

PRMT5对肝癌细胞增殖及凋亡的影响

张尤历¹ 葛璐¹ 陆瑛¹ 胡昌龙¹ 张行行¹ 彭琬昕² 何俊波¹ 龚爱华^{2,3} 徐岷^{1*}

(¹江苏大学附属医院, 镇江 212000; ²癌基因及相关基因国家重点实验室, 镇江 212000;

³江苏大学医学院基础医学系, 镇江 212000)

摘要 该文目的为探讨蛋白质精氨酸甲基转移酶5(protein arginine methyltransferase 5, PRMT5)对肝癌细胞增殖、凋亡的影响。设计PRMT5短发夹核糖核酸(shRNA)序列, 装入pLKO.1-TRC vector质粒, 进行慢病毒包装, 感染肝癌细胞SMMC-7721和BEL-7402, 嘌呤霉素筛选并培养稳定低表达PRMT5细胞株。Western blot、qPCR检测shRNA干扰效率; CCK-8检测细胞增殖活性; 平板克隆法检测细胞克隆形成能力; 流式细胞术检测细胞凋亡; Western blot检测细胞增殖、凋亡相关蛋白的影响。结果显示, 成功构建慢病毒重组质粒sh-PRMT5并感染肝癌细胞。Western blot、qPCR结果表明, 筛选出的稳转细胞株能低表达PRMT5; 在肝癌细胞中下调PRMT5的表达, 可抑制细胞增殖($P<0.05$), 降低cyclin B1、cyclin D1、cdc20和cdc25B蛋白质水平($P<0.05$), 降低细胞克隆形成能力($P<0.05$), 促进细胞凋亡($P<0.05$), 同时能诱导Caspase-3表达, 降低Bcl-2/Bax的比值($P<0.05$)。由此说明, 下调PRMT5的表达能抑制肝癌细胞增殖, 诱导细胞凋亡, 为进一步研究体内PRMT5的作用提供基础。

关键词 蛋白质精氨酸甲基转移酶5(PRMT5); 肝癌; 增殖; 凋亡

Effects of PRMT5 on Cell Proliferation and Apoptosis in Hepatocellular Carcinoma Cells

Zhang Youli¹, Ge Lu¹, Lu Ying¹, Hu Changlong¹, Zhang Xingxing¹, Peng Wanxin², He Junbo¹, Gong Aihua^{2,3}, Xu Min^{1*}

(¹Affiliated Hospital of Jiangsu University, Zhenjiang 212000, China; ²State Key Laboratory of Oncogenes and Related Genes, Zhenjiang 212000, China; ³School of Medicine, Jiangsu University, Zhenjiang 212000, China)

Abstract The paper aimed at investigating the effects of PRMT5 on cell proliferation and apoptosis in hepatocellular carcinoma cells. PRMT5 short hairpin RNA (shRNA) sequence was designed and inserted into pLKO.1-TRC vector, then packaging lentivirus to infect SMMC-7721 and BEL-7402 cells. Stable infected cells were obtained by puromycin screening. shRNA silencing efficiency was tested by Western blot and qPCR. Cell proliferation activity was detected by CCK-8. Colony formation ability was detected by plate colony assay. Apoptosis was observed by flow cytometry. The expressions of cell proliferation- and apoptosis-related protein were detected by Western blot. The specific shRNA against PRMT5 plasmid (sh-PRMT5) was successfully constructed and infected into SMMC-7721 and BEL-7402 cells. The results of Western blot and qPCR demonstrated that the expression of PRMT5 was efficiently inhibited at both protein and mRNA levels ($P<0.05$). It revealed that PRMT5 depletion

收稿日期: 2015-09-16 接受日期: 2015-11-12

国家自然科学基金(批准号: 81472333)、江苏省自然科学基金(批准号: BK2013247)资助的课题, 重点实验室开放课题资助(批准号: 90-13-05)和江苏大学高级人才启动基金(批准号: 1281270058)

*通讯作者。Tel: 0511-85026370, E-mail: peterxu1974@163.com

Received: September 16, 2015 Accepted: November 12, 2015

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.81472333), the Natural Science Foundation of Jiangsu Province (Grant No.BK2013247), the Open Foundation of Key Laboratory (Grant No.90-13-05) and Advanced Talent Foundation of Jiangsu University (Grant No.1281270058)

*Corresponding author. Tel: +86-511-85026370, E-mail: peterxu1974@163.com

网络出版时间: 2015-12-28 10:21:35 URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20151228.1021.006.html>

decreased cell proliferation ($P < 0.05$). It was found that knockdown of *PRMT5* reduced the protein levels of cyclin B1, cyclin D1, cdc20 and cdc25B, respectively ($P < 0.05$). It showed that knockdown of *PRMT5* inhibited cell colony formation ability. It was found that knockdown of *PRMT5* induced the apoptosis ($P < 0.05$). It indicated that knockdown of *PRMT5* activated Caspase-3 and reduced the ratio of Bcl-2 to Bax in protein levels ($P < 0.05$). Taken together, downregulation of *PRMT5* inhibited cell proliferation and induced the apoptosis of hepatocellular carcinoma cells. It may provide a new therapeutic target for the clinical treatment of hepatocellular carcinoma.

