

"Untersuchung der Substratspezifität der PRMTs 1, 3 und 6 und der Funktion der Arginindimethylierung"

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

Doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

vorgelegt der

Naturwissenschaftlichen Fakultät I

Biowissenschaften

der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von

Frau Silke Otto

geb. am: 22.09.1978 in: Dortmund

Gutachter:

1. Prof. Dr. Elmar Wahle

2. Prof. Dr. Wolfgang Sippl

3. Prof. Dr. Albert Jeltsch

Verteidigung am 20.10.2009

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	1
1.1	Arginindimethylierung	1
1.2	Protein-Arginin-Methyltransferasen (PRMTs)	2
1.2.1	PRMT1	4
1.2.2	PRMT3	7
1.2.3	PRMT6	8
1.3	PABPN1	8
1.4	hnRNP K	12
	Zielsetzung der Arbeit	13
2.1	Material	14
2.1.1	Ausgangsvektoren	14
2.1.2	<i>primer</i>	15
2.1.3	Bakterienstämme	15
2.1.4	Sterilisation	15
2.2	Methoden	15
2.2.1	Nukleinsäuretechniken	15
2.2.1.1	PCR	15
2.2.1.2	Mutagenese	15
2.2.1.3	Agarosegele	16
2.2.1.4	Elution von DNA aus Agarosegelen	17
2.2.1.5	Restriktionsverdau	17
2.2.1.6	Dephosphorylierung	17
2.2.1.7	Phenol/Chloroform-Extraktion	17
2.2.1.8	Fällung der DNA	18
2.2.1.9	Photometrische Konzentrationsbestimmung von DNA	18
2.2.1.10	Ligation	18
2.2.1.11	Sequenzierung	19
2.2.1.12	Klonierung der einzelnen Konstrukte	20
2.2.2	Mikrobiologische Methoden	23
2.2.2.1	Herstellung elektrokompetenter <i>E. coli</i>	23
2.2.2.2	Elektrotransformation	24
2.2.2.3	Agarplatten und flüssiges LB-Medium	25

2.2.2.4	Minipräparation von Plasmid DNA	25
2.2.2.5	Midipräparation von Plasmid DNA	25
2.2.3	Proteinbiochemische Methoden	25
2.2.3.1	<i>In vitro</i> Transkription und -translation	25
2.2.3.2	SDS-PAGE	26
2.2.3.3	Expression von Proteinen	27
2.2.3.4	Reinigung der Proteine	28
2.2.3.5	Reinigung von PRMT1 ohne <i>tag</i>	29
2.2.3.6	Reinigung von PRMT3 ohne <i>tag</i>	32
2.2.3.7	Reinigung von His-PRMT1 und 3	33
2.2.3.8	Reinigung der Chimären CKL, CKS, CKLC, CKSC	34
2.2.3.9	Reinigung von His-bovPABPN1	36
2.2.3.10	Reinigung der Chimären PKL, PKS, CP, CPC	37
2.2.3.11	Dialyse	38
2.2.3.12	<i>Western blot</i>	39
2.2.3.13	Silberfärbung von Coomassie-gefärbten SDS-Gelen in 30 min	41
2.2.3.14	Bestimmung der Proteinkonzentration	41
	Photometrische Konzentrationsbestimmung	41
	Bradford-Test	42
	Bestimmung der Konzentration mit Hilfe eines SDS-Gels	42
2.2.4	Aktivitätstests	42
2.2.4.1	Filterbindungstest für die Bindung von Proteinen an RNA	42
2.2.4.2	Analyse der RNA-Bindung durch native Gelelektrophorese	43
2.2.4.3	Methylierungstest	43
	Methylierungstest mit PABPN1 als Substrat (TCA-Fällung/Gel)	43
	Methylierungstest mit Peptiden als Substrat	44
2.3	Oozyteninjektion	44
2.3.1	Auswahl der Oozyten	44
2.3.2	Präparation der Injektionsnadel	45
2.3.3	Vorbereitung der Probe	45
2.3.4	Injektion	45
2.3.5	Inkubation und Präparation	46
2.3.6	Fällung nukleärer und zytoplasmatischer Proteine	46
3.	Ergebnisse	47

3.1	Etablierung eines Aktivitätstests mit Peptid als Substrat	48
3.2	Reinigung der humanen PRMTs 1, 3 und 6 ohne <i>tag</i>	55
3.3	Für die Arginindimethylierung am C-Terminus von PABPN1 benötigen die PRMTs keine weiteren Polypeptide	57
3.4	Untersuchung der Substratspezifität der PRMTs 1, 3 und 6	59
3.4.1	Methylierung von PABPN1 und hnRNP K durch PRMT1,3 und 6	60
3.4.2	PRMT3 bevorzugt das RGG-Peptid	62
3.5	Analyse der Substratspezifität mit Hilfe von Proteinchimären	66
3.5.1	Die PK-Fusionen sind bessere Substrate für PRMT3 und 6 als hnRNP K	68
3.5.2	Die "Hantelhypothese"	69
3.5.3	Untersuchung der "Hantelhypothese" mit Hilfe der CspB-Chimären	70
3.6	Untersuchung des Importes von methyliertem und unmethyliertem PABPN1 in den Zellkern von <i>Xenopus laevis</i> Oozyten	73
3.6.1	Etablierung der Importexperimente und Vorversuche	73
3.6.1.1	Nicht methyliertes rekombinantes PABPN1 wird importiert, die $\Delta c49$ -Mutante kaum	76
3.6.1.2	Oozyten- und Eiextrakt methylieren PABPN1 <i>in vitro</i>	78
3.6.1.3	Inhibition der Methylierung durch die Extrakte durch Sinefungin oder Adenosylhomocystein	79
3.6.1.4	Die Methylierung des translatierten PABPN1 durch das Retikulumlysats ist zu vernachlässigen	80
3.6.2	Die Importtests zeigen keinen Unterschied beim Import von unmethyliertem und methyliertem PABPN1 in den Kern von <i>Xenopus laevis</i> Oozyten	81
4.	Diskussion	83
4.1	Zur Reinigung der humanen PRMTs 1,3 und 6 ohne <i>tag</i> und mit His- <i>tag</i>	83
4.2	Für die Arginindimethylierung von PABPN1 benötigen die PRMTs keine weiteren Polypeptide	84
4.3	PRMT3 bevorzugt das RGG-Peptid	85
4.4	Zum Methylierungstest mit Peptiden	85
4.5.	Die lokale Aminosäuresequenz ist für die Substratspezifität-	

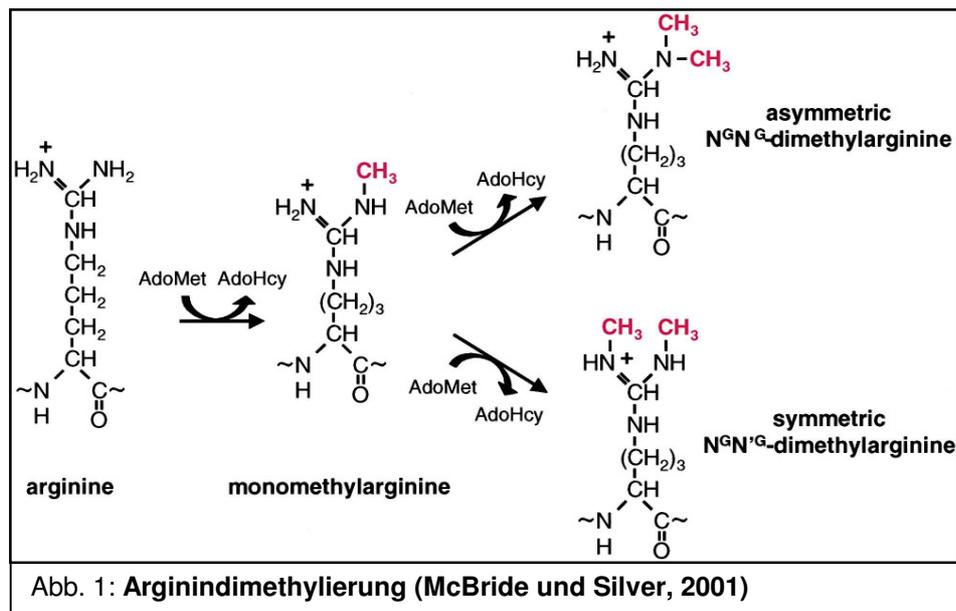
	aller untersuchten Enzyme wichtig	86
4.6	Zur "Hantelhypothese"	87
4.7	Instabilität und Aggregationsverhalten der Chimären KLP, KSP, CKI, CKS, CKSC, CKLC	88
4.7.1	Mögliche Beeinflussung der PRMTs durch Pufferbestand- teile im Aktivitätstest	88
4.7.2	Mögliche Beeinflussung der PRMTs durch an CspB gebun- dene Nukleinsäuren	89
4.7.3	Korrekte Faltung der Proteinchimären	89
4.8	Modellierungen	91
4.8.1	Enzyme	91
4.8.1.1.	Die Öffnungen der Dimerringe von PRMT1 und 3 sind klein	91
4.8.2	Substrate	93
4.8.2.1	Gefaltete Domänen passen nicht in die Öffnung des Dimerringes	94
4.9	Erweiterungen der "Hantelhypothese"	95
4.9.1	Argumente für die "Schlaufenhypothese"	95
4.10	Zu den Oozyteninjektionen	96
4.10.1	Beeinflussung der Lokalisation von PABPN1 durch dessen Methy- lierung	97
4.10.2	Zum Import von methyliertem und unmethyliertem PABPN1	98
4.10.3.	Technische Schwierigkeiten bei der Durchführung der Injektionsexperimente	99
	Zusammenfassung	99
	Literaturverzeichnis	103
	Anhang	114
	Danksagung	123
	Angaben zu meiner Person und Lebenslauf	124
	Erklärung	125

1. Einleitung

1.1 Arginindimethylierung

Die Arginindimethylierung gehört zu den posttranslationalen Modifikationen von Proteinen und wurde 1967 entdeckt (Paik and Kim, 1967). Diese Modifikationen regulieren die Stabilität, die Aktivität, die Lokalisation und die Affinität der Proteine.

Die folgende Abbildung zeigt ein Schema der Arginindimethylierung (McBride und Silver, 2001).



Bei der Arginindimethylierung (siehe Abbildung 1) werden zwei Methylgruppen auf die Stickstoffatome der Aminogruppen eines Arginins übertragen (Lee und Loh, 1977). Als Methylgruppendonor dient dabei S-Adenosylmethionin (SAM bzw. in Abbildung 1 AdoMet). Die Übertragung der Methylgruppe des Methionins findet in einer nukleophilen Substitutionsreaktion des Typs 2 (S_{N2}) statt (Osborne *et al.*, 2007). Dabei wird das SAM zu S-Adosylhomocystein (AdoHcy) umgewandelt. Dieses kann als kompetitiver Inhibitor wirken und ist daher für die Zelle giftig. In den Zellen wird es jedoch durch das Enzym Adosylhomocysteinhydrolase zu Adenosin und Homocystein abgebaut. Aus dem Homocystein kann wieder Methionin synthetisiert werden, was zur Generierung eines neuen SAM-Moleküls verwendet werden kann. Das Adenosin wird z.T. über die Adosinkinase zu AMP oder durch die Adosin Deaminase (ADA) zu Inosin verstoffwechselt (Kredich und Hersfeld, 1979). Bei der Arginindimethylierung entsteht zunächst ω - N^G -Mono-methylarginin (MMA) als Intermediat.

Die Methylierungsreaktion wird durch die sogenannten Protein-Arginin-Methyltransferasen, im Folgenden mit PRMT abgekürzt, katalysiert (s. 1.2).

Lange Zeit wurde angenommen, dass es sich bei der Arginindimethylierung um eine irreversible Modifikation handelt. Die Peptidyl-Arginin-Deiminase kann allerdings die Anzahl an methylierten Argininen reduzieren, indem sie diese in Citrullin umwandelt. Dies gilt jedoch nur für Arginin oder Monomethylarginin (Cuthbert *et al.*, 2004). Die LSD1-Aminoxidase kann hingegen spezifisch Methylgruppen vom dimethylierten Lysin des Histons H3 entfernen (Shi *et al.*, 2004). JMJD6 enthält eine Jumonji-Domäne und ist eine Eisen- und 2-Oxoglutarat-abhängige Dioxygenase, welche das Histon H3 am Arginin 2 demethyliert (Chang, *et al.* 2007).

1.2 Protein-Arginin-Methyltransferasen (PRMTs)

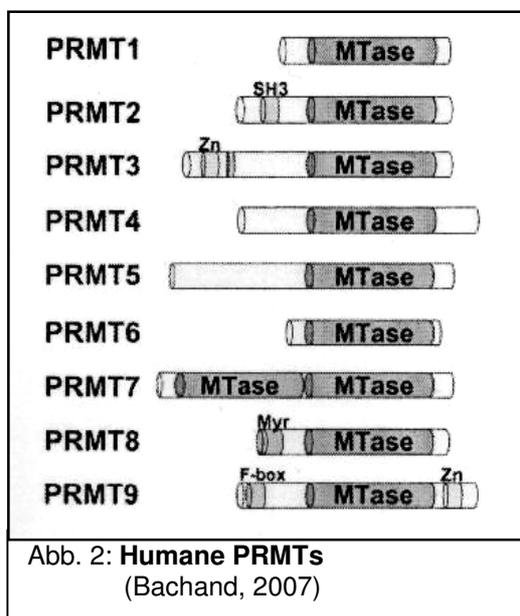
Typ I-Methyltransferasen katalysieren die Synthese von asymmetrischem ω - N^G , N^G -Dimethylarginin (aDMA), während die Arginine nach einer Enzymreaktion mit einer Typ II-Argininmethyltransferase symmetrisch ω - N^G , N^G -dimethyliert (sDMA) sind (Brachand *et al.*, 2007). Typ III PRMTs katalysieren nur die Monomethylierung von Argininen (Miranda *et al.*, 2006), wobei es bisher noch unklar ist, ob es sich dabei nur um Intermediate der Dimethylierung handelt. Typ IV Methyltransferasen methylieren das δ -Stickstoffatom des Arginins, jedoch wurde diese Modifikation bisher nur bei *Saccharomyces cerevisiae* nachgewiesen (Niewmierzycka und Clarke, 1999).

Gene, welche für PRMTs kodieren, wurden in einzelligen Eukaryoten bis hin zum Menschen gefunden (Banchand *et al.*, 2007), jedoch bisher nicht in Prokaryoten (Gary und Clarke, 1998).

Bisher wurden neun humane PRMTs entdeckt (Bachand *et al.*, 2007). Dabei gehören PRMT1, 2, 3, 4, 6 und 8 zu den Typ I-Methyltransferasen und PRMT5, 7 und 9 zu den Typ II PRMTs. PRMT1, 3 und 6 werden in den Abschnitten 1.2.1, 1.2.2 und 1.2.3 genauer beschrieben. Humanes PRMT2, auch HRMT1L1 genannt, wurde über die Homologie seiner Sequenz zu PRMT1 der Ratte und HMT1 (bzw. RMT1) der Hefe als Methyltransferase identifiziert (Katsanis, Yaspo und Fisher, 1997). PRMT2 bindet an verschiedene Proteine, wie z. B. das Retinoblastoma-Genprodukt (RB) (Yoshimoto *et al.*, 2006). Es wurde aber erst kürzlich nachgewiesen, dass PRMT2 Histon H4 asymmetrisch dimethyliert, wodurch es als Typ I-Methyltransferase klassifiziert werden konnte (Lakowski und Frankel, 2009). PRMT4 wird auch als CARM1 bezeichnet, was für Coaktivator-assoziierte Arginin-Methyltransferase steht

(Chen *et al.*, 1999). Durch assoziierte Proteine kann die Aktivität der Enzyme beeinflusst werden. So arbeitet beispielsweise PRMT5 im Zytoplasma im sogenannten "Methylosom", wo es durch die Methylierung der Sm-Proteine an der Biogenese der snRNPs beteiligt ist (Friesen *et al.*, 2001). PRMT7 (Gros *et al.*, 2003) kann die Bildung von MMA und sDMA katalysieren (Miranda *et al.*, 2004). Von Arginin-Methyltransferase 8 ist bekannt, dass sie spezifisch und membrangebunden in Gehirnzellen vorkommt. *In vitro* kann PRMT8 GST-GAR, GST-Npl3 und Histon H4 methylieren (Lee *et al.*, 2005). PRMT9 wurde als erstes in Hefe gefunden. Für dieses Enzym ist bisher noch kein Substrat bekannt (Gary und Clarke, 1998).

Die folgende Abbildung zeigt Schemata von allen neun bekannten humanen PRMTs.



In allen ist die sogenannte Methyltransferase-Domäne (MTase) stark konserviert. Bei PRMT7 ist diese verdoppelt. Die MTase-Domäne wird in einigen Veröffentlichungen auch katalytische Kern-Region (*catalytical core*) genannt. Sie setzt sich aus der SAM-Bindedomäne, dem Dimerisierungsarm und der β -Faltblattstruktur zusammen (Zhang und Cheng, 2000 bzw. 2003 und 1.2.1 Abb. 3). Für die enzymatische Aktivität ist der "Double-E-loop" der SAM-Bindedomäne sowie der "THW-loop", welcher sich in der β -barrel-Struktur

befindet, von großer Bedeutung (Zhang, Zhou und Cheng, 2000). Die Region N-terminal von der katalytischen Kern-Region wird von W. Yue *et al.* als "pre-core" bezeichnet (Yue *et al.*, 2007). Sie ist bei allen Methyltransferasen unterschiedlich gestaltet. Bei PRMT2 weist sie eine SH3-Domäne auf (Abbildung 2 SH3). PRMT3 und PRMT9 verfügen über ein Zinkfinger-Motiv (Zn), wobei dieses bei PRMT9 C-terminal lokalisiert ist. Außerdem besitzt PRMT9 am N-Terminus eine F-box. PRMT8 hat ein Myristoylierungsmotif (Myr), welches für dessen Bindung an die Membran verantwortlich ist (Lee *et al.*, 2005). PRMTs können Homodimere und Oligomere bilden (Zhang und Cheng, 2003; Zhang, Zhou, Cheng, 2000).

Durch die Modifikation ihrer Substrate sind PRMTs an verschiedenen zellulären Mechanismen beteiligt. Dazu gehören die Prozessierung von prä-mRNA (Bedford und Richard, 2005), Signaltransduktion (Abramovich *et al.*, 1997) und DNA-

Reparaturmechanismen (Boisvert *et al.*, 2005). Unter anderem wird über den Histoncode auch die Regulation der Transkription gesteuert (Jenuwein und Allis, 2001).

Bisher ist noch wenig über die Substratspezifität der PRMTs bekannt. Die unterschiedlichen N-Termini der Methyltransferasen lassen jedoch vermuten, dass diese bei ihrer Substratspezifität eine Rolle spielen könnten. Proteine mit Glycin- und Arginin-reichen Sequenzen, auch GAR-Motive genannt, sind meistens gute Substrate für Argininmethyltransferasen (Najbauer *et al.*, 1993). In diesen GAR-Motiven sind die Arginine oft in sogenannten RGG-Boxen lokalisiert (Ostareck-Lederer *et al.*, 2006). Die Arginine können aber auch in RXR-Clustern organisiert sein, wie es z. B. bei PABPN1 der Fall ist (s. u.). Solche Motive sind für die RNA-Bindung (Kiledjian und Dreyfuss, 1992), für Protein-Protein-Wechselwirkungen (Bouvet *et al.*, 1998) und für die nukleäre Lokalisation zuständig (Lee *et al.*, 1996). Eine Ausnahme bildet CARM1, welches keine GAR-Motive methyliert.

Im Gegensatz zu PRMT1-*knockout*-Zelllinien sind PRMT1-*knock out*-Mäuse nur bis zu frühen embryonalen Stadien lebensfähig. Dies lässt darauf schließen, dass PRMT1 eine fundamentale und nicht redundante Rolle spielt (Pawlak *et al.*, 2000). PRMT3-*knock out*-Mäuse hingegen sind lebensfähig (Swiercz *et al.*, 2007). Für PRMT6 sind keine *knock-out*-Mäuse in der Literatur beschrieben, *knock-down*-Zellen sind jedoch lebensfähig (Guccione *et al.*, 2007).

Nachstehend sollen die Methyltransferasen 1, 3 und 6 genauer beschrieben werden.

1.2.1 PRMT1

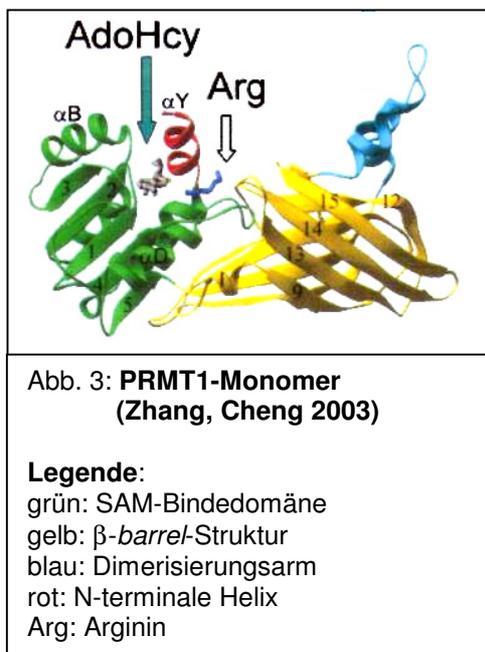
Noch vor der PRMT1 der Ratte (PRMT1) wurde HMT1 als einzige Typ I-Methyltransferase in *Saccharomyces cerevisiae* entdeckt (Gary *et al.*, 1996). Die PRMT1 wurde über ihre Homologie zur Hefemethyltransferase (HMT1) gefunden und außerdem über ihre Interaktion mit BTG1 sowie TIS21/BTG2, welche die Aktivität des Enzyms stimulieren. rPRMT1 ist ein 40,5 kDa großes Polypeptid, welches aus 353 AS besteht (Lin *et al.*, 1996).

Humanes PRMT1, auch HRMT1L2 genannt, wurde erst später entdeckt (Scott *et al.*, 1998). Es wurden drei verschiedene Spleißvarianten (V1-3) der humanen PRMT1 beschrieben, welche sich in den ersten vier Exons des N-Terminus unterscheiden (Scorilas *et al.*, 2000). Im Jahre 2004 wurde eine vierte Spleißvariante entdeckt (Mathioudaki *et al.*, 2004). Die Aminosäuresequenz des humanen Proteins hPRMT1-

V2 stimmt zu 96 % mit der von rPRMT1 überein. hPRMT1-V2 ist 41,5 kDa groß und besteht aus 361 AS.

In dieser Arbeit wurde unmethyliertes PABPN1 in *Xenopus* Oozyten injiziert (s. 3.6). Dabei mußte beachtet werden, dass die Oozyten PRMTs enthalten, welche das injizierte PABPN1 methylieren könnten. xPRMT1b ist eine Calcium-induzierte Methyltransferase, welche die neuronale Entwicklung im Amphibien-Embryo kontrolliert (Batut *et al.*, 2005). Zwei EST-tags von *Xenopus* ähneln den humanen Spleißvarianten V1 und 2 (BE025764, BE035704) (Zhang und Cheng, 2003).

Obwohl sie kein NLS aufweist, wird Methyltransferase 1 beim Menschen sowohl im Zytoplasma als auch im Zellkern gefunden (Tang *et al.*, 1998). Sie pendelt jedoch zwischen Nukleus und Zytoplasma hin und her, wobei der größere Teil zytoplasmatisch ist (Herrmann *et al.*, 2005).



Sowohl die Kristallstruktur von HMT1 als auch die von PRMT1 wurde aufgeklärt (Weiss *et al.*, 2000; Zhang und Cheng, 2003). Durch limitierte Proteolyse gehen oft die ersten 10 AS des N-Terminus verloren (Zhang und Cheng, 2003). Im Gegensatz zu PRMT3 konnte am N-Terminus von PRMT1 nur eine α -Helix (α Y AS 41-51) kristallisiert werden. Nach dieser folgt die SAM-Bindedomäne (PRMT1 AS 52-176, HMT1 AS 30-162). Diese enthält auch den sogenannten "double-E-loop", dessen beide Glutamate Teile des aktiven Zentrums sind (s. Abb. 4). Der SAM-Bindedomäne schließt sich die β -barrel-Struktur

an (PRMT1 AS 177-187 und 217-352, HMT1 AS 163-174 und 205-383). Zwischen den angegebenen Aminosäuren liegt der Dimerisierungsarm (PRMT1 AS 188-216, HMT1 AS 175-204). Dieser besteht bei PRMT1 aus drei, bei HMT1 aus zwei α -Helices.

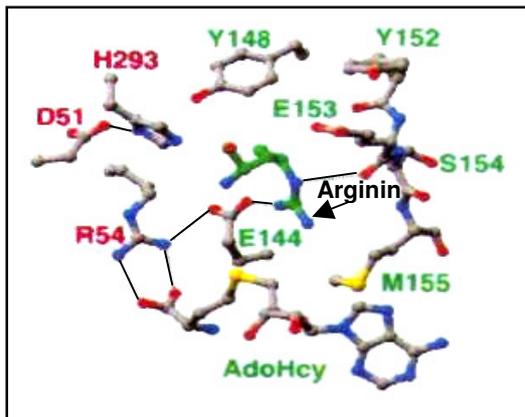


Abb. 4: **SAM und Arginin im aktiven Zentrum von PRMT1**
(Zhang und Cheng, 2003)

Für die Aktivität von PRMT1 und HMT1 ist die negative Ladung und die Länge der Seitenkette der beiden Glutamate des oben erwähnten "double-E-loops" von entscheidender Bedeutung (PRMT1 E144 und E153, HMT1 E132 und E141). Je ein Glutamat greift an das δ - und das andere an das eine ω -Stickstoffatom der Aminogruppen des Arginins an. Dadurch beeinflussen sie die Ladungen an den Stickstoffatomen und

bringen das Arginin in die richtige Stellung für eine nukleophile Substitution.

In Kristallen bilden sowohl PRMT1 als auch HMT1 ein ringförmige Dimere. Dabei gehen hydrophobe Seitenketten der Aminosäuren des Dimerisierungsarmes des einen Dimerpartners Bindungen mit hydrophoben AS der SAM-Bindedomäne des anderen Bindungspartners ein. PRMT1 ist nur als Dimer aktiv (Weiss *et al.*, 2000; Zhang und Cheng, 2003). In Gelfiltrationschromatografien eluiert rPRMT1 bei viel größeren Molekulargewichten, was auf einen Polypeptidkomplex schließen lässt (Lin *et al.*, 1996). Von HMT1 existiert die Kristallstruktur einen Hexamers aus drei Dimeren (Weiss *et al.*, 2000).

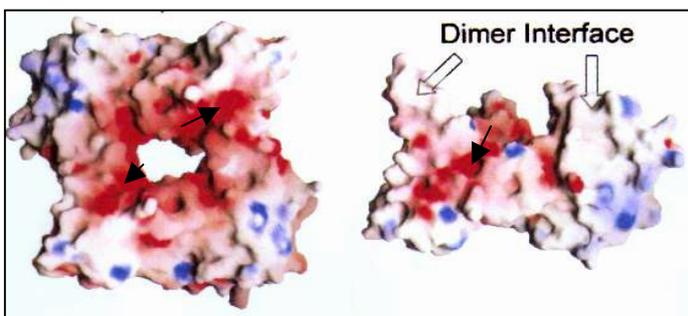


Abb. 5: **PRMT1-Dimer** (links)
PRMT1-Monomer (rechts)
(Zhang und Cheng, 2003)

Legende:
rot = negative Ladung, blau = positiv, weiß = neutral

Die Substratbindestellen befinden sich in der inneren Oberfläche der Öffnung des Ringes (s. Abb. 5 schwarze Pfeile) und an der äußeren Oberfläche der β -barrel-Struktur (in Abb. 5 nicht zu sehen). Sie zeichnen sich durch saure und negativ geladene Aminosäuren aus (Zhang und Cheng, 2003).

PRMT1 methyliert viele unterschiedliche Substrate (Bedford und Richard, 2005). Hier sollen nur einige Beispiele genannt werden: Über die Methylierung von PABPN1 und hnRNPs ist es an der mRNA-Prozessierung beteiligt (Bedford und Richard, 2005). Durch die Methylierung von Histon H4 wirkt es an der transkriptionellen Regulation mit (Yu *et al.*, 2006). Da es MRE11 methyliert, ist es an der DNA-Reparatur beteiligt (Boisvert *et al.*, 2005)

und durch die Methylierung von STAT1 spielt es bei der Signaltransduktion eine Rolle (Yu *et al.*, 2006).

1.2.2 PRMT3

PRMT3 wurde durch seine Assoziation mit PRMT1 gefunden (Tang *et al.*, 1998). Bisher wurde PRMT3 von Hefe (Bachand und Silver, 2004), Ratte (Zhang, Zhou, Cheng, 2000) und Mensch (Tang *et al.*, 1998) beschrieben, wobei humanes PRMT3 (hPRMT3) zu 90% mit dem Enzym der Ratte identisch ist.

hPRMT3 besteht aus 513 AS und hat eine molare Masse von ca. 58 kDa. Diese Methyltransferase ist im Gegensatz zu PRMT1 nur im Zytoplasma von Zellen zu finden (Tang *et al.*, 1998; Frankel *et al.*, 2002; Herrmann *et al.*, 2008).

Die Kern-Region von PRMT3 (AS 201-528) war die erste aufgeklärte Methyltransferasestruktur (Zhang, Zhou und Cheng, 2000). Diese Region ähnelt im Aufbau der von PRMT1. Deshalb sollen hier nur die Unterschiede hervorgehoben werden. Die Aminosäuresequenz der Kern-Region von PRMT3 weist bei der β -barrel-Struktur eine Deletion einer AS und die Insertion von acht AS an anderer Stelle auf. Trotz dieses geringen Sequenzunterschiedes ist die Ringöffnung der PRMT1- und PRMT3-Dimere unterschiedlich in Form und Größe (s. 4.8.1.1). PRMT3 bildet zwar ringförmige Dimere, jedoch sind für PRMT3 noch keine Hexamere nachgewiesen worden.

Zusätzlich zu der Kern-Region weist PRMT3 einen spezifischen N-Terminus aus 194 AS auf. Dieser ist reich an sauren Aminosäuren und enthält eine Tyrosinphosphorylierungskonsensussequenz (Y85-F93) sowie ein C2H2-Zinkfingermotiv (C48-H69). Der N-terminale Zinkfinger ist für die Substratspezifität (Bachand und Silver, 2004) und dadurch für die Aktivität sehr wichtig (Frankel und Clarke, 2000). Im Gegensatz zu PRMT1 konnte die direkt am N-Terminus von PRMT3 befindliche α -Helix (α X) kristallisiert werden, welche bei der Fixierung des SAM hilft.

Auch der Reaktionsmechanismus ist dem von PRMT1 sehr ähnlich. Die aktiven Zentren von PRMT1 und 3 lassen sich gut zur Deckung bringen (Zhang und Cheng, 2003). Dabei übernehmen die Glutamate E326 und E335 von PRMT3 dieselbe Funktion wie E144 und E153 bei PRMT1.

PRMT3 methyliert GST-GAR, Sam68, PABPN1 und rpS2 (Swiercz, Persin und Bedford, 2005). Damit sind für PRMT3 viel weniger Substrate bekannt als für

PRMT1. Über die Methylierung des rpS2-Proteins reguliert PRMT3 die Ribosomenbiosynthese und wirkt so an der Regulation der Translation mit.

1.2.3 PRMT6

Bei der Durchsuchung der Datenbanken für das menschliche Genom wurde die sechste humane Arginin-Methyltransferase gefunden und PRMT6 genannt (Frankel *et al.*, 2002). Durch Unterschiede in der 5' bzw. 3'UTR existieren zwei Transkripte von 2,4 und 2,6 kb Länge. Das translatierte Protein besteht aus 375 AS und hat eine molare Masse von 41,9 kDa.

GFP-Fusionen von PRMT6 sind ausschließlich im Nukleus lokalisiert (Fankel *et al.*, 2002; Herrmann *et al.*, 2008).

Wie die anderen SAM-abhängigen Methyltransferasen weist auch PRMT6 die katalytische Kernregion, bestehend aus SAM-Bindedomäne, β -barrel-Struktur und Dimerisierungsarm auf.

Obwohl bisher in den Datenbanken keine Kristallstruktur erhältlich ist, kann davon ausgegangen werden, dass auch PRMT6 Dimere bildet. In Glycerolgradientenzentrifugationen sedimentierte PRMT6 wie ein Monomer oder kleines Oligomer (Herrmann *et al.*, 2008).

PRMT6 methyliert GST-GAR und Npl3 und erzeugt dabei ω - N^G -Monomethylarginin und asymmetrisches ω - N^G, N^G -Dimethylarginin. Ein weiteres Substrat ist das Arginin 2 von Histon H3 (Guccione *et al.*, 2007). Über die Methylierung des Transaktivator Proteins (Tat) (Boulanger *et al.*, 2005) und des HIV-I Rev-Proteins wird die Expression von HIV-Genen unterdrückt. PRMT6 methyliert außerdem die *high mobility group A* Proteine HMGA1a und b und ist damit an der Chromatindynamik beteiligt (Miranda *et al.*, 2005; Sgarra *et al.*, 2006). PRMT6 ist die einzige Methyltransferase, welche auch Automethylierung zeigt (Frankel *et al.*, 2002).

1.3 PABPN1

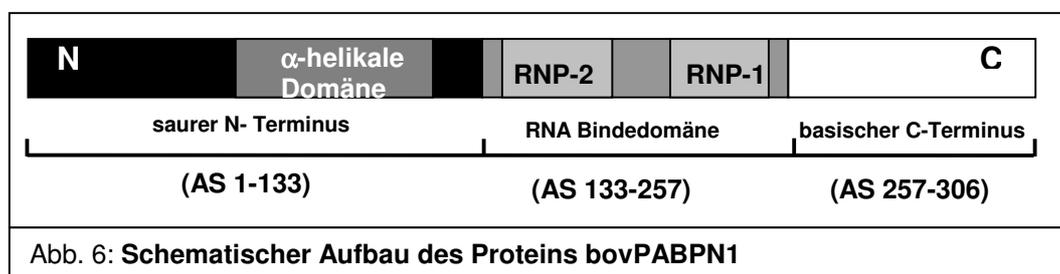
Poly(A)-Bindepoteine (PABPs) wurden bei allen Eukaryoten nicht aber bei Bakterien gefunden. Beim Menschen gibt es fünf verschiedene PABPs. Vier davon sind zytoplasmatisch: PABPC1, 3 und 5 sowie iPABP. PABPN1 ist das einzige nukleäre PABP (Mangus, Evans und Jacobson, 2003).

Xenopus PABPN1

In *Xenopus* wurden verschiedene Poly(A)-Bindeproteine entdeckt, welche alle in Oozyten zu finden sind und in der frühen embryonalen Entwicklung eine wichtige Rolle spielen. Dazu gehören die zytoplasmatischen Proteine ePAB (Voeltz *et al.*, 2001), ePABP2 (Good *et al.*, 2004), XePABP2 (auch p32 genannt) (Cosson *et al.*, 2004), XPABP1 (Cosson *et al.*, 2002b) und das nukleäre XPABPN1 (Kim *et al.*, 2001). ePAB wird für die zytoplasmatische Polyadenylierung in Oozyten und der frühen embryonalen Entwicklung benötigt. Auch schützt es die mRNA vor Deadenylierung. Es ist das am meisten vorkommende Poly(A)-Bindeprotein in Oozyten-, Ei- und Embryo-Extrakten (Cosson *et al.*, 2002b; Voeltz *et al.*, 2001). ePABP2 (Good *et al.*, 2004) und XePABP2 (Cosson *et al.*, 2004) sind zwei Allele des gleichen Gens und haben die gleiche Funktion wie ePAB. PABP1 und ePAB können Dimere bilden (Cosson *et al.*, 2004). PABP1 ist auch mit translationalen Komplexen assoziiert (Cosson *et al.*, 2002b). Das aus 296 AS bestehende XPABPN1 weist eine α -helikale *coiled-coil*-Domäne und eine RNA-Bindedomäne des RNP-Typs auf. In der Oozyte wird es maternal und später von der Zygote exprimiert (Kim *et al.*, 2001). Die Sequenz von XPABPN1 ist zu 70% mit der von *bovinem* PABPN1 (Rinder-PABPN1) identisch (Cosson *et al.*, 2004).

Bovines PABPN1

In dieser Arbeit wurde rekombinant gereinigtes *bovines* PABPN1, ehemals PABII genannt, als Substrat verwendet. Es besteht aus 306 AS und hat eine molare Masse von 32,8 kDa. Es setzt sich aus einem sauren N-Terminus, einer RNA-Bindedomäne und einem basischen C-Terminus zusammen (Nemeth *et al.*, 1995). Die folgende Abbildung 6 zeigt den schematischen Aufbau von PABPN1.



Der N-Terminus von PABPN1

Am N-Terminus befindet sich direkt nach dem Startmethionin eine alaninreiche Sequenz aus 10 Alaninen. In autosomal dominant vererbten Mutationen, weist PABPN1 12 bis 17 Alanine auf (Brais *et al.*, 1998). Dies verstärkt die ohnehin

vorhandene Neigung von PABPN1 zur Aggregation (Tavanez *et al.*, 2005). Dadurch entstehen filamentöse Einschlüsse in den Zellkernen von Muskelzellen (Calado *et al.*, 2000). Durch diese toxischen Fibrillen wird eine Krankheit hervorgerufen, welche oculopharyngeale Muskeldystrophie (OPMD) genannt wird (Brais *et al.*, 2003). Es wurde beschrieben, dass der N-Terminus von PABPN1 keine stabil gefaltete Tertiärstruktur hat (Lodderstedt *et al.*, 2008). Danach folgt die α -helikale Domäne, welche für die Interaktion mit der Poly(A)-Polymerase wichtig ist (Kerwitz *et al.*, 2003).

Die RNA-Bindedomäne von PABPN1

Die RNA-Bindedomäne enthält zwei RNP-Motive (Kühn *et al.*, 2003). Die RNP-Motive sowie der C-Terminus sind an der Bindung an den Poly(A)-Schwanz der mRNA beteiligt (Kühn *et al.*, 2003). Dabei geht ein PABPN1-Molekül mit 11 Adenosinen eine spezifische Bindung ein (Meyer *et al.*, 2002). Bis jetzt existieren keine Kristallstrukturen von PABPN1. In den Datenbanken sind jedoch Strukturen von zwei RNA-Bindedomänen eines humanen PABPs vorhanden (Deo *et al.*, 1999). Oubridge *et al.* konnten die RNA-Bindedomäne von U1A mit RNA kokristallisieren (Oubridge *et al.*, 1994).

Der C-Terminus von PABPN1

Eine Faltung des C-Terminus in eine Sekundär- oder Tertiärstruktur ist aufgrund der Aminosäurezusammensetzung eher unwahrscheinlich (s. Diskussion 4.7.3).

Im 49 AS langen C-Terminus von PABPN1 befinden sich 13 Arginine, welche alle asymmetrisch dimethyliert werden. Das aus dem Kalbsthymus gewonnene PABPN1 war an diesen Argininen vollständig dimethyliert. Außerdem waren zwei Arginine außerhalb des C-Terminus monomethyliert. Die dimethylierten Arginine befinden sich in RXR-Clustern, wobei X eine beliebige AS sein kann (Smith *et al.*, 1999).

Bisher war bekannt, dass PRMT1 und PRMT3 diese Arginine methylieren (Smith *et al.*, 1999).

Funktion von PABPN1

Durch die Bindung von PABPN1 an den Poly(A)-Schwanz und die Bindung der Poly(A)-Polymerase an PABPN1, wird die Affinität der Polymerase zur RNA erhöht und damit ihre Prozessivität gesteigert. (Wahle *et al.*, 1991; Bienroth *et al.*, 1993). PABPN1 limitiert die Länge des Poly(A)-Schwanzes bei Säugetieren auf ca. 250 nt und ist damit an seiner Längenkontrolle beteiligt (Wahle *et al.*, 1991 und 1995; Bienroth *et al.*, 1993).

Funktion der Arginindimethylierung von PABPN1

Auch über die Funktion der Arginindimethylierung von PABPN1 ist noch wenig bekannt. Weder die Affinität von PABPN1 zum Poly(A)-Schwanz, noch die Stimulierung der Poly(A)-Polymerase wird durch die Dimethylierung der C-terminalen Arginine beeinflusst (Kühn *et al.*, 2003; Smith *et al.*, 1999).

In einigen Veröffentlichungen wird die Arginindimethylierung als Schutz der Proteine vor Aggregation diskutiert. Das orthologe Protein Pab2 von *Saccharomyces pombe* neigt zur Aggregation, wenn die Methyltransferase HMT1 inaktiviert wurde (Perreault *et al.*, 2007). Auch die Selbstassoziation des *Saccharomyces cerevisiae*-Proteins Npl3 ist in einem Stamm verstärkt, in welchem HMT1 ausgeschaltet wurde (Yu *et al.*, 2004). Es konnte jedoch kein Effekt der Argininmethylierung auf das Aggregationsverhalten von *bovinem* PABPN1 nachgewiesen werden (Fronz *et al.*, 2008). In einer Veröffentlichung wird vorgeschlagen, dass die Arginindimethylierung als Schutz der Arginine vor endogenen reaktiven Dicarbonylagentien dienen könnte (Fackelmayer, 2005). Eine andere mögliche Funktion der Arginindimethylierung wäre deren Einfluss auf die intrazelluläre Lokalisation von Proteinen. Der Export des hnRNP Npl3 der Hefe wird beispielsweise durch die Methylierung des Proteins begünstigt (Shen *et al.*, 1998). Wird die Methylierung inhibiert, so führt dies zu einer signifikanten Abnahme des HMW FGF-2-Proteins im Zellkern (Pintucci, Quarto und Rifkin, 1996).

Lokalisation von PABPN1 in der Zelle

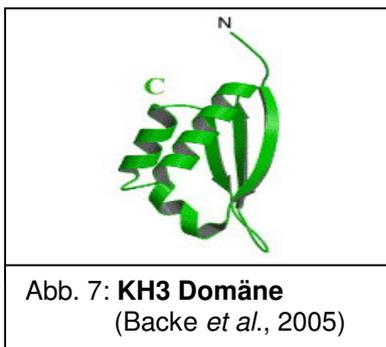
PABPN1 befindet sich vorwiegend im Zellkern (Wahle *et al.*, 1991; Krause *et al.*, 1994; Bear *et al.*, 2003; Kühn und Wahle, 2004). Es pendelt jedoch zwischen Zellkern und Zytoplasma hin und her (Calado *et al.*, 2000b). Sowohl der Export als auch der Import von PABPN1 geschehen aktiv. PABPN1 wird nicht passiv über die Bindung an die mRNA transportiert, denn es wird auch exportiert, wenn keine mRNA transkribiert wird. Bei 4°C kommt der Export von PABPN1 zum Erliegen. Danach wurde keine passive Diffusion beobachtet. Der Import erfolgt aktiv über die RanGTP-abhängige Bindung von PABPN1 an Transportin. Das nukleäre Lokalisationssignal (NLS) befindet sich am C-Terminus von PABPN1 und schließt methylierte Arginine ein. (Calado *et al.*, 2000b). Es stellt sich daher die Frage, ob die Arginindimethylierung des C-Terminus von PABPN1 einen Einfluss auf den Import bzw. Export des Proteins haben könnte.

1.4 hnRNP K

hnRNP steht für heterogenes nukleäres Ribonukleoprotein. Solche Proteine binden an RNA-Polymerase II-Transkripte. Im Zellkern sind sie an der Transkription und der Prozessierung der prä-mRNA beteiligt. Im Zytoplasma wirken sie an der Translation und am mRNA-Umsatz (*turnover*) mit (Krecic und Swanson, 1999).

