

Untersuchungen zur funktionellen Bedeutung der Protein-Arginin-Methylierung in humanen Zellen

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)
am Department Biologie
der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften
an der Universität Hamburg



vorgelegt von
Frank Herrmann

Hamburg, im April 2006

Genehmigt vom Department Biologie
der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften
an der Universität Hamburg
auf Antrag von Herrn Professor Dr. W. DEPPERT
Weiterer Gutachter der Dissertation:
Herr Professor Dr. H.-P. MÜHLBACH
Tag der Disputation: 16. Juni 2006

Hamburg, den 30. Mai 2006



Professor Dr. Reinhard Lieberei
Leiter des Departments Biologie

Für
meine Eltern

HAMBURGER
**MOR
GEN
POST**

■ WEISHEIT DES TAGES

»Forschung läuft fast immer darauf hinaus, dass es plötzlich mehrere Probleme gibt, wo es früher nur ein einziges gegeben hat«

Norman Mailer

Danksagungen

Die vorliegende Dissertation wurde in der Zeit von Januar 2003 bis April 2006 in der Abteilung Molekulare Zellbiologie am Heinrich-Pette-Institut in Hamburg angefertigt.

Mein Dank gilt zuerst Herrn *Prof. Dr. Wolfgang Deppert* für die Ermöglichung und Betreuung dieser Dissertation.

Ganz besonders bedanken möchte ich mich bei meinem „Cheffe“ *Dr. Frank O. Fackelmayer* (FOF) für seine Förderung und wissenschaftliche Unterstützung, seine stete Diskussionsbereitschaft, sein unermüdliches Interesse am Fortgang der Arbeit und das freundschaftliche Arbeitsklima.

Für die gute Zusammenarbeit im Labor, für viele spaßige, interessante und (zum Glück nicht immer) fachliche Diskussionen bedanke ich mich herzlich bei meinen ehemaligen Kolleginnen und Kollegen *Giulia Mearini*, *Andrea Schwander* und *Ercan Akgün*. Ein besonderer Dank geht an *Maike Bossert* für Ihre enorme Unterstützung im Labor und *Roger Helbig* für hilfreiche Tipps und Tricks bei der konfokalen Mikroskopie.

Arne Düsedau sowie *Dr. J. Heukeshoven* danke ich für die Durchführung der Zellsortierung bzw. der massenspektrometrischen Analysen und *Daniel Speidel* für die Unterstützung bei der Durchflusscytometrie.

Danken möchte ich besonders meinem Freund und Kollegen *Peter Pably* für seine grenzenlose Hilfsbereitschaft und seine große Geduld in den letzten Monaten. Zudem danke ich *Felix Bohne* und all meinen anderen Freunden für die schönen Dinge, die das Leben außerhalb der Wissenschaft so lebenswert machen.

Und schließlich bedanke ich mich bei *meinen Eltern*, *meiner Schwester Anja* und *meiner ganzen Familie*, die mich immer unterstützt haben und ohne deren Hilfe diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

Teile dieser Dissertation sind veröffentlicht in:

Herrmann, F., Bossert, M., Schwander, A., Akgun, E., and Fackelmayer, F.O. (2004). Arginine methylation of scaffold attachment factor A by heterogeneous nuclear ribonucleoprotein particle-associated PRMT1. J Biol Chem 279, 48774-48779.

Herrmann, F., Lee, J., Bedford, M.T., and Fackelmayer, F.O. (2005). Dynamics of human protein arginine methyltransferase 1 (PRMT1) in vivo. J Biol Chem 280, 38005-38010.

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abbildungs- und Tabellenverzeichnis	V
Abkürzungen	VIII

1. <u>Einleitung</u>	01
1.1 Posttranslationale Modifikationen	02
1.2 Methylierung von Argininen	04
1.2.1 Die Familie der Protein-Arginin-Methyltransferasen	04
1.2.2 Struktur der Protein-Arginin-Methyltransferasen	05
1.2.3 Regulation zellulärer Prozesse durch Arginin-Methylierung	09
1.2.3.1 Regulation von RNA-Prozessierung und Transport	10
1.2.3.2 Regulation der Transkription	11
1.2.3.3 DNA-Reparatur	13
1.2.4 Regulierung der Arginin-Methylierung	14
1.3 Das Kernprotein „Scaffold Attachment Factor A“, ein Substrat der Arginin-Methylierung	16
1.3.1 SAF-A als Bestandteil der Kernmatrix	16
1.3.2 Domänenstruktur und Bindungseigenschaften von SAF-A	17
1.3.3 Funktionelle Wechselwirkungen von SAF-A	19
2. <u>Zielsetzung</u>	23
3. <u>Material und Methoden</u>	24
3.1 Material	24
3.1.1 Geräte, Chemikalien und Verbrauchswaren	24
3.1.2 Allgemeine Puffer und Lösungen	26
3.1.3 Antikörper, Vektoren und Oligonukleotide	30
3.2 Methoden	33
3.2.1 Allgemeine Methoden	33
3.2.2 Arbeiten mit Zellen	33
3.2.2.1 Zelltypen und Kulturbedingungen	33
3.2.2.2 Inhibierung der Methylierung in Zellen	33
3.2.2.3 Chemische Transfektion eukaryotischer Zellen mit Polyethylenimin	34

3.2.2.4	Herstellung stabiler Zelllinien	34
3.2.2.5	Langzeitlagerung eukaryotischer Zellen	34
3.2.2.6	Vorbereitung von Zellen für die Durchflusscytometrie	35
3.2.2.7	Analyse mittels FACS („Fluorescence Associated Cell Sorting“)	36
3.2.2.8	Immunfluoreszenzfärbung eukaryotischer Zellen	36
3.2.3	Mikroskopische Methoden	37
3.2.3.1	Konfokale Fluoreszenzmikroskopie	37
3.2.3.2	„Fluorescence Recovery After Photobleaching“ (FRAP)	37
3.2.3.3	Auswertung von FRAP-Daten	38
3.2.3.4	Normalisierung und Darstellung der FRAP-Kurven	39
3.2.3.5	Regressionsanalyse der FRAP Daten	40
3.2.3.6	Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie	41
3.2.4	Molekularbiologische Methoden	44
3.2.4.1	Mutagenese-PCR	44
3.2.4.2	Klonierung von SAF-A2:GFP	45
3.2.4.3	Elektrotransformation von <i>E. coli</i>	45
3.2.4.4	Plasmidisolierung aus <i>E. coli</i> (Minipräparation)	46
3.2.4.5	Plasmidisolierung aus <i>E. coli</i> (Maxipräparation)	46
3.2.4.6	DNA-Sequenzierung	46
3.2.5	Biochemische Methoden	47
3.2.5.1	Denaturierende SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	47
3.2.5.2	Westernblot Analyse	47
3.2.5.3	Far Western Analyse	47
3.2.5.4	Immunpräzipitation (IP) von Proteinen	48
3.2.5.5	Mechanische Zellfraktionierung	48
3.2.5.6	Kernfraktionierung „ <i>in situ</i> “	48
3.2.5.7	Glyceringradientenzentrifugation	49
3.2.5.8	<i>In vitro</i> Methylierungsassay	50
3.2.5.9	<i>In vitro</i> Citrullinierungsassay	50
3.2.5.10	Massenspektrometrie	51

4. Ergebnisse	52
4.1 Lokalisation, Komplexbildung und Mobilität von Protein-Arginin-Methyltransferasen in humanen Zellen	52
4.1.1 Lokalisation endogener Protein-Arginin-Methyltransferasen	52
4.1.2 Expression und enzymatische Aktivität der PRMT:GFP-Konstrukte	55
4.1.3 Lokalisation der PRMT:GFP-Konstrukte	57
4.1.4 Bestimmung der Komplexgrößen von PRMT1-7 durch Zentrifugation über Glyceringradienten	58
4.1.5 Bestimmung der Komplexgrößen von PRMTs durch Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie	59
4.1.6 Die Mobilität von PRMTs <i>in vivo</i>	64
4.2 Untersuchungen zur Mobilität von PRMT1 <i>in vivo</i>	69
4.2.1 Lokalisation, Aktivität und Oligomerisierung von PRMT1- und PRMT6:GFP	69
4.2.2 Mobilität von PRMT1:GFP in hypomethylierten Zellen	71
4.2.3 Expression, Lokalisation und Mobilität von PRMT1mut:GFP	75
4.3 Methylierung von Scaffold Attachment Factor A	79
4.3.1 PRMT1 co-sedimentiert mit hnRNP-Komplexen	79
4.3.2 Direkte Bindung von PRMT1 an hnRNP-Partikel	81
4.3.3 PRMT1 vermittelte Arginin-Methylierung von SAF-A	83
4.3.4 <i>In situ</i> Zellfraktionierung von SAF-A:GFP transfizierten Zellen	85
4.3.5 Herstellung eines Methyl-sensitiven anti-SAF-A Antikörpers	86
4.3.6 Die Methylierung von SAF-A in verschiedenen Zelltypen	88
4.3.7 Lokalisation und Mobilität von hypomethyliertem SAF-A	89
4.3.8 Kartierung der Methylierungsstellen durch MALDI-TOF	92
4.3.9 Klonierung von SAF-A Punktmutanten	93
4.3.10 Untersuchungen zur Reversibilität der Arginin-Methylierung	95
4.3.11 Klonierung und Analyse von SAF-A2	98
5. Diskussion	103
5.1 Mobilität und Komplexbildung von Protein-Arginin-Methyltransferasen in humanen Zellen	103
5.1.1 Lokalisation und Aktivität der PRMTs	103
5.1.2 Bestimmung der Komplexgrößen von PRMTs	105
5.1.3 Mobilität der PRMTs <i>in vivo</i>	107
5.2 Lokalisation und Mobilität von PRMT1 <i>in vivo</i>	109

5.3 Arginin-Methylierung von SAF-A	112
5.3.1 Direkte Interaktion von PRMT1 und SAF-A in hnRNP-Partikeln	112
5.3.2 PRMT1-vermittelte Arginin-Methylierung von SAF-A	114
5.3.3 Kartierung der Methylierungsstellen <i>in vitro</i> und <i>in vivo</i>	115
5.3.4 Biochemische Charakterisierung der Arginin-Methylierung von SAF-A	116
5.3.5 Regulation der Arginin-Methylierung	118
5.3.6 Funktion der Arginin-Methylierung <i>in vivo</i>	121
6. <u>Zusammenfassung</u>	<u>124</u>
7. <u>Anhang</u>	<u>125</u>
8. <u>Literaturverzeichnis</u>	<u>126</u>

Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

1. Abbildungen		Seite
Abb. 1.1	Schematische Darstellung der Arginin-Methylierung.	04
Abb. 1.2	Familie der Protein-Arginin-Methyltransferasen.	06
Abb. 1.3	Struktur und Dimerisierung von PRMT1.	07
Abb. 1.4	Schematische Darstellung PRMT-regulierter Prozesse.	09
Abb. 1.5	Mögliche Regulation der Arginin-Methylierung durch Enzyme.	15
Abb. 1.6	Modellvorstellung für die Organisation des Chromatins.	17
Abb. 1.7	Schematische Darstellung von SAF-A.	18
Abb. 3.1	Beispiel für die Auswertung von Zellen mit dem Programm „ImageJ“.	39
Abb. 3.2	Diagramm ausgewerteter FRAP-Daten.	40
Abb. 3.3	Regressionsanalyse der Rückstromkurve von PRMT1:GFP.	41
Abb. 3.4	Schematische Darstellung der Orientierung der Mutageneseprimer.	44
Abb. 3.5	Schema der Kernfraktionierung „ <i>in situ</i> “.	49
Abb. 4.1	Lokalisation endogener Protein-Arginin-Methyltransferasen.	53
Abb. 4.2	Fixierungsabhängige Lokalisation endogener PRMT1.	54
Abb. 4.3	Expression und Aktivität der PRMT:GFP-Fusionsproteine.	56
Abb. 4.4	Typische Lokalisation der PRMT:GFP-Fusionsproteine.	57
Abb. 4.5	Bestimmung der Komplexgrößen von PRMTs durch Glyceringradientenzentrifugation.	58
Abb. 4.6	Aggregation von PRMT5:GFP in unlöslichen Proteinkomplexen.	59
Abb. 4.7a	Diffusionseigenschaften der PRMT:GFP-Fusionsproteine in Lösung.	60
Abb. 4.7b	Diffusionseigenschaften der PRMT:GFP-Fusionsproteine in Lösung.	61
Abb. 4.8	Inhibierung der Methylierung von PRMT Substraten durch Adenosin Dialdehyd	63
Abb. 4.9	Qualitative FRAP-Daten von PRMT-Fusionsproteinen.	65
Abb. 4.10	Rückstromkurven der verschiedenen PRMTs <i>in vivo</i> .	66
Abb. 4.11	Expression, Aktivität, Oligomerisierung und Lokalisation von PRMT1:GFP und PRMT6:GFP	70
Abb. 4.12	Nukleäre Anreicherung von PRMT1 in hypomethylierten Zellen.	71
Abb. 4.13	Hypomethylierung beeinflusst die Mobilität von PRMT1 in lebenden Zellen.	71

Abb. 4.14	Quantitative Mobilitätsmessungen von PRMT1, PRMT6, hnRNP-C und β gal-NLS.	72
Abb. 4.15	Immobilisierung von nukleärer PRMT1 ist vollständig reversibel.	73
Abb. 4.16	Identifizierung PRMT1-assoziiierter Proteine.	75
Abb. 4.17	Oligomerisierung und Aktivität von PRMT1mut:GFP.	76
Abb. 4.18	Nukleäre Anreicherung von PRMT1mut:GFP.	77
Abb. 4.19	Mobilität von PRMT1mut:GFP im Nukleus.	78
Abb. 4.20	PRMT1 co-sedimentiert mit 40S hnRNP-Partikeln.	80
Abb. 4.21	PRMT1 ist mit SAF-A in hnRNP Komplexen assoziiert.	81
Abb. 4.22	Direkte Interaktion von PRMT1 und SAF-A <i>in vitro</i> .	82
Abb. 4.23	Hypomethyliertes SAF-A bindet verstärkt an PRMT1.	83
Abb. 4.24	SAF-A wird durch rekombinante und endogene PRMT1 methyliert.	84
Abb. 4.25	SAF-A ist ein typisches Substrat für Typ-I-Methyltransferasen.	84
Abb. 4.26	Kernfraktionierung von SAF-A:EGFP transfizierten Zellen.	85
Abb. 4.27	Der neue Antikörper A232 erkennt ausschließlich unmethyliertes SAF-A.	87
Abb. 4.28	Methylierungsstatus von SAF-A in verschiedenen Zelllinien.	89
Abb. 4.29	Lokalisation von hypomethyliertem SAF-A.	90
Abb. 4.30	Mobilität von SAF-A:GFP im Nukleus.	91
Abb. 4.31	Schematische Darstellung potenzieller Methylierungsstellen.	93
Abb. 4.32	Posttranslationale Methylierung von SAF-A:GFP.	94
Abb. 4.33	Arginin 793 ist eine bevorzugte Methylierungsstelle in SAF-A.	95
Abb. 4.34	Citrullinierung von Argininen.	97
Abb. 4.35	Sequenzhomologie-Vergleich der zwei SAF-A Isoformen.	99
Abb. 4.36	Expressionsvergleich der zwei SAF-A Isoformen.	100
Abb. 4.37	Methylierungs-unabhängige Interaktion von SAF-A2 und PRMT1.	101
Abb. 4.38	Vergleich der <i>in vivo</i> Mobilität der SAF-A Isoformen.	102
Abb. 6.1	Vergleich der Diffusionseigenschaften von PRMT-Komplexen.	106
Abb. 6.2	Veränderung der Diffusionseigenschaften von PRMTs in hypomethylierten Zellen.	108

2. Tabellen	Seite
Tabelle 3.1 Verwendete primäre Antikörper.	30
Tabelle 3.2 Verwendete Vektoren.	31
Tabelle 3.3 Parameter für konfokale Fluoreszenzmikroskopie.	37
Tabelle 3.4 Parameter für Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie.	42
Tabelle 3.5 Typisches Programm für Mutagenese-PCR.	45
Tabelle 4.1 Quantitative Auswertung der Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie.	62
Tabelle 4.2 Vergleich der Diffusionszeiten +/- Adox-Behandlung.	63
Tabelle 4.3 Diffusionseigenschaften von GFP-Fusionsproteinen <i>in vivo</i> .	67
Tabelle 4.4 Mobile Fraktionen der GFP-Fusionsproteine.	68
Tabelle 4.5 Methylierte Argininreste in SAF-A.	92

Abkürzungen

Abb.	Abbildung
Adox	Adenosin-2'-3'-dialdehyd
AK	Antikörper
AS	Aminosäure
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
D	Diffusionskoeffizient
DIC	Differenzieller Interferenz Kontrast
DMEM	„Dulbecco's modified Eagle medium“
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxy Nukleotid-Triphosphat
(E)GFP	„(Enhanced) Green Fluorescent Protein“
FACS	„Fluorescence Associated Cell Sorting“
FCS	„Fluorescence Correlation Spectroscopy“
FRAP ,	„Fluorescence Recovery after Photobleaching“
g	Erdbeschleunigung
hnRNA	heterogene nukleäre Ribonukleinsäure
hnRNP	heterogenes nukleäres Ribonukleoprotein
³ H-SAM	S-Adenosyl-L-[methyl- ³ H]Methionin
IF	Immunfluoreszenz
IP	Immunpräzipitation
kDa	Kilodalton
M	molar
MALDI-TOF	„Matrix-assisted Laser Desorption Ionization/Time of Flight“
NLS	Kernlokalisationssequenz
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PCR	„Polymerase Chain Reaction“
PFA	Paraformaldehyd
PEI	Polyethylenimin
PRMT	Protein-Arginin-Methyltransferase
rpm	Umdrehungen pro Minute
ROI	„Region of Interest“
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
S	Svedberg
SAF-A	„Scaffold Attachment Factor A“
SAR/MAR	„Scaffold/Matrix Attachment Region“
SDS	Natriumdodecylsulfat
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
U	„Units“
ÜN	Über Nacht
WT	Wildtyp
α	anti
% (v/v)	Volumenprozent
% (w/v)	Gewichtsvolumenprozent
% (w/w)	Gewichtsprozent

Abkürzungen für Aminosäuren und Nukleotide sind nach IUPAC-Standard angegeben.

1. Einleitung

Mit großem Aufwand wurde bis 2001 das Erbmateriale des Menschen im „Humanen Genom Projekt“ analysiert und seine Sequenz ermittelt. Die Reihenfolge der über drei Milliarden Einzelbausteine des menschlichen Genoms auf den Chromosomen ist nun bis auf kleine Unsicherheiten bekannt. Weitgehend ungeklärt bleibt aber, welche Funktionen die geschätzten 30 000 bis 50 000 Gene des Menschen haben und welche Bedeutung ihnen im gesunden Organismus beziehungsweise bei der Ausbildung von Krankheiten zukommt. Für das Verständnis der zellulären Vorgänge ist es im nächsten Schritt nun notwendig, die Funktionen der Gen-Produkte, also der Proteine, zu untersuchen. Proteine sorgen als „Arbeitsmoleküle“ der Zellen durch ein hochkomplexes Zusammenwirken für die Ausführung des in den Genen festgelegten Programms und sind an nahezu allen Zellaktivitäten beteiligt.

Die Gesamtheit aller Proteine, die von einem Genom, einer Zelle oder einem Organismus zu einem bestimmten Zeitpunkt exprimiert wird, bezeichnet man als Proteom. Im Gegensatz zum statischen Genom ist das Proteom kontinuierlicher Veränderung unterworfen. Zum einen wird die Synthese zahlreicher Proteine zell- und gewebespezifisch reguliert, zum anderen nehmen äußere Bedingungen Einfluss auf die Quantität und Qualität der exprimierten Proteine. Als „Genexpression“ wird der gesamte Prozess des Umsetzens der im Gen enthaltenen Information in ein Protein bezeichnet, der in mehreren Schritten erfolgt. Dabei gibt es verschiedene Ebenen, auf denen eine Regulation stattfinden kann.

So hat bereits die Gen-Organisation auf dem DNA-Strang einen Einfluss auf die Aktivität verschiedener Gene. Die Transkription von Genen in mRNA wird durch zahlreiche Faktoren zelltypspezifisch gesteuert. Zudem können bei Eukaryoten aus derselben DNA-Sequenz durch alternatives Spleißen der bei der Transkription hergestellten prä-mRNA mehrere unterschiedliche reife RNA-Versionen entstehen, die zu unterschiedlichen Proteinen führen. Schließlich kann die Stabilität oder Funktion von synthetisierten Proteinen und Peptiden durch chemische Modifikationen nachträglich beeinflusst werden. Aus der Sequenz des Genoms kann man also keine einfachen Rückschlüsse auf die erzeugten Proteine ziehen, da durch die hohe kombinatorische Vielfalt verschiedener Regulationsprozesse eine Vielzahl von Proteinen mit unterschiedlicher Funktion resultiert.

1.1 Posttranslationale Modifikationen

Zahlreiche zelluläre Proteine werden nach ihrer Synthese an den Ribosomen noch chemisch verändert. Bislang sind in der Literatur mehr als 200 unterschiedliche chemische Gruppen bekannt, die an Proteine angefügt werden können. Diese posttranslationalen Modifikationen können die biologische Aktivität, Stabilität, Wechselwirkungen oder die Lokalisation der betroffenen Proteine erheblich beeinflussen. Sie können unterschiedlicher Natur sein, und umfassen u.a. das Anhängen von Zucker-, Phosphat-, Acetyl- oder Methylgruppen an einzelne Aminosäurereste.

So bieten die bei der Glykosylierung im Lumen des Endoplasmatischen Retikulums angehefteten Zuckerketten z.B. Schutz vor Verdau durch Proteasen oder dienen als Transportsignal für die Verpackung in Transportvesikel. Außerdem sind Glykoproteine als Teil der Glykokalyx unentbehrlich für die spezifische Erkennung von Zelloberflächen. Die Aktivität vieler regulatorischer Proteine wird über die Phosphorylierung bzw. Dephosphorylierung von bestimmten Aminosäurenresten gesteuert. Die Phosphorylierung von Proteinen spielt in zahlreichen Geweben eine wesentliche Rolle bei der Vermittlung von Reizen (Signaltransduktion). Zudem wird die Aktivität zahlreicher Enzyme (z.B. MAP-Kinasen) und Transkriptionsfaktoren (z.B. p53, RB-Protein, NF κ B) durch ihren Phosphorylierungsstatus gesteuert (Bode & Dong, 2004; Tamrakar *et al.*, 2000; Jans & Hubner, 1996). Die Acetylierung, also die Anknüpfung einer Essigsäure an freie Aminogruppen von Aminosäuren, ist eine der häufigsten Modifikationen in eukaryotischen Zellen. Sie kann entweder an der freien Aminogruppe der ersten Aminosäure eines Proteins stattfinden, oder an freien ϵ -Aminogruppen interner Lysine. So tragen mehr als die Hälfte der löslichen Proteine eine Acetylgruppe an ihrer aminoterminalen Aminosäure, was die Stabilität der betroffenen Proteine beeinflusst. Im Gegensatz zur aminoterminalen Acetylierung spielt die Acetylierung interner Lysinreste eine wichtige Rolle bei der Modulation der Funktion des betroffenen Proteins. Das bekannteste Beispiel für Proteine, deren Funktion durch Acetylierung beeinflusst wird, sind die Histone, die am Aufbau und der Organisation des Chromatins beteiligt sind. Die Acetylierung von Histonen wurde vor mehr als 30 Jahren erstmals beschrieben und zählt zu den am besten verstandenen Histonmodifikationen (Übersicht in Kouzarides, 2000). Durch die aufeinander abgestimmte Aktivität von Histon-Acetyltransferasen (HATs) und Histon-Deacetylasen (HDACs) stellt sich ein spezifischer Acetylierungsgrad ein, der im Zusammenspiel mit anderen posttranslationalen Modifikationen eine Modulation der Genexpression ermöglicht (Turner, 2002; Kurdistani & Grunstein, 2003).

Im Gegensatz zu posttranslationalen Modifikationen wie Phosphorylierung oder Acetylierung stellt die Methylierung von Aminosäureresten eine deutlich stabilere Modifikation dar. Neuere Untersuchungen zeigen, dass die Protein-Methylierung an der Regulation zahlreicher biologischer Prozesse wie RNA-Prozessierung, Transkription, Reparatur von DNA-Schäden sowie bei der Signaltransduktion und bei Differenzierungsvorgängen beteiligt ist (Übersicht in Lee *et al.*, 2005).

Die Methylierung von Proteinen rückte erst in den letzten Jahren mit der Identifizierung verschiedener Protein-Methyltransferasen in den Mittelpunkt des wissenschaftlichen Interesses. Protein-Methylierung kann an Arginin-, Lysin-, Histidin-, Prolin- und Carboxylresten von Aminosäuren auftreten und galt bis vor kurzem als eine irreversible Modifikation. Die Identifizierung einer Lysin-spezifischen Demethylase (LSD1) durchbrach dieses Dogma und eröffnete neue Perspektiven für die Funktion der Protein-Methylierung (Shi *et al.*, 2004). Während die Methylierung von Argininresten an zahlreichen RNA-Bindeproteinen und Histonen nachgewiesen wurde, findet die Modifikation von Lysinen bevorzugt an den amino- und carboxyterminalen Armen von Histonen statt. Ebenso wie die Acetylierung kann die Histon-Methylierung die Wechselwirkung mit DNA und Chromatin-assoziierten Proteinen modulieren, was zu veränderten nukleosomalen Strukturen und Funktionen führt und in den verschiedensten biologischen Wirkungen resultiert (Rice & Allis, 2001).

1.2 Methylierung von Argininen

1.2.1 Die Familie der Protein-Arginin-Methyltransferasen

Die Methylierung von Argininresten in Proteinen wurde vor beinahe 40 Jahren zum ersten Mal an Proteinfractionen aus Kalbsthymus beschrieben (Paik & Kim, 1967). Bis heute konnten zahlreiche Protein-Arginin-Methyltransferasen (PRMTs) in verschiedenen eukaryotischen Organismen wie Hefe, *Drosophila melanogaster* und in Säugetieren identifiziert werden (Miranda *et al.*, 2006; Gary & Clarke, 1998; McBride & Silver, 2001; Boulanger *et al.*, 2004). Zudem wurden durch Genom-Sequenzierungsprojekte weitere PRMT-Gene in *Danio rerio* (Hung & Li, 2004), *Xenopus*, *C. elegans* und *Arabidopsis* gefunden. In Säugetierzellen wurden bislang acht PRMT-Gene identifiziert (Abb. 1.2), die starke Homologien untereinander aufweisen und für PRMT1, PRMT2, PRMT3, CARM1/PRMT4, PRMT5/JBP1, PRMT6, PRMT7 und PRMT8 kodieren (Abramovich *et al.*, 1997; Chen *et al.*, 1999; Frankel *et al.*, 2002; Katsanis *et al.*, 1997; Pollack *et al.*, 1999; Tang *et al.*, 1998; Miranda *et al.*, 2004; Lee *et al.*, 2005a, 2005b).

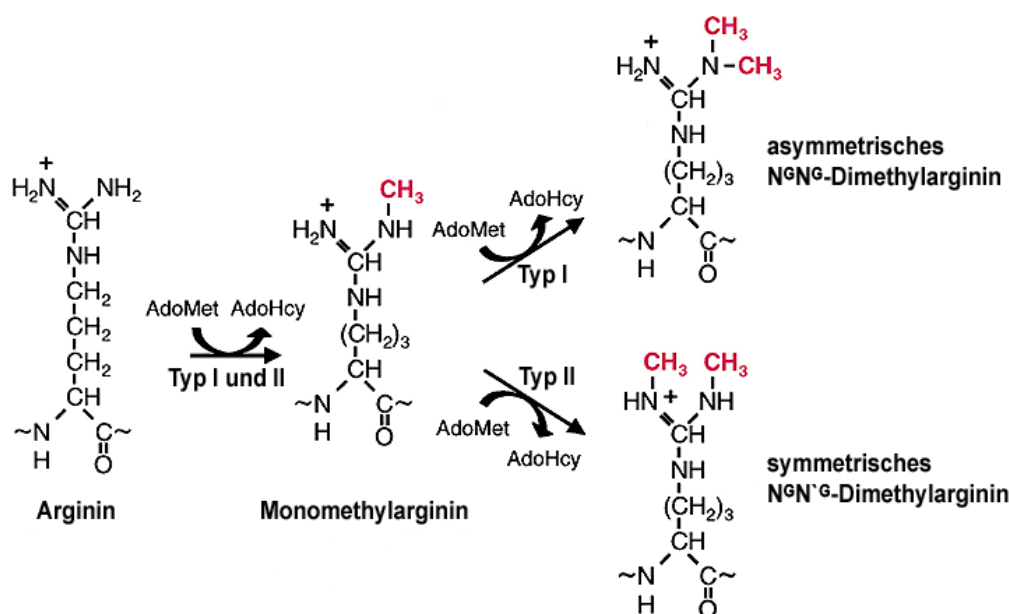


Abb. 1.1 Schematische Darstellung der Arginin-Methylierung.

Im ersten Schritt wird von beiden bekannten Typen von Protein-Arginin-Methyltransferasen (Typ I und II) Monomethylarginin gebildet. Typ-I-Methyltransferasen (PRMT1, 3, 4, 6) erzeugen in einem zweiten Reaktionsschritt asymmetrisches Dimethylarginin. Symmetrisches Dimethylarginin wird von den Typ-II-Methyltransferasen PRMT5 und PRMT7 gebildet. Man beachte, dass die Methylierung den basischen Charakter des modifizierten Argininrestes nicht verändert, aber zu dessen Vergrößerung und somit möglicherweise zu sterischen Effekten führt; gleichzeitig werden durch die Anheftung des Methylrestes Wasserstoffatome von der Guanidinogruppe entfernt, die an Wasserstoff-Brückenbindungen beteiligt sein können (Abb. modifiziert aus McBride & Silver, 2001).

Es werden zwei Typen von PRMTs unterschieden. Beide Typen katalysieren die Übertragung der Methylgruppe von S-Adenosyl-L-Methionin (AdoMet) auf die Guanidinogruppe von Arginin in bestimmten Proteinsubstraten, wodurch in einem ersten Schritt monomethyliertes Arginin (MMA) und freies S-Adenosyl-Homocystein (AdoHcy) entstehen (*Abb. 1.1*). Die beiden Typen unterscheiden sich in der nachfolgenden Reaktion, die zur Bildung von zweifach methyliertem Arginin führt. Typ-I-PRMTs übertragen zwei Methylreste auf den gleichen Stickstoff der Guanidinogruppe, wobei ein „asymmetrisches“ Dimethylarginin (aDMA) entsteht; Methyltransferasen von Typ II übertragen je eine Methylgruppe auf jeden Stickstoff, so dass ein „symmetrisches“ Dimethylarginin (sDMA) entsteht. Dabei sind PRMT5 und PRMT7 die einzigen bekannten Typ-II-Methyltransferasen. Alle anderen PRMT-Familienmitglieder gehören zum Typ I. In den letzten Jahren wurden zahlreiche verschiedene Substrate von PRMTs identifiziert (Übersicht in Bedford & Richard, 2005). Der größte Teil wurde dabei von PRMT1 methyliert, die mit über 90 % den größten Teil zu der Typ-I-Aktivität in Säugetierzellen beiträgt (Tang *et al.*, 2000). PRMT1 stellt somit die vorherrschende Arginin-Methyltransferase in humanen Zellen und Geweben dar.

1.2.2 Struktur der Protein-Arginin-Methyltransferasen

Die acht humanen PRMTs variieren in ihrer Länge zwischen 361 (PRMT1) und 692 Aminosäuren (PRMT7) (*Abb. 1.2*). Allen gemeinsam ist eine hochkonservierte Kernregion, in der die Methyltransferaseaktivität lokalisiert ist. Dort befinden sich auch die Signaturmotive I, post I, II, und III von S-Adenosylmethionin-(AdoMet)-abhängigen Methyltransferasen. Die PRMT-typische THW-Schleife liegt am C-terminalen Ende der Kernregion. Die größten Sequenzunterschiede zwischen den einzelnen PRMT-Familienmitgliedern liegen im N-terminalen Abschnitt der Proteine. Hier findet sich bei PRMT6 eine Kernlokalisationssequenz (NLS), bei PRMT3 eine Zinkfingerstruktur und bei PRMT2 eine SH3-Domäne, die möglicherweise die Substratspezifität steuert (Kouzarides, 2002). Von menschlicher PRMT1 sind außerdem vier alternative Spleißformen bekannt, die in der Länge des N-Terminus variieren (Scott *et al.*, 1998). Interessanterweise findet man in PRMT7 eine möglicherweise durch Genduplikation entstandene Duplizierung aller PRMT-typischen Sequenzmotive.

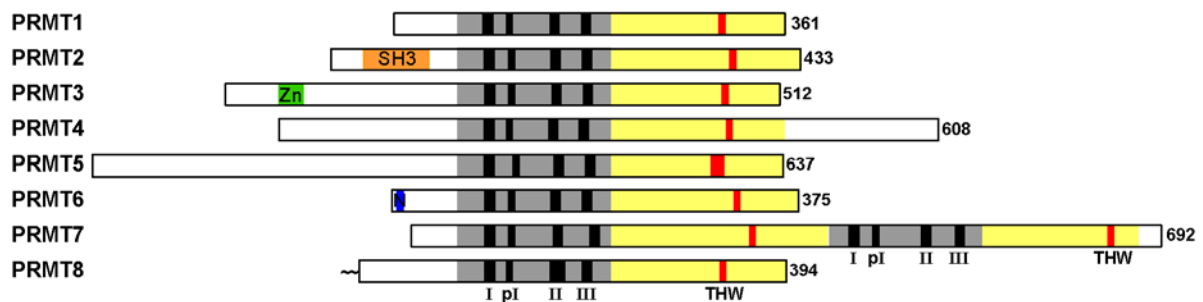


Abb. 1.2 Familie der Protein-Arginin-Methyltransferasen.

Schematische Darstellung der acht bekannten, humanen Protein-Arginin-Methyltransferasen. Farblich hervorgehoben sind die in allen PRMTs vorkommenden Signaturmotive I, post I, II und III (schwarz), die hoch konservierten PRMT-Kernregionen (grau, gelb), sowie die konservierte THW-Schleife (rot). PRMT2 und PRMT3 besitzen zudem eine aminoterminal SH3- (orange) bzw. eine Zinkfinger-Domäne (grün). Am aminoterminalen Ende von PRMT6 befindet sich eine Kernlokalisationssequenz (NLS, blau). Die membranassoziierte Lokalisation von PRMT8 wird durch eine aminoterminal Myristoylierung des Proteins vermittelt (~). Die Länge der jeweiligen Proteine in Aminosäuren ist am carboxyterminalen Ende angegeben.

Durch Kristallstrukturanalysen von PRMT1, PRMT3 (beide aus Ratte) und Hmt1 (aus Hefe) konnten interessante Einblicke in die Funktionsweise der konservierten PRMT-Kernregion gewonnen werden (Zhang & Cheng, 2003; Zhang *et al.*, 2000; Weiss *et al.*, 2000). Die monomere PRMT-Kernregion kann in drei funktionelle Bereiche eingeteilt werden (Abb. 1.3):

In der N-terminalen Hälfte der Kernregion befindet sich die Bindestelle für den Methyl donor AdoMet. Dieser unter PRMTs am stärksten konservierte Bereich ist auch in anderen AdoMet-abhängigen Methyltransferasen teilweise konserviert (Zhang *et al.*, 2000). Die C-terminale Hälfte der Kernregion formt eine PRMT-spezifische β -Fass-Domäne, die sich auf die AdoMet-Bindestelle im N-Terminus zurückfaltet. In der Spalte zwischen den beiden Domänen befindet sich das aktive Zentrum und die Bindestelle für Substratproteine. In allen drei kristallografischen Untersuchungen wurde außerdem eine identische Dimerisierungsdomäne identifiziert, die für die enzymatische Aktivität der PRMTs essenziell ist. Sowohl die Mutation von Aminosäuren in der Dimerisierungsdomäne von Hmt1 als auch die vollständige Deletion dieses Bereichs in PRMT1 (AS 188-222) führten zu einer vollständigen enzymatischen Inaktivierung der Methyltransferasen (Weiss *et al.*, 2000; Zhang & Cheng, 2003).

Durch die Dimerisierung entsteht eine ringförmige Struktur. Damit befinden sich die aktiven Zentren der beiden Monomere in räumlicher Nähe zueinander. Die Ausbildung einer solchen Struktur ist möglicherweise notwendig, damit der Methyl donor AdoMet korrekt gebunden werden kann. Außerdem könnte die räumliche Nähe der beiden aktiven Zentren eine fortlaufende Herstellung des Endprodukts Dimethylarginin

erleichtern. Einige PRMTs neigen zusätzlich zur Dimerisierung zur Bildung größerer homo-oligomerer Komplexe. So bilden Hmt1 und PRMT1 Hexamere und PRMT5 aggregiert in Komplexen, die aus zahlreichen Untereinheiten bestehen (Weiss *et al.*, 2000; Tang *et al.*, 1998; Rho *et al.*, 2001). Die Multimerisierung von PRMT1 und PRMT5 scheint essenziell für die enzymatische Aktivität der beiden Enzyme zu sein (Lim *et al.*, 2005).

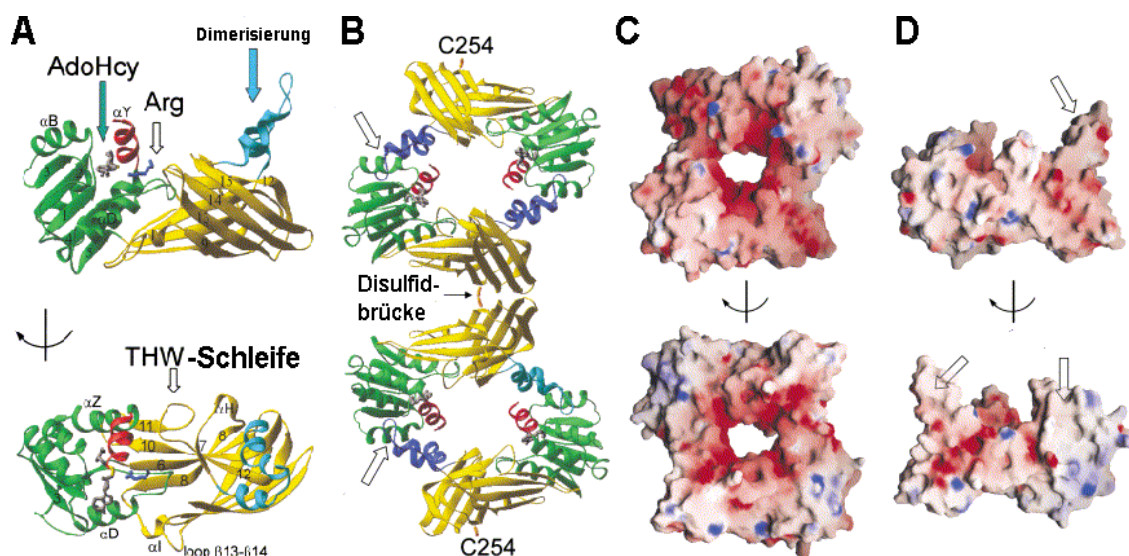


Abb. 1.3 Struktur und Dimerisierung von PRMT1.

(A) Struktur des PRMT1-Monomers aus verschiedenen Perspektiven. Dargestellt sind N-terminale Helix αY (rot), AdoMet-Bindedomäne (grün), β -Fass Struktur (gelb) und Dimerisierungsdomäne (hellblau). Das gebundene Arginin (blau) liegt im aktiven Zentrum zwischen der AdoMet-Bindedomäne und der β -Fass Struktur. Gebundenes AdoHcy ist als Stabmodell gezeigt. (B) Zwei ringförmige Dimere sind über eine Disulfidbrücke an Cystein-254 miteinander verbunden. Hydrophobe Bereiche der Dimerisierungsdomäne sind mit der äußeren Oberfläche der AdoMet-Bindedomäne assoziiert (Pfeil). (C, D) Gezeigt sind je zwei verschiedene Perspektiven von GRASP-Oberflächen des PRMT1 Dimers (C) und Monomers (D). Die Oberflächenladung (rot=negativ, weiss=neutral, blau=positiv) ist farblich markiert (Abb. modifiziert aus Zhang & Cheng, 2003).

Die Funktionen der unterschiedlichen N- und C-Termini von PRMTs sind bislang noch unklar. Es wird angenommen, dass sie eine wichtige Rolle bei der spezifischen Regulation einzelner PRMTs spielen. So beeinträchtigte die Deletion des N-Terminus von Hmt1 (Hefe) die Stabilität des Hexamers und verminderte somit die enzymatische Aktivität des Proteins (Weiss *et al.*, 2000). Zudem scheint eine Interaktion der N- und C-Termini von PRMT5 die Ausbildung homomerer Komplexe zu beeinflussen (Rho *et al.*, 2001). Die Deletion des N-terminalen Bereichs von PRMT3 inklusive der Zinkfingerdomäne führte ebenfalls zu einer Abnahme der enzymatischen Aktivität und beeinträchtigt möglicherweise die Erkennung von Substratproteinen (Tang *et al.*, 1998;

Frankel & Clarke, 2000). Für die N-terminale Region von CARM1/PRMT4 wurde bislang keine regulatorische Funktion gezeigt. Allerdings spielt der CARM1/PRMT4-spezifische C-Terminus eine wichtige Rolle für die Funktion des Enzyms als transkriptioneller Co-Aktivator (Teyssier *et al.*, 2002). Die Kristallstrukturanalysen an Hmt1, PRMT1 und PRMT3 haben gezeigt, dass sich auf der Oberfläche der Methyltransferasen ein lange, mäandrierende Furche befindet. Möglicherweise liegen dort mehrere Bindestellen für verschiedene Konsensussequenzen der Substratproteine. Somit könnte erklärt werden, warum ein einzelnes Enzym mehrere Substrate mit variierenden Konsensussequenzen erkennen kann (Zhang & Cheng, 2003).

Trotz der hochkonservierten Methyltransferasedomäne besitzen alle PRMTs eine typische Substratspezifität (Stallcup, 2001; Frankel *et al.*, 2002). Der exakte Mechanismus der Substraterkennung von PRMTs ist allerdings trotz kristallografischer Studien noch immer unklar. Hinweise geben vor allem Untersuchungen, bei denen die bevorzugten Methylierungsstellen auf bestimmten Substratproteinen kartiert wurden. Dabei ist deutlich geworden, dass Typ-I-Enzyme bevorzugt Arginine methylieren, die in Glycin-Arginin-reichen (GAR) Bereichen mit der Aminosäuresequenz RGG, RXR oder GRG vorliegen (Gary & Clarke 1998; Klein *et al.*, 2000; Smith *et al.*, 1999; Najbauer *et al.*, 1993). Dieses Sequenzmotiv findet sich besonders häufig bei RNA-bindenden Proteinen wie z.B. den hnRNP-Proteinen (Kiledijan & Dreyfuss, 1992). Allerdings methyliert CARM1/PRMT4 keine Arginine in GAR-Sequenzen und besitzt eine höhere Substratspezifität als die anderen Typ-I-PRMTs. Bislang ist kein Sequenzmotiv identifiziert worden, welches von CARM1/PRMT4 bevorzugt methyliert wird (Lee & Bedford, 2002). Die Typ-II-Methyltransferasen PRMT5 und PRMT7 methylieren sowohl isolierte Arginine als auch Arginine in GAR-Sequenzen (Friesen *et al.*, 2001; Lee *et al.*, 2005b).

1.2.3 Regulation zellulärer Prozesse durch Arginin-Methylierung

Die funktionelle Bedeutung der Arginin-Methylierung für die lebende Zelle ist bis heute noch nicht ausreichend verstanden. Die verfügbaren Daten legen nahe, dass die Arginin-Methylierung sich hauptsächlich auf Prozesse im Zellkern auswirkt. So wurden in den letzten Jahren zahlreiche Substrate der Protein-Arginin-Methyltransferasen identifiziert die an verschiedenen zellulären Prozessen wie z.B. RNA-Prozessierung, transkriptionelle Regulation, Reparatur von DNA-Schäden (vgl. Abb. 1.4), aber auch bei der Signaltransduktion oder bei Differenzierungsvorgängen beteiligt sind. In den folgenden Abschnitte werden diese Prozesse detaillierter beschrieben.

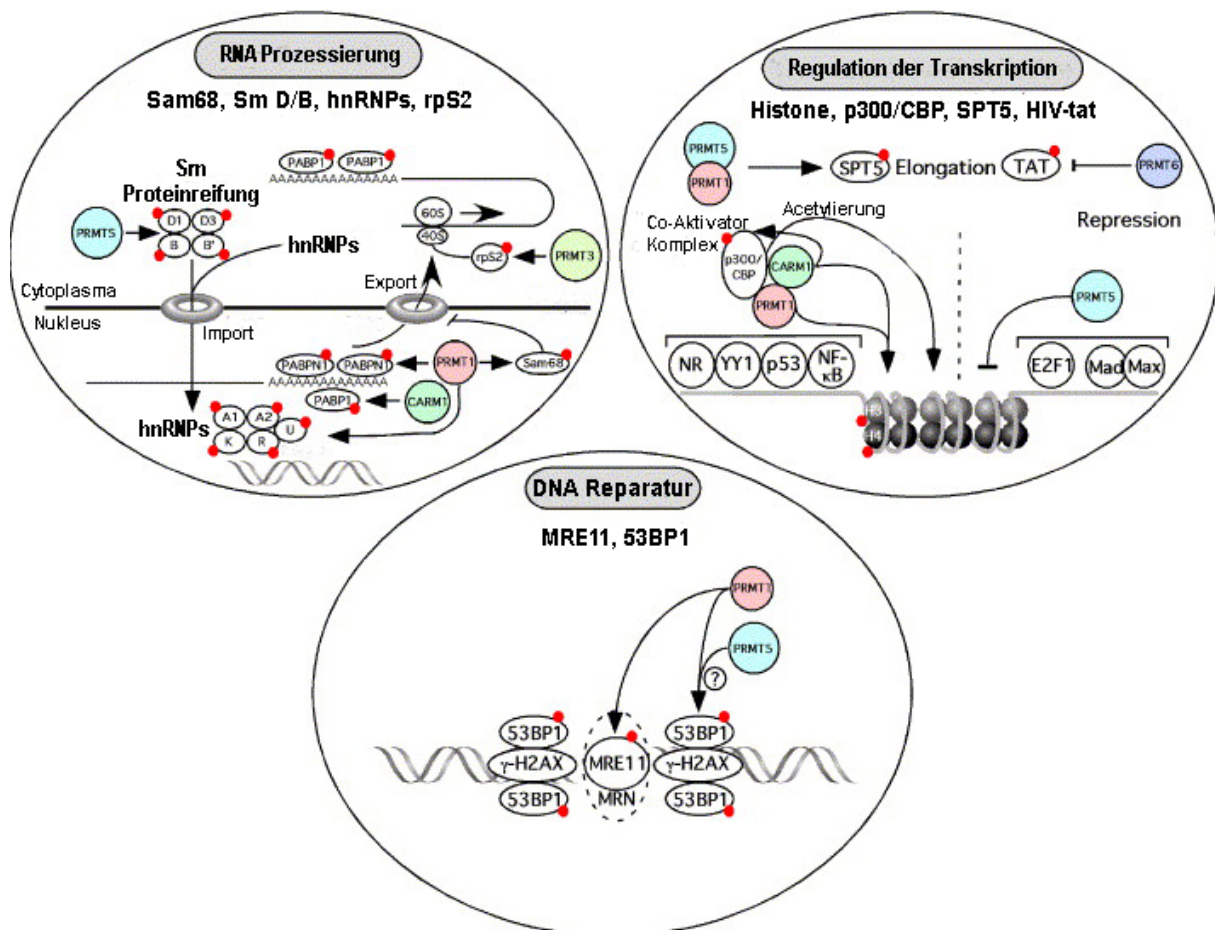


Abb. 1.4 Schematische Darstellung PRMT-regulierter Prozesse.

PRMTs sind an der Prozessierung von RNA, an der Regulation von Transkription und an der Reparatur von DNA-Schäden beteiligt. Durch Methylierung modifizierte Proteine sind mit einem roten Punkt markiert (Abb. modifiziert aus Bedford & Richard, 2005).

1.2.3.1 Regulation von RNA-Prozessierung und Transport

RNA-Bindeproteine wie die heterogenen nukleären Ribonukleoproteine (hnRNPs) erfüllen zahlreiche strukturelle und funktionelle Aufgaben in eukaryotischen Zellen. Sie binden prä-mRNA und sind an der Bildung der Ribonukleokomplexe und der Spleißosom-Komplexe beteiligt. Somit spielen sie eine wichtige Rolle bei der Verpackung und Prozessierung von RNA sowie der Regulation der Transkription und Translation. Es sind zahlreiche verschiedene Ribonukleoproteine mit unterschiedlichen Funktionen bekannt.

Die meisten RNA-Bindeproteine besitzen GAR-Sequenzabschnitte, die für Bindung der RNA verantwortlich sind. Zahlreiche Studien haben gezeigt, dass Argininreste in diesen Bereichen die bevorzugten Substrate von Typ-I-Methyltransferasen sind (Liu & Dreyfuss, 1995). So konnte für einige hnRNP-Proteine wie hnRNP-A, hnRNP R und hnRNP K bereits eine Methylierung durch PRMT1 nachgewiesen werden (Nichols *et al.*, 2000; Wada *et al.* 2002). Aus diesem Grund wird angenommen, dass die Methylierung von Argininen einen Einfluss auf die Nukleinsäurebindung dieser Proteine hat. Die wenigen Experimente zu dieser Thematik führten allerdings zu keiner eindeutigen Aussage. So führte die Methylierung von „fragile X mental retardation protein“ (Fmrp) zu einer verminderten Bindung an die minimale RNA-Sequenz *sc1* (Stetler *et al.*, 2006). Die Methylierung von hnRNP-A1 hat einen Effekt auf die sequenz-unspezifische Bindung an homo-polymere RNA (Rajpurohit *et al.*, 1994), während die Methylierung von hnRNP-K und von Hrp1 (Hefe) die Affinität der Proteine zu RNA nicht beeinflusste (Ostareck-Lederer *et al.*, 2006; Valentini *et al.*, 1999).

Möglicherweise stellt die Arginin-Methylierung auch ein „Reifungssignal“ für Proteine dar. So wurde von mehreren Gruppen gezeigt, dass die durch PRMT5 und möglicherweise PRMT7 vermittelte Methylierung der spleißosomalen Sm-Proteine B/B', D1 und D3 essenziell für ihren korrekten Einbau in den Sm-Kern des Spleißosoms ist (Meister *et al.*, 2001; Brahms *et al.*, 2001; Friesen *et al.*, 2001a; Miranda *et al.*, 2004; Lee *et al.*, 2005b). Das Spleißosom ist ein makromolekularer Komplex, welcher sich aus Proteinen und einer prä-mRNA aufbaut und das Spleißen im Zellkern von Eukaryoten katalysiert (vgl. Kramer, 1996). Die Sm-Proteine werden nur im methylierten Zustand vom „survival of motor neuron“ (SMN)-Protein gebunden (Buhler *et al.*, 1999; Brahms *et al.*, 2001) und mit Hilfe des SMN-Komplexes auf den snRNAs assembliert (Meister *et al.*, 2002).

In einigen Fällen scheint die Methylierung von Argininresten auch die zelluläre Lokalisation der betroffenen Proteine zu beeinflussen. So wurde bei den von Hmt1 methylierten hnRNP-Proteinen Np13p, Hrp1p und Nab2p in *S. cerevisiae* gezeigt, dass

sie nur im methylierten Zustand aus dem Zellkern exportiert werden können (McBride *et al.*, 2000; Shen *et al.*, 1998). Die zelluläre Lokalisation von hnRNP-A2 wird ebenfalls durch seinen Methylierungsstatus reguliert. Normalerweise lokalisiert hnRNP-A2 bevorzugt im Zellkern. Allerdings führt eine Inhibierung der Methylierung durch den Methyltransferaseinhibitor Adenosin-Dialdehyd (Adox) zu einer cytoplasmatischen Anreicherung des Proteins (Nichols *et al.*, 2000). Der gleiche Effekt war für das RNA-Bindeprotein Sam68 beschrieben worden, dessen genaue zelluläre Funktion bislang noch ungeklärt ist. Allerdings verhinderte die Deletion der Methylierungsstellen den Sam68-vermittelten Export von HIV-RNA (Cote *et al.*, 2003). Außerdem veränderte Sam68 seine Bindung an andere Proteine in Abhängigkeit von seinem Methylierungsstatus (Bedford *et al.*, 2000). Die Methylierung bestimmter Argininreste führte dabei zu einer Abnahme der Bindung an SH3-Domänen bestimmter Interaktionspartner wie p59 (fyn) und Phospholipase C γ -1.

Die Methylierung des ribosomalen Proteins rpS2 ist eine von Hefe bis Mensch hochkonservierte Modifizierung und spielt eine wichtige Rolle bei der Modulation der ribosomalen Biosynthese (Bachand & Silver, 2004; Swiercz *et al.*, 2005). Die funktionelle Bedeutung der Methylierung von weiteren RNA-Bindeproteinen wie den poly (A) Bindeproteinen (PABPs) und des Ewing Sarcoma Protein (EWS) ist noch nicht bekannt (Lee & Bedford, 2002; Smith *et al.*, 1999; Pahlich *et al.*, 2005).

1.2.3.2 Regulation der Transkription

Posttranslationale Modifikationen von Histonen stehen in engem Zusammenhang mit der Aktivierung und der Repression von Transkriptionsvorgängen. Zu den posttranslationalen Modifikationen von Histonen gehört neben der Acetylierung spezifischer Lysinseitenketten durch Histon-Acetyltransferasen oder die Phosphorylierung von Serinresten durch Histon-Kinasen auch die Methylierung von Lysin- und Argininresten durch Histon-Methyltransferasen. Die Histonmodifikationen beeinflussen sich in vielen Fällen gegenseitig, sodass spezifische Muster auftreten. Die verschiedenen Histonmodifikationen erfolgen dabei auf einem oder mehreren Histon-Termini und führen in einer kombinatorischen, sequenzabhängigen Weise zu einer spezifischen Aktivierung bzw. Inaktivierung von Genen. Sie können daher als ein „Histon-Code“ der Zelle zur Steuerung transkriptionsabhängiger Vorgänge verstanden werden (Jenuwein & Allis, 2001; Sims & Reinberg, 2003; Kouzarides, 2002).

Mindestens drei Mitglieder der PRMT-Familie sind an dieser Steuerung von Transkriptionsvorgängen beteiligt (vgl. Abb.1.3). PRMT1 methyliert spezifisch Histon H4

an Arginin-3 *in vivo* und CARM1/PRMT4 methyliert Histon H3 an Arginin-2, -17 und -26 *in vitro* (Chen *et al.*, 1999; Strahl *et al.*, 2001; Wang *et al.*, 2001; Schurter *et al.* 2001). Beide Enzyme besitzen co-aktivierende Eigenschaften bei der „nuclear receptor“-abhängigen transkriptionellen Regulation (Miao *et al.*, 2006; Koh *et al.*, 2001; Wang *et al.*, 2001; Bauer *et al.*, 2002). Es wurde ebenfalls berichtet, dass eine H4-Arginin-3-Methylierung eine nachfolgende Acetylierung von H4 verstärkt (Wang *et al.*, 2001).

Mit dem hSWI/SNF-Komplex assoziierte PRMT5 methyliert bevorzugt hypoacetyliertes Histon H3 an Arginin-8 bzw. H4 an Arginin-3 und scheint zu einer Inaktivierung der Transkription von *c-myc* abhängigen Zielgenen beizutragen (Pal *et al.*, 2003, 2004). Die Arginin-Methylierung repräsentiert damit ähnlich wie die Histon-(De-) Acetylierung eine Histonmodifikation, die zu einer Aktivierung bzw. Repression von Transkription führen kann (Übersicht in Lee *et al.*, 2005).

„High-mobility group“ (HMG)-Proteine sind an der Modulation der Chromatinstruktur beteiligt und spielen wichtige Rollen bei verschiedenen entwicklungsbiologischen Mechanismen. Die Proteine der HMGA-Subfamilie verfügen über je drei hochkonservierte DNA-bindende Domänen („AT-Hooks“), mit denen sie in die schmale Furche AT-reicher DNA binden. Außerdem vermittelt dieser Bereich auch Interaktionen mit Transkriptionsfaktoren wie z.B. NF- κ B oder ATF-2 (Thanos & Maniatis, 1992; Du & Maniatis, 1994). Die AT-Hooks von HMGA1a enthalten zahlreiche RG-Sequenzen mit methylierten Argininen (Edberg *et al.*, 2004, 2005; Sgarra *et al.*, 2003). Das Methylierungsmuster und der Methylierungsgrad dieser Bereiche variiert dabei in unterschiedlichen Zelllinien. Zudem konnte in apoptotischen Zellen eine deutliche Zunahme der Arginin-Methylierung von HMGA1a beobachtet werden. Die Methylierung dieser „AT-Hooks“ durch PRMT6 (Miranda *et al.*, 2005; Sgarra *et al.*, 2006) könnte zur Modulation von Protein-DNA oder Protein-Protein Wechselwirkungen beitragen. Transkriptionsfaktoren wie p53 (An *et al.*, 2004), YY1 (Rezai-Zadeh *et al.*, 2003) und NF κ B (Covic *et al.*, 2004) rekrutieren die PRMTs an die Promotorregionen spezifischer Gene (s. Abb. 1.3), wo sie zahlreiche regulative Aufgaben bei der Transkription erfüllen. So wurde die *in vivo*-Methylierung von Argininresten des transkriptionellen Co-Aktivators p300/CBP durch CARM1/PRMT4 beschrieben. Diese Modifikation verhindert die Assoziation von p300/CBP mit dem Transkriptionsfaktor CREB und beeinflusst somit die Regulation der Transkription (Xu *et al.*, 2001).

