufferbedingungen eingesetzt. Der gesamte Ansatz wurde nach der Restriktion in einem Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt. Ein Gelstück, welches das zu markierende Fragment enthielt, wurde anschließend ausgeschnitten und in einen Dialyseschlauch mit geringem Volumen Aqua bidest überführt. Der Schlauch wurde verschlossen und die DNA bei einer Feldstärke von 6 V/cm abhängig von der Größe des Fragments für 10 - 30 min eluiert. Die DNA wurde im Anschluss gefällt, gewaschen und in Aqua bidest gelöst. Für die radioaktive Markierung wurde die DNA auf 4,5 ng/µl verdünnt. Davon wurden 11 µl für 10 min bei 95 °C erhitzt und anschließend 5 min auf Eis inkubiert. Es wurden 4 µl High Prime Lösung und 5 µl α^{32}P dCTP dazugegeben. Der Ansatz wurde 1 h bei 37 °C inkubiert. Währenddessen wurde der Northern Blot zweimal mit 2x SSC für je 2 min gewaschen. Danach wurde der Blot zusammen mit Hybridisierungspuffer in eine Röhre gegeben und in einem Ofen für 1 h bei 65 °C vorhybridisiert.
Die markierte Sonde wurde mittels eines BIO-RAD Micro spin Säulchens nach Angabe des Herstellers aufgereinigt und für 10 min bei 95 °C denaturiert. Die radioaktive Probe wurde zum Blot gegeben und über Nacht inkubiert (~ 10^7 cpm/ml Hybridisierungslösung). Am nächsten Tag wurde dreimal für 15 min in mit Waschpuffer (0,5x SSC, 5 % SDS) gewaschen. Im Anschluss erfolgte die Exposition der Membran gegen einen Röntgenfilm.

4.1.12 cDNA-Synthese

Die cDNA-Synthese erfolgte mittels einer Reversen Transkriptase (M-MLV RT, Invitrogen). Eine Reaktion enthielt 0,5 - 2 µg Gesamt-RNA. Das Volumen aller Proben wurde mit Aqua bidest auf 10 µl aufgefüllt. Zu jeder Probe wurde 1 µl 10 mM dNTPs und 1µl (entspricht 0,5 µg) eines 17mer Oligo-dT Primers gegeben. Nach

einer Inkubation für 5 Minuten bei 65°C wurden 4 µl des 5x Reaktionspuffers (250 mM Tris-HCl, pH 8,3; 375 mM KCl; 15 mM $MgCl_2$), 2 µl 100 mM DTT, 1 µl RNase-Inhibitor (entspricht 30 Units) und 1 µl M-MLV RT (entspricht 200 Units) zu den Proben pipettiert. Das Endvolumen jedes Ansatzes betrug 25 µl. Zur reversen Transkription wurden die Proben für 50 Minuten bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde die M-MLV RT für 15 Minuten bei 70°C inaktiviert. Die entstandene cDNA wurde in die Polymerase-Kettenreaktion eingesetzt. Die Lagerung erfolgte bei - 20 °C.

4.1.13 Polymerase-Kettenreaktion (*polymerase chain reaction*, PCR)

Die PCR dient der spezifischen Amplifizierung einer DNA-Sequenz zwischen zwei Oligonukleotiden (Primern), die gegenläufig an komplementäre DNA-Stränge binden. Die zu amplifizierende DNA wird zunächst durch hohe Temperatur (> 90 °C) in ihre Einzelstränge getrennt. Danach erfolgt bei geeigneter Temperatur die Anlagerung (*annealing*) der Primer an die komplementären Sequenzabschnitte. Im Anschluss erfolgt die Verlängerung der Primer durch eine hitzestabile DNA-Polymerase (*elongation*). Die jeweils synthetisierten DNA-Stränge dienen in einem zweiten Reaktionszyklus ihrerseits als Matrize. Durch weitere Wiederholungen dieses Vorgangs entseht ein spezifisches dopppelsträngiges DNA-Amplifikat.
PCR-Reaktionen wurden mit der *Taq*-Polymerase (Invitrogen) und mitgelieferten Pufferkomponenten durchgeführt. Ein typischer Reaktionsansatz enthielt:

	5 µl	10x Puffer (200 mM Tris-HCl, pH 8,4; 500 mM KCl)
	0,5 µl	10 mM dNTP-Mix
	1 µl	Vorwärtsprimer (20 pmol)
	1 µl	Rückwärtsprimer (20 pmol)
	0,75 µl	50 mM $MgCl_2$
	0,2 µl	Taq-Polymerase (1 Unit)
	10 - 200 ng	*template* DNA
ad	25 µl	Aqua bidest

Die Reaktion erfolgte in einem programmierbaren *Thermocycler*. Ein PCR-Programm enthielt folgende Schritte:

	93 °C	3 min	initiale Denaturierung
	93 °C	30 s	Denaturierung
20 - 30x	50 -60 °C	30 s	*annealing*
	70 °C	60 s/kb Amplifikat	*elongation*
	70 °C	10 min	*elongation*

Die entstandenen DNA-Fragmente wurden mittels der Gelelektrophorese analysiert.

4.1.14 quantitative Polymerasekettenreaktion (qPCR, "Echtzeit"-PCR)

Im Vergleich zur Endpunkt-PCR, bei der DNA-Produkte qualitativ nachgewiesen werden, ist es mit Hilfe der quantitativen PCR möglich, Aussagen über die Ausgangs-DNA-Mengen zu machen.
Bei der qPCR wird ein fluoreszierender Reporterfarbstoff verwendet, um die Amplifikation der DNA zu verfolgen. Die in dieser Arbeit verwendete Substanz ist Sybr Green, die, wenn sie interakliert, unter UV-Bestrahlung (494 nm) Licht bei 521 nm emittiert. Maschinen, die mit entsprechenden Photosensoren diese Lichtemissionen messen, heißen *LightCycler*. Die Reaktionen wurden mit Hilfe eines Fertigansatzes der Firma Bioline durchgeführt. Ein typischer Reaktionsansatz enthielt:

1 µl	Vorwärtsprimer (20 pmol)
1 µl	Rückwärtsprimer (20 pmol)
0,5 µl	Sybr Green
10 µl	ImmoMix (Fertigansatz mit hitzeaktivierbarer DNA Polymerase)
4 µl	cDNA-Lösung
8,5 µl	Aqua bidest

Das Programm unterschied sich zur Endpunkt-PCR darin, dass die Temperatur für *annealing* und *elongation* gleich gewählt wurde (Zwei-Stufen-PCR):

	95 °C	10 min	hitzeaktivierender Schritt
40x	95 °C	15 s	
	60 °C	1 min	

Die Quantifizierung der PCR basiert auf der Berechnung des Fluoreszenz-Schwellenwertes, dem so genannten *Threshold Cycle* oder CT-Wert. Der CT-Wert ist der PCR-Zyklus, bei dem die Reporterfluoreszenz die Hintergrundfluoreszenz signifikant übersteigt. Die Veränderungen der Transkriptmenge eines Gens kann mit Hilfe dieses CT-Werts bestimmte werden, wenn er mit dem CT-Wert eines unveränderlichen Haushaltsgens (Standard) ins Verhältnis gesetzt wird. Beispielhaft ist hier die Quantifizierung des Gens SLC2A14 relativ zum Gen GAPDH dargestellt:

$$\Delta CT_{SLC2A14} = CT_{SLC2A14} - CT_{GAPDH} = 20{,}19 - 15{,}96 = 4{,}23$$

Nach Verlust von CARM1 und PRMT1 (dkd) wurden die Transkriptmengen erneut analysiert:

$$\Delta CT_{SLC2A14\,(dkd)} = CT_{SLC2A14\,(dkd)} - CT_{GAPDH\,(dkd)} = 21{,}97 - 15{,}90 = 6{,}07$$

Um die relative Expression von SLC2A14 zu erhalten, subtrahiert man zunächst

$$\Delta\Delta CT = \Delta CT_{SLC2A14} - \Delta CT_{SLC2A14(dkd)} = 4{,}23 - 6{,}07 = -1{,}84$$

und errechnet daraus

$$\text{ratio} = 2^{\Delta\Delta CT} = 0{,}28$$

Die Expression von SLC2A14 war also nach Verlust von CARM1 und PRMT1 um mehr als dreieinhalbfach zurückgegangen.

In der vorliegenden Arbeit wurden alle Reaktionen als technische Triplikate durchgeführt. Daraus ergaben sich die Standardabweichungen der CT Werte. Die

Standardabweichung für die ΔCT Werte erhält man nach dem Fehlerfortpflanzungsgestetz aus dem Fehler der Einzelwerte

$$s = \sqrt{s_1^2 + s_2^2}$$

Für die $2^{\Delta\Delta CT}$ Funktion wird anschließend der Bereich $2^{\Delta\Delta CT +/-s}$ berechnet. Dies ergibt den Fehlerbereich, der wie folgt angegeben wird $(2^{\Delta\Delta CT +s}) - (2^{\Delta\Delta CT})$.

4.1.15 Erstellung eines Genexpressionsprofils (Microarray-Analyse)

4.1.15.1 mRNA-Amplifikation

Erststrang cDNA-Synthese

Das *Message Amp aRNA Kit* (Ambion) wurde zur Amplifikation von mRNA aus Gesamt-RNA-Isolaten benutzt. 1 µg Gesamt-RNA in 11 µl Aqua bidest und 1 µl T_7-Oligo(dT) Primer wurden für 10 min bei 70 °C inkubiert und anschließend auf Eis abgekühlt. Dazu wurde eine Lösung, bestehend aus 2 µl 10x Erststrangpuffer, 1µl Ribonuklease Inhibitor, 4 µl dNTP-Mix und 1 µl Reverse Transkriptase gegeben. Die Probe wurde gemischt und 2 h bei 42 °C inkubiert.

Zweitstrangsynthese

Eine zweite Lösung, bestehend aus 63 µl Nuklease-freiem Wasser, 10 µl Zweitstrangpuffer, 4 µl dNTP-Mix, 2µl DNA Polymerase und 1 µl RNaseH, wurde angesetzt und der Probe untergemischt. Es erfolgte eine Inkubation für 2 h bei 16 °C.
Die entstandene doppelsträngige cDNA wurde aufgereinigt. Die Probe (100 µl) wurde zu 250 µl cDNA-Bindepuffer pipettiert. Der gesamte Ansatz wurde auf eine Säule gegeben, die 1 min bei 12000 UpM zentrifugiert wurde. Die Säule wurde mit 500 µl cDNA-Waschpuffer gewaschen und 1 min bei 12000 UpM trocken zentrifugiert. Die cDNA wurde zweimal mit je 10 µl nukleasefreiem Wasser (55 °C) eluiert.

In-vitro-Transkription

Der 20 µl cDNA-Lösung wurden 16 µl 75 mM NTP-Mix, 4 µl Reaktionspuffer sowie 4 µl T_7-Enzym-Mix zugestzt und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Probe (44 µl) mit nukleasefreiem Wasser auf 100 µl aufgefüllt. Es erfolgte die Aufreinigung der amplifizierten RNA.

Die Probe (100 µl) wurde zu 350 µl aRNA-Bindepuffer und 250 µl Ethanol (100 %) gegeben. Nach Durchmischung wurde die Probe auf eine Säule gegeben und 1 min bei 12000 UpM zentrifugiert. Die Säule wurde mit 650 µl aRNA Waschpuffer gewaschen und 1 min bei 12000 UpM getrocknet. Die RNA wurde zweimal mit 50 µl nukleasefreiem Wasser (55 °C) eluiert.

4.1.15.2 Präparation der Hybridisierungsprobe

cDNA-Synthese

Für die Präparation der Hybridisierungsprobe wurde das CyScribe Post Labelling Kit RPN5660 (Amersham) verwendet.

8 µl amplifizierte RNA (0,5 - 2,0 µg) und 3 µl Random Nonamer-Primer wurden 5 min bei 70 °C erhitzt und anschließend 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Dem Ansatz wurden 4 µl CyScript-Puffer; 2 µl 0,1 M DTT, 1 µl dNTP-Mix, 1 µl aadUTP (Aminoalyl-dUTP) und 1 µl CyScript Reverse Transkriptase zugegeben. Es erfolgte eine Inkubation für 1,5 h bei 42 °C. Danach wurde der Probe 2 µl 2,5 M NaOH zugegeben. Es folgte eine Inkubation für 15 min bei 37 °C. Im Anschluss wurde die Probe mit 10 µl 2 M HEPES (freie Säure) neutralisiert. Der Ansatz wurde mittels eines PCR-Aufreinigungs-Kits (Qiagen) über Säulen nach Angaben des Herstellers aufgereinigt. Die Elution von der Säule erfolgte in zweimal 30 µl 0.1 M $NaHCO_3$ (Bicarbonat).

Markierung der Probe

Zur Fluoreszenz-Markierung wurde die Probe (60 µl) in ein Reaktionsgefäß pipettiert, das den Farbstoff Cy5 enthielt. Eine Referenzprobe (in dieser Arbeit *siNON-targeting*) wurde in ein anderes Reaktionsgefäß mit dem Farbstoff Cy3 pipettiert. Die Ansätze wurden 1 h bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Dieser Schritt dient

der Veresterung der Farbstoffe an die Aminoalyl-UTP der cDNA. Beide Proben wurden anschließend vereint mit 600 µl PB-Puffer (Qiagen) auf eine Säule gegeben. Die Säule wurde jeweils einmal mit 700 µl und 400 µl PE-Puffer gewaschen und anschließend 1 min trockenzentrifugiert. Die Elution der markierten cDNA erfolgte mit zweimal 30 µl Aqua bidest pH 8 - 9 (55 °C). Der Probe wurde 20 µl humane Cot1 DNA (1 mg/ml) und 4 µl Poly A (5 µg/µl) zugefügt, sodass der Ansatz ein Volumen von 84 µl besaß. Dieser Ansatz wurde danach in einem Vakuumkonzentrator auf 36 µl eingeengt, und im Anschluss mit 10 µl 20x SSC und 4 µl 2 % SDS versetzt.
Für jedes Experiment wurde durch eine Umkehrung der Probenmarkierung (Referenzprobe Cy5; Probe Cy3) ein technisches Dublikat hergestellt.

4.1.15.3 Hybridisierung

cDNA-Chips wurden 3 min in kochendem MilliQ-Wasser denaturiert und anschließend in Ethanol (100 %) bei -20 °C fixiert. Es erfolgte ein Zentrifugationsschritt (1500 UpM, 3 min), der der Trocknung diente. Die Chips wurden danach in Blocking-Reagenz (1 % BSA; 4,5x SSC; 0,1 % SDS) bei 55 °C für 20 - 30 min inkubiert, anschließend 3 min in MilliQ-Wasser gewaschen und erneut ttrocken zentrifugiert.
Die Probe (50 µl) wurde auf den Chip pipettiert und ein zweiter Chip wurde auf den ersten gelegt, sodass die Probe mit zwei Sätzen fixierter cDNA in Berührung kam (*Sandwich*-Methode). Die Hybridisierung erfolgte über Nacht bei 55 °C im 50 ml Falkon-Röhrchen. Um ein Austrocknen der Probe zu verhindern, wurde ein gefaltetes Kimwipes-Tuch mit 3x SSC; 0,1 % SDS benetzt und in das Röhrchen vorgelegt.
Am nächsten Tag wurden die Chips zweimal in 0,1x SSC; 0,1 % SDS für 10 min gewaschen. Danach wurden die Chips zweimal in 0,1 SSC und einmal in MillQ-Wasser für 5 min gewaschen. Nach der Zentrifugation (trocknen) erfolgte das einscannen der Chips. Die Auswertung erfolgte durch die Microarray-Einheit am Institut.

4.1.16 Herstellung chemisch kompetenter Zellen (*E.coli*)

Ein Bakterienstamm wurde auf LB-Agarplatte ausgestrichen, eine 2 ml Übernachtkultur in LB-Medium angeimpft und am nächsten Tag eine Kultur in 200 ml LB-Medium bis zu einer OD_{595} von 0,6 gezogen. Die Zellen wurden in gekühlten 50 ml Gefäßen bei 3000 UpM für 15 Minuten bei 4°C in einem SS34 Rotor zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das gesamte Pellet in 67 ml RF1-Lösung durch leichtes vortexen gelöst und 15 Minuten auf Eis inkubiert. Nach erneutem Zentrifugieren bei 3000 UpM für 15 Minuten bei 4°C wurde das Pellet in 16 ml RF2-Lösung resuspendiert und für 15 Minuten auf Eis inkubiert. Aliquots zu 200 µl wurden in Reaktionsgefäße pipettiert und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Lagerung erfolgte bei -80°C.

4.1.17 Transformation chemisch kompetenter Zellen (*E.coli*)

Die DNA (50 ng – 1 µg Plasmid-DNA) wurde zu 100 – 200 µl Suspension chemisch kompetenter Bakterien gegeben. Nach einer Inkubation von 20 Minuten auf Eis wurden die Bakterien für 2 Minuten bei 42°C inkubiert. Anschließend wurden 500 µl LB-Medium ohne Antibiotika zugegeben und für 30 Minuten bei 37°C inkubiert, bevor der Ansatz auf Agarplatten ausgestrichen wurde.

4.2 Proteinbiochemische Methoden

4.2.1 Proteinkonzentrationsbestimmung nach Bradford (Bradford, 1976)

Zur Konzentrationsbestimmung von Proteinen wird die Verschiebung des Absorptionsmaximums von Coomassie von 465 nm zu 595 nm nach Bindung an Proteine im sauren Milieu ausgenutzt.
In Plastikküvetten wurden jeweils 100 µl Aqua bidest vorgelegt , darin BSA von 1 – 10 µg pipettiert, um eine Eichgerade zu erstellen. Die zu bestimmende Probe wurde in

Doppelbestimmungen pipettiert. Nach Zugabe von je 900 µl Bradford-Reagenz wurde die Absorption der Proben bei 595 nm gemessen. Anhand der Eichgerade konnte die Proteinkonzentration der Probe bestimmt werden.

4.2.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE) von Proteinen (Laemmli 1970)

Die PAGE erfolgte mit dem Mini-Protean System von BIO-RAD.

In der vorliegenden Arbeit wurden 10 %ige Trenngele nach folgendem Schema gegossen:

2,5 ml	30 % Acrylamid-Lösung
2,8 ml	1 M Tris pH 8,8
37,5 µl	20 % SDS
2,81 ml	Aqua bidest
20 µl	20 % APS
10 µl	TEMED

Sammelgele setzten sich wie folgt zusammen:

0,85 ml	30 % Acrylamid-Lösung
0,625 ml	1 M Tris pH 6,8
25 µl	20 % SDS
3,5 ml	Aqua bidest
10 µl	20 % APS
5 µl	TEMED

Die mit Probenpuffer versetzten Proben wurden für 5 Minuten bei 95°C erhitzt und danach in die Geltaschen pipettiert. Die Elektrophorese erfolgte bei maximal 170 V für etwa 1,5 Stunden bei RT. Die so aufgetrennten Proteine wurden entweder mit Coomassie gefärbt oder für einen Immunblot auf eine Membran transferiert.

4.2.3 Färbung von SDS-Gelen mit Coomassie

Das Gel wurde je nach Dicke für 15 - 60 Minuten in Coomassie (25% (v/v) Ethanol; 50% (v/v) Essigsäure; 0,25% (w/v) Coomassie Brilliant Blau G-250) inkubiert. Zum Sichtbarmachen der Proteine wurde das Gel in Entfärber (25% (v/v) Ethanol; 50% (v/v) Essigsäure) geschwenkt, bis die gewünschte Intensität der Proteinbanden erreicht war. Die Dokumentation erfolgte durch Scannen oder Trocknen des Gels.

4.2.4 Western Blot, nass

Mit dieser Methode werden Proteine nach der Auftrennung mittels SDS-PAGE im elektrischen Feld auf eine Membran transferiert und dort immobilisiert.
Der Aufbau des Blots erfolgte nach folgendem Schema:

Anode	Schwamm
	2 Whatman Papiere
	Membran (PVDF oder Nitrocellulose)
	SDS-Gel
Kathode	2 Whatman Papiere

Die Proteine aus 0,75 mm dicken Gelen wurden 1 h, aus 1,5 mm dicken Gelen 1,5 h mit 45 V auf die Membran transferiert. Bei der Verwendung von PVDF-Membran musste diese zuvor 15 Sekunden in Methanol geschwenkt werden. Mit einer Ponceau-Färbung (0,5% (w/v) Ponceau S; 1% Essigsäure) der Membran wurde der Erfolg des Transfers überprüft. Alternativ wurde bei der SDS-PAGE ein gefärbter Marker verwendet, dessen farbige Banden auf der Membran nach dem erfolgreichen Transfer sichtbar waren.

4.2.5 Immunfärbung

Nach dem Transfer der Proteine wurden die freien Proteinbindestellen auf der Membran durch Inkubation für 1 Stunde bei RT in TBS/Tween/Milch abgesättigt. Der

Erst-Antiköper wurde in TBS/Tween 1:1000 verdünnt. Die Inkubation der geblockten Membran mit dem verdünnten Erstantikörper erfolgte 1h bei oder über Nacht bei 4°C. Um nicht gebundenen Antikörper von der Membran zu entfernen, wurde diese mit TBS/Tween dreimal 1 min gewaschen. Der entsprechende Zweitantikörper wurde ebenfalls in TBS/Tween verdünnt und mit der Membran für 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Die Membran wurde im Anschluss dreimal für 10 min mit TBS/Tween und einmal 1 min mit TBS gewaschen.
Für eine Membran wurden je 10 ml ECL-Lösung 1 und ECL–Lösung 2 angesetzt. Diese wurden erst kurz vor Inkubation mit der Membran zusammengegeben. In einer Filmkassette wurde ein Röntgenfilm auf der von einer Folie bedeckten Membran exponiert. Die Expositionszeit hing von der Stärke des Signals ab und variierte von einer Sekunde bis zu einer Stunde. Die Entwicklung des Röntgenfilms erfolgte mit dem X-Omat 2000 von Kodak.

4.2.6 Präparation von Gesamtprotein aus Säugerzellen (IPH-Extrakt)

Adhärente Zellen wurden auf der Schale zweimal mit kaltem PBS gewaschen und in PBS mit einem Gummischaber geerntet. Die Zellen wurden für 3 Minuten bei 3000 UpM pelletiert und das Pellet in IPH-Puffer resuspendiert (je nach Größe des Pellets etwa 100 – 400 µl IPH-Puffer pro Pellet aus einer 6-cm Schale). Um einen Abbau und Denaturierung der Proteine zu verhindern, wurden dem IPH-Puffer Protease-Inhibitoren und 0,5 mM DTT zugesetzt. Die Zellsuspension wurde für 15 – 30 Minuten bei 4°C unter Rotation inkubiert. Die nachfolgende Zentrifugation bei 13000 UpM für 15 Minuten bei 4°C trennte die Zelltrümmer von den im Überstand enthaltenen Proteinen. Die Proteinlösung wurde bei -20°C gelagert. Sollten funktionelle Analysen mit dem Zellextrakt durchgeführt werden, wurde Glycerin (Endkonzentration 10%) zugegeben und die Extrakte bei -80°C gelagert.

