

Untersuchungen zur Rolle von Proteintranslokationen bei der Regulation der Genexpression

Dissertation

zur Erlangung des Grades
Doktor der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)
am Department Chemie der Universität Hamburg



vorgelegt von

Peter Pably

Hamburg, 2010

Für
meine Eltern

Diese Arbeit wurde am Heinrich-Pette-Institut für experimentelle Virologie und Immunologie an der Universität Hamburg in der Abteilung Molekulare Zellbiologie bzw. Tumorstudiologie durchgeführt und von Herrn Dr. Frank O. Fackelmayer betreut.

1. Gutachter: Prof. Dr. Wolfgang Deppert
2. Gutachter: Prof. Dr. Ulrich Hahn

Tag der Disputation: 4. Juni 2010

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht in:

Herrmann F, Pably P, Eckerich C, Bedford MT, Fackelmayer FO. 2009. Human protein arginine methyltransferases in vivo--distinct properties of eight canonical members of the PRMT family. *J Cell Sci* **122**: 667-677.

Pably P, Eckerich C, Fackelmayer FO. Intranuclear localization and dynamics of the Notch 1 intracellular domain. (Manuskript in Arbeit)

Danksagung

Herrn Prof. Dr. Wolfgang Deppert möchte ich recht herzlich für die Ermöglichung und Betreuung dieser Dissertation sowie für die großzügige Aufnahme während meiner abteilungslosen Zeit in seiner Arbeitsgruppe danken.

Herrn Prof. Dr. Ulrich Hahn danke ich für die Begutachtung dieser Arbeit.

Herrn Dr. Frank O. Fackelmayer danke ich für die Bereitstellung des interessanten Themas, seine Betreuung und den unzähligen, aufschlussreichen Diskussionen während meiner Arbeit sowie für das angenehme Arbeitsklima.

Bedanken möchte ich mich bei Daniel Speidel für die Durchführung der FACS Analysen, bei Arne Düsedau für die Durchführung der Zellsortierungen, bei Anette März für die Durchführung der MALDI-TOF Analysen und bei Carmen Eckerich für die nette Unterstützung während der Zeit in Ioannina.

Meinen Freunden und Kollegen in Hamburg und Ioannina danke ich für deren enorme Hilfsbereitschaft, das hervorragende Arbeitsklima, sowie für den Spaß innerhalb und außerhalb des Labors. Dazu gehören: Andrea Hermannstädter, Lars Tögel, Nina Heinlein, Heike Helmbold, Roger Helbig, Giulia Mearini, Sofia Bellou, Natasa Emmanouelidou, Sofia Zografou, Akis Liokatis, Michalis Mentzaris, Ilka Hillje, Jörg Klauser, Michaela Petter, Lena Oltrogge, Mirja Bettels, Sonja Strauch, Claudia Rottensteiner, Hilke Falinski, Holger Wirth, Michael Kothe, Ani der Sarkissian und viele mehr.

Ein besonderer Dank geht an meine Schwester Ramona Pably, für ihre uneingeschränkte Hilfsbereitschaft in jeglicher Hinsicht.

Meinen Eltern Helmut und Marliese danke ich sehr herzlich für die immer währende Unterstützung. Ohne sie wäre diese Arbeit niemals möglich gewesen.

Inhaltsverzeichnis

1. Zusammenfassung und Abstract	4
1.1 Zusammenfassung	4
1.2 Abstract	6
2. Einleitung	7
2.1 Direkte Genregulation durch den Notch Rezeptor	7
2.1.1 Funktion des Notch Rezeptors	7
2.1.2 Struktur des humanen Notch 1 Proteins	7
2.1.2.1 Die Extrazelluläre Domäne von Notch1	8
2.1.2.2 Notch 1 Intrazelluläre Domäne (NIC)	9
2.1.3 Die Notch Signaltransduktion	9
2.2 Indirekte, epigenetische Genregulation durch Histon-Methylierung	12
2.2.1 Chromatin und Histone	12
2.2.2 Posttranslationale Histon-Modifikationen	14
2.2.2.1 Acetylierung	15
2.2.2.2 Phosphorylierung	15
2.2.2.3 Ubiquitinierung	16
2.2.2.4 Ribosylierung	17
2.2.2.5 Methylierung	17
2.2.3 Methylierung von Argininresten in Proteinen	18
2.2.4 Struktur der Arginin-Methyltransferasen	19
2.2.5 Regulation der Transkription durch Arginin-Methylierung	23
2.2.6 Regulation der Arginin-Methyltransferasen	25
2.2.7 Protein-Arginin-Methyltransferase 1 und 4	26
2.3 Aktin	28
3. Zielsetzung	30
4. Material und Methoden	31
4.1 Material	31
4.1.1 Geräte, Chemikalien und Verbrauchswaren	31
4.1.2 Antikörper, Plasmide und Oligonukleotide	34
4.1.3 Allgemeine Puffer und Lösungen	35
4.2 Methoden	39
4.2.1 Allgemeine Methoden	39
4.2.2 Arbeiten mit Zellen	39
4.2.2.1 Zelltypen und Kulturbedingungen	39
4.2.2.2 Inhibierung der Methylierung in Zellen	39
4.2.2.3 Chemische Transfektion eukaryotischer Zellen mit Polyethylenimin	40

4.2.2.4	Transfektion eukaryotischer Zellen mit Lipofectamine 2000	40
4.2.2.5	Herstellung stabiler Zelllinien	40
4.2.2.6	Langzeitlagerung eukaryotischer Zellen	41
4.2.2.7	Blockieren der Zellen im Zellzyklus	41
4.2.2.8	Synchronisation der Zellen	41
4.2.2.9	Vorbereitung von Zellen für die Durchflusszytometrie	42
4.2.2.10	Analyse mittels FACS („Fluorescence Associated Cell Sorting“)	43
4.2.2.11	Indirekte Immunfluoreszenzfärbung eukaryotischer Zellen	43
4.2.2.12	Bestrahlung der Zellen mit γ -Strahlen	44
4.2.3	Mikroskopische Methoden	44
4.2.3.1	Konfokale Fluoreszenzmikroskopie	44
4.2.3.2	„Fluorescence Recovery After Photobleaching“ (FRAP)	45
4.2.3.3	Auswertung von FRAP-Daten	46
4.2.3.4	Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie (FCS)	48
4.2.4	Molekularbiologische Methoden	50
4.2.4.1	Elektrotransformation von <i>E. coli</i>	50
4.2.4.2	Plasmid-Isolierung aus <i>E. coli</i> (Minipräparation)	50
4.2.4.3	Plasmid-Isolierung aus <i>E. coli</i> (Maxipräparation)	51
4.2.4.4	DNA-Sequenzierung	51
4.2.4.5	qRT-PCR	52
4.2.4.6	Array-Analysen	52
4.2.4.7	Zellfraktionierung	52
4.2.5	Biochemische Methoden	53
4.2.5.1	Denaturierende SDS-Polyakrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	53
4.2.5.2	Westernblot Analyse	53
4.2.5.3	Immunpräzipitation (IP) von Proteinen	54
4.2.5.4	Glyceringradientenzentrifugation	54
4.2.5.5	Immunpräzipitation von PRMTs aus mitotischen Zellen	54
4.2.5.6	<i>In vitro</i> Methylierungsassay	55
4.2.5.7	Massenspektroskopie	56
5.	Ergebnisse	57
5.1	Charakterisierung des „Notch Intra Cellular“ (NIC) Proteins	57
5.1.1	Kontrollen zur Aktivität von NIC-GFP	58
5.1.2	Mobilität von NIC-GFP in den NIC-Körperchen	59
5.1.3	Lokalisationsvergleich zwischen NIC und Ott	61
5.1.4	Lokalisationsvergleich zwischen NIC und Sp100B/Sp100-HMG	62
5.1.5	Lokalisation von NIC unter oxidativem Stress	63
5.1.6	Lokalisationsvergleich zwischen NIC und RBP-Jk	64
5.1.7	Lokalisationsvergleich zwischen NIC und PML	65
5.2	Lokalisation und Aktivität von PRMT	71
5.2.1	Lokalisation von PRMT1 und PRMT4 in verschiedenen Zelltypen	71
5.2.2	Lokalisation von PRMT4 im Zellzyklus	73

5.2.3 Lokalisation von PRMT4 während der DNA-Reparatur	76
5.2.4 Komplexbildung von PRMT4	77
5.2.5 Aktivität von PRMT4 im Verlauf des Zellzyklus	79
5.3 Methylierung und Komplexbildung von Aktin	83
6. Diskussion	91
6.1 Lokalisation und Mobilität von Notch1 Intra Cellular (NIC)	91
6.1.1 Bildung von nukleären Körperchen und deren Lokalisation	91
6.1.2 Mobilität von Notch1 Intra Cellular in den NIC-Körperchen	93
6.2 Aktivität und Lokalisation von PRMT1 und PRMT4	94
6.2.1 Lokalisation von PRMT1 und PRMT4	94
6.2.2 Komplexbildung und Aktivität von PRMT4	95
6.2.3 PRMT4 während der DNA-Reparatur	97
6.3 Polymerisation und Komplexbildung von nukleärem Aktin	98
7. Abkürzungsverzeichnis	102
8. Sicherheitstechnische Daten	104
8.1 Gefahrstoffe	104
8.2 Verzeichnis der Gefahrensymbole	104
8.3 Verzeichnis der R- und S-Sätze	105
8.3.1 Gefahrenhinweise (R-Sätze)	105
8.3.2 Kombination der R-Sätze	105
8.3.3 Sicherheitsratschläge (S-Sätze)	106
8.3.4 Kombination der S-Sätze	106
9. Abbildungsverzeichnis	107
10. Tabellenverzeichnis	108
11. Literaturverzeichnis	109

1. Zusammenfassung und Abstract

1.1 Zusammenfassung

Notch 1 ist ein Transmembran-Protein, das nach Ligandenbindung proteolytisch gespalten wird. Die dadurch freigesetzte Domäne transloziert in den Zellkern und fungiert als Transkriptionsaktivator. In dieser Arbeit konnte erstmals gezeigt werden, dass die intrazelluläre Domäne von Notch 1 (NIC, notch intra cellular) im Zellkern in definierten „nuclear bodies“ lokalisiert. Diese Kernkörperchen kolokalisieren nicht mit anderen bekannten Kernkörperchen wie den PML-Körperchen, können aber den Ko-Transkriptionsaktivator RBP-Jk rekrutieren, der an der Aktivierung von Zielgenen beteiligt ist. Photobleaching-Experimente zeigten, daß NIC sich dynamisch zwischen Kernkörperchen und Kernplasma austauscht, und nur ein kleiner Teil länger in den Kernkörperchen verweilt. Diese Ergebnisse lassen zusammengefaßt vermuten, dass die Kernkörperchen eine Rolle bei der Aktivierung der Transkription durch Notch spielen.

Protein-Arginin-Methyltransferasen (PRMT) katalysieren die posttranslationale Methylierung von Arginineresten von Proteinen wie z.B. Histonen, und spielen somit eine wichtige Rolle in der epigenetischen Regulation der Genexpression. In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass die Lokalisation von PRMT1 und PRMT4 zelltypabhängig und im Falle von PRMT4 auch zellzyklusabhängig ist. Erstmals wurde nachgewiesen, dass sowohl Komplexbildung als auch Methylierungsaktivität von PRMT4 während der Mitose deutlich abnehmen. Diese Versuche zeigten zudem, dass PRMT4 in der Lage ist sich selbst zu methylieren. Desweiteren wurde Aktin als bisher unbekanntes Substrat der PRMT4 identifiziert.

Aktin ist ein essenzieller Bestandteil des Zytoskeletts, der als globuläres G-Aktin und als polymerisiertes, filamentöses F-Aktin vorliegen kann. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass nukleäres Aktin aus konfluenten Zellen *in vitro* bevorzugt polymerisiert und schließlich präzipitiert. Dieses präzipitierte Polymer befindet sich in konfluent gewachsenen Zellen in einem Komplex mit der phosphorylierten RNA Polymerase II. Es liegt daher nahe, dass die Polymerisation von nukleärem Aktin einen Einfluss auf die Transkription hat.

1.2 Abstract

Notch 1 is a transmembrane receptor, which is proteolytically cleaved after ligand binding. Upon cleavage, the intracellular domain of the receptor translocates to the nucleus where it acts as a transcriptional activator. Results of the present dissertation show that the Notch 1 intracellular domain (NIC) resides in defined nuclear bodies. These “NIC bodies” do not co-localize with known nuclear bodies such as PML bodies. In addition, we show that NIC recruits its co-transcriptional activator RBP-Jk into these NIC bodies. RBP-Jk participates in the activation of Notch 1 target genes. Photobleaching experiments demonstrate that NIC dynamically exchanges between the NIC bodies and the nucleoplasm, and that only a small population of NIC in the bodies behaves like an immobile protein. These findings suggest that NIC bodies play a role in the activation of transcription by Notch 1.

Protein arginine methyltransferases (PRMT) catalyze the post-translational methylation of arginine residues in proteins such as histones, and thereby play an important role in the epigenetic regulation of gene expression. We show here that the intracellular localization of PRMT1 and PRMT4 is cell line dependent, and that PRMT4 localization changes dynamically during the cell cycle. Moreover, we demonstrate that the ability of complex formation and the methylation activity of PRMT4 dramatically decrease during mitosis. Results of this dissertation also show that PRMT4 is able to methylate itself. In addition, Actin was identified as a novel in-vitro substrate of PRMT4.

Actin is an essential protein in the cytoskeletal structure of cells. Actin exists as globular G-Actin or as polymeric, filamentous F-Actin. Our experiments show that nuclear Actin from confluent U2OS-cells, but not from sparse cells, polymerizes *in vitro*. These precipitates of nuclear Actin were found to also contain the phosphorylated, transcriptionally active RNA polymerase II. Collectively, these results add to the growing body of evidence that nuclear Actin plays a role in transcription, and that it most probably does so in polymerized form.

2. Einleitung

2.1 Direkte Genregulation durch Notch 1

Notch ist ein transmembranständiger Transkriptionsfaktor, der erstmalig 1917 von Morgan beschrieben wurde (Morgan 1917). In der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* zeigte eine Haploinsuffizienz des Notch-Gens eine Kerbe (engl. „notch“) im Flügel. Während *Drosophila melanogaster* nur über einen Notch Rezeptor verfügt wurden bei Menschen und Mäusen vier Orthologe identifiziert, Notch 1 bis Notch 4.

2.1.1 Funktion des Notch Rezeptors

Notch-Proteine sind an zahlreichen Entwicklungsprozessen und Zellschicksalsentscheidungen beteiligt. So spielen sie eine wichtige Rolle bei essenziellen zellulären Mechanismen wie Differenzierung, Proliferation, Apoptose, Erhalt von Stammzellen und der Ausbildung von Gewebegrenzen (Miele and Osborne 1999). Notch ist unter anderem involviert in die Regulation von Prozessen wie der frühen Embryogenese (Swiatek et al. 1994; Hamada et al. 1999), der Myogenese (Lardelli et al. 1994), der Gliogenese (Tanigaki et al. 2001), der neuronalen Entwicklung (Nye et al. 1994), der Differenzierung von Muskelzellen (Kopan et al. 1994), Granulozyten (Milner et al. 1996; Schroeder and Just 2000) und der Lymphozyten (Pui et al. 1999; Radtke et al. 1999), sowie der Pankreas-Zell-Differenzierung (Apelqvist et al. 1999). Störungen im Notch Signaltransduktionsweg haben Entwicklungsstörungen, Erkrankungen und Onkogenese wie z.B. die T-Zell akute lymphoblastische Leukämie (Ellisen et al. 1991) zur Folge.

2.1.2 Struktur des humanen Notch 1 Proteins

Das humane Notch 1 Protein besteht aus 2556 Aminosäuren und hat ein Molekulargewicht von 273kDa. Notch 1 wird als Vorläuferprotein im endoplasmatischen Retikulum synthetisiert und während des Transports zur Zelloberfläche im trans-Golgi Netzwerk prozessiert. Notch 1 Rezeptoren besitzen nur

eine einzige Transmembrandomäne, und ihr N-Terminus liegt im extrazellulären Bereich. Das heißt sie sind Typ 1-Transmembranproteine. An der Zytoplasmamembran liegt Notch 1 als Heterodimer vor, welches aus einer ca. 180 kDa großen, N-terminalen extrazellulären Domäne und einem nicht-kovalent daran gebundenen, membranständigen Proteinteil besteht. Dieser etwa 120 kDa große membranständige Teil besteht aus der intrazellulären Domäne NIC (Notch intra cellular), der Transmembrandomäne, sowie und einem kurzen extrazellulären Rest (Blaumueller and Artavanis-Tsakonas 1997).

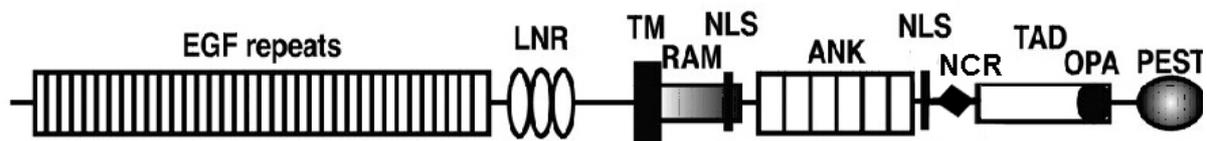


Abb. 2.2.1: Struktur des humanen Notch 1 Rezeptors.

Der N-terminale Bereich des Notch-Rezeptors besteht aus 36 Epidermal Growth Factor (EGF) like Repeats und drei LIN12 Repeats (LNR). Die EGF Repeats agieren als Liganden-Bindedomäne wobei die LIN12 Repeats eine Signalweiterleitung in Abwesenheit eines Liganden verhindern. Der intrazelluläre Teil (NIC) beinhaltet die RAM-Domäne und eine Reihe von Ankyrin-Repeats (ANK), die beide im Kern mit CSL/RBPJ- κ interagieren können. Weiter sind zwei Kernlokalisations-Signale (NLS), eine Zytokin Response Sequenz (NCR), eine transkriptionelle Aktivierungsdomäne (TAD) und eine C-terminale PEST-Sequenz lokalisiert. Die PEST-Sequenz besitzt Transaktivierungspotenzial und ist in der Regulation der Proteinstabilität involviert. (modifiziert aus (Chu and Bresnick 2004))

2.1.2.1 Die Extrazelluläre Domäne von Notch 1

Die extrazelluläre Domäne des Notch 1 Rezeptors besteht größtenteils aus 36 Epidermal Growth Factor-like (EGF) Tandemwiederholungen (Lardelli et al. 1994). Innerhalb der EGF-like-repeats liegt die Ligandenbindungsstelle (Rebay et al. 1991). Es folgen 3 Cystein-reiche Notch/Lin12 Wiederholungen (LNR) (siehe Abb. 2.2.1). Diese halten den Rezeptor bis zur Liganden abhängigen Aktivierung in einer ruhenden Konformation, um so eine Liganden unabhängige Aktivierung zu unterdrücken (Lieber et al. 1993; Lyman and Young 1993; Greenwald 1994).

2.1.2.2 Notch 1 intrazelluläre Domäne (NIC)

Über die intrazelluläre Domäne (NIC) von Notch 1 wird die Signalweitergabe vermittelt. An die Transmembrandomäne schließt die RAM-Domäne (RBP-Jk assoziiertes Modul) an. Die RAM-Domäne ist die Bindungsstelle für den Transkriptionsfaktor CBF-1 (C Promotor Bindungsfaktor 1) bzw. RBP-Jk (Rekombinationssignal Bindungsprotein J-kappa) (Tamura et al. 1995), der das humane Homolog zu *Drosophila* Supressor of Hairless Su(H) bzw. zu *C. elegans* Lag-1 (daher auch CSL genannt, CBF-1 / Su(H) / Lag-1) bildet. In der RAM-Domäne befindet sich ein Kernlokalisationsignal (NLS, nuclear localisation signal). Eine weitere NLS befindet sich hinter der ANK Domäne. Im Anschluss an die RAM-Domäne folgt die ANK-Domäne (6 Ankyrin Wiederholungen), welche für Protein-Protein Interaktionen zuständig ist. C-terminal der ANK liegt die NCR Sequenz (Notch cytokine response), welche Zytokin-Signale integriert und an welcher der transkriptionelle Ko-Aktivator p300 bindet (Bigas et al. 1998; Oswald et al. 2001). Weiter C-terminal liegt die transkriptionelle Aktivierungsdomäne TAD, die für die Transkription einiger Zielgene nötig ist (Kurooka et al. 1998).

Nachfolgend befindet sich eine Glutamin-reiche Region, OPA, deren Funktion noch nicht bekannt ist. Am C-terminalen Ende des Proteins befindet sich eine PEST-Sequenz (Prolin-, Glutamat-, Serin-, Threonin-reiche Domäne), welche in die Proteinstabilität involviert ist (Rogers et al. 1986). Sie wird bei Proteinen gefunden, die einem schnellen intrazellulären Abbau unterliegen (Wharton et al. 1985; Kidd et al. 1986).

2.1.3 Die Notch Signaltransduktion

Der Notch-Rezeptor wird durch Bindung von Liganden an die extrazelluläre Domäne aktiviert. Bei Säugetieren gibt es hierbei zwei Liganden-Familien: Serrate-ähnliche Liganden wie Jagged 1 und 2, sowie Delta-ähnliche Liganden wie Dll 1,3 und 4 (Luo et al. 1997; Shutter et al. 2000). In Folge der Ligandenbindung werden zwei proteolytische Spaltungen im Rezeptor ausgelöst. Die erste wird durch die ADAM Metalloprotease TACE (Tumor-Necrosis Factor α-converting Enzyme) vermittelt, die den Rezeptor nahe der Transmembrandomäne spaltet (Parks et al. 2000). Die zweite Spaltung erfolgt innerhalb der Transmembrandomäne durch einen γ -Sekretase Komplex, an dem Presenilin und

Nicastrin beteiligt sind. Das dadurch freigewordene intrazelluläre zytoplasmatische Notch-Fragment NIC wird in den Zellkern transloziert, wo es über Interaktionen mit DNA-gebundenen Transkriptionsfaktoren, den CSL-Proteinen, die Transkription von Zielgenen aktiviert (Chan and Jan 1999; Weinmaster 2000). Hierbei interagiert intrazelluläres Notch (NIC) über die RAM- und Ankyrin-Domäne mit einem ubiquitären basischen Helix-Loop-Helix (bHLH) Transkriptionsfaktor der CSL-Familie (Jarriault et al. 1995) und verwandelt diesen von einem transkriptionellen Repressor in einen transkriptionellen Aktivator. Ohne Notch Signalaktivierung sind CSL-Proteine mit einem Ko-Repressorkomplex assoziiert, der aktiv die Transkription unterdrückt. Der Ko-Repressorkomplex besteht unter anderem aus Histondeacetylase 1 (HDAC-1), SMRT, N-CoR (nuclear receptor co-repressor), SKIP (Ski-interacting protein), CIR (CBF-interacting repressor) und SHARP (Kao et al. 1998; Kurooka et al. 1998; Hsieh et al. 1999; Zhou et al. 2000; Oswald et al. 2002) (siehe Abb. 2.2.2). Die intrazelluläre Notch Domäne entfernt die Ko-Repressoren von CSL und rekrutiert Ko-Aktivatoren. An diesem Ko-Aktivator-Komplex sind verschiedene Histon Acetyltransferasen beteiligt, wie z.B. p300/CBP und die Histon-Acetylase PCAF. Die Interaktion von NIC und CSL an der DNA wird dabei von einem Protein der nukleären mastermind-Familie, MAML-1, -2, -3 (mastermind-like proteins) als Ko-Aktivator stabilisiert (Kurooka and Honjo 2000; Wu et al. 2000; Oswald et al. 2001; Fryer et al. 2002; Jeffries et al. 2002; Wallberg et al. 2002).

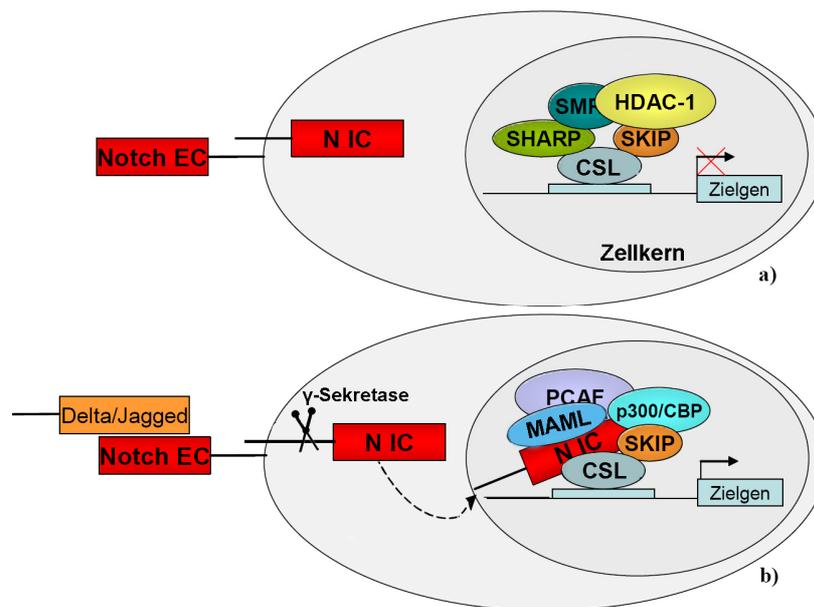


Abb. 2.2.2: Der Notch-Signalweg.

a) Im ruhenden Zustand rekrutiert CSL/RBPJ- κ einen Ko-Repressor-Komplex, der neben SMRT, SHARP und dem Brückenprotein SKIP die Histon-Deacetylase HDAC-1 enthält. b) Nach der Liganden-Bindung wird der Notch-Rezeptor proteolytisch gespalten. Die erste Spaltung erfolgt in der extrazellulären Domäne (NEC), die zweite durch γ -Sekretase in der intrazellulären Domäne (NIC). NIC wird von der Membran freigesetzt und transloziert aufgrund der Kernlokalisations-Signale in den Kern, wo es CSL/RBPJ- κ binden kann. Diese Bindung verdrängt den Ko-Repressorkomplex und induziert die Rekrutierung eines Ko-Aktivator-Komplexes, der aus Ko-Aktivatoren wie MAML Proteinen und der Histon-Acetyltransferase PCAF besteht, die mit CBP/p300 interagieren. SKIP dient auch hier als Brückenprotein. Dieser Ko-Aktivator-Komplex induziert die Transkription von Notch-Zielgenen. (modifiziert aus (Kohlhof 2006)).

Zu den Notch Zielgenen gehören unter anderen die Helix-Loop-Helix Transkriptionsfaktoren HES-1 und HES-5, die eine Rolle bei der Differenzierungsregulierung spielen (Ohtsuka et al. 1999; Davis and Turner 2001), und der Zellzyklusregulator Cdkn1a (Rangarajan et al. 2001) und CD21 (Strobl et al. 2000).

2.2 Indirekte, epigenetische Genregulation durch Histon-Methylierung

Histone sind kleine basische Proteine, um die die DNA im Zellkern gewickelt ist. Durch diese Kompaktierung wird die Unterbringung des DNA-Stranges im Zellkern ermöglicht, und die Zugänglichkeit von Genen und regulatorischen Elementen gesteuert. Zusätzlich wird die Genexpression durch posttranslationale Modifikationen der Histone auf epigenetische Weise reguliert. Diese Modifikationen werden durch spezifische Enzyme ausgeführt.

2.2.1 Chromatin und Histone

In den Kernen eukaryotischer Zellen lagert sich die Desoxyribonukleinsäure (DNA) mit Histonen und Nicht-Histon-Proteinen in einem komplexen Gebilde zusammen. Die gute Anfärbeeigenschaft dieser Protein-DNA-Komplexe führte zu deren Bezeichnung als „farbkörperchen“ oder Chromosomen (griechisch chroma, Farbe und soma, Körper). Das Chromatin weist trotz seiner hohen Packungsdichte dynamische Eigenschaften auf.

Die humane DNA besitzt ca. 3×10^9 Basenpaare, welche im Zellkern jeder somatischen Zelle untergebracht werden müssen. Der negativ geladenen DNA lagert sich ein stark basisch geladener Histon-Protein-Komplex an. Dieser besteht aus je zwei H2A-, H2B-, H3- und H4-Histonproteinen, den sog. Core-Histonen. Die DNA ist auf einer Länge von ca. 146 Basenpaaren mit zwei linksgängigen, superhelikalen Windungen um dieses Histonoktamer gewunden (siehe Abb. 2.3.1). Diese aus Histonproteinkomplex und DNA bestehende Einheit stellt das kleinste sich wiederholende Verpackungselement des Chromatins dar und wird als Nukleosom (alternativ auch „Core-Partikel“) bezeichnet. Ein weiteres Protein der Histon-Familie ist Histon H1, das kein Teil des Histonoktamers ist, sondern an der Ein- und Austrittsstelle auf der aufgewickelten DNA an das Nukleosom bindet und dadurch die Interaktion des oktameren Komplexes mit der DNA stabilisiert (Kornberg 1974).

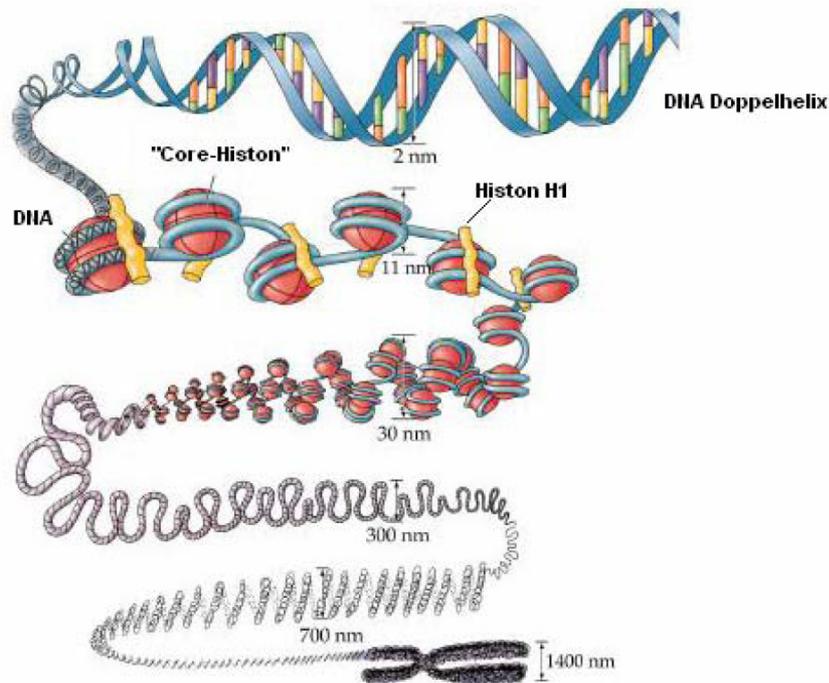


Abb. 2.3.1: Darstellung der Packungsdichten des DNA-Histonkomplexes.

(Abb. aus (Cooper and Hausman 2006))

Die Histone des Chromatins sind hoch konservierte Proteine: Auch in entfernt verwandten Spezies unterscheiden sie sich nur um wenige Aminosäuren. Die hohe Konservierung legt nahe, dass die Histone im Nukleus eine essenzielle Aufgabe übernehmen. Die Core-Histonproteine H2A, H2B, H3 und H4 haben ein Molekulargewicht zwischen 11 kDa (H4) und 15 kDa (H3), während Histon H1 mit 19-23 kDa das größte Histon darstellt. Alle Histone sind stark basisch und deshalb bei physiologischen Salzkonzentrationen und pH-Werten positiv geladene Moleküle. Der Grund hierfür liegt an dem hohen Anteil basischer Aminosäuren: so weist z.B. H4 einen Arginingehalt von 15 % auf. Über diese positiven Ladungen interagieren Histone mit dem negativ geladenen Ribose-Phosphat-„Rückgrat“ der DNA-Doppelhelix, wodurch es zur Ausbildung der Nukleosomen kommt. Dabei berühren die kleinen Furchen der DNA-Doppelhelix ca. alle 10 bp das Histonoktamer z.B. an den positiv geladenen Arginin-Seitenketten. Die großen Furchen sind dem Nukleosomen-Core abgewandt und zeigen nach außen, wodurch diese mit sequenzspezifischen Regulatorproteinen interagieren können. Ist der Zusammenbau von Histonen und DNA zu einer Nukleosomenkette erfolgt, kann die Struktur dieser kleinsten funktionalen Einheiten des Chromatins auf drei verschiedene Arten verändert werden:

1. Die Position eines Nukleosoms kann durch sog. Remodeling-Komplexe unter Energieaufwand (in Form einer Hydrolyse von ATP) verändert werden. Diese Aktivität spielt eine wichtige Rolle bei DNA-gebundenen Prozessen wie der Transkription. Durch Nukleosomen-„Verschiebung“ wird die vorher nukleosomal verpackte DNA für Enzyme der Transkriptionsmaschinerie zugänglich gemacht und somit die Transkription aktiviert. Außerdem ist die Wiederherstellung der regelmäßigen Anordnung der Nukleosomen nach der Replikation nur durch die Remodeling-Aktivität der Histon-Chaperone möglich (Übersichtsartikel (Langst and Becker 2001; Becker and Horz 2002; Langst and Becker 2004).
2. Eine weitere strukturelle Veränderung erfolgt durch den replikationsunabhängigen Einbau von speziellen Histon-Varianten in Nukleosomen. Sie ersetzen die regulären Core-Histone, und markieren damit bestimmte Chromatinabschnitte, zum Beispiel im Bereich geschädigter DNA (Henikoff et al. 2004).
3. Die Aminotermini der Histone bereits assemblierter Nukleosomen, die reich an Lysinen und Argininen sind und aus dem „Core“ herausragen, sind Ziel zahlreicher posttranslationaler Modifikationen, die im folgenden Abschnitt näher erläutert werden. Die daraus resultierende Veränderung der Nettoladung oder der dreidimensionalen Struktur der Histone beeinflusst den Verpackungsgrad des Chromatins, was letztendlich einen Einfluss auf die Gen-Regulation hat.

2.2.2 Posttranslationale Histon-Modifikationen

Zahlreiche Proteine werden über die kovalente Anheftung niedermolekularer Gruppen posttranslational modifiziert. Zu diesen Modifikationen gehören unter anderem die Acetylierung, die Glykosylierung, die Phosphorylierung, die ADP-Ribosylierung, und die Methylierung. Eine andere Klasse von Modifikationen beinhaltet die Anheftung kleiner Proteine wie Ubiquitin oder verwandter Proteine. Modifikationen können die Interaktion des betroffenen Proteins mit anderen Proteinen oder dessen Bindung an Nukleinsäuren verändern, oder nehmen Einfluss auf die Lokalisation bzw. Aktivität des Proteins. So sind zum Beispiel Zuckerketten für die spezifische Erkennung von Zelloberflächen verantwortlich, Phosphatgruppen spielen für die Übertragung von Signalen in der Zelle eine wesentliche Rolle, und Acetylgruppen regulieren unter anderem die Lebensdauer eines Proteins sowie die Transkription von bestimmten Genen. Somit stehen der

eukaryotischen Zelle eine Vielzahl von Möglichkeiten zur Verfügung, die begrenzte Anzahl an Genprodukten über die Expressionskontrolle hinaus zu regulieren und deren Funktion zu beeinflussen. Einige der an Histonen vorkommende Modifikationen und ihre physiologischen Funktionen werden in den folgenden Abschnitten beschrieben.

2.2.2.1 Acetylierung

Die Acetylierung von Histonen wurde vor mehr als 30 Jahren erstmals beschrieben und zählt zu den am besten verstandenen Histon-Modifikationen (Übersichtsartikel: (Kouzarides 2000). Dabei wird der Acetylrest von AcetylCoA von einer Histon-Acetyltransferase (HAT) auf die ϵ -Aminogruppen konservierter Lysinreste übertragen (Johnson and Turner 1999). Die Acetylgruppen können durch Histon-Deacetylasen (HDACs) wieder entfernt werden (Hydrolyse). Durch die aufeinander abgestimmte Aktivität von HATs und HDACs stellt sich ein spezifischer Acetylierungsgrad ein, der im Zusammenspiel mit anderen posttranslationalen Modifikationen eine Modulation der Genexpression ermöglicht (Turner 2002; Kurdistani and Grunstein 2003). So sind z.B. dekondensierte Bereiche des Chromatins (Euchromatin) stärker an den Histonen acetyliert und werden im weitaus höheren Maße transkribiert als die stark kondensierten Chromatinregionen (Heterochromatin), die für die Transkriptionsmaschinerie nicht zugänglich sind (Brown 1966; Hebbes et al. 1988).

2.2.2.2 Phosphorylierung

Alle Histone können auch phosphoryliert werden, wobei diese Modifikation an Serinen erfolgt. Insbesondere sei hierbei auf die Phosphorylierung von Serin 10 in Histon H3 hingewiesen, da diese Modifikation zellzyklusabhängig ist und bisher am besten untersucht wurde (Nowak and Corces 2004). Die H3-S10-Phosphorylierung ist in Eukaryoten ein konservierter Marker für die Mitose. Ab der Prophase bis zur Metaphase nimmt die Menge an S10-phosphoryliertem H3 zu, um dann zur Telophase hin wieder abzunehmen (Gurley et al. 1978). Mittlerweile konnte auch gezeigt werden, dass diese Phosphorylierung für die korrekte Durchführung der Chromosomenkondensation und -segregation in der

Mitose und der Meiose von Bedeutung ist (Wei et al. 1998; Hans and Dimitrov 2001).

Zudem gibt es Hinweise, dass dieselbe Modifikation auch mit der Transkriptionsaktivierung in Eukaryoten zusammenhängt (Nowak and Corces 2004). Der Anteil phosphorylierter H3-Histone in zuvor ruhenden Zellen steigt nach Stimulation mit Wachstumsfaktoren sprunghaft an (Mahadevan et al. 1991).