Keywords protein arginine methyltransferase 5 (*PRMT5*); hepatocellular carcinoma; proliferation; apoptosis

肝癌是一种高度恶性的消化道肿瘤。目前研究已发现多种途径在肝癌的发展中扮演着重要的角色,特别是那些涉及血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)介导的血管生成、Wnt、PI3K/AKT/mTOR、AMP激活的蛋白激酶(AMP-activated protein kinase, AMPK)和c-Met等。因此,从分子水平探索肝癌发生发展的机制,并将特征性分子作为抗肿瘤靶点,可为临床预防和治疗肝癌开辟新的途径。

蛋白质精氨酸甲基转移酶5(protein arginine methyltransferase 5, *PRMT5*)是一类将S-腺苷甲硫氨酸上的甲基转移至底物蛋白质中精氨酸胍基上的酶,可催化多种底物蛋白质甲基化,从而发挥不同的生物学功能^[1]。研究发现,*PRMT5*与肿瘤的发生发展密切相关。Hsu等^[2]和Aggarwal等^[3]发现,*PRMT5*影响细胞死亡信号通路以及恶性癌细胞形成。然而,目前关于*PRMT5*在肝癌发生发展中的生物学功能和分子调控的研究鲜有报道。为探讨*PRMT5*在肝癌发生发展中的作用,本研究构建了*PRMT5* shRNA干扰质粒,筛选出稳定低表达*PRMT5*的细胞株,研究*PRMT5*对细胞增殖、凋亡作用的影响。

1 材料与方法

1.1 材料

人肝癌细胞株SMMC-7721、BEL-7402和人胚肾293T细胞购于中国科学院上海细胞库;慢病毒骨架质粒pLKO.1-TRC vector购于Addgene公司;慢病毒重组对照组质粒pLKO.1-sh-EGFP、辅助包装质粒psPAX2、pMD2.G为江苏大学医学院生物学实验室保存;DMEM培养基购于HyClone公司;胎牛血清FBS购于Gibco公司;限制性内切核酸酶(*EcoR* I、*Age* I)购于Fermentas公司;PCR试剂盒、质粒提取试剂盒、胶回收试剂盒购于TaKaRa公司;细胞凋亡试剂盒购于BD公司;转染试剂PEI、嘌呤霉素购于Sigma公司;

CCK-8试剂盒购于康为世纪生物公司;鼠抗*PRMT5*单克隆抗体、Bax抗体、兔抗Caspase-3抗体、Bcl-2抗体购于Santa Cruz公司;兔抗cyclin B1抗体、cyclin D1抗体、cdc25B抗体、cdc20抗体购于Cell Signaling公司;鼠抗 β -tubulin抗体购于Bioworld公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 人肝癌细胞SMMC-7721、BEL-7402和人胚肾293T细胞接种于含10%胎牛血清的DMEM培养液中,于37 °C、5% CO₂恒温培养箱中培养。

1.2.2 *PRMT5* shRNA干扰载体构建 在Sigma公司官网搜索了与pLKO.1质粒相兼容的*PRMT5* shRNA序列,该序列已在肺癌A549细胞中证实了干扰效率达95%,其上游引物为:5'-CCG GGG CTC AAG CCA CCA ATC TAT GCT CGA GCA TAG ATT GGT GGC TTG AGC CTT TTT G-3',下游引物为:5'-AAT TCA AAA AGG CTC AAG CCA CCA ATC TAT GCT CGA GCA TAG ATT GGT GGC TTG AGC C-3'。引物序列由南京金斯瑞公司合成。用TE液稀释至1 μ g/ μ L,退火形成双链片段。限制性内切核酸酶*EcoR* I及*Age* I双酶切慢病毒骨架质粒pLKO.1-TRC,经1%琼脂糖凝胶电泳后,割胶回收双酶切产物,与退火产物链经T4 DNA连接酶连接后转化入超级感受态Stbl3细胞中,挑取单克隆进行菌液PCR鉴定。上游引物为:5'-GCA GGG ATA TTC ACC ATT ATC GTT TCA GA-3',下游引物为:5'-TGC CAT TTG TCT CGA GGT CG-3',产物长度257 bp。取阳性菌液培养后提取质粒,送南京金斯瑞公司测序正确后用于后续慢病毒包装实验。

1.2.3 慢病毒包装 将对数生长期的293T细胞以4 \times 10⁶/孔铺于10 cm培养皿中,细胞贴壁后按4:3:1的比例将慢病毒质粒sh-*PRMT5*/sh-EGFP、慢病毒包装质粒psPAX2和穿梭质粒pMD2.G混匀,用PEI转染细胞,每皿共转质粒10 μ g,质粒与PEI质量体积比为