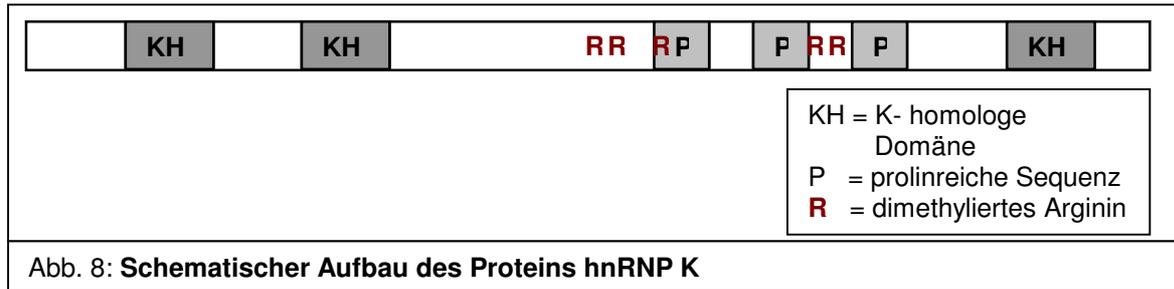
Einige hnRNPs pendeln zwischen Kern und Zytoplasma, auch ohne an RNA zu binden (Dreyfuss *et al.*, 1993).

hnRNP K wurde als eines der letzten der 20 hnRNPs gefunden, welche den hnRNP-Partikel bilden (Matunis *et al.*, 1992). Auch hnRNP K verfügt über ein N-terminales NLS sowie eine nukleäre *shuttling* Domäne (Michael *et al.*, 1997). Es bindet an CT-reiche einzelsträngige DNA und CU-reiche einzelsträngige RNA und stimuliert die Aktivität der RNA-Polymerase II (Gaillard, Cabannes und Strauss, 1994). Dadurch ist es an der transkriptionellen Aktivierung verschiedener Gene beteiligt. Es wirkt außerdem zusammen mit hnRNP E1 an der Inhibition der Translation der 15-Lipoxygenase (r15-LOX) in Retikulozyten mit (Ostareck und Ostareck-Lederer *et al.*, 1997, 2001, 2004). hnRNP K und hnRNP E1/E2 interagieren mit der IRES der c-myc-mRNA und steigern damit deren Translation *in vitro* und *in vivo* (Evans *et al.*, 2003). hnRNP K wird durch die Serinkinase Erk und die Tyrosinkinase c-Src phosphoryliert, wodurch seine Affinität zu Nukleinsäuren reguliert wird (Habelhah *et al.*, 2001; Ostareck-Lederer *et al.*, 2002).



hnRNP K weist drei KH-Domänen auf (Siomi *et al.*, 1993). KH1 und KH2 befinden sich am N-Terminus, KH3 am C-Terminus von hnRNP K. Es existiert eine Kristallstruktur und eine NMR-Struktur von KH3. Diese besteht aus 67 AS. KH3 setzt sich aus einem dreisträngigen antiparallelen β -Faltblatt zusammen, welches an drei α -Helices grenzt. Die Sekundär-

strukturen sind in folgender Reihenfolge über unstrukturierte Schleifen miteinander verknüpft: $\beta 1-\alpha 1-\alpha 2-\beta 2-\beta 3-\alpha 3$. Sowohl der N- als auch der C-Terminus sind in Lösung und im Kristall flexibel (s. Abbildung 7). Zwischen den $\beta 1$ -Strängen von zwei hnRNP K-Molekülen können sich vier Wasserstoffbrückenbindungen ausbilden, wodurch ein Pseudodimer entsteht (s. 4.9.1, Abb. 36 B und Backe *et al.*, 2005). Abbildung 8 zeigt eine schematische Darstellung von hnRNP K.



Zwischen den KH-Domänen 2 und 3 liegen drei prolinreiche Sequenzen. Außerdem befinden sich dort fünf RGG-Motive (Matunis *et al.*, 1992), von denen fünf Arginine dimethyliert sind (Arginin 256, 258, 268, 296 und 299). Für die Dimethylierung dieser fünf Arginine ist allein PRMT1 verantwortlich (Ostareck-Lederer *et al.*, 2006).

Zielsetzung dieser Arbeit

Zu Beginn dieser Arbeit war bekannt, dass PRMT 1 und 3 die Arginindimethylierung von PABPN1 katalysieren (Smith *et al.*, 1999). Durch eine Fraktionierung von Proteinextrakten aus Hela-Zellen und Maus-ES-Zellen konnte gezeigt werden, dass auch PRMT6 an der Arginindimethylierung von PABPN1 beteiligt ist. Diese Arbeiten wurden parallel zu der vorliegenden Dissertation von Katharina Fronz durchgeführt. PRMT1 und 3 methylieren PABPN1 *in vitro*. Dabei wurde festgestellt, dass ein N-terminaler GST-tag die Enzymaktivität von PRMT1 herabsetzt (Ostareck-Lederer *et al.*, 2006). Deshalb war das erste Ziel dieser Arbeit PRMT1, 3 und 6 ohne tag und mit dem kleineren His-tag in *Escherichia coli* zu exprimieren und zu reinigen. Mit Hilfe der rekombinanten Enzyme sollte bestätigt werden, dass diese für die Arginindimethylierung von PABPN1 verantwortlich sind. Ihre Reinigung sollte außerdem genügend große Enzymmengen liefern, um ihre Substratspezifität untersuchen zu können. Da bei Bakterien bisher keine PRMTs nachgewiesen werden konnten, sollten sie auch keine Polypeptide aufweisen, welche für die Methylierung durch die PRMTs wichtig sind. Deshalb sollte der Vergleich der spezifischen Aktivitäten der zellulären und der rekombinanten Enzyme als Argument dafür dienen, dass während der Reinigung der zellulären PRMTs kein wichtiger Faktor abgetrennt wurde.

Über die Substratspezifität der PRMTs ist bisher wenig bekannt (s. 1.2). Deshalb war das zweite Ziel dieser Arbeit die Untersuchung der Substratspezifität von PRMT1, 3 und 6 mit Hilfe von Peptiden und Proteinchimären. Diese Experimente sollten

Aufschluss darüber geben, ob die lokale Aminosäuresequenz des Substrates die Substratspezifität des Enzymes determiniert, oder ob benachbarte gefaltete Domänen die Aktivität des Enzymes beeinflussen können.

Bei einigen Proteinen beeinflusst ihre Methylierung ihre Lokalisation in der Zelle (Shen *et al.*, 1998). Um herauszufinden, ob dies eine Funktion der Methylierung von PABPN1 sein könnte, wurden Injektionsexperimente an *Xenopus laevis* Oozyten durchgeführt.

2. 1 Material

2. 1.1 Ausgangsvektoren

Die Expressionsplasmide pUK-His-synPABPN1 und pUK-His-synPABPN1 Δ c49 für *bovines* Poly(A)-Bindepotein sowie dessen C-terminale Deletionsmutante wurden von Uwe Kühn zur Verfügung gestellt (Kühn *et al.*, 2003).

Die Ausgangsplasmide pET28a-His-hPRMT3 und pGEX-6P-1-GST-hPRMT6 (Ostareck-Lederer *et al.*, 2006) für die Klonierung der PRMTs ohne *tag* sowie pET16b-hnRNP K-V3 stammten von Antje Ostareck-Lederer (Ostareck *et al.* 1997).

Das Plasmid pET28b-rPRMT1 wies eine Deletion der ersten 10 Aminosäuren auf und wurde von Xiaodong Cheng von der Emory Universität kloniert (Zhang und Cheng, 2003).

Das Plasmid pGEX6P-1-His-hPRMT1-V2 wurde von Bernhard Lagerbauer (Universität Würzburg) zur Verfügung gestellt.

Das Konstrukt pUK-H4C (Yvonne Kervitz, MLU Halle) enthielt PABPN1 mit einer N-terminalen Deletion der ersten 113 Aminosäuren (AS). Ein Stück des N-Terminus (114-125) war noch vorhanden sowie die α -helikale Domäne von PABPN1 (AS 126-159). Die RNP-Domäne von PABPN1 wurde durch die RBD4 aus *Xenopus* PABPC (AS 295-395) ersetzt. Dahinter befand sich der C-Terminus von PABPN1 (AS 259-306). Die RBD4 war über zwei KpnI-Schnittstellen eingefügt (Kervitz *et al.*, 2003).

pET11a-CspB wurde von Mirco Sackewitz (MLU Halle) zur Verfügung gestellt. Es enthält das offene Leseraster des Kälteschockproteins von *Bacillus subtilis*, welches über PCR und die Schnittstellen NdeI und BamHI kloniert wurde.

2.1.2 primer

Die verwendeten *primer* wurden bei der Firma Invitrogen Custom Primers bestellt. Eine Liste der *primer* befindet sich im Anhang.

2.1.3 Bakterienstämme

Für Klonierungszwecke wurden *Escherichia coli*- Zellen (*E. coli*) des Stammes XL-1-Blue verwendet. Für Expressionen wurden je nach Ergiebigkeit in Bezug auf die Proteinmenge verschiedene *E. coli*- Stämme benutzt: BL21(DE3), BL21(DE3) pUBS, oder BL(21)codon+.

2.1.4 Sterilisation

Alle Glasgeräte sowie Medien und Pufferlösungen wurden (sofern die Bestandteile dies zuließen) bei 121 °C und 1 bar für 30 min autoklaviert (Systec GmbH). Verwendete Plastikwaren waren meistens steril verpackt.

2.2 Methoden

2.2.1 Nukleinsäuretechniken

2.2.1.1 PCR

Für eine Polymerase-Kettenreaktion wurden die drei verschiedenen Polymerasen Pfu (Promega 2,5 U pro Ansatz), PfuTurbo (Stratagene 2,5 Units (U) pro Ansatz) oder Pwo (peqLab 1 U pro Ansatz) verwendet. Die Reaktionen wurden wie in den Anleitungen empfohlen angesetzt und der Thermocycler (TRIO-Thermoblock von Biometra) wie darin beschrieben programmiert. Eine Standard-PCR-Reaktion setzte sich aus folgenden Bestandteilen zusammen: Bidestilliertes Wasser, dem 1 X konzentrierten Reaktionspuffer des Herstellers, 3 ng Plasmid-DNA, *primer* (je 5 µM), dNTP-Mix (jedes dNTP 200µM) und 1-2,5 U Polymerase (s.o.). Zum Teil wurde DMSO (Sigma-Aldrich) hinzugefügt, so dass es 5 % des Reaktionsvolumens ausmachte. Der Reaktionsansatz hatte meistens ein Endvolumen von 100 µl.

2.2.1.2 Mutagenese

Die *primer* für eine PCR-Mutagenese wurden wie im QuickChange Site-Directed Mutagenesis Kit von Promega beschrieben entworfen. Im Gegensatz zur PCR

wurden für eine Mutagenese 50 ng Ausgangsplasmid und 50 pmol *primer* verwendet. Auch betrug das Reaktionsvolumen nur 50 µl. Als Kontrolle wurde ein Ansatz ohne Polymerase mitgeführt. Nach der Mutagenesereaktion wurde jeweils der Hälfte des Ansatzes 20 U DpnI-Restriktionsenzym (NEB) zugesetzt. Dann wurde das Ausgangsplasmid bei 37°C für 2 bis 4 Stunden verdaut. Jeweils 6 µl des Mutageneseansatzes vor und nach dem DpnI-Verdau wurden zur Kontrolle auf ein Agarosegel geladen.

2.2.1.3 Agarosegele

Für Agarosegele wurde eine entsprechende Menge Agarose (Serva) in 100 ml 0,5 X TBE-Puffer aufgeköcht. Vor dem Gießen der Gele wurden 5 µl einer 10 mg/ml Ethidium-Bromid-Stammlösung (Roth) zugesetzt. Als Laufpuffer diente ebenfalls 0,5 X TBE-Puffer. Dazu wurde 10 X TBE - Puffer mit bidestilliertem Wasser verdünnt.

10 X TBE:

216 g Tris (Serva)

110 g Borsäure (Merck)

7,44 g EDTA pH8 (Roche)

mit bidestilliertem Wasser auf 2 l aufgefüllt.

Die Proben wurden mit 10 X konzentriertem Ladepuffer so gemischt, dass dieser nur noch 1 X konzentriert vorlag.

10 X DNA-Ladepuffer:

25 mg Bromphenolblau-Natrumsalz (Merck)

25 mg Xylene Cyanolblau (Merck)

in 330 µl 150 mM Tris-HCl pH 7,6 gelöst

6 ml 87% Glycerin (Roth)

700 µl bidestilliertes Wasser.

Als Referenz für die Größe der Banden wurde meistens der 1 kb-Marker von Invitrogen verwendet. Damit die Ethidiumbromid-gefärbten DNA-Banden fotografiert werden konnten, wurde das Gel auf den UV-Tisch gelegt.

2.2.1.4 Elution von DNA aus Agarosegelen

Die Elution von DNA aus Agarosegelen wurde mit Hilfe des Elutionskits von Roche entsprechend der Anleitung vorgenommen. Abweichend dazu wurden die Agarosegele mit 0,5 X TBE gegossen (s. 2.2.1.3).

2.2.1.5 Restriktionsverdau

Es wurden ausschließlich Enzyme von Fermentas benutzt und nach den Angaben des Kataloges verwendet. Ein Testverdau nach einer DNA-Minipräparation hatte üblicherweise ein Reaktionsvolumen von 10 µl, welches 3 µl der DNA-Lösung, 1 µl des passenden 10 X Puffers, je 5-10 U der Enzyme sowie 0,5 µl einer 10 mg/ml BSA-Lösung und bidestilliertes Wasser enthielt. Ein solcher Ansatz wurde für 1 Stunde bei 37°C inkubiert und dann durch Zusatz von Ladepuffer (s. 2.2.1.3) gestoppt. Für den Verdau eines Vektors wurden standardmäßig 5-10 µg Plasmid-DNA eingesetzt. Die anderen Bestandteile der Reaktion wurden gemäß den Angaben im Katalog angeglichen. Auch die Inkubationszeit bei 37°C wurde dementsprechend verlängert. Der Verdau der Restriktionsschnittstellen an den Enden von PCR-Produkten erfolgte der Vollständigkeit halber meist über Nacht, da viele Enzyme an Enden nicht gut schneiden.

2.2.1.6 Dephosphorylierung

Um eine Religation von linearisierten Vektoren zu vermeiden, wurden diese mit Hilfe der *calf intestine alkaline phosphatase* (CIP) (Roche) an den 5'-Enden der Schnittstellen dephosphoryliert. Dazu wurden 1 µl CIP und 10 µl des dazugehörigen 10 X Puffers zu dem Restriktionsverdau oder dem Elutionsprodukt (s. 2.2.1.4 bzw. 5) zugegeben und der Ansatz mit bidestilliertem Wasser auf 100 µl aufgefüllt. Die Inkubation erfolgte bei 37°C für 1 Stunde. Danach empfahl sich eine Phenol/Chloroform-Extraktion mit anschließender Fällung der DNA (s. 2.2.1.7 und 2.2.1.8), da die CIP die nachfolgende Ligation stören kann. Bei Vektoren, welche mit zwei verschiedenen Enzymen geschnitten worden waren, wurde meistens auf eine Dephosphorylierung verzichtet.

2.2.1.7 Phenol/Chloroform-Extraktion

Vor der Phenol/Chloroform-Extraktion wurde der Ansatz mit bidestilliertem Wasser auf 400 µl aufgefüllt. Dann wurde es mit einem Volumen eines 1:1

Phenol/Chloroform-Gemisches gut vermischt, 2 min bei 14000 rpm in der Tischzentrifuge (BioFuge pico von Heraeus) zentrifugiert und der wäßrige Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Der Überstand wurde mit einem Volumen Chloroform (Merck) erneut kräftig gemischt, so dass er milchig wurde. Nach einer weiteren Zentrifugation (s.o.) wurde wieder die wäßrige Phase abgenommen und in ein neues Reaktionsgefäß gegeben.

2.2.1.8 Fällung der DNA

Da die Konzentration der DNA-Lösung nach der Phenol/Chloroform-Extraktion meist viel zu gering war, wurde die DNA gefällt und in einem kleineren Volumen 20 mM Tris-HCl pH 8 oder bidestilliertem Wasser wieder gelöst. Die Fällung erfolgte in 0,8 Volumen Isopropanol (Merck). Bei sehr geringer erwarteter DNA-Ausbeute wurden der DNA 3 M Natriumacetat pH 5 (Merck) hinzu gegeben, so dass die Endkonzentration 300 mM betrug. Das Gemisch wurde dann 15 bis 30 min bei 14000 rpm in der Tischzentrifuge zentrifugiert. Bei geringeren DNA-Mengen erfolgte die Zentrifugation bei 4°C in der Kühlzentrifuge (Eppendorf Zentrifuge 5417R). Der Überstand wurde entfernt und das Pellet mit 70% Ethanol gewaschen. Anschließend wurde der Überstand sorgfältig abgenommen und das Pellet entweder luftgetrocknet, oder für ca. 2 min die SpeedVac (Centrivac von Heraeus Instruments) benutzt. Dem Pellet wurde danach eine geeignete Menge 20 mM Tris-HCl pH 8 oder bidestilliertes Wasser zugesetzt. Dann wurde das Pellet entweder 15 min bei Raumtemperatur gelöst (siehe Minipräparation von DNA 2.2.2.4), oder im Thermoschüttler für 15 min bei 37°C geschüttelt.

2.2.1.9 Photometrische Konzentrationsbestimmung von DNA

Für eine spektrometrische Konzentrationsbestimmung wurden die DNA-Proben zumeist 1 zu 50 in Puffer oder Wasser verdünnt. Der Wert des Absorptionsmaximums der Probe bei 260 nm wurde aufgeschrieben. Die DNA-Konzentration wurde mit der Formel $c = OD_{260} \times 50 \mu\text{g} / \text{ml} \times \text{Verdünnungsfaktor}$ errechnet.

2.2.1.10 Ligation

Für eine DNA-Ligation wurden standardmäßig 50 ng geschnittener Vektor verwendet. Die Menge an Insert wurde mit folgender Formel berechnet:

$$x \text{ ng Insert} = \frac{\text{Menge des Vektors (50 ng)} \times \text{Größe des inserts (kbp)} \times 3}{\text{Größe des Vektors (kbp)}}$$

kBp = Kilobasenpaare

Das Reaktionsvolumen betrug meist 10 µl. Diese enthielten neben dem Vektor und dem *insert* noch 10 X T4-DNA-Ligase-Puffer und 400 U T4-DNA-Ligase (NEB). Meist hatten beide Ligationspartner "*sticky ends*", so dass eine Inkubation des Ligationsansatzes für 1 Stunde bei Raumtemperatur ausreichte. Nur selten wurde für 4 Stunden bei 16°C im Thermocycler, oder gar bei 4°C im Kühlschrank über Nacht ligiert. Bei größeren Ligationsvolumen wurde die DNA nach der Ligation gefällt (s. 2.2.1.8).

2.2.1.11 Sequenzierung

Für eine Sequenzierung wurden 200 bis 250 ng Plasmid-DNA verwendet. Diese wurden in einem Reaktionsansatz von 10 µl mit 5 pmol Primer, 1 µl 10 X ABI-Puffer und 2 µl ABI-Mix sowie bidestilliertem Wasser, gemischt. ABI-Puffer und ABI-Mix stammten aus dem ABI-Kit (BIGDye Terminator Kit von Applied Biosystems). Um Sequenzen vom Startcodon bzw. vom Stopcodon aus zu sequenzieren, wurden kommerzielle *primer* (Novagen) benutzt. Das verwendete Thermocycler-Programm lautete dann wie folgt: Anfangsdenaturierung bei 95°C für 2 min, Denaturierung im Zyklus 95°C für 30 sec, Hybridisierung bei 53°C für 30 sec, Elongation bei 72°C x min je nach Länge der Sequenz, 30 Zyklen, Endverlängerung für 5 min bei 72°C und Abkühlung auf 4°C. Bei längeren Sequenzen wurden eigene *primer* für die Sequenzierung der Mittelstücke verwendet und das Programm entsprechend angeglichen.

Nach der Kettenabbruchreaktion wurden die Ansätze mit bidestilliertem Wasser auf 20 µl aufgefüllt. Dann wurden sie über Sephadex G50-Säulen von nicht eingebauten Nukleotiden befreit. Dazu wurden 700 µl der Sephadex G50-Suspension (GE Healthcare) für 2 min bei 2000 g in Micro Bio-Spin Chromatography Columns (Biorad) zentrifugiert. Die 20 µl der Ansätze wurden in die Mitte der abgeschrägten Fläche des Säulenmaterials pipettiert. Dann erfolgte erneut eine Zentrifugation, wie oben beschrieben. 5 µl dieses Filtrats wurden in spezielle Sequenziergefäße pipettiert (Genetic Analyser 0,5 ml Sample Tubes von Applied Biosystems) und anschließend mit 20 µl HiDi Formamide (Applied Biosystems) gemischt. Dann wurde alles bei 98°C für 2-3 min denaturiert. Die Sequenzierung erfolgte im Sequenzer

(Perkin Elmer), wie in dessen Anleitung beschrieben. Alle neu klonierten Konstrukte wurden so sequenziert.

2.2.1.12 Klonierung der einzelnen Konstrukte

Enzyme

pET19b-hPRMT1-V2

Zur besseren Vergleichbarkeit der PRMTs sollten sie alle humanen Ursprungs sein. Da PRMT1 bisher nur von der Ratte verwendet worden war, wurde deshalb humanes PRMT1 kloniert. Humanes PRMT1, auch HRMT1L2 genannt, liegt in 3 verschiedenen Spleißvarianten vor (Scorilas *et al.*, 2000). Diese unterscheiden sich nur in den ersten 4 Exons des N-Terminus. Es wurde später sogar noch eine vierte Variante gefunden (Mathioudaki *et al.*, 2004; *accession number* AY775289).

Die humane Spleißvariante hPRMT1-V2 (GenbankTM *accession number* AF222689) wurde per PCR vom Konstrukt pGEX6P-1-His-hPRMT1-V2 (Bernhard Lagerbauer, Universität Würzburg) amplifiziert. Es wurden die Restriktionsschnittstellen für NcoI und BamHI eingeführt. Das Amplifikat wurde mit diesen Enzymen geschnitten und in den mit denselben Enzymen geöffneten pET19b-Vektor (Novagen, s. Anhang) ligiert. Durch die Wahl dieser Schnittstellen wurde der His-tag des Vektors herausgeschnitten. Die Spleißvariante V1 wurde ebenfalls kloniert, da sie aber im Weiteren keine Verwendung fand, soll sie hier nicht beschrieben werden.

pET19b-hPRMT3

hPRMT3 wurde durch PCR vom Konstrukt pET28a-His-hPRMT3 (Antje Ostareck-Lederer, MLU Halle) gewonnen und wie hPRMT1-V2 in den pET19b-Vektor ligiert, der dadurch seinen His-tag verlor. Die hPRMT3-Sequenz wies einen Basenaustausch an der Stelle 1471 bp (490 AS) auf. Dadurch entsteht die Aminosäure Arginin an Stelle eines Lysins. Dieser Austausch wurde mit Hilfe einer Mutagenese behoben.

pT7-7-hPRMT6

hPRMT6 wurde mit Hilfe einer PCR vom Konstrukt pGEX-6P-1-GST-hPRMT6 (Antje Ostareck-Lederer, MLU Halle) vervielfältigt, mit NdeI und BamHI geschnitten und in

den pT7-7-Vektor ligiert (Tabor und Richardson, 1985), der durch die vorhergehende Insertion von PAP513 keinen His-*tag* mehr enthielt (Uwe Kühn, MLU Halle).

pET19b-His-HPRMT6

Aus dem Konstrukt pT7-7-hPRMT6 wurde mit NdeI und BamHI hPRMT6 ausgeschnitten und in den pET19b-Vektor ligiert. Durch die Wahl dieser Schnittstellen blieb der His-*tag* erhalten.

Substrate für PRMTs

Wie die zuvor beschriebenen PRMT-Konstrukte wurden auch alle Sequenzen der im Folgenden beschriebenen Chimären vor der Verwendung sequenziert. Damit wurde sichergestellt dass ihr Leseraster stimmte.

Da die Klonierung der DNA-Konstrukte für die Chimären beschrieben wird, werden alle folgenden Sequenzangaben in Basenpaaren (bp) gemacht. Angaben zu den Aminosäuren sind in Abschnitt 3.5 zu finden.

pET16b-KLP

In das Konstrukt pET16b-hnRNP K Spleißvariante V3 (Antje Ostareck-Lederer, MLU Halle) wurden per PCR Restriktionsschnittstellen für die Enzyme KpnI und SacII eingebracht. Dann erfolgte mit Hilfe dieser Enzyme eine Excision eines hnRNP K-Fragmentes, im Folgenden KL genannt. Dieses erstreckte sich von Basenpaar (bp) 723 bis 999 und war somit 279 bp lang. KL codiert für alle fünf Arginine, welche in hnRNP K dimethyliert werden (s. 1.4). Über eine PCR wurden die letzten 147 bp amplifiziert, welche für den C-Terminus von PABPN1 codieren. Das Amplifikat wurde außerdem mit Schnittstellen für die oben genannten Enzyme versehen. Dann erfolgte die Ligation der Sequenz des C-Terminus von PABPN1 an die Stelle von hnRNP K, wo zuvor KL ausgeschnitten worden war.

pET16b-KSP

pET16b-KSP wurde analog zu pET16b-KLP kloniert. Nur wurde hier ein kleineres Stück, genannt KS, von hnRNP K ausgeschnitten. Dieses codiert zwar auch für alle fünf wichtigen Arginine, erstreckt sich jedoch nur von bp 753 bis bp 927 und ist daher nur 174 bp lang. Auch hier wurde KS durch die letzten 147 bp des C-Terminus von PABPN1 ersetzt.

pGM10-PKL

Zur Klonierung von pGM10-PKL wurde zunächst das Konstrukt pUK-H4C (Uwe Kühn, MLU Halle) verwendet (Kerwitz *et al.*, 2003 und 2.1.1). Mit Hilfe der Restriktionsenzyme KpnI und BamHI wurde die RBD4 zusammen mit dem PABPN1 C-Terminus ausgeschnitten. Das KL-Fragment aus hnRNP K (s.o.) wurde durch PCR mit den Schnittstellen für diese Enzyme amplifiziert. Dann erfolgte eine Ligation in das geschnittene pUK-H4C-Konstrukt. Um den fehlenden N-Terminus von PABPN1 zu regenerieren, wurde mit Hilfe der Schnittstellen für XhoI und BamHI eine Umklonierung in den Vektor pGM10-His-SynPABPN1 (Uwe Kühn, MLU Halle) vorgenommen.

pGM10-PKS

Das Konstrukt pGM10-PKS wurde analog zum pGM10-PKL kloniert, nur dass hier wiederum das kleinere hnRNP K Fragment KS (s.o.) die letzten 147 bp des C-Terminus von PABPN1 ersetzte.

pGM10-CKL

Für die Klonierung von pGM10-CKL wurde das Konstrukt pGM10-PKL benutzt. Daraus wurde per Restriktion mit den Enzymen NdeI und KpnI der PABPN1-Anteil von bp 1 bis bp 774 ausgeschnitten. Zurück blieb das KL-Fragment von hnRNP K. Dann wurde CspB vom Konstrukt pET11a-CspB (s. 2.1.1) amplifiziert und mit Schnittstellen für die obigen Restriktionsenzyme versehen. Nun konnte die gesamte CspB-Sequenz vor das KL-Fragment ligiert werden.

pGM10-CKS

pGM10-CKS wurde analog zu pGM10-CKL kloniert. Nur wurde hierfür der PABPN1-Anteil auf dem pGM10-PKS-Konstrukt ausgeschnitten und durch das offene Leseraster für CspB ersetzt.

pUK-CP

Für die Klonierung von pUK-CP wurde erneut das pUK-H4C-Konstrukt (Uwe Kühn, MLU Halle) verwendet (Kerwitz *et al.*, 2003). Mit den Restriktionsenzymen NdeI und KpnI wurde ein Verdau durchgeführt, so dass nur noch die letzten 147 bp des

C-Terminus von PABPN1 übrig blieben. Dann wurde das offene Leseraster für CspB N-terminal damit fusioniert.

pGM10-CKLC

Zur Herstellung des Konstruktes pGM10-CKLC wurde der Vektor pGM10-CKL benutzt. Daran wurde eine Mutagenese durchgeführt, durch welche das Stopcodon in ein Codon für die AS Tyrosin umgewandelt wurde. Nun wurde der ORF von CspB mit Stopcodon per PCR amplifiziert, wobei gleichzeitig Schnittstellen für BamHI und EcoRI eingeführt wurden. Das mutagenisierte pGM10-CKL wurde mit diesen Restriktionsenzymen geschnitten und das PCR-Produkt von CspB hinter das KL-Fragment ligiert.

pGM10-CKSC

pGM10-CKSC wurde analog zu pGM10-CKLC kloniert, nur wurde hier das Konstrukt pGM-CKS mutagenisiert und verlor dadurch das Stopcodon.

pUK-CPC

Zur Synthese des pUK-CPC-Konstruktes wurde zunächst eine Mutagenese des Stopcodons des pUK-CP-Vektors durchgeführt. Dann wurde das Plasmid mit BamHI und EcoRI geschnitten und das CspB-PCR-Produkt mit denselben Schnittstellen hinter die letzten 147 bp des C-Terminus von PABPN1 im pUK-CP-Konstrukt ligiert.

2.2.2 Mikrobiologische Methoden

2.2.2.1 Herstellung elektrokompetenter *E. coli*

Aus *E. coli* XL-1-Blue- Glycerinkulturen erfolgte mit Hilfe eines sterilen Zahnstochers ein Verdünnungsausstrich auf eine Agarplatte mit entsprechendem Antibiotikum. Nach einer Inkubation der Platte über Nacht bei 37°C wurde eine Einzelkolonie genommen, und damit eine 3 ml Vorkultur in flüssigem LB-Medium mit dem entsprechenden Antibiotikum angeimpft. Diese wurde über Nacht bei 37°C geschüttelt. Am nächsten Tag wurden 400 ml flüssiges LB-Medium mit entsprechendem Antibiotikum versetzt und mit der Vorkultur angeimpft, so dass eine OD_{600nm} von ca. 0,030 gemessen wurde. Der Kultur wurde zusätzlich noch 0,1% D-Glucose-Monohydrat (Merck) zugesetzt, da diese Bakterien sich sonst nur sehr

langsam vermehren. Nach 2-3 Stunden schütteln bei 37°C war meist eine OD_{600nm} von 0,8 erreicht. Die Bakterien wurden bei 4°C und einer Geschwindigkeit von 4000 rpm für 15 min pelletiert. Danach folgten mehrere Waschschriffe mit eiskaltem 10% Glycerin. Die Bakterien wurden im ersten Schritt in einem Volumen 10% Glycerin resuspendiert und wie oben beschrieben zentrifugiert. In den nächsten Schritten betrug das Volumen nur die Hälfte, ein Viertel und schließlich 10 ml. Dabei wurden die Bakterien immer auf Eis gehalten. Das Pellet des letzten Schrittes wurde in 1 bis 2 ml 10% Glycerin aufgenommen, in ca. 40-50 Eppendorf Gefäßen zu 50 bzw. 100 µl aliquotiert und so schnell wie möglich in flüssigem Stickstoff eingefroren. Zur Kontrolle auf Verunreinigungen wurden die nun kompetenten Bakterien auf Agarplatten mit allen relevanten Antibiotika ausgestrichen. Die Transformations-effizienz konnte mit Hilfe eines Kontrollplasmides bekannter Konzentration (1 ng) getestet werden. Dazu wurde 1 ng Plasmid in 50 µl Bakterienlösung gegeben, transformiert (s.u.) und 10-20 µl davon aufplattiert. Dies sollte 50-100 Kolonien ergeben.

2.2.2.2 Elektrotransformation

Zunächst wurden die Transformationsküvetten auf Eis gekühlt. Dann wurden die kompetenten Bakterien auf Eis aufgetaut und schnellstmöglich verwendet. Dazu wurden sie in die Küvette pipettiert und 0,5 bis 1 µl Plasmid-DNA zugefügt. Bei Transformationen von Ligationsreaktionen wurden aufgrund der geringeren Effizienz meist 100 µl Bakterien und 1 µl DNA-Lösung verwendet. Die Küvette wurde mehrfach auf den Tisch geklopft, um störende Blasen im Medium zu beseitigen. Danach wurde sie abgetrocknet und in die Elektroporationsmaschine gestellt (EasyjectPlus von EquiBio). Die Elektrotransformation erfolgte bei einer Spannung von 2500 V für 5 Sekunden. Nach dem Puls wurde den Bakterien möglichst schnell 500 µl flüssiges LB-Medium zugesetzt und alles in ein Reaktionsgefäß überführt. Bei einer Selektion auf Ampizillinresistenz konnten bis zu 100 µl der transformierten Bakterien sofort auf ampizillinhaltigen Agarplatten ausgestrichen werden. Dagegen mussten sie bei einer Kanamycinresistenz zunächst bei 37°C mindestens 1 Stunde geschüttelt werden, damit sich diese Resistenz ausbilden konnte.

2.2.2.3 Agarplatten und flüssiges LB-Medium

Das Feststoffgemisch für LB-Medium wurde bei der Firma Roth bestellt und musste nur noch, wie angegeben, in bidestilliertem Wasser gelöst werden. Danach wurde es in Flaschen abgefüllt bei 121 °C und 1 bar für 30 min autoklaviert (Systec GmbH).

Agarplatten enthielten 15 g Agarose pro Liter LB-Medium und 0,1 mg/ml Antibiotikum.

2.2.2.4 Minipräparation von Plasmid-DNA

Für eine Minipräparation von Plasmid-DNA wurden mit sterilen Pipettenspitzen Einzelkolonien von Agarplatten genommen. Damit wurden 3 ml flüssigen LB-Mediums angeimpft, welche je 3 µl einer 1000 X konzentrierten Antibiotikallösung enthielten. Dieses Gemisch wurde in Reagenzgläsern mit Deckel über Nacht bei 37 °C geschüttelt. Dann erfolgte die Plasmid-Minipräparation nach dem Prinzip der alkalischen Lyse (s. Cornel Mülhardt, 2002).

Für eine Transformation von Minipräp-DNA wurde diese zuvor mit Phenol/Chloroform extrahiert und anschließend gefällt (2.2.1.7 und 2.2.1.8).

Sollte direkt nach der DNA-Präparation eine Sequenzierung folgen, wurde das peqGold Plasmid Minipräp-Kit 1 von peqLab verwendet.

2.2.2.5 Midipräparation von Plasmid-DNA

Nach einem erfolgreichen Testverdau der Minipräp-DNA (s. 2.2.1.5) wurden 100µl des Restes der Vorkultur dazu verwendet, 100 ml (bei *high copy* Plasmiden) bzw. 200 ml (bei *low copy* Plasmiden) flüssigen LB-Mediums anzuimpfen, die ein entsprechendes Antibiotikum enthielten. Diese Kultur wurde bei 37 °C über Nacht geschüttelt. Zur Gewinnung größerer und saubererer DNA-Mengen für Sequenzierungen oder Expressionen wurde damit eine Midipräparation von Plasmid-DNA durchgeführt. Hierzu wurde das Qiagen Plasmid Midi Kit verwendet und wie darin beschrieben, vorgegangen.

2.2.3 Proteinbiochemische Methoden

2.2.3.1 *In vitro* Transkription und -translation

Für die *in vitro* -Transkription und -Translation wurde das TNT T7 Quick Coupled Transcription/Translation System von Promega verwendet.

Im 30 µl Ansatz befanden sich dazu: 25 µl TNT T7 Quick Master Mix des Kits, 1 µg Plasmid, 1 µl ³⁵S-Methionin (10 µCi). Dieses Gemisch wurde mit sterilem nucleasefreiem Wasser aufgefüllt. Eine Linearisierung des Plasmides erbrachte meistens keine Vorteile, weshalb darauf verzichtet wurde. Der Ansatz wurde ein bis zwei Stunden bei 30 °C inkubiert.

2.2.3.2 SDS-PAGE

Für ein SDS-Polyacrylamidgel wurden die Puffer des Laemmli-Systems (Laemmli, U.K. 1970) verwendet (s. auch Hubert Rehm, "Der Experimentator", 4. Auflage Spektrum Verlag 2002).

Die Acrylamidkonzentration der Gele richtete sich nach der Größe der aufzutrennenden Proteine und wurde nach der Tabelle im "Experimentator" (Hubert Rehm, "Der Experimentator", 4. Auflage Spektrum Verlag 2002) ermittelt. Standardmäßig wurden 12%-Gele gegossen, für kleinere Chimären 15%-Gele und für Peptide 20%-Gele (s.3.1).

Für ein 12% Gel wurde folgendes zusammenpipettiert:

Trenngel:

8,4 ml	bidestilliertes Wasser
6,0 ml	4 X Trenngelpuffer
9,6 ml	30% Acrylamidlösung
0,3 ml	APS (Merck)
0,06 ml	TEMED (Merck)

Sammelgel:

7,36 ml	bidestilliertes Wasser
3,0 ml	4 X Sammelgelpuffer
1,6 ml	30% Acrylamidlösung
0,08 ml	APS
0,04 ml	TEMED

Meistens wurden 15 µl Proteinprobe mit 5 µl 4 X SDS-Probenpuffer gemischt, 3 min bei 90 °C aufgeköcht, zentrifugiert und geladen.

4X SDS-Probenpuffer:

375 mM Tris-HCl pH 6,8

2% SDS

12% Glycerol 87%

0,05% Bromphenolblau

10% 2- β -Mercaptoethanol wurden frisch dazu gegeben.

Ein solches Gel wurde entweder für einen *Western blot* (2.2.3.12) verwendet oder mit Coomassie-Färbelösung angefärbt. Im zweiten Fall wurde es entfärbt und dann entweder getrocknet oder gleich digital in den Computer eingelesen.

Die Coomassiefärbelösung bestand aus: 100 ml/l Essigsäure (Roth), 250 ml/l Methanol (Roth) und 0,25 g Coomassie Brilliant Blue G250 (Serva).

Die Entfärbelösung setzte sich aus 30% Methanol und 10% Essigsäure zusammen.

2.2.3.3 Expression von Proteinen

Für eine Expression wurden die entsprechenden Bakterienstämme (s. 2.1.3), wie in 2.2.2.2 beschrieben, elektrotransformiert. Die 500 μ l LB-Medium mit den Bakterien wurde auf 3 antibiotikumhaltigen Agarplatten ausplattiert und über Nacht bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Kolonien mit Einmalspateln und 500 μ l flüssigem LB-Medium abgeschabt.

Mit dieser Kultur wurden dann LB-Flüssigkulturen angeimpft, so dass eine OD_{600nm} von 0,030 zu messen war. Dem Medium wurde zuvor das entsprechende Antibiotikum zugesetzt. Diese Bakterienkulturen wurden unter Schütteln bei 37°C bis zu einer OD_{600nm} von 0,4-0,6 wachsen gelassen. Danach wurden sie für 10 min bei 3500 g und 4°C abzentrifugiert und in Minimalmedium wieder resuspendiert. 1 l dieses Mediums hatte die Zusammensetzung:

Minimalmedium

200 ml 5 X M9 Salzlösung

20 ml 20% Pepton aus tryptisch verdautem Casein (Roth)

10 ml 20% Glucose

1 ml 1 M $MgCl_2$ (Merck)

0,3 ml 1 M CaCl₂ (Merck)

Dieses Gemisch wurde mit sterilem bidestilliertem Wasser auf 1 l aufgefüllt. Die M9-Salzlösung bestand aus:

5 X M9 Salzlösung (1l) (nach Sambrook, Fritsch und Maniatis (1989), A2.2):

42,5 g Na₂HPO₄ x 2H₂O (Merck)

15 g KH₂PO₄ (Merck)

2,5 g NaCl (Roth)

5 g NH₄Cl (Merck)

400 ml einer solchen Kultur wurden 10 µl Antibiotikum zugesetzt. Dann wurde die Expression durch Zugabe von 1 ml 400 mM IPTG gestartet. Es wurde eine Probe vor (VI) und eine Probe nach Induktion (NI) genommen. Dann folgte eine Inkubation unter Schütteln bei ca. 23 °C für 2 bis 3 Stunden. Längere Expressionen resultierten meistens nur in der Aggregation der Proteine. Danach wurden die Bakterien wie oben beschrieben zentrifugiert und die Pellets entweder in flüssigem Stickstoff eingefroren oder gleich lysiert.

2.2.3.4 Reinigung der Proteine

Alle Reinigungsschritte wurden unter kühlen Bedingungen, entweder im Kühlschrank der FPLC (Pharmacia Biotech) oder im Kühlraum, durchgeführt. Die Proben wurden stets auf Eis gehalten und nicht öfter als nötig in flüssigem Stickstoff eingefroren und wieder aufgetaut.

Die einzelnen Fraktionen wurden zusammen mit dem *load* (L vor Beginn der Säule) und dem Durchfluss (Ft) sowie den Waschsritten (W) auf ein SDS-Gel aufgetragen (s. 2.2.3.2). Dieses wurde entweder mit Coomassie gefärbt oder einer Silberfärbung unterzogen (s. 2.2.3.13).

Bei der Reinigung der Enzyme wurden die Fraktionen auf ihre Aktivität getestet (s. 2.2.4.3 und 3.1) und nur die aktivsten vereinigt. Bei den Substratproteinen wurden jeweils die im Coomassie-gefärbten Gel am saubersten erscheinenden Fraktionen zusammengefügt. Dieser Proben-*pool* wurde immer gegen den Equilibrierungspuffer der nächsten Säule dialysiert (s. 2.2.3.11).

Die Standardprozedur für die Reinigung über eine Säule sah nach dem Beladen das Waschen mit 1-5 Säulenvolumen (SV) Puffer A vor. Danach folgte über 10 SV ein

Gradient aus Puffer A und B. Schließlich wurde erneut mit einem Säulenvolumen Puffer B und dann mit Puffer A gewaschen. Der Gradient wurde fast immer in 40 Fraktionen aufgeteilt, von denen anschließend Aliquots (F) entnommen wurden. Gereinigte Proteine wurden vor dem Verbrauch aliquotiert.

Für die Reinigung wurden zwei verschiedene Protokolle verwendet. Ein Protokoll wurde von Bodo Moritz (MLU, Halle) für die Reinigung von hnRNP K etabliert. Das Protokoll zur Reinigung der hnRNP K-haltiger Chimären (CKL, CKS, CKLC, CKSC) sah eine ähnliche Reinigungsstrategie vor. Ein weiteres Protokoll wurde von Uwe Kühn (MLU, Halle) für die Reinigung von PABPN1 entwickelt (Kühn *et al.*, 2003) und für die Reinigung von PABPN1 und PABPN1-haltiger Fusionsproteine (PKL, PKS, CP, CPC) verwendet.

2.2.3.5 Reinigung von PRMT1 ohne tag

Zellaufschluss

Nach der Expression der Proteine (s. 2.2.3.3) wurde das Bakterienpellet auf Eis aufgetaut und in ca. 6 ml eiskaltem Lysispuffer resuspendiert. Der Lysispuffer bestand folgenden Bestandteilen:

Lysispuffer:

20 mM	Tris-HCl pH8
1 M	KCl
0,25%	NP40 (Sigma-Aldrich)

Anschließend wurden Proteaseinhibitoren (Roche Diagnostics) hinzugefügt:

- Leupeptin einer Stammlösung von 2 mg/ml in Wasser zu einer Endkonzentration von 0,4 µg/ml.
- Pepstatin einer Stammkonzentration in Ethanol von 1 mg/ml zu einer Endkonzentration von 0,7 µg/ml.
- PMSF (Phenylmethylsulfonylfluorid von Roth) einer Stammkonzentration von 0,2 M in Ethanol zu einer Endkonzentration von 0,5 mM.

Der Zellaufschluss der Bakterien erfolgte mit einem Ultraschallgerät mit 3 X 30 Pulsen und zwischenzeitlichen Pausen von je 30 Sekunden. In diesen konnte sich

das Lysat in einem Eisbad wieder abkühlen, so dass die Proteine geschützter waren. Durch eine Zentrifugation bei 12000 g für 30 min bei 4 °C wurden die Zelltrümmer der Bakterien abgetrennt.

Zur Überprüfung der Effizienz der Expression und des Zellaufschlusses wurden die Proben vor und nach der Induktion (VI, NI) zusammen mit Proben vor dem Aufschluss (VL), nach dem Aufschluss (NL) und nach der Zentrifugation (NZ) sowie vom Pellet (P) auf ein SDS-Gel aufgetragen.

Alle PRMTs ohne *tag* wurden nach dem Zellaufschluss über eine zuvor experimentell ermittelte Säulenkombination bestehend aus DEAE-Säule, Hydroxyapatit-Säule (HA-Säule) und Gelfiltration gereinigt. Die Expression und Reinigung von hPRMT6 ohne *tag* sowie His-hPRMT6 wurde von Dr. Knut Kölbl übernommen.

Anionenaustauschchromatografie (DEAE-Säule)

Für diesen ersten Reinigungsschritt wurde eine Leersäule mit der entsprechenden Menge an DEAE-Sepharose (von Pharmacia Biotech: 10 mg Protein pro ml Säulenvolumen) gefüllt.

Dann wurden die beiden Puffer für den Gradienten hergestellt und entgast.

PufferA:

50 mM	Tris-HCl pH 7,4
50 mM	KCl
1 mM	EDTA
0,5 mM	DTT (Gerbu Biotechnik GmbH)
10%	Glycerin

PufferB:

50 mM	Tris-HCl pH 7,4
500 mM	KCl
1 mM	EDTA
0,5 mM	DTT
10%	Glycerin

DTT wurde immer erst am Ende hinzugefügt, wenn der Puffer schon gekühlt war, damit es nicht so schnell oxidieren konnte.

Die Säule wurde mit Puffer B auf die maximale Leitfähigkeit eingestellt. Danach wurde sie mit Puffer A nach Angaben des Herstellers des Materials equilibriert. Das Protein wurde mit einer Geschwindigkeit von einem Säulenvolumen pro Stunde auf die Säule geladen und ein Aliquot vom Durchfluss (Ft) abgenommen. Auch der Gradient lief mit einer Geschwindigkeit von einem Säulenvolumen pro Stunde. Die Enzyme wurden in einem KCl-Gradienten von 50 mM bis 500 mM eluiert.