Eine zur Formulierung der Hypothese des „Histon-Codes“ führende Beobachtung (Jenuwein and Allis 2001) ist die gegenseitige Inhibition der Phosphorylierung von Serin 10 und der Methylierung von Lysin 9 am Histon H3. Diese *in vitro* Ergebnisse wurden durch die Doppel-Null-Mutation von *su(var)3-9* in embryonalen Maus-Fibroblasten untermauert, die vermehrt an Serin 10 in H3 phosphoryliert waren (Rea et al. 2000). Dagegen wird die Acetylierung von H3 Lysin 14 durch die Phosphorylierung von H3 Serin 10 gefördert (Lo et al. 2000).

2.2.2.3 Ubiquitinierung

Die Ubiquitinierung, bei der das stark konservierte, 76 Aminosäuren große Polypeptid Ubiquitin (8,5 kDa) kovalent an die Histone angeheftet wird, konnte bis auf H4 bei allen Histonproteinen nachgewiesen werden. Über die Bedeutung dieser Histon-Modifikation ist allerdings noch nicht sehr viel bekannt. Im Allgemeinen werden Proteine durch mehrfache Ubiquitinierung für den proteasomalen Abbau markiert; die Anheftung nur eines einzelnen Ubiquitins führt dagegen nicht zu einem verstärkten Abbau des modifizierten Proteins. Es liegt nahe, daß die Mono-Ubiquitinierung daher andere Funktionen erfüllt als die Poly-Ubiquitinierung. So konnte die Mono-Ubiquitinierung von H2B in Versuchen mit Tetrahymena tatsächlich mit Transkriptionsaktivierung in Verbindung gebracht werden (Davie et al. 1991). Im Sinne eines Histon-Codes (Jenuwein and Allis 2001), scheint die Ubiquitinierung von H2B an Lysin 123 in Hefen für die Methylierung von H3 Lysin 4 durch die Histon-Methyltransferase (HMTase) Set1 Voraussetzung zu sein (Sun and Allis 2002).

2.2.2.4 ADP-Ribosylierung

Die ADP-Ribosylierung von Histonen ist bisher vor allem mit den Prozessen des Alterns, der DNA-Krümmung und der Transkriptionsaktivierung in Verbindung gebracht worden. Dass die Histon-ADP-Ribosylierung die Transkription beeinflussen könnte, zeigen Parallelen zur Histon-Acetylierung. Insbesondere kann die Acetylierung von Histon H4 mit einer gesteigerten transkriptionellen Aktivität assoziiert sein. Steigt die H4-Acetylierung an, so nimmt auch die ADP-Ribosylierung am H4-Molekül zu (Golderer and Grobner 1991). An den aminoterminalen Argininen von Histonen können bis zu 100 Moleküle negativ geladener ADP-Ribose angelagert werden (Jacobson and Jacobson 1999). Es kommt durch die Neutralisierung der positiv geladenen Histon-Enden zu einer Verminderung der Affinität zur negativ geladenen DNA und zu einer Auflockerung der Nukleosomen-Struktur. Dies könnte letztendlich den Zugang von Transkriptionsfaktoren zur DNA erleichtern (de Murcia et al. 1988). Die im Alter beobachtete, reduzierte Histon-ADP-Ribosylierung könnte in einer altersentsprechenden, reduzierten Transkriptionsrate der Zellen begründet sein (Mishra and Das 1992). Die ADP-Ribosylierung wurde außerdem mit zellulären Prozessen wie der DNA-Reparatur, der Apoptose und der Genomstabilität in Verbindung gebracht (Chiarugi 2002). Das einzige bisher identifizierte ADP-ribosylierende Enzym PARP1 (Poly-ADP-Ribose-Polymerase 1) wird durch DNA-Doppelstrangbrüche aktiviert, und führt zu einer lokalen Anhäufung ADP-ribosylierter Histone in diesem Bereich (de Murcia et al. 1988).

2.2.2.5 Methylierung

Die Methylierung von Histonen stellt eine komplexere Modifikation dar als die in den vorigen Abschnitten erläuterten posttranslationalen Modifikationen. Die Methylierung kann in unterschiedlichen Graden sowohl an Argininen als auch Lysinen auftreten, wobei je nach Modifikationsstelle die Transkription gesteigert oder vermindert wird. Lysin kann mono-, di-, oder trimethyliert werden, beim Arginin verläuft die Methylierung zum Mono- oder Dimethylarginin. Bislang sind 24 Lysin- bzw. Arginin-Methylierungsstellen für die Core-Histone beschrieben. Zusammen mit der Tatsache, dass unterschiedliche Methylierungsstufen

auftreten können, ergibt sich ein enormes kombinatorisches Potenzial („Histon-Code“), das von der Zelle offenbar für Regulationsmechanismen verwendet wird.

2.2.3 Methylierung von Argininresten in Proteinen

Die Methylierung von Argininresten in Proteinen wurde vor über 40 Jahren an Proteinextrakten aus Kalbsthymus beschrieben (Paik and Kim 1967). Bis heute konnten zahlreiche Protein-Arginin-Methyltransferasen (PRMTs) in eukaryotischen Organismen wie Hefe, *Drosophila melanogaster* und in Säugetieren identifiziert werden (Gary and Clarke 1998; McBride and Silver 2001; Boulanger et al. 2004; Miranda et al. 2006). Zudem wurden durch Genom-Sequenzierungsprojekte PRMT-Gene in *Danio rerio* (Hung and Li 2004), *Xenopus*, *C. elegans* und *Arabidopsis* gefunden. In Säugetierzellen wurden bislang elf PRMT-Gene identifiziert, die starke Homologien untereinander aufweisen und für PRMT1, PRMT2, PRMT3, CARM1/PRMT4, PRMT5/JBP1, PRMT6, PRMT7, PRMT8, PRMT9/FBXO11, PRMT10 und PRMT11 kodieren (Abramovich et al. 1997; Katsanis et al. 1997; Tang et al. 1998; Chen et al. 1999; Pollack et al. 1999; Frankel et al. 2002; Miranda et al. 2004; Lee et al. 2005b; Lee et al. 2005c; Cook et al. 2006; Krause et al. 2007). Nach dem Endprodukt der enzymatischen Reaktion werden zwei Typen von PRMTs unterschieden: Typ I und Typ II PRMTs. Beide katalysieren zuerst die Übertragung einer Methylgruppe von S-Adenosylmethionin (AdoMet) auf eine Guanidinogruppe von Arginin in bestimmten Proteinsubstraten, wodurch monomethyliertes Arginin (MMA) und freies S-Adenosylhomocystein (AdoHcy) entstehen (siehe Abbildung 2.3.2). Die beiden Enzymtypen unterscheiden sich in der folgenden Reaktion, die zur Bildung von zweifach methyliertem Arginin führt. Typ-I-PRMTs übertragen zwei Methylreste auf das gleiche Stickstoffatom der Guanidinogruppe, und bilden so ein „asymmetrisches“ Dimethylarginin (aDMA); Methyltransferasen von Typ II übertragen je eine Methylgruppe auf beide endständigen Stickstoffatome, so dass ein „symmetrisches“ Dimethylarginin (sDMA) entsteht. PRMT5, PRMT7 und PRMT9 sind die einzigen bekannten Methyltransferasen vom Typ II, alle anderen PRMT-Familienmitglieder gehören dem Typ I an.

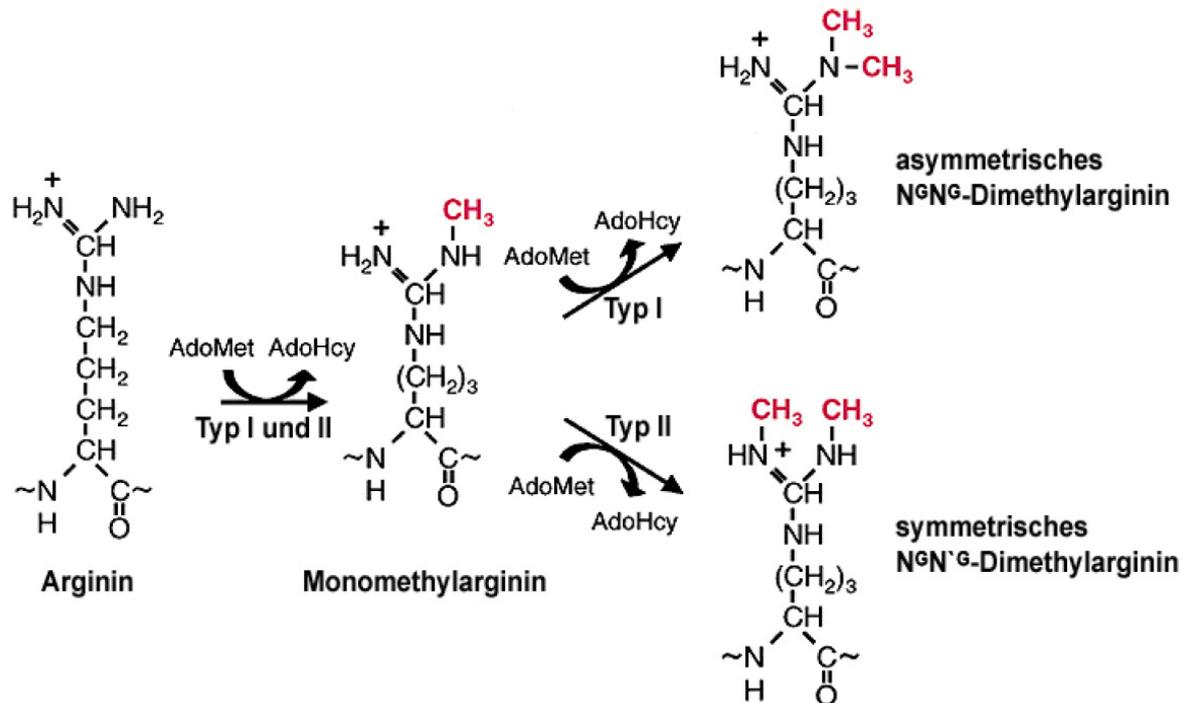


Abb. 2.3.2: Schematische Darstellung der Arginin-Methylierung.

Im ersten Schritt wird von den 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 and Silver 2001).

In den letzten Jahren wurden zahlreiche Proteinsubstrate der PRMTs identifiziert (Bedford and Richard 2005). Der größte Teil dieser Proteine wird 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.

2.2.4 Struktur der Protein-Arginin-Methyltransferasen

Die elf humanen PRMTs variieren in ihrer Länge zwischen 361 (PRMT1) und 843 Aminosäuren (PRMT9). Allen gemeinsam ist eine hochkonservierte Kernregion, in der die Methyltransferaseaktivität lokalisiert ist. Dort befindet sich auch die Signaturmotive I, post-I, II und III der S-Adenosylmethionin-(AdoMet)-abhängigen Methyltransferasen. Die PRMT-typische, aber in ihrer Funktion nicht aufgeklärte THW-Schleife liegt am carboxyterminalen Ende der Kernregion. Die größten

Sequenzunterschiede zwischen den einzelnen PRMT-Familienmitgliedern liegen im N-terminalen Abschnitt. Hier findet sich bei PRMT2 eine SH3-Domäne, die möglicherweise die Substratspezifität steuert (Kouzarides 2002), bei PRMT3 eine Zinkfingerstruktur, bei PRMT6 eine Kernlokalisationssequenz (NLS), und bei PRMT8 ein Myristoyl-Anker, der das Enzym in der Plasmamembran verankert (siehe Abb. 2.3.3). Von humaner PRMT1 sind zudem 4 alternative Spleißformen bekannt, die in der Länge des N-Terminus variieren (Goulet et al. 2007). PRMT7 ist bemerkenswert, weil es offenbar durch Genduplikation entstanden ist, und daher eine Duplizierung aller PRMT-typischen Sequenzmotive aufweist. Durch Kristallstrukturanalysen der enzymatischen Kerne von PRMT1, PRMT3 (beide aus Ratte) und Hmt1 (aus Hefe) konnten interessante Einblicke in die Funktionen der konservierten Regionen gewonnen werden (Weiss et al. 2000; Zhang et al. 2000; Zhang and Cheng 2003). Die C-terminale Hälfte der Kernregion formt nach diesen Erkenntnissen eine β -Fass-Domäne, die sich auf die S-Adenosylmethionin-Bindestelle im N-Terminus zurückfaltet. Das aktive Zentrum und die Bindestelle für Substratproteine befinden sich in der Spalte zwischen diesen beiden Domänen. In den kristallografischen Untersuchungen von PRMT1, 3 und Hmt1 konnte außerdem eine identische Dimerisierungsdomäne identifiziert werden, die für die enzymatische Aktivität der PRMTs notwendig ist. Sowohl die Mutation von Aminosäuren in der Dimerisierungsdomäne von Hmt1, als auch die Deletion dieses Bereichs in PRMT1 (AS 188-222) führten zu einer vollständigen enzymatischen Inaktivierung der Methyltransferasen (Weiss et al. 2000; Zhang and Cheng 2003). Durch die Dimerisierung entsteht eine ringförmige Struktur, bei der sich die aktiven Zentren der beiden Monomere in räumlicher Nähe zueinander befinden. Die Ausbildung einer solchen Struktur ist möglicherweise notwendig, damit der Methyl donor S-Adenosylmethionin korrekt gebunden werden kann, und könnte die Herstellung des Endprodukts Dimethylarginin in nur einem Substratbindungs-Schritt erleichtern. Fast alle PRMTs neigen neben der Dimerisierung auch zur Bildung größerer homo-oligomerer Komplexe, die für die Aktivität in vivo notwendig zu sein scheinen. So bilden Hmt1 und PRMT1 mindestens Hexamere, und PRMT5 aggregiert in hochmolekularen Komplexen, die aus zahlreichen Untereinheiten bestehen (Tang et al. 1998; Weiss et al. 2000; Rho et al. 2001). Diese Multimerisierung von PRMT1 und PRMT5 scheint essenziell für die

enzymatische Aktivität der beiden Proteine zu sein (Lim et al. 2005). In vivo-Mobilitätsmessungen und ex-vivo Messungen mit Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie unseres Labors konnten zeigen, daß PRMT2 ein stabiles Dimer und PRMT3 ein stabiles Tetramer bildet, während PRMT6 und PRMT7 sich wie Monomere verhalten. PRMT1 und PRMT4 lagen bei diesen Messungen in großen Komplexen vor (Herrmann et al. 2009).

Die Funktionen der unterschiedlichen N- und C-Termini von PRMTs konnten bislang noch nicht vollständig geklärt werden. Es wird aber angenommen, dass sie eine wichtige Rolle bei der spezifischen Regulation der individuellen PRMTs spielen. So beeinträchtigte die Deletion des N-Terminus von Hmt1 (*Hefe*) die Stabilität des Hexamers und verminderte damit die enzymatische Aktivität (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, die den Zinkfinger enthält, führte ebenfalls zu einer Abnahme der enzymatischen Aktivität und beeinträchtigt möglicherweise die Erkennung von Substratproteinen (Tang et al. 1998; Frankel and 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).

Trotz der stark konservierten Methyltransferasedomäne besitzen alle PRMTs eine eigene, typische Substratspezifität (Zhang et al. 2000; Stallcup 2001). Der exakte Mechanismus der Substraterkennung von PRMTs ist trotz kristallografischer Studien noch nicht gut verstanden. Die Kristallstrukturanalysen von Hmt1, PRMT1 und PRMT3 zeigten allerdings, dass sich auf der Oberfläche der Methyltransferasen ein lange, mäandrierende Furche befindet. Möglicherweise liegen dort mehrere Bindestellen für verschiedene Konsensussequenzen der Substratproteine. Dies könnte die relaxierte Spezifität der PRMTs erklären, das heißt wie ein einzelnes Enzym mehrere Substrate mit variierenden Konsensussequenzen erkennen kann (Zhang and Cheng 2003). Weitere Hinweise geben Untersuchungen, bei denen die bevorzugten Methylierungsstellen auf Substratproteinen kartiert wurden. Dabei zeigte sich, dass die meisten Typ-I-Enzyme bevorzugt Argininreste methylieren, die in Glycin-Arginin-reichen (GAR)

Bereichen mit der Aminosäuresequenz RGG, RXR oder GRG vorliegen (Najbauer et al. 1993; Clark et al. 1997; Smith et al. 1999). Dieses Sequenzmotiv findet sich besonders häufig bei RNA-bindenden Proteinen wie z.B. den hnRNP-Proteinen (Kiledjian and Dreyfuss 1992). CARM1/PRMT4 methyliert keine Arginine in GAR-Sequenzen, und besitzt eine höhere Substratspezifität als die anderen Typ-I-PRMTs. Bislang konnte jedoch kein Sequenzmotiv identifiziert werden, welches von CARM1/PRMT4 bevorzugt methyliert wird (Lee and Bedford 2002). Die Typ-II-Methyltransferasen PRMT5 und PRMT7 methylieren sowohl isolierte Argininreste als auch Argininreste in Gly-Ala-Arg-Sequenzen (Lee et al. 2005c).

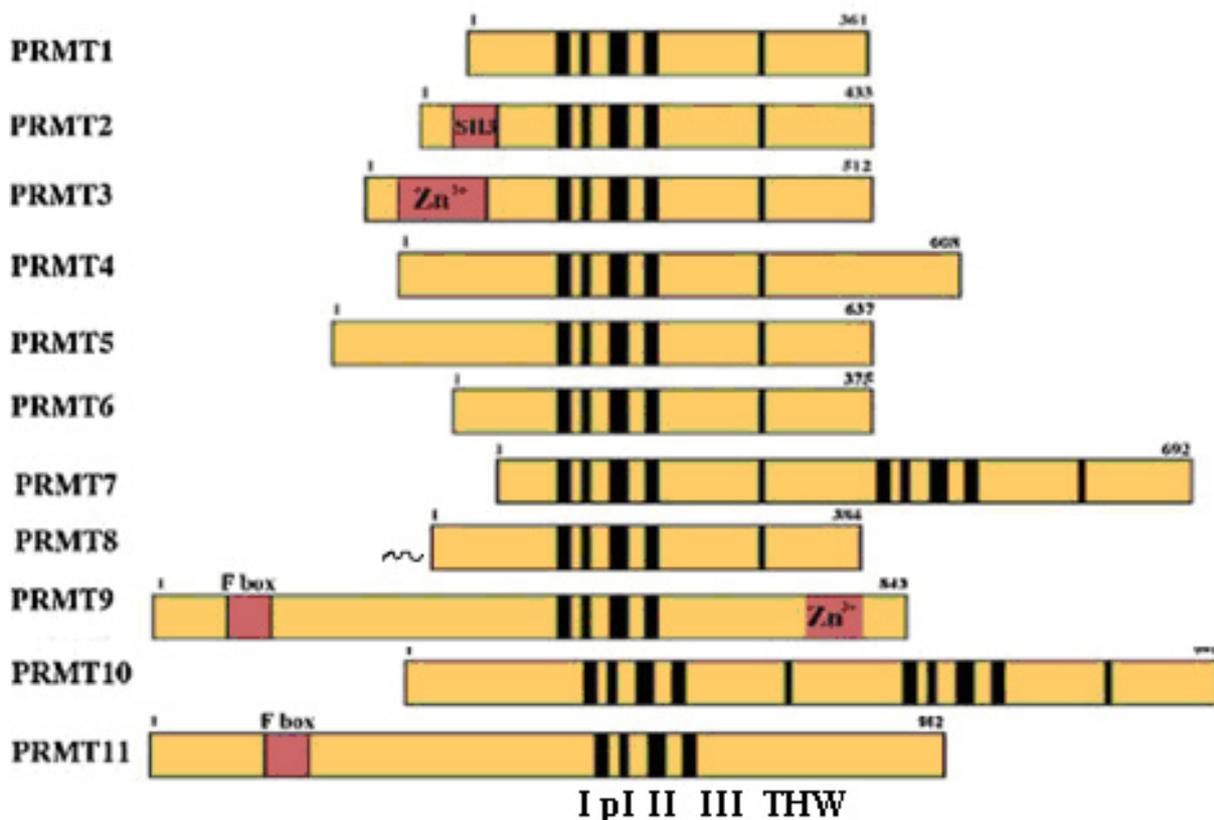


Abb.2.3.3: Familie der Protein-Arginin-Methyltransferasen.

Schematische Darstellung der elf bekannten Protein-Arginin-Methyltransferasen (PRMTs). Farblich hervorgehoben sind die konservierten Signaturmotive I, post I, II und III (schwarz), sowie die PRMT-spezifische THW-Schleife (rot). PRMT2, PRMT3, PRMT9 und PRMT11 besitzen zudem eine aminoterminal SH3- bzw. eine Zinkfinger-Domäne und/oder eine F-Box. Am aminoterminalen Ende von PRMT6 befindet sich eine Kernlokalisationssequenz (NLS). Die membranassoziierte Lokalisation von PRMT8 wird durch eine aminoterminal Myristoylierung des Proteins vermittelt (~). Die Länge der jeweiligen Proteine ist am carboxyterminalen Ende in Aminosäuren angegeben (modifiziert nach (Pal and Sif 2007)).

2.2.5 Regulation der Transkription durch Arginin-Methylierung

Die funktionelle Bedeutung der Arginin-Methylierung für die Zelle ist bis heute noch nicht ausreichend verstanden. Die verfügbaren Daten legen nahe, dass die Arginin-Methylierung sich sowohl auf Prozesse im Zellkern als auch im Zytoplasma auswirkt. So wurden in den letzten Jahren zahlreiche Substrate der PRMTs identifiziert, die an verschiedenen zellulären Prozessen wie z.B. RNA-Prozessierung, transkriptionelle Regulation, Ribosomenbiosynthese, Reparatur von DNA-Schäden, aber auch bei der Signaltransduktion oder bei Differenzierungsvorgängen beteiligt sind.

Wie in den vorangegangenen Kapiteln beschrieben, stehen posttranslationale Modifikationen von Histonen in engem Zusammenhang mit der Aktivierung und der Repression von Transkriptionsvorgängen. Mindestens drei Mitglieder der PRMT-Familie sind an dieser Steuerung von Transkriptionsvorgängen beteiligt, wie z.B. der Kernrezeptor-abhängigen Regulation: PRMT1 methyliert spezifisch das Histon H4 an Arginin 3 *in vivo*, während CARM1/PRMT4 Histon H3 an Arginin 2, -7 und -26 *in vitro* methyliert. Es wurde ebenfalls berichtet, dass eine Arginin 3 H4-Methylierung eine nachfolgende Acetylierung von H4 verstärkt (Wang et al. 2001). Damit ist die Arginin-Methylierung offenbar in Regulationsmechanismen über den „Histon-Code“ eingebunden. Mit dem hSWI/SNF-Repressor-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. Die Arginin-Methylierung repräsentiert damit ähnlich wie die Histon-(De)-Acetylierung eine Histon-Modifikation, die zu einer Aktivierung bzw. Repression der Transkription führen kann (Übersichtsartikel (Lee et al. 2005a).

Weitere nukleäre Protein mit direkten Bezug zur Genexpression sind die „High-mobility group“ (HMG)-Proteine, die an der Modulation der Chromatinstruktur beteiligt und wichtige Rollen bei verschiedenen entwicklungsbiologischen Mechanismen spielen. Die Proteine der HMGA-Unterfamilie verfügen über je drei hochkonservierte DNA-bindende Domänen, die sogenannten „AT-Hooks“, mit denen sie in die schmale Furche AT-reicher DNA binden. Außerdem vermittelt dieser Bereich auch Interaktionen mit Transkriptionsfaktoren wie NF- κ B oder ATF-2. Die AT-Hooks von HMGA1a enthalten zahlreiche RG-Sequenzen mit

methylierten Argininen (Edberg et al. 2004), wobei das Methylierungsmuster und der Methylierungsgrad dieser Bereiche offenbar in unterschiedlichen Zelllinien variiert. Die Methylierung dieser „AT-Hooks“ durch PRMT6 (Miranda et al. 2005) könnte zur Modulation von Protein-DNA- oder Protein-Protein-Wechselwirkungen beitragen. Zudem konnte in apoptotischen Zellen eine deutliche Zunahme der Arginin-Methylierung von HMGA1a beobachtet werden.

Verschiedene Untersuchungen legen nahe, daß Transkriptionsfaktoren wie NFκB, p53, und YY1 die PRMTs an die Promotorregionen spezifischer Gene rekrutieren (Rezai-Zadeh et al. 2003; An et al. 2004; Covic et al. 2005), wo sie regulative Aufgaben bei der Transkription erfüllen (siehe Abb. 2.3.4). So wurde die *in vivo*-Methylierung von Argininresten im Promotor 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 PRMT1 und PRMT5 den Elongationsfaktor SPT5 binden und methylieren, was dessen promotorspezifische Bindungseigenschaften verändert und die Elongation der Transkription beeinträchtigt (Kwak et al. 2003) (siehe Abb. 2.3.4).

Die Arginin-Methylierung scheint auch an der Regulation der Expression von viralen Genen beteiligt zu sein. So führt die PRMT6-katalysierte Methylierung des HIV-Transaktivatorproteins TAT zu einer Verminderung TAT-abhängiger Transkription. Zudem konnte bei verminderter Expression von PRMT6 eine erhöhte HIV-Replikation beobachtet werden (Boulanger et al. 2005).

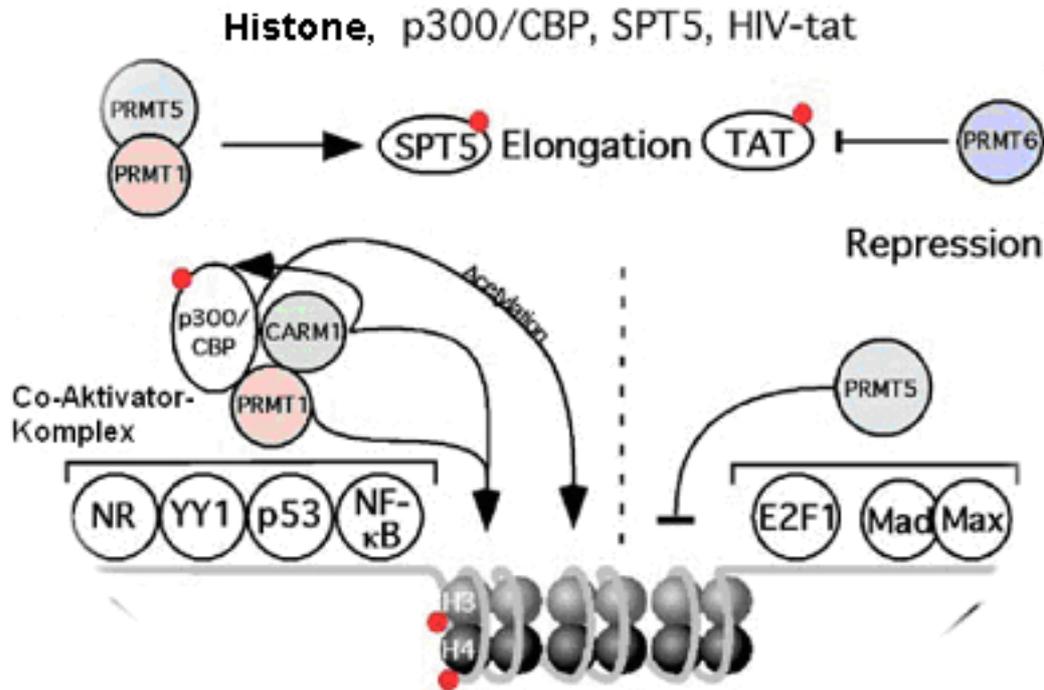


Abb. 2.3.4: Regulierung der Transkription durch Arginin-Methylierung.

Die methylierten Proteine sind mit einem roten Punkt markiert (modifiziert aus (Bedford and Richard 2005)).

2.2.6 Regulation der Arginin-Methyltransferasen

Im Jahr 2004 wurde in zwei parallel veröffentlichten Publikationen gezeigt, dass die Arginin-Methylierung von Histonen durch Peptidyl-Arginin-Deiminase-4 (PAD4) rückgängig gemacht werden kann (Cuthbert et al. 2004; Wang et al. 2004). Bei dieser Reaktion werden sowohl unmodifiziertes als auch monomethyliertes, nicht aber dimethyliertes Arginin durch Abspaltung eines Guanidino-Stickstoffs (Desiminierung) irreversibel in die nicht-proteinogene Aminosäure Citrullin umgewandelt. Da bislang noch keine Aminotransferase identifiziert wurde, die eine Rückumwandlung in Arginin katalysiert, ist die funktionelle Bedeutung der Desiminierung von (methylierten) Argininresten noch unklar. Neuere Arbeiten zeigten, daß auch eine Gruppe von Enzymen, die eine sogenannte Jumonji-Domäne enthalten, in der Revertierung der Arginin-Methylierung eine Rolle spielen. Diese Proteine wurden ursprünglich als Lysin-Demethylasen beschrieben, können aber offenbar auch monomethylierte Arginin-Reste demethylieren (Chang et al. 2007). Von JMJD6 wurde direkt gezeigt, daß es in Histonen Argininreste aus methyliertem Arginin regenerieren kann. Weitere Untersuchungen werden zeigen müssen, ob es JMJD-Protein gibt, die auch di-

methylierte Argininreste demethylieren können, und welche physiologischen Rollen diese Enzyme spielen.

Neben der (nachträglichen) Demethylierung müssen in der Zelle noch andere Mechanismen vorhanden sein, die eine Regulation der Methylierungsreaktion erlauben. So könnte die Aktivität von PRMTs selbst durch posttranslationale Modifikationen, Protein-Protein Interaktionen oder Regulation der Substrat-Zugänglichkeit kontrolliert werden. Tatsächlich besitzt PRMT6 eine Automethylierungsaktivität (Frankel et al. 2002), und im Lauf der vorliegenden Arbeit konnte erstmalig auch eine derartige Aktivität für PRMT4 gezeigt werden. Offenbar spielt auch die Homo-Multimerisierung einiger PRMTs eine regulatorische Rolle für deren enzymatische Aktivität (Weiss et al. 2000; Zhang and Cheng 2003). So ist gezeigt worden, daß PRMT4 durch eine Phosphorylierung im Bereich der Dimerisierungsdomäne während der Mitose inaktiviert wird, indem die für die Aktivität notwendigen Komplexe dissoziieren (Higashimoto et al. 2007).

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 zytoplasmatischen und zwei nukleären Komplexen gebunden vor. Als Komponente des „Methylosoms“ methyliert PRMT5 Sm-Proteine und spielt eine Rolle bei der Herstellung der snRNP-Partikel (Friesen et al. 2001). Im Zellkern führt die Bindung von PRMT5 an den Chromatin-Remodelling-Komplex hSWI/SNF zu einer verstärkten Methyltransferase-Aktivität des Enzyms (Pal et al. 2004).

2.2.7 Protein-Arginin-Methyltransferase 1 und 4

Die Untersuchungen dieser Arbeit fokussieren primär auf PRMT1 und PRMT4, die im Folgenden näher beschrieben werden. PRMT1 wurde 1996 in einem „yeast-two-hybrid“ Experiment als 40,5 kDa Polypeptid identifiziert, das mit TIS21 („Tetradecanoyl phorbol acetate-inducible sequence 21“) und BTG1 interagiert, zwei Mitgliedern einer Genfamilie die in der Signaltransduktion eine Rolle spielen

(Lin et al. 1996). Durch alternatives Spleißen des auf Chromosom 19q liegenden PRMT1-Gens, werden verschiedene Isoformen von PRMT1 exprimiert, die alle katalytisch aktiv sind, sich aber in ihrer N-terminalen Region unterscheiden. Die Expression der Spleißvarianten variiert zwischen verschiedenen Geweben (Goulet et al. 2007). PRMT1 wird ubiquitär exprimiert und ist in Säugerzellen für den Hauptanteil der Arginin-Methylierung verantwortlich (Scorilas et al. 2000; Tang et al. 2000). Für die Methyltransferaseaktivität von PRMT1 ist mindestens eine Dimerbildung notwendig (Zhang and Cheng 2003), starke Aktivität findet sich aber erst bei größeren multimeren Komplexen (Lim et al. 2005).

PRMT4 wurde ebenfalls über ein yeast-two-hybrid-Experiment gefunden. Chen et al. suchten dabei nach Proteinen, die an die Aktivierungsdomäne 2 des p160 Co-Aktivators binden. Daher trägt PRMT4 alternativ den Namen CARM1 („Coactivator-associated arginine methyltransferase 1“) und wird häufig mit dem Doppelnamen CARM1/PRMT4 genannt (Chen et al. 1999).

Interessanterweise ist für PRMT4 neben der Funktion als Co-Aktivator auch eine Co-Repressor-Aktivität beschrieben worden (Xu et al. 2001). Von PRMT4 methyliertes CBP kann nicht länger an den Transkriptionsfaktor CREB binden, was eine Repression CREB-regulierter Gene zur Folge hat. Wie PRMT1 wird auch PRMT4 alternativ gespleißt. Die resultierenden drei Isoformen unterscheiden sich in ihren Funktionen und werden gewebespezifisch exprimiert (Ohkura et al. 2005). Sowohl für PRMT1 als auch für PRMT4 wurden für weiterführende Untersuchungen „knock-out“ Mäuse generiert. Obwohl die embryonalen Stammzellen der PRMT1 „knock-out“ Maus kultiviert werden konnten, starben Embryonen spätestens am Tag 6,5 der Embryonalentwicklung (Pawlak et al. 2000). Die PRMT4 „knock-out“ Mäuse waren in ihrer Entwicklung retardiert und starben perinatal aufgrund eines Lungendefekts (Yadav et al. 2003). Diese Resultate verdeutlichen, dass PRMT1 und PRMT4 essenziell für eine normale Entwicklung der Maus sind, und keine Alternativen für diese beiden Enzyme vorliegen.

2.3 Aktin

Aktin ist ein zentraler, evolutionär sehr stark konservierter Bestandteil des Zytoskeletts, und stellt eines der häufigsten Proteine eukaryotischer Zellen dar. Es ist von Amöben bis zum Menschen universell verbreitet. Straub isolierte 1942 (Straub 1942) monomeres Aktin (auch globuläres Aktin oder G-Aktin genannt) und fand heraus, dass dieses durch Erhöhung der Salzkonzentration (Mg^{2+} , K^+) zu filamentösem Aktin (F-Aktin) polymerisiert. Die Geschwindigkeit dieses reversiblen Prozesses wird zudem sehr stark von ATP beeinflusst. Jedes globuläre Aktinmolekül enthält im allgemeinen ein gebundenes Mg^{2+} -Ion, das mit einem ATP oder ADP komplexiert ist. Elektronenmikroskopische und Röntgenstruktur-Analysen zeigten, daß F-Aktin aus zwei Protofilamenten besteht, welche sich eng umeinander winden und so eine rechtsdrehende Doppelhelix mit einem Durchmesser von 7-9 nm bilden. In dieser Anordnung ist jede G-Aktinuntereinheit von 4 weiteren umgeben (Holmes et al. 1990). Alle Untereinheiten in einem Aktinfilament besitzen die gleiche Polarität. Aus diesem Grund ist die ATP-Bindungstasche der Aktinmonomere nur an einem Ende des Filaments zugänglich, welches als Minus-Ende bezeichnet wird. Dieses Ende des Filaments unterscheidet sich hinsichtlich der Polymerisationskinetik vom 5 bis 10 mal schneller wachsenden Plus-Ende. Ursache dafür sind die unterschiedlichen, „kritischen“ Aktinkonzentrationen, $0,1 \mu M$ für das Plus- bzw. $0,8 \mu M$ für das Minus-Ende, die überschritten werden müssen bevor es zu einer Polymerisation kommt. Durch diese Kinetiken ist das Aktin-Zytoskelett ein sehr dynamisches Gebilde, in dem Filamente sehr rasch wachsen oder verkürzt werden. Die Dynamik des Aktin-Zytoskeletts wird durch den Einfluss Aktin-bindender Proteine reguliert (siehe Abb. 2.4.1), welche die Filamente stabilisieren oder destabilisieren. Dadurch werden einzelne Filamente auch zu Bündeln oder dreidimensionalen Netzwerken verknüpft, oder an der Plasmamembran verankert, und es entstehen hochorganisierte Strukturen wie Stressfasern (längs angeordnete Bündel aus Aktinfilamenten), Filopodien (fingerförmige Zellfortsätze), Lamellipodien (dünne, blattähnliche Zellausläufer) oder „crowns“ (kronenförmige Ausstülpungen an der Zelloberfläche, die z.B. der Phagozytose vorangehen). Andere Aktin-bindende Faktoren fragmentieren bereits bestehende

Filamente, und führen zu einer Rückgewinnung von G-Aktin. Eine erneute Verlängerung oder die Entstehung neuer Filamente aus dem G-Aktin-Reservoir führen zu einer ständigen Umstrukturierung des Aktinnetzwerkes. Das Aktin-Zytoskelett ist maßgeblich beteiligt an der Entwicklung und Aufrechterhaltung der Zellform, an der Zellbewegung und Chemotaxis, am gerichteten intrazellulären Transport von Proteinen und Organellen, an der Zytokinese, der Exo- und Endozytose sowie vielen weiteren Zellfunktionen. Angesichts der ionischen Bedingungen und der Konzentrationen sollte Aktin im Zytosol zu über 99 % in Polymer-Form sein. Tatsächlich liegt in der unstimulierten Zelle jedoch etwa die Hälfte des Aktins in der monomeren Form vor (Eichinger et al. 1999). Dieser Zustand wird durch G-Aktin-bindende Proteine erreicht, welche die Polymerisation zu F-Aktin verhindern, und einen Großteil des zellulären Aktins für einen raschen Umbau des Mikrofilamentsystems bereithalten.