1:3。转染后48 h、72 h分别收取细胞上清液(即为病毒液), 4 °C 4 000 ×g离心10 min, -80 °C保存。

1.2.4 建立稳定低表达PRMT5细胞株 将对数生长长期的人肝癌细胞SMMC-7721、BEL-7402接种于6孔板中, 细胞汇合度达60%~70%后, 用病毒上清感染细胞, 每孔加入200 μL病毒液, 并换成含聚凝胺的培养液(使聚凝胺的最终浓度为8 μg/mL), 24 h后追加一次病毒。48 h后用嘌呤霉素的最低杀死浓度进行筛选。设立实验组(干扰PRMT5表达组)、对照组(干扰EGFP表达组)和空白对照组(未加病毒上清液)。

1.2.5 稳定低表达PRMT5细胞株的鉴定 用RIPA裂解液提取4种稳转细胞总蛋白, Western blot法检测细胞内PRMT5的蛋白质水平。用Trizol提取4种稳转细胞总RNA并逆转录成cDNA, qPCR检测细胞内PRMT5的mRNA水平。PRMT5上游引物序列为: 5'-GGA CGG AGA AGG GCA GAC TA-3', 下游引物序列为: 5'-CCC GCA TCC AGA ACA TGG AA-3'。GAPDH上游引物序列为: 5'-ACC ATC TTC CAG GAG CGA GAT-3', 下游引物序列为: 5'-ATG ACG AAC ATG GGG GCA TC-3'。

1.2.6 CCK-8法检测细胞增殖能力 将4种稳转细胞株以 2×10^3 /孔接种于96孔板中, 设立5个复孔, 分别于第1、2、3、4、5 d加入10 μL CCK-8溶液, 继续孵育2 h, 在酶联免疫检测仪490 nm处测量各孔的吸光度(D)值, 以空白对照(无细胞孔)调零。实验重复3次, 取平均值, 以时间为横轴、相对增殖率为纵轴绘制生长曲线图。

1.2.7 平板克隆形成实验 用0.25%胰蛋白酶将对数生长期的细胞消化后, 吹打成单个细胞悬浮在细胞培养液中, 细胞计数后以 1×10^3 /孔接种于6孔板中, 置于细胞培养箱培养, 2 d观察一次, 当出现肉眼可见的克隆时, 终止培养。去培养基, 固定, 染色, 显微镜下计数>50个细胞的克隆数。克隆形成率=(克隆形成数/接种细胞数)×100%。

1.2.8 Western blot检测增殖、凋亡相关蛋白的水平 用RIPA裂解液提取4种稳转细胞总蛋白, 取50 μg蛋白质在12% SDS-PAGE凝胶进行电泳, 湿转法转至PVDF膜上。加5%脱脂奶粉, 室温封闭1 h, 加入一抗(cyclin B1、cyclin D1、cdc20、cdc25B、Caspase-3、BAX、Bcl-2、PRMT5和β-Tubulin), 4 °C孵育过夜, 加入HRP标记的二抗室温孵育1 h, 用ECL发光试剂检测显影, 图像用灰度分析软件处理分析。

1.2.9 流式细胞术检测细胞凋亡 将4种稳转细胞株培养48 h后, 弃去培养液, 用不含EDTA胰蛋白酶消化后收集细胞, 1 000 r/min离心5 min, 用预冷的PBS洗涤细胞2次后, 用100 μL Binding buffer重悬细胞。在细胞悬液中加入5 μL Annexin V-FITC和5 μL PI混匀后避光室温孵育15 min, 再加入400 μL Binding buffer, 上机检测。每组实验重复3次。

1.3 统计学处理

采用SPSS 17.0软件进行统计学分析。计量数据用均数±标准差表示, 行t检验; $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 构建慢病毒重组质粒sh-PRMT5的鉴定结果

双酶切的慢病毒骨架pLKO.1-TRC质粒与干扰序列连接后转化, 挑取转化子进行菌液PCR(图1)。将阳性克隆菌落扩大培养后提取质粒送南京金斯瑞公司测序, 测序结果正确。

2.2 包装病毒、感染目的细胞并筛选获得低表达PRMT5稳转细胞株

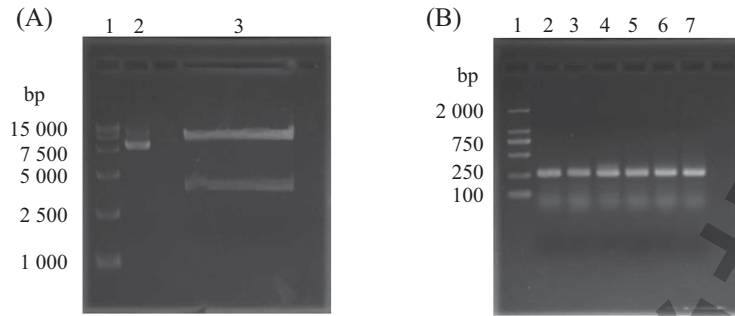
重组慢病毒质粒与包装质粒按比例转染入293T细胞后, 细胞上清液逐渐变黄, 分别于转染后48、72 h收集病毒上清, 并感染SMMC-7721、BEL-7402细胞, 用最低杀死浓度的嘌呤霉素筛选, 3 d后未感染慢病毒的空白组细胞完全死亡, 慢病毒感染组残留下被病毒感染上的细胞, 即稳定低表达PRMT5的细胞株。用嘌呤霉素最佳筛选浓度维持培养。提取蛋白质及总RNA。Western blot检测发现, 与对照组相比, 实验组PRMT5蛋白质水平明显降低(图2A)。qPCR结果显示, 实验组PRMT5 mRNA水平较对照组明显降低($P < 0.05$)(图2B)。