4.2.7 Immunpräzipitation

Um ein Protein aus einem Extrakt aufzureinigen oder den Extrakt von diesem Protein zu depletieren wird eine Immunpräzipitation durchgeführt. Das Protein wird von einem spezifischen Antikörper erkannt, der wiederum an ProteinA und G Sepharose gebunden wird und so per Zentrifugation pelletiert werden kann.
Aus Zellen wurde ein Gesamtzell-Extrakt (IPH-Extrakt) hergestellt und mittels Bradford-Reagenz die Proteinkonzentration ermittelt. Je nach Experiment wurden pro Ansatz 500 µg bis 5 mg Proteinextrakt eingesetzt. Bei unterschiedlichen Konzentrationen der verwendeten Extrakte wurden die Gesamtvolumina mit IPH-Puffer angeglichen. 2 µg des spezifischen Antikörpers wurden üN mit dem Extrakt bei 4°C im Rad inkubiert. Pro Ansatz wurden je 10 µl ProteinA und G Sepharose gemischt und zweimal mit iPH-Puffer gewaschen. Die ProteinA/G Sepharose wurde zum Extrakt gegeben und für zwei Stunden bei 4°C auf einem Rad inkubiert. Danach wurde die Sepharose bei 3000 UpM für 5 Minuten pelletiert und insgesamt sechsmal mit IPH-Puffer gewaschen, um nicht gebundene Proteine zu entfernen. Das Pellet wurde nach dem Waschen in 1x SDS-Probenpuffer aufgenommen und die gebunden Proteine auf einem SDS-Gel analysiert.

4.2.8 Methyltransferase-Assay (*in vitro*)

In einem Methylierungsansatz wurden das zu methylierende Substrat, 1 µl ^{14}C-SAM und immunpräzipitierte PRMT vereint. Mit PBS wurde auf 20 – 35 µl aufgefüllt. Der Ansatz wurde für zwei Stunden schüttelnd (800 UpM, Thermomixer) bei 37°C inkubiert und anschließend mit SDS-Probenpuffer versetzt. Nach der gelelektrophoretischen Auftrennung wurden die Proteine auf eine Membran transferiert. Nach dem Trocknen wurde die Membran einem Röntgenfilm (Kodak BioMax MS), zusammen mit einer *TranScreen*-Folie (Kodak) für Niedrigenergie-Strahler ausgesetzt. Die Entwicklung des Films erfolgte in der Regel nach viertägiger Expositionszeit.

4.2.9 Luciferase-Assay

HeLa-Zellen wurden auf 24*well*-Platten ausgesät und bei einer 50 %igen Konfluenz transfiziert. Pro *well* wurden 2 µg DNA (500 ng Reporter, 500 ng β-Galactosidase, 333 ng je Expressionskonstrukt) in 100 µl Ca-P-Lösungen tropfenweise zugegeben. IL-4 (20 ng/mL Endkonzentration) wurde 16 h vor Ernte zu den Zellen gegeben. 48 h nach Transfektion wurden die Zellen in eiskaltem PBS gewaschen und anschließend in 150 µl 1x Passiv-Lysepuffer (Promega) für 0,5 h unter starkem Schütteln bei Raumtemperatur lysiert. 10 µl des Lysats wurden zusammen mit 150 µl Luciferin-Lösung und 350 µl ATP-Lösung in die Messung eingesetzt. Die RLU (*relative light units*) wurden mit einem Luminometer bestimmt.
Um Unterschiede in der Transfektionseffizienz der Reporterplasmide zu egalisieren wurde das ß-Galaktosidase Gen unter der Kontrolle eines konstitutiv aktiven Promotors transfiziert. ß-Galaktosidase katalysiert mit ß-Mercaptoethanol als reduzierenden Kofaktor die Spaltung von ONPG in gelbes Nitrophenol. Auf Basis dieser Reaktion wurde ein Enzymassay zur Bestimmung der Menge an ß-Galaktosidase verwendet.
Hierzu wurden für 24 Proben 25ml LacZ Puffer, 1.75ml ONPG und 65µl ß-Mercaptoethanol angesetzt und 1ml in Plastikküvetten aliquotiert. Nach Zugabe von 50µl Lysat erfolgte eine photometrische Messung der optischen Dichte bei λ=420nm, sobald eine deutliche Gelbfärbung sichtbar war (in der Regel nach 30 min). Als Leerwert diente LacZ-Puffer ohne Lysat.
Die RLU wurden zu denen des ß-Galaktosidase-Assays ins Verhältnis gesetzt. Alle Transfektionen wurden als Triplikate durchgeführt.

4.3 Zellbiologische Methoden und Zellkultur

4.3.1 Kultivierung von Säugerzellen

Die Kultivierung adhärenter humaner und muriner Zellen erfolgte in Kunststoff-Zellkulturflaschen verschiedener Größe. Das verwendete Standardmedium war DMEM, dem 10 % fötales Kälberserum und Penicillin/Streptomycin (nach Angaben

des Herstellers) zugegeben wurde. Die Inkubation erfolgte im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO_2.
Die Behandlung der Zellen erfolgte an einer Sterilbank, um Kontaminationen zu vermeiden. Zum Passagieren wurde zunächst das Kulturmedium entfernt und die Zellen mit PBS gewaschen. Dann wurden die Zellen mit Trypsin/EDTA überschichtet (ca. 30 µl/cm^2) und kurz bei 37 °C inkubiert. Die Zellen wurden durch leichtes Klopfen vollständig vom Gefäßboden gelöst und entsprechend verdünnt mit frischem Medium ausgesät.

4.3.2 Transfektion von DNA (Calcium-Phosphat)

Einen Tag vor der Transfektion wurden Zellen so ausplattiert, dass sie zum Zeitpunkt der Transfektion 30 – 50% Konfluenz erreicht hatten. Für die Transfektion wurde zunächst DNA vorgelegt, danach TE-Puffer (0,1 mM Tris; 0,01 mM EDTA, pH 8), 2xHBS (250 mM NaCl, 50 mM Hepes, 1,5 mM Na_2HPO_4) und 2,5 M $CaCl_2$ zugegeben, wobei nach jedem Schritt gevortext wurde. Übersicht der Volumina für die entsprechenden Kulturschalen-Größen:

	DNA	**TE**	**$CaCl_2$**	**2x HBS**
21 cm^2	10 µg	225 µl	25 µl	0,25 ml
56 cm^2	25 µg	450 µl	50 µl	0,5 ml
145 cm^2	50 µg	900 µl	100 µl	1 ml

Nach 30 Minuten Inkubation bei RT wurde die Lösung tropfenweise auf die Zellen gegeben und die Schale anschließend kurz geschwenkt. Nach 24 h wurde ein Mediumwechsel vorgenommen und die Zellen nach weiteren 24 h geerntet.

4.3.3 Transfektion von DNA (Fugene)

50 – 80% konfluente Zellen wurden in einem Verhältnis 3:2 (Reagenz:DNA) laut Herstellerangaben transfiziert. Ein Mediumwechsel war nicht nötig. Zellen wurden 24 h nach Transfektion geerntet.

4.3.4 Transfektion von siRNA (Oligofectamine)

Alle siRNA-Transfektionen wurden in 6 cm Schalen gemacht. Zellen besaßen eine Konfluenz von 30 %.
22 µl eines siRNA-Duplex (20 µM) wurden in 400 µl OptiMEM gelöst. 7 µl Oligofectamine wurden in 35 µl OptiMEM gelöst. Nach kurzer Inkubation wurde der Oligofectamine-Ansatz zum siRNA-Ansatz gegeben, gemischt und für 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Währenddessen wurden die Zellen mit PBS gewaschen und mit 1,5 mL DMEM (ohne Antibiotika, ohne Serum) überschichtet. Danach wurde der Transfektionsansatz zu den Zellen gegeben. Es folgte eine Inkubation für 4 h bei 37 °C (Inkubator). Danach wurde 3,5 mL DMEM (mit 10 % fötalem Kälberserum, ohne Antibiotika) zu den Zellen gegeben. Die Ernte der Zellen erfolgte 48 h nach Transfektion.

4.3.5 Immunfluoreszenz

Zellen wuchsen auf einem Deckgläschen bis zu einer 50 - 70 %igen Konfluenz in einer 6*well*-Schale heran. Zellen wurden dann in PBS gewaschen und 10 min in PBS/3 % Paraformaldehyd/2 % Sucrose bei Raumtemepratur fixiert. Anschließend wurde zweimal mit PBS gewaschen und noch einmal für 3 min mit PBS inkubiert. Die Zellen wurden für 5 min mit PBS/0,2 % Triton X 100 permeabilisiert. Danach wurde einmal mit PBS gewaschen und für 3 min wiederum in PBS inkubiert. Die nächste Inkubation erfolgte für 20 min in PBS/0,1 % Triton X 100/3 % Ziegenserum. Danach wurde das Deckgläschen aus der Schale entfernt, mit 75 µl Erstantikörper überschichtet und für 2 h bei Raumtemperatur in eine Feuchtkammer gelegt. Im

Anschluss wurde dreimal für 5 min mit PBS gewaschen und mit 75 µl Zweitantikörper überschichtet. Nach 30 minütiger Inkubation in der Feuchtkammer wurden die Zellen zweimal mit PBS für 5 min gewaschen. Dann erfolgte eine Inkubation für 5 min mit PBS und Bisbenzamid (Hoechst-Färbung der Nuklei). Das Deckgläschen wurde auf einem Objektträger unter Verwendung von Immu-Mount (Shandon) eingedeckt. Die Ränder des Deckgläschens wurden mit Nagellack versiegelt.

4.3.6 Einfrieren und Auftauen von Zellen

Die Zellen wurden trypsiniert und bei 1200 UpM für 5 Minuten pelletiert. Das Pellet aus einer 175 cm^2-Flasche wurde in 2 ml Einfriermedium (30% FCS; 10% DMSO in DMEM) aufgenommen und in 1 ml Aliquots in Einfrierröhrchen gegeben. Diese wurden zunächst über Nacht in einer Styroporbox langsam auf -80°C gekühlt, um anschließend in flüssigen Stickstoff überführt zu werden.
Zum Auftauen der Zellen wurden die Zellen in einer 175 cm^2-Flasche ausgesät. Am nächsten Tag erfolgte ein Mediumwechsel, um das DMSO zu entfernen.

5 Ergebnisse

5.1 PRMT werden von verschiedenen Zelllinien exprimiert

Bevor Versuche zur Rolle der Argininmethyltransferasen CARM1 und PRMT1 in der Genregulation gemacht wurden, galt es den Expressionsstatus einzelner PRMT in verschiedenen Zelllinien zu belegen. Daher wurde aus humanen Zelllinien RNA isoliert, um die relativen Transkriptmengen der PRMT 1 – 6 im Northern-Blot-Verfahren zu bestimmen. Der Vergleich mit dem ubiquitären Haushaltsgen GAPDH zeigt, dass PRMT1 und CARM1 am stärksten von allen untersuchten Argininmethyltransferasen exprimiert werden (Abb. 5).

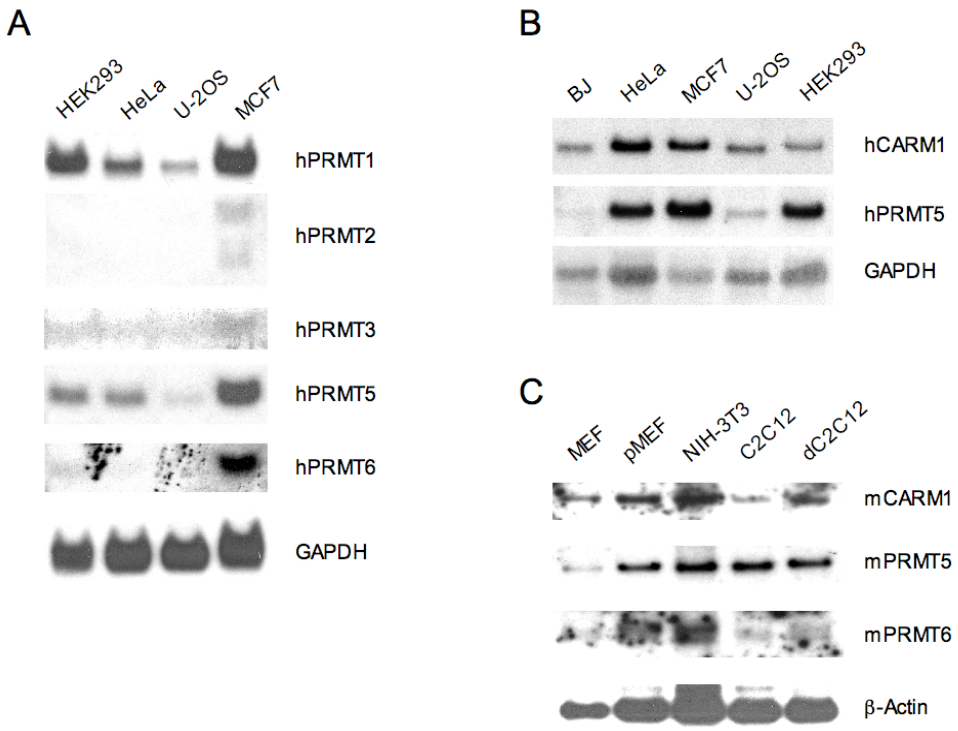


Abb. 5. Transkriptmengen von PRMT in verschiedenen Zellinien. Humane (h) PRMT wurden in embryonalen Nierenzellen (HEK293), Cervixkarzinomzellen (HeLa), Osteosarkomzellen (U-2OS), epithelialen Milchdrüsenzellen (MCF7) sowie Vorhautfibroblasten (BJ) mittels Northern Blot untersucht (A,B). Ebenso wurden murine (m) PRMT in embryonalen Mäusefibroblasten (MEF), primären Fibroblasten (pMEF), in einer etablierten embryonalen Fibroblastenzelllinie (NIH-3T3) und in un- bzw. differenzierten Muskelzellen (C2C12, dC2C12) analysiert (C).

Die individuellen Transkriptmengen der jeweiligen PRMT sind in der Brustkrebszelllinie MCF7 am höchsten. Geringste Mengen finden sich in U-2OS und BJ Zellen, letztere wurden nur auf PRMT4 bzw. 5 hin untersucht. Für PRMT2 sind Splicevarianten in MCF7 Zellen detektierbar.
Murine CARM1 sowie PRMT5 und 6 wurden ebenfalls mittels Northern Blot untersucht. Abbildung 5C zeigt, dass die Transkriptmenge von CARM1 während der Ausdifferenzierung der Muskelzelllinie C2C12 deutlich zunimmt. Diese Beobachtung steht in Übereinstimmung mit den Daten von Muscat und Mitarbeitern, wonach CARM1 bei der Muskeldifferenzierung erhöht exprimiert vorliegt und über den Transkriptionsfaktor MEF2 Differenzierungsprozesse steuert (Chen et al., 2002).

5.2 Subzelluläre Lokalisation von CARM1 und PRMT1

PRMT1 und CARM1 besitzen sowohl nukleäre wie auch cytoplasmatisch lokalisierte Substrate (Bedford and Richard, 2005). Es musste daher davon ausgegangen werden, dass sich das Vorkommmen der beiden Enzyme nicht auf ein Zellkompartiment beschränkt. Indirekte Immunfluoreszenzfärbungen zeigen, dass beide Methyltransferasen sowohl nukleär als auch cytoplasmatisch vorliegen. In beiden Fällen dominiert die nukleäre Lokalisation, jedoch bei CARM1 stärker als bei PRMT1. Letzteres liegt ferner in granulären Einheiten vor (Abb. 6).

5.3 Genexpressionsanalyse von HEK293 Zellen nach Transfektion von siRNA gegen CARM1

Um neue Zielgene für CARM1 zu finden, wurde zunächst ein siRNA-basierter *knockdown* in HEK293 Zellen durchgeführt. Dieser Zelltyp, eine embryonale Nierenzelllinie, besitzt eine effiziente Transfizierbarkeit. Eine bereits publizierte siRNA-Sequenz wurde zur Etablierung des *knockdown* herangezogen (Chevillard-Briet et al., 2002). 72h nach Behandlung mit dieser spezifischen siRNA für CARM1 (nachfolgend siCARM1), waren die Proteinmengen dieses Enzyms in der Immunfärbung nicht mehr detektierbar (Abb. 7A).

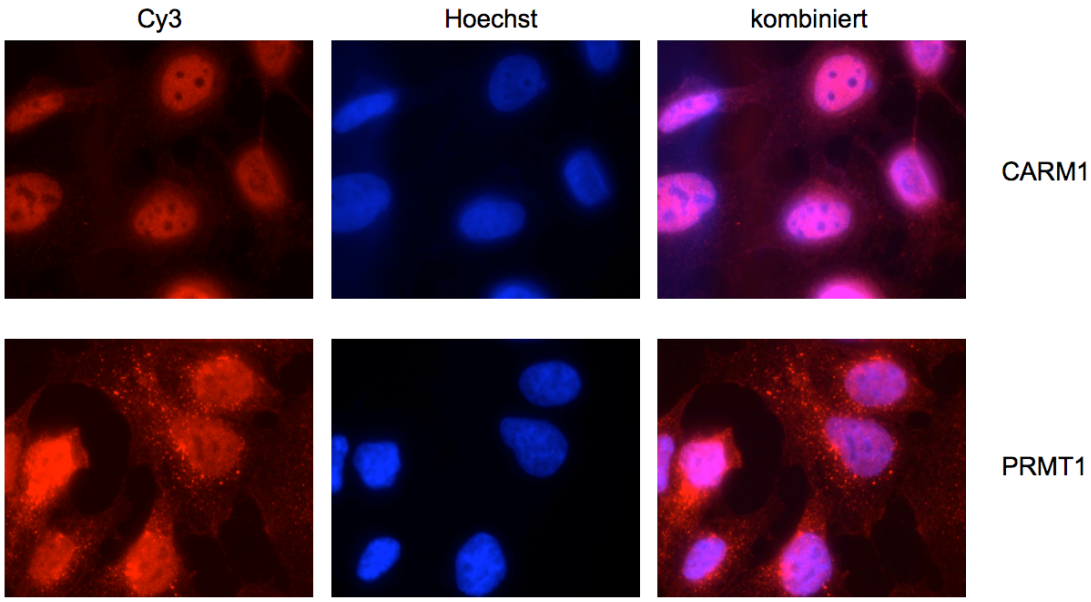


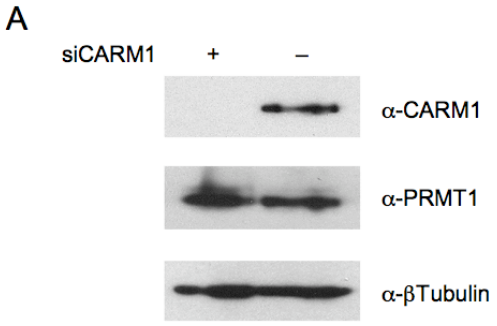
Abb. 6. CARM1 und PRMT1 kommen vorwiegend im Kern vor, sind aber auch cytoplasmatisch lokalisiert. HEK293 Zellen wurden mit Paraformaldehyd fixiert und mit Erstantikörper gegen CARM1 oder PRMT1 (beide Upstate) inkubiert. Anschließend erfolgte die Inkubation mit Cy3-gekoppeltem Zweitantikörper. Die Hoechst-Behandlung diente der Färbung der nukleären DNA.

Die Abwesenheit eines transkriptionellen Coaktivators in der Zelle sollte zu Veränderungen im Expressionssatus seiner Zielgene führen. Dies wurde im Anschluss mittels eines Microarrays analysiert, auf dem 11552 humane cDNA fixiert waren. Die Auswertung ergab, dass die meisten Gene unter den gewählten Bedingungen stärker exprimiert werden. Nur sechs Gene liegen nach Verlust von CARM1 mehr als zweifach dereguliert vorliegen (Abb. 7B). Die Darstellung ist das Ergebnis von drei unabhängigen Experimenten. Für jedes Experiment wurden technische Wiederholungen erstellt und die Farbmarkierung (Cy3; Cy5) umgekehrt. Zur Analyse lagen also 12 Chips vor.

Zunächst wurden einige der potentiellen Zielgene für CARM1 mittels RT-PCR validiert (Abb. 7C). Das am stärksten deregulierte Gen Egr1 ist ein sogenanntes *immediate early response* Gen, also ein Gen, welches sehr früh nach Mitogenstimulation in der Zelle aktiviert wird. Zwei weitere Gene dieser Familie, die ebenfalls im Microarray-Experiment identifiziert wurden, sind CTGF und IER3. Einen dem Egr1 ähnlichen Promoteraufbau besitzt das Gen c-Fos. Beide Gene werden häufig gemeinsam über den MAPK-Signalweg reguliert. In diesem Signalweg erfolgt nach Aktivierung einer Rezeptortyrosinkinase die Umwandlung von GDP- zu GTP-

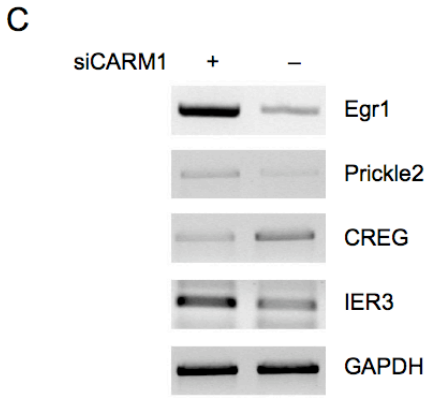
gebundenem Ras durch Guaninnukleotid-Austauschfaktoren. Dies ermöglicht die Bindung und Aktivierung der Kinase Raf, die ihrerseits die Kinase MEK phosphoryliert. MEK phosphoryliert schließlich die Kinase ERK, die in den Zellkern gelangt und verschiedene Transkriptionsfaktoren aktiviert. (Eine ausführliche Darstellung des MAPK-Signalwegs bietet die Abbildung 20 im Diskussionsteil.)

Obwohl c-Fos in der Microarray-Analyse nicht erkannt wurde, zeigt die RT-PCR, dass c-Fos ebenso wie Egr1 nach Verlust von CARM1 in HEK293 Zellen verstärkt exprimiert wird (Abb. 7D). Für CARM1 war keine cDNA auf dem Chip fixiert worden.



B

x-fache Veränderung	Richtung	Acc	Gensymbol
3,155	hoch	AA486533	EGR1
2,426	hoch	AA630794	SLC3A2
2,253	hoch	AA400234	
2,075	hoch	AA461309	
2,069	hoch	AA453287	MGC5306
2,043	hoch	T59256	PRICKLE2
1,892	hoch	AA132226	CBX3
1,889	hoch	AA485373	VMP1
1,869	hoch	R58985	
1,843	runter	T71991	CREG
1,834	hoch	AA425320	DNAJB9
1,828	hoch	AA598794	CTGF
1,827	hoch	R80197	KIAA0352
1,799	hoch	N21609	MGC13090
1,792	hoch	AA485151	HSPH1
1,780	hoch	R44164	CDK11
1,776	hoch	T60075	FABP5
1,746	runter	R00884	DHFR
1,742	runter	N54470	THRAP4
1,735	hoch	H09113	TRIP8
1,707	hoch	AA406552	SLC2A3
1,695	hoch	AA460265	ETV5
1,684	hoch	N91145	CARF
1,681	hoch	N71095	C9orf78
1,678	hoch	AA457705	IER3



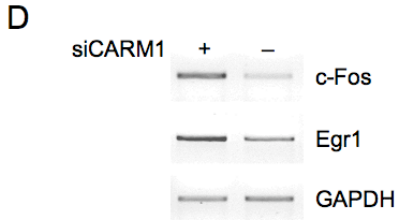


Abb. 7. Nach Transfektion von siCARM1 werden *immediate early response* Gene in HEK293 Zellen aktiviert. CARM1 ist in der Immunfärbung nach Transfektion von siCARM1 (72h) nicht mehr detektierbar. Die Expression von PRMT1 bleibt unbeeinflusst. Die Färbung für βTubulin belegt, dass gleiche Proteinmengen aufgetragen wurden (A). Die 25 meist regulierten Gene nach Verlust von CARM1. Neben Egr1 werden auch die *immediate early response* Gene CTGF und IER3 verstärkt exprimiert (B). Nach Validierung dieser potentiellen Zielgene für CARM1 mittels RT-PCR (C) zeigte sich, dass auch c-Fos aktiviert wird. GAPDH wird durch siCARM1 nicht reguliert und diente als Kontrolle dafür, dass gleiche RNA-Mengen zur cDNA-Synthese eingesetzt wurden (D).