Zusätzlich zu seiner lange bekannten Funktion als Bestandteil des Zytoskeletts spielt Aktin offenbar auch eine wichtige Rolle in nukleären Proteinkomplexen. Nukleäres Aktin ist dabei in mehrere verschiedene Prozesse involviert, die bisher nur zum Teil detailliert untersucht und verstanden sind. Unter anderem wird Aktin für die Transkription durch alle drei RNA Polymerasen benötigt. Des Weiteren assoziiert nukleäres Aktin mit kleinen Ribonucleoproteinen (RNPs), welche eine essenzielle Rolle in der mRNA-Prozessierung spielen (Scheer et al. 1984; Cisterna et al. 2006). Aktin ist auch involviert in den Export von RNA und Proteinen aus dem Zellkern ins Zytoplasma (Hofmann et al. 2001; Van Impe et al. 2003). Weiterhin bildet Aktin Komplexe mit bestimmten heterogenen nukleären Ribonucleoproteinen (hnRNPs), welche an mRNA binden und an denen Prozesse der RNA-Reifung stattfinden, und die an der Struktur des Zellkerns beteiligt sind (Percipalle et al. 2001; Percipalle et al. 2002; Obrdlik et al. 2008). Durch die Assoziierung nukleären Aktins und Aktin-bindender Proteine mit Histon-Acetyl-Transferase-Komplexen wird Aktin eine Rolle im Chromatin-Remodeling zugeschrieben (Shen et al. 2003). Durch diese nukleären Prozesse von Aktin wird vermutet, dass Aktin ein Teil der Regulation der Transkription darstellt.

3. Zielsetzung

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der direkten und indirekten Regulation der Genexpression durch die räumliche Anordnung von Enzymen, deren Aktivität und Komplexbildung. Dafür wurden drei Proteine ausgewählt. Der Rezeptor Notch 1, welcher nach der Ligandenbindung als Transkriptionsaktivator fungiert, wurde als direkter Faktor zur Genregulation gewählt. Dabei soll die räumliche Anordnung und die Mobilität seiner intrazellulären Domäne im Zellkern confocal-mikroskopisch untersucht werden. Als indirekter Faktor zur Genregulierung wurden die Protein-Arginin-Methyltransferasen 1 und 4 gewählt. Diese spielen eine essenzielle Rolle bei der Methylierung der Histone, und damit der epigenetischen Ebene der Genregulation. In diesem Teil der Arbeit soll ebenfalls die räumliche Anordnung der Enzyme in verschiedenen Zelllinien sowie die Aktivität und die Komplexbildung untersucht werden. Als weiteres Protein wurde Aktin gewählt. Aktin ist ein bedeutender Bestandteil des Zytoskeletts, wo es eine wichtige Funktion beim Transport von Proteinen und Proteinkomplexen erfüllt, wurde in den letzten Jahren aber auch mit Prozessen im Zellkern wie Transkriptionsregulation und RNA-Transport in Verbindung gebracht. Da die molekularen Details dieser Funktion von nukleärem Aktin bisher nur unvollständig verstanden sind, soll im Rahmen dieser Arbeit die Komplexbildung und die Polymerisation von Aktin im Zellkern näher untersucht werden.

4. Material und Methoden

4.1 Material

4.1.1 Geräte, Chemikalien und Verbrauchswaren

Geräte

Bakterien-Inkubationsschüttler	Innova, NBS
Bakterienkulturroller	Innova, NBS
Brutschränke	HeraCell, Heraeus, Hanau
Durchflussscytometer	FACSCalibur, BD Biosciences
Elektrophoresekammern	Technische Werkstätten, 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
7500 Fast Real-Time PCR System	Applied Biosystems, Lincoln CA USA
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	Bioruptor, Diagenode, Lüttich
Waagen	BP121S, BP610, Sartorius, Göttingen
Zellkulturmikroskop	Axiovert 25, Zeiss, Jena
Zentrifugen	Super T21, Sorvall, Bad Homburg Speed Vac SPD101B, Savant Modell 5415D, Eppendorf, Hamburg LC-70 Ultrazentrifuge, Beckman Coulter

Chemikalienliste

Acrylamid/Bisacrylamid Rotiphorese 30	Roth
Acetonitril (ACN)	Merck
Adenosin 2'-3'-dialdehyd (Adox)	Sigma
Agar	Difco
Agarose	Sigma
Albumin (perliert, bovin, p.a.)	Roth
Alzianblau 8GS	Fluka

Ammoniumhydrogencarbonat	Merck
Ammoniumpersulfat (APS)	Sigma
Aphidicolin	Sigma
Biotin-16-UTP	Roche
Bradford-Reagenz	Bio-Rad
Bromphenolblau	Roth
BSA (50 mg/ml)	NEB
Cäsiumchlorid	Roth
Coomassie-Brillant Blau R-250	Roth
Cycloheximid	Sigma
Cytochalasin D	Sigma
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Merck
Dithiothreitol (DTT)	Roth
EDTA	Merck
Essigsäure	Merck
Ethanol p.a.	Merck
Ethidiumbromid	Roth
Formaldehyd	Merck
Glycerin	Merck
Glycin	Roth
Hefeextrakt	Difco
Hydroxyharnstoff	Sigma
Isopropanol	Merck
Kaliumacetat	Merck
Kaliumchlorid	Merck
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck
Latrunculin B	Sigma
Magermilchpulver	Drogeriemarkt
Maleinsäurediethylester	Sigma
2-Mercaptoethanol	Merck
Methanol p.a.	Merck
Natriumacetat	Merck
Natriumcitrat	Merck
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Roth
Natriumchlorid	Merck
Natriumfluorid	Merck
di-Natriumhydrogenphosphat	Merck
Nocodazol	Sigma
Nonidet P40 Substitute	Fluka
Oligonukleotide	MWG-Biotech
Polyethylenimin	Sigma
Ponceau S	Sigma
Protease Inhibitor Tabletten	Roche
Protein G Sepharose	Pierce
PVDF-Membran	Millipore
Rhodamin 6G	Sigma
Rotiblock 10x	Roth
S-Adenosyl-L-[methyl- ³ H]methionin	Amersham Pharmacia
Salzsäure 25 %	Merck

TEMED	Roth
Trifluoressigsäure (TFA)	Merck
Tris	Merck
Triton X-100	Sigma
Trypsin	Sigma
Trypton	Merck
Tween [®] 20	Promega

Antibiotika

Ampicillin	Roche
Kanamycin	Sigma
Penicillin	PAA
Streptomycin	PAA

Enzyme

DNase, RNase	Roche
Pfu-Turbo DNA-Polymerase	Stratagene
T4-Ligase	Roche
Restriktionsenzyme	NEB
SuperScript II Reverse Transkriptase	Invitrogen

Zellkultur

DMEM High Glucose Medium	PAA
Fötale Rinderserum (FBS)	PAA
G418-Sulfat (Geneticin)	PAA
OptiMEM	Invitrogen
Insulin	Sigma
Trypsin-EDTA Lösung (1x)	PAA, Linz
Zellkulturschalen (60 mm, 100 mm, 145 mm)	Greiner
35 mm Glasboden-Kulturschalen	MatTek

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
ChIP Assay Kit	Upstate
ECL™ Detection Kit	Amersham Biosciences
GFX PCR-Purification/Gelband	Pharmacia
hNotch Microarray System	SuperArray
RNeasy Mini Kit	Quiagen
TaqMan® Fast Universal PCR Master Mix	Applied Biosystems
ZipTip™	Millipore

4.1.2 Antikörper, Plasmide und Oligonukleotide**Primäre Antikörper**

Antikörper	Herkunft	Verdünnung WB / IF
GFP	Roche, 11 814 460 001	1:1000 / -
Cleaved Notch1 (Val1744)	Cell Signaling, #2421	1:2000 / -
Notch1 (C20)	Santa Cruz, sc-6014	1:1000 / -
Notch1 (G20)	Santa Cruz, sc-23301	1:1000 / 1:100
PML (H238)	Santa Cruz, sc-5621	1:500 / 1:50
RBP-Jκ (H-50)	Santa Cruz sc-28713	- / 1:50
Anti-Flag M2	Sigma, F3165	- / 1:200
Myc-Tag (9B11)	Cell Signaling #2276	1:1000 / 1:100
PRMT1	Upstate, #07-404	1:1000 / 1:400
RNA Polymerase II Phospho-S5	Biozol	1:1000 / -
PRMT4	Imgenex IMG-496	1:500 / 1:30
Aktin (JLA20)	J. J.-C. Lin, University of Iowa	1:250 / -

WB = Western Blot, IF = Immunfluoreszenz

Tabelle 4.1: Verwendete primäre Antikörper.

Sekundäre Antikörper

Für Western-Blot-Analysen wurden die Peroxidase-gekoppelten Antikörper anti-Kaninchen (A0545), anti-Maus (A9309) und anti-Ziege (A5420) von Sigma in einer Verdünnung von 1:50000 in 0,5 % Magermilchpulver in TNT-Puffer eingesetzt. Bei der indirekten Immunfluoreszenz wurde Alexa Fluor 568 bzw. Alexa Fluor 488 anti-Kaninchen (Ziege, Maus) von Molecular Probes in einer Verdünnung von 1:300 verwendet.

Plasmide

Vektor	Fusionsprotein	Insert	Herkunft
pEGFP-N1	eGFP	hPML	T. Hoffmann / HPI Hamburg
pEGFP-N3	eGFP	hNotch1	B.T. Hyman / Massachusetts
		hNIC	B.T. Hyman / Massachusetts
pEGFP-C1	eGFP	-	BD Biosciences
		hPRMT1	M.T. Bedford / Texas
		(NM_198319)	M.T. Bedford / Texas
		hPRMT4	
pBABE	myc	-	J. Chu / Wisconsin
		hNIC	J. Chu / Wisconsin
pSG5	flag	hOtt	T. Heise / HPI Hamburg
		hSP100 B	H. Will / HPI Hamburg
		hSP100 HMG	H. Will / HPI Hamburg
pCDNA3	-	hPML3	H. Will / HPI Hamburg

Tabelle 4.2: Verwendete Plasmide.

siRNA

PML siRNA (h) Santa Cruz, sc-36284

Primer für Sequenzierung

EGFPupstream (bp 548-571→, vor MCS in pEGFP-N3):

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

EGFPdnstream (bp 787-810←, im eGFP-Gen von pEGFP-N3):

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

Primer für RT-PCR

Applied Biosystems

TaqMan Gene Expression Array für:

PML, HEY1, JAG1, MAML1, Numb, 18S, GAPDH, CyclophilinA, RPL13A, Actin

4.1.3 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 (Rezept für 5 l)

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 % (w/v) SDS

Coomassie-Färbe-Lösung

40 % (v/v) Methanol
10 % (v/v) Essigsäure, konz.
0,2 % (w/v) Coomassie Brilliant Blau R250 in H₂O dest.

Coomassie Entfärber-Lösung

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

DHB

Lösung I

5 mg Diammoniumhydrogencitrat
10 mg 2,5 Dihydroxybenzoesäure
0,5 ml Acetonitril
0,5 ml H₂O dest.
10 µl Trifluoressigsäure
10 µl 10% (v/v) H₃PO₄

Lösung II

50% (v/v) Acetonitril
0,1% (v/v) Trifluoressigsäure

Mix

Lösung I : Lösung II = 1:1

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
+ „complete“ Protease Inhibitor Tabletten (EDTA-frei, Roche)

Lysepuffer M

10 mM NaF
0,5 % (v/v) Triton X-100
in 1 X PBS
+ „complete“ Protease Inhibitor Tabletten (EDTA-frei, Roche)

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.

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

Trypsin-Resuspensionspuffer

50 mM NH_4HCO_3
100 mM CaCl_2

TSK-BT

100 mM Tris [pH7,6]
550 mM NaCl
10 mM KCl
2 % (w/v) BSA
0,05 % (v/v) Triton X-100

WB-Elutionspuffer

62,5 mM Tris-HCl [pH6.7]
2 % SDS
100 mM 2-Mercaptoethanol

4.2 Methoden

4.2.1 Allgemeine Methoden

Die unten aufgeführten Methoden wurden nach Sambrook (Sambrook 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 (Wessel and Flugge 1984)
- Bestimmung der Proteinmenge (Bradford 1976)

4.2.2 Arbeiten mit Zellen

4.2.2.1 Zelltypen und Kulturbedingungen

Für alle Experimente wurden, wenn nicht anders angegeben, die adhärenenten Zelllinien U2OS (humane Osteosarcomazellen) und HEK293 (humane embryonale Nierenzelllinie) verwendet. Die Zellen wurden in 145 mm und 100 mm Kulturschalen als Monolayerkultur in DMEM mit 10 % FBS (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 Penicillin-G und 80 µg/ml Streptomycin-Sulfat zugesetzt. Die Zellen wurden alle 2-3 Tage in einem Verhältnis 1:5 bzw. 1:10 passagiert, nachdem sie mit Trypsin (5 mg/ml)/EDTA (2 mg/ml) in PBS von der Kulturschale gelöst wurden. Andere verwendete Zelllinien wurden wie von ATCC empfohlen kultiviert.

4.2.2.2 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) beigefügt, und die Zellen nach 48 h geerntet.

4.2.2.3 Chemische Transfektion eukaryotischer Zellen mit Polyethylenimin

24 h vor der Transfektion werden die Zellen in einem Verhältnis 1:5 passagiert. Zu 10 µg DNA werden 50 µl serumfreies Kulturmedium gegeben. Anschließend vermischt man die DNA mit 300 µl Polyethylenimin-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, durch Schwenken auf den Zellen verteilt und für 4 h unter Standard-Kulturbedingungen inkubiert. Anschließend wird das Medium gewechselt und die Zellen bis zur Analyse weiter kultiviert.

4.2.2.4 Transfektion eukaryotischer Zellen mit Lipofectamine 2000

24 h vor der Transfektion werden die Zellen in einem Verhältnis 1:2 (bei Transfektionen mit DNA) bzw. 1:5 (bei Transfektionen mit siRNA) passagiert, und in OptiMEM mit 10 % FBS aufgenommen. 5 µg DNA bzw. 120 pmol siRNA und 12 µl (bei DNA Transfektion) bzw. 6 µl (bei siRNA Transfektion) Lipofectamine 2000 werden in jeweils 300 µl serumfreies OptiMEM verdünnt und 5 min bei RT inkubiert. Die beiden Ansätze (Lipofectamine 2000 und DNA/siRNA) werden miteinander vermischt und weitere 30 min bei RT inkubiert. In der Zwischenzeit erfolgt ein Mediumwechsel mit 3 ml frischem OptiMEM mit 10 % FBS. Die Transfektionslösung wird vorsichtig auf die Zellen gegeben, durch Schwenken gleichmäßig verteilt und für 6 h unter Standard-Kulturbedingungen inkubiert. Anschließend wird das Medium zu 10 ml DMEM mit 10 % FBS gewechselt und die Zellen für weitere 48 h kultiviert.

4.2.2.5 Herstellung stabiler Zelllinien

U2OS Zellen werden zwei Tage nach der Transfektion mit frischem Medium (DMEM mit FBS und Penicillin/Streptomycin) versorgt, das G418 (Neomycin-Analog) in einer Endkonzentration von 1 mg/ml enthält. Durch die Aufrechterhaltung des Selektionsdruckes für mindestens 4 Wochen wird gewährleistet,

dass nur Zellen überleben, die den Expressionsvektor stabil in ihr Genom integriert haben.

4.2.2.6 Langzeitlagerung eukaryotischer Zellen

Für die Langzeitlagerung von Zellen werden diese bei einer Konfluenz von 75 bis 100% trypsinisiert und in 5 ml DMEM (+FBS, +P/S) mit 10% (v/v) DMSO resuspendiert. Anschließend wird die Zellsuspension auf 1,5 ml Kryoröhrchen aliquotiert. Die Röhrchen werden fest verschraubt und in einen mit Isopropanol (RT) gefüllten Einfrierbehälter (Mr. Frosty, Nalgene) 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 $-1^{\circ}\text{C}/\text{min}$. 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 kryokonservierten Zellen werden diese bei 37°C im Wasserbad aufgetaut und anschließend in eine mit vorgewärmten Medium (+FBS, +P/S) gefüllte 100 mm Kulturschale gegeben. Nach dem Absetzen der Zellen bzw. am nächsten Tag erfolgt ein Mediumwechsel.

4.2.2.7 Blockieren der Zellen im Zellzyklus

Nach dem Umsetzen der Zellen werden diese für 4 h regeneriert. Um die Zellen am G1/S Übergang zu blockieren, werden sie für 20 h mit 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Aphidicolin inkubiert. Für einen Wachstumsblock in der frühen S-Phase werden die Zellen für 20 h mit 10 mM Hydroxyharnstoff inkubiert. Eine 15 h Inkubation mit 100 ng/ml Nocodazol blockiert die Zellen in der M-Phase. Nach den Inkubationen wurden die Zellen fluoreszenzmikroskopisch untersucht.

4.2.2.8 Synchronisation der Zellen

Wie bei den Blocks im Zellzyklus werden die Zellen nach dem Umsetzen für 4 h regeneriert. Anschließend werden die Zellen mit 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Aphidicolin für 20 h inkubiert. Nach dem ersten Block werden die Zellen zweimal mit 37°C warmem PBS und einmal für 5 min bei 37°C mit DMEM gewaschen. Durch Inkubation in

normalem Kulturmedium für 16 h werden die Zellen vorübergehend aus dem Block entlassen. Anschließend wird ein weiteres mal für 20 h mit 5 µg/ml Aphidicolin geblockt. Die Zellen werden wieder wie beschrieben gewaschen, durch Zugabe von normalem Kulturmedium aus dem Block entlassen und nach verschiedenen Zeitabständen fluoreszenzmikroskopisch untersucht.

4.2.2.9 Vorbereitung von Zellen für die Durchflusszytometrie

Durchflusszytometrische Analysen wurden mit U2OS Zellen durchgeführt, die mit GFP-Expressionsplasmiden transfiziert wurden. Zwei Tage nach der Transfektion werden die Zellen geerntet. Hierfür wurden die Zellen zweimal mit 10 ml 0,1 % (w/v) EDTA/PBS (4°C) gewaschen und mit Trypsin vom Plattenboden gelöst. Anschließend wurden die Zellen in 10 ml 0,1 % (w/v) EDTA/1x PBS (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 diese zeitgleich mit Methanol in ein konisch zulaufendes Zentrifugenröhrchen pipettiert. Nach einer mindestens 20-minütigen Inkubation auf Eis wurden die Zellen über Nacht bzw. bis zur Durchflusszytometrie bei -20°C gelagert. Die Durchflusszytometrie sowie die vorherige DNA-Färbung der fixierten Zellen mit Propidiumiodid 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 Aliquoten bei -20°C .

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

Für die fluoreszenzgestützte Zellsortierung wurden Zelllinien verwendet, die entweder stabil oder transient (2 Tage) mit GFP-Expressionsplasmiden transfiziert wurden. Die Zellen wurden zweimal mit 1x PBS (RT) gewaschen und dann durch Trypsin vom Kulturschalenboden gelöst. Anschließend wurden die Zellen in einer Zellkulturschale (100 mm) in 3 bis 5 ml 4% (v/v) FCS/PBS (RT) resuspendiert und durch einen Zellsieb (35 μm Ausschlussgröße) pipettiert. 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.

4.2.2.11 Indirekte Immunfluoreszenzfärbung

Auf Alzianblau-beschichteten Deckgläschen (DG) gewachsene Zellen wurden zweimal mit 1xPBS gewaschen und mit 4 % (v/v) Formaldehyd in 1xPBS für 20 min bei RT fixiert. Die Zellen wurden anschließend zweimal für je 10 min mit 1xPBS gewaschen und 5 min mit 0,5 % Triton X-100 (v/v) in PBS permeabilisiert. Zur Absättigung unspezifischer Bindestellen wurden die Zellen für 1 h bei RT in TSK-BT (+4 % BSA) blockiert. Anschließend wurden die Zellen 2 h bei 37°C , 100 % Luftfeuchtigkeit mit einem spezifischen primären Antikörper inkubiert. Die Zellen wurden 10 min mit PBS und 4 mal je 10 min mit TSK-BT gewaschen. Der sekundäre Antikörper wurde 1 h bei 37°C , 100 % Luftfeuchtigkeit mit den Zellen inkubiert. Anschließend wurde dreimal je 10 min mit TSK-BT und 2 mal je 10 min mit PBS gewaschen. Die Deckgläschen wurden in Antifade-Lösung eingebettet, versiegelt und fluoreszenzmikroskopisch untersucht. Die Antikörper wurden in TSK-BT verdünnt.

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

4.2.2.12 Bestrahlung der Zellen mit γ -Strahlen

Stabil PRMT1- bzw. PRMT4-exprimierende U2OS-Zellen wurden in der Bestrahlungsapparatur LISA des Heinrich-Pette-Instituts (^{137}Cs als Strahlungsquelle) einer γ -Strahlung von 10 Gy ausgesetzt. Dies betrug im Jahr 2006 einer Bestrahlungsdauer von 7,6 min. Im Anschluss wurden die Zellen nach verschiedenen Zeitabständen fluoreszenzmikroskopisch untersucht.

4.2.3 Mikroskopische Methoden

4.2.3.1 Konfokale Fluoreszenzmikroskopie

Mit dem Zeiss LSM510-Meta wurden fixierte Zellen auf Objektträgern und lebende Zellen aufgenommen. Die Präparate der immungefärbten Zellen wurden, wie in Kapitel 4.2.2.11 beschrieben, hergestellt. Für die *in vivo* Mikroskopie wurden mit GFP-Plasmide 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 Objektträgeraufsatz konstant auf 37°C gehalten. Für die Aufnahme konfokaler Bilder wurden die in Tabelle 4.3 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 4.3: Parameter für konfokale Fluoreszenzmikroskopie.

4.2.3.2 „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-Meta 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 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 / NA 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 Zellkerns ab und hatte in y-Richtung eine Höhe von 15 Pixel (ca. 4,29 µm). Das Bleichen erfolgte für 40-80 Iterationen. Direkt vor und nach dem Bleichen wurde eine bestimmte 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 Aufnahme der Bilder erfolgte ohne Verzögerung und mit einer Aufnahmegeschwindigkeit von ~125 ms/Bild.

4.2.3.3 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, „region of interest“) 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. 4.1). In diesen Bereichen kann das Programm „ImageJ“ die mittlere Intensität in allen Bildern bestimmen und die Daten in eine Texttabelle darstellen.

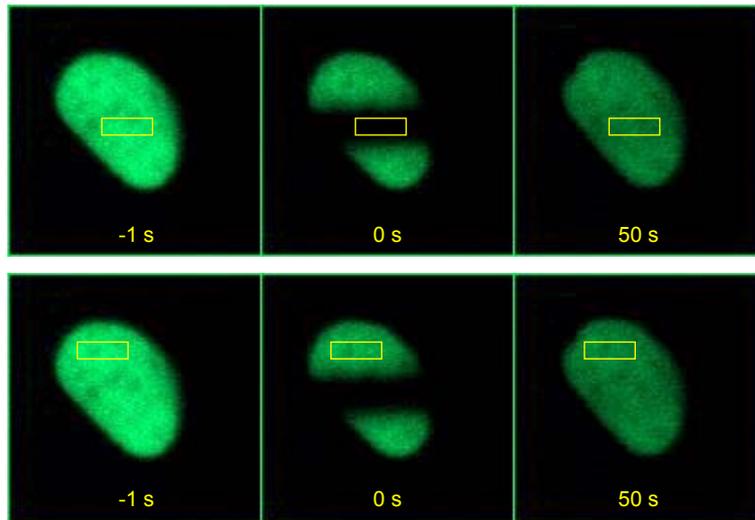


Abb. 4.1: Beispiel für die Auswertung von Zellen mit dem Programm „ImageJ“.

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)).

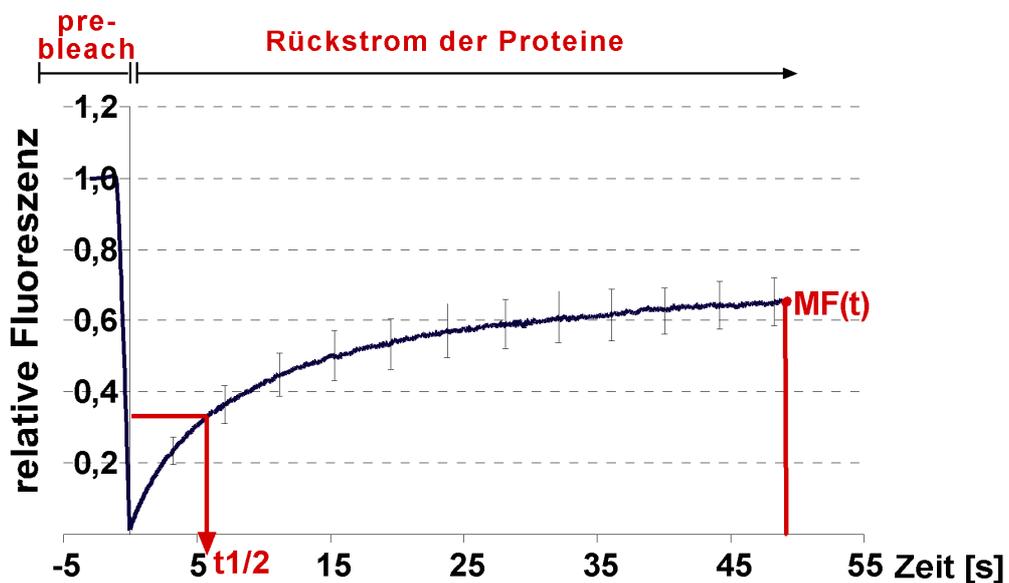


Abb. 4.2: Diagramm ausgewerteter FRAP-Daten.

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)).

Die Definition der mobilen Fraktion, und daraus resultierend auch der immobilen Fraktion, ergibt sich ebenfalls aus der Fluoreszenzintensität des letzten gemessenen Zeitpunkts. Die Werte werden in Prozent angegeben, bezogen auf eine 100% mobile Fraktion, die sich bei einer relativen Intensität von 1,0 am Ende der Messung ergeben würde.

4.2.3.4 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 and Schwille 2003)).

Um die Mobilität von EGFP-Fusionsproteinen in Lösung mit FCS zu bestimmen, wurden die Zellen nach einem Protokoll von Wachsmuth (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 µm oberhalb des Glasbodens positioniert. Vor jeder Messung wurde die Position der Lochblenden für optimale Signalstärke pro Partikel kalibriert. Folgende Parameter (siehe Tabelle 4.4) 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 µm Durchmesser
Messdauer	10 Sekunden

Tabelle 4.4: 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

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

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.

4.2.4 Molekularbiologische Methoden

4.2.4.1 Elektrotransformation von *E. coli*

Für die Transformation werden bei -70°C eingefrorene, kompetente *E. coli*-Zellen (XL1-blue, in 40 μl Aliquoten) 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).

4.2.4.2 Plasmid-Isolierung aus *E. coli* (Minipräparation)

Von den Selektionsplatten werden Einzelkolonien in 1 ml LB-kan⁺ überimpft und bei 37°C für 4 h kultiviert. Die Bakteriensuspension wird für 5 min zentrifugiert

(13200 rpm) und das Pellet in 100 µl GET (siehe unten) resuspendiert. Die Bakterien werden mit 200 µl alkalischem SDS lysiert und die Proteine sowie die bakterielle genomische DNA mit 150 µl Salzlösung gefällt. Der gesamte Ansatz wird 5 min zentrifugiert, der Überstand in ein neues 1,5 ml- Reaktionsgefäß überführt und mit kaltem EtOH (100 %) bei -20°C für 30 min gefällt. Der Ansatz wird erneut zentrifugiert (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.

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

Plasmide wurden nach der Methode von Birnboim (Birnboim and Doly 1979) soliert und anschließend über einen CsCl-Dichtegradienten nach Sambrook (Sambrook 1989) aufgereinigt.

4.2.4.4 DNA-Sequenzierung

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

Ansatz:

1 µg	DNA-Template
10 pmol	spezifischer Primer
3 µl	BigDye (Terminator-Cycle-Sequencing-Mix)
5 µl	2,5 x Puffer
ad 20 µl aqua dest.	

Thermocycler-Programm:

25 Zyklen:	
Denaturierung:	96°C, 30 s
Hybridisierung:	50°C, 5 s
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.

4.2.4.5 qRT-PCR

Von transfizierten Zellen wurde mit dem RNeasy Kit (Qiagen) nach Angaben des Herstellers die gesamt-RNA isoliert und aufgereinigt. Aus der gewonnenen RNA wurde mittels SuperScript™ II RT (Invitrogen) laut Protokoll cDNA synthetisiert, welche dann in die real-time PCR eingesetzt wurde. Dafür wurde pro Probe 1 µl cDNA, 10 µl 2 x TaqMan Fast Universal Master Mix, 8 µl H₂O dest. und je 1 µl Primer für das zu untersuchende Gen gemischt. Die quantitative Analyse der Genexpression wurde mittels 7500 Fast Real-Time PCR System mit Hilfe von Carmen Eckerich an der Neurochirurgie der Universitätsklinik Eppendorf, Hamburg durchgeführt.

4.2.4.6 Array-Analysen

Sämtliche Kits zur Durchführung der Array-Analysen wurden von der Firma SuperArray bezogen. Die Durchführung erfolgte nach den Angaben des Herstellers. Von transfizierten und sortierten Zellen wurde mit dem ArrayGrade total RNA Isolation Kit die gesamt-RNA isoliert, über ein Agarosegel die Qualität kontrolliert und photometrisch die Konzentration bestimmt. Mit dem TrueLabeling-Amp 2.0 Kit wurde über Nacht zuerst cDNA und daraus Biotin-16-UTP markierte cRNA synthetisiert. Die gewonnene cRNA wurde mit dem ArrayGrade cRNA cleanup Kit aufgereinigt und photometrisch die Konzentration bestimmt. Die oligo Array Hybridisation wurde durch Zugabe von 5 µg cRNA (Sonde) in Hybridisierungspuffer und der Anwendung des Notch Oligo GEArray HybTube Systems durchgeführt. Die Signale auf der Membran wurden Mittels des GEArray Chemiluminescent Detection Kit und durch Auflegen von Röntgenfilmen visualisiert.

4.2.4.7 Zellfraktionierung

Die Zellen wurden mit 500 µl kaltem PBS von den Petrischalen geerntet und in ein 1,5 ml Eppendorfgefäß überführt. Die Suspension wurde bei 4°C für 5 min bei 600 g zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde in 500 µl kaltem Lysepuffer M resuspendiert und 3 min auf Eis inkubiert. Im Anschluss wurde eine weitere Zentrifugation für 10 min bei 16000 g und 4°C durchgeführt. Überstand und Pellet wurden getrennt. Im Überstand befindet sich die Zyto-

plasmafraktion und im Pellet die Zellkernfraktion. Das Pellet wurde mit Lyse-puffer M gewaschen und danach in selbigem resuspendiert. Beide Fraktionen wurden wie üblich sonifiziert und für weitere Analysen eingesetzt.

4.2.5 Biochemische Methoden

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

Mittels SDS-PAGE lassen sich Proteine aufgrund ihrer verschiedenen Molekulargewichte auftrennen. Hierzu werden denaturierende Gele nach Laemmli und Thoma (Laemmli 1970; Thoma et al. 1979) verwendet. Je nach Molekulargewicht des zu untersuchenden Proteins werden Gele mit 7% bis 15% (w/v) Polyacrylamidgehalt eingesetzt.

4.2.5.2 Westernblot-Analyse

Für den immunologischen Proteinnachweis werden die mittels SDS-PAGE elektrophoretisch aufgetrennten Proteine nach der Methode von Towbin (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/cm^2 für 1 h 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 1 h bei RT. Nach weiteren Waschschrinen (3 x 5 min mit TNT) folgt eine 30-minütige Inkubation mit dem sekundären Peroxidase-gekoppelten Antikörper (Verdünnung: 1:50000 in 0,5 % Magermilchpulver in TNT-Puffer). 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.

4.2.5.3 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 IP (1 ml/100 mm Platte) aufgenommen und für 20 s auf Eis sonifiziert. Anschließend wird das Zelllysate mit 10000 g für 10 min bei 4°C zentrifugiert. Für die Immunpräzipitation werden 3-6 µg Antikörper zu 1 ml des Überstandes gegeben und für 3 h bei 4°C inkubiert. Nach Zugabe von 30 µl einer 50%igen Suspension von ProteinG-Sepharose wird für eine weitere Stunde inkubiert. Die Sepharose wird 4-6 mal mit je 1 ml Lysepuffer IP 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.

4.2.5.4 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 überschichtet. Auf den Gradienten wurde ca. 1 ml Gesamtzellextrakt 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).

4.2.5.5 Immunpräzipitation von PRMTs aus mitotischen Zellen

Mit Nocodazol geblockte mitotische Zellen werden durch vorsichtiges Klopfen von der Kulturschale gespült und 5 min bei 700 g und 4°C zentrifugiert. Das Zellpellet wird zweimal mit kaltem PBS gewaschen und anschließend in 500 µl Lysepuffer M resuspendiert. Die Suspension wird 7 min auf Eis sonifiziert und 10 min bei 16000 g und 4°C zentrifugiert. 400 µl werden vom Überstand abgenommen und

mit 100 µl Antikörper / ProteinG-Sepharose 1 h bei 4°C inkubiert. Dafür wurden 6 µg Antikörper und 50 µl ProteinG-Sepharose in einem Gesamtvolumen von 100 µl 30 min bei RT vorinkubiert. Die Sepharose wird dreimal mit 600 µl Lysepuffer M auf Eis gewaschen und kann anschließend in Assays bzw. Western Blot eingesetzt werden.

4.2.5.6 *In vitro* Methylierungsassay

Bakteriell exprimierte und aufgereinigte oder aus Gesamtzellextrakt immungefällte Methyltransferasen können in einem *in vitro* Methylierungsassay auf ihre enzymatische Aktivität getestet werden. Als Methylgruppen-Akzeptoren (Substrate) werden rekombinante Histone oder hitzeinaktivierte, hypomethylierte 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 zentrifugiert (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 Enzym (an 30 µl Protein G Sepharose)
- 5 µCi S-Adenosyl-L-[*methyl*-³H]Methionin (spezifische Aktivität 2,96 TBq/mmol)
- 40 µl hypomethylierter, hitzeinaktivierter 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, die Proteine 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.

4.2.5.7 Massenspektrometrie

PRMT4-GFP wurde mit Protein G-Sepharose gekoppeltem (1 ml Hybridoma-überstand an 50 µl gesetzter Sepharose) anti-GFP Antikörper aus Zellextrakt von $2 \cdot 10^6$ U2OS Zellen immungefällt. Nach gründlichem Waschen in Lysepuffer M und 1x PBS wurden die gebundenen Proteine mit 50 µl 1x Probenpuffer von der Sepharose eluiert, über SDS-PAGE aufgetrennt und mit Coomassie Brilliant Blau angefärbt. Anschließend wurde die sichtbare Bande bei 45 kDa aus dem Gel ausgeschnitten. Die ausgeschnittene Gelbande wurde 30 min mit 100 µl 50% Acetonitril (ACN)/5 mM Ammoniumhydrogencarbonat entfärbt. Zu der Entfärbelösung wurden 100 µl ACN zugegeben und weitere 15 min inkubiert. Die Lösung wurde abgenommen und das Gelstück in der Vakuumzentrifuge bei 35°C getrocknet. Anschließend wurden 20 µl Trypsin (0,1 µg Trypsin pro µl Trypsin-Resuspensionspuffer) zugegeben und über Nacht bei 37°C verdaut. Es wurde 100 µl Wasser hinzu pipettiert und 1 h bei 37°C geschüttelt. Der Überstand wurde abgenommen und in der Vakuumzentrifuge bei 35°C eingetrocknet. Auf das getrocknete Gelpellet wurden weitere 100 µl Wasser zugegeben und nochmals 1 h bei 37°C geschüttelt. Der Überstand wurde abgenommen und das Pellet erneut eingetrocknet. Auf das Gelstück wurde 100 µl 20% ACN / 0,1% TFA gegeben und 1 h bei RT geschüttelt. Der Überstand wurde wie oben beschrieben abgenommen, eingetrocknet und das dadurch entstandene Proteinpellet wurde in 20 µl 0,1%igem TFA resuspendiert. Die Peptide wurden mittels ZipTip™ nach Angaben des Herstellers aufgereinigt, in der Vakuumzentrifuge eingetrocknet und in DHB (Matrix) resuspendiert. Von der Peptidlösung wurde 1 µl auf die Messplatte aufgetragen und getrocknet. Die Analyse mittels „Matrix-assisted Laser Desorption Ionization / Time of Flight“ (MALDI-TOF) Massenspektrometrie, (Axima CRF, Shimadzu) wurde freundlicherweise am Heinrich-Pette-Institut von Annette März durchgeführt. Zur Peptididentifizierung wurde das Programm Mascot von Matrix Science verwendet.

5. Ergebnisse

5.1 Charakterisierung des „Notch Intra Cellular“ (NIC)-Proteins

Für die Genaktivierung ist die Lokalisation eines Transkriptionsfaktors im Zellkern von großer Bedeutung. Von Notch 1 ist bekannt, daß es nach der Stimulierung durch die Bindung eines Liganden an den extrazellulären Teil des Proteins prozessiert wird, und die intrazelluläre Domäne freigesetzt wird. Diese besitzt wie in der Einleitung beschrieben ein Kernlokalisierungssignal, durch das es in den Zellkern transloziert wird und dort auf Zielgene wirken kann. Um die Lokalisation der intrazellulären Domäne von Notch1 (NIC) zu untersuchen, wurden HEK293 (human embryonic kidney) Zellen mit sehr niedrigen endogenen Notch1 Expressionslevel (Ray et al. 1999) auf Glasboden-Kulturschalen kultiviert und mit einem NIC-EGFP Konstrukt (Berezovska et al. 2000) transfiziert. Nach 48 Stunden wurden die Zellen analysiert und dabei festgestellt, dass NIC hauptsächlich in eng umgrenzten Bereichen des Zellkerns lokalisiert, das so genannten „nuclear bodies“ ähnelt (siehe Abb. 5.1.1), und die im folgenden als „NIC-Körperchen“ bezeichnet werden. Im Gegensatz dazu war das Gesamt-Längen-Notch 1 nach Transfektion mit einem Expressionvektor für ein Notch1-GFP Fusionsprotein wie erwartet vorwiegend in der Zellmembran lokalisiert. Definierte Kernkörperchen wurden bei Transfektionen mit Gesamt-Längen-Notch 1 ebenfalls nicht beobachtet.