Hydroxyapatitchromatografie

Der nächste Schritt zur Reinigung von PRMT1 ohne *tag* war eine Hydroxyapatitchromatografie. Das Material wurde, wie in der Anleitung (Bio-Rad) beschrieben, in eine Leersäule gegossen (5 mg Protein pro ml Säulenvolumen). Zur Durchführung dieser Methode wurde der Artikel von M. J. Gorbunoff zu Rate gezogen (Gorbunoff, 1985).

Die Equilibrierungslösung war ungepuffert und setzte sich wie folgt zusammen:

Equilibrierungslösung:

0,001 M	MgCl ₂
0,5 mM	DTT
10%	Glycerin

Mit dieser Lösung wurde die Säule auch nach dem Laden der Probe gewaschen. Sowohl die Puffer für die ersten Elutionsschritte als auch die Puffer für den Gradienten enthielten die oben angegebenen Bestandteile der Equilibrierungslösung. Vor dem eigentlichen Elutionsgradienten wurden zwei Vorelutionen durchgeführt. Der Puffer der ersten Vorelution beinhaltete zu den oben genannten Bestandteilen 0,05 M MgCl₂ und der nachfolgende 0,3 M KCl. Dem folgte ein Waschschrift mit 0,001M Phosphatpuffer pH 6,8. Die eigentliche Elution erfolgte in einem fünfstufigen Gradienten mit 0,01 M bis 0,3 M Phosphatpuffer pH 8. Danach wurde die Säule mit 2 SV 300 mM Phosphatpuffer gewaschen und in 1 mM Puffer gelagert.

Diese Lösungen enthielten folgende Substanzen (Gomori *et al.*, 1955):

1M Phosphatpuffer pH 6,8 (10 ml):

4,97 ml	1 M K ₂ HPO ₄
5,03 ml	1 M KH ₂ PO ₄

1M Phosphatpuffer pH 8 (100 ml):

94 ml 1 M K_2HPO_4

6 ml 1 M KH_2PO_4

Der pH wurde jeweils mit einem pH-Meter überprüft.

Gelfiltration

Zur weiteren Reinigung der PRMTs ohne *tag* wurden die aktivsten Fraktionen der Hydroxyapatitchromatografie mit Hilfe von Centriprep filter devices (Millipore) oder Centricon filter devices (Millipore) nach Anleitung des Herstellers aufkonzentriert.

Danach konnten 200-250 μ l Proteinlösung auf eine Superdex 200HR 10/30 Säule (Pharmacia Biotech) geladen werden. Der Gelfiltrationspuffer enthielt folgendes:

Gelfiltrationspuffer:

20 mM Tris-HCl pH7,4

100 mM KCl

10 mM DTT

Den Fraktionen wurde erst nach der Gelfiltration 10% Glycerol zugesetzt. Anschließend wurden sie in geeigneten Volumina aliquotiert.

2.2.3.6 Reinigung von PRMT3 ohne *tag*

Die Bakterienpellets wurden, wie in 2.2.3.5 beschrieben, aufgeschlossen, zentrifugiert und mit Proteaseinhibitoren versehen. Die Reinigung von PRMT3 ohne *tag* beinhaltete die selben Reinigungsschritte wie für PRMT1 ohne *tag*: DEAE-Säule, Hydroxyapatit-Säule und Gelfiltration.

Anionenaustauschchromatografie (DEAE-Säule)

Die Anionenaustauschchromatografie mit der DEAE-Säule wurde wie für die Reinigung von PRMT1 ohne *tag* beschrieben durchgeführt. Der einzige Unterschied bestand darin, dass die Puffer kein EDTA enthielten. Dies wurde damit begründet, dass PRMT3 N-terminal einen Zinkfinger aufweist, welcher für die Substratspezifität des Enzyms von Bedeutung ist (s. 1.2.2). Da EDTA mit den Zinkionen des Zinkfingers Chelate bilden und damit den Zinkfinger zerstören könnte, wurde es bei der Reinigung von PRMT3 den Puffern nicht zugesetzt.

Hydroxyapatitchromatografie

Der Equilibrierungspuffer für die Hydroxyapatitchromatografie war ungepuffert und enthielt folgende Bestandteile:

0,001 M	NaCl
0,5 mM	DTT
10%	Glycerol

Mit dieser Lösung wurde die Säule auch nach dem Laden der Probe gewaschen. Sowohl die Puffer für die ersten Elutionsschritte als auch die Puffer für den Gradienten enthielten die oben angegebenen Bestandteile der Equilibrierungslösung. Es folgte eine Vorelution mit 0,3 M KCl und der oben (2.2.3.5) beschriebene Waschschrift mit 0,001 M Phosphatpuffer pH 6,8. Der Elutionsgradient und die folgenden Waschschriffe entsprachen denen der Reinigung von PRMT1 ohne *tag*. Die Reinigung von PRMT6 ohne *tag* wurde von Knut Kölbel durchgeführt (s. Fronz *et al.*, 2008).

2.2.3.7 Reinigung von His-PRMT1 und 3

Die Reinigung der PRMTs mit His-*tag* erfolgte über eine Ni-NTA-Säule und eine MonoQ- bzw. ResourceQ-Säule.

Zellaufschluss

Die Bakterienpellets wurden, wie in 2.2.3.5 beschrieben, aufgeschlossen, zentrifugiert und mit Proteaseinhibitoren versehen.

Ni-NTA-Säule

Für ein Pellet von 2 g wurden 0,5 ml Ni-NTA-Agarose verwendet (Ni-NTA Superflow von Qiagen). Diese wurde zur Equilibrierung vorher zwei Mal in Puffer N (s.u.) resuspendiert und danach kurz abzentrifugiert. Anschließend wurde die Ni-NTA-Agarose zusammen mit dem Lysat in eine Bio-Rad Econo-Column gefüllt. Die Bindung des His-*tag* der Enzyme an das Ni-NTA-Material erfolgte dann im Drehinkubator im Kühlraum. Bestand der *tag* aus zehn Histidinen, so reichte eine zweistündige Inkubation aus. Standen jedoch nur sechs Histidine zur Verfügung, dann erfolgte die Bindung über Nacht.

Die Elutionspuffer enthielten verschiedene Mengen einer 2 M Imidazol-Stammlösung in Puffer N (s.u.).

Puffer N :

24 mM	Tris-HCl pH8
1,5 mM	MgCl ₂
1 M	KCl
5%	Glycerol

Für ein Säulenvolumen von 125 µl verlief das Protokoll dann wie folgt:

Wash 1&2	2X	1ml	5 mM	Imidazolösung
Wash 3&4	2X	1ml	20 mM	Imidazolösung
Elution 5&6	2X	1ml	50 mM	Imidazolösung
Elution 7&8	2X	1ml	200 mM	Imidazolösung
Elution 9&10	2X	1ml	500 mM	Imidazolösung
Wash 11&12	2X	1ml	1000 mM	Imidazolösung

Anionenaustauschchromatografie (MonoQ/ResourceQ-Säule)

Zur Anionenaustauschchromatografie wurde entweder eine 1 ml MonoQ-Säule oder eine ResourceQ-Säule (1 ml) (Pharmacia Biotech) verwendet. Die Elution erfolgte mit Hilfe eines KCl-Gradienten von 100 mM bis 1 M KCl.

Puffer A und B enthielten ferner:

20 mM	Tris-HCl pH 8
5-10%	Glycerin
1 mM	EDTA (außer bei PRMT3-Reinigungen)
1 mM	DTT

His-PRMT6 wurde von Knut Kölbl gereinigt (s. Fronz *et al.*, 2008).

2.2.3.8 Reinigung der Chimären CKL, CKS, CKLC, CKSC

(Erläuterung der Abkürzungen 3.5 Abb. 23 und Text)

Die Reinigung dieser Chimären erfolgte über eine Ni-NTA-Säule und eine Hydroxyapatit (HA)-Säule.

Zellaufschluss und Ni-NTA-Säule

Der Zellaufschluss wurde wie in 2.2.3.5. und die Ni-NTA-Säule wie in 2.2.3.7 beschrieben durchgeführt.

Bei der Ni-NTA-Chromatografie waren aber Hochsalzbedingungen von besonderer Wichtigkeit, da sowohl hnRNP K als auch seine Chimären bei Salzkonzentrationen unter 400 mM aggregieren (s. 4.7). Da die Proteine während der Dialyse zu niedrigeren Salzkonzentrationen ausfielen, konnten keine Säulen verwendet werden, bei denen eine geringere Salzkonzentration zur Bindung an das Material nötig war (MonoQ, RespoureceQ etc.).

Hydroxyapatitchromatografie

Da die Salzkonzentration bei einer Bindung an Hydroxylapatit nicht ausschlaggebend ist, wurde die Probe mit einer Salzkonzentration von 400 mM auf eine Hydroxyapatit-Säule geladen. Diese wurde zuvor mit folgendem Puffer equilibriert:

Equilibrierungspuffer:

0,4 M	KCl
0,5 mM	DTT
10%	Glycerin
20 mM	Imidazol

Die oben genannten Chimären aggregieren in gebundener Form nicht so leicht. Deshalb wurde auf dieser Säule eine Umpufferung auf eine niedrigere KCl-Konzentration vorgenommen. Dazu wurde die Säule mit folgendem Waschpuffer gespült:

Waschpuffer:

0,15 M	KCl
0,001 M	Phosphatpuffer pH8
0,5 mM	DTT
10%	Glycerin
20 mM	Imidazol

Zur Elution wurde ein Phosphatgradient von 1 mM bis 500 mM Phosphatpuffer verwendet. Puffer A und B enthielten, bis auf das Phosphat, dieselben Bestandteile wie der Waschpuffer. Die einzelnen Fraktionen durften nicht zu oft aufgetaut werden, da das nun wieder ungebundene Protein bei niedrigeren KCl-Konzentrationen erneut aggregierte.

Stabilisierende Zusätze wurden getestet, hatten aber z.T. Auswirkungen auf die Enzyme im Methylierungstest (2.2.4.3 und Diskussion 4.7). Zudem würden die ohnehin schon gering konzentrierten Chimären zusätzlich verdünnt, weshalb auf diese Zusätze verzichtet wurde. Stattdessen wurden die Proteine aliquotiert und nicht mehr als zwei Mal aufgetaut.

Obwohl die Chimären (CKL, CKS, CKLC, CKSC) nach der Hydroxyapatit-chromatografie noch nicht vollständig von kontaminierten Proteinen befreit waren (s. 3.5, Abb. 24), konnte keine Gelfiltrationssäule angeschlossen werden, da die Chimären schon beim Aufkonzentrieren vor der Säule an den Filtrationsmembranen kleben blieben. Auch wurden die Proteine durch die Gelfiltration zu stark verdünnt.

2.2.3.9 Reinigung von His-bovPABPN1

Die Reinigung von *bovinem* PABPN1 mit His-tag erfolgte über eine Ni-NTA-Säule, gefolgt von einer MonoQ- und einer MonoS-Säule.

Zellaufschluss

Für die Expression einer genügend großen Menge an PABPN1 wurden meist größere Kulturen benötigt. Deren Pellets mussten dann im *Disruptor* (Constant Cell Disruption Systems) bei einem Druck von 2,4 kbar aufgeschlossen werden. Die Zugabe der Proteaseinhibitoren sowie die Zentrifugation nach der Lyse wurden, wie im Protokoll für die Reinigung der His-PRMTs beschrieben, durchgeführt. Der Lysispuffer bestand jedoch beim "PABPN1-Protokoll" aus anderen Chemikalien:

Lysispuffer PABPN1:

50 mM	K ₂ HPO ₄ pH 8
300 mM	NaCl
10%	Glycerin

Ni-NTA-Säule

Die Bindung des His-*tag* an das Säulenmaterial erfolgte wie oben beschrieben (2.2.3.7). Bei der Elution entsprach Puffer N jedoch in diesem Fall dem Lysispuffer (s.o.).

Das "PABPN1-Protokoll " sah folgendes Vorgehen vor:

Wash1 mit	20 SV	Puffer N	
Wash2 mit	20 SV	20 mM	Imidazolösung
Wash3 mit	6 SV	50 mM	Imidazolösung
Wash4 mit	6 SV	75 mM	Imidazolösung
Elution mit	20 SV	500 mM	Imidazolösung in 5 Schritten (Elution 1-5)

MonoQ/ResourceQ-Säule

Die Anionenaustauschchromatografie wurde, wie zuvor für die PRMTs mit His-*tag* beschrieben, durchgeführt (s. 2.2.3.7).

Kationenaustauschchromatografie (MonoS/ResourceS-Säule)

Zur weiteren Reinigung von PABPN1 mit His-*tag* erfolgte z.T. ein Reinigungsschritt mit einer MonoS (Pharmacia Biotech)- bzw. ResourceS-(Amersham Bioscience) Säule.

Die Elution wurde mit Hilfe eine KCl-Gradienten von 50 mM bis 1 M KCl durchgeführt.

Puffer A und B enthielten ferner:

20 mM	HEPES pH 8 (Gerbu)
10%	Glycerin
1 mM	EDTA
0,5 mM	DTT

2.2.3.10 Reinigung der Chimären PKL, PKS, CP, CPC

(Erläuterung der Abkürzungen 3.5 Abb. 23 und Text)

Die Chimären PKL, PKS, CP und CPC wurden mit wenigen Abweichungen wie His-bovPABPN1 gereinigt (s. 2.2.3.9).

Zellaufschluss und Ni-NTA

Die Imidazolösungen wurden z.T. abweichend vom "PABPN1-Protokoll" denen des His-PRMT-Protokolls angeglichen. Ansonsten wurde das "PABPN1-Protokoll" befolgt.

MonoQ/ResourceQ-Säule

Die Anionenaustauschchromatografie wurde wie zuvor für die PRMTs mit His-*tag* beschrieben durchgeführt (s. 2.2.3.7).

MonoS / ResourceS-Säule

Um die gebundenen Nukleinsäuren abzutrennen, wurde die CP-Chimäre versuchsweise auf diese Säule geladen.

Das Fusionsprotein befand sich jedoch mit den Nukleinsäuren zusammen im Durchfluss, so dass diese Reinigungsmethode entfiel (weiteres dazu s. 4.7.2).

2.2.3.11 Dialyse

Zwischen den einzelnen Säulenchromatografien einer Proteinreinigung wurden die Proteine gegen den Equilibrierungspuffer der jeweils nächsten Säule dialysiert.

Dazu wurden zunächst Dialyseschläuche verschiedener Ausschlussvolumen (Serva) für 10 min in 2 % Natriumcarbonat und 1 mM EDTA gekocht. Danach wurden sie nochmals für 10 min nur in 1 mM EDTA erhitzt. Dann wurden die Schläuche mit bidestilliertem Wasser gewaschen und in 70 % Ethanol im Kühlschrank gelagert.

Vor einer Dialyse wurden die Schläuche mit bidestilliertem Wasser und anschließend mit Dialysepuffer gespült. Vor der Befüllung des Schlauches wurden der Probe Proteaseinhibitoren zugesetzt (s. 2.2.3.5). Das Volumen des Dialysepuffers war stets 100 Mal größer als das der Probe. Die Dialyse erfolgte im Kühlraum unter Rühren für 2 Stunden oder über Nacht. Bevor die dialysierten Proben auf eine Säule geladen wurden, mussten stets die Leitfähigkeiten der Probe und des Equilibrierungspuffers der Säule verglichen werden. War eine zu große Differenz dazwischen vorhanden, wurde weiter dialysiert. Nach der Dialyse wurde die Probe erneut mit Proteaseinhibitoren versehen. Dann wurde sie für 10 min bei 4°C bei 12000 g zentrifugiert und ein Aliquot als *load* entnommen. Erst anschließend wurde die Probe auf die jeweilige Säule geladen.

2.2.3.12 Western blot

Für einen *Western blot* wurden zunächst sechs dicke Whatmanpapiere (Chromapapier, Whatman 3 mm von Fisher Scientific) und die *blot*-Membran (Protran Nitrocellulose Transfer Membran von Whatman) auf die Größe des Gels zugeschnitten und in 1 X Transferpuffer gelegt.

10 X Transferpuffer:

58 g Tris

29 g Glycerin

3,7 g SDS

Der Puffer wurde mit bidestilliertem Wasser auf 1 l aufgefüllt.

Für 1 X Transferpuffer wurden 100 ml 10 X Transferpuffer mit 200 ml Methanol gemischt und mit bidestilliertem Wasser aufgefüllt.

Dann wurden die drei ersten Whatmanpapiere auf die Kathode der Semidry-Blotkammer gelegt. Darauf kam das in 1 X Transferpuffer gewaschene Gel. Dann wurde die *blot*-Membran platziert. Zur späteren Orientierung wurde die rechte obere Ecke des Gels und der Membran abgeschnitten. Auf die Membran wurden wiederum drei Whatmanpapiere gelegt und dann die Kammer mit dem Deckel zugeschraubt, welcher die Anode enthielt. Die Milliamperezahl wurde mit Hilfe der für die Blotapparatur angegebenen Formel berechnet: $0,8-3 \text{ mA} / \text{cm}^2$. Dann wurde für höchstens eine Stunde geblottet und nach Ablauf dieser Zeit die Membran für drei Minuten in PonceauS-Lösung gelegt. Die PonceauS-Lösung bestand aus 0,5 g PonceauS (Sigma) und 1 ml Essigsäure und wurde mit bidestilliertem Wasser auf 100 ml aufgefüllt. Danach wurde die Membran mit Leitungswasser entfärbt, bis die Banden deutlich zu sehen waren. Dann wurden der Proteinmarker und gefärbte Gelspuren mit einem weichen Bleistift markiert. Nun folgte das Blockieren der Membran. Dazu wurde die Membran für eine Stunde in einem Gemisch aus Milchpulver (Sucofin) und 1 X TN-Tween geschüttelt. Dieses wurde zuvor filtriert, damit es keine Klumpen enthielt. Dabei konnte die Konzentration des Milchpulvers je nach Antikörper variieren.

10 X TN-Tween enthielt 24,2 g Tris und 87,6 g NaCl. Diese Chemikalien wurden in 800 ml bidestilliertem Wasser gelöst. Dann wurde das Gemisch mit HCl auf pH 7,5

eingestellt. Erst anschließend wurden 5 ml Tween dazugeben. Danach wurde die Lösung mit bidestilliertem Wasser auf 1 l aufgefüllt.

α -hPRMT3-Antikörper (Ostareck-Lederer *et al.*, 2006)

hPRMT3 wurde mit Hilfe von α -hPRMT3-Serum detektiert. Dazu wurde nach dem Blockieren drei Mal für 10 min mit 1 X TN-Tween gewaschen. Das Serum wurde 1:500 in einem filtrierten Gemisch aus 5%-Milchpulver in 1 X TN-Tween verdünnt. Dann wurde die Membran für eine Stunde unter Schütteln darin inkubiert und danach erneut, wie oben beschrieben, gewaschen. Als sekundärer Antikörper diente α -rabbit-HRP (GE-Healthcare), welcher 1:5000 mit 5%-Milchpulver in 1 X TN-Tween verdünnt wurde. Die Inkubation mit den sekundären Antikörpern erfolgte immer unter Schütteln für 30 min. Schließlich wurde wiederum gewaschen und danach der *blot* entwickelt.

α -rPRMT1 (Côté *et al.*, 2003)

Bei der Benutzung dieses Antiserums wurde fast genauso verfahren, wie bei einer Detektion mit α -hPRMT3-Serum. Nur wurde der primäre Antikörper hier 1:1000 verdünnt.

α -PABPN1 Lama-Antikörper (Verheesen *et al.*, 2006)

Vor der Verwendung des α -PABPN1 Lama-Antikörpers (3F5) wurde die Membran mit 4 % Milchpulver in 1 X PBS blockiert. Der Lama-Antikörper wurde mit 2 % Milchpulver in 1 X PBS 1:800 verdünnt. Die Bindung des Antikörpers an das geblottete PABPN1 erfolgte über Nacht im Kühlraum unter langsamem Schütteln. Da der Lama-Antikörper einen Myc-*tag* trug, konnte als sekundärer Antikörper der α -cMyc-Antikörper (Invitrogen) dienen. Dieser wurde 1:2500 in 2 % Milchpulver in 1 X TN-Tween verdünnt. Die Membran wurde damit für eine Stunde unter Schütteln bei Raumtemperatur inkubiert. Schließlich wurde der α -mouse-HRP-Antikörper (GE-Healthcare) als tertiärer Antikörper 1:200 in 5% Milchpulver in 1 X TN-Tween verdünnt und die Membran damit für 30 min inkubiert. Gewaschen wurde jeweils wie oben beschrieben. Weitere Informationen sind der oben angegebenen Veröffentlichung zu entnehmen.

α -bovPABPN1 (Krause *et al.*, 1994)

Vor der Nutzung dieses primären Antikörpers wurde die Membran für eine Stunde in 2,5 % Milchpulver in 1 X TN-Tween blockiert. Dann wurde der Antikörper in dem gleichen Milchpulver-TN-Tween-Gemisch 1:1000 verdünnt und die Membran darin für eine Stunde geschüttelt. Gewaschen wurde jeweils nur durch Schwenken in 1 X TN-Tween, was sechs Mal wiederholt wurde. Als sekundärer Antikörper diente der *swine*- anti-*rabbit* Antikörper (Dako), welcher 1:5000 in 2,5 % Milchpulver in 1 X TN-Tween verdünnt wurde.

α -hnRNP K-Antikörper (Narmann *et al.*, 2008)

Vor der Verwendung dieses primären Antikörpers wurde die Membran für eine Stunde mit 4% Milchpulver in 1X TN-Tween blockiert. In der gleichen Lösung wurde der Antikörper 1:10000 verdünnt und die Membran damit eine halbe bis eine Stunde inkubiert. Gewaschen wurde jeweils sechs Mal für 5 min in 1 X TN-Tween. Als sekundärer Antikörper wurde der α -*mouse*-HRP-Antikörper 1:500 verdünnt.

Zur Entwicklung des *blots* wurden Super Signal West Pico Stable Peroxide Solution und Luminol *Enhancer* Solution (Therma Scientific) verwendet. In der Dunkelkammer wurden Filme (GE Healthcare) für unterschiedliche Zeiten aufgelegt und damit belichtet. Die Filme wurden entwickelt (Röntgen Liquid von Tetenal), in Wasser gewaschen, und das Ergebnis fixiert (Röntgen Superfix von Tetenal). Schließlich wurden die Filme gewaschen, getrocknet und mit Hilfe von Markierungen auf der Blotmembran der Marker und die Geltaschen eingezeichnet.

2.2.3.13 Silberfärbung von Coomassie-gefärbten SDS-Gelen in 30 min

Eine Silbergefärbung wurde nach dem Protokoll von Nesterenko *et al.* (1994) durchgeführt.

2.2.3.14 Bestimmung der Proteinkonzentration

Photometrische Konzentrationsbestimmung

Die Extinktion wurde photometrisch bei 280 nm bestimmt. Danach wurde die Proteinkonzentration c basierend auf dem Lambert Beer'schen Gesetz $E = c \times \epsilon \times d$

mit Hilfe des Extinktionskoeffizienten ϵ ausgerechnet. Dieser wurde unter Verwendung des Computerprogramms Protean ermittelt.

Bradford-Test

Für einen Bradford-Test wurde zunächst eine 1 zu 5 Verdünnung des Bradford-Reagenzes (Roti-Quant von Roth) vorgenommen. Je 500 μl dieses Reagenzes wurden mit 20 μl einer BSA-Verdünnung bekannter Konzentration gemischt und die Absorption bei 595 nm gemessen. So wurde eine Eichreihe für verschiedene BSA-Konzentrationen ermittelt. Schließlich konnten auch 20 μl der passend verdünnten Proteinprobe auf diese Art gemessen und mit Hilfe der Eichreihe die Konzentration bestimmt werden.

Bestimmung der Proteinkonzentration mit Hilfe eines SDS-Gels

Als genaueste Bestimmungsmethode für die Proteinkonzentration partiell gereinigter Proteine erwies sich deren Bestimmung mit Hilfe eines SDS-Gels. Auch hierfür wurde eine Eichreihe von verdünnten BSA-Mengen neben verschiedenen Volumina der Proteinprobe aufgetragen. Das Gel wurde Coomassie-gefärbt, gut entfärbt und anschließend digital in den Computer eingelesen. Mit Hilfe des Programmes ImageQuant konnte die Schwärzung der BSA-Banden der Eichreihe bestimmt werden. Dann wurde deren Schwärzung über ihrer Proteinmenge aufgetragen. Mit Hilfe dieser Eichgerade konnte die Konzentration der Proben berechnet werden.

2.2.4 Aktivitätstests

2.2.4.1 Filterbindungstest für die Bindung von Proteinen an RNA

Für den Filterbindungstest wurde zunächst in einer PNK-Reaktion Oligo(A)₁₄ mit $\gamma^{32}\text{P}$ -ATP radioaktiv markiert und gefällt (s. Sambrook, Fritsch und Maniatis, 1989). Das dazu verwendete Oligo-A14 (sowie andere Poly(A)-Fraktionen, s. 2.2.4.2) stammten von Sylke Meyer, MLU Halle. Die Effektivität der Markierung wurde über die Bindung der Proben an DE81-Papier und eine anschließende Szintillationsmessung bestimmt (Stayton und Kornberg, 1983). Die RNA-Konzentration nach der Fällung wurde berechnet. Dann wurde eine Verdünnungsreihe des zu untersuchenden RNA-Bindeproteins in Filterbindungspuffer (s. Kühn *et al.*, 2003) angefertigt. Danach erfolgte der Filterbindungstest (s. Kühn *et al.*, 2003 und Wahle *et al.*, 1993).

2.2.4.2 Analyse der RNA-Bindung durch native Gelelektrophorese

Hierfür enthielt ein Bindungsansatz: 1 μl 1,5 μM konzentriertes und ^{32}P -markiertes Poly(A) einer Länge zwischen 105 und 130 Nukleotiden (Herstellung s. 2.2.4.1), 18 μl Bindungspuffer (s.o. aber mit 0,2 mg/ml methyliertem BSA) und 1 μl einer Bindeproteinverdünnung in Bindepuffer. Diese Ansätze wurden auf ein natives Agarose/Polyacrylamid-Kompositgel geladen (s. Ruegsegger, Beyer und Keller, 1996) und mit dem Phosphorimager und dem Computerprogramm ImageQuant ausgewertet (s. 3.1).

2.2.4.3 Methylierungstest

Methylierungstest mit PABPN1 als Substrat (TCA-Fällung/Gel)

Diese Methode wurde von Antje Ostareck-Lederer beschrieben (Ostareck-Lederer *et al.*, 2006). Eine Methylierungsreaktion von 25 μl Volumen setzte sich aus folgenden Chemikalien zusammen:

Methylierungsreaktion (Ostareck-Lederer *et al.*, 2006).

50 mM	HEPES pH 8
40 mM	Kaliumacetat (Merck)
0,2 mg / ml	BSA
0,01%	NP40
10%	Glycerin
1 mM	EDTA pH 8
0,5 mM	DTT
960 pmol	^{14}C -SAM (38,4 μM) (Amersham, GE Healthcare)
500 ng	PABPN1 (15,6 pmol bzw. 0,624 μM)
<1 μg	Enzym

Jeder Reaktionsansatz wurde auf dem Vortexer gemischt, abzentrifugiert und für 3 Stunden bei 30°C inkubiert. Es wurden 11 μl eines 25 μl Ansatzes auf ein 12% SDS-Gel geladen. Dieses wurde getrocknet, und die radioaktiven Banden wurden per Autoradiografie sichtbar gemacht. Weitere 11 μl derselben Ansätze wurden einer TCA-Fällung unterzogen und anschließend mit Hilfe einer

Absaugvorrichtung durch einen Glasfaserfilter (Glass Microfibre Filtern GF/C von Whatmann) filtriert (siehe Ostareck-Lederer *et al.*, 2006).

In dieser Arbeit wurde die Menge der eingebauten Methylgruppen wie folgt ermittelt: Der Filter wurde in 2 ml Szintillationslösung gegeben und die Radioaktivität (cpm) im Szintillationszähler gemessen. Mit Hilfe der Herstellerangaben auf der SAM-Verpackung konnte die Konzentration von SAM errechnet werden. Mit dieser Information konnte eine Eichreihe mit verschiedenen Mengen an SAM ebenfalls im Szintillationszähler gemessen werden. Die Steigung dieser Eichreihe entsprach der spezifischen Aktivität des SAM in dpm/pmol. Mit Hilfe der spezifischen Aktivität konnten die gemessenen dpm-Werte in die molare Menge an eingebauten Methylgruppen umgerechnet werden. Eine *unit* (U) wurde als Einbau von pmol Methylgruppen unter den oben genannten Bedingungen in 3 Stunden Inkubationszeit definiert.

Methylierungstest mit Peptiden als Substrat

Die Peptide stammten von Kristin Löbner aus der AG von Prof. Beck-Sickinger der Universität Leipzig und wurden, wie in Fronz *et al.* 2008 beschrieben, hergestellt. Die Etablierung des Methylierungstests mit Peptiden als Substrat wird im Ergebnisteil (3.1) beschrieben. Dort sind auch die Reaktionsbedingungen sowie die Analysemethode zu finden.

2.3 Oozyteninjektion

Die *Xenopus laevis* Oozyten wurden von der AG Markwardt (Humanphysiologie der MLU Halle) zur Verfügung gestellt.

2.3.1 Auswahl der Oozyten

Aus den in Barth's Medium befindlichen Oozyten wurden zunächst solche des Stadiums fünf für die Injektionsexperimente ausgesucht. Diese Oozyten zeichnen sich dadurch aus, dass sie groß sind, einen weißen intermediären Ring aufweisen und der dunkle und der helle Pol sich gut voneinander abgrenzen. Die Oozyten wurden zum Transport mit einer abgebrochenen Pasteurpipette in ein Greinerröhrchen mit Barth's Medium überführt. Danach wurden sie so bald wie möglich in einem Uhrglas mit Barth's Medium ausgebreitet, da sie im Reinerröhrchen schnell miteinander verklumpen.

1 X Barth's Medium (Modified Barth's Saline (MBS)):

100 mM	NaCl
5 mM	HEPES (mit NaOH eingestellt auf pH7,4)
1 mM	CaCl ₂
1 mM	MgCl ₂

2.3.2 Präparation der Injektionsnadel

Aus Glaskapillaren (GB 150F-8P 0,86 X 1,5 X 80 mm with filament von Science Product, Hofheim) wurden mit Hilfe eines Ziehgerätes (Typ Pu1-E von World Precision Instruments) Injektionsnadeln gezogen. Diese wurden mit einer Pinzette ca. 1,5 cm über der Spitze unter einem Binokular (Zeiss) bei 1,5 facher Vergrößerung abgebrochen. Danach wurden die Nadeln mit Mineralöl (Sigma Adrich) gefüllt. Der Kolben des Mikroinjektors (DRUMMOND "Nanoject" manuell, Herbert Saur Laborbedarf) wurde ganz zurückgedreht und die Nadel eingeschraubt. Danach wurde der Kolben wieder ganz herausgedreht, wodurch das Mineralöl gleichmäßig aus der Nadel tropfen sollte.

2.3.3 Vorbereitung der Probe

Die durch die *in vitro* Translation mit ³⁵S-Methionin (s. 2.2.3.1) radioaktiv markierte Proteinprobe wurde bei 14000 rpm in der Kühlzentrifuge für 10 min abzentrifugiert, um Festbestandteile zu beseitigen, welche die Nadel verstopfen könnten. Dann wurden ca. 3 Tropfen Mineralöl auf ein Stück Parafilm plaziert und 5 µl der Probe in das Öl pipettiert. Die Injektionsnadel wurde mit Hilfe des im Mikromanipulator (Firma Narishige) eingespannten Mikroinjektors in die Probe gefahren. Die Probe wurde durch das Hineindrehen des Kolbens komplett in die Nadel gesaugt.

2.3.4 Injektion

Von einer Mikrotiterplatte wurde die Kante abgebrochen, da sonst die Injektionsnadel anstößt. Dann wurden einzelne Oozyten in Tropfen von Barth's Medium auf der Mikrotiterplatte plaziert und mit einer Pinzette so ausgerichtet, dass der weiße Ring in 45°-Stellung der Nadel gut von dieser getroffen werden konnte. Die Injektionsnadel wurde eingestochen und pro Oozyte je ca. 100 nl Probe injiziert. Die genaue Menge ist schlecht zu bestimmen, da trotz einer Wartezeit von 5 Sekunden, bevor die Nadel

wieder herausgezogen wird, stets etwas Probe wieder austritt (s. 4.10.3). Für einen Ansatz wurden jeweils fünf bis sechs Oozyten injiziert.

2.3.5 Inkubation und Präparation

Nach der Injektion wurden je fünf bis sechs Oozyten mit einer abgebrochenen Pasteurpipette in eine Vertiefung einer Sechswellschale überführt. Diese enthielt 2 ml Barth's Medium und bei Injektion von *in vitro* translatierten Proteinen zusätzlich 40 µl 10 mg/ml Cycloheximid (Sigma-Adrich), da sonst die Translation in der Zelle fortgesetzt wird und andere Proteine markiert werden, welche einen störenden Hintergrund ergeben. Nun wurden die Oozyten für verschiedene Zeiten des Importes bei Raumtemperatur (zwischen 20 und 23°C) inkubiert. Anschließend erfolgte die Präparation mit Hilfe von zwei spitzen Pinzetten. Dazu wurde die Oozyte mit einer Pinzette festgehalten und mit der anderen kurz in die Mitte des dunklen Pols eingestochen. Bei frischen Oozyten quillt der Kern sofort aus der Einstichstelle, wobei der Rest der Oozyte erhalten bleibt. Kerne und "Zytoplasma" wurden getrennt in verschiedenen Puffern in Reaktionsgefäßen gesammelt.

2.3.6 Fällung nukleärer und zytoplasmatischer Proteine

Die Kerne wurden in 300 µl Homogenisierungspuffer, die "Zytoplasmen" in 300 µl "5:1"-Medium gesammelt.

"5:1"-Medium:

83 mM	KCl
17 mM	NaCl
10 mM	Tris-HCl pH 7,2-7,4

Homogenisierungspuffer:

10 mM	Tris-HCl pH 7,4
10 mM	NaCl
1,4 mM	MgCl ₂
1%	SDS

Diese Lösung wurde erst auf pH 7,4 eingestellt, danach wurde SDS zugesetzt.

In diesen Puffern wurden die Kerne und "Zytoplasmen" durch auf- und abpipettieren homogenisiert. Anschließend wurden sie bei 14 000 rpm in der Kühlzentrifuge für 5 - 10 min bei 4 °C zentrifugiert, um die Zelltrümmer zu beseitigen.

Ungefähr 300 µl des Überstandes wurden abgenommen und in neue Reaktionsgefäße überführt. Für die Fällung des nukleären Extraktes wurden 1000 µl eiskaltes Ethanol auf die Proben pipettiert und diese gemischt. Die Präzipitation der Proteine des zytoplasmatischen Extraktes erfolgte in je 1000 µl eiskaltem Aceton (Merck). Die Proben können so über Monate hinweg aufbewahrt werden. Ansonsten folgte eine Zentrifugation bei 14000 rpm bei 4 °C für mindestens 30 min. Der Überstand wurde verworfen und das Proteinpellet mit 70% Ethanol gewaschen und danach getrocknet. Die Pellets lassen sich nur sehr schwer in 15 µl 6 M Harnstoff Urea Pure (Roth) und 5 µl 4 X SDS-Probenpuffer lösen. Mehrfaches Aufkochen und kräftiges Vortexen ist dazu nötig. Schließlich wurden die Proben auf ein SDS-Gel geladen, dieses wurde getrocknet und eine Autoradiografie durchgeführt (s.o.). Weitere Angaben sind im Ergebnisteil (3.6) nachzulesen.

3. Ergebnisse

Zu Beginn dieser Arbeit war bekannt, dass PRMT 1 und 3 die Arginindimethylierung von PABPN1 katalysieren (Smith *et al.*, 1999). Durch eine Fraktionierung von Proteinextrakten aus Hela-Zellen und Maus-ES-Zellen konnte gezeigt werden, dass auch PRMT6 an der Arginindimethylierung von PABPN1 beteiligt ist. Diese Arbeiten wurden parallel zu der vorliegenden Dissertation von Katharina Fronz (MLU Halle) durchgeführt. PRMT1 und 3 methylieren PABPN1 *in vitro*. Dabei wurde festgestellt, dass ein N-terminaler GST-*tag* die Enzymaktivität von PRMT1 herabsetzt (Ostareck-Lederer *et al.*, 2006). Deshalb war das erste Ziel dieser Arbeit PRMT1, 3 und 6 ohne *tag* und mit dem kleineren His-*tag* in *Escherichia coli* zu exprimieren und zu reinigen.

Mit Hilfe der rekombinanten Enzyme sollte

1. bestätigt werden, dass diese für die Arginindimethylierung von PABPN1 verantwortlich sind.
2. eine genügend große Enzymmenge gewonnen werden, um die Substratspezifität der Enzyme untersuchen zu können.
3. nachgewiesen werden, dass während der Reinigung der zellulären PRMTs kein für die Methylierung wichtiger Faktor abgetrennt wurde (näheres dazu siehe Ziesetzungen der Arbeit Seite 13).

Im Gegensatz zu den rekombinant hergestellten humanen Enzymen PRMT3 und 6, stammte das bis dahin verwendete PRMT1 von der Ratte. Zur besseren Vergleichbarkeit aller drei Enzyme wurde daher beschlossen, humanes PRMT1 rekombinant zu exprimieren und zu reinigen.

Humanes PRMT1 liegt in den Zellen in vier verschiedenen Spleißvarianten vor (s. 1.2.1). Von Bernhard Lagerbauer (Universität Würzburg) wurde ein Konstrukt für die Spleißvariante V2 mit His-*tag* zur Verfügung gestellt. Diese wurde, wie im Material und Methodenteil (2.2.1.12) beschrieben, so umkloniert, dass sie keinen *tag* mehr aufwies. Auch die Klonierung für hPRMT3 und hPRMT6 ist dem Methodenteil der Arbeit zu entnehmen. Die Proteinreinigung von hPRMT6 ohne *tag* und His-hPRMT6 wurde von Knut Kölbl (MLU Halle) übernommen.

3.1 Etablierung eines Aktivitätstests mit Peptiden als Substrat

Bei einem PRMT-Aktivitätstest wird die ^{14}C -markierte Methylgruppe von S-Adenosylmethionin (SAM) durch eine Methyltransferase (PRMT) auf das Substrat PABPN1 übertragen. In der folgenden Abbildung ist der Einbau von Methylgruppen in Abhängigkeit von der Enzymmenge aufgetragen (siehe auch Ostareck-Lederer *et al.*, 2006). Die Enzymmenge wurde von 0-40 pmol titriert.

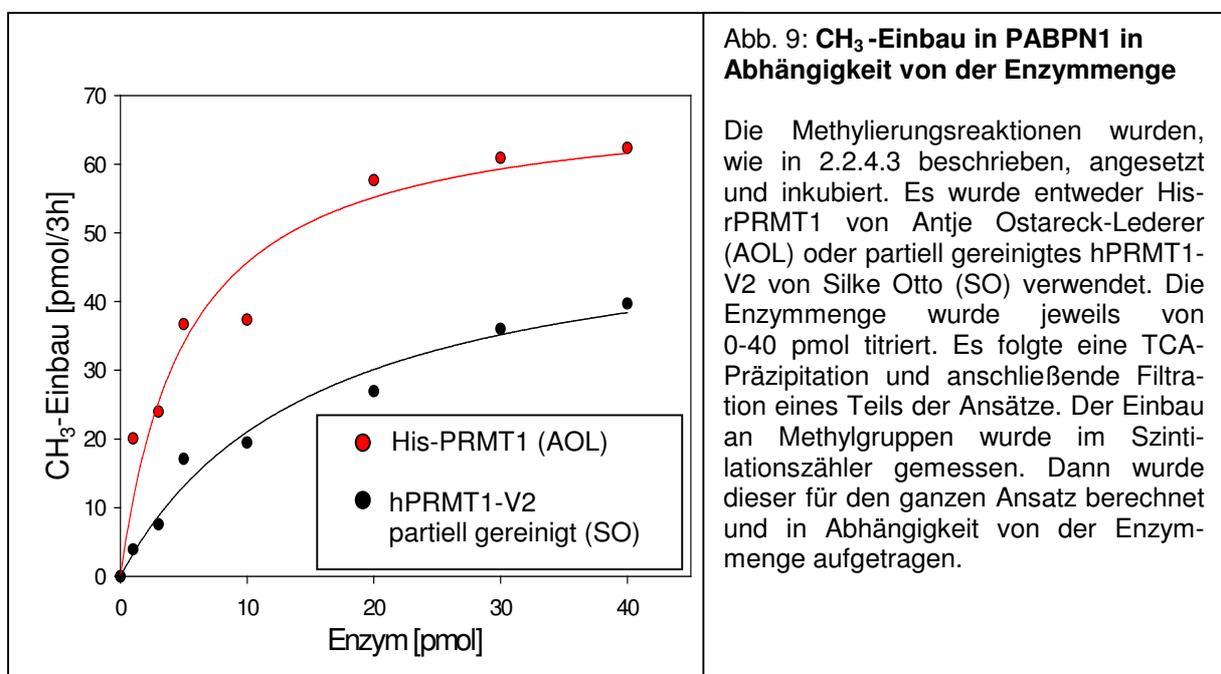


Abb. 9: CH_3 -Einbau in PABPN1 in Abhängigkeit von der Enzymmenge

Die Methylierungsreaktionen wurden, wie in 2.2.4.3 beschrieben, angesetzt und inkubiert. Es wurde entweder His-rPRMT1 von Antje Ostareck-Lederer (AOL) oder partiell gereinigtes hPRMT1-V2 von Silke Otto (SO) verwendet. Die Enzymmenge wurde jeweils von 0-40 pmol titriert. Es folgte eine TCA-Präzipitation und anschließende Filtration eines Teils der Ansätze. Der Einbau an Methylgruppen wurde im Szintillationszähler gemessen. Dann wurde dieser für den ganzen Ansatz berechnet und in Abhängigkeit von der Enzymmenge aufgetragen.

Wie Abbildung 9 zeigt, bestand mit PABPN1 als Substrat keine lineare Abhängigkeit der Enzymaktivität von der Enzymmenge. PABPN1 lag nur in maximal 15-fachem Überschuss über das Enzym vor (erster Messpunkt). Die Menge an Enzym stieg in

den Ansätzen der nächsten Messpunkte, wodurch der Überschuss an PABPN1 immer geringer wurde. Da das Enzym nicht stärker verdünnt werden sollte, hätte mehr Substrat eingesetzt werden müssen. Es war jedoch nicht möglich, rekombinantes PABPN1 in hinreichend hoher Konzentration einzusetzen.