2.3 下调PRMT5对细胞增殖的影响

CCK-8结果显示, 与对照组相比, 实验组细胞增殖减慢, 在24 h即开始出现增殖抑制, 并随时间延长抑制现象越明显($P < 0.05$, 图3)。Western blot结果显示, 下调PRMT5的表达明显抑制cyclin B1、cyclin D1、cdc20、cdc25B的表达($P < 0.05$, 图4)。由此说明, 下调PRMT5的表达可以抑制SMMC-7721、BEL-7402细胞增殖。

2.4 下调PRMT5对克隆形成能力的影响

细胞接种后10 d可见克隆形成, 对照组细胞形成的克隆大且密集, 而实验组细胞形成的克隆相对

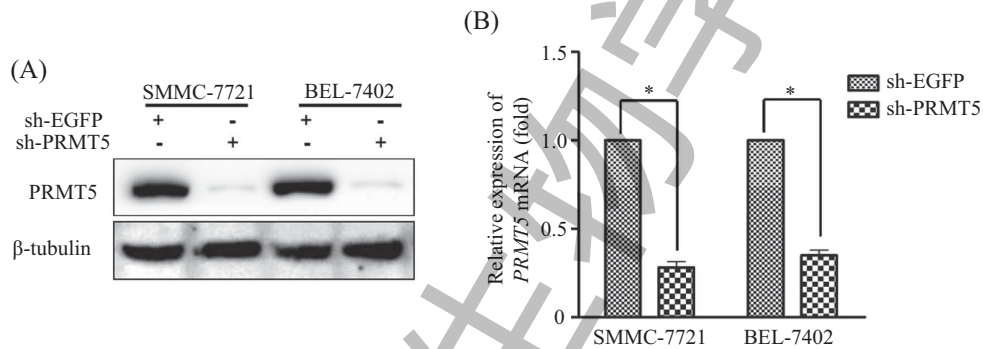


A: pLKO.1质粒(*EcoR* I、*Age* I)双酶切。1: DL 15 000 bp DNA marker; 2: pLKO.1质粒(8 901 bp); 3: pLKO.1质粒双酶切鉴定(*EcoR* I和*Age* I)。B: sh-PRMT5重组子菌液PCR鉴定。1: DL 2 000 bp DNA marker; 2~7: sh-PRMT5重组子菌液PCR。

A: digestion of pLKO.1 vector (*EcoR* I and *Age* I). 1: DL 15 000 bp DNA marker; 2: pLKO.1 vector (8 901 bp); 3: digestion of pLKO.1 vector (*EcoR* I and *Age* I). B: identification of bacterial PCR. 1: DL 2 000 bp DNA marker; 2~7: sh-PRMT5 bacterial PCR.

图1 载体构建

Fig.1 Plasmid construction

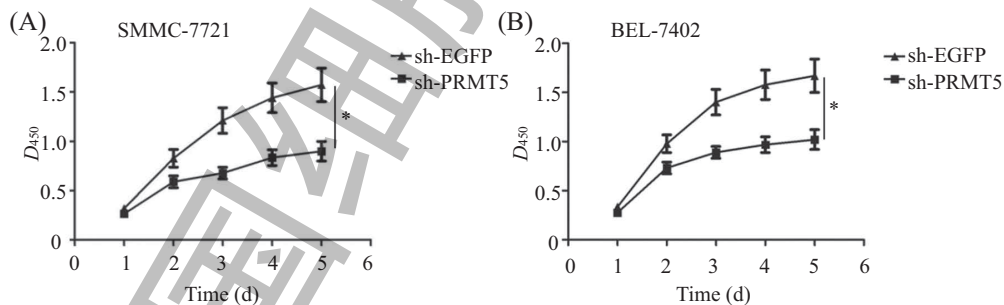


A: Western blot检测PRMT5蛋白质水平; B: qPCR检测PRMT5 mRNA水平, * $P < 0.05$ 。

A: the protein levels of PRMT5 in different groups detected by Western blot; B: the mRNA levels of PRMT5 in different groups detected by qPCR. * $P < 0.05$.