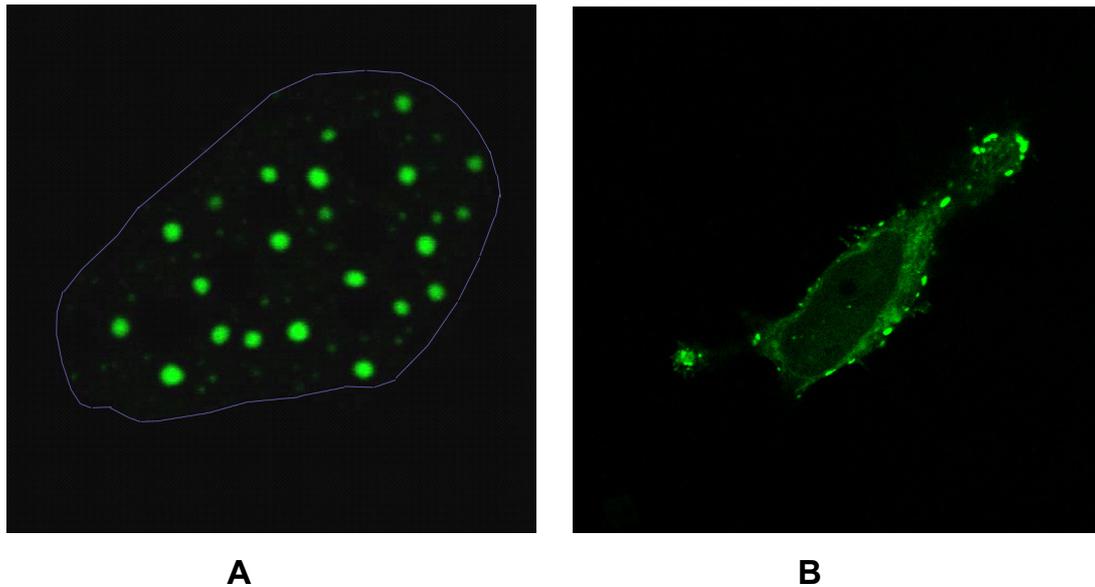


Abb. 5.1.1: Lokalisation von Notch1 Intracellular (NIC) im Zellkern.

A) NIC-GFP lokalisiert in transient transfizierten HEK293-Zellen hauptsächlich in nuclear bodies. Gezeigt ist ein konfokaler optischer Schnitt durch einen einzelnen Zellkern. Der Umriss des Zellkern ist mit einem blauen Strich angedeutet. **B)** Zum Vergleich: Der Rezeptor Notch1-GFP lokalisiert vorwiegend an der Zytoplasma-Membran. Hier ist ein konfokaler optischer Schnitt durch eine einzelne Zelle dargestellt, die mit einem Expressionsvektor für das GFP-Fusionsprotein des Gesamt-Längen-Proteins Notch 1 transfiziert wurde. Beachte die vierfach geringere Vergrößerung der Zelle in (B), die notwendig war, um die gesamte Zelle abzubilden.

5.1.1 Kontrollen zur Aktivität von NIC-GFP

Um sicher zu stellen, daß das in diesen Versuchen verwendete Expressionskonstrukt biologisch aktiv ist, wurde ein Microarray-Experiment mit mRNA durchgeführt, die aus NIC-GFP transfizierten U2OS-Zellen gereinigt wurde. Verwendet wurde dafür ein Oligonukleotid-Array der Firma SuperArray, der die Aktivität typischer Zielgene des Notch Signalwegs sichtbar macht. Die Aktivität von NIC-GFP konnte anhand der gesteigerten Expression von Notch 1-Zielgenen gegenüber mRNA aus nicht transfizierten Kontrollzellen bestätigt werden (siehe Abb. 5.1.2).

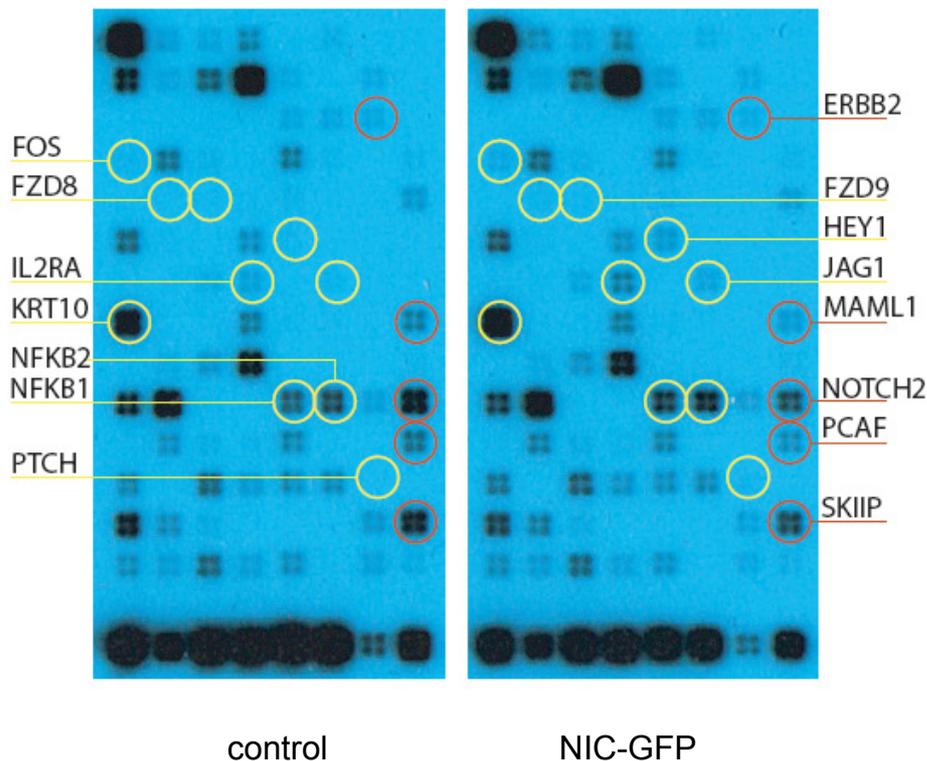


Abb. 5.1.2: Microarray für hNotch 1 zur Kontrolle der Aktivität.

Gesamt-mRNA aus nicht transfizierten U2OS-Zellen (control) und mit NIC-GFP transient transfizierte U2OS-Zellen (NIC-GFP) wurde gereinigt, revers transkribiert, markiert, und mit einem Microarray hybridisiert, der 96 Zielgene des Notch-Signalweges (plus Kontrollen) enthält. Die gelb markierten Gene wurden in Anwesenheit von NIC-GFP aktiviert. Die orange markierten Gene hingegen wurden eher reprimiert.

5.1.2 Mobilität von NIC-GFP in den NIC-Körperchen

Die Mobilität von Proteinen in lebenden Zellen gibt einen Hinweis auf ihre transienten Wechselwirkungen oder stabile Komplexbildungen, welche die Dynamik der Proteine verringern. Um dies zu untersuchen, wurden mikroskopische „Fluorescence Recovery after Photobleaching“ (FRAP) Experimente an NIC-Körperchen durchgeführt. Dafür wurden U2OS-Zellen auf Glasbodenschalen kultiviert und mit NIC-GFP transfiziert. In einem definierten Bereich im Zellkern, der ein einzelnes NIC-Körperchen enthielt, wurde die GFP-Fluoreszenz durch einen hochenergetischen Laserimpuls irreversibel gebleicht und der Rückstrom fluoreszierender NIC-GFP Proteine von außerhalb des gebleichten Bereichs über die Zeit gemessen. Zur Quantifizierung des Rückstroms wurde in mikroskopischen Aufnahmen die Fluoreszenzhelligkeit im definierten Bereich gemessen.

Schon bei der optischen Betrachtung der Bilder konnte beobachtet werden, dass sich die NIC-GFP Moleküle in den NIC-Körperchen sehr schnell mit Molekülen aus dem nicht gebleichten Bereich austauschen (siehe Abb. 5.1.3).

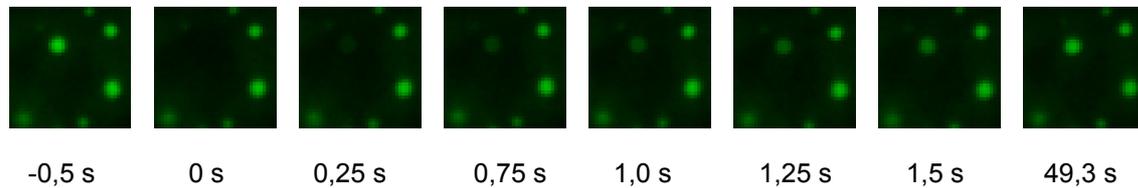


Abb. 5.1.3: FRAP Aufnahmen eines einzelnen NIC-Körperchens.

Die erste Aufnahme wurde vor dem irreversiblen Bleichen eines einzelnen NIC-Körperchens aufgenommen. Danach wurde das Körperchen rechts oben gebleicht, und im Anschluß im Abstand von 0,25 Sekunden weitere Aufnahmen des Bereichs gemacht. Die letzte Aufnahme entstand ca. 50 Sekunden nach dem Bleichen, und zeigt eine etwa siebzigprozentige Wiederherstellung des Fluoreszenzsignals.

Die quantitative Analyse (Abb. 5.1.4) der Rückstromkurven zeigt, dass zur Wiedererlangung der halben Fluoreszenzausgangsintensität in gebleichenen NIC-Körperchen eine Zeit von $t(1/2) = 1,24$ s nötig war. Ein weiteres Ergebnis dieser Experimente ist, dass nur 70% der NIC-GFP Moleküle mobil sind. Die anderen 30% der Moleküle verhalten sich im Messzeitraum wie immobile Proteine (siehe Abb. 5.1.4), und sind damit möglicherweise an strukturelle Proteine des Zellkerns oder an weitgehend immobiles Chromatin gebunden.

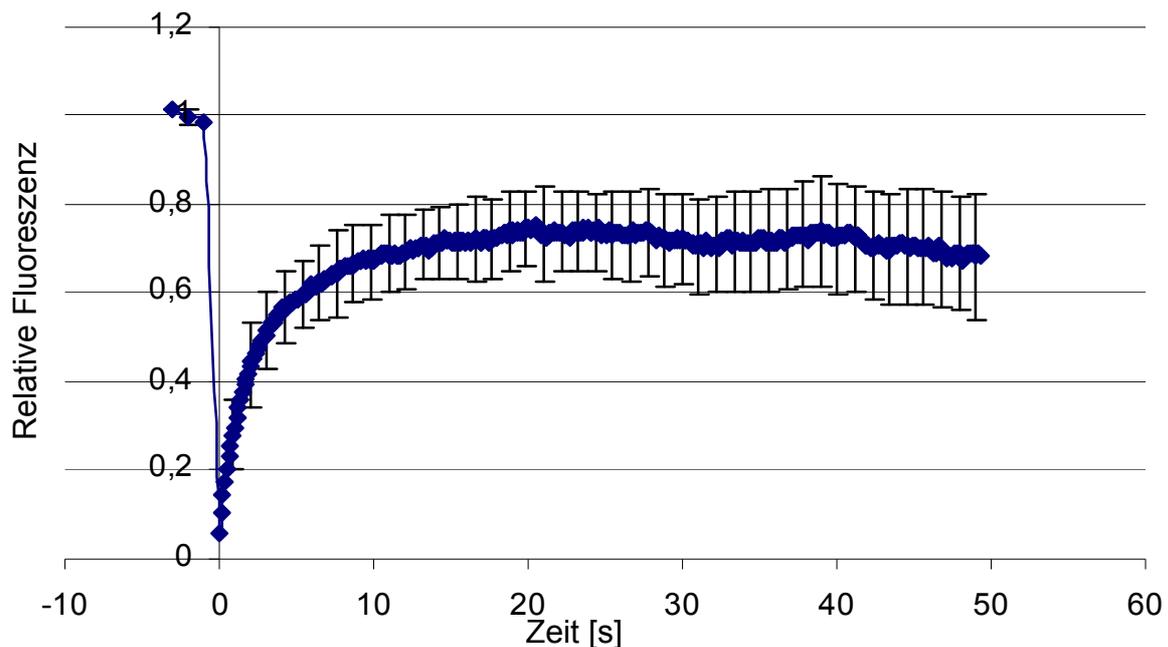


Abb. 5.1.4: Rückstromkurve von NIC-GFP in den NIC-Körperchen.

Das Diagramm zeigt die Fluoreszenzrückstromkurve von NIC-GFP in NIC-Körperchen. Dabei ist auf der Ordinate die relative Fluoreszenz bezogen auf die Werte vor dem Bleichen angegeben, und auf der Abszisse der Verlauf der Zeit nach dem Bleichen. Die negativen Zeitwerte stehen für die Fluoreszenzintensität vor dem Bleichen, die in der quantitativen Analyse als 100% Referenzwerte verwendet werden.

5.1.3 Lokalisationsvergleich zwischen NIC und Ott

Die charakteristische Lokalisation von NIC legt nahe, die „NIC-Körperchen“ mit anderen bereits bekannten nuclear bodies (NB) zu vergleichen. In den folgenden Experimenten wurden dabei Kolokalisations-Versuche durchgeführt mit Proteinen, von denen bekannt ist daß sie in (unterschiedlichen) NB lokalisiert sind. In einem ersten Versuch wurden die Lokalisationen von Ott1 und NIC verglichen. Ott1/RBM15 (RNA binding motif protein) ist ein RNA bindendes Protein, dessen biologische Funktion noch nicht geklärt ist. Seine Lokalisation im Zellkern ähnelt in der Literatur (Ma et al. 2007) jedoch optisch der von NIC-Körperchen. Um eine mögliche Kolokalisation zwischen Ott1 und NIC zu untersuchen, wurden kultivierte U2OS-Zellen auf Deckgläschen mit NIC-GFP und Ott1-flag ko-transfiziert und im Anschluss eine Immunfärbung gegen das flag-Antigen durchgeführt. Danach wurden die Zellen mikroskopisch analysiert (siehe Abb. 5.1.5).

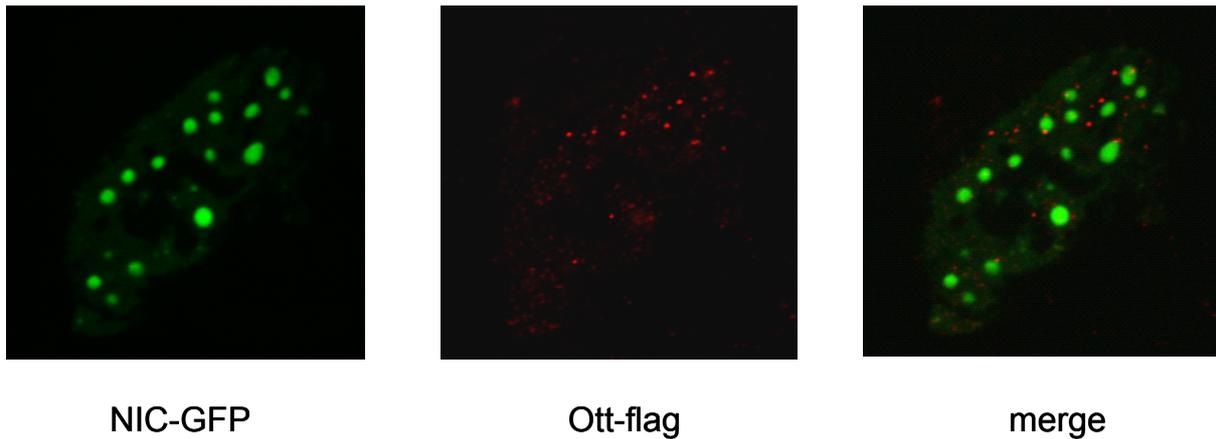


Abb. 5.1.5: Lokalisation von NIC und Ott1.

U2OS-Zellen wurden transient mit NIC-GFP und Ott-flag ko-transfiziert und mit einem flag-Antikörper immungefärbt. Es konnte keine Kolokalisation zwischen NIC und Ott festgestellt werden.

Diese Experimente zeigten jedoch keine Kolokalisation zwischen NIC und Ott1. Ausserdem waren die Kernkörperchen, die Ott1 enthalten, wesentlich kleiner und in ihrer Intensität heterogener als diejenigen, die NIC enthalten.

5.1.4 Lokalisationsvergleich zwischen NIC und Sp100 B / Sp100-HMG

Die Transkriptionsrepressoren Sp100 B und Sp100-HMG bilden ebenfalls nukleäre Körperchen (Negorev et al. 2006). Wegen ihrer genregulierenden Eigenschaft lag eine mögliche Kolokalisation mit den NIC-Körperchen nahe. Um dies zu untersuchen, wurden U2OS-Zellen mit NIC-GFP und Sp100 B-flag bzw. Sp100-HMG-flag ko-transfiziert und anschließend mit einem flag-Antikörper immungefärbt (siehe Abb. 5.1.6).

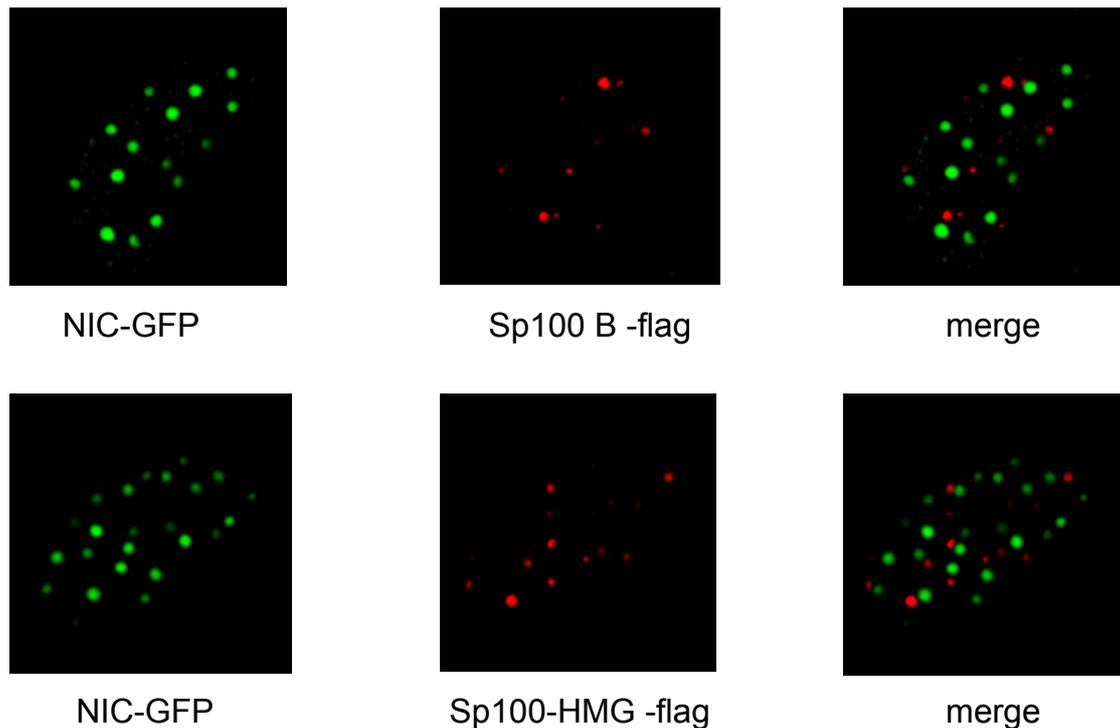


Abb. 5.1.6: Lokalisation von NIC und Sp100 B bzw. Sp100-HMG.

U2OS-Zellen wurden mit NIC-GFP und SP100 B-flag bzw. SP100 HMG -flag ko-transfiziert und mit einem flag-Antikörper immungefärbt. Es konnte weder eine Kolokalisation zwischen NIC (grün) und SP100 B (rot) noch zwischen NIC und SP100 HMG (rot) festgestellt werden.

Es konnte weder eine Kolokalisation zwischen NIC und Sp100 B noch zwischen NIC und Sp100-HMG beobachtet werden.

5.1.5 Lokalisation von NIC unter oxidativem Stress

Der Transkriptionsrepressor Bach2 ist unter anderem an der Regulation von Proliferation und Apoptose beteiligt. Bach2 bildet nukleäre Körperchen, die unter oxidativem Stress charakteristische Donut-ähnliche Ringe ausbilden (Tashiro et al. 2004). In einem weiteren Experiment wurden U2OS-Zellen nach der Transfektion mit NIC-GFP unter Standardbedingungen für 48 h kultiviert und dann zur Herbeiführung des oxidativen Stresses für 2 h mit 1 mM Diethylmaleat (DEM) inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mikroskopisch analysiert (siehe Abb. 5.1.7). Es konnte keine Konformationsänderung der NIC-Körperchen zu Ringen beobachtet werden. Im Gegensatz zu Bach2 scheint die Lokalisation von NIC nicht durch oxidativen Stress beeinflusst zu werden. Auf weitergehende Untersuchungen zu einer möglichen Kolokalisation von NIC und Bach2, zum Beispiel über Immunfluoreszenz oder Ko-Transfektionen, wurde daher verzichtet.

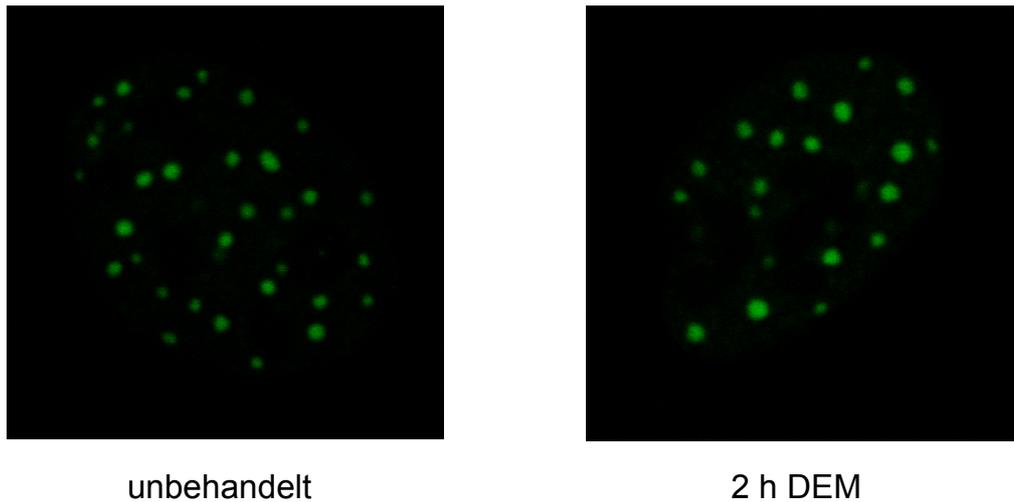


Abb. 5.1.7: NIC-GFP unter oxidativem Stress.

NIC-transfizierte U2OS-Zellen wurden durch 1 mM DEM 2 h oxidativem Stress ausgesetzt. Eine Konformationsänderung zu Ringen konnte jedoch nicht beobachtet werden.

5.1.6 Lokalisationsvergleich zwischen NIC und RBP-Jk

NIC bindet über seine RAM Domäne direkt an den Transkriptionsaktivator RBP-Jk (siehe Kapitel 2.2.2.2 und 2.2.3), wodurch die Transkription von Zielgenen aktiviert wird. Auf Grund dieses Zusammenhangs sollte es zumindest zeitweise zu einer Kollokalisierung von NIC und RBP-Jk kommen. Im folgenden Versuch sollte daher die Lokalisation von NIC und RBP-Jk vergleichend untersucht werden. Dabei wurden U2OS-Zellen auf Deckgläschen kultiviert, mit NIC-GFP transfiziert und das endogene RBP-Jk mit einem spezifischen Antikörper immungefärbt (siehe Abb. 5.1.8). Bei der mikroskopischen Analyse wurde beobachtet, dass die NIC-Körperchen komplett mit dem endogenen RBP-Jk kollokalisieren. Des Weiteren konnte beobachtet werden, dass RBP-Jk bei Anwesenheit von NIC-GFP zum größten Teil in die NIC-Körperchen rekrutiert wird, während es in nicht-NIC-transfizierten Zellen homogen im Zellkern verteilt vorliegt. Sowohl in Anwesenheit wie in Abwesenheit von NIC konnte eine Subpopulation von RBP-Jk im Nukleolus nachgewiesen werden, deren Funktion unbekannt ist. Wir konnten aber reproduzierbar beobachten, daß diese nukleoläre Population von Zelle zu Zelle unterschiedlich war, und vermuten einen Zusammenhang mit dem Zellzyklus.

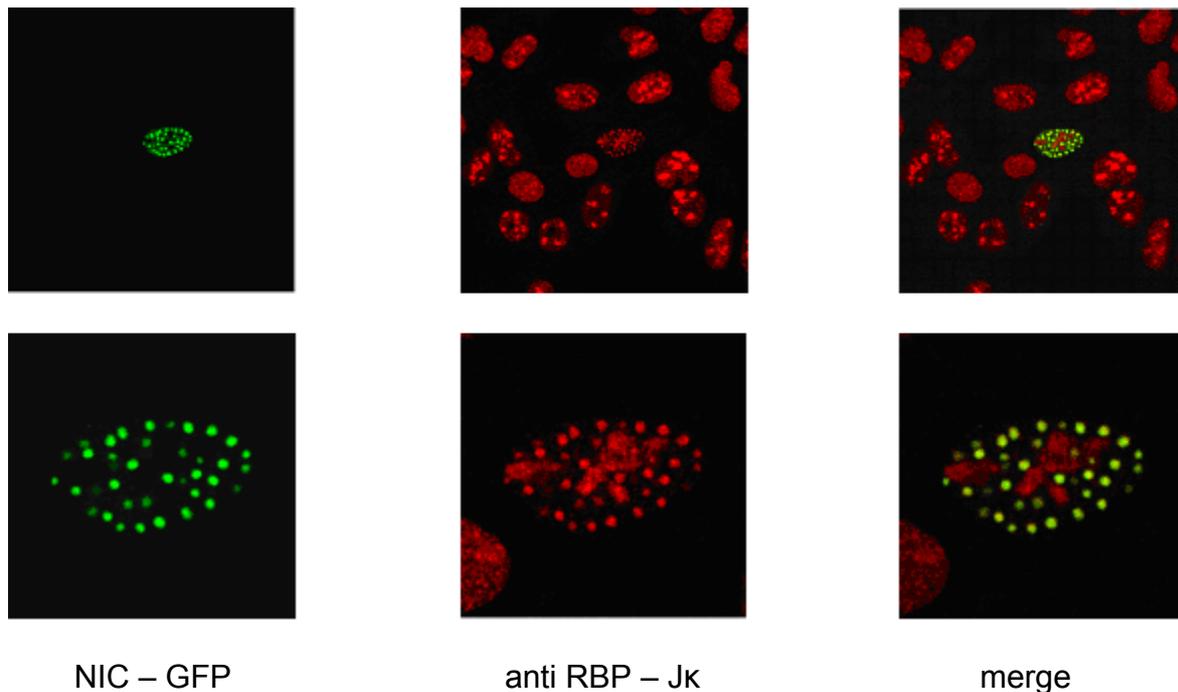


Abb. 5.1.8: Kolokalisation zwischen NIC und RBP-Jk.

U2OS-Zellen wurden mit NIC-GFP (grün) transfiziert und das endogene RBP-Jk (rot) wurde immungefärbt. Oben: Übersichtsfeld mit einer transfizierten Zelle und mehreren untransfizierten Zellen. Unten: Vergrößerung der transfizierten Zelle, bei der die Kolokalisation der beiden Proteine in den NB klar erkennbar ist. Die nukleoläre Population von RBP-Jk zeigt dagegen keine Kolokalisation mit NIC.

5.1.7 Lokalisationsvergleich zwischen NIC und PML

Eine der bekanntesten subnukleären Strukturen ist das Promyelocytic leukemia (PML)-Körperchen. Pro Zellkern befinden sich – abhängig vom Zelltyp und Zellzyklus - normalerweise zwischen 5 und 20 PML-Körperchen (Koken et al. 1995). PML-Körperchen setzen sich jedoch nicht ausschließlich aus PML-Protein zusammen, sondern bestehen aus vielen Dutzend Komponenten, darunter Sp100, SUMO-1, Daxx und p53. Sie spielen eine Rolle bei der DNA-Reparatur, der DNA-Replikation, der Zellzykluskontrolle, der Tumorerdrückung und der Apoptose (Seeler and Dejean 1999; Ruggero et al. 2000). Durch ihre Rekrutierung von Histonacetyltransferasen, CBP (cAMP response element binding protein) und der RNA-Polymerase II sind sie ebenfalls in die Transkription von Genen miteinbezogen (LaMorte et al. 1998; von Mikecz et al. 2000; Boisvert et al. 2001).

Zum Vergleich der Lokalisationen von PML und NIC wurden U2OS-Zellen auf Deckgläschen kultiviert und mit NIC-GFP transfiziert. Die Zellen wurden im

Anschluss mit einem Antikörper gegen endogenes PML immungefärbt und mikroskopisch analysiert (siehe Abb. 5.1.9).

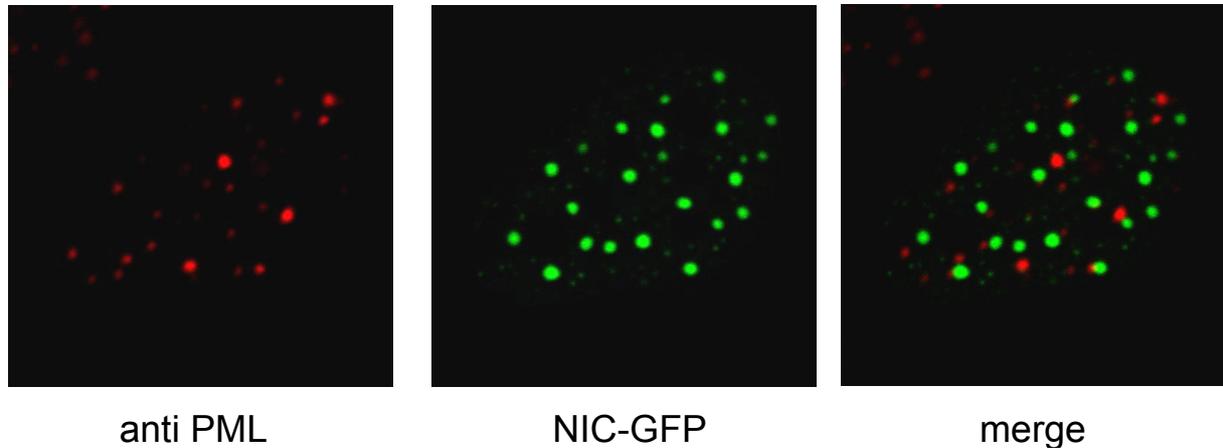


Abb. 5.1.9: Lokalisationsvergleich zwischen PML und NIC.

Auf Deckgläschen fixierte U2OS-Zellen zeigen keine Kolokalisation zwischen NIC-GFP und PML.

Eine Kolokalisation zwischen PML und NIC-GFP konnte nicht festgestellt werden. In vielen Zellen war aber zu beobachten, dass sich die NIC-Körperchen in der Nähe der PML-Körperchen befinden und dass die Anzahl der PML-Körperchen in NIC-transfizierten Zellen im direkten Vergleich zu auf der gleichen Zellkulturschale befindlichen nicht-transfizierten Zellen reduziert war. Dies wurde durch Auszählen der PML-Körperchen in NIC-GFP transfizierten Zellen und nicht-transfizierten Zellen bestätigt (siehe Abb. 5.1.10).

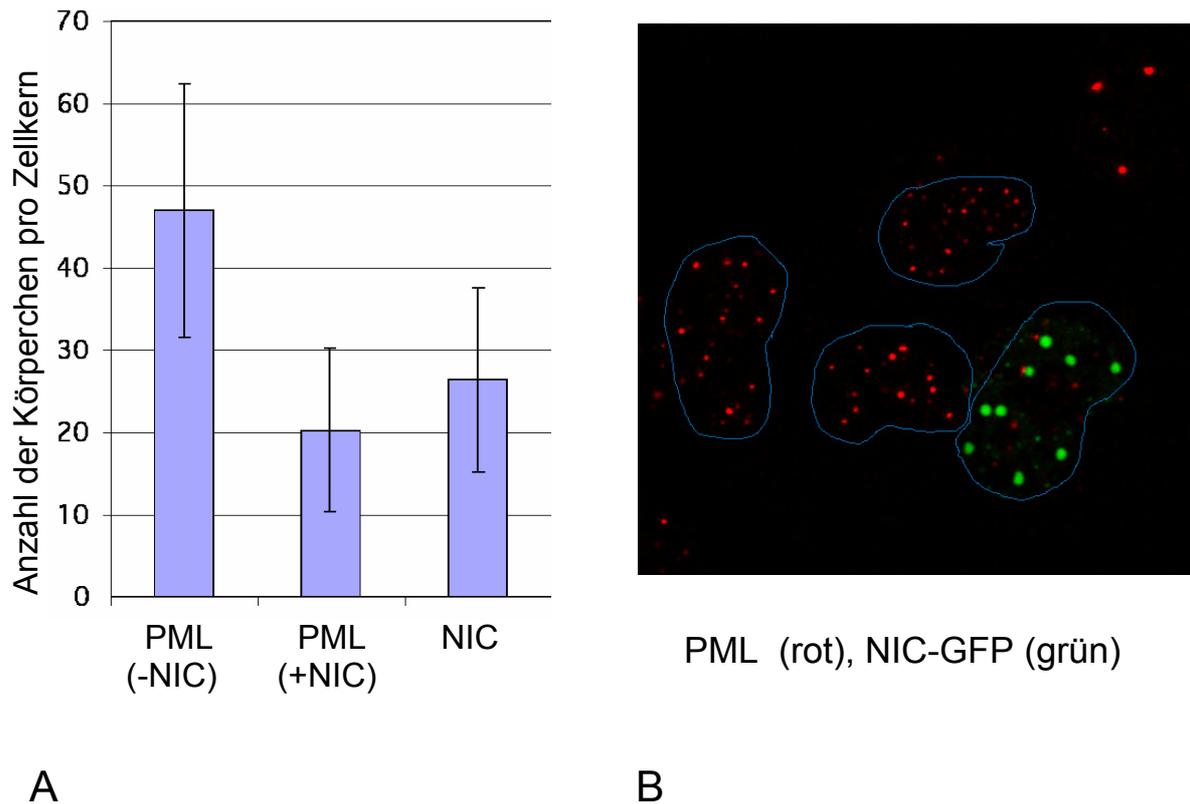


Abb. 5.1.10: Reduzierung der PML-Körperchen in Anwesenheit von NIC-GFP.

A) Die Anzahl der PML-Körperchen in Anwesenheit von NIC-GFP verringert sich um mehr als die Hälfte gegenüber der Anzahl von PML-Körperchen in Abwesenheit von NIC-GFP. B) Übersicht von Zellkernen mit und ohne NIC (grün) und endogenem PML (rot). Gezeigt ist ein konfokaler Schnitt durch vier Zellen, die Zellkerne sind zur besseren Erkennung mit einem blauen Strich umrandet.

Aufbauend auf diesem Ergebnis wurde als nächstes untersucht, ob sich auch die Anzahl der NIC-Körperchen in Abhängigkeit (bei Abwesenheit) der PML-Körperchen ändert. Dafür wurden U2OS-Zellen auf Deckgläsern kultiviert, mit NIC-GFP und kommerziell erworbener PML-siRNA ko-transfiziert, und zur Kontrolle der RNA-Interferenz von PML mit einem PML Antikörper immungefärbt. Da PML essenziell für die Bildung von PML-Körperchen ist, kann davon ausgegangen werden, dass diese bei Abwesenheit von PML nicht gebildet werden (Zhong et al. 2000). Es wurde beobachtet, dass sich NIC auch in Abwesenheit von PML in den charakteristischen NB anreichert (siehe Abb 5.1.11). Die NIC-NB wurden in PML-knockdown-Zellen und Kontrollzellen quantifiziert. Dabei zeigte sich, dass sich in Abwesenheit von PML im Schnitt circa 10 NIC-Körperchen pro Zellkern mehr bilden als in Anwesenheit von PML (siehe Abb. 5.1.12).

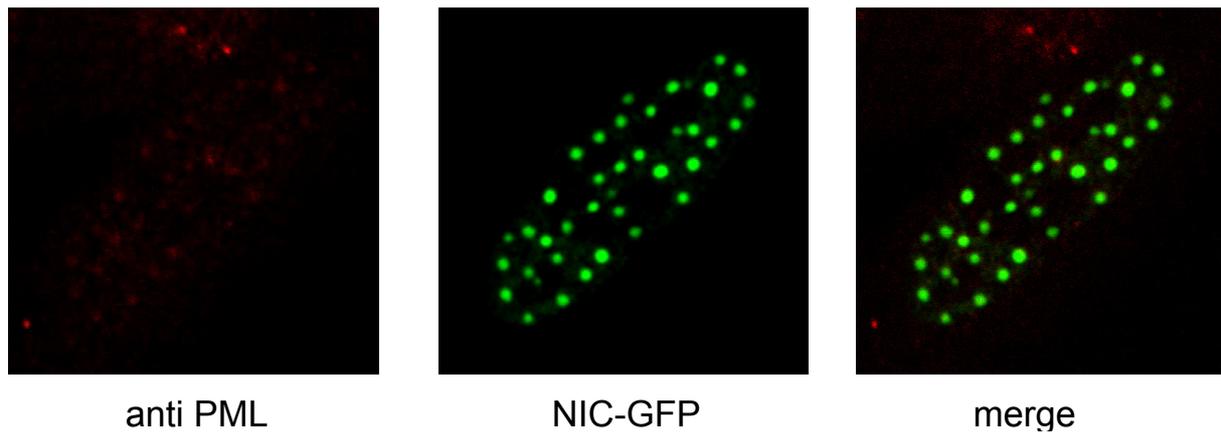


Abb. 5.1.11: NIC-Körperchen in Abwesenheit von PML-Körperchen.