Eine Lösung dieses Problems boten synthetische Peptide (s. Abb. 10), welche in höherer Konzentration als Substrat verwendet werden konnten. Ferner konnte mit ihnen in später folgenden Experimenten die Substratspezifität der Enzyme untersucht werden (s. 3.4.2). Es handelte sich zunächst um folgende Peptide:

PABPN1 (280-306)	FYSGFN <u>S</u> <u>R</u> <u>P</u> <u>R</u> <u>G</u> <u>R</u> <u>V</u> <u>Y</u> <u>R</u> <u>G</u> <u>R</u> <u>A</u> <u>R</u> <u>A</u> <u>T</u> <u>S</u> <u>W</u> <u>Y</u> <u>S</u> <u>P</u> <u>Y</u>
RXR-1 -Peptid	FYSGFN <u>S</u> <u>R</u> <u>P</u> <u>R</u> <u>G</u> <u>R</u> <u>V</u> <u>Y</u> — ATSWY (2,3kD)
RGG -Peptid	GG <u>R</u> GGFGG <u>R</u> GGFGG <u>R</u> GGFG (1,7kD)

Abb 10: **Synthetische Peptide 1**

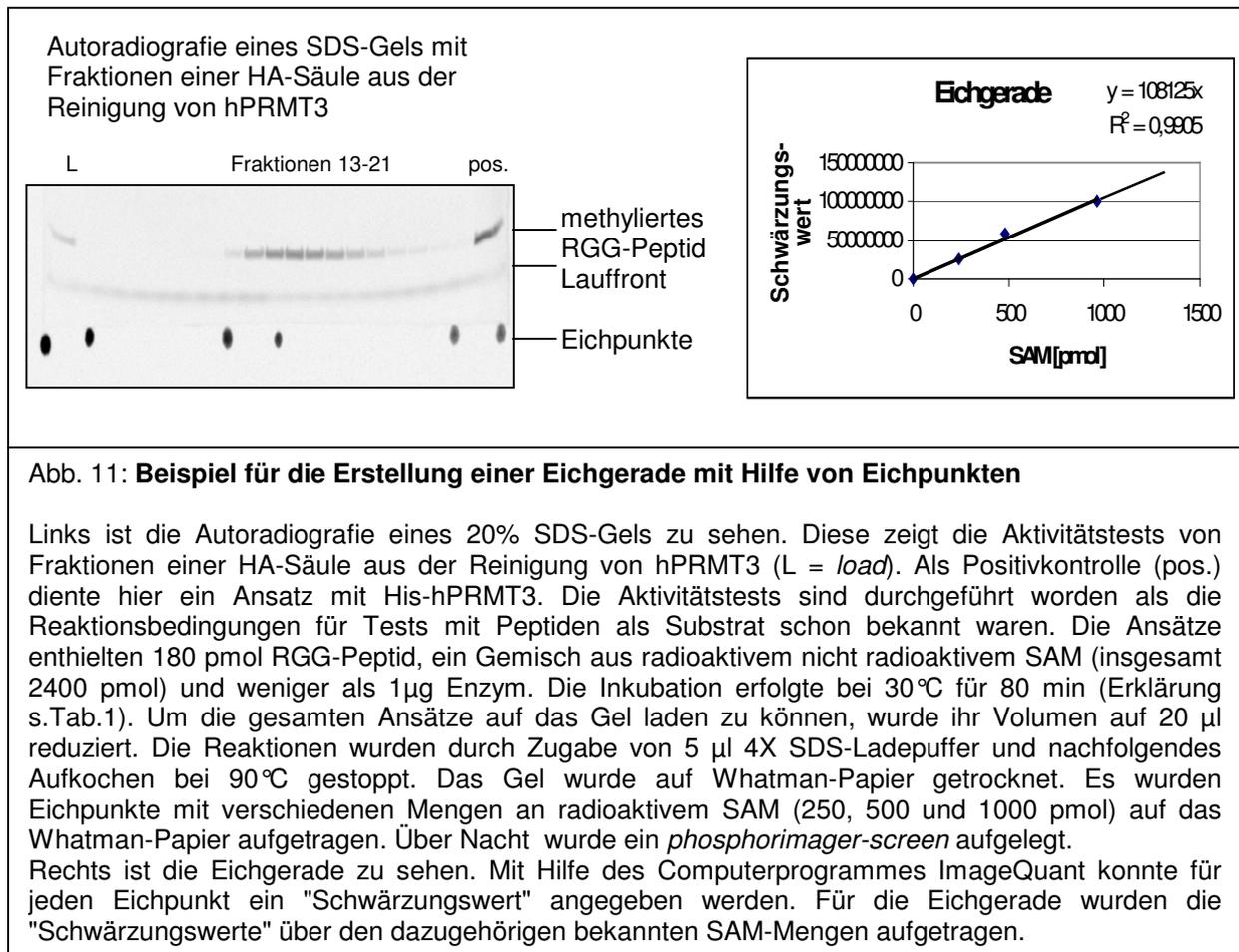
Oben ist ein Teil des C-Terminus von PABPN1 abgebildet (Aminosäure 280 bis 306).
Das RXR-1-Peptid (Mitte) wurde von diesem abgeleitet und weist ein RXR-*cluster* auf. Auf das zweite RXR-*cluster* von PABPN1 (rot markierte AS) wurde zugunsten der Vergleichbarkeit der Peptide verzichtet. Damit weisen beide Peptide drei methylierbare Arginine auf (fett gedruckt und unterstrichen).
Das RGG-Peptid (unten) ist eine idealisierte Aminosäuresequenz, welche eine RGG-*box* repräsentiert (Najbauer *et al.*, 1993).

Für einen Methylierungstest mit den in Abbildung 10 gezeigten Peptiden als Substrat wurden die Pufferbedingungen beibehalten, welche von Antje Ostareck-Lederer (MLU Halle) optimiert und beschrieben worden waren. Auch die Inkubationstemperatur von 30°C wurde nicht verändert (s. 2.2.4.3 und Ostareck-Lederer *et al.*, 2006).

Obwohl die Reaktionsbedingungen für beide Peptide getestet wurden, soll an dieser Stelle nur die Entwicklung des Aktivitätstests mit dem RGG-Peptid als Substrat erläutert werden, da nur dieses später für die Aktivitätstests während der Reinigung der Enzyme ohne *tag* verwendet wurde. Die Begründung dafür wird in später folgenden Ergebnisteilen dieser Arbeit ersichtlich (3.4.2). Da sowohl hPRMT1-V2 als auch hPRMT3 ohne *tag* gereinigt werden sollten, wurden die Reaktionsbedingungen für beide Enzyme in analogen Tests untersucht. Hier sollen jedoch nur die Grafiken für PRMT1 gezeigt werden.

Die bisher für den Aktivitätstest mit PABPN1 verwendete TCA-Fällung mit anschließender Filtration konnte wegen der relativ kurzen Peptide nicht verwendet

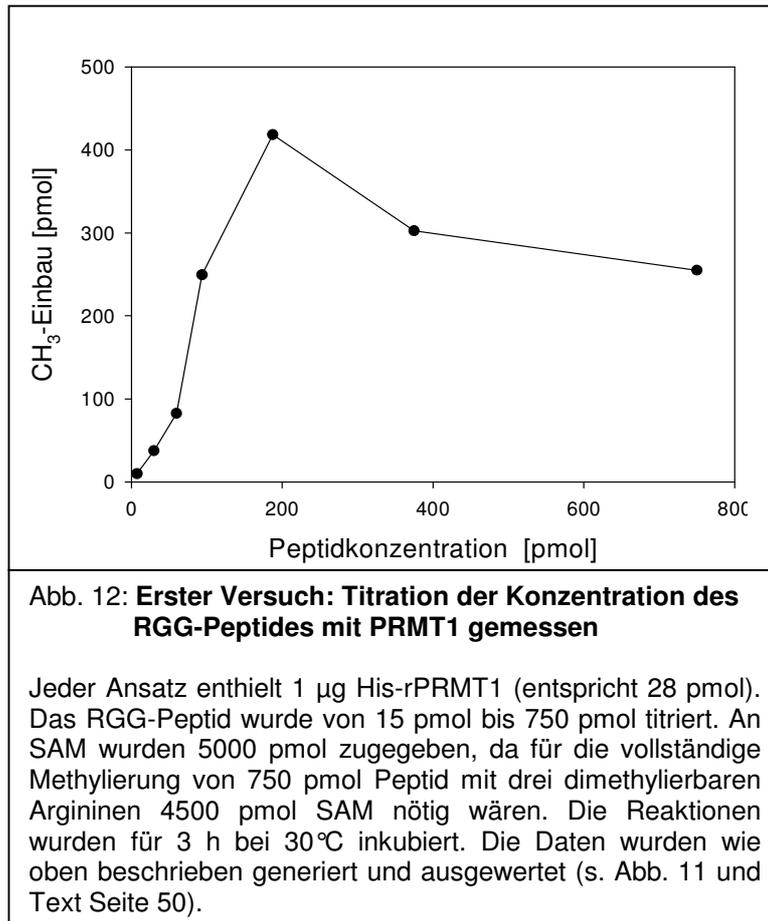
werden. Um das überschüssige SAM von den methylierten Peptiden zu trennen, wurde daher zunächst eine Dünnschichtchromatografie getestet. Diese erbrachte jedoch keine eindeutige Auftrennung (Daten nicht gezeigt). Deshalb wurden die Methylierungsansätze auf hochprozentige SDS-Gele (20%) geladen (s. Abb. 11). Als Positivkontrolle wurde immer ein Methylierungsansatz mit einer bekannten Menge des entsprechenden His-PRMT mit aufgetragen. Die Gele wurden anschließend auf Whatmanpapier getrocknet. Zur Erstellung einer Eichgerade wurden verschiedene Mengen an SAM neben das getrocknete Gel auf das Whatmanpapier pipettiert. Dann wurde über Nacht ein *phosphorimager-screen* aufgelegt. Mit Hilfe des Computerprogrammes ImageQuant konnte für jede Bande der Autoradiografie ein "Schwärzungswert" angegeben werden. Diesem konnte mit Hilfe der Eichgerade eine Menge an eingebauten radioaktiven Methylgruppen zugeordnet werden.



Die Strahlung des SAM wird durch das Whatmanpapier nicht gelöscht. Dies wurde nachgewiesen, indem die Radioaktivität einer bestimmten Menge von flüssigem SAM erst direkt und dann auf Whatmann-Papier aufgetropft in Szintillationsflüssigkeit

gemessen wurde. Die ermittelten spezifischen Aktivitäten waren indentisch. Es konnte deshalb direkt von den ImageQuant-"Schwärzungswerten" der radioaktiven Peptid-Banden auf den Methylgruppen-Einbau in pmol geschlossen werden.

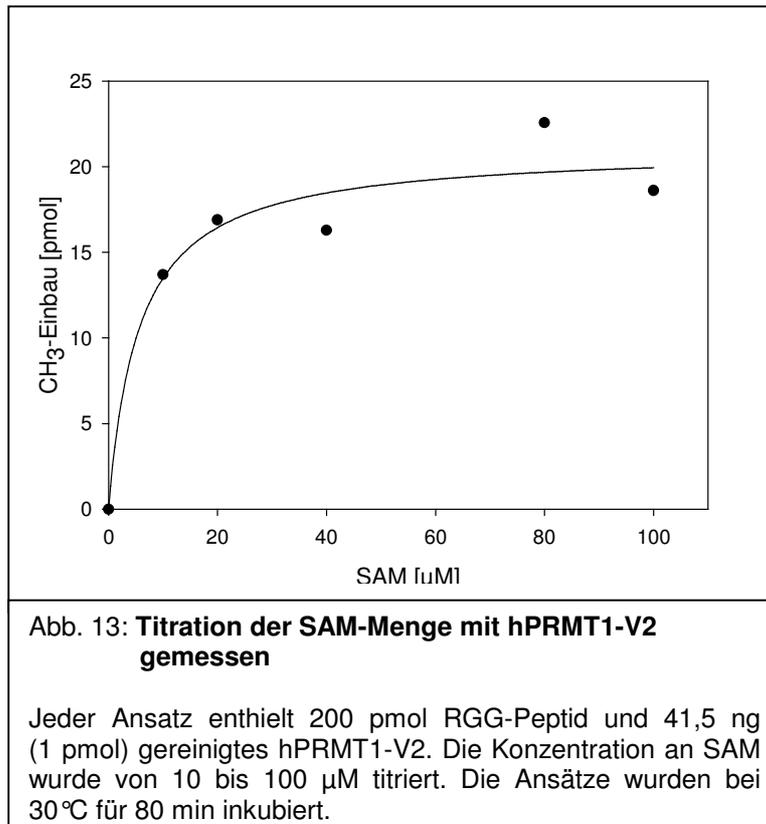
Um herauszufinden, wann eine Substratsättigung der Enzyme eintritt, wurde in einem ersten Versuch die Menge an Peptid im Reaktionsansatz titriert.



Wie aus der obigen Abbildung 12 zu ersehen, war das Enzym bei Mengen höher als 200 pmol RGG-Peptid mit Substrat gesättigt. Bei den letzten Messpunkten war der Einbau geringer. Dies ist möglicherweise auf eine Substrathemmung des Enzymes zurückzuführen. Diese Hemmung der Enzyme wurde auch bei den späteren Michaelis-Menten-Messungen gesehen. Die betreffenden Messpunkte wurden aber bei der Ermittlung der kinetischen Parameter nicht mit berücksichtigt.

PRMT3 war mit Mengen höher als 180 pmol RGG-Peptid mit Substrat gesättigt (Daten nicht gezeigt).

Da SAM als zweites Substrat dient, wurden auch hierfür die sättigenden Bedingungen für die Reaktion ermittelt.



Der errechnete K_m lag bei 5,6 µM SAM. Da für eine vollständige Methylierung von 200 pmol RGG-Peptid 1200 pmol (60 µM) SAM nötig wären, wurden in den folgenden Aktivitätstests 2400 pmol (120 µM) SAM eingesetzt. In einer Testreihe wurde dessen spezifische Aktivität durch die Mischung mit verschiedenen Mengen an nicht radioaktivem SAM variiert (Daten nicht gezeigt). Die Konzentration des nicht radioaktiven SAM wurde zuvor photometrisch bestimmt ($\epsilon = 15\,000\text{ L mol}^{-1}\text{ cm}^{-1}$, bei 256nm). Da der molare Einbau konstant war, konnte davon ausgegangen werden, dass die Methylgruppen von radioaktivem und nicht radioaktivem SAM gleich gut eingebaut werden. Das methylierte Peptid war bei einem Ansatz mit 40% radioaktivem SAM gut in der Autoradiografie zu sehen. Deshalb wurden die oben genannten 2400 pmol SAM von nun an in 960 pmol radioaktiv markiertes und 1440 pmol unmarkiertes SAM aufgeteilt. Die Eichgeraden wurden weiterhin mit radioaktivem SAM erstellt. Bei der Errechnung des Einbaus von Methylgruppen wurde der Wert um den Verdünnungsfaktor durch das nicht radioaktive SAM korrigiert.

Es wurde überprüft, unter welchen Bedingungen eine lineare Abhängigkeit des CH₃-Einbaus von der Inkubationszeit des Tests gegeben war.

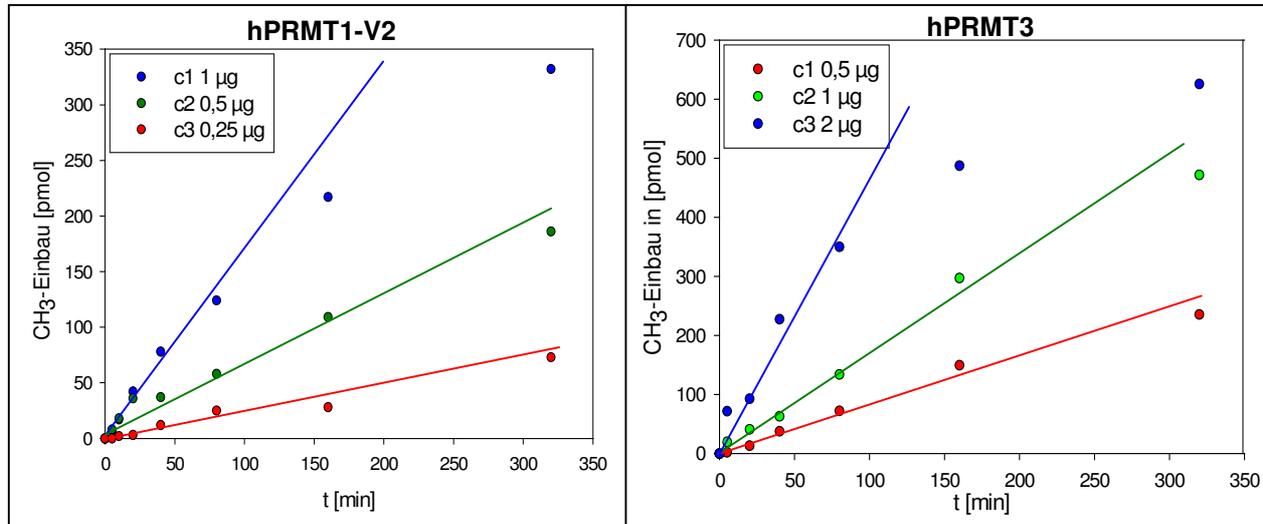


Abb 14: **Einbau von Methylgruppen in Abhängigkeit von der Zeit**
(links für hPRMT1-V2, rechts für hPRMT3)

Es wurden für jedes Enzym drei große Reaktionsansätze pipettiert. Nach verschiedenen Inkubationszeiten wurden diesen 20 µl Aliquots entnommen und deren Reaktion gestoppt. Diese enthielten für hPRMT1-V2 je 200 pmol RGG-Peptid mit 2400 pmol SAM und entweder 1 µg, 0,5 µg oder 0,25 µg partiell gereinigtes hPRMT1-V2 und für hPRMT3 180 pmol RGG-Peptid, 2400 pmol SAM und 2 µg, 1 µg oder 0,5 µg partiell gereinigtes hPRMT3.

Abbildung 14 ist zu entnehmen, dass der CH₃-Einbau durch hPRMT1-V2 in 200 pmol RGG-Peptid bis zu 200 pmol linear abhängig von der Zeit war. Dies entspricht einem Einbau von einer Methylgruppe pro Peptid und ist selbst bei langen Inkubationszeiten der Fall. Bei einer Methylierung von 180 pmol RGG-Peptid durch hPRMT3 war der Einbau bis zu 300 pmol linear abhängig von der Zeit. Für die folgenden Experimente wurde von beiden Enzymen weniger als 1 µg pro 20 µl Ansatz eingesetzt und eine Inkubationszeit von nicht mehr als 80 min eingehalten. Zur besseren Übersicht sollen hier die ermittelten Reaktionsbedingungen für beide Enzyme mit dem RGG-Peptid als Substrat tabellarisch dargestellt werden.

Tab. 1: Reaktionsbedingungen für den Aktivitätstest mit dem RGG-Peptid		
	hPRMT1-V2	hPRMT3
Menge Peptid/Ansatz	200 pmol	180 pmol
Inkubationszeit	≤ 80 min	≤ 80 min
Enzymmenge	< 1 µg	<1 µg
Maximaler CH ₃ -Einbau	200 pmol	300 pmol

Diese Reaktionsbedingungen (s. Tab. 1) wurden für alle Messungen während der Reinigung der PRMTs ohne *tag* verwendet.

Die folgende Abbildung 15 zeigt das Säulenprofil des ersten Reinigungsschrittes von hPRMT1-V2. Hierbei wurde die Aktivität der Fraktionen sowohl mit PABPN1 als auch mit RGG-Peptid als Substrat gemessen.

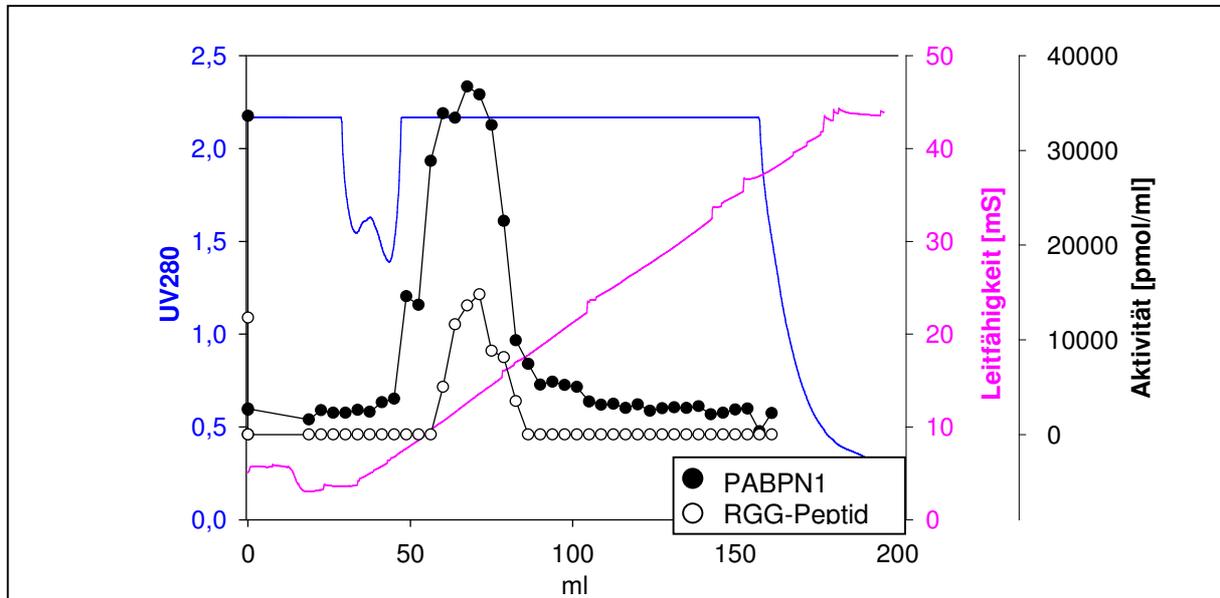


Abb. 15: Säulenprofil einer DEAE-Säule aus der Reinigung von hPRMT1-V2

Die Anionenaustauschchromatografie mit Hilfe der DEAE-Säule wurde, wie in 2.2.3.5 beschrieben, durchgeführt. Während des Laufes wurde die UV-Absorption bei 280 nm (blaue Kurve) sowie die Leitfähigkeit in mS (pinke Kurve) in den Fraktionen (4ml) gemessen. Der Aktivitätstest mit PABPN1 als Substrat wurde, wie in 2.2.4.3 beschrieben, durchgeführt (Ergebnisse für die einzelnen Fraktionen = schwarze Punkte). Der Aktivitätstest mit dem RGG-Peptid als Substrat wurde mit den oben beschriebenen Reaktionsbedingungen (Tab. 1) durchgeführt (weiße Punkte).

Da beim Aktivitätstest mit PABPN1 keine lineare Abhängigkeit der Aktivität von der Enzymmenge bestand (s. Abb. 9), erschien der *peak* der Aktivität breiter. Dies erschwerte die Auswahl der Fraktionen, die für den nächsten Reinigungsschritt verwendet werden sollten. Bei der Messung der Aktivität mit dem Peptid war der *peak* hingegen schärfer, so dass weniger Fraktionen vereinigt wurden und ein größerer Reinigungseffekt erzielt wurde. Folglich wurden für die Reinigung der PRMTs ohne *tag* Aktivitätstests mit dem RGG-Peptid als Substrat durchgeführt.

3. 2 Reinigung der humanen PRMTs 1,3 und 6 ohne tag

Die vollständige Beschreibung der Reinigungen von hPRMT1-V2 und hPRMT3 ist im Methodenteil (2.2.3.5 und 2.2.3.6) zu finden. Exemplarisch sollen hier nur die Säulenprofile und SDS-Gele des letzten Schrittes einer jeden Reinigung gezeigt werden.

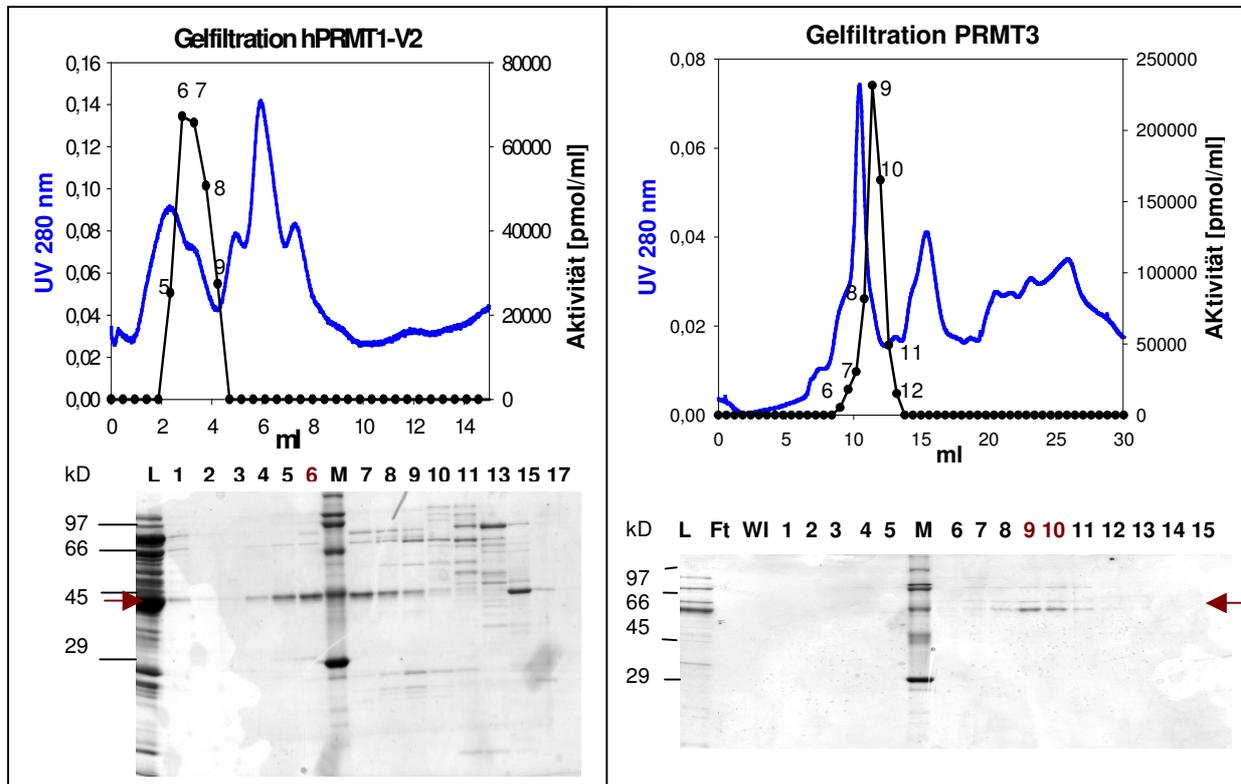


Abb. 16: Säulenprofile und SDS-Gele der Gelfiltrationen von hPRMT1-V2 und hPRMT3 ohne tag

(Oben) Die Gelfiltrationen wurden, wie in 2.2.3.5 bzw. 2.2.3.6 beschrieben, durchgeführt. Während des Laufes wurde die UV-Absorption bei 280 nm (blaue Kurve) der Fraktionen (470µl hPRMT1-V2; 600 µl hPRMT3) gemessen. Der Aktivitätstest mit dem RGG-Peptid als Substrat wurde mit den oben beschriebenen Reaktionsbedingungen (Tab. 1) durchgeführt (schwarze Punkte). Die schwarzen Zahlen entsprechen den Nummern der aktiven Fraktionen.

(Unten) Die Coomassie-gefärbten SDS-Gele zeigen Fraktionen der Gelfiltration (L = load, Ft = Durchfluss, WI = Waschschrift 1, M = marker). Die Nummern der aktivsten Fraktionen sind rot markiert. Die roten Pfeile zeigen an, wo die PRMTs im Gel zu finden sind.

Bei den Säulenprofilen (s. Abb. 16 oben) sind die *peaks* der Aktivität gegenüber den Absorptionsmaxima verschoben. Da dies auf eine Verschiebung zwischen dem Fraktionssammler und den UV-Dekektor zurückzuführen ist, entsprechen sich die Absorptions- und die Aktivitätsmaxima in Wirklichkeit. Auch die PRMT-Banden in den der Coomassie-gefärbten SDS-Gelen (s. Abb. 16 unten) korrelieren mit der Aktivität. Die aktivsten Fraktionen (rote Nummern) weisen nurnoch wenige verunreinigende Banden auf. Die Gelfiltration scheint für die Reinigung von hPRMT1-V2 ein besserer

Reinigungsschritt zu sein als für hPRMT3, denn beim SDS-Gel von hPRMT1-V2 sind mehr abgetrennte kontaminierende Banden zu sehen.

Die folgenden Reinigungstabellen geben Auskunft über den Erfolg der Reinigungen.

Tab. 2: Reinigungstabelle für hPRMT1-V2 mit RGG-Peptid gemessen					
Säule	Aktivität [U]* ¹	Protein [mg]	spezifische Aktivität [U/mg]	Ausbeute [%]	Reinigungsfaktor
Extrakt	6 404 000	139	46 000	100	/
DEAE (F13-17)	4 273 000	63	68 000	67	1,5
HA (F8-12)	2 489 000	21	119 000	39	2,6
Gelfiltration	2 500 000	2,1	1 190 000	39	26

Tab. 3: Reinigungstabelle für hPRMT3 mit RGG-Peptid gemessen					
Säule	Aktivität [U]* ¹	Protein [mg]	spezifische Aktivität [U/mg]	Ausbeute [%]	Reinigungsfaktor
Extrakt	1 188 000	148	8 000	100	/
DEAE (F17-20)	3 877 000	32	121 000	326* ²	15
HA (F14-19)	2 581 000	1,44	1 792 000	217* ²	224
Gelfiltration	495 000	0,46	1 076 000	42	135

*¹ U = CH₃-Einbau in pmol pro 3 h (Messung erfolgte aber unter den in Tab. 1 genannten Reaktionsbedingungen)

*² Die Ausbeute ist nach der DEAE-Säule mehr als 100%. Dies ist vermutlich damit zu erklären, dass ein Inhibitor abgetrennt wurde.

PRMT1 und 3 ohne tag waren nach der Reinigung nahezu sauber (s. SDS-Gele Abb. 16 und Reinigungstabellen) Bei der Reinigung von hPRMT3 war aber nach der Gelfiltration ein starker Verlust an Enzym und damit an Aktivität zu verzeichnen. Da außerdem nicht viele kontaminierende Banden abgetrennt worden waren (s. SDS-Gel Abb. 16), ist dies für hPRMT3 scheinbar ein schlechter Reinigungsschritt.

Die gereinigten Enzyme verloren durch wiederholtes Auftauen der Fraktionen schnell an Aktivität. Dies ist möglicherweise auf ihre geringe Proteinkonzentration zurückzuführen. So hatte die hPRMT3 mit der höchsten spezifischen Aktivität in Fraktion (F10) nach der Gelfiltration eine Konzentration von 0,054 mg/ml. Die hPRMT1-V2 der Fraktion (F6) hingegen lag in einer Konzentration von 0,016 mg/ml vor.

Daher wurden rPRMT1, hPRMT3 und hPRMT6 auch mit His-*tag* kloniert und gereinigt. Für die Reinigung waren nur zwei Schritte nötig: Eine Ni-NTA- und eine MonoQ-Säule (s. 2.2.3.7). Durch diese effizienten Reinigungsschritte konnten größere Enzymmengen höherer Konzentration gewonnen werden. Die Reinigung der PRMTs mit His-*tag* soll hier nicht gezeigt werden, wurde aber im Methodenteil (2.2.3.7) beschrieben. Die folgende Abbildung 17 zeigt die gereinigten Enzyme mit His-*tag* zusammen mit denen ohne *tag*.

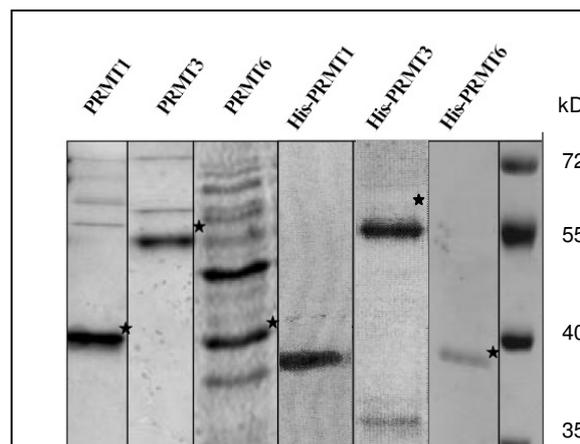


Abb. 17: **Gereinigte PRMTs**

Die einzelnen Spuren wurden von verschiedenen Gelen zusammengefügt. Wenn mehrere Banden zu sehen sind, wurden die PRMTs mit einem Stern markiert. Die PRMTs mit His-*tag* wurden für die Michaelis-Menten-Kinetiken verwendet (s. 3.4 und 3.5). PRMT6 und His-PRMT6 stammen von Knut Kölbl.

3.3 Für die Arginindimethylierung am C-Terminus von PABPN1 benötigen die PRMTs keine weiteren Polypeptide

Die resultierenden Daten für die spezifischen Aktivitäten der Enzyme mit His- bzw. ohne *tag* sind in der nächsten Tabelle zusammen mit Daten für zelluläre PRMTs von Katharina Fronz (MLU Halle) zu finden. Die zellulären PRMTs wurden durch eine Fraktionierung von Proteinextrakten aus Hela-Zellen und Maus-ES-Zellen gewonnen.

Die Werte für PRMT6 ohne *tag* und mit His-*tag* stammen von Knut Kölbel (MLU Halle). Eigene Daten wurden fett gedruckt. Alle Messungen dieser Tabelle sind mit PABPN1 als Substrat durchgeführt worden.

Tab. 4: Vergleich der spezifischen Aktivitäten der PRMTs			
Enzym	Spezifische Aktivität (ohne Tag) [U/μg]	Spezifische Aktivität (His-Tag) [U/μg]	Spezifische Aktivität (zelluläres Enzym) [U/μg]
PRMT1	1 300	1 600	1 450
PRMT3	360	300	170
PRMT6	120	220	550

Alle PRMTs ohne *tag* stammten vom Menschen. His-PRMT1 war von der Ratte, alle anderen His-PRMTs vom Menschen. Das zelluläre PRMT1 war auch menschlichen Ursprungs, PRMT3 und 6 stammten von der Maus. Die Bestimmung der Proteinkonzentration für die PRMTs ohne *tag* erfolgte, wie in 2.2.3.14 beschrieben, über SDS-Gele. Die Menge an zellulären PRMTs wurde über *Western blots* mit bekannten Konzentrationen an His-PRMTs abgeschätzt. Eine Unit (U) ist definiert als der CH₃-Einbau in nmol pro 3 h Inkubationszeit. Für weitere Angaben zu der letzten Spalte siehe Fronz *et al.*, 2008. Für die PRMTs ohne *tag* konnten keine Standardfehler angegeben werden, weil sie sehr schnell an Aktivität verloren.

Wie aus Tabelle 4 ersichtlich wird, können alle Enzyme ob mit oder ohne *tag*, ob zellulär oder rekombinant, PABPN1 methylieren. Damit konnte bestätigt werden, dass PRMT1, 3 und 6 für die Methylierung von PABPN1 verantwortlich sind. Ein N-terminaler GST-*tag* inhibiert die Aktivität von PRMT1 (s. Ostareck-Lederer *et al.*, 2006). Die His-*tags* scheinen jedoch keinen Einfluss auf die Aktivität der Enzyme zu haben. Deshalb wurden alle folgenden Experimente mit den His-PRMTs durchgeführt. GST-PRMT4 methyliert PABPN1 nicht, wohl aber sein natürliches Substrat PABPC (persönliche Mitteilung von Katharina Fronz). Es bestand ferner kein signifikanter Unterschied in der spezifischen Aktivität zwischen humaner PRMT1 ohne *tag* und PRMT1 mit His-*tag* von der Ratte. Folglich wurde in den weiteren Versuchen die His-rPRMT1 verwendet. Da in Bakterien bisher keine Gene für PRMTs gefunden worden sind, sollten diese auch keine die Aktivität der rekombinanten Enzyme beeinflussenden Faktoren enthalten. Die zellulären Enzyme wurden zudem mit hohen Ausbeuten gereinigt. Außerdem besteht kein signifikanter Unterschied in den spezifischen Aktivitäten der rekombinanten PRMTs der zellulären

("authentischen") Enzyme. All dies lässt vermuten, dass PABPN1 von PRMT1, 3 und 6 ohne die Hilfe von anderen Polypeptiden als Substrat erkannt und methyliert wird.

3.4 Untersuchung der Substratspezifität der PRMTs 1, 3 und 6

Für die Untersuchung der Substratspezifität von PRMT1, 3 und 6 wurden verschiedene Substrate durch die Messung von Michaelis-Menten-Kinetiken miteinander verglichen.

Vor der Messung der Michaelis-Menten-Kinetiken wurde mit Hilfe von Progresskurven für jedes Substrat der Bereich ermittelt, in welchem die Produktmenge linear abhängig von der Zeit war. Die nächste Abbildung zeigt ein Beispiel für solche Progresskurven. Die Steigung der Ausgleichsgeraden entspricht dem linearen Teil der Anfangsgeschwindigkeit der Methylierungsreaktion in pmol/mg/min.

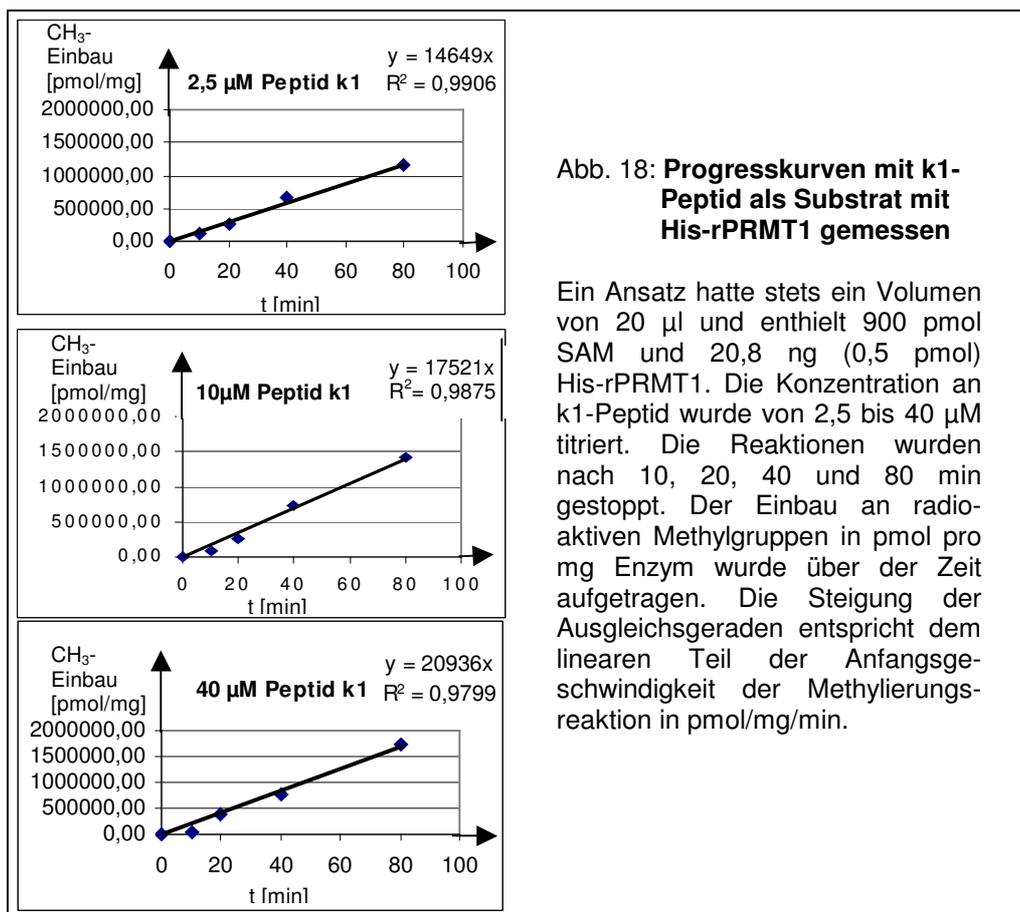


Abb. 18: Progresskurven mit k1-Peptid als Substrat mit His-rPRMT1 gemessen

Ein Ansatz hatte stets ein Volumen von 20 µl und enthielt 900 pmol SAM und 20,8 ng (0,5 pmol) His-rPRMT1. Die Konzentration an k1-Peptid wurde von 2,5 bis 40 µM titriert. Die Reaktionen wurden nach 10, 20, 40 und 80 min gestoppt. Der Einbau an radioaktiven Methylgruppen in pmol pro mg Enzym wurde über der Zeit aufgetragen. Die Steigung der Ausgleichsgeraden entspricht dem linearen Teil der Anfangsgeschwindigkeit der Methylierungsreaktion in pmol/mg/min.

Für die Progresskurven und die Messreihen der Michaelis-Menten Kinetiken wurde weiterhin die SDS-Gel-Methode zur Trennung von methyliertem Substrat und nicht eingebautem SAM verwendet. Deshalb wurde auch das Reaktionsvolumen von 20 µl

beibehalten. Die Pufferbedingungen (s. 2.2.4.3 und Ostareck-Lederer *et al.*, 2006) sowie die Reaktionstemperatur von 30°C, wurden ebenfalls nicht verändert. Ein Reaktionsansatz enthielt jedoch nur 900 pmol radioaktives SAM. An Enzym wurden pro Ansatz 20 ng His-rPRMT1 (0,5 pmol) bzw. ca. 50 ng His-hPRMT3 (0,9 pmol), oder ca. 30 ng His-hPRMT6 (0,7 pmol) eingesetzt (genaue Reaktionsbedingungen siehe Tabelle im Anhang). Für jede Substratkonzentration einer Messreihe wurden Doppelbestimmungen durchgeführt. Zur Überprüfung der Aktivität des verwendeten Enzymes wurde pro Messreihe eine Positivkontrolle mit PABPN1 als Substrat mitgeführt. Eine Michaelis-Menten Kinetik enthält Daten aus mindestens zwei solcher Messreihen. Zur Erstellung der Michaelis-Menten Diagramme wurden die Geschwindigkeiten des Methylgruppeneinbaus über der Substratkonzentration aufgetragen. Die erhaltenen Konstanten sind apparente Werte, da während der Reaktionszeit Produkte mit Methylierungen an verschiedenen Argininen entstehen, wobei sowohl Dimethylierungen als auch Monomethylierungen vorkommen können.

3.4.1 Methylierung von PABPN1 und hnRNP K durch PRMT1, 3 und 6

Zunächst wurden die Michaelis-Menten-Kinetiken für PABPN1 und hnRNP K gemessen. In den von Knut Kölbl stammenden Daten (Abb. 19 und 20) sind in den Werten für PABPN1 mit His-hPRMT3 Messungen von Silke Otto enthalten.

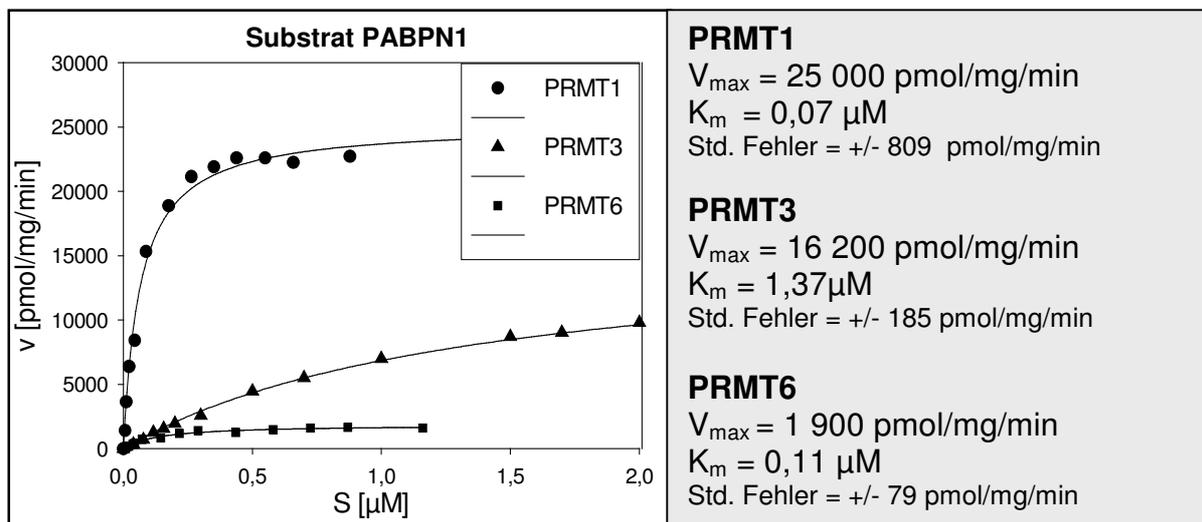


Abb 19: Michaelis-Menten Diagramme für PRMT1, 3 und 6 mit PABPN1 als Substrat

Die Reaktionszeit betrug für PABPN1 mit His-rPRMT1 10 bis 20 min, für His-hPRMT3 20 bis 80 min und für His-hPRMT6 20 bis 40 min. Weitere Angaben siehe einleitender Text (3.4). Zur Erstellung der Michaelis-Menten Diagramme (links) wurden die Anfangsgeschwindigkeiten (v) des Methylgruppeneinbaus über der Substratkonzentration (S) aufgetragen. Rechts sind die aus den Kinetiken ermittelten Parameter aufgelistet (Std. Fehler = Standardfehler).

Die Michaelis-Menten Diagramme und die daraus ermittelten kinetischen Parameter zeigen, dass PABPN1 für PRMT1 ein gutes, für PRMT3 ein nicht ganz so gutes und für PRMT6 ein relativ schlechtes Substrat ist (s. Abb. 19). Bei PRMT3 ist die Affinität zu PABPN1 geringer als bei den anderen Enzymen (K_m 1,37 μ M). PRMT6 methyliert PABPN1 nur sehr langsam (V_{max} 1900 pmol/mg/min).

Die folgende Abbildung zeigt die Michaelis-Menten Diagramme für PRMT1, 3 und 6 mit hnRNP K als Substrat sowie die daraus ermittelten kinetischen Parameter.

