



UNIVERSITÄTS**medizin.**
Institut für Pharmakologie
AG Kleinert

MAINZ

JOHANNES GUTENBERG
UNIVERSITÄT MAINZ



Analysen zur Expression proinflammatorischer Mediatoren in humanen Zellkulturmodellen und murinen Tiermodellen chronisch- inflammatorischer Erkrankungen

Dissertation

zur Erlangung des Grades

„Doktor der Naturwissenschaften“

am Fachbereich Biologie der Johannes Gutenberg – Universität Mainz

Diese Arbeit wurde vorgelegt von

Ingrid Casper

Geboren am 11.01.1984 in Tuß / Kirgistan,

Mainz, 2013

Tag der Prüfung: 09.07.2013

Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre hiermit, dass ich diese Dissertation selbstständig ohne Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Quellen und Hilfsmittel verfasst habe. Alle den benutzten Quellen wörtlich oder sinngemäß entnommenen Stellen sind als solche einzeln kenntlich gemacht.

Diese Arbeit ist bislang keiner anderen Prüfungsbehörde vorgelegt worden und auch nicht veröffentlicht worden.

Ich bin mir bewusst, dass eine falsche Erklärung rechtliche Folgen haben wird.



Ingrid Casper

Inhaltsverzeichnis

| | |
|---|-----------|
| Inhaltsverzeichnis | IV |
| Zusammenfassung | IX |
| Abstract | XI |
| Abkürzungsverzeichnis | XII |
| Tabellenverzeichnis | XVI |
| Abbildungsverzeichnis..... | XVII |
| 1 Einleitung | 1 |
| 1.1 Regulationsebenen der Genexpression | 1 |
| 1.1.1 Regulation der Transkription..... | 1 |
| 1.1.2 mRNA-Prozessierung | 3 |
| 1.1.3 Kern-Zytoplasmatransport | 3 |
| 1.1.4 mRNA-Stabilität | 4 |
| 1.1.5 Regulation der Translation..... | 5 |
| 1.1.6 Posttranslationelle Modifikation | 6 |
| 1.2 Die humane induzierbare NO-Synthase (iNOS) | 7 |
| 1.2.1 Isoformen der NO-Synthase | 7 |
| 1.2.2 Funktionen von NO..... | 7 |
| 1.2.3 Regulation der iNOS-Expression | 9 |
| 1.3 PolyA-bindende Proteine (PABP)..... | 12 |
| 1.3.1 Isoformen und Lokalisation von PolyA-bindenden Proteinen | 13 |
| 1.3.2 Funktionen von PABP | 14 |
| 1.3.3 Regulation von PABP | 15 |
| 1.4 Rheumatoide Arthritis (RA) | 16 |
| 1.4.1 Die Pathogenese der RA | 17 |
| 1.4.2 Behandlung der RA | 19 |

| | | |
|-------|--|----|
| 1.4.3 | Sekundärmetabolite aus Pilzen als neue therapeutische Option | 20 |
| 1.5 | Die Rolle von microRNAs (miRNAs) in der rheumatoiden Arthritis (RA) | 22 |
| 1.5.1 | Die Biogenese von microRNAs | 22 |
| 1.5.2 | Funktion von microRNAs | 23 |
| 1.5.3 | Die Rolle von microRNAs in der rheumatoiden Arthritis (RA) | 24 |
| 1.6 | Das Tiermodell der Kollagen-induzierten Arthritis (CIA) | 25 |
| 1.7 | Lipopolysaccharid (LPS)-induziertes Inflammationsmodell in der Maus | 26 |
| 2 | Material | 27 |
| 2.1 | Geräte | 27 |
| 2.2 | Verbrauchsmaterialien | 28 |
| 2.3 | Chemikalien | 28 |
| 2.4 | Reagenzien und Kits | 30 |
| 2.5 | Lösungen und Puffer | 31 |
| 2.6 | Antikörper | 36 |
| 2.7 | Enzyme | 37 |
| 2.8 | Plasmide | 37 |
| 2.9 | Oligonukleotide | 40 |
| 2.10 | Zelllinien | 43 |
| 2.11 | Bakterien | 43 |
| 2.12 | Substanzen | 44 |
| 3 | Methoden | 45 |
| 3.1 | Zellbiologische Methoden | 45 |
| 3.1.1 | Kultivierung eukaryoter Zellen | 45 |
| 3.1.2 | Kryokonservierung und Rekultivierung eukaryoter Zellen .. | 45 |
| 3.1.3 | Bestimmung der Lebendzellzahl | 46 |
| 3.1.4 | Stimulation eukaryoter Zellen | 46 |
| 3.1.5 | Transfektion eukaryoter Zellen | 46 |