Durch RNAi von PML wurde die Bildung von PML-Körperchen in U2OS-Zellen verhindert, was aber keinen Einfluß auf die Lokalisation von NIC in NB hatte.

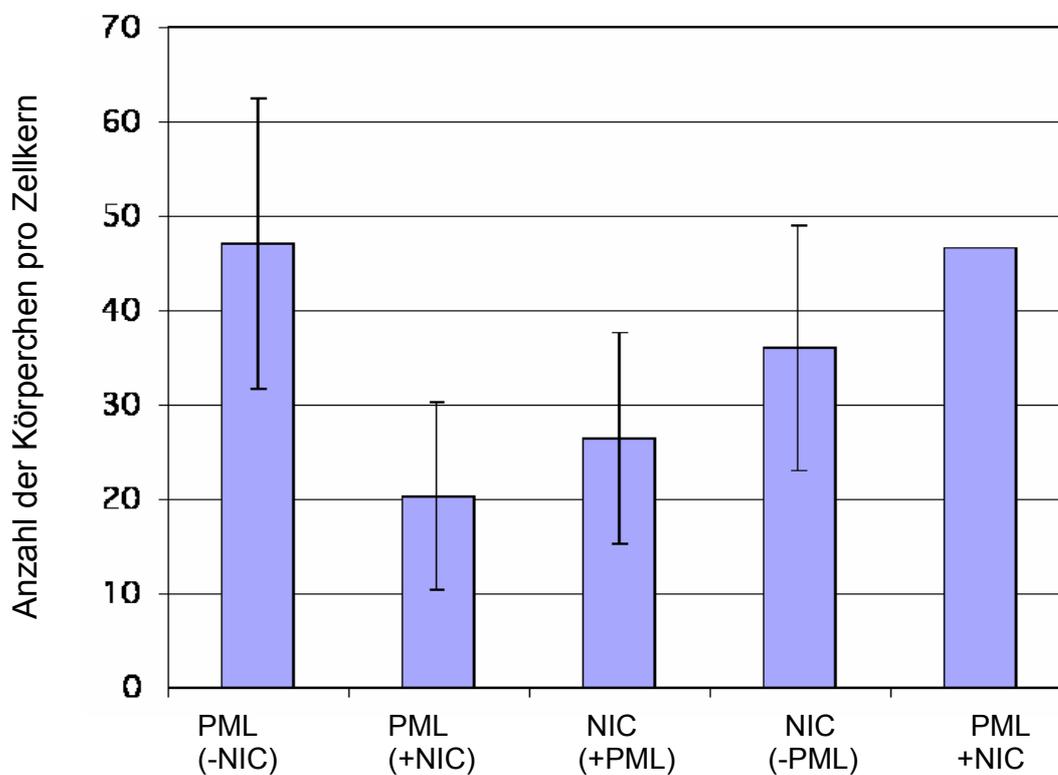


Abb. 5.1.12: Die Anzahl der PML-Körperchen und der NIC-Körperchen in gegenseitiger Abhängigkeit.

Die Anzahl der endogenen PML-Körperchen verringert sich bei der Anwesenheit von NIC statistisch signifikant um über 50%. Die Anzahl der NIC-Körperchen erhöht sich bei der Abwesenheit von endogenem PML um circa 10 pro Zellkern. Werden NIC-Körperchen und PML-Körperchen eines Zellkerns zusammengezählt, so entspricht die Summe der Anzahl von endogenen PML-Körperchen bei Abwesenheit von NIC.

In einem quantitativen real-time-PCR-Experiment wurde als nächstes untersucht, ob die Abnahme der Zahl an PML-Körperchen durch eine NIC-vermittelte

Veränderung der PML-Expression verursacht wird. Die Transkriptionsrate von PML blieb jedoch bei NIC-GFP transfizierten Zellen und nicht transfizierten Zellen gleich (siehe Abb 5.1.13), während Kontrollen mit den bekannten Notch 1-Zielgenen HEY und Jag1 eine NIC-abhängige Aktivierung zeigten. Die Ergebnisse dieser Zielgene bestätigten das Microarray-Experiment (Abb. 5.1.2).

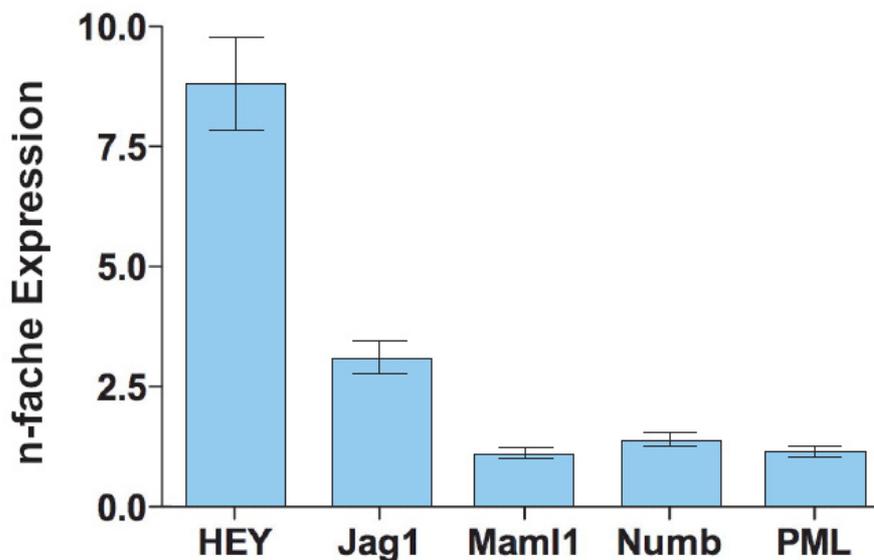


Abb. 5.1.13: Quantitative PCR zur Untersuchung der PML Repression.

Gesamt-mRNA von NIC-transfizierten U2OS-Zellen und untransfizierten Kontrollzellen wurde gereinigt, revers transkribiert, und der Expressionslevel von fünf Genen in einem quantitativen Real-Time-PCR-Experiment quantifiziert. Untersucht wurden die Gene HEY und Jag1, die im Microarray deutlich induziert waren, Maml1, das leicht reprimiert war, und Numb, das unverändert war. Die Expression von PML war in NIC-exprimierenden Zellen unverändert.

Die bisher gezeigten Lokalisationsversuche von NIC waren alle mit Fusionsproteinen von NIC mit dem grün fluoreszierenden Protein (GFP) durchgeführt worden. Um einen Einfluß von GFP auf die Lokalisation von NIC auszuschließen, wurden U2OS-Zellen auf Deckgläschen mit einem alternativen Expressionskonstrukt für myc-getaggtetes NIC (NIC-myc) und PML-GFP ko-transfiziert, anschließend mit einem myc-Antikörper immungefärbt und mikroskopisch analysiert (siehe Abb. 5.1.14). Auch hier konnte keine Kolokalisation zwischen den NIC- und PML-Körperchen festgestellt werden. Bei genauerem Betrachten kann sogar beobachtet werden, dass die PML-Körperchen von NIC ausgespart bleiben. Interessanterweise zeigte sich bei diesem Versuch, daß die Zahl der NIC-Körperchen durch die starke Expression

von PML deutlich reduziert ist. Dies wurde in nahezu allen PML-transfizierten Zellen beobachtet; in vielen dieser Zellen war NIC auch nur homogen im Zellkern verteilt, und es konnten keine NIC-Körperchen beobachtet werden. Dies bestätigt noch einmal unabhängig den Zusammenhang zwischen PML und NIC-Körperchen.

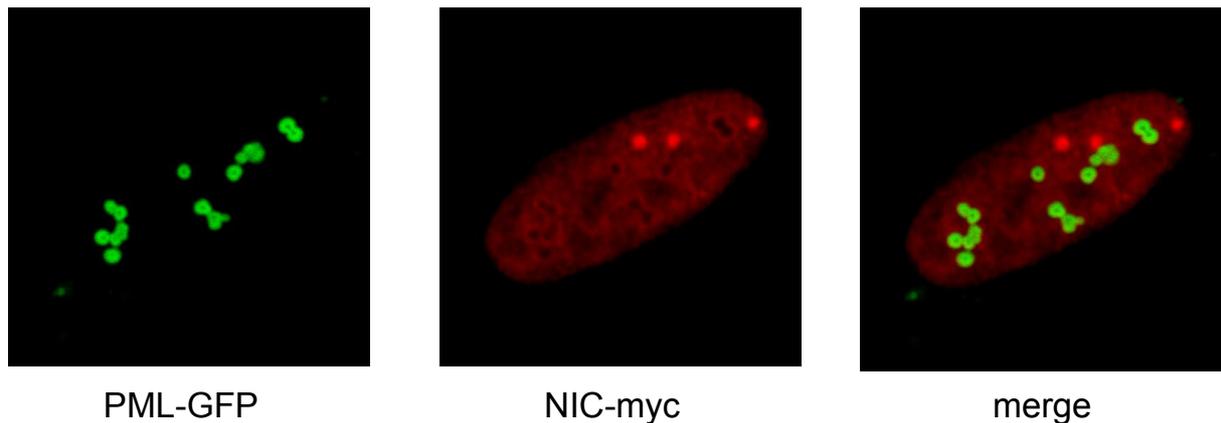


Abb. 5.1.14: Lokalisationsvergleich zwischen PML-GFP und NIC-myc.

NIC-myc (rot) und PML-GFP (grün) ko-transfizierte U2OS-Zellen zeigen keine Kolokalisation zwischen PML- und NIC-Körperchen. Gezeigt ist ein konfokaler Schnitt durch eine typische Zelle. Beachte die geringe Zahl an NIC-Körperchen im Vergleich zu Abb. 5.1.6, in der endogenes PML untersucht wurde.

Eine spezifische PML Isoform, PML3, ist dafür bekannt daß sie andere Proteine in die PML-Körperchen rekrutiert (Fogal et al. 2000; Wu et al. 2009). Es bestand daher die Möglichkeit, dass NIC durch eine erhöhte Expression von PML3 ebenfalls in PML-Körperchen rekrutiert wird. Um dies zu untersuchen, wurden U2OS-Zellen transient mit NIC-GFP und PML3 ko-transfiziert und anschließend mit einem PML-Antikörper immungefärbt, der alle PML-Isoformen erkennt (siehe Abb. 5.1.15).

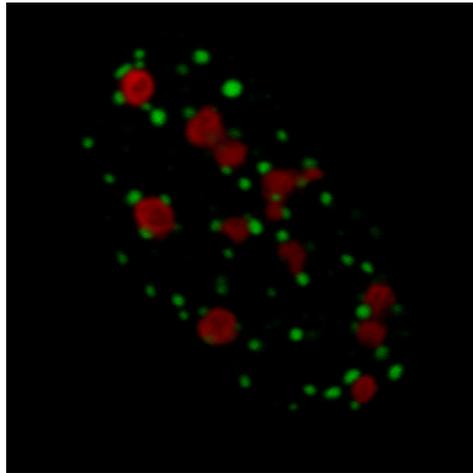


Abb. 5.1.15: Lokalisationsvergleich zwischen NIC und PML3.

U2OS-Zellen wurden transient mit NIC-GFP und PML3 ko-transfiziert und anschließend mit einem PML-Antikörper immungefärbt. NIC (grün) lokalisiert auch in diesem Fall nicht in den PML-Körperchen (rot).

Es konnte jedoch auch in diesem Fall keine Rekrutierung von NIC in die PML-Körperchen festgestellt werden. Es wurde allerdings in der Mehrzahl der Zellen beobachtet, dass die NIC-Körperchen bevorzugt an der Peripherie der PML-Körperchen vorkommen.

5.2 Lokalisation und Aktivität von Protein-Arginin-Methyltransferasen der PRMT-Familie

5.2.1 Lokalisation von PRMT1 und PRMT4 in verschiedenen Zelltypen

Die Lokalisation von PRMT1 wurde in der Literatur bisher sehr unterschiedlich beschrieben (Tang et al. 1998; Frankel et al. 2002; Cote et al. 2003). Der Grund für diese Unterschiede war vor Beginn der vorliegenden Arbeit unbekannt. Eine Durchsicht der relevanten Publikationen zeigte jedoch, daß die Lokalisationsstudien verschiedener Arbeitsgruppen sehr oft in unterschiedlichen Zelltypen durchgeführt worden waren. Um zu testen, ob die Lokalisation mehrerer PRMTs möglicherweise vom Zelltyp abhängig ist, wurde die Lokalisation in diversen Zelltypen genauer betrachtet. Dafür wurden die Zelltypen HEK293, U2OS, HeLa und MCF7 mit PRMT1-GFP bzw. PRMT4-GFP Expressionsplasmiden stabil

transfiziert, unter Standardbedingungen kultiviert und mikroskopisch analysiert (siehe Abb. 5.2.1). Dabei zeigte sich, daß sowohl PRMT1 als auch PRMT4 in HEK293-Zellen überwiegend im Zytoplasma lokalisiert. Auch in U2OS-Zellen zeigte sich für PRMT1 eine vorwiegend zytoplasmatische Lokalisation, während für PRMT4 sowohl Zellen mit einer zytoplasmatischen als auch Zellen mit einer nukleären Lokalisation beobachtet werden konnte. Ferner ließ sich in einigen U2OS-Zellen eine annähernd gleichförmige Verteilung von PRMT4 zwischen Zytoplasma und Zellkern feststellen.

Eine vornehmlich zytoplasmatische Lokalisation von PRMT1 konnte ebenfalls in HeLa Zellen beobachtet werden. PRMT4 zeigte in HeLa Zellen hingegen im Vergleich zu HEK293 und U2OS-Zellen eine Anreicherung im Zellkern. Die gleiche Anreicherung war in noch wesentlich stärkerem Masse auch in MCF7 Zellen zu beobachten. Überdies lokalisiert PRMT1 in MCF7-Zellen im Gegensatz zu allen anderen betrachteten Zelllinien im Zellkern.

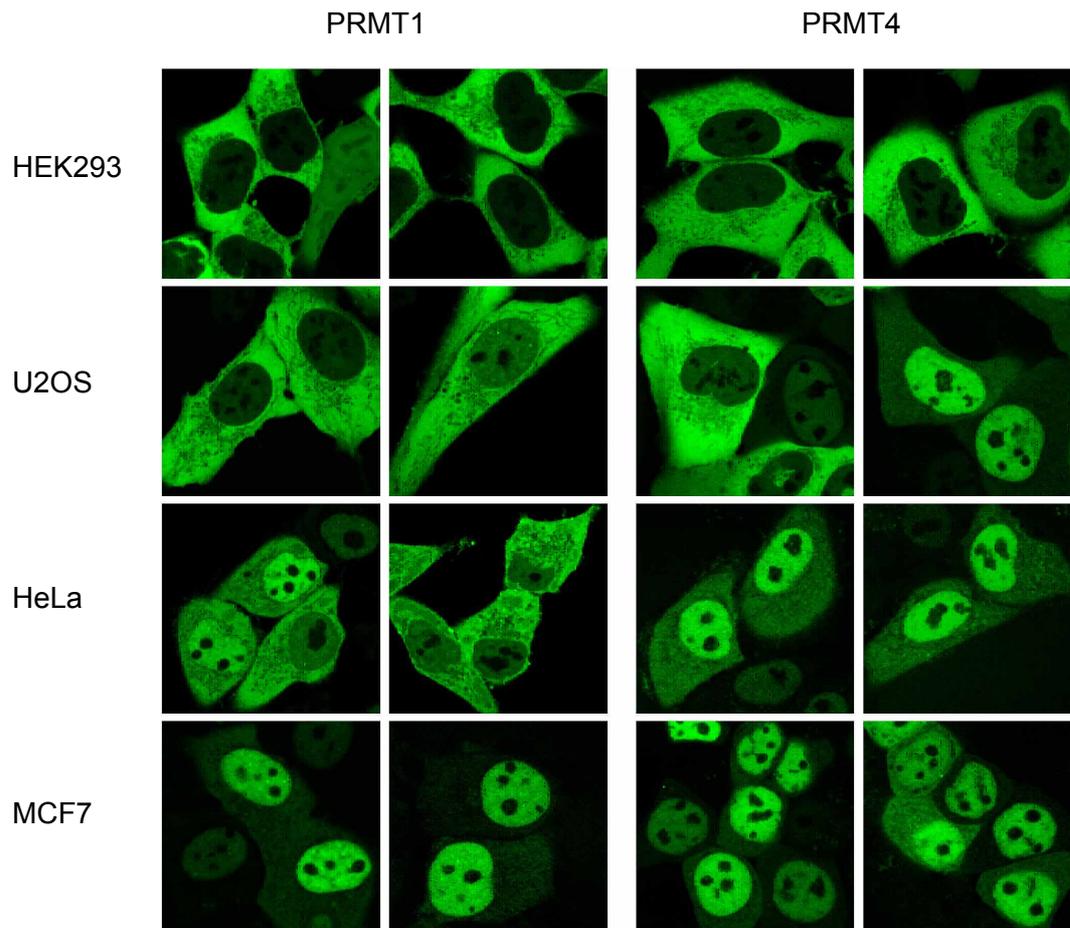


Abb. 5.2.1: Lokalisation von PRMT1 und PRMT4 in verschiedenen Zelltypen.

PRMT1-GFP bzw. PRMT4-GFP wurde stabil in die jeweiligen Zelllinien transfiziert und mikroskopisch analysiert. Gezeigt sind Sichtfelder mit typischen Zellen, jeweils als konfokale optische Schnitte.

5.2.2 Lokalisation von PRMT4 im Zellzyklus

Die unterschiedlichen Phänotypen hinsichtlich der Verteilung von PRMT4 in U2OS-Zellen lassen vermuten, dass die Lokalisation von PRMT4 nicht nur zellspezifisch, sondern auch zellzyklusabhängig ist. Aus diesem Grund wurden stabil transfizierte U2OS-Zellen auf Glasbodenschalen kultiviert und für 20 h mit Aphidicolin bzw. mit Hydroxyharnstoff inkubiert und anschließend mikroskopisch analysiert. Aphidicolin arretiert die Zellen am G1/S Übergangspunkt (Pedrali-Noy et al. 1980). Hydroxyharnstoff arretiert die Zellen in der frühen S-Phase (Timson 1975). Beide Synchronisationsmethoden sollten die Zellen also zum ungefähr gleichen Punkt im Zellzyklus anhalten, und damit vergleichbare Resultate liefern. Die mikroskopische Analyse der arretierten Zellen zeigte, dass sich PRMT4 am G1/S Übergangspunkt bzw. in der frühen S-Phase vorwiegend im Zellkern

befindet (siehe Abb. 5.2.2), daß die Lokalisation von PRMT4 also tatsächlich im Zellzyklus reguliert wird.

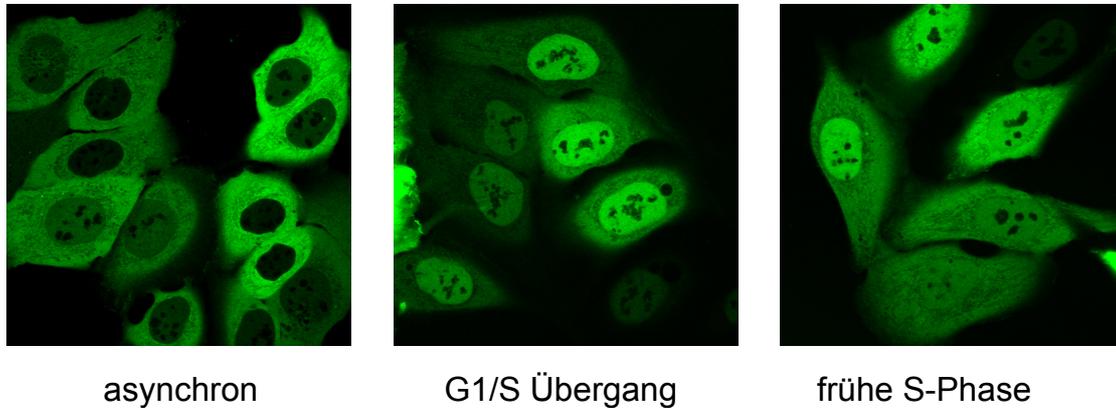


Abb 5.2.2: Lokalisation von PRMT4 am G1/S Übergang bzw. in der frühen S-Phase in U2OS-Zellen.

Um einen Arrest des Zellzyklus am G1/S Übergang bzw. in der frühen S-Phase zu bewirken, wurden U2OS-Zellen 20 h lang mit 5 µg/ml Aphidicolin bzw. in 10 mM Hydroxyharnstoff inkubiert. Bei beiden Verfahren konnte eine Lokalisation des Enzyms vorwiegend im Zellkern beobachtet werden.

Um den Verlauf der Lokalisationsänderung von PRMT4 im Zellzyklus genauer zu untersuchen, wurden PRMT4-GFP exprimierende U2OS-Zellen synchronisiert (siehe 4.2.2.8) und zu verschiedenen Phasen des Zellzyklus analysiert (siehe Abb. 5.2.3). Die Analyse beginnt am G1/S Übergang, der Phase, in der die Zellen arretiert wurden, und erstreckte sich über 24 Stunden nach Entlassen aus dem Zellzyklus-Arrest. Abbildung 5.2.3 zeigt typische Zellen vom Entlassen bis zur darauffolgenden nächsten G1-Phase nach 16.5 Stunden.

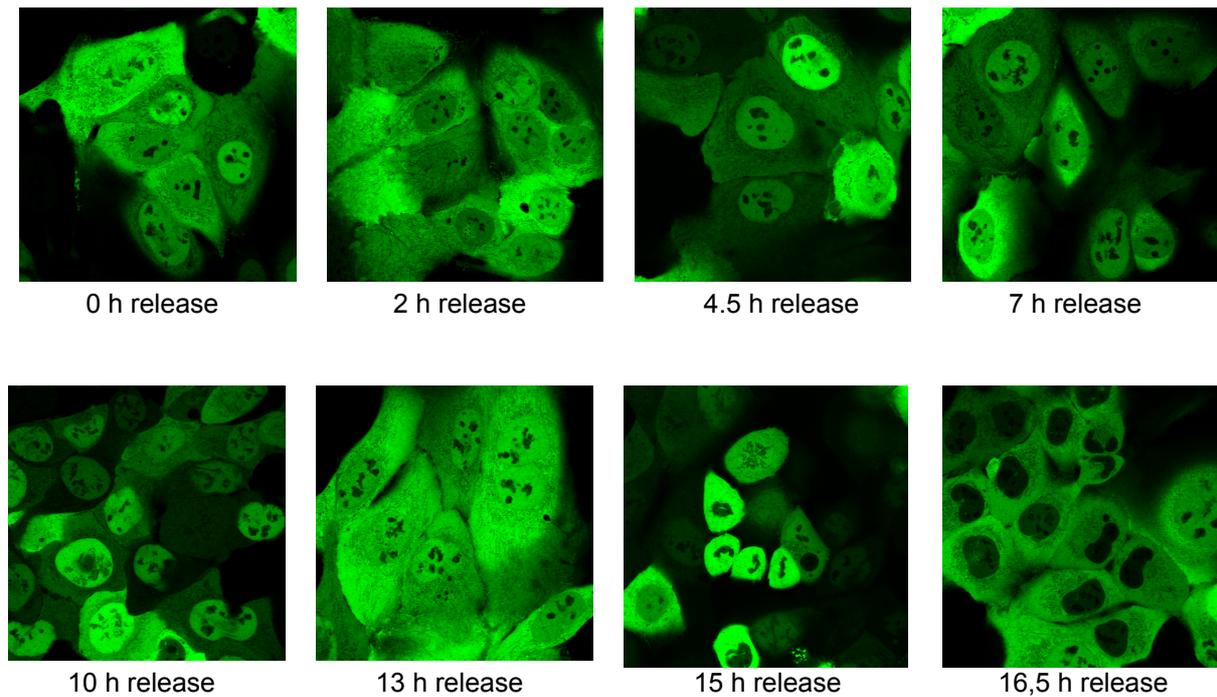


Abb. 5.2.3: Lokalisation von PRMT4 während des Zellzyklus.

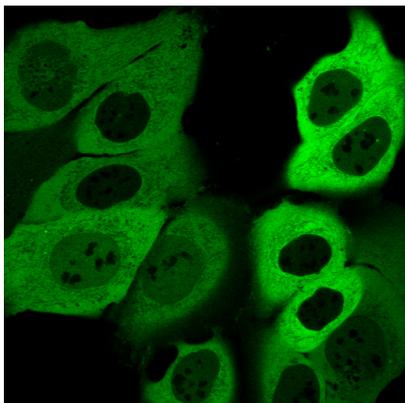
Mit PRMT4-GFP stabil transfizierte U2OS-Zellen wurden mit Aphidicolin am G1/S Übergangspunkt synchronisiert und während des Ablaufs eines kompletten Zellzyklus fluoreszenzmikroskopisch analysiert.

In der frühen S-Phase wurde eine weitgehend homogene Verteilung von PRMT4 zwischen Zellkern und Zytoplasma beobachtet (siehe Abb. 5.2.3, 0 h release und 2 h release). Im weiteren Verlauf der S-Phase war dann eine zunehmende Verlagerung der Lokalisation in den Zellkern zu beobachten (4,5 h bis 10 h release). In der darauf folgenden G2-Phase verdoppelte bis verdreifachte sich das Volumen der Zelle und PRMT4 war nun wieder gleichmäßig zwischen Zellkern und Zytoplasma verteilt (13 h release). In der Mitose (15 h release) und mit dem Auflösen der Kernhülle war PRMT4 gleichmäßig in der Zelle verteilt, nur die Chromosomen war ausgespart. In der nachfolgenden G1-Phase ist PRMT4 wieder hauptsächlich zytoplasmatisch lokalisiert (16,5 h release). Diese Ergebnisse bestätigen die Hypothese, daß die unterschiedlichen Lokalisationen, die in asynchronen Zellpopulationen beobachtet werden, auf eine zellzyklus-abhängige Umverteilung des Enzyms zurückzuführen ist.

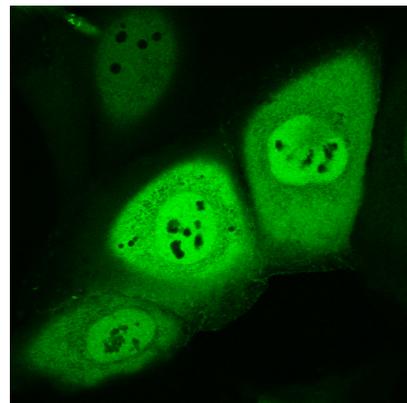
5.2.3 Lokalisation von PRMT4 während der DNA-Reparatur

Die zellzyklus-abhängige Umverteilung von PRMT4 lässt vermuten, daß das Enzym während der Synthesephase im Zellkern benötigt wird. Denkbar ist, daß dies dazu dient, Histone zu methylieren und epigenetische Muster auf das in dieser Phase neu entstehende Chromatin zu übertragen. In weiteren Experimenten sollte getestet werden, ob eine Verlagerung des Enzyms auch dann zu beobachten ist, wenn die DNA geschädigt wird und somit eine DNA-Reparatur (mit der damit zusammen hängenden Neuorganisation des Chromatins) induziert wird.

Um eine Schädigung der DNA zu bewirken, wurden PRMT4-GFP stabil transfizierte U2OS-Zellen mit 10 Gray γ -Strahlung bestrahlt und nach 24 h mikroskopisch analysiert. Für diese Experimente muß beachtet werden, daß U2OS-Zellen trotz ihrer Herkunft aus einem Osteosarkom Wildtyp-p53 exprimiert, das durch eine Schädigung der DNA induziert wird, und die ordnungsgemäße Reparatur derselben koordiniert. Tatsächlich konnten beobachtet werden, dass PRMT4 während der DNA-Reparatur, in der Zeit nach der Bestrahlung hauptsächlich in den Zellkern lokalisiert (siehe Abb. 5.2.4).



unbehandelt



24 h nach Bestrahlung

Abb. 5.2.4: PRMT4 Lokalisation während der DNA-Reparatur.

PRMT4-GFP stabil transfizierte U2OS-Zellen wurden mit 10 Gy γ -Strahlung bestrahlt und 24 h nach der Bestrahlung analysiert. Es ist zu erkennen, dass sich PRMT4 hauptsächlich im Zellkern lokalisiert.

Dieses Experiment zeigt, dass PRMT4 offenbar auch in der DNA-Schadensantwort in den Zellkern rekrutiert wird. Weitere Experimente, auch mit anderen Auslösern von DNA-Schäden, werden in Zukunft zeigen, welche Rolle PRMT4 (und möglicherweise auch andere PRMTs) in diesem Prozeß spielen.

5.2.4 Komplexbildung von PRMT4

Alle in der Literatur verfügbaren Daten legen nahe, dass PRMT4 ähnlich wie PRMT1 und möglicherweise andere PRMTs als Multimer vorliegt. Zudem war bekannt, daß PRMT4 und PRMT1 in unbekannter Art und Weise zusammenarbeiten, um die transkriptionelle Aktivierung durch p53 nach DNA-Schädigung zu regulieren (An et al. 2004). Es erschien also plausibel, daß PRMT1 und PRMT4 auch in vivo einen heteromultimeren Komplex ausbilden können. Um dies näher zu untersuchen, wurden mit PRMT4-GFP stabil transfizierte U2OS-Zellen unter Standardbedingungen kultiviert und lysiert. Aus dem Lysat wurde mit einem anti-GFP Antikörper PRMT4-GFP immungefällt. Der präzipitierte Komplex wurde durch PAGE aufgetrennt und einer Westernblot-Analyse auf endogenes PRMT1 und 4 unterzogen. Für die Untersuchung mitotischer Zellen wurden diese vor der Zell-Lyse mittels Nocodazol in der Mitose arretiert. In der Immunfärbung wurde der Komplex auf endogenes PRMT4 und PRMT1 untersucht. Dabei wurde festgestellt, dass sich sowohl PRMT1 als auch endogenes PRMT4 im Komplex mit PRMT4-GFP befindet. Weiterhin wurde festgestellt, dass sich endogenes PRMT4 während der Mitose nicht mehr im Komplex mit PRMT4-GFP befindet (siehe Abb. 5.2.5). Dies bestätigt frühere Daten, dass die PRMT4-Multimere in der Mitose durch Phosphorylierung reguliert dissoziieren, und dient damit auch als positive Kontrolle, dass die in diesen Experimenten gemessenen Wechselwirkungen des GFP-Fusionsproteins demjenigen des endogenen Proteins entsprechen.

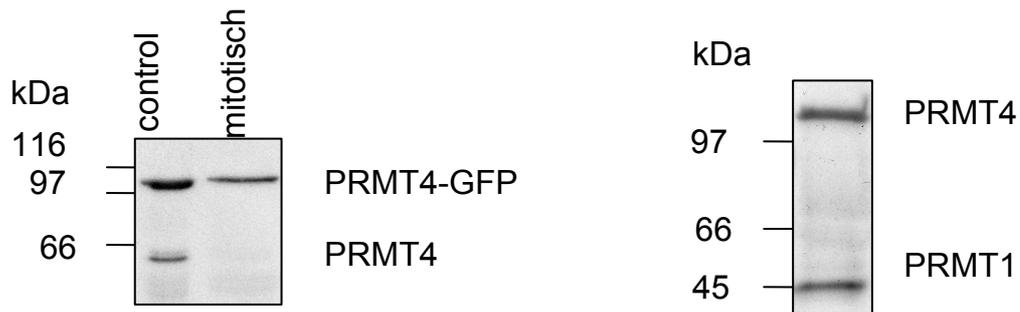


Abb. 5.2.5: Komplexbildung von PRMT4.

Aus PRMT4-GFP stabil transfiziertem U2OS Zellysat wurde PRMT4-GFP mittels eines GFP-Antikörpers immungefällt. Anschließend wurde eine Westernblot Analyse zur Untersuchung auf ein Ko-Fällung von endogenem PRMT4 bzw. PRMT1 durchgeführt.

Zur weiteren Untersuchung der unterschiedlichen Komplexe in mitotischen Zellen und asynchronen Zellen wurden Ganzzellextrakte von stabil PRMT4-GFP exprimierenden U2OS-Zellen beider Proben (mitotisch und asynchron) auf einen Glyzeringradienten aufgetragen und durch Zentrifugation nach Komplexgröße aufgetrennt. Die unterschiedlichen Fraktionen des Gradienten wurden in einer Western Analyse mit einem GFP-Antikörper auf PRMT4-GFP untersucht (siehe Abb. 5.2.6). In einem weiteren Versuch wurde für beide Proben durch Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie (FCS) die Diffusionsgeschwindigkeit von PRMT4-GFP enthaltenden Komplexen gemessen und daraus die Komplexgröße berechnet (Daten nicht gezeigt). Bei beiden Versuchen ergab sich jedoch kein signifikanter Unterschied zwischen mitotischen und asynchronen Zellen.

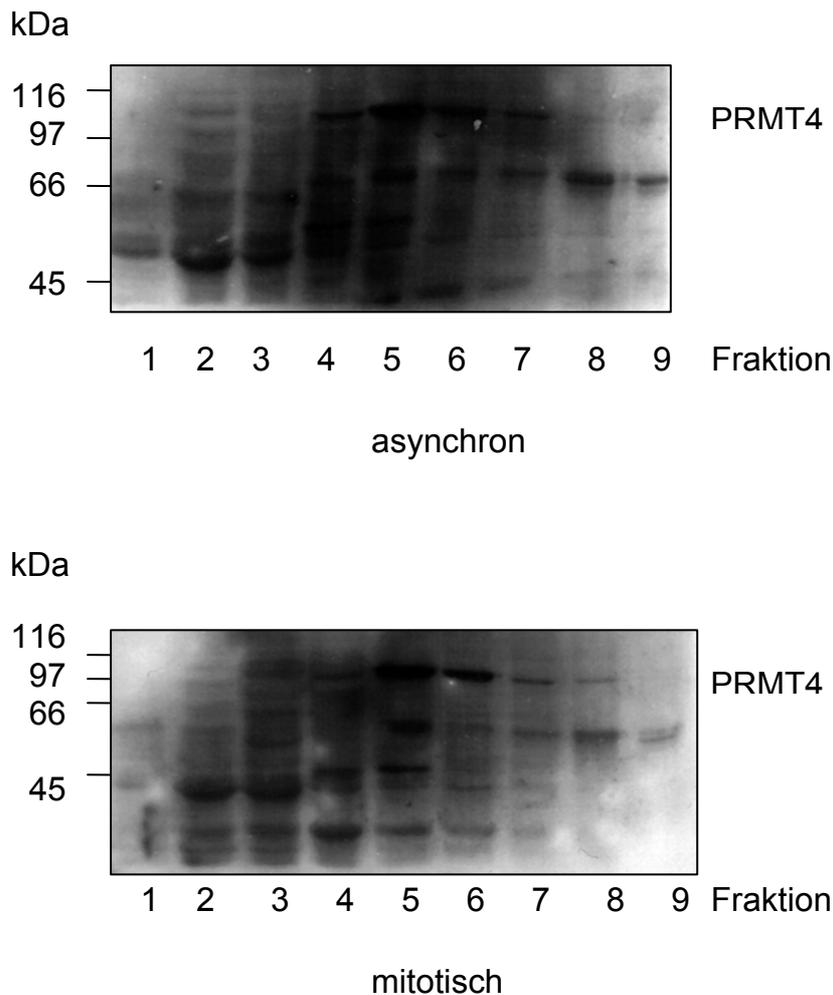


Abb. 5.2.6: Komplexgröße von PRMT4 in der Mitose.

In einem Glyceringradienten wurden die Komplexgrößen von PRMT4 in asynchronen und mitotischen U2OS-Zellen vergleichend untersucht. Es konnte jedoch keine unterschiedliche Komplexgröße festgestellt werden.

5.2.5 Aktivität von PRMT4 im Verlauf des Zellzyklus

Für die Untersuchung der Aktivität von PRMT4 während der Mitose wurden PRMT4-GFP stabil transfizierte U2OS-Zellen mittels Nocodazol in der Mitose arretiert. Das immungefällte PRMT4 wurde zusammen mit rekombinatem Histon H4 bzw. mit hypomethyliertem Ganzzellextrakt (siehe 4.2.2.2) als Substrat in einem Methylierungsassay (siehe 4.2.5.6) eingesetzt. Anschließend wurden die Proben durch SDS-PAGE aufgetrennt und mittels Fluorographie visualisiert. Sowohl Histon H4 als auch der hypomethylierte Ganzzellextrakt werden während der Mitose durch PRMT4 deutlich weniger methyliert, als in asynchronen Zellen. Dies zeigt, dass die Aktivität von PRMT4 in mitotischen Zellen geringer ist als in asynchronen Zellen (siehe Abb. 5.2.7).

