
**Regulation des hämatopoietischen
Transkriptionsfaktors RUNX1 durch die Protein
Arginin Methyltransferase 6**

Dissertation
Zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften

vorgelegt dem Fachbereich
Biochemie, Chemie und Pharmazie
der Goethe-Universität
in Frankfurt am Main

von
Julia Herglotz
aus Oldenburg (Oldb)

Frankfurt am Main, 2011
(D30)

Vom Fachbereich Biochemie, Chemie und Pharmazie (FB14) der Johann Wolfgang Goethe-Universität als Dissertation angenommen.

Dekan: Prof. Dr. D. Steinhilber
Gutachter: Prof. Dr. W. Wels
Prof. Dr. R. Marschalek

Datum der Disputation: 05.09.2011

*Für meine Eltern
und meine Schwester*

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	1
Abbildungsverzeichnis	5
1. Zusammenfassung	8
2. Einleitung	10
2.1 Hämatopoiese	10
2.11 Megakaryopoiese	11
2.12 Thrombopoietin (TPO)	13
2.13 Oberflächenantigene	13
2.131 Das CD34-Antigen	14
2.132 Die CD41/CD61-Antigene	14
2.133 Das CD42-Antigen	14
2.2 Transkriptionsfaktoren	15
2.21 Der Transkriptionsfaktor GATA1	16
2.22 Der Transkriptionsfaktor FOG1	16
2.3 Der Transkriptionsfaktor RUNX1	17
2.31 RUNX1 in Leukämien	17
2.32 Die Domänenstruktur des Transkriptionsfaktors RUNX1	18
2.33 RUNX1-interagierende Transkriptionsfaktoren	19
2.34 RUNX1-interagierende Cofaktoren	20
2.35 Posttranslationale Modifikationen von RUNX1	21
2.4 Protein Arginin Methyltransferasen	23
2.41 Die Domänenstruktur der Protein Arginin Methyltransferasen	24
2.42 Mechanismus der Arginin Methylierung	26
2.43 Substrate und Funktion der Protein Arginin Methyltransferasen	27
2.44 Die Protein Arginin Methyltransferase 6 (PRMT6)	29
2.5 Der Histoncode	30
2.51 Die Struktur des Chromatins	31
2.52 Posttranslationale Modifikationen an Histonen	32
2.53 Erkennung von Histonmodifikationen	34
2.54 Gene in einem Zwischenzustand (<i>Intermediary state</i>)	35
2.6 Zielsetzung der Arbeit	37

3. Ergebnisse	38
3.1 Nachweis der Interaktion von RUNX1 mit PRMT6	38
3.11 RUNX1 interagiert mit der Protein Arginin Methyltransferase 6 (PRMT6).....	38
3.12 Direkte Interaktion von RUNX1 mit PRMT6	40
3.13 Der C-Terminus von RUNX1 interagiert mit PRMT6	41
3.2 Die Methylierung von RUNX1 durch PRMT6 verstärkt die Interaktion beider Faktoren	43
3.21 PRMT6 methyliert RUNX1 am Arginin 307 <i>in vitro</i>	43
3.22 Die Methylierung von RUNX1 durch PRMT6 verstärkt die Interaktion beider Faktoren.....	46
3.3 Megakaryozytendifferenzierung von humanen Stammzellen und Zelllinien	50
3.31 Überprüfung der Megakaryozytendifferenzierung durch Beobachtung der Veränderung der Zellmorphologie.....	51
3.32 Überprüfung der Megakaryozytendifferenzierung mittels FACS.....	52
3.33 Überprüfung des <i>CD41</i> -Expressionslevels während der Megakaryozytendifferenzierung	53
3.4 Expressionsanalyse von RUNX1 und PRMT6 während der Megakaryopoese	55
3.41 Unterschiedliche Expression von <i>RUNX1</i> und <i>PRMT6</i> während der Megakaryopoese von Stammzellen	55
3.42 Unterschiedliche Expression von <i>RUNX1</i> und <i>PRMT6</i> während der Megakaryozytendifferenzierung in humanen Zelllinien.....	57
3.43 Expressionsanalyse von <i>GATA1</i> und <i>FOG1</i> während der Megakaryozytendifferenzierung	58
3.5 PRMT6 reprimiert die Expression von RUNX1-Zielgenen	60
3.51 Nachweis des <i>knock downs</i> und der Überexpression von <i>PRMT6</i> in stabilen K562-Zelllinien	60
3.52 <i>Knock down</i> von <i>PRMT6</i> führt zur Induktion der Expression von RUNX1-Zielgenen	61
3.53 Überexpression von <i>PRMT6</i> führt zur reduzierten Expression von RUNX1-Zielgenen während der Megakaryozytendifferenzierung	62
3.6 Austausch eines RUNX1/PRMT6-Corepressor-Komplexes während der Megakaryozytendifferenzierung	65
3.61 Nachweis von RUNX1 und PRMT6 auf dem Promotor von megakaryozytären Zielgenen.....	65
3.62 Nachweis von Corepressoren auf dem Promotor von megakaryozytären RUNX1-Zielgenen....	66
3.63 Nachweis von Coaktivatoren auf dem Promotor von megakaryozytären RUNX1-Zielgenen	68
3.64 Verifizierung des Austausches eines RUNX1/PRMT6-Corepressor-Komplexes während der Megakaryozytendifferenzierung in HEL-Zellen	71
3.7 Dynamische Regulation von H3R2me2 versus H3K4me3 während der Megakaryozytendifferenzierung	73
3.71 Veränderung der Histonmodifikationen während der Megakaryozytendifferenzierung	73

3.72	PRMT6 katalysiert die asymmetrische Dimethylierung von H3R2 auf dem Promotorbereich der megakaryozytären RUNX1-Zielgene	77
3.8	Megakaryozytäre Zielgene von RUNX1 sind in einem Zwischenzustand (<i>intermediary state</i>)	78
3.81	Nachweis der RNA Polymerase II auf dem Promotorbereich der megakaryozytären RUNX1-Zielgene	78
3.82	Vorhandensein der bivalenten Modifikationen H3K4me2 und H3K27me3 auf dem Promotorbereich der megakaryozytären RUNX1-Zielgene.....	80
4.	Diskussion	83
4.1	PRMT6 ist ein neuer Interaktionspartner von RUNX1	83
4.2	Die Funktion von RUNX1 wird durch eine PRMT6 vermittelte Methylierung reguliert.....	84
4.3	Eine Beeinflussung der Proteinmenge von PRMT6 führt zu einer veränderten RUNX1-Zielgenexpression.....	86
4.4	Austausch eines RUNX1/PRMT6-Corepressorkomplexes während der Megakaryozytendifferenzierung	88
4.5	Epigenetische Regulation von RUNX1-Zielgenen während der Megakaryozytendifferenzierung ..	89
4.6	Model der Genregulation von RUNX1-Zielgenen durch PRMT6	92
4.7	Der Einfluss von RUNX1 und PRMT6 auf die hämatopoietische Differenzierung und Krebs.....	94
5.	Material und Methoden	95
5.1	Material.....	95
5.11	Chemikalien, Geräte und Enzyme	95
5.12	Antikörper	95
5.2	Zellbiologische Methoden.....	97
5.21	Zelllinien.....	97
5.22	Differenzierung der Zelllinien.....	98
5.23	Transfektion.....	98
5.24	Herstellung stabiler Zelllinien.....	99
5.25	Transduktion und FACS-Analyse.....	99
5.3	Molekularbiologische Methoden.....	100
5.31	Standardmethoden.....	100
5.32	Expressionsvektoren.....	100
5.33	Reportergene.....	103
5.34	Herstellung von Gesamtzellextrakten	104
5.35	Herstellung von Kernextrakten	104
5.36	Oligo-pulldown.....	105

5.37	Luciferaseassay und β -Galactosidaseassay	106
5.38	Proteinexpression.....	107
5.39	<i>In-vitro</i> Methyltransferasereaktion	108
5.310	<i>In-vitro</i> Methyltransferasereaktion mit auf einer Cellulosemembran gespotteten Peptiden	109
5.311	Immunopräzipitation.....	109
5.312	GST- <i>pulldown</i>	110
5.313	Chromatin-Immunopräzipitation (ChIP)	111
5.314	Sequentieller ChIP (ChIP-ReChIP).....	112
5.315	qRT-PCR	113
6.	Literaturverzeichnis	115
7.	Anhang.....	131
7.1	Daten von HEL-Zellen	131
7.2	Abkürzungsverzeichnis.....	132
7.3	Verwendete Chemikalien.....	134
7.4	Verwendete Geräte.....	135
7.5	Lebenslauf.....	137
7.6	Publikationen und Posterpräsentationen.....	138
7.7	Danksagung	139

Abbildungsverzeichnis

- Abb. 2. 1:** Das hämatopoietische System (vereinfachte Darstellung)
- Abb. 2. 2:** Überblick über die Megakaryopoese und Thrombopoese
- Abb. 2. 3:** Die Regulation der megakaryozytären/erythroiden Linie durch spezifische Transkriptionsfaktoren
- Abb. 2. 4:** Die Häufigkeitsverteilung der translokations-generierten Onkogene in akuten Leukämien
- Abb. 2. 5:** Die Domänenstruktur des hämatopoietischen Transkriptionsfaktors RUNX1 und interagierende Cofaktoren
- Abb. 2. 6:** Der Einfluss von posttranslationalen Modifikationen auf das Transaktivierungspotential von RUNX1
- Abb. 2. 7:** Die Familie der Protein Arginin Methyltransferasen (PRMTs)
- Abb. 2. 8:** Die Kristallstruktur der Protein Arginin Methyltransferase 1 (PRMT1)
- Abb. 2. 9:** Mechanismus der Arginin-Methylierung durch PRMTs
- Abb. 2. 10:** Schematische Darstellung der Chromatin- und Nukleosomenstruktur
- Abb. 2. 11:** Histonmodifikationen am N-Terminus des Histons H3
- Abb. 2. 12:** Model der Auswirkungen der antagonistischen Histonmodifikationen H3R2me2 und der H3K4me3
- Abb. 2. 13:** Histonmodifikationen der verschiedenen Aktivierungszustände
- Abb. 3. 1:** Interaktionsanalyse von RUNX1 mit verschiedenen Protein Arginin Methyltransferasen (PRMTs)
- Abb. 3. 2:** Interaktion von RUNX1 mit endogenem PRMT6
- Abb. 3. 3:** Direkte Interaktion von RUNX1 und PRMT6
- Abb. 3. 4:** Kartierung der Interaktionsfläche von RUNX1 mit PRMT6
- Abb. 3. 5:** Methylierung von RUNX1 durch PRMT6
- Abb. 3. 6:** Das Arginin 307 von RUNX1 wird durch PRMT6 methyliert
- Abb. 3. 7:** Die Methylierung von RUNX1 durch PRMT6 verstärkt die Interaktion beider Faktoren
- Abb. 3. 8:** Die Methylierung von RUNX1 durch PRMT6 verstärkt die Bindung von RUNX1 an DNA
- Abb. 3. 9:** Die Methylierung von RUNX1 am Arginin 307 durch PRMT6 reprimiert die Aktivierungsfähigkeit

-
- Abb. 3. 10:** Morphologische Veränderungen während der Differenzierung von K562- und HEL-Zellen
- Abb. 3. 11:** Veränderungen der Oberflächenmarker CD34 und CD41 während der Differenzierung von humanen CD34-, K562- und HEL-Zellen
- Abb. 3. 12:** Veränderungen der Expression des Oberflächenmarkers *CD41* während der Differenzierung von humanen CD34-, K562- und HEL-Zellen
- Abb. 3. 13:** *RUNX1*-, *PRMT6*- und Zielgenexpression während der Differenzierung von humanen CD34-Zellen
- Abb. 3. 14:** *RUNX1*-, *PRMT6*- und Zielgenexpression während der Megakaryozyten-differenzierung von K562- und HEL-Zellen
- Abb. 3. 15:** *GATA1* und *FOG1* Expression während der Megakaryozytendifferenzierung
- Abb. 3. 16:** Nachweis des *knock downs* und der Überexpression von *PRMT6* in den stabilen K562-Zelllinien
- Abb. 3. 17:** *Knock down* von *PRMT6* induziert die Expression von *RUNX1*-Zielgenen
- Abb. 3. 18:** Überexpression von *PRMT6* inhibiert die Erhöhung der Expression von *RUNX1*-Zielgenen während der Megakaryozytendifferenzierung
- Abb. 3. 19:** Nachweis von *RUNX1* und *PRMT6* auf dem Promotor von megakaryozytären *RUNX1*-Zielgenen
- Abb. 3. 20:** Nachweis von *Sin3a* und *HDAC1* im Corepressorkomplex von megakaryozytären *RUNX1*-Zielgenen
- Abb. 3. 21:** Nachweis der Coaktivatoren *PCAF*, *p300*, *PRMT1* und *WDR5* auf dem Promotorbereich von megakaryozytären *RUNX1*-Zielgenen
- Abb. 3. 22:** Nachweis von *GATA1* und *FOG1* auf dem Promotorbereich von megakaryozytären *RUNX1*-Zielgenen
- Abb. 3. 23:** Nachweis von *RUNX1*, *PRMT6*, *Sin3a* und *p300* auf dem Promotorbereich der *RUNX1*- Zielgene *CD41* und *miR27a*
- Abb. 3. 24:** Veränderung der Histonmodifikationen während der Megakaryozyten-differenzierung
- Abb. 3. 25:** Veränderung der Histonmodifikationen *H3R2me2* und *H3K4me3* während der Megakaryozytendifferenzierung von HEL-Zellen
- Abb. 3. 26:** *PRMT6* ist verantwortlich für die Dimethylierung von *H3R2* auf dem Promotorbereich von *CD41*, *miR27a*, *CD42b* und *TSP-1*
- Abb. 3. 27:** Nachweis der RNA-Polymerase II auf dem Promotorbereich der megakaryozytären *RUNX1*-Zielgene *CD41* und *miR27a*
- Abb. 3. 28:** Nachweis der bivalenten Histonmodifikationen *H3K27me3* und *H3K4me2* auf dem Promotorbereich der megakaryozytären *RUNX1*-Zielgene *CD41* und *miR27a*
- Abb. 4. 1:** Austausch eines Corepressor- gegen einen Coaktivorkomplex auf dem Promotorbereich von *RUNX1*-Zielgenen während der megakaryozytären Differenzierung von Stamm-/Vorläuferzellen

- Abb. 4. 2:** Veränderung des Histonmodifikationsstatus zusammen mit dem Austausch eines Corepressor- gegen einen Coaktivatorkomplex auf dem Promotorbereich von RUNX1-Zielgenen
- Abb. 4. 3:** Modell der PRMT6-Aktivität auf RUNX1-Zielgene
- Abb. 7.1 :** Nachweis der RNA-Polymerase II auf dem Promotorbereich der megakaryozytären RUNX1-Zielgene *CD41* und *miR27a* in HEL-Zellen
- Abb. 7.2 :** Nachweis der bivalenten Histonmodifikationen H3K27me3 und H3K4me2 auf dem Promotorbereich der megakaryozytären RUNX1-Zielgene *CD41* und *miR27a* in HEL-Zellen

Tabellenverzeichnis

- Tab. 5. 1:** Übersicht aller verwendeter Primärantikörper
- Tab. 5. 2:** Übersicht aller verwendeter Sekundärantikörper
- Tab. 5. 3:** Übersicht aller verwendeter Sekundärantikörper für das Odyssey-System
- Tab. 5. 4:** Übersicht aller verwendeter Immunglobuline
- Tab. 5. 5:** Übersicht aller verwendeter Zelllinien
- Tab. 5. 6:** Übersicht aller verwendeter Primer für die Klonierung der GST-Konstrukte
- Tab. 5. 7:** Übersicht aller verwendeter Sequenzierprimer für den pGEX4T.1 Vektor
- Tab. 5. 8:** Übersicht aller verwendeter Primer für die Klonierung in den pcDNA3.1 Vektor
- Tab. 5. 9:** Übersicht aller verwendeter Primer für die Klonierung in den pIRES2-EGFP Vektor
- Tab. 5. 10:** Übersicht aller verwendeter Sequenzierprimer für den SEW Vektor
- Tab. 5. 11:** Übersicht aller verwendeter Primer für die Klonierung des CD41-Promotor-Fragments in den pGL4.1 Vektor
- Tab. 5. 12:** Programm der Real-Time-PCR
- Tab. 5. 13:** Übersicht aller verwendeter Oligonukleotide für die Real-Time-PCR von cDNA und CHIP-DNA

1. Zusammenfassung

Die Bildung aller Blutzellen ist ein vielschichtiger Prozess aus Proliferation und Differenzierung der pluripotenten Stammzellen. Die Regulation der hämatopoietischen Differenzierung wird unter anderem durch ein Zusammenspiel von zelltypspezifischen Transkriptionsfaktoren gewährleistet (Barreda & Belosevic, 2001).

Der Transkriptionsfaktor RUNX1 spielt eine wichtige Rolle bei der Entwicklung von hämatopoietischen Stammzellen und eine funktionelle Veränderung von RUNX1 führt zur Ausbildung von Leukämien. In humanen Leukämien ist *RUNX1* ein häufiges Ziel von chromosomalen Translokationen. Außerdem ist die Haploinsuffizienz von *RUNX1* beim Menschen ursächlich für familiäre Thrombozytopenien (FPD) mit reduzierten Thrombozytenzahlen (Luddy *et al.*, 1978; Gerrard *et al.*, 1991). Ein *knock out* von *RUNX1* in adulten Mäusen zu einem Defekt in der Megakaryozytendifferenzierung und zu Myelodysplasien (Gowney *et al.*, 2005; Ichikawa *et al.*, 2004).

Die Funktion von RUNX1 wird unter anderem durch die Interaktion mit anderen Transkriptionsfaktoren und Cofaktoren reguliert. Dabei kann RUNX1 die Expression von Zielgenen aktivieren oder reprimieren, abhängig davon welche Cofaktoren rekrutiert werden. Die Rekrutierung von Chromatin-modifizierenden Cofaktoren durch RUNX1 führt zur Veränderung der Chromatinstruktur und leitet epigenetische Regulationsprozesse ein. Bekannte Histon-modifizierende Interaktionspartner von RUNX1 sind p300 und HDAC1. p300 besitzt Histon-Acetyltransferase-Aktivität und führt zur Ausbildung offener Chromatinstrukturen, welche dann Transkriptionsfaktoren erlaubt an die DNA zu binden und somit zur Aktivierung der Expression von Zielgenen beiträgt (Vogelauer *et al.*, 2000). Der Gegenspieler von Acetyltransferasen sind Histon Deacetylasen (z.B. HDAC1), welche Acetylgruppen entfernen und somit reprimierend auf die Genexpression wirken (Berger, 2007).

Bestimmte Zelltypen unterscheiden sich stark voneinander trotz eines gemeinsamen genetischen Codes. Die Expression von zelllinienspezifischen Genen muss daher zelltypspezifisch kontrolliert werden. Dies geschieht durch epigenetische Regulationsvorgänge, welche stammzell-spezifische Gene abschalten, wohingegen zelllinienspezifische Gene angeschaltet werden. Neben der Acetylierung von Histonen ist die Methylierung eine häufige posttranslationale Modifikation, die im *Histone Code* eine wichtige Rolle spielt. Diese Histonmarkierung wird von Methyltransferasen katalysiert.

Die epigenetische Regulation von RUNX1-Zielgenen während der Differenzierung von Vorläufer-/Stammzellen wurde bislang noch nicht näher aufgeklärt. Aus diesem Grund sollten neue Interaktionspartner von RUNX1 mit epigenetischer Funktion identifiziert werden. In dieser Arbeit konnte eine Interaktion von RUNX1 mit der Protein Arginin Methyltransferase 6 (PRMT6)

gezeigt werden. Expressionsanalysen wiesen eine Expression von *RUNX1* und *PRMT6* in Stamm-/Vorläuferzellen nach. Während der Megakaryozytendifferenzierung verhielt sich das Expressionsmuster von *PRMT6* gegensätzlich zu der *RUNX1*-Expression. Zur Überprüfung der Auswirkung von *PRMT6* auf die Megakaryozytendifferenzierung, wurden ein *knock down* sowie eine Überexpression von *PRMT6* durchgeführt. Die veränderte *CD41*-Expression einer Beeinflussung des *PRMT6*-Levels deutet auf einen reprimierenden Effekt von *PRMT6* auf die Megakaryopoese hin.

Das daran anschließende Ziel bestand in dem Nachweis der kooperativen Regulation von differenzierungsspezifischen Genen durch *PRMT6* und *RUNX1*. *PRMT6* konnte als Teil eines *RUNX1*-Corepressorkomplexes mit *Sin3a* und *HDAC1* auf dem Promotorbereich von *RUNX1*-Zielgenen in hämatopoietischen Vorläuferzellen nachgewiesen werden. Ein *in vitro* Methyltransferaseassay lieferte Hinweise darauf, dass *RUNX1* am Arginin 307 von *PRMT6* methyliert wird, was zu einer verstärkten Interaktion beider Faktoren, einer verminderten Aktivierungsfähigkeit und einer erhöhten DNA-Bindungskapazität von *RUNX1* führt. Außerdem konnte eine Methylierung des H3R2 am Promotor von megakaryozytären Genen durch *PRMT6* gezeigt werden, welche die Bindung des *WDR5/MLL*-Komplexes an die *H3K4me2* Markierung verhindert und somit eine Trimethylierung von *H3K4* inhibiert (Hyllus *et al.*, 2007). Auf dem Promotorbereich ist neben den reprimierenden Histonmodifikationen *H3R2me2* und *H3K27me3* die aktivierende *H3K4me2+/me3*-Histonmodifikation, sowie die initiiierende RNA-Polymerase II vorhanden. Die Gene befinden sich in einem Zwischenzustand (*intermediary state*) und werden basal transkribiert.

Während der Differenzierung in Richtung Megakaryozyten konnte ein Austausch des Corepressorkomplexes gegen einen Coaktivatorkomplex mit *p300*, *PCAF*, *WDR5*, *PRMT1* und *GATA1/FOG1* beobachtet werden. Ein Verlust von *PRMT6* führte zu einer Verringerung der *H3R2me2* Markierung. Dadurch konnte *WDR5* an den Promotor binden und die *H3K4*-Trimethylierung wurde durch den *WDR5/MLL*-Komplex katalysiert. Zusätzlich konnte eine Acetylierung des Promotorbereiches und die Belegung des Promotorbereiches mit der elongierenden RNA-Polymerase II, phosphoryliert am Serin 2, nachgewiesen werden, was zur Induktion der Expression der megakaryozytären Gene führte.

Zusammenfassend konnte *PRMT6* als neuer Interaktionspartner von *RUNX1* identifiziert werden, welcher durch die *H3R2*-Methylierung differenzierungsspezifische Gene in einem Zwischenzustand hält und reprimierend auf die Megakaryozytendifferenzierung wirkt. Die Expression der *intermediary state* Gene kann während der Differenzierung schnell aktiviert werden. Zusätzlich konnte eine Methylierung von *RUNX1* durch *PRMT6* gezeigt werden.

2. Einleitung

2.1 Hämatopoiese

Als Hämatopoiese wird die Bildung aller Blutzellen aus pluripotenten Stammzellen bezeichnet. Die hämatopoietische Stammzelle (HSC) muss einerseits die Fähigkeit zur Selbsterneuerung besitzen, andererseits muss sie die Ursprungszelle weiter differenzierter Vorläuferzellen sein, die sich in die verschiedenen Zelllinien des hämatopoietischen Systems differenzieren können (Knapp *et al.*, 1995; Weissmann, 2000).

Abstammend aus dem Mesoderm, beginnt die Hämatopoiese in den ersten drei Wochen der embryonalen Entwicklung des Menschen im Dottersack. Anschließend wandern die Stammzellen weiter in die Leber und Milz. Im adulten Menschen findet die Hämatopoiese schließlich hauptsächlich im Knochenmark statt (Haas *et al.*, 1976; Mikkola & Orkin, 2006).

Nach phänotypischen und funktionellen Gesichtspunkten werden HSCs in langzeit-repopulierende Stammzellen (*long-term* HSC, LT-HSC), welche sich ein Leben lang teilen und in kurzzeit-repopulierende Stammzellen (*short-term* HSC, ST-HSC), welche sich nur begrenzte Zeit teilen, eingeteilt. Aus LT-HSCs werden über ST-HSCs multipotente Vorläuferzellen gebildet, deren Potential zur die Selbsterneuerung eingeschränkt ist. Aus diesen Vorläuferzellen gehen nach Zellteilung und Differenzierung myeloische Vorläuferzellen (*common myeloid progenitor*, CMP) und lymphoide Vorläuferzellen (*common lymphoid progenitor*, CLP) hervor. Deren Differenzierungspotential ist auf die jeweiligen Linien begrenzt. CLPs produzieren Zelltypen lymphoiden Ursprungs wie T-Zellen, B-Zellen, natürliche Killerzellen (NK-Zelle) und dendritische Zellen, wohingegen sich CMPs insbesondere zu Megakaryozyten, Erythrozyten, Granulozyten und Makrophagen-Vorläuferzellen entwickeln. Spätere Zellvorläuferstadien beschränken sich auf wenige Zelltypen (Adolfsson *et al.*, 2001; Akashi *et al.*, 2000; Kondo *et al.*, 1997; Weissman *et al.*, 2001). Einen Überblick über den Ablauf und die Differenzierung hämatopoietischer Stammzellen gibt Abbildung 2.1.

Die Proliferation und Differenzierung der hämatopoietischen Stammzellen zu einer bestimmten Zellreihe findet unter der Einwirkung von Zytokinen statt, welche ihre Wirkung über Signalkaskaden entfalten. Diese aktivierten Signalwege führen zu posttranslationalen Modifikationen von Transkriptionsfaktoren, welche die Funktion der Transkriptionsfaktoren beeinflussen, was sich letztendlich auf eine Änderung der Expression von bestimmten Zielgenen auswirkt (Orkin, 2000). Als einige wichtige Zytokine der Hämatopoiese seien hier die Interleukine (IL 1-12, IL15, IL21), Stammzellofaktor (SCF), *granulocyte colony-stimulating factor* (G-CSF), *granulocyte macrophage colony-stimulating factor* (GM-CSF), *macrophage colony-stimulating factor* (M-CSF), Erythropoietin (EPO) und Thrombopoietin (TPO) genannt. Einige davon, wie SCF, IL-3, GM-CSF wirken dabei auf mehrere Zellreihen. Wohingegen

andere, spätere Faktoren wie EPO, TPO, G-CSF oder M-CSF ihren Einfluss nur noch auf einzelne Zellreihen ausüben (Greenberger, 2000).

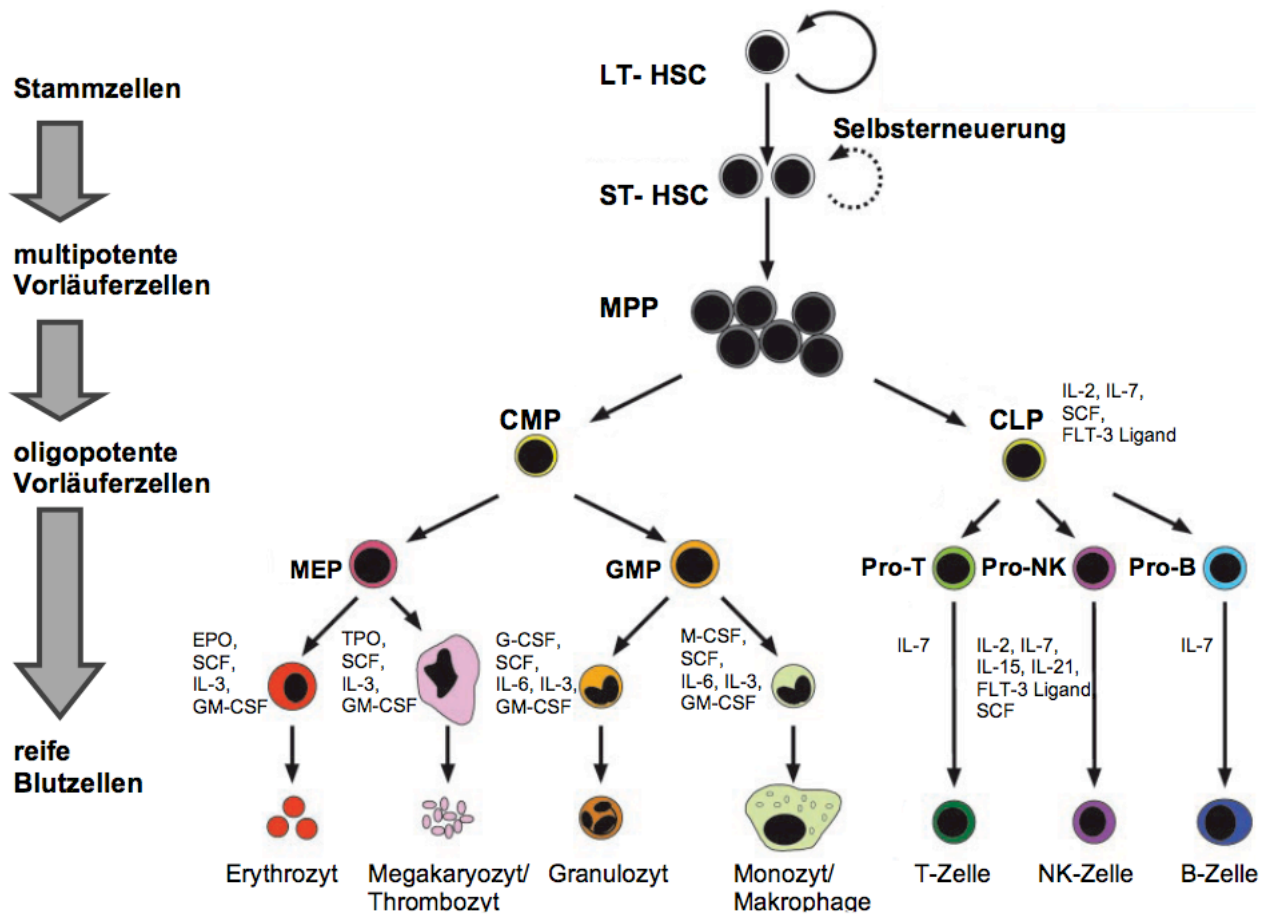


Abb. 2. 114: Das hämatopoietische System (vereinfachte Darstellung)

Aus hämatopoietischen Stammzellen (HSC) gehen über multipotente Vorläuferzellen (MPP) linienspezifische Progenitorzellen hervor (CMPs, CLPs). Über weitere Vorläuferzellen werden sämtliche reife Zellen des hämatopoietischen Systems gebildet. Einige wichtige Zytokine der Hämatopoiese für die linienspezifische Differenzierung sind genannt: Interleukine (IL-2, IL-3, IL-6, IL-7, IL-15, IL-21), Stammzellfaktor (SCF), *granulocyte colony-stimulating factor* (G-CSF), *granulocyte macrophage colony-stimulating factor* (GM-CSF), *macrophage colony-stimulating factor* (M-CSF), Erythropoietin (EPO), Thrombopoietin (TPO), FLT-3 Ligand.

LT-HSZ, *long-term* hämatopoietische Stammzelle; ST-HSZ, *short-term* hämatopoietische Stammzelle; MPP, multipotente Vorläuferzellen; CMP, gesamte myeloide Vorläufer; CLP, gesamte lymphoide Vorläufer (modifiziert nach Passegue *et al.*, 2003; Blom & Spits, 2006)

2.11 Megakaryopoese

Die Megakaryopoese ist ein mehrstufiger Entwicklungsprozess an dessen Ende die Bildung und Freisetzung von Thrombozyten steht, wie in Abb. 2.2 dargestellt. Die pluripotente hämatopoietische Stammzelle differenziert zur bipotenten megakaryozytären/erythroiden Vorläuferzelle. Die megakaryozytäre und erythroide Linie sind durch diese gemeinsame Vorläuferzelle näher miteinander verbunden (Debili *et al.*, 1996; Vannucchi *et al.*, 2000).

Anschließend erfolgt die Differenzierung zu einer megakaryozytären Vorläuferzelle (CFU-MK), die eine hohe Proliferationskapazität besitzt und zur Koloniebildung befähigt ist. Der weitere Reifungsprozess führt über den Promegakaryoblasten, den Megakaryoblasten zum postmitotischen Megakaryozyten und zur Ausschleusung von Thrombozyten in die Blutbahn (Hoffman, 1989).

Thrombozyten spielen eine wichtige Rolle bei der Blutgerinnung. Bei einer Verletzung des Blutgefäßes kommt es zu einer Formveränderung und Oberflächenvergrößerung. Dies begünstigt die Anheftung an das umliegende Gewebe (Thrombozytenadhäsion) und die Aggregation der Thrombozyten untereinander. Zusätzlich werden von den Thrombozyten dabei gerinnungsfördernde Stoffe freigesetzt (Angiolillo *et al.*, 2010).

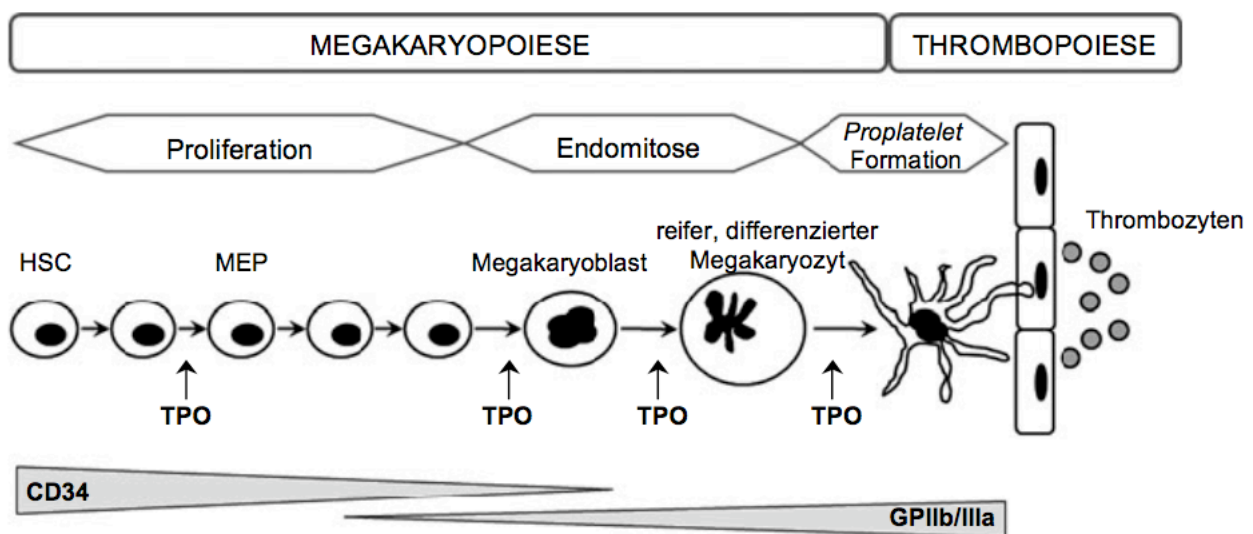


Abb. 2.2: Überblick über die Megakaryopoese und Thrombopoese

Die hämatopoietischen Stammzellen (HSC) entwickeln sich über verschiedene Vorläuferstufen wie der megakaryozytären/erythroiden Vorläuferzelle (MEP) und dem Megakaryoblasten zum reifen Megakaryozyten. Nach weiterer Differenzierung setzt der Megakaryozyt Thrombozyten frei. Auf viele Differenzierungsschritte übt das Zytokin Thrombopoietin (TPO) Einfluss aus. Die mit der Megakaryopoese assoziierten Oberflächenantigene sind mit Veränderung des Expressionslevels genannt (modifiziert nach Pendaries *et al.*, 2007).

Im Laufe ihrer Entwicklung verlieren die Megakaryozyten ihr Proliferationspotential. Während der Differenzierung findet eine Endomitose/Endoreduplikation statt: Es findet eine (unvollständige) Kernteilung statt, ohne dass eine Zellteilung erfolgt (Jackson, 1990; Ravid *et al.*, 2002). Als Konsequenz beobachtet man eine Erhöhung der Anzahl der Chromosomensätze bis hin zu 64N innerhalb des Zellkerns (DNA-Ploidität). Zusammen mit der Polyploidität nimmt das Volumen des Zytoplasmas des Megakaryozyten zu. Reife Megakaryozyten haben einen Durchmesser von 20-40 μm (Mathur *et al.*, 2004). Polyploide Zellen der megakaryozytären Reihe sind in der Lage, ein internes Membransystem, die so genannten

Demarkationsmembranen, zu bilden. Dieses Demarkationsmembransystem hält einen Membranvorrat für die Ausstülpung von Prothrombozyten bereit (Nakao & Angrist, 1968; Italiano & Shivdasani, 2003).

2.12 Thrombopoietin (TPO)

Eine Anzahl von Zytokinen wurde mit der Megakaryopoese in Verbindung gebracht (Kirito & Kaushansky, 2006). Aufgrund der Tatsache, dass die *messenger*-RNA für den c-Mpl Rezeptor nur in CD34+ Progenitorzellen, Megakaryozyten und Thrombozyten nachgewiesen werden konnte, wurde hier der Rezeptor für ein, für die Megakaryopoese spezifisches, Zytokin vermutet. Thrombopoietin (TPO) wurde dann als der Faktor identifiziert, der an den c-Mpl Rezeptor bindet (Bartley *et al.*, 1994; De Sauvage *et al.*, 1994).

Thrombopoietin ist das wichtigste Zytokin für die Stimulierung der Proliferation und Differenzierung von megakaryozytären Progenitorzellen (siehe Abb. 2.2). Sowohl die initiale Proliferation als auch die terminale Reifung und Endomitose werden von TPO beeinflusst und gesteuert (Kaushansky, 1995; Kaushansky, 2005). Aufgrund der Rezeptorbindungsdomäne weist das 332 Aminosäuren große Glycoprotein TPO große Ähnlichkeit mit EPO, dem linienspezifischen Zytokin der Erythropoese, auf (Bartley *et al.*, 1994; Kuter *et al.*, 2000). In Flüssigkulturen mit Knochenmarkzellen von Mäusen und Menschen erhöht Thrombopoietin die Größe und Anzahl von Megakaryozyten und stimuliert die Expression von thrombozytenspezifischen Oberflächenantigenen wie CD41/CD61 und CD42 (Kaushansky, 1994; Papayannopoulou *et al.*, 1996).

2.13 Oberflächenantigene

Oberflächenantigene sind auf der Zelloberfläche lokalisierte Glykoproteine, die entsprechend der Zellfunktion verschiedene Aufgaben erfüllen, z.B. Bindungsrezeptoren, Immunglobulin-Rezeptoren, Rezeptoren für Signaltransduktion und Adhäsionsmoleküle (Schlossmann *et al.*, 1995). Diese Antigene können in Kombination mit anderen vorliegen oder spezifisch für Zelllinien sein. Mit zunehmender Zelldifferenzierung kann die Expression von bestimmten Antigenen reprimiert oder induziert werden. Alle bekannten Oberflächenantigene erhalten neben ihrer funktionellen oder chemischen Bezeichnung eine CD-Bezeichnung. Die monoklonalen Antikörper, die dasselbe Antigen erkennen, wurden Differenzierungsgruppen (CD = *cluster of differentiation*) zugeteilt. In der heutigen Nomenklatur wird mit CD allerdings das Zellantigen bezeichnet (Fonatsch *et al.*, 2003).

Während der zytoplasmatischen Reifung der Megakaryozyten findet die Synthese von spezifischen Oberflächenproteinen, wie z.B. CD41 (GPIIb oder α IIb), CD42b (GPIb) und CD61 (GPIIIa oder β 3) statt, welche die späteren Differenzierungsprozesse regulieren (Hoffman, 1989; Ellis *et al.* 1995; Lepage *et al.*, 2000). Außerdem geht ein Verlust von CD34 bei 2N-

Megakaryozyten-Vorläuferzellen mit einer verminderten Teilungsfähigkeit einher, wie in Abbildung 2.2 dargestellt (Debili *et al.*, 1992; Matur *et al.*, 2004).

2.131 Das CD34-Antigen

Von Civin *et al.* wurde das CD34-Antigen zuerst beschrieben (Civin *et al.*, 1984). Es handelt sich dabei um ein hochgradig glykosyliertes transmembranes Protein mit einem Molekulargewicht von ungefähr 116 kDa. CD34 ist auf der Oberfläche von frühen lymphohämatopoietischen Stamm- und Vorläuferzellen, Endothelzellen kleiner Blutgefäße und embryonalen Fibroblasten zu finden (Krause *et al.*, 1996).

Die Funktion des CD34-Glykoproteins ist noch nicht vollständig geklärt, wobei eine Funktion im Bereich der Zelladhäsion und der Hemmung der Hämatopoese vermutet wird (Krause *et al.*, 1996). Während der weiteren Differenzierung der hämatopoietischen Stammzellen wird die CD34-Expression herunterreguliert. Die reiferen, schon linienspezifischen, CD34 positiven Vorläuferzellen zeichnen sich zusätzlich durch eine Koexpression linienspezifischer Oberflächenantigene aus (Drénou, 1996). Die intrinsischen Mechanismen, die zu einem endgültigen Abschalten der CD34-Transkription während der Polyploidisation von Megakaryozyten führen, sind jedoch noch nicht vollständig geklärt (Knapp *et al.*, 1995; Matur *et al.*, 2004).

2.132 Die CD41/CD61-Antigene

Als CD41-Antigen bezeichnet man das thrombozytenspezifische Glykoprotein (GP) IIb. Zusammen mit CD61 (GPIIIa oder $\beta 3$) bildet CD41 eine Untereinheit des Fibrinogenrezeptors GPIIb/IIIa (CD41/CD61-Komplex). Zu dessen Aufgaben gehören die Bindung von Fibrinogen, Fibronectin und des CD42b-Faktors (Schlossmann *et al.*, 1995). Antikörper gegen CD41 reagieren fast ausschließlich mit Thrombozyten und Megakaryozyten (Tomer *et al.*, 1988). Eine Expression von CD41 wird in hämatopoietischen Vorläuferzellen, insbesondere den megakaryozytär determinierten, gefunden (Mitjavila-Garcia *et al.*, 2002). Da CD41 auch während der gesamten Zelldifferenzierung der Megakaryozyten präsentiert wird, gehört CD41 zu den linienspezifischen Oberflächen-antigenen (Vainchenker *et al.*, 1982).

2.133 Das CD42-Antigen

Der Oberflächenmarker CD42 existiert als Heterodimer mit dem Glykoprotein V auf der Megakaryozytenoberfläche und kann in CD42a und CD42b unterteilt werden. CD42a ist ein Membran-Glykoprotein (GP IX), dessen Expression von TPO induziert wird. Es bildet einen nicht-kovalenten Komplex mit anderen Glykoproteinen. CD42b (GP Ib) ist für die Adhäsion der Thrombozyten an das Subendothel von verletzten Blutgefäßen verantwortlich. Die Expression

von GPIb wird während der Megakaryopoese etwas später induziert als GPIIb und wird somit als Marker für reife Megakaryozyten benutzt (Lepage *et al.*, 2000).

2.2 Transkriptionsfaktoren

Die Zellen des Blutsystems unterscheiden sich aufgrund ihrer unterschiedlichen Proteinexpression (Miyamoto, 2002). Die spezifische Proteinexpression hämatopoietischer Zellen wird während der Differenzierung durch ein Zusammenspiel von Zelltyp-spezifischen Transkriptionsfaktoren und extrazellulären Signalen, wie Zell-Zell-Interaktionen, Wachstumsfaktoren oder anderen Molekülen, die an entsprechende Rezeptoren auf der Oberfläche von Zellen binden, reguliert (Barreda & Belosevic, 2001). Transkriptionsfaktoren können dabei sowohl verstärkend als auch vermindernd auf die Genexpression wirken. Entscheidend für die Regulation der Genexpression sind die Bindungsaffinität an DNA-Sequenzen, die relative Konzentration in der Zelle, funktionelle Änderungen durch posttranslationale Modifikationen, sowie das Vorhandensein von Cofaktoren.

Für die Regulation der Hämatopoese sind Transkriptionsfaktoren essentiell. Die Expression linienspezifischer Gene wird durch das Zusammenspiel von Transkriptionsfaktoren reguliert, die in den bestimmten Stadien der Differenzierung in hämatopoietischen Zellen präsent sind. Die Linienzugehörigkeit und das Stadium der Differenzierung einer hämatopoietischen Zelle kann somit durch das Muster der in ihr vorhandenen Transkriptionsfaktoren charakterisiert werden.

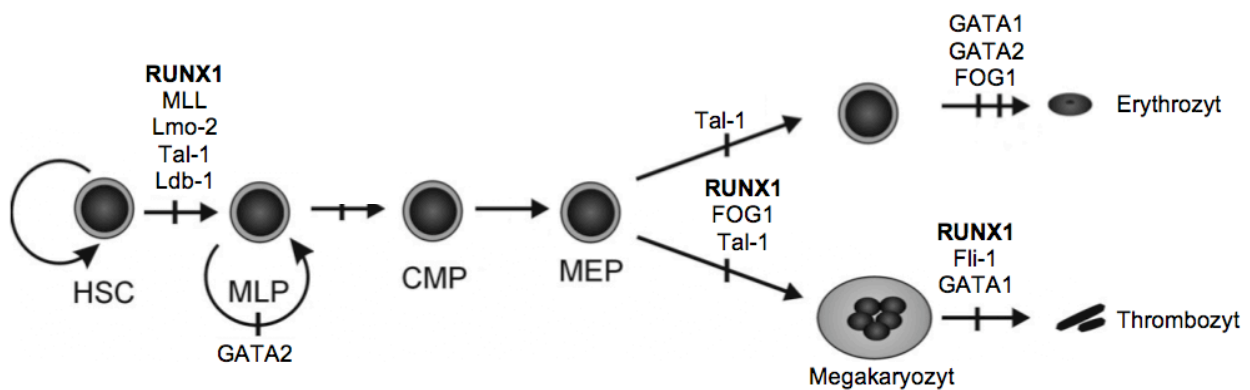


Abb. 2. 3: Die Regulation der megakaryozytären/erythroiden Linie durch spezifische Transkriptionsfaktoren

Aus hämatopoietischen Stammzellen (HSC) gehen linienspezifische Progenitorzellen hervor (CMPs). Über weitere Vorläuferzellen (CMP, MEP) werden Erythrozyten und Megakaryozyten/Thrombozyten gebildet. Einige wichtige Transkriptionsfaktoren für die Differenzierung der Stammzellen und für linienspezifische Differenzierung der Hämatopoese sind genannt: RUNX1, Tal-1, Lmo-2, Ldb-1, Pu.1, GATA1, GATA2, FOG1 (modifiziert nach Ferreira *et al.*, 2005).

RUNX1: *Runt-related transcription factor 1*; MLL: *mixed lineage-leukemia*; Lmo-2: *LIM domain only protein 2*; Tal-1 (SCL): *T-cell acute lymphocytic leukemia*; Ldb-1: *LIM domain binding 1*; Pu.1 (Spi1): *spleen focus forming virus (SFFV) proviral integration oncogene spi1*; GATA1: *GATA binding protein 1*; GATA2: *GATA binding protein 2*; FOG1: *friend of GATA1*; Fli-1: *Friend leukemia virus integration 1*

Für die Selbsterneuerung der hämatopoietischen Stammzellen sind unter anderem die Transkriptionsfaktoren RUNX1, MLL, Tal-1 (SCL), Lmo-2, Ldb-1, GATA2 und Pu.1 wichtig (Ferreira *et al.*, 2005; Orkin & Zon, 2008). Die Differenzierung der Erythrozyten und Megakaryozyten wird durch die Transkriptionsfaktoren RUNX1, Tal-1, Fli-1, GATA1, GATA2 und FOG1 reguliert, wie in Abbildung 2.3 dargestellt (Elagib *et al.*, 2003; Goldfarb, 2007; Goldfarb, 2009).

2.21 Der Transkriptionsfaktor GATA1

GATA1 ist ein Zink-Finger Transkriptionsfaktor, der an die DNA-Sequenz (A/T)GATA(A/G) bindet. In einigen Promotorbereichen erythroider Gene ist diese DNA-Sequenz zu finden (Shivdasani *et al.*, 1997). Die Funktion von GATA1 wird durch die Interaktion mit verschiedenen Proteinen modelliert, wie FOG1 (*friend of GATA1*), Sp1, PU.1 und Fli-1. Die N-Terminale Zink-Fingerdomäne von GATA1 interagiert mit FOG1, während die Zink-Fingerdomäne am C-Terminus für die DNA-Bindung essentiell ist. *GATA1* wird innerhalb des Blutsystems in Erythrozyten, Megakaryozyten, eosinophilen Granulozyten und Mastzellen exprimiert. Für die Differenzierung von Erythrozyten und Megakaryozyten ist die Expression von *GATA1* von großer Bedeutung (Fujiwara *et al.*, 1996; Shivdasani *et al.*, 1997). Eine homozygote Mutation von *GATA1* in Mäusen führt zu einer Anämie aufgrund einer gestörten Erythrozytendifferenzierung und somit letztendlich zu embryonaler Letalität (Fujiwara *et al.*, 1996). Ein megakaryozytenspezifischer *knock out* von *GATA1* führt zur Anreicherung von unreifen Megakaryozyten und eine Verminderung von Thrombozyten (Shivdasani *et al.*, 1997). Ein zelllinienspezifisches Ausschalten des *GATA1* Gens hat einen Block der erythroiden Differenzierung auf der Stufe der Proerythroblasten mit nachfolgender Apoptose dieser Zellen zur Folge, wohingegen alle anderen Blutzelllinien weiter gebildet werden können (Pevny *et al.*, 1991; Pevny *et al.*, 1995; Weiss & Orkin, 1995).

2.22 Der Transkriptionsfaktor FOG1

FOG1 (*friend of GATA1*) ist ein Transkriptionsfaktor, der als GATA-Bindungspartner entdeckt wurde und die Aktivität des Bindungspartners beeinflusst, ohne selbst direkt an DNA zu binden (Hong *et al.*, 2005). Vier der neun Zink-Fingerdomänen können mit GATA1 interagieren. Mutations- und Deletionsanalysen der Zink-Fingerdomänen ergaben, dass die verschiedenen Domänen die erythroide und megakaryozytäre Differenzierung beeinflussen (Cantor, Katz & Orkin, 2002). *FOG1* weist dasselbe Expressionsmuster wie *GATA1* auf und wird in den erythroiden und megakaryozytären Zelllinien exprimiert. Wie bei *GATA1* wird auch bei *FOG1*-defizienten Mäusen ein Fehlen von reifen Megakaryozyten und megakaryozytären Vorläuferzellen sowie eine Blockierung in der Erythropoiese beobachtet (Tsang *et al.*, 1998).

2.3 Der Transkriptionsfaktor RUNX1

Die Megakaryozytendifferenzierung, ausgehend von der bipotenten megakaryozytären/erythroiden Vorläuferzelle, erfordert die Aktivierung von megakaryozytären Genen, während gleichzeitig erythrozytenspezifische Gene reprimiert werden. Die Differenzierungsrichtung hängt unter anderem von einer unterschiedlichen *RUNX1*-Expression ab: Während die *RUNX1*-Expression in frühen erythroiden Zellen sehr gering ist und während der Erythropoese weiter herunterreguliert wird, wird *RUNX1* während der Megakaryozytendifferenzierung stark exprimiert (Elagib *et al.*, 2003; Lorsbach *et al.*, 2004).

In der frühen Embryonalentwicklung nimmt *RUNX1*, auch *AML1*, *CBFA2* oder *PEBP2aB* genannt, eine entscheidende Rolle ein, da *RUNX1*-Null Mäuse embryonale Letalität (E 11,5-12,5) zur Folge haben. Mäuse mit einer konditionalen *RUNX1*-Deletion weisen eine reduzierte Thrombozytenanzahl und kleine, unreife Megakaryozyten auf (Ichikawa *et al.*, 2004; Putz *et al.*, 2006). Haploinsuffizienz von *RUNX1* beim Menschen führt zu familiären Thrombozytopenien (FPD) mit reduzierten Thrombozytenzahlen (Luddy *et al.*, 1978; Gerrard *et al.*, 1991). Umgekehrt induziert eine Überexpression von *RUNX1* in hämatopoietischen Zellen die Differenzierung der Zellen in Richtung Megakaryozyten (Niitsu *et al.*, 1997).

2.31 *RUNX1* in Leukämien

RUNX1 spielt, wie zuvor erwähnt, eine wichtige Rolle in der Hämatopoese und eine funktionelle Veränderung von *RUNX1*, durch Mutationen, Deletionen und chromosomalen Translokationen, führt zur Ausbildung von Leukämien. In Abbildung 2.4 ist die Verteilung der translokationsgenerierten Onkogene aufgeführt. Die resultierenden *RUNX1*-Fusionsproteine agieren häufig als dominant-negative Inhibitoren des normalen *RUNX1*-Genes (Look, 1997; Speck & Gilliland, 2002).

Die häufigste chromosomale Translokation in akuten myeloischen Leukämien (AML) zu 10-20% ist die t(8;21). Das Fusionsprotein beinhaltet den N-Terminus von *RUNX1*, inklusive der RUNT-Domäne, und das fast vollständige ETO-Protein (Miyoshi *et al.*, 1991). Das *RUNX1*-ETO-Fusionsprotein ist in der Lage Corepressoren zu rekrutieren und führt dann zu einer Reprimierung der Expression von *RUNX1*-Zielgenen (Meyers *et al.*, 1995). Eine weitere Translokation des Volllängen-*RUNX1* mit dem Transkriptionsfaktor TEL, t(12;21), wird in akuten lymphoblastischen Leukämien mit B-Zell-Ursprung (B-ALL) gefunden. 20-25% der Kinder mit dieser Krankheit weisen die t(12;21) Translokation auf (Golub *et al.*, 1995; Romana *et al.*, 1995). Neben den Translokationen werden in Leukämien Punktmutationen des *RUNX1*-Genes gefunden. In *de novo* AML liegen zu 5-10% Punktmutationen des *RUNX1*-Genes vor. Viele Mutationen sind in der RUNT-Domäne von *RUNX1* zu finden, welche die DNA-Bindung oder die Interaktion mit Cofaktoren beeinflussen (Osato *et al.*, 1999).

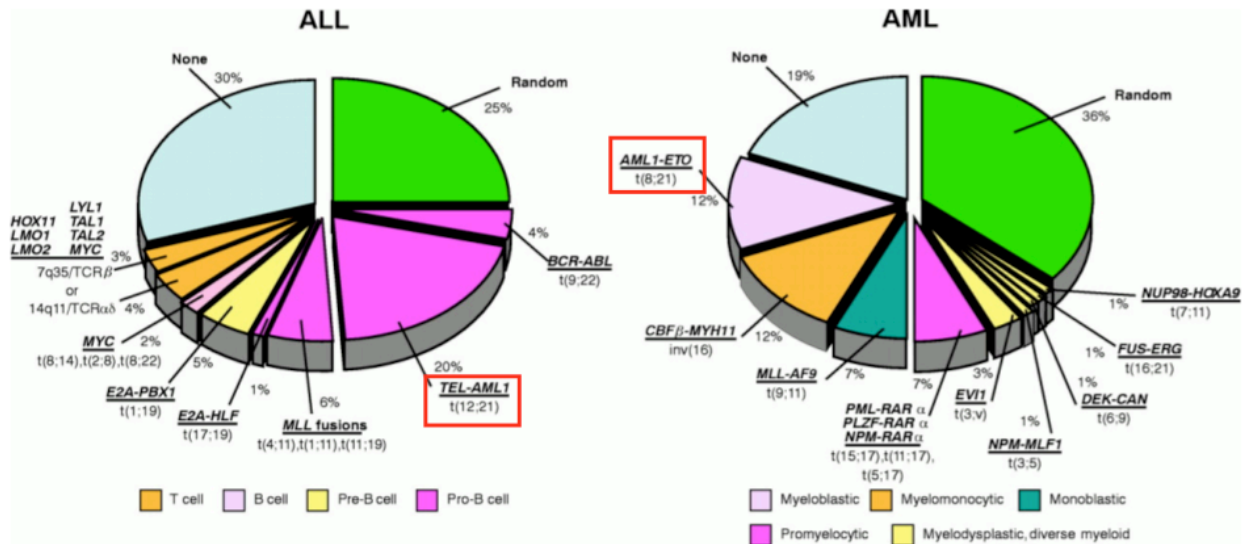


Abb. 2. 4: Die Häufigkeitsverteilung der translokations-generierten Onkogene in akuten Leukämien

Das Vorkommen der Translokationsproteine in akuten myeloischen (AML) und lymphoblastischen (ALL) Leukämien von Kindern und jungen Erwachsenen ist angegeben. "Random" bedeutet dabei sporadische Translokationen in Einzelfällen. In einigen Fällen von Leukämien sind keine spezifischen Genabnormalitäten identifizierbar ("None"), (modifiziert nach Look *et al.*, 1997).

Daneben wurden in dem C-Terminus von *RUNX1* Mutationen nachgewiesen. Einige dieser Mutationen resultieren in einer Leserasterverschiebung. Es kann dadurch zur Entstehung eines STOP-Codons und somit zu verkürzten Versionen von *RUNX1* führen (Harada & Harada, 2009). In familiären Thrombozytopenien (FPD/AML) werden ebenfalls *RUNX1*-Mutationen in einem Allel gefunden (Song *et al.*, 1999).

2.32 Die Domänenstruktur des Transkriptionsfaktors RUNX1

RUNX1 ist eines von drei hoch konservierten *RUNX*-Genen (*RUNX1-3*) der CBF-Proteinfamilie mit großen strukturellen Ähnlichkeiten (Levanon & Groner, 2004). Das *RUNX1*-Gen ist auf dem Chromosom 21q22 lokalisiert und besteht aus 10 Exons (1-6, 7A, 7B, 7C und 8). Seine Expression wird unter anderem über zwei Promotorbereiche gesteuert (Osato, 2004). Drei Spleiß-Varianten von *RUNX1* sind beschrieben (*RUNX1a-c*). Die Transkripte von *RUNX1a* und *RUNX1b* beginnen mit dem Exon 3 am proximalen Promotor, wohingegen das Transkript des distalen Promotors (*RUNX1c*) Exon 1 und 2 enthält und 27 Aminosäuren länger ist (Miyoshi *et al.*, 1995).

Alle Mitglieder der *RUNX1*-Familie enthalten eine DNA-Bindungsdomäne, die RUNT-Domäne (siehe Abb. 2.5). Das ist eine 127 Aminosäuren umfassende hoch konservierte Domäne, die große Ähnlichkeit mit dem *runt*-Gen von *Drosophila melanogaster* aufweist, welches in der Embryogenese eine große Rolle spielt.