5.4 Der durch siCARM1 hervorgerufene Phänotyp wird durch CARMER nicht aufgehoben

Nach Verlust von CARM1 liegen die meisten Gene stärker exprimiert vor als im untransfizierten Zustand (Abb. 7B). Zwar war bereits beschrieben, dass CARM1 eine repressorische Rolle in der Regulation von CREG-Zielgenen besitzt (Xu et al., 2001), jedoch sieht die große Mehrheit der Publikationen CARM1 als Coaktivator. Um glaubhaft darzustellen, dass die gefundenen Gene tatsächlich CARM1 abhängig sind, wurde versucht, die von siCARM1 hervorgerufene verstärkte Expression von Egr1 und c-Fos, durch die gleichzeitige Überexpression eines CARM1-Homologs zu unterbinden. Die Aminosäuresequenzen von humanem und murinem CARM1 sind zu 91 % identisch. Daher erschien es für diesen Versuch geeignet. Jedoch enthält es die Zielsequenz für siCARM1 und konnte daher nicht herangezogen werden.

Die Aminosäuresequenzen von humanem CARM1 (608 AS) und CARMER (530 AS), dem Ortholog aus *Drosophila melanogaster*, zeigen eine 59 %ige Identität. Die katalytischen Domänen sind hoch konserviert, jedoch besitzt CARMER einen kürzeren C-Terminus verglichen mit CARM1. Die mRNA für CARMER enthält die Zielsequenz für siCARM1 jedoch nicht (Cakouros et al., 2004). In einer Untersuchung der Methyltransferaseaktivität wurde zunächst gezeigt, dass CARMER und CARM1 gleiche Substratspezifität besitzen (Abb. 8A). Dabei wurden aufgereinigte Histone aus Kalbsthymus (Roche) *in vitro* einer Methylierungsreaktion mit immunpräzipitierten Methyltransferasen ausgesetzt. Für die Präzipitation wurde ein Hämagglutinin-(HA)-Antikörper benutzt, da die verwendeten Methyltransferasen als Fusionsproteine mit einem entsprechenden Epitop versehen exprimiert wurden. Eine katalytisch inaktive Mutante (CARMUT) wurde ebenfalls in den Versuchsansatz aufgenommen. Als Methylgruppendonor diente ^{14}C-SAM. Abbildung 8A zeigt, dass beide Enzyme, CARM1 und CARMER, H3 *in vitro* effizient methylieren.

Um zu untersuchen, ob der durch siCARM1 hervorgerufene Phänotyp von CARMER aufgehoben werden kann, wurden HEK293 Zellen 24h nach siCARM1-Transfektion mit einem CARMER-Expressionskonstrukt für weitere 48h transfiziert. Abbildung 8B verdeutlicht, dass sowohl der *knockdown* für CARM1 als auch die Expression von CARMER erfolgreich waren. Jedoch ergaben sich unter diesen Bedingungen keine Veränderung der Transkriptmengen von Egr1 und c-Fos (Abb. 8B).

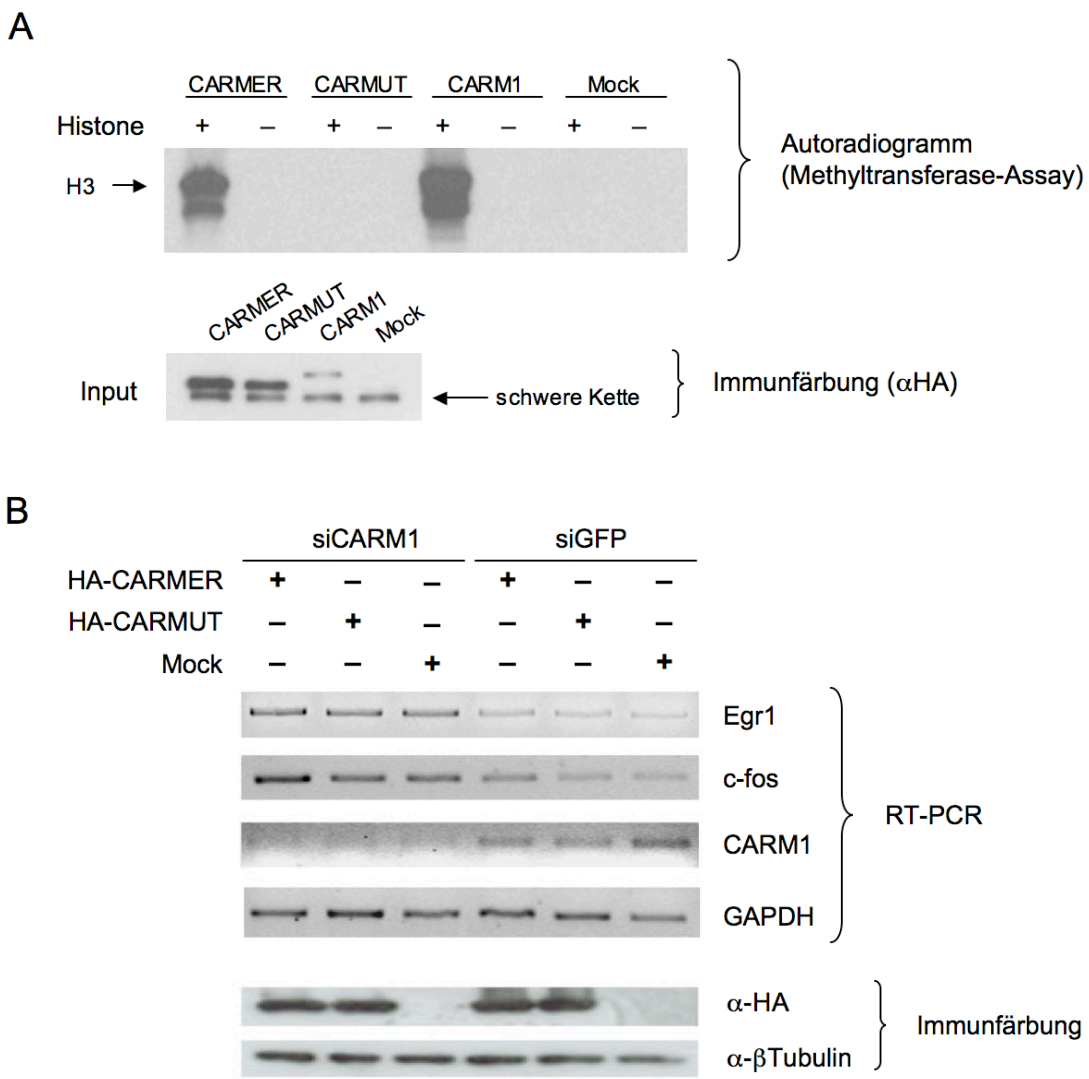


Abb. 8. CARMER kann die durch siCARM1 verursachten Effekte in HEK293 Zellen nicht ausgleichen. Ein Methyltransferase-Assay ergab vergleichbare *in vitro* Aktivitäten von präzipitiertem CARM1 und CARMER auf Histone H3. Der Ansatz enthielt ^{14}C-SAM. Die Reaktion wurde 1 h bei 37 °C inkubiert, danach mit Probenpuffer versehen, mittels SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine Nitrocellulose-Membran geblottet. Die Membran wurde im Anschluss vier Tage einem Röntgenfilm exponiert (A). HEK293 Zellen wurden 72 h nach siCARM1 und 48 h nach Transfektion mit CARMER geerntet. Transkriptmengen für Egr1, c-Fos, CARM1 und GAPDH wurden mittels RT-PCR ermittelt. Erfolgreiche Überexpression von CARMER bzw. der katalytisch inaktiven Mutante CARMUT in der Immunfärbung nachgewiesen (B).

5.5 Der durch siCARM1 hervorgerufene Phänotyp beruht auf einem *off-target* Effekt

Da der erste Versuch fehlschlug, die erhöhten Transkriptmengen von Egr1 und c-Fos auf den Verlust von CARM1 zurückzuführen, musste ein anderer Ansatz gefunden werden, um die erwähnten Zielgene als spezifisch zu bestätigen. Schließlich ist es aufgrund der fehlenden Homologie im C-Terminus möglich, dass CARMER die Funktion von CARM1 in der humanen Zelle nicht vollständig ersetzt.

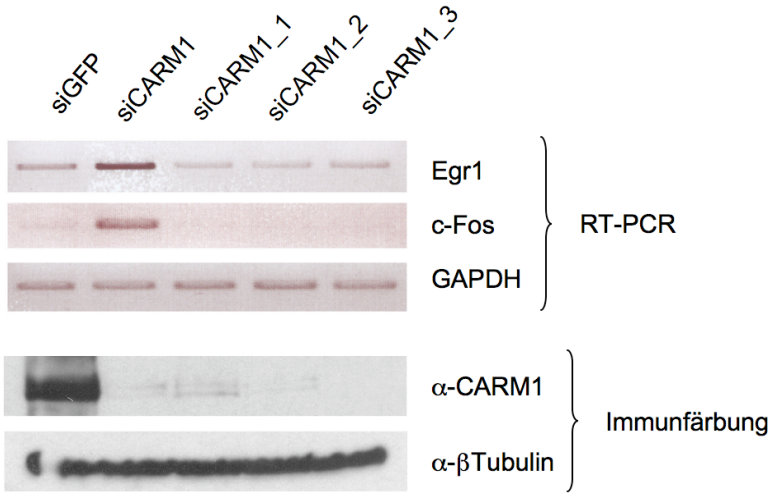


Abb. 9. Lediglich eine von vier siRNA gegen CARM1 bewirkt eine verstärkte Expression von Egr1 und c-Fos. HEK293 Zellen wurden mit vier verschiedenen siRNA gegen CARM1 transfiziert und nach 72 h geerntet. Transkriptmengen für Egr1, c-Fos und GAPDH wurden durch RT-PCR bestimmt. Verminderte CARM1-Expression wurde in der Immunfärbung nachgewiesen.

Eine alternative siRNA, gegen CARM1 gerichtet, sollte bei erfolgreichem *knockdown* ebenfalls zu einer vermehrten Expression von Egr1 und c-Fos führen. Die Transfektion von insgesamt vier siRNA gegen CARM1 ergab allerdings, dass nur die zunächst verwendete siRNA den beschriebenen Effekt auf Egr1 und c-Fos ausübte (Abb. 9). Da die drei anderen siRNA den *knockdown* von CARM1 vermittelten, jedoch die Transkriptmengen von Egr1 und c-Fos nicht beeinträchtigt waren, musste daraus geschlossen werden, dass das Fehlen von CARM1 nicht ursächlich für die erhöhte Expression von Egr1 und c-Fos war.

5.6 Verstärkte Phosphorylierung der MAP-Kinase ERK nach Transfektion von siCARM1 in HEK293 Zellen

Einen durch eine siRNA hervorgerufener Effekt, der sich nicht auf den Abbau seiner Ziel-mRNA zurückführen lässt, nennt man *off-target* Effekt. Der Begriff deutet darauf hin, dass eine siRNA unerwünschte Effektoren in der Zelle besitzen kann. Mögliche, in diesem Fall vorliegende Effektoren werden diskutiert.

Da Egr1 und c-Fos gemeinsam über den MAPK-Signalweg reguliert werden, ist es denkbar, dass diese Kaskade nach Transfektion von siCARM1 verstärkt aktiviert vorliegt. Um dies zu untersuchen wurden HEK293 Zellen mit siCARM1 transfiziert.

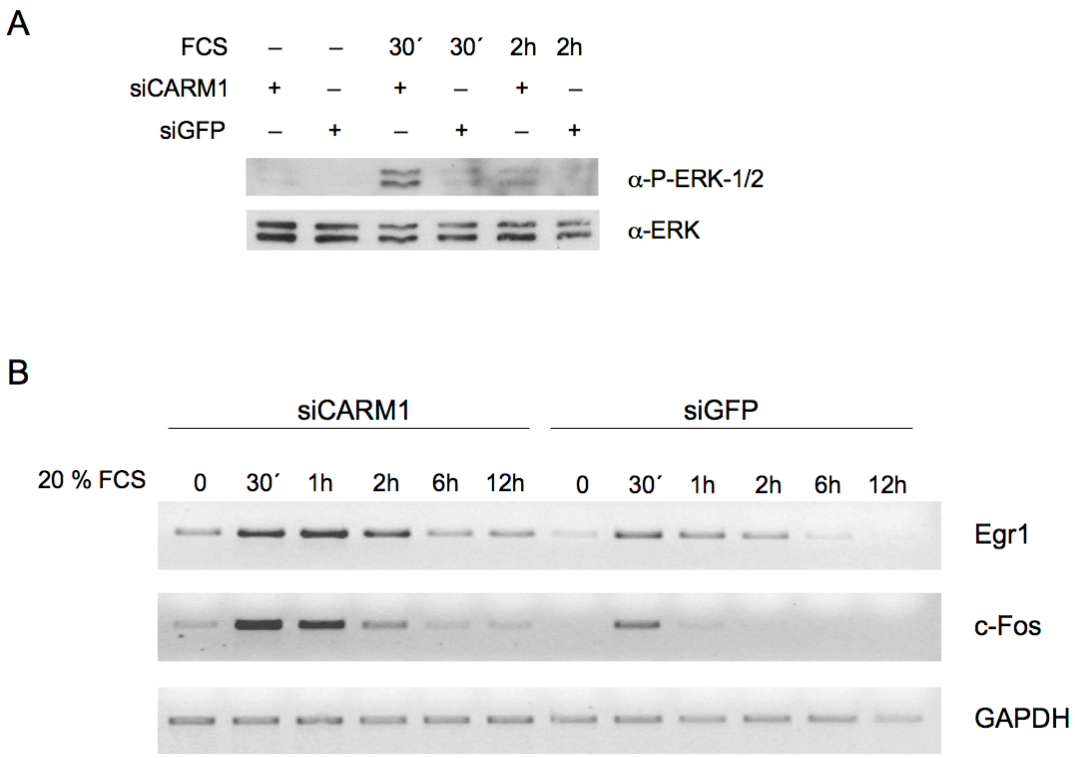


Abb. 10. Verstärkte ERK-Phosphorylierung nach siCARM1-Transfektion korreliert mit vermehrter Expression von Egr1 und c-Fos in HEK293 Zellen. 24 h nach Transfektion mit den angegebenen siRNA erfolgte ein Mediumwechsel. Die Zellen wurden weitere 48 h in serumfreien Medium gehalten, danach mit 20 % FCS (*fetal calf serum*) behandelt und zu den angegebenen Zeitpunkten geerntet. Die Zunahme der ERK-Aktivierung wurde mit einem Phospho-spezifischen Antikörper nachgewiesen (A). Transkriptmengen für Egr1 und c-Fos wurden mittels RT-PCR bestimmt (B).

Am nächsten Tag wurde ein Mediumwechsel zu serumfreien Medium vorgenommen und die Zellen wurden für weitere 48 h inkubiert. Danach erfolgte ein Serumstimulus für 30 min bzw. 2 h. Abbildung 10A zeigt, dass ERK im uninduzierten wie auch im induzierten Zustand nach siCARM1-Transfektion verstärkt aktiviert vorliegt.
Weiterhin fragten wir, ob diese Aktivierung ursächlich für die Expression von Egr1 und c-Fos ist. Wir transfizierten HEK293 Zellen mit siCARM1 und analysierten die Transkriptmengen von Egr1 und c-Fos zu verschiedenen Zeitpunkten nach Serumstimulation (Abb. 10B). Da der Grad der ERK-Phosphorylierung mit der Expressionsstärke von Egr1 und c-Fos korreliert, ist anzunehmen, dass die Aktivierung des MAPK-Signalwegs unmittelbar ursächlich für die verstärkte Expression dieser Gene nach Transfektion von siCARM1 ist. Die Aktivierung von ERK durch siCARM1 ist jedoch nicht in jedem Zelltyp sichtbar. U-2OS und MCF7 Zellen zeigen keine erhöhte Aktivierung von ERK nach Transfektion von siCARM1 (Diplomarbeit Franziska Seifert). Demnach ist der beschriebene *off-target* Effekt zelltypspezifisch, oder besser gesagt, der zu postulierende Effektor liegt zelltypspezifisch vor.

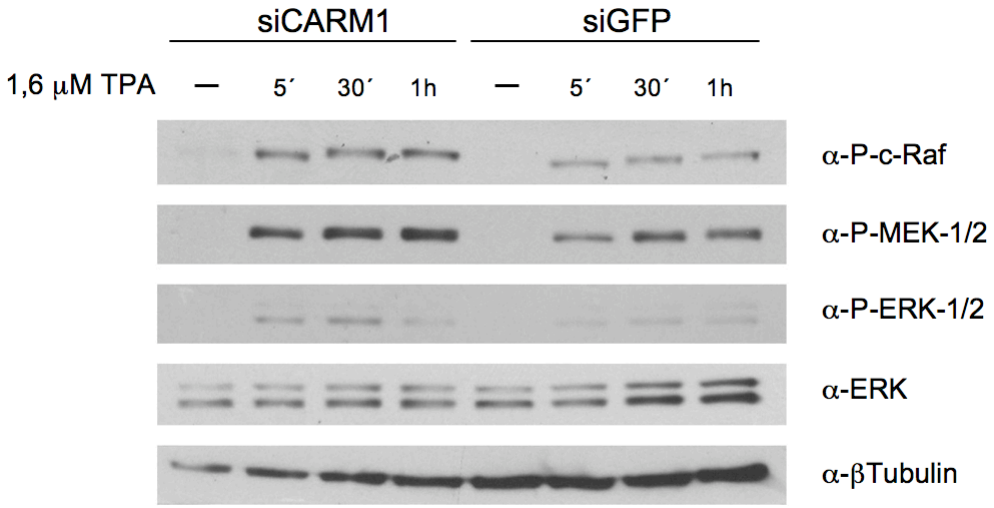


Abb. 11. Die durch siCARM1 verstärkte Aktivierung von MAPK in HEK293 Zellen ist auch in Anwesenheit von TPA sichtbar. 24 h nach Transfektion mit den angegebenen siRNA erfolgte ein Mediumwechsel. Die Zellen wurden weitere 48 h in serumfreien Medium gehalten. Nach Induktion mit TPA für die angegebenen Zeiträume wurden die Zellen geerntet und in der Immunfärbung mit phosphospezifischen Antikörpern für c-Raf, MEK und ERK analysiert.

TPA ist ein Phorbolester, der mitogenähnliche Wirkung auf die Zelle hat, da er die Protein Kinase C (PKC) stimuliert. PKC aktiviert Raf, worauf in der MAPK-Signalkaskade zunächst MEK und danach ERK phosphoryliert werden (Ueda et al., 1996). Abbildung 11 zeigt, dass siCARM1 aktivierend auf Raf, MEK und ERK wirkt. Dieser Effekt wird durch TPA gesteigert.

5.7 Eine neue Strategie für die Identifikation von Zielgenen

Aus den vorliegenden Ergebnissen ergab sich die Notwendigkeit, die Strategie der Identifikation neuer Zielgene zu verändern. Das Zellsystem wurde auf HeLa umgestellt, da nicht ausgeschlossen werden konnte, dass HEK293 Zellen eine Prädisposition für siRNA vermittelte *off-target* Effekte besitzen.

A

Ansatz	Transfektionmengen für eine 6 cm²-Schale
1	40 nM siCARM1_1 + 40 nM siNON-Targeting
2	40 nM siPRMT1_1 + 40 nM siNON-Targeting
3	40 nM siCARM1_1 + 40 nM siPRMT1_1
4	40 nM siCARM1_2 + 40 nM siNON-Targeting
5	40 nM siPRMT1_2 + 40 nM siNON-Targeting
6	40 nM siCARM1_2 + 40 nM siPRMT1_2
7	80 nM siNON-Targeting

B

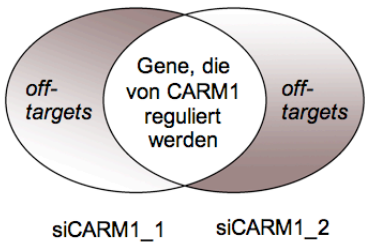


Abb. 12. Erweiterte Strategie zur Identifizierung von Zielgenen für CARM1 und PRMT1. Jeder *knockdown* wurde mit zwei alternativen siRNA durchgeführt. Ein Transfektionsansatz enthielt 80 nM siRNA (Endkonzentration), Ansätze gegen nur eine der beiden Methyltransferasen wurden entsprechend mit unspezifischer (NON-Targeting) siRNA aufgefüllt (A). Ein Zielgen wurde nur dann als ein solches anerkannt, wenn es durch beide alternative Ansätze Bestätigung fand. Hier beispielhaft für CARM1 dargestellt (B).

Die Inkubationszeit der Zellen nach siRNA-Transfektion wurde von 72 h auf 48 h Stunden verkürzt, um die Wahrscheinlichkeit des Auftretens indirekter Effekte herabzusetzen. Die wichtigste Erneuerung jedoch war die Verwendung zweier verschiedener siRNA gegen CARM1. Veränderungen im Expressionsprofil, die nur von einer der beiden siRNA hervorgerufen werden, konnten somit als *off-targets* erkannt und von der weiteren Analyse ausgeschlossen werden (Abb. 12).
Um Zielgene zu identifizieren, die entweder exklusiv von einer Methyltransferase oder überlappend von beiden Methyltransferasen, CARM1 und PRMT1, reguliert werden, wurde der Ansatz um den *knockdown* für PRMT1 erweitert. Um herauszufinden, welche Gene von CARM1 und PRMT1 kooperativ reguliert werden, wurde ein Doppel*knockdown* beider Methyltransferasen etabliert.
Zur Identifikation der Zielgene wurden erneut Chips herangezogen, auf denen 11552 humane cDNA fixiert vorlagen. Für jede Bedingung wurden zwei unabhängige biologische Experimente (alternative siRNA) herangezogen, von denen technisch Dublikate erstellt wurden (Umkehrung der Farbmarkierung, siehe 4.1.15.2). Da die Hybridisierung der markierten cDNA im sogenannten *Sandwich*-Verfahren, d.h. zwischen zwei Chips, stattfand, lagen für jedes Experiment vier Chips, für jede Bedingung also acht Chips vor. Als Referenzprobe diente cDNA aus Zellen, die mit unspezifischer siRNA (siNON-Targeting) transfiziert wurden.