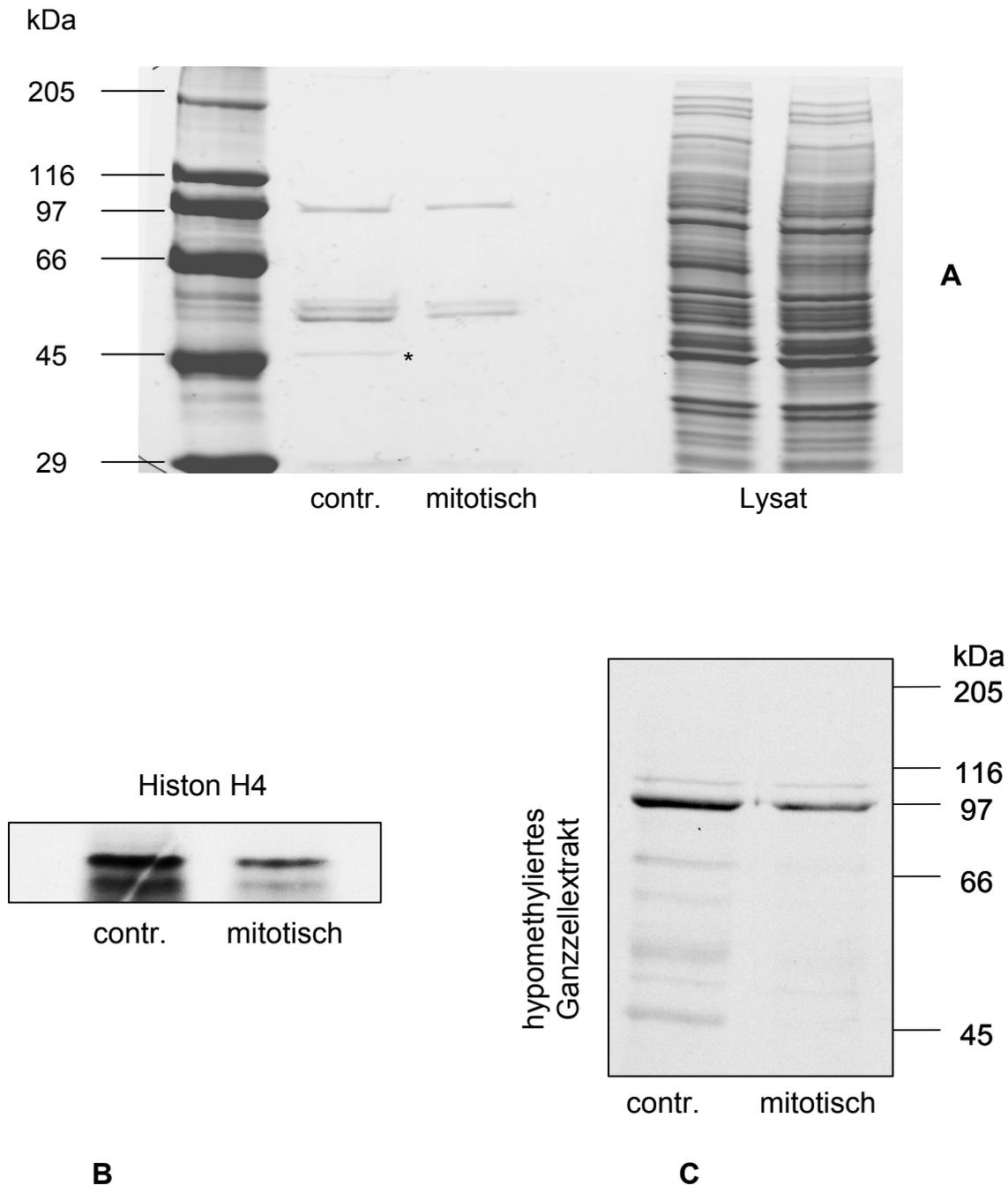


Abb. 5.2.7: Aktivität von PRMT4 während der Mitose.

PRMT4 aus asynchronen Zellen und aus Mitose-arretierten U2OS-Zellen wurde immungefällt und anschließend auf ein SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen und mit Coomassie gefärbt (A). Die Proben wurden ebenfalls mit Histon H4 (B) und mit hypomethyliertem Ganzzell-extrakt (C) als Substrat in einem Methylierungsassay eingesetzt. Bei mitotischen Zellen ist die Aktivität von PRMT4 deutlich geringer als in asynchronen Zellen.

Es wurde beobachtet, dass in asynchronen Zellen ein Protein mit einer Größe von ca. 45 kDa ebenfalls methyliert wird (gezeigt durch einen Stern in Abb 5.2.7 A, zur Methylierung dieses Proteins vergleiche Abb. 5.2.9). Nach einer MALDI-

TOF Analyse wurde dieses Protein als Aktin identifiziert, und die Identifikation in einer Westernblot-Analyse bestätigt. Dieses Ergebnis war sehr überraschend, weil Aktin bisher selbst in Proteomics-Ansätzen nicht als potentielles Substrat einer Arginin-Methylierung aufgefallen war. In einem weiteren Methylierungsassay wurde daher die Methylierung von Aktin in asynchronen und mitotischen Zellen näher untersucht. Des weiteren wurde in einer Probe auf die Zugabe von Substrat verzichtet, um die Selbstmethylierung von PRMT4 zu untersuchen (siehe Abb. 5.2.8).

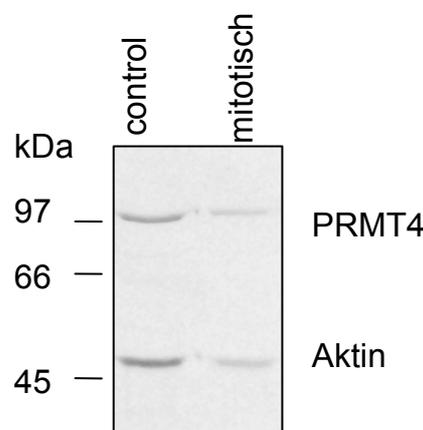


Abb. 5.2.8: Aktinmethylierung und Selbstmethylierung von PRMT4.

PRMT4-GFP stabil transfizierte U2OS-Zellen wurden mit Nocodazol in der Mitose arretiert, lysiert, mit einem GFP Antikörper immungefällt und in einem Methylierungsassay ohne Zugabe von Substrat eingesetzt. Es wurde beobachtet, dass die Selbstmethylierung in mitotischen Zellen im Vergleich zu asynchronen Zellen abnimmt. Des weiteren wurde festgestellt, dass Aktin ebenfalls von PRMT4 methyliert wird.

Während der mehrfachen Wiederholung dieser Experimente zeigte sich, dass die Ergebnisse hinsichtlich der Methylierungsaktivität bei unterschiedlich konfluenter Zelldichte variieren. Dies wurde dann in einem separaten Versuch detaillierter untersucht. Dafür wurden stabil PRMT4-GFP exprimierende U2OS-Zellen in unterschiedlichen Dichten ausplattiert, so dass zum Zeitpunkt der Lyse die Zellen zum einen zu 100% konfluent und zum anderen zu 50% konfluent waren. Bei der Lyse wurde darauf geachtet, dass für beide Proben die gleiche Gesamtzellzahl eingesetzt wurde. Für die anschließenden Methylierungsassays wurden Histon H3 und H4 als Substrat verwendet. Dabei ließ sich beobachten, dass die Aktivität von PRMT4 bezüglich der Histonmethylierung bei einer dichten Population der Zellen

abnimmt. Bezüglich der Selbstmethylierung konnte kein Unterschied festgestellt werden (siehe Abb. 5.2.9). Methyliertes Aktin konnte reproduzierbar nur in den Proben aus konfluenten Zellen nachgewiesen werden.

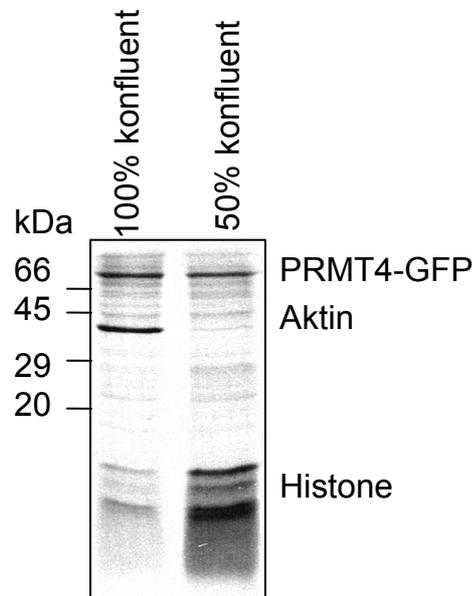


Abb. 5.2.9: PRMT4 Histonmethylierungsaktivität in Abhängigkeit der Zelldichte.

PRMT4 aus unterschiedlich dicht ausplattierten PRMT4-GFP exprimierenden U2OS-Zellen wurde mit Histon H3 und H4 als Substrat in einem Methylierungsassay eingesetzt und die Methylierung durch Fluorographie visualisiert. Die Methylierung der Histone in 50% konfluenten Zellen ist deutlich höher als in 100% konfluenten Zellen.

Beim genaueren Betrachten mehrerer Westernblots wurde beobachtet, dass PRMT4 eine Doppelbande bildet. Daraufhin wurde eine biochemische Fraktionierung stabil PRMT4 exprimierender Zellen durchgeführt, die Lysate der Zellkernfraktion und der Zytoplasmafraktion getrennt mit GFP-Antikörpern immungefällt, in einer SDS-PAGE aufgetrennt und mit Coomassie gefärbt. Dabei zeigte sich, dass nukleäres PRMT4 gegenüber zytoplasmatischem PRMT4 langsamer im Gel migriert (siehe Abb. 5.2.10).

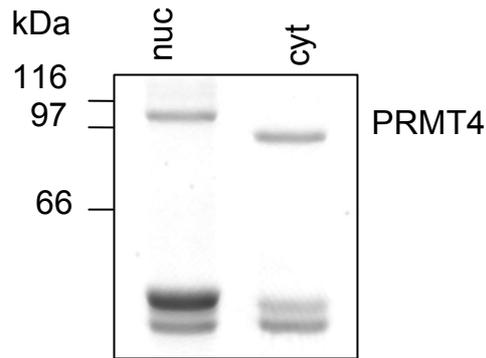


Abb. 5.2.10: Die nukleären und zytoplasmatischen Populationen von PRMT4 unterscheiden sich in der Migration auf SDS-Gelen.

Mit PRMT4-GFP stabil transfizierte U2OS-Zellen wurden fraktioniert. Das PRMT4 der Zellkernfraktion und der Zytoplasmafraktion wurde mit einem GFP Antikörper immunpräzipitiert und im Westernblot analysiert. Dabei wurde beobachtet, dass nukleäres PRMT4 im Vergleich zu zytoplasmatischem PRMT4 langsamer migriert, und somit möglicherweise modifiziert ist.

5.3 Methylierung und Komplexbildung von Aktin

Die im vorhergehenden Abschnitt beschriebenen Versuche hatten das unerwartete Ergebnis gegeben, dass Aktin *in vitro* von immungefälltem PRMT4 methyliert werden kann. In weiteren Schritten sollte daher nun auch die Methylierung von Aktin *in vivo* untersucht werden. Dafür wurden mit PRMT4-GFP stabil transfizierte U2OS Zellen lysiert, PRMT4 und Aktin gefällt, durch SDS-PAGE aufgetrennt und einer Westernblot-Analyse unterzogen. Um ein möglichst umfassendes Bild der Methylierung von Aktin zu erhalten, wurden zu diesen Experimenten Antikörper eingesetzt, die entweder symmetrisch oder asymmetrisch methylierte Argininreste erkennen. Da PRMT4 zum Typ I der Methyltransferasen gehört, wäre das erwartete Ergebnis eine asymmetrische Methylierung (siehe 2.2.3). Es zeigt sich jedoch, daß keiner der beiden Antikörper eine Reaktion mit immungefälltem Aktin aufwies; Positivkontrollen für die Antikörper zeigten dagegen eine Vielzahl von methylierten Proteinen in Gesamtzell-Lysat (siehe Abb. 5.3.1). Aus diesem Ergebnis ist zu schließen, daß Aktin *in vivo* entweder gar nicht oder nur zu einem sehr geringen Prozentsatz methyliert wird, oder daß die Methylierung in einem Sequenzkontext erfolgt, den die Antikörper nicht erkennen.

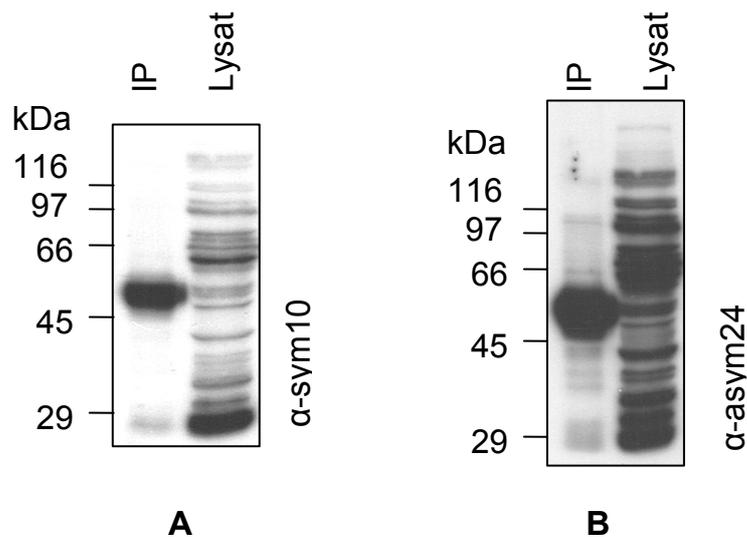


Abb 5.3.1: Untersuchung zur symmetrischen bzw. asymmetrischen Methylierung von Aktin *in vivo*.

Mit PRMT4-GFP co-immungefälltes Aktin aus U2OS-Zellen wurde in einer Westernblot-Analyse auf symmetrische (A) und asymmetrische (B) Methylierung untersucht. Keiner der beiden spezifischen Antikörper konnte jedoch eine Methylierung von Aktin anzeigen. Die starken Banden in den IP-Spuren stammen vom Antikörper, der zur Fällung eingesetzt wurde. Eine Aktin-Bande wäre bei ca. 43kDa zu erwarten.

In zahlreichen Kontrollexperimenten wurde wiederholt beobachtet, dass Aktin aus konfluenten Zellen während eines Standard-Immunfällungsprotokolls präzipitiert, während Aktin auf subkonfluenten Zellen trotz gleicher Gesamt-Proteinmenge nie präzipitierte. Um dies detaillierter zu untersuchen, wurden PRMT4-GFP exprimierende U2OS Zellen mit einer Wachstumsdichte von 100%, 50% und 25% Konfluenz lysiert und gefällt, wobei die Gesamtzellzahl für die Lyse (und somit die Proteinmenge der daraus gewonnenen Lysate) bei allen drei Proben auf gleichem Niveau gehalten wurde. Die Proben wurden einer SDS-PAGE unterzogen und die präzipitierten Proteine mit Coomassie visualisiert. Es wurde festgestellt, dass Aktin nur in Lysaten aus 100% konfluenten Zellen ausfällt (siehe Abb. 5.3.2). Die Identität des gefällten Aktins wurde mittels Westernblot-Analyse mit dem monoklonalen anti-Aktin-Antikörper JLA20 zusätzlich bestätigt (Daten nicht gezeigt).

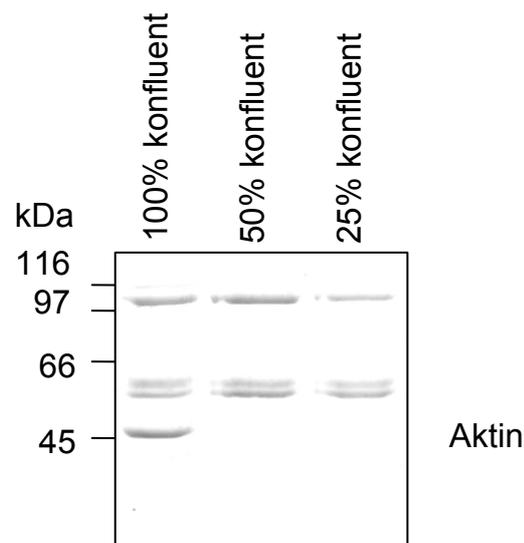


Abb. 5.3.2: Präzipitation von Aktin in Abhängigkeit der Zelldichte.

U2OS Zellen, die PRMT4-GFP stabil exprimieren, wurden unterschiedlich dicht ausplattiert. Nach einer Präzipitation mit anti-GFP Antikörpern und folgender Westernblot-Analyse wurde festgestellt, dass Aktin nur in 100% konfluent gewachsenen Zellen präzipitiert. Kontrollexperimente ohne primären Antikörper zeigten, daß diese Präzipitation unabhängig von PRMT4 ist.

Identische Ergebnisse wurden auch erhalten, wenn die Gesamtzell-Lysate, statt sie mit Antikörpern und ProteinG-Sepharose zu immunfällen, nur für gleich lange Zeit bei 4°C inkubiert und danach abzentrifugiert wurden. Dies zeigt, daß die Präzipitation von Aktin unabhängig von der Immunpräzipitation erfolgt. In weiteren Versuchen wurde dies auch in untransfizierten U2OS-Zellen sowie in HEK293 Zellen untersucht. In den nicht transfizierten U2OS-Zellen konnte obiges Ergebnis bestätigt werden, und Aktin fiel wiederum nur in den 100% konfluenten Zellen aus. Dies zeigt, daß die Präzipitation von Aktin unabhängig von PRMT4 erfolgt, daß aber ein Zusammenhang zwischen Zelldichte und der Polymerisationsfähigkeit von Aktin besteht. Interessanterweise präzipitierte Aktin aus HEK293-Zellen, anders als bei U2OS-Zellen, sowohl bei 100% als auch 50% konfluenten Zellen (siehe Abb 5.3.3). Der Einfluß der Zelldichte auf die Polymerisation von Aktin ist also zelltypabhängig. Weitere Untersuchungen müssen zeigen, ob U2OS-Zellen einen Sonderfall darstellen, und vor allem, wie die Zelldichte-Abhängigkeit der Polymerisation von Aktin reguliert wird.

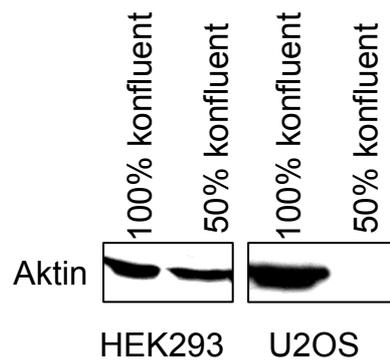


Abb. 5.3.3: Präzipitation von Aktin in U2OS und HEK293 Zellen.

Lysate von untransfizierten U2OS- und HEK293-Zellen in unterschiedlicher Wachstumsdichten wurden einem Standard-IP-Protokoll, allerdings ohne Antikörper und ohne ProteinG-Sepharose, unterzogen und im Westernblot analysiert. Während in HEK293 die Wachstumsdichte der Zellen keine Rolle spielt und sich Aktin in beiden Fällen präzipitieren lässt, fällt Aktin aus U2OS-Zellen nur in 100% konfluent gewachsenen Zellen aus.

Durch Coomassiefärbung des SDS-Acrylamidgels wurde eine weitere Bande mit hohem Molekulargewicht bei 100% konfluent gewachsenen U2OS Zellen gefunden, die bei 50% konfluent gewachsenen Zellen stark reduziert war. In einer Westernblot-Analyse mit zahlreichen im Labor verfügbaren Antikörpern wurde diese Bande als phosphorylierte RNA Polymerase II (Phospho-S5) identifiziert (siehe Abb. 5.3.4).

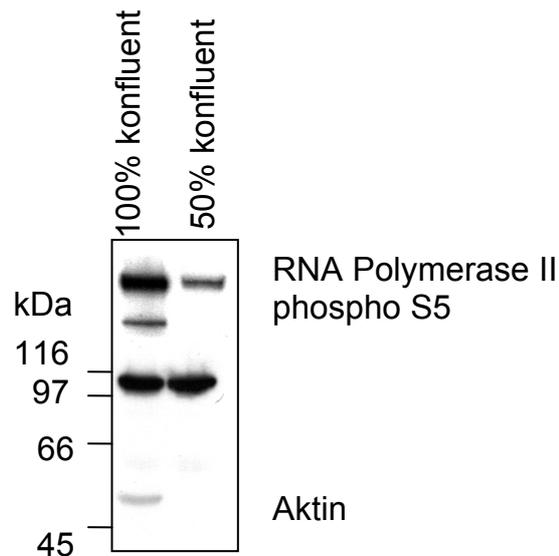


Abb. 5.3.4: Präzipitation von transkriptionell aktiver, phosphorylierter RNA Polymerase II.

Extrakte aus 100% und 50% konfluenten U2OS-Zellen wurden einer Immunfällung gegen PRMT4 unterzogen die gefällten Proteine per SDS-PAGE aufgetrennt und mit Coomassie angefärbt. Die hier gezeigte Westernblot-Analyse identifiziert die oberste Bande als phosphorylierte RNA Polymerase II. Dafür wurden nacheinander ein Aktin-Antikörper, ein GFP-Antikörper und ein RNA Polymerase II phospho S5-Antikörper eingesetzt.

Im nächsten Versuch wurde untersucht, ob das präzipitierte Aktin und die präzipitierte RNA Polymerase II aus dem Zellkern oder dem Zytoplasma stammt. Dafür wurden U2OS Zellen fraktioniert, und die Zellkernfraktion getrennt von der Zytoplasmafraktion einer SDS-PAGE unterzogen und in einer Westernblot-Analyse auf Aktin und RNA Polymerase II Phospho S5 untersucht. Dabei wurde festgestellt, dass sowohl Aktin als auch die RNA Polymerase II ausschließlich aus der Zellkernfraktion präzipitieren (siehe Abb. 5.3.5).

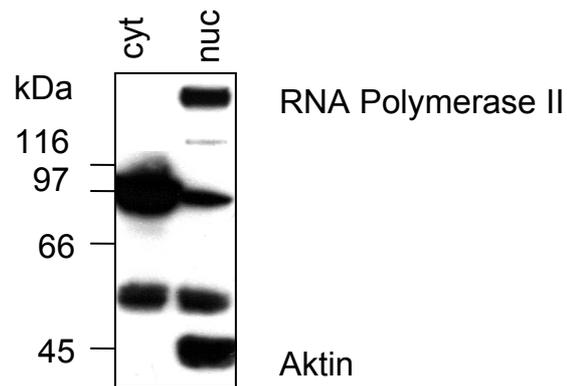


Abb. 5.3.5: Zellfraktionierung zur Untersuchung der Lokalisation von präzipitierbarem Aktin und RNA Polymerase II Phospho S5.

U2OS Zellen wurden fraktioniert und in eine Zellkernfraktion und eine Zytoplasmafraktion aufgeteilt. Die Lysate beider Fraktionen wurden im Westernblot auf Aktin und phosphorylierte RNA Polymerase II analysiert. Dabei wurde festgestellt, dass sowohl Aktin als auch die RNA Polymerase II ausschließlich aus dem Zellkern-Extrakt präzipitiert.

Des weiteren ergab sich die Frage, ob das präzipitierte Aktin filamentöses F-Aktin oder globuläres G-Aktin ist. Um dies zu untersuchen, wurden U2OS Zellen und HEK293 Zellen transient mit zwei verschiedenen Aktin-Mutanten transfiziert. Zum einen mit der Mutante S14C, welche zur Bildung von F-Aktin führt und zum anderen mit der Mutante R62D, welche zur Bildung von G-Aktin führt (Poseern et al. 2002). Nach der Transfektion wurden die Zellen kultiviert, lysiert, einer Präzipitation unterzogen und im Westernblot auf das präzipitierte Aktin untersucht. Hier zeigte sich, dass nur der Wildtyp und das filamentöse F-Aktin, nicht jedoch das globuläre G-Aktin präzipitiert (siehe Abb. 5.3.6). Zwischen den beiden Zelllinien war kein Unterschied zu beobachten.



Abb 5.3.6: Präzipitation von F-Aktin.

HEK293 Zellen wurden mit den Mutanten S14C, welche zur Bildung von F-Aktin führt, bzw. R62D, welche zur Bildung von G-Aktin führt, transient transfiziert, lysiert und das präzipitierte Aktin im Westernblot analysiert. Dabei kann beobachtet werden, dass nur filamentöses F-Aktin präzipitiert.

Um dies zu bestätigen, wurden U2OS Zellen für 4 h mit 10 μ M Cytochalasin D bzw. mit 10 μ M Latrunculin B inkubiert. Beide Substanzen depolymerisieren F-Aktin (Wodnicka et al. 1992; Alessa and Kropf 1999). Für den Versuch wurden jeweils zu 100% konfluent gewachsene Zellen und zu 50% konfluent gewachsene Zellen verwendet. Anschließend wurden die Zellen lysiert, das Lysat einer Präzipitation unterzogen und im Westernblot auf Aktin und phosphorylierte RNA Polymerase analysiert. Das Ergebnis zeigt, dass das depolymerisierte Aktin nicht mehr präzipitiert. Ebenfalls präzipitiert die RNA Polymerase II nur in den unbehandelten Zellen (siehe Abb. 5.3.7).

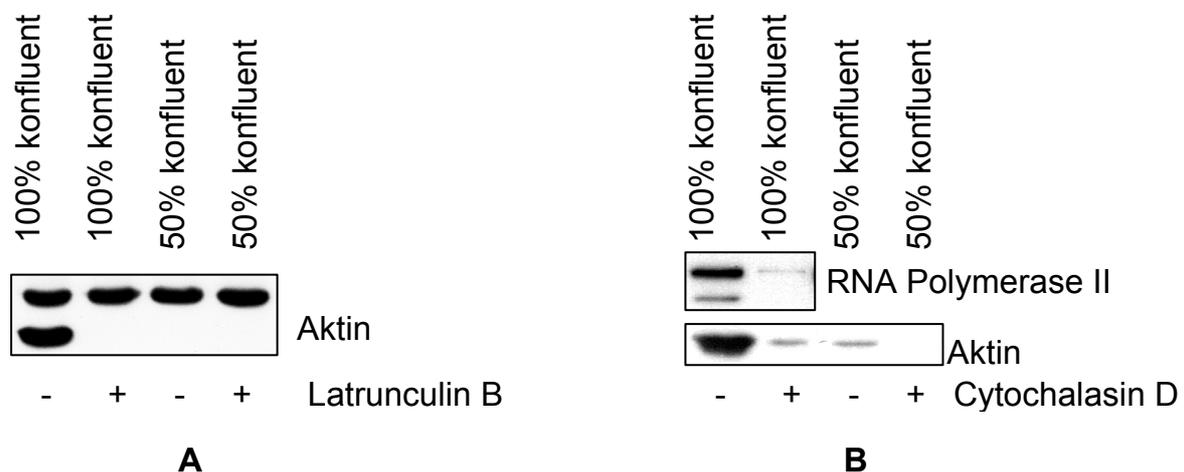


Abb. 5.3.7: Präzipitation von depolymerisiertem Aktin

100% konfluent gewachsene U2OS Zellen und 50% konfluent gewachsene U2OS Zellen wurden jeweils mit Latrunculin B (A) bzw. Cytochalasin D (B) zur Depolymerisation von Aktin inkubiert. Das präzipitierte Aktin und die präzipitierte RNA Polymerase II wurden in einem Westernblot analysiert. Beide Präzipitationen (die von Aktin und die der RNA Polymerase II) finden nur bei polymerisiertem Aktin und in Extrakten aus 100% konfluenten Zellen statt.

Ob die Präzipitation von Aktin eventuell von dessen Methylierung abhängt, wird in einem weiteren Experiment untersucht. Dafür wurden U2OS Zellen transient mit einer R183W-Mutante von Aktin („MG-Aktin“) transfiziert (Procaccio et al. 2006). Bei dieser Mutante ist ein Arginin, welches eine der wenigen möglichen Methylierungsstellen für PRMTs darstellt, zu Tryptophan, mutiert. Das Zelllysate

wurde nach einer Präzipitation durch SDS-PAGE aufgetrennt und im Westernblot auf präzipitiertes Aktin analysiert (siehe Abb. 5.3.8).

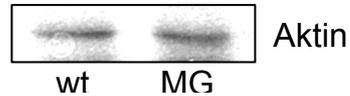


Abb. 5.3.8: Präzipitation von Aktin mit einer R183W-Mutation.

U2OS Zellen wurden mit MG-Aktin-YFP transient transfiziert. Nach der Präzipitation wurde das Zelllysate im Westernblot auf Aktin analysiert.

Es wurde jedoch kein Unterschied zwischen dem Wildtyp Aktin und mutiertem Aktin festgestellt. Weitere Untersuchungen mit Mutanten für andere potentielle Methylierungsstellen werden zeigen müssen, ob Aktin in vivo methyliert wird und diese Methylierung einen Einfluß auf die Polymerisation von Aktin auswirkt.

6 Diskussion

Das Ziel der Arbeit ist die Untersuchung genregulierender Faktoren am Beispiel von Notch1, PRMT4 und Aktin. Es wurde dabei besonders deren räumliche Anordnung in der Zelle sowie deren Aktivität und Komplexbildung untersucht.

6.1 Lokalisation und Mobilität von Notch 1 Intra Cellular (NIC)

6.1.1 Bildung von nukleären Körperchen und deren Lokalisation

Notch 1 ist ein für Differenzierungsprozesse essentieller Transmembran-Rezeptor, der an vielen Entscheidungen des Zellschicksals während der Entwicklung und Organbildung beteiligt ist. Entscheidend für die Funktion von Notch ist der modulare Aufbau des Proteins, der in der Einleitung dieser Arbeit näher beschrieben wurde. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konzentrierten wir uns speziell auf die intrazelluläre Domäne des Proteins (NIC, notch intra cellular), die für die Regulation der Genexpression verantwortlich ist. Diese Domäne ist im inaktivierten Zustand zusammen mit dem Rest des Proteins an der Zytoplasmamembran lokalisiert, räumlich getrennt von den regulatorischen DNA-Sequenzen im Zellkern, und daher transkriptionell neutral. Erst die Bindung von Ligandenproteinen an den extrazellulären Teil von Notch 1 führt zu einer Konformationsänderung des Proteins und nachfolgend einer proteolytischen Spaltung, wodurch die intrazelluläre Domäne vom Rest des Proteins getrennt wird. Die freigesetzte Domäne, die ein Kernlokalisierungssignal besitzt, wird in den Zellkern transportiert, wo es dann weitere Faktoren rekrutiert und Notch-spezifische Zielgene aktiviert.

In den Ergebnissen von 5.1 wurde gezeigt, dass NIC in HEK293- und in U2OS-Zellen im Zellkern in „nuclear bodies“ lokalisiert. Interessanterweise kann NIC seinen bekannten Ko-Transkriptionsaktivator RBP-Jk in diese nuclear bodies rekrutieren, während der Faktor in Abwesenheit von NIC homogen im Zellkern

verteilt vorliegt. Dies zeigt, zusammen mit der durch Microarrays und quantitativer PCR bestätigten Aktivierung spezifischer Zielgene, daß das hier als GFP-Fusionsprotein exprimierte Protein biologisch aktiv ist. Diese Ergebnisse erweitern die Daten von Tonon und Kollegen, die gezeigt hatten, daß NIC von dem Faktor MAML2 in Kernkörperchen rekrutiert werden kann (Tonon et al. 2003). Die in der vorliegenden Arbeit gezeigten Ergebnisse legen nahe, daß umgekehrt auch NIC andere Proteine in die Kernkörperchen rekrutiert. Dies lässt vermuten, dass NIC in diesen Körperchen Komplexe mit anderen Faktoren bildet, welche die Transkription aktivieren.

Die Anzahl und das Erscheinungsbild der von NIC gebildeten Kernkörperchen erinnerte stark an andere bekannte „nuclear bodies“. In weiteren Versuchen wurde daher eine mögliche Kolo-kalisation mit einigen der bekanntesten nuclear bodies untersucht. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass die NIC-Körperchen weder mit dem RNA-bindenden Protein Ott1, noch mit den Transkriptionsrepressoren SP100 B bzw. SP100-HMG und Bach2 kolo-kalisieren. Auch eine Kolo-kalisation mit PML-Körperchen, welche ebenfalls eine hohe transkriptionelle Aktivität besitzen (Ching et al. 2005), konnte nicht gefunden werden. Aus diesen Ergebnissen kann geschlossen werden, daß die NIC-Körperchen nicht mit den hier untersuchten bekannten nuclear bodies identisch sind. In den Versuchen zur Kolo-kalisation mit PML wurde allerdings sehr oft eine räumliche Nähe zwischen PML-Körperchen und NIC-Körperchen beobachtet. Dies stimmt gut mit früheren Daten überein, die bereits gezeigt hatten dass PML Körperchen eine starke Assoziation mit dem *NOTCH1* Gen haben (Wang et al. 2004). Möglicherweise ist PML also in die Regulation des Notch 1-Gens involviert.

Durch Auszählen der NIC-Körperchen und der PML-Körperchen wurde zudem festgestellt, dass die Anzahl der PML-Körperchen bei Anwesenheit von NIC reduziert ist – interessanterweise bleibt die Gesamtzahl an NIC- und PML-Körperchen dabei konstant. Ein Zusammenhang zwischen der Anzahl an PML-Körperchen und NIC-Körperchen konnte auch in zwei weiteren Experimenten bestätigt werden. Wurde die Expression des PML-Proteins durch siRNA vermindert, konnte dadurch die durchschnittliche Anzahl der NIC-Körperchen pro Zellkern gesteigert werden. Umgekehrt führte eine Überexpression von PML zu

einer sehr starken, in vielen Zellen sogar vollständigen Reduktion der Anzahl an NIC-Körperchen.

Diese Daten, sowie die Tatsache dass sich die PML-Körperchen oft in unmittelbarer Nähe der NIC-Körperchen befinden, lässt vermuten, dass die NIC-Körperchen und die PML Körperchen in direkter (zumindest aber in indirekter) Korrelation zueinander stehen. Da eine Quantifizierung der PML-Expression durch quantitative RT-PCR jedoch keine Inhibition oder Aktivierung durch exprimiertes NIC zeigte, scheint der Zusammenhang weniger in der direkten Beeinflussung der Expression der beteiligten Gene zu liegen, sondern vermutlich eher in der Rekrutierung oder der Stabilität der Proteine. Weiterführende Experimente werden nun zeigen müssen, welcher Mechanismus der beobachteten Korrelation zugrunde liegt.

6.1.2 Mobilität von Notch1 Intra Cellular in den NIC-Körperchen

Die in dieser Arbeit erstmalig gefundenen NIC-Körperchen wurden in der Folge mit Hilfe von Photobleaching-Experimenten näher untersucht. Dieser Ansatz sollte zeigen, ob die als GFP-Fusionsproteine exprimierte Notch-Domäne eine für natürliche Proteine übliche Mobilität aufweisen. Dies war insbesondere deshalb wichtig, weil stark exprimierte Protein oft intrazelluläre Aggregate bilden, die biologisch inaktiv sind. FRAP-Experimente mit NIC in individuellen NIC-Körperchen zeigten jedoch, dass sich etwa 70% der Moleküle sehr schnell mit Proteinen außerhalb des gebleichten Bereiches austauschen ($t(1/2) = 1,24 \text{ s}$), was für lösliche, nicht aggregierte Proteine der entsprechenden Größe ein üblicher Wert ist. Im Verlauf dieser Experimente konnte auch gezeigt werden, daß die Fluoreszenz-Intensität benachbarter NIC-Körperchen im Verlauf des Fluoreszenz-Rückstroms in das gebleichte Körperchen abnimmt, daß also NIC Moleküle ungebunden zwischen den NIC-Körperchen ausgetauscht werden können.

Interessanterweise ergaben die FRAP-Experimente, daß etwa 30% der NIC Moleküle im Messzeitraum in den NIC-Körperchen verweilen, und nicht gegen frei bewegliche Moleküle ausgetauscht werden. Diese Ergebnisse legen nahe, dass etwa 30% der NIC Moleküle durch Bindung an strukturelle Proteine des Zellkerns

oder durch Bildung großer Komplexe mit anderen Faktoren wie RBP-Jk in den NIC-Körperchen gebunden ist.

6.2 Aktivität und Lokalisation von PRMT1 und PRMT4

6.2.1 Lokalisation von PRMT1 und PRMT4

Enzyme der Protein-Arginin-Methyltransferase-Familie (PRMT) katalysieren die posttranslationale Methylierung von Argininresten in Proteinen, und sind damit an vielen zellulären Signalwegen und Prozessen beteiligt. Im Verlauf dieser Arbeit wurden die beiden häufigsten und aktivsten Mitglieder der PRMT-Familie, PRMT1 und PRMT4, näher untersucht. Diese beiden Proteine sind bekannt dafür, daß sie Histone an unterschiedlichen Stellen methylieren, und damit über den sogenannten Histon-Code an der epigenetischen Regulation der Genexpression beteiligt sind. Zu Beginn dieser Arbeit waren über die intrazelluläre Lokalisation der beiden Proteine nur wenige und zudem widersprüchliche Ergebnisse veröffentlicht worden. Ein möglicher Punkt für die Widersprüche war, daß die publizierten Experimente mit verschiedenen Expressionskonstrukten und in verschiedenen Zelltypen durchgeführt worden waren. Daher wurde dieser Punkt detailliert in vier humanen Zelltypen untersucht, die jeweils stabil mit den identischen Expressionvektoren für PRMT1 bzw. PRMT4 transfiziert worden waren. Dabei zeigte sich, daß die Lokalisation von PRMT1 und PRMT4 tatsächlich zelltypspezifisch ist. Wie in Abbildung 5.2.1 gezeigt, konnte beobachtet werden, dass sowohl PRMT1 als auch PRMT4 in HEK293-Zellen vorrangig im Zytoplasma und nur gering im Zellkern lokalisiert waren, während in U2OS-Zellen die Lokalisationsrate Zellkern / Zytoplasma für beide Proteine mehr in Richtung Zellkern verschoben wird und sogar einzelne Zellen mit vorwiegender Zellkernlokalisation vorhanden sind. In HeLa und noch stärker ausgeprägt in MCF7-Zellen wurde letztlich eine überwiegende Lokalisation von PRMT1 und PRMT4 im Zellkern beobachtet.