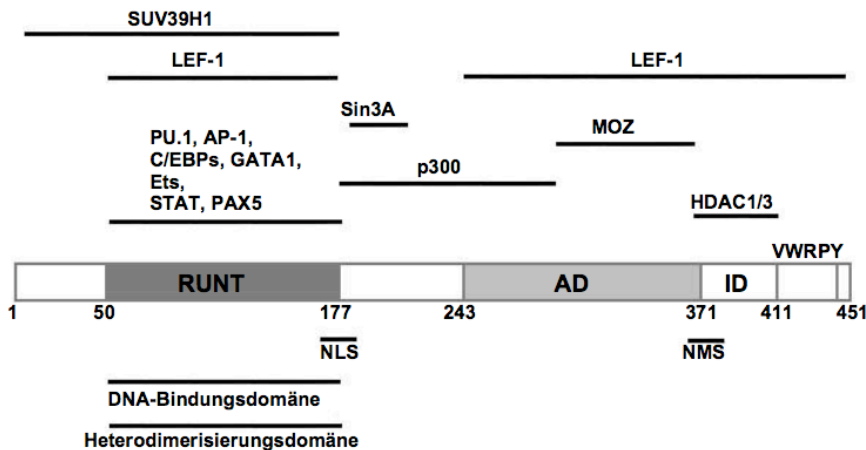


Abb. 2. 5: Die Domänenstruktur des hämatopoietischen Transkriptionsfaktors RUNX1 und interagierende Cofaktoren

RUNX1 besitzt eine DNA-Bindungsdomäne, die RUNT-Domäne, welche auch für die Heterodimerisation mit dem Cofaktor CBF β verantwortlich ist. Am C-Terminus von RUNX1 sind eine Transaktivierungsdomäne (AD), eine inhibitorische Domäne (ID) und das VWRPY-Motiv lokalisiert. Die Region des Kernlokalisierungssignales (NLS), des nukleären Matrixsignals (NMS), sowie die Interaktionsfläche mit einer Reihe von Cofaktoren sind angegeben (modifiziert nach Ito, 1999).

SUV39H1: *Suppressor of variegation 3-9 homolog 1*; LEF-1: *Lymphoid enhancer binding factor 1*; Sin3a: *SIN3 homolog A*; PU.1 (Spi1): *Spleen focus forming virus (SFFV) proviral integration oncogene spi1*; AP1: *Apetala1*; C/EBP: *CCAAT/enhancer binding protein*; GATA1: *GATA binding protein 1*; Ets: *Ets transcription factor*; STAT: *Signal-transducer and activator of transcription*; PAX5: *paired box 5*; p300: *E1A-associated protein p300*; MOZ: *Monocytic leukemia zinc finger protein*; HDAC: *Histone deacetylase*

Darüber hinaus ist die RUNT-Domäne die Interaktionsfläche für die Heterodimerisation mit dem Cofaktor CBF β , welcher weder eine DNA-Bindungsdomäne noch ein Kernlokalisierungssignal enthält. Diese Heterodimerisierung verstärkt die DNA-Bindungskapazität von RUNX1 durch die Induktion struktureller, allosterischer Veränderungen in der DNA-Bindungsoberfläche (Speck & Stacy, 1995; Kagoshima *et al.*, 1993).

An der C-terminal gelegenen Transaktivierungsdomäne werden verschiedene Domänen aktivierender Cofaktoren gebunden (Ito, 1999). Weiterhin befinden sich am äußeren C-terminalen Ende wie auch C-terminal der RUNT-Domäne Repressor- sowie Corepressorbindungsstellen (Kanno *et al.*, 1998; Lutterbach & Hiebert, 2000; Aronson *et al.*, 1997). Außerdem ist am C-Terminus ein Kernlokalisierungssignal (NLS) zu finden (Zeng *et al.*, 1997).

2.33 RUNX1-interagierende Transkriptionsfaktoren

Die Funktion von RUNX1 wird durch die Interaktion mit verschiedenen Transkriptionsfaktoren, Chromatin-modifizierenden Enzymen und Cofaktoren bestimmt.

Neben der *RUNX1*-Expression, ist die Expression von *GATA1* für die Differenzierung von Erythrozyten und Megakaryozyten von großer Bedeutung (siehe Abschnitt 2.21). Eine transkriptionelle Kooperation und Interaktion von *RUNX1* und *GATA1* bei der Aktivierung von megakaryozytären Promotoren konnte in Reporterassays gezeigt werden (Elagib *et al.*, 2003; Xu *et al.*, 2006).

Daneben konnte eine Interaktion von *RUNX1* mit *C/EBP α* und *PU.1* nachgewiesen werden, welche über die DNA-Bindungsdomänen vermittelt und die Transaktivator-domäne aller Proteine erfordert (Petrovick *et al.*, 1998). *C/EBP α* spielt eine wichtige Rolle bei der Entwicklung von Granulozyten und Monozyten und kooperiert mit *RUNX1* bei der Aktivierung von Linien-spezifischen Genen, wie *M-CSFR*, in myeloiden Zellen (Scott *et al.*, 1992; Zhang *et al.*, 1996). *PU.1* ist essentiell für die Myelopoese und reguliert mit *RUNX1* und *C/EBP* die Genexpression des CSF-1 Rezeptors (*c-fms*) (Scott *et al.*, 1994; Bonifer *et al.*, 2008).

Während der Differenzierung in Richtung Megakaryozyten aktiviert *RUNX1* mit *AP-1* und *ETS* Transkriptionsfaktoren megakaryozytenspezifische Gene. Die Expression von *AP-1* wird dabei zuerst durch *RUNX1* während der Differenzierung induziert (Pencovich *et al.*, 2011).

2.34 *RUNX1*-interagierende Cofaktoren

Neben der Interaktion von *RUNX1* mit dem Heterodimerisierungspartner *CBF β* , sind eine Reihe weiterer Coaktivatoren und Corepressoren bekannt, die die Funktion von *RUNX1* regulieren (siehe Abb. 2.5).

Ein bekannter Corepressor von *RUNX1* ist *Sin3a*. Die Interaktionsfläche von *RUNX1* mit *Sin3a* liegt C-terminal der *RUNX1*-Domäne (Ito, 1999). Das C-terminale *VWRPY*-Motiv von *RUNX1* ist für die Interaktion mit *Groucho/TLE*-Corepressoren verantwortlich. Die Reprimierungsaktivität von *RUNX1*, vermittelt durch das *VWRPY*-Motiv, spielt bei der frühen Entwicklung der T-Zelllinie eine wichtige Rolle (Aronson *et al.*, 1997; Javed *et al.*, 2000; Nishimura *et al.*, 2004). *RUNX1* interagiert darüber hinaus C-terminal mit den Histon-Deacetylasen *HDAC1* und *HDAC3*. Diese Histon-modifizierenden Enzyme entfernen Acetylgruppen, reprimieren somit die Genexpression und tragen zur Veränderung der Chromatinstruktur bei. Eine *RUNX1 S424D*-Mutante hat eine verminderte Affinität für die beiden Repressoren (Reed-Inderbitzin *et al.*, 2006; Guo & Friedmann, 2008). Die C-terminale Region von *RUNX1* ist ebenfalls verantwortlich für die Interaktion mit *p300*. *p300* katalysiert die Acetylierung der Lysine 14 und 18 des Histons *H3*, welche in aktiv transkribierten Regionen gefunden wird (Schiltz *et al.*, 1999; Vogelauer *et al.*, 2000). Eine Überexpression von *p300* stimuliert die transkriptionelle Aktivität von *RUNX1* (Kitabayashi *et al.*, 1998). Neben *p300* interagiert *RUNX1* auch mit der Histon-Acetyltransferase *MOZ*, welche als Coaktivator von *RUNX1* fungiert (Kitabayashi *et al.*, 2001). Als Zielgene beider Faktoren sind die Myeloperoxidase und das entzündungsspezifische Proteins *MIP-1 α* bekannt

(Bristow & Shore, 2003). RUNX1 kann darüber hinaus mit der Histon-Methyltransferase SUV39H1 interagieren. SUV39H1 ist eine SET-Domänen enthaltende Histonmethyltransferase, welche die Methylierung vom Lysin 9 des Histons 3 (H3K9) katalysiert. Durch die Interaktion beider Faktoren wird dann die DNA-Bindung von RUNX1 gestört (Chakraborty *et al.*, 2003). Kürzlich wurde eine Interaktion von RUNX1 mit der Protein Arginin Methyltransferase 1 (PRMT1) nachgewiesen (siehe auch 2.41 und 2.53). Für PRMT1 wurde die Methylierung des Histons 4 am Arginin 3 beschrieben, welche in aktiv transkribierten Chromatinbereichen gefunden wird (Wang *et al.*, 2001; Zhao *et al.*, 2008).

2.35 Posttranslationale Modifikationen von RUNX1

Der Aufbau eines Proteins ist von dem jeweiligen Gen kodiert und festgelegt. Die Struktur eines Proteins und seine biochemische Funktion wird durch die Aminosäuresequenz des Proteins (Primärstruktur), die spezifische Faltung der Polypeptidkette (Sekundär- und Tertiärstruktur), sowie mögliche Bindung mehrerer Polypeptidketten (Quartärstruktur) definiert. Darüber hinaus kann die Funktion eines Proteins nach der Translation auch noch beeinflusst werden. Posttranslationale Modifikationen (PTMs) sind eine wichtige Regulationsmöglichkeit für Proteine. Chemische Gruppen werden dabei kovalent an die Aminosäureseitenketten der Proteine verknüpft, wobei die Eigenschaften des Proteins wie die Ladungsverteilung verändert werden können. Proteine können in ihrer Aktivität, Lokalisation und Stabilität beeinflusst werden. Außerdem können Protein-Protein-Interaktionen durch PTMs verändert werden. Diese Veränderungen der Proteinfunktion können dann zu einer veränderten Expression von Zielgenen führen (Blyth, Cameron & Neil, 2005; siehe Abb. 2.6).

Transkriptionsfaktoren können durch Phosphorylierung, Acetylierung, Ubiquitinierung, SUMOylierung und Methylierung modifiziert werden. Daneben kommen Glykosylierung, ADP-Ribosylierung oder Biotinylierung von Proteinen vor (Wang *et al.*, 2009).

Phosphorylierung ist eine gut untersuchte Modifikation bei Transkriptionsfaktoren. Dabei wird durch die Enzymfamilie der Kinasen eine Phosphatgruppe von Adenosintriphosphat (ATP) auf die Hydroxylgruppe der jeweiligen Aminosäure übertragen. In Proteinen werden hauptsächlich drei Aminosäuren phosphoryliert, welche eine Hydroxygruppe in der Seitenkette besitzen: Serin, Threonin und Tyrosin. Serin ist die am häufigsten phosphorylierte Aminosäure. Eine Phosphorylierung hat in einigen Fällen eine Konformationsänderung des Proteins zur Folge. Transkriptionsfaktoren können auf diesem Weg über Signaltransduktionskaskaden aktiviert werden. Zusätzlich hat die Konformationsänderung auch Einfluss auf die Interaktion mit anderen Proteinen (Pawson, 2004).

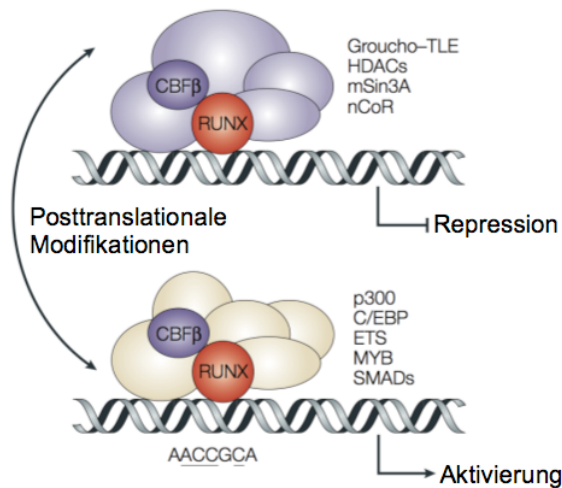


Abb. 2.6: Der Einfluss von posttranslationalen Modifikationen auf das Transaktivierungspotential von RUNX1

Die Interaktion von RUNX1 und dem Heterodimerisierungspartner CBF β mit Coaktivatoren bzw. Corepressoren könnte durch posttranslationale Modifikationen von RUNX1 beeinflusst werden. Das würde dann zu einer veränderten Expression von RUNX1-Zielgenen führen (modifiziert nach Blyth, Cameron & Neil, 2005).

Bei der Acetylierung wird eine Acetylgruppe kovalent mit einer Aminosäure verknüpft. Diese Reaktion wird durch Acetyltransferasen katalysiert. Das geschieht im Austausch mit Wasserstoffatomen an Hydroxyl-, Thiol-, und Aminogruppen. Acetylierung reguliert DNA-Protein Interaktionen, zelluläre Lokalisation, transkriptionelle Aktivität und Protein-Stabilität (Gu & Roeder, 1997; Kim *et al.*, 2006).

Bei Ubiquitinierung und SUMOylierung werden relativ große Moleküle an das Protein angehängt. Ubiquitin besteht aus 76 Aminosäuren und hat eine Molekülmasse von 8,5 kDa. Über ein C-terminales Glycin (G76) wird Ubiquitin an das zu markierende Protein gebunden. Man unterscheidet je nach Anzahl der verbundenen Ubiquitin-Moleküle zwischen einer Mono-, Oligo-, Multi- und Poly-Ubiquitinierung. Wenn mindestens fünf Ubiquitinmoleküle mit einem Zielprotein verbunden sind, spricht man von einer Poly-Ubiquitinierung und das so modifizierte Protein wird hauptsächlich dem Abbau durch das Proteasom zugeführt. Mono-, Multi-, sowie Oligo-Ubiquitinierungen hingegen beeinflussen die intrazelluläre Verteilung von Proteinen und können die Interaktion mit anderen Proteinen ermöglichen (Hershko & Ciechanover, 1992; Mukhopadhyay & Riezman, 2007).

SUMOylierte (*Small Ubiquitin-like Modifier*) Proteine besitzen um die 100 Aminosäuren und haben eine Molekülmasse von 12 kDa. Die exakte Länge und Molekülmasse variiert zwischen den verschiedenen Isoformen (SUMO 1-3). Obwohl keine Sequenzähnlichkeit besteht, weisen Ubiquitin und SUMO eine große Ähnlichkeit der strukturellen Faltung auf. SUMOylierung von

Proteinen verändert die Proteinstabilität, den Transport zwischen Nukleus und Zytoplasma und das Transaktivierungspotential (Cheng *et al.*, 2006).

Methylierung von Proteinen ist eine posttranslationale Modifikation, bei der eine Methylgruppe von S-Adenosyl-Methionin kovalent an ein Protein gebunden wird. Proteine können an Argininen, Lysinen und Histidinen modifiziert werden. Wie bei den anderen posttranslationalen Modifikationen hat die Methylierung einen Einfluss auf DNA-Protein Interaktionen, zelluläre Lokalisation, transkriptionelle Aktivität und Protein-Stabilität (Aletta, Cimato & Ettinger, 1998; Stallcup *et al.*, 2003; Smith *et al.*, 2004). Die Methylierung von Argininen ist für die vorliegende Arbeit von großer Bedeutung und wird in einem eigenen Teilabschnitt weiter erläutert (siehe 2.4).

RUNX1 kann durch die ERK1/2 Serin-/Threonin-Kinasen phosphoryliert werden. Die Aktivierung der Kinasen erfolgt durch Zytokine wie IL-3 und Thrombopoietin. An verschiedenen Stellen der Transaktivierungsdomäne (z.B. Serin 249 und 266) wird RUNX1 durch ERK1/2 phosphoryliert (Tanaka *et al.*, 1996). Die Phosphorylierung führt dann zu einer Dissoziation des Sin3a-Komplexes und verstärkt somit das Aktivierungspotential von RUNX1. In einigen Fällen wird phosphoryliertes RUNX1 ins Zytoplasma transportiert und anschließend durch Proteasomen degradiert (Tanaka *et al.*, 1996; Imai *et al.*, 2004). Des Weiteren kann RUNX1 mit der Lysin-Acetyltransferase p300 interagieren und an zwei konservierten Lysinen, Lysin 24 und 43, durch p300 modifiziert werden. Diese Acetylierung erhöht die DNA-Bindungskapazität und das Aktivierungspotential von RUNX1 (Yamaguchi *et al.*, 2004). Eine Phosphorylierung von RUNX1 an S276/T300/S303 verstärkt die Interaktion mit dem Coaktivator p300 (Aikawa *et al.*, 2006; Wee *et al.*, 2008). Darüber hinaus wurde bereits gezeigt, dass RUNX-Proteine durch Ubiquitin-Ligasen modifiziert und daraufhin degradiert werden. Eine Dimerisierung mit dem Cofaktor CBF β verhindert den Ubiquitin-Proteasom vermittelten Abbau (Huang *et al.*, 2001). Weiterhin kann RUNX1 durch die Protein Arginin Methyltransferase 1 (PRMT1) C-Terminal der RUNT-Domäne am RTAMR-Motiv methyliert werden. Diese Methylierung führt zur Dissoziation von RUNX1 vom Sin3a-Komplex und erhöht das Transaktivierungspotential von RUNX1 (Zhao *et al.*, 2008).

2.4 Protein Arginin Methyltransferasen

Arginin-Methylierung ist eine häufige posttranslationale Modifikation, die bei nukleären und zytoplasmatischen Proteinen gefunden wird. Diese Methylierung wird durch die Protein Arginin Methyltransferasen (PRMTs) katalysiert. 1967 wurden die ersten methylierten Derivate identifiziert (Paik & Kim, 1967). Die ersten Gene, welche für PRMTs kodieren, wurden jedoch erst in den 1990ern entdeckt (Gary & Clarke, 1998).

Arginin-methylierte Proteine sind bei einer Reihe von verschiedenen Prozessen, wie transkriptioneller Regulation, RNA-Metabolismus und DNA-Reparatur beteiligt (Bedford & Richard, 2005).

2.41 Die Struktur der Protein Arginin Methyltransferasen

Zurzeit sind neun Gene in Säugetieren bekannt, die für Proteine kodieren, die Methyltransferase-Aktivität besitzen (siehe Abb. 2.7): PRMT1-8 und PRMT10 (Bedford, 2007; Teyssier *et al.*, 2010). Zwei weitere Proteine (FBXO10 und PRMT9/FBXO11) werden weiterhin zur Familie der Protein Arginin Methyltransferasen gezählt (Cook *et al.*, 2006; Krause *et al.*, 2007).

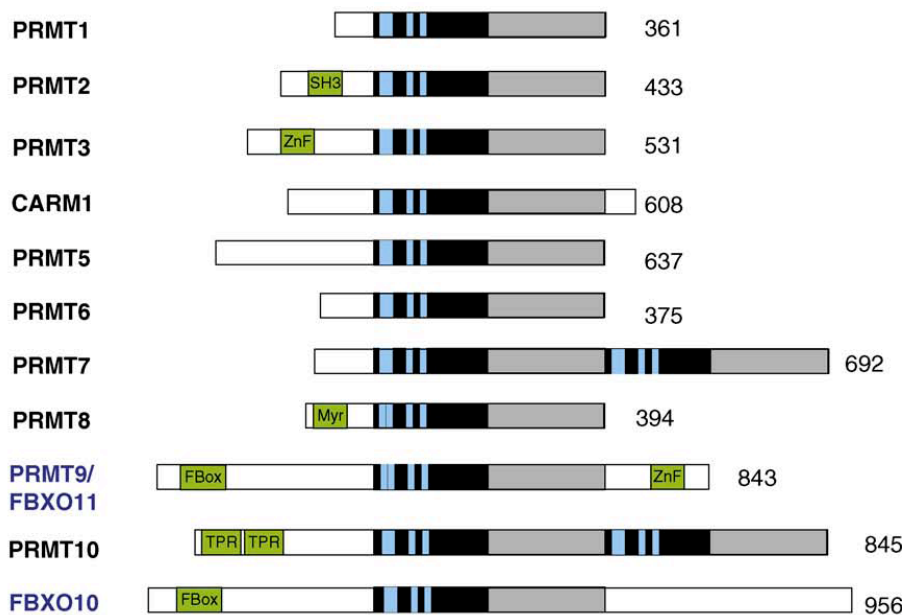


Abb. 2. 7: Die Familie der Protein Arginin Methyltransferasen (PRMTs)

In Säugerzellen sind neun PRMTs sowie zwei verwandte Mitglieder (PRMT9/FBXO11 und FBXO10) bekannt. Die konservierten Motive (I, post-I, II und III) sind als blaue Balken dargestellt und bilden mit der Rossmann-Falte (schwarz) die S-Adenosyl-L-Methionin (SAM)-Bindungsdomäne. Die Substratbindungsdomäne, welche aus der siebensträngigen β -Faltblattstruktur und dem *THW-loop* besteht, ist grau markiert. Spezifische Motive wie die SH3-Domäne (SH3), Zinkfinger-Motive (ZnF), Myristoylierungs-Motiv (Myr), das F-Box-Motiv (FBox) und das Tetratricopeptid-Motiv (TPR) sind als grüne Boxen gekennzeichnet (Teyssier *et al.*, 2010).

Arginin Methyltransferasen sind evolutionär konserviert von Hefe, Würmern, Fliegen, Pflanzen bis hin zu Säugetieren, werden jedoch nicht in Prokaryoten gefunden (Gary & Clarke, 1998; Boulanger *et al.*, 2005).

Drei strukturelle Untergruppen von S-Adenosyl-L-Methionin abhängigen Methyltransferasen lassen sich unterscheiden (Katz *et al.*, 2003). Die größte Klasse (Klasse 1) besitzt eine siebensträngige β -Faltblattstruktur. Die zweite Klasse setzt sich aus SET-Lysin Methyltransferasen zusammen und die dritte Klasse besteht aus membranassoziierten Methyltransferasen. Protein Arginin Methyltransferasen gehören der ersten Klasse an und besitzen vier konservierte Motive (I, post-I, II und III), eine *double E loop*-Struktur, sowie eine *THW-Loop*-Struktur (Katz *et al.*, 2003). Die hochkonservierte S-Adenosyl-L-Methionin (SAM)-Bindungsdomäne wird aus den vier konservierten Motiven und der *double E loop*-Struktur gebildet. Sie enthält einen Teil, der für die Bindung des Methylgruppendonors zuständig ist und besteht aus der so genannten Rossmann-Falte (siehe Abb. 2.8). Die SAM-Bindungsdomäne, sowie eine weniger konservierte Substratbindungsstelle besitzt jede Protein Arginin Methyltransferase (Zhang *et al.*, 2000). Sie bilden zusammen die katalytische Domäne der PRMTs. Die Substratbindungsstelle liegt in Form einer siebensträngigen β -Faltblattstruktur vor und beinhaltet den *THW-loop*.

Neben den konservierten Motiven sind die N- und C-terminalen Abschnitte für jede PRMT spezifisch. Am N-Terminus von PRMT2 befindet sich zusätzlich eine SH3-Domäne. Diese Domäne vermittelt die Bindung eines hnRNP-Proteins (Kzhyshkowska *et al.*, 2001). PRMT3 besitzt keine siebensträngige β -Faltblattstruktur, sondern eine verkürzte Version (Zhang *et al.*, 2000). Daneben ist bei PRMT3 N-terminal ein Zinkfinger-Motiv zu finden, welches für die Methylierung von artifiziellen Substraten nicht essentiell, aber für die Erkennung und Methylierung von RNA-bindenden Substraten notwendig ist (Frankel & Clarke, 2000). PRMT7 und PRMT10 besitzen jeweils zwei katalytische Domänen. PRMT8 ist eine membran-assoziierte, gewebespezifische Arginin Methyltransferase. Die Myristoylierung eines spezifischen Motivs am N-Terminus führt zur Assoziation von PRMT8 mit der Plasmamembran (Lee *et al.*, 2005). Die Methyltransferasen PRMT9/FBXO11 und FBXO10 enthalten beide ein F-Box-Motiv. Dieses Motiv wird bei einigen Zellzyklus regulierenden Proteinen gefunden und vermittelt ubiquitinabhängige proteolytische Spaltung durch den SCF Ubiquitin Ligase Komplex (Kumar & Paietta, 1998; Cardozo & Pagano, 2004).

Im Jahre 2000 wurde die Struktur der katalytischen Domäne von PRMT3 (Ratte) aufgelöst (Zhang *et al.*, 2000). Die Kristallstruktur der konservierten Region von PRMT1 (Ratte) wurde 2003 aufgedeckt (Zhang & Cheng, 2003). 2007 wurde die Struktur der Kern-Domäne von CARM1/PRMT4 (Maus) entschlüsselt (Yue *et al.*, 2007).

In Abbildung 2.8 ist die Kristallstruktur von PRMT1 dargestellt. Die konservierte SAM-Bindungsdomäne ist in grün und die Substratbindungsstelle mit der siebensträngigen β -Faltblattstruktur ist in gelb hervorgehoben. Weiterhin sind die N-terminale Helix von PRMT1

(rot) und der Dimerisierungsarm (blau) hervorgehoben. Zusätzlich mit abgebildet sind das gebundene Produkt S-Adenosyl-Homocystein (AdoHcy) in grau und das Arginin des Substrats in dunkelblau.

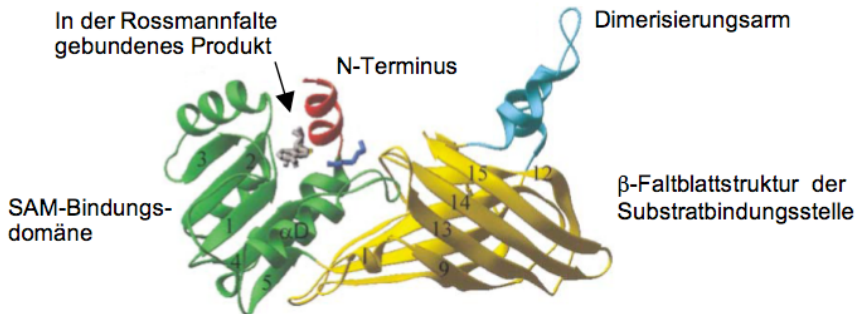


Abb. 2. 8: Die Kristallstruktur der Protein Arginin Methyltransferase 1 (PRMT1)

Dargestellt sind die konservierte SAM-Bindungsdomäne (grün), die Substratbindungsdomäne (gelb), der N-Terminus (rot), der Dimerisierungsarm (hellblau). Außerdem sind das gebundene Produkt S-Adenosyl-homocystein (AdoHcy) (grau) und das Substratarginin (dunkelblau) mit abgebildet (Zhang & Cheng, 2003).

2.42 Mechanismus der Arginin Methylierung

Die Guanidino-Gruppe kann auf drei verschiedene Arten methyliert werden (siehe Abb. 2.9): Monomethylierung (MMA), symmetrische Dimethylierung (SDMA) und asymmetrische Dimethylierung (ADMA). Am häufigsten tritt dabei eine Dimethylierung auf (Paik & Kim, 1980). Unter physiologischen Bedingungen enthält die Seitenkette von Argininen eine positive Ladung an der Guanidinogruppe. Eine Methylierung dieser Gruppe verändert die Bindungseigenschaften dieser Aminosäure. Wasserstoffbrückenbindungen, sterische und hydrophobe Eigenschaften werden dadurch verändert (Hughes & Waters, 2006).

Protein Arginin Methyltransferasen werden in verschiedene Enzymgruppen unterteilt (Typ I-IV). Die Enzymgruppen I-III methylieren terminale (ω) Guanidino-Stickstoffatome und katalysieren somit eine Monomethylierung. Die PRMTs übertragen dabei Methylgruppen vom Cofaktor S-Adenosyl-L-Methionin auf das Stickstoffatom der Guanidinogruppe der Argininseitenkette. Dabei entsteht S-Adenosyl-L-Homocystein (Gary & Clarke, 1998).

Typ I-Enzyme (PRMT1, 3, 4, 6 und 8) führen nach der Monomethylierung eine asymmetrische Dimethylierung (aDMA) aus, wohingegen Typ II-Enzyme (PRMT5, PRMT7 und PRMT9/FBXO11) die Formation von symmetrisch methyliertem Dimethylarginin (sDMA) katalysieren. PRMT5 ist das einzige reine Typ II-Enzym (Branscombe *et al.*, 2001). PRMT7 und PRMT9/FBXO11 können symmetrische wie auch die asymmetrische Methylierung katalysieren (Lee *et al.*, 2005b; Cook *et al.*, 2006). Daneben kann PRMT7 auch Substrate monomethylieren (Typ III), ohne eine Dimethylierung durchzuführen (Bedford, 2007). Typ IV-Enzyme wurden in

Saccharomyces cerevisiae beschreiben und katalysieren die Monomethylierung von internen (δ) Guanidino-Stickstoffatomen (Niewmierzycka & Clarke, 1999).

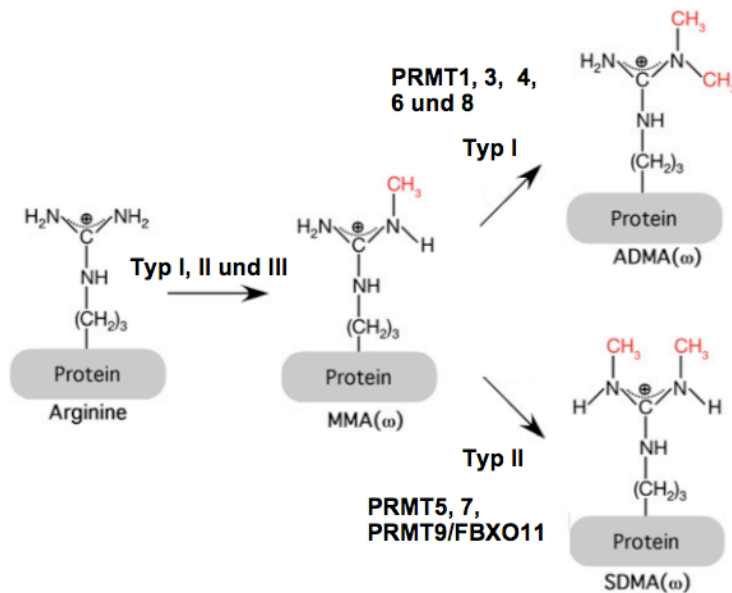


Abb. 2. 9: Mechanismus der Arginin-Methylierung durch PRMTs

Typ I, II und III-Enzyme katalysieren Monomethylarginin (MMA) von einem terminalen (ω) Guanidino-Stickstoffatom. Asymmetrische omega-N^G, N^G-Dimethylarginine (ADMA) werden durch Typ I-Enzyme (PRMT1, 3, 4, 6 und 8) generiert, während symmetrische Dimethylierung von Typ II-Enzymen (PRMT5, 7 und PRMT9/FBXO11) katalysiert wird. Typ III-Enzyme führen nur eine Monomethylierung durch (modifiziert nach Bedford & Clarke, 2009).

Obwohl PRMT2 eine hohe Sequenzhomologie zu PRMT1 aufweist, konnte für humanes PRMT2 bislang noch keine enzymatische Aktivität nachgewiesen werden. Ebenso wurden PRMT10 und FBXO10 noch nicht näher beschrieben und die Enzymaktivität konnte bislang noch nicht gezeigt werden (Bedford & Clarke, 2009).

2.43 Substrate und Funktion der Protein Arginin Methyltransferasen

Die Substratspezifität von Protein Arginin Methyltransferasen ist noch nicht genau aufgeklärt. Es werden immer mehr neue Substrate für Protein Arginin Methyltransferasen, insbesondere für Typ I-Enzyme, gefunden. Einige Substrate sind RNA-assoziierte Proteine, welche in der RNA-Prozessierung oder dem Transport involviert sind (Gary & Clarke, 1998). Glycin-Arginin-reiche Sequenzen (GAR-Motive) sind bevorzugte Substrate einiger PRMTs (Najbauer *et al.*, 1993). Als Substrate von PRMT1 sind die Sequenzen GGRGRGG aus Fibrillarin und GGRGGS aus hnRNP (*heterogeneous nuclear ribonuclear protein*) beschrieben (Kim *et al.*, 1997; Gary & Clarke, 1998). Die Arginine der N-terminalen RGFGRGGRGGRGRGRRRG-Sequenz von dem 40S ribosomalen Protein S2 (rpS2) sind Methylierungsstellen von PRMT3 (Bachand &

Silver, 2004). Daneben werden die N-Termini von Histonen bevorzugt von PRMTs methyliert, welche jedoch nicht immer GAR-Motive aufweisen (Paik & Kim, 1967).

Insbesondere bei Peptidstudien werden einzelne methylierte Arginine von PRMT-Substraten gefunden. Jedoch enthalten viele Proteine, welche von PRMTs modifiziert werden, eine größere Anzahl von methylierten Argininen (Kölbel *et al.*, 2009).

Protein Arginin Methyltransferasen sind ubiquitär exprimierte Enzyme. PRMT1 ist die vorherrschende Methyltransferase in Säugerzellen und ist für 85% der gesamten Protein Arginin Methylierung in RAT1 Fibroblasten zuständig (Tang *et al.*, 2000). PRMT1 ist im Nukleus und im Zytoplasma lokalisiert und besitzt in beiden Kompartimenten Substrate (Herrmann *et al.*, 2005). Es wurde gezeigt, dass PRMT1 hnRNP Moleküle methylieren kann, was den Übergang zwischen Nukleus und Zytoplasma dieser Proteine beeinflusst (Herrmann *et al.*, 2004). Das Arginin R3 von Histon 4 ist eine Methylierungsstelle (SGRGK-Motiv) von PRMT1 und führt zu einer Aktivierung der Transkription (Wang *et al.*, 2001). Zhao und Kollegen konnten 2008 zeigen, dass RUNX1 durch PRMT1 an einem SGRGK-Motiv C-terminal der RUNT-Domäne methyliert wird, was eine Dissoziation des Sin3a-Corepressorkomplexes zur Folge hat (Zhao *et al.*, 2008).

PRMT4 wird auch *Coactivator Associated Methyltransferase 1* (CARM1) genannt, da sie mit verschiedenen Coaktivatoren interagiert und die Genexpression von Zielgenen aktiviert. Unter anderem geht CARM1 Bindungen mit der p160 Proteinfamilie, p300/CBP und AIB1 ein (Chen *et al.*, 1999; Bedford & Richard, 2005). Außerdem interagiert CARM1 mit dem Chromatin-Remodeller Brg1 und anderen Komponenten des SWI/SNF-Komplexes (Xu *et al.*, 2001). *Splicing* Faktoren sind ebenfalls Substrate von CARM1, wodurch Transkription und *Splicing* gekoppelt reguliert werden (Cheng *et al.*, 2007). CARM1 methyliert das Histon H3 am R17 und R26. Die Aktivierung des pS2 Genes wurde mit der Methylierung dieser Stellen in Verbindung gebracht (Schurter *et al.*, 2001; Ma *et al.*, 2001).

PRMT1 und CARM1 spielen eine zentrale Rolle bei der Regulation der Proteinfunktion, was bei *knock out* Mausexperimenten deutlich wird. PRMT1^{-/-} Mäuse sterben direkt nach der Implantation vor Tag E6.5 (Pawlack *et al.*, 2000). CARM1^{-/-} Mäuse sind bei der Geburt kleiner als die Wildtypmäuse und nicht lebensfähig (Yadav *et al.*, 2003). Ein *knock out* von PRMT1 oder CARM1 resultiert in einer Anreicherung von hypomethylierten Substraten *in vivo*, was darauf schließen lässt, dass diese beiden PRMTs nicht durch andere ersetzbar sind (Pawlak *et al.*, 2002; Kim *et al.*, 2004). Eine Kooperation von PRMT1 und CARM1 konnte zumeist bei der Aktivierung, aber auch in einigen Fällen bei der Reprimierung von Genen, mittels cDNA *microarray* Analyse von siRNA-vermitteltem *knock down* beider PRMTs gefunden werden (Kleinschmidt *et al.*, 2008). Eine Coaktivatorfunktion von PRMT1 und CARM1 wurde bei

verschiedenen Transkriptionsfaktoren wie p53, NF- κ B oder STAT5 beschrieben (An *et al.*, 2004; Hassa *et al.*, 2008; Kleinschmidt *et al.*, 2008).

Die Protein Arginin Methyltransferasen 3 und 8 unterscheiden sich von den anderen durch ihre spezialisierte Lokalisation. PRMT3 ist die einzige hauptsächlich zytosolische Protein Arginin Methyltransferase (Tang *et al.*, 1998). Das ribosomale Protein rpS2 ist ein Zinkfinger-abhängiges Substrat von PRMT3 und kann somit nicht von anderen Methyltransferasen methyliert werden (Swiercz *et al.*, 2005). PRMT3^{-/-} Embryonen sind kleiner als der Wildtyp, erreichen aber nach der Geburt die Normalgröße (Swiercz *et al.*, 2007). PRMT8 wird vornehmlich im Gehirn exprimiert und ist die einzige Membran-assoziierte PRMT. Es konnte eine Interaktion von PRMT8 mit PRMT1 und PRMT2 gezeigt werden (Lee *et al.*, 2005).

PRMT5 ist das hauptsächliche Typ II-Enzym in Säugerzellen und hat verschiedene Bindungspartner in Zytoplasma und Nukleus. Die Methylierung von Histonen ist für PRMT5 ebenfalls beschrieben. Die Interaktion von PRMT5 und COPR5 (*cooperator of PRMT5*) resultiert in der Methylierung von H4R3 sowie H3R8. Daneben wurde im Gegensatz zu PRMT1 und CARM1 beschrieben, dass PRMT5 eine Corepressorfunktion besitzt, welche auch von COPR5 abhängt (Lacroix *et al.*, 2008).

PRMT2, PRMT7, PRMT9/FBXO11, PRMT10 und FBXO10 sind derzeit am wenigsten charakterisiert. Bislang konnte für PRMT2, PRMT10 und FBXO10 noch keine Methyltransferaseaktivität nachgewiesen werden. PRMT2 ist als Coaktivator für den Angrogenrezeptor und Extrogenrezeptor α beschrieben (Meyer *et al.*, 2007). Die Enzymaktivität von PRMT7 wird kontrovers diskutiert: Typ II und Typ III-Aktivität wird in verschiedenen Experimenten bestätigt (Miranda *et al.*, 2004; Lee *et al.*, 2005b).

2.44 Die Protein Arginin Methyltransferase 6 (PRMT6)

Im Vergleich mit den anderen Protein Arginin Methyltransferasen besitzt PRMT6 alle konservierten Struktur motive der PRMT Familie, weist jedoch keine weiteren bekannten Motive außerhalb der katalytischen Domäne auf (siehe Abb. 2.7). PRMT6 ist im Nukleus lokalisiert. Außerdem wird PRMT6 durch seine Automethylierung charakterisiert. Es konnte eine Typ I-Enzymaktivität nachgewiesen werden: PRMT6 ist in der Lage die Produktion von sowohl monomethyliertem, als auch asymmetrisch dimethyliertem Arginin zu katalysieren (Frankel *et al.*, 2002).

Ein Methylierungssubstrat von PRMT6 ist das HIV Transaktivatorprotein Tat, welches eine Arginin reiche Transaktivierungsdomäne besitzt und darüber die Transkription stimuliert. Die Arginine 52 und 53 der Sequenz 46-RKKRRQRRRAPQDSQ-60 der Transaktivator domäne werden durch PRMT6 methyliert. Das hat eine Reduktion des Transaktivierungspotentials des Tat-Proteins zur Folge und beeinflusst somit die virale Vermehrung negativ (Boulanger *et al.*, 2005).

PRMT6 interagiert ebenfalls mit der DNA Polymerase β und methyliert diese *in vitro* und *in vivo*. Durch die Modifikation wird die DNA-Bindung und die Prozessivität und somit die Polymeraseaktivität erhöht. Die Arginine 83 und 152 wurden dabei als Methylierungsstellen identifiziert, welche jedoch nicht ein Teil von GAR-Motiven sind. PRMT6 spielt somit eine wichtige Rolle bei der Regulierung der Reparatur von DNA-Strangbrüchen (El-Andalousi *et al.*, 2006).

Ein weiteres Substrat ist das nukleäre HMGA1a-Proteins (*high-mobility group A*). Gebunden an die kleine Furche AT-reicher DNA-Sequenzen, regulieren diese Proteine die Assemblierung von Nukleoprotein-DNA Komplexen. Die Funktion von HMGA-Proteinen wird durch posttranslationale Modifikationen reguliert (Miranda *et al.*, 2005). Massenspektrometrische Analysen konnten die Arginine 57 und 59 des HMGA1a Proteins als Methylierungsstellen von PRMT6 lokalisieren (Sgarra *et al.*, 2006).

PRMT6 kann darüber hinaus Histone als Substrate erkennen: Die Histone H3 und H4 werden von PRMT6 *in vitro* methyliert. Für die H3R2-Methylierung ist PRMT6 das hauptsächliche Enzym. Die antagonistische Funktion der H3R2-Methylierung zur H3K4-Methylierung durch den MLL-Komplex ist sehr gut beschrieben (Hyllus *et al.*, 2007; Guccione *et al.*, 2007). Dies wird in einem weiteren Abschnitt (siehe 2.52) näher behandelt.

2.5 Der Histoncode

Die DNA galt lange Zeit als alleiniger Informationsträger für die Vererbung. Den "Verpackungsproteinen" der DNA, den Histonen, wurde früher eine rein strukturelle Bedeutung zugeschrieben. Histone können jedoch ebenfalls Informationsträger sein und die Information von Zelle zu Zelle weitergeben. Dafür können Histone durch verschiedene posttranslationale Modifikationen verändert werden. Einzelne Modifikationen oder Kombinationen werden dann von Effektmolekülen abgelesen und haben Auswirkungen auf die Prozesse an diesem Chromatinabschnitt. Die Existenz dieses Histoncodes wurde das erste Mal von Strahl und Allis im Jahr 2000 vorgeschlagen (Strahl & Allis, 2000). Die Histonmodifikationen legen fest in welcher Struktur das Chromatin vorliegt und welche Chromatin-bindenden Proteine rekrutiert werden. Dadurch werden Prozesse am zugehörigen Chromatinabschnitt wie Genexpression, DNA-Reparatur oder DNA-Replikation reguliert (Balint *et al.*, 2005; Kouzarides, 2007).

2.51 Die Struktur des Chromatins

In eukaryotischen Zellen ist das genetische Material in einer komplexen Struktur aus DNA und Proteinen, dem Chromatin, organisiert. Das Chromatin ist die am stärksten kondensierte Form der DNA (siehe Abb. 2.10).

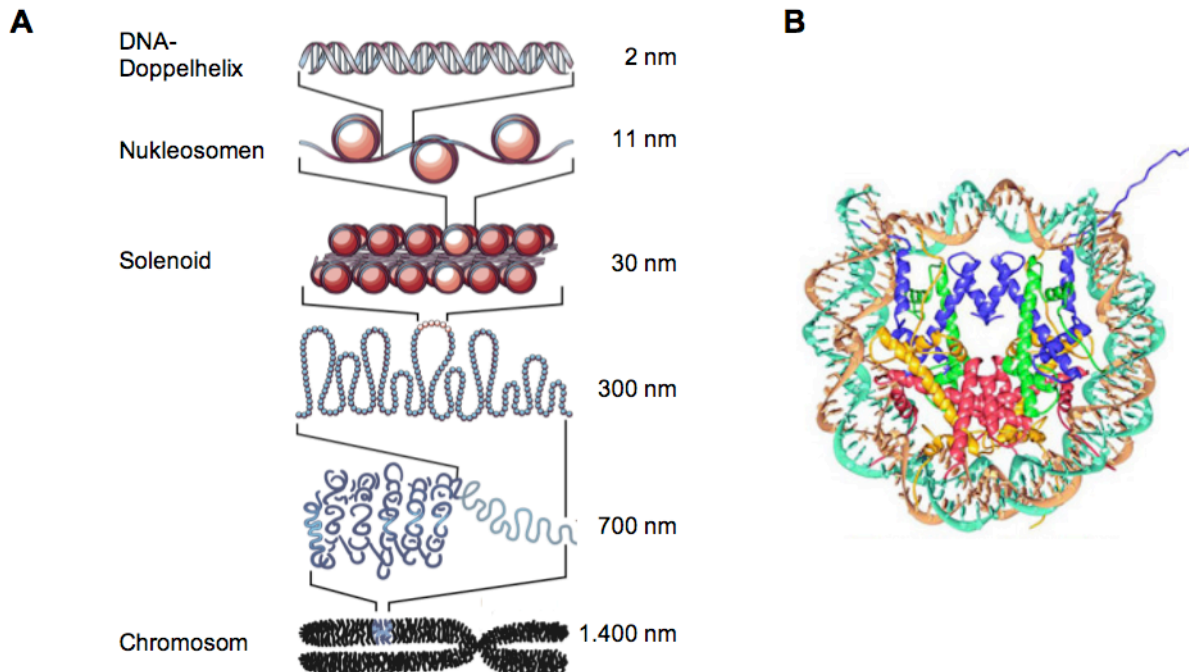


Abb. 2. 10: Schematische Darstellung der Chromatin- und Nucleosomenstruktur

(A) Darstellung des Aufbaus von Chromatin in eukaryotischen Zellen. DNA und Histonproteine bilden die Nucleosomen, die kettenförmig aneinander gereiht sind. Die Nucleosomenreihe wird weiter zu Solenoiden (30 nm-Faser) aufgewunden. Durch weitere Schleifenbildung entsteht der höchste Kondensationsgrad, das Chromosom. (B) Die Struktur eines Nucleosoms. 147 bp DNA sind in einer linksgewundenen α -Helix um ein Histonoktamer der Histone H2A (gelb), H2B (rot), H3 (blau) und H4 (grün) gewunden (modifiziert nach Felsenfeld & Groudine, 2003).

Die kleinste Einheit des Chromatins ist das Nucleosom, welches aus einem Histonoktamer und ca. 147 bp DNA besteht, die um den Proteinkern gewunden ist (Luger *et al.*, 1997). Histone sind kleine (11-14 kDa) basische Proteine, welche evolutionär konserviert sind. Der basische Gehalt ergibt sich aus dem hohen Anteil der Aminosäuren Lysin und Arginin. Fünf Hauptklassen von Histonen sind bekannt: H1, H2A, H2B, H3 und H4. Alle Histonklassen teilen strukturelle Motive: Ein N-terminales Ende, eine globuläre α -helikale Domäne und ein C-terminales Ende. Über ionische Wechselwirkungen binden die Histone an die negativ geladenen Phosphatgruppen der DNA. Darüber hinaus gibt es Wasserstoffbrückenbindungen und nicht polare Wechselwirkungen zwischen der DNA und den Histonproteinen (Arents & Moudrianakis, 1995; Luger & Richmond, 1998).

Ein Histonoktamer besteht aus einem H3-H4 Tetramer und zwei H2A-H2B-Dimeren. Das Histon H1 ist nicht an dem Nukleosomenzentrum beteiligt, sondern ist an die DNA gebunden. Die Nukleosomen wickeln sich spulenförmig auf und bilden eine 30 nm-Faser, die als Solenoid bezeichnet wird. Weitere Faltung und Schlaufenbildung führt dann zur vollendeten Kondensation und Bildung des Chromosomens (Luger *et al.*, 1997).

2.52 Posttranslationale Modifikationen an Histonen

Bereits Mitte der 1960er Jahre erfolgte die erste Beschreibung von posttranslational modifizierten Histonen (Allfrey *et al.*, 1964). Seitdem wurden verschiedene Modifikationen der N-Termini von Histonen beschrieben wie Acetylierung, Methylierung, Phosphorylierung, Ubiquitylierung, SUMOylierung, ADP-Ribosylierung, Biotinylierung und Citrullinierung. Neuerdings wurde eine Lysin-Formylierung entdeckt (Jiang *et al.*, 2007). Verschiedene Aminosäuren können darüber hinaus durch dieselbe Art von posttranslationaler Modifikation verändert werden: Serine und Threonine können von verschiedenen Kinasen phosphoryliert werden. Lysine können durch Histon Acetyltransferasen oder durch Lysin Methyltransferasen modifiziert werden. Dabei können Lysine mit ein, zwei oder drei Methylgruppen versehen werden. Bei Argininen tritt eine Mono- oder Dimethylierung auf. Die Argininseitenketten können durch PRMTs entweder symmetrisch oder asymmetrisch methyliert werden (Kouzarides, 2007). Es treten jedoch nicht nur einzelne Modifikationen von Aminosäuren der Histonenden auf. Die verschiedenen Modifikationen beeinflussen sich gegenseitig. Dabei ergeben sich viele Möglichkeiten wie diese aufeinander wirken: sie können sich gegenseitig ausschließen, kooperativ wirken oder unabhängig voneinander fungieren (siehe Abb. 2.11).

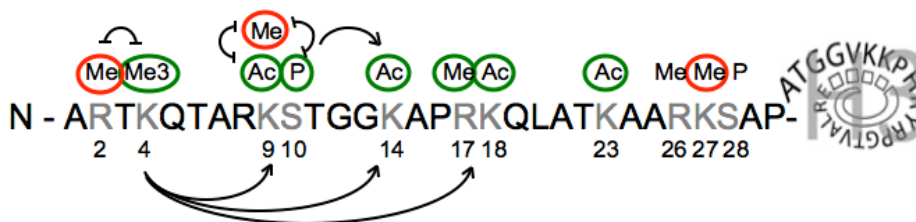


Abb. 2. 11: Histonmodifikationen am N-Terminus des Histons H3

Zusammenspiel von verschiedenen Histonmodifikationen am N-Terminus des Histons 3: Modifikationen, die aktivierend auf die Genexpression wirken, sind in grün, reprimierende Histonmodifikationen in rot dargestellt. Einige Modifikationen schließen sich gegenseitig aus (Balken) oder induzieren andere Modifikationen (Pfeil) (modifiziert nach Jenuwein & Allis, 2001).

Die Acetylierung eines der Lysine K4, K9, K14 und K18 am Histon 3 durch Histon Acetyltransferasen führt zu einer verstärkten Modifikation der anderen Lysine. Generell trägt die Acetylierung von Lysinen zur Öffnung der Chromatinstruktur bei, was wiederum in eine aktive

Transkription resultiert (Zhang *et al.*, 1998). Das Entfernen dieser Acetylgruppen durch Histon Deacetylasen (HDAC), zum Beispiel durch HDAC1, dagegen hat die Repression der Genexpression zur Folge (Pazin & Kadonaga, 1997). Die Methylierung von Lysin 9 an Histon 3 (H3K9me) wird durch die Lysin Methyltransferase SUV39H1 katalysiert und markiert in Säugern fakultatives oder konstitutives transkriptionell inaktives Heterochromatin. Die K9 Methylierung ist somit eine repressive Histonmarkierung (Rice *et al.*, 2003). Im Gegensatz dazu führt die Acetylierung derselben Aminosäure zu offenem, transkriptionell aktivem Chromatin (Bernstein *et al.*, 2005). Histon H3 N-Termini, welche am S10 phosphoryliert sind, werden von H3K14 Acetyltransferasen (z.B. Gcn5) bevorzugt (Lo *et al.*, 2000). Umgekehrt verhindert die Phosphorylierung des H3S10 die Methylierung des H3K9 durch SUV39H1. Die Rekrutierung von HP1 (*heterochromatin protein 1*) ist in Folge dessen gestört (Rea *et al.*, 2000; Fischle *et al.*, 2003). Die aktivierende Acetylierung von H3K14 und die reprimierende Methylierung von H3K9, schließen sich somit über die H3S10 Phosphorylierung gegenseitig aus. Für die Protein Arginin Methyltransferase 1 wurde die Methylierung des Histons 4 am Arginin 3 beschrieben (Wang *et al.*, 2001). CARM1 hingegen methyliert H3R17 und H3R26 (Schurter *et al.*, 2001; Ma *et al.*, 2001). Während der Östrogen-Rezeptor-vermittelten Genaktivierung konnte eine sequentielle Funktion dieser Histonmodifikationen nachgewiesen werden. Nach Östrogen-Stimulation wurde die H4R3-Methylierung durch PRMT1 gefunden. Anschließend acetylieren an den Promotor rekrutierte Histonacetyltransferasen H3K14, H3K18 und H3K23. Dies wiederum führt zur Methylierung von R17 in Histon H3 durch CARM1 (Bauer *et al.*, 2002). Somit haben diese Histonmodifikationen einen Einfluss aufeinander und führen letztendlich zur Aktivierung der Transkription des Genes.

Asymmetrische H3R2-Dimethylierung wird durch die Protein Arginin Methyltransferase 6 *in vitro* und *in vivo* katalysiert. Wie in Abbildung 2.12 veranschaulicht, inhibiert die H3R2-Methylierung die Rekrutierung des MLL-Methyltransferasekomplexes (Guccione *et al.*, 2007; Hyllus *et al.*, 2007).

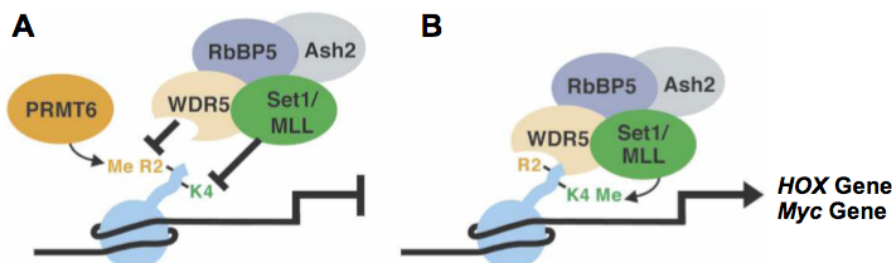


Abb. 2. 12: Model der Auswirkungen der antagonistischen Histonmodifikationen H3R2me2 und der H3K4me3

(A) Die Dimethylierung vom Arginin 2 an Histon 3 durch PRMT6 blockiert die Bindung des MLL/WDR5- Methyltransferasekomplexes, inhibiert die Trimethylierung von H3K4 und führt somit zu Reprimierung der Transkription. (B) Bei einem Verlust von PRMT6 kann der Methyltransferasekomplex binden, H3K4 methylieren und somit die Transkription aktivieren (Hyllus *et al.*, 2007).

Die Enzyme der MLL-Familie (SET1A; MLL1-4) katalysieren die Trimethylierung des H3K4. Die MLL-Methyltransferase besitzt einen zentralen Komplex bestehend aus MLL/SET, WDR5, Ash2 und RbBP5 (Milne *et al.*, 2002). Die Untereinheiten WDR5, Ash2 und RbBP5 bilden eine strukturelle Plattform, welche die jeweilige enzymatisch aktive Untereinheit SET1A/MLL1-4 bindet. Die Trimethylierung des H3K4 ist maßgeblich an der Genregulation beteiligt. Die Genexpression der *Hox*-Gene wird durch die Promotor-Bindung der K4-Methyltransferase MLL reguliert (Milne *et al.*, 2002). Eine Überexpression von PRMT6 führt einer erhöhten H3R2-Dimethylierung und zu einer verminderten H3K4-Trimethylierung (Hyllus *et al.*, 2007).

Des Weiteren gibt es einen Zusammenhang zwischen H3K4-Trimethylierung und der Rekrutierung des basalen Transkriptionsfaktors TFIID. Die TAF3 Untereinheit des Transkriptionsfaktors TFIID erkennt spezifisch methyliertes Lysin 4 des Histons 3. Die Bindung von TFIID an H3 N-Termini wird durch Acetylierung an H3K9 und H3K14 verstärkt. Eine asymmetrische Dimethylierung an H3R2 vermindert hingegen die Bindung von TFII (Vermeulen *et al.*, 2007).

2.53 Erkennung von Histonmodifikationen

Die Histonmodifikationen an den N-Termini werden durch Effektorproteine erkannt. Dabei erfolgt die Bindung dieser Proteine an bestimmte Histonmodifikationen durch spezielle Erkennungsdomänen. Aufgrund von Modifikationen besitzen diese Domänen eine veränderte Affinität zu den Histonenden: Bindungen können verstärkt oder verhindert werden.

Bromodomänen binden an Lysin-acetylierte Histone. Diese Domänen werden in Chromatin-assoziierten Proteinen gefunden, insbesondere bei Acetyltransferasen, aber auch bei Komponenten von *Remodelling* Komplexen (Zeng & Zhou, 2002). Das erste Histon-Bindungsmotif, das strukturell charakterisiert wurde, war die Bromodomäne des transkriptionellen Coaktivators PCAF (*p300/CBP-associated factor*). Die NMR Struktur zeigte eine antiparallele vierreihige Helix mit einer hydrophobischen Bindungstasche an einem Ende (Dhalluin *et al.*, 1999). Des Weiteren wurde die Kristallstruktur der Acetyltransferase Gcn5p gebunden an acetyliertes H4K16 beschrieben (Owen *et al.*, 2000). Proteine können auch mehrere Bromodomänen enthalten. TAF1, die größte Untereinheit des Transkriptionsfaktors TFIID, enthält eine verdoppelte Domäne und erkennt mehrere acetylierte Aminosäuren (Jacobson *et al.*, 2000).

Bei der Erkennung von methylierten Aminosäuren gibt es größere Unterschiede, da eine Mono-, Di- oder Trimethylierung vorliegen kann. Die Diversität ist noch größer, da Lysin Methylierung mit Genaktivierung und *Silencing* verbunden ist: Die H3K4me3-Histonmodifikation wird in aktiven Genabschnitten gefunden, während die Markierungen H3K27me3 und H3K9me3 in fakultativem und konstitutivem Heterochromatin vorhanden sind.

Eine Lysin-Methylierung wird durch die Chromodomäne, Tudordomäne oder die PHD-Domäne (*plant homeodomain*) erkannt. Das Heterochromatin Protein-1 (HP1) und das Polycomb Protein sind involviert in epigenetische Reprimierung und enthalten beide eine Chromodomäne (Dhalluin *et al.*, 1999). Eine hohe Bindungsaffinität des Proteins HP1 besteht zu di- und trimethylierten H3K9, wohingegen das Polycomb-Protein trimethyliertes H3K27 bindet (Jacobs & Khorasanizadeh, 2002; Fischle *et al.*, 2003). CHD1 (*chromo helicase DNA-binding protein 1*) spielt eine wichtige Rolle bei der transkriptionellen Elongation. Am N-Terminus von CHD1 befinden sich zwei Chromodomänen, die an methyliertes Lysin 4 in Histon 3 binden (Flanagan *et al.*, 2005).

Seitenketten von Serinen, Tyrosinen und Threoninen können phosphoryliert vorliegen. Für Nicht-Histon-Proteine sind einige Phospho-Erkennungsdomänen beschrieben, wie z.B. die SH2- und WD40-*repeat*-Domänen, die in zytoplasmatischen Substraten von Kinasen zu finden sind. Informationen über Phosphohiston-Effektormoleküle sind jedoch noch sehr limitiert. Der N-Terminus von Histon H3 kann an zwei Bereichen, Serin 10 und Serin 28, phosphoryliert vorliegen. Die 14-3-3 Proteine in Säugerzellen sind eine Familie mit hoch konservierten Phospho-Erkennungsdomänen, welche Signaltransduktion, Chromosomenkondensation und Apoptose regulieren (Seet *et al.*, 2006). Eine hohe Affinität der 14-3-3 ξ -Isoform konnte zu phosphorylierten H3S10 und eine geringere zu H3S28ph nachgewiesen werden (Macdonald *et al.*, 2005).

2.54 Gene in einem Zwischenzustand (*Intermediary state*)

Es wurden einige Histonmodifikationen identifiziert, die ausschließlich in Euchromatin und aktiven Genabschnitten gefunden werden. Darunter sind Di- und Trimethylierung von H3K4, Dimethylierung von H3K36, Acetylierung von H3K9 und H4K16 und Hyperacetylierung von den Histonen H3 und H4. Die Trimethylierung von H3K27 sowie die Di- und Trimethylierung von H3K9 dagegen sind in stillgelegten Genbereichen und Heterochromatin assoziiert (Fischle *et al.*, 2003; Kouzarides, 2007). Die Mechanismen des genauen Zusammenspiels dieser Histonmodifikationen werden jedoch erst langsam verstanden.