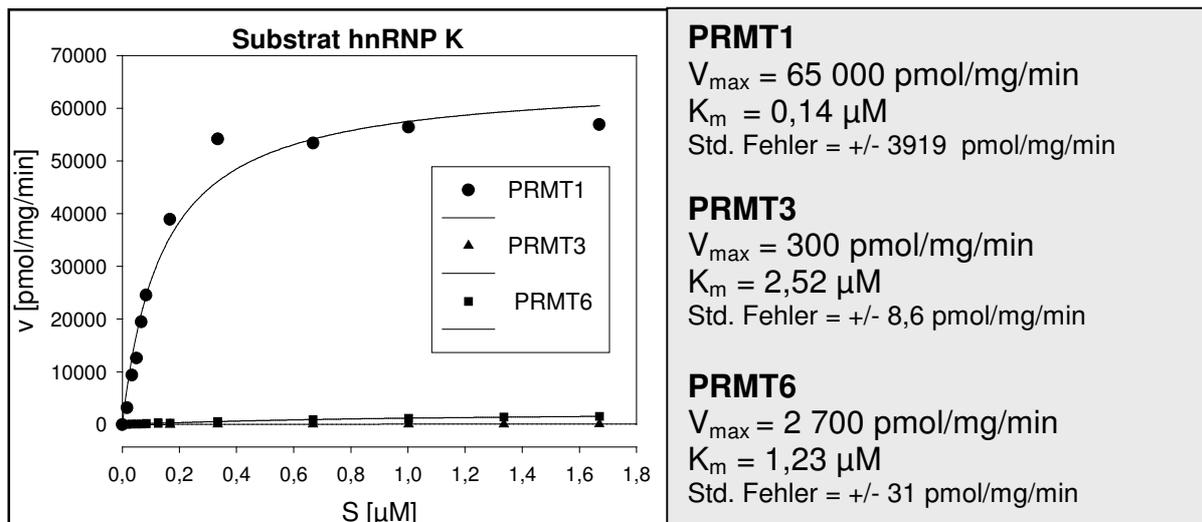


Abb. 20: Michaelis-Menten Diagramme für mit PRMT1, 3 und 6 mit hnRNP K als Substrat

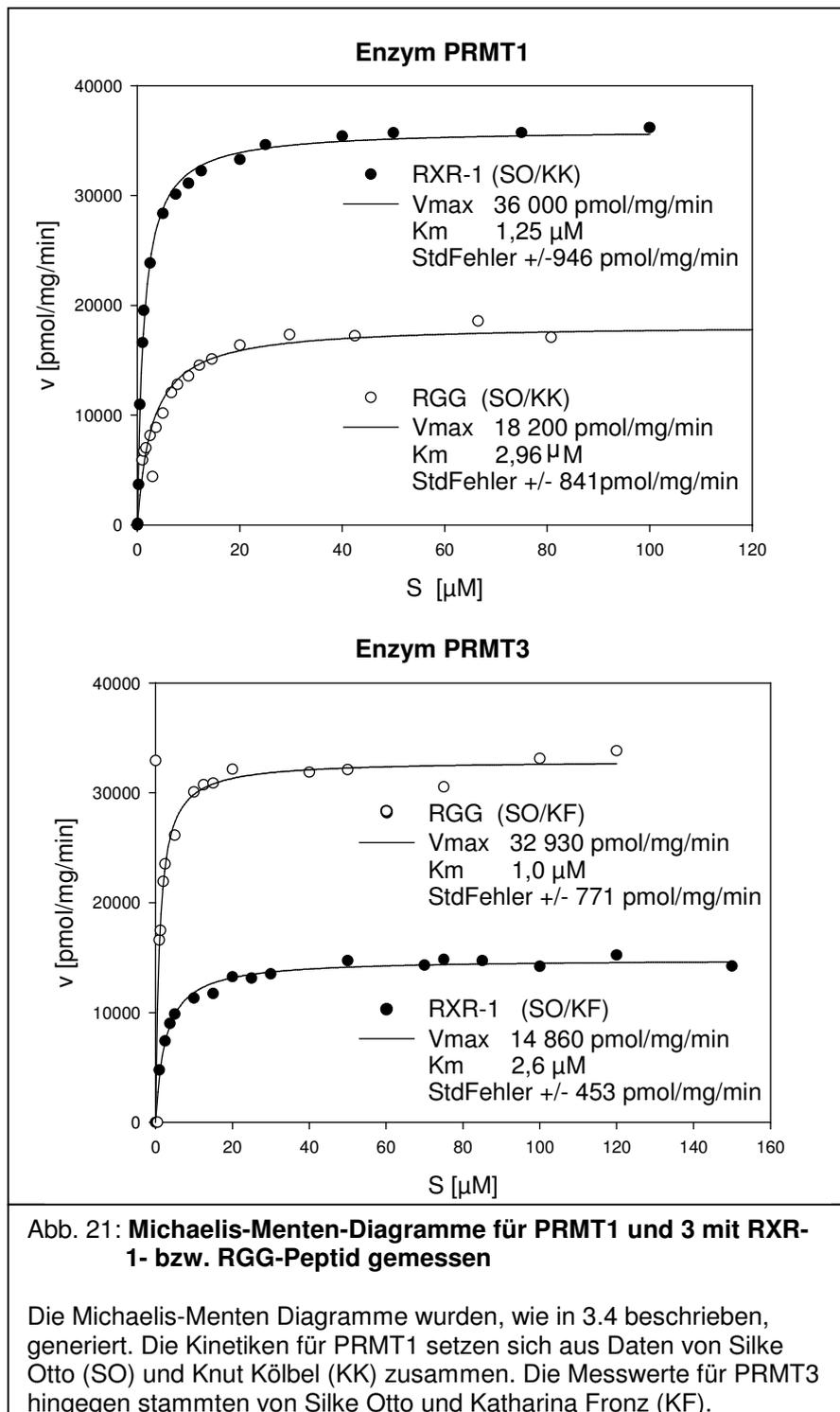
Die Reaktionszeit betrug für hnRNP K mit His-rPRMT1 10 bis 20 min, für His-hPRMT3 für 40 bis 80 min und für His-hPRMT6 mindestens 6 Stunden. Weitere Angaben siehe einleitender Text (3.4.1). Zur Erstellung der Michaelis-Menten Diagramme (links) wurden die Anfangsgeschwindigkeiten (v) des Methylgruppeneinbaus über der Substratkonzentration (S) aufgetragen. Rechts sind die aus den Kinetiken ermittelten Parameter aufgelistet (Std. Fehler = Standardfehler).

Abbildung 20 zeigt, dass hnRNP K ein gutes Substrat für PRMT1, jedoch ein schlechtes Substrat für PRMT3 und 6 ist.

Aus den obigen Abbildungen 19 und 20 wird ersichtlich, dass hnRNP K und PABPN1 ähnlich gute Substrate für PRMT1 sind. hnRNP K ist hingegen ein viel schlechteres Substrat für PRMT3 und PRMT6 als PABPN1.

3.4.2 PRMT3 bevorzugt das RGG-Peptid

Die folgende Abbildung zeigt Michaelis-Menten Diagramme für PRMT1 und 3, welche mit dem RGG- und dem RXR- Peptid als Substrat gemessen wurden. Damit sollte festgestellt werden, ob sich die Präferenzen der Enzyme für die vollständigen Proteine bei den Messungen mit den Peptiden widerspiegeln. Dabei weist das RXR-Peptid wie PABPN1 *RXR-cluster* auf und das RGG-Peptid RGG-Sequenzen, wie sie in ähnlicher Form in hnRNP K zu finden sind (s. 3.1, Abb. 10).



Die Michaelis-Menten Diagramme (Abb. 21) zeigen deutlich, dass das RXR-1-Peptid für PRMT1 ein besseres Substrat ist als das RGG-Peptid. Beim Vergleich der V_{max} - und K_m - Werte wird deutlich, dass das RXR-1-Peptid schneller methyliert und fester gebunden wird.

Für PRMT3 hingegen gilt der umgekehrte Fall. Laut den V_{max} - und K_m -Werten preferiert PRMT3 eindeutig das RGG-Peptid. Dies war so nicht zu erwarten, weil die RGG-Boxen in hnRNP K schlechte Substrate für PRMT3 sind. Demnach scheinen die Daten für die Peptide, denen der Gesamtproteine zu widersprechen.

Da es sich bei dem RGG-Peptid aber um eine Konsensussequenz aus typischen methylierbaren Proteinen handelt (s. Najbauer *et al.*, 1993), wurden weitere Peptide untersucht, deren Sequenzen direkt den Bereich von hnRNP K abdecken, welcher in diesem Protein methyliert wird.

hnRNP K (250-307) PVGFPM <u>RGR</u> GGFDRMPPG <u>R</u> GGRPMPPSRRDYDDMSPRRGPPPPPPG <u>R</u> GG <u>R</u> GGSRARNL	
GFPM <u>RGR</u> GGFDRMPPG <u>R</u> GGR (K1-Peptid 252-271)	GPPPPPPG <u>R</u> GG <u>R</u> GGSRARNL (K2-Peptid 288-307)
Abb 22: Synthetische Peptide 2 Oben ist der Teil der hnRNP K- Sequenz zu sehen, welcher die schon bekannten methylierbaren Arginine (fett und unterstrichen) enthält (Ostareck-Lederer <i>et al.</i> , 2006). Dieser erstreckt sich von Aminosäure 250 bis 307 des Gesamtproteins. (Mitte) Das K1-Peptid beinhaltet drei der methylierbaren Arginine und deckt den Bereich zwischen Aminosäure 252 und 271 von hnRNP K ab. (Unten) Das K2-Peptid hingegen entspricht den Aminosäuren 288 bis 307 und weist nur zwei methylierbare Arginine auf.	

In der folgenden Tabelle werden die kinetischen Parameter aller drei PRMTs dargestellt, welche mit allen bisher genannten Peptiden als Substrat ermittelt wurden. Zum Vergleich wurden die kinetischen Parameter aller Enzyme für PABPN1 und hnRNP K mit hinzugefügt.

Tab. 5: Vergleich der kinetischen Parameter für PRMT1, 3 und 6 mit Peptid- und Proteinsubstraten gemessen					
PRMT1					
Name	Substrate	V_{\max} [nmol/mg/min]	K_{cat} [sec ⁻¹]	K_m [μM]	k_{cat}/K_m [sec ⁻¹ M ⁻¹]
(KK)	PABPN1	25,0	0,018	0,07	270 000
(KK)	hnRNP K	65,6	0,046	0,14	325 000
(SO/KK)*	RXR-1	36,00	0,025	1,30	20 100
(SO/KK)	RGG	18,20	0,013	3,00	4 300
(SO/KF)	K1	20,00	0,014	0,14	103 800
(SO/KF)	K2	20,70	0,015	0,09	168 000
PRMT3					
Name	Substrate	V_{\max} [nmol/mg/min]	K_{cat} [sec ⁻¹]	K_m [μM]	k_{cat}/K_m [sec ⁻¹ M ⁻¹]
(SO/KK)	PABPN1	16,2	0,016	1,37	12 000
(KK)	hnRNP K	0,3	0,0003	2,52	100
(SO/KF)	RXR-1	14,90	0,015	2,60	5 800
(SO/KF)	RGG	32,90	0,033	1,00	31 900
(SO/KK)	K1	24,30	0,024	6,40	3 800
(SO)	K2	31,00	0,031	45,50	700
PRMT6					
Name	Substrate	V_{\max} [nmol/mg/min]	K_{cat} [sec ⁻¹]	K_m [μM]	k_{cat}/K_m [sec ⁻¹ M ⁻¹]
(KK)	PABPN1	1,9	0,0013	0,11	13 000
(KK)	hnRNP K	2,7	0,002	1,23	1 600
(KK)	RXR-1	1,10	0,0008	2,20	300
(KK)	RGG	1,50	0,001	2,50	400
(KK)	K1	0,70	0,0005	0,90	600
(KK)	K2	0,80	0,0006	4,80	100

*Die schon erläuterten Namenskürzel zeigen an, von wem die Daten stammen. Die Sequenz und die Erläuterung der Peptide ist in Abb. 10 und 22 zu finden.

Für PRMT1 sind PABPN1 und hnRNP K etwa gleich gute Substrate (s. Tab. 5). Die Peptide werden von PRMT1, mit Ausnahme des RGG-Peptids, ähnlich effizient methyliert wie die vollständigen Substratproteine. Dies lässt vermuten, dass die lokale Aminosäuresequenz für die Methylierung der Substrate wichtig ist. Möglicherweise wird das RGG-Peptid deshalb nicht so effizient methyliert, weil es sich dabei um eine Konsensussequenz aus typischen methylierbaren Proteinen handelt (s. Najbauer *et al.*, 1993), deren lokale Aminosäuresequenz für PRMT1 nicht optimal ist. Benachbarte gefaltete Domänen scheinen die Methylierung durch PRMT1 nicht zu beeinflussen, denn hnRNP K wird genauso effizient methyliert wie die K-Peptide (K1 und K2).

PRMT3 methyliert hnRNP K 120 Mal weniger effizient als PABPN1. Das RXR-Peptid wird nur um einen Faktor zwei weniger effizient methyliert als PABPN1. Deshalb kann auch hier davon ausgegangen werden, dass die lokale Sequenz des Substrates für dessen Methylierung durch PRMT3 wichtig ist. PRMT3 zeigt eine starke Präferenz für das RGG-Peptid. Aber auch die beiden K-Peptide werden von PRMT3 viel effizienter methyliert als hnRNP K, da sie schneller methyliert werden können. Die benachbarten gefalteten KH-Domänen scheinen folglich PRMT3 bei der Methylierung von hnRNP K zu behindern. Mit Ausnahme des RGG-Peptids scheint PRMT3 Peptide weniger stark binden zu können als Proteine.

PRMT6 methyliert hnRNP K acht Mal weniger effizient als PABPN1. Alle Peptide werden weniger effizient methyliert als die Proteinsubstrate. Dabei war die Effizienz der Methylierung des K1-Peptids der von hnRNP K noch am ähnlichsten.

Aus Tabelle 5 können drei allgemeine Schlußfolgerungen gezogen werden:

1. Für jede PRMT gibt es mindestens ein Peptid, welches mit ähnlicher Effizienz methyliert wurde wie ein Substratprotein. Die Enzyme scheinen folglich ihre Substrate an der lokalen Aminosäuresequenz zu erkennen und nicht mit gefalteten Domänen Kontakt aufnehmen zu müssen.
2. Einige Peptide werden erfolgreicher methyliert als die Substratproteine (s. Tab. 5 PRMT3). Dies lässt vermuten, dass benachbarte gefaltete Domänen das Enzym bei der Methylierung behindern können.
3. PRMT1, 3 und 6 haben unterschiedliche Präferenzen für die Peptide.

3.5 Analyse der Substratspezifität mit Hilfe von Proteinchimären

Um die obigen Schlußfolgerungen näher zu verifizieren, wurden Proteinchimären aus beiden Substratproteinen kloniert (s. 2.2.1.12), exprimiert und gereinigt. Auch hierfür wurde die Reinigung im Methodenteil (2.2.3.8 und 2.2.3.10) beschrieben, so dass an dieser Stelle nur ein Schema der Chimären gezeigt werden soll.

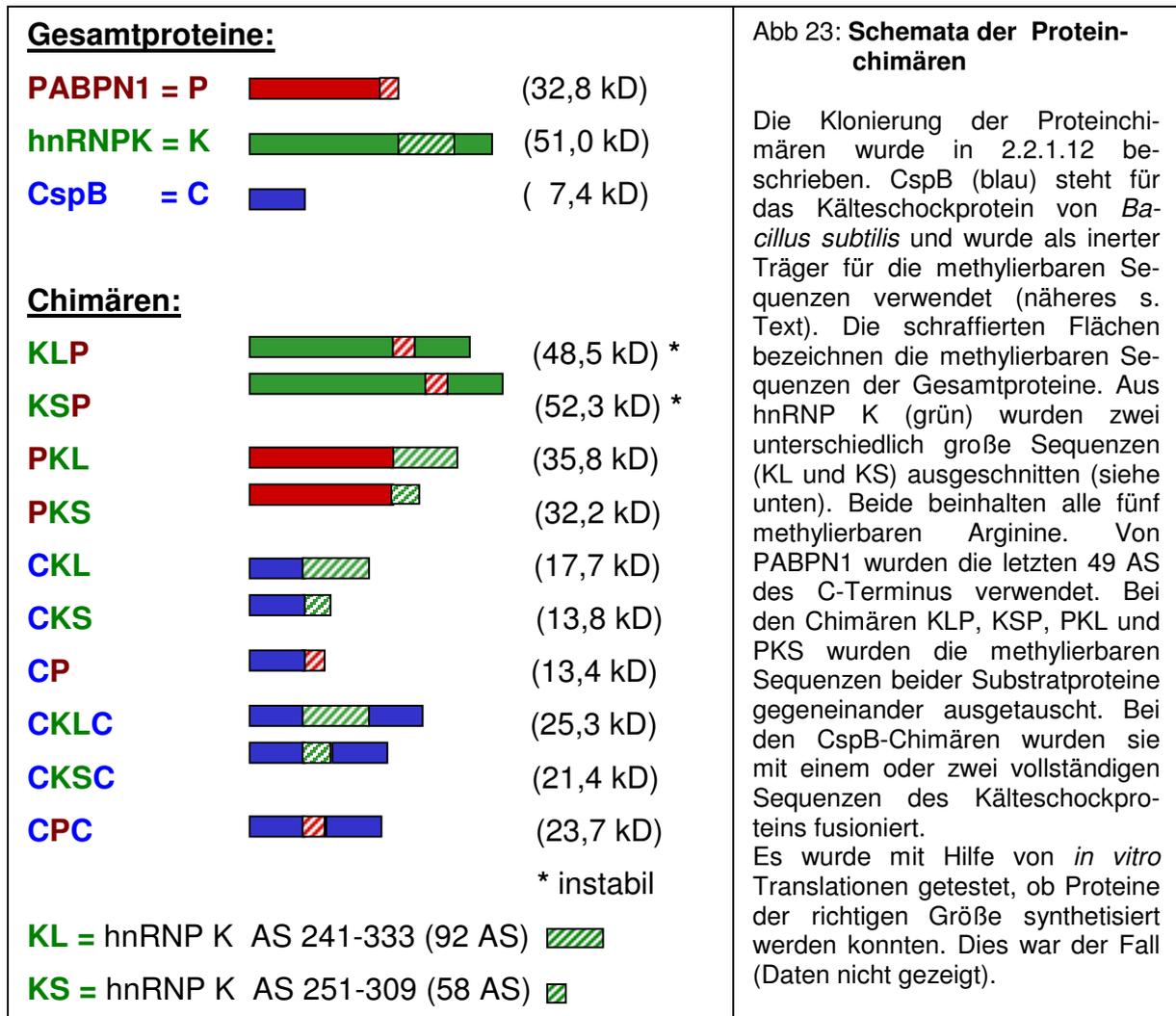


Abb 23: Schemata der Proteinchimären

Die Klonierung der Proteinchimären wurde in 2.2.1.12 beschrieben. CspB (blau) steht für das Kälteschockprotein von *Bacillus subtilis* und wurde als inerte Träger für die methylierbaren Sequenzen verwendet (näheres s. Text). Die schraffierten Flächen bezeichnen die methylierbaren Sequenzen der Gesamtproteine. Aus hnRNP K (grün) wurden zwei unterschiedlich große Sequenzen (KL und KS) ausgeschnitten (siehe unten). Beide beinhalten alle fünf methylierbaren Arginine. Von PABPN1 wurden die letzten 49 AS des C-Terminus verwendet. Bei den Chimären KLP, KSP, PKL und PKS wurden die methylierbaren Sequenzen beider Substratproteine gegeneinander ausgetauscht. Bei den CspB-Chimären wurden sie mit einem oder zwei vollständigen Sequenzen des Kälteschockproteins fusioniert. Es wurde mit Hilfe von *in vitro* Translationen getestet, ob Proteine der richtigen Größe synthetisiert werden konnten. Dies war der Fall (Daten nicht gezeigt).

Bei der Abkürzung CspB in Abbildung 23 handelt es sich um das Kälteschockprotein von *Bacillus subtilis*. Dieses wurde als inerte Träger eingesetzt, da es nicht methyliert wird. Somit sollte es auch keine Sequenzen oder Domänen enthalten, welche die Methylierung beeinflussen könnten. Es weist nur ein Arginin auf, welches sich weder in einer RGG-*box* noch in einem RXR-*cluster* befindet, sondern in einem β -*turn* (Gly, Asn, Arg, Gly, Pro, Gln). Beim Versuch der Methylierung von CspB war kein Einbau von radioaktiven Methylgruppen detektierbar (Daten nicht gezeigt).

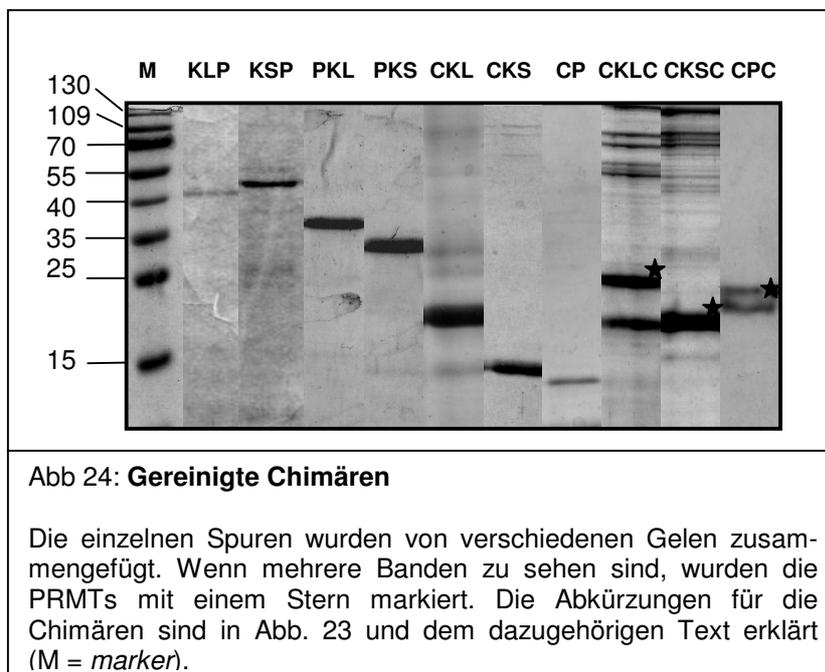
Bei den Chimären KLP, KSP sowie PKL und PKS wurden die methylierbaren Sequenzen von PABPN1 und hnRNP K gegeneinander ausgetauscht. Diese

enthielten stets alle Arginine, welche bei PABPN1 und hnRNP K dimethyliert werden und sind in den Proteinen wahrscheinlich ungefaltet (s. 4.7.3). Aus hnRNP K wurden zwei unterschiedlich lange Sequenzen (KL und KS, s. Abb. 23) ausgeschnitten. Bei den KLP-, bzw. KLS-Chimären wurden sie durch die letzten 49 Aminosäuren (AS) des C-Terminus von PABPN1 ersetzt. Diese Fusionsproteine waren leider sehr instabil (s. 4.7).

Bei den PKL- bzw. PKS-Fusionsproteinen wurden KL bzw. KS anstelle des C-Terminus von PABPN1 angefügt. Die Kälteschockprotein-Chimären wurden analog dazu kloniert. Dabei ist das Kälteschockprotein jeweils in gesamter Länge in der Chimäre enthalten.

Die CKC-Fusionsproteinen und das CPC-Protein weisen eine weitere vollständige Kälteschockprotein-Sequenz auf, welche an den C-Terminus der CK-Proteine, bzw. an das CP-Protein fusioniert wurde ("Hantelproteine").

Im Anhang befindet sich eine Übersichtstabelle über die Ergebnisse der Reinigungen (Säulen, Endkonzentration) der Chimären und über die Bedingungen, unter denen die Michaelis-Menten-Messungen durchgeführt wurden, welche zu den folgenden Tabellen führten.



In Abbildung 24 sind SDS-Gel-Ausschnitte der letzten Reinigungsschritte der gereinigten chimären Proteine zu sehen. Die meisten Chimären weisen in den SDS-Gelen wenig kontaminierende Banden auf und sind damit sauber genug für Methylierungsversuche. KLP und KSP waren während der Reinigung sehr instabil.

Ihre Abbaubanden wurden z.T. besser methyliert, als die vollständigen Proteine, weshalb keine klare Aussage getroffen werden konnte (s. Anhang). Deshalb wurden die Daten dieser Messungen nicht in die nachfolgenden Tabellen aufgenommen. Methylierte Abbaubanden wurden bei keiner anderen Chimäre gesehen. Die PKL- und PKS-Chimären waren hingegen stabil und ließen sich in großen Mengen reinigen. Auch die Fusionen CP und CPC ließen sich gut reinigen, wurden aber nicht so gut überexprimiert. Die zweite Bande bei CPC (s. Abb. 24) wurde in späteren Versuchen nicht methyliert. Weniger sauber sind die CKLC- und CKSC -Fusionen. Diese ließen sich nicht gut reinigen, da sie eine starke Neigung zu Aggregation hatten. Bei den CK-Proteinen war diese nicht ganz so stark ausgeprägt. Allgemein zeigte sich, dass Chimären instabiler wurden, je mehr Anteile sie am zur Aggregation neigenden hnRNP K enthielten (mehr dazu siehe Diskussion 4.7).

3.5.1 Die PK-Fusionen sind bessere Substrate für PRMT3 und 6 als hnRNP K

Tab. 6: Kinetische Parameter für PRMT1, 3 und 6 mit den PK-Chimären gemessen				
PRMT1				
Substrat	V_{max} [nmol/mg/min]	K_m [μ M]	k_{cat} [1/sec]	k_{cat}/K_m [$sec^{-1} M^{-1}$]
PABPN1*	25,0	0,07	0,018	270 000
hnRNP K*	65,6	0,14	0,046	325 000
PKL	33,9	0,100	0,0229	229 000
PKS	46,9	0,100	0,0317	317 000
PRMT3				
PABPN1	16,2	1,37	0,016	12 000
hnRNP K*	0,3	2,52	0,0003	100
PKL	3,0	6,200	0,0029	470
PKS	10,2	4,300	0,0099	2 300
PRMT6				
PABPN1*	1,9	0,11	0,0013	13 000
hnRNP K*	2,7	1,23	0,002	1 600
PKL*	3,8	0,110	0,0027	24 000
PKS*	4,3	0,090	0,0030	33 000

* von Knut Kölbl gemessen

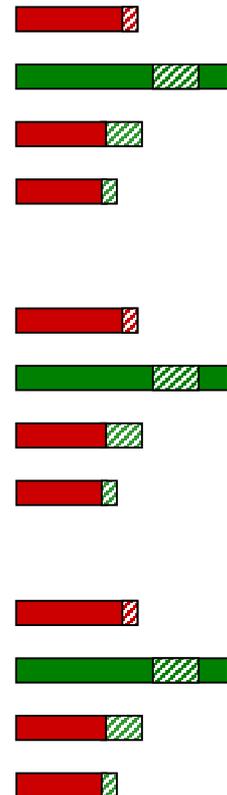


Tabelle 6 zeigt die Kinetischen Parameter für PRMT1, 3 und 6 für die PK-Chimären. Beide PK-Fusionen werden genauso effizient von PRMT1 methyliert wie PABPN1 und hnRNP K. Dies spricht für die lokale Aminosäuresequenz als Spezifitätsdeterminante für PRMT1, wie es auch schon die Peptid-Daten suggerierten (Tab. 5). Da hnRNP K ein eben so gutes Substrat ist wie die PK-Chimären, scheint die C-terminale KH-Domäne (KH3) keinen Einfluss auf die Methylierung durch PRMT1 zu haben.

Für PRMT3 und PRMT6 sind die PK-Proteine viel bessere Substrate als hnRNP K. Dies legt die Vermutung nahe, dass beide Enzyme durch die benachbarten gefalteten Domänen von hnRNP K bei der Methylierung behindert werden.

3.5.2 Die "Hantelhypothese"

PRMTs können ringförmige Dimere bilden, deren aktive Zentren sich innen an der Ringöffnung befinden (s. 1.2.1, Abb. 5 bzw. Zhang und Cheng, 2003; Zhang, Zhou, Cheng 2000). Nach der "Hantelhypothese" dieser Arbeit können daher ungefaltete Substrate einfach an die aktiven Zentren der ringförmigen Dimere gelangen und deshalb besonders gut methyliert werden. Dies würde erklären, warum der ungefaltete C-Terminus von PABPN1, aber auch die endständigen KL und KS-Sequenzen der PK-Fusionen sowie Peptide gute Substrate sind.

Bei hnRNP K hingegen ist die zu methylierende Sequenz von zwei gefalteten Domänen (KH2 und KH3, s. 1.4, Abb. 8) umgeben. Daher werden hnRNP K und einige Chimären (s. 3.5, Abb. 23) in dieser Arbeit als "Hantelproteine" bezeichnet. Laut der "Hantelhypothese" sollte bei diesen Proteinen die zu methylierende Sequenz für die ringförmigen Dimere schlechter zugänglich sein, weshalb solche "Hantelproteine" schlechtere Substrate sein müßten.

Würde PRMT1 "Hantelproteine" besser methylieren können als PRMT3 und 6, so wäre dies eine Erklärung dafür, dass das Hantelprotein hnRNP K ein gutes Substrat für PRMT1, jedoch ein schlechtes für PRMT3 und 6 ist.

3.5.3 Untersuchung der "Hantelhypothese" mit Hilfe der CspB-Chimären

Tab. 7: Kinetische Parameter für PRMT1 mit den Chimären gemessen					
Substrat	V_{max} [nmol/mg/min]	K_m [μ M]	k_{cat} [1/sec]	k_{cat}/K_m [sec ⁻¹ M ⁻¹]	
PABPN1*	25,0	0,070	0,0169	241 000	
CP	26,7	0,080	0,0180	225 000	
CPC	22,8	0,500	0,0154	31 000	
hnRNP K*	65,6	0,140	0,0443	316 000	
CKL	14,9	0,080	0,0101	126 000	
CKS	36,6	0,340	0,0247	73 000	
CKLC	15,3	0,210	0,0103	49 000	
CKSC	6,3	0,330	0,0043	13 000	

* von Knut Kölbl gemessen

In Tabelle 7 sind die kinetischen Parameter gezeigt, welche für PRMT1 mit den diversen Chimären ermittelt wurden. Zum Vergleich wurden die Daten für PABPN1 und hnRNP K mit eingetragen.

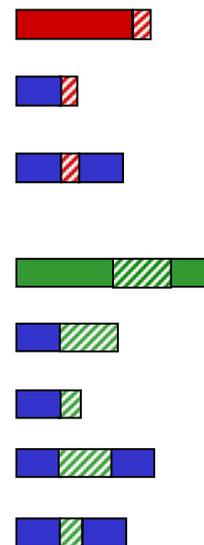
PABPN1 und die CP-Chimäre sind ähnlich gute Substrate, wie aus den k_{cat}/K_m -Werten zu sehen ist. Da das Kälteschockprotein keine Sequenzen enthalten sollte, welche die Methylierung der Arginine beeinflussen, spricht dies dafür, dass die lokale Sequenz der 49 Aminosäuren des C-Terminus von PABPN1 bei der Substratspezifität von PRMT1 eine Rolle spielt. Laut dem K_m kann PRMT1 die CPC-Chimäre schlechter binden. Dies wirkt sich nachteilig auf die Methylierungseffizienz (k_{cat}/k_m) aus. CPC wird um den Faktor 7 schlechter methyliert als PABPN1. Dies spricht für einen schwachen "Hanteleffekt".

CKL wird ähnlich effizient methyliert wie hnRNP K. CKS ist aufgrund seines hohen K_m ein deutlich schlechteres Substrat als hnRNP K. Laut der "Hantelhypothese" hätten beide CK-Proteine bessere Substrate sein sollen als hnRNP K, da die endständige KL bzw. die KS-Sequenz für die ringförmigen Dimere besser zugänglich sein sollte. Der Unterschied zwischen beiden CK-Chimären besteht darin, dass die

KL-Sequenz mehr von der C-terminalen prolinreichen Sequenz von hnRNP K enthält, was dafür sprechen könnte, dass die lokalen Proline für eine bessere Bindung des Enzyms an das Substrat sorgen. Die CKC-Chimären sind wiederum schlechtere Substrate für PRMT1 als die CK-Fusionen. CKLC wird nur um einen Faktor 2,5, CKSC um einen Faktor von 5,6 weniger effizient methyliert als CKL bzw. CKS. Ein eventueller "Hanteleffekt" ist deshalb ähnlich schwach ausgebildet, wie bei der CPC-Hantel. Allgemein scheint die lokale Sequenz für die Substratspezifität von PRMT1 wichtig zu sein, während das Enzym auch ein hantelförmiges Substratprotein noch gut methylieren kann.

Tab. 8: Kinetische Parameter für PRMT3 mit den Chimären gemessen				
Substrat	V_{max} [nmol/mg/min]	K_m [μ M]	k_{cat} [1/sec]	k_{cat}/K_m [sec ⁻¹ M ⁻¹]
PABPN1	11,5	1,010	0,0111	11 000
CP	0,9	0,080	0,0009	12 000
CPC	0,6	0,590	0,0005	900
hnRNP K*	0,3	2,520	0,0003	120
CKL	0,3	0,050	0,0003	6 000
CKS	1,0	1,780	0,0010	540
CKLC	0,2	0,370	0,0002	550
CKSC	0,1	0,139	0,0001	800

* von Knut Kölbl gemessen

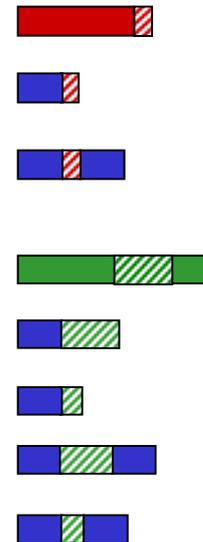


Der Vergleich der katalytischen Effizienzen zeigt, dass PABPN1 und das CP-Fusionsprotein gleich gute Substrate für PRMT3 sind (s. Tab. 8). Folglich scheint die lokale Aminosäuresequenz auch für die Substraterkennung durch PRMT3 wichtig zu sein. Allerdings wird CP mit einer geringeren V_{max} und einem 12 Mal niedrigeren K_m -Wert als PABPN1 methyliert. Die mitgeführten Positivkontrollen zeigten an, dass das eingesetzte Enzym voll aktiv war (Daten nicht gezeigt). Deshalb ist die niedrigere V_{max} nicht auf ein beschädigtes Enzym zurückzuführen. Bei der CPC-Hantelchimäre scheint PRMT3 durch das C-terminale CspB sterisch behindert zu werden, was sich

an allen Parametern der Tabelle ablesen lässt. Zwischen den k_{cat}/K_m -Werten von CP und CPC besteht ein Unterschied von Faktor 13 und damit ein relativ deutlicher "Hanteleffekt".

Alle hnRNP K-Chimären (PKL, PKS, CKL, CKS, CKLC, CKSC) sind bessere Substrate als hnRNP K. Die Daten für die PK- und CK-Proteine scheinen sich zu widersprechen, denn bei den PK-Chimären ist PKS ein besseres Substrat als PKL, bei den CK-Fusionen ist es hingegen umgekehrt. Es spricht für die "Hantelhypothese", dass die PK- und CK-Fusionsproteine bessere Substrate sind als das "Hantelprotein" hnRNP K. CKL wird 10 Mal effizienter methyliert als CKLC, was ebenfalls für einen "Hanteleffekt" spricht. Unerwarteter Weise besteht dieser zwischen CKS und CKSC nicht.

Tab. 9: Kinetische Parameter für PRMT6 mit den Chimären gemessen				
Substrat	V_{max} [nmol/mg/min]	K_m [μ M]	k_{cat} [1/sec]	k_{cat}/K_m [$sec^{-1} M^{-1}$]
PABPN1 ^{*1}	1,9	0,110	0,0013	13 000
CP	1,6	0,030	0,0011	37 000
CPC	2,1	0,2	0,0015	6 400
hnRNP K ^{*1}	2,7	1,230	0,0019	1 500
CKL	0,4	0,370	0,0003	810
CKS	0,4	0,510	0,0003	530
CKLC	1,4	2,9	0,0010	330
CKSC	nd*	nd	nd	nd



*1 von Knut Kölbl gemessen

*2 nd = kein Einbau von Methylgruppen detektierbar

Der Einbau muß folglich geringer sein als 0,3 pmol (Detektionsgrenze)

Laut Tabelle 8 wird CP mindestens ebenso effizient methyliert wie PABPN1. Dies spricht dafür, dass die lokale Sequenz auch bei der Substratspezifität von PRMT6 eine wichtige Rolle spielt. CPC hingegen wird langsamer methyliert und schlechter von PRMT6 gebunden. Dieser Unterschied ist mit einem Faktor 5,7 zwischen CP und CPC ähnlich wie bei PRMT1 und 3.

Die PK-Fusionen (s. Tab. 6) sind bessere Substrate als hnRNP K, was für die "Hantelhypothese" spricht, die CK-Chimären widersprüchlicher Weise jedoch nicht. Zu CKLC und CKSC ist allgemein zu sagen, dass sich diese Proteine aufgrund ihres Aggregationsverhaltens schwer reinigen und von PRMT3 und auch PRMT6 sehr schlecht methylieren ließen (s. 4.7). Auch nach langen Inkubationszeiten von sechs, bzw. acht Stunden erfolgte kaum ein auswertbarer Einbau von Methylgruppen. Daher sind diese Daten nicht interpretierbar.

Allgemein scheint die lokale Aminosäuresequenz der Substrate bei allen Enzymen für die Substraterkennung eine Rolle zu spielen. Die Vermutung, dass PRMT1 Hantelproteine besser methylieren kann als PRMT3 und 6 hat sich nicht bestätigen lassen. Alle Enzyme zeigen einen schwachen "Hanteleffekt" bei der Methylierung von CP und CPC. Zwischen den CK-Fusionen und den CKC-Hanteln besteht bei PRMT1 ebenfalls ein schwacher "Hanteleffekt". PRMT3 scheint Hantelproteine etwas schlechter methylieren zu können als PRMT1, jedoch sind die Daten z. T. widersprüchlich. Bei PRMT6 ist ein "Hanteleffekt" nur zwischen den PK-Chimären und hnRNP K zu sehen. Ferner lag der Einbau an radioaktiven Methylgruppen in die CspB-Hanteln oft nahe der Detektionsgrenze von 0,3 pmol. Die niedrigste V_{max} hatte PRMT3 mit 0,1 nmol/mg/min bei der Methylierung der CKSC-Chimäre. Da mit der "Hantelhypothese" der Unterschied in der Substratspezifität der PRMTs nicht erklärt werden konnte, werden im Diskussionsteil dieser Arbeit noch weitere Faktoren diskutiert, welche die Substratspezifität der Enzyme beeinflussen könnten.

3.6 Untersuchung des Imports von methyliertem und unmethyliertem PABPN1 in den Zellkern von *Xenopus laevis* Oozyten

Nun sollte die Frage nach der Funktion der Arginindimethylierung des PABPN1 C-Terminus untersucht werden. Wie in der Einleitung (1.3) beschrieben, hat die Methylierung von PABPN1 weder eine Auswirkung auf die Affinität von PABPN1 zum Poly(A)-Schwanz, noch auf die Stimulierung der Poly(A)-Polymerase (Kühn *et al.*, 2003; Smith *et al.*, 1999). Da bei Sm-Proteinen sowie beim Hefeprotein Npl3 die Arginindimethylierung einen Einfluss auf Lokalisation der Proteine hat (s. 1.1 und Shen *et al.*, 1998, McBride *et al.*, 2005), wäre dies auch für PABPN1 denkbar. Daher sollte mit Hilfe von Injektionsexperimenten in das Zytoplasma von *Xenopus*-Oozyten das Importverhalten von methyliertem und unmethyliertem PABPN1 in den Kern

untersucht werden. Dazu musste das Arbeiten mit *Xenopus*-Oozyten etabliert werden (s. 2.3).

3.6.1 Etablierung der Importexperimente und Vorversuche

Zunächst sollte der Import von vollständig methyliertem PABPN1 aus Kalbsthymus mit dem Import von nicht methyliertem rekombinanten PABPN1 verglichen werden. Die injizierten Proteine befanden sich in MonoS-Puffer, welcher u.a. auch DTT enthielt. Die Oozyten fielen schon kurz nach der Injektion während der Inkubationszeit in sich zusammen. Trotz des geringen injizierten Volumens von 50-100 nl wurden die schädlichen Pufferbestandteile in der Oozyte scheinbar noch nicht genug verdünnt. Vor der nächsten Injektion wurde der Puffer über eine Dialyse gegen 1X PBS (s. Sambrook, Fritsch und Maniatis, 1989) ausgetauscht. Die zytoplasmatischen und die nukleären Extrakte von fünf Oozyten wurden pro Ansatz vereinigt. Daher wären im Ansatz mindestens 50 ng PABPN1 enthalten. Diese PABPN1-Menge lag scheinbar unter der Detektionsgrenze aller für *Western blots* verwendeten Antikörper oder wurde von Zellbestandteilen der Oozyten maskiert. Zu den verwendeten Antikörpern zählten der Lama-Antikörper (Verheesen *et al.*, 2006) sowie ein Kaninchen-Antikörper gegen *bovines* PABPN1 (Krause *et al.* 1994). Weder beim *semidry*-Verfahren, noch beim *wet-blot* wurden PABPN1-Banden detektiert. Auch die Verwendung zweier verschiedener *blot*-Membranen (Nitrozellulose- bzw. PVDF-Membran) erbrachte keine Verbesserung (Daten nicht gezeigt).

Da das injizierte PABPN1 mit Hilfe eines *Western blots* nicht detektiert werden konnte, wurde eine Markierung des His-PABPN1 mit einem hoch sensitiven Fluoreszenzfarbstoff vorgenommen (IRDye 800 CW Protein Labeling-Kit Microsale von LI-COR Biosciences). Die Rechnung nach der Anleitung ergab, dass nur 0,24 Farbstoffmoleküle pro PABPN1 gebunden hatten, d.h. es wurde nur jedes vierte PABPN1 markiert. Trotzdem konnte 1 ng markiertes PABPN1 in einem SDS-Gel nachgewiesen werden. Dazu wurde ein Fluoreszenzimager (Odyssee Scanner von Li-COR) verwendet. Nun war es von Interesse, ob die Markierung die Funktion des PABPN1 beeinflusst. Deshalb wurden Poly(A)-Bindungstests und danach Gelshifts durchgeführt (s. 2.2.4.1 und 2.2.4.2). Diese ergaben, dass das fluoreszenzmarkierte PABPN1 nicht mehr aktiv in der RNA-Bindung war. Ein Grund dafür könnte gewesen sein, dass der Farbstoff kovalent an die primären Amine von Lysinen band, welche auch in der RNA-Bindedomäne von PABPN1 zu finden sind (Burd und Dreyfuss,

1994; Kenan *et al.*, 1991). Da jedoch die Arginine und das Importsignal im C-Terminus von PABPN1 davon nicht beeinflusst werden, wurde das fluoreszenzmarkierte PABPN1 trotzdem testweise injiziert. Es konnte zwar ein Import von fluoreszierendem PABPN1 in den Kern nachgewiesen werden, jedoch ließ er sich nicht auswerten, da auf dem zur Analyse verwendeten SDS-Gel der Hintergrund zu groß war. Eine Begründung dafür könnte sein, dass der nicht eingebaute Farbstoff nicht völlig entfernt werden konnte und dann auch mit den Lysinen von Proteinen der Oozyte NHS-Ester bildete (Daten nicht gezeigt).

Für die nachfolgenden Experimente wurde das zu injizierende, *bovine* PABPN1 mit His-tag in Retikulozytenlysat *in vitro* translatiert. Dabei wurde der Reaktion ³⁵S-Methionin zugesetzt, so dass das synthetisierte Protein radioaktiv markiert war (s. 2.2.3.1). Die Injektion dieser Proteine in Retikulozytenlysat wurde von den Oozyten zum Einen besser vertragen als die Injektion von in Puffer befindlichen Proteinen. Zum Anderen sind Autoradiografien radioaktiv markierter Proteine sensitiver als *Western blots*, so dass geringere Proteinmengen nachgewiesen werden konnten.

Auch eine P³²-Markierung eines PABPN1-Konstruktes mit N-terminaler Proteinkinase-Erkennungssequenz wurde versucht. Die Autoradiografie zeigte, dass die Proteinkinase-reaktion sehr erfolgreich war. Wurde danach jedoch die nicht eingebaute Radioaktivität mit Hilfe einer Gelfiltrationssäule (*Zebraspin Column* von Pierce) abgetrennt, waren auch große Verluste des markierten Proteins zu verzeichnen, weshalb auf eine solche Markierung verzichtet wurde (Daten nicht gezeigt).

Bei der Injektion von ³⁵S-markiertem PABPN1 war es wichtig, dem Barth's Medium, in welchem die injizierten Oozyten vor der Präparation inkubiert wurden, Cycloheximid zuzufügen. Dadurch wurde verhindert, dass in den Oozyten das überschüssige ³⁵S-Methionin in andere Proteine eingebaut wurde und deshalb auf der Autoradiografie ein dunkler Hintergrund zu sehen war. Dieser überdeckte bei den ersten Versuchen die PABPN1-Bande im zytoplasmatischen Proteinextrakt. Dadurch wurde zunächst fälschlicher Weise angenommen, dass der Import schon nach weniger als 30 min abgeschlossen und nicht abhängig von der Zeit wäre.