Weitere Studien haben gezeigt, dass Arginin-Methylierung auch an anderen Prozessen der transkriptionellen Regulation beteiligt ist. So wurde gezeigt, dass PRMT1 und PRMT5 den Elongationsfaktor SPT5 binden und methylieren. Durch die Methylierung

von SPT5 werden die promotorspezifischen Bindungseigenschaften von SPT5 verändert und die Elongation der Transkription beeinträchtigt (Kwak *et al.*, 2003). Außerdem scheint die Arginin-Methylierung auch bei der Regulation der Transkription von Virus-Genen beteiligt zu sein. So führte die Methylierung des HIV-Transaktivatorproteins Tat durch PRMT6 zu einer Verminderung Tat-abhängiger Transkription (Boulanger *et al.*, 2005). Zudem führte die verminderte Expression von PRMT6 zu einer erhöhten HIV-Replikation.

1.2.3.3 DNA-Reparatur

Das Genom wird kontinuierlich durch UV-Strahlung, reaktive Sauerstoffspezies und eine Vielzahl anderer exogener und endogener Ursachen geschädigt. Dadurch entstehen vererbare Mutationen, die zu einer malignen Entartung der Zelle führen können, wenn die aufgetretenen Schäden nicht durch enzymatische Prozesse repariert werden. Innerhalb sehr kurzer Zeit nach einem DNA-Schaden kommt es zu einer Anreicherung zahlreicher Reparaturenzyme in nukleären Reparatur-Foci an der betroffenen Region. Dabei ist phosphoryliertes Histon H2AX (γ -H2AX) essenziell für die effiziente Erkennung und/oder Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen (Pilch *et al.*, 2003; Sedelnikova *et al.*, 2003). Auch bei der Regulation dieser Prozesse scheint Arginin-Methylierung eine wichtige Rolle zu spielen. Boisvert *et al.* (2003) konnten zeigen, dass mindestens ein Protein des MRE11-RAD50-NBS1 (MRN) DNA-Reparaturkomplexes methyliert vorliegt. In einer Folgestudie wurden dann Argininreste in der C-terminalen GAR-Domäne von MRE11 als Substrat von PRMT1 identifiziert (Boisvert *et al.*, 2005). Der Methylierungsstatus von MRE11 hatte keinen Einfluss auf die MRN-Komplexbildung. Allerdings verliert MRE11 seine Exonukleaseaktivität, wenn die Arginine in der GAR-Domäne mutiert sind. Werden Zellen mit Methylierungsinhibitoren oder mit PRMT1 siRNA behandelt, so führt dies zu einer fehlerhaften „checkpoint“-Kontrolle während der S-Phase des Zellzyklus (Boisvert *et al.* 2005b). Interessanterweise bleibt MRE11 dabei in sogenannten „Promyelocytic Leukemia“ (PML)-Körperchen gebunden, und die Ausbildung von γ -H2AX Foci an DNA-Schäden ist stark reduziert (Boisvert *et al.*, 2005a). Möglicherweise wird durch den Methylierungsstatus von MRE11 die Bindung an nukleäre Strukturen wie PML-Körperchen oder Reparatur-Foci reguliert.

Ein vergleichbarer Effekt wird bei dem p53 Bindeprotein1 (53BP1) beobachtet, das ebenfalls eine Rolle bei der Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen spielt. Die DNA-Bindung dieses Proteins wird durch eine von PRMT1 methylierte GAR-Domäne vermittelt, die zudem an die interne Tudor-Domäne von 53BP1 bindet (Boisvert *et al.*,

2005b; Charier *et al.* 2004). Huyen *et al.* (2004) haben gezeigt, dass 53BP1 mit seiner Tudor-Domäne an methylierte Lysine von Histon H3 bindet. Möglicherweise führen DNA-Schäden zu einer Konformationsänderung der DNA, wodurch methyliertes Lysin-79 in Histon H3 von 53BP1 gebunden werden kann. Weitere Studien werden zeigen müssen, ob fehlerhafte Arginin-Methylierung zum Entstehen genomischer Instabilität beiträgt.

1.2.4 Regulierung der Arginin-Methylierung

Im Gegensatz zu posttranslationalen Modifikationen wie der Phosphorylierung und Acetylierung sind für die Arginin-Methylierung bislang keine Enzyme identifiziert worden, die eine Wiederabspaltung der Methylgruppe katalysieren. Der Methylierungsgrad eines Proteins kann also nicht durch antagonistische Enzyme reguliert werden. Es müssen in der Zelle daher andere Regulationsmechanismen vorhanden sein, die eine Modulation der Methylierungsreaktion ermöglichen. So könnte die Aktivität von PRMTs durch posttranslationale Modifikationen, Protein-Protein Interaktionen oder Regulation der Substrat-Zugänglichkeit kontrolliert werden. Tatsächlich besitzt PRMT6 eine Automethylierungsaktivität (Frankel *et al.*, 2002), deren Funktion aber bisher nicht untersucht wurde. Möglicherweise spielt auch die Homo-Multimerisierung einiger PRMTs eine regulatorische Rolle für deren enzymatische Aktivität (Weiss *et al.*, 2000; Zhang & Cheng, 2003). Von PRMT1, PRMT3 und CARM1/PRMT4 ist zudem bekannt, dass ihre enzymatische Aktivität durch Interaktionen mit anderen Proteinen reguliert werden kann (Lin *et al.*, 1996; Singh *et al.*, 2004; Xu *et al.*, 2004). PRMT5 liegt in mindestens einem cytoplasmatischen und zwei nukleären Komplexen gebunden vor. Als Bestandteil des „Methylosom“-Komplexes methyliert PRMT5 die Sm-Proteine und spielt wie im vorigen Abschnitt beschrieben eine Rolle bei der Herstellung der snRNP-Partikel (Friesen *et al.*, 2005). Die Bindung von PRMT5 an den hSWI/SNF-Komplex führt zu einer verstärkten Methyltransferase-Aktivität des Enzyms (Pal *et al.*, 2004).

Im Jahr 2004 wurde gezeigt, dass die Methylierung von Histonen durch Peptidyl-Arginin-Deiminase-4 (PAD4) rückgängig gemacht werden kann (Cuthbert *et al.* 2004; Sarmiento *et al.*, 2004). Bei dieser Reaktion werden sowohl unmodifiziertes als auch monomethyliertes, nicht aber dimethyliertes Arginin (Hidaka *et al.*, 2005) durch Abspaltung eines Guanidino-Stickstoffs (Deiminierung) irreversibel in die nicht-proteinogene Aminosäure Citrullin umgewandelt (s. Abb. 1.5). Da bislang noch keine Aminotransferase identifiziert wurde, die eine Rückumwandlung in Arginin katalysiert, ist die funktionelle Bedeutung der Deiminierung von (methylierten) Argininresten noch unklar. Möglicherweise handelt es sich bei der Arginin-Methylierung um eine irreversible

oder zumindest sehr dauerhafte Modifikation, die nur unter sehr speziellen Umständen durch Abspaltung des methylierten Guanidino-Stickstoffs entfernt werden kann. Die Regulation der Arginin-Methylierung unterscheidet sich daher höchstwahrscheinlich von der Regulation der Lysin-Methylierung. Hier konnte kürzlich eine Lysin-spezifische Aminoxidase identifiziert werden (Shi *et al.*, 2004). Diese Lysin-spezifische Demethylase 1 (LSD1) entfernt die Methylgruppen von dimethyliertem Lysin-4 und Lysin-9 von Histon H3 (Metzger *et al.*, 2005). Möglicherweise sind weitere, noch unbekannte Mitglieder dieser Enzymfamilie auch in der Lage, die Methylgruppen von Argininresten zu entfernen (vgl. Abb. 1.5).

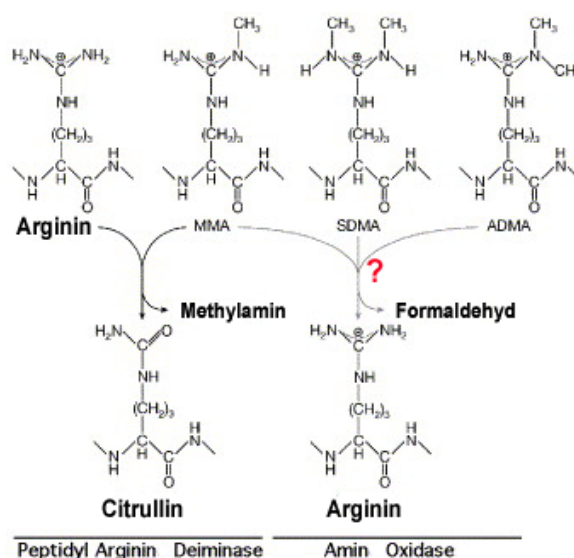


Abb. 1.5 Mögliche Regulation der Arginin-Methylierung durch Enzyme.

Die Peptidyl Arginin Deiminase deiminiert Arginin und monomethyliertes Arginin (MMA) zu Citrullin. Eine Aminoxidase, die in der Lage ist Methylgruppen von Arginin abzuspalten, ist noch nicht bekannt (Abb. modifiziert aus Bedford & Richard, 2005).

1.3 Das Kernprotein „Scaffold Attachment Factor A“, ein Substrat der Arginin-Methylierung

„Scaffold Attachment Factor A“ (SAF-A/hnRNP-U) gehört zur Familie der heterogenen nukleären Ribonukleoproteine (hnRNPs), die zu den typischen Substraten der Arginin-Methyltransferasen gehören (Liu & Dreyfuss, 1995; s. *Kapitel 1.2.3.1*). HnRNPs binden prä-mRNA und sind an der Bildung der Ribonukleokomplexe beteiligt, wo sie eine wichtige Rolle bei der Verpackung und Prozessierung von RNA spielen. Als Hauptkomponenten einer Skelettstruktur des Zellkerns, ähnlich dem Cytoskelett im Cytoplasma, sind hnRNPs und speziell SAF-A an der Architektur des Zellkerns, sowie an Chromatin-organisierenden Prozessen beteiligt (Mattern *et al.*, 1996). SAF-A ist zudem essenziell für die Integrität von Chromosomenterritorien und für die Organisation von makromolekularen „Fabriken“ der Transkription und Replikation. SAF-A ist ein ubiquitäres Protein (Romig *et al.*, 1992; Fackelmayer *et al.*, 1994) und ist für die Entwicklung und Lebensfähigkeit von Säugetieren unentbehrlich (Roshon & Ruley, 2005). Da die Funktion und die biochemischen Eigenschaften von SAF-A sehr gut charakterisiert sind, eignet sich dieses Protein besonders zur Untersuchung der Rolle der Arginin-Methylierung. Die folgenden Abschnitte fassen das heutige Wissen über SAF-A zusammen.

1.3.1 SAF-A als Bestandteil der Kernmatrix

Das menschliche Kernprotein SAF-A (hnRNP-U) ist ausschließlich im Zellkern zu finden, wo es zum Teil löslich, zum anderen Teil an die Kernmatrix gebunden vorliegt (Fackelmayer, 1991; Fackelmayer & Richter, 1994a). Zur Struktur der Kernmatrix, die zu 98 % aus Proteinen besteht, gehören unter anderem die Lamina mit den integrierten Kernporenkomplexen, Überreste der Nukleoli, sowie ein dreidimensionales Netzwerk aus unterschiedlich dicken Fasern. Die Protein-Zusammensetzung der Kernmatrix hängt sehr stark von der Präparationsmethode ab (Cook, 1988). Präpariert man die Kernmatrix unter schonenden Bedingungen, so beobachtet man 20-50 nm dicke polymorphe Fasern, an denen Proteinkomplexe angelagert sind (He *et al.*, 1990). Man geht davon aus, dass diese Proteinkomplexe molekulare „Fabriken“ der DNA-Replikation („replication factories“) oder Transkription („transcription factories“) darstellen (Hassan & Cook, 1993; Hozak *et al.*, 1993; Jackson *et al.*, 1993). Diese Proteinkomplexe und andere angeheftete Proteine können durch weitere biochemische Schritte entfernt

werden. Übrig bleibt ein Netzwerk von Fasern mit 2-3 nm Durchmesser, welches hauptsächlich aus heterogener nukleärer RNA (hnRNA) und Proteinen besteht. Entfernt man die RNA mit RNase, so wird das Fasergeflecht zerstört und die Chromosomenterritorien lösen sich auf (Ma *et al.*, 1999). Behandelt man Zellen mit Transkriptionshemmstoffen, so führt dies zum Zusammenbruch der Kernmatrix, was auf eine direkte Korrelation von Transkription und Kernmatrix hinweist (Fey *et al.*, 1986; Nickerson *et al.*, 1989). Die hnRNA hat also vermutlich eine strukturgebende Funktion bei der Ausbildung und Aufrechterhaltung der Kernmatrix und scheint somit an der Organisation des Genoms in Chromosomen-Territorien beteiligt zu sein.

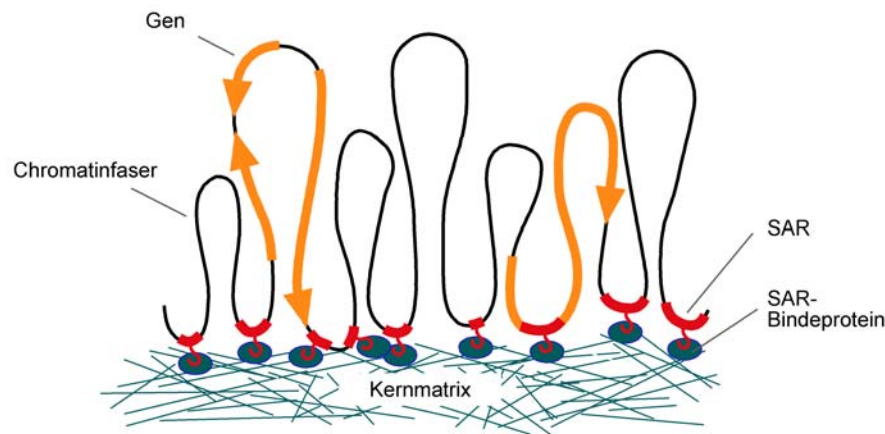


Abb. 1.6 Modellvorstellung für die Organisation des Chromatins.

Das Chromatin ist nach diesem Modell in Schleifen organisiert, die an ihrer Basis über spezielle DNA-Sequenzen (SAR/MAR-Regionen) und SAR-bindende Proteine mit der Kernmatrix verbunden sind. Jede Schleife stellt eine unabhängige funktionelle Einheit dar (aus Fackelmayer, 2000).

1.3.2 Domänenstruktur und Bindungseigenschaften von SAF-A

Eine Quantifizierung der SAF-A-Menge nach Kernmatrixpräparationen hat gezeigt, dass etwa 50 % aller SAF-A Moleküle mit der Kernmatrix assoziiert sind (Fackelmayer *et al.*, 1994). Die Kernmatrix-Bindedomäne befindet sich auf den 210 C-terminalen Aminosäuren von SAF-A (Herrmann, 2002). Für den Kernimport von SAF-A konnten bisher zwei Kernlokalisierungssignale (NLS) identifiziert werden. Die erste NLS stellt eine potentielle NLS mit einer Länge von neun Aminosäuren ($^{241}\text{KKRGVKRPR}^{249}$) dar (Kiledjian & Dreyfuss, 1992), die zweite NLS ($^9\text{KKLKVSELKEELKKRR}^{24}$) liegt innerhalb der DNA-Bindedomäne des Proteins (s. Abb. 1.7) und ist zweigeteilt (Schwander, 2004). SAF-A wurde unabhängig in der Arbeitsgruppe von G. Dreyfuss als Bestandteil der hnRNP-Komplexe identifiziert (Choi & Dreyfuss, 1984). Diese Komplexe setzten sich aus

mindestens 20 verschiedenen Proteinen mit molekularen Massen von 34 kDa (hnRNP-A1) bis 120 kDa (hnRNP-U/SAF-A) zusammen. HnRNPs verändern die Struktur von hnRNA und sind an der Prozessierung von prä-mRNA beteiligt (Dreyfuss, 1986; Dreyfuss *et al.*, 1988). Die Bindung von SAF-A an RNA erfolgt über eine im C-Terminus lokalisierte RNA-Bindedomäne, die sogenannte RGG-Box (Kiledijan & Dreyfuss, 1992). Diese RGG-Box findet man auch in anderen RNA-bindenden Proteinen, wie Nucleolin, Fibrillarin, SSB-1 und dem SAF-A verwandten Protein E1B-AP5 (Jong *et al.*, 1987; Aris & Blobel, 1991; Gabler *et al.*, 1998). In unserer Arbeitsgruppe konnte gezeigt werden, dass SAF-A im Zellkern in inaktivierten X-Chromosomenterritorien angereichert wird. Die Bindung an die nicht codierende Xist-RNA wird dabei über die RGG-Box von SAF-A vermittelt (Helbig & Fackelmayer, 2003). Durch *in vivo* „Fluorescence Recovery after Photobleaching“ (FRAP) Analysen wurde gezeigt, dass SAF-A Teil einer höchst stabilen Protein-Struktur in inaktivierten X-Chromosomenterritorien ist, die möglicherweise zur Immobilisierung von Xist-RNA dient (Fackelmayer, 2005). Ergebnisse aus der Arbeitsgruppe von G. Dreyfuss haben auch gezeigt, dass Arginine in der RGG-Box von SAF-A und anderen hnRNP-Proteinen durch Anheftung eines Methylrestes posttranslational modifiziert werden (Liu & Dreyfuss, 1995).

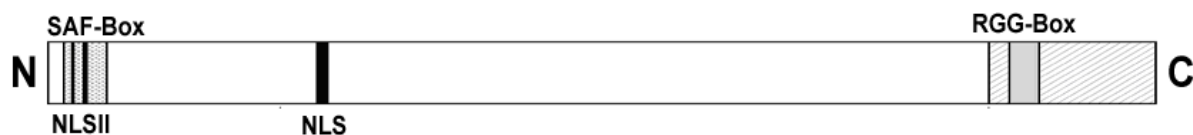


Abb. 1.7 Schematische Darstellung von SAF-A.

Die N-terminale SAF-Box (schraffierte Box; AS 11-43) vermittelt SAR/MAR-spezifische DNA-Bindung. Mit der im C-Terminus zwischen den Aminosäuren 714-738 lokalisierten RGG-Box (graue Box; 25 AS lang) bindet SAF-A an RNA. SAF-A besitzt zwei Kernlokalisationssequenzen (NLS und NLSII), wobei für NLSII eine zweigeteilte Sequenz codiert. Der aminoterminal Bereich ist reich an sauren Aminosäuren, wie Asparaginsäure und Glutaminsäure. Der carboxyterminale Bereich ist auf 129 Aminosäuren reich an Glycin (zu 26%, schräg schraffiert).

Neben der Bindung an RNA liegen große Mengen von SAF-A *in vivo* in DNA-gebundener Form vor. Nach Quervernetzung mit Formaldehyd waren 20 % des im Zellkern vorhandenen SAF-A fest mit DNA assoziiert (Fackelmayer *et al.*, 1994; Göhring & Fackelmayer, 1997). In weiteren Experimenten konnte der DNA-bindende Bereich von SAF-A auf die N-terminalen 45 Aminosäuren eingegrenzt werden (Göhring *et al.*, 1997; Kipp *et al.*, 2000). Innerhalb dieser DNA-Bindedomäne existiert ein 31 Aminosäuren umfassendes Proteinmotiv, die sogenannte „SAF-Box“, welches Sequenzhomologien zu zahlreichen eukaryotischen Proteinen aufweist. SAF-A bindet mit der SAF-Box

hochspezifisch an SAR/MAR-Elemente der DNA, wobei Bindungsstudien mit dem SAR/MAR-Element MII aus dem menschlichen Topoisomerase I-Gen (Romig *et al.*, 1992) und mit Subfragmenten von MII zeigten, dass die SAR/MAR-Spezifität von SAF-A nicht auf eine einzelne Bindestelle zurückzuführen ist. Die SAF-Box wurde als erste Proteindomäne identifiziert, die spezifisch an SAR/MAR-DNA bindet und zugleich evolutionär hoch konserviert ist. Die Wechselwirkung einer einzelnen SAF-Box mit DNA ist allerdings sehr schwach. Zu einer spezifischen und stabilen Bindung von SAF-A an DNA kommt es erst, wenn mindestens fünf „A-tracts“ (A-tract = vier oder mehr aufeinanderfolgende Adeninreste) in einer Sequenz >200 bp vorliegen und SAF-A zusätzlich multimerisiert, wodurch mehrere SAF-Boxen miteinander gekoppelt werden (Kipp *et al.*, 2000). Dieser Mechanismus, bei dem die Kopplung vieler schwacher, niederaffiner Wechselwirkungen in einer starken und spezifischen Bindung resultiert (kooperativer Effekt), wird als Massenbindung bezeichnet (Zuckerkindl & Villet, 1988). Die Multimerisierung von SAF-A kann auch *in vitro* beobachtet werden. So bildet aufgereinigtes SAF-A in der Gegenwart von DNA filamentöse Strukturen (Länge ~1 µm; Durchmesser ~35 nm), an denen die DNA verankert und z.T. schleifenförmig organisiert ist (Fackelmayer *et al.*, 1994; Romig *et al.*, 1992). Die Multimerisierungsdomäne von SAF-A konnte auf die letzten 85 Aminosäuren im C-Terminus eingegrenzt werden (Schwander, 2004).

1.3.3 Funktionelle Wechselwirkungen von SAF-A

Die Regulation der DNA-Replikation in der Zelle ist eines der grundlegenden Probleme der Zell- und Molekularbiologie. Zwar ist bekannt, dass die DNA-Replikation an definierten Stellen auf der DNA, den so genannten Origins, beginnt, aber die Aktivierung und Regulation dieser Bereiche ist noch nicht ausreichend verstanden.

Für eine vereinfachte Analyse der Replikationskontrolle wurden in der Arbeitsgruppe von H.J. Lipps Plasmide entwickelt, die durch die Kombination eines SAR/MAR-Elementes mit einem aktiv transkribierten Gen die Fähigkeit erwerben, sich autonom, also unabhängig von den zellulären Chromosomen, zu replizieren. Diese mit einem SAR/MAR-Element versehenen Vektoren sind im Zellkern stabil mit Metaphase-Chromosomen assoziiert, wobei die Vektoren spezifisch mit SAF-A interagierten (Jenke *et al.*, 2002, 2004; Baiker *et al.*, 2000). Durch die spezifische Interaktion zwischen dem extra-chromosomalen Replikon und der essenziellen Kernmatrix-Komponente SAF-A wird eine effiziente Weitergabe während der Mitose mittels eines Huckepack-Mechanismus ermöglicht. Die so stabilisierten Vektoren sind in der Lage, ohne eine

Beteiligung von *transaktiv* wirksamen viralen Faktoren, in einer Kopienzahl von etwa 5-10 Kopien episomal zu replizieren. Die episomale Replikation kann in Abwesenheit von Selektionsdruck über mehrere hundert Generationen stabil erfolgen (Piechaczek *et al.*, 1999). Die hohe mitotische Stabilität der Vektoren und eine gleichbleibende Kopienzahl über einen langen Zeitraum lassen auf eine effiziente Replikation schließen. Es ist wahrscheinlich, dass die Vektoren die Replikationsmaschinerie der Wirtszelle nutzen und zeitgleich wie die wirtseigene DNA repliziert werden.

Die Bindung von Plasmid-DNA an stabile Kernmatrixstrukturen wurde auch von Mearini *et al.* (2004) gezeigt. Allerdings konnte in dieser Studie keine SAR/MAR-sequenzspezifische Immobilisierung von Fluoreszenz-markierten Plasmiden beobachtet werden. Von Kipp *et al.* (2000a) wurde gezeigt, dass die DNA-Bindedomäne von SAF-A ein wichtiges regulatorisches Element für den korrekten Ablauf von Replikationsprozessen ist. Zellen die transient mit einer SAF-A-Mutante ohne SAF-Box transfiziert wurden, waren in ihrer Proliferationsrate deutlich gehemmt. Offensichtlich übt das mutierte Protein ohne DNA-Bindedomäne einen dominant negativen Effekt auf die natürliche Funktion von SAF-A aus.

Neben der Replikation ist SAF-A noch in weitere funktionelle Netzwerke der Zelle involviert. So konnten bislang mehrere Interaktionspartner von SAF-A identifiziert werden. Zu ihnen gehören Transkriptionsfaktoren wie der Glukocorticoid Rezeptor (GR), p300/CBP (Eggert *et al.*, 1997, 2001; Martens *et al.*, 2002), RNA Polymerase II (Kim & Nikodem, 1999; Carty & Greenleaf, 2002), KLF2 (Kruppel-like factor 2; Ahmad & Lingrel, 2005) YAP (Yes-associated protein; Howell *et al.*, 2004) der Proliferationsinhibitor Necdin (Taniura & Yoshikawa, 2002) und die Rezeptoruntereinheit E3RS der E3-Ubiquitin-Ligase SCF ^{β -TrCP} (Davis *et al.*, 2002). SAF-A nimmt also vermutlich auch bei der Regulation der Transkription, der Proliferation und des proteasomalen Abbaus eine funktionelle Rolle ein. So konnte gezeigt werden, dass SAF-A *in vivo* an den C-terminalen Bereich des Glukocorticoid Rezeptors bindet, der die Transkription vieler Hormon-abhängiger Gene reguliert. SAF-A stört die GR-abhängige Transkription durch Unterdrückung der Glukocorticoid-abhängigen Aktivierung (Eggert *et al.*, 1997). Werden SAF-A/hnRNP-U und GR co-transfiziert, so ist der inhibierende Effekt von SAF-A abhängig von der Menge an co-transfiziertem GR. Große Mengen an GR führen zu einer Reduzierung der GR-abhängigen Transkription; niedrige Mengen an co-transfiziertem GR haben kaum einen Effekt. Transient transfizierte SAF-A/hnRNP-U Konstrukte ohne GR-Bindedomäne führen interessanterweise zu einer Aktivierung der GR-abhängigen Transkription (Eggert *et al.*, 2001). Die relativen Konzentrationen von SAF-A, GR und

DNA-Bindestellen für GR in der Zelle haben also einen Einfluss auf die Glukocorticoid-abhängige Transkription. Dabei sind die GR-Moleküle zusammen mit assoziiertem Hormon über eine Wechselwirkung mit SAF-A fest an die Kernmatrix gebunden. SAF-A könnte daher als Speicherort für kernlokalisierte Glukocorticoid-Rezeptoren dienen.

Eine Subpopulation des menschlichen SAF-A-Proteins ist als Teil des prä-Initiationskomplexes *in vivo* an RNA Polymerase II gebunden. Diese Bindung wird durch den mittleren Teil von SAF-A (AS 269-536) vermittelt. SAF-A behindert dabei die Phosphorylierung der carboxyterminalen Domäne (CTD) durch TFIIF und verhindert den Start der Transkription (Kim & Nikodem, 1999). Eine kürzlich erschienene Studie hat gezeigt, dass mit RNA Polymerase II assoziiertes SAF-A über eine kurze C-terminale Peptidsequenz an Actin gebunden ist. Möglicherweise ist dieser SAF-A/Actin-Komplex an der Regulation der Initiationsphase von Transkription beteiligt (Kukalev *et al.*, 2005). Ein weiteres mit SAF-A assoziiertes Protein ist p300/CBP, ein Transkriptionsfaktor, der als eine Art Verbindungsbrücke zwischen dem Transkriptionskomplex und anderen auf der DNA gebundenen Transkriptionsfaktoren agiert (Martens *et al.*, 2002). Virale Proteine wie E1A und das große T-Antigen aus Simian Virus SV40 können diese Interaktionen stören. Außerdem besitzt p300/CBP eine intrinsische Acetyltransferase-Aktivität (Ogryzko *et al.*, 1996; Bannister & Kouzarides, 1996) und interagiert mit anderen Acetyltransferasen wie p/CAF (Yang *et al.*, 1996). Mit Chromatin-Immunpräzipitationen wurde gezeigt, dass p300-SAF-A Komplexe an SAR/MAR-Elemente im Topoisomerasel-Gen binden, bevor dieses während der G₁-Phase im Zellzyklus aktiviert wird. Gleichzeitig erfolgt eine lokale Acetylierung der Nukleosomen (Martens *et al.*, 2002). Die Interaktion von p300 und SAF-A mit SAR/MAR-Elementen nicht transkribierter Gene könnte zu einer lokalen Acetylierung von Histonen durch p300 führen und somit diese Chromatinregionen für die Transkriptionskomplexe zugänglich machen.

In postmitotischen Neuronen bilden der Proliferationsinhibitor Necdin und SAF-A einen stabilen Komplex in der Kernmatrix (Taniura & Yoshikawa, 2002). Die Bindestelle für Necdin befindet sich nahe einer C-terminalen Region, die ebenfalls eine Bindung an die Kernmatrix vermittelt. Ektopisch exprimiertes Necdin liegt konzentriert in den Nukleoli vor, wird aber von co-transfiziertem SAF-A in das Nukleoplasma transportiert. Eine Inhibierung der Necdin-vermittelten Proliferation könnte also von einer Bindung von Necdin an SAF-A in einem spezifischem Kernkompartiment abhängig sein (Taniura & Yoshikawa, 2002).

Außerdem scheint SAF-A ebenfalls für die Kernlokalisierung von E3RS, einer Rezeptoruntereinheit der E3-Ubiquitin-Ligase SCF^{β-TrCP}, verantwortlich zu sein (Davis *et*

al., 2002). Obwohl beide bekannten Substrate ($I\kappa B\alpha$ und β -Catenin) von $SCF^{\beta-TrCP}$ cytoplasmatisch lokalisiert sind, wurde die Untereinheit E3RS hauptsächlich im Kern gefunden. Über Co-Lokalisationsstudien mit SAF-A-NLS Mutanten und SAF-A-NES-Konstrukten wurde gezeigt, dass E3RS fest an SAF-A gebunden ist und die subzelluläre Lokalisation von E3RS durch SAF-A bestimmt wird (Davis *et al.*, 2002). Die Bindung erfolgt höchstwahrscheinlich über ein nicht phosphoryliertes „Destruction Motif“ von SAF-A (Kanemori *et al.*, 2005). Allerdings ist SAF-A kein Substrat der E3-Ligase. Es wird nicht ubiquitiniert und scheint eher eine Art Pseudosubstrat darzustellen, das die Ligase-Aktivität versiegelt und somit verhindert, dass falsche Substrate für den proteasomalen Abbau markiert werden (Davis *et al.*, 2001).

SAF-A ist also ein Kernprotein mit verschiedenen funktionellen Aufgaben in der Zelle. Aufgrund seiner DNA- und Protein-Bindungseigenschaften wird es für wichtige strukturelle, Chromatin-organisierende Funktionen bei der Zellkernarchitektur benötigt (Romig *et al.*, 1992; Fackelmayer *et al.*, 1994; Kipp *et al.*, 2000), und in seiner Funktion als hnRNP-Protein ist es an der Verpackung und Prozessierung von prä-mRNA beteiligt (Dreyfuss *et al.*, 1993). SAF-A wird wie zahlreiche andere RNA-bindende Proteine an Argininresten in der RGG-Box methyliert (Liu & Dreyfuss, 1995). Bislang wurde aber weder die verantwortliche Methyltransferase identifiziert noch die genauen Methylierungsstellen auf SAF-A lokalisiert. Eine noch weit interessantere Frage ist allerdings, welche Bedeutung diese Modifikation für die Proteinfunktion von SAF-A *in vivo* hat. Mit der Beantwortung dieser Frage könnten dann Rückschlüsse auf Funktion der Arginin-Methylierung im Allgemeinen gezogen werden.

2. Zielsetzung

Die vorliegende Dissertation beschäftigt sich mit der funktionellen Bedeutung der Arginin-Methylierung von Proteinen in der lebenden Zelle. Diese posttranslationale Modifikation ist bis heute nur unzureichend verstanden, obwohl in den letzten Jahren zahlreiche Erkenntnisse über die Protein-Arginin-Methyltransferase (PRMT)-Gene, die dreidimensionale Struktur der Enzyme und die Methylierungsstellen auf mehreren Substraten gewonnen wurde. Um die funktionelle Vielfalt der PRMT-Familie besser verstehen zu können, werden im ersten Teil dieser Arbeit wichtige grundlegende Eigenschaften wie Expression, Lokalisation und Substratspezifität der acht bekannten humanen PRMTs vergleichend untersucht. In weiterführenden Experimenten soll mit Hilfe von GFP-Fusionsproteinen sowohl die Mobilität der PRMTs *in vivo* als auch ihre Fähigkeit zur Komplexbildung bzw. Substratbindung biochemisch und konfokalmikroskopisch charakterisiert werden.

Darauf aufbauend soll die funktionelle und strukturelle Bedeutung der Arginin-Methylierung von Proteinen am Beispiel eines wichtigen Substratproteins untersucht werden. Für diese Studien wurde das gut charakterisierte Protein „Scaffold Attachment Factor A“ (SAF-A) gewählt, das an mehreren Argininresten methyliert wird. Es ist wie zahlreiche andere Substrate der Arginin-Methylierung an zentralen genetischen Prozessen im Zellkern beteiligt. Welche Bedeutung diese posttranslationale Modifikation für die Proteinfunktionen von SAF-A *in vivo* hat ist bislang noch völlig ungeklärt.

Im Rahmen dieser Arbeit soll daher untersucht werden, welche Methyltransferase die Methylierung von SAF-A vermittelt, welche Aminosäuren *in vivo* modifiziert werden und welche Auswirkungen diese Modifikationen auf die Lokalisation und Mobilität von SAF-A haben.

3. Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Geräte, Chemikalien und Verbrauchswaren

Geräte

Bakterien-Inkubationsschüttler	Innova, NBS
Bakterienkulturröller	Innova, NBS
Brutschränke	HeraCell, Heraeus, Hanau
Durchflussscytometer	FACSCalibur, BD Biosciences
Elektrophoresekammern	Technik ,Universität Konstanz
Elektroporationssystem	GenePulser II, Bio-Rad, München
FACS-Gerät	FACSAria BD Biosciences
Geldokumentationsanlage	BioDocAnalyze, Biometra
Heizblock	HBT130-2, HLC
Konfokal-Lasermikroskop	LSM510 confocor II, Zeiss, Jena
PCR-Gerät	Mastercycler Gradient, Eppendorf, Hamburg
pH-Meter	Modell CG842, Schott, Hofheim
Röntgenfilme	Fuji SuperRX
Röntgenfilmentwickler	Classic E.O.S Typ 5270/100, Agfa
Semi-Dry-Blotter	Trans-Blot SD, Bio-Rad, München
Spannungsgeräte	PowerPac 300, Bio-Rad, München
	Modell E815, Consort, Belgien
Spectrophotometer	SmartSpec 3000, Bio-Rad, München
Sterilbank	HeraSafe HS15 Typ H, Heraeus, Hanau
Ultraschallgerät	Sonopuls HD 2070, Bandelin, Berlin
Waagen	BP121S, BP610, Sartorius, Göttingen
Zellkulturmikroskop	Axiovert 25, Zeiss, Jena
Zentrifugen	Super T21, Sorvall, Bad Homburg
	Modell 5415D, Eppendorf, Hamburg
	LC-70 Ultrazentrifuge, Beckman Coulter

Chemikalienliste

Acrylamid/Bisacrylamid Rotiphorese® 30	Roth
Adenosin 2'-3'-dialdehyd (Adox)	Sigma
Agar	Difco
Agarose	Sigma
Alzianblau 8GS	Fluka
Ammoniumpersulfat (APS)	Sigma
Bradford-Reagenz	Bio-Rad
Bromphenolblau	Roth
BSA (50 mg/ml)	NEB
Cäsiumchlorid	Roth
Coomassie-Brillant Blau R-250	Roth
Cycloheximid	Sigma

Dimethylsulfoxid (DMSO)	Merck
Dithiothreitol (DTT)	Roth
EDTA	Merck
Essigsäure	Merck
Ethanol p.a.	Merck
Ethidiumbromid	Roth
Glycerin (87 %)	Merck
Glycin	Roth
Hefeextrakt	Difco
Isopropanol	Merck
Magermilchpulver	Drogeriemarkt
2-Mercaptoethanol	Merck
Methanol p.a.	Merck
Natriumdeoxycholsäure	Fluka
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Roth
Natriumorthovanadat	Sigma
Natriumtetrathionat (NaTT)	Sigma
Nonidet® P40 Substitute	Fluka
Oligonukleotide	MWG-Biotech
Paraformaldehyd	Riedel de Haen
Polyethylenimin	Sigma
Ponceau S	Sigma
Protease Inhibitor Tabletten	Roche
Protein A Sepharose CL-4B	Amersham Pharmacia
Protein G Agarose	Pierce
PVDF-Membran	Millipore
Rotiblock 10x	Roth
S-Adenosyl-L-[methyl- ³ H]methionin	Amersham Pharmacia
Salzsäure 25 %	Merck
Sulfolink Coupling Gel	Pierce
TEMED	Roth
Tris	Merck
Triton X-100	Sigma
Trypton	Merck
Tween® 20	Promega
Zinkchlorid	Merck

Antibiotika

Ampicillin	Roche
Kanamycin	Sigma
Penicillin	PAA, Linz
Streptomycin	PAA, Linz

Enzyme

DNase, RNase	Roche
Micrococcus Nuklease	MBI Fermentas
Pfu-Turbo DNA-Polymerase	Stratagene
Restriktionsenzyme	NEB
smPAD	Sigma
T4-Ligase	Roche

Zellkultur

DMEM High Glucose Medium	PAA, Linz
Fötale Kälberserum (FCS)	PAA, Linz
G418-Sulfat (Geneticin)	PAA, Linz
Insulin	Sigma
Trypsin-EDTA Lösung (1x)	PAA, Linz
Zellkulturschalen (60 mm, 100 mm, 145 mm)	Greiner
35 mm Glasboden-Kulturschalen	MatTek, Ashland, USA

Größenmarker

DNA

GeneRuler 100bp ladder Plus	MBI Fermentas
Lambda DNA/Eco130I (Styl)/MluI Marker 17	MBI Fermentas

Protein

High Molecular Weight SDS-PAGE	Sigma
Low Molecular Weight SDS-PAGE	Sigma
Gel Filtration Molecular Weight Markers	Sigma

Kits

BigDye® Cycle Sequencing Kit	Applied Biosystems
ECL™ Detection Kit	Amersham Biosciences
GFX PCR-Purification/Gelband	Pharmacia
Minipräp Kit	Pharmacia
Anti-Citrulline (modified) Detection Kit	Upstate

3.1.2 Allgemeine Puffer und Lösungen

2x Sammelgelpuffer für SDS-Polyacrylamid-Gele

0.25 M Tris-HCl [pH6.8]
 7 mM SDS
 1 Spatelspitze Bromphenolblau

5x Trenngelpuffer für SDS-Polyacrylamid-Gele

1.86 M Tris-HCl [pH8.8]
 15 mM SDS

10x Laufpuffer für SDS-Polyacrylamid-Gele (5l)

151.5 g Tris
 720.5 g Glycin
 50 g SDS

10x Probenpuffer für SDS-Polyacrylamidgele

100 mM Tris-HCl [pH8.0]
 25 % (v/w) SDS
 50 % Mercaptoethanol
 0.25 % Bromphenolblau

50x TAE (Tris/Acetat/EDTA)

242 g Tris-Base
57.1 ml Essigsäure konz.
100 ml EDTA (0.5 M, pH8.0)
ad 1l H₂O bidest.

Alkalisches SDS

0.2 N NaOH
1 % (v/w) SDS

Coomassie-Färbe-Lösung

40 % (v/v) MetOH
10 % (v/v) Essigsäure, konz.
0.2 % (w/v) Coomassie Brillant Blau R250 in H₂O dest.

Coomassie Entfärber-Lösung

10 % (v/v) MetOH
40 % (v/v) Essigsäure, konz.
in H₂O dest.

GET

50 mM Glukose
10 mM EDTA
25 mM Tris [pH8.0]

LB-Medium (1 l)

10 g NaCl
10 g Trypton
5 g Hefeextrakt

Lysepuffer (IP)

150 mM NaCl
50 mM Tris-HCl [pH8.0]
1 % (v/v) Nonidet[®] P40
+Protease Inhibitor Tabletten (EDTA-frei)

Matrixpuffer 1

10 mM PIPES [pH6.8]
(Isotonischer Puffer 1) 100 mM NaCl
300 mM Sucrose
3 mM MgCl₂
0.5 % (v/v) Triton X-100
2 mM NaTT (frisch zugeben)

Matrixpuffer 2

10 mM PIPES [pH6.8]
(Extraktionspuffer 1) 250 mM (NH₄)₂SO₄
300 mM Sucrose
3 mM MgCl₂
0.5 % (v/v) Triton X-100

Matrixpuffer 3

10 mM PIPES [pH6.8]
(Isotonischer Puffer 2) 50 mM NaCl
300 mM Sucrose
3 mM MgCl₂
0.5 % (v/v) Triton X-100
200 U/ml DNaseI

Matrixpuffer 4

10 mM PIPES [pH6.8]
(Extraktionspuffer 2) 50 mM NaCl
250 mM (NH₄)₂SO₄
300 mM Sucrose
3 mM MgCl₂
0.5 % (v/v) Triton X-100

Matrixpuffer 5

10 mM PIPES [pH6.8]
(Extraktionspuffer 3) 1.7 M NaCl
300 mM Sucrose
3 mM MgCl₂
0.5 % (v/v) Triton X-100

PAD Puffer (1x)

50 mM Tris
2 mM DTT
5 mM CaCl₂

PBS (1x)

138 mM NaCl
2.7 mM KCl
12.7 mM Na₂HPO₄
1.5 mM KH₂PO₄
[pH7.4]

Ponceau-S-Lösung

0.2 % (w/w) Ponceau-S
5 % (v/v) Essigsäure, konz.

Quellpuffer

5 mM MgCl₂
10 mM Tris [pH7.4]

RIPA (1x)

50 mM Tris-HCl [pH8.0]
150 mM NaCl
1 % (v/v) Nonidet[®] P40 Substitute
0.5 % (w/v) Natriumdeoxycholsäure
0.1 % (w/v) SDS

Salzlösung

3 M Kaliumacetat

1.8 M Essigsäure

Semi-Dry Puffer für Western-Transfer

50 mM Tris-HCl [pH8.0]

40 mM Glycin

1.5 mM SDS

20 % (v/v) Methanol

SOC-Medium (1 l)

20 g Trypton

5 g Hefe

0.5 g NaCl

20 ml Glucose (1 M)

TE-Puffer (1x)

10 mM Tris-HCl [pH8.0]

1 mM EDTA-NaOH [pH8.0]

TNT-Puffer (10x)

100 mM Tris-HCl [pH8.0]

1.5 M NaCl

0.05 % (v/v) Tween® 20

WB-Elutionspuffer

62.5 mM Tris-HCl [pH6.7]

2 % SDS

100 mM 2-Mercaptoethanol

3.1.3 Antikörper, Vektoren und Oligonukleotide

Primäre Antikörper

Antikörper	Herkunft	WB / IF	IP
A232 (unmethyl. SAF-A)	Peptidantikörper	1:1000 / 1:400	10 µl
A465 (unmethyl. SAF-A)	Peptidantikörper	1:1000 / 1:400	10 µl
Citrullin	Abcam, ab6464	1:1000 / -	-
GFP	Roche, 11 814 460 001	1:1000 / -	8 µg
Dimethylarginin (asym24)	Upstate, #07-414	1:1000 / -	5 µg
Dimethylarginin (sym10)	Upstate, #07-412	1:1000 / -	-
GST	AG Hauber, HPI Hamburg	1:1500 / -	-
GST-HRP	Santa Cruz, sc-138	1:1500 / -	-
hnRNP-A (4B10)	Santa Cruz, sc-32301	1:1000 / -	-
hnRNP-C1/C2 (4F4)	Santa Cruz, sc-32308	1:2000 / -	3 µg
hnRNP-U (3G6)	Santa Cruz, sc-32315	1:1000 / -	5 µg
Histon H3	Abcam, ab1791	1:1000 / -	-
Lamin A/C	Santa Cruz, sc-20681	1:1000 / -	-
Monomethylarginin	Abcam, ab415	1:2000 / -	-
Monomethylarginin	Abcam, ab414	1:2000 / -	-
Myc-Tag (9B11)	Cell Signaling #2276	1:1000 / -	5 µg
PRMT1	Upstate, #07-404	1:1000 / 1:400	5 µg
PRMT2	Abcam, ab3763	1:200 / 1:30	-
PRMT3	Upstate, #07-256	1:500 / 1:30	-
PRMT4	Imgenex IMG-496	1:500 / 1:30	-
PRMT5	Upstate, #07-405	1:1000 / 1:30	-
PRMT6	Imgenex, IMG-506	1:1000 / 1:30	-
PRMT7	Upstate, #07-639	1:500 / 1:30	-
SAF-A (K371)	Polyklonal, Kaninchenserum	1:1000 / 1:300	-
SAF-A (7C8)	Alois Schepers, München	1:1000 / -	-
Sam68 (7-1)	Santa Cruz, sc-1238	1:1000 / -	-
αTubulin	Sigma Aldrich, T5168	1:2000 / -	-

WB = Western Blot, IF = Immunfluoreszenz, IP = Immunpräzipitation

Tabelle 3.1 **Verwendete primäre Antikörper.**

Sekundäre Antikörper

Im Westernblot wurden anti-Kaninchen-Peroxidase (A0545) und anti-Maus-Peroxidase (A9309) von Sigma mit einer Verdünnung von 1:50000 in TNT, + 0.5 % Magermilchpulver, eingesetzt. Bei der Immunfluoreszenz wurde Alexa Fluor 568 anti-Kaninchen (Ziege) von Molecular Probes in einer Verdünnung von 1:400 verwendet.

Vektoren

Vektor	(Fusions-) Protein	Insert	Herkunft
pEGFP-N1	eGFP	-	BD Biosciences
		hnRNP-C	D. Brook/Nottingham
		hPRMT8	M.T. Bedford/Texas
		SAF-A	Laborsammlung
pEGFP-C1	eGFP	-	BD Biosciences
		hPRMT1 (NM_198319)	M.T. Bedford/Texas
		hPRMT2	M.T. Bedford/Texas
		hPRMT3	M.T. Bedford/Texas
		hPRMT4	M.T. Bedford/Texas
		hPRMT5	M.T. Bedford/Texas
		hPRMT6	M.T. Bedford/Texas
		hPRMT7	M.T. Bedford/Texas
pDsRed-N1	dsRed	SAF-A	Laborsammlung
pCMV-Tag1	Myc-Tag	-	Stratagene
		SAF-A	Laborsammlung
pCMV-Sport1	-	cDNA	
		DKFZp762N1910Q3	RZPD, Berlin
pCMV-Sport6	-	cDNA	
		IRAKp961O0226Q2	RZPD, Berlin
pGEX(SN)	GST	PRMT1 (NM_198318)	H. Herschman/UCLA
		PRMT2	H. Herschman/UCLA

Tabelle 3.2 *Verwendete Vektoren.*

Primer für PRMT1 „site-directed“-Mutagenese

PRMT1in1: 5'-ACC TCT TCA AGG ACA AGG TGG CGG CGG CCG TCG GCT CGG
GCA CCG GCA T -3'

PRMT1in2: 5'-ATG CCG GTG CCC GAG CCG ACG GCC GCC GCC ACC TTG TCC
TTG AAG AGG T-3'

Ausgetauschte Nukleotide, die für Alanin kodieren, sind unterstrichen.

Primer für SAF-A „site-directed“-Mutagenese

R773Ko: 5'-GAG GGA ACT ACA ACA AAG GTG GAA TGC CCA AC-3'

R773Ku: 5'-GTT GGG CAT TCC ACC TTT GTT GTA GTT CCC TC-3'

R779Ko: 5'-GGT GGA ATG CCC AAC AAA GGG AAC TAC AAC CAG-3'

R779Ku: 5'-CTG GTT GTA GTT CCC TTT GTT GGG CAT TCC ACC-3'

R793Ko: 5'-GGA CGA GGA AAC AAT AAA GGC TAC AAA AAT CAA TC-3'

R793Ku: 5'-GAT TGA TTT TTG TAG CCT TTA TTG TTT CCT CGT CC-3'

Ausgetauschte Nukleotide, die für Lysin kodieren, sind unterstrichen.

Primer für SAF-A2:GFP Klonierung

A2vorn1: 5'-AGA TCG AGC TCA CGA AGG AGA AGC AAA CAC TG-3'

A2hinten: 5'-AGA TCA CCG GTG GCC GAT ACC CTT GGT ACC CGT A-3'

Die Schnittstellen für die entsprechenden Restriktionsenzyme (*AgeI*, *SacI*) sind unterstrichen.

Primer für Sequenzierung

EGFPupstream (bp 548-571 →, vor MCS in pEGFP-N1):

5'-GAG GTC TAT ATA AGC AGA GCT GGT-3'

EGFPdnstream (bp 787-810 ←, in eGFP-Gen von pEGFP-N1) :

5'-GGT CAG CTT GCC GTA GGT GGC ATC-3'

EGFPC (bp 1266-1287 →, vor MCS in pEGFP-C1):

5'-CAT GGT CCT GCT GGA GTT CGT G-3'

prmt1seq1 (bp 585-604 →, in PRMT1-Gen; NM_198319):

5'-GAC ATC ATC ATC AGC GAG TG-3'

prmt1seq2 (bp 883-903 →, in PRMT1-Gen; NM_198319):

5'-GAC ATC TAT ACC GTC AAG GTG-3'

prmt1seqrev (bp 574-594 ←, in PRMT1-Gen; NM_198319):

5'-GAT GAT GTC CAC CTT CTC CAC-3'

a2C250v (bp 1140-1161 →, in SAF-A2-Gen; AL834470):

5'-AGA TCG AAT TCT GCT CGA GGA GCC AGA GAT GGA CC-3'

a2C250h (bp 1969-1991 ←, in SAF-A2-Gen; AL834470):

5'-AGA TCG GAT CCG ACC CCG ACA GCC CCT GTT TTC CT-3'

Unterstrichene Sequenzen sind Primer-Überhänge. → gibt die Richtung der Sequenzierung an.

3.2 Methoden

3.2.1 Allgemeine Methoden

Die unten aufgeführten Methoden wurden nach Sambrook *et al.* (1989) oder den angegebenen Protokollen durchgeführt und werden im Text nicht näher erläutert.

- Agarose-Gelelektrophorese von DNA
- Coomassie-Färbung von Proteingelen
- Silberfärbung von Proteingelen (Wray *et al.*, 1981)
- Bestimmung von DNA-Konzentrationen
- CsCl-Dichtegradientenzentrifugation
- Proteinfällung nach Wessel und Flügge (1984)
- Bestimmung der Proteinmenge (Bradford, 1976)

3.2.2 Arbeiten mit Zellen

3.2.2.1 Zelltypen und Kulturbedingungen

Für sämtliche Experimente wurden, wenn nicht anders angegeben, die adhärente Zelllinie HEK293 (humane Embryo-Nierenzellen) verwendet. Die Zellen wurden in 145 mm und 100 mm Kulturschalen als Monolayerkultur in DMEM mit 10 % FCS (3.75 g/l NaHCO₃, 4.5 g/l Glukose) bei 37°C, 100 % Luftfeuchtigkeit, und 5 % CO₂ kultiviert. Weiterhin waren dem Medium 40 µg/ml Penicilin-G und 80 µg/ml Streptomycin-Sulfat zugesetzt worden. Die Zellen wurden alle 2-3 Tage geteilt, indem sie mit Trypsin (5 mg/ml in PBS) von der Kulturschale gelöst und 1:5 bzw. 1:10 passagiert wurden.

Sämtliche anderen verwendeten Zelllinien wurden wie von ATCC empfohlen kultiviert.

3.2.2.2 Inhibierung der Methylierung in Zellen

Zur Inhibierung der Methylierung in HEK293 Zellen und Gewinnung von hypomethyliertem Zellextrakt wird dem Kulturmedium 15 µm periodat oxidiertes Adenosin (Adenosin-2'-3'-dialdehyd, Sigma A7154) beigelegt und die Zellen nach 48 h entweder geerntet oder fluoreszenzmikroskopisch analysiert.

3.2.2.3 Chemische Transfektion eukaryotischer Zellen mit Polyethylenimin

24 h vor der Transfektion werden die HEK293 Zellen 1:10 geteilt. Zu 10 µg DNA werden 50 µl serumfreies Kulturmedium gegeben. Anschließend vermischt man die DNA mit 304.5 µl Polyethylenimin (PEI)-Arbeitslösung (4.5 µl 0.5 %ige PEI-Lösung + 300 µl serumfreies Medium) und inkubiert den Ansatz für 30 min bei RT. Das Medium der Zellen wird abgenommen und mit 3 ml frischem Medium ersetzt. Die Transfektionslösung wird tropfenweise auf die Zellen gegeben, gut gemischt und für 4 h unter Standard-Kulturbedingungen inkubiert. Anschließend wird das Medium gewechselt und die Zellen bis zur Analyse weiter kultiviert.

3.2.2.4 Herstellung stabiler Zelllinien

HEK293 Zellen werden zwei Tage nach der Transfektion mit neuem Medium (DMEM mit FCS und Penicillin/Streptomycin) versorgt, das G418 (Neomycin-Analog) in einer Endkonzentration von 1 mg/ml enthält. G418 ist ein Antibiotikum, das durch seine Bindung an Ribosomen und eine damit verbundene Blockierung der Proteinsynthese cytotoxisch wirkt. Voraussetzung für die Verwendung von G418 ist, dass der transfizierte Expressionsvektor neben dem zu exprimierenden Insert zusätzlich ein G418- bzw. Neomycinresistenzgen (*neo^r*) enthält; das Resistenzgen codiert für eine Aminoglykosid-3'Phosphotransferase (APH).

Durch die Aufrechterhaltung des Selektionsdruckes für mindestens 3-4 Wochen wird gewährleistet, dass nur Zellen überleben, die den Expressionsvektor stabil in ihr Genom integriert haben.

3.2.2.5 Langzeitlagerung eukaryotischer Zellen

Für die Langzeitlagerung von Zellen werden diese bei einer Konfluenz von 75 bis 100% trypsinisiert und in 5 ml DMEM (+FCS, +P/S, +10 % (v/v) DMSO) resuspendiert. Anschließend wird die Zellsuspension auf 1.5 ml Cryoröhrchen aliquotiert. Die Röhrchen werden fest verschraubt und in einen mit Isopropanol (RT) gefüllten Einfrierbehälter (Mr. Frosty) gestellt. Anschließend erfolgt die Tiefkühlung der Zellen bei –80°C über Nacht. Das Isopropanol fungiert als Isolationsmedium und führt zu einer konstanten Tiefkühlung der Zellen mit einer Rate von –1°C/min. Die Zellen werden für maximal 3 Wochen bei –80°C zwischengelagert. Die Langzeitlagerung der eingefrorenen Zellen erfolgt in flüssigem Stickstoff.

Für die Wiederaufnahme der Kultivierung von cryokonservierten Zellen werden diese bei 37°C im Wasserbad aufgetaut und anschließend der gesamte Inhalt des Cryoröhrchens

in eine mit vorgewärmten Medium (+FCS, +P/S) gefüllte 100 mm Kulturschale gegeben. Nach dem Absetzen der Zellen bzw. am nächsten Tag erfolgt ein Mediumwechsel.

3.2.2.6 Vorbereitung von Zellen für die Durchflusscytometrie

Für die Durchflusscytometrie wurden mit GFP-Konstrukten transfizierte HEK293 Zellen in 100 mm Kulturschalen verwendet. Nach zwei Tagen wurden die Zellen geerntet. Hierfür wurden die Zellen zweimal mit 10 ml 0,1 % (w/v) EDTA/1x PBS (4°C) gewaschen und durch Trypsin vom Plattenboden gelöst. Anschließend wurden die Zellen in 10 ml 0,1 % (w/v) EDTA/1xPBS (4°C) resuspendiert und zentrifugiert (5 min, 310 g, 4°C). Der Überstand wurde verworfen und das Pellet durch Klopfen gelockert. Dann wurden die Zellen in 700 µl 0.1 % (w/v) EDTA/1x PBS (4°C) resuspendiert und mit 10 ml Methanol (-20°C) fixiert. Um Zelltrümmer und ein Verklumpen der Zellen zu vermeiden, wurden Methanol und Zellen zeitgleich in ein konisch zulaufendes Plastikröhrchen pipettiert. Nach einer mindestens 20 minütigen Inkubation auf Eis wurden die Zellen über Nacht bzw. bis zur Durchflusscytometrie bei -20°C gelagert.

Die Durchflusscytometrie sowie die vorherige DNA-Färbung der fixierten Zellen mit Propidiumjodid wurden freundlicherweise von Daniel Speidel (HPI, Hamburg) vorgenommen.

Färbelösung

1:15 *Propidiumiodid-Stammlösung*

1:30 *RNase A-Stammlösung*

in PBS; jeweils frisch angesetzt, lichtgeschützt gelagert

Propidiumiodid-Stammlösung

0.5 mg/ml Propidiumiodid in 380 mM Natriumcitrat [pH7.0]. Lagerung lichtgeschützt bei 4°C

RNase A-Stammlösung

10 mg/ml RNase A in 10 mM Natriumacetat [pH5.2] lösen, 15 min kochen, nach langsamer Abkühlung auf RT pH-Wert durch Zugabe von 1/10 Volumen 1 M Tris-HCl [pH7.4] einstellen. Lagerung in Aliquote bei -20°C.