In embryonischen Stammzellen wurden Gene entdeckt, die sowohl die reprimierende H3K27-Trimethylierung, als auch die aktivierende H3K4me3 aufweisen. Diese Gene befinden sich in einem Zwischenzustand (*intermediary state*), der schnell in Aktivierung oder Reprimierung umgewandelt werden kann (Azucara *et al.*, 2006; Bernstein *et al.*, 2006; Oguro *et al.*, 2010). In hämatopoietischen Stammzellen findet sich interessanterweise eine Anzahl dieser *intermediary state* Gene mit reprimierender H3K27me3 und aktiver H3K4me2, jedoch ohne eine Trimethylierung von H3K4 aufzuweisen (H3K4me2+/me3-), siehe Abbildung 2.13. Auf dem

Promotorbereich einer großen Anzahl dieser Gene sind Bindungsstellen der Transkriptionsfaktoren PU.1 und RUNX1 zu finden (Orford *et al.*, 2008).

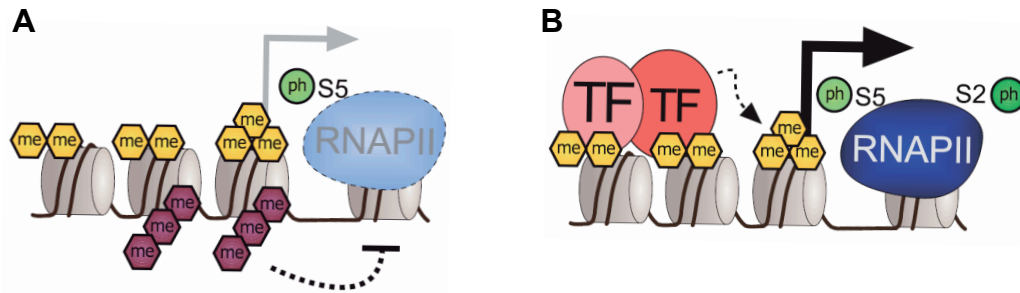


Abb. 2. 13: Histonmodifikationen der verschiedenen Aktivierungszustände

(A) Schematische Darstellung eines Gens im *intermediary state*. An dem Promotorbereich ist die aktivierende H3K4 Di- und Trimethylierung (gelb), die reprimierende H3K27me3 (lila), sowie die initiierte RNA-Polymerase II, phosphoryliert am Serin 5, zu finden. **(B)** Abbildung eines Promotorbereichs eines aktiven Genabschnitts. Auf dem Promotorbereich sind aktivierende H3K4me2/me3 (gelb), Transkriptionsfaktoren (TF) und die RNA-Polymerase II in der Elongationsform (phosphoryliert am Serin 5 und Serin 2) zu sehen (Hublitz *et al.*, 2009).

Publikationen weisen auf einen Zusammenhang zwischen verschiedenen Histonmodifikationen und der RNA-Polymerase II (RNA-Pol. II) hin: Die initiierte Form der RNA-Pol. II, phosphoryliert am Serin 5 (pS5), wird zusammen mit H3K9 und H3K14 Acetylierung und H3K4 Trimethylierung gefunden, wohingegen die elongierende Form der RNA-Pol. II (pS2) mit H3K36me3 und H3K79me2 auftritt (Guenther *et al.*, 2007). Interessanterweise finden sich auch unterschiedliche Mengen der RNA-Pol. II um den Transkriptionsstart bei H3K4me2+/me3+ gegenüber H3K4me2+/me3- Genen (Orford *et al.*, 2008).

2.6 Zielsetzung

Der Transkriptionsfaktor RUNX1 besitzt eine wichtige Funktion bei der Entwicklung von hämatopoietischen Stammzellen. Eine funktionelle Veränderung von *RUNX1*, durch Mutationen, Deletionen und chromosomalen Translokationen, trägt zur Ausbildung von Leukämien bei. Darüber hinaus spielt RUNX1 eine essentielle Rolle bei der Megakaryozytendifferenzierung. Diese Funktion spiegelt sich darin wieder, dass Haploinsuffizienz von *RUNX1* beim Menschen zu familiären Thrombozytopenien (FPD) mit reduzierten Thrombozytenzahlen führt (Luddy *et al.*, 1978; Gerrard *et al.*, 2001) und ein *knock out* von *RUNX1* in adulten Mäusen einen Defekt in der Megakaryozytendifferenzierung und Myelodysplasien hervorruft (Growney *et al.*, 2005; Ichikawa *et al.*, 2004).

Die Funktion von RUNX1 wird unter anderem durch die Interaktion mit anderen Transkriptionsfaktoren und Cofaktoren, sowie durch posttranslationale Modifikationen reguliert. RUNX1 kann dadurch aktivierend oder reprimierend auf die Expression von Zielgenen wirken (Blyth, Cameron & Neil, 2005). Während der Zelldifferenzierung werden durch epigenetische Regulationsvorgänge stammzellspezifische Gene ab- und zelllinienspezifische Gene angeschaltet. Neben der Acetylierung ist die Methylierung von Argininen eine häufige posttranslationale Modifikation, die bei dem *Histone Code* eine wichtige Rolle spielt. Diese Histonmarkierung wird von Methyltransferasen katalysiert.

Zur Identifikation neuer Interaktionspartner von RUNX1 mit epigenetischer Funktion sollte daher mittels Immunopräzipitation und *GST-pulldown* untersucht werden, ob RUNX1 mit Protein Arginin Methyltransferasen (PRMTs) interagiert und welche Auswirkungen dies auf die Regulation von RUNX1 Zielgenen hat. Ein Schwerpunkt lag dabei auf der epigenetischen Regulation von RUNX1 Zielgenen während der Megakaryozytendifferenzierung, da RUNX1 eine essentielle Rolle bei der Regulation der Differenzierung in Richtung Megakaryozyten spielt. Die Zusammensetzung der regulatorischen Proteinkomplexe, sowie die vorhandenen Histonmodifikationen auf dem Promotorbereich von RUNX1-Zielgenen sollten mittels Chromatin-Immunopräzipitation näher analysiert werden. Zusätzlich sollte der Einfluss von PRMTs im Zusammenhang mit RUNX1 auf die Megakaryozytendifferenzierung aufgeklärt werden. Daneben sollte eine mögliche Methylierung von RUNX1 durch PRMTs mit Hilfe von *in vitro*-Methyltransferasereaktionen untersucht und die Methylierungsstelle kartiert werden. Außerdem sollte die Auswirkung einer Methylierung von RUNX1 auf die DNA-Bindung und Interaktion mit anderen Faktoren näher charakterisiert werden. Zuletzt sollten aufgrund der Zusammensetzung der regulatorischen Komplexe und der epigenetischen Markierungen, sowie der Auswirkungen der Methylierung von RUNX1 Rückschlüsse auf einen allgemeingültigen Mechanismus der Regulation von RUNX1-Zielgenen in Vorläufer-/Stammzellen gezogen werden.

3. Ergebnisse

1996 wurde gezeigt, dass der Transkriptionsfaktor RUNX1 für die Erstellung von hämatopoietischen Stammzellen im murinen Embryo essentiell ist (Okuda *et al.*, 1996; Wang *et al.*, 1996). Haploinsuffizienz von *RUNX1* löst familiäre Fehlsteuerung der Entwicklung von Blutplättchen aus (Harada & Harada, 2009; Miyoshi *et al.*, 1991). Außerdem führt ein *knock out* von *RUNX1* in adulten Mäusen zu einem Defekt in der Megakaryozytendifferenzierung und zu Myelodysplasien (Gowney *et al.*, 2005; Ichikawa *et al.*, 2004; Ichikawa *et al.*, 2008).

Einige megakaryozytäre Zielgene von RUNX1 wurden bisher identifiziert; unter anderem *c-Mpl*, *CD41*, *CD42b* und die micro-RNA *miR27a* (Ben-Ami *et al.*, 2009; Xu *et al.*, 2006; Elagib *et al.*, 2003; Pencovich *et al.*, 2010; Satoh *et al.*, 2008).

Die Regulation von megakaryozytären Genen durch RUNX1 ist dabei an die Aktivität von anderen hämatopoietischen Transkriptionsfaktoren gekoppelt, wie GATA1 und FOG1 (Elagib *et al.*, 2003; Pencovich *et al.*, 2010). Neben der Interaktion mit anderen Transkriptionsfaktoren, interagiert RUNX1 mit transkriptionellen Coaktivatoren wie CBP/p300 oder den Corepressoren Sin3a und HDAC1 (Kitabayashi *et al.*, 1998; Lutterbach *et al.*, 2000; Wang *et al.*, 2009). Die Funktion von RUNX1 und somit die Expression von RUNX1-Zielgenen kann darüber hinaus über die Interaktion mit epigenetischen Regulatoren durch direkte Modifikation von RUNX1 oder durch Histonmodifikationen verändert werden.

In vorausgegangenen Untersuchungen konnte eine Interaktion von RUNX1 mit der Protein Arginin Methyltransferase 1 (PRMT1) gezeigt werden (Zhao *et al.*, 2008). Eine Methylierung von RUNX1 durch PRMT1 führte dabei zur Verminderung der Interaktion von RUNX1 mit dem Corepressor Sin3a. Da eine Interaktion von RUNX1 mit PRMT1 somit beschrieben und analysiert wurde, wurde in dieser Arbeit das Augenmerk auf eine mögliche Interaktion von RUNX1 mit weiteren PRMTs, die Methylierung weiterer Arginine von RUNX1 und deren Auswirkung gelegt.

3.1 Nachweis der Interaktion von RUNX1 mit PRMT6

3.11 RUNX1 interagiert mit der Protein Arginin Methyltransferase 6 (PRMT6)

Um eine Interaktion von RUNX1 mit Protein Arginin Methyltransferasen (PRMTs) zu untersuchen, wurde zunächst eine Coimmunopräzipitation von RUNX1, welches mit einem Flag-Affinitätstag versehen war, und verschiedenen HA-PRMTs durchgeführt. Dazu wurden HEK293T-Zellen mit Expressionsvektoren für Flag-RUNX1 und jeweils einem HA-PRMT transient transfiziert. Von den elf verschiedenen PRMTs wurden die zytoplasmatische Methyltransferase PRMT3 und zwei nukleär lokalisierte epigenetische Regulatoren, CARM1 (PRMT4) und PRMT6, für eine Interaktionsanalyse ausgewählt. Zur weiteren Kontrolle der

Immunopräzipitation wurde RUNX1 sowie die PRMTs einzeln ohne Interaktionspartner transfiziert.

Nach 48-stündiger Expression, wurde ein Proteinlysate hergestellt. Diesem Lysat wurden anti-Flag Agarose-Beads hinzugefügt. Durch eine anschließende Inkubation konnte Flag-RUNX1 aus den Proteinextrakten herausgezogen werden. Mittels SDS-Gelelektrophorese und darauf folgendem Western Blot konnte die jeweilige interagierende PRMT mit Hilfe des HA-Affinitätstags nachgewiesen werden. Um die eingesetzte Menge der verschiedenen Proteine zu ermitteln, wurden je zwei Proben der Proteinlysate ebenfalls mittels SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt und im Western Blot analysiert (siehe 5.38 und 5.311).

Mittels Coimmunopräzipitation konnte eine Interaktion von RUNX1 mit PRMT6 und eine schwächere Interaktion mit CARM1 gezeigt werden (Abb. 3.1 A-B). PRMT3 scheint unter diesen Bedingungen nicht mit RUNX1 zu interagieren (Abb. 3.1 C).

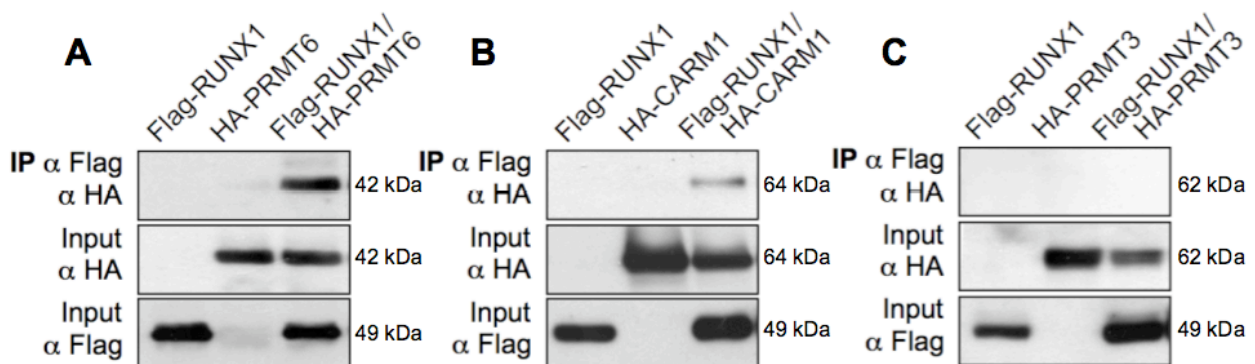


Abb. 3. 1: Interaktionsanalyse von RUNX1 mit verschiedenen Protein Arginin Methyltransferasen (PRMTs)

(A) RUNX1 interagiert mit der Protein Arginin Methyltransferase 6. Es konnte eine schwächere Interaktion von RUNX1 und CARM1/PRMT4 (B), aber keine Interaktion von RUNX1 mit PRMT3 nachgewiesen werden (C).

Proteinlysate von transient transfizierten HEK293T-Zellen wurden für eine Coimmunopräzipitation verwendet. 5×10^5 Zellen pro well eines 6-wells wurden mit 250 ng Flag-RUNX1, je 1 μ g HA-PRMT und 4 μ l Metafectene transfiziert. 48 Stunden nach der Transfektion wurden Kernextrakte hergestellt und in die Immunopräzipitation eingesetzt. Flag-RUNX1 wurde dabei über das Flag-Affinitätstag mittels anti-Flag Agarose-Beads angereichert. Die Proben der Immunopräzipitation sowie ein Teil des Proteinlysats (Input-Kontrolle) wurden über SDS-Gelelektrophorese und Western Blot analysiert. Zum Nachweis der PRMTs wurde ein anti-HA Antikörper verwendet. RUNX1 wurde mit Hilfe eines anti-Flag Antikörpers nachgewiesen.

Die Interaktion von RUNX1 und PRMT6 sollte in hämatopoietischen Zellen weiter untersucht werden, ohne dass dabei durch Überexpression der Interaktionspartner in das Zellmilieu eingegriffen wurde.

Um sich diesem Ziel anzunähern, wurde Flag-RUNX1 in K562-Zellen transfiziert. Proteinlysate wurden nach 48 Stunden Inkubation hergestellt und anschließend wurde RUNX1 mit Hilfe von anti-Flag Agarose-Beads aufgereinigt. Die Proben der Immunopräzipitation sowie ein Teil des

Proteinlysats wurden mit einer SDS-Gelelektrophorese und im anschließenden Western Blot analysiert. PRMT6 wurde mit Hilfe eines spezifischen Antikörpers nachgewiesen.

Auch unter diesen Bedingungen konnte eine Interaktion von RUNX1 mit endogenem PRMT6 gezeigt werden (siehe Abb. 3.2 A).

Zum letztendlichen Nachweis einer Interaktion von endogenem RUNX1 und PRMT6 wurden Kernextrakte aus der humanen Leukämiezelllinie TF-1 hergestellt, welche in Richtung Megakaryozyten und Erythrozyten differenziert werden kann und eine erhöhte Menge RUNX1 enthält. PRMT6 wurde mit Hilfe eines spezifischen Antikörpers und magnetischen Protein G-*Beads* aus den Proteinlysaten herausgezogen und der Interaktionspartner RUNX1 konnte im anschließenden Western Blot durch einen anti-RUNX1 Antikörper nachgewiesen werden (siehe Abb. 3.2 B).

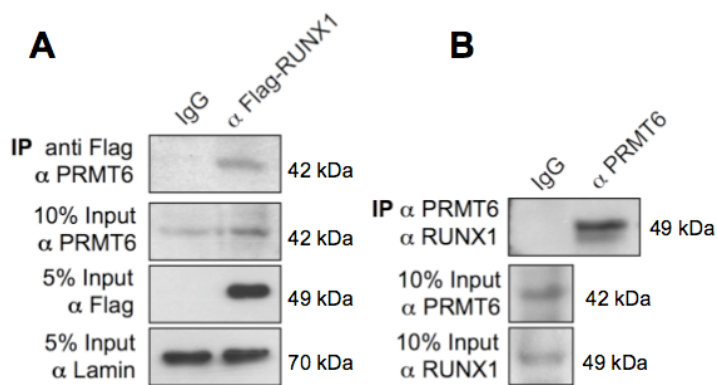


Abb. 3. 2: Interaktion von RUNX1 mit endogenem PRMT6

(A) Es konnte eine Interaktion von Flag-RUNX1 mit endogenem PRMT6 gezeigt werden. 4×10^6 K562-Zellen wurden mit 2 μ g Flag-RUNX1 und 10 μ l Metafectene transient transfiziert. Nach 48-stündiger Inkubation wurden Proteinextrakte der transfizierten Zellen hergestellt und RUNX1 mittels anti-Flag Agarose-*Beads* angereichert. Eine Interaktion mit endogenem PRMT6 konnte im Western Blot mit einem spezifischen anti-PRMT6 Antikörper nachgewiesen werden.

(B) Endogenes RUNX1 interagiert mit endogenem PRMT6. Endogenes PRMT6 wurde mit 2 μ g eines spezifischen anti-PRMT6 Antikörpers und Protein G-*Beads* aus Kernextrakten von 4×10^7 TF-1-Zellen angereichert. Die Coimmunopräzipitation und 10% der Kernextrakte (*Input*-Kontrolle) wurden mittels SDS-Gelelektrophorese und anschließendem Western Blot analysiert. Zum Nachweis des Interaktionspartners RUNX1 wurde ein spezifischer Antikörper verwendet.

3.12 Direkte Interaktion von RUNX1 mit PRMT6

Es konnte bereits gezeigt werden, dass RUNX1 mit der Protein Arginin Methyltransferase 6 interagiert (siehe Abb. 3.1 und 3.2). Zum Nachweis dieser Interaktion wurden Zelllysate verwendet. In Zellen liegen Proteine zum Teil in großen Komplexen vor. Es kann deshalb nicht

ausgeschlossen werden, dass RUNX1 und PRMT6 ein nur Teil eines Proteinkomplexes sind und deshalb die nachgewiesene Interaktion indirekt war.

Zur Überprüfung, ob eine direkte Interaktion vorliegt, wurde ein *GST-pulldown* von ^{35}S -RUNX1 mit GST-PRMT6 durchgeführt (siehe auch 5.312). Dafür wurde cDNA von RUNX1 mit radioaktiv markierten ^{35}S -Methionin *in vitro* translatiert. PRMT6, welches als Fusionsprotein mit der Glutathion S-Transferase (GST) vorlag, wurde in *E.coli* BL21 exprimiert und über anti-GST Agarose-Beads aufgereinigt. In dem anschließenden *Pulldown* wurden GST-PRMT6 und ^{35}S -RUNX1 für einige Stunden inkubiert und GST-PRMT6 wurde mittels der anti-GST *Beads* herausgezogen. Abschließend wurden die Proben des *Pulldowns* mit einer SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt und die Interaktion mittels Autoradiographie analysiert. Als Kontrolle wurde GST in *E.coli* BL21 exprimiert und ebenfalls in den *Pulldown* mit RUNX1 eingesetzt. So konnte ausgeschlossen werden, dass die Interaktion von RUNX1 mit PRMT6 über das GST-Protein vermittelt wurde. Der gesamte Versuch wurde ebenfalls *vice versa* mit ^{35}S -PRMT6 und GST-RUNX1 durchgeführt.

In beiden Fällen konnte eine direkte Interaktion festgestellt werden (siehe Abb. 3.3 A-B). Dabei war die Interaktion von ^{35}S -RUNX1 mit GST-PRMT6 stärker, wobei eine leichte Bindung von ^{35}S -RUNX1 an das GST-Protein bzw. die *Beads* vorlag.

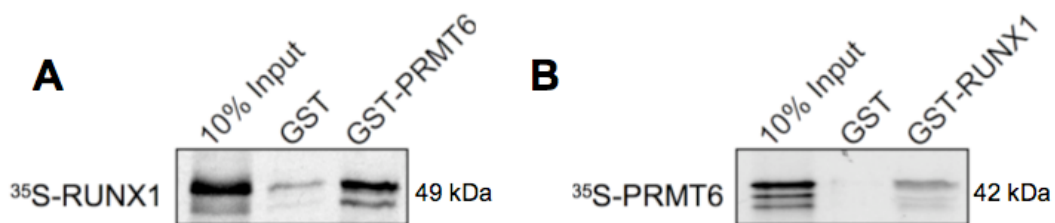


Abb. 3. 3: Direkte Interaktion von RUNX1 und PRMT6

Mittels *GST-pulldowns* konnte gezeigt werden, dass eine direkte Interaktion von RUNX1 und PRMT6 vorliegt. Dieser Versuch wurde von Olga Bölling (aus der Arbeitsgruppe von Dr. Jörn Lausen, Georg-Speyer-Haus, Frankfurt) durchgeführt.

(A) *GST-pulldown* von ^{35}S -RUNX1 mit GST-PRMT6. GST-PRMT6 wurde in *E.coli* BL21 exprimiert und mittels anti-GST Agarose-Beads angereichert. ^{35}S -RUNX1 wurde *in vitro* translatiert und mit GST-PRMT6 inkubiert. Die Interaktion wurde mittels SDS-Gelelektrophorese und anschließender Autoradiographie analysiert. (B) *GST-pulldown* von ^{35}S -PRMT6 und GST-RUNX1. Der Versuch wurde *vice versa* durchgeführt.

3.13 Der C-Terminus von RUNX1 interagiert mit PRMT6

Zur Überprüfung der Interaktionsfläche von RUNX1 mit PRMT6 wurde ein *GST-pulldown* mit verschiedenen RUNX1-Konstrukten durchgeführt. PRMT6 wurde dafür *in vitro* translatiert. Vier RUNX1-Konstrukte des N- und des C-Terminus sowie der DNA-Bindungsdomäne wurden in *E.coli* BL21 als GST-Fusionsprotein exprimiert und aufgereinigt. Der *GST-pulldown* erfolgte wie

zuvor beschrieben mit anschließender SDS-Gelelektrophorese und Autoradiographie. Es wurde darauf geachtet, dass vergleichbare Mengen der verschiedenen GST-RUNX1-Konstrukte für den *Pulldown* verwendet wurden. Die eingesetzte Menge wurde mittels Coomassie Brilliantblau-Färbung überprüft.

Als Interaktionsfläche von RUNX1 mit PRMT6 konnte der Aminosäurebereich 300-451 identifiziert werden (siehe Abb. 3.4 B). In Abbildung 3.4 A sind neben dem ermittelten Interaktionsbereich von RUNX1 und PRMT6 die Interaktionsflächen von RUNX1 mit verschiedenen Cofaktoren gezeigt.

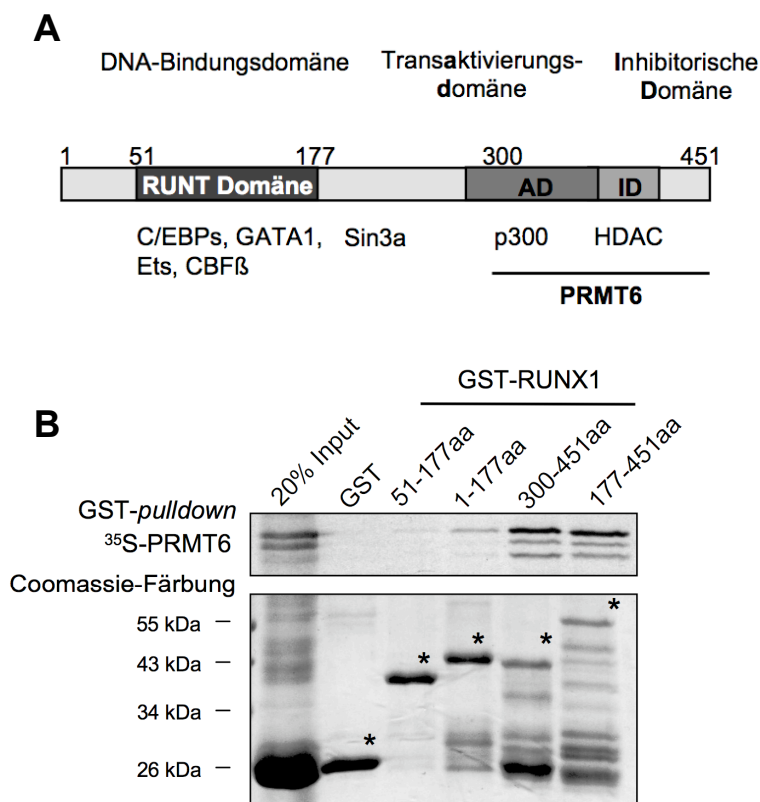


Abb. 3. 4: Kartierung der Interaktionsfläche von RUNX1 mit PRMT6

(A) Schematische Darstellung der Domänenstruktur von RUNX1 und dessen Interaktionspartner. RUNX1 beinhaltet eine DNA-Bindungsdomäne, die RUNT-Domäne, eine Aktivierungsdomäne (AD) und eine C-terminale inhibitorische Domäne (ID). Die RUNT-Domäne interagiert mit verschiedenen Transkriptionsfaktoren, unter anderem mit dem Heterodimerisierungspartner CBFβ. Die Aktivierungsdomäne wechselwirkt mit dem Coaktivator p300 und die inhibitorische Domäne interagiert mit Histon-Deacetylasen (HDAC).

(B) Der Aminosäurebereich 300-451 von RUNX1 interagiert mit PRMT6. Ein GST-pulldown wurde mit rekombinanten GST-RUNX1-Konstrukten und mit *in vitro* translatiertem ³⁵S-PRMT6 durchgeführt. Die Interaktion wurde mittels SDS-Gelelektrophorese und anschließender Autoradiographie analysiert. Das SDS-Gel wurde rehydriert und die eingesetzten Mengen der RUNX1-Konstrukte mittels Coomassie Brilliantblau-Färbung überprüft. Die Sterne markieren die Position der GST-RUNX1-Konstrukte. Dieser Versuch wurde von Olga Bölling (aus der Arbeitsgruppe von Dr. Jörn Lausen, Georg-Speyer-Haus, Frankfurt) durchgeführt.

Die Aminosäuren 177-451 von RUNX1 interagieren ebenfalls mit PRMT6, beinhalten jedoch den Bereich 300-451. Der N-Terminus von RUNX1 interagiert nur leicht mit PRMT6.

Es konnte in diesem Abschnitt gezeigt werden, dass Flag-RUNX1 mit HA-CARM1 (PRMT4) leicht und mit HA-PRMT6 stärker interagiert. Die Interaktion von RUNX1 und PRMT6 wurde mittels endogener Immunopräzipitation bestätigt. Außerdem konnte mit Hilfe des GST-*pulldowns* nachgewiesen werden, dass eine direkte Interaktion vorliegt. Als Interaktionsfläche von RUNX1 mit PRMT6 wurde der C-Terminus von RUNX1 ermittelt.

3.2 Die Methylierung von RUNX1 durch PRMT6 verstärkt die Interaktion beider Faktoren

Arginin-Methylierung ist eine verbreitete posttranslationale Modifikation, welche bei zytoplasmatischen und nukleären Proteinen gefunden werden kann. Diese Methylierung wird von Protein Arginin Methyltransferasen katalysiert. In Säugerzellen sind momentan 11 PRMTs bekannt (Pal & Sif, 2007). Für PRMT2, PRMT10 und FBXO10 konnte bislang noch keine enzymatische Aktivität nachgewiesen werden.

PRMT6 ist eine nukleäre Methyltransferase, welche Substrate bevorzugt, die nicht zwingend Glycin-Arginin-reiche (GAR) Motive enthalten (Frankel *et al.*, 2002). Zu den PRMT6-spezifischen Substraten zählen das *scaffold*-Protein HMGA1a/b, die DNA-Polymerase β , das HIV Transaktivator Protein, sowie das Histon H3 (Miranda *et al.*, 2005; El-Andaloussi *et al.*, 2006; Boulanger *et al.*, 2005). Die hier erwähnten Substrate von PRMT6 sind alle im Zellkern lokalisiert und Chromatin-assoziiert.

Die Funktion von RUNX1 wird durch posttranslationale Modifikationen reguliert. Phosphorylierung, Methylierung und Acetylierung von RUNX1 wurden bereits beschrieben (Biggs *et al.*, 2006; Chakraborty *et al.*, 2003; Zhao *et al.*, 2008; Yamaguchi *et al.*, 2004). Es sollte deshalb untersucht werden, ob der nukleäre Transkriptionsfaktor RUNX1 von der Protein Arginin Methyltransferase 6 posttranslational modifiziert wird. In dem Falle einer Methylierung von RUNX1 durch PRMT6 sollte die Methylierungsstelle ermittelt und die Auswirkungen dieser Modifikation untersucht werden.

3.21 PRMT6 methyliert RUNX1 am Arginin 307 *in vitro*

Zu Anfang sollte die Möglichkeit überprüft werden, ob RUNX1 durch PRMT6 *in vitro* methyliert wird. Für die Methyltransferase-Reaktion wurden bakteriell aufgereinigte GST-Fusionsproteine benutzt. PRMT6 sowie RUNX1 wurden als GST-Fusionsproteine in *E.coli* BL21 exprimiert und aus diesen als Überexpressionsproteine aufgereinigt. RUNX1 wurde mit der Methyltransferase PRMT6 und einem Methylgruppendonor inkubiert (siehe 5.39). Dabei setzte man als Methylgruppendonor S-(5'-Adenosyl)-L-Methionin-(methyl- ^3H) (^3H -SAM) ein, um die

Methylierung nachweisen zu können. Das Wasserstoffisotop ^3H ist in der zu übertragenden Methylgruppe des ^3H -SAM radioaktiv markiert, wodurch nach der Übertragungsreaktion das methylierte Protein markiert vorliegt. Die Reaktion wurde mit Proteinladepuffer abgestoppt und mit Hilfe einer SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt. Anschließend wurde das Gel getrocknet und die radioaktiv markierten Proteine mittels Autoradiographie nachgewiesen. Zuletzt wurden die eingesetzten Proteine im SDS-Gel mittels Coomassie Brilliantblau-Lösung angefärbt.

In Abbildung 3.5 ist das Ergebnis der Autoradiographie sowie die dazugehörige Coomassie-Färbung gezeigt. Es ist zu erkennen, dass der Transkriptionsfaktor RUNX1 durch PRMT6 methyliert wird. Der GST-Fusionsanteil wurde dabei nicht methyliert. Die Coomassie-Färbung zeigte, dass in etwa identische Mengen an GST-Protein bzw. GST-RUNX1 für die Methyltransferasereaktion verwendet wurden. Eine geringe Degradation von GST-RUNX1 ist sichtbar.

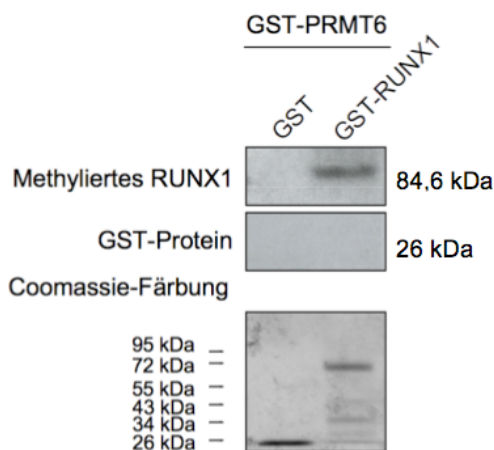


Abb. 3. 5: Methylierung von RUNX1 durch PRMT6

Eine Methylierung von RUNX1 durch PRMT6 konnte gezeigt werden, wohingegen das GST-Fusionsprotein nicht modifiziert wurde. Die Coomassie-Färbung wies gleiche Mengen an GST-Protein sowie GST-RUNX1 mit nur geringer Degradation nach.

Bakteriell exprimierte und aufgereinigte GST-Fusionsproteine von RUNX1 und PRMT6 wurden in eine *in-vitro* Methyltransferasereaktion eingesetzt. Dafür wurden 10 μg GST-PRMT6 mit 5 μg GST-RUNX1 und 4 μl des Methyltransferasedonors ^3H -SAM verwendet und für 1,5 Stunden bei 37°C inkubiert. Die Proben wurden mittels einer 12%igen SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt, das Gel wurde unter Vakuum getrocknet und nach mehrwöchiger Exposition wurde das radioaktive Substrat mittels Autoradiographie nachgewiesen. Anschließend wurden die Proteine im rehydrierten SDS-Gel mittels Coomassie-Brilliantblau-Lösung angefärbt.

Nach dem Nachweis einer Methylierung von RUNX1 durch PRMT6 sollte die Methylierungsstelle von RUNX1 ermittelt werden. Da der C-Terminus von RUNX1 mit PRMT6 interagiert, liegt es nahe, dass PRMT6 RUNX1 C-terminal methyliert. Deshalb sollte der C-Terminus von RUNX1 näher auf eine mögliche Methylierungsstelle untersucht werden. Dafür

Die Synthese der RUNX1-Peptide an eine Cellulosemembran wurde von Dr. Joachim Koch (Georg-Speyer-Haus, Frankfurt) unter Verwendung eines Peptid-Spotters ausgeführt. Auf diese gespottete Membran wurde anschließend eine Methyltransferasereaktion mit GST-PRMT6 und dem Methyltransferase-donor ^3H -SAM durchgeführt (siehe 5.310). GST-PRMT6 wurde zuvor in *E.coli* BL21 exprimiert und aufgereinigt. Die Membran wurde anschließend gewaschen, getrocknet und die radioaktiv markierten Peptide wurden autoradiographisch nachgewiesen.

Von den sieben Argininen am C-Terminus von RUNX1 konnte das Arginin 307 als Methylierungsstelle von PRMT6 ermittelt werden. Die ersten 18 Aminosäuren des Histons 4 (Positivkontrolle) wurden stärker als das RUNX1-Peptid um das Arginin 307 methyliert, wobei bei dem Histon 4-Peptid zwei Arginine an Position 3 und 17 vorlagen.

3.22 Die Methylierung von RUNX1 durch PRMT6 verstärkt die Interaktion beider Faktoren

In den vorangegangenen Versuchen konnte eine Methylierung von RUNX1 am Arginin 307 durch die Protein Arginin Methyltransferase 6 gezeigt werden. Deshalb sollte anschließend die Funktion dieser Methylierung untersucht werden. Dabei sollte zuerst der Einfluss der Methylierung auf die Interaktion beider Faktoren geprüft werden, da posttranslationale Modifikationen Protein-Protein-Interaktionen beeinflussen können. In vorausgegangenen Untersuchungen konnte z.B. eine verminderte Interaktion von RUNX1 mit dem Corepressor Sin3a aufgrund einer Methylierung von RUNX1 durch PRMT1 gezeigt werden (Zhao *et al.*, 2008).

Eine Immunopräzipitation wurde mit überexprimiertem Flag-RUNX1 und HA-PRMT6 durchgeführt (siehe 5.311). Es sollte ein Vergleich mit der RUNX1 R307A-Mutante bzw. unter Einfluss des unspezifischen Methyltransferaseinhibitors Adenosin-Dialdehyd (AdOx) gemacht werden. Dafür wurden HEK293T-Zellen mit Flag-RUNX1 bzw. Flag-RUNX1 R307A und HA-PRMT6 transfiziert und eine Probe für 24 Stunden mit dem Methyltransferaseinhibitor behandelt. Kernextrakte der transfizierten Zellen wurden hergestellt und in die Immunopräzipitation eingesetzt. Mit Hilfe von anti-Flag Agarose-Beads wurde RUNX1 angereichert und mittels SDS-Gelelektrophorese und darauf folgendem Western Blot konnte PRMT6 mit Hilfe des HA-Affinitätstags nachgewiesen werden. Um die eingesetzte Menge der verschiedenen Proteine zu ermitteln, wurden je zwei Proben der Proteinlysate ebenfalls mittels SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt und im Western Blot unter zu Hilfenahme des Odyssey-Systems (LI-COR Biosciences[®], Lincoln) analysiert.

Es konnte eine Interaktion von Flag-RUNX1 und HA-PRMT6 gezeigt werden. Die Bandenstärke der Interaktion von Flag-RUNX1 und HA-PRMT6 wurde mit Hilfe des Odyssey-Systems errechnet und als 1 definiert. Die anderen Interaktionsbandenstärken wurden dann im

Verhältnis dazu angegeben. Der Methyltransferaseinhibitor AdOx verringerte die Interaktion beider Faktoren um 73%. Eine ähnliche Verminderung der Interaktion konnte bei der RUNX1 R307A-Mutante beobachtet werden. Die transfizierten Einzelfaktoren zeigten keine Hintergrundbindung (siehe Abb. 3.7).

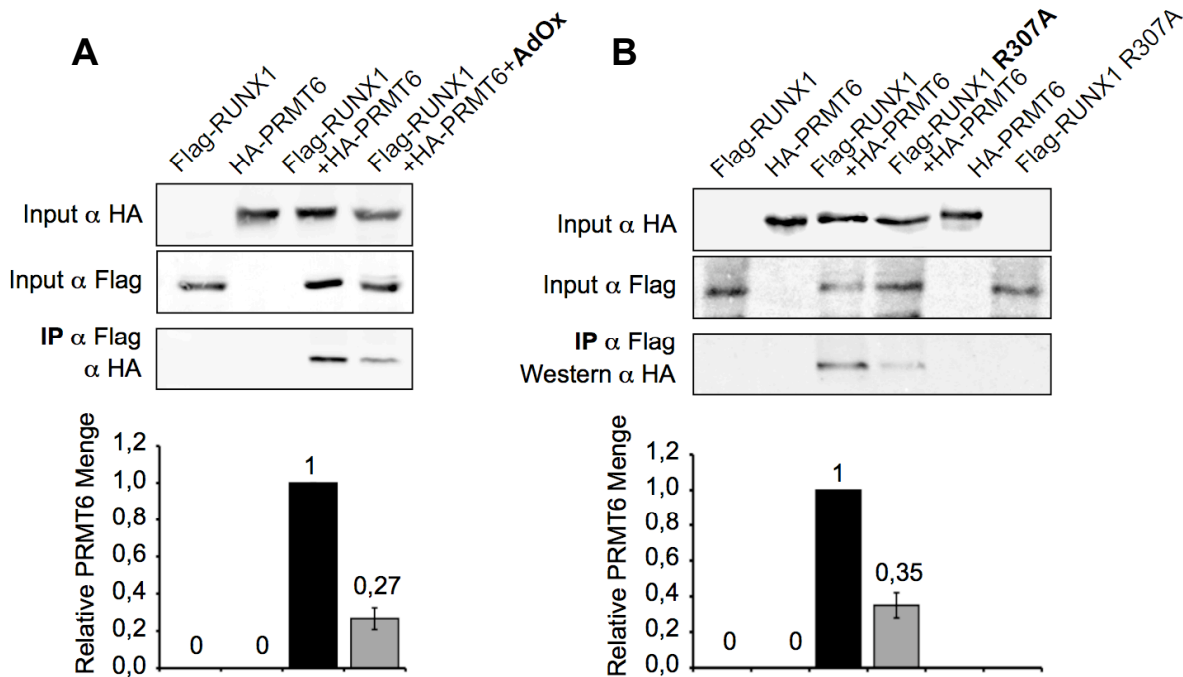


Abb. 3. 7: Die Methylierung von RUNX1 durch PRMT6 verstärkt die Interaktion beider Faktoren

(A) Die Interaktion von RUNX1 mit PRMT6 wurde durch den Methyltransferaseinhibitor AdOx verringert. (B) Ebenso konnte eine Verminderung der Interaktion der Mutante RUNX1 R307A mit PRMT6 nachgewiesen werden.

Proteinlysate von transient transfizierten HEK293T-Zellen wurden für eine Coimmunopräzipitation (IP) verwendet. 5×10^5 Zellen pro *well* eines 6-*wells* wurden mit 250 ng Flag-RUNX1 bzw. Flag-RUNX1 R307A, 1 μ g HA-PRMT6 und 2 μ l Metafectene transfiziert. Die Zellen wurden zum Teil 24 Stunden nach der Transfektion mit 20 μ M AdOx für weitere 24 Stunden behandelt. Danach wurden Kernextrakte hergestellt und in die Immunopräzipitation eingesetzt. Flag-RUNX1 wurde dabei über das Flag-Affinitätstag mittels anti-Flag Agarose-*Beads* angereichert. Die Proben der Immunopräzipitation sowie ein Teil des Proteinlysats (*Input*-Kontrolle) wurden über SDS-Gelelektrophorese und Western Blot unter zu Hilfenahme des Odyssey-Systems analysiert. Zum Nachweis von PRMT6 wurde ein anti-HA Antikörper verwendet. RUNX1 wurde mit Hilfe eines anti-Flag Antikörpers nachgewiesen. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung aus mindestens zwei unabhängigen Experimenten und vier unabhängigen Werten an.

In einem weiteren Versuch sollte der Einfluss der Methylierung von RUNX1 durch PRMT6 auf die DNA-Bindung von RUNX1 untersucht werden. Hierzu wurde ein Oligo-*pull-down* von RUNX1, PRMT6 und dem Cofaktor CBF β zusammen mit einem Oligonukleotid durchgeführt (siehe 5.36). CBF β verstärkt die DNA-Bindung von RUNX1, ohne jedoch direkt an die DNA zu binden (Speck & Stacy, 1995). Eine Komplexformation von RUNX1, CBF β und DNA führt zu einer strukturellen Änderung der DNA-Bindungsdomäne von RUNX1 (Bäcktröm *et al.*, 2002).

Für den *Oligo-pulldown* wurden HEK293T-Zellen mit Flag-RUNX1, CBF β , HA-PRMT6 bzw. einer shRNA gegen PRMT6 transfiziert und teilweise mit dem Methyltransferaseinhibitor AdOx behandelt. Die Kernextrakte wurden mit einem biotinylierten Oligonukleotid, welches RUNX1-Bindestellen enthält, zusammengegeben. Hier wurde eine Sequenz des RUNX3-Promotors verwendet. Mittels magnetischer Streptavidin-*Beads* wurde das Oligonukleotid angereichert und in einer anschließenden SDS-Gelelektrophorese und Western Blot unter zu Hilfenahme des Odyssey-Systems quantifiziert.

Es konnte eine Bindung von RUNX1 an das RUNX3-Oligonukleotid nachgewiesen werden. Die Bandenstärke der Bindung von Flag-RUNX1 an das Oligonukleotid wurde mit Hilfe des Odyssey-Systems errechnet und als 1 definiert. Die anderen Interaktionsbandenstärken wurden dann im Verhältnis dazu errechnet (siehe Abb. 3.8).

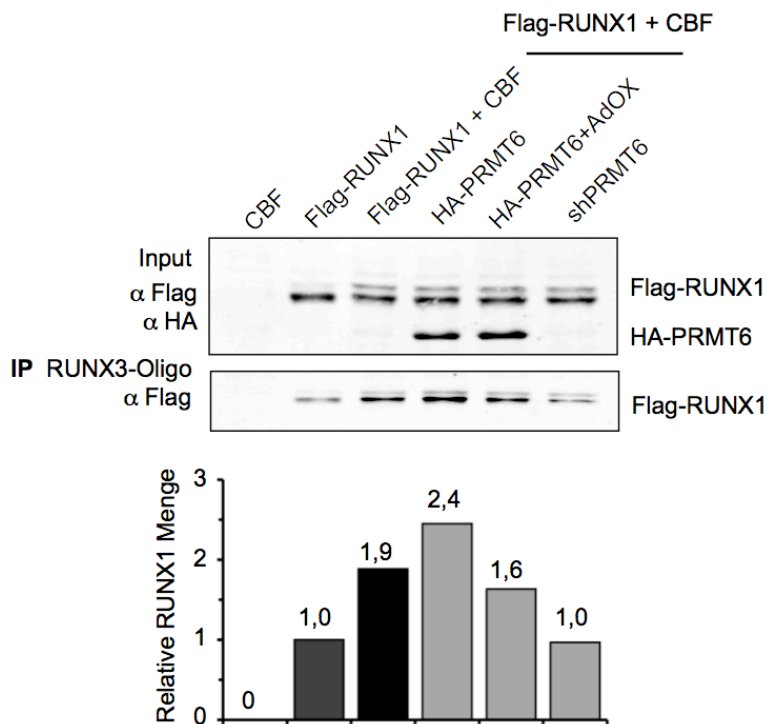


Abb. 3. 8: Die Methylierung von RUNX1 durch PRMT6 verstärkt die Bindung von RUNX1 an DNA

Die Bindung von RUNX1 an das RUNX3-Oligonukleotid wurde durch CBF β und PRMT6 verstärkt, wohingegen der Methyltransferaseinhibitor AdOx und ein *knock down* von PRMT6 die Bindung des RUNX1-Komplexes verringern. 5×10^5 HEK293T-Zellen wurden mit 250 ng Flag-RUNX1, 250 ng CBF β , 1 μ g HA-PRMT6 bzw. mit 1 μ g einer shRNA gegen PRMT6 transfiziert und teilweise mit dem Methyltransferaseinhibitor AdOx (20 μ M) behandelt. Die Kernextrakte wurden mit einem biotinyliertem RUNX3-Oligonukleotid, welches RUNX1-Bindestellen enthält, zusammengegeben. Mittels magnetischer Streptavidin-*Beads* wurde das Oligonukleotid angereichert und in einer anschließenden SDS-Gelelektrophorese und Western Blot unter zu Hilfenahme des Odyssey-Systems analysiert. Die Bandenstärke der Bindung von Flag-RUNX1 an das Oligonukleotid wurde als 1 definiert und die anderen Interaktionsbandenstärken wurden dann im Verhältnis dazu errechnet.

Der Cofaktor CBF β führte zu einer Verstärkung der RUNX1-Bindung an die DNA-Sequenz, welche durch PRMT6 weiter erhöht wurde. Eine Behandlung mit AdOx sowie ein *knock down* von endogenem PRMT6 zeigten eine Verringerung der DNA-Bindung von RUNX1 (siehe Abb. 3.8). Die eingesetzten Mengen an Flag-RUNX1 und HA-PRMT6 wurden ebenfalls im Western Blot überprüft.

Um den Einfluss der Methylierung von RUNX1 durch PRMT6 auf die Transaktivierungsfähigkeit von RUNX1 zu testen, wurde ein Reportergenassay durchgeführt. Dafür wurden RUNX1 bzw. die Arginin-Mutanten von RUNX1, teilweise mit PRMT6 oder einer shRNA gegen PRMT6, mit einem RUNX1-abhängigen Reportergenen in HEK293T-Zellen cotransfiziert. Es wurde eine R307A-Mutante, welche am Arginin 307 nicht mehr methyliert werden kann, und die R307F-Mimikry-Mutante, welche eine Methylierung am R307 vortäuscht, verwendet. Außerdem wurde ein Reportergen mit einem Elastase2-Promotor eingesetzt. Die Elastase 2 (ELA2) wird in der frühen Entwicklung der myeloiden Linie exprimiert und die Expression wird durch RUNX1 reguliert (Oelgeschlager *et al.*, 1996; Nuchprayoon *et al.*, 1997; Lausen *et al.*, 2006). Unterschiede in der Transfektionseffizienz wurden mit Hilfe eines β -Galactosidaseassays ermittelt und ausgeglichen. Die Aktivität des ELA2-Promotors ohne Zugabe von Cofaktoren wurde als 1 festgelegt und die anderen Werte darauf bezogen.

Die Expression der Luciferase wurde durch den Wildtyp RUNX1 3-fach induziert. Die RUNX1 R307A-Mutante führte zu einer 9-fachen Erhöhung, die RUNX1 R307F-Mimikry-Mutante zu einer mit RUNX1-Wildtyp vergleichbaren Expressionsaktivierung (siehe Abb. 3.9 A). Eine zusätzliche Transfektion von PRMT6 zeigte keine Änderungen des Expressionsmusters (siehe Abb. 3.9 B). Ein *knock down* von PRMT6 führte zu einer 7-fach erhöhten Luciferaseaktivität mit dem RUNX1-Wildtyp, einer leicht stärkeren Aktivität bei der RUNX1 R307A-Mutante und einer etwas geringeren Expressionsinduktion bei der RUNX1 R307F-Mutante (siehe Abb. 3.9 C).

RUNX1 scheint in den Zellen methyliert durch PRMT6 vorzuliegen, da die Aktivierungsfähigkeit mit der Mimikry-Mutante vergleichbar ist. Ein *knock down* von PRMT6 erhöht die Expression des Reportergens bis fast auf den Wert der R307A-Mutante, welche an dem Arginin 307 nicht mehr methyliert werden kann. Jedoch wird die Luciferaseaktivität durch die R307F-Mutante ebenfalls bei einem *knock down* von PRMT6 verstärkt. Es könnte somit noch eine weitere Methylierungsstelle von RUNX1 durch PRMT6 vorliegen.

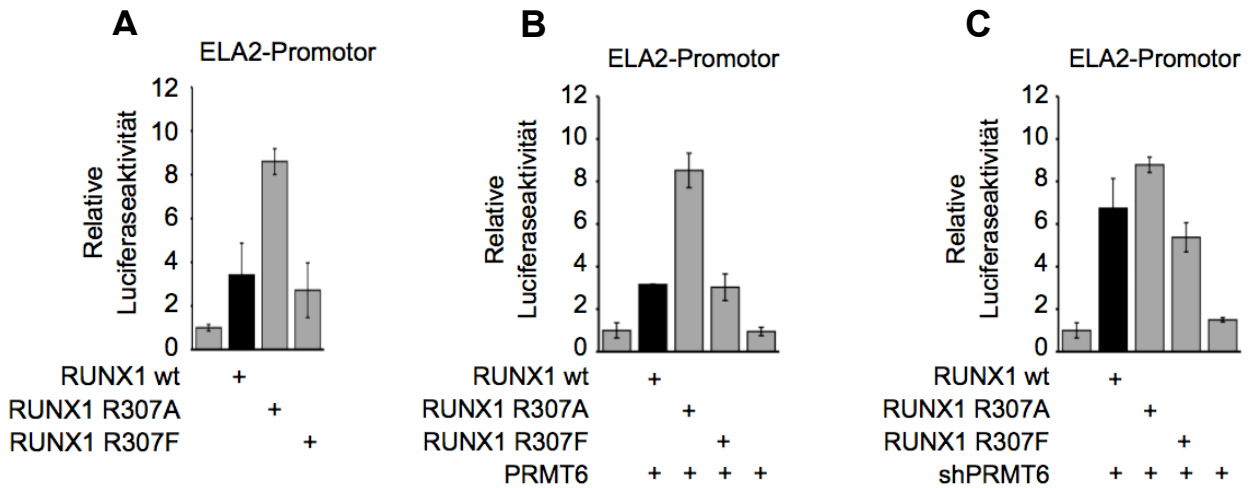


Abb. 3. 9: Die Methylierung von RUNX1 am Arginin 307 durch PRMT6 repräsentiert die Aktivierungsfähigkeit

(A) Die Luciferaseaktivität wird durch den RUNX1-Wildtyp sowie die R307F-Mutante gleichstark erhöht, wohingegen die R307A-Mutante zu einer größeren Induktion der Luciferaseaktivität führte. Eine Cotransfektion von PRMT6 zeigte dasselbe Muster (B). Ein *knock down* von PRMT6 erhöhte die Luciferaseaktivität bei allen RUNX1-Formen (C).

80.000 HEK293T-Zellen pro *well* eines 24-*well*s wurden mit 300 ng ELA2-Promotor-, 50 ng β -Galactosidase-, 500 ng RUNX1-, 1 μ g PRMT6- bzw. shPRMT6-Plasmid-DNA und 1,5 μ l Metafectene transfiziert. 48 Stunden nach Transfektion wurden die Zellen lysiert und in den Luciferase- und β -Galactosidaseassay eingesetzt. Die Aktivität des Elastase2-Promotors ohne Zugabe von Cofaktoren wurde als 1 festgelegt und die anderen Werte abhängig dazu errechnet. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung aus mindestens zwei unabhängigen Experimenten und vier unabhängigen Werten an.

In diesem Abschnitt konnte eine Methylierung von RUNX1 durch PRMT6 am Arginin 307 gezeigt werden. Diese Methylierung führt zu einer Verstärkung der Interaktion beider Faktoren sowie der Bindungsfähigkeit von RUNX1 an DNA. Die methylierungsdefiziente Mutante R307A zeigte eine höhere transkriptionelle Aktivierungsfähigkeit im Luciferaseassay.

3.3 Megakaryozytendifferenzierung von humanen Stammzellen und Zelllinien

Ein *knock out* von RUNX1 in adulten Mäusen führt zu einem Defekt in der Megakaryocyten-differenzierung (Gronow *et al.*, 2005; Ichikawa *et al.*, 2004; Ichikawa *et al.*, 2008). RUNX1 ist somit ein sehr wichtiger Transkriptionsfaktor für die Regulation der Differenzierung in Richtung Megakaryozyten.

In dieser Arbeit sollte die Funktion von RUNX1 während der Megakaryozytendifferenzierung näher untersucht werden. Dafür wurden humane CD34+ Vorläuferzellen sowie die Zelllinien K562 und HEL verwendet.

3.31 Überprüfung der Megakaryozytendifferenzierung durch Beobachtung der Veränderung der Zellmorphologie

CD34+ Progenitorzellen wurden vom DRK Blutspendedienst Frankfurt zur Verfügung gestellt. Die Zellen wurden *in vitro* unter Serum freien Bedingungen für 6 Tage in Stem Span Medium expandiert, welches mit Flt-3 Ligand (*Fms-like tyrosine kinase 3 ligand*), Stammzellfaktor (SCF), Interleukin 3 (IL-3) und IL-6 versetzt wurde. Zur Induktion der Megakaryozytendifferenzierung wurden die Zellen in Stem Span Medium mit SCF, IL-9, IL-6 und Thrombopoietin (TPO) für 4-6 Tage kultiviert. Für die Megakaryozytendifferenzierung von K562- und HEL-Zellen wurde dem Kultivierungsmedium 30 nM bzw. 15 nM 12-*o*-Tetradecanoylphorbol-13-acetat (TPA) zugegeben und für 6-96 Stunden kultiviert.

Die Megakaryopoese ist ein mehrstufiger Entwicklungsprozess, wobei aus pluripotenten hämatopoietischen Stammzellen durch Proliferation und Differenzierung über verschiedene Zwischenstufen die Megakaryozyten entstehen. Die Megakaryozyten verlieren im Laufe der Differenzierung ihr Proliferationspotential (Pendaries *et al.*, 2007).

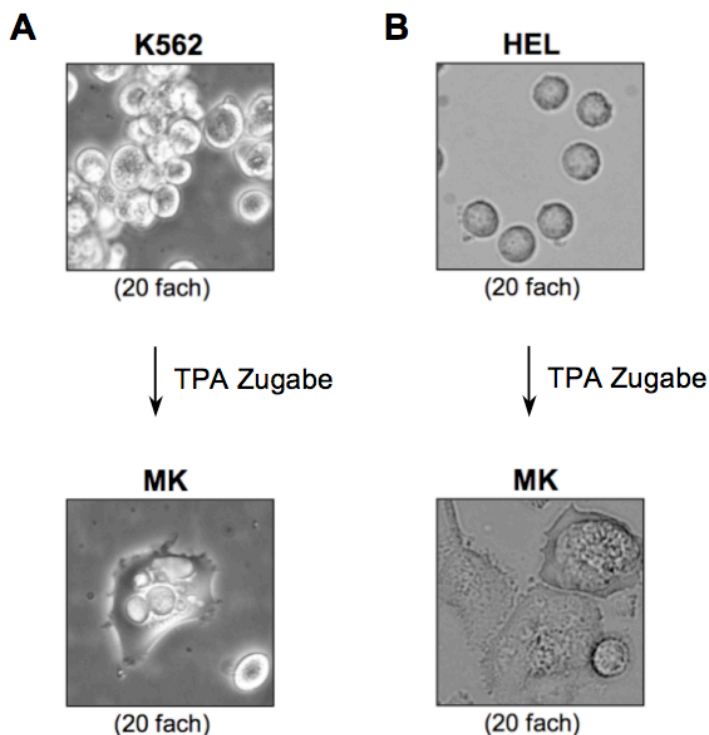


Abb. 3. 10: Morphologische Veränderungen während der Differenzierung von K562- und HEL-Zellen

Bei der Differenzierung von K562- sowie HEL-Zellen konnten morphologische Veränderungen beobachtet werden. (A) Für die Differenzierung von K562-Zellen wurden 2×10^6 Zellen in einer 10 cm-Schale ausgesät. Zur Induktion der Megakaryozytendifferenzierung (MK) von K562-Zellen wurde dem Kultivierungsmedium 30 nM 12-*o*-Tetradecanoylphorbol-13-acetat (TPA) zugegeben. Die Zellen wurden für 6-96 Stunden inkubiert. (B) Für die Differenzierung von HEL-Zellen wurde derselbe Versuchsansatz wie für K562-Zellen mit 15 nM TPA verwendet. Anschließend wurden die Zellen für 6-48 Stunden inkubiert.

Die Differenzierung der humanen CD34-Zellen zeigte sich in einer Zellvergrößerung und dem Absetzen der Suspensionszellen (Daten hier nicht gezeigt).

Die in dieser Arbeit verwendeten Zelllinien besitzen Charakteristika von Erythrozyten-/Megakaryozyten-Vorläuferzellen. Die Differenzierung in Richtung Megakaryozyten setzt somit bei einem späteren Entwicklungspunkt ein. Schon einige Stunden nach der Induktion der Megakaryozytendifferenzierung konnte bei K562- und HEL-Zellen ein Absetzen der Suspensionszellen und eine starke Vergrößerung der Zellen beobachtet werden (siehe Abb. 3.10 A-B).

3.32 Überprüfung der Megakaryozytendifferenzierung mittels FACS

Neben den morphologischen Veränderungen sollte die Megakaryozytendifferenzierung auch mittels FACS (*fluorescence activated cell sorting*) überprüft werden.

Während der Differenzierung in Richtung Megakaryozyten werden einige Membranmoleküle, wie CD41, CD42b oder CD61, die später die Thrombozyten charakterisieren und für viele biologische Funktionen nötig sind, verstärkt exprimiert und an die Zelloberfläche exportiert. Gleichzeitig zeigt sich während der Megakaryozytendifferenzierung ein Verlust des Stammzellmarkers CD34 (Hoffman, 1989; Bruno & Hoffman, 1998).

Humane CD34-Zellen wurden *in vitro* unter Serum freien Bedingungen für 6 Tage durch Zugabe der Zytokine Flt-3 Ligand, SCF, IL-3 und IL-6 expandiert. Die Megakaryozyten-differenzierung wurde mittels SCF, IL-9, IL-6 und TPO für 4 Tage induziert.

Bei K562- und HEL-Zellen wurde die Differenzierung Richtung Megakaryozyten mit TPA für 48-96 Stunden induziert.

Während der Differenzierung von humanen Stammzellen (CD34-Zellen) konnte eine Abnahme der CD34 positiven Zellen von 71% auf 16% beobachtet werden. Darüber hinaus konnte eine Zunahme des CD41-Membranmoleküls nachgewiesen werden (siehe Abb. 3.11 A). Undifferenzierte K562-Zellen waren nur zu 1% CD41 positiv. Wie in Abbildung 3.11 B ersichtlich konnte nach der Induktion der Megakaryozytendifferenzierung eine Zunahme von CD41 positiven Zellen auf 70% detektiert werden. Eine gewisse Ausnahme bildeten die HEL-Zellen. Ohne Induktion der Megakaryozytendifferenzierung lag schon eine große Anzahl an CD41 positiven Zellen vor. Jedoch konnte auch hier eine erhöhte Menge des CD41-Membranmoleküls während der Differenzierung nachgewiesen werden (siehe Abb. 3.11 C).