5.8 Etablierung des Einzel- und Doppel*knockdown* von CARM1 und PRMT1 in HeLa Zellen

HeLa Zellen wurden mit je zwei verschiedenen siRNA gegen CARM1 und PRMT1 transfiziert. Zusätzlich wurden zweimal zwei siRNA kombiniert transfiziert, um einen Doppel*knockdown*, also einen Verlust beider Enzyme zu erreichen. Nach 48 h wurden die Zellen geerntet. Transkriptmengen von CARM1 und PRMT1 wurden mittels RTqPCR analysiert (Abb. 13A). Da eine Verminderung der Transkriptmenge nicht zwangsläufig zu einer reduzierten Proteinmenge führt, wurde der Verlust von CARM1 und PRMT1 ebenfalls in der Immunfärbung nachgewiesen (Abb. 13B). Diese Ergebnisse bestätigen einen effizienten *knockdown* von CARM1 und PRMT1 sowohl nach Transfektion von einzelner wie auch kombinierter siRNA. Jeder

Transfektionsansatz enthielt gleiche Mengen siRNA. Die Endkonzentration betrug 80 nM. Ein Transfektionsansatz, der sich nur gegen ein Enzym richtete, enthielt 40 nM spezifische siRNA und 40 nM unspezifische siRNA (siNON-Targeting).

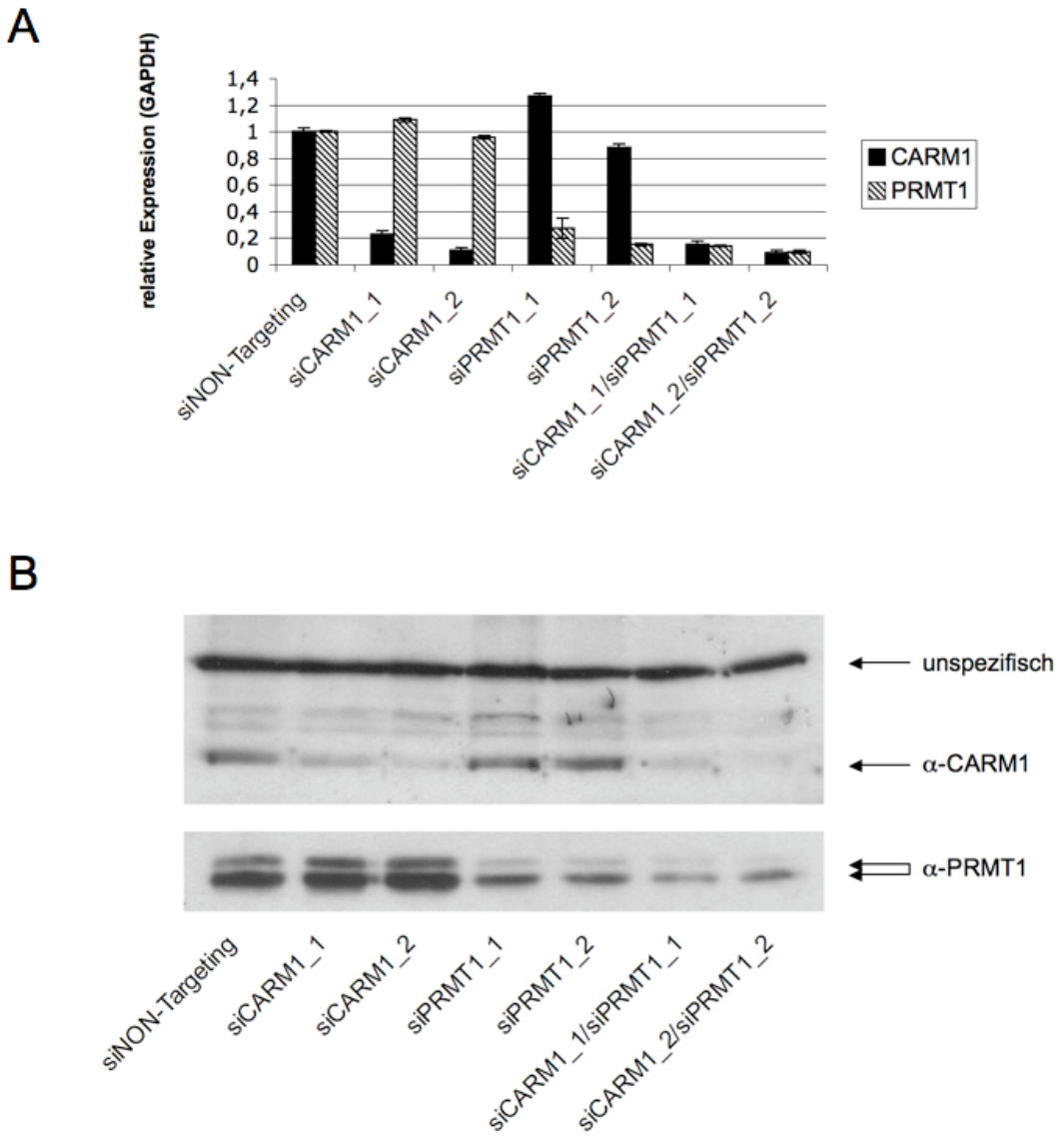


Abb. 13. Einzel- sowie Doppel*knockdown* von CARM1 und PRMT1. HeLa Zellen wurden mit alternativen siRNA gegen CARM1, PRMT1 oder beide Methyltransferasen transfiziert. Nach 48 h Stunden wurden die Zellen geerntet. Die Expressionen von CARM1 und PRMT1 wurden bezüglich der mRNA-Mengen mittels RTqPCR (A) und auf Proteinebene in der Immunfärbung (B) untersucht.

5.9 CARM1 und PRMT1 kooperieren in der Genregulation

Es wurden Genexpressionsprofile erstellt, bei denen die Häufigkeit der Transkripte aus Einzel- bzw. Doppel*knockdown*-Ansätzen zu der aus unspezifisch transfizierten Zellen (siNON-Targeting) ins Verhältnis gesetzt wurden. Abbildung 14 verdeutlicht, welche Veränderungen sich unter den gewählten Bedingungen im Expressionsprofil der Zelle ergeben. In der hier gewählten Darstellung eines Streudiagramms (MA-Plot) entspricht jeder Punkt des Diagramms einer der 11552 fixierten cDNA des Chips. Auf der x-Achse werden A-Werte dargestellt, d.h. das arithmetische Mittel der Intensitäten des Cy3- und Cy5-Signals jedes Punktes. Auf der y-Achse wird der dazugehörige M-Wert aufgetragen, der sich aus dem Verhältnis der Intensitätswerte des Cy3- und Cy5-Signals ergibt. Transkripte, die nach Verlust eines oder beider Enzyme einen M-Wert $\log_2 \geq 1$ oder $\log_2 \leq -1$ (entspricht einer mehr als zweifachen Veränderung) und einen A-Wert ≥ 7 besitzen, werden als dereguliert erachtet (rote Punkte). Bei einem geringeren A-Wert (< 7) ist die Expression eines Gens schwach oder gar nicht vorhanden, sodass Abweichungen in diesem Bereich häufig auf Hintergrundsignale zurückzuführen sind.

Während die Transkriptmengen in HeLa Zellen nach Verlust von CARM1 oder PRMT1 kaum messbaren Veränderungen unterworfen sind, zeigt sich eine deutliche Deregulation nach Verlust beider Enzyme (Abb. 14.). Demnach liegen zwischen CARM1 und PRMT1 kooperative Effekte vor, die hier aufgedeckt werden. Die wenigen Gene, die bei Verlust eines einzigen Enzyms mehr als zweifach dereguliert vorliegen, lassen sich (mit Ausnahme von PRMT1) mittels der RTqPCR nicht validieren. Im Gegensatz zu PRMT1 war für CARM1 keine cDNA auf dem Microarray fixiert worden.

Insgesamt 63 Gene liegen nach Verlust beider Enzyme mehr als zweifach in ihrer Expression verändert vor. Bei genauerer Betrachtung jedoch stellt sich heraus, dass etwa 30 % dieser Gene nicht gleichsam durch die alternativen siRNA reguliert werden. Diese Gene werden als *off-targets* erachtet und in weitere Analysen nicht miteinbezogen. Es verbleiben 45 Gene, die in Tabelle 3 dargestellt sind. Mit Web basierten Hilfprogrammen wurde versucht, diese in sogenannte Gen-Ontologie-Diagramme (GO*Charts*) zu gruppieren. Unter Verwendung niedriger Stringenzkriterien ermittelt die Internetressource DAVID (http://david.niaid.nih.gov/david/ease.htm), dass 18 % der Zielgene in Stoffwechselprozesse involviert sind. Eine

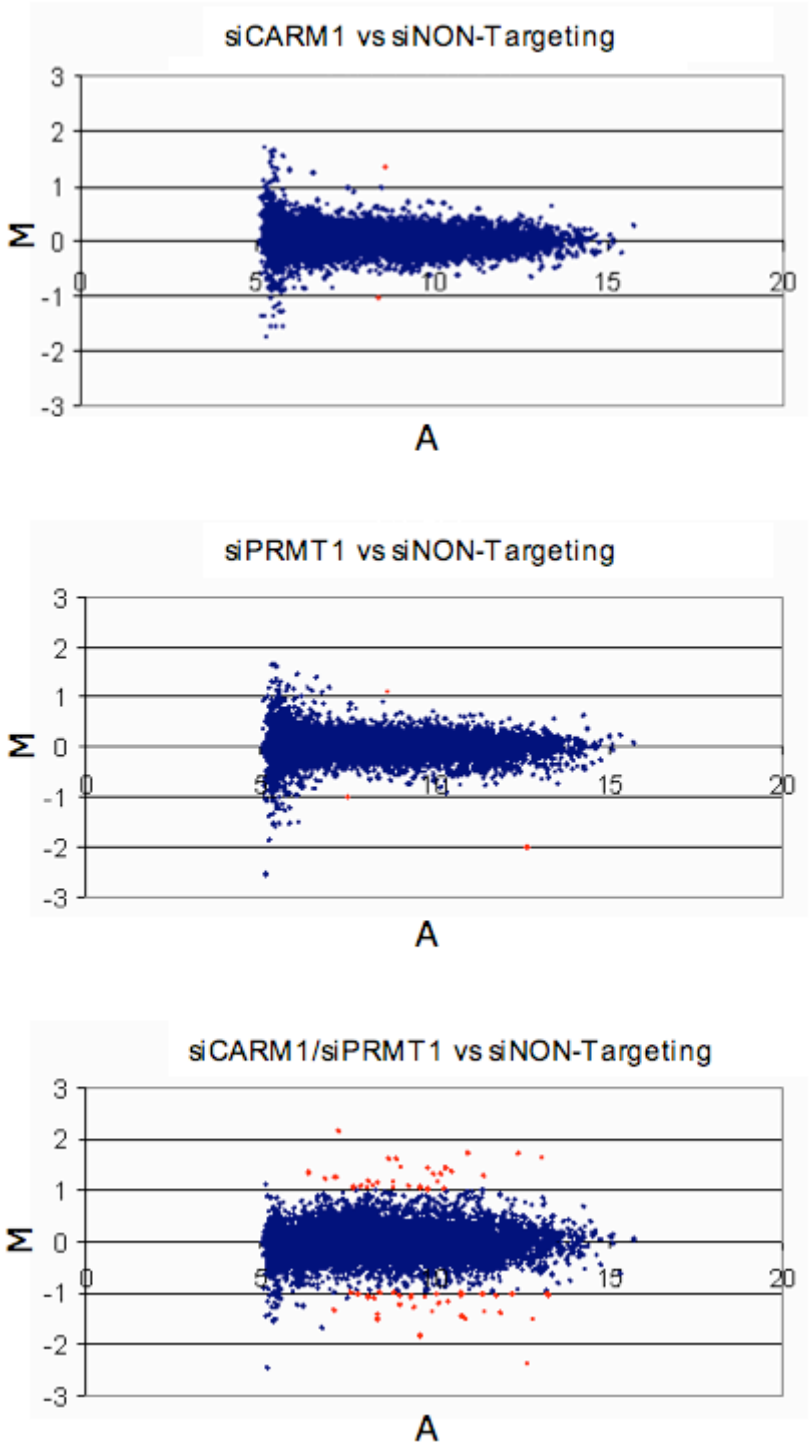


Abb. 14. Kooperative Effekte zwischen CARM1 und PRMT1 in der Genregulation. MA-Plots wurden für die angegebenen Bedingungen mittels eines 11552 cDNA-Chips erstellt. M-Werte beschreiben die Abweichung von der mittleren Signalstärke (A-Wert). Transkripte mit M-Werten $\log_2 \geq 1$ oder $\log_2 \leq -1$ und einem A-Wert ≥ 7 wurden als dereguliert erachtet (rote Punkte). Je stärker der M-Wert eines Gens von 0 abweicht, desto stärker ist der Grad seiner Deregulation verglichen zum Kontrollzustand (siNON-Targeting).

Interpretation dieses Ergebnisses ist nur bedingt möglich, da für die überwiegende Mehrheit der Zielgene (34) noch nicht bekannt ist, in welchen biologischen Prozessen sie eine Rolle spielen.

Die kooperativen Effekte, die zwischen CARM1 und PRMT1 bei der Genregulation vorliegen, lassen sich durch Abbildung 15 noch einmal verdeutlichen. Die Transkriptmengen der zwanzig Gene, die nach Verlust beider Enzyme am stärksten dereguliert sind, wurden mit den entsprechenden Werten bei Verlust von nur einer Methyltransferase verglichen.

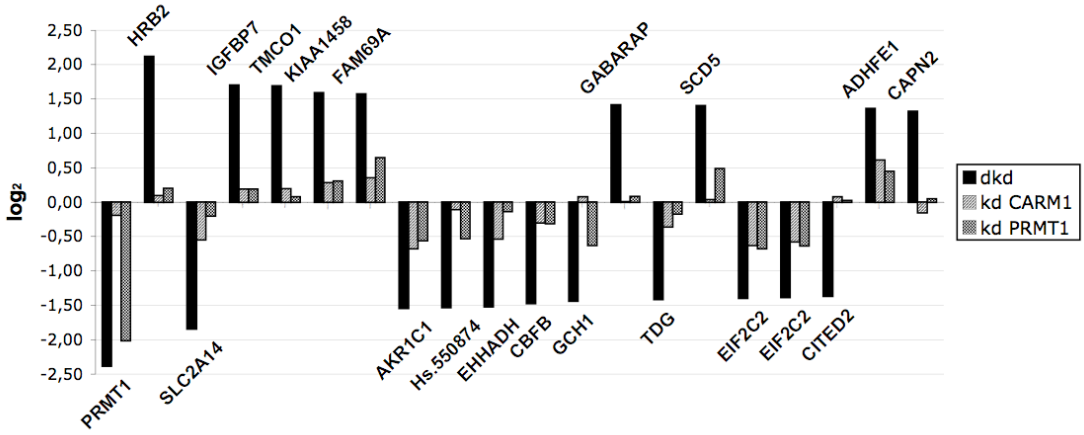


Abb. 15. Die zwanzig meist regulierten Gene nach Verlust beider Enzyme verglichen mit dem Verlust von CARM1 oder PRMT1. Die Abweichung der Transkriptmenge eines Gens wurde als $\log_2$-Wert relativ zum Kontrollzustand (siNON-Targeting) angegeben. Dargestellt ist die Auswertung von acht Chips (siehe 5.8). Abkürzungen: dkd = Doppel*knockdown*, kd = *knockdown*, sonstige siehe Abkürzugsverzeichnis.

Um die Analyse des Microarray zu bestätigen, wurden einige Zielgene mittels RTqPCR validiert (Abb.16). Die relative Expression der Gene wurde gegen GAPDH normiert, da die Transkriptmenge dieses Gens unter den gewählten Bedingungen unverändert blieb.

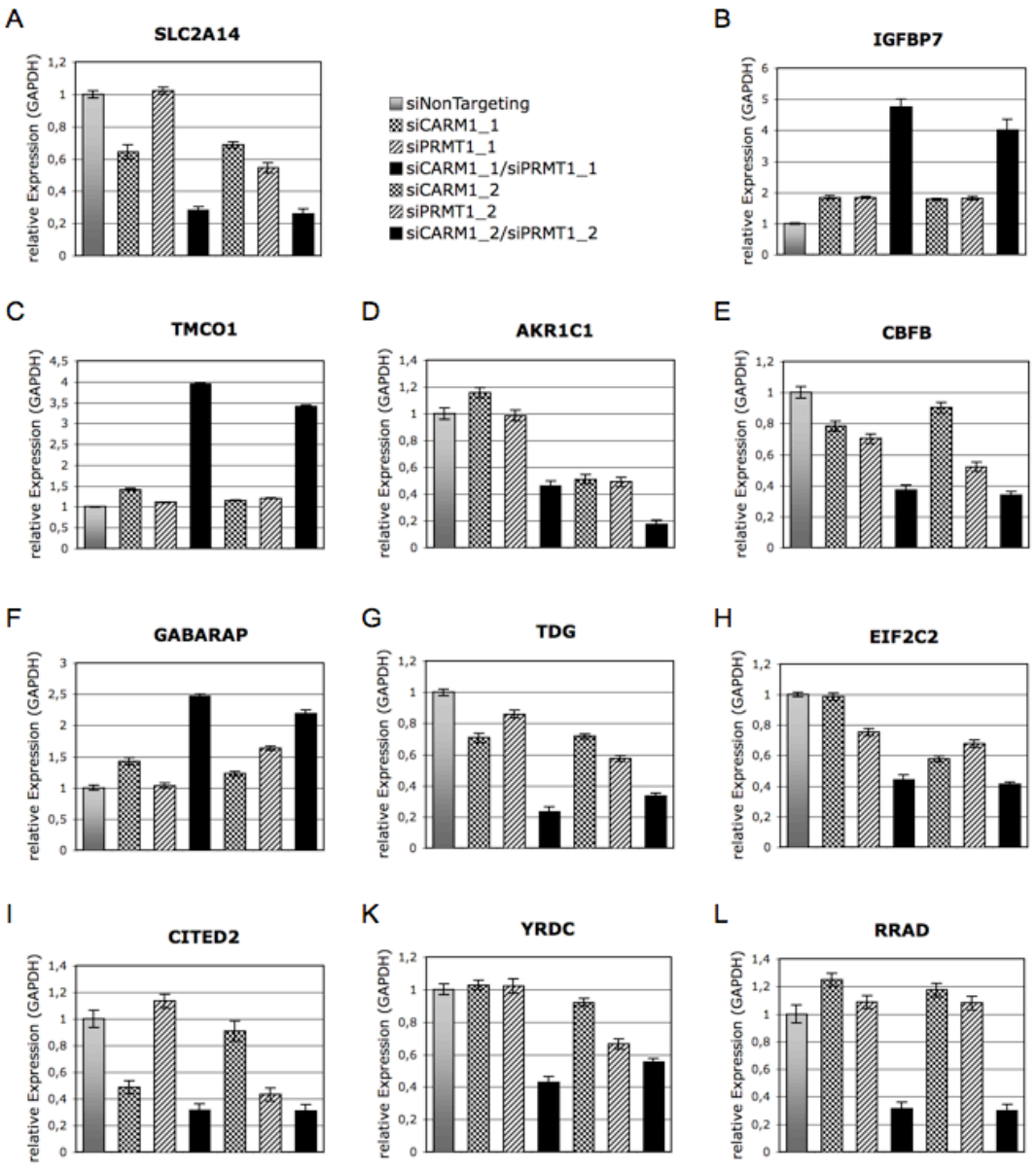


Abb. 16. Validierung der gemeinsamen Zielgene für CARM1 und PRMT1. RTqPCR wurden für SLC2A14 (A), IGFBP7 (B), TMCO1 (C), AKR1C1 (D), CBFB (E), GABARAP (F), TDG (G), EIF2C2 (H), CITED2 (I), YRDC (K) und RRAD (L) durchgeführt.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass der alleinige Verlust von CARM1 oder PRMT1 nur schwache Veränderungen im Genexpressionprofil der Zelle erbringt. Der Verlust beider Enzyme jedoch führt zu einer mehr als zweifachen Deregulation von 45 Genen und belegt somit die kooperative Funktion von CARM1 und PRMT1 in der Genregulation.

x-fache Veränderung	Richtung	Acc	Gensymbol
5,2	runter	N55480	PRMT1
4,3	hoch	W52273	HRB2
3,6	runter	T97782	SLC2A14
3,3	hoch	T53298	IGFBP7
3,2	hoch	T98298	TMCO1
3	hoch	AA011654	KIAA1458
3	hoch	AA027277	FAM69A
2,9	runter	R93124	AKR1C1
2,9	runter	R26163	
2,9	runter	N64734	EHHADH
2,8	runter	AA187148	CBFB
2,7	runter	AA443688	GCH1
2,7	hoch	AA457725	GABARAP
2,7	runter	AA496947	TDG
2,6	hoch	AA457374	SCD5
2,6	runter	R17005	EIF2C2
2,6	runter	N93082	EIF2C2
2,6	runter	AA115076	CITED2
2,6	hoch	N70632	ADHFE1
2,5	hoch	AA102454	CAPN2
2,5	hoch	AA148532	MGC4655
2,5	runter	AA040269	EIF2C2
2,4	hoch	W72496	PREI3
2,4	runter	W87710	KLHL32
2,3	hoch	AA460298	C14orf45
2,3	runter	N64794	MLR2
2,2	hoch	AA974707	EGFR
2,2	hoch	T73794	LOC440751
2,2	hoch	W46612	COL5A1
2,2	hoch	H79023	ADAM12
2,2	runter	H07072	VCAM1
2,2	runter	N30147	
2,1	runter	R23755	
2,1	runter	AA938563	CCL2
2,1	runter	AA011394	YRDC
2,1	hoch	W49785	C5orf5
2,1	hoch	W52273	HRB2
2,1	runter	N39413	ANKRD13C
2,1	runter	T97737	EIF2C2
2,1	hoch	R01070	AIG1
2,1	runter	AA406552	SLC2A3
2,1	hoch	R07296	SOAT1
2,1	hoch	W48713	EGFR
2,1	runter	W84445	RRAD
2,1	runter	W16424	SLC16A9
2	runter	AA598517	KRT8
2	runter	T49061	ZBTB41
2	hoch	N54338	CD276
2	hoch	T90072	FOXP1

Tab. 3. Liste aller Gene, die nach Verlust von CARM1 und PRMT1 mehr als zweifach dereguliert vorlagen. Neben der Richtung ihrer Regulation sind Accession-Nummern der EST-Klone und zugeordnete Gensymbole angegeben.

5.10 Promotoranalyse gemeinsamer Zielgene von CARM1 und PRMT1

Eine große Anzahl an Publikationen beschreibt CARM1 und PRMT1 als transkriptionelle Coaktivatoren. Tabelle 2 umfasst alle bisher bekannten Transkriptionsfaktoren, die eine oder beide Methyltransferase zur Zielgenaktivierung rekrutieren. Daher war die Frage naheliegend, ob die Gene, die nach Verlust beider Enzyme in ihrer Expression geschwächt sind, durch CARM1 und PRMT1 transkriptionell reguliert werden. Um diese Frage zu beantworten, untersuchten wir die Promotoren der erhaltenen Zielgene auf Anreicherungen von Bindestellen für Transkriptionsfaktoren.