图2 shRNA沉默肝癌细胞株SMMC-7721和BEL-7402中PRMT5基因的验证结果

Fig.2 Identification of shRNA-mediated knockdown of PRMT5 in SMMC-7721 and BEL-7402 cells



A: CCK-8检测下调PRMT5的表达对SMMC-7721细胞增殖的影响, * $P < 0.05$; B: CCK-8检测下调PRMT5的表达对BEL-7402细胞增殖的影响, * $P < 0.05$ 。

A: the effects of PRMT5 downregulation on cell proliferation in SMMC-7721 cells detected by CCK-8, * $P < 0.05$; B: the effects of PRMT5 downregulation on cell proliferation in BEL-7402 cells detected by CCK-8, * $P < 0.05$.

图3 下调PRMT5的表达对SMMC-7721和BEL-7402细胞增殖的影响

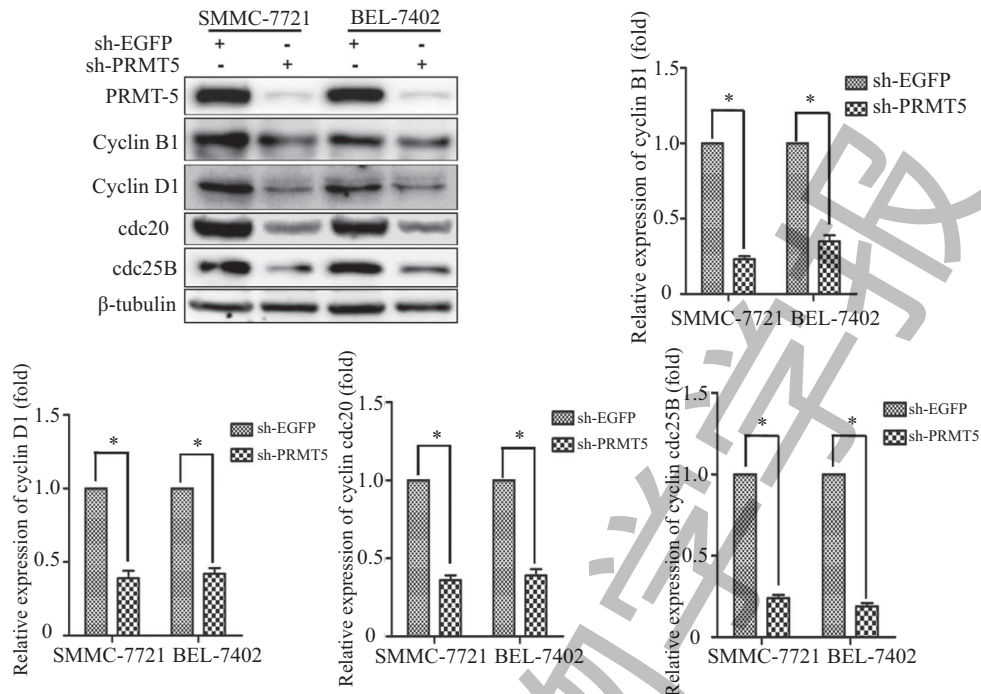
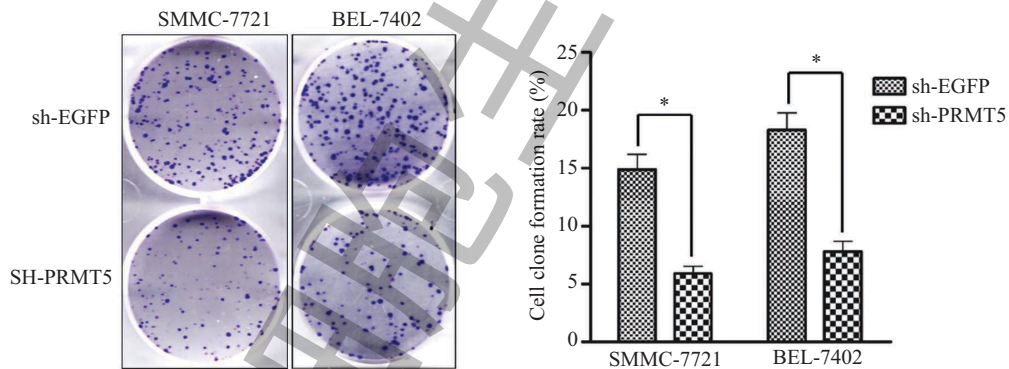
Fig.3 Effects of PRMT5 downregulation on cell proliferation in SMMC-7721 and BEL-7402 cells

小,且较稀疏。SMMC-7721对照组与实验组克隆形成率分别为14.9%和5.9%,BEL-7402对照组与实验组克隆形成率分别为18.3%和8.8%。由此说明,下调PRMT5的表达能明显抑制克隆形成,差异均有统计