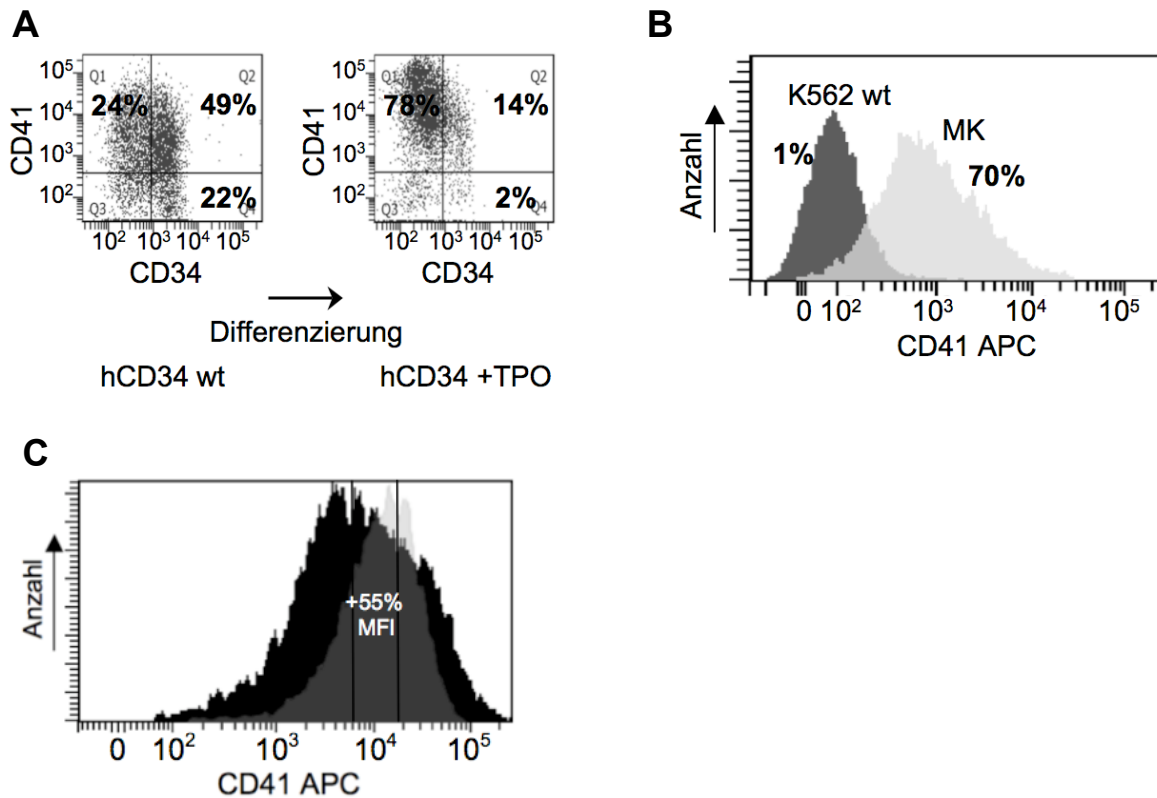


Abb. 3. 11: Veränderungen der Oberflächenmarker CD34 und CD41 während der Differenzierung von humanen CD34-, K562- und HEL-Zellen

Bei der Megakaryozytendifferenzierung von humanen CD34- (**A**), K562- (**B**) und HEL-Zellen (**C**) konnte eine Erhöhung der CD41 positiven Zellen sowie eine Reduktion der CD34 positiven Zellen festgestellt werden. Dieser Versuch wurde von Dr. Ashok Kumar (aus der Arbeitsgruppe von Dr. Jörn Lausen, Georg-Speyer-Haus, Frankfurt) durchgeführt.

3.33 Überprüfung des *CD41*-Expressionslevels während der Megakaryozytendifferenzierung

Es konnte bei den CD34-, K562- und HEL-Zellen eine Abnahme der CD34 positiven Zellen während der Megakaryozytendifferenzierung nachgewiesen werden. Wie in der Literatur beschrieben wird der Stammzellmarker während der Differenzierung reduziert. Eine Zunahme der CD41-positiven Zellen konnte auch in allen drei Fällen beobachtet werden. Jedoch war die Anzahl der CD41-positiven Zellen vor Induktion der Differenzierung bei den expandierten CD34-Zellen und den zwei verschiedenen Zelllinien unterschiedlich hoch. Deshalb sollte anschließend die Expressionsänderung des *CD41*-Membranmoleküls auf mRNA-Ebene mittels qRT-PCR untersucht werden.

Humane CD34+ Zellen wurden wie zuvor beschrieben *in vitro* für 6 Tage durch Zugabe der Zytokine Flt-3 Ligand, SCF, IL-3 und IL-6 expandiert und anschließend wurde die Megakaryozytendifferenzierung durch Zugabe von TPO für 4 Tage induziert. K562- und HEL-Zellen wurden mit TPA für 96 bzw. 48 Stunden in Richtung Megakaryozyten differenziert.

Die geringste Expression an *CD41* lag in uninduzierten K562-Zellen mit ca. 0,08% vor, bezogen auf die Expression des nicht regulierten *housekeeping* Genes Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH). In undifferenzierten HEL-Zellen sowie in expandierten, aber undifferenzierten CD34-Zellen lag die Grundexpression von *CD41* bei ca. 2,5% GAPDH (siehe Abb. 3.12). Nach Induktion der Megakaryozytendifferenzierung konnte bei CD34-, K562- und HEL-Zellen eine Erhöhung der Expression von *CD41* detektiert werden. Bei den K562- und HEL-Zellen wurde die Expression ungefähr um den Faktor 4 gesteigert. Dabei lag jedoch bei K562-Zellen eine Veränderung von 0,08% auf ca. 0,44% GAPDH und bei den HEL-Zellen von 2,5% auf 10% GAPDH vor. Bei den K562-Zellen lag die geringste *CD41*-Expression vor, jedoch waren nach der Megakaryozytendifferenzierung annähernd alle Zellen *CD41*-positiv (siehe Abb. 3.11). Die Differenzierung der CD34-Zellen führte zu einer ca. 13-fachen Erhöhung der Expression von *CD41* auf 33% GAPDH (siehe Abb. 3.12).

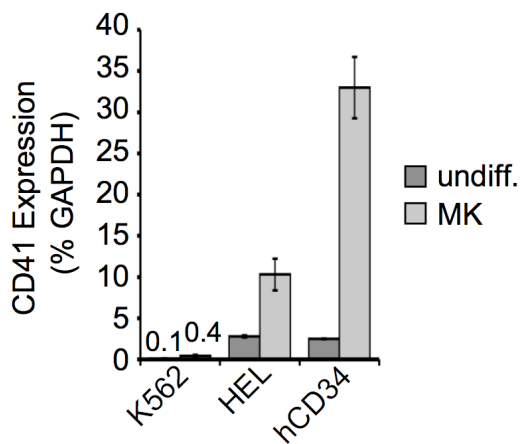


Abb. 3. 12: Veränderungen der Expression des Oberflächenmarkers *CD41* während der Differenzierung von humanen CD34-, K562- und HEL-Zellen

Bei der Differenzierung von humanen CD34-, K562- und HEL-Zellen konnte eine Erhöhung der Expression des Oberflächenmarkers *CD41* von einem unterschiedlichen basalen Expressionslevel der verschiedenen Zellen mittels qRT-PCR detektiert werden.

2×10^6 K562-Zellen wurden mit 30 nM TPA für 96 Stunden in Richtung Megakaryozyten differenziert. Bei HEL-Zellen erfolgte die Induktion mit 15 nM TPA für 48 Stunden. Humane CD34+ Zellen wurden vom DRK Blutspendedienst Frankfurt zur Verfügung gestellt. 5×10^5 Zellen/ml pro well eines 24wells wurden *in vitro* für 6 Tage durch Zugabe der Zytokine Flt-3 Ligand, SCF, IL-3 und IL-6 expandiert. Die Megakaryozytendifferenzierung wurde durch Zugabe von SCF, IL-9, IL-6 und TPO für 4 Tage induziert. Anschließend wurde die RNA der undifferenzierten und induzierten Zellen isoliert. Diese wurde in cDNA umgeschrieben und in der qRT-PCR gemessen. Dafür wurden spezifische Primerpaare für *CD41* und GAPDH verwendet. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung aus mindestens zwei unabhängigen Experimenten und vier unabhängigen Werten an.

Während der Megakaryozytendifferenzierung konnte bei den humanen CD34-, K562- und HEL-Zellen eine Abnahme des Stammzellmarkers CD34 sowie eine Zunahme der *CD41*-positiven

Zellen nachgewiesen werden. Somit konnte die Differenzierung der Zellen in Richtung Megakaryozyten nachgewiesen werden.

Die Anzahl der CD41-positiven Zellen vor Induktion der Differenzierung war jedoch bei den expandierten CD34-Zellen und bei den HEL-Zellen um ein Vielfaches höher als bei den K562-Zellen. Diese Beobachtung konnte auch bei der Analyse der Expression von *CD41* mittels qRT-PCR bestätigt werden.

Darüber hinaus konnte die Differenzierung der K562- und HEL-Zellen durch die Veränderung der Morphologie der Zellen beobachtet werden.

3.4 Expressionsanalyse von *RUNX1* und *PRMT6* während der Megakaryopoese

3.4.1 Unterschiedliche Expression von *RUNX1* und *PRMT6* während der Megakaryopoese von Stammzellen

RUNX1 ist, wie schon zuvor beschrieben, ein sehr wichtiger Transkriptionsfaktor für die Megakaryozytendifferenzierung. Um die funktionelle Verbindung zwischen *RUNX1* und *PRMT6* herauszufinden, wurde die Expression beider Faktoren in Erythrozyten/Megakaryozyten-Vorläuferzellen und während der Differenzierung untersucht.

Humane CD34-Zellen wurden dafür *in vitro* expandiert und für die Differenzierung in Richtung Erythrozyten für 9 Tage mit Erythropoietin (hCD34 EPO) und für die Megakaryozytenlinie für 5 Tage mit Thrombopoietin (hCD34 TPO) behandelt. Die Expression wurde mittels qRT-PCR gemessen und ist als relative Expression in Bezug zu unbehandelten Zellen angegeben (siehe 5.22 und 5.315).

Die Differenzierung der CD34-Zellen Richtung Erythrozyten konnte durch eine verringerte Expression von *CD34* und eine stark erhöhte Expression von α -Globin nachgewiesen werden (siehe Abb. 3.13 A). *CD34* ist ein Marker für Stammzellen und wird somit während der Differenzierung der Zellen herunterreguliert. α -Globin ist ein Marker für Erythrozyten und durch die erhöhte Expression konnte die Differenzierung der CD34-Zellen in Richtung Erythrozyten gezeigt werden.

Die Quantifizierung der Expression von *RUNX1* und *PRMT6* zeigte, dass beide Proteine in den CD34-Stamm-/Progenitorzellen exprimiert werden. Eine starke Verringerung der Expression von *RUNX1* war während der Erythrozytendifferenzierung von CD34-Zellen nachzuweisen. Die mRNA Expression von *PRMT6* hingegen wurde induziert (siehe Abb. 3.13 A).

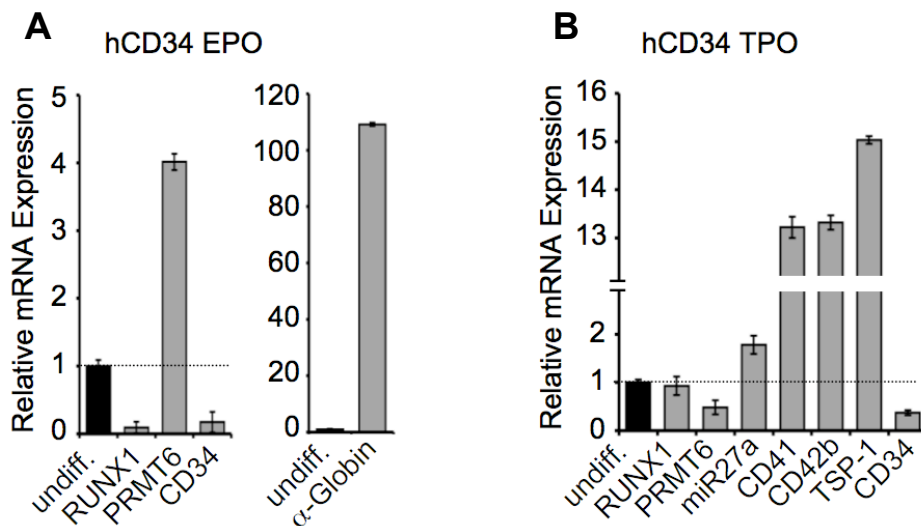


Abb. 3. 13: *RUNX1*-, *PRMT6*- und Zielgenexpression während der Differenzierung von humanen CD34-Zellen

(A) Während der Erythrozytendifferenzierung wurde die Expression von *RUNX1* stark herunterreguliert, während *PRMT6* 4-fach stärker exprimiert wurde im Vergleich zu undifferenzierten (undiff.) CD34-Zellen. Der Erythrozytenspezifische Marker α -Globin wurde verstärkt exprimiert (B) Während der Differenzierung in Richtung Megakaryozyten war die mRNA Expression von *RUNX1* gleich bleibend, wohingegen die *PRMT6*-Expression verringert wurde. Megakaryozytäre Zielgene von *RUNX1* wurden stärker exprimiert.

Humane CD34+ Stammzellen wurden vom DRK Blutspendedienst Frankfurt zur Verfügung gestellt. Die Zellen wurden *in vitro* unter Serum freien Bedingungen für 6 Tage durch die Zugabe der Zytokine Flt-3 Ligand, SCF, IL-3 und IL-6 expandiert (undiff.) und anschließend in Richtung Erythrozyten bzw. Megakaryozyten differenziert. Für die Differenzierung in Richtung Erythrozyten wurden die expandierten Zellen für 9 Tage mit Erythropoietin (EPO) behandelt. Die Megakaryozytendifferenzierung wurde durch die Zugabe von Thrombopoietin (TPO) für 5 Tage induziert. Von undifferenzierten und induzierten Zellen wurde die RNA isoliert. Diese wurde in cDNA umgeschrieben und in der qRT-PCR gemessen. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung aus mindestens zwei unabhängigen Experimenten und vier unabhängigen Werten an.

Während der Differenzierung der CD34-Zellen Richtung Megakaryozyten ist ein umgekehrter Effekt zu beobachten. Die mRNA-Expression von *RUNX1* war gleich bleibend, während die *PRMT6*-Expression auf einen leicht geringeren Level reduziert wurde (siehe Abb. 3.13 B). Zur weiteren Analyse wurde die Expression von einigen bekannten megakaryozytären *RUNX1*-Zielgenen, *CD41*, *CD42b*, *miR27a* (Zhao *et al.*, 2008; Xu *et al.*, 2006; Ben-Ami *et al.*, 2008), untersucht. Die Expression des *RUNX1*-Zielgens *miR27a* wurde etwas erhöht während der Megakaryozytendifferenzierung. Die weiteren untersuchten megakaryozytären Zielgene von *RUNX1* *CD41*, *CD42b* und auch das *PRMT6*-Zielgen *TSP-1* (Michaud-Levesque & Richard, 2009) wurden 13- bis 15-fach stärker exprimiert.

Eine Differenzierung der Zellen wurde mit der Reduktion der Expression des Stammzellmarkers *CD34* bei gleichzeitiger Induktion von *CD41* bestätigt.

3.42 Unterschiedliche Expression von *RUNX1* und *PRMT6* während der Megakaryozytendifferenzierung in humanen Zelllinien

In dieser Arbeit konnte bereits gezeigt werden, dass *RUNX1* und *PRMT6* in Stamm-/Vorläuferzellen exprimiert werden. Die Expression von *RUNX1* ist während der Megakaryozytendifferenzierung von Stammzellen gleich bleibend, wohingegen die Expression aller megakaryozytärer Zielgene von *RUNX1* bei der Induktion der Megakaryopoese erhöht und die Expression von *PRMT6* herunterreguliert wird. Diese Beobachtung sollte mit der Differenzierung der zwei Zelllinien K562 und HEL nachvollzogen werden.

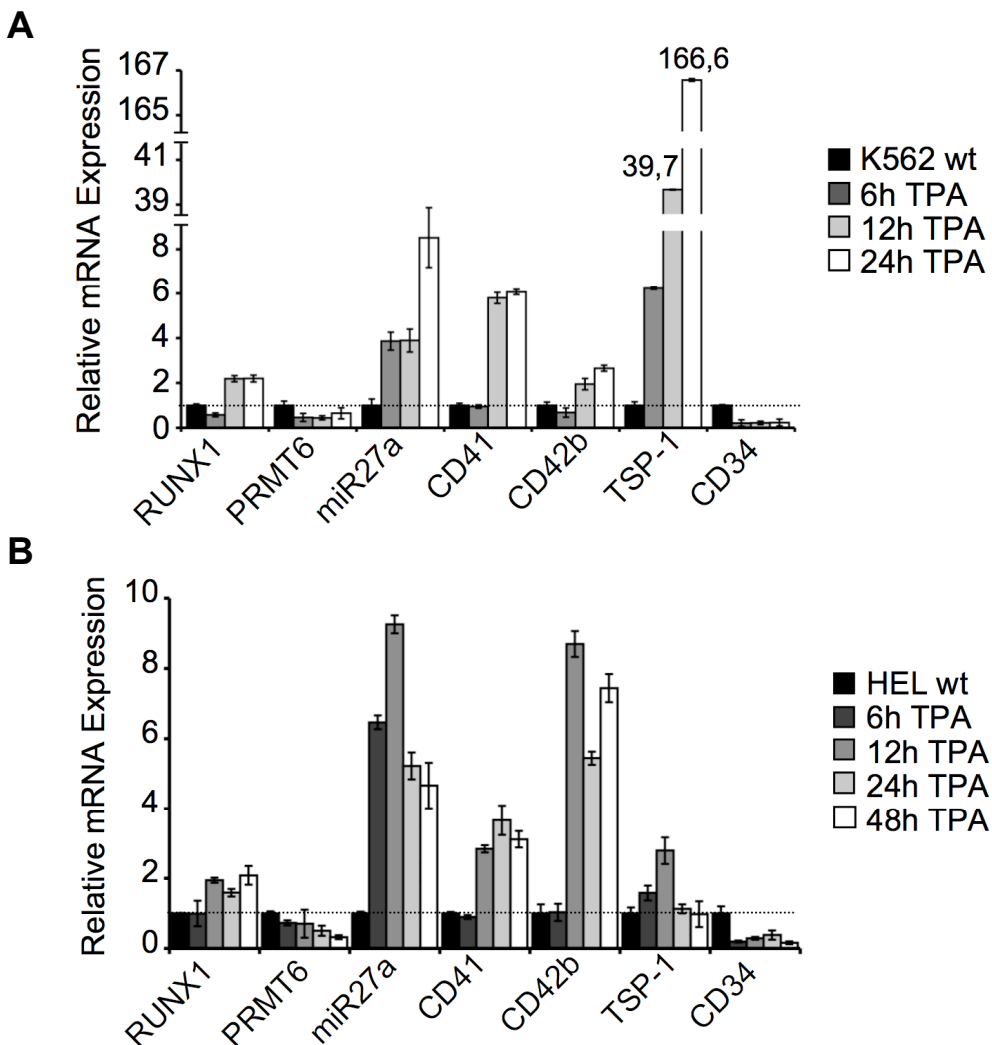


Abb. 3. 14: *RUNX1*-, *PRMT6*- und Zielgenexpression während der Megakaryozytendifferenzierung von K562- und HEL-Zellen

Während der Megakaryozytendifferenzierung von K562-Zellen (**A**) und HEL-Zellen (**B**) wurde die *PRMT6*-Expression verringert, während die Expression von *RUNX1* und dessen megakaryozytären Zielgenen stärker exprimiert wurde. Der Stammzellmarker CD34 wurde während der Differenzierung beider Zelllinien auf einen Basallevel herunterreguliert.

2×10^6 Zellen K562-Zellen wurden durch Zugabe von 30 nM TPA für 6-24 Stunden in Richtung Megakaryozyten differenziert. Bei HEL-Zellen wurde die Differenzierung mit 15 nM TPA für 6-48 Stunden induziert. Anschließend wurde die RNA der undifferenzierten und induzierten Zellen isoliert, in cDNA umgeschrieben und in der qRT-PCR gemessen. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung aus mindestens zwei unabhängigen Experimenten und vier unabhängigen Werten an.

K562-Zellen wurden durch Zugabe von 30 nM 12-O-Tetradecanoylphorbol-13-acetat (TPA) für 6-24 Stunden in Richtung Megakaryozyten differenziert. Bei HEL-Zellen wurde die Differenzierung mit 15 nM TPA für 6-48 Stunden induziert.

In K562-Zellen wurde *RUNX1* während der Differenzierung in Richtung Megakaryozyten etwas stärker exprimiert im Vergleich mit undifferenzierten Zellen (K562 wt). Gleichzeitig wurde die mRNA Expression aller *RUNX1*-Zielgene induziert. *CD42b* wurde nach 24 Stunden um den Faktor 3 verstärkt exprimiert. Die mRNA Expression von *CD41* sowie der *micro-RNA27a* wurde 6- bis 9-fach induziert. Die Erhöhung der Expression von *TSP-1* war während der Megakaryozytendifferenzierung von K562 am stärksten (siehe Abb. 3.14 A). Der Stammzellmarker *CD34* wurde schon nach 6 Stunden nur noch gering exprimiert.

Während der Megakaryozytendifferenzierung von HEL-Zellen konnte ein ähnliches Expressionsmuster festgestellt werden. Die Expression von *TSP-1* bildete die einzige Ausnahme. Es konnte lediglich eine leichte Induktion der Expression von *TSP-1* nach 6-12 Stunden festgestellt werden, welche anschließend wieder reduziert wurde (siehe Abb. 3.14 B).

Es konnte gezeigt werden, dass sich die Expression von *RUNX1* und *PRMT6* während der Differenzierung von humanen CD34-, K562- und HEL-Zellen unterschiedlich verhält. Während der Erythrozytendifferenzierung von CD34-Zellen wurde die Expression von *RUNX1* stark herabreguliert, während die Expression von *PRMT6* zunahm. Bei der Differenzierung Richtung Megakaryozyten konnte eine gleich bleibende *RUNX1*-Expression und eine Verringerung der Expression von *PRMT6* festgestellt werden. Des Weiteren konnte eine Verstärkung der Expression von megakaryozytären *RUNX1*-Zielgenen (*miR27a*, *CD41*, *CD42b*) und dem *PRMT6*-Zielgen *TSP-1* nachgewiesen werden.

Dieses Expressionsmuster der untersuchten Gene konnte auch während der Differenzierung von K562- und HEL-Zellen beobachtet werden. Die Ausnahme war eine leichte Erhöhung der *RUNX1*-Expression in beiden Zelllinien und eine nur geringe und transiente Zunahme der *TSP-1* Expression während der Differenzierung von HEL-Zellen.

3.43 Expressionsanalyse von *GATA1* und *FOG1* während der Megakaryozytendifferenzierung

Für die Differenzierung von Erythrozyten und Megakaryozyten ist die Expression von *GATA1* und *FOG1* von großer Bedeutung (Fujiwara *et al.*, 1996; Tsang *et al.*, 1996). Ein gezieltes Ausschalten beider Gene führt zu einer schnellen Blockierung der erythroiden Differenzierung (Pevny *et al.*, 1991; Weiss & Orkin, 1995; Tsang *et al.*, 1996). Es wurde darüber hinaus

beschrieben, dass die Expression von megakaryozytären Genen durch GATA1/FOG1 (*friend of GATA1*) induziert wird. In vorangegangenen Arbeiten wurde bereits gezeigt, dass ein transkriptionell aktiver RUNX1-Komplex während der Megakaryozytendifferenzierung mit dem Transkriptionsfaktor GATA1 verknüpft ist (Elagib *et al.*, 2003; Pencovich *et al.*, 2010).

Aufgrund dieser Kooperation von GATA1 und FOG1 mit RUNX1 bei der Expressionsregulation von megakaryozytären Zielgenen, sollte auch die Expression von *GATA1* und *FOG1* auf mRNA-Ebene während der Differenzierung in Richtung Megakaryozyten untersucht werden.

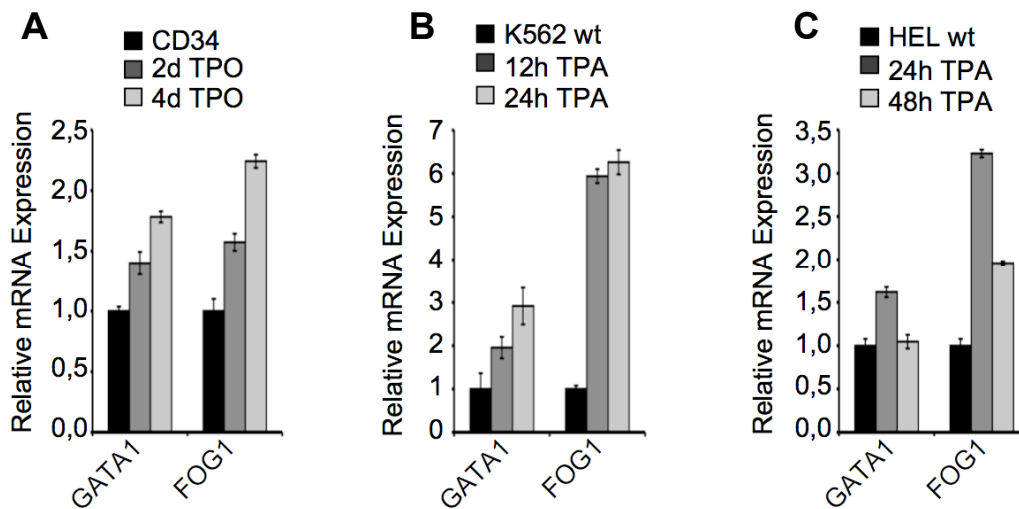


Abb. 3. 15: *GATA1*- und *FOG1*-Expression während der Megakaryozytendifferenzierung

Die *GATA1*- und *FOG1*-Expression wurde während der Megakaryozytendifferenzierung von CD34-Zellen (**A**), K562-Zellen (**B**) und HEL-Zellen (**C**) zwischen 1,5-7 fach induziert. Nach 48 Stunden TPA Behandlung von HEL-Zellen konnte wieder eine leichte Abnahme der Expressionsinduktion beobachtet werden.

Humane CD34-Zellen wurden *in vitro* unter Serum freien Bedingungen für 6 Tage durch die Zugabe eines Zytokin-Mixes expandiert und anschließend durch TPO-Zugabe für 2-4 Tage in Richtung Megakaryozyten differenziert. 2×10^6 Zellen K562-Zellen wurden durch Zugabe von 30 nM TPA für 12-24 Stunden in Richtung Megakaryozyten differenziert. Bei HEL-Zellen wurde die Differenzierung mit 15 nM TPA für 24 bzw 48 Stunden induziert. Anschließend wurde die RNA der undifferenzierten und induzierten Zellen isoliert, in cDNA umgeschrieben und in der qRT-PCR gemessen. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung aus mindestens zwei unabhängigen Experimenten und vier unabhängigen Werten an.

Es konnte eine Induktion der Expression der beiden für die Megakaryozytendifferenzierung wichtigen Faktoren *GATA1* und *FOG1* während der Differenzierung von humanen CD34-, K562- und HEL-Zellen nachgewiesen werden (siehe Abb. 3.15 A-C). Dabei zeigte sich die stärkste Expressionserhöhung von *GATA1* und insbesondere seinem Cofaktor *FOG1* in K562-Zellen. In HEL-Zellen konnte eine transiente Zunahme der *GATA1/FOG1*-Expression beobachtet werden.

3.5 PRMT6 reprimiert die Expression von RUNX1-Zielgenen

3.51 Nachweis des *knock downs* und der Überexpression von *PRMT6* in den stabilen K562-Zelllinien

Zur Überprüfung der Expressionsregulation von RUNX1-Zielgenen durch PRMT6 wurden zwei stabile K562-Zelllinien erstellt mit dem *knock down* und der Überexpression von *PRMT6* (siehe Abb. 3.16 A-B).

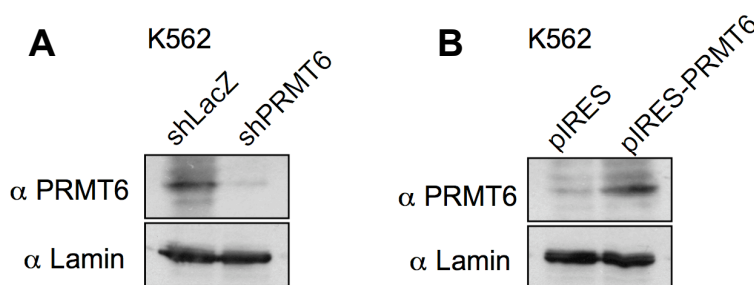


Abb. 3. 16: Nachweis des *knock downs* und der Überexpression von *PRMT6* in den stabilen K562-Zelllinien

(A) Ein *knock down* von *PRMT6* konnte in der stabilen K562-Zelllinie mittels Western Blots nachgewiesen werden. Als Ladekontrolle wurde hier ein anti-Lamin Antikörper verwendet. Vorweg wurde eine *small hairpin*-RNA (shRNA) gegen das humane *PRMT6* in den psiRNA-h7SKGFPzeo Vektor eingefügt und anschließend durch Zugabe von Zeozin selektiert. Eine shRNA gegen *LacZ* wurde als Kontrolle verwendet.

(B) Mittels Western Blot Analyse konnte die Überexpression von *PRMT6* in der stabilen K562-Zelllinie bestätigt werden. Als Ladekontrolle wurde ein anti-Lamin Antikörper verwendet. Zur Erstellung der Zelllinie wurde die cDNA von humanem *PRMT6* in den pIRES2-EGFP Vektor eingefügt. Zur Selektion diente G418.

Für die Erstellung beider Zelllinien wurden die GFP positiven Zellen mittels FACS herausortiert und anschließend im Selektionsmedium weiter kultiviert. Nach der Selektion wurden Kernextrakte der stabilen K562-Zelllinien hergestellt und mittels SDS-Gelelektrophorese und Western Blots analysiert.

Für *knock down*-Experimente wurde eine *small hairpin*-RNA (shRNA) in den psiRNA-h7SKGFPzeo Vektor mittels *BbsI*-Restriktionsschnittstellen eingefügt. K562-Zellen wurden mit dem Vektorkonstrukt transfiziert und durch Zugabe von Zeozin selektiert. Als Kontrolle wurde eine Kontroll-shRNA (shLacZ) verwendet. Die cDNA von *PRMT6* wurde mit Hilfe der Restriktionsenzyme *NheI* und *EcoRI* in den pIRES2-EGFP Vektor zur Erstellung einer stabilen K562-Zelllinie eingefügt. Die transfizierten Zellen wurden mit G418 selektiert. Der Leervektor pIRES2-EGFP wurde als Kontrolle verwendet.

Zum Nachweis des *knock downs* bzw. der Überexpression von *PRMT6* in den stabilen Zelllinien wurden Kernextrakte hergestellt und mittels SDS-Page mit darauf folgendem Western Blot analysiert. Es konnte ein *knock down* bzw. eine Überexpression von *PRMT6* nachgewiesen werden.

3.52 Knock down von *PRMT6* führt zur Induktion der Expression von *RUNX1*-Zielgenen

Mit den vorangegangenen Experimenten konnte ein gegensätzliches Expressionsmuster von *PRMT6* und *RUNX1* sowie deren megakaryozytären Zielgenen gezeigt werden. In den darauf aufbauenden Experimenten sollte untersucht werden, wie *PRMT6* die Expression der *RUNX1*-Zielgene beeinflusst.

Zum Nachweis des Einflusses von *PRMT6* wurde eine stabile K562-Zelllinie mit einem *knock down* von *PRMT6* durch eine *small hairpin RNA* (shRNA) verwendet (siehe 3.51). Als Kontrolle diente eine shRNA gegen *LacZ*. Die RNA der beiden Zelllinien wurde isoliert und die Expression verschiedener Gene in der qRT-PCR quantifiziert.

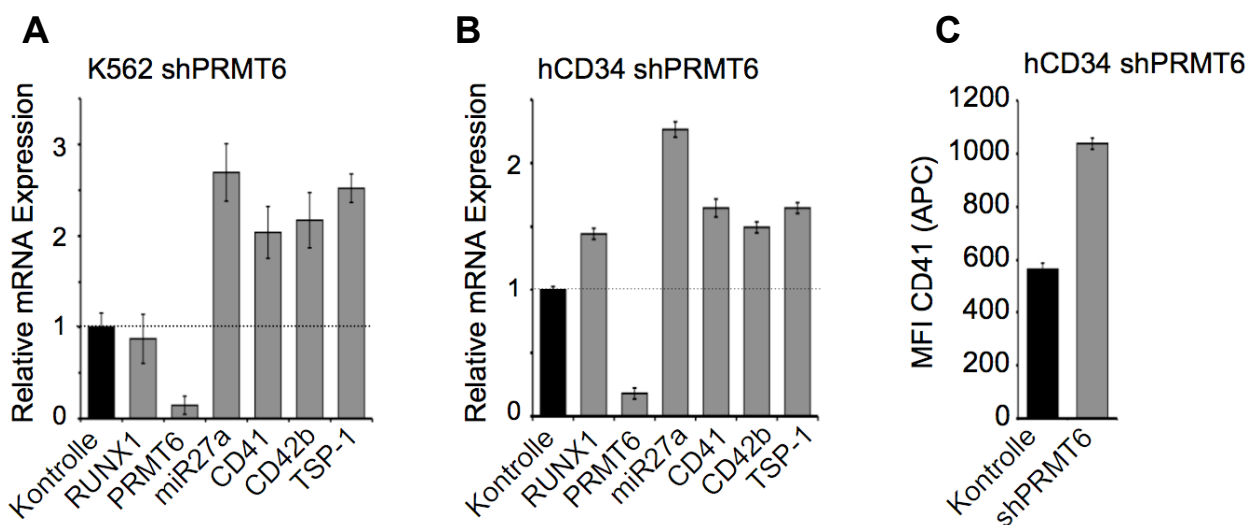


Abb. 3. 17: Knock down von *PRMT6* induziert die Expression von *RUNX1*-Zielgenen

Ein *knock down* von *PRMT6* in K562- (**A**) sowie CD34-Zellen (**B-C**) führte zu einer Erhöhung der Expression der megakaryozytären Zielgene von *RUNX1*. Zusätzlich konnte eine Zunahme des CD41-Oberflächenmarkers in CD34 shPRMT6-Zellen mittels FACS Analyse festgestellt werden (**C**).

Für dieses Experiment wurde die stabile K562-Zelllinie mit einem *knock down* von *PRMT6* benutzt. Humane CD34-Zellen wurden mit dem lentiviralen SEW-Vektor, welcher eine shRNA gegen das humane *PRMT6* bzw. *LacZ* enthielt, transduziert und mittels FACS wurden die GFP positiven Zellen herausortiert. Nach anschließender RNA-Isolierung wurde die cDNA in einer qRT-PCR quantifiziert. Außerdem wurden die transduzierten CD34-Zellen mittels FACS auf die Expression des Oberflächenmoleküls *CD41* untersucht. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung aus mindestens zwei unabhängigen Experimenten und vier unabhängigen Werten an. Die FACS-Analyse wurde von Dr. Ashok Kumar (aus der Arbeitsgruppe von Dr. Jörn Lausen, Georg-Speyer-Haus, Frankfurt) durchgeführt.

Der *knock down* von *PRMT6* in K562-Zellen resultierte in einer 2- bis 3-fach erhöhten Expression der *RUNX1*-Zielgene *miR27a*, *CD41*, *CD42b* und *TSP-1*, wohingegen die Expression von *RUNX1* gleich bleibend war (siehe Abb. 3.17 A).

Zur weiteren Überprüfung wurden humane CD34-Zellen lentiviral transduziert. Der dafür verwendete SEW Vektor enthielt eine Expressionskassette mit einer shRNA gegen das humane *PRMT6*. Die transduzierten CD34-Zellen wurden für 6 Tage in Expansionsmedium kultiviert und anschließend wurde die RNA isoliert.

Ähnlich zu dem *knock down* von *PRMT6* in K562-Zellen, wurden die megakaryozytären Zielgene von *RUNX1* in CD34 sh*PRMT6*-Zellen leicht verstärkt exprimiert. Jedoch konnte auch eine geringe Erhöhung der Expression von *RUNX1* beobachtet werden (siehe Abb. 3.17 B). Zusätzlich zur Analyse des Expressionsmusters auf mRNA-Ebene, sollte die Veränderung des *CD41*-Oberflächenmoleküls mittels FACS auf Proteinebene detektiert werden. In den *PRMT6 knock down* CD34-Zellen konnte eine Zunahme des *CD41*-Markers an der Zelloberfläche nachgewiesen werden. Der MFI (*median fluorescence intensity*) lag dabei um den Faktor 2 erhöht vor (siehe Abb. 3.17 C).

3.53 Überexpression von *PRMT6* führt zur reduzierten Expression von *RUNX1*-Zielgenen während der Megakaryozytendifferenzierung

Da ein *knock down* von *PRMT6* zu einer Expressionserhöhung der megakaryozytären *RUNX1*-Zielgene führt, sollte anschließend getestet werden, ob eine Überexpression von *PRMT6* den gegenteiligen Effekt zeigt.

Eine *PRMT6* stabil überexprimierende K562-Zelllinie wurde zu diesem Zweck erstellt (siehe 3.51). Dafür wurden K562-Zellen mit einem pIRES2-EGFP Vektor, welcher die cDNA von *PRMT6* enthält, transfiziert. Die transfizierten Zellen wurden anschließend mit G418 selektiert. Als Kontrolle ist der pIRES2-EGFP Leervektor verwendet worden.

Nach der Selektion wurden die Zellen mit TPA für 1-4 Tage Richtung Megakaryozyten differenziert. Anschließend wurde von undifferenzierten Zellen und von jedem Differenzierungszeitpunkt der *PRMT6* überexprimierenden und Kontroll-Zellen RNA isoliert und die cDNA mittels qRT-PCR analysiert.

Die Kontrollzellen sowie die *PRMT6* stabil überexprimierenden K562-Zellen zeigten eine Erhöhung der *RUNX1*-Expression während der Megakaryozytendifferenzierung um den Faktor 4 im Vergleich mit den unbehandelten Zellen (Daten hier nicht gezeigt). Diese Expressionsnahme war in beiden Zelllinien identisch.

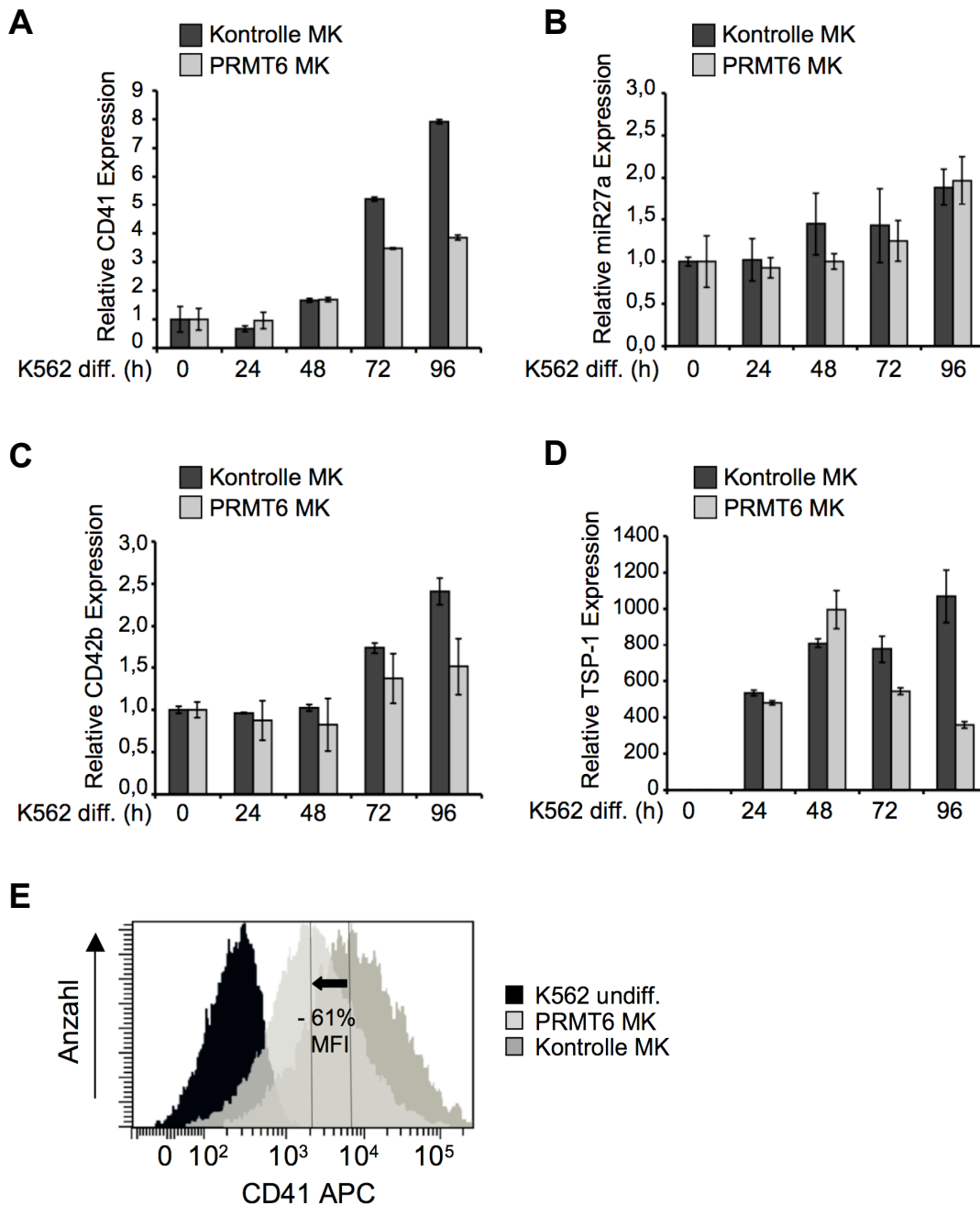


Abb. 3. 18: Überexpression von *PRMT6* inhibiert die Erhöhung der Expression von *RUNX1*-Zielgenen während der Megakaryozytendifferenzierung

(A-D) Während der Megakaryozytendifferenzierung zeigten die *RUNX1*-Zielgene in den K562-*PRMT6*-Zellen eine (partiell) geringere Erhöhung der Expression im Vergleich mit den Kontroll-Zellen. (E) In den *PRMT6*-überexprimierenden K562-Zellen konnte auch eine Dezimierung des CD41-Membranmoleküls mittels FACS detektiert werden.

Die *PRMT6* stabil überexprimierende K562-Zelllinie bzw. die Kontroll-Zelllinie wurde mit TPA für 1-4 Tage in Richtung Megakaryozyten induziert. Dafür wurden 2×10^6 Zellen pro 10 cm Zellkulturschale mit 30 nM TPA behandelt. Anschließend wurde von undifferenzierten Zellen und von jedem Differenzierungszeitpunkt der *PRMT6*-überexprimierenden und Kontroll-Zellen RNA isoliert und die cDNA mittels qRT-PCR analysiert. Die FACS-Analyse wurde von Dr. Ashok Kumar (aus der Arbeitsgruppe von Dr. Jörn Lausen, Georg-Speyer-Haus, Frankfurt) durchgeführt. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung aus mindestens zwei unabhängigen Experimenten und vier unabhängigen Werten an.

Während der Megakaryozytendifferenzierung zeigten die RUNX1-Zielgene *CD41*, *CD42b* und *TSP-1* in den K562-*PRMT6*-Zellen eine geringere Erhöhung der Expression im Vergleich mit den Kontroll-Zellen (siehe Abb. 3.18 A, C und D).

Der Unterschied in der *CD41*-Expression zeigte sich ab 72 Stunden und betrug bei 96 Stunden eine Verminderung der Expression um ca. 50%. Die Expression von *CD42b* nahm nach drei Tagen zu und ergab eine 2,5-fache Erhöhung in den Kontroll-Zellen und eine 1,5-fache Zunahme in den *PRMT6*-überexprimierenden K562-Zellen. Die Expression von *TSP-1* wurde während der Megakaryozytendifferenzierung am stärksten induziert. Durch die Überexpression von *PRMT6* wurde die Expression dieses Gens 96 Stunden nach Induktion der Differenzierung um den Faktor 3,5 reduziert.

Bei der *miR27a* konnte nur ein transienter Effekt der Überexpression von *PRMT6* auf die Expression nachgewiesen werden (siehe Abb. 3.18 B). 48 Stunden nach TPA-Behandlung der Zellen konnte eine leichte Verringerung der *miR27a*-Expression in den *PRMT6*-überexprimierenden Zellen nachgewiesen werden. Jedoch war die Expressionserhöhung nach 96 Stunden in beiden Zelllinien wieder annähernd identisch.

Neben der verringerten Induktion der *CD41*-Expression in den *PRMT6*-überexprimierenden K562-Zellen konnte auch eine geringere Menge des CD41-Membranmoleküls mittels FACS detektiert werden (siehe Abb. 3.18 E). Eine 61%ige Verringerung des MFI (*median fluorescence intensity*) wurde in den *PRMT6*-K562-Zellen nachgewiesen.

Zusammenfassend führte ein *knock down* von *PRMT6* in K562- sowie CD34-Zellen zu einer Erhöhung der Expression der megakaryozytären Zielgene von RUNX1 sowie des CD41-Oberflächenmarkers auf Proteinebene.

Die Überexpression von *PRMT6* zeigte einen gegensätzlichen Effekt während der Megakaryozytendifferenzierung: Es konnte eine verringerte Induktion der Expression der RUNX1-Zielgene und eine Dezimierung des *CD41*-Oberflächenmarkers in *PRMT6*-K562-Zellen nachgewiesen werden.

Somit konnte gezeigt werden, dass *PRMT6* die Expression von RUNX1-Zielgenen in Progenitorzellen reprimiert. Wenn die Expression von *PRMT6* während der Megakaryozytendifferenzierung herabreguliert wird, wird die RUNX1-Zielgenexpression induziert.

3.6 Austausch eines RUNX1/PRMT6-Corepressor-Komplexes während der Megakaryozytendifferenzierung

3.61 Nachweis von RUNX1 und PRMT6 auf dem Promotor von megakaryozytären RUNX1-Zielgenen

Die bisherigen Ergebnisse deuten darauf hin, dass PRMT6 einen reprimierenden Effekt auf die Expression von RUNX1-Zielgenen besitzt. Die Regulation der megakaryozytären Zielgene sollte deshalb im Detail auf Promotor-ebene untersucht werden.

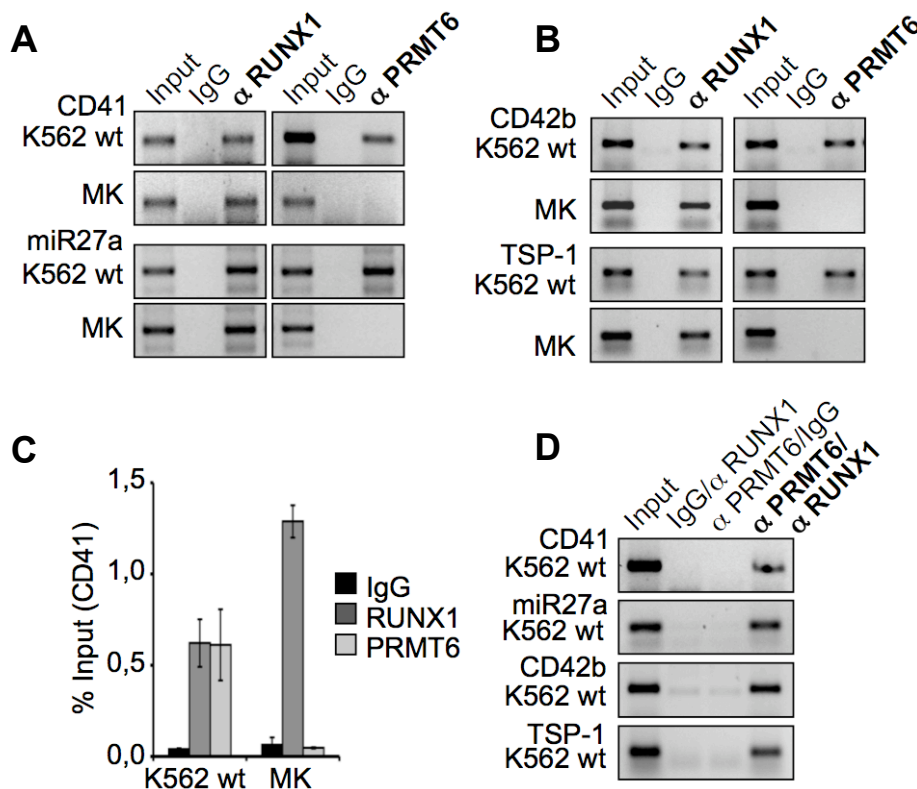


Abb. 3. 19: Nachweis von RUNX1 und PRMT6 auf dem Promotor von megakaryozytären RUNX1-Zielgenen

(A-C) RUNX1 und PRMT6 konnten in unbehandelten K562-Zellen auf dem Promotorbereich von *CD41*, *miR27a*, *CD42b* und *TSP-1* nachgewiesen werden. Nach der Differenzierung der Zellen konnte eine Bindung von RUNX1, jedoch keine Bindung von PRMT6 gezeigt werden (A-B). Mittels qRT-PCR konnte eine erhöhte Bindung von RUNX1 auf dem Promotorbereich von *CD41* während der Megakaryozytendifferenzierung ermittelt werden, während eine Bindung von PRMT6 nicht mehr nachzuweisen war (C). (D) Mit Hilfe einer sequenziellen Chromatin-Immunopräzipitation (ChIP-ReChIP) konnte eine gleichzeitige Bindung von PRMT6 und RUNX1 auf dem Promotor der vier Zielgene gezeigt werden.

Es wurde eine Chromatin-Immunopräzipitation von $1,25 \times 10^6$ undifferenzierten bzw. für 96 Stunden mit TPA induzierten K562-Zellen durchgeführt. Um das Chromatin anzureichern wurden 5-10 μ g eines anti-PRMT6 bzw. anti-RUNX1 Antikörpers verwendet. Für den ChIP-ReChIP wurde zuerst ein anti-PRMT6 Antikörper und anschließend ein anti-RUNX1 Antikörper in einer Probe benutzt. Die Proteine wurden durch die Proteinase K verdaut, die DNA wurde isoliert und mittels (quantitativer) PCR nachgewiesen. Für den Nachweis wurden Primer verwendet, die 80-250 bp

der verschiedenen Promotorbereiche amplifizieren. Die Input-DNA wurde 1:20 verdünnt und die PCR-Produkte wurden zu gleichen Mengen in einer 2%igen Agarosegelelektrophorese aufgetrennt. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung aus mindestens zwei unabhängigen Experimenten und vier unabhängigen Werten an.

Mit Hilfe einer Chromatin-Immunopräzipitation (ChIP) sollte die Besetzung des Promotorbereiches megakaryozytärer Zielgene von RUNX1 untersucht werden (siehe 5.313 und 5.314). Dafür wurden die Protein/DNA-Komplexe durch die Behandlung der K562-Zellen mit Formaldehyd verbunden. Die Zellen wurden lysiert und das Chromatin durch Sonifizierung fragmentiert. Spezifische Antikörper und magnetische *Beads* wurden benutzt, um bestimmte Protein/DNA-Komplexe anzureichern. Die Proteine wurden durch die Proteinase K verdaut, die DNA wurde isoliert und mittels (quantitativer) PCR nachgewiesen. Dafür wurden Primerpaare verwendet, die Promotorbereiche der megakaryozytären Zielgene um potentielle RUNX1-Bindestellen amplifizieren.

Die Promotorbereiche von *CD41*, *miR27a*, *CD42b* und *TSP-1* wurden vor und nach der Induktion der Megakaryozytendifferenzierung auf PRMT6- und RUNX1-Bindung geprüft. Beide Faktoren konnten in unbehandelten K562-Zellen auf dem Promotorbereich der vier megakaryozytären Zielgene nachgewiesen werden. Nach der Megakaryozyten-differenzierung konnte eine Erhöhung der RUNX1-Bindung gezeigt werden, wohingegen PRMT6 nicht mehr zu detektieren war (siehe Abb. 3.19 A-B). Mittels qRT-PCR konnte eine erhöhte Bindung von RUNX1 auf dem Promotorbereich von *CD41* während der Megakaryozytendifferenzierung ermittelt werden, während eine Bindung von PRMT6 nicht mehr nachzuweisen war (siehe Abbildung 3.19 C). Durch die Benutzung der anti-PRMT6 und anti-RUNX1 Antikörper nacheinander in einem ChIP-Experiment (ChIP-ReChIP) konnte eine gleichzeitige Bindung beider Proteine auf dem Promotor von *CD41*, *miR27a*, *CD42b* und *TSP-1* in undifferenzierten Zellen gezeigt werden (siehe Abb. 3.19 D).

3.62 Nachweis von Corepressoren auf dem Promotor von megakaryozytären RUNX1-Zielgenen

Ausgehend von der Idee, dass PRMT6 ein Teil eines Corepressorkomplexes von RUNX1 sein könnte, wurde die Bindung der Corepressoren und bekannten RUNX1-Interaktionspartner Sin3a und HDAC1 an die megakaryozytären Promotoren untersucht.

In undifferenzierten K562-Zellen konnten Sin3a und HDAC1 auf dem Promotor der Gene *CD41*, *miR27a*, *CD42b* und *TSP-1* nachgewiesen werden. Nach Induktion der Megakaryozyten-differenzierung lag keine Bindung der zwei Corepressoren mehr vor (siehe Abb. 3.20 A- B).

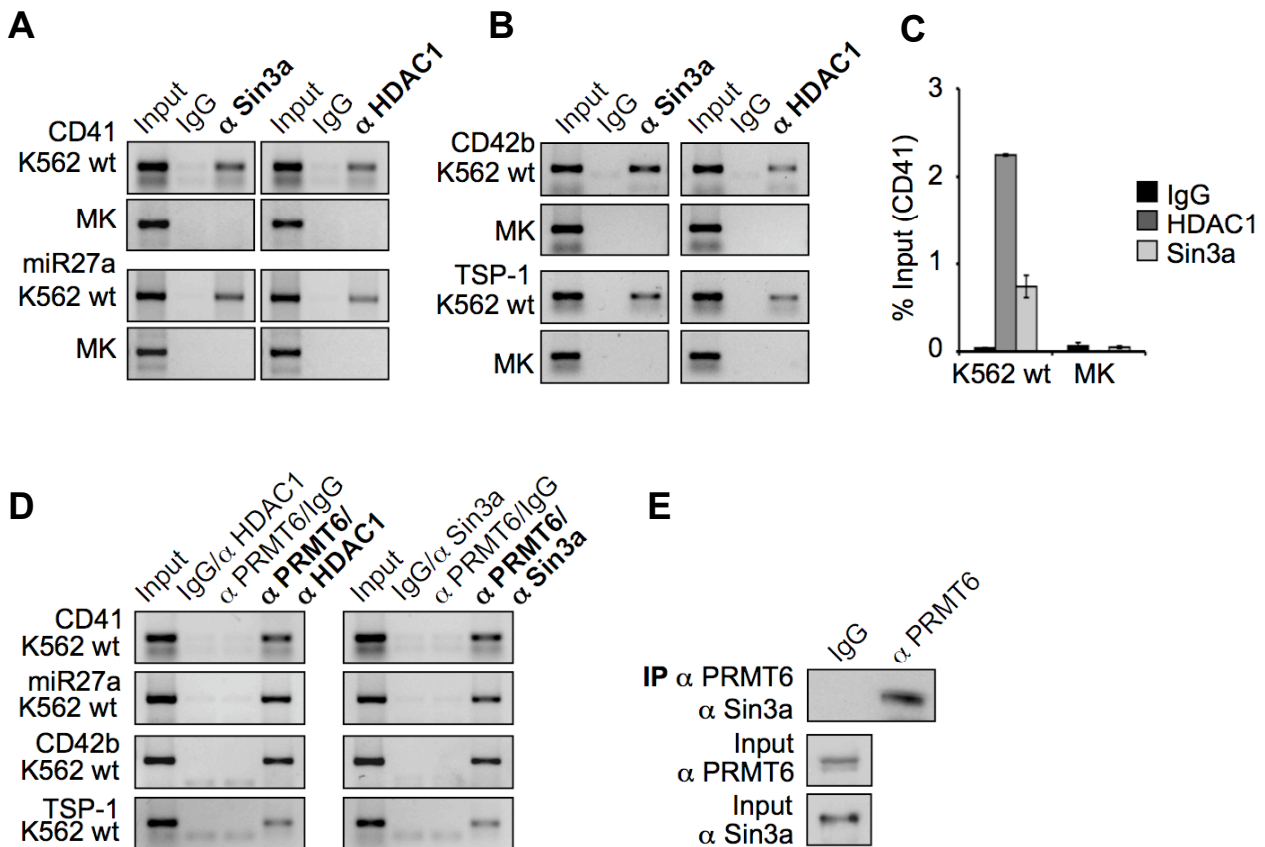


Abb. 3. 20: Nachweis von Sin3a und HDAC1 im Corepressorkomplex von megakaryozytären RUNX1-Zielgenen

(A-C) Sin3a und HDAC1 konnten in unbehandelten K562-Zellen auf dem Promotorbereich der megakaryozytären RUNX1-Zielgene *CD41*, *miR27a*, *CD42b* und *TSP-1* nachgewiesen werden. Nach der Differenzierung der Zellen konnte keine Bindung der beiden Corepressoren gezeigt werden (A-B). Die Bindung von HDAC1 und Sin3a an den *CD41*-Promotor konnte mittels qRT-PCR quantifiziert werden (C). Eine Chromatin-Immunopräzipitation von $1,25 \times 10^6$ undifferenzierten bzw. für 96 Stunden mit TPA induzierten K562-Zellen mit spezifischen Antikörpern gegen Sin3a und HDAC1 durchgeführt. Für die PCR wurden Primer verwendet, die Bereiche des *CD41*, *miR27a*, *CD42b* und *TSP-1* Promotors amplifizieren. Die Input-DNA wurde 1:20 verdünnt und die PCR-Produkte wurden zu gleichen Mengen in einer 2%igen Agarosegelelektrophorese aufgetrennt. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung aus mindestens zwei unabhängigen Experimenten und vier unabhängigen Werten an. (D) Mit Hilfe einer sequenziellen Chromatin-Immunopräzipitation konnte eine gleichzeitige Bindung von PRMT6 mit HDAC1 und Sin3a in undifferenzierten K562-Zellen auf dem Promotorbereich der megakaryozytären Zielgene von RUNX1 gezeigt werden. Für den ChIP-ReChIP wurde zuerst ein anti-PRMT6 Antikörper und darauf ein anti-HDAC1 bzw. anti-Sin3a Antikörper verwendet. (E) In unbehandelten K562-Zellen konnte eine Interaktion von PRMT6 und Sin3a nachgewiesen werden. Aus 3×10^7 K562-Zellen wurden Kernextrakte hergestellt und mit Hilfe eines anti-PRMT6 Antikörpers und magnetischen Protein G-Beads PRMT6 angereichert. Im Western Blot wurde der Interaktionspartner Sin3a nachgewiesen.