Die Internetressource CRME (http://creme.dcode.org/index.php) zieht bei einer solchen Untersuchung nur die Promotorelemente heran, die evolutionär zwischen Mensch, Maus und Ratte konserviert sind. Damit erhöht sich die Wahrscheinlichkeit, dass ein solchermaßen identifiziertes Element tatsächlich biologische Funktion hat, d.h. von einem Transkriptionsfaktor erkannt wird. Die Analyse zur Anreicherung von Transkriptionsfaktor-Bindestellen der Gene, die bei Verlust beider Enzyme mehr als zweifach niedriger reguliert waren, ergab ein interessantes Ergebnis (Tab. 4).

Transkriptionsfaktor	Anzahl der Promotoren	Gennamen
STAT5	7	CBFB, KRT8, RRAD, CCL2, CITED2, YRDC, KLHL23
PAX2	6	CBFB, KRT8, RRAD, CITED2, YRDC, KLHL23
STAT6	6	CBFB, KRT8, RRAD, CITED2, YRDC, KLHL23
AP2α	6	CBFB, GCH1, RRAD, CITED2, YRDC, KLHL23
STAT1	5	CBFB, CCL2, CITED2, YRDC, KLHL23
CDXA	5	GCH1, RRAD, CCL2, CITED2, YRDC
USF2	5	CBFB, KRT8, RRAD, CITED2, YRDC
E2F	5	CBFB, GCH1, CITED2, YRDC, KLHL23
HMGA1	5	CBFB, CCL2, CITED2, YRDC, KLHL23

Tab. 4. Angereicherte Bindestellen für Transkriptionsfaktoren in den Promotoren der Gene, die nach Verlust von CARM1 und PRMT1 mehr als zweifach niedriger reguliert vorlagen. Konservierte Promotorelemente wurden mit Hilfe der Internetressource CREME bei einem Matrix-Schwellenwert von 0,85 ananlysiert.

Für sieben Gene findet das Programm Bindestellen für STAT5, sechs Gene mit Bindestellen für PAX2, STAT6 und AP2α. Fünf Gene besitzen Bindestellen für STAT1, CDXA, USF2, E2F und HMGA1. Für zwei dieser Faktoren ist bekannt, dass sie von PRMT1 methyliert werden. Dabei handelt es sich um HMGA1 (*high mobility groub protein AT-hook1*) und STAT1 (Miranda et al., 2005; Mowen et al., 2001). STAT6 wird ebenfalls methyliert, jedoch ist nicht bekannt, durch welche PRMT (Chen et al., 2004). Der Verlust der Methylierung von STAT1 und STAT6 führt in beiden Fällen zu einer verminderten Aktivierbarkeit ihrer Zielgene. Die Funktion der HMGA1-Methylierung ist nicht bekannt. USF-Proteine (*upstream simulatory factors*) sorgen im Komplex mit Histon modifizierenden Enzymen, darunter PRMT1, für die Aufrechterhaltung von transkriptionell aktivem Chromatin (Huang et al., 2005). Schließlich ist bekannt, dass CARM1 ein transkriptioneller Coaktivaor für E2F ist (El Messaoudi et al., 2006). Es liegt daher die Vermutung nahe, dass weitere der identifizierten Faktoren im Zuge der transkriptionellen Aktivierung mit CARM1 und PRMT1 in Verbindung stehen.

5.11 CARM1 und PRMT1 kooperieren in der STAT5 vermittelten Genaktivierung

Die Anreicherung von STAT5-Bindestellen in den Promotoren der Gene, die nach Verlust von CARM1 und PRMT1 mehr als zweifach niedriger reguliert vorliegen, rief die Frage hervor, ob CARM1 und PRMT1 Coaktivatoren dieses Transkriptionsfaktors sind. Die Zelle besitzt zwei Gene für STAT5 (STAT5A und STAT5B), deren Produkte eine 90 %ige Identität besitzen. Einige Studien belegen Redundanz zwischen beiden Proteinen, jedoch sind ihre Expressionsprofile zelltypabhängig. STAT5A wird verstärkt in Milchdrüsen exprimiert, während STAT5B häufiger in der Leber vorkommt (Paukku and Silvennoinen, 2004).

Interleukin-4 (IL-4) ist ein Cytokin, dass die Aktivierung von STAT3, STAT5 und STAT6 in B-Zellen vermittelt (Rolling et al., 1996). Für STAT6 wurde bereits gezeigt, dass es in HeLa Zellen durch IL-4 aktiviert wird (Kotanides et al., 1995; Valineva et al., 2005).

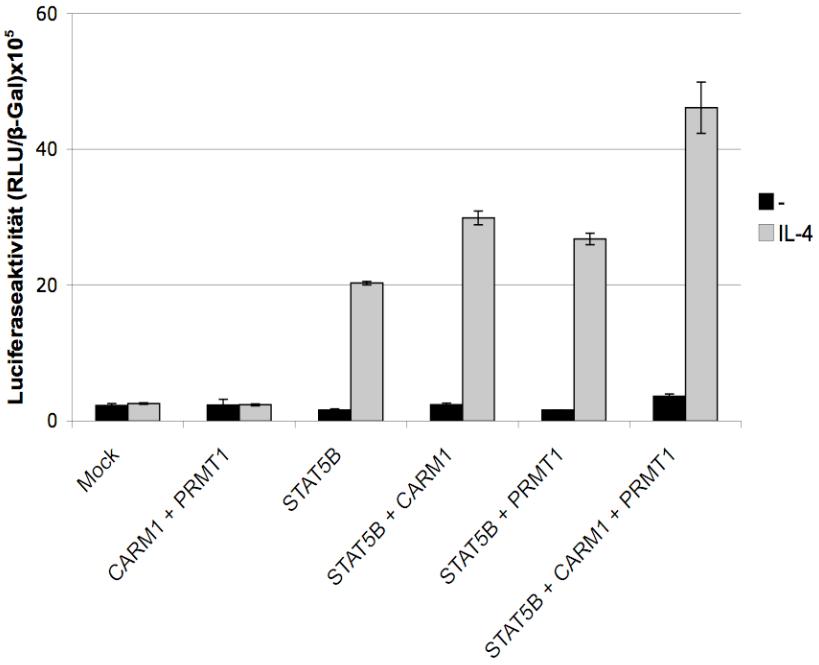


Abb. 17. CARM1 und PRMT1 kooperieren in der STAT5 vermittelten Genaktivierung. HeLa-Zellen wurden auf 24*well*-Platten ausgesät. Bei einer 50 %igen Konfluenz wurden pro *well* 500 ng Reporter (pGL3-6GAS), 500 ng β-Galactosidase und 333 ng je Expressionskonstrukt transfiziert. IL-4 (20 ng/ml Endkonzentration) wurde 16 h vor Ernte zu den Zellen gegeben. 48 h nach Transfektion erfolgte die Lyse der Zellen. RLU (*relative light units*) wurden mit einem Luminometer bestimmt und gegen die ß-Galaktosidase-Aktivität abgeglichen.

Um zu untersuchen, ob CARM1 und PRMT1 kooperative Coaktivatoren für STAT5 sind, wurde die Methode des Luciferaseassays gewählt, bei der das Reportergen Luciferase unter der Kontrolle eines zu untersuchenden Promotors steht. Der von uns gewählte Promotor enthielt die sechsfache Kopie der sogennaten GAS (*engl.* Interferon γ activated site) des β-Casein Promotors. Eine solche Bindestelle wird von verschiedenen STAT-Faktoren erkannt und findet sich in den Promotoren vieler STAT-Zielgene.

HeLa Zellen wurden mit Expressionskonstrukten für STAT5B, CARM1 und PRMT1 sowie dem Reportergen und einem β-Galactosidasekonstrukt zur Normalisierung transfiziert. 48 Stunden nach Transfektion, 16 Stunden nach Induktion durch Interleukin 4 (IL-4) wurden die Zellen geerntet und die Reportergenexpression analysiert (Abb. 17). Nur nach Überexpression von STAT5B zeigt sich eine Aktivierbarkeit des Reportergens nach Zugabe von IL-4. Diese Aktivierung kann durch die zusätzliche Expression von CARM1 oder PRMT1 nicht wesentlich

verstärkt werden. Werden jedoch beide Methyltransferasen exprimiert, zeigt sich eine mehr als zweifach stärkere Aktivierung. Dieses Ergebnis belegt, dass CARM1 und PRMT1 kooperativ auf die STAT5 vermittelte Genaktivierung wirken.

5.12 CARM1 und PRMT1 sind essentiell für die IL-4 vermittelte Zielgenaktivierung in HeLa Zellen

Nachdem gezeigt wurde, dass IL-4 STAT5 in HeLa Zellen aktiviert, untersuchten wir den möglichen Einfluss von IL-4 auf die Expression der gemeinsamen Zielgene von CARM1 und PRMT1.

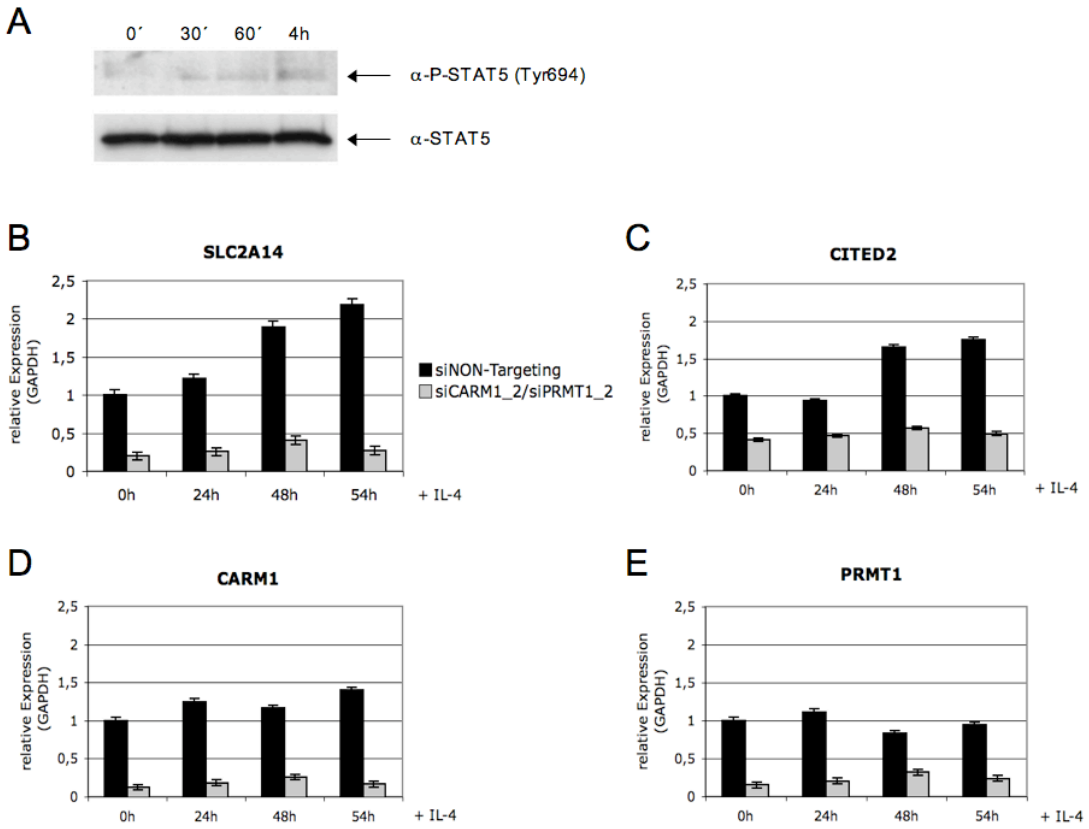


Abb. 18. CARM1 und PRMT1 sind essentiell für die IL-4 vermittelte Expression von SLC2A14 und CITED2 in HeLa Zellen. Die Auswertungen erfolgten mittels Immunfärbung (A) und RTqPCR (B, C, D, E). STAT5 wird nach Stimulation durch IL-4 (20 ng/ml) phosphoryliert (A). HeLa Zellen wurden für 72 h mit siRNA gegen CARM1 und PRMT1 transfiziert. 24, 48 und 54 h vor Ernte wurden die Zellen mit IL-4 stimuliert. Transkriptmengen von SLC2A14 und CITED2 nehmen nur in Anwesenheit von CARM1 und PRMT1 zu (B,C). CARM1 und PRMT1 werden nicht reguliert (D,E).

Dazu wurden HeLa Zellen in An- und Abwesenheit von CARM1 und PRMT1 mit IL-4 stimuliert und zu verschiedenen Zeitpunkten geerntet. Für SLC2A14 und CITED2 konnte eine Induktion durch IL-4 nachgewiesen werden. Nach Verlust von CARM1 und PRMT1 jedoch unterbleibt diese Aktivierung (Abb. 18). Es stellte sich weiterhin die Frage, ob die unterbundene Aktivierung von SLC2A14 und CITED2 spezifisch für eine Induktion durch IL-4 ist, oder ob andere Stimuli in Abwesenheit von CARM1 und PRMT1 ebenfalls nicht in der Lage wären, diese beiden Gene zu aktivieren.

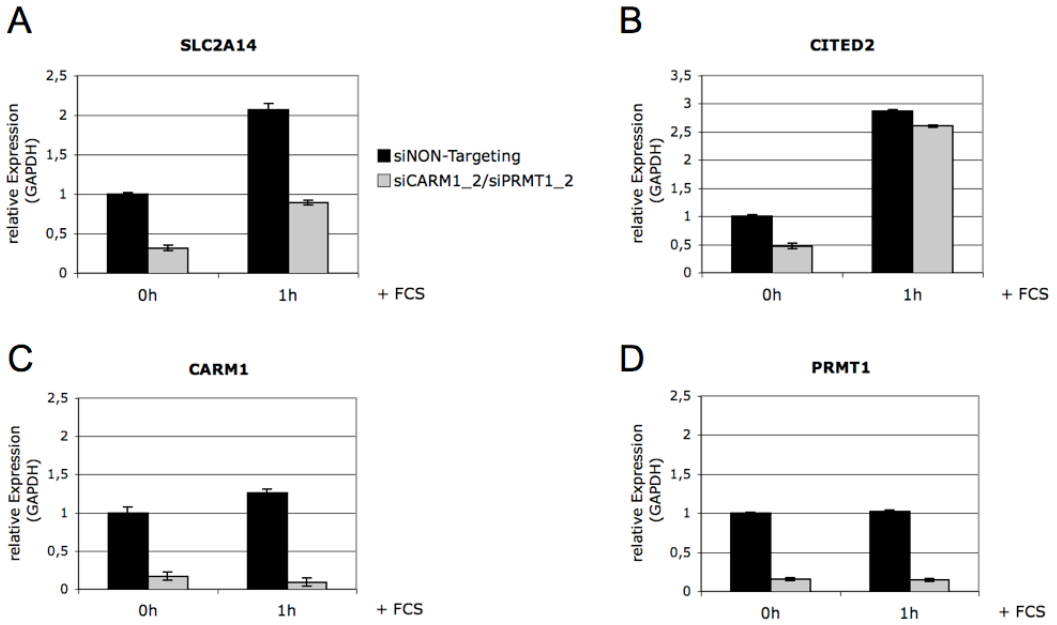


Abb. 19. CARM1 und PRMT1 sind nicht essentiell für die FCS vermittelte Expression von SLC2A14 und CITED2 in HeLa Zellen. 24 h nach Transfektion mit den angegebenen siRNA erfolgte ein Mediumwechsel. Die Zellen wurden weitere 48 h in serumfreien Medium gehalten. Eine Stunde vor Ernteerfolgte die Induktion mit 20 % FCS (*fetal calf serum*). Die Auswertung erfolgte mittels RTqPCR. Transkriptmengen von SLC2A14 und CITED2 nahmen nach Behandlung mit FCS in An- und Abwesenheit von CARM1 und PRMT1 zu (A,B). CARM1 und PRMT1 wurden nicht reguliert (C,D).

Die Promotoren von CITED2 und SLC2A14 besitzen einige Bindestellen für verschiedene ETS-Faktoren. Folgerichtig lassenen sich beide Gene durch einen Serumstimulus induzieren (Abb. 19). Interessanterweise bleiben diese Gene nach

Verlust von CARM1 und PRMT1 eingeschränkt induzierbar. Dies lässt darauf schließen, dass durch den Serumstimulus auch solche Faktoren aktiviert werden, die nicht auf CARM1 und PRMT1 bei der Zielgenaktivierung zurückgreifen.

6 Diskussion

6.1 siRNA können unerwünschte Effekte in der Zelle hervorrufen

Mit der RNA-Interferenz hat eine Methode in der Molekularbiologie Einzug gehalten, die zunächst stürmische Begrüßung erfuhr. Auch die Pharmaunternehmen waren auf den Plan gerufen. Schien es doch, als könnte man nun jedem Onkogen wirksam entgegentreten. Tatsächlich gibt es bereits sogenannte antisense-Medikamente, viele befinden sich auf dem Weg ihrer Zulassung (Rayburn et al., 2006). Bei all den Vorzügen, die diese neue Methode mit sich bringt, muss doch kritisch erwähnt werden, dass es sich hierbei um ein Werkzeug handelt, das man erst seit kurzem zu verstehen beginnt.

Studien mit unspezifischer siRNA belegen, dass *off-target* Effekte u.a. abhängig sind von der Konzentration der transfizierten siRNA (Persengiev et al., 2004). Für den therapeutischen Einsatz muss das ebenso bedacht werden, wie die Möglichkeit, dass eine siRNA an verschiedenen Wirkorten unterschiedliche Effekte hervorrufen kann. In dieser Arbeit zeigen wir, dass eine spezifische siRNA zelltyp-abhängig *off-target* Effekte induziert.

Obwohl zunächst angenommen, dass siRNA mit einer Sequenz von weniger als 30 Nukleotiden nicht in der Lage sind, RNA abhängige Enzyme, wie beispielsweise die PKR, zu aktivieren, setzt sich in der neueren Literatur die Erkenntnis durch, dass dem doch der Fall sein kann (Sledz et al., 2003).

Das Herausfinden der Eigenschaften, die eine siRNA haben muss, damit man eine Aktivierung unerwünschter Effektoren ausschließen kann, ist eine große Herausforderung für die Grundlagenforschung, um nicht zuletzt zukünftige klinische Anwendungen der RNA-Interferenz verantworten zu können.

Die heute als häufigste Ursache für *off-target* Effekte angesehene Erklärung ist, dass siRNA ähnlich einer miRNA wirken können. Die Gruppe um Yu Shen von *Abbott Laboratories* konnte zum ersten Mal zeigen, dass sieben Nukleotide in der antisense Sequenz einer siRNA ausreichen, um verschiedene mRNA zu degradieren, die eine dazu komplementäre Sequenz in ihren 3´UTR besitzen (Lin et al., 2005). Diese Neuigkeit fand zunächst wenig Beachtung. Ein halbes Jahr später jedoch

veröffentlichten die Forscher von *Dharmacon*, dem weltweit führenden Hersteller für siRNA, eine Arbeit, die zu vergleichbaren Ergebnissen kam (Birmingham et al., 2006). Diese Studie belegt die Allgemeingültigkeit von Shens Aussage und führte fortan zu einem Umdenken im Design von siRNA.

6.2 Potentielle Effektoren von siCARM1

Dharmacon bietet online (http://www.dharmacon.com/seedlocator/) die Möglichkeit, zu untersuchen, welche potentiellen Nebentargets eine siRNA besitzen kann. Dabei wird die Nukleotidfolge einer siRNA herangezogen. Anhand der sogenannten *Seed*-Sequenz, bestehend aus den Nukleotiden 2 - 7 der siRNA, bestimmt der Algorithmus diejenigen cDNA, die in ihrem 3´UTR solche *Seed*-Regionen enthalten.
Man kann nicht davon ausgehen, dass die so identifzierten Gene tatsächlich von der entsprechenden siRNA reguliert werden, jedoch konnten Birmingham et al. zeigen, dass die Häufigkeit des Verkommens einer *Seed*-Sequenz die Regulation des potentiellen *off-targets* begünstigt.
Der *seedlocator* bestimmte 133 cDNA mit multiplen *Seed*-Regionen für siCARM1. Die meisten ließen sich bekannten Genen zuordnen. Anhand dieser Liste wurden durch Literaturstudium diejenigen Gene herausgesucht, die MAPK-Aktivität, bzw. Egr1 und c-Fos Expression negativ regulieren können (Tab. 5).

Acc	Gensymbol	Genname (*engl.*)
NM_052847	GNG7	Guanine nucleotide binding protein (G protein), gamma 7
NM_005539	INPP5A	Inositol polyphosphate-5-phosphatase, 40kDa
NM_014914	CENTG2	Centaurin, gamma 2
NM_032242	PLXNA1	Plexin A1

Tab. 5. Mögliche Effektoren von siCARM1.

Der erste potentielle Effektor ist das Guaninnukleotid-Bindeprotein γ 7 (GNG7). Ein G-Protein besteht aus einer α, einer β und einer γ-Untereinheit. GNG7 ist eines von mehreren Proteinen aus der Familie der γ-Untereinheiten. G-Proteine vermitteln bei

der Signaltransduktion ausgehend von sogenannten 7-Helix-Membranrezeptoren die Aktivierung eines weiteren Effektors (z.B. Adenylatcyclase). Wenn die α-Untereinheit GTP gebunden hat, besitzt sie eine aktive Konfiguration und dissoziert von den β und γ-Untereinheiten. Nach Hydrolyse des GTP zu GDP liegt die α-Untereinheit wieder inaktiv im Komplex mit β und γ-Untereinheit vor. Da die γ-Untereinheit notwendig für den inaktiven Zustand des G-Proteins ist und da G-Protein gekoppelte Rezeptoren bekannte Signalgeber für MAPK sind, ist es denkbar, dass das Fehlen von GNG7 einen Einfluss auf die Egr1 bzw. c-Fos Expression hat.

Der zweite mögliche Effektor ist die Inositolpolyphosphat-5-phosphatase (INPP5A), ein Enzym, das Inositol-1, -4, -5-triphosphat (IP_3) hydrolysiert. IP_3 ist ein wichtiger sogenannter *second messenger* für Mitogen stimulierte Signalwege in der Zelle. Es sorgt im IP_3/DAG-Signalweg für die Freisetzung von Calcium-Ionen aus dem endoplasmatischen Retikulum und trägt so zur Aktivierung der Protein-Kinase C (PKC) bei. PKC wiederum ist in der Lage über Raf den MAPK-Weg zu aktivieren (Ueda et al., 1996). Zum besseren Verständnis ist der MAPK-Signalweg in Abbildung 20 detailiert dargestellt. Die Tatsache, dass TPA die Wirkung von siCARM1 auf die MAPK verstärkte (Abb. 11), deutet darauf hin, dass der gesuchte Effektor von siCARM1 möglicherweise ein negativer Regulator der PKC ist. Es ist bisher jedoch nicht untersucht worden, ob INPP5A in HEK293 Zellen in der Lage ist, die PKC negativ zu beeinflussen.