3.2.2.7 Analyse mittels FACS („Fluorescence Associated Cell Sorting“)

Für die fluoreszenzgestützte Zellsortierung wurden HEK293 Zellen verwendet, die sowohl stabil als auch transient (2 Tage) mit GFP-Konstrukten transfiziert waren. Für die FACS wurden die Zellen zweimal mit 1x PBS (RT) gewaschen und dann durch Trypsin vom Kulturschalenboden gelöst. Anschließend wurden die Zellen einer Zellkulturschale (100 mm) in 3 bis 5 ml 4% (v/v) FCS/1x PBS (RT) resuspendiert und durch ein Zellsieb (35 µm Ausschlussgröße) pipettiert. Direkt daran schloss sich die FACS an. Die Sortierungen wurden in Form von Massensortierungen vorgenommen. Hierbei wurden die GFP-positiven Zellen eines Transfektionsansatzes gesammelt und anschließend weiter kultiviert. Die Zellsortierungen wurden freundlicherweise von Arne Düsedau (HPI, Hamburg) durchgeführt.

3.2.2.8 Immunfluoreszenzfärbung eukaryotischer Zellen

Auf Alzianblau-beschichteten Deckgläschen (DG) gewachsene Zellen wurden zweimal mit 1x PBS gewaschen und mit 3.5 % (w/v) Paraformaldehyd (PFA) in 1x PBS für 20 min bei RT fixiert. Nach erneutem Waschen in 1x PBS wurden die DG zum Block reaktiver Aldehydgruppen für 10 min bei RT mit 100 mM Tris-HCl [pH7.5] inkubiert. Zur Membranpermeabilisierung wurden die Zellen mit 0.5 % (v/v) Triton X-100/1x PBS behandelt, nach 10 min kurz mit 1x PBS gewaschen und zur Absättigung unspezifischer AK-Bindestellen für eine Stunde bei RT mit 3 % (w/v) BSA/1x PBS geblockt. Nach erneutem Waschen in 1x PBS erfolgte die Inkubation mit in 1x PBS verdünntem primären AK für 2 h bei 37°C (in feuchter Kammer). Anschließend wurden die DG gründlich gewaschen und für 30 min bei 37°C mit dem sekundären AK in 1x PBS inkubiert. Nach erneutem Waschen wurden die DG in Antifadelösung eingebettet und fluoreszenzmikroskopisch untersucht.

Alternativ wurden die Zellen für 30 min mit kaltem Aceton (-20°C) fixiert und anschließend getrocknet. Die weiteren Schritte wurden wie oben beschrieben durchgeführt.

3.2.3 Mikroskopische Methoden

3.2.3.1 Konfokale Fluoreszenzmikroskopie

Mit dem Zeiss LSM510 confocor II wurden fixierte Zellen auf Objektträgern und lebende Zellen aufgenommen. Die Präparate der immungefärbten Zellen wurden, wie in *Kapitel 3.2.2.8* beschrieben, hergestellt. Für die *in vivo* Mikroskopie wurden mit GFP-Fusionsproteinen transfizierte HEK293 Zellen auf 35 mm Glasboden-Kulturschalen in 2 ml Medium kultiviert. Die Temperatur der Zellen wurde während der Versuche am Mikroskop durch einen beheizbaren Objektträgertischauflage konstant auf 37°C gehalten. Für die Aufnahme konfokaler Bilder wurden die in *Tabelle 3.3* genannten Einstellungen gewählt. Um das Ausbleichen der Fluorochrome zu minimieren, wurde die Leistung des Lasers der Fluoreszenzstärke der Zellen angepasst. Der Vergrößerungsfaktor variierte je nach Experiment und ist in den Aufnahmen durch einen Größenbalken angegeben.

Parameter	Einstellung
Auflösung	512 × 512 Pixel
Aufnahme	LP505 (GFP, Alexa Fluor 488) LP560 (Alexa Fluor 568)
Laser	Argon/2 458, 477, 488, 514 nm (GFP, Alexa Fluor 488), HeNe 1 543 nm (Alexa Fluor 568)
Scanspeed	9
Grund-Laserleistung (Argon)	50-70%
Konfokale Blende (Pinhole)	1 Airy
Objektiv	Plan-Apochromat 63× /1.4 Oil
Vergrößerung (Zoom)	variabel
Wellenlänge zur Anregung	488 nm (GFP) Leistung: 0,5-5%, 543 nm (DsRed) Leistung: 1-10%
Datentiefe	12 Bit

Tabelle 3.3 Parameter für konfokale Fluoreszenzmikroskopie.

3.2.3.2 „Fluorescence Recovery After Photobleaching“ (FRAP)

Mittels FRAP lässt sich die Mobilität bzw. die Diffusionsgeschwindigkeit von fluoreszierenden Molekülen in Lösungen sowie in lebenden Zellen untersuchen. Die Methode beruht darauf, dass die fluoreszierenden Moleküle innerhalb einer definierten

Region durch einen kurzzeitigen, hochenergetischen Laserpuls irreversibel geblichen („bleaching“) werden und anschließend die Rückkehr der Fluoreszenz („fluorescence recovery“), welche durch die Diffusion von nicht geblichenen Molekülen in die geblichene Region bedingt ist, über die Zeit verfolgt wird. Zudem bewegen sich geblichene Moleküle aus der geblichenen Region heraus. Es kommt zu einer Durchmischung geblichener und ungeblichener Moleküle.

Die FRAP-Experimente wurden an einem Konfokal-Lasermikroskop des Typs Zeiss LSM510 durchgeführt. Es wurden stabil mit GFP-Konstrukten transfizierte HEK293 Zellen verwendet, die in 35 mm Kulturschalen mit Glasbodeneinsatz kultiviert wurden. Die Zellen wurden während der Messung durch einen beheizbaren Objektträgertischaufsatz konstant bei 37°C gehalten.

Die Aufnahmen wurden bei einer Auflösung von 128x128, einer Datentiefe von 8 Bit und einem Vergrößerungsfaktor (Zoom) von 3-5 mit einem Öl-Immersionsobjektiv (Plan-Apochromat 63x / N.A. 1,4 Lochblendendurchmesser: 4 Airy) getätigt. Die Hauptleistung des Argon-Lasers wurde auf 85 % gesetzt. Die Anregung von GFP erfolgte durch eine Laser-Wellenlänge von 488 nm des Argon-Lasers, für die Detektion wurde ein 530 nm-Langpassfilter verwendet. Um das Bleichen während der Aufnahmen zu minimieren, wurde die Anregungsintensität des 488 nm-Lasers auf 1 % reduziert. Hingegen wurde für das aktive und irreversible Bleichen von GFP die Transmission der Laser bei Wellenlängen von 458, 477, 488 und 514 nm auf 100% gesetzt. Die rechteckige Bleichregion (ROI) deckte in x-Richtung die gesamte Breite des Kerns ab und hatte in y-Richtung eine Höhe von 15 Pixel (ca. 4.29 µm). Das Bleichen erfolgte für 40-80 Iterationen, d.h., der Laser fuhr die Bleichregion 40-80 mal ab. Direkt vor und nach dem Bleichen wurde eine gewisse Anzahl Bilder in konstanten zeitlichen Abständen aufgenommen, um den Verlauf der Fluoreszenzströme zu verfolgen. Gewöhnlich wurde die Anzahl der vor dem Bleichen aufzunehmenden Bilder auf 3 und die Gesamtzahl der aufzunehmenden Bilder auf 400 gesetzt. Die Verzögerung der Aufnahme aufeinanderfolgender Bilder wurde auf 0 ms gesetzt. Die Bilder wurden daher so schnell wie möglich nacheinander aufgenommen (~125 ms/Bild).

3.2.3.3 Auswertung von FRAP-Daten

Die Daten der FRAP-Experimente wurden mit Hilfe des Programms „ImageJ“ ausgewertet. Die Bilderserie von 300-400 Bildern pro Zelle wurde mit dem „Plug-In“ „LSM-Reader“ eingelesen. Mit den „Tools“ von „ImageJ“ können Regionen (ROI) festgelegt werden, in denen die Intensität der Fluoreszenz bestimmt werden soll. Dazu

wurden jeweils gleich große Bereiche in der geblichenen und der nicht geblichenen Region ausgewählt (s. Abb. 3.1). In diesen Bereichen kann das Programm „ImageJ“ die mittlere Intensität in allen Bildern bestimmen und die Daten in eine Texttabelle ausgeben.

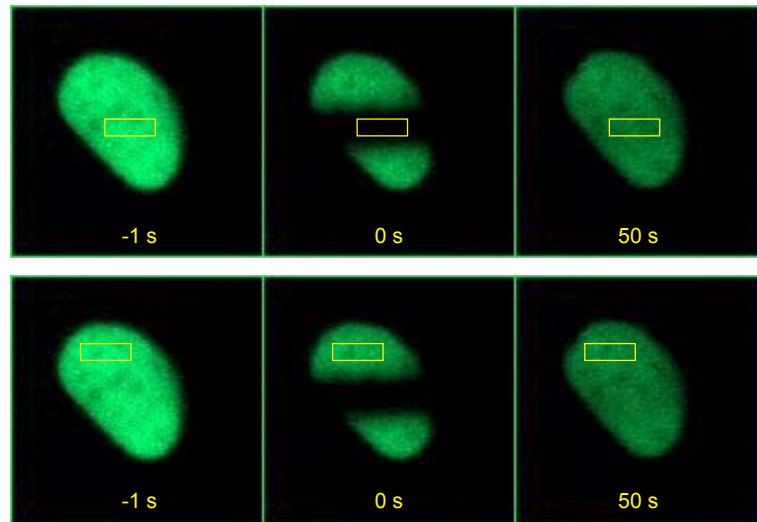


Abb. 3.1 Beispiel für die Auswertung von Zellen mit dem Programm „ImageJ“.

Es werden zwei Bereiche festgelegt, einer in der geblichenen (*obere Reihe*), einer in der nicht geblichenen Region des Zellkerns (*untere Reihe*). Das Programm misst die Fluoreszenzintensität in allen 400 Bildern. Die Daten werden in Form einer Texttabelle ausgegeben (aus Schwander, 2004).

3.2.3.4 Normalisierung und Darstellung der FRAP-Kurven

Die Daten der FRAP-Experimente wurden als Tabelle aus „ImageJ“ exportiert und in „MS Excel“ weiterverarbeitet. Das gemessene Fluoreszenzsignal in einer ROI wird auf die Veränderungen der totalen Fluoreszenz angeglichen, was in der folgenden Formel umgesetzt wird (Kim *et al.*, 2002):

$$I_{\text{rel}} = (T_t/T_0)/(I_{t0}/I_0)$$

Dabei ist T_t die Fluoreszenzintensität im geblichenen Bereich zu einem bestimmten Zeitpunkt t , T_0 die Fluoreszenzintensität im nicht geblichenen Bereich zu einem bestimmten Zeitpunkt t , I_{t0} die durchschnittliche Intensität in der geblichenen Region während der „pre-bleached“-Phase und I_0 die durchschnittliche Intensität in der nichtgeblichenen Region während der „pre-bleached“-Phase. Durch die Division I_{t0}/I_0 wird ein Korrekturfaktor gebildet, der die unterschiedlichen Intensitäten der ROIs im in- und out-Bereich angleicht. Die Zeit wird im Programm „Excel“ in Sekunden nach dem Bleichen angegeben.

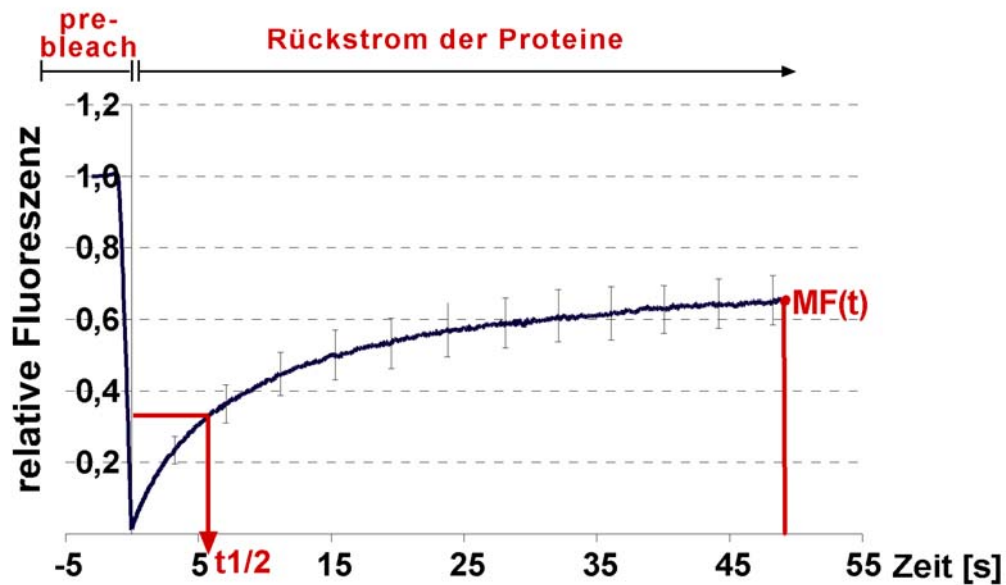


Abb. 3.2 Diagramm ausgewerteter FRAP-Daten.

Dargestellt ist eine exemplarische Auswertung der FRAP-Daten. Die Kurve stellt die Mittelwerte aller Daten dar, mit den daraus resultierenden Standardabweichungen, die in den Fehlerbalken ausgedrückt werden. $t_{1/2}$ bezeichnet die Diffusionszeit, nach der die Hälfte des Proteins in den geblichenen Bereich zurückgeflossen ist, $MF(t)$ die mobile Fraktion (aus Schwander 2004).

3.2.3.5 Regressionsanalyse der FRAP Daten

Eine nicht-lineare Regressionsanalyse der Daten zur Bestimmung der mobilen Fraktion ($MF(t)$), $t_{1/2}$ und des Diffusionskoeffizienten D wurde mit dem Programm „Prism 4“ (Graphpad Inc.) durchgeführt (vgl. Abb. 3.2). Alle FRAP-Kurven konnten mit der Weibull Funktion

$$F(t) = F_{\max} \cdot (1 - \exp(-K \cdot t^s))$$

optimal beschrieben werden. Dabei repräsentiert $F(t)$ die Fluoreszenz zum Zeitpunkt t , $F_{\max}$ die Asymptote der Rückflusskurve (entspricht $MF(t)$), K die Rückflusskonstante und s den Weibull “Form Parameter”. Dieser Parameter beschreibt die Änderung der exponentiellen Rückflussrate über die Zeit. Bei $s=1$ verwandelt sich die Weibull Funktion in eine Exponentialfunktion erster Ordnung.

$$F(t) = F_{\max} \cdot (1 - \exp(-K \cdot t))$$

In unseren Experimenten konnte mit dem Wert $s = 0.74$ eine signifikant bessere Näherung erreicht werden als mit der Exponentialfunktion erster Ordnung (s. Abb. 3.3).

Der Diffusionskoeffizient D (angegeben in $\mu\text{m}^2/\text{s}$) wurde aus $t_{1/2}$ mit folgender Formel berechnet:

$$D = \omega^2 / (4 \cdot \tau)$$

τ repräsentiert $t_{1/2}$ in Sekunden, und ω repräsentiert die Höhe der Bleichregion in μm (Axelrod *et al.*, 1976).

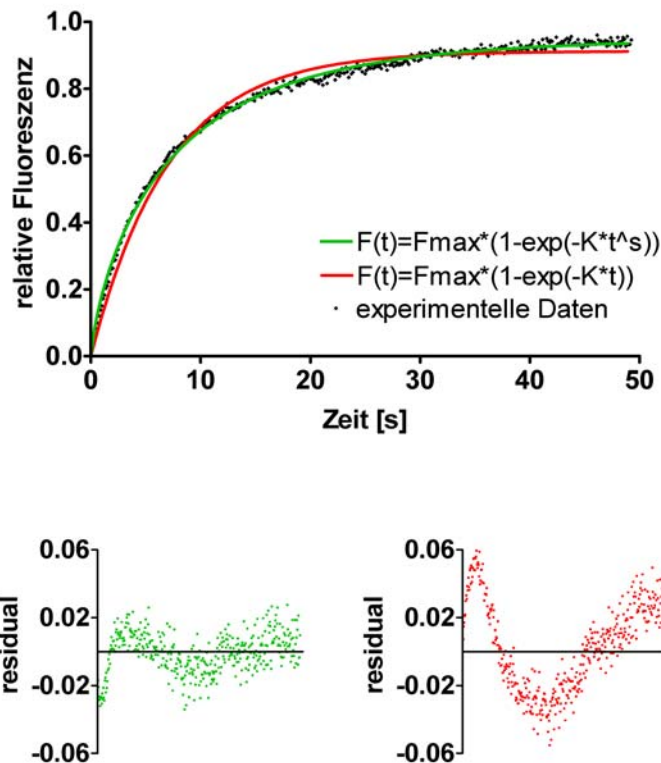


Abb. 3.3 Regressionsanalyse der Rückstromkurve von PRMT1:GFP.

Die experimentell ermittelten Rückstromkurven wurden mit einer Exponentialfunktion erster Ordnung (rot) und der Weibull-Funktion (grün) beschrieben. Die Abweichungen zwischen den experimentellen und den berechneten Kurven (unten) zeigen, dass mit der Weibull-Funktion (links) eine bessere Näherung als mit einer Exponentialfunktion erster Ordnung (rechts) erreicht wird.

3.2.3.6 Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie (FCS)

Das Prinzip der Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie (FCS) beruht auf der Beobachtung von Fluktuationen der Fluoreszenzsignale in einem möglichst kleinen Beobachtungsraum. Sind Messraum und Fluorophor-Konzentration klein genug, so kann der Ein- und Austritt einzelner Moleküle beobachtet werden. Zur Detektion wird ein Laserstrahl mit einer zum Fluorophor passenden Wellenlänge über ein Objektiv auf die Probe fokussiert. Die Fluoreszenz-Emission wird über das gleiche Objektiv aufgefangen, gefiltert und mit einer "Avalanche"-Photodiode (APD) detektiert. Durch eine Lochblende und die optische Fokussierung wird der Messraum auf unter einen Femtoliter verkleinert.

Die Korrelation des Signals erfolgt über ein angeschlossenes Computersystem. Korrelation bezeichnet das Ausmaß der wechselseitigen Beziehung zweier Größen. Bei der FCS ist damit die Übereinstimmung von Fluoreszenzsignalen in Abhängigkeit von der Zeit gemeint. Das Primärsignal einer FCS Messung stellt sich als Rauschen dar, das jedoch eine Vielzahl von Informationen enthält. Diese lassen sich über eine Korrelationsfunktion $G(\tau)$ erschließen, die aus allen Fluoreszenzintensitäten $F(t)$ einen normalisierten Korrelationskoeffizienten für jeden Zeitabstand (τ) liefert. In einer typischen Korrelationsfunktion wird $G(\tau)$ gegen den dekadischen Logarithmus von τ aufgetragen. $G(\tau)$ ist für kleine τ maximal, zeigt einen sigmoidalen Abfall und nähert sich bei langen τ dem Wert Null (Details in Bacia & Schwille, 2003).

Um die Mobilität von EGFP-Fusionsproteinen in Lösung mit FCS zu bestimmen, wurden die Zellen nach einem Protokoll von Wachsmuth *et al.* (2000) präpariert und anschließend in isotonem Tris-Puffer (20 mM Tris-HCl [pH7.4], 130 mM NaCl) verdünnt. Die Messungen wurden an einem Zeiss LSM 510/ConfoCor2 Mikroskop in Zellkulturschalen mit optischem Glasboden durchgeführt. Der konfokale Raum wurde in einem definiertem (200 μ l) Flüssigkeitsvolumen ca. 200 μ m oberhalb des Glasbodens positioniert. Vor jeder Messung wurde die Position der Lochblenden für optimale Signalstärke pro Partikel kalibriert. Folgende Parameter (s. *Tabelle 3.4*) blieben während allen Messungen gleich:

Parameter	Einstellung
Filter	AOTF; Langpass > 505 nm
Laser	Argon; 488 nm; 6 mA Röhrenstrom; 1 % Anregungsleistung
Objektiv	C-Apochromat; 40x; N.A. 1,26; Wasserimmersion
Temperatur	37°C
Partikelkonzentration	1 bis 5 / konfokalem Volumen
Blende	50 μ m Durchmesser
Messdauer	10 Sekunden

Tabelle 3.4 Parameter für Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie.

Filter und Anregungslaser wurden passend zu EGFP gewählt, dessen Anregungsmaximum bei 488 nm und Emissionsmaximum bei 510 nm liegt. Da FCS empfindlich auf Änderungen des Refraktionsindex reagiert, wurde ein verstellbares Wasser-Immersionsobjektiv verwendet. Für jedes untersuchte EGFP-Konstrukt wurden zwischen 3 bis 6 unabhängige Messungen mit jeweils 100 Autokorrelationskurven (Messdauer je Kurve: 10 s) durchgeführt. Um die Vergleichbarkeit zu Messungen *in vivo* zu erhalten, betrug die Messtemperatur konstant 37°C. Zur Analyse der Daten wurde die

Zeiss ConfoCor2 Software verwendet. Die Autokorrelationskurven wurden dabei mit einem Diffusionsmodell für eine frei diffundierende Komponente approximiert und ausgewertet (für Details und Grundlagen der verwendeten mathematischen Modelle siehe Handbuch des ConfoCor2 Systems). Durch die Approximation („curve fit“) erhält man die charakteristische Diffusionszeit τ_d eines Moleküls in Lösung. Somit kann der translationale Diffusionskoeffizient D über die Gleichung

$$D = \omega^2 / (4 \cdot \tau_d)$$

berechnet werden. Den Äquatorialradius ω des konfokalen Raumes erhält man durch Kalibrierungsmessungen mit Rhodamin-6-Grün (Rh6G). Es wurde ein Wert von $\omega = 159$ nm berechnet.

Zur Berechnung der hydrodynamischen Radien r_H der Moleküle (unter Annahme einer kugelförmigen Gestalt der Moleküle) wurde die Stokes-Einstein Gleichung

$$r_H = k \cdot T / (D \cdot 6 \pi \cdot \eta)$$

verwendet. Dabei repräsentiert k die Boltzmann Konstante und T die Temperatur (310K). Die Viskosität η der Lösung wurde in Messungen mit EGFP experimentell bestimmt (1.18 mPa*s). Die Berechnung des hydrodynamischen Radius r_H ermöglicht eine Abschätzung des Molekulargewichtes der Proteinkomplexe mittels der Gleichung

$$m = 4 \pi \cdot \rho \cdot N_A \cdot r_H^3.$$

Die durchschnittlichen Dichte ρ des Proteins wurde auf 1.2 g/cm³ festgelegt, und die Avogadrozahl hat den Wert $N_A = 6.022 \cdot 10^{23}$ mol⁻¹.

3.2.4 Molekularbiologische Methoden

3.2.4.1 Mutagenese-PCR

Zur Mutagenese einzelner Aminosäuren wurde eine „site-directed“ Mutagenese mittels PCR durchgeführt. Hierzu wurden spezielle ‚mismatch‘-Primer entworfen, die durch eine veränderte Nukleotidsequenz, im Vergleich zur Template-DNA, einen Aminosäureaustausch zur Folge haben (vgl. Abb. 3.4). Zur „site-directed“-Mutagenese von SAF-A wurden Primer verwendet, die einen Austausch der Aminosäure Arginin zu Lysin (R→K) bewirken. Bei diesen Primern kommt es während der Hybridisierung des ersten PCR-Zyklus zu Fehlpaarungen in einem Bereich von ein bis drei Nukleinsäuren. Zur Klonierung von *PRMT1mut* wurden die Primer *PRMT1in1* und *PRMT1in2* verwendet, die einen Austausch von drei nebeneinander liegenden Aminosäuren (VLD→AAA) verursachen. Der Bereich der Fehlpaarungen erstreckt sich hier während der Hybridisierung über neun Nukleotide.

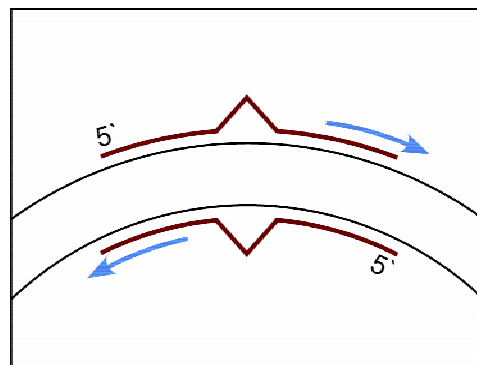


Abb. 3.4 Schematische Darstellung der Orientierung der Mutageneseprimer.

Die Amplifikation startet an den Primer (rot) mit dem ‚mismatch‘ (Dreieck). Die Richtung der Elongation wird durch die blauen Pfeile angegeben und erfolgt über den gesamten Vektor (aus Schwander, 2004).

Die Amplifikation des PCR-Produktes startet an den Primern und verläuft um den gesamten Vektor. Alle Mutationen wurden zunächst mit dem DNA-Template pEGFP-SAF-A, bzw. pCMV-SAF-A:myc durchgeführt. Die Mutante R773/779/793K entstand durch erneute Mutationen des Vektors R773K:GFP. Sämtliche verwendeten Primer sind unter *Kapitel 3.1.3* aufgeführt.

Um eine effektive und korrekte Amplifikation zu erreichen, wurde die thermostabile Turbo-*Pfu*-DNA-Polymerase aus *Pyrococcus furiosus* verwendet, die aufgrund ihrer Korrekturlesefunktion eine sehr niedrige Fehlerrate (1.3×10^{-6}) aufweist. Je PCR-Ansatz (50 μ l) wurden zu 10 ng Template-DNA 200 μ M dNTPs, 1-5% DMSO, 5 mM $MgSO_4$, je

10 pmol/Primer, 5 µl 10x *Pfu* Reaktionspuffer und 2.5 U Turbo-*Pfu*-DNA-Polymerase zugegeben und mit folgendem Programm amplifiziert:

Denaturierung:	95°C, 5 min
<u>30 Zyklen:</u>	
Hybridisierung/Extension:	68°C, 10 min
Denaturierung:	95°C, 30 sek
Finale Extension:	0

Tabelle 3.5 *Typisches Programm für Mutagenese-PCR.*

3.2.4.2 Klonierung von SAF-A2:GFP

Die cDNA-Vektoren DKFZp762N1910Q3 (AL834470) und IRAKp961O0226Q2 (BC029105) wurden beim Deutschen Ressourcenzentrum für Genomforschung GmbH (RZPD) in Berlin angefordert und die Plasmide mittels Maxipräparation aus *E. coli* isoliert. Beide Vektoren wurden mit dem Restriktionsenzym *Bam*HI geschnitten und mit dem GFX-Plasmidkit von Amersham Pharmacia Biotech nach Anleitung gereinigt. Anschließend wurden die geschnittenen Vektoren (0.6 µg) mit T4-Ligase (20U/Ansatz) und dem entsprechenden Puffer über Nacht bei 20°C ligiert. Die Amplifikation der für SAF-A2 kodierenden Sequenz erfolgte mittels PCR mit den Primern *A2vorn1* und *A2hinten*. Anschließend wurde das gesamte PCR-Produkt und der Vektor pEGFP-N1 (0.6 µg) mit den Restriktionsenzymen *Age*I und *Sac*I geschnitten, gereinigt und über Nacht bei 20°C ligiert. Die Ligationsansätze wurden erneut gereinigt und durch Elektroporation in *E.coli* XL-1blue transformiert. Nach anschließender Plasmidisolierung wurde die Klonierung des neuen Vektors pEGFP-SAF-A2 durch DNA-Sequenzierung überprüft.

3.2.4.3 Elektrotransformation von *E. coli*

Für die Transformation werden bei –70°C eingefrorene, kompetente *E. coli*-Zellen (XL1-blue, in 40 µl Aliquote) aufgetaut und auf Eis gestellt. Nach Zugabe von 1 ng gereinigter DNA wird die Elektroporation in vorgekühlten Küvetten (Spaltbreite 1 mm) mit einem Elektroporator (Gene-Pulser II, BioRad) bei 1.8 kV, 25 µF und 200 Ω durchgeführt. Anschließend werden die Zellen in 1 ml SOC-Medium überführt und nach 1 h bei 37°C auf Selektionsplatten ausplattiert (LB mit 1.6 % Agar und 50 ng/ml Kanamycin).

3.2.4.4 Plasmidisolierung aus *E. coli* (Minipräparation)

Von den Selektionsplatten werden Einzelkolonien in 1 ml LB-kan⁺ überimpft und bei 37°C für 4 h kultiviert.

Die Bakterien werden für 5 min abzentrifugiert (13200 rpm) und das Pellet in 100 µl GET (siehe unten) resuspendiert. Die Bakterien werden mit 200 µl alkalischen SDS lysiert und die Proteine sowie die bakterielle genomische DNA mit 150 µl Salzlösung gefällt. Der gesamte Ansatz wird 5 min abzentrifugiert, der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit kaltem EtOH (100 %) bei –20°C für 30 min gefällt. Der Ansatz wird erneut abzentrifugiert (13200 rpm, 15 min, 4°C) und der Überstand verworfen. Das getrocknete DNA-Pellet wird in 100 µl TE+RNase (250 ng/ml) aufgenommen und für 30 min bei 37°C inkubiert.

3.2.4.5 Plasmid-Isolierung aus *E. coli*-Zellen (Maxipräparation)

Plasmide wurden nach der Methode von Birnboim (1979) isoliert und anschließend über einen CsCl-Dichtegradient nach Sambrook *et al.* (1989) aufgereinigt.

3.2.4.6 DNA-Sequenzierung

Die Sequenzierung klonierter DNA-Fragmente erfolgte entsprechend der Dideoxy- oder Kettenabbruch-Methode nach Sanger (1977) unter Verwendung des „BigDye“-Kits von Applied Biosystems.

Ansatz:

1 µg	DNA-Template
10 pmol	spezifischer Primer
3 µl	Big Dye (Terminator-Cycle-Sequencing-Mix)
5 µl	2.5x Puffer
ad 20 µl	aqua dest.

Thermocycler-Programm:

25 Zyklen:	
Denaturierung:	96°C, 30 sek
Hybridisierung:	50°C, 5 sek
Extension:	60°C, 4 min

Anschließend wurde die DNA mit Ethanol gefällt und getrocknet. Die Sequenzanalyse erfolgte am Institut für Zellbiochemie und Klinische Neurobiologie, Hamburg.

3.2.5 Biochemische Methoden

3.2.5.1 Denaturierende SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Mittels SDS-PAGE lassen sich Proteine aufgrund ihrer verschiedenen Molekulargewichte auftrennen. Hierzu werden denaturierende Gele nach Laemmli (1970) und Thoma *et al.* (1979) verwendet. Je nach Molekulargewicht des zu untersuchenden Proteins werden Gele mit 7% bis 14% (w/v) Polyacrylamidgehalt eingesetzt.

3.2.5.2 Westernblot Analyse

Für den immunologischen Proteinnachweis werden die mittels SDS-PAGE elektrophoretisch aufgetrennten Proteine nach der Methode von Towbin *et al.* (1979) auf eine PVDF-Membran (Millipore Porengröße 0.45 µm) transferiert.

Der Transfer wird in einer Semi-Dry-Blot-Kammer der Firma BioRad durchgeführt und erfolgt bei 1 mA/cm² für 1h bei einer Geldicke von 0.7 mm. Nach dem Transfer wird die Membran mit Ponceau-S-Lösung reversibel angefärbt, um die Positionen der Markerproteine festzuhalten. Vor dem immunologischen Nachweis werden unspezifische Proteinbindestellen blockiert, indem man die Membran für 30 min in 1x Rotiblock-Lösung inkubiert. Anschließend folgt die Inkubation mit dem primären Antikörper (Verdünnung: 1:20 bis 1:2000 in TNT, je nach Antiserum) für 1h bei RT. Nach weiteren Waschschritten (3 x 5 min mit TNT) folgt eine 30 minütige Inkubation mit dem sekundären Peroxidasegekoppelten Antikörper (Verdünnung: 1:50000 in TNT, + 0.5 % Magermilchpulver). Die Nachweisreaktion erfolgt nach erneutem Waschen mit TNT (3 x 10 min) durch eine Chemilumineszenzreaktion mit dem ECL-System. Anschließend erfolgt eine Lumineszenz-Photographie auf Röntgenfilm. Bei vergleichenden Analysen wird ein Blot nachfolgend mit mehreren Antikörpern inkubiert. Als Zwischenschritt können die Antikörper der vorherigen Inkubation vom Blot eluiert werden. Dafür inkubiert man die Membran mit WB-Elutionspuffer für 30 min bei 70°C. Anschließend wird die Membran mit H₂O (2 x 10 min) und TNT (1 x 10 min) bei RT gewaschen.

3.2.5.3 Far Western Analyse

Zum Nachweis einer direkten Protein-Protein Wechselwirkung *in vitro* kann die sogenannte Far Western Analyse durchgeführt werden.

Endogenes SAF-A wurde aus Extrakt von HEK293 Zellen immungefällt und in zwei identische Aliquote aufgeteilt. Die immungefällten Proteine wurden mit SDS-PAGE aufgetrennt, auf eine PVDF-Membran transferiert und für eine Stunde in 1x PBS

renaturiert. Die Membran wurde in zwei Streifen geschnitten und eine weitere Stunde mit rekombinater PRMT1-GST (50 ng/ml in 1x PBS) bzw. der zehnfachen Menge GST-Protein inkubiert. Nach mehrmaligem intensivem Waschen in TNT wurden die gebundenen Proteine mit Meerrettichperoxidase-gekoppeltem anti-GST Antikörper und anschließender Chemilumineszenz detektiert.

3.2.5.4 Immunpräzipitation (IP) von Proteinen

Transfizierte Zellen werden 40-48 h nach der Transfektion, nicht transfizierte Zellen bei einer Konfluenz von 90-100 % geerntet. Die Zellen werden in Lysepuffer (1 ml/100 mm Platte) aufgenommen und für 20 sek auf Eis sonifiziert.

Anschließend wird das Zelllysat mit 10000g für 10 min bei 4°C abzentrifugiert. Für die Immunpräzipitation werden 3-5 µg Antikörper zu 1 ml des Überstandes gegeben und für 3 h bei 4°C inkubiert. Nach Zugabe von 30 µl Protein G Sepharose wird für eine weitere Stunde inkubiert. Die Sepharose wird 4-6 mal mit je 1 ml Lysepuffer und 1-2 mal mit je 1 ml 1x PBS gewaschen und der gebundene Immunkomplex anschließend durch kochen (90°C, 5 min) in 20-30 µl 2x SDS-Probenpuffer eluiert.

3.2.5.5 Mechanische Zellfraktionierung

Auf 100 mm Kulturschalen gewachsene Zellen werden für 5 min mit 3 ml Quellpuffer überschichtet und anschließend geerntet. Die Zellen werden in einem Dounce-Homogenisierer aufgeschlossen und die Zellkerne mit 1000 g für 5 min abzentrifugiert. Der Überstand wird abgenommen (Cytoplasmafraktion) und das Pellet (Kernfraktion) in 3 ml Wasser resuspendiert. Zur weiteren Analyse werden von jeder Fraktion 360 µl abgenommen und die enthaltenen Proteine mittels der Wessel-Flügge Methode gefällt.

3.2.5.6 Kernfraktionierung „in situ“

Die Kernfraktionierung von Zellkernen wurde leicht verändert nach Fey & Penman (1988) durchgeführt (Schema s. Abb. 3.5). HEK293 Zellen werden durch PEI-Transfektion mit den verschiedenen Konstrukten transfiziert und nach 24 h auf Alzianblau-beschichtete Deckgläschen (Ø13 mm) umgesetzt. Nach weiteren 24 h werden die Zellen fraktioniert. Dafür wäscht man die Zellen zweimal kurz mit PBS und überschichtet sie anschließend mit 100 µl/Deckgläschen Matrixpuffer 1. Zur Stabilisierung wird Natriumtetrathionat (Endkonzentration: 2 mM) zugegeben und der Ansatz 10 min bei RT inkubiert. Anschließend werden die Deckgläschen mit je 100 µl/Deckglas Matrixpuffer 2 überschichtet und für 10 min bei RT inkubiert. In einem weiteren Fraktionierungsschritt

werden die Kerne mit 100 µl Matrixpuffer 3 + 20 Einheiten DNase/100 µl für 20 min bei RT überschichtet und anschließend für 5 min mit Matrixpuffer 4 behandelt.

Im letzten Schritt fraktioniert man die Kerne mit Matrixpuffer 5. Anschließend werden sie mit Fixierlösung (1x PBS, 1x Hoechst 33258, 40 % Glycerin, 8 % Formaldehyd) fixiert. Die Analyse der Zellen erfolgte mittels Fluoreszenzmikroskopie.

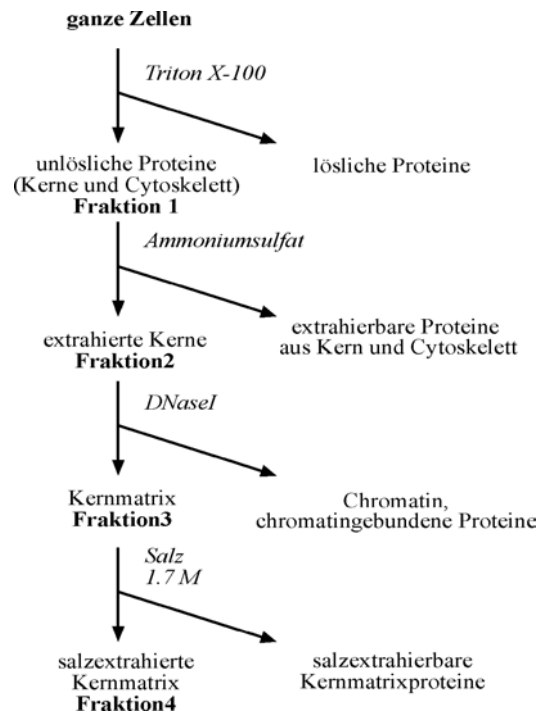


Abb. 3.5 Schema der Kernfraktionierung „in situ“.

3.2.5.7 Glyceringradientenzentrifugation

Zur Auftrennung der Proteine im nativen Zustand wurden Gradienten mit einem Glycerinanteil von 10-30 % (w/v) erstellt. Hierzu wurden elf verschiedene Glycerinkonzentrationen (10-30%, in 2% Abständen) in Lysepuffer hergestellt und manuell in Fraktionen von je 800 µl in Polyallomer-Zentrifugenröhrchen von Beckman gegossen. Auf den Gradienten wurde ca. 1 ml Ganzzelleextrakt in Lysepuffer aufgetragen. Die Zentrifugation erfolgte für 20 h bei 4°C und 25000 bzw. 30000 rpm in einem SW41 Ti-Rotor (Beckman). Die Gradienten wurden in je 11 Fraktionen (ca. 800 µl) von oben abgenommen und gelelektrophoretisch analysiert. Als Sedimentationsmarker dienten BSA (66kDa, 4.2S), β-Amylase (200kDa, 8.9S) und Apoferritin (443kDa, 17.6S).

3.2.5.8 *In vitro* Methylierungsassay

Bakteriell exprimierte und gereinigte oder aus Ganzzellextrakt immungefällte Methyltransferasen können in einem *in vitro* Methylierungsassay auf ihre Methylierungsaktivität getestet werden. Als Methylgruppen-Akzeptoren (Substrate) werden rekombinante Histone oder hitzeinaktivierte, hypomethylierte (s. Kapitel 3.2.2.2) Zellextrakte verwendet. Zur Herstellung dieser Zellextrakte werden Adox-behandelte Zellen in Wasser geerntet und die endogenen Methyltransferasen durch Erhitzen auf 70°C für 10 min inaktiviert. Ausgefallene Proteine werden abzentrifugiert (10 min, max. rpm) und der Überstand auf 1x PBS [pH7.5] eingestellt.

Für die Methylierungsreaktion wird folgender Ansatz pipettiert:

- 500 ng rekombinantes oder immungefälltes Protein (an 30 µl Protein G Sepharose)
- 5 µCi S-Adenosyl-L-[methyl-³H]Methionin (spezifische Aktivität 2.96 TBq/mmol)
- 20 µl hypomethylierter, hitzeinaktivierte Zellextrakt
- ad 60 µl 1x PBS

Die Reaktion wird bei 37°C für 2 Stunden inkubiert und anschließend mit 7 µl 10x SDS-Puffer versetzt. Zur Analyse wird der Ansatz durch SDS-PAGE aufgetrennt und die Proteine in mit Coomassie-Färbelösung angefärbt und zur Signalverstärkung für 45 min in enHance Reagenz (PerkinElmer Life Sciences) inkubiert. Abschließend werden die Proteingele in H₂O gewaschen (3 x 10 min), auf Whatman-Filterpapier getrocknet und die radioaktiv markierten Proteine mittels Fluorographie visualisiert.

3.2.5.9 *In vitro* Citrullinierungsassay

Die Aminosäure Arginin kann enzymatisch durch Peptidyl-Arginin-Deiminasen (PAD) in die basische, nicht-proteinogene Aminosäure Citrullin umgewandelt werden.

Für die Citrullinierungsreaktion wird folgender Ansatz pipettiert:

- Immungefälltes Protein (an 30 µl Protein G Sepharose) in 60 µl 1x PAD Puffer oder auf 1x PAD Puffer eingestellter Zellextrakt (60 µl aus 1 ml Ansatz)
- 1.5 µl gereinigte smPAD

Die Reaktion wird bei 37°C für 30 min inkubiert und anschließend mit 7 µl 10x SDS-Puffer versetzt. Analyse erfolgt durch SDS-PAGE und Westernblot mit spezifischem anti-Citrullin Antikörper.

3.2.5.10 Massenspektrometrie

Endogenes SAF-A wurde mit Protein G-Sepharose gekoppeltem (1 ml Hybridomaüberstand an 30 µl gesetzter Sepharose) anti-SAF-A Antikörper (7C8) aus Zellextrakt von $2 \cdot 10^6$ HEK293 Zellen immungefällt. Nach gründlichem Waschen in Lysepuffer und 1x PBS wurden die gebundenen Proteine mit 50 µl 1x Probenpuffer (+ 0.5 % (w/v) DTT) von der Sepharose eluiert, über SDS-PAGE aufgetrennt und mit Coomassie Brilliant Blau R250 angefärbt. Anschließend wurde die sichtbare Bande bei 120 kDa aus dem Gel ausgeschnitten. Die Analyse mittels „Matrix-assisted Laser Desorption Ionization/Time of Flight“ (MALDI-TOF) Massenspektrometrie, (Axima CRF, Shimadzu) wurde freundlicherweise am Heinrich-Pette-Institut von Dr. J. Heukeshoven/Abt. Tumorstudiologie durchgeführt. Zur Peptididentifizierung wurde das Programm Mascot von Matrix Science verwendet.

4. Ergebnisse

4.1 Lokalisation, Komplexbildung und Mobilität von Protein-Arginin-Methyltransferasen in humanen Zellen

Die Primärstruktur von Proteinen wird auf DNA-Ebene durch den genetischen Code festgelegt. Zudem kann die Zelle bereits neu synthetisierte Proteine durch posttranslationale Modifikationen verändern und somit z.B. ihre Lokalisation, Aktivität oder ihre Wechselwirkung mit anderen Proteinen regulieren. Die strukturelle und funktionelle Vielfalt von Proteinen in der Zelle kann dadurch um ein Mehrfaches erhöht werden. Es gibt zahlreiche solcher posttranslationaler Modifikationen mit unterschiedlichen biologischen Auswirkungen. Je nach Funktion können diese Modifikationen stabil oder transient sein. So stellen transiente Protein-Modifikationen wie die Phosphorylierung oder Acetylierung ein wichtiges regulatorisches Instrument der Zelle zum An- bzw. Ausschalten spezifischer zellulärer Reaktionen dar. Dagegen beeinflussen stabile posttranslationale Modifikationen wie Myristoylierung, Glykosylierung oder Ubiquitinierung die physikalisch-chemischen Eigenschaften von Proteinen, meist ohne direkten Einfluss auf die Aktivität eines Proteins.

Die in dieser Arbeit untersuchte Methylierung von Argininresten in Proteinen wurde zwar vor fast 40 Jahren zum ersten Mal an Proteinfractionen aus Kalbsthymus beschrieben (Paik & Kim, 1967), die physiologische Rolle der Arginin Methylierung ist jedoch trotz zahlreicher Veröffentlichungen noch immer weitgehend unklar (Übersicht in Bedford & Richard, 2005). In den letzten Jahren konnten in mehreren Arbeiten acht eng verwandte Protein-Arginin-Methyltransferasen (PRMTs) sowie zahlreiche ihrer Substrate und Wechselwirkungspartner identifiziert werden. Um die funktionelle Vielfalt der PRMT-Familie besser verstehen zu können, wurden im ersten Teil dieser Arbeit wichtige grundlegende Eigenschaften wie Expression, Lokalisation und Substratspezifität der acht bekannten humanen PRMTs vergleichend untersucht. In weiterführenden Experimenten wurde mit Hilfe von GFP-Fusionsproteinen sowohl die Mobilität der PRMTs *in vivo* als auch ihre Fähigkeit zur Komplexbildung biochemisch und konfokalmikroskopisch untersucht.

4.1.1 Lokalisation endogener Protein-Arginin-Methyltransferasen

Erste Aussagen über eine mögliche Funktion bzw. über potenzielle Interaktionspartner von Proteinen können manchmal durch ihre intrazelluläre Verteilung getroffen werden. Die Lokalisation der acht PRMT-Familienmitglieder wurde bereits zuvor in verschiedenen

Zelllinien beschrieben, allerdings variieren die Ergebnisse der einzelnen Studien z.T. beträchtlich. Um einen direkten Vergleich der subzellulären Lokalisation aller nicht-membranassoziierten PRMTs in einer humanen Zelllinie zu ermöglichen, wurden HEK293 Zellen auf Deckgläschen kultiviert, mit kommerziellen Antikörpern gegen PRMT1 bis PRMT7 nach einem identischen Protokoll immungefärbt (s. *Kapitel 3.2.2.8*) und fluoreszenzmikroskopisch fotografiert (*Abb. 4.1*).

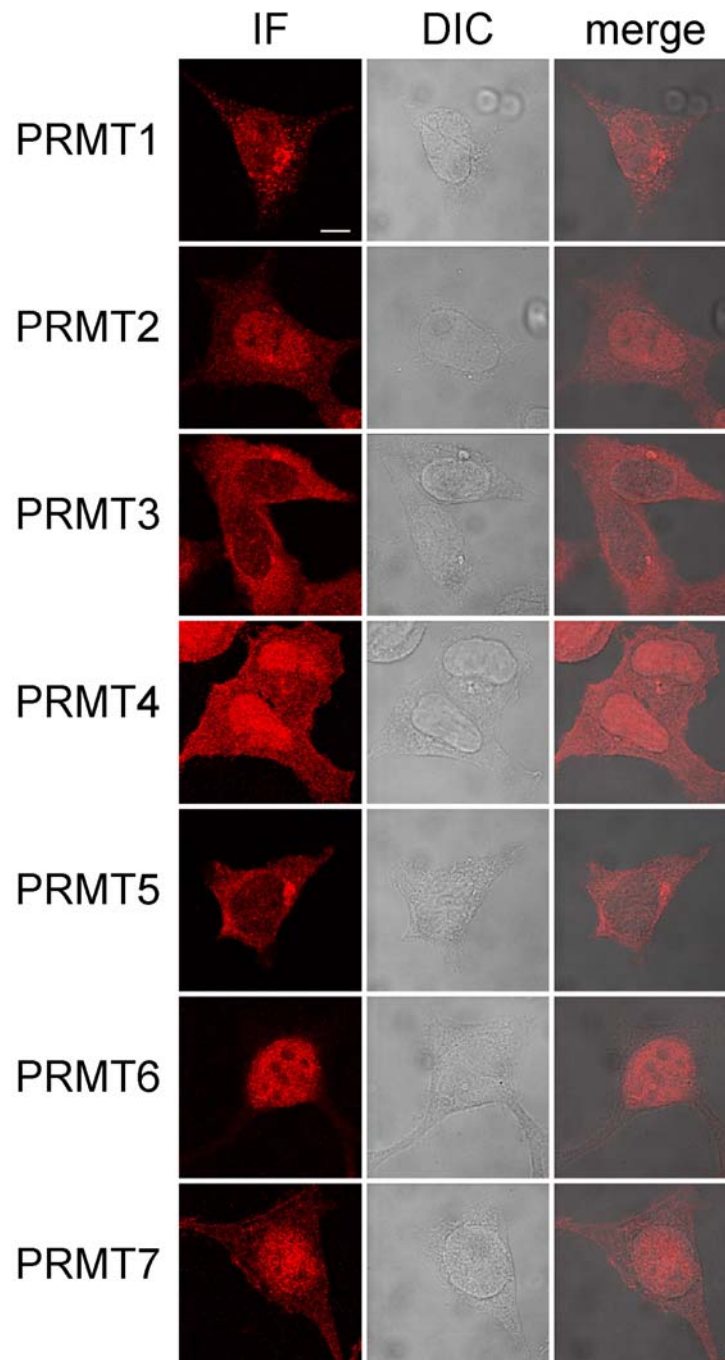


Abb. 4.1 Lokalisation endogener Protein-Arginin-Methyltransferasen.

HEK293 Zellen wurden auf Deckgläschen kultiviert und mit Antikörper gegen PRMT1 bis PRMT7 immungefärbt (IF). Anschließend wurden die Zellen konfokal fluoreszenzmikroskopisch analysiert und fotografiert. Zum Vergleich wurden die Zellen zusätzlich im differentiellen Interferenz Kontrast (DIC) aufgenommen. Balken, 10 µm.

Dabei zeigten sich erhebliche Unterschiede in der Lokalisation der einzelnen Methyltransferasen. PRMT2, PRMT4 und PRMT7 waren hauptsächlich im Zellkern, aber auch in signifikanter Menge im Cytoplasma zu beobachten. PRMT3 und PRMT5 waren wie bereits beschrieben überwiegend im Cytoplasma lokalisiert (Tang *et al.*, 1998; Rho *et al.*, 2001), während PRMT6, als einzige Arginin-Methyltransferase mit einer bekannten NLS, fast ausschließlich im Nukleus zu beobachten war. Die Lokalisation der in eukaryotischen Zellen vorherrschenden Arginin-Methyltransferase PRMT1 wurde in bisherigen Arbeiten sehr unterschiedlich beschrieben, was möglicherweise durch die Verwendung verschiedener Zelllinien erklärt werden kann (Tang *et al.*, 1998 ; Frankel *et al.*, 2002; Cote *et al.*, 2003).

Interessanterweise war die Lokalisation endogener PRMT1 sehr stark abhängig von der für die Immunfluoreszenz verwendeten Fixierungsmethode. So konnte bei der Standardfixierung der Zellen mit Paraformaldehyd (PFA) eine überwiegende Anreicherung des Proteins im Zellkern und eine schwächere, granuläre Fluoreszenz im Cytoplasma beobachtet werden. Bei einer Fixierung der Zellen mit Aceton veränderte sich dies deutlich hin zu einer vorwiegend cytoplasmatischen Lokalisation von PRMT1 (Abb. 4.2). Die Lokalisation der anderen PRMTs war jedoch unabhängig von der verwendeten Fixierungsmethode (*Daten nicht gezeigt*). Um zu klären, welche Fixierungsmethode die subzelluläre Verteilung von PRMT1 am besten wiedergibt, wurden HEK293 Zellen biochemisch fraktioniert und die cytoplasmatische bzw. nukleäre Fraktion im Westernblot auf Anwesenheit von PRMT1 getestet. Dabei zeigte sich wie bei der Fixierung mit Aceton eine signifikante Anreicherung des Proteins im Cytoplasma (Abb. 4.2, rechts).

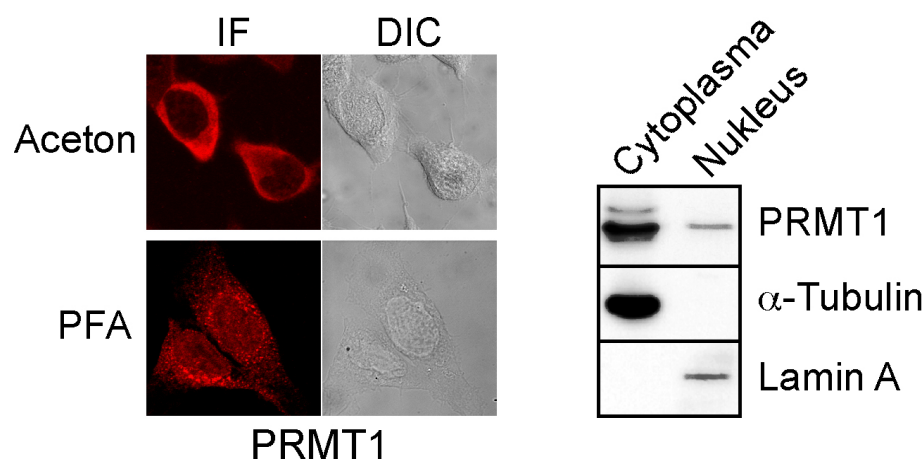


Abb. 4.2 Fixierungsabhängige Lokalisation endogener PRMT1.

Links: HEK293 Zellen wurden auf Deckgläschen kultiviert, mit Aceton bzw. Paraformaldehyd (PFA) fixiert und mit Antikörper gegen PRMT1 immungefärbt. Anschließend wurden die Zellen fluoreszenzmikroskopisch untersucht und fotografiert (IF). Zum Vergleich wurden die Zellen im differentiellen Interferenz Kontrast (DIC) aufgenommen. *Rechts:* HEK293 Zellen wurden in eine cytoplasmatische und eine nukleäre Fraktion aufgetrennt und im Westernblot auf Anwesenheit von PRMT1 getestet. Zur Kontrolle wurden die gleichen Fraktionen mit Antikörper gegen α -Tubulin (cytoplasmatisch) und Lamin A (nukleär) angefärbt.

4.1.2 Expression und enzymatische Aktivität der PRMT:GFP-Konstrukte

Die Charakterisierung der Diffusionseigenschaften von Proteinen kann wichtige Erkenntnisse bezüglich ihrer Wechselwirkung mit anderen Proteinen erbringen. Für spätere *in vivo* „Fluorescence Recovery after Photobleaching“ (FRAP)-Mobilitätsstudien und zur Bestimmung der Komplexgrößen der einzelnen PRMTs mittels Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie (FCS) wurden in einer Zusammenarbeit mit Mark T. Bedford (Universität von Texas, Smithville) GFP-Fusionsproteine aller acht humanen PRMTs hergestellt. Um sicherzustellen, dass die PRMT:GFP-Fusionsproteine identische Eigenschaften wie ihre endogenen Äquivalente besitzen, wurden sie bezüglich ihrer Expression, Lokalisation und Aktivität sowohl biochemisch als auch mikroskopisch untersucht. Dazu wurden HEK293 Zellen stabil mit den PRMT:GFP-Expressionsvektoren transfiziert und anschließend nach Fluoreszenzintensität mittels „Fluorescence Associated Cell Sorting“ (FACS) sortiert. Alle stabil exprimierten GFP-Fusionsproteine zeigten im SDS-PAGE mit anschließendem Westernblot die erwartete Größe. Sie unterschieden sich jedoch deutlich in ihrer Expressionsstärke (*Abb. 4.3 A*). Transient transfizierte Zellen exprimierten im Gegensatz dazu nahezu identische Mengen der PRMTs (*Daten nicht gezeigt*). Die Expressionsmenge der stabil transfizierten PRMTs wird daher vermutlich durch selektive Maßnahmen in der Zelle reguliert.

Alle GFP-Fusionsproteine wurden außerdem auf ihre enzymatische Aktivität getestet (*Abb. 4.3 B*). Dazu wurden die stabil transfizierten Fusionsproteine mit anti-GFP-Antikörper aus HEK293 Ganzzelextrakten immungefällt und zusammen mit S-Adenosyl-L-[methyl-³H]Methionin (³H-SAM) und hypomethyliertem Ganzzelextrakt (*Abb. 4.3 B, oben*) bzw. rekombinanten Histonen H2A/B, H3 und H4 (*Abb. 4.3 B, unten*) in einem *in vitro* Methylierungsexperiment eingesetzt. Die Substratproteine, die durch die Methylierung radioaktiv markiert wurden, wurden durch SDS-PAGE mit anschließender Fluorographie visualisiert.

PRMT1, -4, -6 und -8 zeigten die stärksten enzymatischen Aktivitäten, mit jeweils charakteristischer Substratspezifität. Zudem war bei einer sehr langen Exposition des Films eine spezifische Substratbande von PRMT5 bei einer Größe von ca. 30 kDa und eine schwache Methylierung von Histon H3 und H4 zu beobachten. (*Daten nicht gezeigt*). Für die Fusionsproteine PRMT2, -3 und -7:GFP konnte keine spezifische Aktivität nachgewiesen werden, was eventuell durch die vergleichsweise schwache Expression von PRMT3 und -7 zu erklären ist (vgl. *Abb. 4.3 A*). Nur bei sehr langer Exposition waren auch bei diesen PRMTs Substratbanden zu erkennen, die sich jedoch nicht von der unspezifischen Hintergrundaktivität in der Kontrollspur unterschieden.