学意义($P < 0.05$)(图5)。

2.5 下调PRMT5对细胞凋亡的影响

流式细胞术对4种稳转细胞株进行细胞凋亡检测(图6),凋亡细胞比例SMMC-7721 sh-

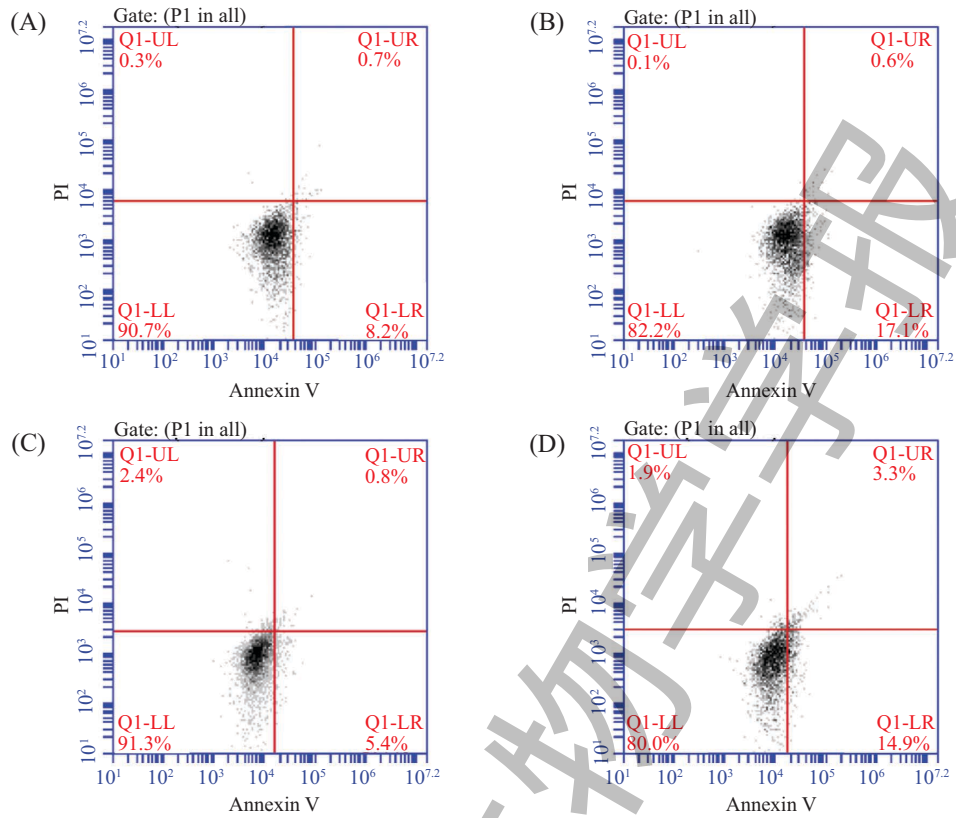
* $P < 0.05$.图4 下调*PRMT5*的表达对SMMC-7721和BEL-7402细胞增殖相关蛋白的影响Fig.4 Effects of *PRMT5* downregulation on proliferation-related protein in SMMC-7721 and BEL-7402 cells* $P < 0.05$.图5 下调*PRMT5*的表达对SMMC-7721和BEL-7402细胞克隆形成能力的影响Fig.5 Effects of *PRMT5* downregulation on cell colony formation in SMMC-7721 and BEL-7402 cells

EGFP组(8.37±0.76)%, SMMC-7721 sh-PRMT5组(18.18±0.93)%, BEL-7402 sh-EGFP组(6.04±0.45)%, BEL-7402 sh-PRMT5组(18.48±1.24)%。在肝癌细胞中干扰*PRMT5*的表达,细胞凋亡比例明显增加($P < 0.05$),差异具有统计学意义。在肝癌细胞SMMC-7721、BEL-7402中,低表达*PRMT5*能诱导Caspase-3表达($P < 0.05$),降低Bcl-2/Bax的比值($P < 0.05$),说明下调*PRMT5*的表达能诱导肿瘤细胞凋亡(图7)。

3 讨论

*PRMT5*属于蛋白质精氨酸甲基转移酶家族,该

家族中有9个主要的成员,根据其产生的甲基精氨酸的种类不同可分为4种主要的类型,*PRMT5*属于II型,能催化对称性二甲基精氨酸(symmetric dimethyl arginines, sDMA)生成^[4-5]。与其他家族成员不同的是,*PRMT5*参与调节多种细胞内蛋白质的相互作用。研究显示,在哺乳动物基因组中,有超过1%的基因编码甲基转移酶^[6]。*PRMT5*最初因可与Jak2相互作用而在人类细胞中被发现^[7]。*PRMT5*蛋白质主要定位于细胞质中,部分存在于细胞核中。*PRMT5*可甲基化组蛋白精氨酸位点,通过对称性和非对称性两种不同的修饰方式介导基因不同的调控活性,既可