Ein möglicher weiterer Effektor ist CENTG2 (γ-Centaurin 2). CENTG2 gehört zur Familie der ARF-GAP, also der Proteine, die GTPase-Aktivität für ADP-Ribosylierungsfaktoren (ARF) besitzen. ARF Proteine gehören wie Ras zur Superfamilie der GTPasen, die zwischen einer aktiven, GTP-gebundenen und einer inaktiven, GDP-gebundene Konformation wechseln. Ein GAP-Enzym begünstigt die Reaktionskinetik einer GTPase, sodass diese verstärkt im GDP-gebundenen Zustand, also inaktiv vorliegt. Der entsprechende Signalweg wird abgeschaltet.

ARF-Proteine spielen eine Rolle beim vesikulären Transport. Es wurde gezeigt, dass die Aktivierung von ERK durch ARF6 eine Bedingung für die Invasion von Melanomzellen in die extrazelluläre Matrix darstellt (Tague et al., 2004). Nie und andere konnten zeigen, dass CENTG2 GTPase-Aktivität für ARF6 besitzt (Nie et al., 2002).

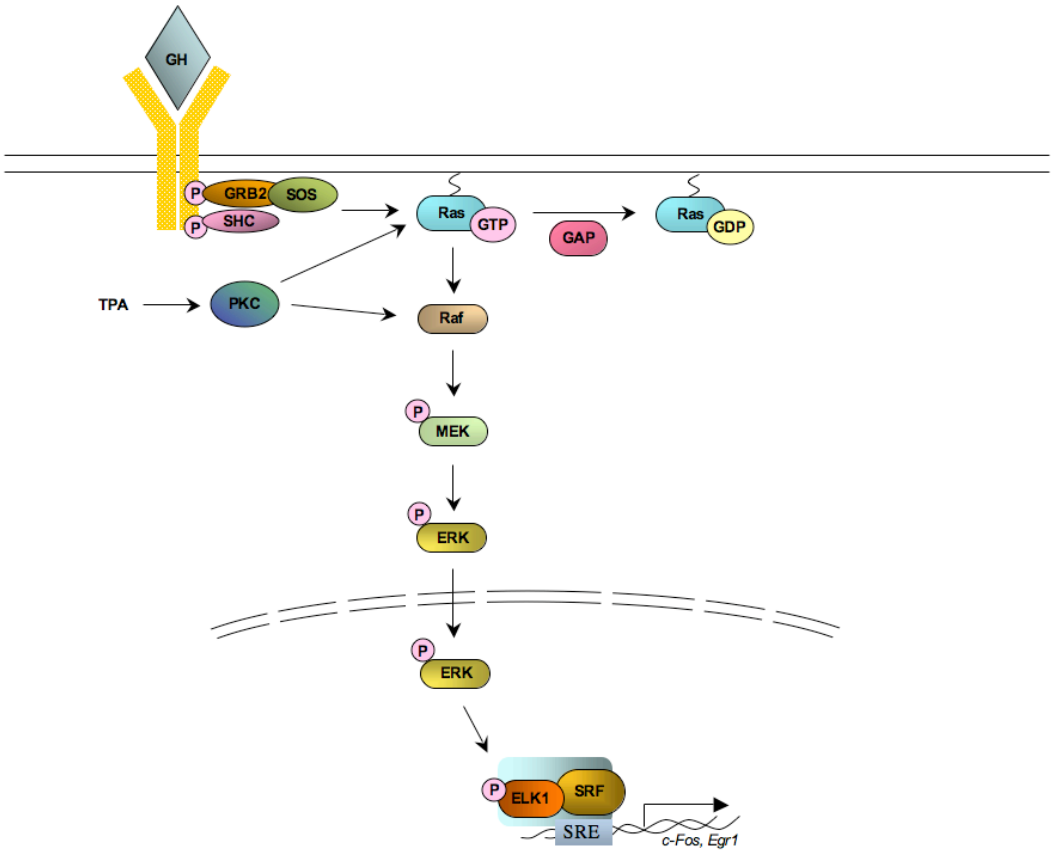


Abb. 20. Schematische Darstellung des MAPK-Siganlwegs. Nach Bindung eines Wachstumsfaktors (GH) an eine Rezeptortyrosinkinase erfolgen Autophosphorylierungen an der cytoplasmatischen Seite des Rezeptors, worauf Effektoren binden, die einen Guaninnukleotid-Austauschfaktor (SOS) rekrutieren. SOS vermittelt die Umwandlung von GDP- zu GTP-gebundenem Ras, was die Bindung und Aktivierung der Kinase Raf begünstigt, die ihrerseits die Kinase MEK phosphoryliert. MEK phosphoryliert schließlich die Kinase ERK, die in den Zellkern gelangt und verschiedene Transkriptionsfaktoren aktiviert. Hier beispielhaft den ETS-Faktor ELK1, der im ternären Komplex mit SRF an Serum responsive Elemente in den Promotoren von *immediate early response* Genen bindet. Die Proteinkinase C (PKC) ist in der Lage sowohl Ras als auch Raf zu aktivieren.

Plexine sind Zellrezeptoren, die vor allem bei der Regulation der Zell-Motilität eine Rolle spielen. Am Besten verstanden ist die Steuerung des Wachstumskegels in Axonen durch Plexine und ihre Liganden, den Semaphorinen (Kruger et al., 2005). Obwohl Plexin A1 (PLXNA1) über Rho-GTPasen den Umbau des Cytoskeletts reguliert, besitzt es eine GAP-Aktivität für R-Ras, die nach Ligandbindung aktiviert wird (Oinuma et al., 2004). R-Ras ist im geringen Maße in der Lage, MAPK zu aktivieren (Self et al., 2001).

Der in dieser Arbeit beschriebene *off-target* Effekt war bisher nur in HEK293 und 911 Zellen zu beobachten. Obwohl HEK293 Zellen als embryonale Nierenzellen gelten, besitzen sie Eigenschaften neuronaler Zellen (Shaw et al., 2002). Dies ist ein Hinweis auf PLXNA1 als möglichen Effektor, da Plexine eine wesentliche Rolle in neuronalen Signalwegen spielen (Negishi et al., 2005) .
Um herauszufinden, ob einer der genannten potentiellen Effektoren (GNG7, INPP5A, CENTG2 und PLXNA) tatsächlich ursächlich für den beschriebenen *off-target* Effekt ist, muss zunächst festgestellt werden, ob er in HEK293 vorliegt, und ob seine Expression nach Transfektion von siCARM1 abnimmt. Es ist auch denkbar, dass mehrere Effektoren zum siCARM1-Phänotyp beitragen.
Von den 133 cDNA, die unter Verwendung des *Seedlocator* bestimmt wurden, sind hier nur die Gene diskutiert worden, die nach bisherigem Stand der Forschung eine inhibierende Funktion im MAPK-Signalweg besitzen. Daher ist es zugegebenermaßen wahrscheinlich, dass andere bzw. weitere Effektoren den siCARM1-Phänotyp hervorrufen.

6.3 CARM1 und PRMT1 sind kooperative Coaktivatoren für STAT5

Michael Stallcup und Mitarbeiter haben mit Hilfe von Reportergenassays gezeigt, dass beide Methyltransferasen, CARM1 und PRMT1, Coaktivatoren für nukleäre Hormonrezeptoren, genauer den Estrogen-, den Thyroid- sowie den Androgenrezeptor, sind (Koh et al., 2001). Dabei ergaben sich bei Anwesenheit eines weiteren Cofaktors der p160-Familie (GRIP1) synergistische Effekte zwischen CARM1 und PRMT1.
Anhand eines Transkriptionsassays konnte *in vitro* gezeigt werden, dass Synergien bei der p53 abhängigen Transkription zwischen CARM1 und p300, sowie zwischen PRMT1 und p300 auftreten (An et al., 2004). Die Transkriptionsaktivität nimmt weiter zu, wenn alle drei Faktoren gemeinsam in den Assay eingesetzt werden. Desweiteren zeigte diese Studie, dass CARM1 ebenso wie p53 nach UV-Behandlung von U-2OS Zellen an den endogenen GADD45 Promotor rekrutiert wird.
Unter der Annahme, dass andere Transkriptionsfaktoren bei der Aktivierung ihrer Zielgene ebenfalls auf CARM1 und PRMT1 angewiesen sind, erstellten wir

Genexpressionsprofile nach Verlust jeweils eines oder beider Enzyme in HeLa Zellen. Dieses System wurde von uns gewählt, um tatsächlich neue Transkriptionsfaktoren zu identifizieren, die auf CARM1 und PRMT1 bei der Genaktivierung zurückgreifen. HeLa Zellen besitzen kein p53, da das papillomavirale Protein E6 für dessen Degradation sorgt (Scheffner et al., 1990). Zudem exprimieren sie den Estrogenrezeptor nicht.

Nur der Verlust beider Enzyme zeigt eine signifikante Veränderung im Genexpressionsprofil. Eine Promotoranalyse ergab, dass Bindestellen für STAT5 vermehrt in solchen Genen auftreten, die nach Verlust beider Enzyme schwächer exprimiert werden (Tab. 4). Der Reportergenassay bestätigt CARM1 und PRMT1 als Coaktivatoren für STAT5 (Abb. 17). Weitere Experimente zeigen, dass CARM1 und PRMT1 essentiell für die IL-4 vermittelte Aktivierung von SLC2A14 und CITED2 sind. Ein Modell zur Promotorsituation der STAT5 vermittelten Genaktivierung ist anhand von Abbildung 21 dargestellt.

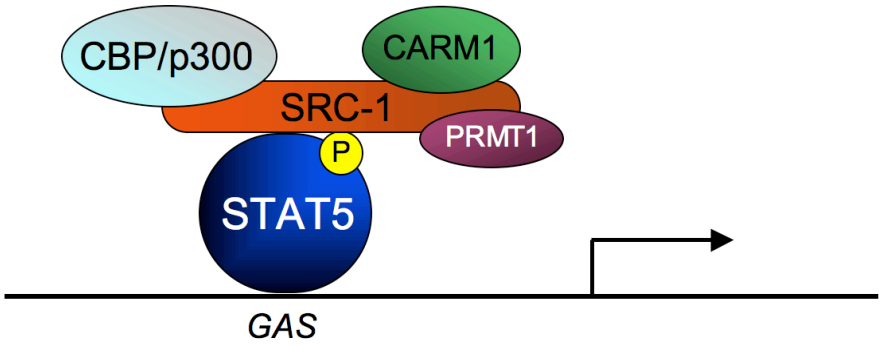


Abb. 21. CARM1 und PRMT1 an STAT5 abhängigen Zielgenen. Aktiviertes STAT5 bindet an GAS-Elemente seiner Zielgene und rekruitiert den Cofaktor SRC-1 (Litterst et al., 2003). Über die Bindung an SRC-1 gelangt CBP/p300 zu den Promotoren (Pfitzner et al., 1998). SRC-1 interagiert ebenso mit CARM1 und PRMT1 (Koh et al., 2001).

6.4 *Carm1*$^{-/-}$ und *Il-7r*$^{-/-}$ Mäuse besitzen den gleichen Phänotyp in Bezug auf die Entwicklung von Thymocyten

Eine stetig wachsende Zahl an Publikationen beschreibt Funkionen der Argininmethylierung in der Biologie von thymocytischen (T-) sowie anderen lymphoiden Zellen. In diesem Zusammenhang werden zunächst die Phänotypen der Mäuse besprochen, denen die hier untersuchten Argininmethyltransferasen fehlen.

Prmt1 knockout-Mäuse sterben am Embryonaltag E6.5, was eine essentielle Rolle für PRMT1 im Zellmetabolismus impliziert (Pawlak et al., 2000). Dennoch gelang es aus entsprechdenden Blastocysten, embryonale Stammzellen (ES) zu isolieren und zu kultivieren. In diesen Zellen war die Menge an asymmetrisch dimethyliertem Arginin verglichen mit Wildtypzellen um etwa die Hälfte reduziert. Da die T-Zell Entwicklung zum Zeitpunkt der Letalität von *Prmt1* defizienten Mäusen noch nicht eingesetzt hat, lässt dieser Phänotyp die Frage offen, ob PRMT1 in der T-Zell Entwicklung eine Rolle spielt.
Carm1 knockout-Mäuse sterben spätestens perinatal aufgrund eines Lungendefekts, embryonale Letalität ist ab E18.5 festzustellen (Yadav et al., 2003). *Carm1*$^{-/-}$ Embryos besitzen 5 - 10 mal weniger Thymuszellen im Vergleich zu wildtypischen Embryos (Kim et al., 2004). Es zeigte sich, dass die Thymocyten der *knockout*-Mäuse in einem frühen Differenzierungsstadium arretieren. Zu diesem Zeitpunkt liegen die Corezeptoren CD4 und CD8 nicht exprimiert vor, daher wird dieses Stadium doppelt negativ (DN) genannt (Abb. 22). Anhand anderer Oberflächenproteine lässt sich dieses Stadium jedoch weiter differenzieren. Für die *Carm1*$^{-/-}$ DN Thymocyten wurde festgestellt, dass sie CD44^{+} CD25^{-} sind, also dem Stadium DN1 zugehörig. Kim et al. diskutieren, dass die unterbliebene Methylierung von TARPP, einem frühen T-Zell spezifischen Faktor und Substrat für CARM1, zu diesem Phänotyp beitragen könnte.

Essentiell für die Entwicklung von B- und T-Zellen ist die Signalgebung durch Interleukin-7 (IL-7). Das Fehlen des IL-7 Rezeptors (IL-7R) führt in Bezug auf die T-Zell Entwicklung zu einem *Carm1*$^{-/-}$ ähnlichen Phänotyp (Maki et al., 1996). Neben einer zwanzig- bis siebzigfachen Reduktion der Thymuszellen, wurde festgestellt, dass die unreifen Thymocyten vor allem in DN1 und DN2 verharren, sich ihre Entwicklung also verzögerte (Porter and Malek, 1999). Dies ist auch deswegen

bemerkenswert, da sich aus der Literatur und durch die vorliegende Arbeit Hinweise auf mechanistische Zusammenhänge zwischen Argininmethylierung und Signalgebung durch Interleukine ergeben. Tatsächlich ist STAT5 der Transkriptionsfaktor, der unmittelbar nach Aktivierung des IL-7R durch Janus Kinasen (JAK) phosphoryliert wird (Pallard et al., 1999). STAT5 aktiviert seinerseits daraufhin essentielle Gene der Thymocytenentwicklung (z.B. TCRγ) und garantiert das Überleben der Zelle durch Hochregulierung antiapoptotischer Gene (z.B. Bcl-2).

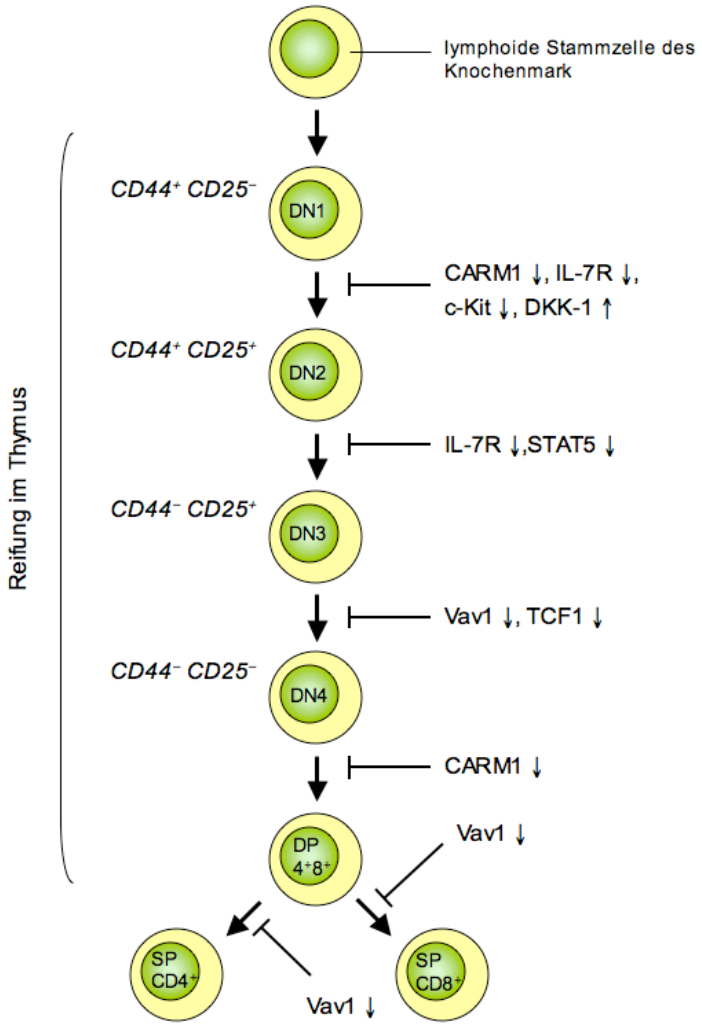


Abb. 22. Schematische Darstellung der Thymocytenentwicklung. *Knockout*-Phänotypen sind angedeutet. Jedes Stadium lässt sich anhand von Oberflächernmarkern (CD) charakterisieren. Die Überexpression des Wnt-Inhibitors DKK-1 führt ebenso zu einem Arrest in DN1, wie der *knockout* von CARM1, IL-7R und c-Kit. Weitere Erläuterungen siehe Text. (Abbildung nach Mak et al., 2001).

Mäuse, die weder STAT5A noch STAT5B besitzen, sterben perinatal und haben ebenfalls eine stark reduzierte Thymozytenzahl (Yao et al., 2006). Auch hier arretieren die unreifen Thymocyten, allerdings nicht in DN1 sondern in DN2.
Eine weitere Signalkaskade, die in T-Zellen durch den IL-7R reguliert wird, ist der PI3K-Weg (Benbernou et al., 2000). Dabei wird die PI3K durch PYK2 (*engl.* proline-rich tyrosine kinase) aktiviert, die mit JAK1 assoziert vorliegt. Schließlich wird die Schlüsselkinase AKT/PKB aktiviert, die durch Inhibition proapoptotischer Proteine, zum Überleben der Zelle beiträgt. AKT/PKB aktiviert u.a. die Transkriptionsfaktoren NF-AT und NF-κB. NF-AT regulierte Genexpression wird von PRMT1 durch Methylierung des Cofaktors NIP45 positiv beeinflusst (Mowen et al., 2004). Für NF-κB ist CARM1 bereits als Coaktivator beschrieben worden (Covic et al., 2005).

Der *Carm1 knockout* zeigt einen früheren Phänotyp in Bezug auf unreife Thymocyten als STAT5. Diese Abweichung kann dadurch erklärt werden, dass CARM1 ein Cofaktor für verschiedene Transkriptionsfaktoren ist. CARM1 und möglicherweise auch PRMT1 können als multiple Effektoren eines Signalwegs verstanden werden, da sich ihre Aktivität nicht auf einen Transkriptionsfaktor beschränkt. Dafür spricht die Übereinstimmung im T-Zell Phänotyp zwischen *Carm1*$^{-/-}$ und *Il-7r*$^{-/-}$ Mäusen.
Darüberhinaus sind CARM1 und PRMT1 Effektoren verschiedener Rezeptoren. Parallel zum IL-7-Signalweg wird auch durch Wnt die Reifung der T-Zellen beeinflusst (Staal 2003 current). Es wird vermutet, dass dies zummindest teilweise über die transkriptionelle Aktivierung von c-Kit geschieht (Chi 2003 Immunity). c-Kit ist eine Rezeptortyrosinkinase, die bei der Signalgebung in Stammzellen und verschiedenen frühen Vorläuferzellen eine Rolle spielt. Der Verlust von c-Kit führt ebenso wie der von CARM1 und IL-7R zu einem Arrest der unreifen Thymocyten in DN1 (Waskow et al., 2002). Interessanterweise behindert die Überexpression von DKK-1, einem Inhibitor des Wnt-Signalwegs, ebenfalls das Heranreifen der Thymocyten (Abb. 22). Wnt integriert sein Signal über verschiedene Transkriptionsfaktoren. Darunter β-Catenin und LEF-1, für die CARM1 bereits als Coaktivator beschrieben wurde (Koh et al., 2002).
Möglicherweise beeinflusst CARM1 den Wnt-Signalweg nicht nur über Transkriptionsfaktoren. BRG1, die ATPase Untereinheit verschiedener Chromatin *remodeling* Komplexe, wird von CARM1 nach Induktion durch Estrogen in ihrer

enzymatischen Aktivität stimuliert (Xu et al., 2004). Der Verlust von BRG1 führt zu einem Rückgang der Expression bestimmter Wnt-Zielgene in frühen Thymocyten, darunter c-Kit (Chi et al., 2003).
Die frühe Letalität der *Prmt1*$^{-/-}$ Maus lässt eine intensive Diskussion kooperativer Effekte von PRMT1 und CARM1 in der Thymocytenentwicklung nicht zu. Aufschluss darüber könnten konditionale und zelltypspezifische *knockout*-Modelle liefern. Eine weitere Möglichkeit stellt der Einsatz chemischer Inhibitoren dar.
Es wurde gezeigt, dass PRMT1 bei der Erythropoese aktiviert wird (Bakker et al., 2004). Die Behandlung mit MTA, einem allgemeinen Methyltransferaseinhibitor, verhinderte die Differenzierung erythroider Vorläuferzellen. Die Autoren spekulieren, dass dieser Effekt auf die Inhibition von PRMT1 zurückzuführen ist. Da MTA jedoch alle SAM abhängigen Methyltransferasen der Zelle inhibiert, ist es denkbar, dass die gefundenen Effekte auf kooperative Funktionen verschiedener Enzyme zurückzuführen sind. Vielversprechend wäre hier also der kombinierte Einsatz spezifischer siRNA gegen PRMT1 und weiterer Methyltransferasen, beispielsweise CARM1.

6.5 Gemeinsame Rolle für CARM1 und STAT5 in der Tumorigenese

Liang Cheng und Mitarbeiter entdeckten, dass CARM1 in Testosteron abhängigen wie auch Testosteron unabhängigen Prostatakarzinomen überexpremiert vorliegt (Hong et al., 2004). Sie diskutierten, dass CARM1 als Coaktivator des Testosteronrezeptors eine Rolle in der Entstehung dieses Tumortyps besitzt. Dies wurde durch jüngste Untersuchungen bestätigt (Majumder et al., 2006).
Die Aktivierung von STAT5 korreliert mit einem hohen histologischem Grad an Prostata-Krebs (Li et al., 2004). In Testosteron abhängigen wie unabhängigen Zelllinien wirkt dominant negatives STAT5 apoptotisch (Ahonen et al., 2003). Dominant negatives STAT5 inhibiert primäre Prostatatumor-Zellen (C2H) in ihrem Potential, Tumore in Nacktmäusen zu generieren (Kazansky et al., 2003). Da die vorliegende Arbeit CARM1 als Coaktivator für STAT5 charakterisiert, ist es denkbar, dass dieser Mechanismus zur Entartung von Pankreaszellen beiträgt.