Mittels qRT-PCR konnte eine Bindung von HDAC1 und Sin3a an den *CD41*-Promotor zu 0,8-2,2% Input in undifferenzierten K562-Zellen ermittelt werden (siehe Abb. 3.20 C). Es konnte somit bislang gezeigt werden, dass die Protein Arginin Methyltransferase 6 und die Corepressoren Sin3a und HDAC1 in megakaryozytären Vorläuferzellen auf dem Promotorbereich von megakaryozytären Zielgenen von RUNX1 zu finden sind.

Mit Hilfe eines ChIP-ReChIP konnte eine gemeinsame Bindung von PRMT6 mit HDAC1 und Sin3a auf dem Promotorbereich der megakaryozytären Gene gezeigt werden. Dafür wurde zuerst ein anti-PRMT6 Antikörper und darauf ein anti-HDAC1 bzw. anti-Sin3a Antikörper verwendet (siehe Abb. 3.20 C).

Zur Überprüfung der Interaktion von PRMT6 mit dem Corepressor Sin3a wurde eine Coimmunopräzipitation durchgeführt. Aus 3×10^7 unbehandelten K562-Zellen wurden Kernextrakte hergestellt und mit Hilfe eines anti-PRMT6 Antikörpers und magnetischen Protein G-Beads wurde PRMT6 angereichert. Im Western Blot wurde der Interaktionspartner Sin3a nachgewiesen. Wie in Abbildung 3.20 D ersichtlich konnte mittels Coimmunopräzipitation eine Interaktion von endogenem PRMT6 und Sin3a gezeigt werden.

3.63 Nachweis von Coaktivatoren auf dem Promotor von megakaryozytären RUNX1-Zielgenen

In dieser Arbeit konnte in vorangegangenen Experimenten gezeigt werden, dass die Protein Arginin Methyltransferase 6 ein Teil eines Corepressorkomplexes von RUNX1 mit Sin3a und HDAC1 ist, der in megakaryozytären Vorläuferzellen Zielgene von RUNX1 reprimiert.

Da die Expression der untersuchten RUNX1-Zielgene während der Megakaryozyten-differenzierung hochreguliert wird und RUNX1 in dem Corepressor- sowie dem Coaktivatorkomplex vorkommt, sollte nun die Bindung von Coaktivatoren auf dem Promotorbereich von RUNX1-Zielgenen während der Differenzierung untersucht werden.

Zur Untersuchung dieser Fragestellung wurde die Bindung der Coaktivatoren und bekannten RUNX1-Interaktionspartner p300, PCAF, PRMT1, sowie die Bindung von WDR5 (*WD-repeat domain 5*) an regulatorische Elemente von megakaryozytären Zielgenen während der Megakaryozytendifferenzierung untersucht. PCAF und p300 acetylieren den N-Terminus des Histons 3 (Schiltz *et al.*, 1999;). Für PRMT1 wurde die Methylierung von RUNX1 und des Histons 4 am Arginin 3 beschrieben (Zhao *et al.*, 2008). WDR5 ist eine wichtige Komponente des MLL- Komplexes (*mixed-lineage leukemia*), der die Methylierung des Lysins 4 von Histon 3 (H3K4me3) katalysiert (Milne *et al.*, 2002). Hyperacetylierung, sowie die Histonmodifikationen H4R3me2 und H3K4me3 werden in aktiv transkribierten Genabschnitten gefunden.

In TPA behandelten K562-Zellen konnte die Bindung von p300 und WDR5 auf dem Promotor der Gene *CD41*, *miR27a*, *CD42b* und *TSP-1* nachgewiesen werden. Vor der Induktion der Megakaryozytendifferenzierung lag keine Bindung der Coaktivatoren vor (siehe Abb. 3.21 A-B).

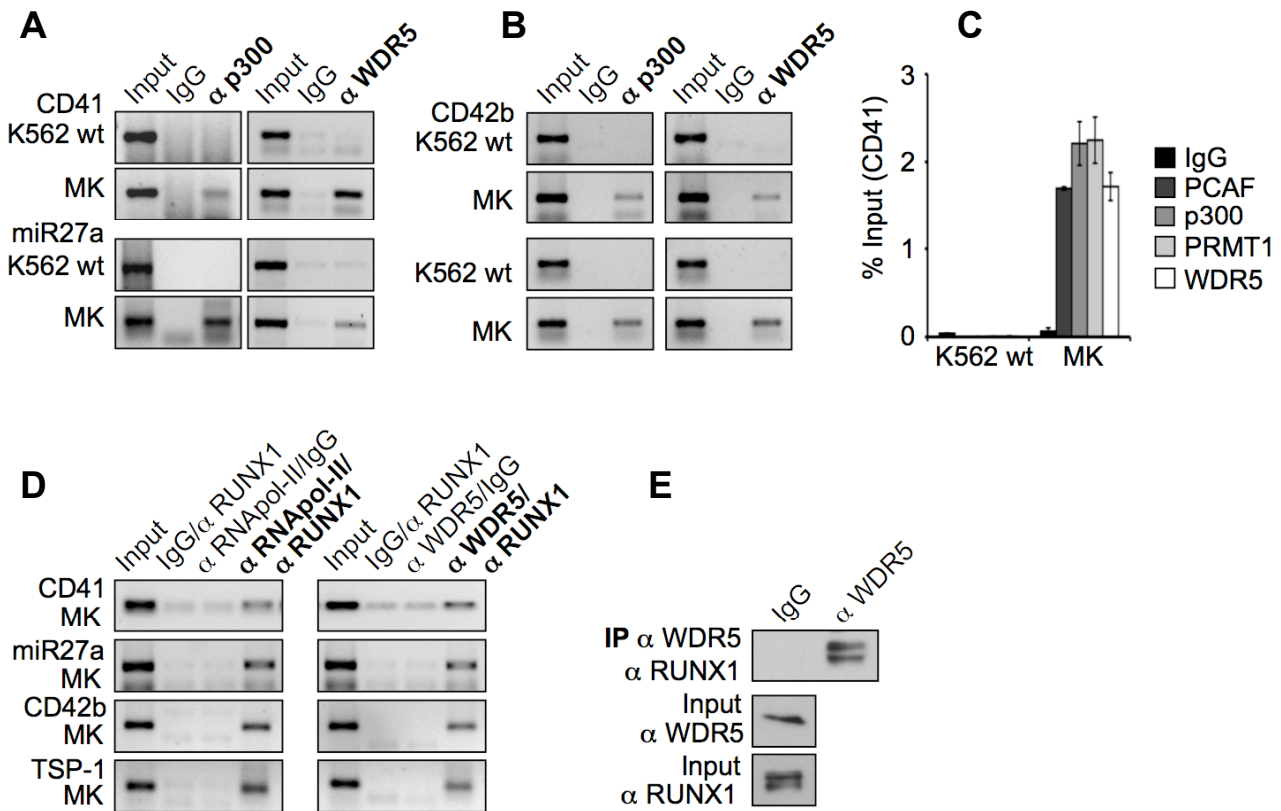


Abb. 3. 21: Nachweis der Coaktivatoren PCAF, p300, PRMT1 und WDR5 auf dem Promotorbereich von megakaryozytären RUNX1-Zielgenen

(A-C) p300 und WDR5 konnten in TPA behandelten K562-Zellen auf dem Promotorbereich der megakaryozytären Zielgene *CD41*, *miR27a*, *CD42b* und *TSP-1* nachgewiesen werden. Vor der Differenzierung der Zellen konnte keine Bindung der beiden Coaktivatoren gezeigt werden (A-B). Mittels qRT-PCR konnte die Bindung von PCAF, P300, PRMT1 und WDR5 an den *CD41*-Promotor in differenzierten K562-Zellen ermittelt und quantifiziert werden (C). Bei der Chromatin-Immunopräzipitation wurden undifferenzierte und für 96 Stunden mit TPA induzierte K562-Zellen und spezifische Antikörper gegen PCAF, p300, PRMT1 und WDR5 verwendet. Für die (quantitative) PCR wurden Primer benutzt, welche bestimmte Bereiche des *CD41*, *miR27a*, *CD42b* und *TSP-1* Promotors amplifizieren. Die PCR-Produkte wurden in einer 2%igen Agarosegelelektrophorese aufgetrennt, wobei die Input-DNA 1:20 verdünnt verwendet wurde. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung aus mindestens zwei unabhängigen Experimenten und vier unabhängigen Werten an. (D) Mit Hilfe einer sequenziellen Chromatin-Immunopräzipitation konnte eine gemeinsame Bindung von RUNX1 mit WDR5 und mit der RNA-Polymerase II (RNAPol-II) in differenzierten K562-Zellen gezeigt werden. Für den ChIP-ReChIP wurde zuerst ein anti-RNA Polymerase II Antikörper bzw. ein anti-WDR5 Antikörper und darauf ein anti-RUNX1 Antikörper verwendet. (E) In TPA induzierten K562-Zellen konnte eine Interaktion von RUNX1 und WDR5 nachgewiesen werden. Aus 3×10^7 K562-Zellen wurden Kernextrakte hergestellt und mit Hilfe eines anti-WDR5 Antikörpers und magnetischen *Beads* wurde PRMT6 angereichert. Im Western Blot wurde der Interaktionspartner RUNX1 nachgewiesen.

Mittels qRT-PCR konnte eine Bindung von PCAF, p300, PRMT1 und WDR5 zu 1,8-2,3% Input an den *CD41*-Promotor in differenzierten K562-Zellen ermittelt werden. Alle vier aktivierenden epigenetischen Regulatoren sind erst nach TPA-Induktion auf dem *CD41-Locus* nachweisbar (siehe Abb. 3.21 C).

Der Austausch eines RUNX1-Corepressorkomplexes mit Sin3a und HDAC1 gegen einen RUNX1-Coaktivatorkomplex konnte somit auf dem *CD41*-Promotor während der Differenzierung in Richtung Megakaryozyten mittels qRT-PCR gezeigt werden (siehe Abb. 3.20 C und 3.21 C).

In vorausgegangenen Untersuchungen wurde eine Interaktion von RUNX1 mit PRMT1 gezeigt (Zhao *et al.*, 2008). Dabei führte eine Methylierung von RUNX1 durch PRMT1 zur Verminderung der Interaktion von RUNX1 mit dem Corepressor Sin3a. Auch in dieser Arbeit konnte bestätigt werden, dass Sin3a und PRMT1 in zwei unterschiedlichen RUNX1-Komplexen vorliegen.

Zusätzlich konnte eine gleichzeitige Bindung von RUNX1 mit WDR5 sowie mit der RNA-Polymerase II auf den vier Promotorbereichen der megakaryozytären Zielgene mit Hilfe einer sequenziellen Chromatin-Immunopräzipitation gezeigt werden (siehe Abb. 3.21 D). Da die Expression der untersuchten RUNX1-Zielgene während der Differenzierung in Richtung Megakaryozyten induziert wird, wurde die Interaktion von RUNX1 mit der RNA-Polymerase II als Indiz für eine Aktivierung der Expression untersucht und konnte mittels ChIP-ReChIP bestätigt werden.

Zur weiteren Überprüfung der Interaktion von RUNX1 mit Coaktivatoren wurde eine Coimmunopräzipitation in TPA induzierten K562-Zellen durchgeführt. Dafür wurden aus 3×10^7 K562-Zellen, welche für 96 h mit TPA behandelt wurden, Kernextrakte hergestellt und mit Hilfe eines anti-WDR5 Antikörpers und magnetischen Protein G-*Beads* WDR5 angereichert. Im Western Blot konnte der Interaktionspartner RUNX1 nachgewiesen werden. Somit konnte mittels Coimmunopräzipitation eine Interaktion von endogenem RUNX1 mit WDR5 nachgewiesen werden (siehe Abb. 3.21 E).

In vorangegangenen Arbeiten wurde gezeigt, dass ein transkriptionell aktiver RUNX1-Komplex während der Megakaryozytendifferenzierung mit dem Transkriptionsfaktor GATA1 verknüpft ist (Elagib *et al.*, 2003; Pencovich *et al.*, 2010). Es wurde beschrieben, dass die Expression von megakaryozytären Genen durch GATA1/FOG1 (*friend of GATA1*) induziert wird. Außerdem konnte eine Induktion der Expression beider Faktoren während der Megakaryozytendifferenzierung nachgewiesen werden (siehe 3.43).

Deshalb wurde in dieser Arbeit ebenfalls die Bindung von GATA1 und FOG1 untersucht. Auf den Promotorbereichen der megakaryozytären RUNX1-Zielgene konnten GATA1 und FOG1

nach der Induktion von K562-Zellen nachgewiesen werden, jedoch nicht in unbehandelten Zellen (siehe Abb. 3.22 A-B).

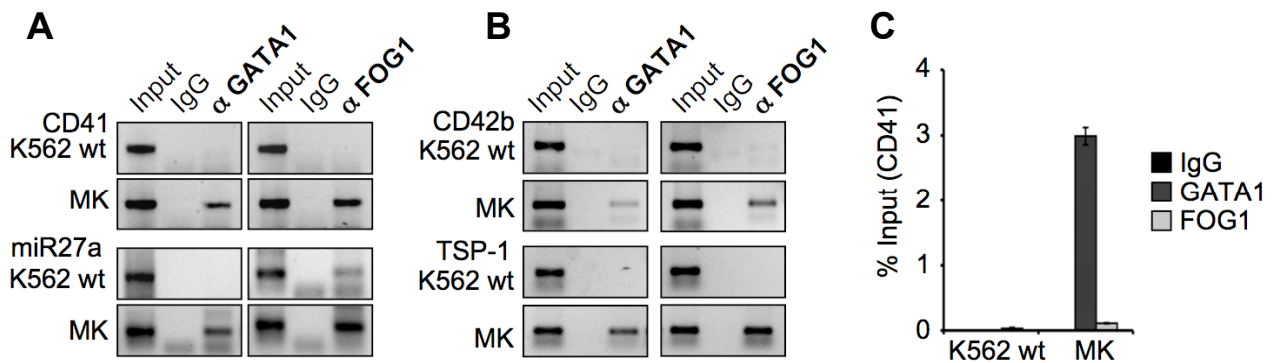


Abb. 3. 22: Nachweis von GATA1 und FOG1 auf dem Promotorbereich von megakaryozytären RUNX1-Zielgenen

(A-C) GATA1 und FOG1 konnten in TPA behandelten K562-Zellen auf dem Promotorbereich von *CD41*, *miR27a*, *CD42b* und *TSP-1* nachgewiesen werden, während vor der Differenzierung der Zellen keine Bindung gezeigt werden konnte (A-B). Mittels qRT-PCR konnte die Bindung GATA1 und FOG1 auf dem *CD41*-Promotor nach TPA-Induktion quantifiziert werden (C).

Bei der Chromatin-Immunopräzipitation wurden undifferenzierte und für 96 Stunden mit TPA induzierte K562-Zellen und spezifische Antikörpern gegen GATA1 und FOG1 verwendet. Für die PCR wurden Primer benutzt, welche bestimmte Bereiche des *CD41*, *miR27a*, *CD42b* und *TSP-1* Promotors amplifizieren. Die PCR-Produkte wurden in einer 2%igen Agarosegelelektrophorese aufgetrennt, wobei die Input-DNA 1:20 verdünnt verwendet wurde. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung aus mindestens zwei unabhängigen Experimenten und vier unabhängigen Werten an.

Eine leichte Bindung von FOG1 konnte auch vor der Differenzierung der K562-Zellen auf dem *miR27a*-Promotor festgestellt werden (siehe Abb. 3.22 A). Mittels qRT-PCR konnte die Bindung von GATA1 und FOG1 an den *CD41*-Promotor quantifiziert werden. Dabei war im Vergleich zur Bindung von GATA1 eine geringere FOG1-Bindung in differenzierten K562-Zellen detektierbar (siehe Abb. 3.22 C).

3.64 Verifizierung des Austausches eines RUNX1/PRMT6-Corepressor-Komplexes während der Megakaryozytendifferenzierung in HEL-Zellen

Zum Ausschluss eines zelltypspezifischen Effektes, sollte der Austausch eines Corepressor-Komplexes gegen einen Coaktivator-Komplex während der Megakaryozytendifferenzierung in HEL-Zellen überprüft werden.

RUNX1, PRMT6 und der Corepressor Sin3a konnten in undifferenzierten HEL-Zellen auf dem Promotorbereich von *CD41* und *miR27a* nachgewiesen werden. Nach der Megakaryozyten-

differenzierung konnte die Bindung von RUNX1 und dem Coaktivator p300 gezeigt werden, wohingegen PRMT6 und Sin3a nicht mehr zu detektieren waren (siehe Abb. 3.23 A).

Durch einen sequenziellen ChIP konnte gleichzeitige Bindung beider Proteine auf dem *CD41*- und *miR27a*-Promotor auch in HEL-Zellen gezeigt werden (siehe Abb. 3.23 B). Für den ChIP-ReChIP wurden die Chromatin-/DNA-Komplexe zuerst mit einem PRMT6- und anschließend mit einem RUNX1-Antikörper angereichert.

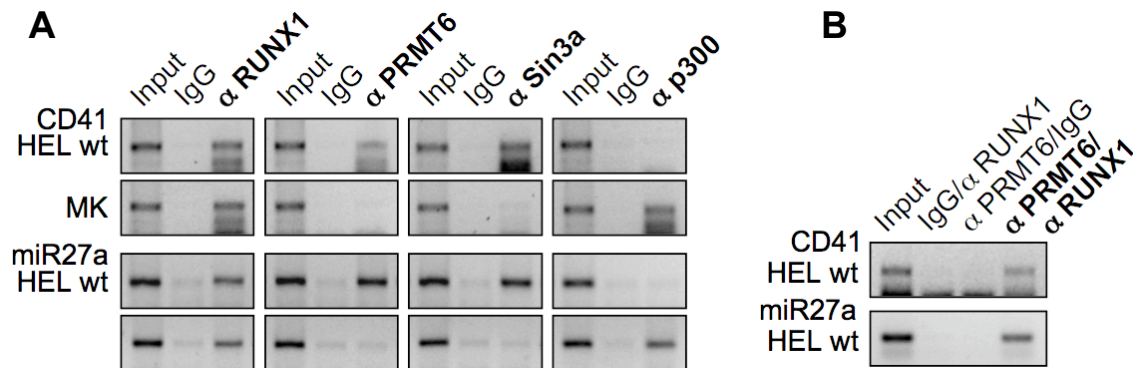


Abb. 3. 23: Nachweis von RUNX1, PRMT6, Sin3a und p300 auf dem Promotorbereich der RUNX1-Zielgene *CD41* und *miR27a*

(A) RUNX1, PRMT6 und der Corepressor Sin3a konnten in unbehandelten HEL-Zellen auf dem *CD41*- und *miR27a*-Promotor nachgewiesen werden. Nach der Differenzierung der Zellen konnte die Bindung von RUNX1 und dem Coaktivator p300, jedoch nicht mehr die Bindung von PRMT6 und Sin3a gezeigt werden. Es wurde eine Chromatin-Immunopräzipitation von undifferenzierten und für 48 Stunden mit 15 nM TPA induzierten HEL-Zellen mit spezifischen Antikörpern gegen RUNX1, PRMT6, Sin3a und p300 verwendet. Für die PCR wurden Primer benutzt, welche die Bereiche des *CD41*- und *miR27a*- Promotors amplifizieren. Die PCR-Produkte wurden in einer 2%igen Agarosegelelektrophorese aufgetrennt, wobei die Input-DNA 1:20 verdünnt verwendet wurde.

(B) Mit Hilfe einer sequenziellen Chromatin-Immunopräzipitation konnte eine gleichzeitige Bindung von PRMT6 und RUNX1 auf dem Promotor von *CD41* und *miR27a* in undifferenzierten HEL-Zellen nachgewiesen werden. Dafür wurde das Chromatin erst mit einem anti-PRMT6 Antikörper und darauf mit einem anti-RUNX1 Antikörper angereichert.

In diesem Abschnitt wurde die Besetzung der Promotorbereiche von *CD41*, *miR27a*, *CD42b* und *TSP-1* vor und nach der Induktion der Megakaryozytendifferenzierung in K562- und HEL-Zellen untersucht. RUNX1 konnte in unbehandelten und differenzierten Zellen auf dem Promotorbereich der vier megakaryozytären Zielgene nachgewiesen werden. Es konnte gezeigt werden, dass die Protein Arginin Methyltransferase 6 ein Teil eines Corepressorkomplexes von RUNX1 mit Sin3a und HDAC1 ist, der in megakaryozytären Vorläuferzellen die Zielgene von RUNX1 reprimiert. Dieser Corepressorkomplex wird während der Differenzierung in Richtung Megakaryozyten durch einen Coaktivatorkomplex mit PCAF, p300, PRMT1, WDR5, GATA1 und FOG1 ausgetauscht.

3.7 Dynamische Regulation von H3R2me2 versus H3K4me3 während der Megakaryozytendifferenzierung

In dieser Arbeit konnte bereits gezeigt werden, dass PRMT6 ein Teil eines RUNX1 Corepressorkomplexes ist, der während der Megakaryozytendifferenzierung gegen einen Coaktivatorkomplex ausgetauscht wird. Als Konsequenz daraus wird die Expression der megakaryozytären Zielgene von RUNX1 während der Differenzierung in Richtung Megakaryozyten induziert.

Es ist bereits gezeigt worden, dass PRMT6 eine Typ I Protein Arginin Methyltransferase ist, welche das Arginin 2 von Histon 3 asymmetrisch dimethyliert (H3R2me2as) (Guccione *et al.*, 2007; Hyllus *et al.*, 2007). Diese Histonmodifikation wird häufig in Heterochromatin oder transkriptionell inaktiven Regionen von Euchromatin gefunden und kommt nicht auf aktiven Promotoren vor.

Die Dimethylierung von H3R2 blockiert die Bindung des WDR5/MLL-Komplexes und hat somit einen negativen Einfluss auf die Funktion der MLL-Lysin-Methyltransferase und inhibiert in Folge dessen die Trimethylierung von H3K4 (Guccione *et al.*, 2007; Hyllus *et al.*, 2007; Iberg *et al.*, 2008). Die Trimethylierung von H3K4 wird dem Promotorbereich von Genen gefunden, die aktiv transkribiert werden.

3.7.1 Veränderung der Histonmodifikationen während der Megakaryozytendifferenzierung

Die Dimethylierung von H3R2 ist eine Markierung für inaktives Chromatin und unterdrückt die Trimethylierung von H3K4, welche in aktiv transkribierten Regionen gefunden werden kann. PRMT6 könnte somit die Transkription von RUNX1 Zielgenen unterdrücken, indem H3K4me3 blockiert wird.

Um diese Hypothese zu überprüfen, wurde eine Chromatin-Immunopräzipitation von unbehandelten und differenzierten hCD34- und K562-Zellen durchgeführt. Dafür wurden anti-H3R2me2, anti-H3K4me3, anti-H3K9me3 und anti-H3K9ac Antikörpern verwendet und die mit diesen Histonmodifikationen assoziierte DNA mittels qRT-PCR gemessen. Die Acetylierung von H3K9 wird in aktiv transkribierten Regionen gefunden und dient als Kontrolle für aktives Chromatin. Der Gegenspieler der Acetylierung von H3K9 ist die (Tri-) Methylierung an diesem Lysin, welche in inaktiven Genbereichen bzw. konstitutivem Heterochromatin vorkommt. Als weitere Kontrolle wurde ein Antikörper gegen das Histon 3 gewählt, um unterschiedliche Ausgangsmengen in der Immunopräzipitation auszugleichen.

Für die qRT-PCR wurden Primer verwendet, die spezifisch bestimmte Regionen von *CD41* und *miR27a* amplifizieren. Der *CD41*- und *miR27a*-Locus wurde dafür nach potentiellen Bindestellen

von RUNX1 mit Hilfe des Analyseprogramms TESS (*Transcription Element Search System*, Schug *et al.*, 1998) untersucht. Es wurden RUNX1-Bindestellen am jeweiligen Promotorbereich und in einer *upstream* Region von *CD41* und einem regulatorischen Element der *miRNA27a* (Ben-Ami *et al.*, 2008), welches ca. -10.000 bp vom Promotor entfernt liegt, gefunden (siehe Abb. 3.24 A, B). Die Primerpaare für die qRT-PCR wurden so gewählt, dass ein Bereich von 80-200 bp um die RUNX1-Bindestellen amplifiziert wird. Zusätzlich dazu wurde jeweils ein Primerpaar *downstream* des Transkriptionsstarts gewählt. Es ist bekannt, dass die Histonmodifikationen der Promotorbereiche auch nach dem Transkriptionsstart mit geringerer Häufigkeit vorhanden sind.

In expandierten, aber undifferenzierten hCD34-Zellen konnte eine Dimethylierung von H3R2 auf dem *CD41*-Promotor festgestellt werden. Nach TPO Induktion lag die reprimierende H3R2me2 nicht mehr vor. Dafür konnte die aktivierende H3K4me3 nachgewiesen werden (Abb. 3.24 A). Dasselbe Verteilungsmuster der beiden Histonmodifikationen war auch am *miR27a*-Promotor zu erkennen. Jedoch traten die Histonmodifikationen mit geringerer Häufigkeit auf (siehe Abb. 3.24 B).

Eine Dimethylierung am H3R2 konnte *upstream* des Promotors, an der Promotorregion und zu einem geringen Maße *downstream* des Transkriptionsstarts von *CD41* in undifferenzierten K562-Zellen nachgewiesen werden (siehe Abb. 3.24 A). Ebenso konnte diese Histonmodifikation am Promotorbereich der *miRNA27a* und mit einer geringeren Häufigkeit an dem regulatorischen Element und *downstream* des Transkriptionsstarts gefunden werden. Während der Differenzierung der K562-Zellen nahm die H3R2-Dimethylierung ab, während die Trimethylierung von H3K4 auf dem *CD41*- und *miR27a*-Locus stark zunahm (siehe Abb. 3.24 A, B). Gleichzeitig mit der Zunahme der Methylierung von H3K4 während der Differenzierung der K562-Zellen konnte eine starke Erhöhung der aktivierenden Acetylierung an H3K9 detektiert werden (siehe Abb. 3.24 A, B). Diese war an der *upstream* Region des *CD41*-Locus 2,5-fach stärker als am Promotorbereich oder *downstream* des Transkriptionsstarts. Ebenso lag am regulatorischen Element der *miR27a* die stärkste Acetylierung von H3K9 vor.

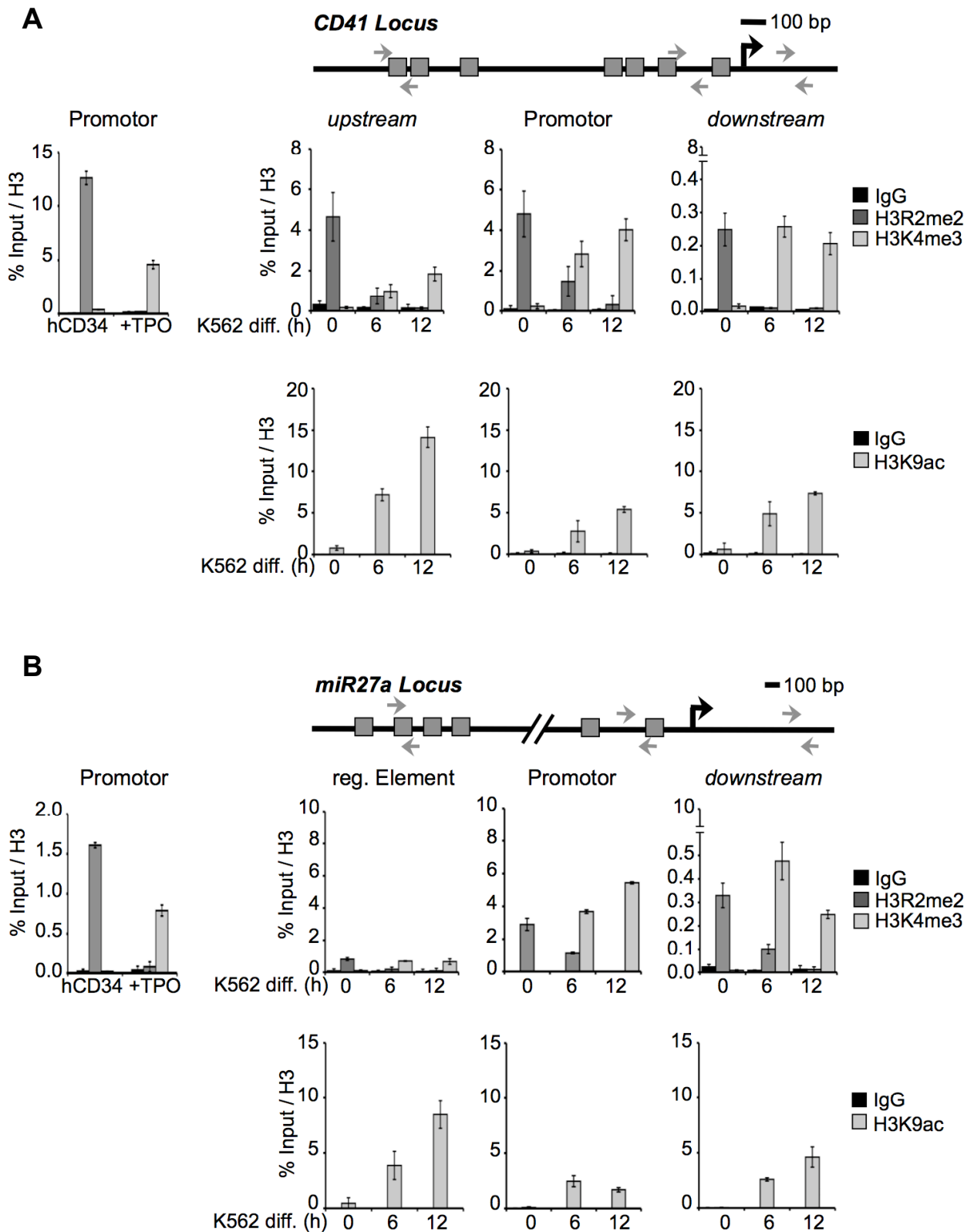


Abb. 3. 24: Veränderung der Histonmodifikationen während der Megakaryozytendifferenzierung

Eine H3R2-Dimethylierung konnte auf dem *CD41*- (**A**) und dem *miR27a*-Locus (**B**) in undifferenzierten hCD34- und K562 Zellen festgestellt werden. Während der Differenzierung der Zellen nahm die H3R2-Dimethylierung ab, während die H3K4me3 zunahm. Gleichzeitig mit der Zunahme der H3K4me3 konnte eine starke Erhöhung der Acetylierung von H3K9 nachgewiesen werden.

Von unbehandelten und TPO induzierten hCD34-Zellen sowie undifferenzierten und für 6-12 Stunden differenzierten K562-Zellen wurde eine Chromatin-Immunopräzipitation mit anti-H3, anti-H3R2me2, anti-H3K4me3 und anti-H3K9ac Antikörpern durchgeführt. Die mit diesen Histonmodifikationen assoziierte DNA wurde mittels qRT-PCR gemessen. Es wurden Primer verwendet, die spezifisch bestimmte Regionen von *CD41* und *miR27a* amplifizieren. Die Effizienz der verschiedenen Primerpaare wurde überprüft und ausgeglichen. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung aus mindestens zwei unabhängigen Experimenten und vier unabhängigen Werten an.

Zur Überprüfung der Verteilung der reprimierenden und aktivierenden Histonmodifikationen auf dem *CD41*- und *miR27a*-Promotor, wurde die Chromatin-Immunopräzipitation von H3R2me2 und H3K4me3 in HEL-Zellen wiederholt.

Eine gleiche Verteilung der Histonmodifikationen H3R2me2 und H3K4me3 auf dem *CD41*- und *miR27a*-Promotor konnte auch während der Differenzierung von HEL-Zellen nachgewiesen werden (siehe Abb. 3.25).

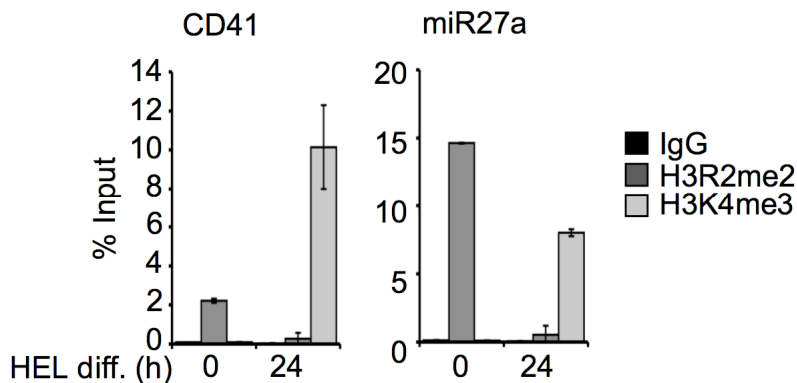


Abb. 3. 25: Veränderung der Histonmodifikationen H3R2me2 und H3K4me3 während der Megakaryozyten-differenzierung von HEL-Zellen

Am *CD41*- und *miR27a*-Promotor konnte während der Megakaryozytendifferenzierung eine Abnahme der Dimethylierung am H3R2 mit gleichzeitiger Zunahme der H3K4me3 festgestellt werden.

Eine Chromatin-Immunopräzipitation mit anti-H3R2me2 und anti-H3K4me3 Antikörpern wurde von undifferenzierten und für 24 Stunden mit TPA induzierten HEL-Zellen (HEL diff.) durchgeführt. In der anschließenden qRT-PCR wurden Primer verwendet, die spezifisch den Promotorbereich von *CD41* und *miR27a* amplifizieren. Die Effizienz der Primer wurde überprüft und ausgeglichen. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung aus mindestens zwei unabhängigen Experimenten und vier unabhängigen Werten an.

Die Dimethylierung von H3R2 lag in undifferenzierten HEL-Zellen auf beiden Promotoren vor. Die Abnahme dieser Modifikation während der Megakaryozytendifferenzierung ging mit einer Zunahme der aktivierenden H3K4me3 einher. Die reprimierende Markierung war stärker auf dem *miR27a*-Promotor nachweisbar.

In diesem Abschnitt konnte gezeigt werden, dass die reprimierende Dimethylierung am H3R2 in undifferenzierten hCD34-, K562- und HEL-Zellen auf dem *CD41*- und *miR27a*-Locus auftritt. Während der Megakaryozytendifferenzierung der Zellen nahm die H3R2me2 ab, während die aktivierenden Histonmodifikationen H3K4me3 und H3K9ac stark zunahm. Die Bindung von WDR5 ist gleichzeitig mit der H3K4-Trimethylierung auf dem Promotorbereich von RUNX1-Zielgenen in differenzierten Zellen zu finden.

Die Veränderungen der Histonmodifikationen H3R2me2 und H3K4me3 sowie die Zunahme von H3K9ac korreliert mit dem Verlust der Bindung von PRMT6 an den Promotoren der megakaryozytären Zielgene von RUNX1 während der Megakaryozytendifferenzierung. Die gesammelten Daten legen nahe, dass der Bindungsverlust von PRMT6 während der Megakaryozytendifferenzierung zu einer Verringerung der H3R2-Dimethylierung führt.

3.72 PRMT6 katalysiert die asymmetrische Dimethylierung von H3R2 auf dem Promotorbereich der megakaryozytären RUNX1-Zielgene

PRMT6 ist die hauptsächliche H3R2-Methyltransferase (Hyllus *et al.*, 2007). Es konnte bereits in dieser Arbeit gezeigt werden, dass diese Histonmodifikation auch auf dem Promotorbereich der megakaryozytären Zielgene von RUNX1 in undifferenzierten Zellen gefunden werden kann. Desweiteren sollte nachgewiesen werden, dass PRMT6 die verantwortliche Methyltransferase ist und die Dimethylierung des H3R2 auf dem Promotorbereich von RUNX1-Zielgenen katalysiert.

Zur Erbringung des Nachweises wurde die stabile K562-Zelllinie verwendet, in welcher ein *knock down* von PRMT6 durch eine *small hairpin RNA* vorliegt. Eine Chromatin-Immunopräzipitation wurde mit einem anti-H3R2me2 spezifischen Antikörper bzw. einem anti-H3 Antikörper zur Kontrolle durchgeführt. Anschließend wurde die H3R2me2-assoziierte DNA mittels qRT-PCR auf die Anreicherung bestimmter Promotorbereiche von *CD41*, *miR27a*, *CD42b* und *TSP-1* untersucht.

Auf den Promotorbereichen der vier megakaryozytären Zielgene konnte in den Kontroll-Zellen (Kontr.) eine Dimethylierung von H3R2 zwischen 2-3% Input nachgewiesen werden (siehe Abb. 3.26). Ein spezifischer *knock down* von PRMT6 führte zu einer starken Verringerung dieser Histonmodifikation.

Somit konnte gezeigt werden, dass die Methylierung von H3R2 auf den Promotorbereichen der megakaryozytären Zielgene *CD41*, *miR27a*, *CD42b* und *TSP-1* hauptsächlich von PRMT6 katalysiert wird.

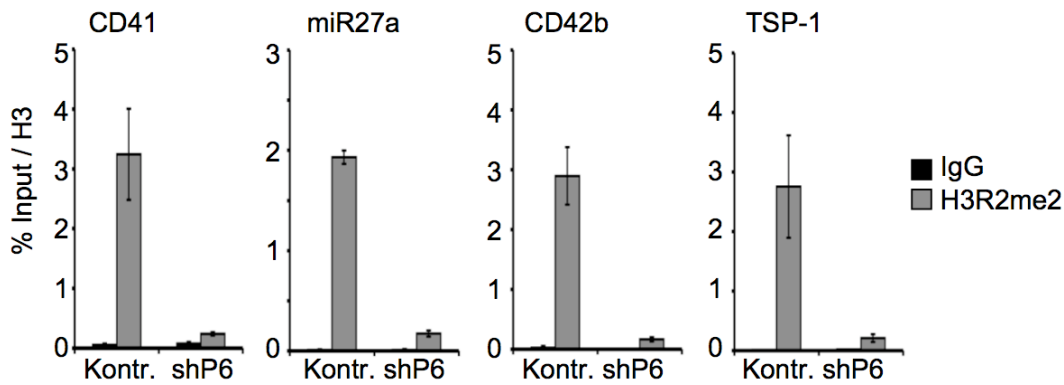


Abb. 3. 26: PRMT6 ist verantwortlich für die Dimethylierung von H3R2 auf dem Promotorbereich von *CD41*, *miR27a*, *CD42b* und *TSP-1*

In den Kontroll-K562-Zellen (Kontr.) kann eine Dimethylierung von H3R2 nachgewiesen werden, welche bei einem *knock down* von PRMT6 (shP6) stark verringert vorliegt.

Die K562-Zelllinie mit einem stabilen *knock down* von PRMT6 wurde für eine Chromatin-Immunopräzipitation mit einem spezifischen anti-H3R2me2 Antikörper und einem anti-H3 Antikörper zur Kontrolle verwendet. Anschließend wurde eine qRT-PCR mit Primern durchgeführt, die Promotorbereiche der Zielgene *CD41*, *miR27a*, *CD42b* und *TSP-1* amplifizieren. Die Effizienz der Primer wurde überprüft und ausgeglichen. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung aus mindestens zwei unabhängigen Experimenten und vier unabhängigen Werten an.

3.8 Megakaryozytäre Zielgene von RUNX1 sind in einem Zwischenzustand (*intermediary state*)

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass ein RUNX1-PRMT6-Corepressorkomplex während der Megakaryozytendifferenzierung gegen einen Coaktivatorkomplex ausgetauscht wird. Der Verlust des PRMT6 enthaltenden Corepressorkomplexes während der Differenzierung korreliert mit der Abnahme der reprimierenden Dimethylierung am H3R2, wohingegen die aktivierenden Histonmodifikationen H3K4me3 und H3K9ac zunehmen, wenn ein Aktivatorkomplex auf dem Promotorbereich zu finden ist. Als Konsequenz daraus wird die Expression der megakaryozytären Zielgene von RUNX1 während der Differenzierung in Richtung Megakaryozyten induziert.

3.8.1 Nachweis der RNA Polymerase II auf dem Promotorbereich der megakaryozytären RUNX1-Zielgene

Protein-kodierende Gene werden von der RNA-Polymerase II transkribiert. Da die Expression der megakaryozytären Zielgene von RUNX1 während der Differenzierung der Zellen induziert wird, sollte die Bindung der RNA-Polymerase II auf dem Promotorbereich der megakaryozytären Zielgene von RUNX1 untersucht werden.

Durch eine Chromatin-Immunopräzipitation konnte die RNA-Polymerase II auf dem Promotorbereich von *CD41* und *miR27a* in undifferenzierten K562-Zellen nachgewiesen werden

(siehe Abb. 3.27 A). Zusätzlich konnte mittels ChIP-ReChIP eine gleichzeitige Bindung von PRMT6 und der RNA-Polymerase II in undifferenzierten K562-Zellen gezeigt werden (siehe Abb. 3.27 B). Nach TPA Induktion war eine starke Zunahme der Bindung der RNA-Polymerase II ca. um den Faktor 4 sichtbar.

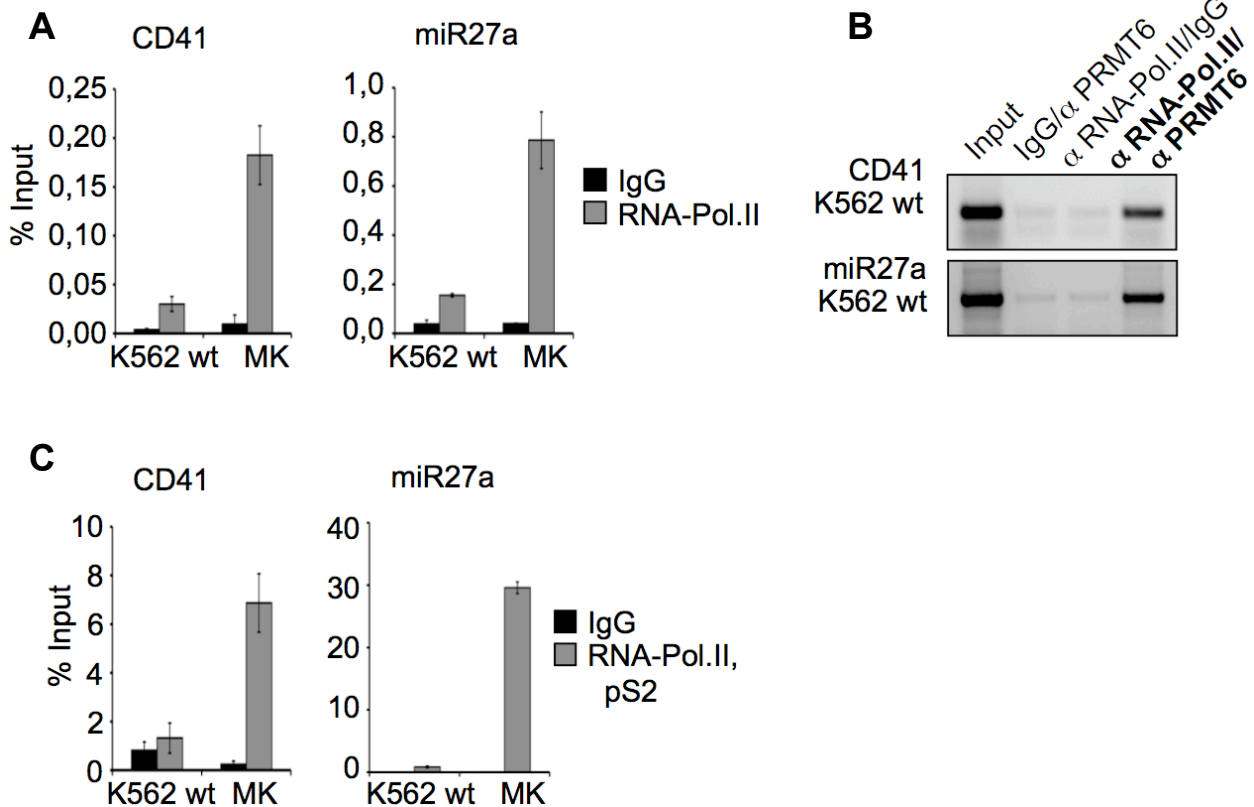


Abb. 3. 27: Nachweis der RNA-Polymerase II auf dem Promotorbereich der megakaryozytären RUNX1-Zielgene *CD41* und *miR27a*

(A) In undifferenzierten K562-Zellen konnte die Bindung der RNA-Polymerase II an den *CD41*- und *miR27a*-Promotor nachgewiesen werden, welche nach TPA Induktion stark zunahm. (B) Mittels ChIP-ReChIP konnte eine gleichzeitige Bindung der RNA-Polymerase II mit PRMT6 in undifferenzierten K562-Zellen gezeigt werden. (C) Die Bindung der aktiven Form der RNA-Polymerase II, phosphoryliert am Serin 2, war vor TPA Induktion auf dem *CD41*- und *miR27a*-Promotor kaum nachweisbar, wohingegen eine starke Bindung in differenzierten Zellen detektiert werden konnte.

Es wurde eine Chromatin-Immunopräzipitation mit Antikörpern gegen die RNA-Polymerase II bzw. gegen die aktivierte Form der RNA-Polymerase II phosphoryliert am Serin 2 (RNA-Pol.II, pS2) von undifferenzierten und mit TPA induzierten K562-Zellen (MK) durchgeführt. Für den ChIP-ReChIP wurden undifferenzierte K562-Zellen und ein anti-RNA-Polymerase II Antikörper und anschließend ein anti-PRMT6 Antikörper verwendet. Die mit der RNA-Polymerase II assoziierte DNA wurde mittels qRT-PCR gemessen. Dabei wurden Primer verwendet, die spezifisch den Promotorbereich von *CD41* und *miR27a* amplifizieren. Die Effizienz der Primerpaare wurde überprüft und ausgeglichen. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung aus mindestens zwei unabhängigen Experimenten und vier unabhängigen Werten an.

Die RNA-Polymerase II kann in verschiedenen Aktivierungszuständen auf dem Promotorbereich vorhanden sein: Inaktiv mit einer Phosphorylierung am Serin 5 oder in der elongierenden Form zusätzlich phosphoryliert am Serin 2 (pS2). Mit Hilfe eines spezifischen Antikörpers wurde der Aktivierungszustand der RNA-Polymerase II, welche an die megakaryozytären Promotorbereiche gebunden war, untersucht. In undifferenzierten K562-Zellen lag die RNA-Polymerase II zum großen Teil inaktiv vor, während eine aktive RNA-Polymerase II nach TPA Induktion nachgewiesen werden konnte (siehe Abb. 3.27 C).

In allen Fällen konnte eine stärkere Bindung der RNA-Polymerase II an den *miR27a*-Promotor detektiert werden. Mit dem spezifischen Antikörper gegen die RNA-Polymerase II, phosphoryliert am Serin 2, konnten höhere Bindungswerte (Prozent Input) nachgewiesen werden, welche mit einer stärkeren Effizienz des Antikörpers erklärt werden können.

Zur Überprüfung der Bindung der RNA-Polymerase II an die Promotorbereiche der megakaryozytären Zielgene von RUNX1 wurde der CHIP in HEL-Zellen wiederholt (Daten siehe Anhang). Es zeigte sich dasselbe Ergebnis: Die RNA-Polymerase II war in der inaktiven Form in undifferenzierten Zellen zu einem geringen Anteil auf dem Promotorbereich von *CD41*- und der *micro-RNA27a* nachzuweisen. Nach 24 stündiger TPA Induktion konnte eine verstärkte Bindung der RNA-Polymerase II der elongierenden Form detektiert werden.

3.82 Vorhandensein der bivalenten Modifikationen H3K4me2 und H3K27me3 auf dem Promotorbereich der megakaryozytären RUNX1-Zielgene

Es wurde bereits gezeigt, dass die Gene, welche die aktivierende H3K4me2+/me3- Markierung zusammen mit einer reprimierenden Histonmodifikation besitzen, in Stammzellen zu einem geringen Level exprimiert werden (Orford *et al.*, 2008; Santos-Rosa *et al.*, 2002). Diese Gene werden in einem Zwischenzustand (*intermediary state*) zwischen Reprimierung und Aktivierung gehalten. Eine Statusänderung kann somit schnell erfolgen. Kürzlich wurde eine Korrelation zwischen dem Vorhandensein von RUNX1-Bindestellen und der Dimethylierung von H3K4 bei diesen bestimmten Genen gefunden (Orford *et al.*, 2008).

Aus diesem Grund sollte das Vorhandensein der bivalenten Histonmodifikationen H3K4me2 und H3K27me3 auf dem Promotorbereich der megakaryozytären Zielgene von RUNX1 untersucht werden. Dafür wurde eine Chromatin-Immunopräzipitation von undifferenzierten, expandierten und TPO induzierten humanen CD34-Zellen mit spezifischen Antikörpern gegen die zwei Histonmodifikationen durchgeführt. Das zeitgleiche Vorhandensein von der reprimierenden H3K27-Trimethylierung und der aktivierenden H3K4-Dimethylierung konnte auf dem Promotorbereich von *CD41* und *miR27a* in undifferenzierten hCD34-Zellen detektiert

werden (siehe Abb. 3.28 A). In differenzierten Zellen war nur noch die aktivierende H3K4me2-Histonmodifikation vorhanden.

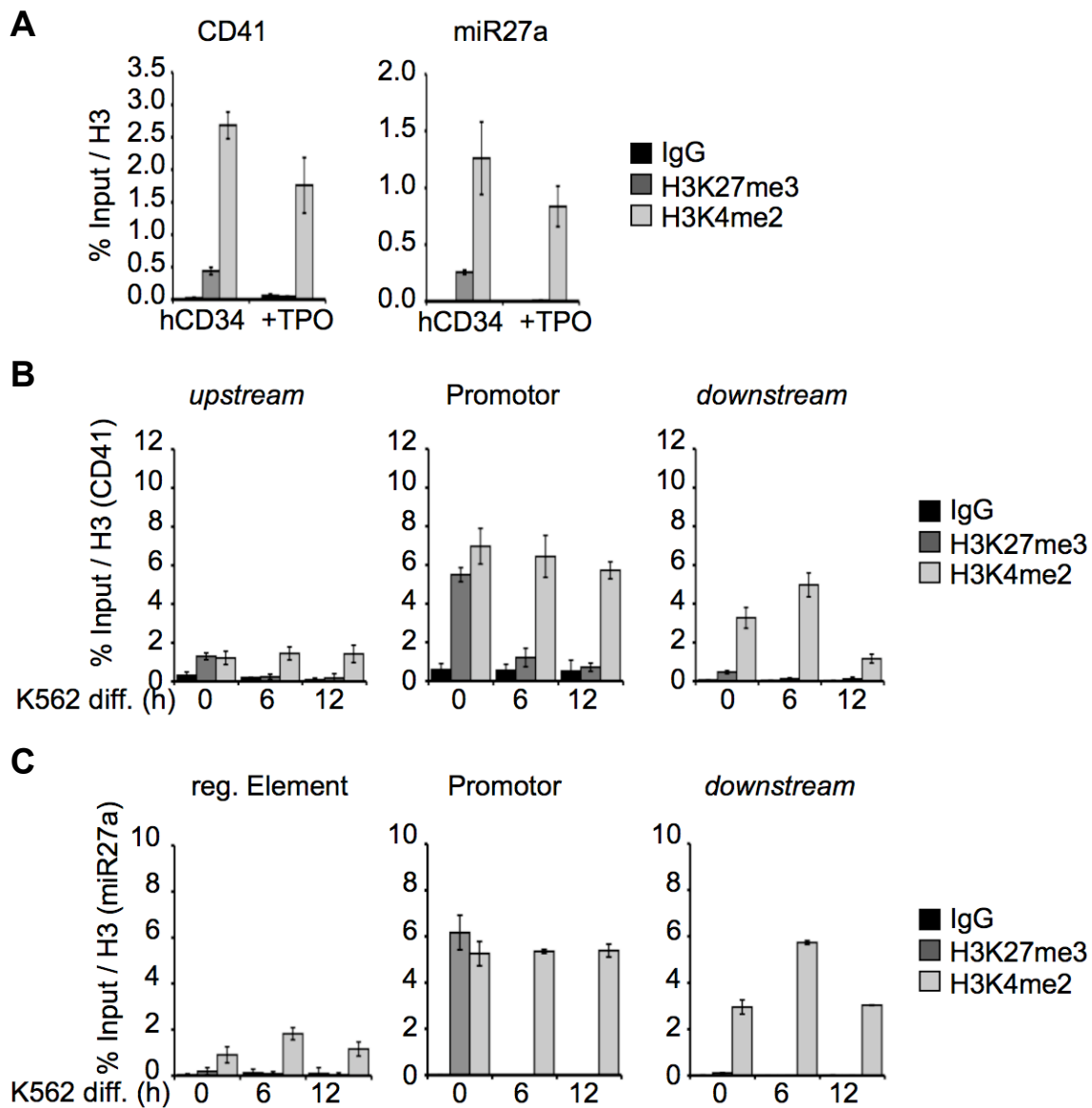


Abb. 3. 28: Nachweis der bivalenten Histonmodifikationen H3K27me3 und H3K4me2 auf dem Promotorbereich der megakaryozytären RUNX1-Zielgene *CD41* und *miR27a*

(A-C) Auf dem *CD41*- und *miR27a*-Locus waren die Histonmodifikationen H3K27me3 und H3K4me2 in undifferenzierten hCD34- (A) und K562-Zellen (B-C) vorhanden. Während der Differenzierung konnte nur die aktivierende H3K4me2 gleich bleibend nachgewiesen werden.

Humane CD34-Zellen wurden expandiert und mit TPO in Richtung Megakaryozyten differenziert. K562-Zellen wurden für 6-12 Stunden mit TPA induziert. Unbehandelte und differenzierte hCD34- und K562-Zellen wurden für eine Chromatin-Immopräzipitation mit anti-H3K27me3, anti-H3K4me2 und anti-H3 Antikörpern verwendet. Für die qRT-PCR wurden Primer verwendet, die spezifisch bestimmte Regionen von *CD41* und *miR27a* um RUNX1-Bindestellen amplifizieren. Die Effizienz der verschiedenen Primerpaare wurde überprüft und ausgeglichen. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung aus mindestens zwei unabhängigen Experimenten und vier unabhängigen Werten an.

Die H3K27me₃-Histonmodifikation konnte im Vergleich mit der H3K4-Dimethylierung mit einer geringeren Häufigkeit auf dem Promotorbereich nachgewiesen werden. Das geringe Vorhandensein der reprimierenden H3K27-Trimethylierung in undifferenzierten, expandierten hCD34-Zellen korreliert mit dem höheren basalen Expressionslevel von *CD41* im Vergleich mit den K562-Zellen (siehe 3.33).

Zur weiteren Überprüfung des simultanen Auftretens der reprimierenden H3K27me₃ und der aktivierenden H3K4me₂ auf dem *CD41*- und *miR27a*-Locus wurden K562-Zellen für 6-12 Stunden mit TPA induziert und für ein ChIP-Experiment verwendet. Die mit den Histonmodifikationen assoziierte DNA wurde mittels qRT-PCR gemessen. Dafür wurden Primer eingesetzt, welche einen Bereich der *upstream* Region, des Promotorbereichs und *downstream* des Transkriptionsstarts des *CD41*- und *miR27a*-Locus amplifizieren.

Auf dem Promotorbereich von *CD41* und zu einem geringeren Wert in der *upstream* Region konnten die Histonmodifikationen H3K27me₃ und H3K4me₂ zu gleichen Anteilen detektiert werden. *Downstream* des Transkriptionsstarts war die reprimierende H3K27-Trimethylierung jedoch nur schwach nachweisbar. Während der Differenzierung kam es auf dem *CD41*-Locus zu einem Verlust der H3K27me₃, wohingegen die H3K4me₂ gleich bleibend vorhanden war (siehe Abb. 3.28 B).

Das gleichzeitige Auftreten der reprimierenden und aktivierenden Histonmodifikationen in undifferenzierten K562-Zellen konnte ebenfalls auf dem *miR27a*-Promotor gezeigt werden (siehe Abb. 3.28 C). Auf dem regulatorischen Element und nach dem Transkriptionsstart war die H3K27me₃ kaum detektierbar. Die aktivierende H3K4-Dimethylierung blieb während aller Differenzierungsstadien konstant. Die regulatorische Region der *miR27a* wies die geringsten Mengen der beiden Histonmodifikationen auf.

Dasselbe Verteilungsmuster der reprimierenden H3K27me₃ und der aktivierenden H3K4me₂ auf dem *CD41*- und *miR27a*-Promotor wurde auch in HEL-Zellen während der Megakaryozyten-differenzierung gefunden (Daten siehe Anhang).

Zusammenfassend konnte in diesem Abschnitt gezeigt werden, dass die (zumeist inaktive) RNA-Polymerase II auf dem Promotor von megakaryozytären Zielgenen von RUNX1 zusammen mit aktivierenden und reprimierenden Histonmodifikationen in hämatopoietischen Vorläuferzellen vorhanden ist. Aufgrund dessen werden die bivalenten Gene zu einem geringen Level exprimiert. Während der Differenzierung gehen die reprimierenden Histonmarkierungen verloren. Die elongierende RNA-Polymerase II wird auf den Promotorbereichen gefunden und die Expression der megakaryozytären Gene wird induziert.

4. Diskussion

RUNX1 ist ein zentraler Transkriptionsfaktor für die Entwicklung von hämatopoietischen Stammzellen. Funktionelle Veränderungen von RUNX1 tragen zur Ausbildung von Leukämien bei. Neben chromosomalen Translokationen werden auch Mutationen und Deletionen des *RUNX1*-Gens gefunden. Darüber hinaus spielt RUNX1 eine essentielle Rolle bei der Megakaryozytendifferenzierung. Diese Funktion spiegelt sich darin wieder, dass Haploinsuffizienz von *RUNX1* beim Menschen die Ausbildung von familiären Thrombozytopenien (FPD) mit reduzierten Thrombozytenzahlen bewirkt (Luddy *et al.*, 1978; Gerrard *et al.*, 2001). In adulten Mäusen führt ein *knock out* von *RUNX1* zu einem Defekt in der Megakaryozytendifferenzierung und zu Myelodysplasien (Growney *et al.*, 2005; Ichikawa *et al.*, 2004; Ischikawa *et al.*, 2008).

Während der Differenzierung von hämatopoietischen Zellen wird die Funktion von RUNX1 unter anderem durch die Interaktion mit anderen Transkriptionsfaktoren, epigenetischen Regulatoren und Cofaktoren, sowie durch posttranslationale Modifikationen reguliert. RUNX1 kann dadurch aktivierend oder reprimierend auf die Expression von Zielgenen wirken (Blyth, Cameron & Neil, 2005). In der vorliegenden Arbeit wurde die Regulation von RUNX1 durch Protein Arginin Methyltransferasen (PRMTs) und deren Einfluss auf die Zielgenexpression untersucht.

4.1 PRMT6 ist ein neuer Interaktionspartner von RUNX1

In dieser Arbeit konnte mittels Immunopräzipitation eine Interaktion von RUNX1 mit CARM1/PRMT4 und PRMT6 gezeigt werden (siehe Abb. 3.1). Die Interaktion von RUNX1 mit CARM1 war im Vergleich zu der Interaktion mit PRMT6 unter den gegebenen Bedingungen schwächer. Deshalb wurde die Interaktion von RUNX1 mit PRMT6 weiter untersucht. Eine direkte Interaktion von RUNX1 und PRMT6 konnte mittels *GST-pulldowns* gezeigt werden. Darüber hinaus konnte eine Interaktion von endogenem RUNX1 mit endogenem PRMT6 nachgewiesen werden (siehe Abb. 3.2 und 3.3). Die erhaltenen Ergebnisse sprechen dafür, dass RUNX1 und PRMT6 in der Zelle direkt miteinander interagieren und somit eine gemeinsame physiologische Funktion erfüllen.