Mit ca. 32 kDa ist PABPN1 klein genug, um passiv in den Kern zu diffundieren (Shulga *et al.*, 1996; Keminer und Peters, 1999). Deshalb wurde für die folgenden Experimente PABPN1 mit GST-tag verwendet, was somit ca. 58 kDa groß war. Dies

hatte den positiven Nebeneffekt, dass der GST-tag sechs weitere Methionine enthielt, so dass das radioaktive Signal verstärkt wurde. Als Negativkontrolle wurde eine Mutante von PABPN1 koinjiziert, welcher die letzten 49 Aminosäuren des C-Terminus fehlen (Δ c49-Mutante). Damit weist sie kein nukleäres Importsignal (NLS) auf (Calado *et al.*, 2000) und sollte deshalb nicht importiert werden.

3.6.1.1 Nicht methyliertes rekombinantes PABPN1 wird importiert, die Δ c49-Mutante kaum

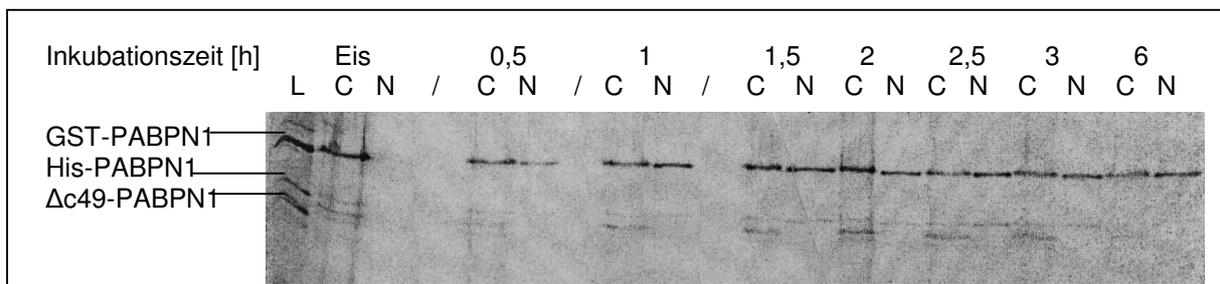


Abb. 25: Autoradiografie eines Injektionsexperiments mit verschiedenen PABPN1-Konstrukten

³⁵S-markiertes *bovines* GST-PABPN1, His-PABPN1 und PABPN1 ohne die letzten 49 AS des C-Terminus wurden koinjiziert. Nach verschiedenen Inkubationszeiten von 0,5 bis 6 h in Barth's Medium mit Cycloheximid wurden je 5 Oozyten pro Inkubationszeit präpariert. L steht für den load (Gewinnung siehe Text), C für den zytoplasmatischen- und N für den nukleären Proteinextrakt. Die zytoplasmatischen und nukleären Proteinextrakte wurden wie in 2.3.6 beschrieben gewonnen und auf ein SDS-Gel geladen. Zu sehen ist die Autoradiografie des SDS-Gels.

Der load (Abb. 25) wurde gewonnen, indem mit dem Injektor das gleiche Volumen, welches sonst injiziert wurde, in 5 μ l SDS-Probenpuffer gespritzt wurde. Dieser befand sich im abgeschnittenen Deckel eines Eppendorfgefäßes, so dass das Gemisch anschließend in ein Reaktionsgefäß zentrifugiert werden konnte.

Da bei einer Inkubation auf Eis kein Import erfolgen sollte (Mitteilung Utz Fischer Universität Würzburg), wurden die Proteinextrakte einer solchen Probe als Negativkontrolle aufgetragen. Schon während der Injektion wurde die Injektionsbank in eine Petrischale gestellt, die mit Eis gefüllt war. Die Inkubation erfolgte zunächst in vorgekühltem Medium im Kühlschrank. Später wurde dazu übergegangen, die Oozyten sofort nach der Injektion in eiskaltem Medium zu präparieren. Auch wurden die Kerne durch Hin- und Herschieben mit den Pinzetten im Medium von zytoplasmatischen Resten gereinigt. Die oben gezeigte Autoradiografie gehört zu denen, wo diese Negativkontrolle gelungen ist. Dennoch wurden im Durchschnitt der

Experimente 33 % des injizierten GST-PABPN1 in der Kernfraktion gefunden. Von einem passiven Import ist hierbei nicht auszugehen, da das Protein dafür zu groß sein sollte. Bei Raumtemperatur (zwischen 20 und 23 °C) wurden GST-PABPN1 und His-PABPN1 gut importiert. Von der $\Delta c49$ -PABPN1-Mutante gelangte hingegen sehr viel weniger, manchmal gar nichts, in den Kern. Dies entsprach der Erwartung, da dieses PABPN1 kein Importsignal aufwies. Trotzdem wurde die His- $\Delta c49$ -PABPN1-Bande nicht als interne Kontrolle verwendet, weil auch davon im Durchschnitt der Experimente 21 % in der Kernfraktion zu finden waren.

Es wurden auch Zeitverläufe des Imports für die Eis- und die His- $\Delta c49$ -PABPN1-Kontrolle gemessen (Daten nicht gezeigt). Diese zeigten, dass der Anteil an Protein im Kern nicht proportional mit der Zeit stieg sondern schwankte. Dies ist ein Indiz dafür, dass es sich hierbei nicht um einen Import oder passive Diffusion handeln kann. Vielmehr ist davon auszugehen, dass bei der Injektion z.T. die Kernmembran beschädigt wurde, so dass radioaktives PABPN1 eindringen konnte.

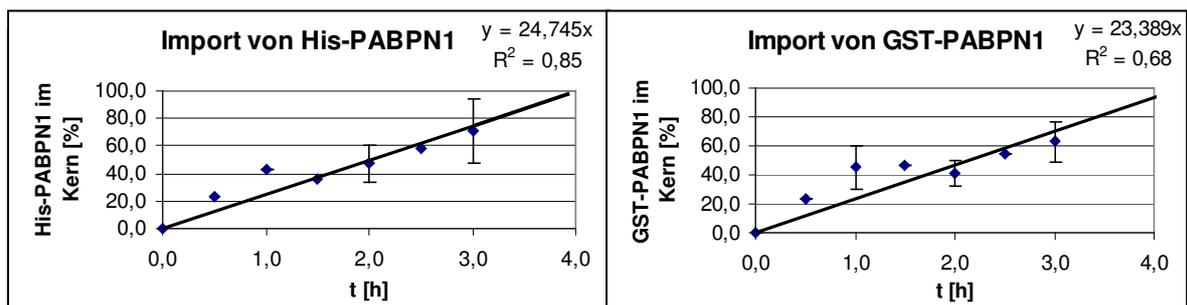


Abb. 26: Quantifizierung des Importes von GST- und His-PABPN1

Mit Hilfe des ImageQuant-Programmes wurde die Schwärzung der Banden ermittelt. Bei der Auswertung wurden jeweils die Schwärzungen der Banden im zytoplasmatischen und im nukleären Proteinextrakt zur Gesamtschwärzung addiert und diese 100 % gesetzt. Danach wurde der Anteil an importiertem Protein im Kernextrakt errechnet. Der *load* wurde deshalb nicht 100 % gesetzt, weil nach dem Herausziehen der Injektionsnadel immer ein Teil der Probe wieder aus der Oozyte austrat. Dies war durch die rote Färbung des Retikulozytenlysates unter dem Binokular gut zu verfolgen. Die Messpunkte vom Import von His-PABPN1 (links) sind Mittelwerte aus nur zwei Messreihen, beim Import von GST-PABPN1 (rechts) bestehen sie aus Mittelwerten von vier Messreihen.

Wie Abbildung 26 zeigt, werden His-PABPN1 und GST-PABPN1 mit einer ähnlichen Rate von ca. 24 % des injizierten Proteins pro Stunde importiert.

Da sowohl das Retikulozytenlysate als auch die Oozyten selbst PRMTs enthalten, könnten diese das *in vitro* synthetisierte PABPN1 methylieren. Dadurch wäre kein Vergleich zwischen unmethyliertem und methyliertem PABPN1 möglich.

Zunächst sollte die Methylierung durch die Oozyten untersucht werden, in welchen die Existenz eines xPRMT1 nachgewiesen worden war (s. 1.2.1 und Batut *et al.*, 2005).

3.6.1.2 Oozytenextrakt und Eiextrakt methylieren PABPN1 *in vitro*

Eine Möglichkeit, die Methylierung des injizierten PABPN1 durch die PRMTs der Oozyten zu umgehen, ist herauszufinden, wie schnell diese Methylierung vonstatten geht. Dann kann die Inkubationszeit so verkürzt werden, dass zumindest nur eine teilweise Methylierung stattfinden kann. Dazu wurde eine *in vitro* Methylierung von PABPN1 durch Oozyten- bzw. Eiextrakt durchgeführt. Der Eiextrakt wurde von der AG Fischer (Universität Würzburg) zur Verfügung gestellt und wie in Leno und Laskey (1991) beschrieben, hergestellt. Die Herstellung des Oozytenextraktes ist in der Legende der folgenden Abbildung beschrieben.

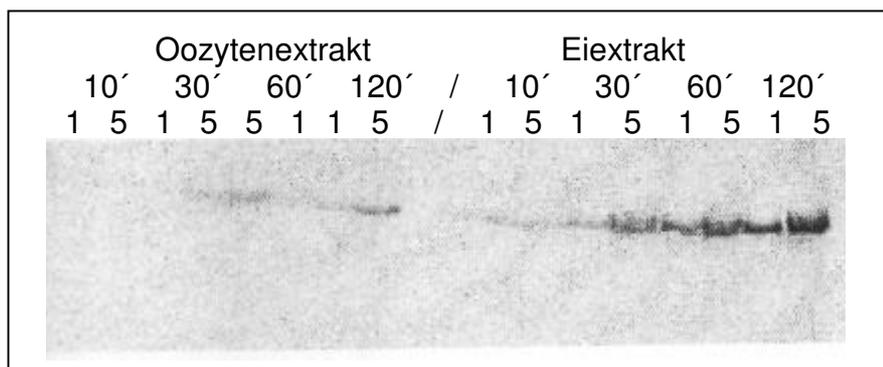


Abb. 27: **Oozyten-Extrakt methyliert PABPN1 *in vitro***

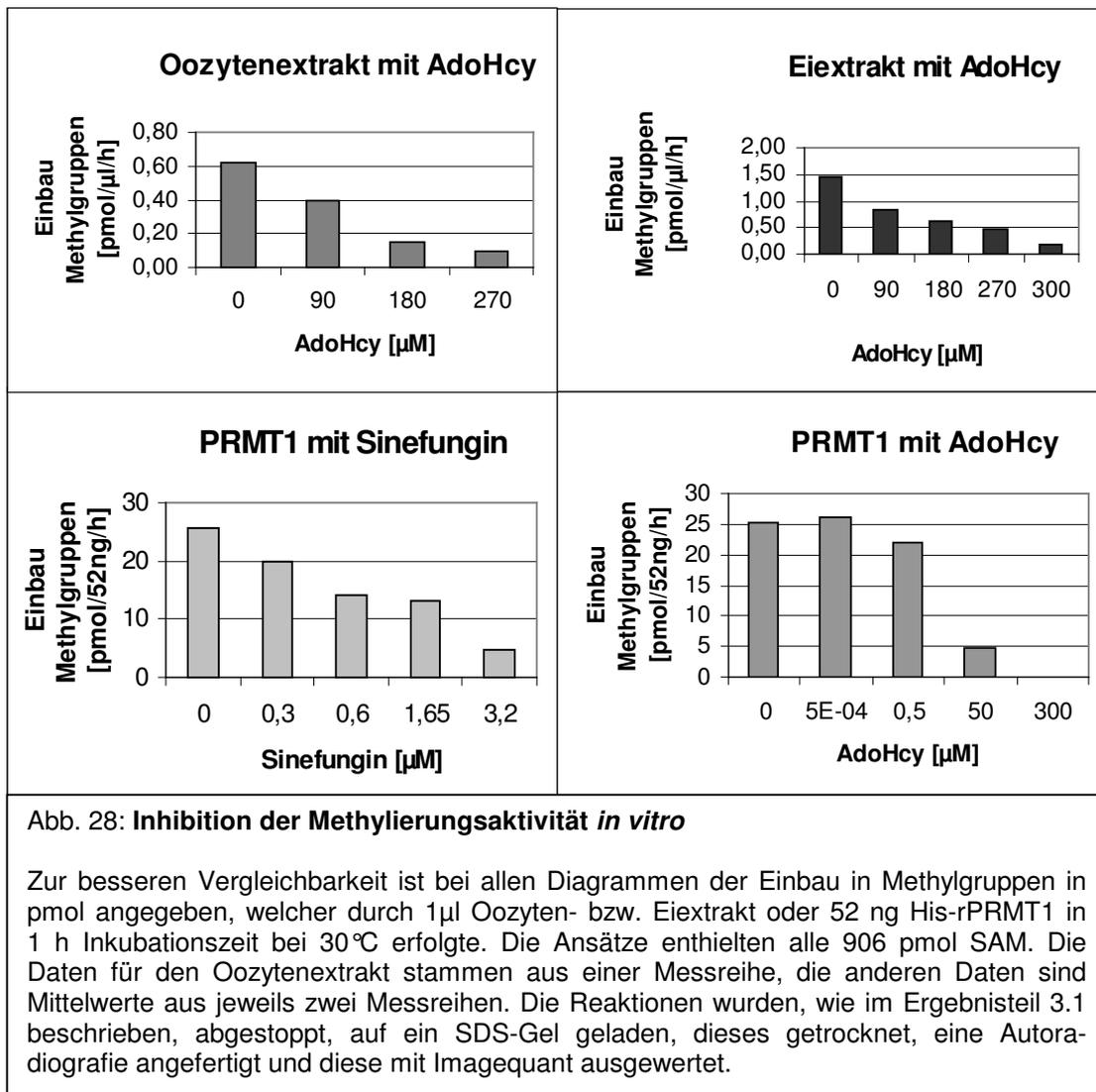
Zur Gewinnung des Oozytenextraktes wurden 40 Oozyten in möglichst wenig Medium (40 μ l) verwendet. Dann wurden 60 μ l Methylierungsmastermix (ohne Enzym und SAM, siehe 2.2.4.3) damit vermischt, so dass 100 μ l Oozytensuspension vorlagen. Nun wurden die Oozyten mit Hilfe einer Pipette zerkleinert und für 20 min bei 14000 rpm bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und für die folgenden Experimente verwendet. Es wurden zwei Mastermixe für je sechs Methylierungsansätze à 20 μ l erstellt. Beide enthielten die im Methodenteil (s. 2.2.4.3) angegebenen Pufferbestandteile und wurden mit bidestilliertem Wasser so aufgefüllt, dass auf einen Ansatz 9 μ l Puffermix kämen. Dann wurden sechs Mal 2 μ l 14 C-SAM (906 pmol) und die sechsfache Menge an 0,8 μ l (6,39 pmol) His-PABPN1 hinzugegeben. In den einen Mastermix wurden 6 μ l Oozytenextrakt, in den anderen 30 μ l Oozytenextrakt pipettiert, so dass ein Ansatz des einen Mastermixes 1 μ l und des anderen 5 μ l Oozytenextrakt enthielt. Nach Ablauf verschiedener Inkubationszeiten bei 30°C wurden den Mastermixen je 20 μ l entnommen und deren Reaktionen wie im Ergebnisteil 3.1 beschrieben abgestoppt, auf ein SDS-Gel geladen, dieses getrocknet, eine Autoradiografie angefertigt und diese mit Imagequant ausgewertet. Mit dem Eiextrakt wurde analog verfahren.

Zur Auswertung der Autoradiografie in Abbildung 27 wurde zunächst der Einbau an Methylgruppen in pmol / μl Extrakt / 3 h berechnet. Da die gesamten 100 μl Oozytenextrakt 40 Oozyten enthielten, entsprach eine Oocyte 2,5 μl Extrakt. Durch 1 μl Oozytenextrakt wurden in drei Stunden 1,89 pmol Methylgruppen in 6,4 pmol PABPN1 eingebaut. Somit erreichten die Methyltransferasen einer Oocyte einen Einbau von ca. 4,7 pmol Methylgruppen in drei Stunden. Beim Eiextrakt war nicht bekannt, wieviele Eier dafür verwendet wurden. Jedoch war 1 μl des Eiextraktes sieben Mal so aktiv wie der Oozytenextrakt.

Über einen *Western blot* konnte abgeschätzt werden, dass bei einer *in vitro* Translation in Retikulozytenlysat ca. 8 ng/ μl PABPN1 synthetisiert werden (Daten nicht gezeigt). Somit würden ungefähr 0,8 ng/100 nl injiziert werden. Dies entspräche 25 fmol PABPN1. Für die vollständige Dimethylierung aller 13 Arginine dieser Menge an PABPN1 wäre ein Einbau von ca. 0,65 pmol Methylgruppen nötig. Folglich könnte die Oocyte möglicherweise schon in 24 min das injizierte PABPN1 vollständig methylieren.

3.6.1.3 Inhibition der Methylierung der Extrakte durch Sinefungin oder Adenosylhomocystein

Durch die Übertragung der Methylgruppe von S-Adenosylmethionin (SAM) auf ein Arginin entsteht der kompetitive Inhibitor Adenosylhomocystein (AdoHcy). Auch SAM-Analoga wie Sinefungin wirken als kompetitive Inhibitoren (Cheng *et al.*, 2004). Vor den eigentlichen Versuchen mit der Koinjektion eines dieser Hemmstoffe wurden beide separat in die Oozyten gespritzt. Unter dem Binokular war zu verfolgen, dass nach einer Stunde die mit 60 μM AdoHcy injizierten Oozyten weniger in sich zusammen gefallen waren, als Oozyten mit der gleichen Menge und Konzentration an Sinefungin (Daten nicht gezeigt). Dies ließe sich damit erklären, dass AdoHcy im Gegensatz zu Sinefungin ein natürlicher Inhibitor ist. Vermutlich wurde zumindest ein Teil des AdoHcy durch die Adenosylhomocysteinhydrolase (s.1.1) in den Oozyten unschädlich gemacht. Die Inhibitionsexperimente wurden zur besseren Vergleichbarkeit mit der *in vitro* Methylierung auch *in vitro* durchgeführt.



Die Methylierungsaktivität des Oozytenextraktes lässt sich durch den Inhibitor AdoHcy gut inhibieren (s. Abb. 28). Bei sechsfachem Überschuss (270 μM) AdoHcy über das SAM verfügt der Oozytenextrakt nur noch 16% seiner ursprünglichen Aktivität. Der Eiextrakt ließ sich nur wenig schlechter durch AdoHcy inhibieren als der Oozytenextrakt. PRMT1 wird durch Sinefungin viel effizienter gehemmt, als mit AdoHcy. Dennoch wurde aus den oben genannten Gründen für die nächsten Experimente AdoHcy als Methyltransferasehemmstoff verwendet.

3.6.1.4 Die Methylierung von PABPN1 durch das Retikulozytenlysats ist zu vernachlässigen

Vor dem eigentlichen Experiment wurde nun die Methylierungsaktivität des Retikulozytenlysats näher betrachtet. Um festzustellen, inwieweit endogene Methyltransferasen das PABPN1 des Retikulozytenlysates methylieren, wurde

¹⁴C -markiertes SAM in das Lysat pipettiert und für zwei Stunden bei 30 °C inkubiert. Falls ein Einbau von radioaktiven Methylgruppen stattgefunden hatte, so war dieser so gering, dass er in der Autoradiografie nicht zu sehen war (weniger als 0,3 pmol Detektionsgrenze). Im nächsten Ansatz wurden Retikulozytenlysat, ein Plasmid mit der Sequenz für GST-PABPN1 zusammen mit einem für Δc49-PABPN1 und radioaktives SAM gemischt und wie oben beschrieben inkubiert. Auch hier lag der Einbau von radioaktiven Methylgruppen in das synthetisierte GST-PABPN1 durch die lysateigenen PRMTs unter der Detektionsgrenze von 0,3 pmol.

3.6.2 Die Importtests zeigen keinen Unterschied beim Import von unmethyliertem und methyliertem PABPN1 in den Kern von *Xenopus laevis* Oozyten

Die Herstellung der Proben für die Injektion von unmethyliertem und methyliertem PABPN1 ist in der Legende zur folgenden Abbildung genauer beschrieben. Beide Proben wurden per *in vitro* Translation synthetisiert und dabei mit radioaktivem ³⁵S-Methionin markiert. Eine Probe wurde danach mit nicht radioaktivem SAM *in vitro* methyliert. Diesem Ansatz wurde 5'-Methylthioadenosine/S-Adenosylhomocystein Nukleosidase (kurz MTA/AdoHcy-Nukleosidase) zugesetzt. Dieses Enzym baut den bei der Dimethylierung entstehenden Hemmstoff AdoHcy zu Adenin, und S-Ribosyl-L-Homocystein ab (Duerre *et al.* 1962; Lee *et al.*, 2001).

Um einen Eindruck davon zu bekommen, wieviel Prozent Methylgruppen in das nicht radioaktiv methylierte PABPN1 eingebaut werden konnten, wurde analog dazu eine *in vitro* Translation von PABPN1 mit nicht radioaktivem Methionin vorgenommen. Das synthetisierte PABPN1 wurde danach mit ¹⁴C-SAM *in vitro* methyliert. Nach drei Stunden war es zu 19 % methyliert. Analog dazu wurde ein Ansatz mit His-PABPN1 radioaktiv methyliert. Dieses war nach drei Stunden zu 18 % methyliert. In einem früheren Experiment (s. 3.1) war schon getestet worden, dass nicht radioaktives und radioaktives SAM gleich gut eingebaut werden. Ein weiteres Experiment hatte gezeigt, dass nach drei Stunden Methylierung nicht viel mehr weitere Methylgruppen eingebaut werden (Daten nicht gezeigt). Daher sollte auch das nicht radioaktiv methylierte, translatierte PABPN1 zu ungefähr 18 % methyliert gewesen sein.

Vor der Injektion wurde der Probe mit dem nicht methylierten PABPN1 AdoHcy zugesetzt, so dass dieses in der Probe in einer Konzentration von 60 μM vorlag. Die

Probe mit dem methylierten PABPN1 wurde mit einer äquivalenten Menge bidestilliertem Wasser versehen.

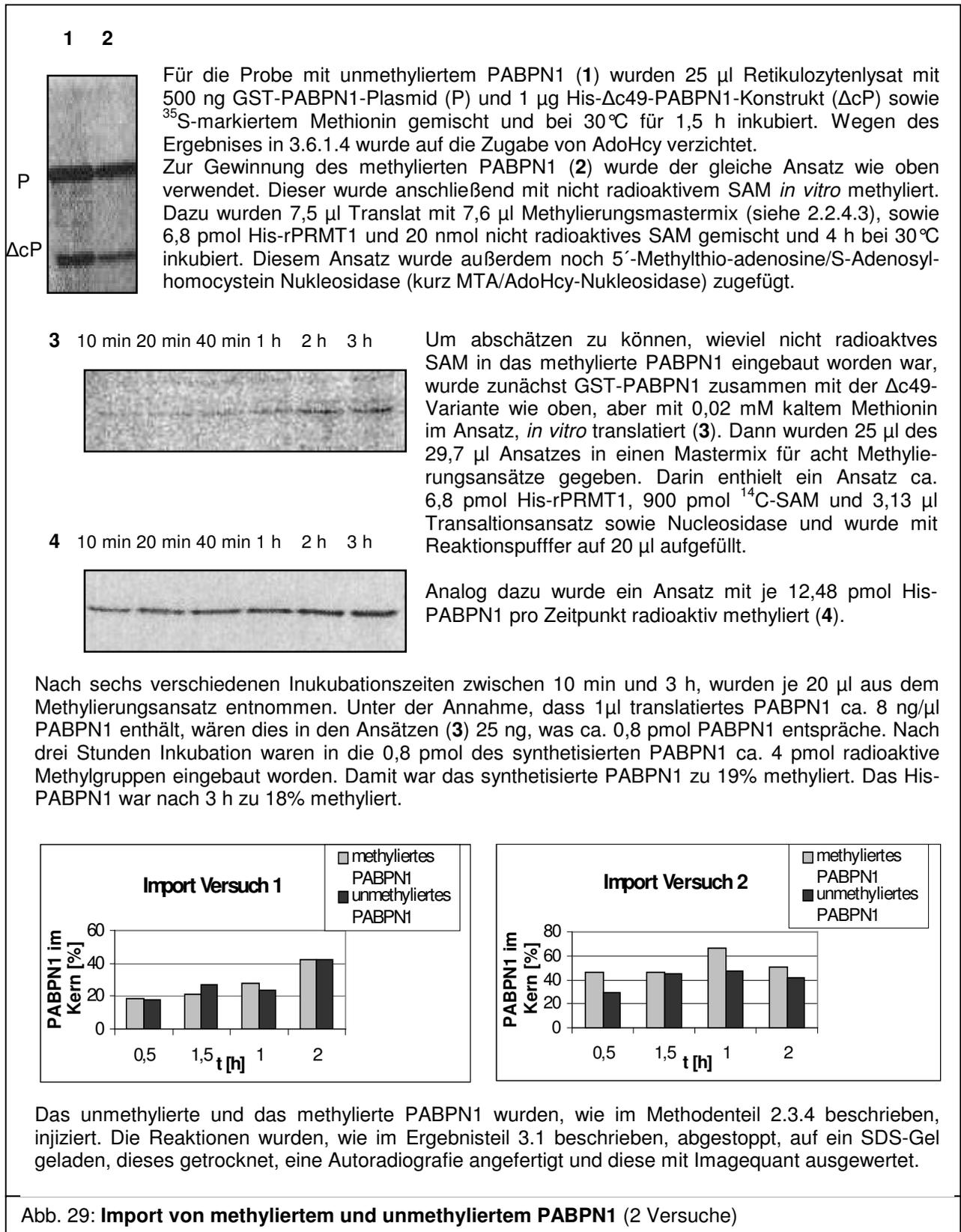


Abbildung 29 zeigt, dass unter den oben genannten Bedingungen kein signifikanter Unterschied im Importverhalten von methyliertem oder unmethyliertem PABPN1 besteht. Bei Versuch zwei war nach einer Stunde Inkubationszeit weniger unmethyliertes PABPN1 im Kernextrakt zu finden als erwartet, nach zwei Stunden galt dies auch für methyliertes PABPN1. Dies könnte zum Einen daran liegen, dass der Importweg mit PABPN1 gesättigt ist und es deshalb zu einer Stagnation kommt. Andererseits wäre es auch möglich, dass das injizierte PABPN1 im Zytoplasma der Oozyten abgebaut wird und deshalb die Importrate nicht mehr aufrecht erhalten werden kann. Wie es zu den Unterschieden zwischen beiden Versuchen kommen konnte, wird in der Diskussion (4.10.3) beschrieben.

4. Diskussion

4.1 Zur Reinigung der humanen PRMTs 1,3 und 6

Zu Beginn dieser Arbeit war bekannt, dass die Arginindimethylierung von PABPN1 durch die Protein-Arginin-Methyltransferasen PRMT1 und 3 katalysiert wird (Smith *et al.*, 1999). Es wurden Fraktionierungen von Proteinextrakten aus Hela-Zellen und Maus-ES-Zellen durchgeführt, welche vermuten ließen, dass auch PRMT6 an der Arginindimethylierung von PABPN1 beteiligt ist. Die Fraktionierungen wurden parallel zu der vorliegenden Dissertation von Katharina Fronz (MLU Halle) durchgeführt. Ein N-terminaler GST-*tag* beeinträchtigt die Enzymaktivität von PRMT1 (Ostareck-Lederer *et al.*, 2006). In dieser Arbeit wurden deshalb zunächst PRMT1, 3 und 6 ohne *tag* in *Escherichia coli* exprimiert und gereinigt (s. 3.2). Die PRMTs ohne *tag* verloren durch häufiges Auftauen an Aktivität. Dies war möglicherweise auf ihre geringe Konzentration zurückzuführen. Wegen der leichteren Reinigung und der zu erwartenden höheren Konzentration wurden PRMT1, 3 und 6 auch mit His-*tag* exprimiert und gereinigt (s. 3.2, Abb. 17). Mit Hilfe der rekombinanten Enzyme konnte bestätigt werden, dass PRMT1, 3 und 6 für die Arginindimethylierung von PABPN1 verantwortlich sind (s. 3.3, Tab. 4). Als Negativkontrolle wurde GST-PRMT4 verwendet, welches PABPN1 nicht methylierte (persönliche Mitteilung Katharina Fronz).

Außerdem konnte gezeigt werden, dass sich die spezifische Aktivität der PRMTs ohne *tag*, der His-PRMTs und der zellulären Enzyme nicht signifikant voneinander unterschied (s. 3.3, Tab. 4). Da folglich ein N-terminaler His-*tag* die Enzymaktivität

nicht beeinträchtigt, konnten die His-PRMTs zur Untersuchung der Substratspezifität verwendet werden.

In dieser Arbeit wurden zwei humane Spleißvarianten von PRMT1 (hPRMT1-v2 und hPRMT1-v1) für die Reinigung ohne *tag* kloniert. hPRMT1-v2 wurde jedoch als erstes gereinigt und getestet. Es bestand kein signifikanter Unterschied in der spezifischen Aktivität zwischen hPRMT1-v2 ohne *tag* und His-PRMT1 von der Ratte (s. 3.3, Tab. 4). Deshalb wurde in den weiteren Versuchen nur noch die His-rPRMT1 verwendet. In einer Veröffentlichung (Pawlak *et al.*, 2002) wurde allerdings beschrieben, dass zwei Spleißvarianten von PRMT1 der Maus überlappende aber auch zum Teil unterschiedliche Substrate hatten. Durch einen N-terminalen His-*tag* wurde der Unterschied in der Substratspezifität jedoch aufgehoben. Es wäre daher interessant, auch hPRMT1-v1 und v3 ohne *tag* zu reinigen. Dann könnte untersucht werden, ob auch die humanen PRMT1-Spleißvarianten unterschiedliche Substratspezifitäten haben und ob diese die Methylierung von PABPN1 betreffen.

4.2 Für die Arginindimethylierung von PABPN1 benötigen die PRMTs keine weiteren Polypeptide

PRMTs arbeiten oft in Komplexen zusammen mit anderen Proteinen, welche ihre Substratspezifität determinieren. PRMT5 beispielsweise methyliert die Sm-Proteine im sogenannten "Methylosom". Dabei werden die Substrate durch die assoziierte Untereinheit pICln erkannt (Friesen *et al.*, 2001).

In der vorliegenden Arbeit konnte kein signifikanter Unterschied in den spezifischen Aktivitäten der rekombinanten PRMTs und der zellulären ("authentischen") Enzyme nachgewiesen werden (s. 3.3). Die zellulären Enzyme wurden zudem mit hohen Ausbeuten gereinigt (persönliche Mitteilung von Katharina Fronz). Ein Verlust von Untereinheiten, die für die Methyltransferase-Reaktion von Bedeutung sind, ist also unwahrscheinlich. All dies lässt vermuten, dass PABPN1 von PRMT1, 3 und 6 ohne die Hilfe von anderen Polypeptiden als Substrat erkannt und methyliert wird.

Wie *knock-down*- bzw. *knock-out*-Versuche an verschiedenen Zelllinien und Mäusen gezeigt hatten, wird hnRNP K nur durch PRMT1 methyliert (Ostareck-Lederer *et al.* 2006), rpS2 hingegen nur durch PRMT3 (Swiercz *et al.*, 2007) und Arginin 2 in Histon H3 durch PRMT6 (Guccione *et al.*, 2007). PABPN1 hingegen wird durch drei verschiedene Methyltransferasen methyliert. Daraus folgt, dass die PRMTs zwar spezifische Substrate haben, ihre Substratspezifitäten aber auch Überlappungen

zulassen. Diese zeigten sich in der vorliegenden Arbeit auch bei der Methylierung der Peptide (s. 4.3 und 4.4).

4.3 PRMT3 bevorzugt das RGG-Peptid

Bei PABPN1 sind die dimethylierten Arginine in RXR-Motiven lokalisiert (Smith *et al.*, 1999). Beim heterogenen nukleären Ribonukleoprotein K (hnRNP K) befinden sie sich in RGG-Motiven. Im Gegensatz zu PABPN1 wird hnRNP K ausschließlich von PRMT1 dimethyliert (Ostareck-Lederer *et al.*, 2006). In dieser Arbeit konnte jedoch gezeigt werden, dass PRMT3 ein Peptid mit RGG-Motiven (Najbauer *et al.*, 1993) stark präferiert. Dieses wird 320 Mal effizienter methyliert als hnRNP K. Für PRMT1 ist es hingegen ein unerwartet schlechtes Substrat, denn hnRNP K wird 75 Mal effizienter methyliert als dieses Peptid. In einer Veröffentlichung wurde ebenfalls beschrieben, dass das RGG-Peptid im Vergleich zu einem Histon H4-Peptid ein schlechtes Substrat für PRMT1 war (Osborne *et al.*, 2007). Eine Begründung dafür könnte sein, dass es sich beim RGG-Peptid um eine Konsensussequenz handelt, welche auf Sequenzteilen von Fibrillarin und Nucleolin der Ratte basiert (Najbauer *et al.*, 1993). Damit entspricht es keiner natürlichen Sequenz. Deshalb wurde in dieser Arbeit die Methylierung weiterer Peptide untersucht, welche direkt von der zu methylierenden Sequenz von hnRNP K abgeleitet wurden. Diese waren für PRMT1 ähnlich gute Substrate wie hnRNP K, für PRMT3 wiederum bessere Substrate und für PRMT6 etwas schlechtere als hnRNP K (s. 3.4.2 Tab. 5).

4.4 Zum Methylierungstest mit Peptiden

Beim Methylierungstest der rekombinanten Enzyme mit PABPN1 als Substrat war keine lineare Abhängigkeit der Aktivität von der Enzymmenge gegeben. Da das Enzym nicht stärker verdünnt werden sollte, hätte mehr Substrat eingesetzt werden müssen. Es war jedoch nicht möglich, rekombinantes PABPN1 in hinreichend hoher Konzentration einzusetzen. Eine Lösung dieses Problems boten synthetische Peptide (s. 3.1, Abb. 10), welche in höherer Konzentration als Substrat verwendet werden konnten. Da das RGG-Peptid von PRMT3 und 6 effizienter methyliert wurde als das RXR-Peptid (s. 3.4.2, Tab. 5), wurde für die Reinigung der rekombinanten PRMTs ein Methylierungstest entwickelt, bei welchem das RGG-Peptid als Substrat diente.

4.5. Die lokale Aminosäuresequenz ist für die Substratspezifität aller untersuchten Enzyme wichtig

Für jedes Enzym existiert mindestens ein Peptid, welches ähnlich effizient methyliert wird wie ein Proteinsubstrat (3.4.2, Tab. 5). Dies spricht dafür, dass die lokale Aminosäuresequenz bei der Substratspezifität der Enzyme die wichtigste Rolle spielt. Sequenzmotive in den N-Termini der Enzyme können auch eine gewisse Rolle bei der Substraterkennung spielen (s. Bachand 2007 und Abb. 2). So ist beispielsweise der Zinkfinger von PRMT3 an der Substraterkennung beteiligt (Bachand und Silver, 2004; Frankel und Clarke, 2000).

Die lokale Aminosäuresequenz liefert auch eine mögliche Erklärung dafür, dass PRMT1 bestimmte Arginine von hnRNP K und PABPN1 nicht als Substrat methyliert. Dies wird mit der folgenden Abbildung veranschaulicht.

<u>hnRNP K (AS 241-333)</u>
MMFDDRRGRRPVGFPMRGGGDFRMPGRRGGRRP MPPSRDYDDMSPRRGPPPPPPGRRGGRRAR NLPLPPPPPPRRGGDLMAYDRRGRPGDRY
<u>Legende:</u> dimethylierbare Arginine nicht methylierte Arginine Aspartate restliche AS
Abb. 30: KL-Sequenz aus hnRNP K

Abbildung 30 zeigt den Ausschnitt von hnRNP K, in welchem sich die dimethylierten Arginine (rot und unterstrichen) befinden. Diese sind oftmals in unmittelbarer Nachbarschaft von Argininen lokalisiert, welche nicht methyliert werden (blau). Es ist auffällig, dass diese nicht methylierten Arginine oft vor

oder hinter Aspartaten (grün) zu finden sind.

Die Substratbindestelle der PRMTs ist sauer, also negativ geladen (Zhang und Cheng, 2003; Zhang, Zhou und Cheng, 2000). Es ist daher vorstellbar, dass es zu einer Abstoßung zwischen der sauren, negativ geladenen Bindestelle und den Aspartaten des Substrates kommt, so dass die benachbarten Arginine nicht methyliert werden können. Ähnliches gilt für Arginine im glutamatreichen N-Terminus von PABPN1. Eine Ausnahme scheint das dimethylierte Arginin (AS 258) im C-Terminus von PABPN1 zu sein, welches direkt neben dem Aspartat (AS 257) lokalisiert ist. Möglicherweise wird dessen Wirkung durch Interaktionen mit anderen Aminosäuren abgeschwächt.

4.6 Zur "Hantelhypothese"

PRMT1 (Zhang und Cheng, 2003), aber auch PRMT3 (Zhang, Zhou und Cheng, 2000) und CARM1 (Troffer-Charlier *et al.*, 2007), sind als Dimere kristallisiert worden. Von HMT1, dem PRMT1-Homologen der Hefe, ist sogar eine Kristallstruktur eines Hexamers bekannt, welches aus einem Trimer von Dimeren besteht (Weiss *et al.*, 2000). Durch die Dimerisierung entsteht eine Ringstruktur, wobei sich die aktiven Zentren der Enzyme im Inneren des Ringes befinden.

Für PRMT3 und PRMT6 sind die PK-Chimären und mindestens ein Peptid viel bessere Substrate als hnRNP K selbst. Dies legt die Vermutung nahe, dass beide Enzyme durch die benachbarten gefalteten Domänen von hnRNP K bei der Methylierung behindert werden. Für PRMT1 ist dies scheinbar nicht der Fall.

Daraus wurde die sogenannte "Hantelhypothese" abgeleitet. Diese besagte, dass die zu methylierende Sequenz für die Enzym-Dimere unzugänglicher wird, wenn sie sich zwischen zwei gefalteten Domänen des Substratproteins befindet, da diese Domänen den Zugang zum aktiven Zentrum behindern. Solche "Hantelproteine" sollten daher schlechtere Substrate sein. Um diese Hypothese zu untersuchen, wurden Hantel-Chimären hergestellt, welche N- und C-terminal von der zu methylierenden Sequenz aus hnRNP K oder PABPN1 ein CspB-Protein aufwiesen. Dies entspricht der Struktur von hnRNP K, weil die zu methylierende Sequenz sich hier ebenfalls zwischen zwei gefalteten KH-Domänen (KH2 und 3) befindet (s.1.4, Abb. 8).

Die Vermutung, dass PRMT1 diese "Hantelproteine" besser methylieren kann als PRMT3 und 6, ließ sich nicht bestätigen. Alle Enzyme zeigten einen ähnlich schwachen "Hanteleffekt" beim Vergleich der Methylierung von CP und CPC (PRMT1 Faktor 7, PRMT3 Faktor 13, PRMT6 Faktor 6). Die Daten für die hnRNP K-Fusionen (CKL, CKS, CKLC, CKSC) sind aus den folgenden Gründen nicht interpretierbar: Bei PRMT3 war der "Hanteleffekt" zwischen den CK- und CKC-Chimären zwar stärker ausgeprägt als bei PRMT1, jedoch sind die Daten für PRMT3 in sich widersprüchlich. So ist bei den PK-Chimären PKS das bessere Substrat bei den CK-Chimären ist es hingegen CKL. Von PRMT6 werden alle hnRNP K-Fusionen gleich schlecht methyliert. Ein "Hanteleffekt" ist nur zwischen den PK-Chimären und hnRNP K zu sehen, nicht aber zwischen den CK- und CKC-Fusionen. Ferner lag der Einbau an radiaktiven Methylgruppen in die CspB-Hanteln durch PRMT3 und 6 oft nahe der Detektionsgrenze von 0,3 pmol. Die

Schwierigkeiten, welche bei der Reinigung und Methylierung der Chimären auftraten, werden in den folgenden Abschnitten diskutiert.

4.7 Instabilität und Aggregationsverhalten der hnRNP K-Chimären KLP, KSP, CKL, CKS, CKSC, CKLC

Das Protein hnRNP K fällt bei KCl-Konzentrationen unter 400 mM aus. An eine Säule gebunden, lässt es sich aber umpuffern. Die von der Säule gewonnenen Fraktionen aggregieren dann jedoch bei häufigem Auftauen wieder sukzessiv (persönliche Mitteilung Bodo Moritz, MLU Halle). Ein ähnliches Verhalten wurde bei Chimären beobachtet, welche die methylierbaren Sequenzen aus hnRNP K enthielten. Dabei neigten diejenigen Fusionsproteine, welche die längere hnRNP K-Sequenz KL beinhalteten, stärker zur Aggregation. Aggregate sind als Substrate für eine Methylierung ungeeignet. Daher wurden alle Substratproteine aliquotiert und höchstens zwei Mal aufgetaut. Dennoch lässt sich eine Aggregation der Substrate auch während der Methylierungsreaktion nicht ausschließen.

Durch das Aggregationsverhalten waren die Konzentrationen an hnRNP K-Chimären gering. Die Chimären ließen sich auch nicht aufkonzentrieren, weil sie am Filter der Säulen kleben blieben. Da in den Methylierungsreaktionen nur bestimmte Volumina an Substrat eingesetzt werden konnten, war es z.T. nicht möglich, die Substratkonzentration viel höher als den K_m zu titrieren. Deshalb musste die V_{max} bei einigen Messungen grafisch extrapoliert werden.

Die Chimären KLP und KSP waren zusätzlich sehr instabil. Sie konnten nicht verwendet werden, da ihre Abbauprodukte besser methyliert wurden als die Gesamtproteine (s. Anhang).

Die Löslichkeit von hnRNP K lässt sich durch bestimmte Pufferzusätze (10% Sucrose, 50 mM Natriumcitrat) verbessern (persönliche Mitteilung von Bodo Moritz, MLU Halle). Die Chimären waren aber zum Zeitpunkt dieser Mitteilung schon gereinigt. Da die Zusätze die ohnehin z.T. schon geringe Proteinkonzentration weiter verdünnt hätten, wurde auf sie verzichtet.

4.7.1 Mögliche Beeinflussung der PRMTs durch Pufferbestandteile im Aktivitätstest

Es wurde untersucht, ob Pufferbestandteile für die Substratproteine einen Einfluss auf die Aktivität der PRMTs 1, 3 und 6 haben (Daten nicht gezeigt). Phosphat und Imidazol lagen im Aktivitätstest in so geringen Konzentrationen vor, dass sie keinen

Einfluss auf die Enzyme hatten. Kaliumchlorid aus den Substraten lag im Aktivitätstest hingegen in einer Konzentration bis zu 75 mM vor. Diese Salzkonzentration konnte im Test die Aktivität von PRMT3 bis zu einem Faktor 2 vermindern. PRMT1 und 6 werden durch diese Konzentration an Kaliumchlorid nicht beeinflusst. Im Ansatz der Methylierungsreaktion waren 40 mM Kaliumacetat enthalten. Die Aktivität der Enzyme verringert sich jedoch erst ab einer Konzentration von 100 mM Kaliumacetat um einen Faktor 1,2 (PRMT1), 1,3 (PRMT3) und 1,7 (PRMT6).

4.7.2 Mögliche Beeinflussung der PRMTs durch an CspB gebundene Nukleinsäuren

CspB ist ein RNA-*chaperone* (Zeeb und Balbach, 2003). Es bindet so fest an Nukleinsäuren, dass diese sich weder mit einer MonoQ- noch mit einer MonoS-Säule abtrennen ließen. Deshalb wurde eine Entfaltung in 6 M Guanidiniumchlorid und eine anschließende Rückfaltung versucht (s. Sackewitz *et al.*, 2008). Da die UV-Spektren der so gereinigten CspB-Chimären ein unerklärliches Maximum bei 300 nm aufwiesen, wurde auf diese Reinigungsmethode verzichtet. Die an den Chimären verbliebenen Nukleinsäuren könnten die PRMTs behindern, so dass die CspB-Chimären als schlechtere Substrate erscheinen würden als sie in Wirklichkeit sind. Andererseits sollten die Nukleinsäuren nur fest an die CspB-Domänen binden und nicht an die zu methylierende Sequenz, weshalb sie die Aktivität der PRMTs nicht negativ beeinflussen sollten.

4.7.3 Korrekte Faltung der Proteinchimären

Bei der Reinigung von Proteinchimären stellt sich die Frage nach der korrekten Faltung dieser künstlichen Proteine. Von den hnRNP K-Chimären (CKL, CKSD, CKLC und CKSC) konnte aus den oben genannten Gründen (s. 4.7) nicht genug Protein gereinigt werden, um ihr CD-Spektrum messen zu können. PKL und PKS hatten mit ca. 150-200 nM im Poly(A)-Bindungstest (Daten nicht gezeigt) eine 25 X höhere K_D als PABPN1 (Literaturwert 8 nM; Kühn *et al.* 2003). Bei diesen Chimären wurde jedoch der C-Terminus von PABPN1 durch Teile von hnRNP K ersetzt. Da der C-Terminus von PABPN1 aber auch an der Bindung der RNA beteiligt ist (Kühn *et al.*, 2003), lässt die höhere K_D nicht auf Fehlfaltung des Proteins schließen. Die RNP-Domäne von PABPN1 hat allein einen K_D von 1500 nM (Kühn *et al.*, 2003). Da die K_D

der PK-Chimären besser ist als die K_D der RNP-Domäne allein, müssten die Chimären über gefaltete Domänen verfügen.