6.6 Nach Verlust von CARM1 und PRMT1 liegt die Hälfte aller Gene im Expressionsprofil hochreguliert vor

Da für CARM1 und PRMT1 eine kooperative Rolle bei der Aktivierung von Genen bekannt war, erwarteten wir nach Verlust beider Enzyme Gene zu identifizieren, deren Expression relativ zum Kontrollzustand zurückgegangen war. Interessanterweise fanden wir jedoch etwa die Hälfte aller Zielgene im Genexpressionsprofil stärker exprimiert vor (Abb. 14). Eine mögliche Erklärung hierfür ist, dass CARM1 und PRMT1 einen Faktor aktivieren, der inhibierend auf die Genexpression wirkt. Ein solcher Faktor ist EIF2C2, den wir in der Microarray-Analyse anhand dreier verschiedener cDNA nachweisen konnten (Tab. 3). EIF2C2 ist in der Literatur auch alternativ als Argonaut2 (Ago2) bekannt. Erst jüngst fand man heraus, dass EIF2C2 der essentielle Faktor des RISC ist (Liu et al., 2004). RISC (*engl.* RNA-induced silencing complex) vermittelt über die Wechselwirkung des antisense-Strangs einer siRNA mit dem komplementären Abschnitt einer mRNA die Degradation dieses Transkripts (Sontheimer, 2005). Liu et al. fanden heraus, dass EIF2C2 diese Endonukleaseaktivität, für die in der Literatur der Begriff *Slicer* geprägt wurde, besitzt. EIF2C2$^{-/-}$ MEF sind nicht in der Lage, als Antwort auf eine siRNA, Gene zu reprimieren. Desweiteren inhibieren bestimmte Aminosäureaustausche in EIF2C2 die *Slicer*-Aktivität. Es ist also denkbar, dass die Gene, die im Genexpressionsprofil verstärkt aktiviert vorlagen, nur indirekt auf das Fehlen von CARM1 und PRMT1 zurückzuführen sind, sondern dass vielmehr die verminderte Expression von EIF2C2 für diese *zweite Welle* an Zielgenen verantwortlich ist.

In der Literatur finden sich zwei Beispiele, wonach CARM1 über die Methylierung eines weiteren transkriptionellen Cofaktors eine inhibitorische Funktion in der Genregulation besitzt. In beiden Fällen vermittelt die Argininmethylierung den Zerfall eines aktivatorischen Komplexes.

CARM1 besitzt repressorische Funktion in der Regulation bestimmter Zielgene des Transkriptionsfaktors CREB, indem es Argininreste in der KIX-Domäne des Coaktivators CBP methyliert. Methyliertes CBP ist nicht in der Lage, an die KID-Domäne von CREB zu binden und kann so seine aktivatorische Rolle in der Genregulation nicht mehr entfalten (Xu et al., 2001). Diese Beobachtung ist verblüffend, weil sich Synergien zwischen CARM1 und CBP in der Aktivierung von

Zielgenen für nukleäre Rezeptoren ergeben (Koh et al., 2001). Xu et al. weisen jedoch darauf hin, dass die Interaktion von CBP mit nukleären Rezeptoren nicht über die KIX-Domäne vermittelt wird und daher die Methylierung von CBP eine Selektion der Zielgene ermöglicht.

Eine sowohl aktivatorische wie auch repressorische Funktion hat CARM1 nach O´Malley und Mitarbeitern im Estrogen-Signalweg (Feng et al., 2006). Es wurde gezeigt, dass CARM1 nach Stimulation durch Estrogen SRC-3 methyliert, was zu einer Auflösung des Aktivatorkomplexes führt. SRC-3 Mutanten, die nicht mehr methyliert werden, ermöglichen eine verstärkte Induktion eines Estrogen abhängigen Reportersystems.

Aufgrund der hier angeführten Beispiele der repressorischen Funktion von CARM1 in der Transkription, ist es vorstellbar, dass ebenso PRMT1 den Zerfall eines Aktivatorkomplexes reguliert. Bisher ist für dieses Enzym ein solcher Mechanismus nicht bekannt. Jedoch besitzt PRMT1 mit TAFII68 ein Substrat, von dem *in vivo* bekannt ist, dass es an R203 methyliert wird (Ong et al., 2004; Wada et al., 2002). TAFII68 ist Bestandteil der basalen Transkriptionsmaschinerie. Über die Funktion seiner Methylierung ist nichts bekannt.

6.7 Ausblick

Die vorliegende Arbeit deckt die zwischen CARM1 und PRMT1 vorhandenen kooperativen Effekte in der Genregulation auf. Aufgrund der Tatsache, dass wir nur solche Gene identifizieren konnten, die von beiden Methyltransferasen gemeinsam reguliert werden, ist anzunehmen, dass die kooperative Funktion von CARM1 und PRMT1 ein allgemeines Prinzip der Genregulation ist. Wir gehen daher davon aus, dass die für p53, nukleäre Hormonrezeptoren und STAT5 beschriebenen Effekte auf eine Vielzahl weiterer Transkriptionsfaktoren zutrifft. Weitere Unterstützung für diese Hypothese liefern unpublizierte Daten von Michael Hottiger und Mitarbeitern, die belegen, dass beide Methyltransferasen, CARM1 und PRMT1, kooperative Coaktivatoren für NF-κB sind (persönliche Mitteilung, M. Hottiger).

CARM1 und PRMT1 interagieren über Mitglieder der p160-Familie (SRC-1, SRC-2, SRC-3) mit Hormonrezeptoren. Welche Rolle p160-Faktoren im Zusammenwirken

von CARM1, PRMT1 und STAT5 besitzen wird derzeit im Labor anhand von Reportergenassays und Interaktionsstudien untersucht. Desweiteren werden wir mit Hilfe von Chromatin-Immunpräzipitationen untersuchen, ob CARM1 und PRMT1 *in vivo* zu STAT5 regulierten Zielgenen rekrutiert werden.

CARM1 und PRMT1 methylieren eine Vielzahl RNA-bindender Proteine und regulieren darüber die Stabilität und den nukleocytoplasmatischen Transport bestimmter mRNA. Wir können daher nicht selbstverständlich davon ausgehen, dass die Veränderungen im Genexpressionsprofil der Zelle allein auf transkriptionelle Effekte zurückzuführen sind. Um dies zu untersuchen, werden derzeit im Labor Reportergenassays für einige Zielgene von CARM1 und PRMT1 etabliert. Daneben stellen *Nuclear-run-on*-Assays eine adäquate Möglichkeit dar, diese Fragestellung zu untersuchen.

Es ist denkbar, dass nicht alle in dieser Arbeit identifizierten Zielgene von CARM1 und PRMT1 gemeinsam reguliert werden. Während sich mittels der RTqPCR-Analyse (Abb. 16) im Einzel*knockdown* von CARM1 und PRMT1 bereits milde Effekte auf die Expression der meisten Zielgene zeigen, ist dies für RRAD nicht der Fall (Abb. 16L). Möglicherweise trifft ähnliches auch auf TMCO (Abb. 16C) und YRDC (Abb. 16T) zu. Eine Erklärung hierfür ist eine redundante Rolle beider Methyltransferasen für bestimmte Zielgene. Wenn dies zutrifft, werden die Effekte, die im Doppel*knockdown* auf die Expression dieser Gene vorliegen, nach Überexpression sowohl von CARM1 als auch von PRMT1 aufgehoben.

7 Literaturverzeichnis

Abramovich, C., Yakobson, B., Chebath, J., and Revel, M. (1997). A protein-arginine methyltransferase binds to the intracytoplasmic domain of the IFNAR1 chain in the type I interferon receptor. Embo J *16*, 260-266.

Ahonen, T. J., Xie, J., LeBaron, M. J., Zhu, J., Nurmi, M., Alanen, K., Rui, H., and Nevalainen, M. T. (2003). Inhibition of transcription factor Stat5 induces cell death of human prostate cancer cells. J Biol Chem *278*, 27287-27292.

Altschuler, L., Wook, J. O., Gurari, D., Chebath, J., and Revel, M. (1999). Involvement of receptor-bound protein methyltransferase PRMT1 in antiviral and antiproliferative effects of type I interferons. J Interferon Cytokine Res *19*, 189-195.

Amur, S. G., Shanker, G., Cochran, J. M., Ved, H. S., and Pieringer, R. A. (1986). Correlation between inhibition of myelin basic protein (arginine) methyltransferase by sinefungin and lack of compact myelin formation in cultures of cerebral cells from embryonic mice. J Neurosci Res *16*, 367-376.

An, W., Kim, J., and Roeder, R. G. (2004). Ordered cooperative functions of PRMT1, p300, and CARM1 in transcriptional activation by p53. Cell *117*, 735-748.

Ancelin, K., Lange, U. C., Hajkova, P., Schneider, R., Bannister, A. J., Kouzarides, T., and Surani, M. A. (2006). Blimp1 associates with Prmt5 and directs histone arginine methylation in mouse germ cells. Nat Cell Biol *8*, 623-630.

Assenmacher, N., and Hopfner, K. P. (2004). MRE11/RAD50/NBS1: complex activities. Chromosoma *113*, 157-166.

Bachand, F., and Silver, P. A. (2004). PRMT3 is a ribosomal protein methyltransferase that affects the cellular levels of ribosomal subunits. Embo J *23*, 2641-2650.

Bakker, W. J., Blazquez-Domingo, M., Kolbus, A., Besooyen, J., Steinlein, P., Beug, H., Coffer, P. J., Lowenberg, B., von Lindern, M., and van Dijk, T. B. (2004). FoxO3a regulates erythroid differentiation and induces BTG1, an activator of protein arginine methyl transferase 1. J Cell Biol *164*, 175-184.

Baldwin, G. S., and Carnegie, P. R. (1971). Specific enzymic methylation of an arginine in the experimental allergic encephalomyelitis protein from human myelin. Science *171*, 579-581.

Bauer, U. M., Daujat, S., Nielsen, S. J., Nightingale, K., and Kouzarides, T. (2002). Methylation at arginine 17 of histone H3 is linked to gene activation. EMBO Rep *3*, 39-44.

Bedford, M. T., Frankel, A., Yaffe, M. B., Clarke, S., Leder, P., and Richard, S. (2000). Arginine methylation inhibits the binding of proline-rich ligands to Src homology 3, but not WW, domains. J Biol Chem *275*, 16030-16036.
Bedford, M. T., and Richard, S. (2005). Arginine methylation an emerging regulator of protein function. Mol Cell *18*, 263-272.

Benbernou, N., Muegge, K., and Durum, S. K. (2000). Interleukin (IL)-7 induces rapid activation of Pyk2, which is bound to Janus kinase 1 and IL-7Ralpha. J Biol Chem *275*, 7060-7065.

Birmingham, A., Anderson, E. M., Reynolds, A., Ilsley-Tyree, D., Leake, D., Fedorov, Y., Baskerville, S., Maksimova, E., Robinson, K., Karpilow, J.*, et al.* (2006). 3' UTR seed matches, but not overall identity, are associated with RNAi off-targets. Nat Methods *3*, 199-204.

Boisvert, F. M., Chenard, C. A., and Richard, S. (2005a). Protein interfaces in signaling regulated by arginine methylation. Sci STKE *2005*, re2.

Boisvert, F. M., Dery, U., Masson, J. Y., and Richard, S. (2005b). Arginine methylation of MRE11 by PRMT1 is required for DNA damage checkpoint control. Genes Dev *19*, 671-676.

Boisvert, F. M., Hendzel, M. J., Masson, J. Y., and Richard, S. (2005c). Methylation of MRE11 regulates its nuclear compartmentalization. Cell Cycle *4*, 981-989.

Boisvert, F. M., Rhie, A., Richard, S., and Doherty, A. J. (2005d). The GAR motif of 53BP1 is arginine methylated by PRMT1 and is necessary for 53BP1 DNA binding activity. Cell Cycle *4*, 1834-1841.

Boulanger, M. C., Liang, C., Russell, R. S., Lin, R., Bedford, M. T., Wainberg, M. A., and Richard, S. (2005). Methylation of Tat by PRMT6 regulates human immunodeficiency virus type 1 gene expression. J Virol *79*, 124-131.

Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem *72*, 248-254.

Branscombe, T. L., Frankel, A., Lee, J. H., Cook, J. R., Yang, Z., Pestka, S., and Clarke, S. (2001). PRMT5 (Janus kinase-binding protein 1) catalyzes the formation of symmetric dimethylarginine residues in proteins. J Biol Chem *276*, 32971-32976.

Brostoff, S., and Eylar, E. H. (1971). Localization of methylated arginine in the A1 protein from myelin. Proc Natl Acad Sci U S A *68*, 765-769.

Burgess, W. H., Bizik, J., Mehlman, T., Quarto, N., and Rifkin, D. B. (1991). Direct evidence for methylation of arginine residues in high molecular weight forms of basic fibroblast growth factor. Cell Regul *2*, 87-93.

Cakouros, D., Daish, T. J., Mills, K., and Kumar, S. (2004). An arginine-histone methyltransferase, CARMER, coordinates ecdysone-mediated apoptosis in Drosophila cells. J Biol Chem *279*, 18467-18471.

Chen, D., Ma, H., Hong, H., Koh, S. S., Huang, S. M., Schurter, B. T., Aswad, D. W., and Stallcup, M. R. (1999). Regulation of transcription by a protein methyltransferase. Science *284*, 2174-2177.

Chen, S. L., Loffler, K. A., Chen, D., Stallcup, M. R., and Muscat, G. E. (2002). The coactivator-associated arginine methyltransferase is necessary for muscle differentiation: CARM1 coactivates myocyte enhancer factor-2. J Biol Chem *277*, 4324-4333.

Chen, W., Daines, M. O., and Hershey, G. K. (2004). Methylation of STAT6 modulates STAT6 phosphorylation, nuclear translocation, and DNA-binding activity. J Immunol *172*, 6744-6750.

Chevillard-Briet, M., Trouche, D., and Vandel, L. (2002). Control of CBP co-activating activity by arginine methylation. Embo J *21*, 5457-5466.

Chi, T. H., Wan, M., Lee, P. P., Akashi, K., Metzger, D., Chambon, P., Wilson, C. B., and Crabtree, G. R. (2003). Sequential roles of Brg, the ATPase subunit of BAF chromatin remodeling complexes, in thymocyte development. Immunity *19*, 169-182.

Cook, J. R., Lee, J. H., Yang, Z. H., Krause, C. D., Herth, N., Hoffmann, R., and Pestka, S. (2006). FBXO11/PRMT9, a new protein arginine methyltransferase, symmetrically dimethylates arginine residues. Biochem Biophys Res Commun *342*, 472-481.

Cote, J., and Richard, S. (2005). Tudor domains bind symmetrical dimethylated arginines. J Biol Chem *280*, 28476-28483.

Covic, M., Hassa, P. O., Saccani, S., Buerki, C., Meier, N. I., Lombardi, C., Imhof, R., Bedford, M. T., Natoli, G., and Hottiger, M. O. (2005). Arginine methyltransferase CARM1 is a promoter-specific regulator of NF-kappaB-dependent gene expression. Embo J *24*, 85-96.

Daujat, S., Bauer, U. M., Shah, V., Turner, B., Berger, S., and Kouzarides, T. (2002). Crosstalk between CARM1 methylation and CBP acetylation on histone H3. Curr Biol *12*, 2090-2097.

Decker, T., Muller, M., and Stockinger, S. (2005). The yin and yang of type I interferon activity in bacterial infection. Nat Rev Immunol *5*, 675-687.

Duong, F. H., Christen, V., Berke, J. M., Penna, S. H., Moradpour, D., and Heim, M. H. (2005). Upregulation of protein phosphatase 2Ac by hepatitis C virus modulates NS3 helicase activity through inhibition of protein arginine methyltransferase 1. J Virol *79*, 15342-15350.

Duong, F. H., Christen, V., Filipowicz, M., and Heim, M. H. (2006). S-Adenosylmethionine and betaine correct hepatitis C virus induced inhibition of interferon signaling in vitro. Hepatology *43*, 796-806.

Duong, F. H., Filipowicz, M., Tripodi, M., La Monica, N., and Heim, M. H. (2004). Hepatitis C virus inhibits interferon signaling through up-regulation of protein phosphatase 2A. Gastroenterology *126*, 263-277.

El Messaoudi, S., Fabbrizio, E., Rodriguez, C., Chuchana, P., Fauquier, L., Cheng, D., Theillet, C., Vandel, L., Bedford, M. T., and Sardet, C. (2006). Coactivator-associated arginine methyltransferase 1 (CARM1) is a positive regulator of the Cyclin E1 gene. Proc Natl Acad Sci U S A *103*, 13351-13356.

Feng, Q., Yi, P., Wong, J., and O'Malley B, W. (2006). Signaling within a coactivator complex: Methylation of SRC-3/AIB1 is a molecular switch for complex disassembly. Mol Cell Biol.

Friedrich, K., Kammer, W., Erhardt, I., Brandlein, S., Sebald, W., and Moriggl, R. (1999). Activation of STAT5 by IL-4 relies on Janus kinase function but not on receptor tyrosine phosphorylation, and can contribute to both cell proliferation and gene regulation. Int Immunol *11*, 1283-1294.

Friesen, W. J., Massenet, S., Paushkin, S., Wyce, A., and Dreyfuss, G. (2001). SMN, the product of the spinal muscular atrophy gene, binds preferentially to dimethylarginine-containing protein targets. Mol Cell *7*, 1111-1117.

Friesen, W. J., Wyce, A., Paushkin, S., Abel, L., Rappsilber, J., Mann, M., and Dreyfuss, G. (2002). A novel WD repeat protein component of the methylosome binds Sm proteins. J Biol Chem *277*, 8243-8247.

Fujiwara, T., Mori, Y., Chu, D. L., Koyama, Y., Miyata, S., Tanaka, H., Yachi, K., Kubo, T., Yoshikawa, H., and Tohyama, M. (2006). CARM1 regulates proliferation of PC12 cells by methylating HuD. Mol Cell Biol *26*, 2273-2285.

Gary, J. D., Lin, W. J., Yang, M. C., Herschman, H. R., and Clarke, S. (1996). The predominant protein-arginine methyltransferase from Saccharomyces cerevisiae. J Biol Chem *271*, 12585-12594.

Ghosh, S. K., Paik, W. K., and Kim, S. (1988). Purification and molecular identification of two protein methylases I from calf brain. Myelin basic protein- and histone-specific enzyme. J Biol Chem *263*, 19024-19033.

Hong, H., Kao, C., Jeng, M. H., Eble, J. N., Koch, M. O., Gardner, T. A., Zhang, S., Li, L., Pan, C. X., Hu, Z., *et al.* (2004). Aberrant expression of CARM1, a transcriptional coactivator of androgen receptor, in the development of prostate carcinoma and androgen-independent status. Cancer *101*, 83-89.

Huang, S., Litt, M., and Felsenfeld, G. (2005). Methylation of histone H4 by arginine methyltransferase PRMT1 is essential in vivo for many subsequent histone modifications. Genes Dev *19*, 1885-1893.

Kakimoto, Y., and Akazawa, S. (1970). Isolation and identification of N-G,N-G- and N-G,N'-G-dimethyl-arginine, N-epsilon-mono-, di-, and trimethyllysine, and glucosylgalactosyl- and galactosyl-delta-hydroxylysine from human urine. J Biol Chem *245*, 5751-5758.

Kazansky, A. V., Spencer, D. M., and Greenberg, N. M. (2003). Activation of signal transducer and activator of transcription 5 is required for progression of autochthonous prostate cancer: evidence from the transgenic adenocarcinoma of the mouse prostate system. Cancer Res *63*, 8757-8762.

Kim, J., Lee, J., Yadav, N., Wu, Q., Carter, C., Richard, S., Richie, E., and Bedford, M. T. (2004). Loss of CARM1 results in hypomethylation of thymocyte cyclic AMP-regulated phosphoprotein and deregulated early T cell development. J Biol Chem *279*, 25339-25344.

Kim, S., Tuck, M., Kim, M., Campagnoni, A. T., and Paik, W. K. (1984). Studies on myelin basic protein-specific protein methylase I in various dysmyelinating mutant mice. Biochem Biophys Res Commun *123*, 468-474.

Koh, S. S., Chen, D., Lee, Y. H., and Stallcup, M. R. (2001). Synergistic enhancement of nuclear receptor function by p160 coactivators and two coactivators with protein methyltransferase activities. J Biol Chem *276*, 1089-1098.

Koh, S. S., Li, H., Lee, Y. H., Widelitz, R. B., Chuong, C. M., and Stallcup, M. R. (2002). Synergistic coactivator function by coactivator-associated arginine methyltransferase (CARM) 1 and beta-catenin with two different classes of DNA-binding transcriptional activators. J Biol Chem *277*, 26031-26035.

Komyod, W., Bauer, U. M., Heinrich, P. C., Haan, S., and Behrmann, I. (2005). Are STATS arginine-methylated? J Biol Chem *280*, 21700-21705.

Kotanides, H., Moczygemba, M., White, M. F., and Reich, N. C. (1995). Characterization of the interleukin-4 nuclear activated factor/STAT and its activation independent of the insulin receptor substrate proteins. J Biol Chem *270*, 19481-19486.

Kruger, R. P., Aurandt, J., and Guan, K. L. (2005). Semaphorins command cells to move. Nat Rev Mol Cell Biol *6*, 789-800.

Kwak, Y. T., Guo, J., Prajapati, S., Park, K. J., Surabhi, R. M., Miller, B., Gehrig, P., and Gaynor, R. B. (2003). Methylation of SPT5 regulates its interaction with RNA polymerase II and transcriptional elongation properties. Mol Cell *11*, 1055-1066.

Lee, J. H., Cook, J. R., Yang, Z. H., Mirochnitchenko, O., Gunderson, S. I., Felix, A. M., Herth, N., Hoffmann, R., and Pestka, S. (2005). PRMT7, a new protein arginine methyltransferase that synthesizes symmetric dimethylarginine. J Biol Chem *280*, 3656-3664.

Li, H., Ahonen, T. J., Alanen, K., Xie, J., LeBaron, M. J., Pretlow, T. G., Ealley, E. L., Zhang, Y., Nurmi, M., Singh, B., *et al.* (2004). Activation of signal transducer and activator of transcription 5 in human prostate cancer is associated with high histological grade. Cancer Res *64*, 4774-4782.

Lin, W., Shen, G., Yuan, X., Jain, M. R., Yu, S., Zhang, A., Chen, J. D., and Kong, A. N. (2006). Regulation of Nrf2 transactivation domain activity by p160 RAC3/SRC3 and other nuclear co-regulators. J Biochem Mol Biol *39*, 304-310.

Lin, W. J., Gary, J. D., Yang, M. C., Clarke, S., and Herschman, H. R. (1996). The mammalian immediate-early TIS21 protein and the leukemia-associated BTG1 protein interact with a protein-arginine N-methyltransferase. J Biol Chem *271*, 15034-15044.

Lin, X., Ruan, X., Anderson, M. G., McDowell, J. A., Kroeger, P. E., Fesik, S. W., and Shen, Y. (2005). siRNA-mediated off-target gene silencing triggered by a 7 nt complementation. Nucleic Acids Res *33*, 4527-4535.

Lischwe, M. A., Cook, R. G., Ahn, Y. S., Yeoman, L. C., and Busch, H. (1985a). Clustering of glycine and NG,NG-dimethylarginine in nucleolar protein C23. Biochemistry *24*, 6025-6028.

Lischwe, M. A., Ochs, R. L., Reddy, R., Cook, R. G., Yeoman, L. C., Tan, E. M., Reichlin, M., and Busch, H. (1985b). Purification and partial characterization of a nucleolar scleroderma antigen (Mr = 34,000; pI, 8.5) rich in NG,NG-dimethylarginine. J Biol Chem *260*, 14304-14310.