Als Interaktionsfläche von RUNX1 mit PRMT6 wurde der C-Terminus von RUNX1 ermittelt (siehe Abb. 3.4). Viele aktivierende Cofaktoren werden an der C-terminal gelegenen Transaktivierungsdomäne von RUNX1 gebunden, unter anderem p300 und MOZ (Ito, 1999). C-terminal der RUNT-Domäne sowie am äußeren C-terminalen Ende von RUNX1 befinden sich ebenfalls Repressor- und Corepressorbindungsstellen, wie zum Beispiel Bindungsstellen von Histon Deacetylasen und Sin3a (Kanno *et al.*, 1998; Lutterbach & Hiebert, 2000). Zur weiteren Charakterisierung der Interaktion von RUNX1 mit PRMT6 könnte die Interaktionsfläche mittels

zusätzlicher RUNX1-Konstrukte des C-Terminus, die einen kleineren Aminosäureabschnitt von RUNX1 umfassen, noch weiter eingegrenzt werden.

4.2 Die Funktion von RUNX1 wird durch eine PRMT6-vermittelte Methylierung reguliert

Mit Hilfe eines *in vitro* Methyltransferaseassays wurde eine Methylierung von RUNX1 durch PRMT6 gezeigt (siehe Abb. 3.5). Da der C-Terminus von RUNX1 mit PRMT6 interagiert, lag die Vermutung nahe, dass PRMT6 RUNX1 C-terminal methyliert. Mittels *in vitro* Methyltransferasereaktionen von RUNX1-Peptiden, gebunden an eine Cellulosemembran, konnte eine Methylierung von RUNX1 durch PRMT6 am Arginin 307 gezeigt werden (siehe Abb. 3.6).

Die Sequenz um das Arginin 307 in RUNX1 ist sehr Prolin-reich (303-FGDPRQFPTLP-313). Obwohl PRMT6 wie auch PRMT1 Glycin-Arginin-reiche (GAR)-Motive methyliert, besitzt PRMT6 daneben eine besondere Substratspezifität mit noch ungeklärter Erkennungssequenz. Der N-Terminus von Histon H3 (1-ARTKQTARKS-10) sowie die Arginine 83 (79-TGKLRKLEKIRQ-90) und 152 (149-RIPREEMLMQ-159) der DNA Polymerase β sind Substrate von PRMT6, welche keine GAR-Sequenzen beinhalten (El-Andaloussi *et al.*, 2006; Hyllus *et al.*, 2007). Vergleiche der Aminosäuresequenzen der vier Methylierungsstellen der verschiedenen Substrate von PRMT6 zeigen keine auffälligen Übereinstimmungen und lassen somit keinen Rückschluss auf die Erkennungssequenz von PRMT6 zu.

Zur vollständigen Klärung und Überprüfung der Methylierungsstelle könnte eine massenspektrometrische Analyse durchgeführt werden und eine PRMT6 spezifische *in vivo* Methylierung von RUNX1 nachgewiesen werden. Dafür könnte die Methylierung von Arginin-Mutanten von RUNX1 (z.B. R307A), welche an dem spezifischen Arginin nicht mehr methyliert werden können, mit dem Wildtyp bei einer Überexpression von PRMT6 verglichen werden. Zu erwarten wäre eine geringere bzw. keine Methylierung der RUNX1-Arginin-Mutante im Vergleich mit dem Wildtyp. Zur weiteren Überprüfung der Methylierungsstelle wird zurzeit eine *in vitro* Methyltransferasereaktion mit verschiedenen Konstrukten des N-Terminus, C-Terminus und der RUNT-Domäne von RUNX1 sowie mit der R307A-Mutante von RUNX1 durchgeführt. Darüber hinaus könnte mit Hilfe eines methylierungsspezifischen Antikörpers die Methylierung eines bestimmten Arginins von RUNX1 durch PRMT6 nachgewiesen werden. Ein *in vitro* Methyltransferaseassay mit verschiedenen Peptidsequenzen könnte darüber hinaus Hinweise auf die Erkennungssequenz von PRMT6 geben.

Die Ergebnisse der Immunopräzipitation von PRMT6 mit RUNX1 unter Einfluss des Methyltransferaseinhibitors AdOx und mit der RUNX1 R307A-Mutante weisen darauf hin, dass die Methylierung des Arginins 307 von RUNX1 durch PRMT6 zu einer Verstärkung der Interaktion beider Faktoren führt (siehe Abb. 3.7). Darüber hinaus gibt der durchgeführte Oligo-

pull-down erste Hinweise darauf, dass die Methylierung von RUNX1 am Arginin 307 die DNA-Bindungsfähigkeit von RUNX1 erhöht (siehe Abb. 3.8). Außerdem lässt ein Reporterassay mit der methylierungsdefizienten RUNX1 R307A-Mutante darauf schließen, dass die Methylierung an dieser Stelle das aktivierende Potential von RUNX1 reprimiert (siehe Abb. 3.9). Zusammenfassend deuten die erhaltenen Ergebnisse auf eine Methylierung von RUNX1 durch PRMT6 hin, welche die Interaktion mit PRMT6, die DNA-Bindung und die Aktivität von RUNX1 beeinflusst.

Neben dem *knock down* von *PRMT6* beim *Oligo-pull-down* und der methylierungsdefizienten RUNX1-Mutante bei der Coimmunopräzipitation, wurde der indirekte Methyltransferaseinhibitor AdOx als weitere Kontrolle verwendet. Dieser wirkt unspezifisch auf alle Methyltransferasereaktionen ein (Johnson, Najbauer & Aswad, 1993). Eine geeignetere weitere Kontrolle wäre in diesem Fall ein spezifischer PRMT6-Inhibitor. N-substituierte Arginyl-Peptidinhibitoren wurden bereits entwickelt, welche jedoch nicht PRMT spezifisch sind (Lakowski *et al.*, 2010). Für Histon Deacetylasen hingegen wurden schon spezifische Inhibitoren konzipiert (Vigushin & Coombes, 2002).

Eine ähnliche Funktion des Einflusses einer Methylierung, wie in dieser Arbeit beschrieben, konnte für den nukleären Rezeptor HNF4 gezeigt werden. Die Methylierung von HNF4 durch PRMT1 führte zu einer erhöhten DNA-Bindung und einer veränderten Zielgenexpression (Barrero & Malik, 2006). Eine Beeinflussung der Protein-Protein Interaktionen konnte auch für eine durch CARM1/PRMT4-vermittelte Methylierung der Coaktivatoren CBP und p300 nachgewiesen werden. Die Methylierung von CBP vermindert die Interaktion mit dem Transkriptionsfaktor CREB und CREB-anhängige Zielgenexpression (Xu *et al.*, 2001). Im Falle des Epstein-Barr Virus verstärkt die asymmetrische Dimethylierung von Argininen des nukleären Antigens 2 (EBNA2) die DNA-Bindung des Faktors an Zielgene sowie die Komplexbildung mit anderen Faktoren (Gross *et al.*, 2010). Für RUNX1 konnte in vorausgegangenen Untersuchungen eine Methylierung der Arginine 206 und 210 durch PRMT1 gezeigt werden, welche die Interaktion von RUNX1 mit dem Corepressor Sin3a vermindert (Zhao *et al.*, 2008). Auch für die PRMT6-vermittelte Methylierung von RUNX1 könnte der Einfluss auf die Interaktion mit anderen Transkriptionsfaktoren und Cofaktoren überprüft werden. Möglicherweise hat auch die Methylierung von RUNX1 am Arginin 307 einen Einfluss auf die Interaktion mit Sin3a und wäre deshalb eine wichtige zu untersuchende Fragestellung. Die Methylierungsstelle 307 liegt außerdem in der Interaktionsfläche von RUNX1 mit p300 und LEF-1 (Ito, 1999), deshalb ist eine Beeinflussung der Interaktion dieser Proteine durch eine Methylierung von RUNX1 vorstellbar. Diese mögliche funktionelle Auswirkung der Methylierung von RUNX1 könnte mittels Coimmunopräzipitation überprüft werden.

Posttranslationale Modifikationen können neben dem Einfluss auf Protein-Protein Interaktionen, der DNA-Bindung und der Proteinaktivität auch die Lokalisation und die Stabilität der Proteine

verändern (Bae & Lee, 2005). Für den Transkriptionsfaktor FOXO1 konnte gezeigt werden, dass eine PRMT1-vermittelte Methylierung die Lokalisation und die Ubiquitylierung und somit die Proteinstabilität beeinflusst (Yamataga *et al.*, 2008). Auch für eine ERK-vermittelte Phosphorylierung von RUNX1 konnte ein Einfluss auf die intrazelluläre Lokalisation und Proteinstabilität nachgewiesen werden (Imai *et al.*, 2004). Zur weiteren Charakterisierung des Einflusses der PRMT6-vermittelten Methylierung von RUNX1 könnte deshalb auch die Lokalisation und die Proteinstabilität von RUNX1 näher betrachtet werden. Diese Experimente würden einen näheren Einblick in die funktionelle Regulation von RUNX1 durch posttranslationale Modifikationen geben.

RUNX1 wird an verschiedenen Bereichen durch unterschiedliche Enzyme posttranslational modifiziert. Neben der Methylierung von RUNX1 sind Phosphorylierung, Acetylierung und Ubiquitylierung von RUNX1 beschrieben (Tanaka *et al.*, 1996; Yamaguchi *et al.*, 2004). Eine Beeinflussung von verschiedenen posttranslationalen Modifikationen bei Proteinen ähnlich dem Histoncode wurde bereits vorgeschlagen (Sims & Reinberg, 2008) und konnte durch verschiedene Beispiele gezeigt werden: Eine Methylierung von FOXO1 durch PRMT1 in einem Akt-Phosphorylierungsmotif inhibiert diese Phosphorylierung (Yamagata *et al.*, 2008). Andererseits verstärkt eine Methylierung von p53 (R372) durch SET9 die Acetylierung am Arginin 382 (Sims & Reinberg, 2008). RUNX1 wird durch PRMT1 an den Argininen R206 und R210 methyliert (Zhao *et al.*, 2008). Außerdem sind am C-Terminus von RUNX1 eine Anzahl von Phosphorylierungsstellen bekannt (Ito, 1999). Eine zentrale Fragestellung für weitere Untersuchungen ist der Einfluss der PRMT6-vermittelten Methylierung von RUNX1 auf die anderen bekannten posttranslationalen Modifikationen von RUNX1.

4.3 Eine Beeinflussung der Proteinmenge von PRMT6 führt zu einer veränderten RUNX1-Zielgenexpression

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Expression von *RUNX1* und den *RUNX1*-Zielgenen *CD41*, *miR27a*, *CD42b* und *TSP-1* während der megakaryozytären Differenzierung von humanen CD34-, K562- und HEL-Zellen induziert wird, während die *PRMT6*-Expression herunterreguliert wird (siehe Abb. 3.13 und 3.14). Zur Etablierung der Megakaryozyten-differenzierung von CD34-, K562- und HEL-Zellen wurden bestehende Protokolle abgewandelt (Tetteroo *et al.*, 1984; Bütler *et al.*, 1990; Cheng *et al.*, 2009). Zusätzlich wurde die Differenzierung der Zellen in Richtung Megakaryozyten durch Beobachtung der morphologischen Veränderungen sowie mittels FACS (*fluorescence activated cell sorting*) überprüft (siehe Abb. 3.10 und 3.11). Aufgrund des gegensätzlichen Expressionsmusters von *PRMT6* in Bezug zu *RUNX1* und der *RUNX1*-Zielgene stellte sich die Frage, ob *PRMT6* die Expression der *RUNX1*-Zielgene beeinflusst. Mit Hilfe eines *knock downs* bzw. der

Überexpression von *PRMT6* in CD34- sowie K562-Zellen konnte gezeigt werden, dass *PRMT6* in Progenitorzellen die *RUNX1*-Zielgenexpression reprimiert (siehe Abb. 3.17 und 3.18).

Die Auswirkungen einer Überexpression von *PRMT6* auf die Expression der *RUNX1*-Zielgene waren jedoch nur während der Induktion der Megakaryozytendifferenzierung zu beobachten. Eine mögliche Erklärung ist, dass in undifferenzierten Zellen eine erhebliche Menge an *PRMT6* vorhanden ist, wodurch eine Überexpression keinen weiteren Effekt mehr erkennen lässt. Während der Differenzierung in Richtung Megakaryozyten wird die Expression von *PRMT6* herunterreguliert. Es ergibt sich somit eine größere Differenz der *PRMT6*-Menge zwischen den Wildtyp und den *PRMT6*-überexprimierenden Zellen. Dadurch konnten die reprimierenden Effekte von *PRMT6* auf die Zielgene von *RUNX1* sichtbar gemacht werden.

Über die funktionelle Rolle von Protein Arginin Methyltransferasen während der Differenzierung von hämatopoietischen Zellen ist bislang noch nicht viel bekannt. Es ist beschrieben, dass ein *knock down* von *PRMT5* in Vorläuferzellen zu einer verstärkten erythroiden Differenzierung führt (Liu *et al.*, 2011). Für *PRMT1* ist eine hohe Expression in T-Helferzellen beschrieben (Parry & Ward, 2010). Außerdem scheint *PRMT1* in der Zellkultur die Megakaryozytendifferenzierung zu beeinflussen (Chang *et al.*, 2010). Die Wirkung von *PRMT6* auf die Differenzierung von Stamm-/Progenitorzellen könnte mit Hilfe eines *in-vitro colony-forming Assays* (CFA) näher untersucht werden. Ein *knock down* oder eine Überexpression von *PRMT6* in humanen Progenitorzellen könnte dabei mit Kontrollzellen auf die Proliferation- bzw. Differenzierungsfähigkeit untersucht werden. Neben den morphologischen Beobachtungen könnte die Differenzierung der Zellen mittels FACS analysiert werden. Es ist zu vermuten, dass ein *knock down* von *PRMT6* die Megakaryozytendifferenzierung verstärkt und eine Überexpression von *PRMT6* inhibierend wirkt. Mittels CFA konnte für *RUNX1* schon gezeigt werden, dass *RUNX1*-defiziente Stammzellen eine Inhibition der megakaryozytären Differenzierung sowie eine fehlerhafte T- und B-Lymphozyt Entwicklung besitzen (Ichikawa *et al.*, 2004).

Die Bedeutung von *PRMTs* für die Funktion am lebenden Organismus können *knock out* Mausexperimente zeigen. Für *PRMT6* wurde bislang noch keine *knock out* Maus veröffentlicht, so dass die Funktion von *PRMT6* während der embryonalen Entwicklung noch ungeklärt ist. Bereits beschrieben wurde, dass *PRMT1*^{-/-} Embryonen sich nicht weiter als Tag E6.5 entwickeln und *CARM1*^{-/-} Mäuse bei Geburt letal sind (Pawlak *et al.*, 2000; Yadav *et al.*, 2003). Bei embryonaler Lethalität wäre eine weitere Untersuchung der Bedeutung des Gens nicht möglich. Außerdem bleiben in einigen Fällen *knock out* Mäuse phänotypisch unauffällig, da Kompensationsmechanismen vorliegen (Gensch *et al.*, 2008). Eine konditionelle *knock out* Maus könnte einen spezifischen Effekt, z.B. den Einfluss von *PRMT6* auf die Megakaryozytendifferenzierung, aufklären. Dafür könnten *PRMT6*-LoxP-Mäuse mit Cre-Mäusen gekreuzt werden. Für die Cre-Rekombinase könnte ein megakaryozytärer Promotor verwendet

werden, so dass der *knock out* von PRMT6 megakaryozytenspezifisch ist. Für einen induzierbaren *knock out* von PRMT6 könnten Liganden-aktivierbare Cre-Rekombinasen verwendet werden, so dass zusätzlich der Zeitpunkt des *knock outs* bestimmt werden könnte.

4.4 Austausch eines RUNX1/PRMT6-Corepressorkomplexes während der Megakaryozytendifferenzierung

Mittels Chromatin-Immunoprecipitation konnte RUNX1 in unbehandelten und differenzierten Zellen auf dem Promotorbereich der vier untersuchten megakaryozytären Zielgene nachgewiesen werden. Es konnte außerdem gezeigt werden, dass PRMT6 Teil eines Corepressorkomplexes von RUNX1 mit Sin3a und HDAC1 ist, der in megakaryozytären Vorläuferzellen die Zielgene von RUNX1 reprimiert. Dieser Corepressorkomplex wird während der Differenzierung in Richtung Megakaryozyten durch einen RUNX1-Coaktivatorkomplex mit p300, PCAF, WDR5, GATA1, FOG1 und PRMT1 ausgetauscht (siehe Abb. 3.19-3.22 und 4.1).

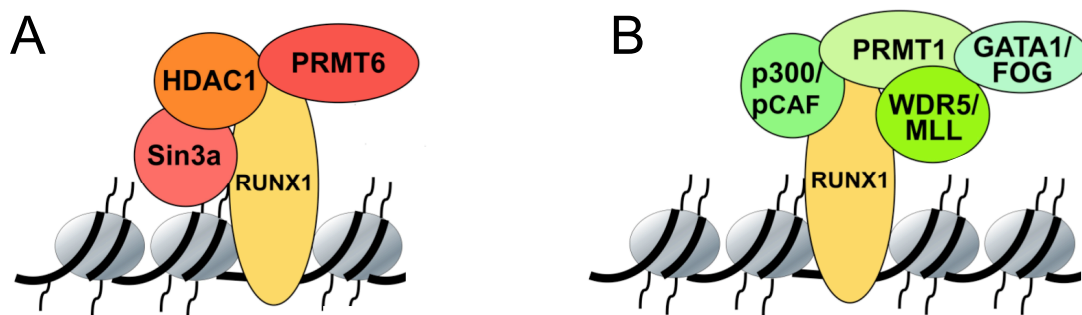


Abb. 4. 1: Austausch eines Corepressor- gegen einen Coaktivatorkomplex auf dem Promotorbereich von RUNX1-Zielgenen während der megakaryozytären Differenzierung von Stamm-/Vorläuferzellen

(A) RUNX1 rekrutiert einen Corepressorkomplex mit PRMT6, Sin3a und HDAC1 zu dem Promotorbereich von megakaryozytären Zielgenen in Vorläufer-/Stammzellen. (B) Während der Differenzierung wird der Corepressorkomplex gegen einen RUNX1-enthaltenden Coaktivatorkomplex mit p300, PCAF, PRMT1, WDR5, GATA1/FOG1 ausgetauscht.

Die Beobachtung der Rekrutierung von GATA1 und FOG1 an die aktiven Promotoren der RUNX1-Zielgene während der Megakaryozytendifferenzierung wird durch frühere Studien belegt, welche eine Induktion der Expression von megakaryozytären Genen durch GATA1/FOG1 und eine transkriptionelle Kooperation von RUNX1 und GATA1 bei der Aktivierung von megakaryozytären Zielgenen nachgewiesen haben (Elagib *et al.*, 2003; Xu *et al.*, 2006). Dass GATA1 eine wichtige Funktion bei der Megakaryozytendifferenzierung besitzt, wurde durch einen megakaryozytenspezifischen *knock down* von *GATA1* gezeigt, welcher zu einer Anreicherung von unreifen Megakaryozyten und einer Verminderung von Thrombozyten führt (Shivdasani *et al.*, 1997). Zusätzlich ist bereits bekannt, dass GATA1 eine Rolle bei

Konvertierung von RUNX1 von einem Repressor zu einem Aktivator durch Unterstützung der aktivierenden posttranslationalen Modifikationen von RUNX1 spielt (Elagib & Goldfarb, 2007).

Weitere Funktionen könnte GATA1 im Chromatin-*Remodelling* und der Steigerung der transkriptionellen Elongation der RUNX1-Zielgene durch Kontaktierung des P-TEFb Kinasekomplexes haben (Dore *et al.*, 2008; Goldfarb, 2009). Für das CD4-Gen wurde eine Interaktion von RUNX1 mit P-TEFb beschrieben, was eine Inhibition der transkriptionellen Elongation zur Folge hatte (Jiang *et al.*, 2005). GATA1 könnte dieser Interaktion entgegenwirken und somit eine Aktivierung der RUNX1-Zielgene fördern.

Eine interessante weiterführende Fragestellung wäre, wie verschiedene posttranslationale Modifikationen von RUNX1 durch PRMT1, p300, ERK1/2 und PRMT6 zusammenwirken und welchen Einfluss diese auf die Interaktionsfähigkeit von RUNX1 haben. Die Rekrutierung von Cofaktoren durch RUNX1 könnte auf dem voneinander abhängigen, Code-ähnlichen Modifikationsstatus des Proteins beruhen. Dieses wurde als genereller Mechanismus für die Regulation von Transkriptionsfaktoren vorgeschlagen (Kowenz-Leutz *et al.*, 2010; Murray-Zmijewski *et al.*, 2008; Sims & Reinberg, 2008). Bei dem Austausch der Cofaktorkomplexe von RUNX1 spielt PRMT1 eine aktive Rolle. PRMT1 methyliert den Transkriptionsfaktor RUNX1 an den Argininen 206 und 210, was dann zur Dissoziation des Corepressors Sin3a führt (Zhao *et al.*, 2008). Die Phosphorylierung von RUNX1 an S249 und S266 durch ERK1/2 hat ebenfalls einen negativen Einfluss auf die Interaktion von RUNX1 mit Sin3a (Imai *et al.*, 2004; Wang *et al.*, 2009). In dieser Arbeit konnte eine Bindung von RUNX1, PRMT6 und Sin3a an Promotorbereiche megakaryozytärer Zielgene von RUNX1 in Progenitorzellen und eine Interaktion von endogenem PRMT6 und Sin3a nachgewiesen werden. Zusätzlich gibt es Hinweise darauf, dass RUNX1 durch PRMT6 am Arginin 307 methyliert wird. Um den Cofaktoraustausch durch posttranslationale Modifikationen von RUNX1 zu untersuchen, wird zurzeit der Einfluss einer PRMT6-vermittelten Methylierung von RUNX1 auf die Interaktion mit Sin3a analysiert. Darüber hinaus ist die R307-Methylierung von RUNX1 katalysiert durch PRMT6 möglicherweise im Corepressorkomplex und die PRMT1-vermittelte RUNX1-Methylierung der Arginine 206 und 210 im Coaktivatorkomplex auf dem Promotorbereich megakaryozytärer Zielgene in Vorläuferzellen nachweisbar. Zur Untersuchung dieser Fragestellung werden jedoch Antikörper benötigt, welche spezifisch eine Methylierung bestimmter Arginine von RUNX1 detektieren.

4.5 Epigenetische Regulation von RUNX1-Zielgenen während der Megakaryozytendifferenzierung

In hämatopoietischen Vorläufer-/Stammzellen konnten die reprimierenden Histonmodifikationen H3R2me2 und H3K27me3 und die aktivierende H3K4-Dimethylierung auf dem Promotorbereich der megakaryozytären Zielgene von RUNX1 detektiert werden. Darüber hinaus konnte gezeigt

werden, dass die H3R2me2-Histonmodifikation auf dem Promotorbereich megakaryozytärer RUNX1-Zielgene PRMT6-abhängig ist (siehe Abb. 3.24-3.26, 3.28 und 4.2 A).

Während der Megakaryozytendifferenzierung sind die reprimierenden Markierungen auf den Promotorbereichen nicht mehr vorhanden, wohingegen die aktivierende Di- und Trimethylierung von H3K4, sowie die Acetylierung von H3K9 verstärkt auftreten. Gleichzeitig wird die Genexpression der megakaryozytären Zielgene von RUNX1 induziert (siehe Abb. 3.24-3.26, 3.28 und 4.2 B).

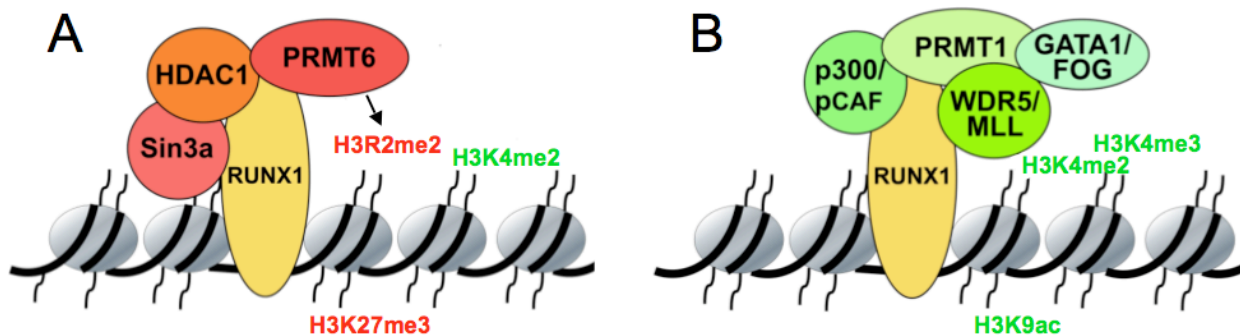


Abb. 4.2: Veränderung des Histonmodifikationsstatus zusammen mit dem Austausch eines Corepressors gegen einen Coaktivator-Komplex auf dem Promotorbereich von RUNX1-Zielgenen

(A) RUNX1 rekrutiert einen Corepressor-Komplex mit PRMT6, Sin3a und HDAC1 zu dem Promotorbereich von megakaryozytären Zielgenen in Vorläufer-/Stammzellen. Reprimierende Histonmodifikationen wie H3R2me2 und H3K27me3 sind zusammen mit der aktivierenden H3K4me2 auf dem Promotorbereich vorhanden. Das Gen ist in einem *intermediary state*. (B) Der Corepressor-Komplex ist gegen einen RUNX1-enthaltenden Coaktivator-Komplex ausgetauscht. Die aktivierenden Histonmodifikationen H3K4me3 und H3K9ac werden etabliert und die elongierende RNA-Polymerase II treibt die Transkription des Genes an.

Das Auftreten der aktivierenden H3K4me2 neben den reprimierenden Histonmodifikationen H3R2me2 und H3K27me3 auf dem Promotorbereich der megakaryozytären RUNX1-Zielgene in Vorläuferzellen deutet auf einen nicht vollständig reprimierten Zustand der Genexpression hin. Dafür spricht auch die Grundexpression von *CD41* in undifferenzierten hCD34- und HEL-Zellen, die sowohl auf mRNA-Ebene sowie mittels FACS detektierbar ist (Abb. 3.11 und 3.12). In embryonalen Stammzellen wurden Gene gefunden, die sich in einem Zwischenzustand befinden, der schnell in Aktivierung oder Reprimierung umgewandelt werden kann. Diese *intermediary state*-Gene weisen sowohl die reprimierende H3K27 Trimethylierung, als auch die aktivierende H3K4me3 auf (Azuara *et al.*, 2006; Bernstein *et al.*, 2006; Oguro *et al.*, 2010). In hämatopoietischen Stammzellen wurden einige Gene nachgewiesen, die eine reprimierende H3K27me3 und eine aktivierende H3K4me2 besitzen, jedoch ohne eine Trimethylierung von H3K4 aufzuweisen (H3K4me2+/me3-). Ebenso wurde auf dem Promotorbereich dieser Gene ein hoher Anteil von Bindungsstellen der Transkriptionsfaktoren PU.1 und RUNX1 gefunden

(Orford *et al.*, 2008). Diese Beobachtungen sprechen dafür, dass die megakaryozytären Zielgene von RUNX1 und PRMT6 sich in hämatopoietischen Vorläufer-/Stammzellen in einem *intermediary state* befinden und somit die Expression dieser Gene während der Differenzierung schnell aktiviert werden kann.

In der vorliegenden Arbeit konnte eine Kompatibilität von H3R2me2 und H3K4me2 festgestellt werden. Es konnte jedoch nicht die Frage beantwortet werden, ob die beiden Modifikationen auf einem einzelnen Nukleosomen zusammen auftreten. In Regionen mit einer Dimethylierung von H3R2, welche durch PRMT6 vermittelt wird, war die Trimethylierung von H3K4 nicht detektierbar. Diese Beobachtung steht im Einklang mit anderen Veröffentlichungen, dass eine Methylierung des H3R2 durch PRMT6 die H3K4me3-Markierung verhindert (Guccione *et al.*, 2007; Hyllus *et al.*, 2007; Iberg *et al.*, 2008).

Die aktivierenden und reprimierenden RUNX1-Komplexe könnten neben den untersuchten Proteinen noch weitere Transkriptionsfaktoren, epigenetische Regulatoren und Cofaktoren enthalten. Das Auftreten der H3K27-Trimethylierung konnte in Progenitorzellen auf dem Promotorbereich von megakaryozytären RUNX1-Zielgenen nachgewiesen werden. Aufgrund dieser Ergebnisse könnte das Vorhandensein der H3K27-Methyltransferase Ezh1 oder Ezh2/KMT6 (Cao & Zhang, 2004) untersucht werden. Darüber hinaus wurde auf den Promotorbereich der untersuchten megakaryozytären RUNX1-Zielgene während der Differenzierung die H3K4-Trimethylierung nachgewiesen. Zur weiteren Aufklärung der Komplexpartner von RUNX1 könnte bestimmt werden, welche Histon Lysin Methyltransferase, z.B. SET1A, MLL1-4 (Ruthenburg, Allis & Wysocka, 2006), die H3K4me3-Histonmodifikation katalysiert und ob die MLL-Komplexproteine RbBP5 und ASH2 ebenfalls zu finden sind.

Die Expression der megakaryozytären Zielgene von RUNX1 wird während der Differenzierung der Zellen induziert. Da die RNA-Polymerase II die Bildung der mRNAs in Eukaryoten katalysiert (Roeder, 1976; Cramer *et al.*, 2000), wurde die Bindung der RNA-Polymerase II auf dem Promotorbereich der megakaryozytären Zielgene von RUNX1 untersucht. Dabei wurde die RNA-Polymerase II auf dem Promotorbereich der basal transkribierten megakaryozytären Zielgene von RUNX1 in hämatopoietischen Vorläuferzellen gefunden. Während der Megakaryozytendifferenzierung konnte eine erhöhte Menge der RNA-Polymerase II und eine Phosphorylierung am Serin 2 (elongierende Form) nachgewiesen werden (siehe Abb. 3.27). Zum gleichen Zeitpunkt wird die Genexpression der megakaryozytären RUNX1-Zielgene induziert. Das Auftreten unterschiedlicher Mengen an RNA-Polymerase II um den Transkriptionsstart bei Genen mit H3K4me2+/me3- gegenüber H3K4me2+/me3+ konnte ebenso in anderen Veröffentlichungen beobachtet werden (Orford *et al.*, 2008).

Darüber hinaus wurde eine gegenseitige Beeinflussung der Phosphorylierung der RNA-Polymerase II und des Auftretens der Histonmodifikationen H3K79me2 und H3K36me3

beschrieben (Kizer *et al.*, 2005; Berger, 2007). Die Histonmodifikation H3K79me2 wird während der Initiation der Elongation, die H3K36me3 wird während der späteren Elongation gefunden (Berger, 2007; Campos & Reinberg, 2009). Da die RNA Polymerase II, phosphoryliert am Serin 2, auf dem Promotorbereich der megakaryozytären RUNX1-Zielgene während der Differenzierung nachgewiesen wurde, ist es wahrscheinlich, dass auch die Histonmodifikationen H3K79me2 und H3K36me3 detektiert werden könnten. Der Nachweis dieser beiden Histonmodifikationen würde den aktiv transkribierten Zustand der Promotorbereiche zusätzlich belegen.

4.6 Model der Genregulation von RUNX1-Zielgenen durch PRMT6

Zusammenfassend belegen die gesammelten Daten eine Bindung von RUNX1 zusammen mit einem Corepressorkomplex aus PRMT6, Sin3a und HDAC1 an Promotorbereiche von *intermediary state* Genen in hämatopoietischen Vorläuferzellen. Die Interaktion von RUNX1 und PRMT6 und die Bindung von RUNX1 an die DNA werden dabei möglicherweise durch eine C-terminale Methylierung von RUNX1 verstärkt. Zusätzlich katalysiert PRMT6 die Dimethylierung von H3R2 am Promotor von megakaryozytären Zielgenen. Diese H3R2me2-Histonmodifikation blockiert die Bindung des WDR5/MLL-Komplexes, vermindert die katalytische Aktivität der MLL Methyltransferase und inhibiert somit die Methylierung des H3K4 (Ruthenburg *et al.*, 2007; Hyllus *et al.*, 2007). Auf dem Promotorbereich ist neben den reprimierenden Histonmodifikationen die aktivierende H3K4me2+/me3-Histonmodifikation sowie die initiiierende RNA-Polymerase II vorhanden. Diese bivalenten Gene werden aufgrund dessen zu einem geringen Level exprimiert (siehe Abb. 4.2 A).

Eine verminderte Bindung von PRMT6 an den Promotorbereich führt zu einem Verlust der H3R2me2 Markierung. Als Konsequenz daraus kann WDR5 an den Locus binden und die H3K4-Trimethylierung wird durch den WDR5/MLL-Komplex vermittelt. Diese Vermutung konnte durch die Bindung von WDR5 an die Promotorregion, sowie durch das Auftreten der H3K4me3 belegt werden. Zusätzlich werden weitere Coaktivatoren und Transkriptionsfaktoren wie p300, PCAF, PRMT1 und GATA1/FOG1 auf dem acetylierten Promotorbereich gefunden. Die elongierende RNA-Polymerase II, phosphoryliert am Serin 2, treibt dann die Expression des Gens voran (siehe Abb. 4.2 B).

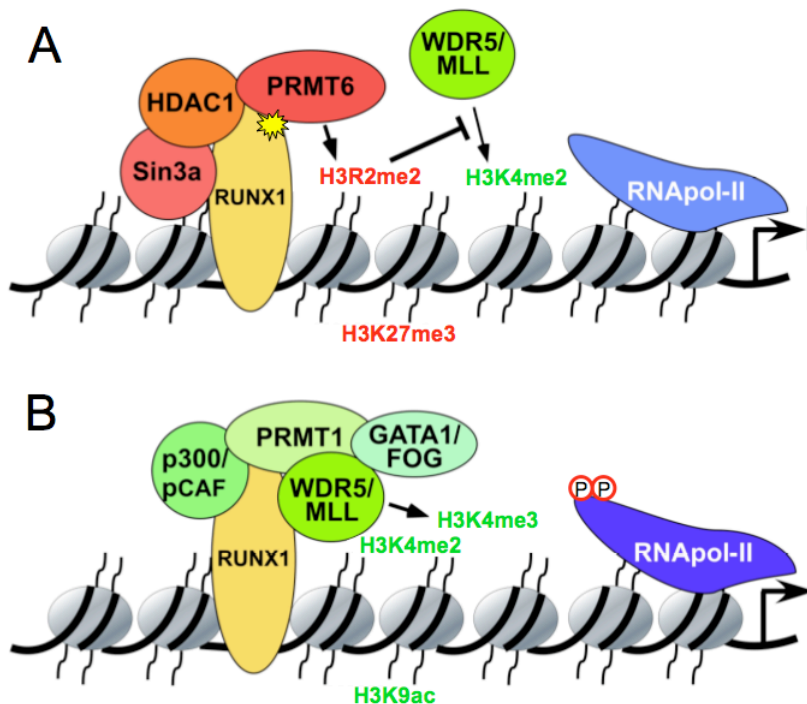


Abb. 4. 3: Modell der PRMT6-Aktivität auf RUNX1-Zielgenen

(A) RUNX1 rekrutiert einen Corepressorkomplex mit PRMT6, Sin3a und HDAC1 in Vorläufer-/Stammzellen. Dabei liegt RUNX1 durch PRMT6 methyliert vor. Das Gen ist in einem *intermediary state*: Repremierende Histonmodifikationen wie H3R2me2 und H3K27me3 sind zusammen mit der aktivierenden H3K4me2 auf dem Promotorbereich vorhanden. Die Trimethylierung von H3K4 ist durch Blockierung der WDR5-Bindung inhibiert. (B) Der Corepressorkomplex ist gegen einen RUNX1 enthaltenden Coaktivatorkomplex mit p300, PCAF, PRMT1, WDR5, GATA1/FOG1 ausgetauscht. Ein Verlust von PRMT6 führt zu einer Verringerung der H3R2me2-Histonmodifikation und einer erhöhten WDR5-Rekrutierung. Als Konsequenz daraus werden die aktivierenden Histonmodifikationen H3K4me3 und H3K9ac etabliert und die elongierende RNA-Polymerase II treibt die Transkription des Gens an.

Da sich die beiden Modifikationen H3R2me2 und H3K4me3 gegenseitig ausschließen, müssen diese Modifikationen reversibel sein und entfernt werden können, wenn der Zustand des Promotors wieder geändert werden soll. Die Demethylase JMJD6 (*Jumonji domain-containing 6*) entfernt die Methylierung von dimethyliertem R3 in Histon H4 und R2 in Histon H3 (Chang *et al.*, 2007). Während der Differenzierung von Vorläufer-/Stammzellen müsste die Bindung von JMJD6 auf dem Promotorbereich der megakaryozytären Zielgenen nachweisbar sein.

Daneben können Arginine und Monomethylarginine in Citrullin durch Peptidylarginin-Deiminasen (PADs) umgewandelt werden. Dieser Prozess verändert die Struktur der Aminosäure, so dass diese nicht mehr methyliert werden kann. Die Protein Deiminase 4 (PAD4) ist eine Deiminase, welche die Argininmethylierung durch Citrullinierung umkehren kann (Thompson & Fast, 2006; Parry & Ward, 2010). Deshalb ist es auch denkbar, dass PADs die Methylierung von H3R2 entfernen und somit eine Rolle bei der Aktivierung der megakaryozytären Zielgenen von RUNX1 spielen.

In megakaryozytären/erythroiden Vorläuferzellen werden Gene mit gegensätzlichem Programm, wie *CD41* und *Glycophorin A* auf geringem Level exprimiert und während der Differenzierung in Richtung Megakaryozyten oder Erythrozyten induziert bzw. reprimiert (Klimchenko *et al.*, 2009). Diese Beobachtung könnte auf einen allgemeinen Mechanismus für die Differenzierung von Stammzellen hindeuten, da eine globale geringe Expression und anschließende Initiation der Transkription bei vielen Genen in pluripotenten embryonalen Stammzellen beobachtet werden kann (Efroni *et al.*, 2008; Guenther *et al.*, 2007).

4.7 Der Einfluss von RUNX1 und PRMT6 auf die hämatopoietische Differenzierung und Krebs

Der Transkriptionsfaktor RUNX1 spielt eine wichtige Rolle für die Entwicklung von hämatopoietischen Stammzellen und für die Differenzierung bestimmter Blutlinien, insbesondere für die Megakaryozytendifferenzierung (Orkin & Zon, 2008; Elagib *et al.*, 2003; Goldfarb, 2007). Über die Expression von *PRMTs* in hämatopoietischen Zellen ist jedoch sehr wenig bekannt. Obwohl noch keine Erkenntnisse über die Expression von *PRMT6* in Blutzelllinien vorliegen, ist es vorstellbar, dass *PRMT6* eine generelle Funktion bei der Regulation von RUNX1-Zielgenen erfüllt. Erste Daten sprechen dafür, dass RUNX1 und *PRMT6* zusammen auch auf dem Promotorbereich von dem myeloiden RUNX1-Zielgen *Csf1r* gefunden werden (Daten hier nicht gezeigt).

Eine funktionelle Veränderung von RUNX1 trägt zur Ausbildung von Leukämien bei. In humanen Leukämien ist *RUNX1* ein sehr häufiges Ziel von chromosomalen Translokationen. Daneben wurden in dem C-Terminus von *RUNX1* Mutationen nachgewiesen (Look, 1997; Speck & Gilliland, 2002). Kürzlich wurde gezeigt, dass der Gehalt an asymmetrischer Dimethylierung, sowie die Expression von *PRMT1* und *PRMT6* in einer Reihe von Krebskrankheiten erhöht vorliegt (Yoshimatsu *et al.*, 2011). Das könnte darauf schließen lassen, dass Protein Arginin Methyltransferasen bei verschiedenen Krebstypen und möglicherweise auch in Leukämien eine Rolle spielen. Hier könnte das Zusammenspiel von RUNX1 und *PRMT6* bei der akuten myeloischen oder der akuten lymphoblastischen Leukämie näher untersucht werden. Eine Fehlregulation von Histon-Acetyltransferasen (HATs) und Histon-Deacetylasen (HDACs) spielt bei einer Anzahl von Krebsarten eine Rolle. Für Histon Deacetylasen wurden schon spezifische Inhibitoren konzipiert und werden bereits zur Krebstherapie eingesetzt (Vigushin & Coombes, 2002). *PRMT6* ist ebenfalls ein potentielles therapeutisches Ziel zur Behandlung von Krebskrankheiten sein und ein spezifischer *PRMT6*-Inhibitor könnte für eine epigenetische Therapie verwendet werden.

5. Material und Methoden

5.1 Material

5.11 Chemikalien, Geräte und Enzyme

Die eingesetzten Chemikalien stammten von den Firmen AppliChem (Darmstadt), Biontix (München), Carl Roth (Karlsruhe), Invitrogen (Karlsruhe), InvivoGen (Cayla), Roche (Mannheim) und Sigma Aldrich (München). Eine Liste der verwendeten Chemikalien, Geräte und ihrer Bezugsquellen findet sich im Anhang.

Restriktionsenzyme und modifizierte Enzyme wurden von New England Biolabs (Ipswich) und Fermentas (St. Leon-Rot) bezogen.

5.12 Antikörper

Folgende Antikörper wurden für Western Blot Analysen oder für eine (Chromatin-) Immunopräzipitation verwendet:

Tab. 5. 1: Übersicht aller verwendeter Primärantikörper

* (WB = Western Blot; IP = (Chromatin)-Immunopräzipitation)

NAME	ORGANISMUS	VERWENDUNG*	BESCHREIBUNG / HERSTELLER
anti-FLAG	Maus	1:2.000 im WB	Monoklonaler Antikörper gegen das FLAG-Peptid DYKDDDDK; Sigma Aldrich (F3165); 4,6 µg/µl
anti-HA	Maus	1:2.000 im WB	Monoklonaler Antikörper gegen das HA-Peptid CYPYDVPDYASL; Covance (MMS101P); 1 µg/µl
anti-HA	Rabbit	1:1.000 im WB	Polyklonaler Antikörper gegen eine interne Region des HA-Proteins (HA- <i>probe</i> Y11); Santa Cruz (sc-805); 200 µg/ml
anti-RUNX1	Ziege	10 µg/IP; 1:100 im WB	Polyklonaler Antikörper gegen ein Peptid des N-Terminus des humanen RUNX1; Santa Cruz (sc-8563); 200 µg/0,1 ml
anti-RUNX1	Kaninchen	5 µg/IP; 1:1.000 im WB	Polyklonaler Antikörper, der gegen die Aminosäuren 200-300 des humanen RUNX1 gerichtet ist; Abcam (ab23980); 0,7 µg/µl
anti-PRMT6	Ziege	5 µg/IP 1:100 im WB	Polyklonaler Antikörper, der gegen eine interne Region des humanen PRMT6 gerichtet ist; Santa Cruz (sc-55702); 200 µg/ml
anti-PRMT1	Kaninchen	3 µg/IP	Polyklonaler Antikörper, der gegen die Aminosäuren 1-100 des humanen PRMT1 gerichtet ist; antibody online (ABIN 149481); 0,25 µg/µl
anti-p300/CBP	Maus	3 µg/IP	Monoklonaler Antikörper, der gegen die Aminosäuren 2071-2091 von p300 gerichtet ist; NeoMarkers (MS-586); 200 µg/ml
anti-Sin3a	Kaninchen	3 µg/IP 1:100 im WB	Polyklonaler Antikörper, der gegen ein Peptid des N-Terminus des murinen Sin3a gerichtet ist; Detektiert auch das humane Sin3a; Santa Cruz (sc-994); 200 µg/ml
anti-HDAC1	Kaninchen	3 µg/IP	Polyklonaler Antikörper, der gegen den C-Terminus des humanen HDAC1 gerichtet ist; Diagenode (pAb-053-050); 158 µg/0,1 ml

NAME	ORGANISMUS	VERWENDUNG *	BESCHREIBUNG / HERSTELLER
anti-WDR5	Maus	3 µg/IP	Monoklonaler Antikörper, der gegen humanes WDR5 gerichtet ist; Santa Cruz (sc-100895); 100 µg/ml
anti-GATA1	Ziege	3 µg/IP	Polyklonaler Antikörper, der gegen ein Peptid des C-Terminus des humanen GATA1 gerichtet ist; Santa Cruz (sc1233); 200 µg/ml
anti-FOG1	Ziege	3 µg/IP	Polyklonaler Antikörper, der gegen ein Peptid des N-Terminus des murinen FOG-1 gerichtet ist; Detektiert auch das humane FOG-1; Santa Cruz (sc-9361); 200 µg/ml
anti-CARM1	Kaninchen	3 µg/IP	Polyklonaler Antikörper, der gegen die Aminosäuren 11-150 des humanen CARM1 gerichtet ist; Santa Cruz (sc-33176); 200 µg/0,1 ml
anti-H3K9ac	Kaninchen	3 µg/IP	Polyklonaler Antikörper, der gegen die Aminosäuren 1-100 des humanen Histons H3, acetyliert am Lysin 9 gerichtet ist; Abcam (ac10812); 0,8 µg/µl
anti-H3K4me2	Kaninchen	3 µg/IP	Monoklonaler Antikörper, der gegen ein Peptid des Histons H3 um das dimethylierte Lysin 4 gerichtet ist; Abcam (ab32356); 1 µg/µl
anti-H3R2me2	Kaninchen	3 µg/IP	Polyklonaler Antikörper, der gegen ein Peptid des Histons H3 um das dimethylierte Arginin 2 gerichtet ist; Abcam (ab80075); ca. 0,5 µg/µl
anti-H3K27me3	Maus	3 µg/IP	Monoklonaler Antikörper, der gegen ein Peptid des Histons H3 um das trimethylierte Lysin 27 gerichtet ist; Abcam (ab6002); 1 µg/µl
anti-H3K4me3	Maus	3 µg/IP	Monoklonaler Antikörper, der gegen ein Peptid des Histons H3 um das trimethylierte Lysin 4 gerichtet ist; Abcam (ab1012); 1 µg/µl
anti-H3K9me3	Kaninchen	3 µg/IP	Polyklonaler Antikörper, der gegen ein Peptid des Histons H3 um das trimethylierte Lysin 9 gerichtet ist; Abcam (ab8898); 1 µg/µl
anti-RNA pol IIa	Maus	2 µg/IP	Monoklonaler Antikörper, der gegen das Motif YSPTSPPS am C-terminus der humanen RNA polymerase II gerichtet ist; Abcam (ab5408); 1 µg/µl
anti-RNA pol II CTD,pS2	Maus	2 µg/IP	Monoklonaler Antikörper, der gegen die Aminosäuren 1600-1700 der RNA polymerase II, phosphoryliert am Serin2, gerichtet ist; Abcam (ab5095); 1 µg/µl

Tab. 5. 2: Übersicht aller verwendeter Sekundärantikörper

* (WB = Western Blot)

NAME	ORGANISMUS	VERWENDUNG *	BESCHREIBUNG / HERSTELLER
anti-Maus IgG-HRP	Ziege	1:5.000 im WB	Anti-Maus IgG; Santa Cruz (sc-2005); 200 µg/0,5 ml
anti-Kaninchen IgG-HRP	Ziege	1:5.000 im WB	Anti-Kaninchen IgG; Santa Cruz (sc-2004); 200 µg/0,5 ml
anti-Ziege IgG-HRP	Esel	1:5.000 im WB	Anti-Ziege IgG; Santa Cruz (sc-2020); 200 µg/0,5 ml

Tab. 5. 3: Übersicht aller verwendeter Sekundärantikörper für das Odyssey-System

* (WB = Western Blot)

NAME	ORGANISMUS	VERWENDUNG *	BESCHREIBUNG / HERSTELLER
anti-Maus IgG-IRDye®800CW	Ziege	1:10.000 im WB	Anti-Maus IgG; LI-COR® (926,32210); 0,5 mg
anti-Kaninchen IgG-IRDye®800CW	Ziege	1:10.000 im WB	Anti-Kaninchen IgG; LI-COR® (926-32211); 0,5 mg

Tab. 5. 4: Übersicht aller verwendeter Immunoglobuline

* (IP = (Chromatin)-Immunopräzipitation)

NAME	VERWENDUNG *	BESCHREIBUNG / HERSTELLER
Maus IgG	2-10 µg/IP	Maus IgG; Santa Cruz (sc-2025); 200 µg/0,5 ml
Kaninchen IgG	2-10 µg/IP	Kaninchen IgG; Santa Cruz (sc-2027); 200 µg/0,5 ml
Ziege IgG	2-10 µg/IP	Ziege IgG; Santa Cruz (sc-2028); 200 µg/0,5 ml

5.2 Zellbiologische Methoden

5.21 Zelllinien

Die verwendeten Zelllinien sind in Tabelle 5.5 zusammengefasst.

Tab. 5. 5: Übersicht aller verwendeter Zelllinien

ZELLINIE	ZELLTYP / MEDIUM
293T (HEK)	humane Nierenkarzinom-Zelllinie; Embryonale Epithelzellen; Medium: DMEM (Gibco, Karlsruhe)
K562	humane Leukämiezelllinie, myeloische Blutzellen; Medium: RPMI (Gibco, Karlsruhe)
HEL	humane Leukämiezelllinie; erythroblastische Blutzellen; Medium: RPMI (Gibco, Karlsruhe)
TF-1	humane Leukämiezelllinie; erythroblastische Blutzellen; RPMI (Gibco, Karlsruhe)

Die Kultivierung der 293T-, K562-, HEL- und TF-1-Zellen erfolgte bei einer Temperatur von 37°C, 95% relativer Luftfeuchtigkeit und 5% CO₂. Das oben angegebene Medium wurde mit 10% (v/v) fötalem Kälberserum (FKS), 1% (v/v) Penicillin/Streptomycin sowie 2 mM L-Glutamin supplementiert.

CD34+ Stammzellen wurden vom DRK Blutspendedienst Frankfurt zur Verfügung gestellt. Die Zellen wurden *in vitro* unter serumfreien Bedingungen für 6 Tage im 24-Well expandiert. Dafür wurde das StemSpan Medium (Stem cell Technologies, Grenoble) mit Flt-3 Ligand (100 ng/ml),

SCF (100 ng/ml), IL-3 (20 ng/ml) und IL-6 (20 ng/ml) verwendet. 5×10^5 Zellen/ml wurden pro *Well* eines 24-*Wells* ausgesät und jeden Tag wieder auf die Zellzahl eingestellt.

Zur Erhaltung der Zelllinien wurden ca. $2,5 \times 10^6$ Zellen abzentrifugiert und in 1 ml Einfriermedium (FKS mit 10% (v/v) DMSO) aufgenommen. Anschließend wurde die Zellsuspension langsam auf -80°C abgekühlt und bei -80°C oder für längere Lagerung über flüssigem Stickstoff aufbewahrt.

Zum in Kultur bringen der Zellen, wurden die Zellen bei 37°C aufgetaut und in vorgewärmten Medium aufgenommen. Anschließend wurden die Zellen abzentrifugiert und in frischem Medium aufgenommen und ausgesät.

5.22 Differenzierung der Zelllinien

Für die Differenzierung von K562- oder HEL-Zellen wurden 2×10^6 Zellen in einer 10 cm-Schale ausgesät. Zur Induktion der Megakaryozytendifferenzierung von K562-Zellen wurde dem Kultivierungsmedium 30 nM 12-*o*-Tetradecanoylphorbol-13-acetat (TPA) zugegeben. Für die Differenzierung von HEL-Zellen wurde 15 nM TPA verwendet. Anschließend wurden die Zellen bei einer Temperatur von 37°C , 95% relativer Luftfeuchtigkeit und 5% CO_2 für 6-96 Stunden inkubiert.

Humane CD34-Zellen wurden vorweg *in vitro* unter serumfreien Bedingungen expandiert. Für die Erythrozytendifferenzierung wurde dem StemSpan-Medium SCF (20 ng/ml), IL-3 (5 ng/ml), Dexamethason ($2 \mu\text{M}$), Estradiol ($0,2 \mu\text{M}$) und Erythropoietin (1 unit/ml) hinzugefügt. Zur Induktion der Megakaryozytendifferenzierung wurde das Medium mit SCF (1 ng/ml), IL-9 (13,5 ng/ml), IL-6 (7,5 ng/ml) und Thrombopoietin (TPO, 30 ng/ml) versetzt und die Zellen für 4-6 Tage kultiviert.

5.23 Transfektion

Für die Herstellung von Kernextrakten wurden 5×10^5 HEK293T-Zellen pro *Well* eines 6-*Wells* ausgesät. 24 Stunden nach Aussaat der Zellen wurde das Medium gewechselt und die Zellen mit 1-2 μg Plasmid-DNA und 4 μl Polyethylenimin (PEI) bzw. Metafectene transfiziert. Für die Interaktionsanalyse von RUNX1 und den verschiedenen PRMTs wurden 250 ng Flag-RUNX1 und je 1 μg HA-PRMT verwendet. Der komplette Transfektionsansatz wurde nach 20 min Inkubation bei Raumtemperatur auf ein *Well* aufgegeben. Das Medium wurde 24 Stunden nach der Transfektion erneut gewechselt.

Für eine Immunopräzipitation von Flag-RUNX1 mit endogenem PRMT6 wurden 4×10^6 K562-Zellen pro 10 cm Kulturschale mit 2 μg Flag-RUNX1 und 10 μl Metafectene transfiziert. Für einen *Oligo-pulldown* wurden 250 ng Flag-RUNX1, 250 ng CBF, 1 μg HA-PRMT6 und 2 μl

Metafectene auf 5×10^5 HEK293T-Zellen pro *Well* eines 6-*Wells* aufgegeben. Zur Erstellung von stabilen Zelllinien wurden 2×10^6 K562-Zellen mit 10 μg Plasmid-DNA, eine shRNA gegen PRMT6 oder eine cDNA von PRMT6 zur Überexpression enthaltend, und 10 μl Metafectene transfiziert.

Für Luciferaseassays wurden HEK293T-Zellen in 24-*Wells* (ca. 80.000 Zellen pro *Well*) mit maximal 2 μg Plasmid-DNA und 1,5 μl Metafectene transfiziert. Dabei setzte sich die Menge der Plasmid-DNA aus 300 ng ELA2-Promotor-, 50 ng β -Galactosidase-, 500 ng RUNX1-, 1 μg PRMT6- bzw. shPRMT6-Plasmid-DNA zusammen. Dieser Ansatz wurde für 20 min bei Raumtemperatur inkubiert, dann anteilig auf zwei *Wells* verteilt und die Zellen im Brutschrank inkubiert.

Polyethylenimin (PEI)

1 mg/ml in H_2O (pH 7,0)

5.24 Herstellung stabiler Zelllinien

Die K562-Zellen wurden mit pIRES-PRMT6 oder psiRNA-shPRMT6 transfiziert (siehe Transfektion). Für eine Selektion wurden die Zellen 48 Stunden nach der Transfektion mit dem entsprechenden Antibiotikum behandelt (G418 für den pIRES-Vektor, Zeozin für den psiRNA-Vektor). Die erste Woche nach Transfektion wurde nur das Medium gewechselt, anschließend erfolgte eine Umsetzung und Verdünnen der Zellen bei hoher Konfluenz alle 2 Tage.

Die transfizierten Zellen wurden nach ca. 4 Wochen Selektionsdauer mittels FACS (*fluorescence activated cell sorting*) nach dem GFP-Signal sortiert. Dazu wurde das hauseigene FACS-Analyse-Gerät BD FACS AriaTM genutzt. Anschließend wurden die Zellen in Selektionsmedium kultiviert.

Selektionsmedium für K562 pIRES-PRMT6

RPMI (Gibco, Invitrogen) mit 10% (v/v) FKS, 1% (v/v) Penicillin/Streptomycin, 2 mM L-Glutamin und 0,25 mg/ml G418

Selektionsmedium für K562 psiRNA-shPRMT6

RPMI (Gibco, Invitrogen) mit 10% (v/v) FKS, 1% (v/v) Penicillin/Streptomycin, 2 mM L-Glutamin und 0,1 mg/ml Zeozin

5.25 Transduktion und FACS-Analyse (*fluorescence activated cell sorting*)

Dieser Versuch wurde von Dr. Ashok Kumar (aus der Arbeitsgruppe von Dr. Jörn Lausen, Georg-Speyer-Haus, Frankfurt) durchgeführt und wird hier kurz beschrieben.

HEK293T-Zellen wurden mit den entsprechenden Vektoren mittels Calcium-Phosphat-Methode transfiziert. Nach 24, 36 und 48 Stunden wurde der Überstand abgenommen und gefiltert (0,22 μm). 50 μl des viralen, konzentrierten Überstandes (ca. 25 MOI (*multiplicity of infection*))

wurden auf 5×10^5 CD34-Zellen pro *Well* eines 24-*Wells* in 1 ml StemSpan Medium (Stem cell Technologies, Grenoble) aufgegeben. Die Platte wurde für 90 min bei 1.800 rpm und 31°C zentrifugiert. Anschließend wurden die Zellen bei einer Temperatur von 37°C, 95% relativer Luftfeuchtigkeit und 5% CO₂ weiter kultiviert.

Die FACS-Analyse wurde mit dem FACSCanto unter Benutzung der FACSDiva *Software* (BD Biosciences PharMingen, Heidelberg) durchgeführt. Folgende Maus anti-humane monoklonale Antikörper wurden für die Färbung verwendet: APC anti-humanes CD41 (Klon: HIP8) (Biolegend, Fell), PE anti-humanes CD61 (Klon: VI-PL2) (Biolegend, Fell), Pacific Blue™ anti-humanes CD34 (Klon: 581) (Biolegend, Fell), APC/Cy7 anti-humanes CD45 (Klon: HI30) (Biolegend, Fell). 5×10^5 Zellen wurden mit spezifischen Antikörpern für 20 min bei 4°C im Dunkeln angefärbt. Zur Verhinderung unspezifischer Bindungen zu FC-Rezeptoren, wurden die Proben mit TruStain FcX™ (Biolegend, Fell) vor der Antikörper-Färbung inkubiert. Die Zellen wurden zweimal mit FACS-Puffer gewaschen, in 300 µl FACS-Puffer aufgenommen und mittels FACS analysiert.

FACS-Puffer

1% Formaldehyd in PBS

Phosphatgepufferte Kochsalzlösung (PBS)

137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 1,7 mM KH₂PO₄

5.3 Molekularbiologische Methoden

5.31 Standardmethoden

Molekularbiologische Standardmethoden wurden nach Sambrook *et al.* (2001) durchgeführt. Der Protokollsammlung sind Anzucht und Transformation von Bakterien, Plasmid-DNA-Präparationen, Gelelektrophoresen, Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen, Ligations-Reaktionen und PCR Analysen zu entnehmen.

Die Aufreinigung kleiner Mengen von Plasmid-DNA erfolgte mit dem *GeneJet Plasmid Miniprep Kit* (Fermentas, St. Leon-Rot). Größere Mengen Plasmid-DNA wurden mit dem *PureLin HiPure DNA Purification Kit* (Invivogen, Cyla) aufgereinigt. Für die Aufreinigung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen wurde das *Spin DNA Extraction Kit* (Invitex, Berlin) verwendet. RNA wurde mit Hilfe des *RNeasy Mini Kits* von Qiagen (Hilden) isoliert.