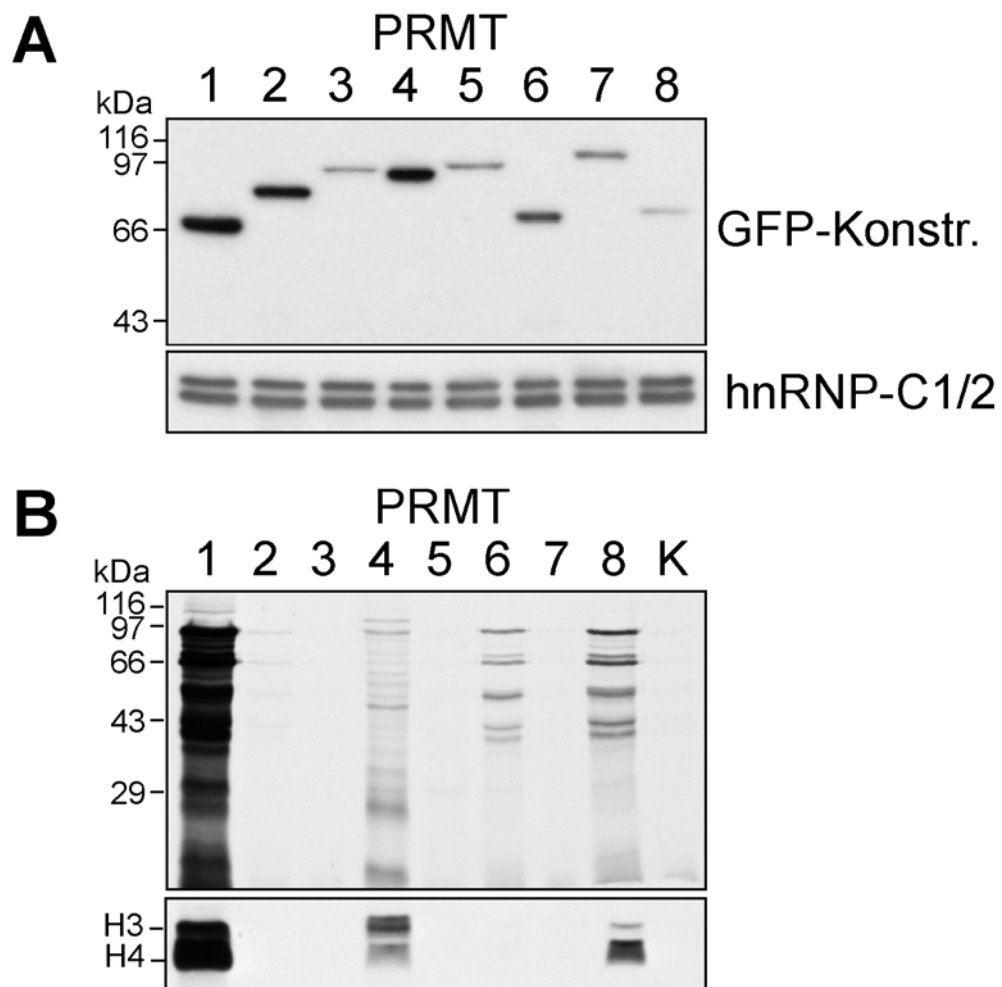


Abb. 4.3 Expression und Aktivität der PRMT:GFP-Fusionsproteine.

HEK293 Zellen wurden stabil mit PRMT:GFP Konstrukten transfiziert. **(A)** Vergleich der Expressionsmengen von GFP-Fusionsproteinen im Westernblot mit α GFP-Antikörper. Als Ladekontrolle diente hnRNP-C. **(B)** radioaktiver Aktivitätsnachweis. PRMT:GFP Konstrukte wurden aus Ganzzellextrakten mit α GFP-Antikörper immungefällt und zusammen mit 3 H-SAM und hypomethyliertem Ganzzellextrakt (*oben*) bzw. rekombinanten Histonen (*unten*) in einem Methylierungsexperiment eingesetzt. Substratproteine mit eingebauten Radionukliden wurden durch SDS-PAGE mit anschließender Fluorographie visualisiert. Als Kontrolle diente ein Ansatz ohne immungefällte PRMT.

4.1.3 Lokalisation der PRMT:GFP-Konstrukte

Um zu klären, ob die GFP-Fusionsproteine eine ähnliche subzelluläre Lokalisation wie ihre endogenen Äquivalente zeigen, wurden stabil transfizierte HEK293 Zellen mit konfokaler Fluoreszenzmikroskopie untersucht (Abb. 4.4). Die Fusionsproteine von PRMT2, -3, -5, und -6 lokalisieren identisch wie die endogenen PRMTs nach Immunfärbung mit spezifischen Antikörpern. PRMT4 und PRMT7 sind etwas stärker cytoplasmatisch angereichert als ihre endogenen Äquivalente (vgl. Abb. 4.1). PRMT1:GFP zeigt ein Lokalisationsmuster wie endogene PRMT1 bei Immunfluoreszenz-Aufnahmen nach Aceton-Fixierung (vgl. Abb. 4.2). PRMT8 ist, wie bereits von Lee *et al.* (2005a) beschrieben, ein membranassoziertes Protein.

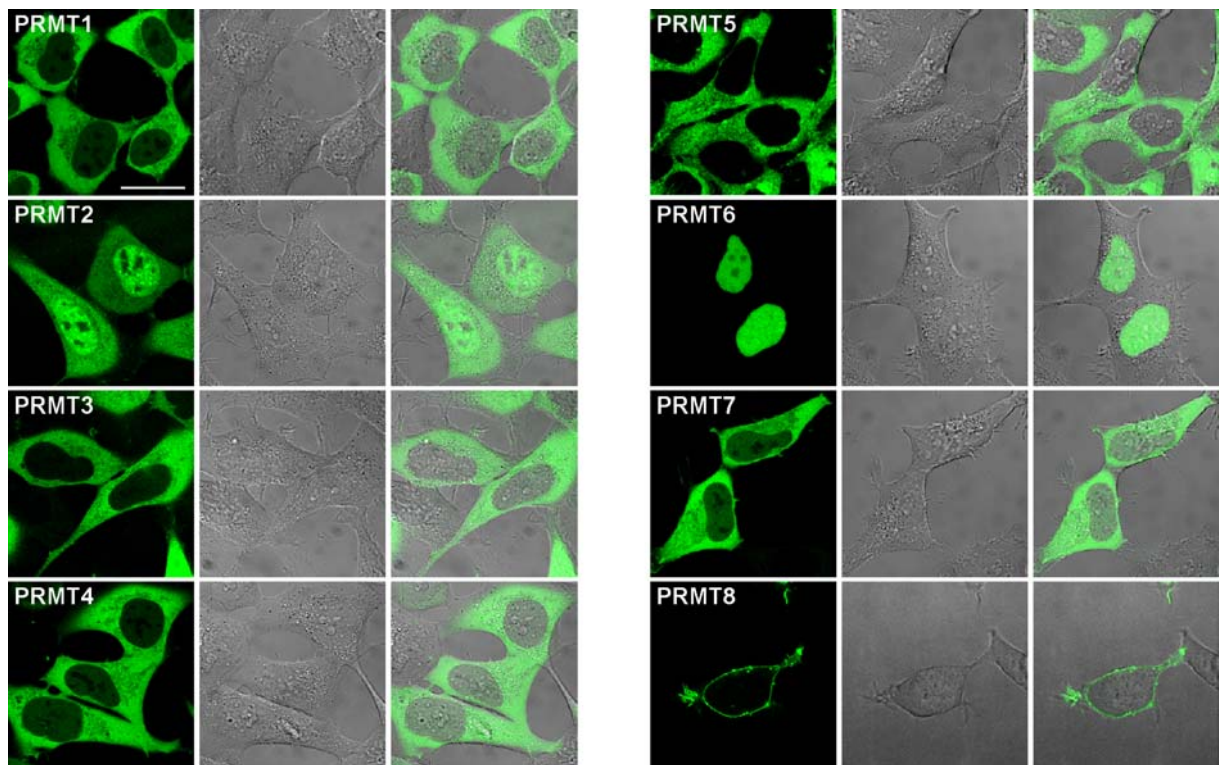


Abb. 4.4 *Typische Lokalisation der PRMT:GFP-Fusionsproteine.*

Konfokale Schnitte durch typische, stabil mit PRMT1 bis PRMT8:GFP transfizierte HEK293 Zellen. Zum Vergleich wurden die Zellen im differentiellen Interferenz Kontrast (DIC) aufgenommen. Balken, 25 μ m.

4.1.4 Bestimmung der Komplexgrößen von PRMT1-7 durch Zentrifugation über Glyceringradienten

Um zu untersuchen, ob die endogenen PRMTs und ihre entsprechenden GFP-Fusionsproteine in identischen Komplexen vorhanden sind, wurde das Sedimentationsverhalten der Proteine im Glyceringradienten miteinander verglichen. Ganzzelextrakte aus stabil transfizierten HEK293 Zellen wurden gemischt und die Proteinkomplexe über Glyceringradientenzentrifugation sedimentiert. Anschließend wurden die Fraktionen im Westernblot mit Antikörper gegen GFP bzw. gegen endogene PRMT1-7 untersucht (Abb. 4.5).

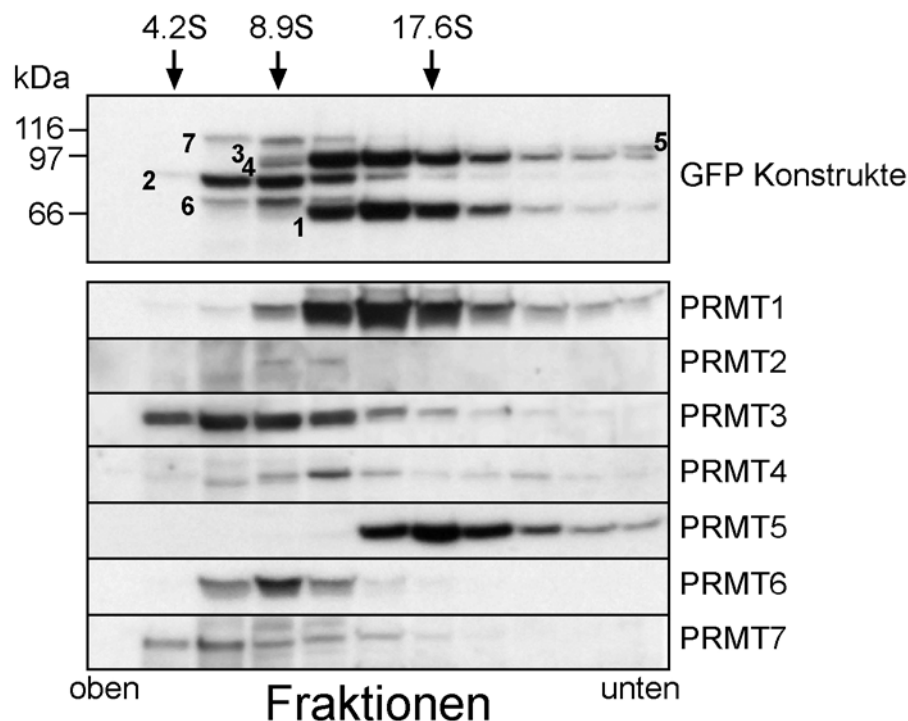


Abb. 4.5 Bestimmung der Komplexgrößen von PRMTs durch Glyceringradientenzentrifugation. Eine Mischung von Ganzzelextrakten aus stabil mit PRMT1-7:GFP transfizierten, sortierten HEK293 Zellen wurde auf einen 10-30%-igen Glyceringradienten geladen. Die Auftrennung der Proteine erfolgte durch Zentrifugation (30000 rpm, 20h, 4°C) und anschließender Gelelektrophorese der von oben abgenommenen Fraktionen. Die Detektion der Fusionsproteine erfolgte durch Westernblot mit α GFP-Antikörper. Die PRMT:GFP Fusionsproteine sind durch ihre jeweilige Nummer markiert. Gleichzeitig wurde die Sedimentation endogener PRMTs untersucht und mit kommerziellen Antikörpern gegen PRMT1-7 im Westernblot nachgewiesen. Als Sedimentationsmarker dienten BSA (66kDa, 4.2S), β -Amylase (200kDa, 8.9S) und Apoferritin (443kDa, 17.6S).

Dieses Experiment zeigt, dass sämtliche GFP-Fusionsproteine in ähnlichen oder identischen Komplexgrößen wie ihre entsprechenden endogenen PRMTs sedimentieren und daher mit großer Sicherheit Teil der gleichen Proteinkomplexe *in vivo* sind. PRMT2, -3, -6 und -7 zeigen ein typisches Migrationsverhalten von Monomeren oder kleinen

oligomeren Komplexen. Von PRMT1, -4 und -5 ist bekannt, dass sie als Bestandteil größerer (Multi-) Proteinkomplexe mit sich selbst und einer ganzen Reihe von weiteren Proteinen interagieren (Lim *et al.*, 2005; Xu *et al.*, 2004, Friesen *et al.*, 2001a). Das Sedimentationsverhalten im Glyceringradienten bestätigt diese Ergebnisse, denn sowohl die endogenen PRMTs als auch die entsprechenden GFP-Fusionsproteine sedimentierten in Proteinkomplexen mit einer Größe von über 200 kDa. Einzig das Sedimentationsverhalten von PRMT5:GFP unterschied sich deutlich von dem endogener PRMT5. Dieses Fusionsprotein scheint in sehr großen, unlöslichen Proteinkomplexen zu aggregieren, die bereits fluoreszenzmikroskopisch zu beobachten sind (Abb. 4.6). Die vorangegangenen Experimente deuten darauf hin, dass alle untersuchten PRMT:GFP Fusionsproteine mit Ausnahme von PRMT5:GFP korrekt exprimiert werden und in verschiedenen funktionellen Proteinkomplexen integriert sind. Sie eignen sich daher gut für weitere *in vivo* Lokalisations- und Mobilitätsstudien.

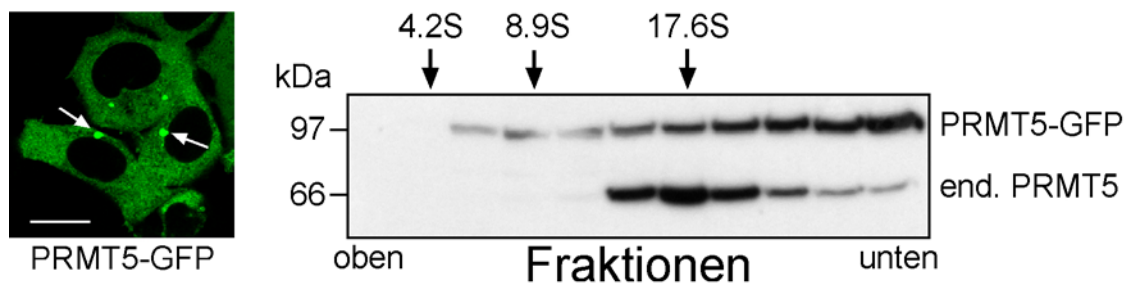


Abb. 4.6 Aggregation von PRMT5:GFP in unlöslichen Proteinkomplexen.

Links: Konfokale Fluoreszenzaufnahme von stabil exprimierter PRMT5:GFP in HEK293 Zellen. Die Pfeile markieren große Proteinkomplexe im Cytoplasma. Balken, 10 μ m. *Rechts:* Vergleich des Sedimentationsverhaltens von endogener PRMT5 und PRMT5:GFP im Glyceringradienten. Details s. Abb. 4.5.

4.1.5 Bestimmung der Komplexgrößen von PRMTs durch Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie

Durch die Bestimmung der Komplexgrößen mittels Glyceringradientenzentrifugation konnten erste Daten über das Komplexierungsverhalten von PRMTs gewonnen werden. Um quantitative Aussagen über die exakte Größe der Proteinkomplexe treffen zu können, wurden die Diffusionseigenschaften PRMT:GFP-Fusionsproteine durch konfokale Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie (FCS) in verdünnten Ganzzellextrakten untersucht.

Die Autokorrelationskurven wurden mit einem Diffusionsmodell für eine frei diffundierende Komponente approximiert („curve fit“) und, wie in Kapitel 3.2.3.6 beschrieben, ausgewertet. Die Abbildung 4.7 zeigt typische Autokorrelationskurven der

einzelnen PRMTs. Durch die Approximation erhält man die charakteristische Diffusionszeiten τ_d der Proteinkomplexe in Lösung. Aus diesen lassen sich ihre ungefähre Größe und Masse berechnen (s. *Tabelle 4.1*). Die PRMTs waren, wie bereits im Glyceringradient beobachtet, in unterschiedlich großen Komplexen gebunden:

PRMT6 und PRMT7 zeigen Diffusionseigenschaften von Monomeren. PRMT2 diffundiert als Dimer und PRMT3 als Tetramer. Die beiden PRMTs mit den meisten bekannten Interaktionspartnern, PRMT1 und PRMT4, sind erwartungsgemäß Teil sehr großer (Multi)-Proteinkomplexe. Für PRMT5 konnte keine verlässliche Aussage getroffen werden. Wie schon mikroskopisch und biochemisch beobachtet, bildet PRMT5 große unlösliche Aggregate mit einer Masse von mehreren Megadalton.

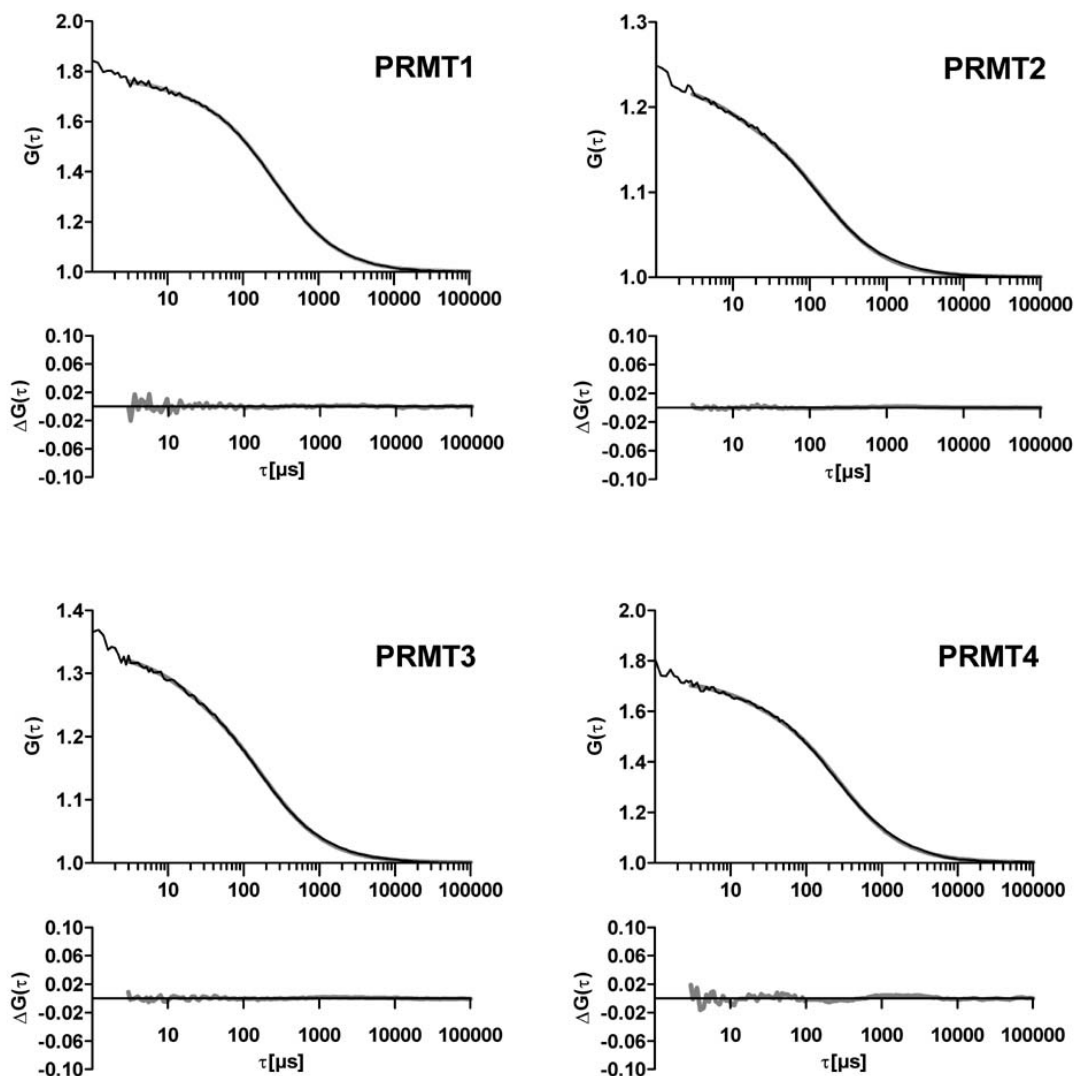


Abb. 4.7a Diffusionseigenschaften der PRMT:GFP-Fusionsproteine in Lösung.

Gezeigt sind Autokorrelationskurven (schwarz) aus Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie (FCS)-Messungen von PRMT:GFP-Fusionsproteinen in Lösung. Näherungskurven (grau) wurden durch Approximation mit einem 1-Komponentenmodell errechnet. $\Delta G(\tau)$ gibt die Abweichung der Näherungskurve von den experimentellen Daten an.

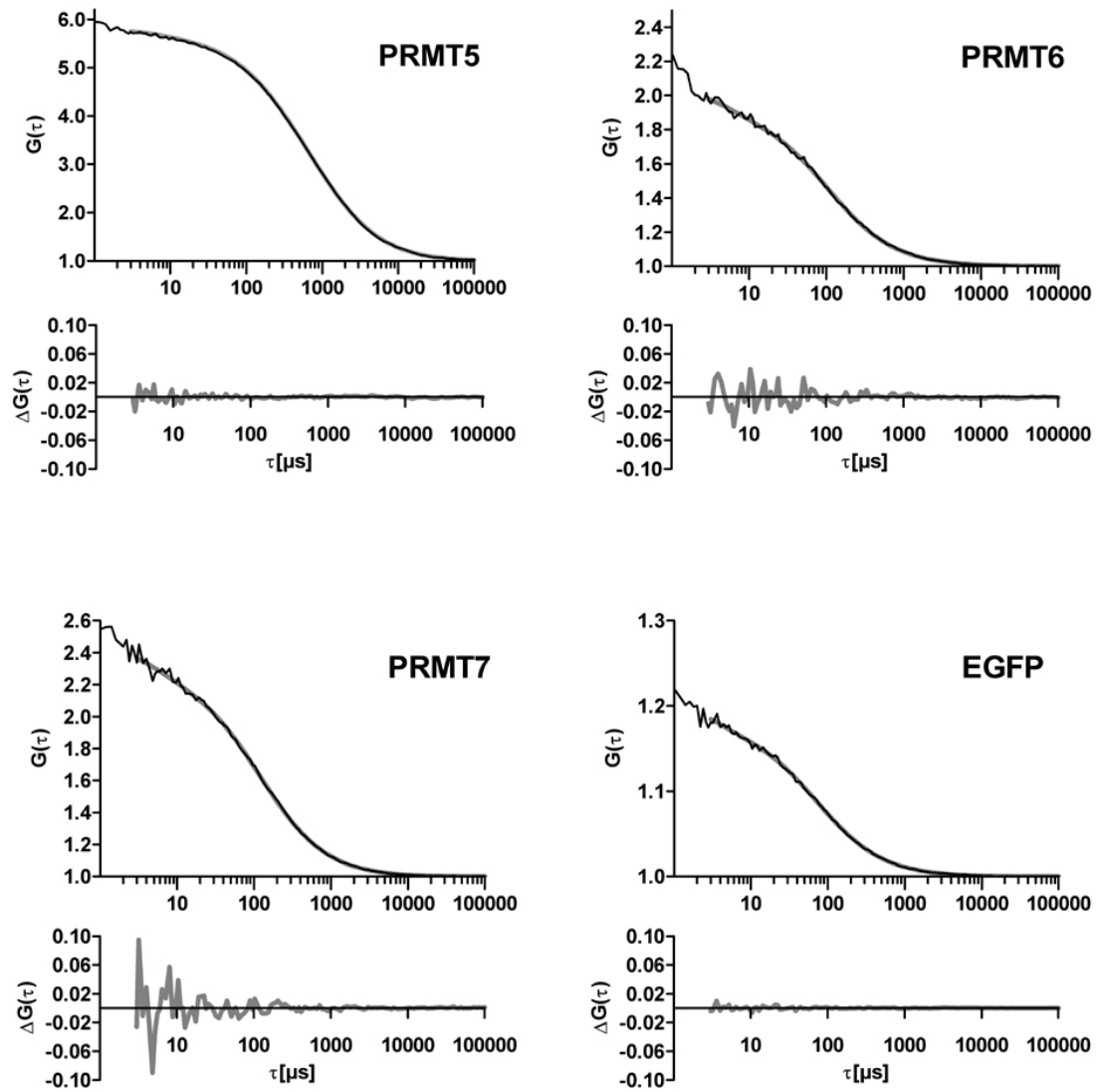


Abb. 4.7b Diffusionseigenschaften der PRMT:GFP-Fusionsproteine in Lösung.
 Legende: siehe vorige Seite.

Protein	$\tau \pm \text{sem}$	$D \pm \text{sem}$	$r_H \pm \text{sem}$	approx. Masse $\pm \text{sem}$	Masse Monomer
	[μs]	[$\mu\text{m}^2/\text{s}$]	[nm]	[kDa]	[kDa]
PRMT1	272.6 $\pm$ 6.5	23.3 $\pm$ 0.6	8.3 $\pm$ 0.2	1743 $\pm$ 140	72
PRMT2	122.3 $\pm$ 3.2	51.8 $\pm$ 1.5	3.7 $\pm$ 0.1	157 $\pm$ 14	78
PRMT3	167.8 $\pm$ 6.2	37.7 $\pm$ 1.5	5.1 $\pm$ 0.2	419 $\pm$ 52	96
PRMT4	261.0 $\pm$ 3.0	24.2 $\pm$ 0.2	7.9 $\pm$ 0.1	1519 $\pm$ 60	90
PRMT5	641.2 $\pm$ 33.5	10.0 $\pm$ 0.6	19.5 $\pm$ 1.1	23389 $\pm$ 3729	100
PRMT6	100.1 $\pm$ 0.6	63.2 $\pm$ 0.5	3.0 $\pm$ 0.1	85 $\pm$ 2	72
PRMT7	116.8 $\pm$ 2.5	54.2 $\pm$ 1.3	3.6 $\pm$ 0.1	137 $\pm$ 10	115
EGFP	70.3 $\pm$ 0.9	90.2 $\pm$ 1.1	2.1 $\pm$ 0.1	29 $\pm$ 1	30

Tabelle 4.1 Quantitative Auswertung der Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie.

Diffusionskoeffizient D , hydrodynamischer Radius r_H und die approximierte Masse der Moleküle wurden, wie in Kapitel 3.2.3.6 beschrieben, berechnet. Alle Angaben sind Mittelwerte (MW) $\pm$ Standardfehler der MW (sem).

In einem weiteren Experiment wurde untersucht, ob die Komplexbildung von PRMTs abhängig von ihrer enzymatischen Aktivität ist. Zur Inhibierung der Methylierungsreaktion wurden Zellen für 48 h mit Adenosin-Dialdehyd (perjodat-oxidiertes Adenosin, Adox) behandelt. Adox wirkt dabei als spezifischer Inhibitor der S-Adenosylhomocystein-(AdoHcy)-Hydrolase, wodurch die intrazelluläre Konzentration an AdoHcy steigt und eine Endprodukthemmung der Methyltransferasen verursacht wird (O`Dea *et al.*, 1987). Dadurch kommt es zu einer Anreicherung unmethylierter Substrate in der Zelle. Die Effizienz der Inhibierung wurde durch den Nachweis hypomethylierter Substratproteine bestätigt (Abb. 4.8 A). In hypomethylierten Zellen konnte zudem eine wie von Côté *et al.*, (2003) beschriebene cytoplasmatische Anreicherung des RNA-bindenden Proteins Sam68 beobachtet werden (Abb. 4.8 B). Die Lokalisation von Scaffold Attachment Factor A (SAF-A) blieb unverändert. Die Behandlung der Zellen mit Adox ist nicht cytotoxisch und hat keinen signifikanten Einfluss auf den Zellzyklus (Abb. 4.8 C). Die Inhibierung hatte allerdings keinen Effekt auf die Diffusionseigenschaften der verschiedenen PRMTs. Die gemessenen Diffusionszeiten von Fusionsproteinen aus unbehandelten bzw. Adox-behandelten Zellextrakten waren nahezu identisch (Tabelle 4.2).

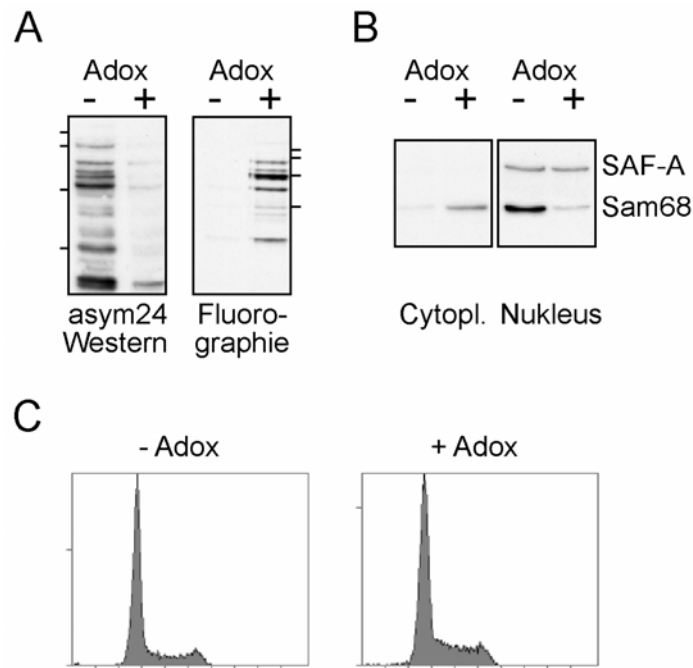


Abb. 4.8 Inhibierung der Methylierung von PRMT Substraten durch Adenosin-Dialdehyd (Adox). (A) Ganzzellextrakte aus unbehandelten bzw. mit Adox behandelten Zellen wurden im Westernblot auf Anwesenheit von asymmetrisch dimethyliertem Arginin getestet (AK: asym24, links). Identische Extrakte dienten als Substrat für ein radioaktives *in vitro* Methylierungsexperiment mit ^3H -SAM und rekombinanter PRMT1-GST (s. Kapitel 3.2.5.8). Die methylierten Proteine wurden durch Fluorographie sichtbar gemacht. (B) Cytoplasmatische Anreicherung von Sam68 in Adox-behandelten Zellen. Unbehandelte und Adox-behandelte Zellen wurden in eine cytoplasmatische und eine nukleäre Fraktion aufgetrennt und im Westernblot mit Antikörper gegen SAF-A und Sam68 immungefärbt. (C) Behandlung mit Adox hat keinen signifikanten Einfluss auf den Zellzyklus. Stabil mit PRMT1:GFP transfizierte HEK293 Zellen wurden 48 h lang mit 15 μM Adox behandelt bzw. unbehandelt gelassen. Zur Bestimmung des DNA-Gehaltes der Zellen wurden Durchflußcytometrie-Messungen durchgeführt. Pro Histogramm wurden 10000 Zellen vermessen (Ordinate: Zellzahl; Abszisse: DNA-Gehalt).

Protein	- Adox	+ Adox
	$\tau \pm \text{sem}$ [μs]	$\tau \pm \text{sem}$ [μs]
PRMT1	272.6 $\pm$ 6.5	278.4 $\pm$ 14.7
PRMT2	122.3 $\pm$ 3.2	137.0 $\pm$ 1.3
PRMT3	167.8 $\pm$ 6.2	159.3 $\pm$ 7.0
PRMT4	261.0 $\pm$ 3.0	267.3 $\pm$ 8.6
PRMT5	641.2 $\pm$ 33.5	710.0 $\pm$ 14.0
PRMT6	100.1 $\pm$ 0.6	121.0 $\pm$ 4.2
PRMT7	116.8 $\pm$ 2.5	108.5 $\pm$ 2.0
EGFP	70.3 $\pm$ 0.9	n.d.

Tabelle 4.2 Vergleich der Diffusionszeiten +/- Adox-Behandlung.

Angegeben sind die durch Approximation erhaltenen charakteristischen Diffusionszeiten τ_d der Proteinkomplexe in Lösung. Alle Angaben sind Mittelwerte (MW) $\pm$ Standardfehler des MW (sem).

4.1.6 Die Mobilität von PRMTs *in vivo*

Die Mobilität von Proteinen in der lebenden Zelle wird durch zahlreiche Faktoren erheblich beeinflusst, wie z.B. lokale Unterschiede der Viskosität oder Interaktionen mit anderen Proteinen bzw. Makromolekülen. Um zu untersuchen, in welchem Ausmaß transiente Wechselwirkungen oder stabile Komplexbildungen die Dynamik der einzelnen PRMTs *in vivo* beeinflussen, wurden „Fluorescence Recovery after Photobleaching“ (FRAP)-Experimente mit allen bekannten humanen PRMTs in stabil transfizierten HEK293 Zellen durchgeführt. Innerhalb eines definierten Bereichs, der sich über Cytoplasma und Zellkern einer Zelle erstreckte, wurde die GFP-Fluoreszenz durch kurzzeitige, hochenergetische Laserpulse geblichen und anschließend der Rückstrom fluoreszierender Proteine aus ungeblichenen Bereichen in den geblichenen Bereich über die Zeit verfolgt. Bereits die rein visuelle Betrachtung der Fluoreszenzrückströme ließ Unterschiede im Diffusionsverhalten der einzelnen PRMT-Fusionsproteine erkennen (*Abb. 4.9*). Zur Quantifizierung des Rückstroms wurden die Fluoreszenzhelligkeiten in ausgewählten Bereichen der mikroskopischen Aufnahmen bestimmt. Dies ermöglicht die Berechnung der Zeit bis zum Wiedererlangen der halben Fluoreszenzintensität ($t_{1/2}$) und davon ausgehend des Diffusionskoeffizienten D der untersuchten Proteine über eine nicht-lineare Regressionsanalyse (Details s. *Kapitel 3.2.3.5*).

Aufgrund der höheren Viskosität im Nukleus wird die Diffusion von inerten Molekülen etwa um den Faktor 2–3 im Verhältnis zum Cytoplasma reduziert. Tatsächlich diffundierte nukleär lokalisierte PRMT2 um den Faktor 3.5 langsamer als die cytoplasmatische Fraktion des Proteins (vgl. Diffusionskoeffizienten in *Tabelle 4.3, oben*) ähnlich wie das Kontrollprotein GFP allein. Dies deutet darauf hin, dass entweder die Mobilität von PRMT2 nicht signifikant durch transiente, ortsabhängige Wechselwirkungen mit anderen Proteinen beeinflusst wird oder dass PRMT2 sowohl im Zellkern als auch im Cytoplasma mit Proteinkomplexen ähnlicher Größe assoziiert ist.

Interessanterweise konnte bei PRMT3 kein Unterschied in der Mobilität zwischen cytoplasmatischer und nukleärer Fraktion beobachtet werden. Dies deutet darauf hin, dass transiente Wechselwirkungen mit anderen Proteinen zu einer verlangsamten Diffusion von PRMT3 im Cytoplasma führen. Alle anderen sowohl im Zellkern als auch im Cytoplasma lokalisierten Proteine wiesen eine niedrigere Mobilität im Zellkern auf.

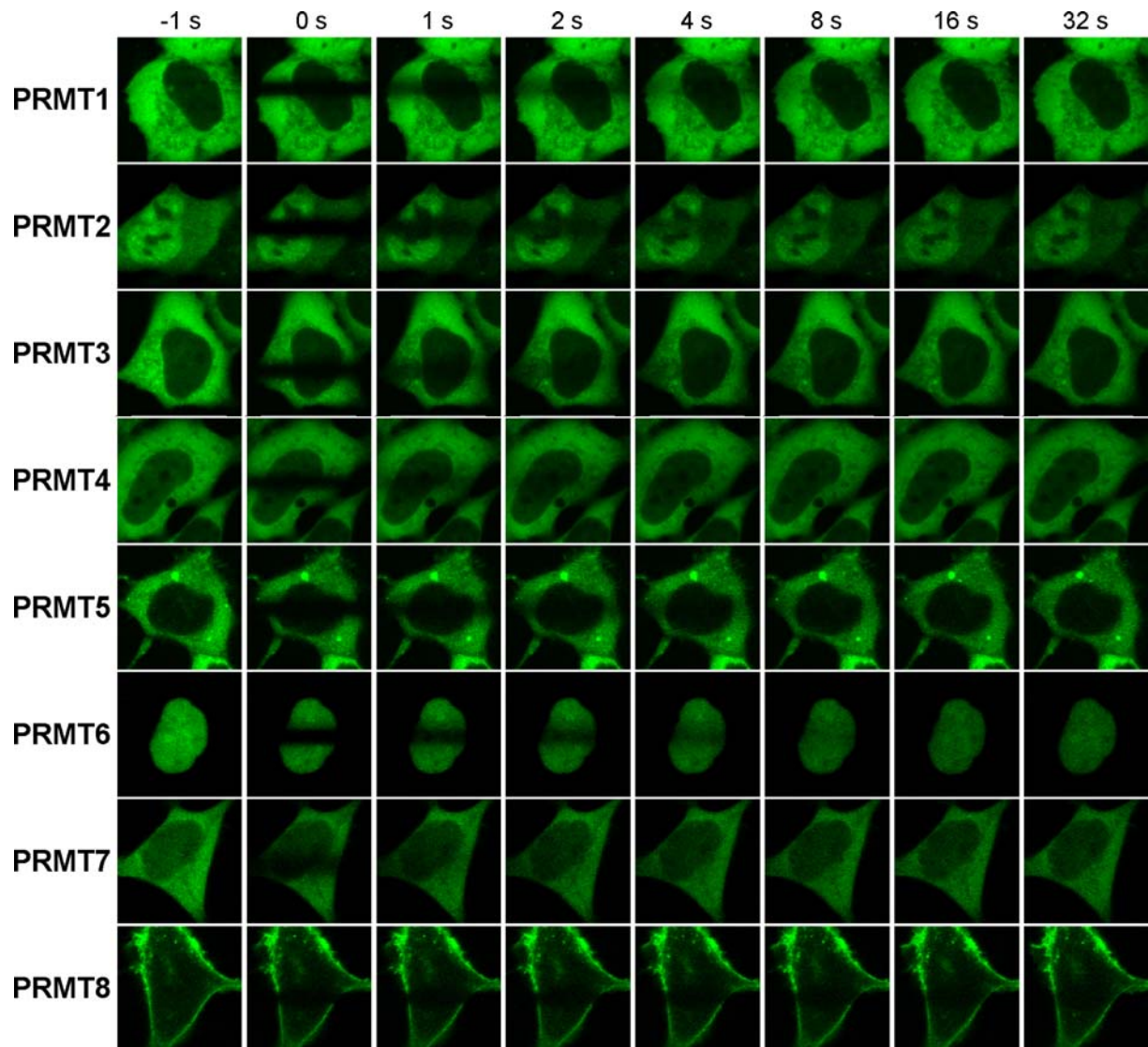


Abb. 4.9 Qualitative FRAP-Daten von PRMT-Fusionsproteinen.

FRAP-Analyse von PRMT1 bis PRMT8:GFP in stabil transfizierten HEK293 Zellen. Die Spalte links (-1 s) zeigt die GFP-Fluoreszenz unmittelbar vor dem Bleichen. Die Bilder der folgenden Spalte (0 s) wurden direkt nach dem kurzen, irreversiblen Bleichen der Fluoreszenz in einer definierten Region (Höhe in y-Richtung: 4,29 μm , Breite in x-Richtung: gesamte Zelle) aufgenommen. Die folgenden Bilder zeigen den Fluoreszenzrückstrom aus umgebliebenen Bereichen in den gebleichenen Bereich über die Zeit. (Bildgröße = 36,6 x 36,6 μm).

Wie erwartet, diffundierten die mit größeren Proteinkomplexen assoziierten PRMT1, -4, und -5 signifikant langsamer als die hochmobilen Familienmitglieder PRMT3 und PRMT7. Zudem zeigten die FRAP-Experimente, dass die ausschließlich im Zellkern lokalisierte PRMT6 mit einem Molekulargewicht von 72 kDa deutlich langsamer diffundiert als das lösliche und mehr als doppelt so große Kontrollprotein β -Galaktosidase-NLS, das als Tetramer mit einem Molekulargewicht von 600 kDa vorliegt. Vermutlich interagiert PRMT6 mit einer Vielzahl anderer nukleärer Proteine, was zu einer deutlichen Abnahme der Diffusionsgeschwindigkeit führt. PRMT8 besitzt typische Diffusionseigenschaften membranassoziierter Proteine (vgl. Nehls *et al.*, 2000).

Zusätzlich wurde untersucht, ob sich die Mobilität der PRMTs unter hypomethylierten Bedingungen verändert. Dazu wurde die Methylierung von Proteinen durch Zugabe des Methylierungsinhibitor Adox bei der Zellkultur inhibiert und die Zellen nach zwei Tagen Inkubation untersucht. Um auszuschließen, dass eine durch die Hypomethylierung verursachte Viskositätsänderung oder andere unspezifische Effekte zu einer Veränderung der Mobilität sämtlicher Proteine im Zellkern führen, wurden wiederum Kontrolllexperimente mit dem Protein β -Galaktosidase-NLS durchgeführt.

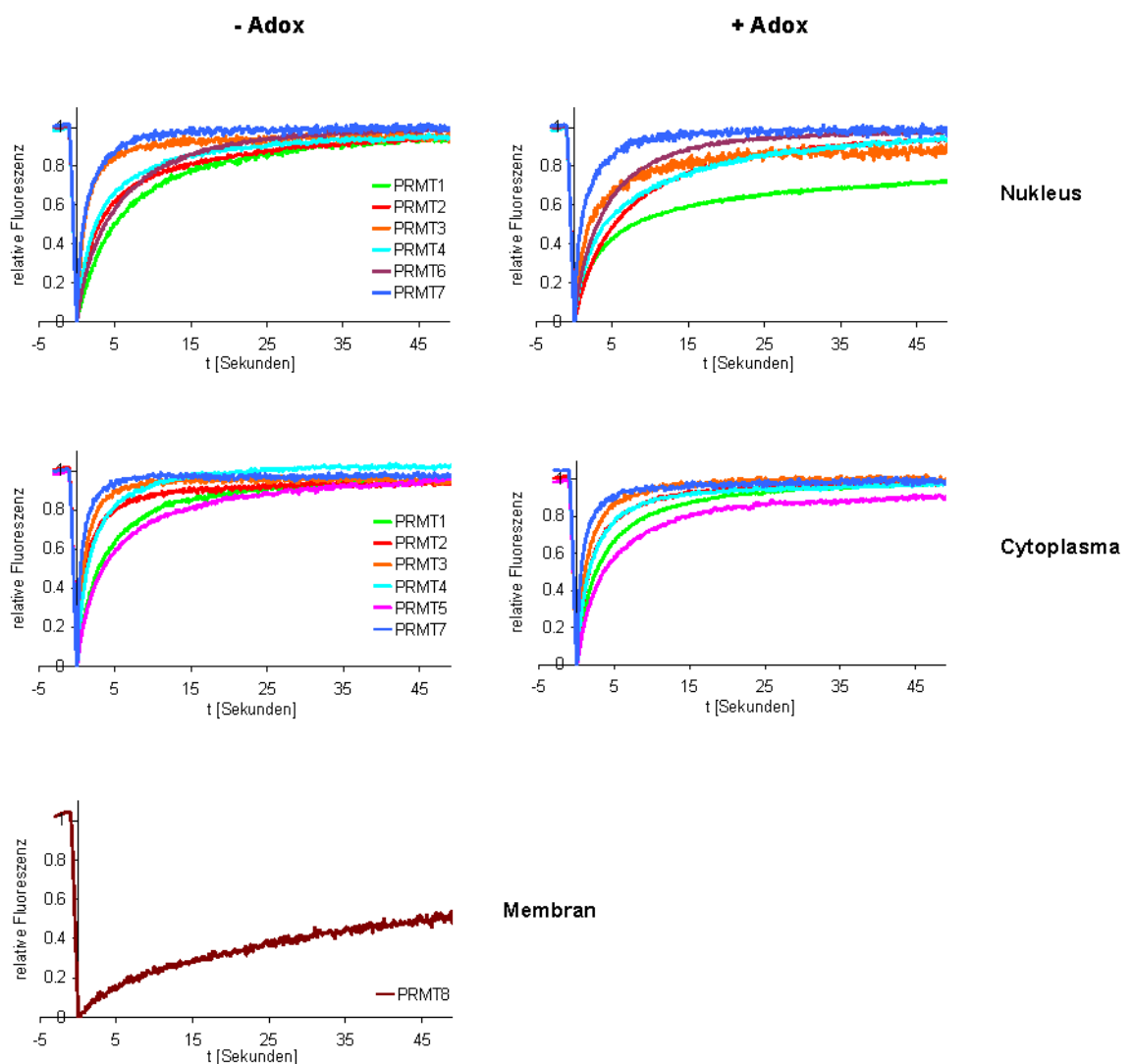


Abb. 4.10 Rückstromkurven der verschiedenen PRMTs in vivo.

Die Diagramme zeigen die graphische Auswertung der FRAP-Daten in Form von Fluoreszenzrückstromkurven. Auf der Ordinate ist die in den geblichenen Bereich von Zellkernen zurückkehrende Fluoreszenz als relative Fluoreszenzintensität angegeben. Auf der Abszisse ist die Zeit in Sekunden angegeben. Die negativen Zeitwerte beziehen sich auf Zeitpunkte unmittelbar vor dem Bleichen. Die Mobilität wurde unter normalen Zellkulturbedingungen (-Adox) und hypomethylierten Bedingungen (+Adox) jeweils für die nukleäre und cytoplasmatische Fraktion des Proteins bestimmt. Man beachte, dass PRMT6 nur im Nukleus und PRMT5 nur im Cytoplasma lokalisieren. Die Rückstromkurve für membranassoziierte PRMT8 ist in einem separaten Diagramm gezeigt. Jede Kurve repräsentiert den Mittelwert von 11-24 einzelnen Zellen.

Die Behandlung der Zellen mit Adox hatte dabei ganz unterschiedliche Auswirkungen auf die Diffusionsgeschwindigkeit der einzelnen PRMT-Familienmitglieder (*Abb. 4.10, rechts; Tabelle 4.3, unten*). Während die Mobilität von PRMT1, PRMT5, PRMT7 und dem Kontrollprotein β -Galaktosidase-NLS nahezu unverändert blieb, konnte bei PRMT2, PRMT3 und der nukleären Fraktion von PRMT4 eine deutliche Abnahme der Diffusionsgeschwindigkeit beobachtet werden. Nur die Mobilität der im Zellkern lokalisierten PRMT6 war unter hypomethylierten Bedingungen etwas erhöht.

-Adox		Cytoplasma	Nukleus	Cytoplasma	Nukleus
		t/2 $\pm$ sem	t/2 $\pm$ sem	D $\pm$ sem	D $\pm$ sem
Protein	n	[Sekunden]	[Sekunden]	[$\mu\text{m}^2/\text{s}$]	[$\mu\text{m}^2/\text{s}$]
PRMT1	20	2.75 $\pm$ 0.21	4.61 $\pm$ 0.42	1.83 $\pm$ 0.12	1.20 $\pm$ 0.12
PRMT2	17	0.97 $\pm$ 0.08	3.51 $\pm$ 0.33	5.28 $\pm$ 0.44	1.56 $\pm$ 0.16
PRMT3	15	0.90 $\pm$ 0.08	0.95 $\pm$ 0.11	5.53 $\pm$ 0.44	5.55 $\pm$ 0.52
PRMT4	15	1.61 $\pm$ 0.13	2.63 $\pm$ 0.29	3.12 $\pm$ 0.21	1.98 $\pm$ 0.17
PRMT5	12	3.59 $\pm$ 0.36	-	1.44 $\pm$ 0.15	-
PRMT6	16	-	3.94 $\pm$ 0.13	-	1.18 $\pm$ 0.04
PRMT7	20	0.58 $\pm$ 0.07	1.04 $\pm$ 0.08	9.21 $\pm$ 0.64	4.99 $\pm$ 0.38
PRMT8*	16	24.78 $\pm$ 2.09	-	0.21 $\pm$ 0.03	-
PRMT1 <i>mut</i>	14	n.d.	5.65 $\pm$ 0.43	n.d.	0.88 $\pm$ 0.07
hnRNP-C	20	-	11.57 $\pm$ 0.91	-	0.44 $\pm$ 0.03
EGFP	8	0.23 $\pm$ 0.07	0.56 $\pm$ 0.08	22.18 $\pm$ 3.14	9.59 $\pm$ 1.20
β Gal-NLS	19	-	2.68 $\pm$ 0.14	-	1.80 $\pm$ 0.09

+Adox		Cytoplasma	Nukleus	Cytoplasma	Nukleus
		t/2 $\pm$ sem	t/2 $\pm$ sem	D $\pm$ sem	D $\pm$ sem
Protein	n	[Sekunden]	[Sekunden]	[$\mu\text{m}^2/\text{s}$]	[$\mu\text{m}^2/\text{s}$]
PRMT1	24	2.61 $\pm$ 0.16	4.01 $\pm$ 0.29	1.93 $\pm$ 0.13	1.26 $\pm$ 0.07
PRMT2	21	1.67 $\pm$ 0.10	5.35 $\pm$ 0.35	2.98 $\pm$ 0.19	0.92 $\pm$ 0.05
PRMT3	13	1.28 $\pm$ 0.11	2.10 $\pm$ 0.22	3.86 $\pm$ 0.27	2.72 $\pm$ 0.36
PRMT4	18	1.61 $\pm$ 0.12	4.69 $\pm$ 0.42	3.09 $\pm$ 0.21	1.14 $\pm$ 0.11
PRMT5	17	3.32 $\pm$ 0.39	-	1.58 $\pm$ 0.12	-
PRMT6	24	-	3.10 $\pm$ 0.17	-	1.59 $\pm$ 0.09
PRMT7	11	0.65 $\pm$ 0.07	0.97 $\pm$ 0.11	7.82 $\pm$ 0.64	5.82 $\pm$ 0.74
PRMT8*	-	n.d.	-	n.d.	-
PRMT1 <i>mut</i>	24	n.d.	4.79 $\pm$ 0.35	n.d.	1.09 $\pm$ 0.08
hnRNP-C	20	-	9.32 $\pm$ 0.59	-	0.53 $\pm$ 0.04
EGFP	-	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
β Gal-NLS	19	-	2.46 $\pm$ 0.11	-	1.94 $\pm$ 0.09

Tabelle 4.3 Diffusionseigenschaften von GFP-Fusionsproteinen in vivo.

Alle Angaben sind Mittelwerte (MW) $\pm$ Standardfehler des MW (sem). n.d. = nicht durchgeführt. (*) man beachte: PRMT8 ist ein membranassoziiertes Protein.

Unter normalen Zellkulturbedingungen, die eine vollständige Methylierung der Proteine erlauben, verhielten sich sämtliche untersuchten PRMTs (außer PRMT8:GFP) wie vollständig lösliche Proteine. Sowohl im Nukleus als auch im Cytoplasma konnte keine signifikante Immobilisierung festgestellt werden. Der Anteil der mobilen Fraktion MF(t) war bei allen über 90% (s. *Tabelle 4.4*).

Interessanterweise führte die Inhibierung der Methylierung durch Adox zu einer deutlichen Abnahme der mobilen Fraktion MF(t) von kernlokalisierter PRMT1. Dieser Effekt war dabei hauptsächlich bei PRMT1 (~74 % MF(t)) und etwas weniger ausgeprägt bei PRMT3 (~88 % MF(t)) zu beobachten (*Abb. 4.10, rechts; Tabelle 4.4*). Bei den anderen PRMTs blieb der Anteil der mobilen Fraktion MF(t) nahezu unverändert.

Protein	Mobile Fraktion MF(t) [%]		
	- / + Adox		
	Cytoplasma	Nukleus	Membran
PRMT1	97 / 97	97 / 74	-
PRMT2	97 / 98	97 / 96	-
PRMT3	94 / 100	95 / 88	-
PRMT4	100 / 99	99 / 97	-
PRMT5	97 / 92	-	-
PRMT6	-	100 / 98	-
PRMT7	98 / 100	100 / 98	-
PRMT8	-	-	74 / -
PRMT1^{mut}	n.d.	92 / 80	-
hnRNP-C	-	78 / 75	-
EGFP	99 / n.d.	97 / n.d.	-
βGal-NLS	-	96 / 100	-

Tabelle 4.4 Mobile Fraktionen der GFP-Fusionsproteine.
Alle Angaben sind Mittelwerte. n.d. = nicht durchgeführt.

4.2 Untersuchungen zur Mobilität von PRMT1 *in vivo*

Die in humanen Zellen vorherrschende Protein Arginin Methyltransferase 1 (PRMT1) ist an zahlreichen biologischen Prozessen wie Differenzierung, Zellproliferation und transkriptioneller Regulation beteiligt. Im vorherigen Kapitel konnte durch Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie und *in vivo* Mobilitätsstudien bestätigt werden, dass PRMT1 in große funktionelle Proteinkomplexe eingebaut ist. Unter hypomethylierten Bedingungen wurde dabei eine teilweise Immobilisierung des Enzyms im Zellkern beobachtet. In weiterführenden Studien sollte dieser Effekt nun genauer charakterisiert werden. Um mehr über die physiologische Rolle von PRMT1 zu erfahren, wurden zudem Mobilitäts- und Lokalisationsstudien mit einer enzymatisch inaktiven Mutante von PRMT1 durchgeführt.

4.2.1 Lokalisation, Aktivität und Oligomerisierung von PRMT1- und PRMT6:GFP

Um sicherzustellen, dass sich die PRMT-Fusionsproteine identisch wie die endogenen PRMTs verhalten, wurden die in den *Kapiteln* 4.1.2 und 4.1.3 durchgeführten biochemischen und mikroskopischen Charakterisierungen von PRMT1:GFP und PRMT6:GFP erweitert (*Abb.* 4.11). Diese Kontrollexperimente zeigen, dass beide Fusionsproteine in physiologischen Mengen exprimiert werden (*Spur* 1 und 2) und in Komplexen mit den entsprechenden endogenen PRMTs co-immunpräzipitiert werden (*Spur* 6 und 7). Diese Oligomerisierung ist eine Voraussetzung für die enzymatische Aktivität der PRMTs (Zhang *et al.*, 2003; Lim *et al.*, 2005). Tatsächlich zeigten die immungefällten Oligomere eine spezifische enzymatische Aktivität (*Spur* 3-5). Daher eignen sich die PRMT-Fusionsproteine ideal für Mobilitäts- und Lokalisationsstudien von katalytisch aktiven Oligomeren *in vivo*.

Während PRMT6, wie bereits beschrieben, ausschließlich im Zellkern zu beobachten war (Frankel *et al.*, 2002), konnte PRMT1 sowohl im Zellkern als auch im Cytoplasma nachgewiesen werden. Obwohl die meisten Substratproteine von PRMT1 im Nukleus lokalisiert sind, wurde durch Quantifizierung der Fluoreszenzintensitäten in Cytoplasma und Zellkern (*Abb.* 4.11 **B**) und durch biochemische Fraktionierungsexperimente (*Abb.* 4.11 **A**; *Spur* 8 und 9) eine (~6-fach) stärkere cytoplasmatische Lokalisierung von PRMT1 im Vergleich zum Zellkern gezeigt.

Werden stabil PRMT1:GFP transfizierte Zellen mit dem Methylierungsinhibitor Adox behandelt, so kommt interessanterweise zu einer deutlichen Anreicherung (~Faktor 2.5) des Fusionsproteins im Zellkern (Abb. 4.12).