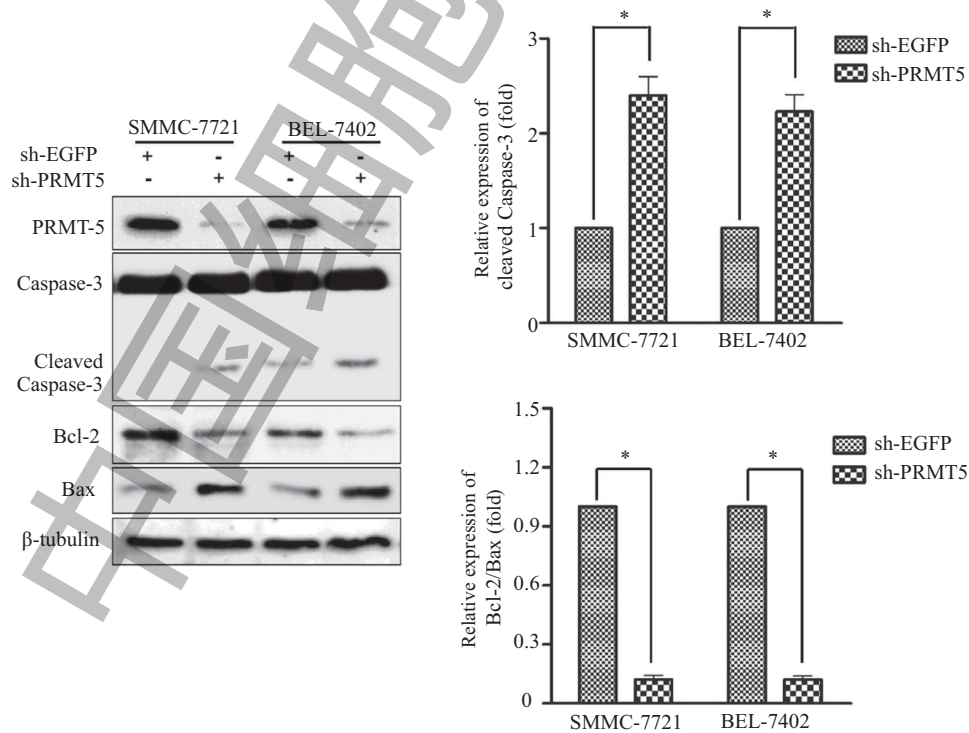


A: SMMC-7721 sh-EGFP组; B: SMMC-7721 sh-PRMT5组; C: BEL-7402 sh-EGFP组; D: BEL-7402 sh-PRMT5组。

A: the group of SMMC-7721 sh-EGFP; B: the group of SMMC-7721 sh-PRMT5; C: the group of BEL-7402 sh-EGFP; D: the group of BEL-7402 sh-PRMT5.

图6 下调PRMT5的表达对SMMC-7721和BEL-7402细胞凋亡的影响

Fig.6 Effects of PRMT5 downregulation on apoptosis in SMMC-7721 and BEL-7402 cells



*P<0.05.

图7 下调PRMT5对SMMC-7721和BEL-7402细胞凋亡相关蛋白的影响

Fig.7 Effects of PRMT5 downregulation on apoptosis-related protein in SMMC-7721 and BEL-7402 cells

以激活基因表达,又可以抑制基因表达。*PRMT5*的作用底物包括Myelin basic protein(MBP)、SmD1、D3、SmB/B'、LSM4和Coilin等蛋白质,其与不同的底物结合从而调控细胞内不同的生化反应^[8]。最近的研究还发现,*PRMT5*在肺癌、胃癌和生殖细胞癌中都有高表达,并和乳腺癌的预后相关^[9-11]。但其对肝癌细胞的影响及作用鲜有报道。

本研究发现,在肝癌细胞中干扰*PRMT5*的表达可明显抑制细胞增殖、降低增殖相关蛋白*cdc20*、*cdc25B*的表达,同时抑制细胞克隆形成能力。*cdc20*在细胞有丝分裂及G₁期与APC/C结合并使之活化,从而调控细胞周期。*cdc25B*作为一种蛋白磷酸酶可使CDC2去磷酸化并使之激活,这一步骤是真核细胞进入有丝分裂的关键。*cyclin B1*作为G₂期的周期蛋白,活化并与CDKs即CDC2形成复合物,促使细胞进行G₂/M期转变。*Cyclin D1*是参与细胞周期调控的周期素重要家族成员,在G₁/S期转换中发挥重要作用。研究表明,*PRMT5*可作为细胞周期与增殖的重要因子,其参与调控细胞增殖的主要机制可能为:*PRMT5*能与SWI/SNF形成复合体,通过修饰组蛋白组成成分H3R8和H4R3,进而抑制细胞周期调控基因和肿瘤抑制基因的转录^[12-13]。*siRNA*介导的基因敲低研究表明,在转录生长因子TGF- β 缺失的条件下,*PRMT5*、HDAC3和SKI共同介导*Smad7*的转录抑制,影响细胞增殖与分化^[14]。这些研究表明,*PRMT5*可与组蛋白修饰酶相互作用一起调节靶基因的表达,控制细胞的生长和增殖。在非组蛋白靶基因中,*PRMT5*能与P53作用参与调节细胞周期与细胞死亡^[15]。*Yang*等^[16]发现,*PRMT5*还参与调节DNA损伤引起的细胞凋亡。而本研究发现,干扰*PRMT5*的表达可促进细胞凋亡,充分说明*PRMT5*与细胞凋亡有关,但其调节凋亡的机制有待进一步研究。