Interessanterweise zeigte sich bei diesen Versuchen, daß speziell PRMT4 in asynchron wachsenden Zellen keine eindeutige Lokalisation zeigte. So waren sowohl Zellen mit fast ausschließlicher Lokalisation in Zytoplasma zu beobachten,

als auch Zellen mit einer nahezu homogenen Verteilung zwischen Kern und Zytoplasma und Zellen mit bevorzugter Lokalisation von PRMT4 im Zellkern. Diese Inhomogenität der Population legte die Vermutung nahe, dass sich die Lokalisation von PRMT4 im Verlauf des Zellzyklus ändert. In Experimenten mit synchronisierten Zellen konnte in der Tat nachgewiesen werden, dass sich während der G1-Phase eine eher zytoplasmatische, am G1/S Übergang eine annähernd gleichmäßige, in der S-Phase eine eher nukleäre, in der G2-Phase eine schwächere gleichmäßige und in der M-Phase eine stärkere gleichmäßige (Chromosomen werden ausgespart) Lokalisation von PRMT4 einstellt.

6.2.2 Komplexbildung und Aktivität von PRMT4

Mitglieder der PRMT-Familie bilden in der Regel homomere Komplexe, die auch für die enzymatische Aktivität notwendig sind. Aus diesem Grund wurde in dieser Arbeit die Komplexbildung und Methylierungsaktivität von PRMT4 näher untersucht. Dabei zeigten Immunfällungen und Aktivitätstests, daß sowohl die Bildung von Komplexen als auch die Methylierungsaktivität von PRMT4 während der Mitose deutlich abnimmt. Während des Verlaufs dieser Experimente konnten Feng und Kollegen unabhängig zeigen, dass PRMT4 am Serin 217 phosphoryliert wird, und dass diese Phosphorylierung hauptsächlich während der Mitose stattfindet. Durch die Phosphorylierung kann PRMT4 nicht mehr an den Methyl donor AdoMet binden und die enzymatische Aktivität von PRMT4 wird deutlich herabgesetzt (Feng et al. 2009). Durch Phosphorylierung am Serin 229 ist PRMT4 nicht mehr fähig, Dimere zu bilden (Higashimoto et al. 2007). In der vorliegenden Arbeit wurde bestätigt, dass PRMT4 während der Mitose keine Komplexe mehr mit anderen PRMT4 Molekülen bildet. Daher liegt die Vermutung nahe, dass PRMT4 durch Phosphorylierung inaktiviert wird. Dies ist zellzyklusabhängig und tritt während der Mitose, in der keine Transkription stattfindet, am stärksten auf.

Im Verlauf dieser Arbeiten wurde erstmalig erkannt, daß PRMT4 in der Lage ist, sich selbst zu methylieren. Eine solche Automethylierung war bisher nur für PRMT6 bekannt, und könnte bei beiden Enzymen zu einer Regulation der Aktivität, der Lokalisation oder der Wechselwirkung mit anderen Proteinen

dienen. Weiterführende Experimente zu dieser Fragestellung werden derzeit in unserer Gruppe durchgeführt.

Ein weiteres interessantes und unerwartetes Ergebnis der vorliegenden Arbeit war, daß PRMT4 *in vitro* offenbar in der Lage ist, Aktin zu methylieren. Dies war überraschend, da Aktin bisher auch in einem Proteomics-Ansatz nicht als potentielles Substrat einer Arginin-Methylierung gefunden worden war (Boisvert et al. 2003). Versuche zum Nachweis der möglichen Methylierung von Aktin in lebenden Zellen waren bisher ohne positives Ergebnis. Da diese Ergebnisse allerdings mit den gleichen Antikörpern erzielt wurden, die auch in dem genannten Proteomics-Ansatz verwendet wurden, ist es möglich daß die Antikörper zwar andere argininmethylierte Proteine erkennen, nicht jedoch methyliertes Aktin. Dies ist besonders deshalb plausibel, da die Antikörper gegen methylierte Argininreste in glycin-reichen Regionen hergestellt wurden, die typische Substrate für PRMT1, nicht aber für PRMT4 darstellen. Es kann aber nicht ausgeschlossen werden, daß die Methylierung von Aktin durch PRMT4 nur *in vitro* zu beobachten ist, in der lebenden Zelle aber nicht stattfindet. Da Aktin nur wenige potentiell als Methylierungstellen geeignete Argininreste enthält, sollte es möglich sein gegen diese Stellen Antikörper zu entwickeln, die eine mögliche Methylierung erkennen können.

Nach Immunfällungen konnte in der Westernblot-Analyse häufig eine Doppelbande von PRMT4 beobachtet werden. Durch weitere Untersuchungen konnte gezeigt werden, daß diese beiden Banden von unterschiedlich migrierenden Populationen im Zellkern und im Zytoplasma her rühren, wobei PRMT4 aus dem Zellkern langsamer migriert als PRMT4 aus dem Zytoplasma. Der Grund für den Migrationsunterschied der beiden Fraktionen ist bisher nicht bekannt. Die plausibelste Annahme ist allerdings eine posttranslationale Modifikation von PRMT4 entweder im Zellkern oder im Zytoplasma. Tatsächlich konnten Feng und Kollegen zeigen, dass phosphorylierte PRMT4 eher im Zytoplasma lokalisiert (Feng et al. 2009). In den Experimenten dieser Autoren zeigte allerdings die zytoplasmatische, phosphorylierte PRMT4 eine langsamere Migration als die nukleäre Fraktion, während in der vorliegenden Arbeit die langsamere migrierende PRMT4 aus dem Zellkern stammt. Möglicherweise ist daher eine weitere Modifikation von PRMT4 für die Diskrepanz dieser Ergebnisse verantwortlich.

Weiterführende Experimente werden diese Fragestellung klären müssen. Ein möglicher Ansatzpunkt ist eine Beobachtung, die im Verlauf dieser Arbeit gemacht wurde, nämlich daß PRMT4 aus nicht-konfluent gewachsenen Zellen im Vergleich zu konfluent gewachsenen Zellen eine deutlich höhere Enzymaktivität bezüglich der Methylierung von Histonen aufweist. Dies legt nahe, daß die enzymatische Aktivität von PRMT4 über die Zelldichte reguliert wird, so daß es sinnvoll erscheint, PRMT4 aus Zellen verschiedener Wachstumsdichten auf regulatorische Modifikationen hin zu untersuchen.

6.2.3 PRMT4 während der DNA-Reparatur

Der Tumorsuppressor p53 ist einer der Hauptkoordinatoren während eines Zellstresses. Dabei aktiviert er verschiedene Gene, die z.B. in den Zellzyklusarrest, die DNA-Reparatur oder die Apoptose involviert sind. Des Weiteren inhibiert er Gene der DNA-Replikation, der Proliferation und der Zellzyklusprogression (Harms et al. 2004; Ho et al. 2005; Imbriano et al. 2005; Sengupta et al. 2005; Scoumanne and Chen 2006; Helton and Chen 2007). Interessanterweise konnte eine *in vivo* Interaktion zwischen p53 und PRMT4 gezeigt werden (An et al. 2004). PRMT4 fungiert als Ko-Aktivator von p53, ohne aber p53 selbst nachweisbar zu methylieren. Statt dessen methyliert PRMT4 dabei offenbar Histone in unmittelbarer Nähe der p53-Zielgene.

Die Fähigkeit von p53 zur Transkriptionsaktivierung von GADD45 (Growth arrest and DNA damage-inducible 45 proteins) nach einer UV-Bestrahlung ist unter anderem abhängig von der Methylierung von Histon H3 durch PRMT4 (Scoumanne and Chen 2008). In einigen Experimenten der vorliegenden Arbeit wurde daher auch die Lokalisation von PRMT4 nach Schädigung der DNA untersucht. Dazu wurden U2OS-Zellen, die Wildtyp-p53 exprimieren und mit PRMT4-GFP stabil transfiziert waren, mit γ -Strahlen bestrahlt und 24 Stunden später fluoreszenzmikroskopisch untersucht. Tatsächlich konnte beobachtet werden, daß PRMT4 in diesen Zellen im Vergleich zu unbestrahlten Kontrollzellen seine Lokalisation von bevorzugt zytoplasmatisch nach bevorzugt nukleär verändert. Diese Änderung entspricht sehr genau derjenigen, die auch in der normalen S-Phase des Zellzyklus (siehe oben) beobachtet wird. Dieses Ergebnis legt nahe, daß PRMT4 während der DNA-Schadensantwort in den Zellkern

rekrutiert wird, entweder um die Histone des in der DNA-Reparatur neu synthetisierten Chromatins zu methylieren, oder um Prozesse der Schadensantwort zu regulieren. Zukünftige Experimente werden zeigen müssen, ob die Rekrutierung von PRMT4 aktives Wildtyp-p53 erfordert, oder ob die Lokalisation auch in Zellen ohne oder mit mutiertem p53 erfolgt. Im direkten Vergleich von Zellen mit unterschiedlichem p53-Status sollte sich so auch klären lassen, ob die Rekrutierung von PRMT4 in den Zellkern für eine p53-abhängige Transkription nötig ist, und ob in der p53-Antwort nach spezifischen Stress-Signalen p53 selbst oder andere p53 Ko-Aktivatoren durch PRMT4 methyliert werden. Dies ist plausibel, weil in früheren Arbeiten (siehe Einleitung) bereits Proteine der DNA-Reparaturwege wie MRE11 und P53BP1 gefunden worden waren, die Substrate der Methylierung darstellen. Ausserdem wurde vor kurzem nachgewiesen, daß p53 von einem anderen Mitglied der PRMT-Familie, PRMT5, direkt methyliert wird (Jansson et al. 2008), was die Zielgen-Spezifität von p53 beeinflusst. Die Änderung der Lokalisation von PRMT4 während der DNA-Schadensantwort könnte ein Hinweis darauf sein, dass auch dieses Enzym an der Regulation der Antwort beteiligt ist, und liefert einen wichtigen Ausgangspunkt für weiterführende Untersuchungen.

6.3 Polymerisation und Komplexbildung von nukleärem Aktin

Im Verlauf der Experimente zur Lokalisation und enzymatischen Aktivität von PRMT4 in U2OS-Zellen wurde reproduzierbar im Immunpräzipitat ein Protein von 43kDa gefunden. Kontrollen zeigten, daß dieses Protein auch unabhängig von der Anwesenheit der Antikörpern im Präzipitat nachweisbar war, also nicht wegen einer Komplexbildung mit PRMT4 ko-immunpräzipitiert wurde. Auffällig war, daß das Protein nur aus Extrakten von konfluent oder sehr dicht gewachsenen Zellen präzipitiert werden konnte, nicht aber aus subkonfluenten Zellen. Radioaktive Aktivitätsmessungen der PRMT4 zeigten weiterhin, daß das präzipitierte Protein von PRMT4 methyliert wird. Daher sollte die Identität des Proteins als neues,

möglicherweise zelldichtereguliertes Substrat der PRMT4 geklärt werden. Eine massenspektrometrische Identifizierung des Proteins zeigte, daß es sich dabei um Aktin handelt. Daraufhin unternommene Versuche, in Westernblot-Analysen mit anti-Methylarginin-Antikörpern eine Argininmethylierung von Aktin *in vivo* nachzuweisen, waren allerdings nicht erfolgreich. Zur Interpretation dieses Ergebnisses ist aber hervorzuheben, daß die verwendeten kommerziellen Antikörper gegen methylierte Arginine in glycinreichen Sequenzkontexten hergestellt worden waren. Diese entsprechen typischen Konsensus-Sequenzen von PRMT1, nicht aber von PRMT4. Konsensus-Sequenzen für PRMT4 wurden trotz großen Anstrengungen bisher nicht gefunden, und Antikörper die verlässlich Arginine erkennen, die durch PRMT4 methyliert wurden, sind nicht erhältlich. Daher ist es möglich, daß Aktin zwar *in vivo* von PRMT4 methyliert wird, die modifizierten Arginine aber der Detektion durch die verfügbaren Antikörper entgehen. Dies würde auch erklären, warum Aktin in einem Proteomics-Ansatz mit denselben Antikörpern nicht als Substrat für PRMTs identifiziert wurde (Boisvert et al. 2003). Alternativ ist es möglich, daß Aktin von PRMT4 zwar *in vitro* methyliert werden kann, daß diese Modifikation *in vivo* aber nicht statt findet. Dieser Frage wird derzeit in unserem Labor weiter nachgegangen.

In einem Teilprojekt dieser Arbeit wurde das Ergebnis näher untersucht, daß Aktin nur aus konfluenten U2OS Zellen präzipitiert, nicht aber Aktin aus nicht-konfluenten Zellen, auch wenn die Proteinkonzentrationen in beiden Extrakten identisch war. Diese Fragestellung erschien interessant, weil Aktin neben seiner Funktion als eines der häufigsten und funktionell wichtigsten Proteine des Zytoskeletts seit mehreren Jahren auch als nukleärer Faktor bekannt ist, der in der Transkription bestimmter Gen beteiligt ist. Die betroffenen Gene sind dabei oft in zelluläre Anpassungsvorgänge an veränderte Wachstumsbedingungen der Zelle involviert, wie der Zelldichte oder mechanischer Belastung der Zellen.

In der Tat konnte durch Zellfraktionierungen belegt werden, dass es sich bei dem präzipitierten Aktin um eine Fraktion von Aktin handelt, die ursprünglich aus dem Zellkern stammt. Durch Inhibition der Aktin-Polymerisation konnte des weiteren gezeigt werden, dass Aktin nicht mehr ausfällt. Die Aktin-Polymerisation während der Gewebewachstumsphase ist außerdem vom Zelltyp abhängig. So konnte

Aktin aus HEK293-Zellen auch aus nicht dicht gewachsenen Zellen gefällt werden.

Frühere Arbeiten hatten gezeigt, dass die Aktinkonzentration im Zellkern ungefähr einem Viertel der Konzentration im Zytoplasma entspricht, und dass etwa 20% des nuklären Aktins als polymeres Aktin vorliegt (McDonald et al. 2006). G-Aktin diffundiert durch die Kernhülle in den Zellkern, so dass die Aktinkonzentration im Zellkern abhängig ist von der Aktinkonzentration im Zytoplasma (Bohnsack et al. 2006). Im Zellkern bindet Profilin an G-Aktin und initiiert somit die Polymerisation von Aktinfilamenten durch z.B. N-WASP (Goldschmidt-Clermont et al. 1992). Thymosin β , welches unter anderem auch eine Rolle in der Zellproliferation spielt, inhibiert jedoch die Polymerisation von Aktin (Huff et al. 2004; Hannappel 2007). Die Verwicklung von Thymosin β in die Proliferation könnte erklären, warum nukläres Aktin vor der Kontaktinhibition der Zellen nicht polymerisiert und somit in den Versuchen auch nicht gefällt werden konnte. In Zellen ohne Kontaktinhibition, wie den ebenfalls verwendeten HEK293-Zellen, würde diese Polymerisationsinhibition von Aktin nicht stattfinden. Dies würde erklären, warum nukläres Aktin aus HEK293-Zellen sowohl aus konfluenten wie auch aus vereinzelt wachsenden Zellen präzipitiert.

Diese These wird unterstützt durch die Studien von Gieni und Hendzel (Gieni and Hendzel 2008) welche zeigten dass polymeres Aktin mit Hilfe von Myosin bestimmte Genloci im Kernplasma verlagern kann. Dadurch wird die Möglichkeit der Chromatin-Dekondensation erhöht, welche für eine effektive Transkription nötig ist. Zellstress, wie z.B. Verletzung der Gewebestruktur, dagegen erhöht den Level von G-Aktin im Zellkern (Kremer et al. 2007). Ein wichtiger Faktor in diesen Prozessen ist der Serum-Response-Faktor (SRF) ein Transkriptionsfaktor, welcher Zellwachstumsgene (wie z.B. *c-fos*) reguliert. Latrunculin B, welches die Aktin-Polymerisation inhibiert, blockiert die serum-induzierte Aktivierung von SRF, während stabilisiertes F-Aktin (z.B. durch Jasplakinolid) die Transkription von SRF-Zielgenen induziert (Sotiropoulos et al. 1999; Kustermans et al. 2008). Dies ist ein weiteres Indiz dafür, dass nukleäres, polymeres Aktin das Zellwachstum bzw. die Proliferation inhibiert, welches den Rückgang der Aktin-Polymerisation bei nicht dicht gewachsenem Zellgewebe erklärt.

Polymeres Aktin spielt unter anderem auch eine funktionelle Rolle bei der RNA-Polymerase II vermittelten Transkription (Wu et al. 2006; Yoo et al. 2007). Dabei assoziiert Aktin mit der phosphorylierte C-Terminale Domäne der RNA Polymerase II und begünstigt somit deren weitere Phosphorylierung. Diese Modifikation ist für die Transkriptionsaktivität der RNA Polymerase II nötig (Kim and Nikodem 1999; Kukalev et al. 2005). Dadurch reguliert nukleäres Aktin die durch die RNA Polymerase II vermittelte Transkription (Hofmann et al. 2004). Durch die Inhibierung der Bildung von polymerem Aktin durch Latrunculin konnte gezeigt werden, dass auch die RNA Transkription inhibiert wurde (McDonald et al. 2006). Diese These wird durch die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit gestützt, die zeigten, dass Aktin im Komplex mit RNA Polymerase II nur aus Extrakten des Zellkerns gefällt werden konnte, nicht aber aus zytoplasmatischen Extrakten. Die Bildung dieses Komplexes wird gehemmt, wenn die Polymerisation von Aktin gestört ist. Dies wurde in der vorliegenden Arbeit sowohl mit chemischen Hemmstoffen der Aktin-Polymerisation nachgewiesen, als auch über die Expression eines polymerisations-inaktiven Aktinkonstrukts. Dies bestätigt die oben genannten Ergebnisse, daß es einen direkten Zusammenhang gibt zwischen der Polymerisation nukleären Aktins und der Transkription. In unserer Gruppe wird nun in weiterführenden Experimenten untersucht, ob die Polymerisation von Aktin möglicherweise auch von einer Arginin-Methylierung des Proteins reguliert werden kann. Dies erscheint plausibel, da Aktin nur über wenige Argininreste verfügt, die potentielle Ziele einer Methylierung darstellen können, und diese in Regionen des Proteins liegen, die in die Polymerisierung des Proteins involviert sind. Ein Beispiel ist das Arginin an Position 183 (Procaccio et al. 2006), von dem auch eine natürlich vorkommende Mutation bekannt ist, die die Depolymerisation-Dynamik von Aktin verändert. Eine Methylierung an dieser oder ähnlichen Stellen könnte damit eine Möglichkeit für die Zelle darstellen, die Polymerisation/Depolymerisation von Aktin zu beeinflussen, und somit die Expression von spezifischen Genen zu regulieren.

7. Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
Adox	Adenosin-2'-3'-dialdehyd
AK	Antikörper
ATP	Adenosintriphosphat
Bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
D	Diffusionskoeffizient
dd	bidestilliert
DEM	Diethylmaleat
DIC	Differenzieller Interferenz Kontrast
DMEM	Dulbecco's modified Eagle medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxy Nukleotid-Triphosphat
ECL	Enhanced Chemiluminescence
(E)GFP	(Enhanced) Green Fluorescent Protein
EtOH	Ethanol
FACS	Fluorescence Associated Cell Sorting
FRAP	Fluorescence Recovery after Photobleaching
g	Erdbeschleunigung
HEPES	(N-2-hydroxyethyl)-piperazin-N'(2-ethansulfonsäure)
HRP	Horseradish peroxidase
IgG	Immunoglobulin G
kDa	Kilodalton
M	Molar
MALDI-TOF	Matrix-assisted Laser Desorption Ionization / Time of Flight
NB	nuclear bodies
NLS	Kernlokalisationssequenz
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PCR	Polymerase Chain Reaction

PEI	Polyethylenimin
PML	Promyelocytic leukemia
PRMT	Protein-Arginin-Methyltransferase
PVDF	Polyvinylidenfluorid
rpm	Umdrehungen pro Minute
ROI	Region of Interest
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkriptase PCR
SDS	Natriumdodecylsulfat
siRNA	small interfering RNA
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
UV	Ultraviolett
wt	Wildtyp
α	anti

8. Sicherheitstechnische Daten

8.1 Gefahrenstoffe

Gefahrenstoff	Gefahrensymbol	R-Sätze	S-Sätze
2-Mercaptoethanol	T, N	R 22-24-34-51/53	S 26-36/37/39-45-61
2-Propanol	F, Xi	R 11-36-67	S 7-16-24-26
3-Aminophthalhydrazid	Xi	R 36/37/38-20/21/22-40-50/53	S 24/25
Aceton	F, Xi	R 11-36-66-67	S 9-16-26
Acetonitril	F, Xn	R 11-22/21/22-36	S 1/2-16-36/37
Acrylamid	T	R 45-46-20/21-25-36/38-43-48/23/24/25-62	S 53-45-24-36/37
Ammoniumperoxodisulfat	O, Xn	R 8-22-36/37/38-42/43	S 22-24-26-37
Bisacrylamid	Xn	R 22-20/21/22	S 24/25-36/37
Chloroform	Xn	R 22-38-40-48/20/22	S 36/37
Diethylmaleat	Xi	R 43	S 24-37
Diethylpyrocarbonat	Xn	R 22-36/37/38	S 26-37/39
Dimethylformamid	T	R 61-20/21-36	S 53-45
Dithiothreitol	Xn	R 22-36/38	S 24/25
Essigsäure 100%	C	R 10-35	S 23.2-26-45
Ethanol	F	R 11	S 7-16
Ethidiumbromid	T+	R 22-26-36/37/38-68	S 26-28.2-36/37-45
Ethylendiamin-tetraessigsäure	Xi	R 22-36/37/38	S 26-36
Isoamylalkohol	Xn	R 10-20	S 24/25
Mercaptoethanol	T	R 22-24-34-51/53	S 26-36/37/39-45-61
Methanol	F, T	R 11-23/24/25-39/23/24/25	S 7-16-36/37-45
N,N,N',N'-Tetramethyl-ethylendiamin	F, C	R 11-20/22-34	S 16-26-36/37/39-45
Natriumazid	T+, N	R 28-32-50/53	S 28.1-45-60-61
Natriumdodecylsulfat	Xn	R 21/22-36/37/38	S 26-36/37
Natriumfluorid	T	R 25-32-36/38	S 1/2-22-36-45
Natriumhydroxid	C	R 35	S 26-37/39-45
Phenol	T	R 23/24/25-34-48/20/21/22-68	S 24/25-26-28.6-36/37/39-45
S-Adenosyl-L-[Methyl- ³ H]Methionin	R, Xi	R 36/37/38	S 26-36
Salzsäure 37%	C	R 34-37	S 26-36/37/39-45
Trifluoressigsäure	C	R 20-35-52/53	S 1/2-9-26-27-28-45-61
Wasserstoffperoxid 30%	C	R 34	S 3-26-36/37/39-45

Tabelle 8.1: Gefahrenstoffe

8.2 Verzeichnis der Gefahrensymbole

O	Brandfördernd
C	Ätzend
F	Leichtentzündlich
T	Giftig
T+	Sehr giftig
Xn	Gesundheitsschädlich
Xi	Reizend
N	Umweltgefährlich
R	Radioaktiv

8.3 Verzeichnis der R- und S-Sätze

8.3.1 Gefahrenhinweise (R-Sätze)

R 8	Feuergefahr bei Berührung mit brennbaren Stoffen
R 10	Entzündlich
R 11	Leichtentzündlich
R 20	Gesundheitsschädlich beim Einatmen
R 22	Gesundheitsschädlich beim Verschlucken
R 24	Giftig bei Berührung mit der Haut
R 25	Giftig beim Verschlucken
R 26	Sehr giftig beim Einatmen
R 28	Sehr giftig beim Verschlucken
R 32	Entwickelt bei Berührung mit Säure sehr giftige Gase
R 34	Verursacht Verätzungen
R 35	Verursacht schwere Verätzungen
R 36	Reizt die Augen
R 37	Reizt die Atmungsorgane
R 38	Reizt die Haut
R 40	Verdacht auf krebserzeugende Wirkung
R 43	Sensibilisierung durch Hautkontakt möglich
R 45	Kann Krebs erzeugen
R 46	Kann vererbare Schäden verursachen
R 61	Kann das Kind im Mutterleib schädigen
R 62	Kann möglicherweise die Fortpflanzungsfähigkeit beeinträchtigen
R 66	Wiederholter Kontakt kann zu spröder oder rissiger Haut führen
R 67	Dämpfe können Schläfrigkeit und Benommenheit verursachen
R 68	Irreversibler Schaden möglich

8.3.2 Kombination der R-Sätze

R 20/21	Gesundheitsschädlich beim Einatmen und bei Berührung mit der Haut
R 20/22	Gesundheitsschädlich beim Einatmen und Verschlucken
R 20/21/22	Gesundheitsschädlich beim Einatmen, Verschlucken und Berührung mit der Haut
R 21/22	Gesundheitsschädlich bei Berührung mit der Haut und beim Verschlucken
R 23/24/25	Giftig beim Einatmen, Verschlucken und Berührung mit der Haut
R 24/25	Giftig bei Berührung mit der Haut und beim Verschlucken
R 36/38	Reizt die Augen und die Haut
R 36/37/38	Reizt die Augen, Atmungsorgane und die Haut
R 39/23/24/25	Giftig: ernste Gefahr irreversiblen Schadens durch Einatmen, Berührung mit der Haut und durch Verschlucken
R 42/43	Sensibilisierung durch Einatmen und Hautkontakt möglich
R48/20/21/22	Giftig: Gefahr ernster Gesundheitsschäden bei längerer Exposition durch Einatmen, Berührung mit der Haut und durch Verschlucken

- R 48/20/22 Gesundheitsschädlich: Gefahr ernster Gesundheitsschäden bei längerer Exposition durch Einatmen und durch Verschlucken
- R 48/23/24/25 Giftig: Gefahr ernster Gesundheitsschäden bei längerer Exposition durch Einatmen, Berührung mit der Haut und durch Verschlucken
- R 50/53 Sehr giftig für Wasserorganismen, kann in Gewässern längerfristig schädliche Wirkungen haben
- R 51/53 Giftig für Wasserorganismen, kann in Gewässern längerfristig schädliche Wirkungen haben

8.3.3 Sicherheitsratschläge (S-Sätze)

- S 3 Kühl aufbewahren
- S 7 Behälter dicht geschlossen halten
- S 9 Behälter an einem gut gelüfteten Ort aufbewahren
- S 16 Von Zündquellen fernhalten - nicht rauchen
- S 22 Staub nicht einatmen
- S 23.2 Dampf nicht einatmen
- S 24 Berührung mit der Haut vermeiden
- S 26 Bei Berührung mit den Augen gründlich mit Wasser abspülen und Arzt konsultieren
- S 28.1 Bei Berührung mit der Haut sofort abwaschen mit viel Wasser
- S 28.2 Bei Berührung mit der Haut sofort abwaschen mit viel Wasser und Seife
- S 28.6 Bei Berührung mit der Haut sofort abwaschen mit viel Polyethylenglycol 400 und anschließende Reinigung mit viel Wasser
- S 36 Bei der Arbeit geeignete Schutzkleidung tragen
- S 37 Geeignete Schutzhandschuhe tragen
- S 45 Bei Unfall oder Unwohlsein sofort Arzt zuziehen (wenn möglich, dieses Etikett vorzeigen)
- S 53 Exposition vermeiden - vor Gebrauch bes. Anweisungen einholen
- S 60 Dieser Stoff und sein Behälter sind als gefährlicher Abfall zu entsorgen
- S 61 Freisetzung in die Umwelt vermeiden. Besondere Anweisungen einholen/Sicherheitsdatenblatt zu Rate ziehen

8.3.4 Kombination der S-Sätze

- S 24/25 Berührung mit den Augen und der Haut vermeiden
- S 36/37 Bei der Arbeit geeignete Schutzhandschuhe und Schutzkleidung tragen
- S 36/37/39 Bei der Arbeit geeignete Schutzkleidung, Schutzhandschuhe und Schutzbrille/Gesichtsschutz tragen
- S 37/39 Bei der Arbeit geeignete Schutzhandschuhe und Schutzbrille/Gesichtsschutz tragen

9. Abbildungsverzeichnis

Abb. 2.2.1: Struktur des humanen Notch 1 Rezeptors.	8
Abb. 2.2.2: Der Notch-Signalweg.	11
Abb. 2.3.1: Darstellung der Packungsdichten des DNA-Histonkomplexes.	13
Abb. 2.3.2: Schematische Darstellung der Arginin-Methylierung.	19
Abb.2.3.3: Familie der Protein-Arginin-Methyltransferasen.	22
Abb. 2.3.4: Regulierung der Transkription durch Arginin-Methylierung.	25
Abb. 4.1: Beispiel für die Auswertung von Zellen mit dem Programm „ImageJ“.	47
Abb. 4.2: Diagramm ausgewerteter FRAP-Daten.	47
Abb. 5.1.1: Lokalisation von Notch1 Intracellular (NIC) im Zellkern.	58
Abb. 5.1.2: Microarray für hNotch 1 zur Kontrolle der Aktivität.	59
Abb. 5.1.3: FRAP Aufnahmen eines einzelnen NIC-Körperchens.	60
Abb. 5.1.4: Rückstromkurve von NIC-GFP in den NIC-Körperchen.	61
Abb. 5.1.5: Lokalisation von NIC und Ott1.	62
Abb. 5.1.6: Lokalisation von NIC und Sp100 B bzw. Sp100-HMG.	63
Abb. 5.1.7: NIC-GFP unter oxidativem Stress.	64
Abb. 5.1.8: Kollokalisierung zwischen NIC und RBP-Jk.	65
Abb. 5.1.9: Lokalisationsvergleich zwischen PML und NIC.	66
Abb. 5.1.10: Reduzierung der PML-Körperchen in Anwesenheit von NIC-GFP.	67
Abb. 5.1.11: NIC-Körperchen in Abwesenheit von PML-Körperchen.	68
Abb. 5.1.12: Die Anzahl der PML-Körperchen und der NIC-Körperchen in gegenseitiger Abhängigkeit.	68
Abb. 5.1.13: Quantitative PCR zur Untersuchung der PML Repression.	69
Abb. 5.1.14: Lokalisationsvergleich zwischen PML-GFP und NIC-myc.	70
Abb. 5.1.15: Lokalisationsvergleich zwischen NIC und PML3.	71
Abb. 5.2.1: Lokalisation von PRMT1 und PRMT4 in verschiedenen Zelltypen.	73
Abb 5.2.2: Lokalisation von PRMT4 am G1/S Übergang bzw. in der frühen S-Phase in U2OS-Zellen.	74
Abb. 5.2.3: Lokalisation von PRMT4 während des Zellzyklus.	75

Abb. 5.2.4: PRMT4 Lokalisation während der DNA-Reparatur.	76
Abb. 5.2.5: Komplexbildung von PRMT4.	78
Abb. 5.2.6: Komplexgröße von PRMT4 in der Mitose.	79
Abb. 5.2.7: Aktivität von PRMT4 während der Mitose.	80
Abb. 5.2.8: Aktinmethylierung und Selbstmethylierung von PRMT4.	81
Abb. 5.2.9: PRMT4 Histonmethylierungsaktivität in Abhängigkeit der Zelldichte.	82
Abb. 5.2.10: Die nukleären und zytoplasmatischen Populationen von PRMT4 unterscheiden sich in der Migration auf SDS-Gelen.	83
Abb 5.3.1: Untersuchung zur symmetrischen bzw. asymmetrischen Methylierung von Aktin <i>in vivo</i> .	84
Abb. 5.3.2: Präzipitation von Aktin in Abhängigkeit der Zelldichte.	85
Abb. 5.3.3: Präzipitation von Aktin in U2OS und HEK293 Zellen.	86
Abb. 5.3.4: Präzipitation von transkriptionell aktiver, phosphorylierter RNA Polymerase II.	87
Abb. 5.3.5: Zellfraktionierung zur Untersuchung der Lokalisation von präzipitierbarem Aktin und RNA Polymerase II Phospho S5.	88
Abb 5.3.6: Präzipitation von F-Aktin.	88
Abb. 5.3.7: Präzipitation von depolymerisiertem Aktin	89
Abb. 5.3.8: Präzipitation von Aktin mit einer R183W-Mutation.	90

10. Tabellenverzeichnis

Tabelle 4.1: Verwendete primäre Antikörper.	34
Tabelle 4.2: Verwendete Plasmide.	35
Tabelle 4.3: Parameter für konfokale Fluoreszenzmikroskopie.	45
Tabelle 4.4: Parameter für Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie.	49
Tabelle 8.1: Gefahrenstoffe	104

11. Literaturverzeichnis

- Abramovich C, Yakobson B, Chebath J, Revel M. 1997. A protein-arginine methyltransferase binds to the intracytoplasmic domain of the IFNAR1 chain in the type I interferon receptor. *EMBO J* **16**: 260-266.
- Alessa L, Kropf DL. 1999. F-actin marks the rhizoid pole in living *Pelvetia compressa* zygotes. *Development* **126**: 201-209.
- An W, Kim J, Roeder RG. 2004. Ordered cooperative functions of PRMT1, p300, and CARM1 in transcriptional activation by p53. *Cell* **117**: 735-748.
- Apelqvist A, Li H, Sommer L, Beatus P, Anderson DJ, Honjo T, Hrabe de Angelis M, Lendahl U, Edlund H. 1999. Notch signalling controls pancreatic cell differentiation. *Nature* **400**: 877-881.
- Bacia K, Schwille P. 2003. A dynamic view of cellular processes by in vivo fluorescence auto- and cross-correlation spectroscopy. *Methods* **29**: 74-85.
- Becker PB, Horz W. 2002. ATP-dependent nucleosome remodeling. *Annu Rev Biochem* **71**: 247-273.
- Bedford MT, Richard S. 2005. Arginine methylation an emerging regulator of protein function. *Mol Cell* **18**: 263-272.
- Berezovska O, Jack C, McLean P, Aster JC, Hicks C, Xia W, Wolfe MS, Kimberly WT, Weinmaster G, Selkoe DJ et al. 2000. Aspartate mutations in presenilin and gamma-secretase inhibitors both impair notch1 proteolysis and nuclear translocation with relative preservation of notch1 signaling. *J Neurochem* **75**: 583-593.
- Bigas A, Martin DI, Milner LA. 1998. Notch1 and Notch2 inhibit myeloid differentiation in response to different cytokines. *Mol Cell Biol* **18**: 2324-2333.
- Birnboim HC, Doly J. 1979. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res* **7**: 1513-1523.
- Blaumueller CM, Artavanis-Tsakonas S. 1997. Comparative aspects of Notch signaling in lower and higher eukaryotes. *Perspect Dev Neurobiol* **4**: 325-343.
- Bohnsack MT, Stuken T, Kuhn C, Cordes VC, Gorlich D. 2006. A selective block of nuclear actin export stabilizes the giant nuclei of *Xenopus* oocytes. *Nat Cell Biol* **8**: 257-263.
- Boisvert FM, Cote J, Boulanger MC, Richard S. 2003. A proteomic analysis of arginine-methylated protein complexes. *Mol Cell Proteomics* **2**: 1319-1330.

- Boisvert FM, Kruhlak MJ, Box AK, Hendzel MJ, Bazett-Jones DP. 2001. The transcription coactivator CBP is a dynamic component of the promyelocytic leukemia nuclear body. *J Cell Biol* **152**: 1099-1106.
- Boulanger MC, Liang C, Russell RS, Lin R, Bedford MT, Wainberg MA, Richard S. 2005. Methylation of Tat by PRMT6 regulates human immunodeficiency virus type 1 gene expression. *J Virol* **79**: 124-131.
- Boulanger MC, Miranda TB, Clarke S, Di Fruscio M, Suter B, Lasko P, Richard S. 2004. Characterization of the Drosophila protein arginine methyltransferases DART1 and DART4. *Biochem J* **379**: 283-289.
- Bradford MM. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**: 248-254.
- Brown SW. 1966. Heterochromatin. *Science* **151**: 417-425.
- Chan YM, Jan YN. 1999. Presenilins, processing of beta-amyloid precursor protein, and notch signaling. *Neuron* **23**: 201-204.
- Chang B, Chen Y, Zhao Y, Bruick RK. 2007. JMJD6 is a histone arginine demethylase. *Science* **318**: 444-447.
- Chen D, Ma H, Hong H, Koh SS, Huang SM, Schurter BT, Aswad DW, Stallcup MR. 1999. Regulation of transcription by a protein methyltransferase. *Science* **284**: 2174-2177.
- Chiarugi A. 2002. Poly(ADP-ribose) polymerase: killer or conspirator? The 'suicide hypothesis' revisited. *Trends Pharmacol Sci* **23**: 122-129.
- Ching RW, Dellaire G, Eskiw CH, Bazett-Jones DP. 2005. PML bodies: a meeting place for genomic loci? *J Cell Sci* **118**: 847-854.
- Chu J, Bresnick EH. 2004. Evidence that C promoter-binding factor 1 binding is required for Notch-1-mediated repression of activator protein-1. *J Biol Chem* **279**: 12337-12345.
- Cisterna B, Necchi D, Prosperi E, Biggiogera M. 2006. Small ribosomal subunits associate with nuclear myosin and actin in transit to the nuclear pores. *FASEB J* **20**: 1901-1903.
- Clark GM, Allred DC, Hilsenbeck SG, Chamness GC, Osborne CK, Jones D, Lee WH. 1997. Mitosin (a new proliferation marker) correlates with clinical outcome in node-negative breast cancer. *Cancer Res* **57**: 5505-5508.
- Cook JR, Lee JH, Yang ZH, Krause CD, Herth N, Hoffmann R, Pestka S. 2006.