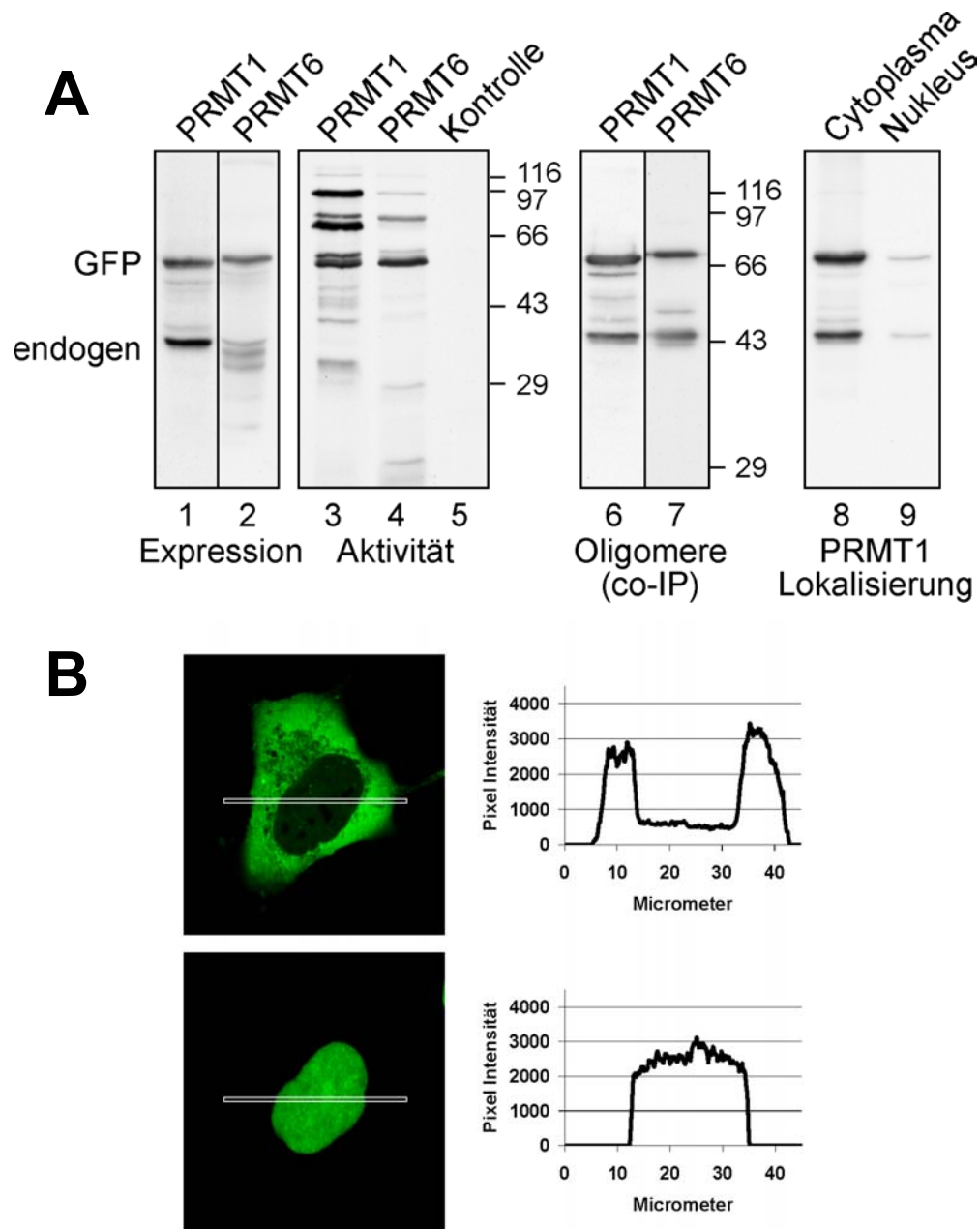


Abb. 4.11 Expression, Aktivität, Oligomerisierung und Lokalisation von PRMT1:GFP und PRMT6:GFP. HEK293 Zellen wurden stabil mit PRMT1:GFP bzw. PRMT6:GFP transfiziert und anschließend sortiert. (A) Spur 1 und 2: Expressionsmenge der GFP-Fusionsproteine im Vergleich zur endogenen Proteinmenge. Proteine wurden im Westernblot mit spezifischen Antikörpern gegen PRMT1 bzw. PRMT6 detektiert. Spur 3-5: radioaktiver Methylierungsnachweis. PRMT1:GFP und PRMT6:GFP wurden aus Ganzzellextrakten mit α GFP-AK immungefällt und zusammen mit 3 H-SAM und hypomethyliertem Ganzzellextrakt in einem Methylierungsnachweis eingesetzt. Substratproteine mit eingebauten Radionukliden wurden durch SDS-PAGE mit anschließender Fluorographie visualisiert. Als Kontrolle diente ein Ansatz ohne immungefällte PRMT. Die Exposition des PRMT6-Experiments war 10-fach länger als die des PRMT1-Experiments. Spur 6 und 7: PRMT-Fusionsproteine co-immunpräzipitieren ihre endogenen Äquivalente. Immunfällungen wie in Spur 3-5 wurden im Westernblot mit Antikörpern gegen PRMT1 bzw. PRMT6 analysiert. Spur 8 und 9: PRMT1 lokalisiert bevorzugt im Cytoplasma. Westernblot mit α PRMT1 Antikörper von Zellfraktionierung aus PRMT1:GFP exprimierenden Zellen. Man beachte: Endogene PRMT1 und PRMT1:GFP fraktionieren identisch in Cytoplasma und Nukleus. (B) Konfokale Schnitte durch typische PRMT1:GFP (oben) bzw. PRMT6:GFP (unten) exprimierende Zellen mit entsprechendem quantitativem Fluoreszenzintensitätsprofil (Rechteck = Messbereich).

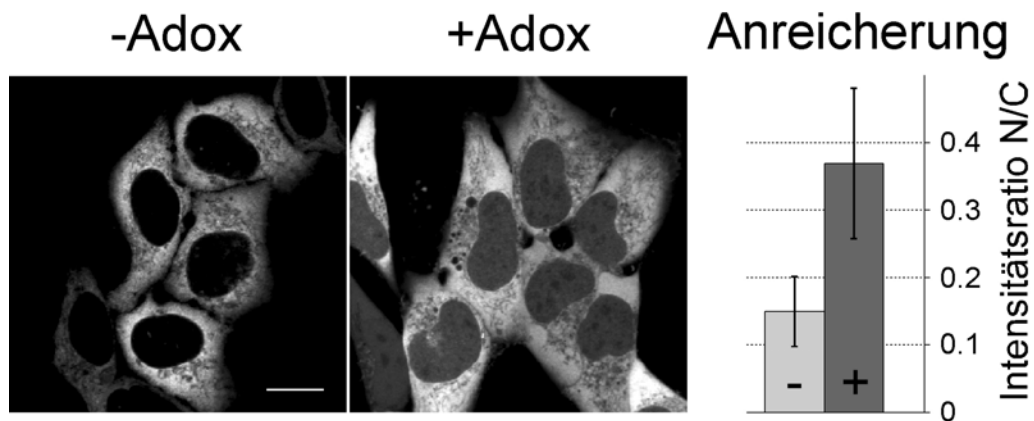


Abb. 4.12 Nukleäre Anreicherung von PRMT1 in hypomethylierten Zellen.

PRMT1:GFP exprimierende HEK293-Zellen wurden für 2 Tage mit dem Methylierungsinhibitor Adox behandelt. Gezeigt sind konfokale Bilder von typischen Adox-behandelten (+) bzw. unbehandelten Zellen (-) sowie eine Quantifizierung der Anreicherung von PRMT1 im Nukleus. Zur Quantifizierung wurde in mehr als hundert Zellen die durchschnittliche Fluoreszenzintensität an verschiedenen Stellen in Nukleus (N) und Cytoplasma (C) ermittelt und als Intensitätsquotient (N/C) dargestellt. Balken, 10 μ m, Fehlerbalken = Standardabweichungen.

4.2.2 Mobilität von PRMT1:GFP in hypomethylierten Zellen

In Kapitel 4.1.6 wurde gezeigt, dass PRMT1 als vollständig lösliches Protein in der gesamten Zelle diffundiert. Interessanterweise konnte nach Adox-Behandlung im Zellkern hypomethylierter Zellen bereits unter dem Mikroskop eine unbewegliche (oder sehr langsam diffundierende) Fraktion des Enzyms beobachtet werden (Abb. 4.13). Diese Mobilitätsänderung betrifft etwa 25% der nukleären Fraktion des Proteins und ist ausschließlich bei PRMT1 zu beobachten.

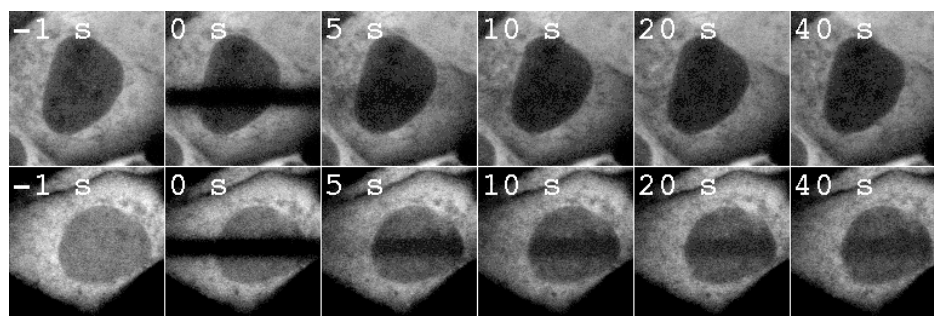


Abb. 4.13 Hypomethylierung beeinflusst die Mobilität von PRMT1 in lebenden Zellen.

Bestimmung der *in vivo* Mobilität von PRMT1 mittels FRAP. Die Zellen waren entweder unbehandelt (*obere Reihe*) oder für 2 Tage mit Adox behandelt worden (*untere Reihe*). Die Spalte links (-1 s) zeigt die GFP-Fluoreszenz unmittelbar vor dem Bleichen. Die Bilder der folgenden Spalte (0 s) wurden direkt nach dem kurzen, irreversiblen Bleichen der Fluoreszenz in einer definierten Region (Höhe in y-Richtung: 4,29 μ m, Breite in x-Richtung: gesamte Zelle) aufgenommen. Die folgenden Bilder zeigen den Fluoreszenzrückstrom über die Zeit.

Zur besseren Übersicht wurden die bereits in *Abb. 4.10* gezeigten FRAP-Kurven von PRMT1 und PRMT6 in neuen Diagrammen dargestellt (*Abb. 4.14*). Weder die Mobilität von PRMT6 noch die des löslichen Kontrollproteins β -Galaktosidase-NLS waren durch die Behandlung mit Adox verändert (*Abb. 4.14 C, D*; vgl. *Tabelle 4.3*).

Die Hauptsubstrate von PRMT1 sind überwiegend DNA/RNA-bindende Proteine wie hnRNPs oder die Histone H3/H4. Um zu untersuchen, ob die Immobilisierung nukleärer PRMT1 eventuell durch Bindung an hypomethylierte Substratproteine vermittelt wird, wurden zusätzlich FRAP-Analysen mit hnRNP-C, einem Bestandteil der prä-mRNA prozessierenden hnRNP-Partikel, durchgeführt. Erwartungsgemäß diffundierte hnRNP-C als Teil großer hnRNP-Komplexe sehr langsam. Eine Veränderung der Diffusionseigenschaften des Proteins in hypomethylierten Zellen konnte nicht beobachtet werden (*Abb. 4.14 D*). Allerdings zeigte die Fluoreszenzrückstromkurve von hnRNP-C einen ähnlich Verlauf wie die von nukleärer PRMT1 in hypomethylierten Zellen.

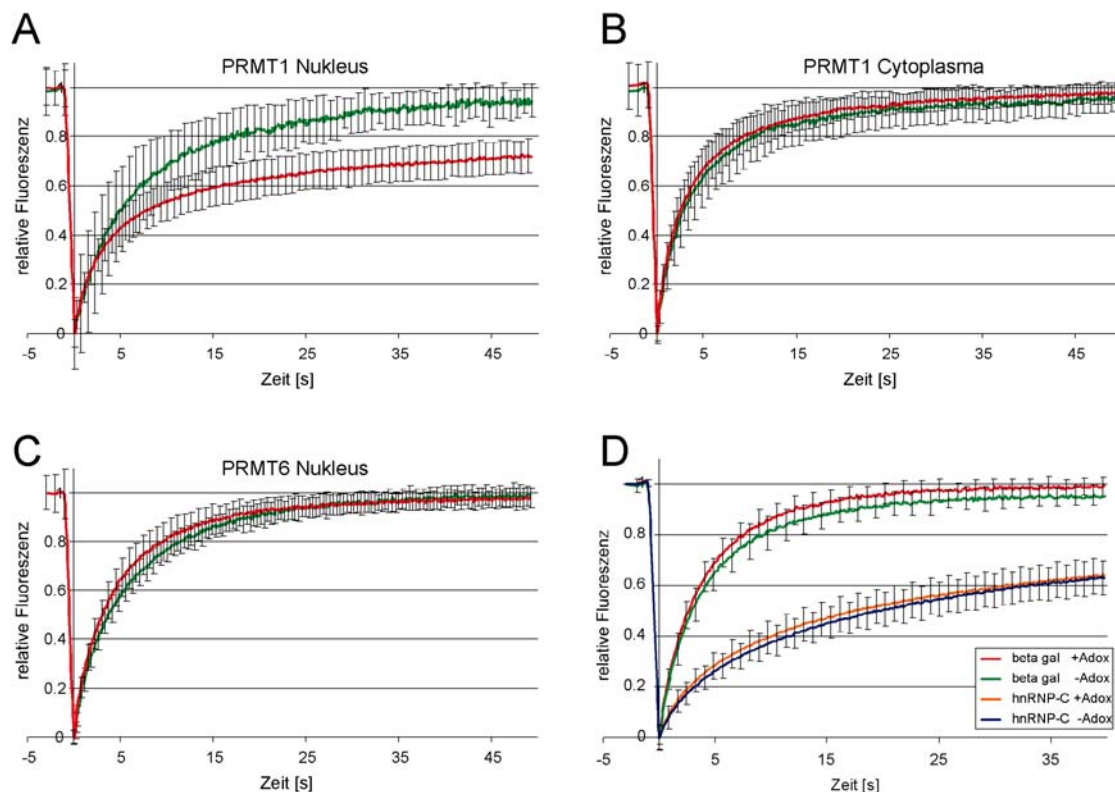


Abb. 4.14 Quantitative Mobilitätsmessungen von PRMT1, PRMT6, hnRNP-C und β gal-NLS.

Hypomethylierung führt zu einer partiellen Immobilisierung von PRMT1 im Zellkern. FRAP-Experimente, wie in *Abb. 4.10* gezeigt, wurden an PRMT1:GFP und PRMT6:GFP exprimierenden HEK293 Zellen durchgeführt. Die Zellen waren entweder unbehandelt (*grün*) oder für zwei Tage mit Adox behandelt (*rot*). Die Mobilität von PRMT1 wurde separat für die nukleäre (**A**) und die cytoplasmatische (**B**) Fraktion bestimmt. (**C**) PRMT6 wurde ausschließlich im Nukleus gemessen. (**D**) Inhibition der Methylierung beeinflusst nicht die Mobilität von hnRNP-Komplexen und β gal-NLS. Quantitative FRAP-Experimente wurden an stabil mit hnRNP-C:GFP und β gal-NLS:GFP transfizierten HEK293 Zellen durchgeführt. (*rot, gelb* mit Adox; *grün, blau*, unbehandelt). Für jede Messung wurden mindestens 25 einzelne Zellen untersucht. Fehlerbalken geben die Standardabweichungen an.

Wenn die Anreicherung und Immobilisierung von PRMT1 im Zellkern durch eine verstärkte Bindung des Enzyms an hypomethylierte Substrate hervorgerufen wird, dann sollten diese Effekte durch eine Re-Methylierung der Proteine wieder rückgängig gemacht werden können. In einem Zeitreihenexperiment wurde zunächst untersucht wie lange die Zelle für eine vollständige Re-Methylierung der Substratproteine von PRMT1 benötigt. Die Zellen wurden für zwei Tage mit Adox behandelt und anschließend in Adox-freiem Medium weiterkultiviert. Nach weniger als sechs Stunden Regenerationszeit konnte in den Zellen kein unmethyliertes SAF-A mehr nachgewiesen werden (Abb. 4.15 B). SAF-A ist ein typisches Substrat von PRMT1 und vermittelt die methylierungsabhängige Bindung von PRMT1 an hnRNP-Komplexe (s. Kapitel 4.3.2 und 4.3.3).

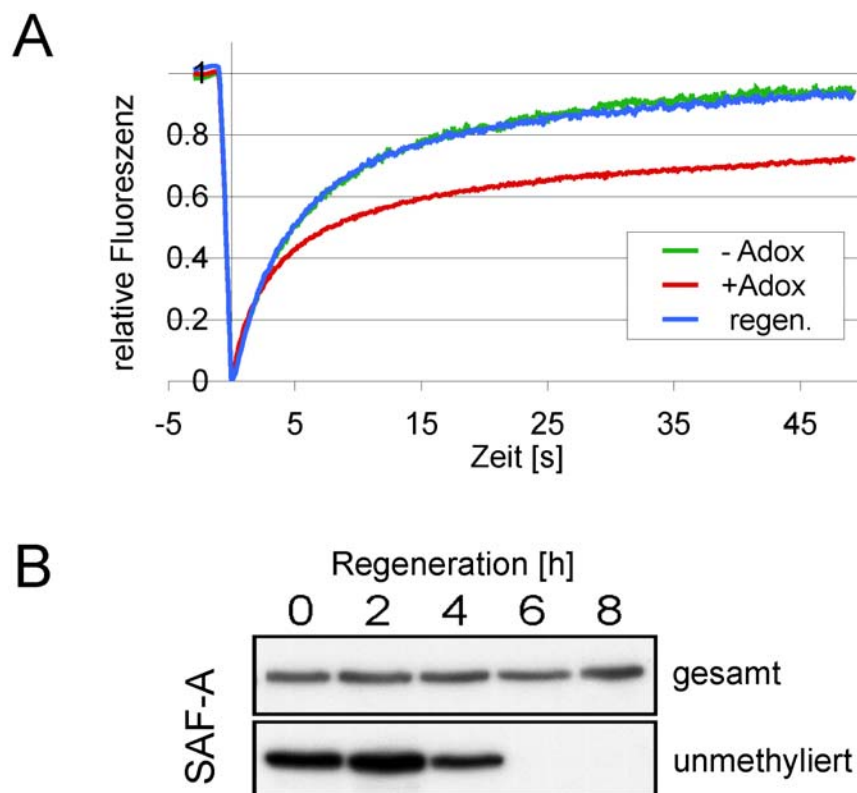


Abb. 4.15 Immobilisierung von nukleärer PRMT1 ist vollständig reversibel.

(A) Die Mobilität von PRMT1:GFP wurde in stabil transfizierten HEK293 Zellen zu verschiedenen Zeitpunkten gemessen: unbehandelt (grüne Kurve), zwei Tage mit Adox behandelt (rote Kurve) und sieben Stunden nach Entfernen von Adox (blaue Kurve). (B) Re-methylierung von Substratproteinen nach Entfernung von Adox aus dem Kulturmedium. Hypomethylierte Zellen wurden gründlich mit PBS gewaschen und für weitere 2, 4, 6 und 8 Stunden in Adox-freiem Medium kultiviert. Die Ganzzelextrakte wurden im Westernblot mit verschiedenen Antikörper gegen das endogene Substratprotein SAF-A (s. Kapitel 4.3.3) untersucht. Oben, Westernblot mit einem Antikörper gegen gesamtes SAF-A; unten, Blot mit einem Peptidantikörper, der nur unmethyliertes SAF-A erkennt (s. Kapitel 4.3.5). Nach 6 Stunden kann kein unmethyliertes SAF-A mehr nachgewiesen werden. Die Gesamtmenge an SAF-A bleibt jedoch unverändert.

Um zu untersuchen, ob die Immobilisierung von PRMT1 reversibel ist, wurden erneut quantitative Mobilitätsstudien an stabil mit PRMT1:GFP transfizierten HEK293 Zellen durchgeführt. Interessanterweise waren sowohl die Immobilisierung von PRMT1 als auch die nukleäre Anreicherung des Enzyms (*nicht gezeigt*) nur bei fortgesetzter Inhibierung der Methylierung zu beobachten. **Abbildung 4.15 B** zeigt vergleichend FRAP-Kurven von PRMT1 in unbehandelten Zellen (*grüne Kurve*), in Adox-behandelten Zellen (*rote Kurve*) und in regenerierten Zellen (*blaue Kurve*, 7 h nach Auswaschen von Adox). Entfernt man den Methylierungsinhibitor Adox, erlangt PRMT1 seine typischen Diffusionseigenschaften nach etwa sieben Stunden zurück; zeitgleich mit einer vollständigen Re-Methylierung von PRMT1-Substraten.

Die oben beschriebenen Mobilitätsstudien deuten darauf hin, dass eine Fraktion von PRMT1 durch Bindung an hypomethylierte Substratproteine im Zellkern immobilisiert wird. Um herauszufinden welche Proteine abhängig von ihrem Methylierungsstatus mit PRMT1 interagieren, wurden Co-Immunfällungsexperimente durchgeführt. Dazu wurden Extrakte aus +/- Adox-behandelten, stabil mit PRMT1:GFP transfizierten HEK293 Zellen mit α PRMT1- bzw. α GFP-Antikörper immungefällt und die co-präzipitierten Proteine durch SDS-PAGE mit anschließender Silberfärbung bzw. Immundetektion im Westernblot visualisiert (**Abb. 4.16**). In den Präzipitaten aus hypomethyliertem Zellextrakt waren besonders Histone des Nukleosomenkerns stark angereichert. Zudem konnte bei einigen weiteren Proteinen eine methylierungs-abhängige Interaktion beobachtet werden. So waren z.B. drei Proteine mit einem Molekulargewicht von 50, 97 und 120 kDa in den +Adox-Präzipitaten angereichert; ein weiteres 70 kDa Protein hingegen deutlich reduziert.

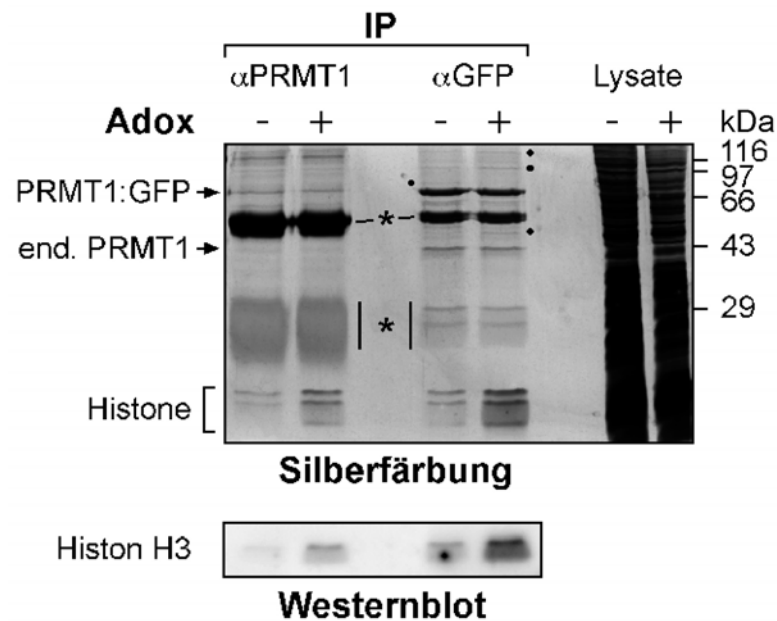


Abb. 4.16 Identifizierung PRMT1-assoziiierter Proteine.

Immunfällungen (IP) mit α PRMT1- bzw. α GFP-Antikörpern aus Ganzzelextrakten von PRMT1:GFP exprimierenden Zellen (ohne Adox bzw. zwei Tage mit Adox behandelt). Nach intensivem Waschen wurden die gebundenen Proteine mittels SDS-PAGE aufgetrennt und durch Silberfärbung (*oben*) bzw. Westernblot mit Antikörper gegen Histone H3 (*unten*) sichtbar gemacht. Proteine, die abhängig vom Methylierungsstatus mit PRMT1 co-präzipitieren, sind mit Punkten neben den Proteinspuren hervorgehoben. Schwere und leichte Ketten, die für die IP eingesetzten Antikörper, sind markiert (*).

4.2.3 Expression, Lokalisation und Mobilität von PRMT1mut:GFP

Um zu überprüfen, ob es sich bei der nukleären Immobilisierung und Akkumulation von PRMT1 in hypomethylierten Zellen um eine aktivitätsabhängige Wechselwirkung mit Substratproteinen handelt, wurde eine enzymatisch inaktive Mutante von PRMT1 hergestellt. Dazu wurden im Expressionsvektor für PRMT1:GFP die drei Codons für die Aminosäurereste Valin 68, Leucin 69 und Aspartat 70 mittels einer „site directed“ Mutagenese-PCR zu Alanin-Codons umgewandelt (VLD $\rightarrow$ AAA). Die Sequenz VLD liegt in einem hoch konservierten Bereich der PRMT-Familie an der Bindestelle des Co-Faktors S-Adenosylmethionin und ist essentiell für die Methyltransferaseaktivität von PRMTs (Zhang & Cheng, 2003). Mehrere Studien an verschiedenen PRMTs haben bereits gezeigt, dass die Mutation der VLD Sequenz zu einer vollständigen Inaktivierung von Arginin-Methyltransferasen führt (Chen *et al.*, 1999; Wada *et al.*, 2002; Boulanger *et al.*, 2004).

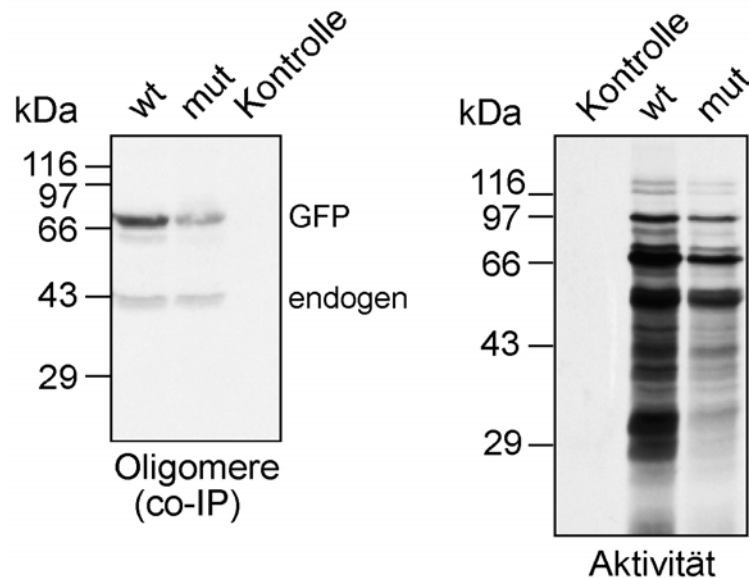


Abb. 4.17 Oligomerisierung und Aktivität von PRMT1mut:GFP.

PRMT1mut:GFP assoziiert mit endogener PRMT1 in enzymatisch aktiven Oligomeren. Extrakt aus PRMT1mut:GFP (mut) bzw. PRMT1:GFP (wt) exprimierenden Zellen wurde mit anti-GFP Antikörper immungefällt (Kontrolle mit anti-Myc Antikörper) und in zwei Aliquote aufgeteilt. Links: Immungefällte Proteine wurden über SDS-PAGE aufgetrennt und im Westernblot mit α PRMT1 Antikörper inkubiert. Man beachte: Sowohl wt PRMT1:GFP als auch PRMT1mut:GFP co-präzipitieren endogene PRMT1. Rechts: Je ein Aliquot wurde in einem *in vitro* Methylierungsnachweis mit 3 H-SAM und hypomethyliertem Ganzzelextrakt auf Aktivität getestet. Methylierte Proteine wurden mittels Fluorographie detektiert.

PRMT1:GFP und PRMT1mut:GFP wurden stabil in HEK293 Zellen transfiziert und nach 3 Wochen Selektionsdruck mit dem Antibiotikum G418 wurde die Gesamtpopulation fluoreszierender Zellen aussortiert und weiterkultiviert (s. Kapitel 3.2.2.7). Zunächst sollte überprüft werden, ob durch die eingefügte Mutation die Methyltransferaseaktivität von PRMT1mut:GFP zerstört ist. Dazu wurde die Mutante mit Antikörper gegen GFP immungefällt und in einem *in vitro* Methylierungsnachweis auf Aktivität getestet. Dabei zeigte sich, dass die Mutante mit co-gefällter, endogener PRMT1 in enzymatisch aktiven, oligomeren Komplexen assoziiert ist (Abb. 4.17).

Bei der mikroskopischen Betrachtung stabil transfizierter Zellen zeigte die Mehrzahl der PRMT1mut:GFP exprimierenden Zellen eine deutlich schwächere Fluoreszenz als wildtyp (wt) PRMT1:GFP exprimierende Zellen (Daten nicht gezeigt). Bei transienter Expression wurden beide Konstrukte gleich stark exprimiert. Dies bedeutet, dass eine starke Expression der Mutante zu einem Selektionsnachteil der Zellen führt, während die wt-Variante diesen Nachteil nicht mit sich bringt. Um auszuschließen, dass die Stärke der Expression einen Einfluss auf die Lokalisation der GFP-Konstrukte hat, wurden beide Fusionsproteine nach gleicher Fluoreszenzintensität sortiert und anschließend fluoreszenzmikroskopisch analysiert.

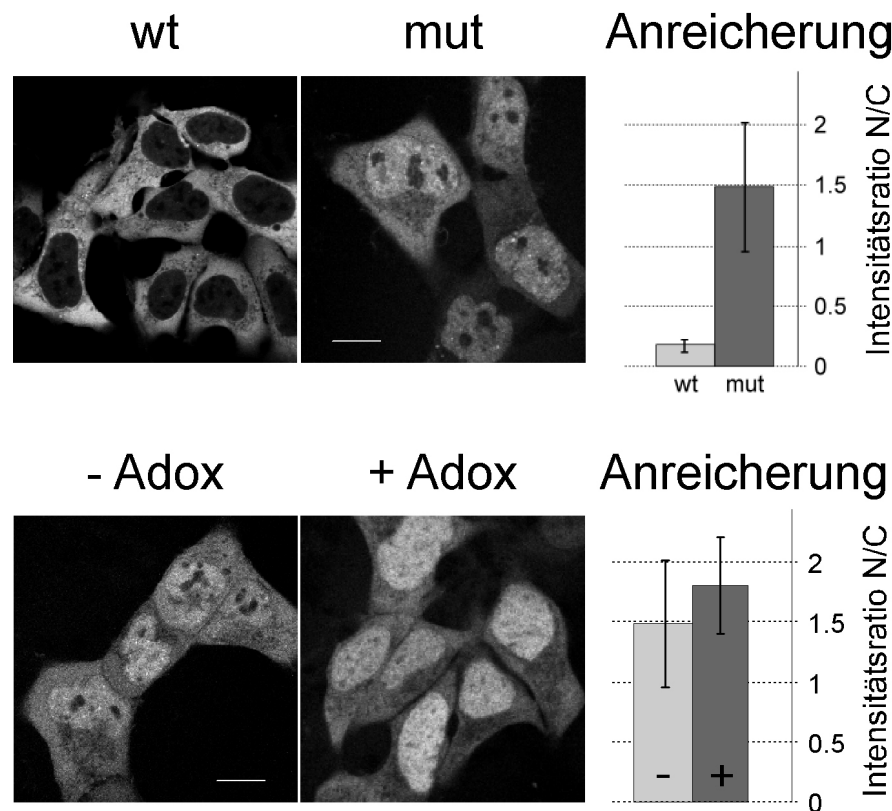


Abb. 4.18 Nukleäre Anreicherung von PRMT1mut:GFP.

Oben: Konfokale Bilder typischer PRMT1:GFP (wt) bzw. PRMT1mut:GFP (mut) exprimierender HEK293 Zellen, sowie eine Quantifizierung der Anreicherung dieser Fusionsproteine im Kern. Quantifizierung wie in Abb. 4.12 beschrieben. Man beachte die deutliche Anreicherung von PRMT1mut:GFP im Zellkern. *Unten:* Nukleäre Anreicherung von PRMT1mut:GFP in hypomethylierten Zellen. Balken, 10 µm. Fehlerbalken geben die Standardabweichung an.

Trotz der Oligomerisierung von PRMT1mut mit aktiver, endogener PRMT1 konnte im Vergleich zu wt PRMT1:GFP eine deutlich veränderte subzelluläre Lokalisation von PRMT1mut:GFP beobachtet werden (Abb. 4.18, oben). Dabei war die Mutante etwa um den Faktor 7 stärker im Zellkern angereichert als das wt GFP-Konstrukt. Beim Vergleich von Adox-behandelten und unbehandelten Zellen konnte keine signifikante Veränderung des Fluoreszenz-Intensitätsverhältnisses zwischen Zellkern und Cytoplasma beobachtet werden (Abb. 4.18, unten). Allerdings führte die Adox-Behandlung zu einer homogenen Verteilung der Mutante im Zellkern.

FRAP-Mobilitätsstudien zeigten, dass die Mutation auch einen Einfluss auf die Mobilität von PRMT1 hat (Abb. 4.19; vgl. Tabelle 4.3). So diffundiert PRMT1*mut* ($D=0.88 \mu\text{m}^2/\text{s}$) im Zellkern langsamer als *wt* PRMT1 ($D=1.20 \mu\text{m}^2/\text{s}$). Zudem konnte bereits im Zellkern unbehandelter Zellen eine kleine unbewegliche Fraktion (~8 %) von PRMT1*mut* beobachtet werden. Die Behandlung der Zellen mit Adox führte wie auch bei *wt* PRMT1 zu einer verstärkten Immobilisierung des inaktiven Enzyms (~20 %) im Zellkern. In Adox-behandelten Zellen zeigten PRMT1*mut* ($D=1.09 \mu\text{m}^2/\text{s}$) und *wt* PRMT1 ($D=1.26 \mu\text{m}^2/\text{s}$) fast identische Diffusionseigenschaften.

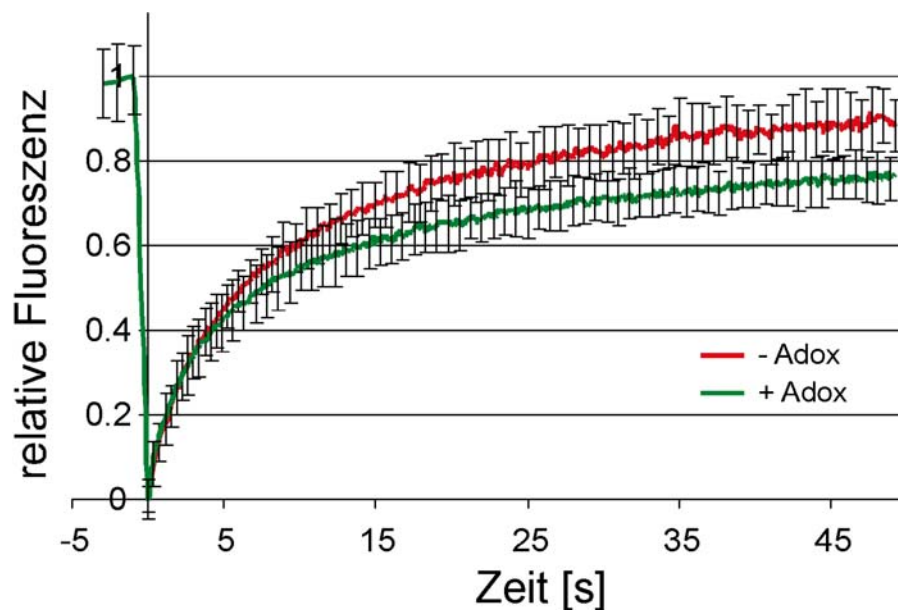


Abb. 4.19 Mobilität von PRMT1*mut*:GFP im Nukleus.

Bestimmung der *in vivo* Mobilität von PRMT1*mut*:GFP mittels FRAP. Die Zellen waren entweder unbehandelt (grün) oder für 2 Tage mit dem Methylierungsinhibitor Adox behandelt worden (rot). FRAP-Experimente wurden wie in Abb. 4.10 beschrieben durchgeführt. Fehlerbalken geben die Standardabweichung an.

4.3 Methylierung von Scaffold Attachment Factor A

Typ-I-Methyltransferasen methylieren bevorzugt Arginine, die in der Aminosäuresequenz RGG, RXR oder GRG vorliegen (Gary & Clarke, 1998; Klein *et al.* 2000; Smith *et al.* 1999). Diese als Glycin-Arginin-reichen (GAR)-Sequenzen bezeichneten Aminosäureabfolgen kommen gehäuft in RNA-Bindedomänen von hnRNP-Proteinen wie hnRNP-A1, hnRNP-K oder hnRNP-U/Scaffold Attachment Factor A (SAF-A) vor, wo sie als RGG-Boxen bezeichnet werden (Kiledijan & Dreyfuss, 1992; Kim *et al.*, 1997; Liu & Dreyfuss, 1995). Vorausgegangene Experimente haben gezeigt, dass Arginine in der RGG-Box von SAF-A und andere hnRNP-Proteinen tatsächlich methyliert sind (Liu & Dreyfuss, 1995).

SAF-A ist ein multifunktionelles Kernprotein, das als Bestandteil der hnRNP-Komplexe an der Verpackung und Prozessierung von prä-mRNA beteiligt ist (Dreyfuss *et al.*, 1993) und aufgrund seiner DNA-Bindungseigenschaften wichtige strukturelle, Chromatinorganisierende Funktionen in der Zellkernarchitektur hat (Romig *et al.*, 1992; Fackelmayer *et al.*, 1994; Kipp *et al.*, 2000). In zahlreichen Studien des Labors konnten zudem wichtige Erkenntnisse über Domänenstruktur, Lokalisation und Protein-Wechselwirkungen von SAF-A gewonnen werden.

SAF-A eignet sich daher sehr gut als Modellprotein für die Aufklärung der funktionellen Bedeutung der Arginin-Methylierung in humanen Zellen. In den folgenden Experimenten sollte unter anderem untersucht werden, welche Methyltransferase für die Methylierung von SAF-A verantwortlich ist, welche Aminosäuren modifiziert werden und welche Bedeutung diese Modifikation für die Proteinfunktion *in vivo* hat.

4.3.1 PRMT1 co-sedimentiert mit hnRNP-Komplexen

In Kapitel 4.2.2 wurde gezeigt, dass nukleäre PRMT1 durch Bindung an hypomethylierte Substratproteine teilweise immobilisiert wird. Dabei war vor allem eine methylierungsspezifische Bindung an Histone des Nukleosomenkerns beobachtet worden. Um zu untersuchen, ob PRMT1 auch mit seinen Hauptsubstraten, den hnRNP-Proteinen, in hnRNP-Komplexen assoziiert ist, wurden native 40S hnRNP-Partikel über Glyceringradientenzentrifugation isoliert und im Westernblot auf Anwesenheit von PRMT1, SAF-A und hnRNP-C getestet (Abb. 4.20). Die Laufzeit und Geschwindigkeit der Zentrifuge wurden dabei so gewählt, dass die 40S Partikel etwa in der Mitte des Gradienten sedimentierten.

Nur ein sehr geringer Anteil von PRMT1 co-sedimentierte in der Fraktion der 40S hnRNP-Partikel (Abb. 4.20 B, -Adox). Der Hauptanteil des Enzyms sedimentierte in

Multimerkomplexen mit einem Molekulargewicht von ~250-400 kDa in den drei obersten Fraktionen des Gradienten (vgl. *Kapitel 4.1.4*). Dieses Ergebnis änderte sich jedoch drastisch, wenn das Experiment mit Extrakten aus Adox-behandelten Zellen durchgeführt wurde. In diesen Zellen co-sedimentierten große Mengen PRMT1 mit den 40S hnRNP-Partikeln oder ihren Multimeren in den unteren Fraktionen des Gradienten. Zudem war die Menge löslicher PRMT1 signifikant reduziert (*Abb. 4.20 A*, vgl. oberste Fraktion +/- Adox).

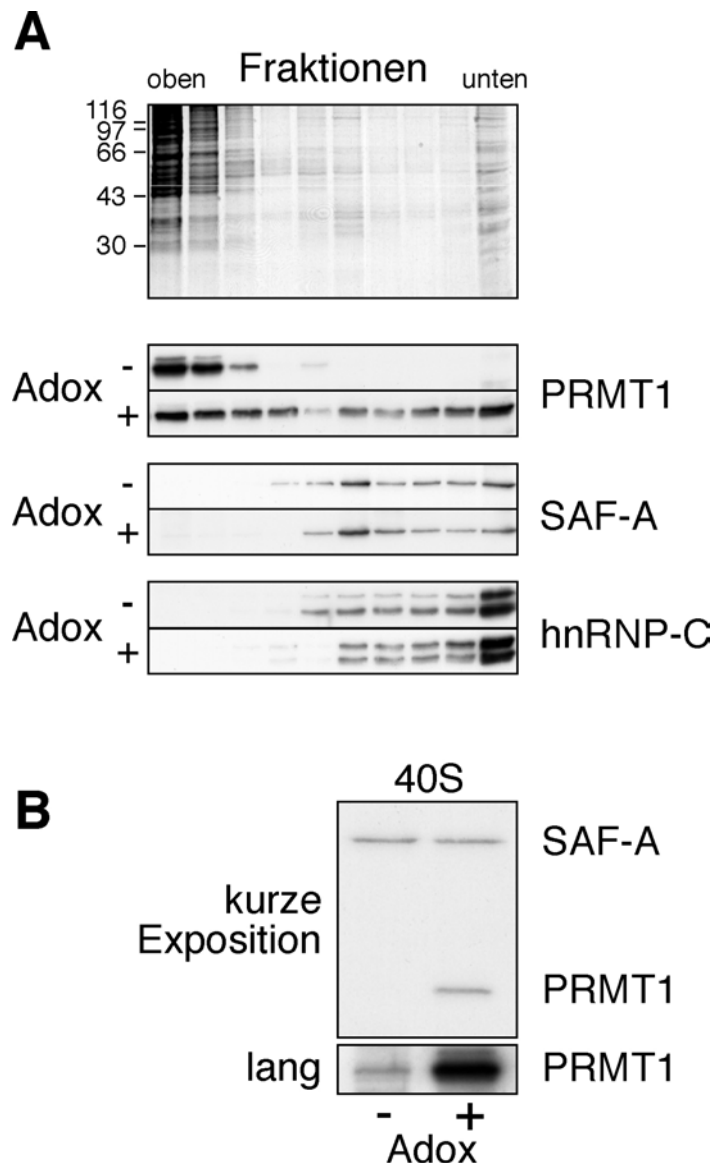


Abb. 4.20 PRMT1 co-sedimentiert mit 40S hnRNP-Partikeln.

(A) Proteine aus Ganzzellextrakten wurden auf einen 10-30%-igen Glyceringradienten geladen. Die Auftrennung der Proteine erfolgte durch Zentrifugation (25000 rpm, 20h, 4°C) und anschließender SDS-Gelelektrophorese der von oben abgenommenen Fraktionen. Die Proteine wurden mit Coomassie Brilliant Blau angefärbt (*oben*). PRMT1, SAF-A und hnRNP-C1/C2 wurden mit spezifischen Antikörpern im Westernblot detektiert (*unten*). Es wurden gleichzeitig Extrakten von unbehandelten (-Adox) und hypomethylierten (+Adox) Zellen untersucht. (B) 40S hnRNP Partikel wurden durch Glyceringradientenzentrifugation aufgereinigt und im Westernblot auf Anwesenheit von SAF-A und PRMT1 getestet. Es zeigte sich eine bevorzugte Assoziierung von PRMT1 mit hypomethylierten hnRNP Komplexen.

4.3.2 Direkte Bindung von PRMT1 an hnRNP-Partikel

Um zu zeigen, dass PRMT1 tatsächlich stabil an hnRNP-Partikel bindet, wurden die typischen hnRNP-Proteine SAF-A und hnRNP-C immungefällt und die Präzipitate im Westernblot auf co-gefällte PRMT1 getestet. Gleichzeitig wurde untersucht, ob auch PRMT3, PRMT5 oder PRMT6 eine stabile Wechselwirkung mit hnRNP-Proteinen eingehen.

Von den untersuchten PRMTs konnte einzig PRMT1 sowohl mit einem SAF-A:myc Konstrukt (Abb. 4.21 A) als auch mit endogenem SAF-A (Abb. 4.21 B) co-präzipitiert werden. Da SAF-A eine Komponente der hnRNP-Partikel ist und PRMT1 auch mit Antikörper gegen hnRNP-C1/C2 co-präzipitiert werden konnte (Abb. 4.21 C), lässt sich eine indirekte, über andere hnRNP-Proteine vermittelte, SAF-A/PRMT1-Interaktion nicht ausschließen.

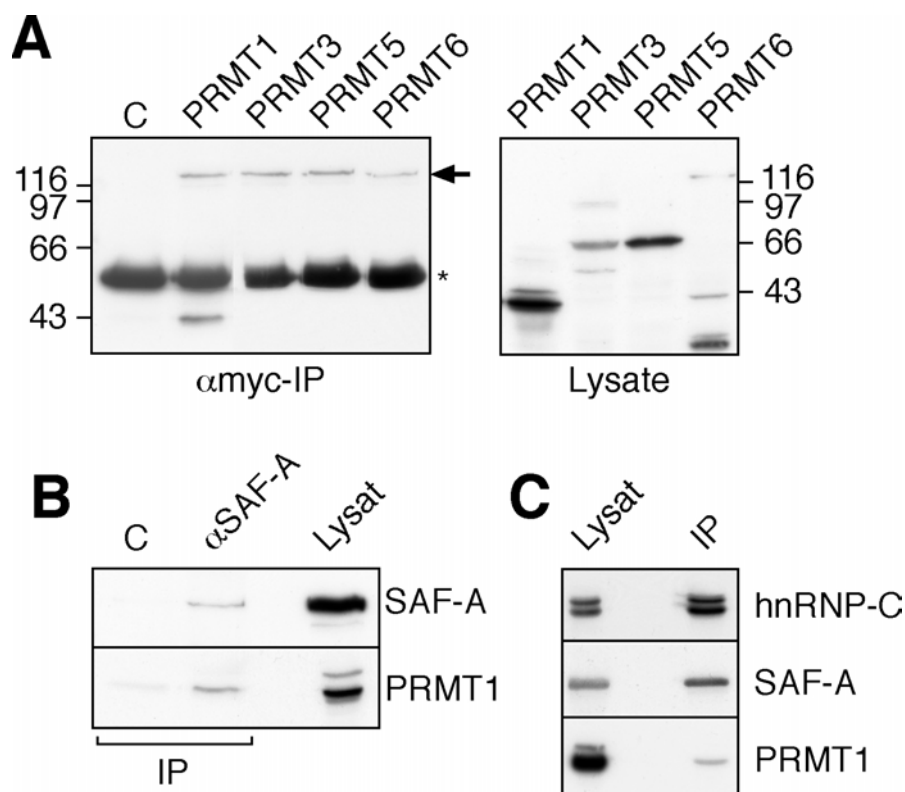


Abb. 4.21 PRMT1 ist mit SAF-A in hnRNP Komplexen assoziiert.

(A) PRMT1, nicht jedoch PRMT3, PRMT5 oder PRMT6 wurden mit SAF-A:MyC co-präzipitiert. HEK293 Zellen wurden mit einem SAF-A:MyC Expressionsvektor bzw. einem leeren pCMV-Tag1 Vektor (Kontrolle, C) transfiziert und der Zellextrakt mit 3 µg αMyC Antikörper immunpräzipitiert. Die immungefällten Proteine wurden über SDS-PAGE aufgetrennt, auf eine PVDF-Membran transferiert und mit einem Mix aus αMyC Antikörper und dem jeweils angegebenen αPRMT Antikörper inkubiert (Bild links). Die Kontrollspur wurde ebenfalls mit PRMT1 Antikörper inkubiert. Der Pfeil zeigt die Position von SAF-A:MyC an. Der Stern (*) markiert die schweren Ketten der IgG. Die Anwesenheit der PRMTs in den Zelllysaten wurde durch Westernblot mit den gleichen Antikörpern bestätigt (Bild rechts). Man beachte: αPRMT6-AK erkennt unspezifische Proteine (120 kDa und 30 kDa). (B) PRMT1 interagiert mit endogenem SAF-A. Ganzzellextrakt (Lysat) wurde mit Antikörper gegen endogenes SAF-A bzw. Protein G Sepharose (ohne AK als Kontrolle) immungefällt und im Westernblot auf Anwesenheit von SAF-A und PRMT1 untersucht. (C) PRMT1 und SAF-A werden mit hnRNP-C1/2 co-präzipitiert. Ganzzellextrakt (Lysat) wurde mit Antikörper gegen hnRNP-C1/2 immungefällt (IP) und präzipitierte Proteine im Westernblot mit Antikörper gegen hnRNP-C1/C2, SAF-A und PRMT1 nachgewiesen.

Um diese Möglichkeit zu untersuchen, wurde eine „Far Western“-Analyse durchgeführt. Das Prinzip dieser Methode basiert auf einer modifizierten klassischen Westernblot-Analyse: Endogenes SAF-A wurde zusammen mit den assoziierten hnRNP-Proteinen immungefällt. Die präzipitierten Proteine wurden über SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran transferiert. Anschließend wurden die Proteine auf der Membran renaturiert und mit rekombinanter PRMT1-GST bzw. GST als Kontrolle inkubiert. Die Immundetektion mit anti-GST bzw. anti-PRMT1 Antikörpern ergab deutliche Signale an der Position von SAF-A und zeigt damit, dass PRMT1 direkt mit SAF-A interagiert (*Abb. 4.22 A*). Im Kontrollansatz mit der 10-fachen Menge an GST und einer „mock“-Immunpräzipitation ohne Antikörper (*Abb. 4.22 B*) war kein Signal zu beobachten.

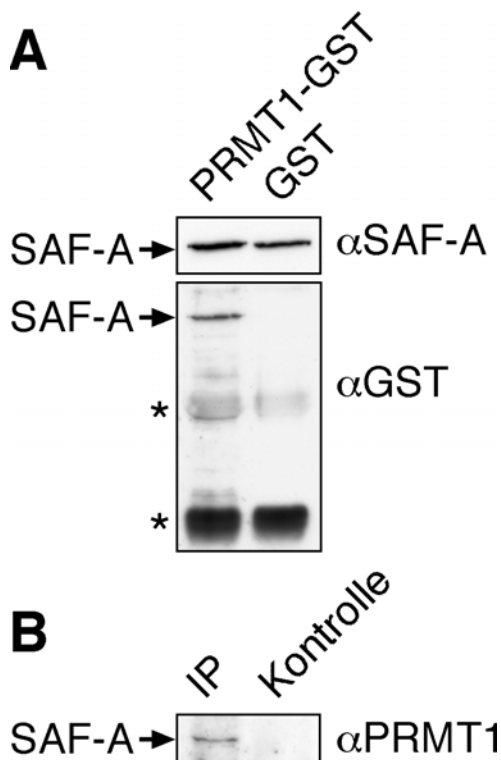
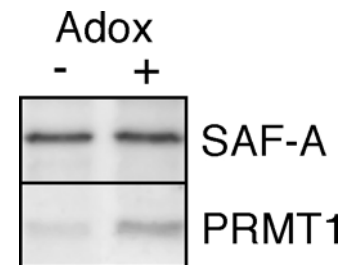


Abb. 4.22 Direkte Interaktion von PRMT1 und SAF-A in vitro. (A) Endogenes SAF-A wurde immungefällt und in zwei identische Aliquote aufgeteilt. Die immungefällten Proteine wurden mit SDS-PAGE aufgetrennt, auf eine PVDF-Membran transferiert und in PBS renaturiert. Die in zwei Streifen geschnittene Membran wurde mit rekombinanter PRMT1-GST bzw. der zehnfachen Menge GST-Protein inkubiert. Gebundene Proteine wurden mit Meerrettichperoxidase-gekoppeltem α GST Antikörper und anschließender Chemilumineszenz detektiert (*unten*). Westernblot mit α SAF-A Antikörper zeigt die Anwesenheit von SAF-A in beiden Spuren (*oben*). (*), schwere und leichte Ketten der IgG. Aus unbekannten Gründen bindet GST an die leichten Ketten der IgG. (B) Gleiches Experiment wie bei (A), jedoch wurde die Immunfällung mit einer mock-Präzipitation ohne Antikörper kontrolliert (nur Protein G Sepharose) und gebundenes PRMT1-GST wurde mit einem α PRMT1 spezifischen Antikörper detektiert. IP, Immunpräzipitat.

In einem weiteren Experiment wurde untersucht, ob PRMT1 bevorzugt an hypomethyliertes SAF-A bindet. Dazu wurde SAF-A aus Extrakten von +/-Adox behandelten Zellen immungefällt und auf co-gefällte PRMT1 untersucht. Dabei konnte eine methylierungs-spezifische Interaktion der beiden Proteine beobachtet werden (Abb. 4.23). Diese Ergebnisse zeigen, dass PRMT1 bevorzugt an hypomethylierte hnRNP-Komplexe bindet und dass diese Bindung durch eine direkte Protein-Protein Interaktion mit SAF-A vermittelt wird.

Abb. 4.23 Hypomethyliertes SAF-A bindet verstärkt an PRMT1.

Endogenes SAF-A wurde aus unbehandeltem (-Adox) bzw. hypomethyliertem (+Adox) Extrakt von HEK293 Zellen immungefällt und im Westernblot auf Anwesenheit von SAF-A und co-präzipitierter PRMT1 getestet.



4.3.3 PRMT1 vermittelte Arginin-Methylierung von SAF-A

Liu und Dreyfuss (1995) haben gezeigt, dass Argininreste in der RGG-Box von SAF-A teilweise methyliert vorliegen, doch die dafür verantwortliche Methyltransferase konnte bislang nicht identifiziert werden. Die direkte Protein-Protein Wechselwirkung von PRMT1 und SAF-A lässt vermuten, dass die Arginin-Methylierung von SAF-A zumindest teilweise von PRMT1 vermittelt wird. In den folgenden Untersuchungen sollte dies experimentell bestätigt werden. Zunächst wurde untersucht, ob immungefälltes SAF-A in einem *in vitro* Methylierungsexperiment von rekombinanter PRMT1-GST methyliert wird. Die Fluorographie in *Abbildung 4.24 A* zeigt, dass sowohl SAF-A als auch weitere co-präzipitierte hnRNPs mit radioaktiv markierten Methylgruppen modifiziert wurden. In einem weiteren Experiment wurde überprüft, ob auch die mit SAF-A in Co-Immunfällungen assoziierte, endogene PRMT1 enzymatisch aktiv ist. *Abbildung 4.24 B* zeigt, dass mit SAF-A co-präzipitierte endogene PRMT1 sowohl in *trans* als auch in *cis* katalytische Aktivität besitzt. PRMT1 methylierte nach Zugabe von ^3H -SAM sowohl im Komplex mit SAF-A/PRMT1 assoziierte hnRNP-Proteine („*cis*“, *Abb. 4.24 B, rechts*) als auch Proteine aus hypomethyliertem Zellextrakt („*trans*“ *Abb. 4.24 B, links*). Die Methylierungsreaktion in *trans* wurde nach Zugabe von hitzeinaktiviertem Extrakt aus Adox-behandelten Zellen und S-Adenosyl-L-[methyl- ^3H]Methionin (^3H -SAM) beobachtet. Dies demonstriert, dass lösliche PRMT1 im nativen hnRNP-Komplex Zugang zu den hnRNP-Proteinen hat.

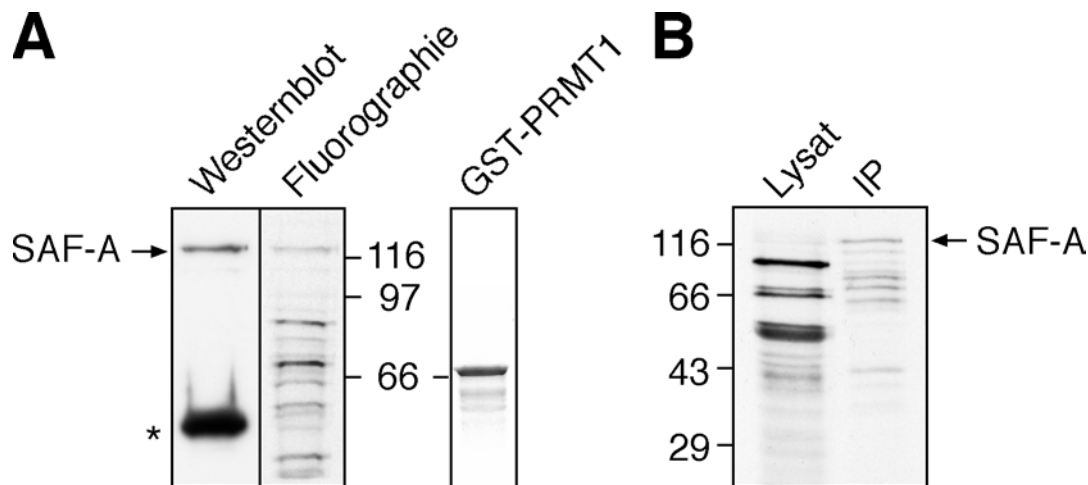


Abb. 4.24 SAF-A wird durch rekombinante und endogene PRMT1 methyliert.

(A) Links: Hypomethylierter Ganzzelextrakt aus mit SAF-A:Myc transfizierten HEK293 Zellen wurde mit α Myc Antikörper immungefällt. Die präzipitierten Proteine dienten als Substrat für einen *in vitro* Methylierungsnachweis mit 3 H-SAM und gereinigter, rekombinanter PRMT1-GST. Die Proteine wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran geblottet. Die 3 H-methylierten Proteine wurden durch Fluorographie sichtbar gemacht. Zusätzlich erfolgte eine Detektion von SAF-A durch Westernblot. (*), schwere Ketten der IgG. Rechts: 1 μ g aufgereinigte PRMT1-GST angefärbt mit Coomassie Blau. (B) Endogene, mit SAF-A co-präzipitierte PRMT1 ist katalytisch aktiv. Extrakt aus SAF-A:Myc exprimierenden Zellen wurde mit α Myc Antikörpern immungefällt und auf co-präzipitierte PRMT1-Aktivität getestet. Als Substrat diente entweder hypomethylierter Ganzzelextrakt (linke Spur, „trans“) oder hypomethylierte Proteine aus co-präzipitierten Komplexen (rechte Spur, „cis“). In diesen Assays wurde nur 3 H-SAM, jedoch keine rekombinante GST-PRMT1 hinzugegeben.

PRMT1 ist eine Typ-I-Methyltransferase und überträgt zwei Methylreste auf den gleichen Stickstoff der Guanidinogruppe, wobei ein „asymmetrisches“ Dimethylarginin entsteht (vgl. Einleitung Abb. 1.1). Wie bei einer Methylierung durch PRMT1 zu erwarten ist, wurde immungefälltes SAF-A im Westernblot von einem Antikörper gegen „asymmetrisches“, nicht aber gegen „symmetrisches“ Dimethylarginin erkannt (Abb. 4.25). SAF-A aus Adox-behandelten Zellen war erwartungsgemäß vollständig unmethyliert.

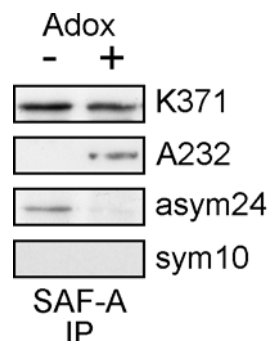


Abb. 4.25 SAF-A ist ein typisches Substrat für Typ-I-Methyltransferasen.

Immungefälltes SAF-A wird im Westernblot von einem Dimethylarginin-spezifischen Antikörper erkannt. Extrakte aus unbehandelten (-Adox) und hypomethylierten Zellen (+Adox) wurden mit Antikörper gegen endogenes SAF-A immungefällt. Präzipitierte Proteine wurden im Westernblot mit Antikörper gegen SAF-A (K371), hypomethyliertes SAF-A (A232), asymmetrisches Dimethylarginin (asym24) und symmetrisches Dimethylarginin (sym10) immungefärbt.