Litterst, C. M., Kliem, S., Marilley, D., and Pfitzner, E. (2003). NCoA-1/SRC-1 is an essential coactivator of STAT5 that binds to the FDL motif in the alpha-helical region of the STAT5 transactivation domain. J Biol Chem *278*, 45340-45351.

Liu, J., Carmell, M. A., Rivas, F. V., Marsden, C. G., Thomson, J. M., Song, J. J., Hammond, S. M., Joshua-Tor, L., and Hannon, G. J. (2004). Argonaute2 is the catalytic engine of mammalian RNAi. Science *305*, 1437-1441.

Majumder, S., Liu, Y., Ford, O. H., 3rd, Mohler, J. L., and Whang, Y. E. (2006). Involvement of arginine methyltransferase CARM1 in androgen receptor function and prostate cancer cell viability. Prostate.

Mak, T. W., Penninger, J. M., and Ohashi, P. S. (2001). Knockout mice: a paradigm shift in modern immunology. Nat Rev Immunol *1*, 11-19.

Maki, K., Sunaga, S., Komagata, Y., Kodaira, Y., Mabuchi, A., Karasuyama, H., Yokomuro, K., Miyazaki, J. I., and Ikuta, K. (1996). Interleukin 7 receptor-deficient mice lack gammadelta T cells. Proc Natl Acad Sci U S A *93*, 7172-7177.

Meissner, T., Krause, E., Lodige, I., and Vinkemeier, U. (2004). Arginine methylation of STAT1: a reassessment. Cell *119*, 587-589; discussion 589-590.

Miranda, T. B., Miranda, M., Frankel, A., and Clarke, S. (2004). PRMT7 is a member of the protein arginine methyltransferase family with a distinct substrate specificity. J Biol Chem *279*, 22902-22907.

Miranda, T. B., Webb, K. J., Edberg, D. D., Reeves, R., and Clarke, S. (2005). Protein arginine methyltransferase 6 specifically methylates the nonhistone chromatin protein HMGA1a. Biochem Biophys Res Commun *336*, 831-835.

Mowen, K. A., Schurter, B. T., Fathman, J. W., David, M., and Glimcher, L. H. (2004). Arginine methylation of NIP45 modulates cytokine gene expression in effector T lymphocytes. Mol Cell *15*, 559-571.

Mowen, K. A., Tang, J., Zhu, W., Schurter, B. T., Shuai, K., Herschman, H. R., and David, M. (2001). Arginine methylation of STAT1 modulates IFNalpha/beta-induced transcription. Cell *104*, 731-741.

Nakajima, T., Matsuoka, Y., and Kakimoto, Y. (1971). Isolation and identification of N-G-monomethyl, N-G, N-G-dimethyl- and N-G,N' G-dimethylarginine from the hydrolysate of proteins of bovine brain. Biochim Biophys Acta *230*, 212-222.

Negishi, M., Oinuma, I., and Katoh, H. (2005). Plexins: axon guidance and signal transduction. Cell Mol Life Sci *62*, 1363-1371.

Nie, Z., Stanley, K. T., Stauffer, S., Jacques, K. M., Hirsch, D. S., Takei, J., and Randazzo, P. A. (2002). AGAP1, an endosome-associated, phosphoinositide-dependent ADP-ribosylation factor GTPase-activating protein that affects actin cytoskeleton. J Biol Chem *277*, 48965-48975.

Oinuma, I., Ishikawa, Y., Katoh, H., and Negishi, M. (2004). The Semaphorin 4D receptor Plexin-B1 is a GTPase activating protein for R-Ras. Science *305*, 862-865.

Ong, S. E., Mittler, G., and Mann, M. (2004). Identifying and quantifying in vivo methylation sites by heavy methyl SILAC. Nat Methods *1*, 119-126.

Paik, W. K., and Kim, S. (1967). Enzymatic methylation of protein fractions from calf thymus nuclei. Biochem Biophys Res Commun *29*, 14-20.

Paik, W. K., and Kim, S. (1968). Protein methylase I. Purification and properties of the enzyme. J Biol Chem *243*, 2108-2114.

Pal, S., Vishwanath, S. N., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., and Sif, S. (2004). Human SWI/SNF-associated PRMT5 methylates histone H3 arginine 8 and negatively regulates expression of ST7 and NM23 tumor suppressor genes. Mol Cell Biol *24*, 9630-9645.

Pal, S., Yun, R., Datta, A., Lacomis, L., Erdjument-Bromage, H., Kumar, J., Tempst, P., and Sif, S. (2003). mSin3A/histone deacetylase 2- and PRMT5-containing Brg1 complex is involved in transcriptional repression of the Myc target gene cad. Mol Cell Biol *23*, 7475-7487.

Pallard, C., Stegmann, A. P., van Kleffens, T., Smart, F., Venkitaraman, A., and Spits, H. (1999). Distinct roles of the phosphatidylinositol 3-kinase and STAT5 pathways in IL-7-mediated development of human thymocyte precursors. Immunity *10*, 525-535.

Park, G. H., Chanderkar, L. P., Paik, W. K., and Kim, S. (1986). Myelin basic protein inhibits histone-specific protein methylase I. Biochim Biophys Acta *874*, 30-36.
Paukku, K., and Silvennoinen, O. (2004). STATs as critical mediators of signal transduction and transcription: lessons learned from STAT5. Cytokine Growth Factor Rev *15*, 435-455.

Pawlak, M. R., Scherer, C. A., Chen, J., Roshon, M. J., and Ruley, H. E. (2000). Arginine N-methyltransferase 1 is required for early postimplantation mouse development, but cells deficient in the enzyme are viable. Mol Cell Biol *20*, 4859-4869.

Persengiev, S. P., Zhu, X., and Green, M. R. (2004). Nonspecific, concentration-dependent stimulation and repression of mammalian gene expression by small interfering RNAs (siRNAs). Rna *10*, 12-18.

Pfitzner, E., Jahne, R., Wissler, M., Stoecklin, E., and Groner, B. (1998). p300/CREB-binding protein enhances the prolactin-mediated transcriptional induction through direct interaction with the transactivation domain of Stat5, but does not participate in the Stat5-mediated suppression of the glucocorticoid response. Mol Endocrinol *12*, 1582-1593.

Pollack, B. P., Kotenko, S. V., He, W., Izotova, L. S., Barnoski, B. L., and Pestka, S. (1999). The human homologue of the yeast proteins Skb1 and Hsl7p interacts with Jak kinases and contains protein methyltransferase activity. J Biol Chem *274*, 31531-31542.

Ponting, C. P. (1997). Tudor domains in proteins that interact with RNA. Trends Biochem Sci *22*, 51-52.

Porter, B. O., and Malek, T. R. (1999). IL-2Rbeta/IL-7Ralpha doubly deficient mice recapitulate the thymic and intraepithelial lymphocyte (IEL) developmental defects of gammac-/- mice: roles for both IL-2 and IL-15 in CD8alphaalpha IEL development. J Immunol *163*, 5906-5912.

Rajpurohit, R., Lee, S. O., Park, J. O., Paik, W. K., and Kim, S. (1994). Enzymatic methylation of recombinant heterogeneous nuclear RNP protein A1. Dual substrate specificity for S-adenosylmethionine:histone-arginine N-methyltransferase. J Biol Chem *269*, 1075-1082.

Rayburn, E. R., Wang, H., and Zhang, R. (2006). Antisense-based cancer therapeutics: are we there yet? Expert Opin Emerg Drugs *11*, 337-352.

Rho, J., Choi, S., Seong, Y. R., Cho, W. K., Kim, S. H., and Im, D. S. (2001). Prmt5, which forms distinct homo-oligomers, is a member of the protein-arginine methyltransferase family. J Biol Chem *276*, 11393-11401.

Richard, S., Morel, M., and Cleroux, P. (2005). Arginine methylation regulates IL-2 gene expression: a role for protein arginine methyltransferase 5 (PRMT5). Biochem J *388*, 379-386.

Rolling, C., Treton, D., Pellegrini, S., Galanaud, P., and Richard, Y. (1996). IL4 and IL13 receptors share the gamma c chain and activate STAT6, STAT3 and STAT5 proteins in normal human B cells. FEBS Lett *393*, 53-56.

Scheffner, M., Werness, B. A., Huibregtse, J. M., Levine, A. J., and Howley, P. M. (1990). The E6 oncoprotein encoded by human papillomavirus types 16 and 18 promotes the degradation of p53. Cell *63*, 1129-1136.

Schurter, B. T., Koh, S. S., Chen, D., Bunick, G. J., Harp, J. M., Hanson, B. L., Henschen-Edman, A., Mackay, D. R., Stallcup, M. R., and Aswad, D. W. (2001). Methylation of histone H3 by coactivator-associated arginine methyltransferase 1. Biochemistry *40*, 5747-5756.

Scott, H. S., Antonarakis, S. E., Lalioti, M. D., Rossier, C., Silver, P. A., and Henry, M. F. (1998). Identification and characterization of two putative human arginine methyltransferases (HRMT1L1 and HRMT1L2). Genomics *48*, 330-340.

Self, A. J., Caron, E., Paterson, H. F., and Hall, A. (2001). Analysis of R-Ras signalling pathways. J Cell Sci *114*, 1357-1366.

Shaw, G., Morse, S., Ararat, M., and Graham, F. L. (2002). Preferential transformation of human neuronal cells by human adenoviruses and the origin of HEK 293 cells. Faseb J *16*, 869-871.

Shen, E. C., Henry, M. F., Weiss, V. H., Valentini, S. R., Silver, P. A., and Lee, M. S. (1998). Arginine methylation facilitates the nuclear export of hnRNP proteins. Genes Dev *12*, 679-691.

Sledz, C. A., Holko, M., de Veer, M. J., Silverman, R. H., and Williams, B. R. (2003). Activation of the interferon system by short-interfering RNAs. Nat Cell Biol *5*, 834-839.

Sontheimer, E. J. (2005). Assembly and function of RNA silencing complexes. Nat Rev Mol Cell Biol *6*, 127-138.

Stallcup, M. R., Chen, D., Koh, S. S., Ma, H., Lee, Y. H., Li, H., Schurter, B. T., and Aswad, D. W. (2000). Co-operation between protein-acetylating and protein-methylating co-activators in transcriptional activation. Biochem Soc Trans *28*, 415-418.

Strahl, B. D., Briggs, S. D., Brame, C. J., Caldwell, J. A., Koh, S. S., Ma, H., Cook, R. G., Shabanowitz, J., Hunt, D. F., Stallcup, M. R., and Allis, C. D. (2001). Methylation of histone H4 at arginine 3 occurs in vivo and is mediated by the nuclear receptor coactivator PRMT1. Curr Biol *11*, 996-1000.

Swiercz, R., Person, M. D., and Bedford, M. T. (2005). Ribosomal protein S2 is a substrate for mammalian PRMT3 (protein arginine methyltransferase 3). Biochem J *386*, 85-91.

Tague, S. E., Muralidharan, V., and D'Souza-Schorey, C. (2004). ADP-ribosylation factor 6 regulates tumor cell invasion through the activation of the MEK/ERK signaling pathway. Proc Natl Acad Sci U S A *101*, 9671-9676.

Tang, J., Gary, J. D., Clarke, S., and Herschman, H. R. (1998). PRMT 3, a type I protein arginine N-methyltransferase that differs from PRMT1 in its oligomerization, subcellular localization, substrate specificity, and regulation. J Biol Chem *273*, 16935-16945.

Ueda, Y., Hirai, S., Osada, S., Suzuki, A., Mizuno, K., and Ohno, S. (1996). Protein kinase C activates the MEK-ERK pathway in a manner independent of Ras and dependent on Raf. J Biol Chem *271*, 23512-23519.

Valineva, T., Yang, J., Palovuori, R., and Silvennoinen, O. (2005). The transcriptional co-activator protein p100 recruits histone acetyltransferase activity to STAT6 and mediates interaction between the CREB-binding protein and STAT6. J Biol Chem *280*, 14989-14996.

Wada, K., Inoue, K., and Hagiwara, M. (2002). Identification of methylated proteins by protein arginine N-methyltransferase 1, PRMT1, with a new expression cloning strategy. Biochim Biophys Acta *1591*, 1-10.

Wagner, S., Weber, S., Kleinschmidt, M. A., Nagata, K., and Bauer, U. M. (2006). SET-mediated promoter hypoacetylation is a prerequisite for coactivation of the estrogen-responsive pS2 gene by PRMT1. J Biol Chem.

Wang, H., Huang, Z. Q., Xia, L., Feng, Q., Erdjument-Bromage, H., Strahl, B. D., Briggs, S. D., Allis, C. D., Wong, J., Tempst, P., and Zhang, Y. (2001). Methylation of histone H4 at arginine 3 facilitating transcriptional activation by nuclear hormone receptor. Science *293*, 853-857.

Waskow, C., Paul, S., Haller, C., Gassmann, M., and Rodewald, H. R. (2002). Viable c-Kit(W/W) mutants reveal pivotal role for c-kit in the maintenance of lymphopoiesis. Immunity *17*, 277-288.

Weiss, V. H., McBride, A. E., Soriano, M. A., Filman, D. J., Silver, P. A., and Hogle, J. M. (2000). The structure and oligomerization of the yeast arginine methyltransferase, Hmt1. Nat Struct Biol *7*, 1165-1171.

Xu, W., Chen, H., Du, K., Asahara, H., Tini, M., Emerson, B. M., Montminy, M., and Evans, R. M. (2001). A transcriptional switch mediated by cofactor methylation. Science *294*, 2507-2511.

Xu, W., Cho, H., and Evans, R. M. (2003). Acetylation and methylation in nuclear receptor gene activation. Methods Enzymol *364*, 205-223.

Xu, W., Cho, H., Kadam, S., Banayo, E. M., Anderson, S., Yates, J. R., 3rd, Emerson, B. M., and Evans, R. M. (2004). A methylation-mediator complex in hormone signaling. Genes Dev *18*, 144-156.

Yadav, N., Lee, J., Kim, J., Shen, J., Hu, M. C., Aldaz, C. M., and Bedford, M. T. (2003). Specific protein methylation defects and gene expression perturbations in coactivator-associated arginine methyltransferase 1-deficient mice. Proc Natl Acad Sci U S A *100*, 6464-6468.

Yao, Z., Cui, Y., Watford, W. T., Bream, J. H., Yamaoka, K., Hissong, B. D., Li, D., Durum, S. K., Jiang, Q., Bhandoola, A.*, et al.* (2006). Stat5a/b are essential for normal lymphoid development and differentiation. Proc Natl Acad Sci U S A *103*, 1000-1005.

Yoshimoto, T., Boehm, M., Olive, M., Crook, M. F., San, H., Langenickel, T., and Nabel, E. G. (2006). The arginine methyltransferase PRMT2 binds RB and regulates E2F function. Exp Cell Res *312*, 2040-2053.

Young, P. R., Vacante, D. A., and Waickus, C. M. (1987). Mechanism of the interaction between myelin basic protein and the myelin membrane; the role of arginine methylation. Biochem Biophys Res Commun *145*, 1112-1118.

Young, P. R., and Waickus, C. M. (1988). Purification and kinetic mechanism of S-adenosylmethionine: myelin basic protein methyltransferase from bovine brain. Biochem J *250*, 221-226.

Zhang, X., and Cheng, X. (2003). Structure of the predominant protein arginine methyltransferase PRMT1 and analysis of its binding to substrate peptides. Structure *11*, 509-520.

Zhang, X., Zhou, L., and Cheng, X. (2000). Crystal structure of the conserved core of protein arginine methyltransferase PRMT3. Embo J *19*, 3509-3519.

Zhang, Y., and Reinberg, D. (2001). Transcription regulation by histone methylation: interplay between different covalent modifications of the core histone tails. Genes Dev *15*, 2343-2360.

Zika, E., Fauquier, L., Vandel, L., and Ting, J. P. (2005). Interplay among coactivator-associated arginine methyltransferase 1, CBP, and CIITA in IFN-gamma-inducible MHC-II gene expression. Proc Natl Acad Sci U S A *102*, 16321-16326.

8 Abkürzungsverzeichnis

Englische Begriffe sind kursiv gedruckt.

Abb.	Abbildung
AKT	*v-akt murine thymoma viral oncogene homolog 1*
AP2α	*Activating enhancer binding protein 2α*
AR	*androgen receptor*
AS	Aminosäure
ATF	*activating transcription factor*
CIITA	*major histocompatibility complex, class II, transactivator*
CARM1	Coactivator-assozierte Methyltransferase 1
CBP	CREB-Bindeprotein
CDXA	*caudal-type homeodomain protein*
CITED2	*Cbp/p300-interacting transactivator, with Glu/Asp-rich carboxy-terminal domain, 2*
CREB	*cAMP response element binding protein*
CTGF	*connective tissue growth factor*
DAG	Diacylglycerol
dkd	*double knockdown*
E2F	*E2 promoter binding factor*
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
Egr1	*early growth response 1*
EIF2C2	*eukaryotic translation initiation factor 2C, subunit 2*
ER	*estrogen receptor*
ERK	extrazelllulär regulierte Kinase
FCS	*fetal calf serum*
c-Fos	*v-fos FBJ murine osteosarcoma viral oncogene homolog*
FXR	*farnesoid X-activated receptor*
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GR	*glucocorticoid receptor*
h	Stunde (*hour*)

HeLa	Henrietta Lacks
HMGA1	*high mobility group AT-hoook 1*
IFN	Interferon
IL	Interleukin
IER3	*immediate early response 3*
IP_3	Inositol-1, -4, -5-triphosphat
JAK	Janus Kinase
K	Lysin
kd	*knockdown*
LEF1	*lymphoid enhancer binding factor 1*
MAPK	Mitogen aktivierte Proteinkinase
MEF2	*MADS box transcription enhancer factor 2*
MEK	Mitogen aktivierte Proteinkinase Kinase 1
NF-κB	*nuklear factor κB*
NFAT	*nuclear factor of activated T cells*
Nrf2	*NF-E2-related factor 2*
p53	*tumor protein p53*
p300	*E1A binding protein p300*
PAX2	*paired box homeotic gene 2*
PKB	Protein Kinase B
PKC	Protein Kinase C
PML	*promyelocytic leukemia*
PRMT	Protein-Argininmethyltransferase
R	Arginin
Raf	*v-raf-1 murine leukemia viral oncogene homolog 1*
RAR	*retinoic acid receptor*
Ras	*v-Ha-ras Harvey rat sarcoma viral oncogene homolog*
RRAD	*Ras related associated with diabetes*
RT-PCR	reverse Transkription und anschließende Polymerasekettenreaktion
RTqPCR	reverse Transkription und anschließende quantifizierte Polymerasekettenreaktion
S	Serin
SAM	S-Adenosylmethionin

siRNA	*small interfering ribonucleic acid*
SLC2A14	*solute carrier family 2 (facilitated glucose transporter), member 14*
SRC-1	*steroid receptor coactivator 1*
STAT	*signal transducer and activator of transcription*
Tax	Genprodukt des tat-Gens, humanes T-Zell-Leukämievirus
TMCO1	*transmembrane and coiled-coil domains 1*
TPA	12-O-Tetradecanoyl-Phorbol-13-Acetat
TR	*thyroid hormone receptor*
USF	*upstream stimulatory factor*
YRDC	*YrdC domain containing (E. coli)*
YY1	*ying yang 1*

Lebenslauf

Markus Kleinschmidt
Zwischenhausen 23
35037 Marburg

Persönliche Daten

Geburtsdatum:	22.05.1977
Geburtsort:	Wuppertal
Familienstand:	ledig
Staatsangehörigkeit:	deutsch

Promotion

11/2002 - 12/2006	Promotion in der Arbeitsgruppe von Frau Prof. Dr. Uta-Maria Bauer am Institut für Molekularbiologie und Tumorforschung (IMT), Marburg

Studium

19.09.2002	Erlangung des Akademischen Grades eines Diplom-Biologen
04/98 - 09/02	2. – 9. Fachsemester im Diplomstudiengang der Biologie an der Philipps-Universität Marburg; Diplomarbeit im Fachgebiet Genetik bei Herrn Professor Dr. Albrecht Klein
10/97 - 03/98	1. Fachsemester der Biologie an der Ernst-Moritz-Arndt-Universität, Greifswald

Zivildienst

09/96 - 09/97	Zivildienst bei der Naturschutzgesellschaft „Schutzstation Wattenmeer“, Wattenmeerhaus Hallig Hooge.

Schulbildung

1987 - 96	Theodor-Heuss-Gymnasium, Radevormwald; Abitur
1983 - 87	Gemeinschaftsgrundschule Bergerhof, Radevormwald

Marburg, den 3.11.2006 _____

Publikationen

Kleinschmidt, M. A., Streubel, G., Samans, B., Krause, M., Bauer, U.M. Analysis of cooperation among the protein arginine methyltransferases CARM1 and PRMT1 in gene regulation. *in preparation*

Wagner, S., Weber, S., Kleinschmidt, M. A., Nagata, K., and Bauer, U. M. (2006). SET-mediated promoter hypoacetylation is a prerequisite for coactivation of the estrogen-responsive pS2 gene by PRMT1. J Biol Chem.

Danksagung

Ich danke Frau Prof. Dr. Uta-Maria Bauer für die wissenschaftliche Betreuung meiner Doktorarbeit. Ihre stete Diskussionsbereitschaft, Anregungen und Hilfestellungen haben wesentlich zum Erfolg dieser Arbeit beigetragen.

Frau Prof. Dr. Renate Renkawitz-Pohl gilt mein Dank für die Betreuung seitens des Fachbereichs Biologie und die Begutachtung meiner Dissertation.

Susanne Weber, Sabine Wagner, Karin Theis, Gundula Streubel, Dawin Hyllus, Inge Pelz, Claudia Stein, Kristin Schnabel, Franziska Seifert und Melanie Wittmann danke ich für eine angenehme und kollegiale Zeit im Labor. Gleiches gilt für die Mitarbeiter der Arbeitsgruppen Eilers, Gaubatz, Suske, Lutz und Müller. Michael Krause und allen Mitarbeitern der Microarray-Einheit danke ich für experimentelle Anleitung. Birgit Samans danke ich für die Auswertung der Chips.

Michael Schümann und Björn von Eyss danke ich für fruchtbare Diskussionen und beispiellosen wissenschaftlichen Ideenreichtum.

Imme Krüger danke ich für ihre Hilfsbereitschaft, viele interessante Gespräche und regelmäßige Tagesauswertungen.

Jörg Storre danke ich für die gemeinsamen Kilometer auf dem Rad und für die einmalige Zusammenführung von Molekularbiologie und Fernfahrertum bei seinem Umzug nach Lausanne.

Ich danke meiner Familie für ihre Aufmerksamkeit und Unterstützung zu jedweder Zeit.

Mein besonderer Dank gilt Sonja Cordts, für Zuspruch, Ablenkung, Geduld, Verständnis und Dinge, die ich lieber woanders niederschreibe.

Erklärung

Hiermit versichere ich, dass ich meine Dissertation

Die kooperative Rolle der Methyltransferasen CARM1 und PRMT1 in der Genregulation

selbst verfasst und mich dabei nur der ausdrücklich bezeichneten Quellen und Hilsmittel bedient habe. Die vorliegende Dissertation wurde in der jetzigen oder einer ähnlichen Form noch nicht zu Prüfungszwecken eingereicht.

Marburg, den 3.11.2006 _____