- FBXO11/PRMT9, a new protein arginine methyltransferase, symmetrically dimethylates arginine residues. *Biochem Biophys Res Commun* **342**: 472-481.
- Cooper GM, Hausman RE. 2006. *The Cell: A Molecular Approach*. Fourth Edition. *ASM Press and Sinauer Associates*.
- Cote J, Boisvert FM, Boulanger MC, Bedford MT, Richard S. 2003. Sam68 RNA binding protein is an in vivo substrate for protein arginine N-methyltransferase 1. *Mol Biol Cell* **14**: 274-287.
- Covic M, Hassa PO, Sacconi S, Buerki C, Meier NI, Lombardi C, Imhof R, Bedford MT, Natoli G, Hottiger MO. 2005. Arginine methyltransferase CARM1 is a promoter-specific regulator of NF-kappaB-dependent gene expression. *EMBO J* **24**: 85-96.
- Cuthbert GL, Daujat S, Snowden AW, Erdjument-Bromage H, Hagiwara T, Yamada M, Schneider R, Gregory PD, Tempst P, Bannister AJ et al. 2004. Histone demethylation antagonizes arginine methylation. *Cell* **118**: 545-553.
- Davie JR, Lin R, Allis CD. 1991. Timing of the appearance of ubiquitinated histones in developing new macronuclei of *Tetrahymena thermophila*. *Biochem Cell Biol* **69**: 66-71.
- Davis RL, Turner DL. 2001. Vertebrate hairy and Enhancer of split related proteins: transcriptional repressors regulating cellular differentiation and embryonic patterning. *Oncogene* **20**: 8342-8357.
- de Murcia G, Huletsky A, Poirier GG. 1988. Modulation of chromatin structure by poly(ADP-ribosylation). *Biochem Cell Biol* **66**: 626-635.
- Edberg DD, Bruce JE, Siems WF, Reeves R. 2004. In vivo posttranslational modifications of the high mobility group A1a proteins in breast cancer cells of differing metastatic potential. *Biochemistry* **43**: 11500-11515.
- Eichinger L, Lee SS, Schleicher M. 1999. Dictyostelium as model system for studies of the actin cytoskeleton by molecular genetics. *Microsc Res Tech* **47**: 124-134.
- Ellisen LW, Bird J, West DC, Soreng AL, Reynolds TC, Smith SD, Sklar J. 1991. TAN-1, the human homolog of the Drosophila notch gene, is broken by chromosomal translocations in T lymphoblastic neoplasms. *Cell* **66**: 649-661.
- Feng Q, He B, Jung SY, Song Y, Qin J, Tsai SY, Tsai MJ, O'Malley BW. 2009. Biochemical control of CARM1 enzymatic activity by phosphorylation. *J Biol Chem* **284**: 36167-36174.
- Fogal V, Gostissa M, Sandy P, Zacchi P, Sternsdorf T, Jensen K, Pandolfi PP, Will H, Schneider C, Del Sal G. 2000. Regulation of p53 activity in nuclear bodies by

- a specific PML isoform. *EMBO J* **19**: 6185-6195.
- Frankel A, Clarke S. 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**: 32974-32982.
- Frankel A, Yadav N, Lee J, Branscombe TL, Clarke S, Bedford MT. 2002. The novel human protein arginine N-methyltransferase PRMT6 is a nuclear enzyme displaying unique substrate specificity. *J Biol Chem* **277**: 3537-3543.
- Friesen WJ, Paushkin S, Wyce A, Massenet S, Pesiridis GS, Van Duyne G, Rappsilber J, Mann M, Dreyfuss G. 2001. The methylosome, a 20S complex containing JBP1 and pICln, produces dimethylarginine-modified Sm proteins. *Mol Cell Biol* **21**: 8289-8300.
- Fryer CJ, Lamar E, Turbachova I, Kintner C, Jones KA. 2002. Mastermind mediates chromatin-specific transcription and turnover of the Notch enhancer complex. *Genes Dev* **16**: 1397-1411.
- Gary JD, Clarke S. 1998. RNA and protein interactions modulated by protein arginine methylation. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* **61**: 65-131.
- Gieni RS, Hendzel MJ. 2008. Mechanotransduction from the ECM to the genome: are the pieces now in place? *J Cell Biochem* **104**: 1964-1987.
- Golderer G, Grobner P. 1991. ADP-ribosylation of core histones and their acetylated subspecies. *Biochem J* **277 (Pt 3)**: 607-610.
- Goldschmidt-Clermont PJ, Furman MI, Wachsstock D, Safer D, Nachmias VT, Pollard TD. 1992. The control of actin nucleotide exchange by thymosin beta 4 and profilin. A potential regulatory mechanism for actin polymerization in cells. *Mol Biol Cell* **3**: 1015-1024.
- Goulet I, Gauvin G, Boisvenue S, Cote J. 2007. Alternative splicing yields protein arginine methyltransferase 1 isoforms with distinct activity, substrate specificity, and subcellular localization. *J Biol Chem* **282**: 33009-33021.
- Greenwald I. 1994. Structure/function studies of lin-12/Notch proteins. *Curr Opin Genet Dev* **4**: 556-562.
- Gurley LR, D'Anna JA, Barham SS, Deaven LL, Tobey RA. 1978. Histone phosphorylation and chromatin structure during mitosis in Chinese hamster cells. *Eur J Biochem* **84**: 1-15.
- Hamada Y, Kadokawa Y, Okabe M, Ikawa M, Coleman JR, Tsujimoto Y. 1999. Mutation in ankyrin repeats of the mouse Notch2 gene induces early embryonic lethality. *Development* **126**: 3415-3424.

- Hannappel E. 2007. beta-Thymosins. *Ann N Y Acad Sci* **1112**: 21-37.
- Hans F, Dimitrov S. 2001. Histone H3 phosphorylation and cell division. *Oncogene* **20**: 3021-3027.
- Harms K, Nozell S, Chen X. 2004. The common and distinct target genes of the p53 family transcription factors. *Cell Mol Life Sci* **61**: 822-842.
- Hebbes TR, Thorne AW, Crane-Robinson C. 1988. A direct link between core histone acetylation and transcriptionally active chromatin. *EMBO J* **7**: 1395-1402.
- Helton ES, Chen X. 2007. p53 modulation of the DNA damage response. *J Cell Biochem* **100**: 883-896.
- Henikoff S, Furuyama T, Ahmad K. 2004. Histone variants, nucleosome assembly and epigenetic inheritance. *Trends Genet* **20**: 320-326.
- Herrmann F, Pably P, Eckerich C, Bedford MT, Fackelmayer FO. 2009. Human protein arginine methyltransferases in vivo--distinct properties of eight canonical members of the PRMT family. *J Cell Sci* **122**: 667-677.
- Higashimoto K, Kuhn P, Desai D, Cheng X, Xu W. 2007. Phosphorylation-mediated inactivation of coactivator-associated arginine methyltransferase 1. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**: 12318-12323.
- Ho JS, Ma W, Mao DY, Benchimol S. 2005. p53-Dependent transcriptional repression of c-myc is required for G1 cell cycle arrest. *Mol Cell Biol* **25**: 7423-7431.
- Hofmann W, Reichart B, Ewald A, Muller E, Schmitt I, Stauber RH, Lottspeich F, Jockusch BM, Scheer U, Hauber J et al. 2001. Cofactor requirements for nuclear export of Rev response element (RRE)- and constitutive transport element (CTE)-containing retroviral RNAs. An unexpected role for actin. *J Cell Biol* **152**: 895-910.
- Hofmann WA, Stojiljkovic L, Fuchsova B, Vargas GM, Mavrommatis E, Philimonenko V, Kysela K, Goodrich JA, Lessard JL, Hope TJ et al. 2004. Actin is part of pre-initiation complexes and is necessary for transcription by RNA polymerase II. *Nat Cell Biol* **6**: 1094-1101.
- Holmes KC, Popp D, Gebhard W, Kabsch W. 1990. Atomic model of the actin filament. *Nature* **347**: 44-49.
- Hsieh JJ, Zhou S, Chen L, Young DB, Hayward SD. 1999. CIR, a corepressor linking the DNA binding factor CBF1 to the histone deacetylase complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**: 23-28.

- Huff T, Rosorius O, Otto AM, Muller CS, Ballweber E, Hannappel E, Mannherz HG. 2004. Nuclear localisation of the G-actin sequestering peptide thymosin beta4. *J Cell Sci* **117**: 5333-5341.
- Hung CM, Li C. 2004. Identification and phylogenetic analyses of the protein arginine methyltransferase gene family in fish and ascidians. *Gene* **340**: 179-187.
- Imbriano C, Gurtner A, Cocchiarella F, Di Agostino S, Basile V, Gostissa M, Dobbstein M, Del Sal G, Piaggio G, Mantovani R. 2005. Direct p53 transcriptional repression: in vivo analysis of CCAAT-containing G2/M promoters. *Mol Cell Biol* **25**: 3737-3751.
- Jacobson MK, Jacobson EL. 1999. Discovering new ADP-ribose polymer cycles: protecting the genome and more. *Trends Biochem Sci* **24**: 415-417.
- Jansson M, Durant ST, Cho EC, Sheahan S, Edelman M, Kessler B, La Thangue NB. 2008. Arginine methylation regulates the p53 response. *Nat Cell Biol* **10**: 1431-1439.
- Jarriault S, Brou C, Logeat F, Schroeter EH, Kopan R, Israel A. 1995. Signalling downstream of activated mammalian Notch. *Nature* **377**: 355-358.
- Jeffries S, Robbins DJ, Capobianco AJ. 2002. Characterization of a high-molecular-weight Notch complex in the nucleus of Notch(ic)-transformed RKE cells and in a human T-cell leukemia cell line. *Mol Cell Biol* **22**: 3927-3941.
- Jenuwein T, Allis CD. 2001. Translating the histone code. *Science* **293**: 1074-1080.
- Johnson CA, Turner BM. 1999. Histone deacetylases: complex transducers of nuclear signals. *Semin Cell Dev Biol* **10**: 179-188.
- Kao HY, Ordentlich P, Koyano-Nakagawa N, Tang Z, Downes M, Kintner CR, Evans RM, Kadesch T. 1998. A histone deacetylase corepressor complex regulates the Notch signal transduction pathway. *Genes Dev* **12**: 2269-2277.
- Katsanis N, Yaspo ML, Fisher EM. 1997. Identification and mapping of a novel human gene, HRMT1L1, homologous to the rat protein arginine N-methyltransferase 1 (PRMT1) gene. *Mamm Genome* **8**: 526-529.
- Kidd S, Kelley MR, Young MW. 1986. Sequence of the notch locus of *Drosophila melanogaster*: relationship of the encoded protein to mammalian clotting and growth factors. *Mol Cell Biol* **6**: 3094-3108.
- Kiledjian M, Dreyfuss G. 1992. Primary structure and binding activity of the hnRNP U protein: binding RNA through RGG box. *EMBO J* **11**: 2655-2664.
- Kim MK, Nikodem VM. 1999. hnRNP U inhibits carboxy-terminal domain

- phosphorylation by TFIIH and represses RNA polymerase II elongation. *Mol Cell Biol* **19**: 6833-6844.
- Kohlhof H. 2006. Untersuchungen zur funktionellen Äquivalenz zwischen Notch und EBNA2 in EBV-immortalisierten B-Zellen. *Dissertation, Ludwig-Maximilians-Universität München*.
- Koken MH, Linares-Cruz G, Quignon F, Viron A, Chelbi-Alix MK, Sobczak-Thepot J, Juhlin L, Degos L, Calvo F, de The H. 1995. The PML growth-suppressor has an altered expression in human oncogenesis. *Oncogene* **10**: 1315-1324.
- Kopan R, Nye JS, Weintraub H. 1994. The intracellular domain of mouse Notch: a constitutively activated repressor of myogenesis directed at the basic helix-loop-helix region of MyoD. *Development* **120**: 2385-2396.
- Kornberg RD. 1974. Chromatin structure: a repeating unit of histones and DNA. *Science* **184**: 868-871.
- Kouzarides T. 2000. Acetylation: a regulatory modification to rival phosphorylation? *EMBO J* **19**: 1176-1179.
- Kouzarides T. 2002. Histone methylation in transcriptional control. *Curr Opin Genet Dev* **12**: 198-209.
- Krause CD, Yang ZH, Kim YS, Lee JH, Cook JR, Pestka S. 2007. Protein arginine methyltransferases: evolution and assessment of their pharmacological and therapeutic potential. *Pharmacol Ther* **113**: 50-87.
- Kremer BE, Adang LA, Macara IG. 2007. Septins regulate actin organization and cell-cycle arrest through nuclear accumulation of NCK mediated by SOCS7. *Cell* **130**: 837-850.
- Kukalev A, Nord Y, Palmberg C, Bergman T, Percipalle P. 2005. Actin and hnRNP U cooperate for productive transcription by RNA polymerase II. *Nat Struct Mol Biol* **12**: 238-244.
- Kurdistani SK, Grunstein M. 2003. Histone acetylation and deacetylation in yeast. *Nat Rev Mol Cell Biol* **4**: 276-284.
- Kurooka H, Honjo T. 2000. Functional interaction between the mouse notch1 intracellular region and histone acetyltransferases PCAF and GCN5. *J Biol Chem* **275**: 17211-17220.
- Kurooka H, Kuroda K, Honjo T. 1998. Roles of the ankyrin repeats and C-terminal region of the mouse notch1 intracellular region. *Nucleic Acids Res* **26**: 5448-5455.

- Kustermans G, Piette J, Legrand-Poels S. 2008. Actin-targeting natural compounds as tools to study the role of actin cytoskeleton in signal transduction. *Biochem Pharmacol* **76**: 1310-1322.
- Kwak YT, Guo J, Prajapati S, Park KJ, Surabhi RM, Miller B, Gehrig P, Gaynor RB. 2003. Methylation of SPT5 regulates its interaction with RNA polymerase II and transcriptional elongation properties. *Mol Cell* **11**: 1055-1066.
- Laemmli UK. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685.
- LaMorte VJ, Dyck JA, Ochs RL, Evans RM. 1998. Localization of nascent RNA and CREB binding protein with the PML-containing nuclear body. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**: 4991-4996.
- Langst G, Becker PB. 2001. Nucleosome mobilization and positioning by ISWI-containing chromatin-remodeling factors. *J Cell Sci* **114**: 2561-2568.
- Langst G, Becker PB. 2004. Nucleosome remodeling: one mechanism, many phenomena? *Biochim Biophys Acta* **1677**: 58-63.
- Lardelli M, Dahlstrand J, Lendahl U. 1994. The novel Notch homologue mouse Notch 3 lacks specific epidermal growth factor-repeats and is expressed in proliferating neuroepithelium. *Mech Dev* **46**: 123-136.
- Lee DY, Teyssier C, Strahl BD, Stallcup MR. 2005a. Role of protein methylation in regulation of transcription. *Endocr Rev* **26**: 147-170.
- Lee J, Bedford MT. 2002. PABP1 identified as an arginine methyltransferase substrate using high-density protein arrays. *EMBO Rep* **3**: 268-273.
- Lee J, Sayegh J, Daniel J, Clarke S, Bedford MT. 2005b. PRMT8, a new membrane-bound tissue-specific member of the protein arginine methyltransferase family. *J Biol Chem* **280**: 32890-32896.
- Lee JH, Cook JR, Yang ZH, Mirochnitchenko O, Gunderson SI, Felix AM, Herth N, Hoffmann R, Pestka S. 2005c. PRMT7, a new protein arginine methyltransferase that synthesizes symmetric dimethylarginine. *J Biol Chem* **280**: 3656-3664.
- Lieber T, Kidd S, Alcamo E, Corbin V, Young MW. 1993. Antineurogenic phenotypes induced by truncated Notch proteins indicate a role in signal transduction and may point to a novel function for Notch in nuclei. *Genes Dev* **7**: 1949-1965.
- Lim Y, Kwon YH, Won NH, Min BH, Park IS, Paik WK, Kim S. 2005. Multimerization of expressed protein-arginine methyltransferases during the growth and differentiation of rat liver. *Biochim Biophys Acta* **1723**: 240-247.

- Lin WJ, Gary JD, Yang MC, Clarke S, Herschman HR. 1996. The mammalian immediate-early TIS21 protein and the leukemia-associated BTG1 protein interact with a protein-arginine N-methyltransferase. *J Biol Chem* **271**: 15034-15044.
- Lo WS, Trievel RC, Rojas JR, Duggan L, Hsu JY, Allis CD, Marmorstein R, Berger SL. 2000. Phosphorylation of serine 10 in histone H3 is functionally linked in vitro and in vivo to Gcn5-mediated acetylation at lysine 14. *Mol Cell* **5**: 917-926.
- Luo B, Aster JC, Hasserjian RP, Kuo F, Sklar J. 1997. Isolation and functional analysis of a cDNA for human Jagged2, a gene encoding a ligand for the Notch1 receptor. *Mol Cell Biol* **17**: 6057-6067.
- Lyman D, Young MW. 1993. Further evidence for function of the Drosophila Notch protein as a transmembrane receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**: 10395-10399.
- Ma X, Renda MJ, Wang L, Cheng EC, Niu C, Morris SW, Chi AS, Krause DS. 2007. Rbm15 modulates Notch-induced transcriptional activation and affects myeloid differentiation. *Mol Cell Biol* **27**: 3056-3064.
- Mahadevan LC, Willis AC, Barratt MJ. 1991. Rapid histone H3 phosphorylation in response to growth factors, phorbol esters, okadaic acid, and protein synthesis inhibitors. *Cell* **65**: 775-783.
- McBride AE, Silver PA. 2001. State of the arg: protein methylation at arginine comes of age. *Cell* **106**: 5-8.
- McDonald D, Carrero G, Andrin C, de Vries G, Hendzel MJ. 2006. Nucleoplasmic beta-actin exists in a dynamic equilibrium between low-mobility polymeric species and rapidly diffusing populations. *J Cell Biol* **172**: 541-552.
- Miele L, Osborne B. 1999. Arbiter of differentiation and death: Notch signaling meets apoptosis. *J Cell Physiol* **181**: 393-409.
- Milner LA, Bigas A, Kopan R, Brashem-Stein C, Bernstein ID, Martin DI. 1996. Inhibition of granulocytic differentiation by mNotch1. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**: 13014-13019.
- Miranda TB, Miranda M, Frankel A, Clarke S. 2004. PRMT7 is a member of the protein arginine methyltransferase family with a distinct substrate specificity. *J Biol Chem* **279**: 22902-22907.
- Miranda TB, Sayegh J, Frankel A, Katz JE, Miranda M, Clarke S. 2006. Yeast Hsl7 (histone synthetic lethal 7) catalyses the in vitro formation of omega-N(G)-monomethylarginine in calf thymus histone H2A. *Biochem J* **395**: 563-570.

- Miranda TB, Webb KJ, Edberg DD, Reeves R, Clarke S. 2005. Protein arginine methyltransferase 6 specifically methylates the nonhistone chromatin protein HMGA1a. *Biochem Biophys Res Commun* **336**: 831-835.
- Mishra SK, Das BR. 1992. (ADP-ribosyl)ation pattern of chromosomal proteins during ageing. *Cell Mol Biol* **38**: 457-462.
- Morgan TH. 1917. The theory of the gene. *Am Nat*.
- Najbauer J, Johnson BA, Young AL, Aswad DW. 1993. Peptides with sequences similar to glycine, arginine-rich motifs in proteins interacting with RNA are efficiently recognized by methyltransferase(s) modifying arginine in numerous proteins. *J Biol Chem* **268**: 10501-10509.
- Negorev DG, Vladimirova OV, Ivanov A, Rauscher F, 3rd, Maul GG. 2006. Differential role of Sp100 isoforms in interferon-mediated repression of herpes simplex virus type 1 immediate-early protein expression. *J Virol* **80**: 8019-8029.
- Nowak SJ, Corces VG. 2004. Phosphorylation of histone H3: a balancing act between chromosome condensation and transcriptional activation. *Trends Genet* **20**: 214-220.
- Nye JS, Kopan R, Axel R. 1994. An activated Notch suppresses neurogenesis and myogenesis but not gliogenesis in mammalian cells. *Development* **120**: 2421-2430.
- Obrdlik A, Kukalev A, Louvet E, Farrants AK, Caputo L, Percipalle P. 2008. The histone acetyltransferase PCAF associates with actin and hnRNP U for RNA polymerase II transcription. *Mol Cell Biol* **28**: 6342-6357.
- Ohkura N, Takahashi M, Yaguchi H, Nagamura Y, Tsukada T. 2005. Coactivator-associated arginine methyltransferase 1, CARM1, affects pre-mRNA splicing in an isoform-specific manner. *J Biol Chem* **280**: 28927-28935.
- Ohtsuka T, Ishibashi M, Gradwohl G, Nakanishi S, Guillemot F, Kageyama R. 1999. Hes1 and Hes5 as notch effectors in mammalian neuronal differentiation. *EMBO J* **18**: 2196-2207.
- Oswald F, Kostezka U, Astrahantseff K, Bourteele S, Dillinger K, Zechner U, Ludwig L, Wilda M, Hameister H, Knochel W et al. 2002. SHARP is a novel component of the Notch/RBP-Jkappa signalling pathway. *EMBO J* **21**: 5417-5426.
- Oswald F, Tauber B, Dobner T, Bourteele S, Kostezka U, Adler G, Liptay S, Schmid RM. 2001. p300 acts as a transcriptional coactivator for mammalian Notch-1. *Mol Cell Biol* **21**: 7761-7774.

- Paik WK, Kim S. 1967. Enzymatic methylation of protein fractions from calf thymus nuclei. *Biochem Biophys Res Commun* **29**: 14-20.
- Pal S, Sif S. 2007. Interplay between chromatin remodelers and protein arginine methyltransferases. *J Cell Physiol* **213**: 306-315.
- Pal S, Vishwanath SN, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Sif S. 2004. Human SWI/SNF-associated PRMT5 methylates histone H3 arginine 8 and negatively regulates expression of ST7 and NM23 tumor suppressor genes. *Mol Cell Biol* **24**: 9630-9645.
- Parks AL, Klueg KM, Stout JR, Muskavitch MA. 2000. Ligand endocytosis drives receptor dissociation and activation in the Notch pathway. *Development* **127**: 1373-1385.
- Pawlak MR, Scherer CA, Chen J, Roshon MJ, Ruley HE. 2000. Arginine N-methyltransferase 1 is required for early postimplantation mouse development, but cells deficient in the enzyme are viable. *Mol Cell Biol* **20**: 4859-4869.
- Pedrali-Noy G, Spadari S, Miller-Faures A, Miller AO, Kruppa J, Koch G. 1980. Synchronization of HeLa cell cultures by inhibition of DNA polymerase alpha with aphidicolin. *Nucleic Acids Res* **8**: 377-387.
- Percipalle P, Jonsson A, Nashchekin D, Karlsson C, Bergman T, Guialis A, Daneholt B. 2002. Nuclear actin is associated with a specific subset of hnRNP A/B-type proteins. *Nucleic Acids Res* **30**: 1725-1734.
- Percipalle P, Zhao J, Pope B, Weeds A, Lindberg U, Daneholt B. 2001. Actin bound to the heterogeneous nuclear ribonucleoprotein hrp36 is associated with Balbiani ring mRNA from the gene to polysomes. *J Cell Biol* **153**: 229-236.
- Pollack BP, Kotenko SV, He W, Izotova LS, Barnoski BL, Pestka S. 1999. The human homologue of the yeast proteins Skb1 and Hsl7p interacts with Jak kinases and contains protein methyltransferase activity. *J Biol Chem* **274**: 31531-31542.
- Posern G, Sotiropoulos A, Treisman R. 2002. Mutant actins demonstrate a role for unpolymerized actin in control of transcription by serum response factor. *Mol Biol Cell* **13**: 4167-4178.
- Procaccio V, Salazar G, Ono S, Styers ML, Gearing M, Davila A, Jimenez R, Juncos J, Gutekunst CA, Meroni G et al. 2006. A mutation of beta -actin that alters depolymerization dynamics is associated with autosomal dominant developmental malformations, deafness, and dystonia. *Am J Hum Genet* **78**: 947-960.
- Pui JC, Allman D, Xu L, DeRocco S, Karnell FG, Bakkour S, Lee JY, Kadesch T, Hardy RR, Aster JC et al. 1999. Notch1 expression in early lymphopoiesis

- influences B versus T lineage determination. *Immunity* **11**: 299-308.
- Radtke F, Wilson A, Stark G, Bauer M, van Meerwijk J, MacDonald HR, Aguet M. 1999. Deficient T cell fate specification in mice with an induced inactivation of Notch1. *Immunity* **10**: 547-558.
- Rangarajan A, Talora C, Okuyama R, Nicolas M, Mammucari C, Oh H, Aster JC, Krishna S, Metzger D, Chambon P et al. 2001. Notch signaling is a direct determinant of keratinocyte growth arrest and entry into differentiation. *EMBO J* **20**: 3427-3436.
- Ray WJ, Yao M, Nowotny P, Mumm J, Zhang W, Wu JY, Kopan R, Goate AM. 1999. Evidence for a physical interaction between presenilin and Notch. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**: 3263-3268.
- Rea S, Eisenhaber F, O'Carroll D, Strahl BD, Sun ZW, Schmid M, Opravil S, Mechtler K, Ponting CP, Allis CD et al. 2000. Regulation of chromatin structure by site-specific histone H3 methyltransferases. *Nature* **406**: 593-599.
- Rebay I, Fleming RJ, Fehon RG, Cherbas L, Cherbas P, Artavanis-Tsakonas S. 1991. Specific EGF repeats of Notch mediate interactions with Delta and Serrate: implications for Notch as a multifunctional receptor. *Cell* **67**: 687-699.
- Rezai-Zadeh N, Zhang X, Namour F, Fejer G, Wen YD, Yao YL, Gyory I, Wright K, Seto E. 2003. Targeted recruitment of a histone H4-specific methyltransferase by the transcription factor YY1. *Genes Dev* **17**: 1019-1029.
- Rho J, Choi S, Seong YR, Cho WK, Kim SH, Im DS. 2001. Prmt5, which forms distinct homo-oligomers, is a member of the protein-arginine methyltransferase family. *J Biol Chem* **276**: 11393-11401.
- Rogers S, Wells R, Rechsteiner M. 1986. Amino acid sequences common to rapidly degraded proteins: the PEST hypothesis. *Science* **234**: 364-368.
- Ruggero D, Wang ZG, Pandolfi PP. 2000. The puzzling multiple lives of PML and its role in the genesis of cancer. *Bioessays* **22**: 827-835.
- Sambrook J. 1989. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. *Cold Spring Harbor Press* **second ed.**
- Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **74**: 5463-5467.
- Scheer U, Hinssen H, Franke WW, Jockusch BM. 1984. Microinjection of actin-binding proteins and actin antibodies demonstrates involvement of nuclear actin in transcription of lampbrush chromosomes. *Cell* **39**: 111-122.

- Schroeder T, Just U. 2000. Notch signalling via RBP-J promotes myeloid differentiation. *EMBO J* **19**: 2558-2568.
- Schwander A. 2004. Die funktionelle Domänenstruktur des humanen Kernproteins Scaffold Attachment Factor A. *Dissertation, Universität Hamburg*.
- Scorilas A, Black MH, Talieri M, Diamandis EP. 2000. Genomic organization, physical mapping, and expression analysis of the human protein arginine methyltransferase 1 gene. *Biochem Biophys Res Commun* **278**: 349-359.
- Scoumanne A, Chen X. 2006. The epithelial cell transforming sequence 2, a guanine nucleotide exchange factor for Rho GTPases, is repressed by p53 via protein methyltransferases and is required for G1-S transition. *Cancer Res* **66**: 6271-6279.
- Scoumanne A, Chen X. 2008. Protein methylation: a new mechanism of p53 tumor suppressor regulation. *Histol Histopathol* **23**: 1143-1149.
- Seeler JS, Dejean A. 1999. The PML nuclear bodies: actors or extras? *Curr Opin Genet Dev* **9**: 362-367.
- Sengupta S, Shimamoto A, Koshiji M, Pedoux R, Rusin M, Spillare EA, Shen JC, Huang LE, Lindor NM, Furuichi Y et al. 2005. Tumor suppressor p53 represses transcription of RECQ4 helicase. *Oncogene* **24**: 1738-1748.
- Shen X, Ranallo R, Choi E, Wu C. 2003. Involvement of actin-related proteins in ATP-dependent chromatin remodeling. *Mol Cell* **12**: 147-155.
- Shutter JR, Scully S, Fan W, Richards WG, Kitajewski J, Deblandre GA, Kintner CR, Stark KL. 2000. Dll4, a novel Notch ligand expressed in arterial endothelium. *Genes Dev* **14**: 1313-1318.
- Singh V, Miranda TB, Jiang W, Frankel A, Roemer ME, Robb VA, Gutmann DH, Herschman HR, Clarke S, Newsham IF. 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**: 7761-7771.
- Smith JJ, Rucknagel KP, Schierhorn A, Tang J, Nemeth A, Linder M, Herschman HR, Wahle E. 1999. Unusual sites of arginine methylation in Poly(A)-binding protein II and in vitro methylation by protein arginine methyltransferases PRMT1 and PRMT3. *J Biol Chem* **274**: 13229-13234.
- Sotiropoulos A, Gineitis D, Copeland J, Treisman R. 1999. Signal-regulated activation of serum response factor is mediated by changes in actin dynamics. *Cell* **98**: 159-169.
- Stallcup MR. 2001. Role of protein methylation in chromatin remodeling and transcriptional regulation. *Oncogene* **20**: 3014-3020.

- Straub FB. 1942. *Stud Inst Med Chem Univ Szeged* **2**: 3-15.
- Strobl LJ, Hofelmayer H, Marschall G, Brielmeier M, Bornkamm GW, Zimmer-Strobl U. 2000. Activated Notch1 modulates gene expression in B cells similarly to Epstein-Barr viral nuclear antigen 2. *J Virol* **74**: 1727-1735.
- Sun ZW, Allis CD. 2002. Ubiquitination of histone H2B regulates H3 methylation and gene silencing in yeast. *Nature* **418**: 104-108.
- Swiatek PJ, Lindsell CE, del Amo FF, Weinmaster G, Gridley T. 1994. Notch1 is essential for postimplantation development in mice. *Genes Dev* **8**: 707-719.
- Tamura K, Taniguchi Y, Minoguchi S, Sakai T, Tun T, Furukawa T, Honjo T. 1995. Physical interaction between a novel domain of the receptor Notch and the transcription factor RBP-J kappa/Su(H). *Curr Biol* **5**: 1416-1423.
- Tang J, Gary JD, Clarke S, Herschman HR. 1998. PRMT 3, a type I protein arginine N-methyltransferase that differs from PRMT1 in its oligomerization, subcellular localization, substrate specificity, and regulation. *J Biol Chem* **273**: 16935-16945.
- Tang J, Kao PN, Herschman HR. 2000. Protein-arginine methyltransferase I, the predominant protein-arginine methyltransferase in cells, interacts with and is regulated by interleukin enhancer-binding factor 3. *J Biol Chem* **275**: 19866-19876.
- Tanigaki K, Nogaki F, Takahashi J, Tashiro K, Kurooka H, Honjo T. 2001. Notch1 and Notch3 instructively restrict bFGF-responsive multipotent neural progenitor cells to an astroglial fate. *Neuron* **29**: 45-55.
- Tashiro S, Muto A, Tanimoto K, Tsuchiya H, Suzuki H, Hoshino H, Yoshida M, Walter J, Igarashi K. 2004. Repression of PML nuclear body-associated transcription by oxidative stress-activated Bach2. *Mol Cell Biol* **24**: 3473-3484.
- Teyssier C, Chen D, Stallcup MR. 2002. Requirement for multiple domains of the protein arginine methyltransferase CARM1 in its transcriptional coactivator function. *J Biol Chem* **277**: 46066-46072.
- Thoma F, Koller T, Klug A. 1979. Involvement of histone H1 in the organization of the nucleosome and of the salt-dependent superstructures of chromatin. *J Cell Biol* **83**: 403-427.
- Timson J. 1975. Hydroxyurea. *Mutat Res* **32**: 115-132.
- Tonon G, Modi S, Wu L, Kubo A, Coxon AB, Komiya T, O'Neil K, Stover K, El-Naggar A, Griffin JD et al. 2003. t(11;19)(q21;p13) translocation in mucoepidermoid carcinoma creates a novel fusion product that disrupts a Notch signaling pathway. *Nat Genet* **33**: 208-213.

- Towbin H, Staehelin T, Gordon J. 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A* **76**: 4350-4354.
- Turner BM. 2002. Cellular memory and the histone code. *Cell* **111**: 285-291.
- Van Impe K, De Corte V, Eichinger L, Bruyneel E, Mareel M, Vandekerckhove J, Gettemans J. 2003. The Nucleo-cytoplasmic actin-binding protein CapG lacks a nuclear export sequence present in structurally related proteins. *J Biol Chem* **278**: 17945-17952.
- von Mikecz A, Zhang S, Montminy M, Tan EM, Hemmerich P. 2000. CREB-binding protein (CBP)/p300 and RNA polymerase II colocalize in transcriptionally active domains in the nucleus. *J Cell Biol* **150**: 265-273.
- Wachsmuth M, Waldeck W, Langowski J. 2000. Anomalous diffusion of fluorescent probes inside living cell nuclei investigated by spatially-resolved fluorescence correlation spectroscopy. *J Mol Biol* **298**: 677-689.
- Wallberg AE, Pedersen K, Lendahl U, Roeder RG. 2002. p300 and PCAF act cooperatively to mediate transcriptional activation from chromatin templates by notch intracellular domains in vitro. *Mol Cell Biol* **22**: 7812-7819.
- Wang H, Huang ZQ, Xia L, Feng Q, Erdjument-Bromage H, Strahl BD, Briggs SD, Allis CD, Wong J, Tempst P et al. 2001. Methylation of histone H4 at arginine 3 facilitating transcriptional activation by nuclear hormone receptor. *Science* **293**: 853-857.
- Wang J, Shiels C, Sasieni P, Wu PJ, Islam SA, Freemont PS, Sheer D. 2004. Promyelocytic leukemia nuclear bodies associate with transcriptionally active genomic regions. *J Cell Biol* **164**: 515-526.
- Wei Y, Mizzen CA, Cook RG, Gorovsky MA, Allis CD. 1998. Phosphorylation of histone H3 at serine 10 is correlated with chromosome condensation during mitosis and meiosis in Tetrahymena. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**: 7480-7484.
- Weinmaster G. 2000. Notch signal transduction: a real rip and more. *Curr Opin Genet Dev* **10**: 363-369.
- Weiss VH, McBride AE, Soriano MA, Filman DJ, Silver PA, Hogle JM. 2000. The structure and oligomerization of the yeast arginine methyltransferase, Hmt1. *Nat Struct Biol* **7**: 1165-1171.
- Wessel D, Flugge UI. 1984. A method for the quantitative recovery of protein in dilute solution in the presence of detergents and lipids. *Anal Biochem* **138**: 141-143.
- Wharton KA, Yedvobnick B, Finnerty VG, Artavanis-Tsakonas S. 1985. opa: a novel family of transcribed repeats shared by the Notch locus and other

- developmentally regulated loci in *D. melanogaster*. *Cell* **40**: 55-62.
- Wodnicka M, Pierzchalska M, Bereiter-Hahn J, Kajstura J. 1992. Comparative study on effects of cytochalasins B and D on F-actin content in different cell lines and different culture conditions. *Folia Histochem Cytobiol* **30**: 107-111.
- Wray W, Boulikas T, Wray VP, Hancock R. 1981. Silver staining of proteins in polyacrylamide gels. *Anal Biochem* **118**: 197-203.
- Wu L, Aster JC, Blacklow SC, Lake R, Artavanis-Tsakonas S, Griffin JD. 2000. MAML1, a human homologue of *Drosophila* mastermind, is a transcriptional co-activator for NOTCH receptors. *Nat Genet* **26**: 484-489.
- Wu Q, Hu H, Lan J, Emenari C, Wang Z, Chang KS, Huang H, Yao X. 2009. PML3 Orchestrates the Nuclear Dynamics and Function of TIP60. *J Biol Chem* **284**: 8747-8759.
- Wu X, Yoo Y, Okuhama NN, Tucker PW, Liu G, Guan JL. 2006. Regulation of RNA-polymerase-II-dependent transcription by N-WASP and its nuclear-binding partners. *Nat Cell Biol* **8**: 756-763.
- Xu W, Chen H, Du K, Asahara H, Tini M, Emerson BM, Montminy M, Evans RM. 2001. A transcriptional switch mediated by cofactor methylation. *Science* **294**: 2507-2511.
- Xu W, Cho H, Kadam S, Banayo EM, Anderson S, Yates JR, 3rd, Emerson BM, Evans RM. 2004. A methylation-mediator complex in hormone signaling. *Genes Dev* **18**: 144-156.
- Yadav N, Lee J, Kim J, Shen J, Hu MC, Aldaz CM, Bedford MT. 2003. Specific protein methylation defects and gene expression perturbations in coactivator-associated arginine methyltransferase 1-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**: 6464-6468.
- Yoo Y, Wu X, Guan JL. 2007. A novel role of the actin-nucleating Arp2/3 complex in the regulation of RNA polymerase II-dependent transcription. *J Biol Chem* **282**: 7616-7623.
- Zhang X, Cheng X. 2003. Structure of the predominant protein arginine methyltransferase PRMT1 and analysis of its binding to substrate peptides. *Structure* **11**: 509-520.
- Zhang X, Zhou L, Cheng X. 2000. Crystal structure of the conserved core of protein arginine methyltransferase PRMT3. *EMBO J* **19**: 3509-3519.
- Zhong S, Salomoni P, Pandolfi PP. 2000. The transcriptional role of PML and the nuclear body. *Nat Cell Biol* **2**: E85-90.

Zhou S, Fujimuro M, Hsieh JJ, Chen L, Miyamoto A, Weinmaster G, Hayward SD. 2000. SKIP, a CBF1-associated protein, interacts with the ankyrin repeat domain of Notch1C To facilitate Notch1C function. *Mol Cell Biol* **20**: 2400-2410.