4.3.4 *In situ* Zellfraktionierung von SAF-A:GFP transfizierten Zellen

Mit biochemischen Methoden können lösliche Proteine und das Chromatin aus dem Zellkern extrahiert werden wobei eine Kernmatrix bzw. ein Kerngerüst (je nach Extraktionsmethode) als unlösliche Struktur zurückbleibt. Als Grundlage der Kernmatrixstruktur wird ein Netzwerk aus Proteinen und RNA angenommen, welches den gesamten Zellkern durchzieht. Allerdings ist es bislang nicht gelungen, die strukturbildenden Proteinkomponenten zu identifizieren und charakterisieren. Hinweise, hauptsächlich von *in vitro* Experimenten, deuten auf eine Beteiligung der Kernmatrix bei der Replikation, RNA-Synthese und Prozessierung, Verankerung von Chromatinschleifen, Regulation der Genexpression und anderen Funktionen hin (Berezney, 1991). Als Hauptbestandteil der Kernmatrix konnten hnRNP-Proteine identifiziert werden. Das hier näher untersuchte SAF-A gehört dabei zu den zehn häufigsten Kernmatrixproteinen. Im folgenden Experiment sollte nun untersucht werden, ob eine gewisse Menge von PRMT1 über die Interaktion mit SAF-A mit der Kernmatrix assoziiert ist.

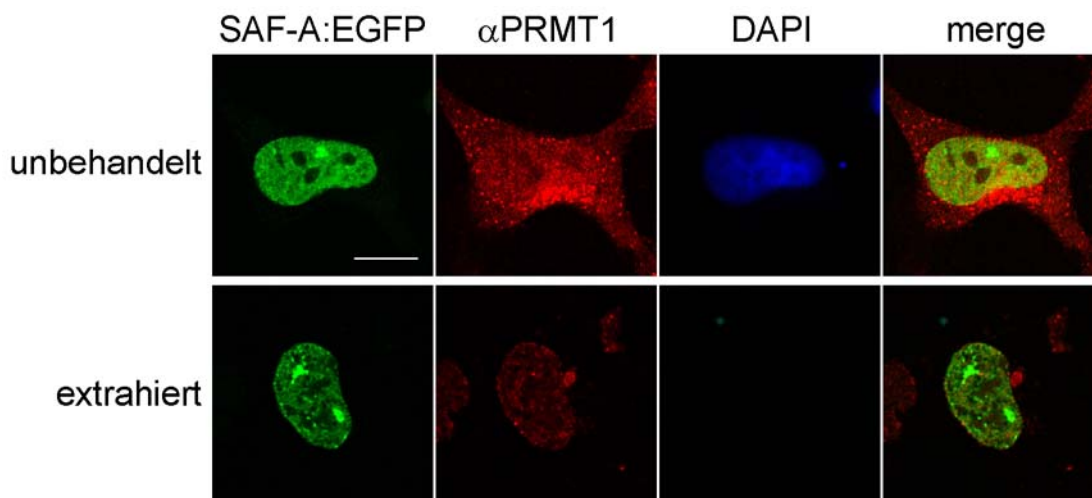


Abb. 4.26 Kernfraktionierung von SAF-A:EGFP transfizierten Zellen.

Mit SAF-A:EGFP stabil transfizierte HEK293 Zellen wurden auf Deckgläschen kultiviert und, wie in Kapitel 3.2.5.6 beschrieben, fraktioniert. Ein Teil der Zellen wurde vor bzw. nach der Fraktionierung mit Antikörper gegen PRMT1 immungefärbt und anschließend mikroskopisch analysiert. *Erste Spalte:* Fluoreszenzaufnahme von SAF-A:EGFP; *zweite Spalte:* Immunfluoreszenz von PRMT1; *dritte Spalte:* Chromatin-Anfärbung mit DAPI (Hoechst 33258); *vierte Spalte:* Überlagerung der Bilder. Balken, 10 µm.

Dazu wurden stabil mit SAF-A:GFP transfizierte HEK293 Zellen auf Deckgläschen kultiviert und einer klassischen *in situ* Zellfraktionierung (s. Kapitel 3.2.5.6) zur Präparation des Kerngerüsts unterzogen. Anschließend wurden die Zellen mit Antikörper gegen endogene PRMT1 immungefärbt. *Abbildung 4.26* zeigt Immunfluoreszenzaufnahmen von den GFP-Fusionsproteinen und endogener PRMT1 vor und nach einer

Zellfraktionierung. Die Anfärbung mit Hoechst 33258 (DAPI) diente der Kontrolle, ob der DNase-Verdau im dritten Fraktionierungsschritt funktioniert hat. Von SAF-A:GFP blieb erwartungsgemäß ein großer Teil im Zellkern gebunden. Nach der Extraktion verbleibt ein körniges Fleckenmuster im Kern, das vermutlich durch das Auswaschen einer nicht strukturgebundenen Fraktion von SAF-A hervorgerufen wird. Interessanterweise war auch ein Teil von PRMT1 im Zellkern an die Kerngerüststruktur gebunden. Die Lokalisationsmuster von PRMT1 und SAF-A waren zwar ähnlich, eine eindeutige Co-Lokalisation der beiden Proteine konnte allerdings nicht nachgewiesen werden.

4.3.5 Herstellung eines Methyl-sensitiven anti-SAF-A Antikörpers

PRMT1 methyliert bevorzugt Arginine, die in der Aminosäuresequenz RG oder RGG vorliegen. Im gesamten SAF-A-Protein sind 19 solcher Sequenzabfolgen zu finden, wobei 15 davon im carboxyterminalen Bereich lokalisiert sind (vgl. Anhang). Eine besondere Anhäufung befindet sich in der kurzen Region zwischen den Aminosäuren 779 bis 794, wo vier RG-Sequenzabfolgen innerhalb von nur 16 Aminosäuren liegen (Abb. 4.27 A, wt Sequenz).

Diese Peptidsequenz wurde in *E. coli* als Fusionsprotein mit einer Protein A-Bindestelle exprimiert und als Substrat für einen *in vitro* Methylierungsnachweis mit rekombinanter PRMT1-GST und PRMT2-GST verwendet. Das Peptid mit der wt-Sequenz wurde dabei effektiv von PRMT1, aber nicht vom Kontrollprotein PRMT2 methyliert (Abb. 4.27 A). Die gleiche Peptidsequenz, bei der die Arginine durch Lysine ersetzt waren, wurde nicht als Substrat erkannt. Dieses Ergebnis bestätigt, dass die Arginin-Methylierung von SAF-A im Bereich der AS 779 bis 794 durch die Typ-I-Methyltransferase PRMT1 vermittelt wird.

Um zu überprüfen, ob die Arginine im Bereich zwischen AS 779-794 auch *in vivo* von PRMT1 methyliert werden, wurde ein polyklonaler Antikörper gegen ein (unmethyliertes) synthetisches 16-mer Peptid mit der Wildtyp-Sequenz **CRGNYNQNFRGRGNRRG** hergestellt. Zur Aufreinigung und Immobilisierung an Thiopropyl-Sepharose wurde ein zusätzliches Cystein an den Aminoterminal des Peptids angehängt. Das Peptid wurde in Kaninchen injiziert und die Seren getestet. Der Erfolg der Immunisierung wurde mit dem bakteriell exprimierten Protein C399 verfolgt, das die C-terminale Hälfte von SAF-A umfasst und durch die Expression in *E.coli* unmethyliert ist (Göhring *et al.*, 1997). Drei der vier immunisierten Kaninchen entwickelten einen guten Titer spezifischer Antikörper, die durch Affinitätschromatographie nach Kipp *et al.* (2000) mit dem immobilisierten Peptid aus dem Serum aufgereinigt wurden.

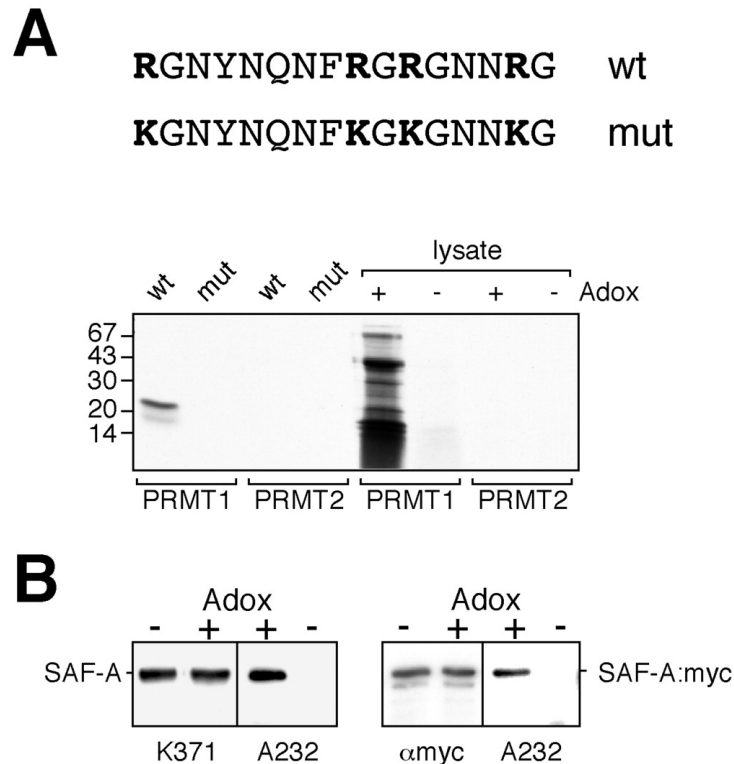


Abb. 4.27 Der neue Antikörper A232 erkennt ausschließlich unmethyliertes SAF-A.

(A) Ein Peptid, bestehend aus den Aminosäuren 779-794 von SAF-A (Wildtypsequenz (wt) mit vier möglichen Methylierungsstellen und einer mutierten (mut) Variante), wurde als Fusionsprotein mit einer Protein A-Bindestelle bakteriell exprimiert und als Substrat in einem *in vitro* Methylierungsnachweis mit ^3H -SAM und rekombinanter PRMT1 und PRMT2 eingesetzt. Die enzymatische Aktivität wurde parallel in Assays mit hypomethylierten Zelllysaten als Substrat getestet. (B) Kaninchen wurden mit dem synthetischen Peptid (wt) immunisiert und entwickelten Antikörper gegen unmethyliertes SAF-A. Identische Mengen an Zellextrakt aus Adox-behandelten Zellen und unbehandelten Kontrollzellen wurden über SDS-PAGE aufgetrennt, auf eine PVDF-Membran transferiert und mit Antikörper gegen gesamtes SAF-A (K371) oder mit Antikörper gegen das unmethylierte, synthetische Peptid (A232) inkubiert.

Obwohl der gereinigte Antikörper A232 das rekombinante Protein C399 mit hoher Sensitivität und Spezifität erkannte, zeigte sich keinerlei Signal in Westernblot-Experimenten mit Ganzzellextrakt aus logarithmisch wachsenden Zellen (Daten nicht gezeigt). Werden die Zellen dagegen mit dem Methylierungsinhibitor Adox behandelt, wird das Protein nach 24 bis 48 Stunden vom Antikörper erkannt (Abb. 4.27 B). Neu synthetisiertes SAF-A kann daher nicht mehr methyliert werden, wodurch das Epitop in unveränderter Form präsentiert wird. Dieser neue methylspezifische Antikörper eignet sich hervorragend zur Bestimmung des Methylierungsstatus von SAF-A in humanen Zellen und ermöglicht damit sowohl quantitative Messungen der unmethylierten SAF-A Menge, als auch direkte Lokalisationsstudien des unmethylierten Proteins in der Zelle.

4.3.6 Die Methylierung von SAF-A in verschiedenen Zelltypen

Die Rolle der Arginin-Methylierung für die lebende Zelle ist bislang nur ansatzweise verstanden. Zwar ist bekannt, dass die Menge der PRMTs in verschiedenen Zellen und Geweben variiert (Katsanis *et al.*, 1997). Es ist jedoch noch nicht geklärt ob dies einen Einfluss auf den Methylierungsstatus einzelner Proteine in verschiedenen Zelltypen hat. Eine solche Untersuchung kann Aufschluss darüber geben, in welchen Zellen und Geweben die Proteinmethylierung eine wichtige Rolle spielt.

Da SAF-A in allen Geweben in großen Mengen exprimiert wird, wurde es als Modellprotein für diese Experimente gewählt. Durch Westernblot-Analysen wurde mit dem oben beschriebenen methylierungs-sensitiven Peptidantikörper A232 der Methylierungsgrad von SAF-A in 23 humanen und einer Affen-Zelllinie untersucht. Als Kontrolle diente der polyklonale Antikörper K371, der SAF-A unabhängig vom Methylierungsstatus erkennt (Abb. 4.28). Es wurden sowohl Suspensionszelllinien (z.B. Jurkat T-Lymphozyten, CA46 B-Lymphozyten, HL-60 Promyeloblasten) als auch adherente Zellen untersucht (z.B. HeLa Cervix Adenokarzinoma-Zellen, TE671 cerebellare Medullablastoma-Zellen und SaOs-2 Osteosarkoma-Zellen). Zudem wurde auf die Heterogenität der Zellen in Bezug auf Ursprung (z.B. Tumore aus Leber, Kolon und Epidermis; verschiedene Leukämieformen; normales Gewebe), Morphologie (epithelial, fibroblastisch, lymphoblastisch, myeloblastisch) und Kulturbedingungen geachtet. Alle diese Zelllinien enthalten erwartungsgemäß vergleichbare Mengen an SAF-A. Überraschenderweise konnte in keiner der Zelllinien unmethyliertes SAF-A nachgewiesen werden. Die Arginin-Methylierung von SAF-A ist dem zufolge eine wesentliche ubiquitäre und quantitative Modifikation.

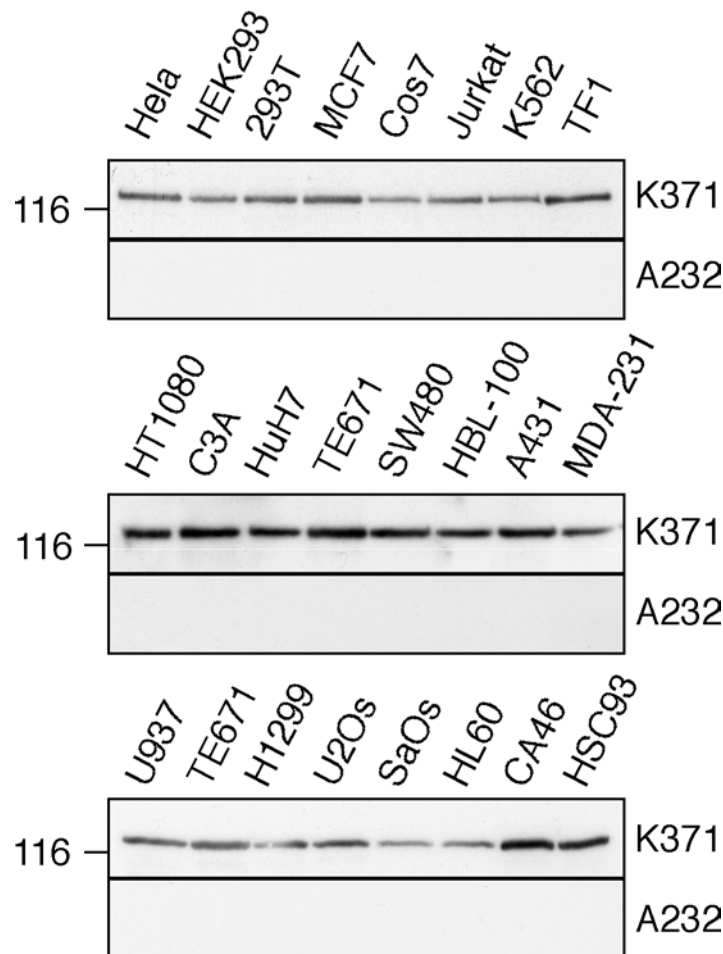


Abb. 4.28 Methylierungsstatus von SAF-A in verschiedenen Zelllinien.

Ganzzellextrakte von 23 humanen und einer Affen-Zelllinie (Cos7) wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt, auf eine PVDF-Membran gebロットet und mit Antikörper gegen gesamtes SAF-A (K371) bzw. Peptidantikörper gegen unmethyliertes SAF-A (A232) immungefärbt. Man beachte, dass SAF-A ein ubiquitäres Protein ist und in allen untersuchten Zelllinien vollständig methyliert vorliegt.

4.3.7 Lokalisation und Mobilität von hypomethyliertem SAF-A

Die subzelluläre Lokalisation zahlreicher RNA-bindender Proteine wie RNA Helikase A, Sam68 und hnRNP-A wird durch ihren Methylierungsstatus beeinflusst (Coté *et al.*, 2003; Smith *et al.*, 2004; Nichols *et al.*, 2000). Um zu untersuchen, ob dies auch für SAF-A der Fall ist, wurden Immunfluoreszenz-Experimente mit dem methylierungs-sensitiven Peptidantikörper A232 und einem Antikörper gegen gesamtes SAF-A (K371) durchgeführt. Dabei zeigte sich, dass die subzelluläre Lokalisation von SAF-A unabhängig vom Methylierungsstatus des Proteins ist, da beide verwendeten Antikörper ein identisches Färbemuster im Zellkern aufwiesen (Abb. 4.29). Auch die Gesamtmenge an SAF-A blieb nach Adox-Behandlung unverändert. Die Methylierung hat also weder Einfluss auf die Stabilität noch auf den Expressionslevel des Proteins.

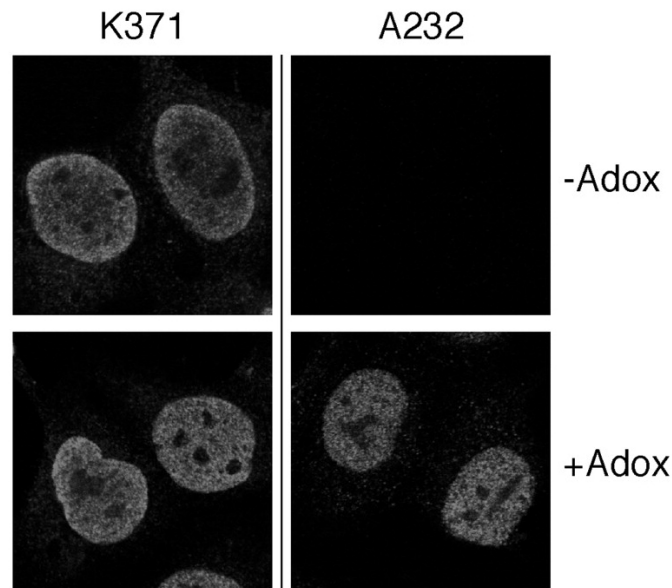


Abb. 4.29 Lokalisation von hypomethyliertem SAF-A.

Lokalisation von SAF-A ist unabhängig vom Methylierungsstatus. Hypomethylierte (+Adox) bzw. unbehandelte (-Adox) HEK293 Zellen wurden mit Antikörper gegen SAF-A (K371) bzw. hypomethyliertes SAF-A (A232) immungefärbt. Man beachte die identische Lokalisation von unmethyliertem (A232, +Adox) und methyliertem (K371, -Adox) SAF-A.

In vivo FRAP-Mobilitätsstudien mit fluoreszenzmarkierten Proteinen haben gezeigt, dass sich viele Proteine innerhalb des Zellkerns sehr schnell bewegen. Ein monomeres Protein kann den Zellkern innerhalb weniger Sekunden durchqueren (Seksek *et al.*, 1997; Phair & Misteli, 2000), ein Proteinkomplex mit einer Größe von bis zu 500 kDa in weniger als einer Minute (Dundr & Misteli, 2000). Interessanterweise konnte beobachtet werden, dass viele Proteine eine geringere Diffusionsgeschwindigkeit besitzen, als nach ihrem Molekulargewicht anzunehmen wäre (Phair & Misteli, 2000; Pederson, 2000; Shopland & Lawrence, 2000; Kruhlak *et al.*, 2000). Grund dafür sind transiente Wechselwirkungen z.B. mit Nukleinsäuren, anderen Proteinen oder der Kernmatrix (Shopland & Lawrence, 2000; Kruhlak *et al.*, 2000).

In unserem Labor durchgeführte Experimente haben gezeigt, dass SAF-A eine sehr geringe Mobilität im Zellkern besitzt, die stark vom Transkriptionszustand der Zelle abhängt (Reuschlein, 2004). Normalerweise liegen etwa 50 % aller SAF-A-Moleküle in einer immobilen Fraktion im Zellkern vor. Wird jedoch die mRNA-Synthese durch Zugabe von Transkriptioninhibitoren (α -Amantin und DRB) verhindert, kommt es zu einem Zusammenbruch der Zellkernstruktur und somit zu einer erhöhten Diffusionsgeschwindigkeit und einer Verringerung der immobilen Fraktion (auf ca. 30 %) von SAF-A. Die Bindung von SAF-A an nukleäre RNA als Bestandteil der Kernmatrix wird dabei von der RGG-Box vermittelt. Entfernt man die RGG-Box, hat dies

vergleichbare Auswirkungen auf die Mobilität des Proteins wie eine Hemmung der Transkription. Um zu überprüfen, ob die RNA-Bindung und somit die Mobilität von SAF-A durch den Methylierungsstatus der RGG-Box beeinflusst ist, wurden *in vivo* FRAP-Mobilitätsstudien von SAF-A:GFP in +/- Adox-behandelten Zellen durchgeführt.

Interessanterweise wurde eine erhöhte Mobilität von SAF-A unter hypomethylierten Bedingungen beobachtet. Der Anteil der mobilen Fraktion $MF(t)$ war im Vergleich zu unbehandelten Zellen ebenfalls um ca. 10% erhöht (Abb. 4.30).

Um eine gesicherte Aussage über die Änderung der Mobilität von hypomethyliertem SAF-A:GFP treffen zu können, wurden die Ergebnisse statistisch abgesichert. Dazu wurden die Daten mittels eines unabhängigen „t-Tests“ auf Signifikanz geprüft. Bereits nach ca. 4 s Fluoreszenzrückstrom sind die Mittelwerte mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit $p < 0.05$ signifikant verschieden.

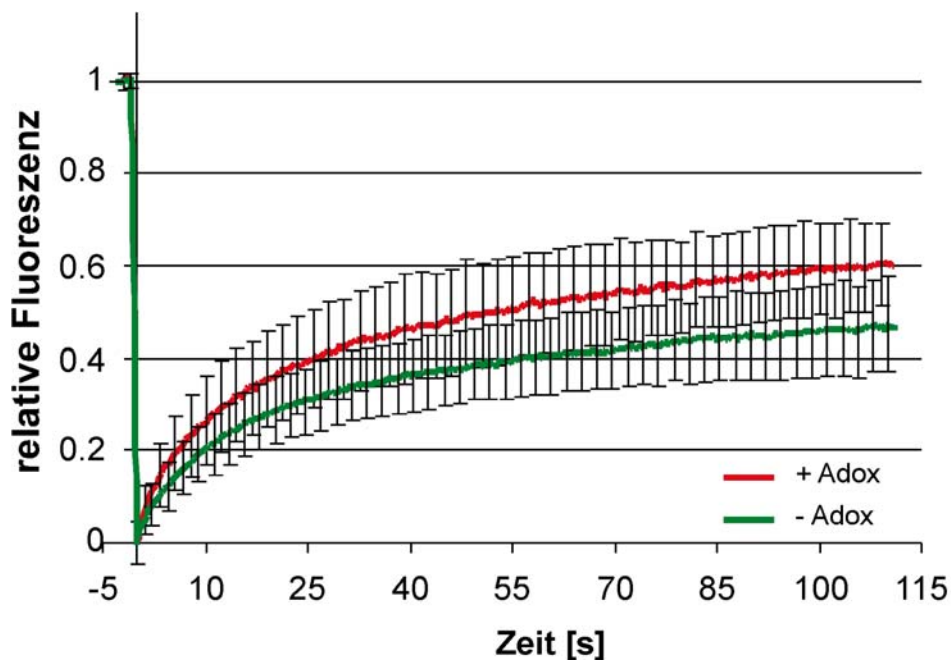


Abb. 4.30 Mobilität von SAF-A:GFP im Nukleus.

Bestimmung der *in vivo* Mobilität von SAF-A:GFP mittels FRAP. Die Zellen waren entweder unbehandelt (grün) oder für 2 Tage mit dem Methylierungsinhibitor Adox behandelt worden (rot). FRAP-Experimente wurden wie in Abb. 4.10 beschrieben durchgeführt. Fehlerbalken geben die Standardabweichungen der Mittelwerte an.

4.3.8 Kartierung der Methylierungsstellen durch MALDI-TOF

In den vorangegangenen Kapiteln wurde gezeigt, dass SAF-A sowohl *in vitro* als auch *in vivo* von PRMT1 im Bereich der Aminosäuren 779-794 methyliert wird. Allerdings geben diese Analysen keinen eindeutigen Hinweis darauf, welche der potentiellen Arginine *in vivo* tatsächlich methyliert vorliegen. Zudem befinden sich in der gesamten Sequenz von SAF-A noch einige weitere potentielle Methylierungsstellen mit der Aminosäuresequenz RG. Die exakte Kartierung der Methylierungsstellen auf SAF-A sollte über eine massenspektrometrische Analyse erfolgen. Dazu wurde endogenes SAF-A aus HEK293 Zellen immungefällt und mittels MALDI-TOF untersucht.

Proteine lassen sich anhand von Peptidmassen ihrer proteolytischen Fragmente in einer Proteindatenbank identifizieren. Bei diesem sog. „*Peptide-Mass-Fingerprinting*“ wurden die experimentell bestimmten Peptidmassen von SAF-A mit den Massen der theoretisch zu erwartenden Peptidfragmente („*in silico*-Verdau“) verglichen. Dabei konnten nicht alle beobachteten Peptidmassen einem unmodifiziertem Peptidfragment von SAF-A zugeordnet werden. Daher wurden die theoretischen Peptidmassen methylierter Peptide von SAF-A berechnet und mit den beobachteten, nicht zugeordneten Peptidmassen verglichen. Diese Untersuchung zeigte, dass mindestens sieben der insgesamt 19 potentiellen RG-Methylierungsstellen von SAF-A modifiziert sind (*Tabelle 4.5*). Interessanterweise waren alle identifizierten Arginine im C-terminalen Bereich von SAF-A zu finden und lagen ausschließlich in dimethylierter Form vor. Es wurden keine Methylierungsstellen gefunden, die nicht dem Konsensus RG entsprachen. In der Region zwischen den Aminosäuren 779 bis 794, die für die Herstellung des methylsensitiven Antikörpers verwendet wurde, waren die Arginine 789 und 793 dimethyliert.

Masse exper. Da	Masse berech. Da	Aminosäuresequenz	AS in SAF-A	Modifikation
1804.33	1804.42	NKSGKNQFN R GGG H RGR	693-709	2x Dimethyl
1383.76	1383.68	NQFN R GGG H RGR	698-709	2x Dimethyl
2304.04	2304.07	R GNMPQ R GGGGGGSGGIGYPYPR	733-755	2x Dimethyl
1315.54	1315.58	GSYSN R GNYNR	763-773	Dimethyl
1049.54	1049.52	G R GNN R GYK	788-796	Dimethyl
836.40	836.40	GNN R GYK	790-796	Dimethyl

Tabelle 4.5 Methylierte Argininreste in SAF-A.

4.3.9 Klonierung von SAF-A Punktmutanten

Die Kartierung der Methylierungsstellen auf SAF-A ermöglichte die zielgerichtete Einführung spezifischer Punktmutationen an diesen Stellen, um die funktionelle Rolle der Modifikation näher zu untersuchen. Als Ausgangsmaterial für die Mutagenesereaktionen wurden die Expressionsvektoren pEGFP-SAF-A bzw. pCMV-SAF-A:myc verwendet. Zunächst wurden einzelne Codons der Argininreste 773, 779 und 793 zu Lysincodons mutiert; später wurde eine Mehrfachmutation hergestellt, bei der alle drei Argininreste mutiert sind (R773/779/793K). Um Veränderungen im Methylierungsstatus der Proteine biochemisch untersuchen zu können, wurden zwei Argininreste mutiert (R779 und R793), die auf dem Epitop des methylsensitiven Antikörpers A232 liegen und *in vivo* methyliert sind. Zudem wurde der an das Epitop angrenzende Argininrest R773 mutiert (s. Abb. 4.31). Um die positive Ladung der Seitenkette zu erhalten, wurde bei allen Mutationen die Aminosäure Arginin zu Lysin (R→K) ausgetauscht. Weder bei den Einfachmutationen noch bei der Mehrfachmutation waren signifikante Änderungen der Lokalisation, Mobilität oder Bindungseigenschaften zu beobachten (*Daten nicht gezeigt*).

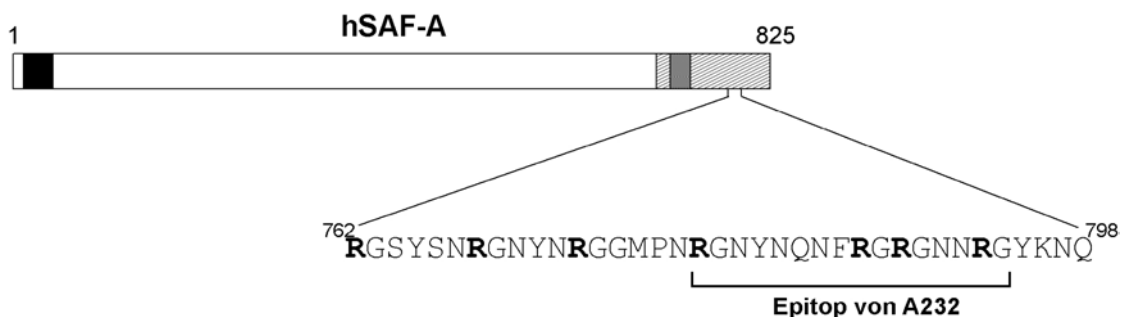


Abb. 4.31 Schematische Darstellung potenzieller Methylierungsstellen.

Gezeigt ist das Epitop für den methylierungssensitiven Peptidantikörper A232 in der RG-reichen Sequenz des Carboxy-Terminus von SAF-A. Zwischen R762 und Q798 liegen insgesamt sieben potenzielle Methylierungsstellen.

Wie bei zahlreichen anderen Substraten von PRMT1 ist auch bei SAF-A die funktionelle Bedeutung der Methylierung immer noch unklar. Die Methylierung von Argininen wird für grundlegende zelluläre Vorgänge, wie Genexpression oder DNA-Replikation nicht benötigt; sie ist aber essentiell für die Differenzierung embryonaler Stammzellen und für die Entwicklung von Mäuseembryonen (Pawlak *et al.*, 2000). Da SAF-A in sämtlichen untersuchten Zelllinien in vollständig methylierter Form vorliegt (vgl. Kapitel 4.3.6), könnte die Methylierung in gewisser Weise ein „Etikett“ darstellen, das ein Protein markiert und z.B. als „funktionell“, „korrekt gefaltet“ oder „korrekt lokalisiert“ ausweist.

Interessanterweise konnte in eigenen Experimenten beobachtet werden, dass transient transfizierte, im Gegensatz zu stabil transfizierten SAF-A:GFP Konstrukten nur zu einem geringen Prozentsatz methyliert sind (*Daten nicht gezeigt*). Durch die transiente Überexpression von SAF-A:GFP Molekülen und die vergleichsweise niedrige Umsatzrate von SAF-A in der Zelle könnte es zu einem Überschuss an nicht funktionellen und daher eventuell unmethylierten SAF-A Molekülen kommen.

Im folgenden Experiment wurde untersucht, ob transient transfiziertes SAF-A:GFP generell nicht oder erst mit Zeitverzögerung nach der Expression methyliert wird. Dazu wurde der „Nachschub“ an neuen SAF-A Molekülen durch Zugabe des Proteinbiosynthesehemmstoffs Cycloheximid (CHX) gestoppt und der Methylierungsstatus von SAF-A:GFP bzw. der SAF-A-Punktmutante R773/779/793K:GFP über einen Zeitraum von acht Stunden mit dem methylierungs-sensitiven Antikörper A232 überprüft (*Abb. 4.32*). Beide GFP-Fusionsproteine lagen zu Beginn der Zeitreihe in teilweise unmethylierter Form vor, die vom Antikörper A232 erkannt wurde. Während die Gesamtmenge von endogenem SAF-A und den GFP-Fusionsproteinen nahezu unverändert blieb, konnte mit zunehmender Zeit der CHX-Inkubation eine Abnahme von unmethyliertem SAF-A:GFP beobachtet werden. Es kommt also zu einer zeitverzögerten posttranslationalen Methylierung des GFP-Fusionsproteins. In Kontrollexperimenten wurde eine zu geringe PRMT1-Aktivität als Grund für die unvollständige Methylierung von SAF-A:GFP ausgeschlossen (*Daten nicht gezeigt*).

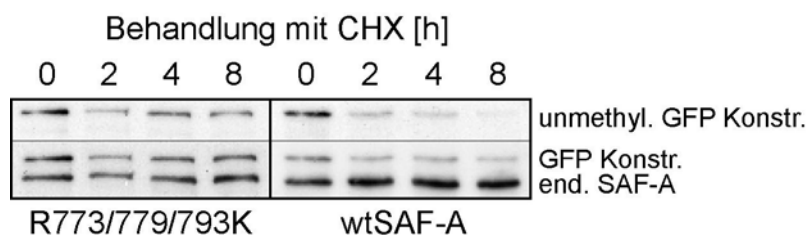


Abb. 4.32 Posttranslationale Methylierung von SAF-A:GFP.

HEK293 Zellen wurden mit SAF-A:GFP bzw. der dreifachen SAF-A Punktmutante R773/779/793K:GFP transient transfiziert. 24 h nach Transfektion wurde die Proteinbiosynthese durch Zugabe von Cycloheximid (CHX; 200 µg/ml Kulturmedium) gestoppt. Die Zellen wurden zu bestimmten Zeitpunkten während der Inkubationszeit geerntet und im Westernblot auf Anwesenheit von GFP-Fusionsproteinen bzw. unmethylierten GFP-Fusionsproteinen und endogenem SAF-A getestet. Man beachte die Abnahme von unmethyliertem SAF-A:GFP über die Zeit.

Die SAF-A-Punktmutante R773/779/793K:GFP blieb weitestgehend unmethyliert, obwohl noch zwei nicht-mutierte, potenzielle Methylierungsstellen (R787, R789) im Epitop von A232 vorhanden sind (vgl. *Abb. 4.31*). Die bevorzugte Methylierungsstellen im Bereich

zwischen Arginin 779 und Glycin 794 befinden sich also an Arginin 779 und/oder Arginin R793.

Bei der Wiederholung des oben beschriebenen Experiments mit den einfach mutierten Konstrukten R779K- bzw. R793K:GFP zeigte sich, dass transient transfiziertes R779K:GFP ähnlich wie SAF-A:GFP methyliert wird. Die Punktmutante R793K:GFP blieb dagegen wie R773/779/793K:GFP nahezu vollständig unmethyliert (Abb. 4.33). Dieses Ergebnis bestätigt die bereits durch MALDI-TOF ermittelte *in vivo* Methylierung von Arginin 793.

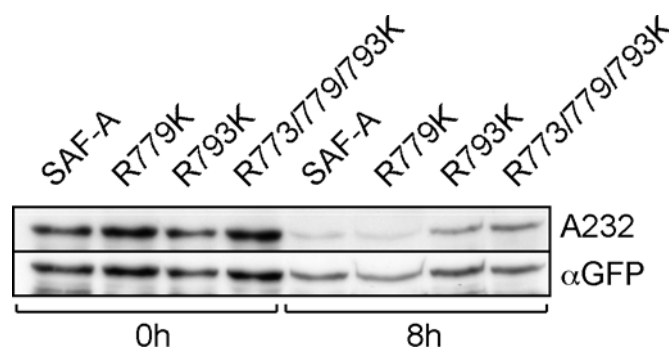


Abb. 4.33 Arginin 793 ist eine bevorzugte Methylierungsstelle in SAF-A.

HEK293 Zellen wurden mit SAF-A:GFP bzw. mit verschiedenen Punktmutanten transient transfiziert und wie in Abb. 4.32 beschrieben behandelt. Die Zellen wurden direkt bzw. nach acht Stunden Inkubationszeit geerntet und im Westernblot auf Anwesenheit von GFP-Fusionsproteinen bzw. unmethylierten GFP-Fusionsproteinen (A232) getestet.

4.3.10 Untersuchungen zur Reversibilität der Arginin-Methylierung

Posttranslationale Modifikationen an Proteinen erweitern die strukturelle und funktionelle Vielfalt des Proteoms um ein Vielfaches. So dienen Protein-Modifikationen wie Phosphorylierung und Acetylierung der Zelle als reversible Schalter, um z.B. die Aktivität von Proteinen zu regulieren. Voraussetzung für die Reversibilität einer Modifikation ist allerdings das Vorhandensein antagonistischer Enzyme (z.B. Kinasen und Phosphatasen), um eine zeitliche Regulation zu gewährleisten.

Die Suche nach einer spezifischen Arginin-Demethylase blieb über viele Jahre erfolglos. Daher wurde die Methylierung von Argininresten lange als eine statische, irreversible Modifikation betrachtet. Erst im Jahr 2004 konnte gezeigt werden, dass eine durch Peptidyl-Arginin-Deiminase-4 (PAD-4) vermittelte Arginin-Deiminierung die Methylierung von Histonen rückgängig gemacht werden kann (Cuthbert *et al.* 2004; Sarmiento *et al.*, 2004). Bei dieser Reaktion werden sowohl unmodifiziertes als auch monomethyliertes, nicht aber dimethyliertes Arginin (Hidaka *et al.*, 2005) durch Abspaltung eines Guanidino-Stickstoffs irreversibel in die seltene Aminosäure Citrullin umgewandelt (s. Abb. 4.34 A).

Bislang wurden sämtliche Untersuchungen zur Reversibilität der Arginin-Methylierung an Histonen durchgeführt, wo diese Modifikation eine Rolle bei der Regulation transkriptioneller Aktivität spielen könnte. Ob diese Reaktion auch an hnRNP-Proteinen, den Hauptsubstraten von PRMT1, stattfindet, ist noch ungeklärt.

In den folgenden Experimenten sollte daher untersucht werden, ob die bei SAF-A und anderen Substrat-Proteinen methylierten Arginine durch PAD zu Citrullin deiminiert werden können.

Zunächst wurden Ganzzellextrakte aus HEK293 Zellen als Substrat für einen Citrullinierungsassay mit einer Skelettmuskel-Peptidyl-Arginin-Deiminase (smPAD/PAD2) verwendet. Die erfolgreiche Deiminierung von Proteinen konnte im Westernblot mit einem spezifischen Antikörper gegen Citrullin gezeigt werden (*Abb. 4.34 B, links*). Mit spezifischen Antikörpern gegen Monomethyl- und Dimethyl-Arginin wurde überprüft, ob bei dieser Reaktion auch methylierte Guanidino-Stickstoffatome von Argininresten abgespalten werden. Ist dies der Fall, so müsste es zu einer Veränderung des Bandenmusters methylierter Proteine kommen.

Erwartungsgemäß konnte keine Veränderung des Bandenmuster dimethylierter Proteine beobachtet werden. Allerdings wurde tatsächlich bei mindestens zwei Proteinen monomethyliertes Arginin zu Citrullin umgewandelt (*Abb. 4.34 B, rechts*).

In einem weiteren Experiment wurde speziell untersucht, ob die PRMT1-vermittelte Methylierung von SAF-A durch eine Deiminierung mit smPAD rückgängig gemacht werden kann. Dazu wurde hypomethyliertes SAF-A immungefällt und mit rekombinanter PRMT1-GST und ^3H -SAM *in vitro* methyliert. Anschließend wurden ein *in vitro* Citrullinierungsexperiment durchgeführt. Sollten radioaktiv markierte Methyl-Guanidin-Stickstoffe durch Deiminierung von Argininen abgespalten werden, so würde dies zu einer Abnahme des Fluorographiesignals führen. In *Abbildung 4.34 B, unten* wird deutlich, dass trotz effektiver Citrullinierung der Proteine keine radioaktiv markierten Methylgruppen abgespalten wurden. Man beachte: Die Deiminierung von Argininen führt zu einer Änderung der Gesamtladung der Proteine. Dadurch verändert sich das Migrationsverhalten von SAF-A im SDS-PAGE.

Es konnte also gezeigt werden, dass die Dimethylierung, und größtenteils auch die Monomethylierung des Guanidin-Stickstoffs von Arginin, eine Deiminierung durch PADs verhindern.

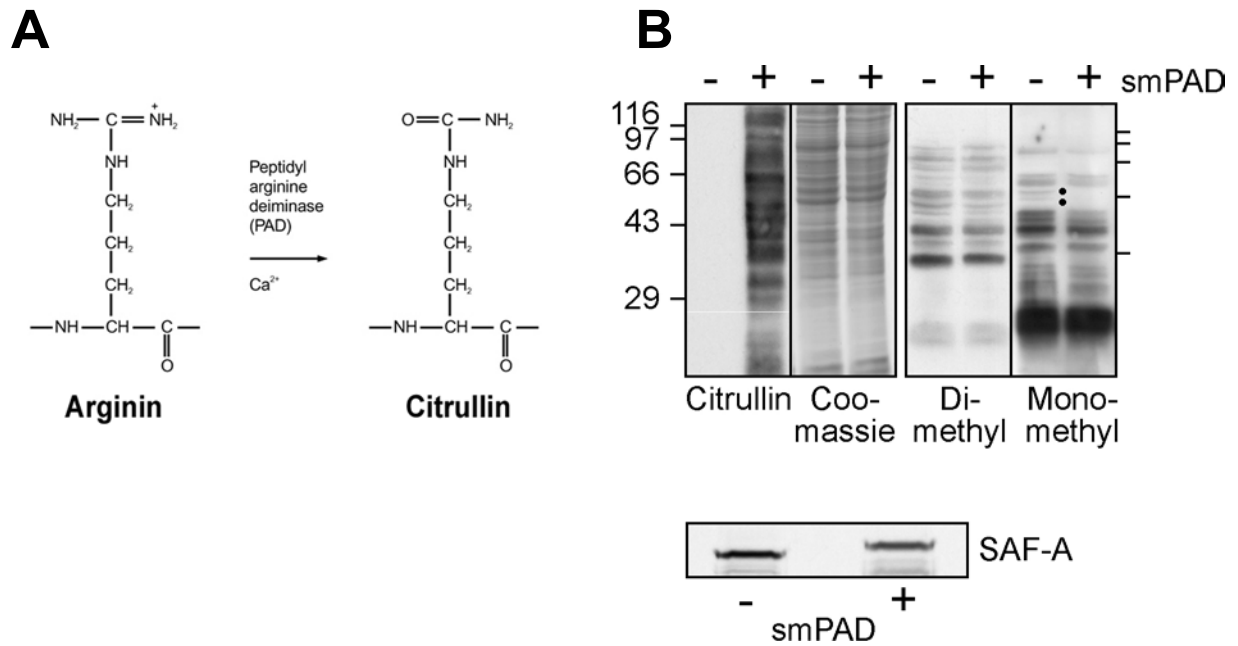


Abb. 4.34 Citrullinierung von Argininen.

Dimethylierte Arginine werden nicht zu Citrullin deiminiert. *Oben:* Schema der Deiminierung von Arginin zu Citrullin vermittelt durch eine Ca²⁺-abhängige Peptidyl-Arginin-Deiminase (PAD). *Mitte:* Ganzzelextrakte aus HEK293 Zellen wurden mit gereinigten Skelettmuskel-Peptidylarginindeiminase (+ smPAD) citrulliniert. Anschließend wurden die Proteine im Westernblot mit Antikörper gegen Citrullin, Dimethylarginin und Monomethylarginin immungefärbt. Als Ladekontrolle wurde die Gesamtmenge an Proteinen mit Coomassieblau angefärbt. Die Punkte markieren Proteine, deren Monomethylarginine zu Citrullin deiminiert wurden. *Unten:* Aus hypomethyliertem Ganzzelextrakt immungefälltes SAF-A wurde zunächst *in vitro* mit ³H-SAM und rekombinanter GST-PRMT1 methyliert. Die radioaktiv markierten Proteine wurden in zwei Aliquote aufgeteilt und *in vitro* mit smPAD inkubiert (Kontrolle, - smPAD). Die Proteine radioaktiv markierten Proteine wurden mittels Fluorographie detektiert. Man beachte das unterschiedliche Migrationsverhalten von citrulliniertem SAF-A im SDS-PAGE.

4.3.11 Klonierung und Analyse von SAF-A2

In *Kapitel 4.3.6* dieser Arbeit wurde gezeigt, dass SAF-A in sämtlichen untersuchten Zelllinien vollständig methyliert vorliegt. Zudem konnte bislang kein Enzym identifiziert werden, das dimethylierte Argininreste von hnRNP-Proteinen entfernen kann. Die Methylierung von hnRNP-Proteinen scheint also nicht zeitlich reguliert, sondern von statischer Natur zu sein. Eine Regulation könnte jedoch mit Hilfe von unmethylierten Isoformen der hnRNP-Proteinen erfolgen. So wäre denkbar, dass methylierte und unmethylierte Isoformen für spezifische Funktionen in der Zelle verantwortlich sind.

Tatsächlich haben Fackelmayer und Richter (1994) gezeigt, dass SAF-A in zwei Isoformen mit unterschiedlicher Primärsequenz, aber ähnlichen biochemischen Eigenschaften vorkommt. Beide Formen binden sowohl an RNA als auch an DNA. Allerdings konnte im Elektronenmikroskop ein Unterschied im Aggregationsverhalten der Isoformen beobachtet werden. Isoform 1 (SAF-A) aggregiert mit DNA in länglichen, unverzweigten Filamenten; Isoform 2 liegt in globulären Strukturen mit einem Durchmesser von 35 nm vor. Während zur Funktion SAF-A in den letzten Jahren zahlreiche Studien veröffentlicht wurden, konnte die komplette Primärsequenz der zweiten Isoform aufgrund fehlender Datenbankeinträge lange nicht identifiziert werden. Mit Abschluss des humanen Genomprojekts wurden diese fehlenden Einträge ergänzt, und eine Identifizierung unbekannter Sequenzabschnitte ermöglicht.

In einem Teilprojekt sollte untersucht werden, ob diese bislang nicht charakterisierte Isoform von SAF-A ebenfalls ein Substrat und Bindungspartner von PRMT1 darstellt. Zudem wurde SAF-A2 bezüglich seiner Expression, Lokalisation und Diffusionseigenschaften untersucht. Dazu wurde die kodierende Sequenz der SAF-A Isoform 2 (SAF-A2) durch Datenbankrecherche ermittelt und in einen GFP-Expressionsvektor kloniert. Ein Teil der Primärsequenz von SAF-A2 wurde durch eine Vergleichsanalyse („Basic Local Alignment Search Tool“ (BLASTP/X); www.ExPASy.org) der bekannten Peptidsequenz **DEVTYGELEKEEAQ** (Fackelmayer & Richter, 1994) mit veröffentlichten „Expressed Sequence Tag“ (EST) cDNA-Sequenzen gefunden. Der noch fehlende N-terminale Bereich konnte durch den Vergleich überlappender cDNA-Sequenzen identifiziert werden. Aus zwei cDNA-Vektoren wurde die Gesamtsequenz von SAF-A2 zusammengesetzt und in den Expressionsvektor pEGFP-N1 kloniert. Die Primärsequenz des Proteins umfasst 747 Aminosäuren (vgl. Anhang).

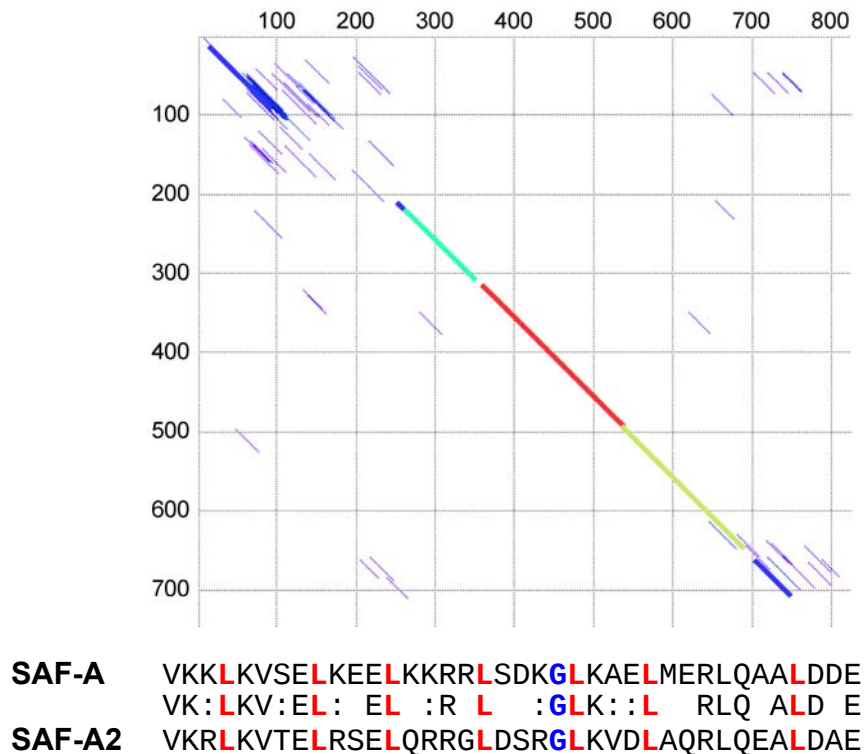


Abb. 4.35 Sequenzhomologie-Vergleich der zwei SAF-A Isoformen.

Dotplot eines Sequenzvergleichs der SAF-A Isoformen (SAF-A: 825; SAF-A2: 747 Aminosäuren). Die farbigen Linien stellen stark homologe Bereiche dar. Die größte Homologie liegt im zentralen Bereich der Proteine (rot). Unten: Sequenzvergleich der hoch konservierten DNA-Bindedomäne „SAF-Box“. Rot markiert sind die für SAF-Box-Motive typischen Leucine. Blau markiert ist das für die DNA-Bindung essenzielle Glycin. (:) markiert Aminosäuren mit gleicher Ladung.

Ein Sequenzvergleich beider SAF-A Isoformen zeigt, dass besonders im zentralen Bereich eine hohe Sequenzhomologie besteht (Abb. 4.35). Der DNA-bindende Bereich von SAF-A, die sogenannte „SAF-Box“ (Göhring *et al.*, 1997; Kipp *et al.*, 2000) ist auf SAF-A2 ebenfalls konserviert (Abb. 4.35). Interessanterweise fehlt im C-Terminus von SAF-A2 die RNA-Bindedomäne (RGG-Box). Insgesamt sind auf SAF-A2 nur acht der für dieses Proteinmotiv typischen RG-Sequenzabfolgen zu finden; vier davon befinden sich im vorderen Bereich, vier im hinteren Viertel des Proteins.

Das neue Fusionsprotein wurde im Westernblot mit verschiedenen Antikörper auf korrekte Expression getestet. Interessanterweise konnte SAF-A2:GFP nur mit einem Antikörper gegen GFP, aber nicht mit SAF-A-spezifischen Antikörpern detektiert werden. Dabei migrierte SAF-A2:GFP mit einem scheinbaren Molekulargewicht von ca. 130 kDa erwartungsgemäß etwas schneller als SAF-A:GFP (Abb. 4.36 A, oben). Außerdem wurde das Sedimentationsverhalten der zwei SAF-A Isoformen im Glyceringradienten miteinander verglichen. Dazu wurden Extrakte aus stabil transfizierten HEK293 Zellen über Glyceringradientenzentrifugation sedimentiert. Anschließend wurden die Fraktionen im Westernblot mit Antikörper gegen GFP untersucht (Abb. 4.36 A, unten). SAF-A2:GFP war in fast allen Fraktionen in ähnlichen Mengen nachzuweisen. D.h., SAF-A2 ist in

unterschiedlich großen Komplexen gebunden. Der größte Teil von SAF-A sedimentiert als Bestandteil der hnRNP-Komplexe etwas tiefer als die zweite Isoform. Die subzelluläre Lokalisation beider SAF-A Isoformen ist sehr ähnlich; beide waren ausschließlich im Zellkern zu finden und zeigten ein heterogenes Verteilungsmuster (Abb. 4.36 **B**). SAF-A ist mit der RGG-Box über eine Bindung an Xist-RNA in den inaktiven X-Chromosomenterritorien (Barr-Körperchen) angereichert (Helbig & Fackelmayer, 2003; Fackelmayer, 2005). Auf SAF-A2 fehlt dieses RNA-Bindemotiv, daher konnte erwartungsgemäß keine Anreicherung von SAF-A2 an inaktiven X-Chromosomen beobachtet werden.

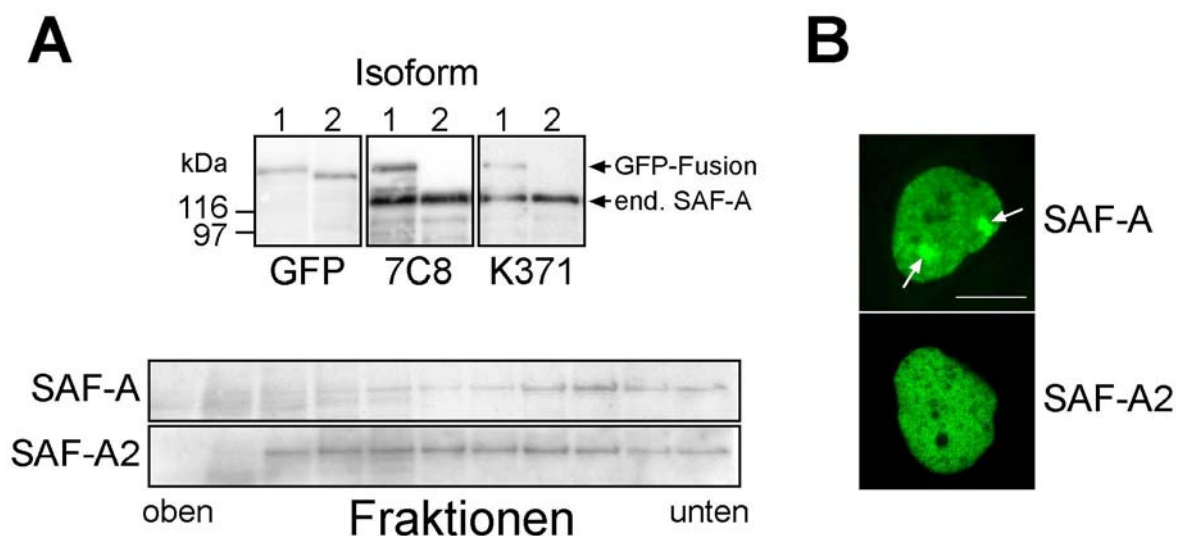


Abb. 4.36 Expressionsvergleich der zwei SAF-A Isoformen.

(A) Oben: SAF-A2:GFP wird im Westernblot nicht von SAF-A-spezifischen Antikörpern erkannt (7C8, K371). Unten: Ganzellextrakten aus stabil mit SAF-A bzw. SAF-A2:GFP transfizierten HEK293 Zellen wurde auf einen 10-30%-igen Glyceringradienten geladen. Die Auftrennung der Proteine erfolgte durch Zentrifugation (25000 rpm, 20h, 4°C) und anschließender Gelelektrophorese der von oben abgenommenen Fraktionen. Die Detektion der Fusionsproteine erfolgte durch Westernblot mit α GFP-Antikörper. (B) Konfokale Fluoreszenzaufnahmen von GFP-Fusionsproteinen im Zellkern. Die Pfeile markieren in inaktiven X-Chromosomenterritorien angereichertes SAF-A:GFP. Balken, 10 μ m.

Als Bestandteil der hnRNP-Komplexe gehört SAF-A zu den Hauptsubstraten der Typ I Methyltransferase PRMT1 und wird an zahlreichen Argininen in der RGG-Box methyliert. Dieser RNA-bindende Abschnitt fehlt bei der zweiten Isoform vollständig. Auch wenn acht vereinzelte RG-Konsensussequenzen auf SAF-A2 vorhanden sind, konnten erwartungsgemäß keine dimethylierten Arginine nachgewiesen werden (Abb. 4.37, links). Um so überraschender war die Entdeckung, dass PRMT1, aber nicht endogenes SAF-A mit SAF-A2 assoziiert ist (Abb. 4.37, rechts). Ob diese Wechselwirkung jedoch eine direkte, von der Methylierungsreaktion unabhängige Bindung ist, oder indirekt über andere Proteine vermittelt wird, muss in zukünftigen Experimenten geklärt werden.

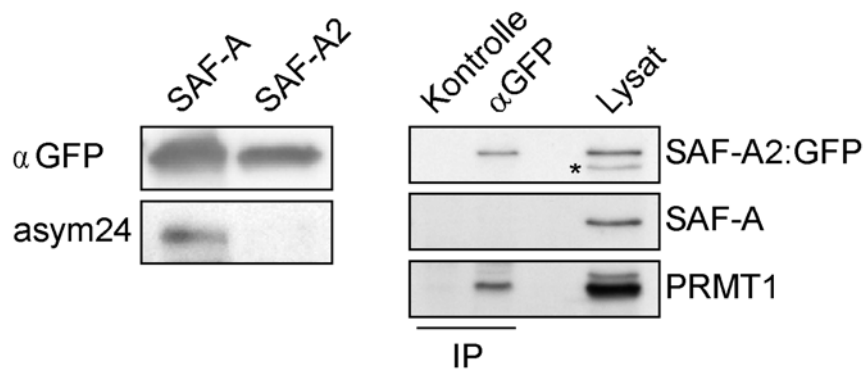


Abb. 4.37 Methylierungs-unabhängige Interaktion von SAF-A2 und PRMT1.

Links: Extrakte von transient mit GFP-Fusionsproteinen transfizierten Zellen wurden im Westernblot mit Antikörper gegen GFP und asymmetrisches Dimethylarginin (asym24) untersucht. *Rechts:* HEK293 Zellen wurden stabil mit einem SAF-A2:GFP Expressionsvektor transfiziert und der Zellextrakt mit 5 μ g α GFP Antikörper immunpräzipitiert. Die immungefällten Proteine wurden über SDS-PAGE aufgetrennt, auf eine PVDF-Membran transferiert und mit Antikörper gegen GFP, SAF-A und PRMT inkubiert. (*) markiert endogenes SAF-A aus vorheriger Färbung mit SAF-A Antikörper.