本文在成功构建*PRMT5* shRNA干扰质粒并筛选出稳定低表达*PRMT5*的肝癌细胞株的基础上,研究了*PRMT5*对肝癌细胞增殖、细胞克隆形成能力及细胞凋亡作用的影响。结果表明,在肝癌细胞中干扰*PRMT5*的表达可明显抑制细胞增殖及细胞克隆形成能力,促进细胞凋亡,提示*PRMT5*作为一种癌基因,可能参与肝癌的发生、发展过程,但其具体分子机制有待进一步研究。同时,通过靶向干扰*PRMT5*来抑制肝癌细胞的增殖,诱导肝癌细胞的凋亡有望为肝癌治疗提供新思路。

参考文献 (References)

- 1 Baldwin RM, Morettin A, Cote J. Role of PRMTs in cancer: Could minor isoforms be leaving a mark? *World J Biol Chem* 2014; 5(2): 115-29.
- 2 Hsu JM, Chen CT, Chou CK, Kuo HP, Li LY, Lin CY, *et al.* Cross-talk between Arg 1175 methylation and Tyr 1173 phosphorylation negatively modulates EGFR-mediated ERK activation. *Nat Cell Biol* 2011; 13(2): 174-81.
- 3 Aggarwal P, Vaites LP, Kim JK, Mellert H, Gurung B, Nakagawa H, *et al.* Nuclear cyclin D1/CDK4 kinase regulates CUL4 expression and triggers neoplastic growth via activation of the PRMT5 methyltransferase. *Cancer Cell* 2010; 18(4): 329-40.
- 4 Yu Z, Chen T, Hebert J, Li E, Richard S. A mouse PRMT1 null allele defines an essential role for arginine methylation in genome maintenance and cell proliferation. *Mol Cell Biol* 2009; 29(11): 2982-96.
- 5 Tee WW, Pardo M, Theunissen TW, Yu L, Choudhary JS, Hajkova P, *et al.* Prmt5 is essential for early mouse development and acts in the cytoplasm to maintain ES cell pluripotency. *Genes Dev* 2010; 24(24): 2772-77.
- 6 Katz JE, Dlakic M, Clarke S. Automated identification of putative methyltransferases from genomic open reading frames. *Mol Cell Proteomics* 2003; 2(8): 525-40.
- 7 Pollack BP, Kottenko SV, He W, Izotova LS, Barnoski BL, Pestka S. The human homologue of the yeast proteins Skb1 and Hsl7p interacts with Jak kinases and contains protein methyltransferase activity. *J Biol Chem* 1999; 274(44): 31531-42.
- 8 Bedford MT, Richard S. Arginine methylation an emerging regulator of protein function. *Mol Cell* 2005; 18(3): 263-72.
- 9 Eckert D, Biermann K, Nettersheim D, Gillis AJ, Steger K, Jack HM, *et al.* Expression of BLIMP1/PRMT5 and concurrent histone H2A/H4 arginine 3 dimethylation in fetal germ cells, CIS/IGCNU and germ cell tumors. *BMC Dev Biol* 2008; 8: 106.
- 10 Kim JM, Sohn HY, Yoon SY, Oh JH, Yang JO, Kim JH, *et al.* Identification of gastric cancer-related genes using a cDNA microarray containing novel expressed sequence tags expressed in gastric cancer cells. *Clin Cancer Res* 2005; 11(2 Pt 1): 473-82.
- 11 Powers MA, Fay MM, Factor RE, Welm AL, Ullman KS. Protein arginine methyltransferase 5 accelerates tumor growth by arginine methylation of the tumor suppressor programmed cell death 4. *Cancer Res* 2011; 71(16): 5579-87.
- 12 Pal S, Baiocchi RA, Byrd JC, Grever MR, Jacob ST, Sif S. Low levels of miR-92b/96 induce PRMT5 translation and H3R8/H4R3 methylation in mantle cell lymphoma. *EMBO J* 2007; 26(15): 3558-69.
- 13 Wang L, Pal S, Sif S. Protein arginine methyltransferase 5 suppresses the transcription of the RB family of tumor suppressors in leukemia and lymphoma cells. *Mol Cell Biol* 2008; 28(20): 6262-77.
- 14 Tabata T, Kokura K, Ten Dijke P, Ishii S. Ski co-repressor complexes maintain the basal repressed state of the TGF-beta target gene, SMAD7, via HDAC3 and PRMT5. *Genes Cells* 2009; 14(1): 17-28.
- 15 Scoumanne A, Zhang J, Chen X. PRMT5 is required for cell-cycle progression and p53 tumor suppressor function. *Nucleic Acids Res* 2009; 37(15): 4965-76.
- 16 Yang M, Sun J, Sun X, Shen Q, Gao Z, Yang C. Caenorhabditis elegans protein arginine methyltransferase PRMT-5 negatively regulates DNA damage-induced apoptosis. *PLoS Genet* 2009; 5(6): e1000514.