CspB wird als Protein beschrieben, dass sich schnell faltet (Sackewitz *et al.* 2008). Da CspB als Gesamtprotein in den Chimären enthalten ist, wurde davon ausgegangen, dass es sich darin ebenfalls faltet.

In einer weiteren Veröffentlichung (Schindler und Schmid, 1996) konnte jedoch aus einem Arrhenius *plot* (Abb. 3) ablesen werden, dass sich CspB bei 30 °C ca. 100 Mal pro Sekunde entfaltet. Die Rückfaltungsrage lag mit 1000 s^{-1} zehn Mal höher. Daraus lässt sich errechnen, dass bei 30 °C im Gleichgewicht ca. 10% des CspB ungefaltet vorliegen. Wegen der schnellen Entfaltung, bzw. der geringen Stabilität von CspB lässt sich nicht ausschließen, dass eine Entfaltung der "Hantelproteine" Voraussetzung für deren Methylierung ist. Für eine zuverlässige Überprüfung der "Hantelhypothese" müssten also entsprechende Konstrukte mit einem stabileren CspB hergestellt werden. Dafür würden sich z.B. CspB-Homologe aus thermostabilen Organismen, wie beispielsweise *Bacillus caldolyticus* (Zhou und Dong, 2003; Huang und Zhou, 2006), anbieten.

Die Faltung der zu methylierenden Sequenzen von PABPN1 und hnRNP K musste nicht getestet werden, da diese vermutlich keine Tertiärstruktur hatten. Sie erfüllen vielmehr die in der Literatur beschriebenen Kriterien für nativ ungefaltete Proteine (s. *review* Fink, 2005):

1. Dazu gehört eine geringe Hydrophobizität (Uversky, Gillespie und Fink, 2000). Diese wird durch das Fehlen der aliphatischen Aminosäuren Isoleucin, Leucin und Valin, sowie der aromatischen Aminosäuren Phenylalanin, Tyrosin und Tryptophan hervorgerufen (Romero *et al.*, 2001). Da die zu methylierende Sequenz von PABPN1 diese Aminosäuren aufweist, gilt dieses Kriterium nur für die zu methylierende Sequenz von hnRNP K.
2. Beide Sequenzen enthalten keine Cysteine, so dass keine Schwefelbrücken gebildet werden können, welche in Sekundär- und Tertiärstrukturen eine wichtige Rolle spielen.
3. Ein weiteres Kriterium ist eine hohe Nettoladung (Uversky, Gillespie und Fink, 2000), welche bei beiden methylierbaren Sequenzen durch die Häufung von positiv geladenen Argininen entsteht.
4. Beide Sequenzen erfüllen das Kriterium von wenig Komplexibilität und hoher Flexibilität (Romero *et al.*, 2001). Dies ist bei hnRNP K auf die häufig

vorkommenden Aminosäuren Glycin und Prolin zurückzuführen. Der C-Terminus von PABPN1 enthält viel Serin aber auch einige Proline.

5. PABPN1 wird direkt von Transportin gebunden. Transportin bindet bevorzugt an ungefaltete Sequenzen (Calado *et al.*, 2000).

4.8 Modellierungen

Um die in dieser Arbeit gewonnenen Daten (Tabellen 6-8) besser verstehen zu können, wurden Substrate und Enzyme mit Hilfe der Modellierungsprogramme Sybyl und Pymol dargestellt. Dabei wurden die Sybyl-Abbildungen in Kooperation mit Frau Thondorf (MLU Halle) erarbeitet. Für alle Abbildungen wurden Röntgen- und NMR-Strukturen aus der Proteindatenbank (pdb) verwendet.

4.8.1 Enzyme

4.8.1.1. Die Öffnungen der Dimerringe von PRMT1 und 3 sind klein

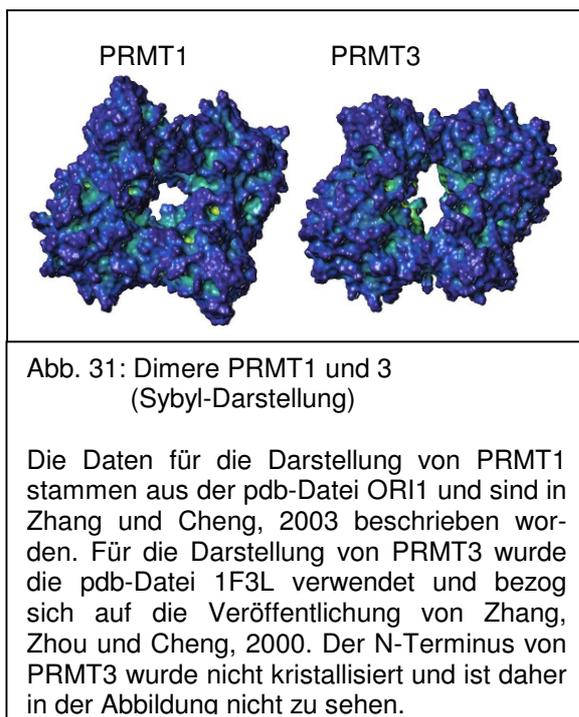


Abbildung 31 zeigt die Oberflächenstruktur der Dimere von PRMT1 und 3 der Ratte. Die Öffnung des Ringes ist bei PRMT1 deutlich kleiner als bei PRMT3. Dies könnte eine Rolle bei der unterschiedlichen Substratspezifität beider Enzyme spielen. Um einen Eindruck von der Größe der jeweiligen Öffnung zu bekommen, wurden die Abstände der im katalytischen Zentrum befindlichen Glutamate (s. 1.2.1, Abb. 4) zwischen den Dimerpartnern gemessen. Bei PRMT1 beträgt der Abstand zwischen den äquivalenten Glutamaten E144 ca. 35 Å.

Die näher zur Ringöffnung gelegenen Glutamate E153 sind nur 15 Å voneinander entfernt. Analog dazu beträgt der Abstand zwischen den beiden Glutamaten E326 bei PRMT3 36 Å und zwischen den beiden Glutamaten E335 27 Å. Zusätzlich wurde die Zugänglichkeit der Bindungstaschen beider Enzyme untersucht.

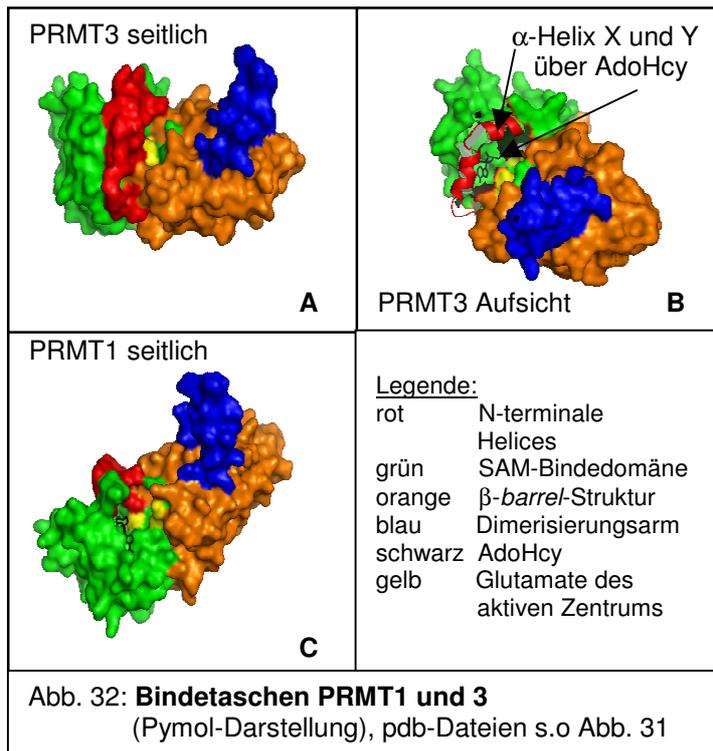


Abbildung 32 zeigt die Bindungstaschen von PRMT1 und 3 im Vergleich. Die Farbgebung entspricht der in Zhang und Cheng (2000 und 2003). Die N-terminalen Helices sind rot, die SAM-Bindedomäne grün und der Dimerisierungsarm blau dargestellt. Die β -barrel-Struktur ist abweichend orange gefärbt. Das gebundene SAM ist in schwarz eingezeichnet. Die gelben Flecken bezeichnen die zwei Glutamate des aktiven Zentrums.

Abbildung 32 A und B zeigen das PRMT3-Monomer in Seitenansicht und Aufsicht. In Abbildung 32 A wird das gebundene SAM von den beiden N-terminalen α -Helices α X und α Y überdeckt. Der daran angrenzende N-Terminus wurde nicht kristallisiert und ist daher nicht mit dargestellt. In Abbildung 32 B sind die Helices als Symbole dargestellt, weshalb das SAM nun sichtbar ist. Es wurde beschrieben, dass diese α -Helices die Bindung des SAM stabilisieren. Dabei ist α X beweglicher als α Y, was den Austausch von AdoHcy und SAM erlaubt (Zhang, Zhou und Cheng, 2000). PRMT1 weist in Abbildung 32 C nur eine N-terminale α -Helix α Y auf. Das Aminosäuremotiv YFxxY (x = beliebige AS) der α X-Helix von PRMT3 ist auch bei PRMT1 und HMT1 zu finden (Zhang und Cheng, 2003; Weiss *et al.*, 2000). Eine eventuell vorhandene Helix α X konnte jedoch weder bei PRMT1 noch bei HMT1 mit kristallisiert werden. Es könnte sich deshalb um eine vollständig ungefaltete Sequenz handeln. Aber auch eine sehr stark bewegliche α -Helix ist nicht auszuschließen. Durch Deletionen der N-terminalen Sequenz von PRMT1 und HMT1 konnte gezeigt werden, dass das SAM nicht mehr so stark an das Enzym binden konnte. Der N-Terminus von PRMT1 scheint somit noch beweglicher zu sein als der von PRMT3. Damit müsste der Austausch von AdoHcy und SAM bei PRMT1 schneller möglich sein als bei PRMT3. Dies würde wiederum erklären, warum PRMT1 aktiver ist. Es wurde ebenfalls diskutiert, ob die Enzymaktivität aller PRMTs über ein Gleichgewicht aus Enzymdimeren und Monomeren reguliert wird, wobei nur die

Dimere aktiv sind (Weiss *et al.*, 2000). Bei PRMT3 liegt das Gleichgewicht eher auf der Seite der Monomere, was ebenfalls erklären könnte, warum PRMT3 weniger aktiv ist als PRMT1.

Zhang, Zhou und Cheng (2000) nehmen an, dass sich der nicht kristallisierte N-Terminus von PRMT3 unter der SAM-Bindedomäne und dem β -*barrel* des Monomers und folglich außerhalb des Dimerringes befindet. Sie diskutieren, dass durch ihre Verbindung mit dem N-Terminus, die α -Helix αX weniger flexibel sein könnte. Da dies jedoch nicht experimentell belegt wurde, wäre es ebenso möglich, dass sich der N-Terminus von PRMT3 nahe der Substratbindetasche befindet und somit die Zugänglichkeit des Enzymes behindert. Damit wäre zu erklären, warum die zu methylierende Sequenz von hnRNP K, welche zwischen zwei gefalteten KH-Domänen liegt, von PRMT3 kaum methyliert werden kann und der bewegliche freie N-Terminus von PABPN1 ein sehr viel besseres Substrat darstellt.

4.8.2 Substrate

Um den Mechanismus der Enzymreaktion verstehen zu können, ist aber auch die Struktur des Substrates von großer Wichtigkeit. Vom N-Terminus von PABPN1 gibt es keine Struktur in den Datenbanken. Es wurde aber beschrieben, dass er keine stabil gefaltete Tertiärstruktur hat (Lodderstedt *et al.*, 2008). Danach folgt die α -helikale Domäne und die RNA-Bindedomäne. Auch davon gibt es noch keine Kristallstruktur, jedoch existieren zahlreiche Strukturen vom RNP- oder RRM-Typ von Domänen dieser Klasse. Ein Beispiel ist die RNA-Bindedomäne von U1A, welche Oubridge *et al.* (1994) mit RNA kokristallisieren konnten. Der C-Terminus von PABPN1 ist wiederum wahrscheinlich kaum gefaltet (s. 4.7.3).

hnRNP K weist drei KH-Domänen auf. Die zu methylierende Sequenz von hnRNP K ist höchstwahrscheinlich ebenfalls ungefaltet (s. 4.7.3) und liegt zwischen den letzten zwei KH-Domänen (s. 1.4). Von der KH-Domäne Nummer drei ist eine Struktur bekannt (Baber *et al.*, 1999).

4.8.2.1 Gefaltete Domänen passen nicht in die Öffnung des Dimerringes

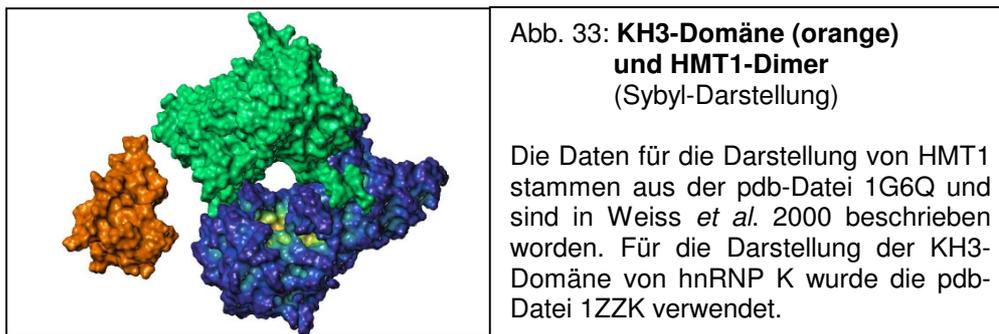


Abbildung 33 zeigt, dass die KH3-Domäne von hnRNP K nicht in die Öffnung des Dimerringes passt. Für diese Abbildung wurde das Hefe-Protein HMT1 verwendet, welches homolog zu PRMT1 ist.

In dieser Arbeit ist ferner die Methylierung von Fusionsproteinen, bestehend aus CspB und den argininreichen Sequenzen von PABPN1 und hnRNP K, untersucht worden.



Wie Abbildung 34 zeigt, passt auch gefaltetes CspB nicht in die Öffnung zwischen den Dimerpartnern.

Wie schon erwähnt (s. 4.7.3), faltet und entfaltet sich dieses Protein jedoch ständig (Schindler und Schmid, 1996), so dass bei einer Reaktionstemperatur für Methylierungen von 30°C im Gleichgewicht ca. 10 % des Proteins ungefaltet vorliegen. Es wäre daher vorstellbar, dass sich die CspB-Anteile der Hantelproteine (CPC, CKSC und CKLC) entfalten und so die dazwischen befindliche zu methylierende Sequenz an die Substratbindetaschen im Inneren des Dimerringes gelangen könnte.

4.9 Erweiterungen der "Hantelhypothese"

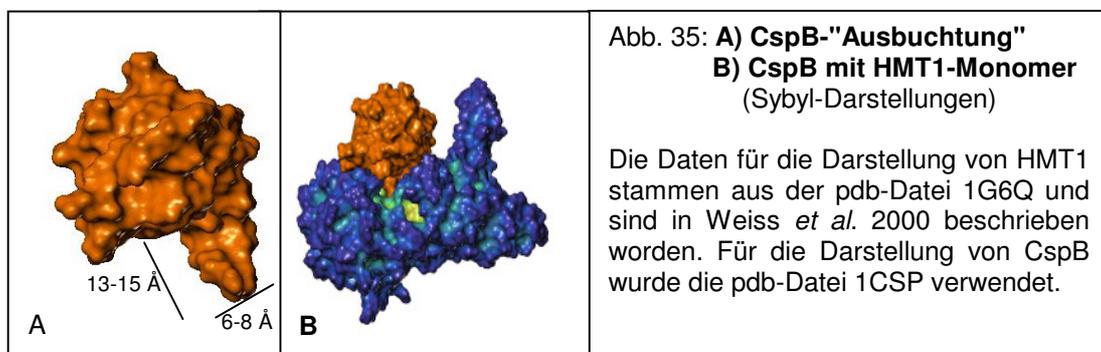
Da alle untersuchten Enzyme (PRMT1, 3 und 6) nur wenig vom "Hanteleffekt" betroffen zu sein scheinen (s. 4.6), reicht die "Hantelhypothese" vermutlich nicht zum Verständnis aller gewonnenen Daten (s. Tab. 6-8) aus.

Da gefaltete Proteindomänen nicht in die Öffnung zwischen den Dimerpartnern passen (s. 4.8.2.1), sind nur zwei Möglichkeiten der Interaktion zwischen den Enzymdimeren und hantelförmigen Substratproteinen vorstellbar:

1. Das Dimer öffnet sich zunächst und schließt sich dann wie eine Klammer um die zu methylierende ungefaltete Sequenz.
2. Die zu methylierenden Sequenzen könnten eine Schlaufe bilden. Diese könnte in die Öffnung zwischen den Dimerpartnern eindringen, auch wenn sich das Dimer nicht öffnet. Die gefalteten Domänen der Substratproteine blieben dabei außerhalb des Dimerringes.

4.9.1 Argumente für die "Schlaufenhypothese"

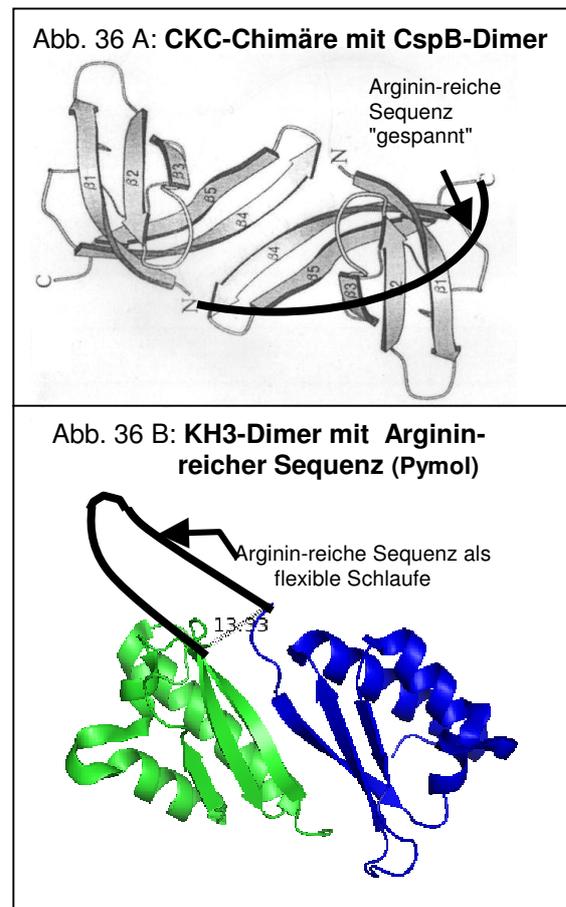
Für die Bildung einer solchen "Substrat-Schlaufe" sprechen z.B. die Glycine und Proline in den Substratsequenzen, welche *loop*-Strukturen begünstigen können (Krieger, Möglich und Kiefhaber, 2005). Dies ist beispielsweise beim β -turn der Fall.



Die langen β -Faltblätter β 4 und 5 von CspB sind über einen β -turn miteinander verbunden und bilden dadurch eine kegelförmige "Ausbuchtung" (s. Abb. 35 A) des ansonsten globulären Proteins (Schindelin *et al.*, 1993). Das Arginin dieses β -turns lässt sich direkt in die Bindetasche eines HMT1-Monomers einpassen (s. Abb. 35 B). Für PRMT3 ohne N-Terminus wurde eine kegelförmige Substratbindetasche von ca. 8 X 6 Å Breite und ca. 8 Å Tiefe beschrieben (Zhang, Zhou und Cheng, 2000). Die enge Öffnung der Substratbindetasche beider Enzyme lässt nur eine sehr enge und kurze "Substrat-Schlaufe" oder gar nur einen β -turn zu.

Die Schlaufenbildung könnte dadurch beeinflusst werden, dass sowohl CspB als auch die KH3-Domäne von hnRNP K in Kristallstrukturen Dimere bilden (Schindelin *et al.*, 1993; Backe *et al.*, 2005). Dafür, dass CspB auch in Lösung als Dimer vorliegt, spricht sein Verhalten bei Gelfiltrationen (Schindelin *et al.*, 1993). Außerdem zeigt es hohe Sequenzhomologien zu CspD und CspE von *E. coli*, welche in Lösung ebenfalls als Dimere vorliegen (Yamanaka *et al.*, 2001; Johnston *et al.*, 2006). Im Gegensatz zu CspB, D und E weist CspA von *E. coli* am N-Terminus drei zusätzliche Aminosäuren auf. Diese werden dafür verantwortlich gemacht, dass CspA nicht dimerisieren kann (Schindelin *et al.*, 1994).

Da noch keine Daten vorliegen, die dem widersprechen, ist nicht auszuschließen, dass KH2 und 3 von hnRNP K auch in Lösung Dimere bilden. Die KH-Domänen von Nova-1 und Nova-2 liegen in Lösung als Dimere vor (Lewis *et al.*, 1999; Ramos *et al.*, 2002). Dabei wurden allerdings isolierte KH-Domänen und keine vollständigen Proteine untersucht. Allgemein wird aber davor gewarnt, von Dimerstrukturen in Kristallen auf die Existenz von Dimeren in Lösung zu schließen (review Valverde *et al.*, 2008).



Unter der Annahme, dass CspB und die KH-Domänen von hnRNP K Dimere bilden können, die wie in der Kristallstruktur angeordnet sind, wurde Abbildung 36 angefertigt. Dabei ist in Abbildung 36 A eine CKC-Chimäre mit einem CspB-Dimer (nach Schindelin *et al.*, 1993) dargestellt. Bei dieser Chimäre ist die zu methylierende Sequenz von hnRNP K (schwarze Linie) C-terminal mit dem einen und N-terminal mit dem anderen CspB fusioniert. Bilden diese nun ein Dimer, so entstünde eine "Substrat-Schleufe", welche jedoch in ihrer Beweglichkeit eingeschränkt wäre, da sie sich über ein Monomer "spannt".

Abbildung 36 B zeigt ein mit Pymol modelliertes Dimer aus zwei KH3-Domänen (nach Backe *et al.*, 2005). Bei hnRNP K

befindet sich die zu methylierende Sequenz C-terminal hinter der KH2- und N-terminal vor der KH3-Domäne. Würden die KH-Domänen ein Dimer bilden, so entstünde auch hierbei eine "Substrat-Schleufe". Jedoch wäre diese aufgrund der Nähe des C-Terminus des einen und des N-Terminus des anderen Dimerpartners (ca. 13 Å) flexibler als bei der CKC-Chimäre.

Dies könnte eine Erklärung dafür sein, dass hnRNP K ein besseres Substrat für PRMT1 und 6 ist als eine CKC-Chimäre. Bei der CKSC-Chimäre wäre die "Substrat-Schleufe" kürzer. Damit wäre sie noch gespannter, was erklären würde, warum CKSC für PRMT1 und 6 ein noch schlechteres Substrat ist als CKLC. Die hier entwickelte Modellvorstellung erklärt jedoch nicht, warum CPC für PRMT6 noch ein vergleichsweise gutes Substrat ist. PRMT3 hingegen bevorzugt die CKC-Chimären gegenüber hnRNP K. Dies könnte entweder etwas mit der anders geformten Substratbindetasche zu tun haben. Andererseits könnte der N-Terminus (in der Kristallstruktur Abb. 32 nicht dargestellt) die Substratbindetasche verformen, oder ihr vorgelagert sein und damit die Zugänglichkeit des Enzyms behindern.

4.10 Zu den Oozyteninjektionen

Bei einigen Proteinen hat deren Methylierung einen Einfluss auf ihre Lokalisation in der Zelle (Lee *et al.*, 1996). Um zu überprüfen, ob dies auch für PABPN1 zutrifft, wurden Injektionsexperimente an *Xenopus*-Oozyten durchgeführt. In Vorversuchen zur Etablierung dieser Experimente konnte gezeigt werden, dass Oozytenextrakte PABPN1 methylieren können (s. 3.6.1.2). Diese Methylierung konnte durch Sinefungin und Adenosylhomocystein inhibiert werden (s. 3.6.1.3). Unter den verwendeten Bedingungen konnte jedoch kein Unterschied beim Import von unmethyliertem und methyliertem PABPN1 in den Zellkern festgestellt werden (s. 3.6.2).

4.10.1 Beeinflussung der Lokalisation von PABPN1 durch dessen Methylierung

Mit Hilfe von Injektionsexperimenten sollte untersucht werden, ob die Arginin-dimethylierung am C-Terminus von PABPN1 einen Einfluss auf dessen Lokalisation in der Zelle hat.

PABPN1 ist nicht ausschließlich im Kern lokalisiert (Wahle *et al.*, 1991; Krause *et al.*, 1994; Bear *et al.*, 2003; Kühn und Wahle, 2004). Dies könnte zum einen auf das *shuttling* von PABPN1 zurückzuführen sein (Calado *et al.*, 2000b). Zum anderen

methylieren die PRMTs PABPN1 verhältnismäßig langsam (s. 3.4.1), so dass neu synthetisiertes PABPN1 nicht sofort vollständig dimethyliert vorliegen kann. Deshalb wäre es denkbar, dass in einer Zelle zwei PABPN1-Populationen von unterschiedlichem Methylierungsstatus existieren, wobei beide unterschiedlich lokalisiert sein könnten. Dagegen spricht allgemein, dass PABPN1 in den Zellen vollständig methyliert zu sein scheint (Smith *et al.*, 1999).

4.10.2 Zum Import von methyliertem und unmethyliertem PABPN1

Die Versuche zum Import von methyliertem und unmethyliertem PABPN1 hätten mit mehr koinjiziertem AdoHcy wiederholt werden müssen. Dies ergeben die folgenden Überlegungen:

1. Aus den Methylierungsexperimenten mit Oozytenextrakt (s. 3.6.1.2) lässt sich errechnen, dass eine Oozyte in drei Stunden 4,7 pmol Methylgruppen in 6,4 pmol PABPN1 einbaut.
2. Über einen *Western blot* konnte abgeschätzt werden, dass bei einer *in vitro* Translation in Retikulozytenlysate ca. 8 ng/µl PABPN1 synthetisiert werden (Daten nicht gezeigt). Somit wurden ungefähr 25 fmol /100 nl in eine Oozyte injiziert.
3. Für die vollständige Dimethylierung aller 13 Arginine dieser Menge an PABPN1 wäre ein Einbau von ca. 0,65 pmol Methylgruppen nötig. Folglich könnte eine Oozyte möglicherweise schon in 24 min das injizierte PABPN1 vollständig methylieren.
4. Um dies zu verhindern, enthielten die injizierten 100 nl Probe 60 µM AdoHcy. Dieses wurde jedoch in der Oozyte (ca. 2 µl) 1 zu 20 verdünnt.
5. Die Inhibitionsversuche (s. 3.6.1.3) hatten gezeigt, dass erst 270 µM AdoHcy die Methylierungsaktivität von 1 µl Oozytenextrakt (entspricht 0,4 Oozyten) auf 16% reduzieren konnten. Folglich hätte eine Oozyte mit mindestens 14 mM AdoHcy in der Probe injiziert werden müssen.

Es wäre aber denkbar, dass eine so hohe Konzentration an Inhibitor für die Oozyten tödlich sein könnte. Geringere Konzentrationen an AdoHcy könnten wiederum durch die Adenosylhomocysteinhydrolase (s. 1.1) abgebaut und damit unschädlich gemacht werden. AdoHcy ist somit bei geringen Mengen ein ineffektiver Inhibitor. Es wäre daher interessant, noch weitere Inhibitoren zu testen, wie z.B. die in Spannhoff *et al.* (2007) beschriebenen. Allerdings wurden diese an humanem PRMT1 und HMT1 aber nicht mit *Xenopus* PRMT1 getestet.

4.10.3 Technische Schwierigkeiten bei der Durchführung der Injektionsexperimente

1. Bei den Negativkontrollen auf Eis sollte eigentlich kein Import erfolgen (persönliche Mitteilung Utz Fischer Universität Würzburg). Es waren aber trotzdem bis zu 33% des injizierten GST-PABPN1 (ca. 58 kD) in den Kernextrakten zu finden. Da die Menge mit zunehmender Inkubationszeit nicht anstieg, liegt dies vermutlich daran, dass einige Kerne bei der Injektion angestochen wurden, so dass GST-PABPN1 in sie eindringen konnte.
2. Nach zwei Stunden Inkubationszeit waren auch bis zu 21% der His-PABPN1-Mutante ohne C-Terminus und damit ohne NLS im Kernextrakt zu finden. Dies ist wahrscheinlich auf eine passive Diffusion dieses ca. 28 kD großen Proteins zurückzuführen.
3. Auch die Quantifizierung des Imports war nicht trivial, weil um die 20% des injizierten Volumens wieder aus der Einstichstelle der Oozyte austraten. Dies lag u.a. an der verwendeten älteren Apparatur. Ein nicht fest genug installierbarer Mikromanipulator vergrößerte das Injektionsloch und mit dem manuellen Injektor konnte die Probe nicht mit genug Druck und damit tief genug eingespritzt werden.
4. Der Zustand lebender Versuchsobjekte ist von vielen nicht immer bekannten und kontrollierbaren äußeren Einflüssen abhängig. Deshalb waren die Importwerte von gleichen Inkubationszeiten aber Experimenten von unterschiedlichen Tagen meistens nicht zusammenfassbar (s. Abb. 29: 2 Versuche).

Da die Injektionsexperimente in *Xenopus* Oozyten technisch schwierig durchzuführen sind, wären Experimente mit permeabilisierten HeLa-Zellen oder isolierten Oozyten-Zellkernen (Radtko *et al.*, 2001) vermutlich günstiger. Diese hätten ferner den Vorteil, dass die im Zytoplasma enthaltenen PRMTs nicht vorhanden wären und somit das nicht methylierte PABPN1 nicht methylieren könnten.

Zusammenfassung

Das nukleäre Poly(A)-Bindepotein 1 (PABPN1) wird an 13 Argininen seines C-Terminus asymmetrisch dimethyliert. Zu Beginn dieser Arbeit war bekannt, dass diese Modifikation von den Protein-Arginin-Methyltransferasen PRMT 1 und 3 katalysiert werden kann (Smith *et al.*, 1999). Durch eine Fraktionierung von Proteinextrakten aus HeLa-Zellen und Maus-ES-Zellen konnte gezeigt werden, dass auch PRMT6 an der Arginindimethylierung von PABPN1 beteiligt ist. Diese Arbeiten wurden parallel zu der vorliegenden Dissertation von Katharina Fronz (MLU Halle)

durchgeführt. Ein N-terminaler GST-*tag* kann die Enzymaktivität von PRMT1 herabsetzen (Ostareck-Lederer *et al.*, 2006). Deshalb wurden in dieser Arbeit zunächst PRMT1, 3 und 6 ohne *tag* und mit dem kleineren His-*tag* in *Escherichia coli* exprimiert und gereinigt. Mit Hilfe der rekombinanten Enzyme konnte bestätigt werden, dass diese die Arginindimethylierung von PABPN1 katalysieren können. Die spezifische Aktivität der PRMTs ohne *tag*, der His-PRMTs und der zellulären Enzyme unterschied sich nicht signifikant. Da folglich ein N-terminaler His-*tag* die Enzymaktivität nicht beeinträchtigt, wurden alle weiteren Versuche mit den His-PRMTs durchgeführt. Dafür sprach ferner, dass diese sich in genügend großer Menge reinigen ließen.

PRMTs arbeiten oft in Komplexen zusammen mit anderen Proteinen, welche ihre Substratspezifität determinieren (Friesen *et al.*, 2001). In der vorliegenden Arbeit konnte kein signifikanter Unterschied in den spezifischen Aktivitäten der rekombinanten PRMTs und der zellulären ("authentischen") Enzyme nachgewiesen werden (s. 3.3). Die zellulären Enzyme wurden zudem mit hohen Ausbeuten gereinigt (persönliche Mitteilung von Katharina Fronz). Ein Verlust von Untereinheiten, die für die Methyltransferase-Reaktion von Bedeutung sind, ist also unwahrscheinlich. All dies lässt vermuten, dass PABPN1 von PRMT1, 3 und 6 ohne Hilfe von anderen Polypeptiden als Substrat erkannt und methyliert wird.

Bei PABPN1 sind die dimethylierten Arginine in RXR-Motiven lokalisiert (Smith *et al.*, 1999). Bei heterogenen nukleären Ribonukleoprotein K (hnRNP K) befinden sie sich in RGG-Motiven. Im Gegensatz zu PABPN1 wird hnRNP K ausschließlich von PRMT1 dimethyliert (Ostareck-Lederer *et al.*, 2006). In dieser Arbeit konnte jedoch gezeigt werden, dass ein Peptid mit RGG-Motiven (Najbauer *et al.*, 1993) ein unerwartet gutes Substrat für PRMT3 ist.

Beim Methylierungstest der Enzyme mit PABPN1 als Substrat war keine lineare Abhängigkeit der Aktivität von der Enzymmenge gegeben. Deshalb wurde für die Reinigung der rekombinanten PRMTs ein Methylierungstest entwickelt, bei welchem das oben genannte RGG-Peptid als Substrat diente.

Um mehr über die Substratspezifität der PRMTs herauszufinden, wurde die Methylierung von weiteren Peptiden und von Proteinchimären untersucht. Bei den Chimären wurden die methylierbaren Sequenzen von PABPN1 (abgekürzt P) und hnRNP K (abgekürzt K) gegeneinander ausgetauscht. Bei anderen Chimären wurden sie C-terminal mit dem Kälteschockprotein von *Bacillus subtilis* (CspB, kurz C)

fusioniert. Dieses diene als inerte Träger, da es unter natürlichen Bedingungen nicht methyliert wird. Für jedes Enzym existiert mindestens ein Peptid, welches ähnlich effizient methyliert wird wie das beste Proteinsubstrat. Dies spricht dafür, dass die lokale Aminosäuresequenz bei der Substratspezifität der Enzyme die wichtigste Rolle spielt. Für PRMT3 und PRMT6 sind die PK-Chimären und mindestens ein Peptid viel bessere Substrate als hnRNP K selbst. Dies legt die Vermutung nahe, dass beide Enzyme durch die benachbarten, gefalteten Domänen von hnRNP K bei der Methylierung behindert werden.

Zu Beginn dieser Arbeit war bekannt, dass PRMTs ringförmige Dimere bilden, wobei sich die aktiven Zentren auf den Innenseiten des Ringes befinden (Zhang und Cheng, 2003; Zhang, Zhou und Cheng, 2000). Die "Hantelhypothese" dieser Arbeit besagte, dass die zu methylierende Sequenz für die Enzym-Dimere unzugänglicher sein sollte, wenn sie sich zwischen zwei gefalteten Domänen des Substratproteins befindet. Solche "Hantelproteine" sollten daher schlechtere Substrate sein. Um diese Hypothese zu untersuchen, wurden Chimären hergestellt, welche N- und C-terminal von der zu methylierenden Sequenz ein CspB-Protein aufwiesen. Die Vermutung, dass PRMT1 diese "Hantelproteine" besser methylieren kann als PRMT3 und 6, ließ sich nicht bestätigen. Alle Enzyme zeigen einen schwachen "Hanteleffekt" bei der Methylierung von CP und CPC (PRMT1 Faktor 7, PRMT3 Faktor 13, PRMT6 Faktor 6). Die Daten der hnRNP K-Chimären (CKL, CKS, CKLC und CKSC) sind nicht interpretierbar. Diese Proteine neigten bei der Reinigung zur Aggregation und konnten deshalb z.T. nicht in genügender Menge hergestellt werden, um die Substratkonzentration weit über dem K_m zu titrieren. Ferner lag der Einbau an radioaktiven Methylgruppen in die CspB-Hanteln durch PRMT3 und 6 oft nahe der Detektionsgrenze von 0,3 pmol. Auch waren die Daten teilweise widersprüchlich.

Da mit der "Hantelhypothese" der Unterschied in der Substratspezifität der PRMTs nicht erklärt werden konnte, wurden anhand von Proteinmodellierungen der Substrate und der Enzyme weitere Faktoren diskutiert, welche für die unterschiedliche Substratspezifität von PRMT1 und 3 wichtig sein könnten. Zwischen der KH2- und der KH3-Domäne von hnRNP K liegen neben den methylierbaren auch einige nicht methylierte Argininreste. Die Letzteren befinden sich oft in unmittelbarer Nachbarschaft von Aspartat. Da die aktiven Zentren der Enzyme ebenfalls viele saure Aminosäuren enthalten, könnte es sein, dass es zu einer Abstoßung der Aspartate kommt. Dies würde erklären, warum die betreffenden Arginine von PRMT1

nicht methyliert werden. Ähnliches gilt für Arginine im glutamatreichen N-Terminus von PABPN1. Ferner konnte gezeigt werden, dass die Ringöffnungen der Enzymdimere bei PRMT1 und 3 unterschiedlich in Form und Größe sind. Gefaltete Domänen passen bei beiden Enzymen nicht hinein. Ein weiterer Unterschied zwischen PRMT1 und 3 ist, dass bei PRMT1 eine eventuelle zweite α -Heix α X nicht mit kristallisiert werden konnte (Zhang und Cheng 2003). Der N-Terminus scheint somit flexibler zu sein als bei PRMT3. Auch wurde PRMT3 ohne seinen großen N-Terminus kristallisiert. Damit ist nicht auszuschließen, dass dieser die Zugänglichkeit der Substratbindetasche beeinträchtigt. Er könnte aber auch Konformationsänderungen daran hervorrufen, welche die Substratspezifität von PRMT3 beeinflussen könnten. Sowohl die KH-Domänen von hnRNP K als auch das CspB-Protein bilden in Kristallstrukturen Dimere (Schindelin *et al.*, 1993; Backe *et al.*, 2005). CspB verhält sich auch in Gelfiltrationen wie ein Dimer. Bei den KH-Domänen von hnRNP K ist eine Dimerisierung in Lösung nicht auszuschließen. Zwischen den Dimerpartnern befindliche ungefaltete Sequenzen könnten daher eine Schlaufe bilden ("Schlaufenhypothese"). Bei den Hantelchimären wäre die "Substrat-Schlaufe" über ein CspB-Protein gespannt, bei hnRNPK wäre sie hingegen freier beweglich. Dies könnte erklären, warum die Hantelfusionen zumindest für PRMT1 und 6 schlechtere Substrate sind als hnRNP K. Da die Schlaufe bei CKSC kürzer ist, würde dies erklären, warum diese Chimäre für PRMT1 und 6 ein schlechteres Substrat ist als die CKLC-Chimäre. Die "Schlaufenhypothese" erklärt aber nicht, warum die CPC-Fusion ein besseres Substrat ist als CKSC.

Bei einigen Proteinen hat deren Methylierung einen Einfluss auf ihre Lokalisation in der Zelle (Lee *et al.*, 1996). Um zu überprüfen, ob dies auch für PABPN1 zutrifft, wurden Injektionsexperimente an *Xenopus*-Oozyten durchgeführt. In Vorversuchen zur Etablierung dieser Experimente konnte gezeigt werden, dass Oozytenextrakte PABPN1 methylieren können. Diese Methylierung konnte durch Sinefungin und Adenosylhomocystein inhibiert werden. Unter den verwendeten Bedingungen konnte jedoch kein Unterschied beim Import von unmethyliertem und methyliertem PABPN1 in den Zellkern festgestellt werden. Dies könnte an einer relativ schnellen Methylierung von PABPN1 nach der Injektion liegen, die durch den koinjizierten Inhibitor AdoHcy nur unvollständig gehemmt wird.