In FRAP-Untersuchungen sollte die Mobilität der beiden SAF-A Isoformen vergleichend untersucht werden. *Abbildung 4.38* zeigt den qualitativen und quantitativen Vergleich des Fluoreszenzrückstroms beider SAF-A Proteine. Zur besseren optischen Darstellung wurde die Mobilität beider Isoformen gleichzeitig in einem Zellkern gemessen. Dazu wurde das rot fluoreszierende Fusionsprotein SAF-A:dsRed in stabil SAF-A2:GFP exprimierende HEK293 Zellen co-transfiziert. Schon bei der mikroskopischen Betrachtung des Rückstromverhaltens kann ein deutlicher Unterschied festgestellt werden. Während bei SAF-A:dsRed eine unbewegliche (oder sehr langsam diffundierende) Fraktion zu beobachten war, diffundierte SAF-A2:GFP wie ein komplett lösliches Protein (MF(t) ~94 %). Die errechnete Diffusionsgeschwindigkeit ($D=0.62 \mu\text{m}^2/\text{s}$) war dabei etwas schneller als die von löslichem hnRNP-C ($D=0.44 \mu\text{m}^2/\text{s}$, vgl. *Tabelle 4.3*). Obwohl die Diffusionseigenschaften von SAF-A-Fusionsproteinen unabhängig vom verwendeten Fluorophor sind (Schwander, 2004), wurden alle quantitativen Untersuchungen einzeln in stabil mit SAF-A- bzw. SAF-A2:GFP transfizierten Zellen durchgeführt.

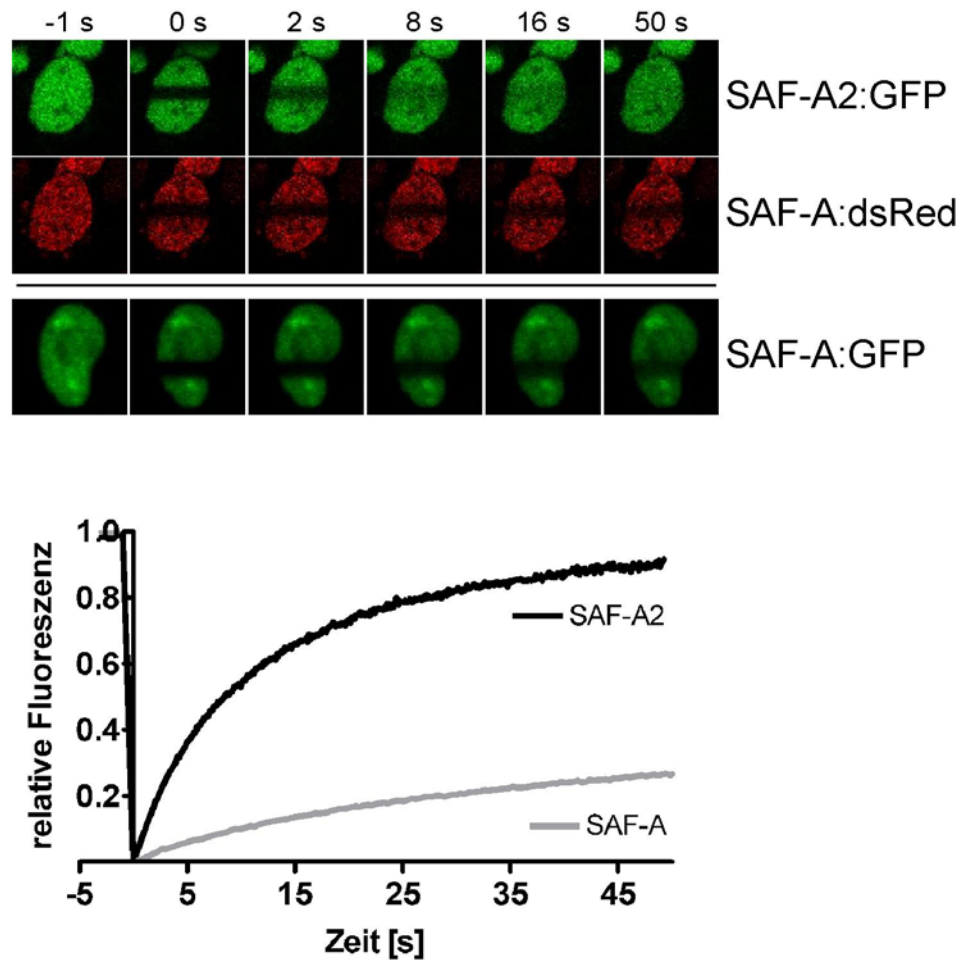


Abb. 4.38 Vergleich der *in vivo* Mobilität der SAF-A Isoformen.

FRAP-Analyse von SAF-A:GFP, SAF-A:dsRed und SAF-A2:GFP in stabil transfizierten Zellen. Details zur Darstellung s. Abb. 4.9 und 4.10.

Die vergleichende Charakterisierung der SAF-A Isoformen zeigt, dass beide Proteine trotz hoher Sequenzhomologie unterschiedliche biochemische Eigenschaften besitzen. Interessanterweise ist SAF-A2 ein Interaktionspartner aber kein Substrat von PRMT1. Auch die Diffusionseigenschaften der beiden Proteine sind sehr verschieden. Vermutlich interagieren die zwei Isoformen mit unterschiedlichen Proteinen im Zellkern. An welchen funktionellen Prozessen im Zellkern SAF-A2 beteiligt ist, muss in kommenden Experimenten untersucht werden.

5. Diskussion

Die vorliegende Dissertation beschäftigt sich mit der Aufklärung der funktionellen Bedeutung einer bisher nur unzureichend verstandenen posttranslationalen Modifikation, der Methylierung von Argininresten in Proteinen. Die Kombination von *in vivo* Untersuchungen zur Lokalisation und Dynamik der für diese Modifikation verantwortlichen Enzyme und Studien zur funktionellen Rolle der Arginin-Methylierung in humanen Zellen bietet zum ersten Mal die Möglichkeit, tiefere Einblicke in die Dynamik funktioneller Netzwerke zu erhalten, an denen Arginin-Methyltransferasen beteiligt sind. In den ersten beiden Abschnitten dieser Arbeit wurde die Komplexbildung und *in vivo* Mobilität der acht bekannten humanen Protein-Arginin-Methyltransferasen erstmals mittels Lebendzellmikroskopie-Verfahren vergleichend untersucht. Ein besonderer Schwerpunkt lag dabei auf der Charakterisierung der häufigsten Methyltransferase PRMT1 bezüglich ihrer subzellulären Lokalisation und Substratbindung. In einem weiteren Abschnitt wurde die funktionelle Bedeutung der Arginin-Methylierung anhand eines gut charakterisierten Substratproteins, des Scaffold Attachment Factors A (SAF-A), näher untersucht.

5.1 Mobilität und Komplexbildung von Protein-Arginin-Methyltransferasen in humanen Zellen

5.1.1 Lokalisation und Aktivität der PRMTs

Um die spezifischen Funktionen der verschiedenen PRMT-Familienmitglieder in der lebenden Zelle besser verstehen zu können, wurde eine vergleichende Charakterisierung der einzelnen PRMTs bezüglich ihrer Lokalisation, Komplexbildung und Mobilität durchgeführt. Schon die spezifische Lokalisation der endogenen PRMTs und ihrer GFP-Fusionsproteine macht deutlich, dass die acht Familienmitglieder in unterschiedliche funktionelle Netzwerke der Zelle involviert sind (*Abb. 4.1*) Die subzelluläre Verteilung der einzelnen PRMTs in HEK293 Zellen variiert dabei erheblich von einer vorwiegend cytoplasmatischen Lokalisation von PRMT1, 3 und 5, (Tang *et al.*, 1998; Rho *et al.*, 2001) über eine vorwiegend nukleäre Lokalisation von PRMT2, 4 und 7, (Frankel *et al.*, 2002; Lee *et al.*, 2005) bis hin zu einer ausschließlich im Zellkern lokalisierten PRMT6 (Frankel *et al.*, 2002) bzw. membranassoziierten PRMT8 (Lee *et al.*, 2005a).

Um sicherzustellen, dass die in späteren Mobilitätsstudien eingesetzten GFP-Fusionsproteine der PRMTs vergleichbare Eigenschaften wie ihre endogenen Äquivalente besitzen, wurden sie bezüglich ihrer Expression, Lokalisation und Aktivität sowohl biochemisch als auch mikroskopisch untersucht. Sämtliche GFP-Fusionsproteine lokalisierten identisch wie die endogenen PRMTs nach einer Immunfärbung mit spezifischen Antikörpern (*Abb. 4.1 & 4.4*). Lediglich die GFP-Fusionsproteine von PRMT4 und PRMT7 zeigten eine stärkere cytoplasmatische Anreicherung als ihre endogenen Äquivalente. Welche Lokalisation in diesen Fällen jedoch die tatsächliche Verteilung der beiden Proteine in der Zelle widerspiegelt, kann bisher nicht eindeutig gesagt werden. Möglicherweise reagieren die bei der Immunfluoreszenz eingesetzten Antikörper unspezifisch mit Proteinen des Zellkerns, oder eine Überexpression der GFP-Fusionsproteine führt zu einer Anreicherung der Proteine im Cytoplasma. Da PRMT4 jedoch co-aktivierende Funktionen bei der Regulation der Transkription ausübt (Lee *et al.*, 2005), ist eine vorwiegend nukleäre Lokalisation des Enzyms äußerst wahrscheinlich.

Interessanterweise variierte die subzelluläre Verteilung von PRMT1:GFP und PRMT4:GFP in verschiedenen Zelltypen. Während in HEK293 Zellen eine überwiegend cytoplasmatische Anreicherung beobachtet wurde, zeigte sich in Hela und Jurkat Zellen eine variable, bei PRMT4 sogar Zellzyklus-abhängige Lokalisation der Proteine (unveröffentlichte Beobachtungen, P. Pably).

Die enzymatische Aktivität der Fusionsproteine wurde durch *in vitro* Methylierungsexperimente überprüft. Dabei zeigten vor allem die zwei am besten charakterisierten Methyltransferasen PRMT1 und PRMT4 die größte spezifische Aktivität. Für beide Enzyme sind in den letzten Jahren zahlreiche Substrate identifiziert worden, die an verschiedenen Prozessen im Zellkern beteiligt sind (Bedford & Richard, 2005). So sind PRMT1 und PRMT4 z.B. involviert in Prozesse bei der Transkription durch eine Methylierung von Histon H4 bzw. H3 (Chen *et al.*, 1999; Wang *et al.*, 2001). Die Methylierung von rekombinanten Histonen H4 bzw. H3 beweist, dass beide Fusionsproteine mit funktionellen Proteinkomplexen assoziiert sind. Für PRMT2 und die membranassoziierte PRMT8 konnte bislang keine Aktivität nachgewiesen werden. Allerdings wurde bereits gezeigt, dass PRMT8 und PRMT1 hetero-dimerisieren (Lee *et al.*, 2005a). Die bei PRMT8 beobachtete Aktivität ist daher durch co-präzipitierte PRMT1-Aktivität zu erklären.

Für die Fusionsproteine PRMT3- und PRMT7:GFP konnte keine deutliche Methylierungsaktivität nachgewiesen werden, was durch eine relativ schwache

Expression und eine vergleichsweise niedrige enzymatische Aktivität dieser PRMTs zu erklären ist. So besitzt z.B. PRMT3 nur einen Bruchteil (~0.8 %) der spezifischen Aktivität von PRMT1 (Tang *et al.*, 1998). Außerdem wurden in bisherigen Untersuchungen, im Gegensatz zu den in dieser Arbeit durchgeführten Experimenten, fast ausschließlich rekombinante Enzyme und Substrate verwendet. So konnte für PRMT3 mit dem ribosomalen Protein rpS2 bislang nur ein *in vivo* Substrat identifiziert werden (Swiercz *et al.*, 2005). Höchstwahrscheinlich wird die Aktivität der nativen PRMTs durch weitere assoziierte Faktoren wesentlich spezifischer reguliert als bei bakteriell exprimierten GST-Fusionsproteinen (Frankel & Clarke, 2000).

5.1.2 Bestimmung der Komplexgrößen von PRMTs

Durch biochemische und fluoreszenzmikroskopische Studien wurde gezeigt, dass die nativen PRMTs in unterschiedlich großen (Multi-) Proteinkomplexen gebunden sind. Im Glyceringradienten sedimentierten endogene PRMT1, 4 und 5 erwartungsgemäß in größeren Komplexen mit einem Molekulargewicht von über 200 kDa (Abb. 4.5). Von diesen Enzymen ist bekannt, dass sie zur Ausbildung großer funktioneller homomerer und heteromerer Komplexe fähig sind (Lim *et al.*, 2005; Xu *et al.*, 2004, Friesen *et al.*, 2001a). Die anderen PRMTs waren deutlich beweglicher und zeigten ein typisches Sedimentationsverhalten von Monomeren oder kleinen oligomeren Komplexen. Sämtliche GFP-Fusionsproteine sedimentierten in vergleichbaren Komplexgrößen wie ihre endogenen Äquivalente und sind daher höchstwahrscheinlich Teil der gleichen funktionellen Proteinnetzwerke *in vivo*. Sie eignen sich also ohne Einschränkung zur fluoreszenzmikroskopischen Analyse der Diffusionseigenschaften von PRMTs. Einzig das GFP-Fusionsprotein von PRMT5 zeigte ein unnatürliches Komplexierungsverhalten. Es bildet im Cytoplasma große unlösliche Aggregate mit einer Masse von mehreren Megadalton (Abb. 4.6). Die Auswertung der Diffusionseigenschaften von PRMT5:GFP ist daher nur unter Vorbehalt zu betrachten.

Durch Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie (FCS) wurde die Größe der PRMT-Komplexe genauer quantifiziert (Tabelle 4.1). Dabei zeigte sich, dass PRMT6 und PRMT7 als Monomere, PRMT2 als Dimer und PRMT3 als tetramerer Komplex vorliegen. Für PRMT1 und PRMT4 wurden allerdings wesentlich schwerere Komplexe ermittelt als im Glyceringradienten. Die Diskrepanz zwischen den durch FCS-Analyse bzw. Glyceringradientenzentrifugation ermittelten Komplexgrößen kann verschiedene Ursachen haben. Möglicherweise zerfallen die großen fragilen Molekülkomplexe im

Verlauf der langen Ultrazentrifugation (~20 h) zu kleineren stabilen Untereinheiten. Die Analyse mittels FCS bietet daher den Vorteil, dass zwischen Probenvorbereitung und dem Ende der Messung nur wenige Minuten vergehen. Unterschiedlichen Methoden zum Aufschließen der Zellen (FCS: mechanisch in hypotonem Puffer; Glycerringradient: Lyse durch Detergenz) hatten keinen Einfluss auf die Komplexstabilität, da bei FCS-Kontrollmessungen mit Detergenz-lysierten Zellen kein Unterschied zu beobachten war. Außerdem ist zu beachten, dass es sich bei den durch FCS-Analyse ermittelten Molekulargewichten der Proteinkomplexe nur um Abschätzungen handelt. So wurde zur vereinfachten Berechnung der hydrodynamischen Radien r_H von Molekülkomplexen mittels der Stokes-Einstein-Gleichung eine kugelförmigen Gestalt der Moleküle angenommen. Dieser idealisierte Wert von r_H geht mit seiner dritten Potenz (vgl. *Kapitel 3.2.3.6*) in die Berechnung des Molekulargewichtes der Komplexe ein und birgt daher ein relativ großes Fehlerpotenzial.

In den *Kapiteln 4.2.2 und 4.3.1* wurde durch biochemische Analysen gezeigt, dass PRMT1 in hypomethylierten Zellen mit Histonen des Nukleosomenkerns und hnRNP-Partikeln assoziiert ist. Allerdings konnte in FCS-Experimenten keine Änderung des Komplexierungsverhaltens von PRMT1 in Adox-behandelten Zellen beobachtet werden (*Abb. 6.1 und Tabelle 4.2*), wie auch bei den anderen PRMTs. Möglicherweise gehen diese extrem großen Aggregate bei der Zentrifugation während der Probenvorbereitung verloren.

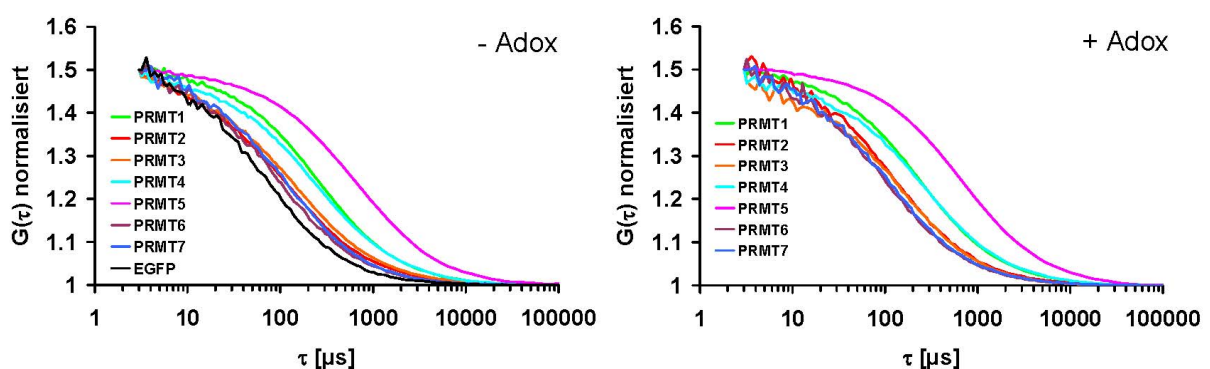


Abb. 6.1 Vergleich der Diffusionseigenschaften von PRMT-Komplexen.

Dargestellt ist ein Vergleich normalisierter Autokorrelationsfunktionen (ACF) von FCS-Messungen in verdünnten Zellextrakten. Die Zellen waren entweder unbehandelt (-Adox) oder für zwei Tage mit Adox behandelt (+Adox). Man beachte: PRMT1, 4 und 5 zeigen Diffusionseigenschaften großer Proteinkomplexe. Bei keiner der untersuchten PRMTs kann ein signifikanter Unterschied zwischen -Adox und +Adox ACFs beobachtet werden.

5.1.3 Mobilität der PRMTs *in vivo*

Die Dynamik der PRMTs in der lebenden Zelle wurde mittels „Photobleaching“ (FRAP)-Experimenten untersucht. Mit dieser Methode kann sowohl die Diffusionsgeschwindigkeit als auch die mobile bzw. immobile Fraktion von fluoreszierenden Molekülen in lebenden Zellen bestimmt werden. Trotz des hohen Gehalts an DNA, RNA und Proteinen in Zellkernen, der intuitiv eine viskose, gelartige und stark diffusionsbeschränkende Umgebung erwarten lässt, haben FRAP-Experimente der letzten Jahre gezeigt, dass die meisten Proteine, wie z.B. Faktoren des „Chromatin-remodeling“, der Transkriptionsaktivierung, des prä-mRNA-Spleißens oder der rRNA-Prozessierung, innerhalb des Zellkerns äußerst mobil sind (Huang *et al.*, 1998; Houtsmuller *et al.*, 1999; Pederson, 2000; Phair & Misteli, 2000; Shopland & Lawrence, 2000; Snaar *et al.*, 2000). Die Viskosität des Nukleoplasmas ist etwa zwei- bis dreimal höher als die des Cytoplasmas und nur etwa fünfmal höher als die von Wasser (Wachsmuth *et al.*, 2000), passend zu der Beobachtung, dass mit FITC markierte Dextrane sich im Zellkern nur etwa viermal langsamer als in wässriger Lösung bewegen (Seksek *et al.*, 1997). Ein monomeres Protein kann daher den Zellkern innerhalb weniger Sekunden durchqueren, und selbst große molekulare Komplexe können innerhalb einiger Minuten vom Zentrum des Kerns zu seiner Peripherie diffundieren (Seksek *et al.*, 1997; Phair & Misteli, 2000). Die Mobilität eines Proteins in der Zelle wird jedoch (im Gegensatz zu FCS-Mobilitätsmessungen in Lösung) nicht maßgeblich durch seine Größe, sondern vor allem durch seine transienten bzw. stabilen Interaktionen mit anderen Molekülen beeinflusst. Die Dynamik der PRMTs in verschiedenen Zellorganellen kann daher wichtige Informationen über die spezifischen Wirkungsorte und Interaktionen der Enzyme liefern.

Aufgrund ihrer zahlreichen Substrate und Interaktionspartner (Übersicht in Bedford & Richard, 2005) diffundierten PRMT1, 4, und 5 erwartungsgemäß langsamer als die hochmobilen Familienmitglieder PRMT3 und PRMT7. Dies bestätigt die Beobachtung, dass diese zwei Enzyme nur eine äußerst geringe Methylierungsaktivität aufweisen (Tang *et al.*, 1998). Obwohl bislang für PRMT2 experimentell keine enzymatische Aktivität gezeigt werden konnte, wird die Diffusion des Enzyms durch transiente, möglicherweise aktivitäts-unabhängige Wechselwirkungen verlangsamt.

Sämtliche PRMTs außer PRMT3 und PRMT7 diffundierten deutlich langsamer als das inerte Kontrollprotein β -Galaktosidase-NLS-GFP, das als Tetramer mit einem Molekulargewicht von 600 kDa vorliegt (Sorg & Stamminger, 1999). Dies verdeutlicht, dass Proteine mit einem wesentlich höheren Molekulargewicht als die PRMTs prinzipiell

frei im Kern diffundieren können. Die Mobilität der Enzyme wird also maßgeblich durch Interaktionen mit anderen Molekülen beeinflusst.

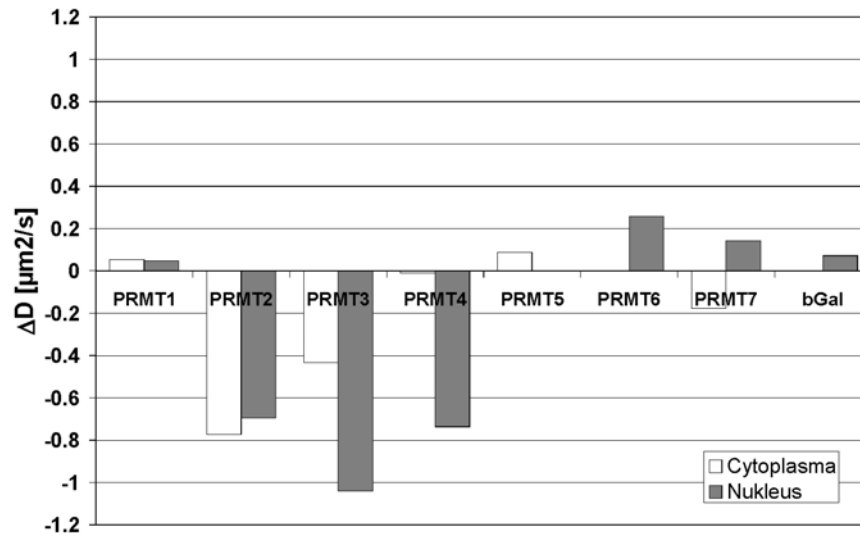


Abb. 6.2 Veränderung der Diffusionseigenschaften von PRMTs in hypomethylierten Zellen.

Angegeben ist die Abweichung vom Diffusionskoeffizienten ΔD in hypomethylierten Zellen vom Diffusionskoeffizienten D der PRMTs in unbehandelten Zellen. Man beachte, dass PRMT5 nur im Cytoplasma und PRMT6 bzw. β Gal nur im Nukleus lokalisieren.

Wie bereits erwähnt, wird aufgrund der höheren Viskosität im Nukleus die Diffusion von inerten Molekülen wie z.B. GFP etwa um den Faktor 2–3 im Verhältnis zum Cytoplasma reduziert. Abweichungen von diesem Verhältnis deuten darauf hin, dass ein Protein bevorzugt Interaktionen mit Proteinen eines speziellen Zellkompartiments eingeht.

Obwohl die meisten bekannten Substratproteine der PRMTs Aufgaben im Zellkern erfüllen, war das Verhältnis von cytoplasmatischer zu nukleärer Mobilität von PRMT1, 3, und 4 stärker beeinflusst als dies durch Unterschiede in der Viskosität erklärt werden könnte. Möglicherweise binden die PRMTs schon während bzw. kurz nach der Proteinbiosynthese an ihre Substratproteine, was zu einer verlangsamten Diffusion der Enzyme im Cytoplasma führt.

Wurden die Zellen mit dem Methylierungsinhibitor Adox behandelt, so hatte dies interessanterweise ganz unterschiedliche Auswirkungen auf die Mobilität der PRMTs in verschiedenen Zellkompartimenten (Abb. 6.2). Während die Mobilität von PRMT1, 5, 6 und 7 nahezu unverändert blieb, konnte bei PRMT2, 3 und 4 eine ortsspezifische Mobilitätsänderung beobachtet werden. Vor allem bei PRMT4, zu deren Hauptsubstrate die Histone des Nukleosomenkerns gehören, war ausschließlich die nukleäre Fraktion in ihrer Diffusion verlangsamt.

Möglicherweise besitzen die PRMTs eine unterschiedlich starke Bindungsaffinität bezüglich ihrer Substrate, die in hypomethylierten Zellen verstärkt zur Geltung kommt. Während Methyltransferasen, die in ihrer Mobilität nicht beeinträchtigt werden, eventuell nur schwach mit ihren Substraten assoziiert sind, binden PRMT2, 3 und 4 möglicherweise sehr stabil an ihre Substrate, bis die enzymatische Reaktion vollständig ausgeführt wurde. Wird die Methylierungsreaktion durch Adox inhibiert, führt dies zu einer Stabilisierung der Substratbindung und somit zu einer verringerten Mobilität der Enzyme.

PRMT1 zeigt einen Extremfall einer solchen stabilen Substratbindung. Hier führte die Inhibierung der Methylierung zu einer teilweisen Immobilisierung des Enzyms im Zellkern (*Abb. 4.10*), während die Mobilität der cytoplasmatischen Fraktion und der ungebundenen nukleären Fraktion nahezu unbeeinflusst blieb (*Abb. 6.2*). Diese durch eine stabile Substratbindung verursachte Immobilisierung von PRMT1 wird in den folgenden Abschnitten ausführlich diskutiert.

5.2 Lokalisation und Mobilität von PRMT1 *in vivo*

Im ersten Abschnitt dieser Arbeit wurde durch biochemische und fluoreszenzmikroskopische Untersuchungsmethoden gezeigt, dass PRMT1 in große funktionelle Proteinkomplexe eingebaut ist, und bei einer Inhibierung der Methylierungsreaktion teilweise im Zellkern immobilisiert wird.

Durch die im zweiten Teil der Dissertation beschriebenen Ergebnisse konnten weitere ungeklärte Fragen bezüglich der Lokalisierung, Dynamik und Aktivität von PRMT1 in lebenden Zellen beantwortet werden. So wurde beobachtet, dass PRMT1 bevorzugt im Cytoplasma von HEK293 Zellen lokalisiert, obwohl die Hauptsubstrate des Enzyms hauptsächlich im Zellkern zu finden sind (Lee *et al.*, 2005; Tang *et al.*, 2000; Christensen & Fuxa, 1988). Die Lokalisation von PRMT1 wurde zwar bereits in verschiedenen Veröffentlichungen beschrieben, allerdings variierten die Beobachtungen beträchtlich zwischen vorwiegend cytoplasmatischer bzw. nukleärer Verteilung des Proteins (Cote *et al.*, 2003; Tang *et al.*, 1998; Frankel *et al.*, 2002). Möglicherweise wird die subzelluläre Lokalisation von PRMT1 durch eine zelltypspezifische Expression der Substratproteine beeinflusst, wodurch PRMT1 in unterschiedliche Kompartimente der Zelle rekrutiert wird. Eine weiterer Grund für die unterschiedlichen Beobachtungen könnte eine ineffiziente Fixierung von löslichen Proteinen bei Immunfluoreszenzstudien sein. So zeigten eigene Experimente, dass die Lokalisation endogener PRMT1 sehr stark abhängig von der

verwendeten Fixierungsmethode ist (Abb. 4.2). Wurden die Zellen mit Paraformaldehyd fixiert, so zeigte sich eine überwiegende Anreicherung des Proteins im Zellkern und eine schwächere, granuläre Fluoreszenz im Cytoplasma. Ein ähnlich artifizieller Effekt wurde in Zellen beobachtet, die als löslich bekannte Proteine wie z.B. GFP exprimierten. In diesen Zellen konnte die *in vivo* Lokalisation direkt mit der Lokalisation des Proteins nach einer Fixierung mit Paraformaldehyd verglichen werden. Bei einer Fixierung der Zellen mit Aceton wurde eine vorwiegend cytoplasmatische Lokalisation von PRMT1 beobachtet. Dies scheint ein realistischeres Bild der subzellulären Verteilung des Proteins wiederzuspiegeln, wie biochemische Zellfraktionierungsexperimente zeigen (Abb. 4.2 und 4.11).

Die Quantifizierung der Fluoreszenzintensitäten in verschiedenen Organellen lebender Zellen zeigte eine etwa 6-fach stärkere cytoplasmatische Fluoreszenz von PRMT1:GFP im Vergleich zum Zellkern. Interessanterweise ist diese Verteilung sehr variabel. Werden HEK293 Zellen für mindestens 24 h mit dem Methylierungsinhibitor Adox behandelt, so kommt es zu einer signifikanten Anreicherung von PRMT1-Molekülen im Zellkern (Abb. 4.12). Die nukleäre Anreicherung ist allerdings vollständig reversibel; sie verschwindet etwa 6-8 Stunden nachdem die Inhibierung der Methylierung beendet wurde, zu einem Zeitpunkt an dem sämtliche Substratproteine im Zellkern wieder vollständig methyliert vorliegen. Die vorwiegend cytoplasmatische Lokalisierung von PRMT1 wird also höchstwahrscheinlich nicht durch eine co-translationale Methylierung der nukleären Substratproteine im Cytoplasma hervorgerufen. Es hat vielmehr den Anschein, dass die Methylierung der Substrate posttranslational im Zellkern erfolgt.

Noch ungeklärt ist, durch welchen Transportmechanismus das Enzym in den Zellkern hinein- bzw. wieder heraustransportiert wird. Denkbar wäre, dass PRMT1 stabil an neu synthetisierte, unmethylierte Substratproteine im Cytoplasma bindet, im „Huckepack“-Verfahren durch die Kernporen gelangt und erst wieder freigesetzt wird, wenn die enzymatische Reaktion vollständig ausgeführt ist. Durch eine Inhibierung der Methylierung wird dieser Enzym-Substrat-Komplex stabilisiert, was zu einem verlangsamten Export nukleärer PRMT1 und somit zu einer Verschiebung der subzellulären Konzentrationsverhältnisse von PRMT1-Molekülen führen könnte. Durch diese Hypothese kann auch die vorwiegend nukleäre Lokalisation einer enzymatisch inaktiven Mutante von PRMT1 erklärt werden. Bei diesem Konstrukt (PRMT1*mut*) wurde eine Punktmutation in der Bindestelle des Co-Faktors S-Adenosylmethionin vorgenommen, was zu einer enzymatischen Inaktivierung von PRMT1 führt (Wada *et al.*, 2002). Allerdings bindet PRMT1*mut* an endogene PRMT1, und wird in katalytisch aktive

Oligomere eingebaut. Durch die Anwesenheit inaktiver PRMT1-Moleküle sinkt die spezifische Aktivität der PRMT1-Oligomere, die somit länger stabil an den Substratproteinen im Kern gebunden bleiben. Dies führt vermutlich, wie bei einer Inhibierung der Methylierung, zu einem verlangsamten Kernexport von PRMT1 und somit zu einer Anreicherung von PRMT1-Molekülen im Zellkern. Interessanterweise konnte bei der Mutante im Vergleich zum Wildtyp auch eine geringere Mobilität im Zellkern beobachtet werden (vgl. Diffusionskoeffizienten in *Tabelle 4.3*), wodurch diese Theorie noch weiter gestützt wird.

Passend zu der Hypothese, dass PRMT1 stabil an unmethylierte Substrate im Kern gebunden ist, wurde bei *in vivo* FRAP-Mobilitätsmessungen in hypomethylierten Zellen eine immobile (oder zumindest sehr langsam diffundierende) Fraktion von PRMT1 im Zellkern, nicht aber im Cytoplasma beobachtet. Biochemisch konnte zudem eine methylierungs-abhängige Bindung von PRMT1 an die beinahe unbeweglichen Histone des Nukleosomenkerns (*Abb. 4.16*; vgl. Mobilität von Histonen in Kimura, 2005) und, wie im folgenden Abschnitt näher diskutiert, an Komponenten des hnRNP-Partikels (*Abb. 4.20 und 4.21*) beobachtet werden. Es existieren also mindestens zwei relativ unbewegliche funktionelle Einheiten, die an der Immobilisierung von PRMT1 in hypomethylierten Zellen beteiligt sind.

Interessanterweise ist bei PRMT6, einem verwandten Enzym von PRMT1 mit ähnlicher Substratspezifität (Frankel *et al.*, 2002), keine Veränderung der subzellulären Lokalisation bzw. Mobilität zu beobachten (*Abb. 4.11 und 4.14*). Dadurch wird die These bestätigt, dass PRMT6, im Gegensatz zu PRMT1, nicht mit größeren Proteinkomplexen assoziiert ist und keine stabile Bindung mit seinen Substraten eingeht. Die beiden Proteine unterscheiden sich also höchstwahrscheinlich im enzymatischen Reaktionsmechanismus bei der Substratbindung.

5.3 Arginin-Methylierung von SAF-A

Im dritten Teil dieser Dissertation konnte gezeigt werden, dass die vorherrschende Arginin-Methyltransferase in humanen Zellen, PRMT1, stabil mit hnRNP-Partikeln assoziiert ist. Die Assoziation mit den hnRNP-Partikeln erfolgt dabei über eine direkte, Interaktion mit SAF-A, einem wichtigen Bestandteil der hnRNP-Komplexe und des Kerngerüsts. Wie von Liu und Dreyfuss (1995) gezeigt, liegen Argininreste in der RGG-Box von SAF-A und weiteren hnRNP-Proteinen teilweise in methylierter Form vor. Bislang war jedoch nicht bekannt, welche Methyltransferase die Anheftung der Methylgruppen katalysiert, und welche Arginine auf SAF-A *in vivo* modifiziert sind. Im Rahmen dieser Arbeit konnte nun gezeigt werden, dass SAF-A durch PRMT1 *in vitro* und *in vivo* methyliert wird. Zudem wurden mehrere Methylierungsstellen von SAF-A identifiziert und mögliche Funktionen der Methylierung von SAF-A untersucht. Die Herstellung eines methylsensitiven Antikörpers erlaubte die Untersuchung des Methylierungsstatus von SAF-A in verschiedenen Zelltypen.

5.3.1 Direkte Interaktion von PRMT1 und SAF-A in hnRNP-Partikeln

In den vorangegangenen Mobilitätsstudien mit PRMT1 wurde beobachtet, dass ein Teil der nukleären Population des Enzyms durch eine stabile Bindung an Histone des Nukleosomenkerns immobilisiert wird. Die stabile Bindung von PRMT1 war dabei abhängig vom Methylierungsstatus der Substratproteine. Neben den Histonen des Nukleosomenkerns gehören vor allem zahlreiche RNA-Bindeproteine wie die in den hnRNP-Komplexen assoziierten hnRNP-Proteine zu den Hauptsubstraten von PRMT1 (Liu & Dreyfuss, 1995). Wenn also PRMT1 feste Bindungen mit unmethylierten Substratproteinen eingeht, könnte das Enzym in Adox-behandelten Zellen auch stabil mit hnRNP-Komplexen assoziiert sein. In der Tat co-sedimentiert PRMT1 mit 40S hnRNP-Partikeln im Glyceringradienten (Abb. 4.20). Die Menge an hnRNP-Partikel-assoziiierter PRMT1 ist dabei stark abhängig vom Methylierungsstatus der Proteine. So ist eine Anreicherung von PRMT1 an hnRNP-Partikeln zu beobachten, wenn das Protein aufgrund eines fehlenden Methyl donors (S-Adenosylmethionin) enzymatisch inaktiv ist. Die Bindung von PRMT1 an hnRNP-Partikel erfolgt also unabhängig von der enzymatischen Aktivität des Proteins. Der Bindungsmechanismus ist daher vermutlich deutlich komplexer als bei einer gewöhnlichen transienten Enzym-Substrat-Wechselwirkung. Wahrscheinlich bindet PRMT1 stabil an seine unmethylierten Substrate und wird erst wieder freigesetzt, wenn die enzymatische Reaktion vollständig ausgeführt ist. Möglicherweise ist die direkte Assoziation von PRMT1 mit ihren Hauptsubstraten,

den hnRNPs, eine Grundlage für den extrem hohen Methylierungsgrad der Substratproteine unter normalen Kulturbedingungen. So konnte in verschiedenen Studien gezeigt werden, dass sämtliche Substrate von PRMTs in vollständig methylierter Form vorliegen (Pawlak *et al.*, 2002; Lischwe *et al.*, 1985). Zusätzlich zur Anreicherung im 40S hnRNP-Partikel ist PRMT1 auch in noch erheblich größeren Komplexen gebunden, die tiefer im Glyceringradienten sedimentieren. Dabei handelt es sich wahrscheinlich um hnRNA mit zahlreichen angelagerten hnRNP-Partikeln.

Um ausschließen zu können, dass PRMT1 im Glyceringradienten mit anderen Komplexen assoziiert ist, die zufällig einen ähnlichen Sedimentationswert wie 40S hnRNP-Partikel besitzen, wurde die direkte Bindung von PRMT1 an hnRNP-Partikel durch Co-Immunfällungen des Enzyms mit den typischen hnRNP-Proteinen SAF-A und hnRNP-C1/2 bestätigt (Abb. 4.21). Zudem konnte gezeigt werden, dass ausschließlich endogene PRMT1, aber nicht PRMT3, PRMT5 und PRMT6 mit hnRNP-Partikeln assoziiert ist. Obwohl in den letzten Jahren zahlreiche hnRNPs, wie hnRNP-K, hnRNP-A1/A2 und hnRNP-R als Substrate der PRMTs identifiziert wurden, konnte für diese Proteine bislang keine stabile Enzym-Substrat-Wechselwirkung gezeigt werden (Ostareck-Lederer *et al.*, 2006; Rajpurohit *et al.*, 1994; Nichols *et al.*, 2000; Wada *et al.*, 2002).

HnRNP-Partikel setzen sich aus mindestens 20 verschiedenen hnRNP-Proteinen zusammen (Dreyfuss *et al.*, 1988). Daher war unklar über welche Proteine die Bindung von PRMT1 an die hnRNP-Partikel vermittelt wird. Durch ein *in vitro* Bindungsexperiment nach der sogenannten „Far-Western“-Methode konnte SAF-A als ein direkter Wechselwirkungspartner von PRMT1 identifiziert werden (Abb. 4.22). Das Prinzip dieser Methode basiert auf einer modifizierten klassischen Westernblot-Analyse, bei der immungefälltes SAF-A mit co-präzipitierten hnRNP-Proteinen zunächst mittels SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran transferiert wird. Anschließend werden die Proteine auf der Membran renaturiert und, anstatt mit Antikörpern wie beim klassischen Westernblot, mit rekombinanter PRMT1 inkubiert. Nach gründlichem Waschen der Membran erfolgt eine Immundetektion der Protein-gebundenen rekombinanten PRMT1 auf der Membran. Dabei konnten neben einer starken Bindung von PRMT1 an SAF-A auch wesentlich schwächere Wechselwirkungen mit weiteren co-präzipitierten Proteinen beobachtet werden. Um welche Proteine es sich dabei handelt, konnte in diesem Experiment nicht geklärt werden. Möglicherweise gibt es neben SAF-A noch weitere direkte Wechselwirkungspartner von PRMT1 im hnRNP-Partikel.

5.3.2 PRMT1-vermittelte Arginin-Methylierung von SAF-A

Bereits vor zehn Jahren wurde von Liu und Dreyfuss (1995) beschrieben, dass Argininreste in der Glycin-Arginin-reichen Region von SAF-A teilweise dimethyliert vorliegen. Bislang konnte jedoch nicht eindeutig geklärt werden, welche Methyltransferase tatsächlich *in vivo* die Methylierung von SAF-A vermittelt. Erste Hinweise darauf, dass SAF-A ein Substrat der vorherrschenden Typ-I-Methyltransferase PRMT1 ist, wurden von Lee und Bedford (2001) gefunden. Sie konnten zeigen, dass bakteriell exprimiertes SAF-A *in vitro* von PRMT1 methyliert wurde. Allerdings können durch *in vitro* Methylierungsexperimente mit rekombinanter PRMT1 nicht automatisch Rückschlüsse auf die tatsächliche Substratspezifität *in vivo* gezogen werden. Die Tatsache, dass PRMT1 *in vivo* physisch mit SAF-A assoziiert ist, macht die Methyltransferase allerdings zu einem sehr wahrscheinlichen Kandidaten für die Methylierung von SAF-A.

Tatsächlich wurde in dieser Arbeit durch *in vitro* und *in vivo* Methylierungsexperimente eine PRMT1-vermittelte Methylierung von SAF-A nachgewiesen. Zunächst wurde gezeigt, dass aus Adox-behandelten Zellextrakten immungefälltes, endogenes SAF-A von rekombinanter PRMT1 methyliert wird (Abb. 4.24 A). Dabei zeigte sich, dass auch zahlreiche weitere mit SAF-A co-präzipitierte Proteine von PRMT1 modifiziert werden. Höchstwahrscheinlich handelt es dabei um Proteine aus dem hnRNP-Komplex. In einem weiterführenden Experiment konnte beobachtet werden, dass endogene, mit dem hnRNP-Komplex assoziierte PRMT1 katalytisch aktiv ist. So methylierte PRMT1 nach Zugabe von ^3H -SAM sowohl im Komplex mit SAF-A/PRMT1 assoziierte hnRNPs als auch Substratproteine aus hypomethyliertem Zellextrakt (Abb. 4.24 B). Dies bedeutet, dass PRMT1 sowohl in *cis* (d.h. im eigenen Komplex) als auch in *trans* katalytisch aktiv ist. Das Enzym hat also im nativen hnRNP-Komplex Zugang zu den hnRNP-Proteinen. Dieses Ergebnis steht im scheinbaren Widerspruch zu den von Liu und Dreyfuss (1995) veröffentlichten Ergebnissen, die keine Methyltransferaseaktivität in hnRNP-Komplexen beobachten konnten. Diese Diskrepanz kann allerdings leicht erklärt werden. Bei Liu und Dreyfuss wurden die hnRNP-Komplexe aus unbehandelten Zellen isoliert, in denen sämtliche hnRNPs bereits vollständig methyliert sind und daher nicht mehr als Substrate für die co-gefällten PRMTs zu Verfügung stehen.

5.3.3 Kartierung der Methylierungsstellen *in vitro* und *in vivo*

Die Stellen der Methylierung durch Typ-I-PRMTs sind bereits an zahlreichen Substratproteinen gut untersucht worden. Dabei wurde beobachtet, dass Typ-I-Enzyme bevorzugt Arginine methylieren, die in der Aminosäuresequenz RGG, RXR oder GRG vorliegen. Interessanterweise findet man auf SAF-A insgesamt 19 Wiederholungen des Dipeptids RG, von denen sich 15 im carboxyterminalen Sechstel des Proteins befinden. Um zu überprüfen, welche Argininreste von SAF-A durch PRMT1 methyliert werden, wurden verschiedene Kartierungsexperimente durchgeführt. So ist rekombinante PRMT1, aber nicht PRMT2, in der Lage ein synthetisch hergestelltes Peptid mit einer Aminosäureabfolge (⁷⁷⁹**RGNYNQNFGRGNNRG**⁷⁹⁴) aus dem C-Terminus von SAF-A *in vitro* zu methylieren (Abb. 4.27 A). Das Peptid enthält vier RG-Folgen, von denen zwei sogar in der Abfolge RGRG vorliegen, was ausgezeichnet mit bisher kartierten Methylierungsstellen in anderen Proteinen übereinstimmt (Cote *et al.*, 2003; Ostareck-Lederer *et al.*, 2006; Gary & Clarke, 1998; Klein *et al.*, 2000; Smith *et al.*, 1999). Ein identisches Peptid, bei dem alle vier Arginine durch Lysine ersetzt sind, wurde erwartungsgemäß nicht von PRMT1 methyliert.

Die oben beschriebenen *in vitro* Analysen geben allerdings noch keinen Hinweis darauf, ob die Arginine im Bereich zwischen AS 779-794 auch in der lebenden Zelle tatsächlich modifiziert vorliegen. Um dies zu überprüfen wurde ein polyklonaler Antikörper gegen ein (unmethyliertes) synthetisches 16-mer Peptid mit der oben beschriebenen Wildtyp-Sequenz hergestellt. Dieser Antikörper (A232) erkennt ausschließlich unmethylierte SAF-A Proteine aus Zellen, die zuvor mindestens für 24 Stunden mit dem Methylierungsinhibitor Adox behandelt wurden (Abb. 4.27 B). In unbehandelten Zellen ist das Epitop durch Methylgruppen abgeschirmt und wird nicht vom Peptidantikörper erkannt. In Westernblot-Experimenten mit SAF-A Konstrukten, bei denen potenziell methylierte Arginine im Bereich von AS 779-794 durch Lysine ersetzt wurden, konnte Arginin-793 als bevorzugte Methylierungsstelle identifiziert werden.

Durch massenspektrometrische Analysen von Peptidfragmenten aus endogenem SAF-A wurde zudem gezeigt, dass mindestens sieben der insgesamt 19 potentiellen RG-Methylierungsstellen *in vivo* dimethyliert vorliegen, die alle im C-terminalen Bereich des Proteins lokalisieren (Tabelle 4.5). Es wurden erwartungsgemäß ausschließlich Methylierungsstellen gefunden die dem Konsensus RG entsprachen.

Bei der Auswertung der massenspektrometrischen Daten müssen verschiedene Aspekte in Betracht gezogen werden. So gilt es zu beachten, dass beim tryptischen Verdau der

Proteine vor und hinter unmodifizierten Argininen, aber nicht hinter modifizierten Argininen geschnitten wird (Baldwin & Carnegie, 1971). Wegen der kurzen Abstände (z.T. 2-3 Aminosäuren) zwischen den Argininen in der RGG-Box von SAF-A können sehr kurze Peptidfragmente entstehen, die massenspektrometrisch nur schwer zu detektieren sind. Auch ist anzunehmen, dass das Methylierungsmuster bei einzelnen SAF-A Molekülen variiert und somit beim tryptischen Verdau Peptide von unterschiedlicher Länge bzw. mit unterschiedlichen Modifikationen entstehen. Die Auswertung der MALDI-TOF Daten wird dadurch enorm erschwert. Da eine Computer-gestützte Identifizierung der Methylierungsstellen mangels einer geeigneten Software nicht möglich war, erfolgte die Auswertung der massenspektrometrischen Daten manuell. In *Tabelle 4.5* wurden daher nur Peptide aufgeführt, bei denen eine Modifizierung der Argininreste sicher nachzuweisen ist. Bei zahlreichen detektierten Peptidmassen konnte keine eindeutige Aussage getroffen werden, da sie sowohl modifizierten als auch unmodifizierten Peptiden exakt zugeordnet werden konnten. Es ist daher möglich, dass neben den in *Tabelle 4.5* angegebenen Methylierungsstellen noch weitere Argininreste *in vivo* modifiziert sind.

5.3.4 Biochemische Charakterisierung der Arginin-Methylierung von SAF-A

Die physiologische Rolle der Arginin-Methylierung ist bisher nur ansatzweise verstanden. Unbeantwortet ist zum Beispiel die einfache Frage, ob sich der Methylierungsstatus von Proteinen in verschiedenen Zelltypen unterscheidet. Eine solche Untersuchung kann Aufschluss darüber geben, in welchen Zellen oder Geweben die Protein-Methylierung eine besondere Rolle spielt. Da die Menge der PRMTs sich in verschiedenen Zellen und Geweben offenbar unterscheidet (Katsanis *et al.*, 1997), wurde in einem Teilprojekt die Methylierung von SAF-A in Zellen unterschiedlichen Ursprungs untersucht. Da SAF-A in allen Geweben in großen Mengen exprimiert wird, stellt es ein ideales Modellprotein für diese Experimente dar. Es waren mehrere experimentelle Ansätze denkbar, wie zum Beispiel der Nachweis des Einbaus radioaktiv markierter Methylgruppen, oder die Hydrolyse des gereinigten Proteins mit nachfolgender Aminosäure-Analyse. Da sich diese Ansätze jedoch nur äußerst schwierig mit einer größeren Anzahl an Proben durchführen lassen, wurden ein immunologischer Nachweis ohne diese Beschränkungen entwickelt. Der Nachweis beruht auf dem oben beschriebenen Peptidantikörper (A232), der zwischen methyliertem und unmethyliertem SAF-A unterscheiden kann da er nur mit unmethyliertem SAF-A reagiert. Dadurch lässt sich der Methylierungsstatus des Proteins

durch einfache Westernblot-Experimente erfassen. Als Kontrolle diene ein polyklonaler Antikörper (K371), der SAF-A unabhängig vom Methylierungsstatus erkennt. Auch wenn in vorherigen Studien bereits beschrieben wurde, dass die meisten PRMT1-Substrate während des gesamten Zellzyklus konstitutiv und beinahe vollständig methyliert sind (Pawlak *et al.*, 2002, 2000), so war das Ergebnis dieser Studie trotzdem überraschend. In keiner der insgesamt 24 untersuchten Zelllinien konnte unmethyliertes SAF-A nachgewiesen werden (Abb. 4.28). Damit bleibt wenig Spielraum für Spekulationen, dass es sich bei der Arginin-Methylierung von hnRNPs um eine dynamische Modifikation wie Acetylierung oder Phosphorylierung handeln könnte. Aus den Ergebnissen lässt sich außerdem schlussfolgern, dass SAF-A schon während, oder unmittelbar nach der Translation methyliert wird. Dies spricht eher für eine statische Funktion der Methylierung. So könnte die Methylierung in gewisser Weise ein „Etikett“ darstellen, das zur Markierung von Proteinen dient und diese z.B. als „funktionell“, „korrekt gefaltet“ oder „korrekt lokalisiert“ ausweist. Tatsächlich wurde beobachtet, dass die Methylierung einen Einfluss auf die subzelluläre Lokalisation von Proteinen wie z.B. RNA-Helikase A, Sam68 und hnRNP-A hat (Cote *et al.*, 2003; Smith *et al.*, 2004; Nichols *et al.*, 2000). In Lokalisationsstudien mit SAF-A konnte jedoch kein signifikanter Unterschied zwischen methyliertem und unmethyliertem Protein beobachtet werden (Abb. 4.29). Ebenso scheint die Menge an SAF-A im Zellkern von unbehandelten und Adox-behandelten Zellen identisch zu sein. Der Methylierungsstatus von SAF-A hat also vermutlich keinen Einfluss auf die Stabilität des Proteins. Zudem ist keine erhöhte Expression von SAF-A in hypomethylierten Zellen zu beobachten, wodurch eine möglicherweise verminderte Funktionalität von hypomethyliertem SAF-A kompensiert werden könnte.

SAF-A und zahlreiche weitere hnRNP-Proteine besitzen neben ihrer Funktion im hnRNP-Komplex auch Chromatin-organisierende Aufgaben in der Zellkernarchitektur. So wurde SAF-A als ein Hauptbestandteil der Kernmatrix identifiziert. Interessanterweise konnte durch *in situ* Kernfraktionierungen gezeigt werden, dass eine kleine Population von PRMT1 ebenfalls stabil an Kernmatrixstrukturen gebunden ist (Abb. 4.29). Möglicherweise sind SAF-A und PRMT1 nicht nur im hnRNP-Partikel, sondern auch in der Kernmatrix fest miteinander assoziiert. Durch die räumliche Nähe von Enzym und Substrat könnte eine effektive Methylierung der hnRNPs gewährleistet werden.

Denkbar wäre auch, dass SAF-A-Moleküle erst dann methyliert werden, wenn sie in einem korrekten funktionellen Kontext integriert sind. Diese Vermutung wird durch die Beobachtung gestützt, dass viele Substratproteine in normalen Zellen vollständig methyliert vorliegen (Abb. 4.28; Lischwe *et al.*, 1985(a); Pawlak *et al.*, 2000). Passend zu

dieser Hypothese wurde beobachtet, dass transient transfizierte, im Gegensatz zu stabil transfizierten SAF-A:GFP Konstrukten nur zu einem geringen Prozentsatz methyliert sind. Da SAF-A ein sehr langlebiges Protein mit einer vergleichsweise niedrigen Umsatzrate ist, könnte es durch eine transiente Überexpression zu einer Anreicherung von funktionell inaktiven und daher eventuell unmethylierten SAF-A-Molekülen kommen. Wird der Nachschub an SAF-A-Molekülen durch Hemmung der Proteinbiosynthese gestoppt, werden die SAF-A:GFP Moleküle innerhalb von acht Stunden nahezu vollständig posttranslational methyliert (Abb. 4.32). Möglicherweise werden die verfügbaren unmethylierten SAF-A:GFP Moleküle nach und nach in funktionelle Komplexe eingebaut und dabei von PRMT1 modifiziert.

Allerdings scheint die Methylierung der hnRNPs keine essenzielle Voraussetzung für ihren Einbau in hnRNP-Komplexe zu sein, da in *Prmt1* ^{-/-} Zellen ohne enzymatische PRMT1-Aktivität (und damit verbundener Hypomethylierung der hnRNPs) die Bildung bzw. Zusammensetzung der hnRNP-Komplexe nicht beeinträchtigt ist (Pawlak *et al.*, 2000). Dies wird in der vorliegenden Arbeit auch durch die Anwesenheit von funktionell intakten hnRNP-Partikeln nach der Hemmung der Methylierung bestätigt (Abb. 4.20). Es zeigte sich jedoch, dass die Mobilität von SAF-A in hypomethylierten Zellen im Vergleich zu Zellen mit einem normalen Methylierungsstatus signifikant erhöht ist. Möglicherweise wird also durch die Methylierung die Bindung von SAF-A an Kernmatrixstrukturen beeinflusst.

5.3.5 Regulation der Arginin-Methylierung

Ein großer Unterschied zwischen der Arginin-Methylierung und anderen posttranslationalen Modifikationen wie z.B. Phosphorylierung oder Acetylierung liegt in der Stabilität der Modifikation. Während bei der Phosphorylierung bzw. Acetylierung die Dauer und das Ausmaß der Modifikation durch antagonistische Enzyme (Kinasen/Phosphatasen bzw. Acetyltransferasen/Deacetylasen) beeinflusst wird, konnte trotz intensiver Suche bislang keine spezifische Demethylase identifiziert werden, die eine zeitliche Modulation der Arginin-Methylierung ermöglichen würde (Denman, 2005). Arginin-Methylierung scheint also von ähnlich stabiler Natur zu sein, wie die häufig an Histon-Termini beobachtete Methylierung von Lysinresten. Kürzlich wurde allerdings eine erste Lysin-spezifische Demethylase (LSD1) beschrieben, die in der Lage ist dimethyliertes Lysin-4 von Histon H3 in unmodifiziertes Lysin umzuwandeln (vgl. Abb. 1.5; Shi *et al.*, 2004). Im selben Jahr konnte von zwei unabhängigen Gruppen gezeigt werden, dass auch die Arginin-Methylierung von Histonen durch eine von Peptidyl-

Arginin-Deiminase 4 (PAD4) vermittelte Deiminierung rückgängig gemacht werden kann (Cuthbert *et al.*, 2004; Wang *et al.*, 2004). Die Familie der PADs katalysiert dabei die Abspaltung eines unmodifizierten bzw. monomethylierten Guanidino-Stickstoffs von Argininresten an Histonen, wodurch die seltene Aminosäure Citrullin entsteht (vgl. Abb. 4.34 A). Ob es sich hierbei um eine Histon-spezifische Deiminierung von Argininresten handelt, oder ob diese Reaktion auch an SAF-A und weiteren Substratproteinen der PRMTs stattfindet, sollte im Rahmen dieser Arbeit untersucht werden. Dazu wurden Proteine in Ganzzellextrakten durch Zugabe einer rekombinanten PAD *in vitro* citrulliniert und anschließend im Westernblot auf Anwesenheit von mono- und dimethylierten Argininresten untersucht. Wie schon für dimethylierte Arginine in Histonen beschrieben (Hidaka *et al.*, 2005), konnte für SAF-A und andere nicht-Histon-Proteine gezeigt werden, dass eine Dimethylierung und größtenteils auch eine Monomethylierung von Argininresten eine Umwandlung der betroffenen Aminosäuren in Citrullin verhindert (Abb. 4.34 B). Dies spricht gegen eine generelle Funktion der PADs als enzymatische Antagonisten zu den Methyltransferasen, die fast ausschließlich die Bildung von Dimethylarginin katalysieren; passend zu der Beobachtung, dass die Hauptsubstrate der PRMTs wie z.B. SAF-A (vgl. Abb. 4.28) *in vivo* vollständig in (di-) methylierter Form vorliegen (Pawlak *et al.*, 2002; Lischwe *et al.*, 1985(a)). So wird in Zellen fast ausschließlich N^G,N^G-Dimethylarginin gefunden; N^G-Monomethylarginin ist hingegen nur in sehr geringen Mengen nachzuweisen (Boffa *et al.*, 1977; Karn *et al.*, 1977). Interessanterweise sind ca. 65 % des nukleären N^G,N^G-Dimethylarginin an hnRNPs gebunden und ca. 12 % aller Argininreste von hnRNPs sind durch Methylgruppen modifiziert (Boffa *et al.*, 1977).