5.32 Expressionsvektoren

pGEX4T.1 Vektor

Der pGEX4T.1 Vektor (GE Healthcare Life Sciences, Uppsala) ist ein Expressions-Vektor-System für *E. coli*, das den TAC-Promotor enthält und für transiente Expression einsetzbar ist. Zur Selektion enthält dieser Vektor außerdem eine Ampicillin-Resistenz. In diesem Vektor ist

die Glutathion S-Transferase, ein 26 kDa großes Protein, vor der multiplen Klonierungsstelle enthalten, so dass ein N-terminales GST-Fusionsprotein entsteht. Die Expression kann durch Zugabe von Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid (IPTG) induziert werden.

RUNX1-Konstrukte der murinen cDNA von RUNX1 (Isoform 3) wurden mit Hilfe der Restriktionsenzyme *Bam*HI bzw. *Eco*RI und *Xho*I *in-frame* in den pGEX4T.1-Vektor eingefügt. GST-PRMT6 (human) war schon im pGEX4T.1 vorhanden.

Tab. 5. 6: Übersicht aller verwendeter Primer für die Klonierung der GST-Konstrukte

(frw = *forward*; rev = *reverse*; Tm = Schmelztemperatur; * der Aminosäurenbereich von RUNX1, den das Primerpaar amplifiziert, ist angegeben)

NAME*	ENZYME	NUKLEOTIDSEQUENZ (5'→3')	Tm [°C]
GST-RUNX1 (1-451as) frw	<i>Bam</i> HI	TATAGGATCCATGCGTATCCCCGTAGAT	65,1
GST-RUNX1 (1-451as) rev	<i>Xho</i> I	ATATCTCGAGTCAGTAGGGCCGCCACAC	69,5
GST-RUNX1 (1-51as) frw	<i>Bam</i> HI	TATAGGATCCATGCGTATCCCCGTAGAT	65,1
GST-RUNX1 (1-51as) rev	<i>Xho</i> I	ATATCTCGAGTCACATGCTGCGGTCGCCGCT	72,1
GST-RUNX1 (51-177as) frw	<i>Bam</i> HI	TATAGGATCCATGGTGGAGGTACTAGCT	65,1
GST-RUNX1 (51-177as) rev	<i>Xho</i> I	ATATCTCGAGTCATCGGGGTTCTCGGGGGCC	73,5
GST-RUNX1 (1-177as) frw	<i>Bam</i> HI	TATAGGATCCATGCGTATCCCCGTAGAT	65,1
GST-RUNX1 (1-177as) rev	<i>Xho</i> I	ATATCTCGAGTCATCGGGGTTCTCGGGGGCC	73,5
GST-RUNX1 (177-451as) frw	<i>Eco</i> RI	TATAGAATTCAGACATCGGCAGAACTAGATG	64,4
GST-RUNX1 (177-451as) rev	<i>Xho</i> I	TATACTCGAGTCAGTAGGGCCGCCACAC	69,5
GST-RUNX1 (300-451as) frw	<i>Eco</i> RI	TATAGAATTCACCGCCTTCGGCGACCCA	68,0
GST-RUNX1 (300-451as) rev	<i>Xho</i> I	TATACTCGAGTCAGTAGGGCCGCCACAC	69,5

Tab. 5. 7: Übersicht aller verwendeter Sequenzierprimer für den pGEX4T.1 Vektor

(frw = *forward*; rev = *reverse*; Tm = Schmelztemperatur)

NAME	NUKLEOTIDSEQUENZ (5'→3')	GC-GEHALT [%]	Tm [°C]
pGEX4T.1 frw	TATAGCATGGCCTTTGCAGG	50,0	57,3
pGEX4T.1 rev	CGGGAGCTGCATGTGTC	64,7	57,6

pcDNA3.1 Vektor

Der pcDNA3.1 Vektor (Invitrogen, Karlsruhe) ist mit einem CMV-Promotor ausgestattet und für transiente Expression in Säugerzellen geeignet. Zusätzlich enthält dieser Vektor eine Ampicillin-Resistenz zur Selektion.

Der Flag-Affinitätstag mit der Sequenz GACTACAAAGACGATGACGACAAG ist mit *Nco*I und *Hind*III in einem pcDNA3.1 Vektor vorhanden. In einen weiteren pcDNA3.1 Vektor ist ein zweifacher HA-Affinitätstag mit *Bgl*II und *Bam*HI hineinkloniert worden. Die *Bgl*II-Schnittstelle ist dadurch nicht mehr vorhanden.

Zur Expression in Säugerzellen wurde die cDNA von RUNX1 in den pcDNA3.1 Vektor mit Flag-Affinitätstag mittels *Bam*HI und *Xho*I kloniert. Die cDNA von PRMT6 war in dem pcDNA3.1 Vektor mit 2HA-Tag vorhanden.

Tab. 5. 8: Übersicht aller verwendeter Primer für die Klonierung in den pcDNA3.1 Vektor

(frw = *forward*; rev = *reverse*; Tm = Schmelztemperatur; * der Aminosäurenbereich von RUNX1, den das Primerpaar amplifiziert, ist angegeben)

NAME*	ENZYME	NUKLEOTIDSEQUENZ (5'→3')	Tm [°C]
RUNX1 (1-451as) frw	<i>Bam</i> HI	TATAGGATCCATGCGTATCCCCGTAGAT	65,1
RUNX1 (1-451as) rev	<i>Xho</i> I	ATATCTCGAGTCAGTAGGGCCGCCACAC	69,5

psiRNA-h7SKGFPzeo Vektor

Der psiRNA-h7SKGFPzeo Vektor (Invivogen, Cyla) ist für transiente bzw. stabile Expression in Säugerzellen geeignet. Das grün fluoreszierende Protein (GFP) als Reporter gen sowie eine Zeozin-Resistenz zur Selektion sind vorhanden.

Für *knock down*-Experimente wurde eine *small hairpin*-RNA (shRNA) in den Vektor mittels *Bbs*I-Restriktionsschnittstellen eingefügt. Folgende shRNAs wurden für einen *knock down* von humanem PRMT6 verwendet:

(1): 5'-ACCTCGGCATTCTGAGCATCTTCTGTTCAAGAGACAGAAGATGCTCAGAATGCCTT-3';

(2): 5'-ACCTCGGAGGAGAAGACCAAGACTTTCAAGAGAAGTCTTTGGTCTTCTCCTCCTT-3'.

Für die meisten Experimente wurde die shPRMT6 (2) verwendet, da ein stärkerer *knock down* von humanem PRMT6 nachzuweisen war.

pIRES2-EGFP Vektor

Der pIRES2-EGFP Vektor (BD Biosciences, Erembodegem) ist mit einem CMV-Promotor ausgestattet und für transiente bzw. stabile Expression in Säugerzellen geeignet. Eine Variante des grün fluoreszierenden Proteins (EGFP) als Reporter gen sowie eine Kanamycin-/Neomycin-Resistenz zur Selektion sind vorhanden. Stabil transfizierte eukaryotische Zellen können mit G418 selektiert werden.

Die cDNA des humanen PRMT6 wurde mit Hilfe der Restriktionsenzyme *Nhe*I und *Eco*RI in den pIRES2-EGFP Vektor zur späteren Erstellung einer stabilen K562-Zelllinie eingefügt.

Tab. 5. 9: Übersicht aller verwendeter Primer für die Klonierung in den pIRES2-EGFP Vektor

(frw = *forward*; rev = *reverse*; Tm = Schmelztemperatur)

NAME	ENZYME	NUKLEOTIDSEQUENZ (5'→3')	Tm [°C]
pIRES PRMT6 frw	<i>Nhe</i> I	TATAGCTAGCTACCCTTACGACGTGCCCGAC	70,8
pIRES PRMT6 rev	<i>Eco</i> RI	TATAGAATTCAGTCCTCCATGGCAAAGTCTTG	67,1

SEW Vektor

Der SEW Vektor (Demaison *et al.*, 2002) ist für die Transduktion von Säugerzellen zur transienten Expression einer shRNA geeignet. Der SFFV-Promotor sowie das grün fluoreszierende Protein (EGFP) wurden gegen einen CMV-Promotor, ein GFP und eine Zeozin-Resistenz zur Selektion ausgetauscht.

Für *knock down*-Experimente wurde eine shRNA gegen das humane PRMT6 mit Hilfe der Restriktionsenzyme *EcoRI* und *XhoI* aus dem psiRNA-h7SKGFPzeo Vektor ausgeschnitten und in den modifizierten SEW Vektor eingefügt.

Tab. 5. 10: Übersicht aller verwendeter Sequenzierprimer für den SEW Vektor

(frw = *forward*; rev = *reverse*; T_m = Schmelztemperatur)

NAME	NUKLEOTIDSEQUENZ (5'→3')	GC-GEHALT [%]	T _m [°C]
SEW frw	ATTACAGGGACAGCAGAGATC	47,6	57,9
SEW rev	GATCTACAGCTGCCTTGTAAG	47,6	57,9

LEGOiG2 Vektor

Der LEGOiG2 Vektor (Fehse, Hamburg) ist mit einem SFFV-Promotor ausgestattet und für die Transduktion von Säugerzellen zur transienten Expression von Proteinen geeignet. In dem Vektor sind eine Variante des grün fluoreszierenden Proteins (EGFP) als Reporter gen sowie eine Ampicillin-Resistenz zur Selektion vorhanden.

Die cDNA des humanen PRMT6 wurde mit Hilfe der Restriktionsenzyme *BamHI* und *NotI* in den LEGOiG2 Vektor eingefügt. Dafür wurde die cDNA aus dem pGEX4T.1 Vektor mit den Restriktionsenzymen ausgeschnitten und in den LEGOiG2 Vektor kloniert.

5.33 ReportergenepGL4.1 Vektor

Der pGL4.1 Vektor (Promega, Madison) ist für transiente Expression in Säugerzellen geeignet. Ein *Firefly* (*luc2*)-Luciferase Reporter gen ist ohne Promotorfragment, mit jedoch einer multiplen Klonierungsstelle, in dem Vektor vorhanden. Jeder beliebige Promotorbereich kann somit in den Vektor kloniert werden.

Ein Vektorkonstrukt mit einem Fragment des Elastase2-Promotors (ELA2) liegt bereits kloniert vor (Lausen *et al.*, 2006). Zusätzlich wurde ein 709 bp-CD41-Promotorfragment aus genomischer DNA amplifiziert und mit den Restriktionsschnittstellen *KpnI* und *NheI* vor das Luciferasegen eingefügt. Die Aktivität des CD41-Promotors kann durch Messung der Expression der *Firefly*-Luciferase untersucht werden.

Tab. 5. 11: Übersicht aller verwendeter Primer für die Klonierung des CD41-Promotor-Fragments in den pGL4.1 Vektor(frw = *forward*; rev = *reverse*; prom. = Promotor; Tm = Schmelztemperatur)

NAME	ENZYME	NUKLEOTIDSEQUENZ (5'→3')	Tm [°C]
CD41 prom. frw	<i>KpnI</i>	ATAGGTACCTCCCCAATCTCCTTGCCACC	69,5
CD41 prom. rev	<i>NheI</i>	TATGCTAGCCTTCCTTCTTCCACAACCTCCC	69,5

5.34 Herstellung von Gesamtzellextrakten

Die Gesamtzellextrakte der transfizierten HEK293T-Zellen wurden 48 Stunden nach der Transfektion (siehe Transfektion) hergestellt.

Dafür wurden die Zellen mit PBS abgelöst und bei 300 x g für 5 min abzentrifugiert. Anschließend wurden die Zellen abhängig von der Größe des Zellpellets in 100-250 µl Lyse-Puffer resuspendiert und für 30 min auf Eis inkubiert und alle 10 min durch Vortexen gemischt. Die Zelltrümmer wurden durch Zentrifugation für 30 min bei 13.226 x g und 4°C abgetrennt, der Überstand wurde aliquotiert und bei -80°C gelagert.

Lyse-Puffer

50 mM Tris (pH 7.4), 100 mM NaCl, 0,1% (v/v) Triton X-100, 1 mM Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA, pH 8,0), 10% (v/v) Glycerol, 1 mM Dithiothreitol (DTT)

Phosphatgepufferte Kochsalzlösung (PBS)

137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 1,7 mM KH₂PO₄

5.35 Herstellung von Kernextrakten

Die Kernextrakte der transfizierten HEK293T-Zellen wurden 48 Stunden nach der Transfektion (siehe Transfektion) hergestellt.

Zuerst wurden die transfizierten Zellen mit PBS abgelöst, 5 min bei 300 x g abzentrifugiert und in 200 µl Puffer A resuspendiert. Nach einer Inkubation für 5 min erfolgte eine Zugabe von 2 µl einer 20%igen Nonidet P-40-Lösung. Nach einer weiteren Inkubation für 10 min und vortexen für 2 Sekunden, wurde für 5 min bei 13.226 x g abzentrifugiert. Die Zytoplasmafraktion wurde verworfen. Das Pellet wurde in 100 µl Puffer C aufgenommen und für 30 min inkubiert, wobei das Zelllysat in 10-minütigen Abständen durch Vortexen gemischt wurde. Durch Zentrifugieren bei 13.226 x g wurden Kernproteine und unlösliche Bestandteile getrennt. Der Kernfraktionsüberstand wurde aliquotiert und bei -80°C gelagert.

Die Herstellung der Kernextrakte erfolgte auf Eis und mit vorgekühlten Puffern. Die Zentrifugation wurde bei 4°C durchgeführt.

Für die Herstellung von Kernextrakten für eine endogene Immunopräzipitation wurden 3x10⁷ TF-1- bzw. K562-Zellen verwendet. Diese wurden in 2 ml Puffer A und 1,1 ml Puffer C (mit

200 mM NaCl) aufgenommen. Zusätzlich wurden die Zellen mit einem Handhomogenisator aufgebrochen. Die Inkubationszeiten wurden auf 30 min erhöht. Die Zentrifugation erfolgte jeweils für 60 min.

Puffer A

10 mM Tris (pH 7,5), 0,1 mM Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA, pH 8,0), 0,1 mM Ethylenglycoltetraessigsäure (EGTA, pH 8,0), 10 mM KCl, 1 mM Dithiothreitol (DTT), Protease-Inhibitor-Mix

Puffer C

10 mM Tris (pH 7,5), Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA, pH 8,0), 1 mM Ethylenglycoltetraessigsäure (EGTA, pH 8,0), 0,4 M NaCl, 20% (v/v) Glycerol, 1 mM Dithiothreitol (DTT), Protease-Inhibitor-Mix

Puffer C (200 mM NaCl)

10 mM Tris (pH 7,5), 1 mM Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA, pH 8,0), 1 mM Ethylenglycoltetraessigsäure (EGTA, pH 8,0), 0,2 M NaCl, 20% (v/v) Glycerol, 1 mM Dithiothreitol (DTT), Protease-Inhibitor-Mix

Nonidet P-40 (NP-40)-Lösung

20% (v/v) NP-40 in Puffer A

Phosphatgepufferte Kochsalzlösung (PBS)

137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 1,7 mM KH₂PO₄

5.36 Oligo-pulldown

Für einen Oligo-pulldown wurden 48 Stunden nach Transfektion Kernextrakte der transfizierten Zellen hergestellt (siehe Transfektion und Herstellung von Kernextrakten). Folgende komplementäre 5'-biotinylierte Oligonukleotide des RUNX3-Promotors wurden verwendet (Wichmann *et al.*, 2010):

5'-AGGGCCTGGCCTTGTGGTTCTGTGGTTGAGGGACCAGGC-3';

5'-GCCTGGTCCCTCAACCACAGAACCACAAGGCCAGGCCCT-3'.

Je 2,5 µl beider Oligonukleotide (100 pmol) wurden mit 6 µl 0,5 M NaCl und 19 µl H₂O zusammengegeben, im kochenden Wasserbad für 2 min erhitzt und anschließend langsam abgekühlt. Nach dem *Annealing* der Oligonukleotide wurden 2 µl mit 200 µl Kernextrakt, 300 µl Bindungspuffer und 100 ng DNA aus Lachssperma als unspezifischer Kompetitor zusammengegeben und für 2,5 Stunden bei 4°C rotierend inkubiert. Anschließend wurden 5 µl magnetische Streptavidin-*Beads* zugegeben und für weitere 3 Stunden bei 4°C gemischt. Nach abschließendem 4-maligen Waschen mit Bindungs-Puffer wurden die Proteine mit 20 µl 4 x Protein-Ladepuffer eluiert und mittels SDS-Gelelektrophorese und Western Blots mit dem Odyssey-System (LI-COR Biosciences®, Lincoln) analysiert. Die Detektion der Fluoreszenz nahe des Infrarotlichtbereichs erlaubt eine Quantifizierung der Proteine mittels spezifischer Antikörper (siehe Antikörper).

Bindungs-Puffer

25 mM HEPES (pH 7,5), 50 mM KCl, 1 mM EDTA (pH 8,0), 10 mM MgCl₂, 5% (v/v) Glycerol, 1 mM DTT, 1% (v/v) Nonidet P-40 (NP-40)

4 x Proteinladepuffer

500 mM Tris HCl (pH 6,8), 4% (w/v) Natriumdodecylsulfat (SDS), 30% (v/v) Glycerin, 40 mM Dithiothreitol (DTT), etwas Bromphenolblau zur Farbgebung

5.37 Luciferaseassay und β -Galactosidaseassay

Die Lysate der transfizierten HEK293T-Zellen wurden 48 Stunden nach Transfektion hergestellt (siehe Transfektion). Zuerst wurden die Zellen mit PBS gewaschen und anschließend mit 90 μ l Lyse-Puffer lysiert und für ca. 10 min auf Eis inkubiert.

Jeweils 5 μ l des Zelllysats wurden in eine 96-Well-Platte vorgelegt. Im Luminometer (MicroLumat LB96P, Berthold Technologies, Bad Wildbad) wurde das Licht, welches bei der durch die Luciferase katalysierte Oxidation des Luciferins freigesetzt wurde, gemessen. Zusätzlich wurde ein Basalwert für den Lyse-Puffer ermittelt.

Lyse-Puffer

50 mM Tris (pH 7,4), 1% (v/v) Triton X-100, 50 mM NaCl

Luciferase-Puffer

21,625 mM Glycylglycine (Gly Gly), 1 mM Adenosintriphosphat (ATP), 10 mM MgSO₄, 0,075 mM Luciferin

Phosphatgepufferte Kochsalzlösung (PBS)

137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 1,7 mM KH₂PO₄

Als Kontrolle der Transfektionseffizienz wurde der β -Galactosidase-Vektor cotransfiziert. Zur Messung der β -Galactosidaseaktivität wurden 5 μ l des Zelllysats in eine 96-Well-Platte vorgelegt und 100 μ l der β -Galactosidase-Lösung dazugegeben.

Die Gelbfärbung, welche aus der Hydrolyse des *o*-Nitrophenyl- β -D-galactopyranosid (ONPG) zu Galactose und *ortho*-Nitrophenol (gelb) resultierte und durch die β -Galactosidase katalysiert wird, wurde gemessen.

Die Messung wurde mit dem SPECTRAMax™ 340 (Molecular Devices, Sunnyvale) mit dem Programm *SPF SoftMaxPro* bei einer Wellenlänge von 420 nm durchgeführt.

 β -Galactosidase-Lösung

11,1 mM MgCl₂, 50 mM β -Mercaptoethanol, 3,25 mM ONPG, 74,4 mM Natrium-Phosphat (pH 7,5)

Natrium-Phosphat-Lösung (0,1 M)

82 mM Na₂HPO₄·2H₂O, 18 mM NaH₂PO₄·2H₂O

o-Nitrophenyl- β -D-galactopyranosid (ONPG)

13,28 mM in 0,1 M Natrium-Phosphat-Lösung

5.38 Proteinexpression

GST-Fusionsproteine von RUNX1-Konstrukten (pGEX4T1-Vektor) sowie die Volllänge-proteine RUNX1 und PRMT6 (pGEX4T1-Vektor) wurden in *Escherichia coli* BL21 (Invitrogen, Karlsruhe) vermehrt.

Dazu wurden die Plasmide in *E. coli* BL21 transformiert und auf LB-Platten mit Chloramphenicol (CAM) und Ampicillin (AMP) ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert. Ein Klon wurde von der LB-Platte entnommen und in 100 ml LB-Medium mit CAM und AMP über Nacht aerob bei 37°C kultiviert.

Am nächsten Tag wurde eine Hauptkultur von 500-1200 ml LB-Medium mit CAM, AMP und 0,8% (w/v) α -D-Glucose mit maximal 1% des Hauptkulturvolumens der Über-Nacht-Kultur beimpft. Die Kulturen wurden aerob bei 37°C bis zu einer OD₆₀₀ von 0,8 bis 1,0 angezogen. Dann wurde die Proteinexpression mit Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid (IPTG) mit einer Endkonzentration von 1 mM induziert und für weitere 1,5 Stunden bei 37°C schüttelnd inkubiert. Anschließend wurde die Bakteriensuspension bei 4.500 x g für 10 Minuten abzentrifugiert und das Bakterienpellet bei -20°C gelagert.

Zur Lyse der Bakterien wurde das Pellet in 10 ml PBS mit 1 mg/ml Lysozym aufgenommen und für ca. 1 Stunde auf Eis inkubiert. Anschließend wurde für 3 x 15 Sekunden mit einem Stabsonifizierer sonifiziert, die Zelltrümmer bei 40.000 x g und 4°C für 60 min abzentrifugiert und der Überstand abgenommen.

Anti-GST Agarose-Beads (Sigma Aldrich, München) wurden für die Aufreinigung der GST-Fusionsproteine verwendet. Vor Verwendung wurden die *Beads* dreimal mit PBS gewaschen. Hierfür wurden die *Beads* in PBS aufgenommen und für 10 Minuten auf einem Drehrad bei 4°C inkubiert und anschließend bei 1.000 x g für 5 Minuten abzentrifugiert. Nach dem letzten Waschschrift wurden die *Beads* 50/50 mit PBS gemischt.

Dem Zelllysat wurden 150 μ l gewaschene anti-GST Agarose-Beads hinzugefügt und für ca. 4 Stunden bei 4°C rotierend inkubiert. Die *Beads* wurden dreimal mit PBS gewaschen und danach 50/50 in PBS aufgenommen und bei 4°C gelagert.

Zur Überprüfung der Expression der GST-Fusionsproteine wurden 10 μ l der *Beads* in 4 x Proteinladepuffer aufgenommen und mittels SDS-Gelelektrophorese und Coomassie Brilliantblau-Färbung analysiert.

LB-Medium

1% (w/v) Trypton, 0,5% (w/v) Hefeextrakt, 1% (w/v) NaCl, 1,5% Agar, 100 μ g/ml Ampicillin (AMP), 30 μ g/ml Chloramphenicol (CAM)

Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid (IPTG)

1 M in H₂O

Phosphatgepufferte Kochsalzlösung (PBS)

137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 1,7 mM KH₂PO₄

Lysozym

100 mg/ml in PBS

4 x Proteinladepuffer

500 mM Tris HCl (pH 6,8), 4% (w/v) Natriumdodecylsulfat (SDS), 30% (v/v) Glycerin, 40 mM Dithiothreitol (DTT), etwas Bromphenolblau zur Farbgebung

Coomassie Brilliantblau-Lösung

0,16% (w/v) Brilliant-Blau R250, 20% (v/v) Isopropanol, 8% (v/v) Essigsäure

5.39 In-vitro Methyltransferasereaktion

Zur Vorbereitung der Methyltransferasereaktion wurden die Proteine als GST-Fusionsproteine in *E.coli* BL21 exprimiert, die Bakterien lysiert und die GST-Fusionsproteine mit Hilfe von anti-GST Agarose-*Beads* angereichert (siehe Proteinexpression).

Anschließend wurden die Fusionsproteine durch Zugabe des Kompetitors L-Glutathion mit einer Endkonzentration von 10 mM von den anti-GST Agarose-*Beads* eluiert und über Nacht in einem Dialyseschlauch E657.1 (Carl Roth, Karlsruhe) in 2 l PBS mit 1 mM Dithiothreitol (DTT) dialysiert. Gegebenenfalls wurden die Proteine dann mit Hilfe einer Säule aufkonzentriert (Roti®-Spin MINI, Carl Roth, Karlsruhe).

Für die Durchführung des Methyltransferasereaktion wurden 10 µg GST-PRMT6 mit 5 µg GST-RUNX1 und 4 µl Tritium markiertem S-(5'-Adenosyl)-L-methionin-(methyl-3H) (1-2 µCi ³H-SAM; 55-85 Ci/mMol) für 1,5 h bei 37°C inkubiert. Jede Probe wurde mit 4 x Proteinladepuffer versetzt und mittels einer 12%igen SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt.

Das Gel wurde zunächst für ca. 30 min in Fixierlösung und anschließend für 30 min in Enhancerlösung EN³HANCE (PerkinElmer, Boston) inkubiert. Darauf folgten drei 10-minütige Waschschrte mit Wasser und abschließend wurde das Gel unter Vakuum bei 65°C für ca. 2 Stunden getrocknet. Nach mehrwöchiger Exposition konnte das radioaktive Substrat mittels Autoradiographie detektiert werden. Zuletzt wurde das Gel rehydriert und die Proteine mit Coomassie-Brilliantblau-Lösung angefärbt.

L-Glutathion

100 mM in PBS

Phosphatgepufferte Kochsalzlösung (PBS)

137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 1,7 mM KH₂PO₄

4 x Proteinladepuffer

500 mM Tris HCl (pH 6,8), 4% (w/v) Natriumdodecylsulfat (SDS), 30% (v/v) Glycerin, 40 mM Dithiothreitol (DTT), etwas Bromphenolblau zur Farbgebung

Fixierlösung

10% (v/v) Essigsäure, 10% (v/v) Glycerin

Coomassie Brilliantblau-Lösung

0,16% (w/v) Brilliant-Blau R250, 20% (v/v) Isopropanol, 8% (v/v) Essigsäure

5.310 *In-vitro* Methyltransferasereaktion mit auf gespotteter Cellulosemembran gespotteten Peptiden

Die Reaktion der RUNX1-Peptide an eine Cellulosemembran wurde von Dr. Joachim Koch (Georg-Speyer-Haus, Frankfurt) unter Verwendung eines Peptid Spotters durchgeführt. 18mer Peptide des Aminosäurebereiches 300-451 von RUNX1 wurden auf eine Cellulosemembran gespottet. Dafür wurden die Peptide so ausgesucht, dass das jeweilige Arginin an Position 5 vorlag. Als zusätzliche Kontrollen dienten ein Peptid von RUNX1 ohne Arginine (GKSFTLTITVFTNPPQVA, Negativkontrolle) sowie die ersten 18 Aminosäuren des Histons 4 (SGRGKGGKGLGKGGAKRH, Positivkontrolle). Außerdem wurden als Kontrolle Arginin zu Alanin Mutationen der Peptide verwendet.

Die Membran wurde in einer Ethanolreihe mit absteigender Konzentration (100%/80%/60%/40%/20%/10%/5%) für jeweils 3 min inkubiert. Anschließend wurde die Membran zweimal in H₂O und PBS für je 5 min geschwenkt und für 45 min mit Roti®-Block blockiert. Dann wurden 10 µg GST-PRMT6, welches in *E.coli* BL21 exprimiert wurde (siehe Proteinexpression), mit 3 µl S-(5'-Adenosyl)-L-methionin-(methyl-3H) (1-2 µCi ³H-SAM; 55-85 Ci/mMol) auf die Membran gegeben. Zwischen Parafilm gelagert wurde die Membran über Nacht bei 30°C inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Membran dreimal für 5 min mit Waschpuffer I, H₂O und Waschpuffer II gewaschen und anschließend getrocknet. Nach mehrtägiger Exposition konnte das radioaktive Peptid mittels Autoradiographie detektiert werden.

Phosphatgepufferte Kochsalzlösung (PBS)

137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 1,7 mM KH₂PO₄

Waschpuffer I

8 M Urea, 1% (w/v) Natriumdodecylsulfat (SDS)

Waschpuffer II

1% (v/v) Essigsäure, 50% Ethanol

5.311 Immunopräzipitation

Für die Immunopräzipitation wurden Lysate der transfizierten HEK293T-Zellen 48 Stunden nach Transfektion hergestellt (siehe Transfektion).

Zuerst wurden die Zellen mit kalten PBS gewaschen, anschließend in 200 µl Lyse-Puffer aufgenommen und für ca. 30 min auf Eis inkubiert. Nach einer 30-minütigen Zentrifugation bei

13.226 x g und 4°C wurde der Überstand abgenommen. Zweimal 10 µl des Zelllysats wurde als *Input*-Kontrolle entnommen und mit 4 x Proteinladepuffer versetzt. Dem restlichen Zelllysats wurden anti-Flag Agarose-*Beads* (Sigma Aldrich, München) zugegeben und es folgte eine Inkubation für 4 Stunden bei 4°C unter ständiger Rotation. Anschließend wurden die *Beads* 4-5 Mal mit Lyse-Puffer gewaschen und in 4 x Proteinladepuffer aufgenommen. Die Coimmunopräzipitation wurde mittels SDS-Gelelektrophorese und anschließendem Western Blot analysiert. Teilweise wurde die Analyse mit dem Odyssey-System (LI-COR Biosciences®, Lincoln) mittels spezifischer Antikörper (siehe Antikörper) durchgeführt.

Phosphatgepufferte Kochsalzlösung (PBS)

137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 1,7 mM KH₂PO₄

Lyse-Puffer

50 mM Tris (pH 7,4), 100 mM NaCl, 0,1% Triton X-100, 1 mM Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA, pH 8,0), 10% (v/v) Glycerin, 1 mM Dithiothreitol (DTT)

4 x Proteinladepuffer

500 mM Tris HCl (pH 6,8), 4% (w/v) Natriumdodecylsulfat (SDS), 30% (v/v) Glycerin, 40 mM DTT, etwas Bromphenolblau zur Farbgebung

Für eine endogene Immunopräzipitation wurden Kernextrakten von 3×10^7 TF-1- bzw. K562-Zellen verwendet (siehe Herstellung von Kernextrakten). Von den 1,1 ml Kernextrakten wurden zweimal 50 µl als *Input*-Kontrolle abgenommen und mit 4 x Proteinladepuffer versetzt. Für die Immunopräzipitation wurden je 500 µl des Kernextrakts mit 2 µg spezifischem Antikörper bzw. IgG als Kontrolle und 5 µl magnetischen Protein G-*Beads* (Invitrogen, Karlsruhe) versetzt und für 4-6 Stunden bei 4°C unter ständiger Rotation inkubiert. Die *Beads* wurden anschließend 4-5 Mal mit Puffer C (mit 200 mM NaCl) gewaschen und in 4 x Proteinladepuffer aufgenommen. Die Immunopräzipitation wurde dann mittels SDS-Gelelektrophorese und Western Blot analysiert.

Puffer C (200 mM NaCl)

10 mM Tris (pH 7,5), 1 mM Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA, pH 8,0), 1 mM Ethylenglycoltetraessigsäure (EGTA, pH 8,0), 0,2 M NaCl, 20% (v/v) Glycerin, 1 mM Dithiothreitol (DTT), Protease-Inhibitor-Mix

4 x Proteinladepuffer

500 mM Tris-HCl (pH 6,8), 4% (w/v) Natriumdodecylsulfat (SDS), 30% (v/v) Glycerin, 40 mM Dithiothreitol (DTT), etwas Bromphenolblau zur Farbgebung

5.312 GST-pulldown

Für einen GST-*pulldown* wurden verschiedene GST-Fusionsproteine in *E.coli* BL21 exprimiert (siehe Proteinexpression). Dieser Versuch wurde von Olga Bölling (aus der Arbeitsgruppe von Dr. Jörn Lausen, Georg-Speyer-Haus, Frankfurt) durchgeführt und wird hier kurz beschrieben.

Der mögliche Interaktionspartner wurde mit Hilfe des *TNT Quick coupled transcription/translation system* (Promega, Madison) nach Angaben des Herstellers mit ^{35}S -Methionin radioaktiv markiert. Für die Durchführung des GST-*pull-downs* wurden gleiche Mengen des GST-Fusionsproteins, welches an anti-GST Agarose-*Beads* (Sigma Aldrich, München) gebunden vorlag, mit dem radioaktiv markierten Interaktionspartner gemischt und anschließend wurde mit Lyse-Puffer auf 300 μl Gesamtvolumen aufgefüllt. Der *in-vitro* Interaktionsassay wurde unter ständiger Rotation für 3 Stunden bei 4°C durchgeführt. Anschließend wurden die *Beads* 4-5 Mal mit Lyse-Puffer gewaschen und in 4 x Proteinladepuffer aufgenommen. Die Interaktion wurde mittels SDS-Gelelektrophorese und anschließender Autoradiographie analysiert. Dafür wurde das Gel vor der Exposition unter Vakuum bei 65°C für ca. 2 Stunden getrocknet.

Lyse-Puffer

50 mM Tris (pH 7,4), 100 mM NaCl, 0,1% Triton X-100, 1 mM Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA, pH 8,0), 10% (v/v) Glycerin, 1 mM Dithiothreitol (DTT)

4 x Proteinladepuffer

500 mM Tris HCl (pH 6,8), 4% (w/v) Natriumdodecylsulfat (SDS), 30% (v/v) Glycerin, 40 mM Dithiothreitol (DTT), etwas Bromphenolblau zur Farbgebung

5.313 Chromatin-Immunopräzipitation (ChIP)

Für eine Chromatin-Immunopräzipitation wurden 1×10^7 undifferenzierte oder differenzierte humane CD34-, K562- oder HEL-Zellen in 10 ml RPMI-Medium resuspendiert. Die DNA-Protein-Komplexe wurden dann mit 0,75% (v/v) Formaldehyd für 15 min bei RT verknüpft. Durch die Zugabe von 0,125 M Glycin mit anschließender Inkubation bei RT für 5 min wurde dieser Prozess gestoppt und die Zellen wurden zweimal mit PBS gewaschen. Das Zellpellet wurde in 1,2 ml ChIP-Lyse-Puffer resuspendiert und für 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde das Chromatin mit Hilfe des Bioruptors (Diagenode, Liège) sonifiziert, so dass DNA-Fragmente von 200-1.000 bp entstanden. Zelltrümmer wurden durch 10-minütige Zentrifugation bei 13.226 x g bei 4°C pelletiert, das Chromatin wurde aliquotiert und bei -80°C gelagert.

Für die Immunopräzipitation wurde 150 μl Chromatin mit 450 μl RIPA-Puffer, 5 μl magnetischen Protein G-*Beads* (New England Biolabs, Ipswich) und 2-10 μg Antikörper (siehe Antikörper) bzw. IgG versetzt und über Nacht bei 4°C unter ständiger Rotation inkubiert. Dabei wurden 150 μl Chromatin als Input-Kontrolle ausgespart. Vor der Verwendung wurden die Protein G-*Beads* mit 75 ng/ μl DNA aus Lachssperma für 30 min und mit Roti®-Block für 45 min blockiert und anschließend dreimal mit RIPA-Puffer gewaschen.

Am nächsten Tag wurden die *Beads* dreimal mit Waschpuffer I und einmal mit Waschpuffer II für je 10 min bei 4°C unter Rotation gewaschen. Dabei wurde ein magnetisches *Rack* verwendet. Die DNA wurde bei 30°C für 15 min mit Elutionspuffer von den *Beads* eluiert. Durch

eine 10-minütige Inkubation bei RT des Eluats mit 1 µl/ml RNase A (20 mg/ml) wurde die vorhandene RNA abgebaut. Anschließend erfolgte eine Phenol-Chloroform-Fällung. Die Verknüpfung der DNA/Protein-Komplexe wurde bei 65°C für 5-6 Stunden durch Zugabe von 5 µl Proteinase K (20 mg/ml) gelöst. Mittels Phenol-Chloroform-Fällung wurde die DNA isoliert. Durch Zugabe von 2 Volumen 100%igem Ethanol und 10 µl Glycogen (5 mg/ml) über Nacht bei -20°C und am darauf folgenden Tag durch Zentrifugation für 1 Stunde bei 13.226 x g und 4°C erfolgte die Präzipitation. Dann wurde die DNA mit 70%igem Ethanol gewaschen, getrocknet, in 20 µl H₂O gelöst und für (quantitative) PCR verwendet.

Phosphatgepufferte Kochsalzlösung (PBS)

137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 1,7 mM KH₂PO₄

ChIP-Lyse-Puffer

50 mM HEPES-KOH (pH 7,5), 140 mM NaCl, 1 mM Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA, pH 8,0), 1% (v/v) Triton X-100, 0.1% (w/v) Natriumdeoxycholat, 1% (w/v) Natriumdodecylsulfat (SDS), Protease-Inhibitor-Mix

RIPA-Puffer

50 mM Tris (pH 8,0), 150 mM NaCl, 2 mM Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA, pH 8,0), 1% (v/v) NP-40, 0.5% (w/v) Natriumdeoxycholat, Protease-Inhibitor-Mix

Waschpuffer I

20 mM Tris (pH 8,0), 150 mM NaCl, 0.1% (w/v) Natriumdodecylsulfat (SDS), 1% (v/v) Triton X-100, 2 mM Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA, pH 8,0)

Waschpuffer II

20 mM Tris (pH 8,0), 500 mM NaCl, 0.1% (w/v) Natriumdodecylsulfat (SDS), 1% (v/v) Triton X-100, 2 mM Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA, pH 8,0)

Elutionspuffer

1% (w/v) Natriumdodecylsulfat (SDS), 100 mM NaHCO₃

5.314 Sequentieller ChIP (ChIP-ReChIP)

Für ChIP-ReChIP wurde das Protokoll für eine Chromatin-Immunopräzipitation (siehe 5.313) mit einigen Änderungen verwendet: Nachdem die Chromatinkomplexe mit dem ersten Antikörper präzipitiert wurden, erfolgte die Elution mit 10 mM DTT für 30 Minuten bei 30°C. Danach wurden die Eluate zehnfach mit Lyse-Puffer verdünnt für die zweite Immunopräzipitation verwendet. Anschließend wurde nach dem oben angegebenen Protokoll weiter verfahren.

5.315 qRT-PCR

Zur Vorbereitung der quantitativen RT-PCR wurde RNA aus 1x10⁶ Zellen mit Hilfe des *RNeasy Mini Kits* von Qiagen (Hilden) isoliert und dann je 1 µg RNA durch die Omniscript Reverse Transkriptase von Qiagen (Hilden) in cDNA umgeschrieben.

Die RT-PCR wurde nach Angaben des Herstellers mit dem LightCycler480 von Roche (Mannheim) durchgeführt. Dafür wurden 23 μl Wasser mit je 1 μl *forward*- und 1 μl *reverse*-Oligonukleotid und 25 μl SYBR Green-Mix (Eurogentec, Köln) versetzt. 48 μl dieses Ansatzes wurden mit 2 μl cDNA gemischt und für eine Doppelbestimmung wurden je 24 μl in ein *Well* einer 96-*Well*-PCR-Platte (GK480K-BC, Kisker Gbr, Steinfurt) pipettiert. Die PCR-Platte wurde kurz abzentrifugiert.

Alle qRT-PCRs wurden zweifach und mit zwei Parallelansätzen durchgeführt.

Die Berechnung der Mittelwerte erfolgte nach der $\Delta\Delta\text{Ct}$ Quantifizierungs-Methode (Pfaffl 2001). Die Transkription des Genes der Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) wurde als Referenz zur Normalisierung verwendet. Relative mRNA-Expression in Kontroll-Zellen wurden als 1 gesetzt und Werte der Bezugsgene wurden relativ dazu berechnet.

Tab. 5. 12: Programm der Real-Time-PCR

* Quantifizierung

Programmschritt	Dauer	Temperatur [°C]	
1. Denaturierung	15 min	95	
2. Denaturierung	60 sec	95	} 50 Zyklen
3. <i>Annealing</i>	30 sec*	58	
4. <i>Elongation</i>	20 sec	72	
5. Schmelzkurve	Messung alle 5°C	57°C-95°C	

Für die Quantifizierung von ChIP-DNA wurden 2 μl der DNA pro Doppelbestimmung verwendet. Prozent *Input*- Werte wurden mit folgender Formel berechnet (Nagaki *et al.*, 2003): $100 \times 2^{(\text{Ct}_{100\% \text{ Input}} - \text{Ct}_{\text{ChIP-IP}})}$.

Tab. 5. 13: Übersicht aller verwendeter Oligonukleotide für die Real-Time-PCR von cDNA und ChIP-DNA

(h = *human*; frw = *forward*; rev = *reverse*; enh. = *Enhancer*; prom. = *Promotor*; upstr. = *upstream*; downstr. = *downstream*; Tm = *Schmelztemperatur*)

NAME	NUKLEOTIDSEQUENZ (5'→3')	GC-GEHALT [%]	Tm [°C]
cDNA			
(h)GAPDH frw	GAGTCAACGGATTTGGTCGTATT	43,0	66,0
(h)GAPDH rev	GAATTTGCCATGGGTGGAAT	45,0	58,0
(h)PRMT6 frw	TCTGGTTCCAGGTGACCTTC	55,0	59,4
(h)PRMT6 rev	AGGTAGAGGAGCGCCTGTTT	55,0	59,4
(h)RUNX1 frw	TCGACTCTCAACGGCACCCGA	61,9	63,7
(h)RUNX1 rev	TGACCGGCGTCGGGGAGTAG	70,0	65,5
(h)GATA1 frw	CAGTCTTTCAGGTGTACCCA	50,0	60,0
(h)GATA1 rev	GCCGCTCTGTCTTCAAAGTC	55,0	62,0
(h)FOG1 frw	CACAGGAAGGATGACGCACT	55,0	62,0
(h)FOG1 rev	GACGTCTTTGTTGATCACTG	45,0	58,0
(h)miR27a frw	CTGAGGAGCAGGGCTTAGCTGC	63,6	65,8
(h)miR27a rev	CTGGGGGGCGGAAGCTTAGCC	70,0	65,5
(h)CD41 frw	AATGGCCCCTGCTGTCTGTGC	65,0	63,5
(h)CD41 rev	TGCACGGCCAGCTCTGTCTTC	65,0	63,5
(h)TSP-1 frw	CTCCGTGCTACCCACTCACT	50,0	57,3
(h)TSP-1 rev	ATGACGGTGACCAGAGTGC	61,1	58,2
(h)CD42b frw	CCACCAAAGCTCCGTGGGGT	60,0	63,5
(h)CD42b rev	AGAAGCCCAGGGGGAGGAGG	60,0	65,5
(h)CD34 frw	TGACCTGAAAAAGCTGGGGATCCT	50,0	62,7
(h)CD34 rev	CCAGCCTTTCTCCTGTGGGGC	66,7	65,7
ChIP-DNA			
GAPDH frw	CTACTAGCGGTTTTACGGGCG	57,1	61,8
GAPDH rev	TCGAACAGGAGGAGCAGAGAG	57,1	61,8
CD41 prom. frw	TCAGCCATGAGCATCCACCCTCT	56,5	64,2
CD41 prom. rev	TGCTGAGCAACGGGCAGAGCAAA	56,5	64,2
CD41 upstr. frw	GACCAAGGTCCATTACCCACCCTGT	56,0	66,3
CD41 upstr. rev	AGCGGAAGAGGAGGAGTGCCA	61,9	63,7
CD41 downstr. frw	GTCCACTGCAAGCCCTCTGGC	66,7	65,7
CD41 downstr. rev	ACGGCTCACCTCCCATGGCT	65,0	63,5
miR27a enh. frw	TCAAACAGGCCCTGCCGAGGA	61,9	63,7
miR27a enh. rev	GACTGGCATGGGGTCACTGCC	68,2	67,7
miR27a prom. frw	ATCCGCCCTGGTGGGTGTGG	70,0	65,5
miR27a prom. rev	CCAGGCAGGCGGGTGAGGAA	70,0	65,5
miR27a downstr. frw	GCCTTGGGCCTCCAGACCGT	70,0	65,5
miR27a downstr. rev	GTGGGGCGGGTGTCACTGCT	70,0	65,5
CD42b prom. frw	CCCCTTCCTTGCCACTGGCTTA	59,1	64,0
CD42b prom. rev	ACTCCCATCTCCCACCCTTGCC	63,6	65,8
TSP-1 prom. frw	AAGCAGCTGTCTCCCCGGG	70,0	65,5
TSP-1 prom. rev	GGGCCACAGAGACGCCTCT	70,0	65,5

6. Literaturverzeichnis

Adolfsson J, Borge OJ, Bryder D, Theilgaard-Monch K, Astrand-Grundstrom I, Sitnicka E, Sasaki Y, Jacobsen SE (2001) Upregulation of Flt3 expression within the bone marrow Lin(-) Sca1(+)c-kit(+) stem cell compartment is accompanied by loss of self-renewal capacity. *Immunity* **15**: 659-669

Aikawa Y, Nguyen LA, Isono K, Takakura N, Tagata Y, Schmitz ML, Koseki H, Kitabayashi I (2006) Roles of HIPK1 and HIPK2 in AML1- and p300-dependent transcription, hematopoiesis and blood vessel formation. *EMBO J* **25**: 3955-3965

Akashi K, Traver D, Miyamoto T, Weissman IL (2000) A clonogenic common myeloid progenitor that gives rise to all myeloid lineages. *Nature* **404**: 193-197

Aletta JM, Cimato TR, Ettinger MJ (1998) Protein methylation: a signal event in post-translational modification. *Trends Biochem Sci* **23**: 89-91

Allfrey VG, Faulkner R, Mirsky AE (1964) Acetylation and Methylation of Histones and Their Possible Role in the Regulation of Rna Synthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **51**: 786-794

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

Angiolillo DJ, Ueno M, Goto S (2010) Basic principles of platelet biology and clinical implications. *Circ J* **74**: 597-607

Arents G, Moudrianakis EN (1995) The histone fold: a ubiquitous architectural motif utilized in DNA compaction and protein dimerization. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**: 11170-11174

Aronson BD, Fisher AL, Blechman K, Caudy M, Gergen JP (1997) Groucho-dependent and -independent repression activities of Runt domain proteins. *Mol Cell Biol* **17**: 5581-5587

Azuara V, Perry P, Sauer S, Spivakov M, Jorgensen HF, John RM, Gouti M, Casanova M, Warnes G, Merkenschlager M, Fisher AG (2006) Chromatin signatures of pluripotent cell lines. *Nat Cell Biol* **8**: 532-538

Bachand F, Silver PA (2004) PRMT3 is a ribosomal protein methyltransferase that affects the cellular levels of ribosomal subunits. *EMBO J* **23**: 2641-2650

Bae S-C, Lee YH (2006) Phosphorylation, acetylation and ubiquitination: The molecular basis of RUNX regulation. *Gene* **366**:58-66

Balint BL, Szanto A, Madi A, Bauer UM, Gabor P, Benko S, Puskas LG, Davies PJ, Nagy L (2005) Arginine methylation provides epigenetic transcription memory for retinoid-induced differentiation in myeloid cells. *Mol Cell Biol* **25**: 5648-5663

Barreda DR, Belosevic M (2001) Transcriptional regulation of hemopoiesis. *Dev Comp Immunol* **25**: 763-789

Barrero MJ, Malik S (2006) Two functional modes of a nuclear receptor-recruited arginine methyltransferase in transcriptional activation. *Mol Cell* **24**: 233-243

Bartley TD, Bogenberger J, Hunt P, Li YS, Lu HS, Martin F, Chang MS, Samal B, Nichol JL, Swift S, et al. (1994) Identification and cloning of a megakaryocyte growth and development factor that is a ligand for the cytokine receptor Mpl. *Cell* **77**: 1117-1124

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

Bedford MT (2007) Arginine methylation at a glance. *J Cell Sci* **120**: 4243-4246

Bedford MT, Clarke SG (2009) Protein arginine methylation in mammals: who, what, and why. *Mol Cell* **33**: 1-13

Bedford MT, Richard S (2005) Arginine methylation an emerging regulator of protein function. *Mol Cell* **18**: 263-272

Ben-Ami O, Pencovich N, Lotem J, Levanon D, Groner Y (2008) A regulatory interplay between miR-27a and RUNX1 during megakaryopoiesis. *PNAS* **106**(1): 238-243

Berger SL (2007) The complex language of chromatin regulation during transcription. *Nature* **447**: 407-412

Bernstein BE, Kamal M, Lindblad-Toh K, Bekiranov S, Bailey DK, Huebert DJ, McMahon S, Karlsson EK, Kulbokas EJ, 3rd, Gingeras TR, Schreiber SL, Lander ES (2005) Genomic maps and comparative analysis of histone modifications in human and mouse. *Cell* **120**: 169-181

Bernstein BE, Mikkelsen TS, Xie X, Kamal M, Huebert DJ, Cuff J, Fry B, Meissner A, Wernig M, Plath K, Jaenisch R, Wagschal A, Feil R, Schreiber SL, Lander ES (2006) A bivalent chromatin structure marks key developmental genes in embryonic stem cells. *Cell* **125**: 315-326

Blom B, Spits H (2006) Development of Human Lymphoid Cells. *Annu Rev Immunol* **24**: 287-320

Blyth K, Cameron ER, Neil JC (2005) The Runx Genes: Gain or Loss of Function in Cancer. *Nature Reviews* **5**: 376-387

Bonifer C, Hoogenkamp M, Krysinska H, Tagoh H (2008) How transcription factors program chromatin--lessons from studies of the regulation of myeloid-specific genes. *Semin Immunol* **20**: 257-263

Boulanger MC, Liang C, Russell RS, Lin R, Bedford MT, Wainberg MA, Richard S (2005) Methylation of Tat by PRMT6 regulates human immunodeficiency virus type 1 gene expression. *J Virol* **79**: 124-131

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

Bristow CA, Shore P (2003) Transcriptional regulation of the human MIP-1alpha Promotor by RUNX1 and MOZ. *Nucleic Acids Res.* **31**(11): 2735-2744

Bütler TM, Ziemiecki A, Friis RR (1990) Megakaryocytic differentiation of K562 cells is associated with changes in the cytoskeletal organization and the pattern of chromatographically distinct forms of phosphotyrosyl-specific protein phosphatases. *Cancer Res* **50**: 6323-6329

Campos EI, Reinberg D (2009) Histones: Annotating Chromatin. *Annual Rev* **43**: 559-599

- Cantor AB, Katz SG, Orkin SH (2002) Distinct domains of the GATA1 cofactor FOG-1 differentially influence erythroid versus megakaryocytic maturation. *Mol Cell Biol* **22**: 4268-4279
- Cao R and Zhang Y (2004) The functions of E(Z)/EZH2-mediated methylation of lysine 27 in histone H3. *Curr opin Genet Dev* **14(2)**: 155-164
- Cardozo T, Pagano M (2004) The SCF ubiquitin ligase: insights into a molecular machine. *Nat Rev Mol Cell Biol* **5**: 739-751
- Chakraborty S, Sinha KK, Senyuk V, Nucifora G (2003) SUV39H1 interacts with AML1 and abrogates AML1 transactivity. AML1 is methylated in vivo. *Oncogene* **22**: 5229-5237
- Chang B, Chen Y, Zhao Y, Bruick RK (2007) JMJD6 is a histone arginine demethylase. *Science* **318**: 444-447
- Chang YI, Hua WK, Yao CL, Hwang SM, Hung YC, Kuan CJ, Leou JS, Lin WJ (2010) Protein-arginine methyltransferase 1 suppresses megakaryocytic differentiation via modulation of the p38 MAPK pathway in K562 cells. *J Biol Chem* **285(27)**: 20595-606
- Chen D, Ma H, Hong H, Koh SS, Huang SM, Schurter BT, Aswad DW, Stallcup MR (1999) Regulation of transcription by a protein methyltransferase. *Science* **284**: 2174-2177
- Cheng D, Cote J, Shaaban S, Bedford MT (2007) The arginine methyltransferase CARM1 regulates the coupling of transcription and mRNA processing. *Mol Cell* **25**: 71-83
- Cheng EC, Luo Q, Bruscia EM, Renda MJ, Troy JA, Massaro SA, Tuck D, Schulz V, Mane SM, Berliner N, Sun Y, Morris SW, Qiu C, Krause DS (2009) Role for MKL1 in megakaryocytic maturation. *Blood* **113**: 2826-2834
- Cheng TS, Chang LK, Howng SL, Lu PJ, Lee CI, Hong YR (2006) SUMO-1 modification of centrosomal protein hNinein promotes hNinein nuclear localization. *Life Sci* **78**: 1114-1120
- Civin CI, Strauss LC, Brovall C, Fackler MJ, Schwartz JF, Shaper JH (1984) Antigenic analysis of hematopoiesis. III. A hematopoietic progenitor cell surface antigen defined by a monoclonal antibody raised against KG-1a cells. *J Immunol* **133**: 157-165
- Cook JR, Lee JH, Yang ZH, Krause CD, Herth N, Hoffmann R, Pestka S (2006) FBXO11/PRMT9, a new protein arginine methyltransferase, symmetrically dimethylates arginine residues. *Biochem Biophys Res Commun* **342**: 472-481
- Cramer P, Bushnell DA, Fu J, Gnatt AL, Maier-Davis B, Thompson NE, Burgess RR, Edwards AM, David PR and Kornberg RD (2000) Architecture of RNA polymerase II and implications for the transcription mechanism. *Science* **288**: 640-649
- De Sauvage FJ, Hass PE, Spencer SD, Malloy BE, Gurney AL, Spencer SA, Darbonne WC, Henzel WJ, Wong SC, Kuang WJ, et al. (1994) Stimulation of megakaryocytopoiesis and thrombopoiesis by the c-Mpl ligand. *Nature* **369**: 533-538
- Debili N, Coulombel L, Croisille L, Katz A, Guichard J, Breton-Gorius J, Vainchenker W (1996) Characterization of a bipotent erythro-megakaryocytic progenitor in human bone marrow. *Blood* **88**: 1284-1296

- Debili N, Issaad C, Masse JM, Guichard J, Katz A, Breton-Gorius J, Vainchenker W (1992) Expression of CD34 and platelet glycoproteins during human megakaryocytic differentiation. *Blood* **80**: 3022-3035
- Dhalluin C, Carlson JE, Zeng L, He C, Aggarwal AK, Zhou MM (1999) Structure and ligand of a histone acetyltransferase bromodomain. *Nature* **399**: 491-496
- Dore LC, Amigo JD, Dos Santos CO, Zhang Z, Gai X, Tobias JW, Yu D, Klein AM, Dorman C, Wu W, Hardison RC, Paw BH, Weiss MJ (2008) A GATA1-regulated microRNA locus essential for erythropoiesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**: 3333-3338
- Drenou B (1996) Flow cytometry for CD34 determination in hematopoietic grafts. *Hematol Cell Ther* **38**: 505-512
- Efroni S, Duttagupta R, Cheng J, Dehghani H, Hoepfner DJ, Dash C, Bazett-Jones DP, Le Grice S, McKay RD, Buetow KH, Gingeras TR, Misteli T, Meshorer E (2008) Global transcription in pluripotent embryonic stem cells. *Cell Stem Cell*. **2(5)**: 437-447.
- El-Andaloussi N, Valovka T, Toueille M, Steinacher R, Focke F, Gehrig P, Covic M, Hassa PO, Schar P, Hubscher U, Hottiger MO (2006) Arginine methylation regulates DNA polymerase beta. *Mol Cell* **22**: 51-62
- Elagib KE, Goldfarb AN (2007) Regulation of RUNX1 transcriptional function by GATA1. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr* **17**: 271-280
- Elagib KE, Racke FK, Mogass M, Khetawat R, Delehanty LL, Goldfarb AN (2003) RUNX1 and GATA1 coexpression and cooperation in megakaryocytic differentiation. *Blood* **101**: 4333-4341
- Ellis MH, Avraham H, Groopman JE (1995) The regulation of megakaryocytopoiesis. *Blood Rev* **9**: 1-6
- Felsenfeld G, Groudine M (2003) Controlling the double helix. *Nature* **421**: 448-453
- Ferreira R, Ohneda K, Yamamoto M, Philipsen S (2005) GATA1 function, a paradigm for transcription factors in hematopoiesis. *Mol Cell Biol* **25**: 1215-1227
- Fischle W, Wang Y, Jacobs SA, Kim Y, Allis CD, Khorasanizadeh S (2003) Molecular basis for the discrimination of repressive methyl-lysine marks in histone H3 by Polycomb and HP1 chromodomains. *Genes Dev* **17**: 1870-1881
- Flanagan JF, Mi LZ, Chruszcz M, Cymborowski M, Clines KL, Kim Y, Minor W, Rastinejad F, Khorasanizadeh S (2005) Double chromodomains cooperate to recognize the methylated histone H3 tail. *Nature* **438**: 1181-1185
- Fonatsch C, Schwarzingler I, Mitterbauer G, Jäger U, Wiesner R, Mannhalter C, Lechner K. (2003) Akute myeloische Leukämien. In: Ganten D, Ruckpaul K. Molekulargenetische Grundlagen von hämatopoetischen Neoplasien. Erste Auflage. Heidelberg, Berlin: Springer Verlag.
- Frankel A, Clarke S (2000) PRMT3 is a distinct member of the protein arginine N-methyltransferase family. Conferral of substrate specificity by a zinc-finger domain. *J Biol Chem* **275**: 32974-32982

- Frankel A, Yadav N, Lee J, Branscombe TL, Clarke S, Bedford MT (2002) The novel human protein arginine N-methyltransferase PRMT6 is a nuclear enzyme displaying unique substrate specificity. *J Biol Chem* **277**: 3537-3543
- Fujiwara Y, Browne CP, Cunniff K, Goff SC, Orkin SH (1996) Arrested development of embryonic red cell precursors in mouse embryos lacking transcription factor GATA1. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**: 12355-12358
- Gary JD, Clarke S (1998) RNA and protein interactions modulated by protein arginine methylation. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* **61**: 65-131
- Gensch N, Borchardt T, Schneider A, Riethmacher D and Braun T (2008) Different autonomous myogenic cell populations revealed by ablation of Myf5 expressing cells during mouse embryogenesis. *Dev* **135**: 1597-1604
- Gerrard JM, Israels ED, Bishop AJ, Schroeder ML, Beattie LL, McNicol A, Israels SJ, Walz D, Greenberg AH, Ray M, et al. (1991) Inherited platelet-storage pool deficiency associated with a high incidence of acute myeloid leukaemia. *Br J Haematol* **79**: 246-255
- Goldfarb AN (2007) Transcriptional control of megakaryocyte development. *Oncogene* **26**: 6795-6802
- Goldfarb AN (2009) Megakaryocytic programming by a transcriptional regulatory loop: A circle connecting RUNX1, GATA1, and P-TEFb. *J Cell Biochem* **107**: 377-382
- Golub TR, Barker GF, Bohlander SK, Hiebert SW, Ward DC, Bray-Ward P, Morgan E, Raimondi SC, Rowley JD, Gilliland DG (1995) Fusion of the TEL gene on 12p13 to the AML1 gene on 21q22 in acute lymphoblastic leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**: 4917-4921
- Greenberger JS (2000) Expression of hematopoietic growth factor receptors on early hematopoietic precursors: detection and regulation. *Curr Opin Hematol* **7**: 161-167
- Gross H, Barth S, Palermo RD, Mamiani A, Hennard C, Zimmer-Strobl U, West MJ, Kremmer E, Grasser FA (2010) Asymmetric Arginine dimethylation of Epstein-Barr virus nuclear antigen 2 promotes DNA targeting. *Virology* **397**: 299-310
- Growney JD, Shigematsu H, Li Z, Lee BH, Adelsperger J, Rowan R, Curley DP, Kutok JL, Akashi K, Williams IR, Speck NA, Gilliland DG (2005) Loss of Runx1 perturbs adult hematopoiesis and is associated with a myeloproliferative phenotype. *Blood* **106**: 494-504
- Gu W, Roeder RG (1997) Activation of p53 sequence-specific DNA binding by acetylation of the p53 C-terminal domain. *Cell* **90**: 595-606
- Guccione E, Bassi C, Casadio F, Martinato F, Cesaroni M, Schuchlantz H, Luscher B, Amati B (2007) Methylation of histone H3R2 by PRMT6 and H3K4 by an MLL complex are mutually exclusive. *Nature* **449**: 933-937
- Guenther MG, Levine SS, Boyer LA, Jaenisch R, Young RA (2007) A chromatin landmark and transcription initiation at most Promoters in human cells. *Cell* **130**: 77-88
- Guo H, Friedman AD (2008) Phosphorylation of Runx1 by cyclin-dependent kinases regulates its interaction with HDAC1 and HDAC3. *Blood* **112**: 495a
- Guo F (2011) Phosphorylation of Runx1 by cyclin-dependent kinases regulates its interaction with HDAC1 and HDAC3. *BJ Biol Chem* **286**: 208-215