Literaturverzeichnis

- Abramovich et al. (1997):** A protein-arginine methyltransferase binds to the intracytoplasmic domain of the IFNAR1 chain in the type I interferon receptor, *The EMBO Journal*, Vol. 15 No. 16(2):260-266
- Baber et al. (1999):** High precision solution structure of the C-terminal KH domain of heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K, a c-myc transcription factor, *J. Mol. Biol.*, Vol. 289:949-962
- Bachand und Silver (2004):** PRMT3 is a ribosomal protein methyltransferase that affects the cellular levels of ribosomal subunits, *The EMBO Journal*, Vol. 23: 2641-2650
- Backe et al. (2005):** X-Ray Crystallographic and NMR Studies of the Third KH Domain of hnRNP K in Complex with Single-Stranded Nucleic Acids, *Structure*, Vol. 13: 1055-1067
- Batut et al. (2005):** The Ca²⁺-induced methyltransferase XPRMT1b controls neural fate in amphibian embryo, *PNAS*, Vol.102, No. 42:15128-15133
- Bear et al. (2003):** Nuclear poly(A)-binding protein PABPN1 is associated with RNA polymerase II during transcription and accompanies the released transcript to the nuclear pore, *Experimental Cell Research*, Vol. 286: 332-344
- Bedford und Richard (2005):** Arginine Methylation: An Emerging Regulator of Protein Function, *Molecular Cell*, Vol.18: 263-272
- Bienroth et al. (1993):** Assembly of a processive messenger RNA polyadenylation complex, *The EMBO Journal*, Vol. 12: 585-594
- Boisvert et al. (2005):** Arginine methylation of MRE11 by PRMT1 is required of DNA damage checkpoint control, *Genes & Development*, Vol. 19: 671-676
- Boulanger et al. (2005):** Methylation of Tat by PRMT6 Regulates Human Immunodeficiency Virus Type 1 Gene Expression, *Journal of Virology*, Vol. 79, No. 1: 124-131
- Bouvet et al. (1998):** Nucleolin Interacts with Several Ribosomal Proteins through Its RGG Domain, *The Journal Of Biological Chemistry*, Vol. 273, Issue 30: 19025-19029
- Brachand et al. (2007):** Minireview: Protein Arginine Methyltransferases: from Unicellular Eukaryotes to Humans, *Eukaryotic Cell*, Vol. 6, No. 6:889-898
- Brais et al. (1998):** Short GCG expansions in the PABP2 gene cause

- oculopharyngeal muscular dystrophy, *Nat. Genet.*, Vol. 18, No. 2: 164-167
- Brais et al. (2003):** Oculopharyngeal muscular dystrophy: a late-onset polyalanine disease, *Cytogenet. Genom Res.*, Vol. 100, No. 1-4: 252-260
- Burd und Dreyfuss (1994):** Conserved structures and diversity of functions of RNA-binding proteins, *Science*, Vol. 265: 615-621
- Calado et al. (2000):** Nuclear inclusions in oculopharyngeal muscular dystrophy consist of poly(A) binding protein 2 aggregates which sequester poly(A) RNA, *Human Molecular Genetics*, Vol. 9, No. 15: 2321-2328
- Calado et al. (2000b):** Deciphering the cellular pathway for the transport of the poly(A)-binding protein II, *RNA*, Vol. 6: 245-256
- Chang, et al. (2007):** JMJD6 Is a Histone Arginine Demethylase, *Science*, Vol. 318: 444-447
- Chen et al. (1999):** Regulation of transcription by a protein methyltransferase, *Science*, Vol. 284, No. 5423: 2174-2177
- Cheng et al. (2004):** Small Molecule Regulators of Protein Arginine Methyltransferases, *The Journal Of Biological Chemistry*, Vol 279, No. 23: 23892-23899
- Cornel Mülhardt (2002):** Der Experimentator, Molekularbiologie/Genomics, 3. Auflage, Spektrum Verlag, Heidelberg
- Cosson et al. (2002b):** Characterization of the poly(A) binding proteins expressed during oogenesis and early development of *Xenopus laevis*, *Molecular and Cellular Biology*, Vol. 20, No. 23: 8996-9008
- Cosson et al. (2004):** Identification of a novel *Xenopus laevis* poly(A) binding protein, *Biol. Cell*, Vol. 96, No. 7:519-527
- Côté et al. (2003):** Sam68 RNA Binding Protein Is an In Vivo Substrate for Protein Arginine N-Methyltransferase 1, *Mol. Biol. Cell*, Vol. 14: 274-287
- Cuthbert et al. (2004):** Histone deimination antagonizes arginine methylation, *Cell*, Vol. 118: 545-553
- Duerre (1962):** A hydrolytic nucleosidase acts on S-adenosylhomocysteine and on 5'-methylthioadenosine, *The Journal Of Biological Chemistry*, Vol. 237: 3737-3741
- Deo et al. (1999):** Recognition of polyadenylate RNA by the poly(A)-binding protein, *Cell*, Vol. 98: 835-845
- Dreyfuss et al. (1993):** hnRNP proteins and the biogenesis of mRNA,

- Annu. Rev. Biochem.*, Vol. 62: 289-321
- Evans et al. (2003):** Members of the poly (rC) binding protein family stimulate the activity of the c-myc internal ribosome entry segment *in vitro* and *in vivo*
Oncogene, Vol. 22: 8012-8020
- Fackelmayer (2005):** Protein arginine methyltransferases guardians of Arg?,
Trends in Biochemical Sciences, Vol.30, No. 12: 666-671
- Fink (2005):** Natively unfolded proteins, *Current Opinion un Structural Biology*,
Vol. 15: 35-41
- Frankel und Clarke (2000):** PRMT3 Is a Distinct Member of the Protein Arginine N-Methyltransferase Family, *The Journal of Biological Chemistry*, Vol. 275,
No. 42: 32974-32982
- Frankel et al. (2002):** The Novel Human Protein Arginine N-Methyltransferase PRMT6 Is a Nuclear Enzyme Displaying Unique Substrate Specificity, *The Journal of Biological Chemistry*, Vol. 277, No. 5: 3537-3543
- Friesen, et al. (2001):** The Methylosome, a 20S Complex Containing JBP1 and pICln, Produces Dimethylarginine-Modified SM Proteins, *Molecular and Cellular Biology*, Vol. 21, No. 24: 8289-8300
- Fronz et al. (2008):** Promiscuos Modification of the Nuclear Poly(A)-binding Protein by Multiple Protein-arginine Methyltransferases Does Not Affect the Aggregation Behaviour, *The Journal of Biological Chemistry*, Vol. 283, No. 29: 20408-20420
- Gaillard, Cabannes und Strauss (1994):** Identity of the RNA-binding protein K of hnRNP particles with protein H16, a sequence-specific single strand DNA-binding protein, *Nucleic Acids Research*, Vol. 22, No. 20: 4183-4186
- Gary et al. (1996):** The predominant protein-arginine methyltransferase from *Saccharomyces cerevisiae*, *The Journal of Biological Chemistry*, Vol. 271,
Issue 21: 12585-12594
- Gary und Clarke (1998):** RNA and protein interactions modulated by protein arginine methylation, *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.*, Vol. 61: 65-131
- Good et al. (2004):** *Xenopus* embryonic poly(A) binding proteins expressed during the early stages of vertebrate development, *Genesis*, Vol. 38, No. 4: 166-175
- Gomori et al. (1955):** Preparation of buffers for use in enzymatic studies,
Methods in Enzymology, Vol. 1: 138-146, Colowick and Kaplan (Ed.),
Academic Press, New York

- Gorbunoff (1985):** Protein Chromatography on Hydroxyapatite Columns
Methodes in Enzymology, Vol. 182, No. 117: 370-380
- Graumann et al. (1996):** Cold shock stress-induced proteins in *Bacillus subtilis*,
J. Bacteriol, Vol. 178, No. 15, 4611-4619
- Gros et al. (2003):** Identification of new drug sensitivity genes using genetic
suppressor elements: protein arginine N-methyltransferase mediates cell
sensitivity to DNA-damaging agents, *Cancer Research*, Vol. 63: 164-171
- Guccione et al. (2007):** Methylation of histone H3R2 by PRMT6 and H3K4 by an
MLL complex are mutually exclusive, *Nature*, Vol. 449: 933-937
- Habelhah et al. (2001):** ERK phosphorylation drives cytoplasmic acculation of
hnRNP-K and inhibition of mRNA translation, *Nature Cell Biology*, Vol. 3:
325-330
- Herrmann et al. (2005):** Dynamics Of Human Protein Arginine Methyltransferase
1 (PRMT1) *In Vivo*, *The Journal of Biological Chemistry*, Vol. 280, No.45:
38005-38010
- Herrmann et al. (2008):** Human protein arginine methyltransferases *in vivo* -
distinct properties of eight canonical members of the PRMT family, *Journal of
Cell Science*, Vol. 122: 667-677
- Huang und Zhou (2006):** Similarity and Difference in the Unfolding of Thermophilic
and Mesophilic Cold Shock Proteins Studied by Molecular Dynamics
Simulations, *Biophysical Journal*, Vol. 91, Issue 7:2451-2463
- Hubert Rehm (2002):** Der Experimentator, Proteinbiochemie/Proteomics,
4. Auflage Spektrum Verlag, Heidelberg
- Jenuwein und Allis (2001):** Translation the Histone Code, *Epigenetics*, Vol.
29: 31074-31097
- Johnston et al. (2006):** Specificity of DNA Binding and Dimerization by CspE from
Escherichia coli, *The Journal Of Biological Chemistry*, Vol. 281, No. 52:
40208-40215
- Katsanis, Yaspo und Fisher (1997):** Identification and mapping of a novel human
gene, HRMT1L1, homologous to the rat protein arginine N-methyltransferase1
(PRMT1) gene, *Mammalian Genome*, Vol. 8: 526-529
- Keminer und Peters (1999):** Permeability of Single Nuclear Pores, *Biophysical
Journal*, Vol. 77, Issue 1: 217-228
- Kenan et al. (1991):** RNA recognition: towards identifying determinants of

- specificity, *Trends Biochem. Science*, Vol. 16, No. 6: 214-220
- Kerwitz et al. (2003):** Stimulation of poly(A) polymerase through a direct interaction with the nuclear poly(A) binding protein allosterically regulated by RNA, *The EMBO Journal*, Vol. 22, No. 14: 3705-3714
- Kiledjian und Dreyfuss (1992):** Primary structure and binding activity of the hnRNP U protein: binding RNA through RGG box, *The EMBO Journal*, Vol. 11, No. 7: 2655-2664
- Kim et al. (2001):** Poly(A) binding protein II in *Xenopus laevis* is expressed in developing brain and pancreas, *Mech. Dev.*, Vol. 109, No. 1: 111-114
- Krause et al. (1994):** Immunodetection of poly(A) binding protein II in the cell nucleus, *Experimental Cell Research*, Vol. 214, No. 1:75-82
- Krecic und Swanson (1999):** hnRNP complexes: composition, structure, and function, *Current Opinions Cell. Biol.*, Vol. 11, No. 3: 363-371
- Kredich und Hersfeld (1979):** S-Adenosylhomocysteine toxicity in normal and adenosine kinase-deficient lymphoblasts of human origin, *Proc. Natl., Acad. Sci. USA*, Vol. 76, No. 5: 2450-2454
- Krieger, Möglich und Kiefhaber (2005):** Effect of Proline and Glycine Residues on Dynamics and Barriers of Loop Formation in Polypeptide Chains, *Journal of the American Chemical Society*, Vol. 127, No. 10: 3346-3352
- Kühn et al. (2003):** The RNA Binding Domains of the Nuclear poly(A)-binding Protein, *The Journal Of Biological Chemistry*, Vol. 278, No. 19: 16916-16925
- Kühn und Wahle (2004):** Structure and function of poly(A) binding proteins, *Biochem Biophys Acta.*, Vol. 1678, No. 2-3: 64-84
- Laemmli (1970):** Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4, *Nature*, Vol. 227: 680-685
- Lakowski und Frankel (2009):** Kinetic Analysis of Human Protein Arginine N-Methyltransferase 2: Formation of Monomethyl- and Asymmetric Dimethylarginine Residues on Histone H4, *Biochemical Journal Immediate Publication*, Published on 30 Apr 2009 as manuscript BJ20090268
- Lee et al. (1996):** A protein that shuttles between the nucleus and the cytoplasm is an important mediator of RNA export, *Genes and Development*, Vol. 10: 1233-1246
- Lee et al. (2001):** Structure of *E. coli* 5'-methylthioadenosine/S-adenosylhomocystein Nucleosidase Reveals Similarity to the Purine

- Nucleoside Phosphorylases, *Structure*, Vol. 9, No. 10: 941-953.
- Lee et al. (2005):** PRMT8, a New Membranebound Tissue-specific Member of the Protein Arginine Methyltransferase Family, *The Journal Of Biological Chemistry*, Vol. 280, No. 38: 32890-3296
- Lee und Loh (1977):** Phosphorylation and methylation of chromatin proteins from mouse brain nuclei, *Journal of Neurochemistry*, Vol. 29: 547-550
- Leno und Laskey (1991):** *Methods in Cell Biology*. In *Xenopus laevis: Practical Uses in Cellular and Molecular Biology*, eds Kay , Peng (Academic Press, San Diego, California), Vol. 36: 561-579
- Lewis et al. (1999):** Crystal structures of Nova-1 and Nova-2 K-homology RNA-binding domains, *Structure*, Vol. 7: 191-203
- Lin et al. (1996):** The Mammalian Immediat-early TIS21 Protein and the Leukemia-associated BTG1 Protein Interact with a Protein-arginine N-Methyltransferase, *The Journal of Biological Chemistry*, Vol. 271, No. 25: 15034-15044
- Lodderstedt et al. (2008):** Hofmeister Salts and Potential Therapeutic Compounds Accelerate in Vitro Fibril Formation of the N-Terminal Domain of PABPN1 Containing a Disease-Causing Alanine Extension, *Biochemistry*, Vol. 47:2181-2189
- Mangus, Evans und Jacobson (2003):** Poly(A)-binding proteins: multifunctional scaffolds for the posttranscriptional control of gene expression, *Genome Biology*, Vol. 4, Issue 7, Article 223
- Mathioudaki et al: (2004):** Cloning and Characterization of a new splice variant (V4) of the PRMT1 gene, Submitted (Oct. 2004) to the EMBL/Gene Bank/DDBJ databases
- Matunis et al. (1992):** Characterization and primary structure of the poly(C)-binding heterogenous nuclear ribonucleoprotein complex K protein, *Molecular Cell. Biology*, Vol. 12, No. 1: 164-171
- McBride und Silver (2001):** State of the Arg: Protein methylation at arginine comes of age, *Cell*, Vol.106:5-8
- McBride et al. (2005):** Arginine Methylation of Yeast mRNA-binding Protein Npl3 Directly Affects Its Function, Nuclear Export and Intracellular Protein Interactions, *The Journal Of Biological Chemistry*, Vol. 280: 30888-30898
- Meyer et al. (2002):** Equilibrium studies on the assoziation of the nuclear poly(A)

- binding protein with poly(A) of different lengths, *Biochemistry*, Vol. 41, No. 19: 6082-6089
- Michael et al. (1997):** The K nuclear shuttling domain: A novel signal for nuclear import and nuclear export in the hnRNP K protein, *The EMBO Journal*, Vol. 16: 3587-359
- Miranda et al. (2004):** PRMT7 is a member of the protein arginine methyltransferase family with a distinct substrate specificity, *Journal of Biol. Chem.*, Vol.279, No. 22: 22902-22907
- Miranda et al. (2005):** Protein arginine methyltransferase 6 specifically methylates the nonhistone chromatin protein HMGA1a, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, Vol. 336: 831-835
- Miranda et al. (2006):** Yeast Hsl7 (histone synthetic lethal 7) catalyses the *in vitro* formation of w-NG-monomethylarginine in calf thymus histone H2A, *Biochem. Journal*, Vol. 395: 563-570
- Najbauer et al. (1993):** Peptides with Sequences Similar to Glycine, Arginine-rich Motifs in Proteins Interacting with RNA Are Efficiently Recognized by Methyltransferase(s) Modifying Arginine in Numerous Proteins, *The Journal Of Biological Chemistry*, Vol. 268, No. 14: 10501-10509
- Narmann et al., (2008):** mRNA silencing in Human Erythroid Cell Maturation, *The Journal of Biological Chemistry*, Vol. 283, Issue 26: 18461-18472
- Nemeth et al. (1995):** Isolation of genomic and cDNA clones encoding bovine poly(A) binding protein II, *Nucleic Acids Res.*, Vol. 23, No 20: 4034-4041
- Nesterenko et al. (1994):** A simple modification of Blum's silver stain method allows for 30 minute detection of proteins in polyacrylamide gels, *J. Biochem. Biophys. Meth.*, Vol. 28: 239-242
- Niewmierzycka und Clarke (1999):** S-Adenosylmethionine-dependent Methylation in *Saccharomyces cerevisiae*, Identification of a novel Protein Arginine Methyltransferase, *The Journal of Biological Chemistry*, Vol. 274, No. 2: 814-824
- Osborne et al. (2007):** Protein Arginine Methyltransferase 1: Positively Charged Residues in Substrate Peptides Distal to the site of Methylation Are Important for Substrate Binding and Catalysis *Biochemistry*, Vol. 46, No. 46: 13370-13381
- Ostareck et al. (1997):** mRNA silencing in erythroid differentiation: hnRNP K and

- hnRNP E1 regulate 15-lipoxygenase translation from the 3' end, *Cell*, Vol. 89:597-606
- Ostareck *et al.* (2001):** Lipoxygenase mRNA Silencing in erythroid differentiation: The 3'UTR regulatory complex controls 60S ribosomal subunit joining, *Cell*, Vol. 104:281-290
- Ostareck-Lederer *et al.* (2002):** c-Src-mediated phosphorylation of hnRNP K drives translational activation of specifically silenced mRNAs, *Molecular Cell. Biology*, Vol. 22:4535-4543
- Ostareck-Lederer *et al.* (2004):** Control of mRNA translation and stability in haematopoietic cells: the function of hNRNPs K and E1/E2, *Biol. Cell*, Vol. 96:407-411
- Ostareck-Lederer *et al.* (2006):** Asymmetric Arginine Dimethylation Of Heterogenous Nuclear Ribonucleoprotein By Protein Arginine Methyltransferase 1 Inhibits Its Interaction with C-Src, *The Journal Of Biological Chemistry*, Vol. 281, Iss. 16: 11115-11125
- Oubridge *et al.* (1994):** Crystal structure at 1.92 Å resolution of the RNA-binding domain of the U1A spliceosomal protein complexed with an RNA hairpin, *Nature*, Vol. 372: 432-438
- Paik and Kim (1967):** Enzymatic methylation of protein fractions from calf thymus nuclei, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, Vol. 29: 14-20
- Pawlak *et al.* (2000):** Arginine N-methyltransferase 1 is required for early postimplantation mouse development, but cells deficient in the enzyme are viable, *Molecular Cell Biol.*, Vol. 20, No. 13: 4859-4869
- Pawlak *et al.* (2002):** Protein Arginine Methyltransferase I: Substrate Specificity and Role in hnRNP Assembly, *The Journal Of Cellular Biochemistry*, Vol. 87: 394-407
- Perreault *et al.* (2007):** Regulation Of The Nuclear Poly(A) Binding Protein By Arginine Methylation In Fission Yeast, *The Journal of Biological Chemistry*, Vol. 282, No. 10: 7552-7562
- Pintucci, Quarto und Rifkin (1996):** Methylation of high molecular weight fibroblast growth factor-2 determines post-translational increases in molecular weight and affects its intracellular distribution, *Molecular Biology of the Cell*, Vol. 7, Issue 8: 1249-1258
- Ramos *et al.* (2002):** Role of Dimerization in KH/RNA Complexes: The Example of

- Nova KH3, *Biochemistry*, Vol. 41, No. 13: 4193-4201
- Romero *et al.* (2001):** Sequence complexity of disordered protein, *Proteins*, Vol. 42: 38-48
- Radtke *et al.* (2001):** Kinetics of protein import into isolated *Xenopus* oocyte nuclei, *PNAS*, Vol. 98, No. 5: 2407-2412
- Rüegsegger, Beyer und Keller, (1996):** Purification and characterization of human cleavage factor I involved in the 3' end processing of messenger RNA precursors, *The Journal Of Biological Chemistry*, Vol. 271: 6107-6113
- Sackewitz *et al.* (2008):** A folded and functional protein domain in an amyloid-like fibril, *Protein Science*, Vol. 17: 1044-1054
- Sambrook, Fritsch und Maniatis (1989):** Molecular Cloning, A laboratory manual, 3rd Ed., Cold Spring Harbour Laboratory, New York
- Schindelin, Marahiel und Heinemann, (1993):** Universal nucleic acid-binding domain revealed by crystal structure of the *B. subtilis* mayor cold-shock protein, *Nature*, Vol. 364(6433): 164-168
- Schindelin *et al.* (1994):** Crystal structure of CspA, the major cold shock protein of *Escherichia coli*, *PNAS*, Vol. 91, No. 11: 5119-5123
- Schindler und Schmid (1996):** Thermodynamic Properties of an Extremely Rapid Protein Foldig Reaction, *Biochemistry*, Vol. 35:16833-16842
- Scorilas *et al.* (2000):** Genomic Organization, Physical Mapping, and Expression Analysis of the Human Protein Arginine Methyltransferase 1 Gene, *Biochemical and Biophysical Res. Communications*, Vol. 278: 349-359
- Scott *et al.* (1998):** Identification and characterization of two putative human arginine methyltransferases (HRMT1L1 and HRMT1L2), *Genomics*, Vol. 48, No. 3: 330-340
- Sgarra *et al.* (2006):** The AT-hook of the Chromatin Architectural Transcription Factor High Mobility Group A1a Is Arginine-methylated by Protein Arginine Methyltransferase 6, *The Journal of Biological Chemistry*, Vol. 281, No. 7: 3764-3772
- Shen *et al.* (1998):** Arginine methylation facilitates the nuclear export of hnRNP proteins, *Genes and Dev.*, Vol. 12: 6779-691
- Shi *et al.* (2004):** Histone demethylation mediated by the nuclear amine oxidase homolog LSD1, *Cell*, Vol. 119: 941-953
- Shulga *et al.* (1996):** Yeast Nucleoporins Involved in Passive Nuclear

- Envelope Permeability, *The Journal of Cellbiology*, Vol. 149, No. 5:
329-339
- Siomi et al. (1993):** The pre-mRNA binding K protein contains a novel evolutionary conserved motif, *Nucleic Acids Research*, Vol. 21, No. 5:
1193-1198
- Smith et al. (1999):** Unusual Sites of Arginine Methylation in Poly(A)-binding Protein II and *in Vitro* Methylation by Protein Arginine Methyltransferases PRMT1 and PRMT3, *The Journal of Biological Chemistry*, Vol. 274, No. 19: 13229-13234
- Spannhoff et al. (2007):** A novel arginine methyltransferase inhibitor with cellular activity, *Bioorganic & Medical Chemistry Letters*, Vol. 17: 4150-4153
- Stayton und Kornberg (1983):** Complex of *Escherichia coli* primase with the replication origin of G4 phage DNA, *The Journal Of Biological Chemistry*, Vol. 258: 13205-13212
- Swiercz, Persin und Bedford (2005):** Ribosomal protein S2 is a substrate for mammalian PRMT3 (protein arginine methyltransferase 3), *Biochem. J.*, Vol. 386: 85-91
- Swiercz et al. (2007):** Ribosomal Protein rpS2 Is Hypomethylated in PRMT3-deficient Mice, *The Journal of Biological Chemistry*, Vol. 282, Issue 23: 16917-16923
- Tabor and Richardson (1985):** Expression Using the T7 RNA Polymerase / Promoter System, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, Vol. 82: 1074-1078
- Tang et al., (1998):** PRMT3, a type I protein arginine N-methyltransferase that differs from PRMT1 in its oligomerization, subcellular localization, substrate specificity, and regulation, *The Journal of Biological Chemistry*, Vol. 273: 16935-16945
- Tavanez et al. (2005):** *In vivo* aggregation properties of the nuclear poly(A)-binding protein PABPN1, *RNA*, Vol. 11, No. 5:752-762
- Troffer-Charlier et al. (2007):** Functional insights from structures of coactivator-associated arginine methyltransferase 1 domains, *The EMBO Journal*, Vol. 26: 4391-4401
- Uversky, Gillespie und Fink (2000):** Why are "natively unfolded" proteins unstructured under physiologic conditions?, *Proteins*, Vol. 41: 415-427
- Valverde et al. (2008):** Structure and function of KH domains, *FEBS Journal*,

Vol. 275: 2712-2726

- Verheesen et al. (2006):** Prevention of oculopharyngeal muscular dystrophy-associated aggregation of nuclear poly(A)-binding protein with a single-domain intracellular antibody, *Human Molecular Genetics*, Vol. 15, No. 1: 105-111
- Voeltz et al. (2001):** A novel embryonic poly(A) binding protein, ePAB, regulates mRNA deadenylation in *Xenopus* egg extracts, *Genes Dev.*, Vol. 15: 774-788
- Wahle et al. (1991):** A novel poly(A)-binding protein acts as a specificity factor in the second phase of messenger RNA polyadenylation, *Cell*, Vol. 66: 759-768
- Wahle et al. (1993):** Mammalian poly(A)-binding protein II. Physical properties and binding to polynucleotides, *The Journal of Biological Chemistry*, Vol. 268, No. 4: 2937-2945
- Wahle et al. (1995):** Poly(A) Tail Length Control Is Caused by Termination of Processive Synthesis *The Journal of Biological Chemistry*, Vol. 270: 2800-2808
- Walker und Duerre (1975):** S-Adenosylhomocysteine metabolism in various species, *Canadian Journal of Biochemistry*, Vol. 53, No. 3: 312-319
- Weiss et al. (2000):** The structure and oligomerization of the yeast arginine methyltransferase Hmt1, *Nature structural biology*, Vol. 7, No. 12: 1165-1171
- Yamanaka et al. (2001):** CspD, a novel DNA replication inhibitor induced during the stationary phase in *Escherichia coli*, *Molecular Microbiology*, Vol. 39, No. 6: 1572-1584
- Yoshimoto et al. (2006):** The arginine methyltransferase PRMT2 binds RB and regulates E2F function, *Experimental Cell Research*, Vol. 312, No. 11: 2040-2953
- Yu et al. (2004):** Arginine methyltransferase affects interactions and recruitment of mRNA processing export factors, *Genes & Development*, Vol. 18: 2024-2035
- Yu et al. (2006):** The role of protein arginine methylation in the formation of silent chromatin, *Genes & Development*, Vol. 20: 3249-3254
- Yue et al. (2007):** Insights into histone code syntax from structural and biochemical studies of CARM1 methyltransferase, *The EMBO Journal*, Vol. 26: 4402-4412
- Zeeb und Balbach (2003):** Single-stranded DNA binding of the cold-shock protein CspB from *Bacillus subtilis*: NMR mapping and mutational

characterization, *Protein Science*, Vol. 12: 112-123

Zhang und Cheng (2003): Structure of the Predominant Protein Arginine Methyltransferase PRMT1 and Analysis of Its Binding to Substrate Peptides, *Structure*, Vol. 11: 509-520

Zhang, Zhou, Cheng (2000): Crystal structure of the conserved core of protein arginine methyltransferase PRMT3, *The EMBO Journal*, Vol. 19, No 14: 3509-3519

Zhou und Dong (2003): Electrostatic Contributions to the Stability of a Thermophilic Cold Shock Protein, *Biophysical Journal*, Vol. 84, No. 7: 2216-2222

Anhang

Vektoren-Liste

pET11a (Alle pET-Vektoren stammen von der Firma Novagen)
pET16b
pET19b
pET28a
pET28b
pUK aus pET19b erzeugt (Uwe Kühn, Dept. Allg. Biochem., MLU Halle)
pGM10 aus pET3d synthetisiert (Georges Martin, Dept. of Cell Biology, University of Basel)
pT7-7 (Stan Tabor Dept. of Biol. Chem. Harvard Medical School, Boston Nov. 1987)
pGEX6P-1 (Amersham Biosciences)

Primer-Liste 5´ zu 3´ (nur die benutzten Primer, von Invitrogen Custom Services)

PRMTs

1. HRMT1L2-V2: für humanes PRMT1 *splice*-Variante 2
catg cca tgg aa atg gag aat ttt gta gcc acc
2. HRMTL2-V1: für humanes PRMT1 *splice*-Variante 1
catg cca tgg aa atg gag gtg tcc tgt ggc
3. HRMT1L2-allgrück:
cgc gga tcc tca gcg cat ccg gta gtc
4. hPRMT1V1mitte: Zum Durchsequenzieren
ggt gac cat cat caa ggg
5. prmt1hB: für rPRMT1 ohne *tag* in pT7-7 mit NdeI und BamHI, Konstrukt wurde nicht benutzt
ggg aat tcc ata tgg cgg cag ccg agg cc

6. prmt1rB: Für His-rPRMT1 ohne *tag*
cgc gga tcc tca gcg cat ccg gta gtc ggt gga ac
7. prmt1h300: Zum Durchsequenzieren rPRMT1 in PT7-7
ctc cag tat ctc tga tta tg
8. prmt1h600:
gta tat ggc ttt gat atg tc
9. prmt1h900:
gag gac tac cta aca gtg
10. prmt1raus:
gtc ttt gga tgt cat gtc c
11. PRMT3hin: für humanes PRMT3 ohne *tag* mit NcoI, Konstrukt hPRMT3
mit Mutation
catg cca tgg aa atg gac gag cca gaa ctg tcg gac
12. PRMT3rück: mit BamHI
cgc gga tcc tca ctg gag acc ata agt
13. MuthPRMT3hin: für die Beseitigung der Mutation in hPRMT3 (1471. bp)
gtt cac aag aat aag a**A**a gat cca cgt tct ctc acc g
14. MuthPRMT3rück:
caa gtg ttc tta ttc t**T**t cta ggt gca aga gag tgg c
15. prmt3h300: zum Durchsequenzieren von hRPMT3 ohne *tag*
gat ttt gaa gcc agt att ag
16. prmt3h600:
gtt tat ttc agc tca tac gg
17. prmt3h900:
gta gat gtt atc ata tct ga
18. hPRMT6NdelohneTag: Für humanes PRMT6 ohne *tag*
ggg aat tcc ata tgt tcg cag ccc aag
19. hPRMT6rück: mit BamHI
cgc gga tcc tca gtc ctc cat ggc
20. hPRMT6360mitte: Zum Durchsequenzieren
gag gtg gtg cgg ttc aac
21. hPRMT6720mitte:
cgg aga tcg ttg tgc agg

Chimären

22. MutK1SacIIhin: **für KLP bzw. KSP**
cct gga gac gct tac ccg cgg gac ggc atg gtt ggt
23. MutK1SacIIruck:
acc aac cat gcc gtc ccg cgg gta acg gtc tcc agg
24. MutK2SacIIhin:
gct cgg aat ctt cct ccg cgg ctt cct cca cca cca
25. MutK2SacIIruck:
tgg tgg tgg agg aag ccg cgg agg aag att ccg agc
26. MutK1KpnIhin:
ggg ggt ttt aca atg ggt acc atg ttt gat gac cgt
27. MutK1KpnIruck:
acg gtc atc aaa cat ggt acc cat tgt aaa acc acc
28. MutK2KpnIhin:
cgc gga cgc cca gtg ggt acc gga ttt ccc atg cgg
29. MutK2KpnIrück:
ccg cat ggg aaa tcc ggt acc cac tgg gcg tcc gcg
30. PABPN1c-TermHin: **für PABPN1 als insert für KLP/KSP mit KpnI**
cgg ggt acc cct aaa cga acc aac aga cca ggc
31. PABPN1C49SacIIruck:
tcc ccg cgg ata gta agg gga ata cca tga tgt cgc
32. PCRK1KpnIhin: **für PKL bzw. PKS hnRNP K-Fragmente als C-Terminus**
cgg ggt acc atg ttt gat gac cgt cgc
33. PCRK1BamHIruck:
cgc gga tcc tca gta acg gtc tcc agg
34. PCRK2KpnIhin:
cgg ggt acc gga ttt ccc atg cgg
35. PCRK2BamHIruck:
cgc gga tcc tca agg aag att ccg agc
36. PCRCspBKpnI?ck: **für CspB-Chimären** CspB-PCR mit T7-promoterprimer hin
cgg ggt acc cgc ttc ttt agt aac gtt agc
37. CspBBamHIhin: für CPC bzw. CKC, 2. CspB an C-Terminus
cgc gga tcc atg tta gaa ggt aaa gta aaa tgg

38. CspBEcoRlr?ck:
ccg gaa ttc tta cgc ttc ttt agt aac gtt agc
39. SO170608B: für CKLC; CKL **Mutagenese Stopcodon entfernt**, hin
g tta gca gcc gga tcc aca gta acg gtc tcc ag
40. SO040708A: für CKLC; CKL Mutagenese Stopcodon entfernt, rück
ct gga gac cgt tac tgt gga tcc ggc tgc taa c
41. so150708H: für CKSC; CKS Mutagenese Stopcodon entfernt, hin
gtt agc agc cgg atc cac aag gaa gat tcc gag
42. so150708R: für CKSC; CKS Mutagenese Stopcodon entfernt, rück
cca tcg tcg gcc tag gtg ttc ctt cta agg ctc
43. CPBam220908Hin: für CPC; CP Mutagenese Stopcodon entfernt
g aca tca tgg tat tcc cct tac tat gga tcc aaa aaa gtg tgt att agg ag
44. CPBam220908Ruck:
ct cct cct aat aca cac ttt ttt gga tcc ata gta agg gga ata cca tga t

Abkürzungen

Proteine und deren Bestandteile

PABPN1	nukleäres Poly(A)-Bindepotein (PABII)
PRMT	Protein-Arginin-Methyltransferase
hnRNP K	heteronukleares Ribonukleoprotein K
LSD-1	Lysin spezifische Demethylase 1
JMJD6	Jumonji-Domäne enthaltende Dioxygenase 6
ADA	Adenosin Deaminase
HRMT1L1	Menschliche (humane) Argininmethyltransferase (= PRMT2)
HRMT1L2	Menschliche (humane) Argininmethyltransferase (= PRMT1)
CARM1	Coaktivator-assoziierte Argininmethyltransferase
Sm-Proteine	Bestandteile der snRNPs im Spliceosom
snRNPs	<i>small nuclear ribonucleoproteins</i>
Npl3	nukleäres Protein Lokalisation 3
HMT1	Hefe Methyltransferase 1 bzw. RMT1
BTG1	<i>B-cell translocation gene 1</i>
Tis21	<i>topoisomerase inhibitor-suppressed gene</i>
MRE11	meiotische Rekombination Protein 11
STAT1	<i>signaltransduction and transcription 1 protein</i>
Sam68	<i>Src-associated in mitosis protein of 68 kDa</i>
rpS2	ribosomales Protein S2
GFP	grün fluoreszierendes Protein
Tat	Transaktivator Protein
HIV-1 Rev	Humaner Immundefizienz-Virus (HIV) -Regulator des Virions (Rev)
HMGA1a	<i>high mobility group A1a</i> Protein
PABPs	Poly(A)-Bindepoteine
PABPC	zytoplasmatisches Poly(A)-Bindepotein
iPABP	Induzierbares Poly(A)-Bindepotein

ePAB	embryonales Poly(A)-Bindeprotein des Krallenfrosches <i>Xenopus</i>
ePABP2	embryonales Poly(A)-Bindeprotein des Krallenfrosches <i>Xenopus</i>
XePABP2	embryonales Poly(A)-Bindeprotein des Krallenfrosches <i>Xenopus</i>
p32	embryonales Poly(A)-Bindeprotein des Krallenfrosches <i>Xenopus</i>
XPABP1	cytoplasmatisches Poly(A) Bindeprotein von <i>Xenopus</i>
XPABPN1	nukleares Poly(A)-Bindeprotein von <i>Xenopus</i>
XPRMT1b	Ca ²⁺ -induziertes PRMT1 von <i>Xenopus laevis</i>
xPRMT1	Calcium-induziertes PRMT1 von <i>Xenopus laevis</i>
Pab2	Poly(A)-Bindeprotein der Hefe
U1A	spleißosomales Protein
Erk	<i>extracellular-signal regulated kinase</i>
hnRNP	heterogenes nukleares Ribonukleoprotein
HMW FGF-2	<i>high molecular weight fibroblast growth factor 2</i>
RanGTP	<i>Ras -related nuclear protein</i> mit Guanosin triphosphat
r15-Lox	15- Lipoxigenase
c-myc	cellular? <i>myelocytomatous gene</i>
c-Src	cellular sarcoma (Tyrosinkinase)
CspB	Kälteschockprotein (<i>Coldshockprotein</i>) von <i>Bacillus subtilis</i>
RB	Retinoblastoma Genprodukt
ΔC49	C-terminale Deletionsmutante von PABPN1, der die letzten 49AS fehlen AS= Aminosäure
RNP4	Ribonukleoprotein 4
RBD4	Ribosomenbindedomäne 4
HRP	<i>horseradish peroxidase</i>
PNK	Proteinkinase
BSA	Rinder (<i>Bovines</i>) Serum Albumin
CIP	<i>Calf intestine phosphatase</i>
MTase	Methyltransferase-Domäne
SH3	Src homologe Domäne
KH3	hnRNP K homologe Domäne
Myr	Myristoyl-Aktionsmotiv
RGG-boxen	Arginin Glycin- haltige Sequenz
RXR-cluster	Arginin und beliebige Aminosäure X- haltige Sequenz
NLS	nukleares Lokalisationssignal
KL	Sequenz von hnRNP K AS 241-333 (92 AS)
KS	Sequenz von hnRNP K AS 251-309 (58 AS)
IRES	interne ribosomale Eintrittsstelle

Moleküle und Chemikalien

SAM	S-Adenosylmethionin (AdoMet)
AdoHcy	Adenosylhomocystein
AMP	Adenosinmonophosphat
ATP	Adenosin triphosphat
MMA	Monomethylarginin
aDMA	asymmetrisches Dimethylarginin
sDMA	symmetrisches Dimethylarginin
GST-GAR	GlutathionS-Transferase-Fusion mit Glycin-Arginin-reicher Sequenz
DNA	Desoxyribonukleinsäure
RNA	Ribonukleinsäure
mRNA	<i>messenger RNA</i>

DMSO	Dimethylsulfoxid
dNTP	Desoxyribonukleotidtriphosphat
Tris	Trihydroxyaminomethan
HCl	Salzsäure
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
DTT	Dithiotiol
NaOH	Natronlauge
SDS	Sodiumdodecylsulfat
APS	Ammoniumpersulfat
TEMED	Tetramethylethylendiamin
NaHPO ₄	Natriumhydrogenphosphat
K ₂ HPO ₄	Di-Kaliumhydrogenphosphat
KH ₂ PO ₄	Kalium-di-Hydrogenphosphat
NaCl	Natriumchlorid (Kochsalz)
NH ₄ Cl	Ammoniumchlorid
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
CaCl ₂	Calciumchlorid
IPTG	1-Isopropyl-β-D-1-thiogalactopyranosid
KCl	Kaliumchlorid
NP40	Nonidet P40
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid (Proteaseinhibitor)
HEPES	2-(4-[2-Hydroxyethyl]-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
TN-Tween	Tris-NaCl-Tween-Lösung
TCA	Trichloressigsäure

Einheiten

kDa	Kilodalton
AS	Aminosäure
kb bzw. kBp	Kilobasenpaare
nt	Nukleotid
g	Gramm
l	Liter
m	Meter
mol	Stoffmenge $6,022 \times 10^{23}$ Moleküle
M	Molarität bzw. Stoffmengenkonzentration [mol/l]
h	Stunde
min	Minute
sec	Sekunde
t	Zeit
m	milli
μ	mikro
n	nano
p	piko
f	femto
rpm	<i>rounds per minute</i>
g	Erdgeschwindigkeitskonstante
c	Konzentration
OD	optische Dichte
V	Volt
A	Ampere
SV	Säulenvolumen

cpm	<i>counts per minute</i>
dpm	<i>decay per minute</i>
UV	Ultraviolette Strahlung
pH	positive Hydroxylionenkonzentration
kbar	kilo Bar
Å	Angström
Ci	Curie, veraltete Einheit der Aktivität eines radioaktiven Stoffes (37 GBq)
S	Sievert, Einheit der Leitfähigkeit

Puffer und Medien

TE	Puffer aus Tris und EDTA
TBE	Puffer aus Tris, Borsäure und EDTA
LB	Laura Broth-Medium
HiDi	Formamid-haltiger Puffer für die Sequenzierung
PBS	Phosphat-gepufferte (<i>buffered</i>) Saline
MBS	Modifizierte Barth's Saline

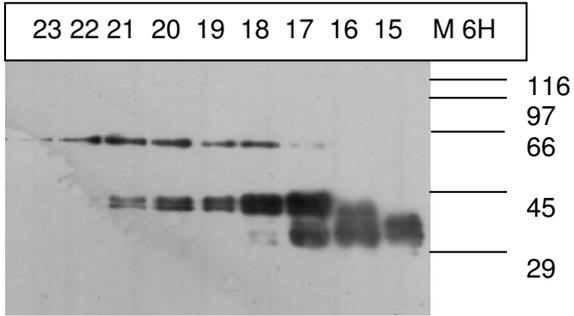
Methodisches

NHS-Ester	N-Hydroxysuccinimidyl-Ester
U	<i>unit</i> (Einheit)
NMR	<i>nuclear magnetic resonance</i>
Hela	Krebszelllinie von Henrietta Lacks
ES	embryonale Stammzellen
pUK	von Uwe Kühn (MLU Halle) konstruiertes Plasmid
PCR	Polymerasekettenreaktion
ORF	<i>open reading frame</i>
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
FPLC	<i>fast performance liquid</i> Chromatografie
Ni-NTA	Ni ²⁺ -Nitrilotriacetat
DEAE	Diethylaminoethyl als Säulenmaterial gekoppelt an Cellulose
HA	Hydroxyapartit
His	Histidin, in diesem Fall <i>His-tag</i> , mehrere Histidine hintereinander
EST	<i>expressed sequence tag</i>
ABI	Applied Biosystems
OPMD	oculopharyngeale Muskeldystrophie

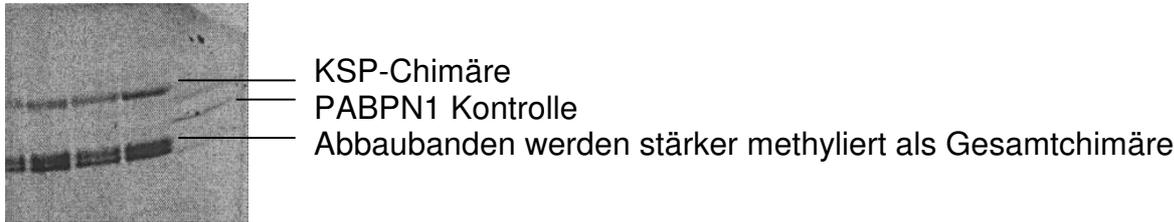
Computerprogramme

EditSeq
 Mapdraw
 Protean
 Word
 Exel
 Powerpoint
 ImageQuant
 SigmaPlot
 AdobePhotoshop

Ausschnitt aus einem Western Blot von KSP mit Abbaubanden



Autoradiografie KSP mit PRMT3 gemessen



Tab. 10: Wichtige Parameter für die Messungen der Michaelis-Menten-Diagramme										
	KLP	KSP	PKL	PKS	CKL	CKS	CP	CKLC	CKSC	CPC
Säulen	NiNTA MonoQ	NiNTA MonoQ	NiNTA MonoQ	NiNTA MonoQ	NiNTA HA	NiNTA HA	NiNTA MonoQ	NiNTA HA	NiNTA HA	NiNTA HA
End-Konzentration [ng/µl]	Pool F24-28 nach Dialyse 5 4.V neu 72 5.V 10	Pool F19-22 31 4.V neu 125 5.V 171	16 neu Pool F16-19 2098	46 neu Pool F15-17 1684	WII 10ng F10 302	F1 45-55 F2 270	Ft 24 WII 178	F4 202	F11 341	F16 218
Enzymmenge [pmol] im Test	PRMT1 F11 23ng bzw. PKL/PKS 52ng → maximal 1,3pmol (Enzym 40,5kDa) PRMT3 F13 21- 50ng/µl PKL/PKS 67, 200 → maximal 3,4pmol, meistens ca. 0,9pmol (Enzym 58 kDa) F15 57ng/µl F17 47,5ng/µl PRMT6 F14 31ng/µl → maximal 0,8pmol (Enzym 41,9kDa) F16 31,5ng/µl									
SAM-Menge [pmol]	900-960pmol									
Inkubationszeit [min] im Test	PRMT1 35 PRMT3 80-95 4.+5.V 30,60,90	PRMT1 35 PRMT3 80-95 4.+5.V 30,60,90	PRMT1 20 PRMT3 40-60	PRMT1 20 PRMT3 40-60	PRMT1 10-20 PRMT3 60-80 PRMT6 480	PRMT1 10-20 PRMT3 60-80 PRMT6 480	PRMT1 10-30 PRMT3 60-80 PRMT6 20-40	PRMT1 10-20 PRMT3 120-360 PRMT6 360 PRMT6 480	PRMT1 10-20 PRMT3 120-360 PRMT6 480	PRMT1 10-20 PRMT3 120-360 PRMT6 20-40
Substrat-Menge [µM] im Test	PRMT1+ 3 1-3.V 0,5 PRMT3 4.+5.V 0,05-0,5	PRMT1+ 3 1-3.V 0,5 PRMT3 4.+5.V 0,05-0,5	PRMT1 bis 5 PRMT3 bis 3 PRMT6 KK	PRMT1 bis 5 PRMT3 bis 5 PRMT6 KK	PRMT1 bis 2 PRMT3 bis 2 PRMT6 bis 2	PRMT1 bis 1 PRMT3 bis 2 PRMT6 bis 2	PRMT1 bis 0,8 PRMT3 bis 2 PRMT6 bis 2	PRMT1 bis 0,6 PRMT3 bis 0,8 PRMT6 bis 2 fast kein Einbau	PRMT1 bis 1 PRMT3 bis 2 PRMT6 kein Einbau	PRMT1 bis 2,0 PRMT3 bis 2 PRMT6 bis 1

Danksagung

Ich möchte den folgenden Personen für Ihre Unterstützung bei meiner Doktorarbeit danken:

Ich danke insbesondere Elmar Wahle für die Betreuung und das interessante Thema, Antje Ostareck-Lederer und Uwe Kühn für DNA-Konstrukte, Ratschläge, Antikörper und z.T. Proteine,

Bodo Moritz für Hinweise zum Umgang mit hnRNP K,

Utz Fischer für die Unterweisung im Umgang mit den Oozyten,

Herrn Markwardt für den Injektor, den Mikromanipulator und Tips zum Injizieren,

Monika Schmidt für die Oozytenpräparation,

Iris Thondorf für die Hilfe bei der Modellierung von Substraten und Enzymen,

meiner Familie für die Hilfe bei der Rechtschreibkorrektur und seelischen Beistand, sowie Freunden und Kollegen für gute Ratschläge und

der DFG und dem SFB 610 für die Finanzierung meiner Arbeit.

Angaben zu meiner Person

Familienname: Otto
Vorname: Silke Katharina
vorhandener akad. Grad: Diplom Biologin
Geburtsdatum: 22. 09.1978
Geburtsort: Dortmund
Geschlecht: weiblich
Stand: ledig
Staatsangehörigkeit: deutsch
Anschrift: Steinweg 25, 06110 Halle (Saale)
Telefon: 0345/ 20 37 810
e-mail: silkeotto3@gmx.de

Tabellarischer Lebenslauf

Schulbildung:

1985 - 1991 Kronach-Grundschule Berlin-Steglitz
1991 - 1998 Paulsen-Oberschule (Gymnasium) Berlin-Steglitz
Hochschulreife: am 12.06.1998 Abitur mit der Gesamtnote 2,4 abgeschlossen

Hochschulstudium:

WS 1998/99 **Immatrikulation** an der Freien Universität Berlin
Studiengang: Biologie
Studienziel: Diplom
08.06.2001 **Vordiplom** zur Diplomprüfung in Biologie "sehr gut" bestanden
21.07.2004 **Diplom** in Biologie mit dem Gesamturteil "sehr gut" bestanden

Mündliche Diplomprüfungen:

Hauptfach: Genetik Note: 1,0
1. Nebenfach: Zellbiologie Note: 1,0
2. Nebenfach: Tierphysiologie Note: 1,3
nicht biolog. Fach: Paläontologie Note: 1,0
Wahlfächer: Biophysik, Datenbankenkurs, Englisch für Naturwissenschaftler
Diplomarbeit: (Fach Genetik)
Note: 1,1
Thema: Identifizierung von Zielgenen des Transkriptionsfaktors
Jumeau bei *Drosophila melanogaster*

21.07.04-01.12.04 arbeitssuchend
01.12.04-31.03.05 Wissenschaftliche Mitarbeiterin an der TU-Braunschweig (Abt.
Zellbiologie)
31.03.05-01.06.05 arbeitssuchend
01.06.05-31.01.09 **Doktorarbeit:** An der Martin-Luther Universität
(Halle-Wittenberg)
Institut für Biochemie und Biotechnologie
Fachgebiet Allg. Biochemie, AG Wahle

06110 Halle (Saale), den

Hiermit erkläre ich, dass ich meine Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die den benutzten Werken wörtlich und inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe.

06110 Halle (Saale), den

Veröffentlichung

Promiscuous Modification of the Nuclear Poly(A)-binding Protein by Multiple Protein-arginine Methyltransferases Does Not Affect the Aggregation Behavior

Katharina Fronz, Silke Otto, Knut Kölbl, Uwe Kühn, Hennig Friedrich, Angelika Schierhorn, Annette G. Beck-Sickinger, Antje Ostareck-Lederer, and Elmar Wahle

THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY Vol. 283, NO. 29, pp. 20408-20420