Obwohl also mindestens zwei Enzymfamilien prinzipiell dazu in der Lage sind, an Lysin- bzw. Argininreste angeheftete Methylgruppen wieder zu entfernen, bleiben berechnete Zweifel, ob die Methylierung von Argininen tatsächlich ein reversibler Prozess ist. So sind PADs zwar indirekt in der Lage, als Antagonisten zu den Arginin-Methyltransferasen zu agieren, allerdings können (monomethylierte) Arginine nicht dauerhaft funktionell durch Citrullin ersetzt werden. Eine Deiminierung von Arginin zu Citrullin verändert die Gesamtladung und somit die physiko-chemischen Eigenschaften (z.B. Protein-/DNA-Interaktion) eines Proteins (Vossenaar *et al.*, 2003). Citrullin müsste also durch einen bislang unbekannten Reaktionsweg wieder in Arginin umgewandelt werden oder citrullinierte Proteine (z.B. Histone im Nukleosom) müssten abgebaut und durch neue Proteine ersetzt werden (Bannister *et al.*, 2002). Für keinen der beiden Wege gibt es bisher experimentelle Belege.

Ein weiterer Grund, der gegen eine tragende Rolle von PADs bei der Regulation der Arginin-Methylierung spricht, ist die zelltypspezifische Expression der PAD-Familienmitglieder. Während die vorherrschende Methyltransferase, PRMT1, ubiquitär in sämtlichen untersuchten Zelllinien zu finden ist, werden PADs nur in spezialisierten Zellen der Haut (PAD1), Skelettmuskel (PAD2), Haarfollikel (PAD3) und reifen Granulocyten (PAD4) exprimiert (Fackelmayer, 2005a), und sind somit in den meisten Zellen als mögliche Antagonisten der Methyltransferasen nicht verfügbar. Außerdem benötigen PADs für ihre enzymatische Aktivität hohe Konzentrationen an Ca^{2+} (Arita *et al.*, 2004), die in gesunden somatischen Zellen mit intakter Kalzium-Homöostase normalerweise nicht vorkommen.

Die Tatsache, dass SAF-A und andere hnRNPs in sämtlichen Zelllinien vollständig methyliert vorliegen, lässt vermuten, dass die Methylierung von hnRNP-Proteinen nicht zeitlich reguliert wird, sondern eine dauerhafte Modifikation der Proteine darstellt. Ein gewisser Grad an Regulation könnte allerdings mit Hilfe von unmethylierten Isoformen der hnRNPs erreicht werden, die sich in ihrer Funktion von den methylierten Proteinen unterscheiden bzw. deren Funktion ergänzen. Tatsächlich konnte im Rahmen dieser Arbeit eine zweite Isoform von SAF-A (SAF-A2) identifiziert werden, die ebenfalls von PRMT1 gebunden, aber nicht methyliert wird (Abb. 4.37). Ein Vergleich der Primärsequenzen zeigt eine extrem hohe Sequenzhomologie im zentralen Bereich und in der aminoterminalen DNA-Bindedomäne (SAF-Box) der beiden Isoformen (Abb. 4.35). Beide Proteine haben zwar ähnliche DNA/RNA-Bindungseigenschaften, unterscheiden sich aber in ihrem Aggregationsverhalten (Fackelmayer & Richter, 1994). Im Elektronenmikroskop konnte beobachtet werden, dass SAF-A mit der DNA zu langen, unverzweigten Filamenten aggregiert, während Isoform 2 globuläre Strukturen mit einem Durchmesser von ca. 35 nm ausbildet. Der Unterschied im Aggregationsverhalten liegt vermutlich in den stark verschiedenen C-Termini der beiden Isoformen begründet. Bei der zweiten Isoform fehlt ein großer Teil der carboxyterminalen Region von SAF-A, auf dem sowohl die stark methylierte RGG-Box, die Kernmatrixbindedomäne als auch die Multimerisierungsdomäne lokalisiert sind. Interessanterweise konnte trotz der fehlenden RNA-Bindedomäne (RGG-Box) eine effiziente RNA-Bindung bei SAF-A2 beobachtet werden (Fackelmayer & Richter, 1994). Obwohl beide Proteine ein ähnliches Lokalisationsmuster im Zellkern zeigen, konnte biochemisch keine direkte Assoziation der beiden Isoformen beobachtet werden. Die deutlich höhere Mobilität von SAF-A2 in FRAP-Experimenten und das unterschiedliche Sedimationsverhalten im Glyceringradienten legen den Schluss nahe, dass die beiden Proteine in

unterschiedlichen Komplexen bzw. Kernstrukturen gebunden sind und vermutlich spezifische Funktionen in der Zelle besitzen (Abb. 4.36 und 4.37). Im Moment kann jedoch nur darüber spekuliert werden, welche funktionellen Aufgaben SAF-A2 in der Zelle besitzt. Um konkrete Vorstellungen über die Aufgabenbereiche von SAF-A2 zu erhalten, müssen in zukünftigen Experimenten weitere Interaktionspartner identifiziert werden.

5.3.6 Funktion der Arginin-Methylierung *in vivo*

In letzter Zeit wurden zahlreiche Substratproteine der Arginin-Methyltransferasen identifiziert, die an verschiedenen zellulären Prozessen wie z.B. RNA-Prozessierung, transkriptioneller Regulation, Reparatur von DNA-Schäden sowie Differenzierungsvorgängen beteiligt sind. Ob allerdings die Methylierung von Argininresten in diesen Prozessen tatsächlich eine regulierende Funktion besitzt, ähnlich der von anderen posttranslationalen Modifikationen, ist größtenteils noch nicht geklärt.

Im Gegensatz zur Phosphorylierung oder Acetylierung verändert die Methylierung von Argininresten nicht den Ladungszustand der betroffenen Aminosäure. Dies ist von besonderer Bedeutung, da Arginin eine positiv geladene Aminosäure ist, die oft an der Ausbildung von Wasserstoffbrücken und amino-aromatischen-Bindungen beteiligt ist und zudem häufig im reaktiven Zentrum von Enzymen bzw. auf Proteinoberflächen gefunden wird, die eine Bindung an Proteine, kleine Liganden oder DNA vermitteln. Im Vergleich zur Phosphorylierung von Serin-, Threonin- oder Tyrosinresten verändert das Anheften einer Methylgruppe kaum die chemischen Eigenschaften von Argininresten und hat daher vermutlich nur einen geringen Effekt auf die Bindungseigenschaften der betroffenen Aminosäure. Es ist daher eher wahrscheinlich, dass Arginin-Methylierung nicht als ein An/Aus Schalter fungiert, sondern bei der Modulation bestimmter Prozesse beteiligt ist.

Auch wenn in den letzten Jahren zahlreiche Substrate von PRMTs identifiziert wurden, die an unterschiedlichsten Prozessen in der Zelle beteiligt sind, so bleibt die tatsächliche Rolle der Arginin-Methylierung von SAF-A, wie für andere Substratproteine auch, weiterhin im Unklaren. Es herrscht eine signifikante Diskrepanz zwischen dem hohen Methylierungsgrad der Substratproteine in allen untersuchten Zelllinien und der Beobachtung, dass Arginin-Methylierung für grundlegende zelluläre Funktionen nicht benötigt wird, da embryonale Stammzellen aus *Prmt1* „knock-out“ Mäuseembryos lebensfähig sind. Allerdings ist eine PRMT1-vermittelte Arginin-Methylierung essenziell für die Differenzierung dieser Zellen *in vitro* und für das Überleben der *Prmt1* „knock-out“

Mäuseembryos (Pawlak *et al.*, 2000). Möglicherweise kann diese Diskrepanz durch die Annahme erklärt werden, dass die Arginin-Methylierung von Proteinen eine Art „Protein-Etikett“ darstellt. Im Gegensatz zu einer klassischen „Signalfunktion“ könnte ein „Etikett“ irreversibel an ein Protein angebracht werden, und dieses für seine komplette Lebensdauer markieren. Dieses Etikett könnte Informationen beinhalten, die zwar für die meisten Prozesse nicht benötigt werden, jedoch unentbehrlich sind, wenn sich, wie z.B. bei Differenzierungsprozessen, die zelluläre Bedingungen ändern. Die Funktion wäre vergleichbar mit einem Preisetikett an einer Ware. Das Etikett ist zwar nicht essenziell für die Funktion der Ware, beinhaltet aber wichtige Informationen wenn diese von einer Person zu nächsten weitergereicht wird. In diesem Fall könnten die angehefteten Methylgruppen signalisieren, dass so modifizierte Proteine „funktionell“, „richtig gefaltet“ oder, nach ihrem ersten Einbau in funktionelle Komplexe, „korrekt lokalisiert“ sind. Diese Idee wird gestützt durch die Beobachtung, dass PRMT1 zusammen mit ihren Hauptsubstraten, den hnRNPs, in hnRNP-Komplexen assoziiert ist. Somit könnte ein neu synthetisiertes hnRNP-Protein sofort beim Einbau in den Komplex methyliert werden. Passend zu dieser Hypothese, liegen sämtliche von PRMT1 methylierten Substrate im hnRNP-Komplex vollständig methyliert vor (Lischwe *et al.*, 1985(a); Pawlak *et al.*, 2000). Im Moment kann nur darüber spekuliert werden, für welche Prozesse ein „Methylierungsetikett“ von Bedeutung sein könnte und wie die darin enthaltene Information ausgelesen werden könnte. Vermutlich sind die involvierten Prozesse so ubiquitär wie die Methylierung selbst und können potenziell in jeder Zelle vorkommen. Andererseits laufen für die Zelle lebenswichtige Prozesse, wie Replikation und Transkription, auch in Abwesenheit von PRMT1-vermittelter Methylierung (die nicht durch andere Methyltransferasen kompensiert werden kann) ab (Pawlak *et al.*, 2000; 2002). Auch die Proteinfaltung und der Zusammenbau funktioneller Komplexe scheinen nicht von einer Methylierung der Proteine abhängig zu sein, da *Prmt1* „knock-out“-Zellen und Adox-behandelte Zellen in der Lage sind normale hnRNP-Komplexe aus unmethylierten Komponenten zu bilden. Das heißt, weder Protein-Protein-Interaktionen zwischen den hnRNPs noch ihre Bindung an RNA werden durch die Methylierung beeinflusst. Es scheint also, dass die Arginin-Methylierung eher in Prozessen eine Rolle spielt, bei denen sich der Zustand der Zelle ändert. Möglicherweise wird damit eine Flexibilität der Zelle bei der Reaktion auf extrazelluläre Stimuli erreicht. Denkbar wäre, dass in der Zelle bevorzugt methylierte Proteine wiederverwendet werden, um Energieressourcen für neu exprimierte Gen-Produkte während Differenzierungs- und Entwicklungsprozessen zu sparen. Dazu passt die Beobachtung, dass embryonale

prmt1 -/- Stammzellen *in vitro* nicht differenzieren können und Embryos aus diesen Zellen nicht entwicklungsfähig sind.

In einer Veröffentlichung von Fackelmayer (2005a) wird noch eine weitere, gänzlich neue Funktion der Arginin-Methylierung diskutiert. Fackelmayer postuliert, dass die Methylgruppe als eine Art Schutzgruppe für essenzielle Argininreste fungieren könnte und diese somit vor einem Angriff durch endogene Dicarbonyl-Verbindungen, wie Methylglyoxal, abschirmt. Diese hochreaktiven Moleküle entstehen als Nebenprodukte normaler metabolischer Prozesse (z.B. bei der Glykolyse) und können die Guanidinogruppe von Argininresten chemisch modifizieren. Werden essenzielle Arginine angegriffen (z.B. im aktiven Zentrum von Enzymen) führt dies zu einem Verlust der Proteinfunktion (Kimura *et al.*, 1996). Interessanterweise wird die Reaktivität der Guanidinogruppe gegenüber Dicarbonyl-Verbindungen durch Dimethylierung, aber nicht durch Monomethylierung drastisch herabgesetzt (Patthy *et al.*, 1977). Die Dimethylierung von Argininen scheint also tatsächlich einen Schutz vor einer Modifikation durch Dicarbonyl-Verbindungen zu bieten.

Sicherlich sind nicht alle Arginine in Proteinen von gleicher Bedeutung für die funktionellen Abläufe in einer Zelle, und Proteine mit einer kurzen Halbwertszeit sind wahrscheinlich weniger anfällig für eine Inaktivierung durch Dicarbonyl-Verbindungen, da sie relativ schnell abgebaut und re-synthetisiert werden. Außerdem scheinen zahlreiche Enzyme durch die Interaktion mit Substraten oder Co-Faktoren vor einem Angriff geschützt zu sein (Qamar *et al.*, 1996; Sandmeier & Christen, 1982). Daher scheint es plausibel, dass hauptsächlich langlebige, enzymatisch inaktive Proteine durch Arginin-Dimethylierung geschützt sein müssen. Tatsächlich gehören die meisten PRMT-Substratproteine zu dieser Kategorie: Histone, hnRNPs, Sm-Proteine und zahlreiche weitere Proteine, die am RNA-Metabolismus beteiligt sind. Die Dimethylierung von Argininresten dient also möglicherweise nicht der Modulation, sondern vielmehr dem Schutz der Funktion eines Proteins. Ob diese sehr interessante Hypothese auch tatsächlich *in vivo* realisiert ist, muss in zukünftigen Experimenten untersucht werden.

6. Zusammenfassung

Die Methylierung von Argininresten in Proteinen ist eine posttranslationale Modifikation, die an der Regulation zahlreicher zellulärer Prozesse beteiligt zu sein scheint. Trotz der Identifizierung einer größeren Anzahl an Substratproteinen und Strukturaufklärung einiger der für die Methylierung verantwortlichen Enzyme ist es bisher nicht gelungen ein Gesamtbild der tatsächlichen funktionellen Bedeutung der Arginin-Methylierung in lebenden Zellen zu entwerfen.

Um grundlegende Einblicke in die Dynamik funktioneller Netzwerke zu erlangen, an denen Arginin-Methyltransferasen beteiligt sind, wurden in dieser Dissertation alle bisher bekannten Protein-Arginin-Methyltransferasen (PRMTs) vergleichend untersucht. Die Ergebnisse dieser Arbeit legen nahe, dass die Mitglieder der PRMT-Familie spezifische, nicht redundante Aufgaben in der lebenden Zelle erfüllen, und sich in Lokalisation, Mobilität und Komplexbildung unterscheiden.

So zeigte sich, dass die am häufigsten vorkommende Methyltransferase PRMT1, aber nicht die anderen PRMTs, funktionell an Komplexen im Zellkern immobilisiert wird. In weiterführenden Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass die Immobilisierung von PRMT1 durch stabile Wechselwirkung mit Substratproteinen im Nukleosom und in hnRNP-Komplexen verursacht wird. Die Bindung des Enzyms an die hnRNP-Komplexe wird dabei durch eine direkte Wechselwirkung mit dem „Scaffold Attachment Factor A“ (SAF-A) vermittelt, der selbst ein Substrat von PRMT1 darstellt und an mehreren in dieser Arbeit kartierten Stellen methyliert wird. Die Bindung von PRMT1 an Komponenten der hnRNP-Komplexe lässt vermuten, dass das Enzym regulatorische Aufgaben im Zusammenhang mit mRNA-Reifung und -Transport erfüllt.

Zusätzlich konnte erstmals eine neue Isoform von SAF-A identifiziert werden, die ebenfalls mit PRMT1 interagiert, aber kein Substrat des Enzyms darstellt. Vergleichende Charakterisierungen der beiden SAF-A-Isoformen legen den Schluss nahe, dass die beiden Proteine verschiedene physiologische Funktionen ausüben.

Die in dieser Arbeit vorgestellten Ergebnisse gestatten neue Einblicke in die physiologische Rolle der Arginin-Methylierung in lebenden Zellen und bilden somit eine wichtige Grundlage für weiterführende Untersuchungen.

7. Anhang

Sequenzen

SAF-A (Accession No. AAC19382 + zusätzliches Alanin an Stelle 230)

```

1MSSSPVNVKK LKVSELKEEL KKRRLSDKGL KAELMERLQA ALDDEEAGGR
51PAMEPGNGSL DLGGDSAGRS GAGLEQEAAA GGDEEEEEEEE EEEEGISALD
101GDQMELGEEN GAAGAADSGP MEEEEAAASED ENGDDQGFQE GEDELGDEEE
151GAGDENGHGE QQPQPPATQQ QQPQQQRGGAA KEAAGKSSGP TSLFAVTVAP
201PGARQGQQQA GGKKKAEGGG GGRPGAPAA GDGKTEQKGG DKKRGVKRPR
251EDHGRGYFEY IEENKYSRAK SPQPPVEEED EHFDDTVVCL DTYNCDLHFK
301ISRDRLSASS LTMESFAFLW AGGRASYGVS KGKVCFEMKV TEKIPVRHLY
351TKDIDIHEVR IGWSLTTSKM LLGEEEFSSYG YSLKGIKTCN CETEDYGEKF
401DENDVITCFA NFESDEVELS YAKNGQDLGV AFKISKEVLA GRPLFPHVLC
451HNCAVEFNFG QKEKPYFPIP EEYTFIQNV LEDRVRGPKG PEEKKDCEVV
501MMIGLPGAGK TTWVTKHAAE NPGKYNILGT NTIMDKMMVA GFKKQMADTG
551KLNTLLQRAP QCLGKFIEIA ARKKRNFILD QTNVSAAAQR RKMCLFAGFQ
601RKAVVVC PKD EDYKQRTQKK AEVEGKDLPE HAVLKMKGNF TLPEVAECFD
651EITYVELQKE EAQKLLEQYK EESKKALPPE KKQNTGSKKS NKNKSGKNQF
701NRGGGGHRGRG GFNMRGGNFR GGAPGNRGGY NRRGGNMPQRG GGGGSGGGIG
751YPYPRAPVFP RGGSYSNRGGN YNRGGMPNRG NYNQNRGRG NNRGYKNQSQ
801GYNQWQQGQF WGQKPWSQHY HQGYY825

```

graue Box: Peptidsequenz für methylsensitiven AK

SAF-A2 (Accession No. DQ470474)

```

1MEVKRLKVTE LRSELQRRGGL DSRGGLKVDLA QRLQEALDAE MLEDEAGGGG
51AGPGGACKAE PRPVAASGGG PGGDEEEDEE EEEDEEEALL EDEDEEPPPA
101QALGQAAQPP PEPPEAAAME AAAEPDASEK PAEATAGSGG VNGGEEQGLG
151KREDEPEER SGDETPGSEV PGDKAAEEQG DDQDSEKSKP AGSDGERRGV
201KRQRDEKDEH GRAYYEFREE AYHSRSKSPL PPEEEAKDEE EDQTLVNLDT
251YTSDLHFQVS KDRYGGQPLF SEKFPTLWSG ARSTYGVTKG KVCFEAKVTQ
301NLPMKEGCTE VSLLRVGWSV DFSRPQLGED EFSYGFDRG LKAENGQFEE
351FGQTFGENDV IGCANFETE EVELSFSKNG EDLGVAFWIS KDSLADRALL
401PHVLCKNCVV ELNFGQKEEP FFPPEEFVF IHAVPVEERV RTAVPPKTIE
451ECEVILMVGL PGSGKTQWAL KYAKENPEKR YNVLGAETVL NQMRMKGLEE
501PEMDPKSRDL LVQQASQCLS KLVQIASRTK RNFILDQCNV YNSGQRRKLL
551LFKTFSRKV VVPNEEDWK KRLELRKEVE GDDVPESIML EMKANFSLPE
601KCDYMDEVTY GELEKEEAQP IVTKYKEEAR KLLPPSEKRT NRRNNRNKRN
651RQNRRGQGY VGGQRGYDN RAYGQYWGQ PGNRGGYRNF YDRYRGDYDR
701FYGRDYEYNR YRDYYRQYNR DWQSYYYHHP QDRDRYYRNY YGYQGYR747

```

Fett markiert sind die potenziellen Methylierungsstellen mit RG-Sequenz. Unterstrichen sind methylierte Arginine *in vivo*.

8. Literaturverzeichnis

- Abramovich, C., B. Yakobson, et al. (1997). "A protein-arginine methyltransferase binds to the intracytoplasmic domain of the IFNAR1 chain in the type I interferon receptor." Embo J **16**(2): 260-6.
- Ahmad, N. and J. B. Lingrel (2005). "Kruppel-like factor 2 transcriptional regulation involves heterogeneous nuclear ribonucleoproteins and acetyltransferases." Biochemistry **44**(16): 6276-85.
- An, W., J. Kim, et al. (2004). "Ordered cooperative functions of PRMT1, p300, and CARM1 in transcriptional activation by p53." Cell **117**(6): 735-48.
- Aris, J. P. and G. Blobel (1991). "cDNA cloning and sequencing of human fibrillarin, a conserved nucleolar protein recognized by autoimmune antisera." Proc Natl Acad Sci U S A **88**(3): 931-5.
- Arita, K., H. Hashimoto, et al. (2004). "Structural basis for Ca(2+)-induced activation of human PAD4." Nat Struct Mol Biol **11**(8): 777-83.
- Axelrod, D., D. E. Koppel, et al. (1976). "Mobility measurement by analysis of fluorescence photobleaching recovery kinetics." Biophys J **16**(9): 1055-69.
- Bachand, F. and P. A. Silver (2004). "PRMT3 is a ribosomal protein methyltransferase that affects the cellular levels of ribosomal subunits." Embo J **23**(13): 2641-50.
- Bacia, K. and P. Schwille (2003). "A dynamic view of cellular processes by in vivo fluorescence auto- and cross-correlation spectroscopy." Methods **29**(1): 74-85.
- Baiker, A., C. Maercker, et al. (2000). "Mitotic stability of an episomal vector containing a human scaffold/matrix-attached region is provided by association with nuclear matrix." Nat Cell Biol **2**(3): 182-4.
- Baldwin, G. S. and P. R. Carnegie (1971). "Isolation and partial characterization of methylated arginines from the encephalitogenic basic protein of myelin." Biochem J **123**(1): 69-74.
- Bannister, A. J. and T. Kouzarides (1996). "The CBP co-activator is a histone acetyltransferase." Nature **384**(6610): 641-3.
- Bannister, A. J., R. Schneider, et al. (2002). "Histone methylation: dynamic or static?" Cell **109**(7): 801-6.
- Bauer, U. M., S. Daujat, et al. (2002). "Methylation at arginine 17 of histone H3 is linked to gene activation." EMBO Rep **3**(1): 39-44.
- Bedford, M. T., A. Frankel, et al. (2000). "Arginine methylation inhibits the binding of proline-rich ligands to Src homology 3, but not WW, domains." J Biol Chem **275**(21): 16030-6.

- Bedford, M. T. and S. Richard (2005). "Arginine methylation an emerging regulator of protein function." Mol Cell **18**(3): 263-72.
- Berezney, R. (1991). "The nuclear matrix: a heuristic model for investigating genomic organization and function in the cell nucleus." J Cell Biochem **47**(2): 109-23.
- Birnboim, H. C. and J. Doly (1979). "A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA." Nucleic Acids Res **7**(6): 1513-23.
- Bode, A. M. and Z. Dong (2004). "Post-translational modification of p53 in tumorigenesis." Nat Rev Cancer **4**(10): 793-805.
- Boffa, L. C., J. Karn, et al. (1977). "Distribution of NG, NG,-dimethylarginine in nuclear protein fractions." Biochem Biophys Res Commun **74**(3): 969-76.
- Boisvert, F. M., J. Cote, et al. (2003). "A proteomic analysis of arginine-methylated protein complexes." Mol Cell Proteomics **2**(12): 1319-30.
- Boisvert, F. M., U. Dery, et al. (2005). "Arginine methylation of MRE11 by PRMT1 is required for DNA damage checkpoint control." Genes Dev **19**(6): 671-6.
- Boisvert, F. M., M. J. Hendzel, et al. (2005a). "Methylation of MRE11 regulates its nuclear compartmentalization." Cell Cycle **4**(7): 981-9.
- Boisvert, F. M., A. Rhie, et al. (2005b). "The GAR motif of 53BP1 is arginine methylated by PRMT1 and is necessary for 53BP1 DNA binding activity." Cell Cycle **4**(12): 1834-41.
- Boulanger, M. C., C. Liang, et al. (2005). "Methylation of Tat by PRMT6 regulates human immunodeficiency virus type 1 gene expression." J Virol **79**(1): 124-31.
- Bradford, M. M. (1976). "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding." Anal Biochem **72**: 248-54.
- Brahms, H., L. Meheus, et al. (2001). "Symmetrical dimethylation of arginine residues in spliceosomal Sm protein B/B' and the Sm-like protein LSm4, and their interaction with the SMN protein." Rna **7**(11): 1531-42.
- Branscombe, T. L., A. Frankel, et al. (2001). "PRMT5 (Janus Kinase-binding Protein 1) Catalyzes the Formation of Symmetric Dimethylarginine Residues in Proteins 10.1074/jbc.M105412200." J. Biol. Chem. **276**(35): 32971-32976.
- Buhler, D., V. Raker, et al. (1999). "Essential role for the tudor domain of SMN in spliceosomal U snRNP assembly: implications for spinal muscular atrophy." Hum Mol Genet **8**(13): 2351-7.
- Carty, S. M. and A. L. Greenleaf (2002). "Hyperphosphorylated C-terminal repeat domain-associating proteins in the nuclear proteome link transcription to DNA/chromatin modification and RNA processing." Mol Cell Proteomics **1**(8): 598-610.

- Charier, G., J. Couprie, et al. (2004). "The Tudor tandem of 53BP1: a new structural motif involved in DNA and RG-rich peptide binding." Structure **12**(9): 1551-62.
- Chen, D., H. Ma, et al. (1999). "Regulation of transcription by a protein methyltransferase." Science **284**(5423): 2174-7.
- Chen, D.-H., K.-T. Wu, et al. (2004). "Effects of Adenosine Dialdehyde Treatment on In Vitro and In Vivo Stable Protein Methylation in HeLa Cells 10.1093/jb/mvh131." J Biochem (Tokyo) **136**(3): 371-376.
- Choi, Y. D. and G. Dreyfuss (1984). "Isolation of the heterogeneous nuclear RNA-ribonucleoprotein complex (hnRNP): a unique supramolecular assembly." Proc Natl Acad Sci U S A **81**(23): 7471-5.
- Christensen, M. E. and K. P. Fuxa (1988). "The nucleolar protein, B-36, contains a glycine and dimethylarginine-rich sequence conserved in several other nuclear RNA-binding proteins." Biochem Biophys Res Commun **155**(3): 1278-83.
- Cook, P. R. (1988). "The nucleoskeleton: artefact, passive framework or active site?" J Cell Sci **90** (Pt 1): 1-6.
- Cote, J., F. M. Boisvert, et al. (2003). "Sam68 RNA binding protein is an in vivo substrate for protein arginine N-methyltransferase 1." Mol Biol Cell **14**(1): 274-87.
- Covic, M., P. O. Hassa, et al. (2005). "Arginine methyltransferase CARM1 is a promoter-specific regulator of NF-kappaB-dependent gene expression." Embo J **24**(1): 85-96.
- Cuthbert, G. L., S. Daujat, et al. (2004). "Histone deimination antagonizes arginine methylation." Cell **118**(5): 545-53.
- Davis, M., A. Hatzubai, et al. (2002). "Pseudosubstrate regulation of the SCF(beta-TrCP) ubiquitin ligase by hnRNP-U." Genes Dev **16**(4): 439-51.
- Denman, R. B. (2005). "PAD: the smoking gun behind arginine methylation signaling?" Bioessays **27**(3): 242-6.
- Dreyfuss, G. (1986). "Structure and function of nuclear and cytoplasmic ribonucleoprotein particles." Annu Rev Cell Biol **2**: 459-98.
- Dreyfuss, G., M. J. Matunis, et al. (1993). "hnRNP proteins and the biogenesis of mRNA." Annu Rev Biochem **62**: 289-321.
- Dreyfuss, G., L. Philipson, et al. (1988). "Ribonucleoprotein particles in cellular processes." J Cell Biol **106**(5): 1419-25.
- Dreyfuss, G., M. S. Swanson, et al. (1988a). "Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein particles and the pathway of mRNA formation." Trends Biochem Sci **13**(3): 86-91.
- Du, W. and T. Maniatis (1994). "The high mobility group protein HMG I(Y) can stimulate or inhibit DNA binding of distinct transcription factor ATF-2 isoforms." Proc Natl Acad Sci U S A **91**(24): 11318-22.

- Dundr, M., T. Misteli, et al. (2000). "The dynamics of postmitotic reassembly of the nucleolus." J Cell Biol **150**(3): 433-46.
- Edberg, D. D., J. N. Adkins, et al. (2005). "Dynamic and differential in vivo modifications of the isoform HMGA1a and HMGA1b chromatin proteins." J Biol Chem **280**(10): 8961-73.
- Edberg, D. D., J. E. Bruce, et al. (2004). "In vivo posttranslational modifications of the high mobility group A1a proteins in breast cancer cells of differing metastatic potential." Biochemistry **43**(36): 11500-15.
- Eggert, H., M. Schulz, et al. (2001). "Effects of the heterogeneous nuclear ribonucleoprotein U (hnRNP U/SAF-A) on glucocorticoid-dependent transcription in vivo." J Steroid Biochem Mol Biol **78**(1): 59-65.
- Eggert, M., J. Michel, et al. (1997). "The glucocorticoid receptor is associated with the RNA-binding nuclear matrix protein hnRNP U." J Biol Chem **272**(45): 28471-8.
- Fackelmayer, F. O. (2005). "A stable proteinaceous structure in the territory of inactive X chromosomes." J Biol Chem **280**(3): 1720-3.
- Fackelmayer, F. O. (2005a). "Protein arginine methyltransferases: guardians of the Arg?" Trends Biochem Sci **30**(12): 666-71.
- Fackelmayer, F. O. (2000). "Die Architektur des Zellkerns." Biospektrum (6): 441-444.
- Fackelmayer, F. O., K. Dahm, et al. (1994). "Nucleic-acid-binding properties of hnRNP-U/SAF-A, a nuclear-matrix protein which binds DNA and RNA in vivo and in vitro." Eur J Biochem **221**(2): 749-57.
- Fackelmayer, F. O. and A. Richter (1994). "hnRNP-U/SAF-A is encoded by two differentially polyadenylated mRNAs in human cells." Biochim Biophys Acta **1217**(2): 232-4.
- Fackelmayer, F. O. and A. Richter (1994a). "Purification of two isoforms of hnRNP-U and characterization of their nucleic acid binding activity." Biochemistry **33**(34): 10416-22.
- Fey, E. G., G. Krochmalnic, et al. (1986). "The nonchromatin substructures of the nucleus: the ribonucleoprotein (RNP)-containing and RNP-depleted matrices analyzed by sequential fractionation and resinless section electron microscopy." J Cell Biol **102**(5): 1654-65.
- Fey, E. G. and S. Penman (1988). "Nuclear matrix proteins reflect cell type of origin in cultured human cells." Proc Natl Acad Sci U S A **85**(1): 121-5.
- Frankel, A. and S. Clarke (2000). "PRMT3 is a distinct member of the protein arginine N-methyltransferase family. Conferral of substrate specificity by a zinc-finger domain." J Biol Chem **275**(42): 32974-82.
- Frankel, A., N. Yadav, et al. (2002). "The novel human protein arginine N-methyltransferase PRMT6 is a nuclear enzyme displaying unique substrate specificity." J Biol Chem **277**(5): 3537-43.

- Friesen, W. J., S. Massenet, et al. (2001). "SMN, the product of the spinal muscular atrophy gene, binds preferentially to dimethylarginine-containing protein targets." Mol Cell **7**(5): 1111-7.
- Friesen, W. J., S. Paushkin, et al. (2001a). "The Methylosome, a 20S Complex Containing JBP1 and pICln, Produces Dimethylarginine-Modified Sm Proteins." Mol. Cell. Biol. **21**(24): 8289-8300.
- Gabler, S., H. Schutt, et al. (1998). "E1B 55-kilodalton-associated protein: a cellular protein with RNA-binding activity implicated in nucleocytoplasmic transport of adenovirus and cellular mRNAs." J Virol **72**(10): 7960-71.
- Gary, J. D. and S. Clarke (1998). "RNA and protein interactions modulated by protein arginine methylation." Prog Nucleic Acid Res Mol Biol **61**: 65-131.
- Gohring, F. and F. O. Fackelmayer (1997). "The scaffold/matrix attachment region binding protein hnRNP-U (SAF-A) is directly bound to chromosomal DNA in vivo: a chemical cross-linking study." Biochemistry **36**(27): 8276-83.
- Gohring, F., B. L. Schwab, et al. (1997). "The novel SAR-binding domain of scaffold attachment factor A (SAF-A) is a target in apoptotic nuclear breakdown." Embo J **16**(24): 7361-71.
- Hassan, A. B. and P. R. Cook (1993). "Visualization of replication sites in unfixed human cells." J Cell Sci **105 (Pt 2)**: 541-50.
- He, D. C., J. A. Nickerson, et al. (1990). "Core filaments of the nuclear matrix." J Cell Biol **110**(3): 569-80.
- Helbig, R. and F. O. Fackelmayer (2003). "Scaffold attachment factor A (SAF-A) is concentrated in inactive X chromosome territories through its RGG domain." Chromosoma **112**(4): 173-82.
- Herrmann, F. (2002). "Untersuchungen zu funktionellen Wechselwirkungen des Kernproteins SAF-A", Diplomarbeit, Universität Konstanz.
- Hidaka, Y., T. Hagiwara, et al. (2005). "Methylation of the guanidino group of arginine residues prevents citrullination by peptidylarginine deiminase IV." FEBS Lett **579**(19): 4088-92.
- Houtsmuller, A. B., S. Rademakers, et al. (1999). "Action of DNA repair endonuclease ERCC1/XPF in living cells." Science **284**(5416): 958-61.
- Howell, M., C. Borchers, et al. (2004). "Heterogeneous nuclear ribonuclear protein U associates with YAP and regulates its co-activation of Bax transcription." J Biol Chem **279**(25): 26300-6.
- Hozak, P., A. B. Hassan, et al. (1993). "Visualization of replication factories attached to nucleoskeleton." Cell **73**(2): 361-73.
- Huang, S., T. J. Deerinck, et al. (1998). "The perinucleolar compartment and transcription." J Cell Biol **143**(1): 35-47.

- Hung, C. M. and C. Li (2004). "Identification and phylogenetic analyses of the protein arginine methyltransferase gene family in fish and ascidians." Gene **340**(2): 179-87.
- Huyen, Y., O. Zgheib, et al. (2004). "Methylated lysine 79 of histone H3 targets 53BP1 to DNA double-strand breaks." Nature **432**(7015): 406-11.
- Jackson, D. A., A. B. Hassan, et al. (1993). "Visualization of focal sites of transcription within human nuclei." Embo J **12**(3): 1059-65.
- Jans, D. A. and S. Hubner (1996). "Regulation of protein transport to the nucleus: central role of phosphorylation." Physiol Rev **76**(3): 651-85.
- Jenke, A. C., I. M. Stehle, et al. (2004). "Nuclear scaffold/matrix attached region modules linked to a transcription unit are sufficient for replication and maintenance of a mammalian episome." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(31): 11322-7.
- Jenke, B. H., C. P. Fetzter, et al. (2002). "An episomally replicating vector binds to the nuclear matrix protein SAF-A in vivo." EMBO Rep **3**(4): 349-54.
- Jenuwein, T. and C. D. Allis (2001). "Translating the histone code." Science **293**(5532): 1074-80.
- Jong, A. Y., M. W. Clark, et al. (1987). "Saccharomyces cerevisiae SSB1 protein and its relationship to nucleolar RNA-binding proteins." Mol Cell Biol **7**(8): 2947-55.
- Kanemori, Y., K. Uto, et al. (2005). "Beta-TrCP recognizes a previously undescribed nonphosphorylated destruction motif in Cdc25A and Cdc25B phosphatases." Proc Natl Acad Sci U S A **102**(18): 6279-84.
- Karn, J., G. Vidali, et al. (1977). "Characterization of the non-histone nuclear proteins associated with rapidly labeled heterogeneous nuclear RNA." J Biol Chem **252**(20): 7307-22.
- Katsanis, N., M. L. Yaspo, et al. (1997). "Identification and mapping of a novel human gene, HRMT1L1, homologous to the rat protein arginine N-methyltransferase 1 (PRMT1) gene." Mamm Genome **8**(7): 526-9.
- Kiledjian, M. and G. Dreyfuss (1992). "Primary structure and binding activity of the hnRNP U protein: binding RNA through RGG box." Embo J **11**(7): 2655-64.
- Kim, J., J. Lee, et al. (2004). "Loss of CARM1 Results in Hypomethylation of Thymocyte Cyclic AMP-regulated Phosphoprotein and Deregulated Early T Cell Development 10.1074/jbc.M402544200." J. Biol. Chem. **279**(24): 25339-25344.
- Kim, M. K. and V. M. Nikodem (1999). "hnRNP U inhibits carboxy-terminal domain phosphorylation by TFIIH and represses RNA polymerase II elongation." Mol Cell Biol **19**(10): 6833-44.
- Kim, S., B. M. Merrill, et al. (1997). "Identification of N(G)-methylarginine residues in human heterogeneous RNP protein A1: Phe/Gly-Gly-Gly-Arg-Gly-Gly-Gly/Phe is a preferred recognition motif." Biochemistry **36**(17): 5185-92.

- Kim, S., E. A. Nollen, et al. (2002). "Polyglutamine protein aggregates are dynamic." Nat Cell Biol **4**(10): 826-31.
- Kimura, H. (2005). "Histone dynamics in living cells revealed by photobleaching." DNA Repair (Amst) **4**(8): 939-50.
- Kimura, K., H. Suzuki, et al. (1996). "Identification of arginyl residues located at the ATP binding site of sarcoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase. Modification with 1,2-cyclohexanedione." J Biol Chem **271**(46): 28933-41.
- Kipp, M., F. Gohring, et al. (2000). "SAF-Box, a conserved protein domain that specifically recognizes scaffold attachment region DNA." Mol Cell Biol **20**(20): 7480-9.
- Kipp, M., B. L. Schwab, et al. (2000a). "Apoptotic cleavage of scaffold attachment factor A (SAF-A) by caspase-3 occurs at a noncanonical cleavage site." J Biol Chem **275**(7): 5031-6.
- Klein, S., J. A. Carroll, et al. (2000). "Biochemical analysis of the arginine methylation of high molecular weight fibroblast growth factor-2." J Biol Chem **275**(5): 3150-7.
- Koh, S. S., D. Chen, et al. (2001). "Synergistic enhancement of nuclear receptor function by p160 coactivators and two coactivators with protein methyltransferase activities." J Biol Chem **276**(2): 1089-98.
- Kouzarides, T. (1999). "Histone acetylases and deacetylases in cell proliferation." Curr Opin Genet Dev **9**(1): 40-8.
- Kouzarides, T. (2002). "Histone methylation in transcriptional control." Curr Opin Genet Dev **12**(2): 198-209.
- Kramer, A. (1996). "The structure and function of proteins involved in mammalian pre-mRNA splicing." Annu Rev Biochem **65**: 367-409.
- Kruhlak, M. J., M. A. Lever, et al. (2000). "Reduced mobility of the alternate splicing factor (ASF) through the nucleoplasm and steady state speckle compartments." J Cell Biol **150**(1): 41-51.
- Kukalev, A., Y. Nord, et al. (2005). "Actin and hnRNP U cooperate for productive transcription by RNA polymerase II." Nat Struct Mol Biol **12**(3): 238-44.
- Kurdistani, S. K. and M. Grunstein (2003). "In vivo protein-protein and protein-DNA crosslinking for genomewide binding microarray." Methods **31**(1): 90-5.
- Kwak, Y. T., J. Guo, et al. (2003). "Methylation of SPT5 regulates its interaction with RNA polymerase II and transcriptional elongation properties." Mol Cell **11**(4): 1055-66.
- Laemmli, U. K. (1970). "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4." Nature **227**(5259): 680-5.
- Lee, D. Y., C. Teyssier, et al. (2005). "Role of protein methylation in regulation of transcription." Endocr Rev **26**(2): 147-70.

- Lee, J. and M. T. Bedford (2002). "PABP1 identified as an arginine methyltransferase substrate using high-density protein arrays." EMBO Rep **3**(3): 268-73.
- Lee, J., J. Sayegh, et al. (2005a). "PRMT8, a new membrane-bound tissue-specific member of the protein arginine methyltransferase family." J Biol Chem **280**(38): 32890-6.
- Lee, J. H., J. R. Cook, et al. (2005b). "PRMT7, a new protein arginine methyltransferase that synthesizes symmetric dimethylarginine." J Biol Chem **280**(5): 3656-64.
- Lim, Y., Y. H. Kwon, et al. (2005). "Multimerization of expressed protein-arginine methyltransferases during the growth and differentiation of rat liver." Biochim Biophys Acta **1723**(1-3): 240-7.
- Lin, W. J., J. D. Gary, et al. (1996). "The mammalian immediate-early TIS21 protein and the leukemia-associated BTG1 protein interact with a protein-arginine N-methyltransferase." J Biol Chem **271**(25): 15034-44.
- Lischwe, M. A., R. G. Cook, et al. (1985). "Clustering of glycine and NG,NG-dimethylarginine in nucleolar protein C23." Biochemistry **24**(22): 6025-8.
- Lischwe, M. A., R. L. Ochs, et al. (1985a). "Purification and partial characterization of a nucleolar scleroderma antigen (Mr = 34,000; pI, 8.5) rich in NG,NG-dimethylarginine." J Biol Chem **260**(26): 14304-10.
- Liu, Q. and G. Dreyfuss (1995). "In vivo and in vitro arginine methylation of RNA-binding proteins." Mol Cell Biol **15**(5): 2800-8.
- Ma, H., A. J. Siegel, et al. (1999). "Association of chromosome territories with the nuclear matrix. Disruption of human chromosome territories correlates with the release of a subset of nuclear matrix proteins." J Cell Biol **146**(3): 531-42.
- Martens, J. H., M. Verlaan, et al. (2002). "Scaffold/matrix attachment region elements interact with a p300-scaffold attachment factor A complex and are bound by acetylated nucleosomes." Mol Cell Biol **22**(8): 2598-606.
- Mattern, K. A., B. M. Humbel, et al. (1996). "hnRNP proteins and B23 are the major proteins of the internal nuclear matrix of HeLa S3 cells." J Cell Biochem **62**(2): 275-89.
- McBride, A. E. and P. A. Silver (2001). "State of the arg: protein methylation at arginine comes of age." Cell **106**(1): 5-8.
- McBride, A. E., V. H. Weiss, et al. (2000). "Analysis of the yeast arginine methyltransferase Hmt1p/Rmt1p and its in vivo function. Cofactor binding and substrate interactions." J Biol Chem **275**(5): 3128-36.
- Mearini, G., P. E. Nielsen, et al. (2004). "Localization and dynamics of small circular DNA in live mammalian nuclei." Nucleic Acids Res **32**(8): 2642-51.
- Meister, G., C. Eggert, et al. (2001). "Methylation of Sm proteins by a complex containing PRMT5 and the putative U snRNP assembly factor pICln." Curr Biol **11**(24): 1990-4.

- Meister, G. and U. Fischer (2002). "Assisted RNP assembly: SMN and PRMT5 complexes cooperate in the formation of spliceosomal UsnRNPs." Embo J **21**(21): 5853-63.
- Metzger, E., M. Wissmann, et al. (2005). "LSD1 demethylates repressive histone marks to promote androgen-receptor-dependent transcription." Nature **437**(7057): 436-9.
- Miao, F., S. Li, et al. (2006). "CARM1 enhances NF- κ B Mediated Gene Transcription Through Methylation of Histone H3 at Arginine 17." Mol Endocrinol.
- Miranda, T. B., P. Khusial, et al. (2004). "Spliceosome Sm proteins D1, D3, and B/B' are asymmetrically dimethylated at arginine residues in the nucleus." Biochem Biophys Res Commun **323**(2): 382-7.
- Miranda, T. B., J. Sayegh, et al. (2006). "Yeast Hsl7 (histone synthetic lethal 7) catalyzes the in vitro formation of omega-N G-monomethylarginine in calf thymus histone H2A." Biochem J.
- Miranda, T. B., K. J. Webb, et al. (2005). "Protein arginine methyltransferase 6 specifically methylates the nonhistone chromatin protein HMGA1a." Biochem Biophys Res Commun **336**(3): 831-5.
- Najbauer, J., B. A. Johnson, et al. (1993). "Peptides with sequences similar to glycine, arginine-rich motifs in proteins interacting with RNA are efficiently recognized by methyltransferase(s) modifying arginine in numerous proteins." J Biol Chem **268**(14): 10501-9.
- Nehls, S., E. L. Snapp, et al. (2000). "Dynamics and retention of misfolded proteins in native ER membranes." Nat Cell Biol **2**(5): 288-95.
- Nichols, R. C., X. W. Wang, et al. (2000). "The RGG domain in hnRNP A2 affects subcellular localization." Exp Cell Res **256**(2): 522-32.
- Nickerson, J. A., G. Krochmalnic, et al. (1989). "Chromatin architecture and nuclear RNA." Proc Natl Acad Sci U S A **86**(1): 177-81.
- O'Dea, R. F., B. L. Mirkin, et al. (1987). "Effect of adenosine analogues on protein carboxymethyltransferase, S-adenosylhomocysteine hydrolase, and ribonucleotide reductase activity in murine neuroblastoma cells." Cancer Res **47**(14): 3656-61.
- Ogryzko, V. V., R. L. Schiltz, et al. (1996). "The transcriptional coactivators p300 and CBP are histone acetyltransferases." Cell **87**(5): 953-9.
- Ostareck-Lederer, A., D. H. Ostareck, et al. (2006). "Asymmetric arginine dimethylation of HNRNP K by PRMT1 inhibits its interaction with C-SRC." J Biol Chem.
- Pahlich, S., K. Bschor, et al. (2005). "Different methylation characteristics of protein arginine methyltransferase 1 and 3 toward the Ewing Sarcoma protein and a peptide." Proteins **61**(1): 164-75.
- Paik, W. K. and S. Kim (1967). "Enzymatic methylation of protein fractions from calf thymus nuclei." Biochem Biophys Res Commun **29**(1): 14-20.

- Pal, S., S. N. Vishwanath, et al. (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**(21): 9630-45.
- Pal, S., R. Yun, et al. (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**(21): 7475-87.
- Patthy, A., S. Bajusz, et al. (1977). "Preparation and characterization of Ng-mono-, di- and trimethylated arginines." Acta Biochim Biophys Acad Sci Hung **12**(3): 191-6.
- Pawlak, M. R., S. Banik-Maiti, et al. (2002). "Protein arginine methyltransferase I: substrate specificity and role in hnRNP assembly." J Cell Biochem **87**(4): 394-407.
- Pawlak, M. R., C. A. Scherer, et al. (2000). "Arginine N-methyltransferase 1 is required for early postimplantation mouse development, but cells deficient in the enzyme are viable." Mol Cell Biol **20**(13): 4859-69.
- Pederson, T. (2000). "Diffusional protein transport within the nucleus: a message in the medium." Nat Cell Biol **2**(5): E73-4.
- Phair, R. D. and T. Misteli (2000). "High mobility of proteins in the mammalian cell nucleus." Nature **404**(6778): 604-9.
- Piechaczek, C., C. Fetzer, et al. (1999). "A vector based on the SV40 origin of replication and chromosomal S/MARs replicates episomally in CHO cells." Nucleic Acids Res **27**(2): 426-8.
- Pilch, D. R., O. A. Sedelnikova, et al. (2003). "Characteristics of gamma-H2AX foci at DNA double-strand breaks sites." Biochem Cell Biol **81**(3): 123-9.
- Qamar, S., K. Marsh, et al. (1996). "Identification of arginine 331 as an important active site residue in the class II fructose-1,6-bisphosphate aldolase of Escherichia coli." Protein Sci **5**(1): 154-61.
- Rajpurohit, R., W. K. Paik, et al. (1994). "Effect of enzymic methylation of heterogeneous ribonucleoprotein particle A1 on its nucleic-acid binding and controlled proteolysis." Biochem J **304** (Pt 3): 903-9.
- Rezai-Zadeh, N., X. Zhang, et al. (2003). "Targeted recruitment of a histone H4-specific methyltransferase by the transcription factor YY1." Genes Dev **17**(8): 1019-29.
- Rho, J., S. Choi, et al. (2001). "Prmt5, which forms distinct homo-oligomers, is a member of the protein-arginine methyltransferase family." J Biol Chem **276**(14): 11393-401.
- Rice, J. C. and C. D. Allis (2001). "Histone methylation versus histone acetylation: new insights into epigenetic regulation." Curr Opin Cell Biol **13**(3): 263-73.
- Romig, H., F. O. Fackelmayer, et al. (1992). "Characterization of SAF-A, a novel nuclear DNA binding protein from HeLa cells with high affinity for nuclear matrix/scaffold attachment DNA elements." Embo J **11**(9): 3431-40.

- Roshon, M. J. and H. E. Ruley (2005). "Hypomorphic mutation in hnRNP U results in post-implantation lethality." Transgenic Res **14**(2): 179-92.
- Sambrook, J. et al. (1989). "Molecular Cloning: A Laboratory Manual." Cold Spring Harbor Press, second ed.
- Sandmeier, E. and P. Christen (1982). "Chemical modification of a functional arginyl residue (Arg 292) of mitochondrial aspartate aminotransferase. Identification as the binding site for the distal carboxylate group of the substrate." J Biol Chem **257**(12): 6745-50.
- Sanger, F., S. Nicklen, et al. (1977). "DNA sequencing with chain-terminating inhibitors." Proc Natl Acad Sci U S A **74**(12): 5463-7.
- Sarmiento, O. F., L. C. Digilio, et al. (2004). "Dynamic alterations of specific histone modifications during early murine development." J Cell Sci **117**(Pt 19): 4449-59.
- Schurter, B. T., S. S. Koh, et al. (2001). "Methylation of histone H3 by coactivator-associated arginine methyltransferase 1." Biochemistry **40**(19): 5747-56.
- Schwander, A. (2004). "Die funktionelle Domänenstruktur des humanen Kernproteins Scaffold Attachment Factor A", Dissertation, Universität Hamburg.
- Scott, H. S., S. E. Antonarakis, et al. (1998). "Identification and characterization of two putative human arginine methyltransferases (HRMT1L1 and HRMT1L2)." Genomics **48**(3): 330-40.
- Sedelnikova, O. A., D. R. Pilch, et al. (2003). "Histone H2AX in DNA damage and repair." Cancer Biol Ther **2**(3): 233-5.
- Seksek, O., J. Biwersi, et al. (1997). "Translational diffusion of macromolecule-sized solutes in cytoplasm and nucleus." J Cell Biol **138**(1): 131-42.
- Sgarra, R., F. Diana, et al. (2003). "During apoptosis of tumor cells HMGA1a protein undergoes methylation: identification of the modification site by mass spectrometry." Biochemistry **42**(12): 3575-85.
- Sgarra, R., J. Lee, et al. (2006). "The AT-hook of the chromatin architectural transcription factor high mobility group A1a is arginine-methylated by protein arginine methyltransferase 6." J Biol Chem **281**(7): 3764-72.
- Shen, E. C., M. F. Henry, et al. (1998). "Arginine methylation facilitates the nuclear export of hnRNP proteins." Genes Dev **12**(5): 679-91.
- Shi, Y., F. Lan, et al. (2004). "Histone demethylation mediated by the nuclear amine oxidase homolog LSD1." Cell **119**(7): 941-53.
- Shopland, L. S. and J. B. Lawrence (2000). "Seeking common ground in nuclear complexity." J Cell Biol **150**(1): F1-4.
- Sims, R. J., 3rd, K. Nishioka, et al. (2003). "Histone lysine methylation: a signature for chromatin function." Trends Genet **19**(11): 629-39.

- Singh, V., T. B. Miranda, et al. (2004). "DAL-1/4.1B tumor suppressor interacts with protein arginine N-methyltransferase 3 (PRMT3) and inhibits its ability to methylate substrates in vitro and in vivo." Oncogene **23**(47): 7761-71.
- Smith, J. J., K. P. Rucknagel, et al. (1999). "Unusual Sites of Arginine Methylation in Poly(A)-binding Protein II and in Vitro Methylation by Protein Arginine Methyltransferases PRMT1 and PRMT310.1074/jbc.274.19.13229." J. Biol. Chem. **274**(19): 13229-13234.
- Smith, W. A., B. T. Schurter, et al. (2004). "Arginine methylation of RNA helicase a determines its subcellular localization." J Biol Chem **279**(22): 22795-8.
- Snaar, S., K. Wiesmeijer, et al. (2000). "Mutational analysis of fibrillarin and its mobility in living human cells." J Cell Biol **151**(3): 653-62.
- Sorg, G. and T. Stamminger (1999). "Mapping of nuclear localization signals by simultaneous fusion to green fluorescent protein and to beta-galactosidase." Biotechniques **26**(5): 858-62.
- Stallcup, M. R. (2001). "Role of protein methylation in chromatin remodeling and transcriptional regulation." Oncogene **20**(24): 3014-20.
- Stetler, A., C. Winograd, et al. (2006). "Identification and characterization of the methyl arginines in the fragile X mental retardation protein Fmrp." Hum Mol Genet **15**(1): 87-96.
- Strahl, B. D., S. D. Briggs, et al. (2001). "Methylation of histone H4 at arginine 3 occurs in vivo and is mediated by the nuclear receptor coactivator PRMT1." Curr Biol **11**(12): 996-1000.
- Swiercz, R., M. D. Person, et al. (2005). "Ribosomal protein S2 is a substrate for mammalian PRMT3 (protein arginine methyltransferase 3)." Biochem J **386**(Pt 1): 85-91.
- Tamrakar, S., E. Rubin, et al. (2000). "Role of pRB dephosphorylation in cell cycle regulation." Front Biosci **5**: D121-37.
- Tang, J., A. Frankel, et al. (2000). "PRMT1 is the predominant type I protein arginine methyltransferase in mammalian cells." J Biol Chem **275**(11): 7723-30.
- Tang, J., J. D. Gary, et al. (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**(27): 16935-45.
- Taniura, H. and K. Yoshikawa (2002). "Necdin interacts with the ribonucleoprotein hnRNP U in the nuclear matrix." J Cell Biochem **84**(3): 545-55.
- Teyssier, C., D. Chen, et al. (2002). "Requirement for multiple domains of the protein arginine methyltransferase CARM1 in its transcriptional coactivator function." J Biol Chem **277**(48): 46066-72.

- Thanos, D. and T. Maniatis (1992). "The high mobility group protein HMG I(Y) is required for NF-kappa B-dependent virus induction of the human IFN-beta gene." Cell **71**(5): 777-89.
- Thoma, F., T. Koller, et al. (1979). "Involvement of histone H1 in the organization of the nucleosome and of the salt-dependent superstructures of chromatin." J Cell Biol **83**(2 Pt 1): 403-27.
- Towbin, H., T. Staehelin, et al. (1979). "Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications." Proc Natl Acad Sci U S A **76**(9): 4350-4.
- Turner, B. M. (2002). "Cellular memory and the histone code." Cell **111**(3): 285-91.
- Valentini, S. R., V. H. Weiss, et al. (1999). "Arginine methylation and binding of Hrp1p to the efficiency element for mRNA 3'-end formation." Rna **5**(2): 272-80.
- Vossenaar, E. R., A. J. Zendman, et al. (2003). "PAD, a growing family of citrullinating enzymes: genes, features and involvement in disease." Bioessays **25**(11): 1106-18.
- Wachsmuth, M., W. Waldeck, et al. (2000). "Anomalous diffusion of fluorescent probes inside living cell nuclei investigated by spatially-resolved fluorescence correlation spectroscopy." J Mol Biol **298**(4): 677-89.
- Wada, K., K. Inoue, et al. (2002). "Identification of methylated proteins by protein arginine N-methyltransferase 1, PRMT1, with a new expression cloning strategy." Biochim Biophys Acta **1591**(1-3): 1-10.
- Wang, H., Z. Q. Huang, et al. (2001). "Methylation of histone H4 at arginine 3 facilitating transcriptional activation by nuclear hormone receptor." Science **293**(5531): 853-7.
- Wang, Y., J. Wysocka, et al. (2004). "Human PAD4 regulates histone arginine methylation levels via demethylation." Science **306**(5694): 279-83.
- Weiss, V. H., A. E. McBride, et al. (2000). "The structure and oligomerization of the yeast arginine methyltransferase, Hmt1." Nat Struct Biol **7**(12): 1165-71.
- Wessel, D. and U. I. Flugge (1984). "A method for the quantitative recovery of protein in dilute solution in the presence of detergents and lipids." Anal Biochem **138**(1): 141-3.
- Wray, W., T. Boulikas, et al. (1981). "Silver staining of proteins in polyacrylamide gels." Anal Biochem **118**(1): 197-203.
- Xu, W., H. Chen, et al. (2001). "A transcriptional switch mediated by cofactor methylation." Science **294**(5551): 2507-11.
- Xu, W., H. Cho, et al. (2004). "A methylation-mediator complex in hormone signaling." Genes Dev **18**(2): 144-56.
- Yang, X. J., V. V. Ogryzko, et al. (1996). "A p300/CBP-associated factor that competes with the adenoviral oncoprotein E1A." Nature **382**(6589): 319-24.

- Zhang, X. and X. Cheng (2003). "Structure of the predominant protein arginine methyltransferase PRMT1 and analysis of its binding to substrate peptides." Structure **11**(5): 509-20.
- Zhang, X., L. Zhou, et al. (2000). "Crystal structure of the conserved core of protein arginine methyltransferase PRMT3." Embo J **19**(14): 3509-19.
- Zuckerkindl, E. and R. Villet (1988). "Generation of high specificity of effect through low-specificity binding of proteins to DNA." FEBS Lett **231**(2): 291-8.