- Haas RJ, Hoelzer D, Kurrle E, Landenberger B, Winkler U (1976) Experimental analysis of developing haematopoiesis in fetal bone marrow. *Pediatr Res* **10**:164-168.
- Harada Y, Harada H (2009) Molecular pathways mediating MDS/AML with focus on AML1/RUNX1 point mutations. *J Cell Physiol* **220**: 16-20
- Hassa PO, Covic M, Bedford MT, Hottiger MO (2008) Protein arginine methyltransferase 1 coactivates NF-kappaB-dependent gene expression synergistically with CARM1 and PARP1. *J Mol Biol* **377**: 668-678
- Herrmann F, Bossert M, Schwander A, Akgun E, Fackelmayer FO (2004) Arginine methylation of scaffold attachment factor A by heterogeneous nuclear ribonucleoprotein particle-associated PRMT1. *J Biol Chem* **279**: 48774-48779
- Herrmann F, Lee J, Bedford MT, Fackelmayer FO (2005) Dynamics of human protein arginine methyltransferase 1 (PRMT1) in vivo. *J Biol Chem* **280**: 38005-38010
- Hershko A, Ciechanover A (1992) The ubiquitin system for protein degradation. *Annu Rev Biochem* **61**: 761-807
- Hoffman R (1989) Regulation of megakaryocytopoiesis. *Blood* **74**: 1196-1212
- Hong W, Nakazawa M, Chen YY, Kori R, Vakoc CR, Rakowski C, Blobel GA (2005) FOG-1 recruits the NuRD repressor complex to mediate transcriptional repression by GATA1. *EMBO J* **24**: 2367-2378
- Hoogenkamp M, Lichtinger M, Krysinska H, Lancrin C, Clarke D, Williamson A, Mazzarella L, Ingram R, Jorgensen H, Fisher A, Tenen DG, Kouskoff V, Lacaud G, Bonifer C (2009) Early chromatin unfolding by RUNX1: a molecular explanation for differential requirements during specification versus maintenance of the hematopoietic gene expression program. *Blood* **114**: 299-309
- Huang G, Shigesada K, Ito K, Wee HJ, Yokomizo T, Ito Y (2001) Dimerization with PEBP2beta protects RUNX1/AML1 from ubiquitin-proteasome-mediated degradation. *EMBO J* **20**: 723-733
- Hughes RM, Waters ML (2006) Arginine methylation in a beta-hairpin peptide: implications for Arg-pi interactions, DeltaCp(o), and the cold denatured state. *J Am Chem Soc* **128**: 12735-12742
- Hyllus D, Stein C, Schnabel K, Schiltz E, Imhof A, Dou Y, Hsieh J, Bauer UM (2007) PRMT6-mediated methylation of R2 in histone H3 antagonizes H3 K4 trimethylation. *Genes Dev* **21**: 3369-3380
- Iberg AN, Espejo A, Cheng D, Kim D, Michaud-Levesque J, Richard S, Bedford MT (2008) Arginine methylation of the histone H3 tail impedes effector binding. *J Biol Chem* **283**: 3006-3010
- Ichikawa M, Asai T, Saito T, Seo S, Yamazaki I, Yamagata T, Mitani K, Chiba S, Ogawa S, Kurokawa M, Hirai H (2004) AML-1 is required for megakaryocytic maturation and lymphocytic differentiation, but not for maintenance of hematopoietic stem cells in adult hematopoiesis. *Nat Med* **10**: 299-304
- Imai KM, Yamaguchi Y, Izutsu K, Nitta E, Mitani K, Satake M, Noda T, Ito Y, Hirai H (2004) The corepressor mSin3A regulates phosphorylation-induced activation, intranuclear location, and stability of AML1. *Mol Cell Biol* **24**: 1033-1043

- Italiano JE Jr., Shivdasani RA (2003) Megakaryocytes and beyond: the birth of platelets. *J Thromb Haemost* **1**: 1174-1182
- Ito Y (1999) Molecular basis of tissue-specific gene expression mediated by the runt domain transcription factor PEBP2/CBF. *Genes Cells* **4**: 685-696
- Jackson CW (1990) Megakaryocyte endomitosis: a review. *Int J Cell Cloning* **8**: 224-226
- Jacobs SA, Khorasanizadeh S (2002) Structure of HP1 chromodomain bound to a lysine 9-methylated histone H3 tail. *Science* **295**: 2080-2083
- Jacobson RH, Ladurner AG, King DS, Tjian R (2000) Structure and function of a human TAFII250 double bromodomain module. *Science* **288**: 1422-1425
- Javed A, Guo B, Hiebert S, Choi JY, Green J, Zhao SC, Osborne MA, Stifani S, Stein JL, Lian JB, van Wijnen AJ, Stein GS (2000) Groucho/TLE/R-esp proteins associate with the nuclear matrix and repress RUNX (CBF(alpha)/AML/PEBP2(alpha)) dependent activation of tissue-specific gene transcription. *J Cell Sci* **113** (12): 2221-2231
- Jenuwein T, Allis CD (2001) Translating the histone code. *Science* **293**: 1074-1080
- Jiang H, Zhang F, Kurosu T, Peterlin BM (2005) Runx1 binds positive transcription elongation factor b and represses transcriptional elongation by RNA polymerase II: possible mechanism of CD4 silencing. *Mol Cell Biol* **25**: 10675-10683
- Jiang T, Zhou X, Taghizadeh K, Dong M, Dedon PC (2007) N-formylation of lysine in histone proteins as a secondary modification arising from oxidative DNA damage. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**: 60-65
- Johnson BA, Najbauer J, Aswad DW (1993) Accumulation of substrates for protein L-isoaspartyl methyltransferase in adenosine dialdehyde-treated PC12 cells. *J Biol Chem* **268**: 6174-6181
- Kagoshima H, Shigesada K, Satake M, Ito Y, Miyoshi H, Ohki M, Pepling M, Gergen P (1993) The Runt domain identifies a new family of heteromeric transcriptional regulators. *Trends Genet* **9**: 338-341
- Kanno T, Kanno Y, Chen LF, Ogawa E, Kim WY, Ito Y (1998) Intrinsic transcriptional activation-inhibition domains of the polyomavirus enhancer binding protein 2/core binding factor alpha subunit revealed in the presence of the beta subunit. *Mol Cell Biol* **18**: 2444-2454
- Katz JE, Dlakic M, Clarke S (2003) Automated identification of putative methyltransferases from genomic open reading frames. *Mol Cell Proteomics* **2**: 525-540
- Kaushansky K (1995) Thrombopoietin: the primary regulator of platelet production. *Blood* **86**: 419-431
- Kaushansky K (2005) Thrombopoietin and the hematopoietic stem cell. *Ann N Y Acad Sci* **1044**: 139-141
- Kaushansky K, Lok S, Holly RD, Broudy VC, Lin N, Bailey MC, Forstrom JW, Buddle MM, Oort PJ, Hagen FS, et al. (1994) Promotion of megakaryocyte progenitor expansion and differentiation by the c-Mpl ligand thrombopoietin. *Nature* **369**: 568-571

- Kim J, Lee J, Yadav N, Wu Q, Carter C, Richard S, Richie E, Bedford MT (2004) Loss of CARM1 results in hypomethylation of thymocyte cyclic AMP-regulated phosphoprotein and deregulated early T cell development. *J Biol Chem* **279**: 25339-25344
- Kim S, Merrill BM, Rajpurohit R, Kumar A, Stone KL, Papov VV, Schneiders JM, Szer W, Wilson SH, Paik WK, Williams KR (1997) Identification of N(G)-methylarginine residues in human heterogeneous RNP protein A1: Phe/Gly-Gly-Gly-Arg-Gly-Gly-Gly/Phe is a preferred recognition motif. *Biochemistry* **36**: 5185-5192
- Kim SC, Sprung R, Chen Y, Xu Y, Ball H, Pei J, Cheng T, Kho Y, Xiao H, Xiao L, Grishin NV, White M, Yang XJ, Zhao Y (2006) Substrate and functional diversity of lysine acetylation revealed by a proteomics survey. *Mol Cell* **23**: 607-618
- Kirito K, Kaushansky K (2006) Transcriptional regulation of megakaryopoiesis: thrombopoietin signaling and nuclear factors. *Curr Opin Hematol* **13**: 151-156
- Kitabayashi I, Aikawa Y, Nguyen LA, Yokoyama A, Ohki M (2001) Activation of AML1-mediated transcription by MOZ and inhibition by the MOZ-CBP fusion protein. *EMBO J* **20**: 7184-7196
- Kitabayashi I, Yokoyama A, Shimizu K, Ohki M (1998) Interaction and functional cooperation of the leukemia-associated factors AML1 and p300 in myeloid cell differentiation. *EMBO J* **17**: 2994-3004
- Kizer KO, Phatnani HP, Shibata Y, Hall H, Greenleaf AL, Strahl BD (2005) A novel domain in Set2 mediates RNA polymerase II interaction and couples histone H3 K36 methylation with transcript elongation. *Mol Cell Biol* **25**: 3305-3316
- Kleinschmidt MA, Streubel G, Samans B, Krause M, Bauer UM (2008) The protein arginine methyltransferases CARM1 and PRMT1 cooperate in gene regulation. *Nucleic Acids Res* **36**: 3202-3213
- Klimchenko O, Mori M, Distefano A, Langlois T, Larbret F, Lecluse Y, Feraud O, Vainchenker W, Norol F, Debili N (2009) A common bipotent progenitor generates the erythroid and megakaryocyte lineages in embryonic stem cell-derived primitive hematopoiesis. *Blood* **114**(8): 1506-1517
- Knapp SH, Scheinecker C, Bello-Fernandez C, Majdic O (1995) Molecular characterization of CD34+ human hematopoietic progenitor cells. *Ann Hematol* **70**: 281-296
- Kölbel K, Ihling C, Bellmann-Sickert K, Neundorf I, Beck-Sickingher AG, Sinz A, Kühn U, Wahle E (2009) Type I arginine methyl transferases PRMT1 and PRMT3 act distributively. *JBC* **284**: 8274-8282
- Kondo M, Weissman IL, Akashi K (1997) Identification of clonogenic common lymphoid progenitors in mouse bone marrow. *Cell* **91**: 661-672
- Kouzarides T (2007) Chromatin modifications and their function. *Cell* **128**: 693-705
- Kowenz-Leutz E, Pless O, Dittmar G, Knoblich M, Leutz A (2010) Crosstalk between C/EBPbeta phosphorylation, arginine methylation, and SWI/SNF/Mediator implies an indexing transcription factor code. *EMBO J* **29**: 1105-1115
- Krause CD, Yang ZH, Kim YS, Lee JH, Cook JR, Pestka S (2007) Protein arginine methyltransferases: evolution and assessment of their pharmacological and therapeutic potential. *Pharmacol Ther* **113**: 50-87

- Krause DS, Fackler MJ, Civin CI, May WS (1996) CD34: structure, biology, and clinical utility. *Blood* **87**: 1-13
- Kumar A, Paietta JV (1998) An additional role for the F-box motif: gene regulation within the *Neurospora crassa* sulfur control network. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**: 2417-2422
- Kuter DJ (ed) (2000) *Thrombopoietin*. New York: Academic Press; 965-982
- Kzhyshkowska SH, Liss M, Kremmer E, Stauber R, Wolf H, Dobner T (2001) Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein E1B-AP5 is methylated in its Arg-Gly-Gly (RGG) box and interacts with human arginine methyltransferase HRMT1L1. *Biochem J* **385**: 305-314
- Lacroix F, Messaoudi SE, Rodier G, Le Cam A, Sardet C, Fabbrizio E (2008) The histone-binding protein COPR5 is required for nuclear functions of the protein arginine methyltransferase PRMT5. *EMBO Rep* **9**: 452-458
- Lakowski TM, Hart P, Ahern CA, Martin NI, Frankel A (2010) N(eta)-Substituted Arginyl Peptide Inhibitors of Protein Arginine N-Methyltransferases. *ACS Chem Biol* **5(11)**: 1053:63
- Lausen J, Liu S, Fliegau M, Lubbert M, Werner MH (2006) ELA2 is regulated by hematopoietic transcription factors, but not repressed by AML1-ETO. *Oncogene* **25**: 1349-1357
- Lee J, Sayegh J, Daniel J, Clarke S, Bedford MT (2005) PRMT8, a new membrane-bound tissue-specific member of the protein arginine methyltransferase family. *J Biol Chem* **280**: 32890-32896
- Lee JH, Cook JR, Yang ZH, Mirochnitchenko O, Gunderson SI, Felix AM, Herth N, Hoffmann R, Pestka S (2005b) PRMT7, a new protein arginine methyltransferase that synthesizes symmetric dimethylarginine. *The Journal of biological chemistry* **280**: 3656-3664
- Lepage A, Leboeuf M, Cazenave JP, de la Salle C, Lanza F, Uzan G (2000) The alpha(IIb)beta(3) integrin and GPIb-V-IX complex identify distinct stages in the maturation of CD34(+) cord blood cells to megakaryocytes. *Blood* **96**: 4169-4177
- Levanon D, Groner Y (2004) Structure and regulated expression of mammalian RUNX genes. *Oncogene* **23**: 4211-4219
- Liu F, Zhao X, Perna F, Wang L, Koppikar P, Abdel-Wahab O, Harr MW, Levine RL, Xu H, Tefferi A, Deblasio A, Hatlen M, Menendez S, Nimer SD (2011) JAK2V617F-mediated phosphorylation of PRMT5 downregulates its methyltransferase activity and promotes myeloproliferation. *Cancer Cell* **19(2)**: 161-3
- Lo WS, Trievel RC, Rojas JR, Duggan L, Hsu JY, Allis CD, Marmorstein R, Berger SL (2000) Phosphorylation of serine 10 in histone H3 is functionally linked in vitro and in vivo to Gcn5-mediated acetylation at lysine 14. *Mol Cell* **5**: 917-926
- Look AT (1997) Oncogenic transcription factors in the human acute leukemias. *Science* **278**: 1059-1064
- Lorsbach RB, Moore J, Ang SO, Sun W, Lenny N, Downing JR (2004) Role of RUNX1 in adult hematopoiesis: analysis of RUNX1-IRES-GFP knock-in mice reveals differential lineage expression. *Blood* **103**: 2522-2529

- Luddy (1978) A fatal myeloproliferative syndrome in a family with thrombocytopenia and platelet dysfunction. *Cancer* **41**: 1959-1963
- Luger K, Mader AW, Richmond RK, Sargent DF, Richmond TJ (1997) Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution. *Nature* **389**: 251-260
- Luger K, Richmond TJ (1998) The histone tails of the nucleosome. *Curr Opin Genet Dev* **8**: 140-146
- Lutterbach B, Hiebert SW (2000) Role of the transcription factor AML-1 in acute leukemia and hematopoietic differentiation. *Gene* **245**: 223-235
- Ma H, Baumann CT, Li H, Strahl BD, Rice R, Jelinek MA, Aswad DW, Allis CD, Hager GL, Stallcup MR (2001) Hormone-dependent, CARM1-directed, arginine-specific methylation of histone H3 on a steroid-regulated Promotor. *Curr Biol* **11**: 1981-1985
- Macdonald N, Welburn JP, Noble ME, Nguyen A, Yaffe MB, Clynes D, Moggs JG, Orphanides G, Thomson S, Edmunds JW, Clayton AL, Endicott JA, Mahadevan LC (2005) Molecular basis for the recognition of phosphorylated and phosphoacetylated histone h3 by 14-3-3. *Mol Cell* **20**: 199-211
- Mathur A, Hong Y, Wang G, Erusalimsky JD (2004) Assays of megakaryocyte development: surface antigen expression, ploidy, and size. *Methods Mol Biol* **272**: 309-322
- Meyer R, Wolf SS, Obendorf M (2007) PRMT2, a member of the protein arginine methyltransferase family, is a coactivator of the androgen receptor. *J Steroid Biochem Mol Biol* **107**: 1-14
- Meyers S, Lenny N, Hiebert SW (1995) The t(8;21) fusion protein interferes with AML-1B-dependent transcriptional activation. *Mol Cell Biol* **15**: 1974-1982
- Michaud-Levesque J, Richard S (2009) Thrombospondin-1 is a transcriptional repression target of PRMT6. *J Biol Chem* **284**: 21338-21346
- Mikkola, Orkin (2006) The journey of developing hematopoietic stem cells. *Development* **133**: 3733-3744
- Milne TA, Briggs SD, Brock HW, Martin ME, Gibbs D, Allis CD, Hess JL (2002) MLL targets SET domain methyltransferase activity to Hox gene Promotors. *Mol Cell* **10**: 1107-1117
- Miranda TB, Miranda M, Frankel A, Clarke S (2004) PRMT7 is a member of the protein arginine methyltransferase family with a distinct substrate specificity. *J Biol Chem* **279**: 22902-22907
- Miranda TB, Webb KJ, Edberg DD, Reeves R, Clarke S (2005) Protein arginine methyltransferase 6 specifically methylates the nonhistone chromatin protein HMGA1a. *Biochem Biophys Res Commun* **336**: 831-835
- Mitjavila-Garcia MT, Cailleret M, Godin I, Nogueira MM, Cohen-Solal K, Schiavon V, Lecluse Y, Le Pesteur F, Lagrue AH, Vainchenker W (2002) Expression of CD41 on hematopoietic progenitors derived from embryonic hematopoietic cells. *Development* **129**: 2003-2013
- Miyamoto T, Iwasaki H, Reizis B, Ye M, Graf T, Weissman IL, Akashi K (2002) Myeloid or lymphoid promiscuity as a critical step in hematopoietic lineage commitment. *Dev Cell* **3**: 137-147

- Miyoshi H, Ohira M, Shimizu K, Mitani K, Hirai H, Imai T, Yokoyama K, Soeda E, Ohki M (1995) Alternative splicing and genomic structure of the AML1 gene involved in acute myeloid leukemia. *Nucleic Acids Res* **23**: 2762-2769
- Miyoshi KS, Kozu T, Maseki N, Kaneko Y, Ohki M (1991) t(8;21) breakpoints on chromosome 21 in acute myeloid leukemia are clustered within a limited region of a single gene, AML1. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**: 10431-10434
- Mukhopadhyay D, Riezman H (2007) Proteasome-independent functions of ubiquitin in endocytosis and signaling. *Science* **315**: 201-205
- Murray-Zmijewski F, Slee EA, Lu X (2008) A complex barcode underlies the heterogeneous response of p53 to stress. *Nat Rev Mol Cell Biol* **9**: 702-712
- Najbauer J, Johnson BA, Young AL, Aswad DW (1993) Peptides with sequences similar to glycine, arginine-rich motifs in proteins interacting with RNA are efficiently recognized by methyltransferase(s) modifying arginine in numerous proteins. *J Biol Chem* **268**: 10501-10509
- Nakao K, Angrist AA (1968) Membrane surface specialization of blood platelet and megakaryocyte. *Nature* **217**: 960-961
- Niewmierzycka A, Clarke S (1999) S-Adenosylmethionine-dependent methylation in *Saccharomyces cerevisiae*. Identification of a novel protein arginine methyltransferase. *J Biol Chem* **274**: 814-824
- Niitsu N, Yamamoto-Yamaguchi Y, Miyoshi H, Shimizu K, Ohki M, Umeda M, Honma Y (1997) AML1a but not AML1b inhibits erythroid differentiation induced by sodium butyrate and enhances the megakaryocytic differentiation of K562 leukemia cells. *Cell Growth Differ* **8**: 319-326
- Nishimura M, Fukushima-Nakase Y, Fujita Y, Nakao M, Toda S, Kitamura N, Abe T, Okuda T (2004) VWRPY motif-dependent and -independent roles of AML1/Runx1 transcription factor in murine hematopoietic development. *Blood* **103**: 562-570
- Nuchprayoon I, Simkevich CP, Luo M, Friedman AD, Rosmarin AG (1997) GABP cooperates with c-Myb and C/EBP to activate the neutrophil elastase Promotor. *Blood* **89**: 4546-4554
- Oelgeschlager IN, Luscher B, Friedman AD (1996) C/EBP, c-Myb, and PU.1 cooperate to regulate the neutrophil elastase Promotor. *Mol Cell Bio* **16**: 4717-4725
- Oguro H, Yuan J, Ichikawa H, Ikawa T, Yamazaki S, Kawamoto H, Nakauchi H, Iwama A (2010) Poised lineage specification in multipotential hematopoietic stem and progenitor cells by the polycomb protein Bmi1. *Cell Stem Cell* **6**: 279-286
- Orford K, Kharchenko P, Lai W, Dao MC, Worhunsky DJ, Ferro A, Janzen V, Park PJ, Scadden DT (2008) Differential H3K4 methylation identifies developmentally poised hematopoietic genes. *Dev Cell* **14**: 798-809
- Orkin SH (2000) Diversification of haematopoietic stem cells to specific lineages. *Nat Rev Genet* **1**: 57-64
- Orkin SH, Zon LI (2008) Hematopoiesis: an evolving paradigm for stem cell biology. *Cell* **132**: 631-644

Osato M (2004) Point mutations in the RUNX1/AML1 gene: another actor in RUNX leukemia. *Oncogene* **23**: 4284-4296

Osato M, Asou N, Abdalla E, Hoshino K, Yamasaki H, Okubo T, Suzushima H, Takatsuki K, Kanno T, Shigesada K, Ito Y (1999) Biallelic and heterozygous point mutations in the runt domain of the AML1/PEBP2alphaB gene associated with myeloblastic leukemias. *Blood* **93**: 1817-1824

Owen DJ, Ornaghi P, Yang JC, Lowe N, Evans PR, Ballario P, Neuhaus D, Filetici P, Travers AA (2000) The structural basis for the recognition of acetylated histone H4 by the bromodomain of histone acetyltransferase gcn5p. *EMBO J* **19**: 6141-6149

Pai WK, Kim S (ed) (1980) *Natural occurrence of various methylated amino acid derivatives*. York: John Wiley&Son, 8-25pp

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

Papayannopoulou T, Brice M, Farrer D, Kaushansky K (1996) Insights into the cellular mechanisms of erythropoietin-thrombopoietin synergy. *Exp Hematol* **24**: 660-669

Parry RV, Ward SG (2010) Protein arginine methylation: a new handle on T lymphocytes? *Trends Immunol* **31**: 164-169

Passegue E, Jamieson CH, Ailles LE, Weissman IL (2003) Normal and leukemic hematopoiesis: are leukemias a stem cell disorder or a reacquisition of stem cell characteristics? *Proc Natl Acad Sci U S A* **100 Suppl 1**: 11842-11849

Pawlak MR, Banik-Maiti S, Pietenpol JA, Ruley HE (2002) Protein arginine methyltransferase I: substrate specificity and role in hnRNP assembly. *J Cell Biochem* **87**: 394-407

Pawlak MR, Scherer CA, Chen J, Roshon MJ, Ruley HE (2000) Arginine N-methyltransferase 1 is required for early postimplantation mouse development, but cells deficient in the enzyme are viable. *Mol Cell Biol* **20**: 4859-4869

Pawson T (2004) Specificity in signal transduction: from phosphotyrosine-SH2 domain interactions to complex cellular systems. *Cell* **116**: 191-203

Pazin MJ, Kadonaga JT (1997) What's up and down with histone deacetylation and transcription? *Cell* **89**: 325-328

Pencovich N, Jaschek R, Tanay A, Groner Y (2011) Dynamic combinatorial interactions of RUNX1 and cooperating partners regulates megakaryocytic differentiation in cell line models. *Blood* **117**: e1-14

Pendaries C, Watson SP, Spalton JC (2007) Methods for genetic modification of megakaryocytes and platelets. *Platelets* **18**: 393-408

Petrovick MS, Hiebert SW, Friedman AD, Hetherington CJ, Tenen DG, Zhang DE (1998) Multiple functional domains of AML1: PU.1 and C/EBPalpha synergize with different regions of AML1. *Mol Cell Biol* **18**: 3915-3925

Pevny L, Lin CS, D'Agati V, Simon MC, Orkin SH, Costantini F (1995) Development of hematopoietic cells lacking transcription factor GATA1. *Development* **121**: 163-172

- Pevny L, Simon MC, Robertson E, Klein WH, Tsai SF, D'Agati V, Orkin SH, Costantini F (1991) Erythroid differentiation in chimaeric mice blocked by a targeted mutation in the gene for transcription factor GATA1. *Nature* **349**: 257-260
- Putz G, Rosner A, Nuesslein I, Schmitz N, Buchholz F (2006) AML1 deletion in adult mice causes splenomegaly and lymphomas. *Oncogene* **25**: 929-939
- Ravid K, Lu J, Zimmet JM, Jones MR (2002) Roads to polyploidy: the megakaryocyte example. *J Cell Physiol* **190**: 7-20
- Rea S, Eisenhaber F, O'Carroll D, Strahl BD, Sun ZW, Schmid M, Opravil S, Mechtler K, Ponting CP, Allis CD, Jenuwein T (2000) Regulation of chromatin structure by site-specific histone H3 methyltransferases. *Nature* **406**: 593-599
- Reed-Inderbitzin E, Moreno-Miralles I, Vanden-Eynden SK, Xie J, Lutterbach B, Durst-Goodwin KL, Luce KS, Irvin BJ, Cleary ML, Brandt SJ, Hiebert SW (2006) RUNX1 associates with histone deacetylases and SUV39H1 to repress transcription. *Oncogene* **25**: 5777-5786
- Rice JC, Briggs SD, Ueberheide B, Barber CM, Shabanowitz J, Hunt DF, Shinkai Y, Allis CD (2003) Histone methyltransferases direct different degrees of methylation to define distinct chromatin domains. *Mol Cell* **12**: 1591-1598
- Roeder RG (1976). Eukaryotic nuclear RNA polymerases. In *RNA polymerase* (ed. R. Losick and M. Chamberlin), pp.285-329. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY
- Romana SP, Poirel H, Leconiat M, Flexor MA, Mauchauffe M, Jonveaux P, Macintyre EA, Berger R, Bernard OA (1995) High frequency of t(12;21) in childhood B-lineage acute lymphoblastic leukemia. *Blood* **86**: 4263-4269
- Ruthenburg AJ, Allis CD, Wysocka J (2006) Methylation of Lysine 4 on Histone H3: Intricacy of Writing and Reading a Single Epigenetic Mark. *Mol Cell* **25**: 15-30
- Schiltz RL, Mizzen CA, Vassilev A, Cook RG, Allis CD, Nakatani Y (1999) Overlapping but distinct patterns of histone acetylation by the human coactivators p300 and PCAF within nucleosomal substrates. *J Biol Chem* **274**: 1189-1192
- Schlossmann S (ed) (1995) *Leucocyte typing V^o: Proceedings of the 5th int. conference on white cell differentiation antigens*. Boston: Oxford University Press
- Schurter BT, Koh SS, Chen D, Bunick GJ, Harp JM, Hanson BL, Henschen-Edman A, Mackay DR, Stallcup MR, Aswad DW (2001) Methylation of histone H3 by coactivator-associated arginine methyltransferase 1. *Biochemistry* **40**: 5747-5756
- Scott EW, Simon MC, Anastasi J, Singh H (1994) Requirement of transcription factor PU.1 in the development of multiple hematopoietic lineages. *Science* **265**: 1573-1577
- Scott LM, Civin CI, Rorth P, Friedman AD (1992) A novel temporal expression pattern of three C/EBP family members in differentiating myelomonocytic cells. *Blood* **80**: 1725-1735
- Seet BT, Dikic I, Zhou MM, Pawson T (2006) Reading protein modifications with interaction domains. *Nat Rev Mol Cell Biol* **7**: 473-483
- Sgarra R, Lee J, Tessari MA, Altamura S, Spolaore B, Giacotti V, Bedford MT, Manfioletti G (2006) The AT-hook of the chromatin architectural transcription factor high mobility group A1a is arginine-methylated by protein arginine methyltransferase 6. *J Biol Chem* **281**: 3764-3772

Shivdasani RA, Fujiwara Y, McDevitt MA, Orkin SH (1997) A lineage-selective knock out establishes the critical role of transcription factor GATA1 in megakaryocyte growth and platelet development. *EMBO J* **16**: 3965-3973

Sims 3rd R, Reinberg D (2008) Is there a code embedded in proteins that is based on post-translational modifications? *Nat Rev* **9**: 1-6

Smith WA, Schurter BT, Wong-Staal F, David M (2004) Arginine methylation of RNA helicase a determines its subcellular localization. *J Biol Chem* **279**: 22795-22798

Song WJ, Sullivan MG, Legare RD, Hutchings S, Tan X, Kufirin D, Ratajczak J, Resende IC, Haworth C, Hock R, Loh M, Felix C, Roy DC, Busque L, Kurnit D, Willman C, Gewirtz AM, Speck NA, Bushweller JH, Li FP, Gardiner K, Poncz M, Maris JM, Gilliland DG (1999) Haploinsufficiency of CBFA2 causes familial thrombocytopenia with propensity to develop acute myelogenous leukaemia. *Nat Genet* **23**: 166-175

Speck NA, Gilliland DG (2002) Core-binding factors in haematopoiesis and leukaemia. *Nat Rev Cancer* **2**: 502-513

Speck NA, Stacy (ed) (1995). New York: Begell House Inc., 337-364

Stallcup MR, Kim JH, Teyssier C, Lee YH, Ma H, Chen D (2003) The roles of protein-protein interactions and protein methylation in transcriptional activation by nuclear receptors and their coactivators. *J Steroid Biochem Mol Biol* **85**: 139-145

Strahl BD, Allis CD (2000) The language of covalent histone modifications. *Nature* **403**: 41-45

Swiercz R, Cheng D, Kim D, Bedford MT (2007) Ribosomal protein rpS2 is hypomethylated in PRMT3-deficient mice. *J Biol Chem* **282**: 16917-16923

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

Tanaka T, Kurokawa M, Ueki K, Tanaka K, Imai Y, Mitani K, Okazaki K, Sagata N, Yazaki Y, Shibata Y, Kadowaki T, Hirai H (1996) The extracellular signal-regulated kinase pathway phosphorylates AML1, an acute myeloid leukemia gene product, and potentially regulates its transactivation ability. *Mol Cell Biol* **16**: 3967-3979

Tang J, Frankel A, Cook RJ, Kim S, Paik WK, Williams KR, Clarke S, Herschman HR (2000) PRMT1 is the predominant type I protein arginine methyltransferase in mammalian cells. *J Biol Chem* **275**: 7723-7730

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

Tetteroo PA, Massaro F, Mulder A, Schreuder-van Gelder R, von dem Borne AE (1984) Megakaryoblastic differentiation of proerythroblastic K562 cell-line cells. *Leuk Res* **8**: 197-206

Teyssier C, Le Romancer M, Sentis S, Jalaguier S, Corbo L, Cavailles V (2010) Protein arginine methylation in estrogen signaling and estrogen-related cancers. *Trends Endocrinol Metab* **21**: 181-189

Thompson PR, Fast W (2006) Histone citrullination by protein arginine deiminase: is arginine methylation a green light or a roadblock? *ACS Chem Biol* **1**: 433-441

Tomer A HL, Burstein SA (1988) Flow cytometric analysis of normal megakaryocytes. *Blood* **71**: 1244-1252

Tsang AP, Fujiwara Y, Hom DB, Orkin SH (1998) Failure of megakaryopoiesis and arrested erythropoiesis in mice lacking the GATA1 transcriptional cofactor FOG. *Genes Dev* **12**: 1176-1188

Vainchenker W, Deschamps JF, Bastin JM, Guichard J, Titeux M, Breton-Gorius J, McMichael AJ (1982) Two monoclonal antiplatelet antibodies as markers of human megakaryocyte maturation: immunofluorescent staining and platelet peroxidase detection in megakaryocyte colonies and in in vivo cells from normal and leukemic patients. *Blood* **59**: 514-521

Vannucchi AM, Paoletti F, Linari S, Cellai C, Caporale R, Ferrini PR, Sanchez M, Migliaccio G, Migliaccio AR (2000) Identification and characterization of a bipotent (erythroid and megakaryocytic) cell precursor from the spleen of phenylhydrazine-treated mice. *Blood* **95**: 2559-2568

Vermeulen M, Mulder KW, Denissov S, Pijnappel WW, van Schaik FM, Varier RA, Baltissen MP, Stunnenberg HG, Mann M, Timmers HT (2007) Selective anchoring of TFIID to nucleosomes by trimethylation of histone H3 lysine 4. *Cell* **131(1)**: 58-69

Vigushin DM, Coombes RC (2002) Histone deacetylase inhibitors in cancer treatment. *Anticancer Drugs* **13**: 1-13

Vogelauer M, Wu J, Suka N, Grunstein M (2000) Global histone acetylation and deacetylation in yeast. *Nature* **408**: 495-498

Wang H, Huang ZQ, Xia L, Feng Q, Erdjument-Bromage H, Strahl BD, Briggs SD, Allis CD, Wong J, Tempst P, Zhang Y (2001) Methylation of histone H4 at arginine 3 facilitating transcriptional activation by nuclear hormone receptor. *Science* **293**: 853-857

Wang L, Huang G, Zhao X, Hatlen MA, Vu L, Liu F, Nimer SD (2009) Post-translational modifications of Runx1 regulate its activity in the cell. *Blood Cells Mol Dis* **43**: 30-34

Wee HJ, Voon DC, Bae SC, Ito Y (2008) PEBP2-beta/CBF-beta-dependent phosphorylation of RUNX1 and p300 by HIPK2: implications for leukemogenesis. *Blood* **112**: 3777-3787

Weiss MJ, Orkin SH (1995) Transcription factor GATA1 permits survival and maturation of erythroid precursors by preventing apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**: 9623-9627

Weissman IL (2000) Stem cells: units of development, units of regeneration, and units in evolution. *Cell* **100**: 157-168

Weissman IL, Anderson DJ, Gage F (2001) Stem and progenitor cells: origins, phenotypes, lineage commitments, and transdifferentiations. *Annu Rev Cell Dev Biol* **17**: 387-403

Xu G, Kanezaki R, Toki T, Watanabe S, Takahashi Y, Terui K, Kitabayashi I, Ito E (2006) Physical association of the patient-specific GATA1 mutants with RUNX1 in acute megakaryoblastic leukemia accompanying Down syndrome. *Leukemia* **20**: 1002-1008

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

- Yadav N, Lee J, Kim J, Shen J, Hu MC, Aldaz CM, Bedford MT (2003) Specific protein methylation defects and gene expression perturbations in coactivator-associated arginine methyltransferase 1-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**: 6464-6468
- Yamagata K, Daitoku H, Takahashi Y, Namiki K, Hisatake K, Kako K, Mukai H, Kasuya Y, Fukamizu A (2008) Arginine Methylation of FOXO Transcription Factors Inhibits Their Phosphorylation by Akt. *Mol Cell* **32**: 221-231
- Yamaguchi Y, Kurokawa M, Imai Y, Izutsu K, Asai T, Ichikawa M, Yamamoto G, Nitta E, Yamagata T, Sasaki K, Mitani K, Ogawa S, Chiba S, Hirai H (2004) AML1 is functionally regulated through p300-mediated acetylation on specific lysine residues. *J Biol Chem* **279**: 15630-15638
- Yoshimatsu M, Toyokawa G, Hayami S, Unoki M, Tsunoda T, Field HI, Kelly JD, Neal DE, Maehara Y, Ponder BA, Nakamura Y, Hamamoto R (2011) Dysregulation of PRMT1 and PRMT6, Type I arginine methyltransferases, is involved in various types of human cancers. *Int J Cancer* **1**: 562-573
- Yue WW, Hassler M, Roe MS, Thompson-Vale V, Pearl LH (2007) Insights into histone code syntax from structural and biochemical studies of CARM1 methyltransferase. *EMBO* **26**: 4402-4412
- Zeng C, van Wijnen AJ, Stein JL, Meyers S, Sun W, Shopland L, Lawrence JB, Penman S, Lian JB, Stein GS, Hiebert SW (1997) Identification of a nuclear matrix targeting signal in the leukemia and bone-related AML/CBF-alpha transcription factors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**: 6746-6751
- Zeng L, Zhou MM (2002) Bromodomain: An acetyl-lysine binding domain. *FEBS Lett* **513**: 124-128
- Zeuner A, Signore M, Martinetti D, Bartucci M, Peschle C, De Maria R (2007) Chemotherapy-induced thrombocytopenia derives from the selective death of megakaryocyte progenitors and can be rescued by stem cell factor. *Cancer Res* **67**: 4767-4773
- Zhang DE, Hetherington CJ, Meyers S, Rhoades KL, Larson CJ, Chen HM, Hiebert SW, Tenen DG (1996) CCAAT enhancer-binding protein (C/EBP) and AML1 (CBF alpha2) synergistically activate the macrophage colony-stimulating factor receptor Promotor. *Mol Cell Biol* **16**: 1231-1240
- Zhang W, Bone JR, Edmondson DG, Turner BM, Roth SY (1998) Essential and redundant functions of histone acetylation revealed by mutation of target lysines and loss of the Gcn5p acetyltransferase. *EMBO J* **17**: 3155-3167
- Zhang X, Cheng X (2003) Structure of the Predominant Protein Arginine Methyltransferase PRMT1 and Analysis of Its Binding to Substrate Peptides. *Structure* **11**: 509-520
- Zhang X, Zhou L, Cheng X (2000) Crystal structure of the conserved core of protein arginine methyltransferase PRMT3. *EMBO J* **19**: 3509-3519
- Zhao X, Jankovic V, Gural A, Huang G, Pardanani A, Menendez S, Zhang J, Dunne R, Xiao A, Erdjument-Bromage H, Allis CD, Tempst P, Nimer SD (2008) Methylation of RUNX1 by PRMT1 abrogates SIN3A binding and potentiates its transcriptional activity. *Genes Dev* **22**: 640-653

7. Anhang

7.1 Daten von HEL-Zellen

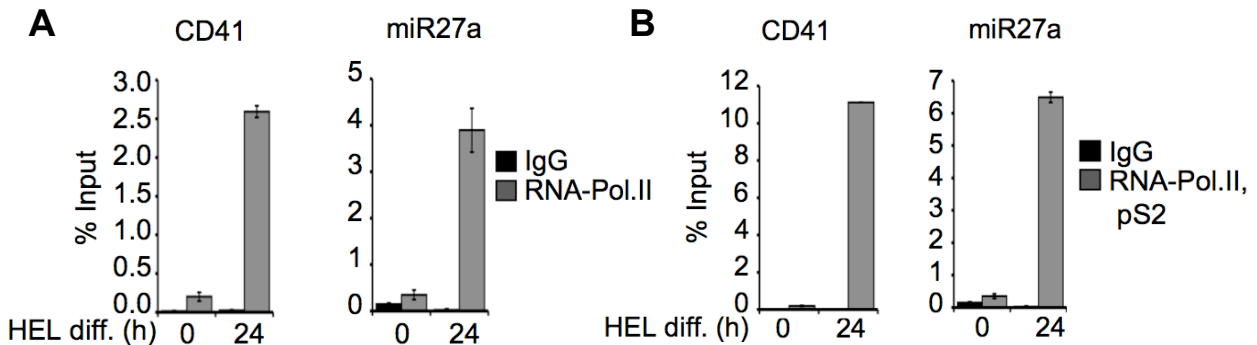


Abb. 7.1 : Nachweis der RNA-Polymerase II auf dem Promotorbereich der megakaryozytären RUNX1-Zielgene *CD41* und *miR27a* in HEL-Zellen

(A) In undifferenzierten HEL-Zellen konnte die Bindung der RNA-Polymerase II an den *CD41*- und *miR27a*-Promotor nachgewiesen werden, welche nach TPA Induktion stark zunahm. (B) Die Bindung der RNA-Polymerase II, phosphoryliert am Serin 2, war vor TPA Induktion auf dem *CD41*- und *miR27a*-Promotor kaum nachweisbar, wohingegen eine starke Bindung in differenzierten Zellen detektiert werden konnte.

Es wurde eine Chromatin-Immunopräzipitation mit Antikörpern gegen die RNA-Polymerase II bzw. gegen die RNA-Polymerase II phosphoryliert am Serin 2 (RNA-Pol.II, pS2) von undifferenzierten (0) und mit TPA induzierten HEL-Zellen (24) durchgeführt. Die der RNA-Polymerase II assoziierte DNA wurde mittels qRT-PCR gemessen. Dabei wurden Primer verwendet, die spezifisch den Promotorbereich von *CD41* und *miR27a* amplifizieren. Die Effizienz der Primerpaare wurde überprüft und ausgeglichen. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung aus mindestens zwei unabhängigen Experimenten und vier unabhängigen Werten an.

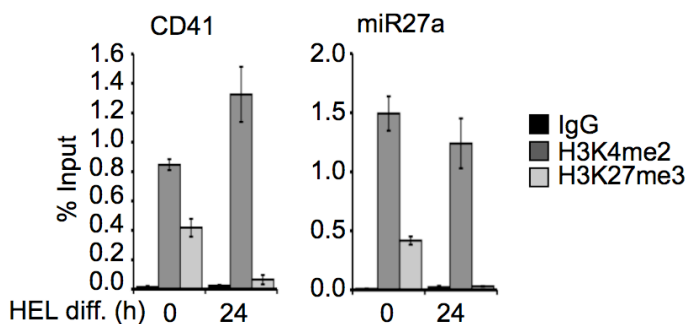


Abb. 7.2 : Nachweis der bivalenten Histonmodifikationen H3K27me3 und H3K4me2 auf dem Promotorbereich der megakaryozytären RUNX1-Zielgene *CD41* und *miR27a* in HEL-Zellen

Auf dem *CD41*- und *miR27a*-Locus waren die Histonmodifikationen H3K27me3 und H3K4me2 in undifferenzierten HEL-Zellen vorhanden. Während der Differenzierung konnte nur die aktivierende H3K4me2 gleich bleibend nachgewiesen werden.

HEL-Zellen wurden für 24 Stunden mit TPA induziert und für eine Chromatin-Immunopräzipitation mit anti-H3K27me3 und anti-H3K4me2 Antikörpern verwendet. Für die qRT-PCR wurden Primer verwendet, die spezifisch bestimmte Regionen von *CD41* und *miR27a* um RUNX1-Bindestellen amplifizieren. Die Effizienz der verschiedenen Primerpaare wurde überprüft und ausgeglichen. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung aus mindestens zwei unabhängigen Experimenten und vier unabhängigen Werten an.

7.2 Abkürzungsverzeichnis

α	anti
% (v/v)	Volumenprozent
% (w/v)	Gewichtsvolumenprozent
% (w/w)	Gewichtsprozent
°C	Grad Celsius
μg	Mikrogramm
μl	Mikroliter
μM	Mikromolar
Abb.	Abbildung
ac	Acetylierung
aDMA	asymmetrische Dimethylierung
AdOx	Adenosin-2'-3'-dialdehyd
ALL	Akute lymphoblastische Leukämie
AML	Akute myeloische Leukämie
AMP	Ampicillin
ATP	Adenosintriphosphat
CAM	Chloramphenicol
CLP	Lymphoide Vorläuferzelle (<i>common lymphoid progenitor</i>)
CMP	myeloische Vorläuferzelle (<i>common myeloid progenitor</i>)
d	Tag
DMEM	<i>Dulbecco's modified medium</i>
DNA	<i>desoxyribonucleic acid</i>
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGTA	Ethylenglycoltetraessigsäure
EPO	Erythropoietin
FACS	<i>fluorescence activated cell sorting</i>
FKS	Fötales Kälberserum
g	Gramm
GAR	Glycin-Arginin-reich
G-CSF	<i>granulocyte colony-stimulating factor</i>
GM-CSF	<i>granulocyte macrophage colony-stimulating factor</i>
GST	Glutathion S-Transferase
h	Stunde
H1	Histon 1

H2	Histon 2
H3	Histon 3
H3K4	Lysin 4 des Histons 3
H3K9	Lysin 9 des Histons 3
H3K27	Lysin 27 des Histons 3
H3R2	Arginin 2 des Histons 3
H4	Histon 4
HDAC	Histone-Deacetylase
HSC	Hämatopoietische Stammzelle (<i>hematopoietic stem cell</i>)
IL	Interleukin
IP	Immunopräzipitation
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
kDa	Kilodalton
LT-HSC	Langzeitrepopulierende hämatopoietische Stammzelle
M-CSF	<i>macrophage colony-stimulating factor</i>
me	Methylierung
me2	Dimethylierung
me3	Trimethylierung
min	Minuten
MEP	megakaryozytäre/erythroide Vorläuferzelle
RNA-Pol. II	RNA-Polymerase II
RNA-Pol. II, pS2	RNA-Polymerase II, phosphoryliert am Serin 2
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
SAM	S-Adenosyl-L-Methionin
SCF	Stammzellfaktor
sDMA	symmetrische Dimethylierung
SDS	Natriumdodecylsulfat
ST-HSC	Kurzzeitrepopulierende hämatopoietische Stammzelle
SUMO	<i>small ubiquitin-related modifier</i>
ONPG	o-Nitrophenyl- β -D-galactopyranosid
P	Phosphorylierung
PBS	Phosphatgepufferte Kochsalzlösung (<i>phosphate buffered saline</i>)
PEI	Polyethylenimin
PRMT	Protein Arginin Methyltransferase
PTM	Posttranslationale Modifikation
Tm	Schmelztemperatur
TPA	12-o-Tetradecanoylphorbol-13-Acetat

TPO	Thrombopoetin
WT	Wildtyp

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

7.3 Verwendete Chemikalien

Bezeichnung	Hersteller	Ort
Ampicillin (AMP)	Carl Roth	Karlsruhe
Adenosintriphosphat (ATP)	Carl Roth	Karlsruhe
Bromphenolblau	Sigma Aldrich	München
Chloramphenicol (CAM)	AppliChem	Darmstadt
Dexamethason	Sigma Aldrich	München
Dithiothreitol (DTT)	Carl Roth	Karlsruhe
Erythropoietin	AppliChem	Darmstadt
Essigsäure, 100%	Carl Roth	Karlsruhe
Estradiol	Sigma Aldrich	München
Ethanol, 100%	Carl Roth	Karlsruhe
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Carl Roth	München
Ethylenglycoltetraessigsäure (EGTA)	Carl Roth	München
Fit-3 Ligand (<i>Fms-like tyrosine kinase 3 ligand</i>)	PeproTech	Hamburg
Formaldehyd	Carl Roth	Karlsruhe
Fötale Kälberserum (FKS)	PAA-Laboratories	Pasching
G418	AppliChem	Darmstadt
α -D-Glucose	Carl Roth	Karlsruhe
L-Glutamin	PAA-Laboratories	Pasching
L-Glutathion	Carl Roth	Karlsruhe
Glycerin	Carl Roth	Karlsruhe
Glycin	Carl Roth	Karlsruhe
Glycogen	Carl Roth	Karlsruhe
Glycylglycin (Gly Gly)	AppliChem	Darmstadt
HEPES	Carl Roth	Karlsruhe
Interleukin 3 (IL-3)	PeproTech	Hamburg
Interleukin 6 (IL-6)	PeproTech	Hamburg
Interleukin 9 (IL-9)	PeproTech	Hamburg
Isopropanol	Carl Roth	Karlsruhe
Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid (IPTG)	Carl Roth	Karlsruhe
KCl	Carl Roth	Karlsruhe
KH_2PO_4	Carl Roth	Karlsruhe
Luciferin	Carl Roth	Karlsruhe
Lysozym	Carl Roth	Karlsruhe

Bezeichnung	Hersteller	Ort
β-Mercaptoethanol	Carl Roth	Karlsruhe
Metafectene	Biontex	München
MgSO ₄	Carl Roth	Karlsruhe
MgCl ₂	Carl Roth	Karlsruhe
NaCl	Carl Roth	Karlsruhe
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Carl Roth	Karlsruhe
Natriumdeoxycholat	Carl Roth	Karlsruhe
NaHCO ₃	Carl Roth	Karlsruhe
Na ₂ HPO ₄ ·2H ₂ O	Carl Roth	Karlsruhe
NaH ₂ PO ₄ ·2H ₂ O	Carl Roth	Karlsruhe
Nonidet P-40 (NP-40)	AppliChem	Darmstadt
o-Nitrophenyl-β-D-galactopyranosid (ONPG)	Carl Roth	Karlsruhe
Penicillin/Streptomycin	PAA-Laboratories	Pasching
Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol (25:24:1)	AppliChem	Darmstadt
Protease-Inhibitor-Mix	Roche	Mannheim
Proteinase K	AppliChem	Darmstadt
Polyethylenimin (PEI)	Sigma Aldrich	München
RNase A	Invitrogen	Karlsruhe
Roti®-Block	Carl Roth	Karlsruhe
Stammzellfaktor (SCF)	PeproTech	Hamburg
12-o-Tetradecanoylphorbol-13-Acetat (TPA)	Sigma Aldrich	München
Thrombopoetin (TPO)	PeproTech	Hamburg
Tris	Carl Roth	Karlsruhe
Triton X-100	Carl Roth	Karlsruhe
Zeozin	Invivogen	Cyla

7.4 Verwendete Geräte

Gerät	Bezeichnung	Hersteller	Ort
Autoklav	HST 4-5-6 E	Zirbus Technology	Bad Grund
Bakterienbrutschrank	Kelvitron	Haraeus Holding GmbH	Hanau
DNA Thermal Cycler	Thermal Cycler 480	Perkin Eltner Cetus	Tuttlingen
DNA Thermal Cycler	GeneAmp 2400	Perkin Eltner Cetus	Tuttlingen
Elektrophoresekammer DNA	PerfectBlue Gelsystem Mini S	PeqLab Biotechnologie GmbH	Erlangen
Elektrophoresekammer Protein	Elektrophoresesystem	PeqLab Biotechnologie GmbH	Erlangen
Entwicklermaschine	OptimaxTQ	MS Laborgeräte	Diehlheim
FACS-Analyse-Gerät	BD FACS Aria Cell Sorter	BD Biosciences	Erembodegem
Falkon-Zentrifuge	Universal 320R	Andreas Hettich GmbH & Co KG	Tuttlingen

Gerät	Bezeichnung	Hersteller	Ort
Gefrierschrank -80°C	Hettich Freezer	Andreas Hettich GmbH & Co KG	Tuttlingen
Geldokumentation DNA	Gel Doc 2000	Bio-Rad Laboratories	München
Gelgießstand	Gießschiene PerfectBlue Mini S	PeqLab Biotechnologie GmbH	Erlangen
Heizbad	1002	GFL Gesellschaft für Labortechnik GmbH	Burgwedel
Kühlzentrifuge	CT15RE	Hitachi High-Technologies Europe GmbH	Mannheim
Light Cycler	LightCycler480	Roche	Mannheim
Luminometer	Microlummat LB96P	Berthold Technologies GmbH	Bad Wildbad
Magnetrührer	Ikamag RCT	Ika	Staufen
Mikroskop-Zellkultur	Diavert	Leitz	Wetzlar
NanoDrop	New Drop 1000 Spectrophotometer Peqlab	Biotechnologie GmbH	Erlangen
PCR-Thermocycler	Primus 96	PeqLab Biotechnologie GmbH	Erlangen
Photometer	BioPhotometer	Eppendorf	Hamburg
Rollmixer	R137	PSI Medizintechnik	Laudenbach
Schüttelinkubator	TH15	Edmund Bühler GmbH	Hechingen
Schüttler	Skyline DRS-12 ELM I LTF	Labortechnik GmbH	Wasserburg
SemiDry-Blotter	PerfectBlue SemiDry Elektro Blotter Web S	PeqLab Biotechnologie GmbH	Erlangen
Sonifizierer	Bioruptor	Diagenode	Liège
Spektrometer	SpektraMax 340	MWG Biotech AG	Ebersberg
Sterilbank	CleanAir	BioFlow Technik	Meckenheim
Stromgeber	Consort	Labortechnik Fröbel	Wasserburg
Vortexer	Vibrofix VF1	Janke & Kunkel Labortechnik	Staufen i. Br.
Tank-Blotter	PerfectBlue Tank Elektro Blotter Web S	PeqLab Biotechnologie GmbH	Erlangen
Thermoblock	TDB-120	Kisker-Biotech	Steinfurt
Waage	EMB 600-2	Kern & Sohn GmbH	Balingen
Wasserbad	Polystat CC3	P.Huber Kältemaschinenbau GmbH	Offenburg
Zählkammer	Glasstic Glide	Hycor Biomedical Inc.	Kassel
Zellkulturbrutschrank	Cellstar	Nunc	Wiesbaden-Biebrich
Zellkulturzentrifuge	Megafuge 1.0R	Haraeus Holding GmbH	Hanau
Zentrifuge	Biofuge pico	Haraeus Holding GmbH	Hanau

7.5 Lebenslauf

Persönliche Angaben

Name: Julia Herglotz
Geburtsdatum: 25.10.1982
Geburtsort: Oldenburg (Oldb)
Staatsangehörigkeit: deutsch

Akademische Ausbildung

Seit 03/2008 Promotion im Bereich Stammzellbiologie des Georg-Speyer-Hauses in der Arbeitsgruppe von Herrn Dr. Lausen

10/2007-01/2008 Studentische Hilfskraft in der Arbeitsgruppe Allgemeine Mikrobiologie von Frau Prof. Dr. Reinhold-Hurek

10/2002-09/2007 Studium der Biologie an der Universität Bremen.
Spezialisierungsfächer Mikrobiologie, Genetik und Biochemie.
Diplomarbeit in der Arbeitsgruppe Allgemeine Mikrobiologie von Frau Prof. Dr. Reinhold-Hurek

Thema der Diplomarbeit: "Funktionelle Analyse des *sci*-Genclusters in *Azoarcus* sp. BH72"

10/2002-12/2003 Studentische Hilfskraft am Max-Planck-Institut für Marine Mikrobiologie in der Abteilung Molekulare Ökologie

Schulischer Werdegang

1999-2002 Besuch der gymnasialen Oberstufe in Bad Zwischenahn (Niedersachsen), einschließlich Abitur 2002

1995-1999 Besuch der Sekundarstufe I in Bad Zwischenahn (Niedersachsen)

1993-1995 Besuch der Orientierungsstufe in Edeweicht (Niedersachsen)

1989-1993 Besuch der Grundschule in Edeweicht (Niedersachsen)

Akademische Lehrer:

Herr Prof. Dr. Marschalek, Herr Prof. Dr. Wels, Frau Prof. Dr. Koenig, Frau Prof. Dr. Reinhold-Hurek

7.6 Publikationen und Posterpräsentationen

Publikationen

Herglotz J, Kuvardina ON, Kumar A, Lausen J (2011) Histone arginine methylation by PRMT6 keeps RUNX1 target genes in an intermediary state in human hematopoietic progenitor cells. *Blood (in revision)*

Wichmann C, Becker Y, Chen-Wichmann L, Vogel V, Vojtkova A, **Herglotz J**, Moore S, Koch J, Lausen J, Mantele W, et al. (2010) Dimer-tetramer transition controls RUNX1/ETO leukemogenic activity. *Blood* **116(4)**: 603-613

Posterpräsentationen

Herglotz J, Kolodziej S, Kuvardina ON, Courtial N, Forne I, Imhof A, Kowentz-Leutz E, Leutz A, Lausen J (2010) The hematopoietic transcription factor Tal1 functionally interacts with protein arginine methyltransferases. 9th EMBL Conference Transcription and Chromatin, Heidelberg, Deutschland (Posterpräsentation)

Herglotz J, Kuvardina ON, Lausen J (2010) Protein arginine methyltransferase 6 regulates histone modification status and represses RUNX1 target genes in hematopoietic progenitors. 2nd UCT Science Day, Frankfurt a. M., Deutschland (Posterpräsentation)

Herglotz J, Kuvardina ON, Kolodziej S, Nadine Courtial, Lausen J (2009) The “Transcription Factor Code” of Tal1 in Hematopoiesis and Leukemia. UCT Science Day, Frankfurt a. M., Deutschland (Posterpräsentation)

7.7 Danksagung

Ein besonderer Dank geht an Dr. Jörn Lausen für die Überlassung dieses interessanten Themas und die Möglichkeit meine Promotionsarbeit in seiner Gruppe durchzuführen. Außerdem möchte ich mich dafür bedanken, dass er jederzeit für mich Zeit hatte und mich mit hilfreichen Anregungen und Ideen immer ein Stück voran gebracht hat.

Bei Prof. Dr. Winfried Wels möchte ich mich für die Betreuung meiner Promotionsarbeit am Georg-Speyer-Haus und für sein Interesse an meinem Projekt bedanken.

Mein Dank gilt auch Prof. Dr. Rolf Marschalek der mich seitens der Johann Wolfgang Goethe Universität betreute und insbesondere auf den UCT Science Days immer ein offenes Ohr für mich hatte.

Bei meiner gesamten Arbeitsgruppe bedanke ich mich für die Unterstützung während meiner Promotionsarbeit, die netten gemeinsamen Stunden und die zahlreichen Diskussionen. Besonders möchte ich mich bei Nadine Courtial für die Einführung in zellbiologische Arbeiten und die Zweisamkeit in den Anfängen unserer Promotionszeit bedanken. Ein großes Dankeschön geht auch an Helge Hussong, die gute Seele in unserem Labor. Bei Stephan Kolodziej, Olga Bölling und Ashok Kumar möchte ich mich für die gute Zusammenarbeit im Labor und bei der Fertigstellung unserer gemeinsamen Publikation bedanken.

Bei Dr. Manuel Grez und Dr. Christian Wichmann möchte ich mich für die gute Zusammenarbeit und Diskussionsbereitschaft bedanken.

Für die Bereitstellung der humanen CD34-Zellen möchte ich mich bei Herrn Dr. Reinhard Henschler vom DRK Blutspendedienst Frankfurt herzlichst bedanken.

Herrn Dr. Joachim Koch danke ich für die Synthese der Peptide an die Cellulosemembran.

Ein ganz großes herzliches Dankeschön gilt vor allem meinen Eltern und meiner Schwester, die mich zu jeder Tages- und Nachtzeit unterstützt und aufgemuntert haben. Vielen Dank für eure Hilfe, euren Zuspruch und Eure Geduld!

Eidesstattliche Versicherung

Ich erkläre hiermit an Eides Statt, dass ich die vorgelegte Dissertation über „Regulation des hämatopoietischen Transkriptionsfaktors RUNX1 durch die Protein Arginin Methyltransferase 6“ selbständig angefertigt und mich anderer Hilfsmittel als der in ihr angegebenen nicht bedient habe, insbesondere, dass alle Entlehnungen aus anderen Schriften mit Angabe der betreffenden Schrift gekennzeichnet sind.

Ich versichere, nicht die Hilfe einer kommerziellen Promotionsvermittlung in Anspruch genommen zu haben.

Frankfurt am Main, den _____

Julia Herglotz