| | | |
|------------|--|----|
| 3.2 | Proteinbiochemische Methoden | 47 |
| 3.2.1 | Isolierung von Proteinen aus Zellen und Geweben | 47 |
| 3.2.2 | Photometrische Quantifizierung von Gesamtprotein nach Bradford | 48 |
| 3.2.3 | Anreicherung von Proteinen | 48 |
| 3.2.4 | SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-PAGE) | 48 |
| 3.2.5 | Immundetektion mittels Western Blot Analyse | 50 |
| 3.2.6 | Luciferase Reportergen Analysen | 50 |
| 3.3 | Molekularbiologische Methoden | 51 |
| 3.3.1 | Isolierung von Ribonukleinsäuren (RNA) aus Zellen und Geweben | 51 |
| 3.3.2 | Quantifizierung von Nukleinsäuren | 52 |
| 3.3.3 | Reverse Transkription | 52 |
| 3.3.4 | Quantitative <i>Real Time</i> Polymerasekettenreaktion (qRT- PCR) | 53 |
| 3.3.5 | microRNA PCR-Arrays..... | 55 |
| 3.3.6 | Kontrolle der RNA-Integrität..... | 55 |
| 3.3.7 | <i>In vitro</i> Transkription zur Herstellung biotinylierter RNA- Sonden | 56 |
| 3.3.8 | Streptavidin-Biotin gekoppelte RNA- Affinitätschromatographie – Pull down Experimente..... | 56 |
| 3.3.9 | Klonierung von DNA Fragmenten | 57 |
| 3.4 | Tierversuche | 61 |
| 3.4.1 | Typisierung von Mäusen | 61 |
| 3.4.2 | Das Modell der kollagen-induzierten Arthritis (CIA) | 62 |
| 3.4.3 | Behandlung der kollagen-induzierten Arthritis (CIA)..... | 63 |
| 3.4.4 | Lipopolysaccharid (LPS)-induziertes Inflammationsmodell | 63 |
| 3.5 | Statistik | 63 |
| 4 | Ergebnisse | 65 |
| 4.1 | Regulation der proinflammatorischen Genexpression durch das zytosolische PolyA-bindende Protein (PABP)..... | 65 |

| | | |
|-------|---|------------|
| 4.1.1 | Herabregulation von PABP in DLD-1 Zellen | 65 |
| 4.1.2 | Wirkung der Herabregulation von PABP auf proinflammatorische Mediatoren | 66 |
| 4.1.3 | Wirkung der Herabregulation der PABP-Expression auf die Promotoraktivität des humanen iNOS-Promotrs..... | 69 |
| 4.1.4 | Einfluss von PABP auf die mRNA-Stabilität..... | 70 |
| 4.1.5 | Bindung von PABP an die 5'- und 3'UTR der humanen iNOS | 71 |
| 4.1.6 | Reportergen-Analysen mit Konstrukten der 5'- und 3'UTR der humanen iNOS mRNA | 77 |
| 4.2 | Regulation proinflammatorischer Mediatoren im Modell der kollagen-induzierten Arthritis (CIA)..... | 84 |
| 4.2.1 | Wirkung von Sekundärmetaboliten aus Pilzen im LPS-induzierten Entzündungsmodell..... | 84 |
| 4.2.2 | Wirkung von Sekundärmetaboliten aus Pilzen in der kollagen-induzierten Arthritis (CIA) | 88 |
| 4.2.3 | Regulation von microRNAs in der kollagen-induzierten Arthritis (CIA) | 101 |
| 4.2.4 | Regualtion vin microRNAs in murinen Makrophagen | 103 |
| 5 | Diskussion | 105 |
| 5.1 | Einfluss des zytosolischen PolyA-bindenen Proteins (PABP) auf die Genexpression der humanen induzierbaren NO-Synthase (iNOS) | 105 |
| 5.2 | Wirkung von Sekundärmetaboliten aus Pilzen auf proinflammatorische Mediatoren..... | 112 |
| 5.2.1 | Wirkung von Gallielalacton (Gal) im LPS-induzierten Entzündungsmodell und in der kollagen-induzierten Arthritis (CIA)..... | 113 |
| 5.2.2 | Wirkung von Oxacyclododecindion (Oxa) im LPS-induzierten Entzündungsmodell und in der kollagen-induzierten Arthritis (CIA)..... | 115 |
| 5.2.3 | Wirkung von S-Curvularin (SC) in der kollagen-induzierten Arthritis (CIA) | 116 |
| 5.2.4 | microRNAs im Modell der kollagen-induzierten Arthritis (CIA)..... | 117 |

| | | | |
|----------|----------------------------|--|------------|
| | 5.2.5 | Regulation von microRNAs in murinen Makrophagen | 119 |
| 6 | Literatur | | 120 |
| 7 | Publikationen | | 131 |

Zusammenfassung

Die humane induzierbare NO-Synthase (iNOS) spielt bei zahlreichen Erkrankungen wie Asthma, Krebs und der rheumatoiden Arthritis eine entscheidende Rolle. Durch Fehlregulation der iNOS-Expression kommt es häufig zu massiven Gewebeschädigungen. Aus diesem Grund ist es wichtig die Mechanismen der Genregulation der iNOS-Expression zu verstehen. Bei Affinitätschromatographie-Analysen wurde das zytosolische PolyA-bindende Protein (PABP) als direkter Interaktionspartner der 3'UTR der humanen iNOS identifiziert. Weitere Bindungsanalysen konnten eine spezifische Bindestelle für PABP in der 5'UTR und zwei Bindestellen im AU-reichen Bereich der 3'UTR der humanen iNOS nachweisen. Eine siRNA-medierte Herabregulation von PABP mit Hilfe der stabilen Expression spezifischer siRNAs in DLD-1 Zellen (siPABP Zellen) zeigte eine signifikant verringerte Expression der humanen iNOS und damit einhergehend eine verringerte NO-Produktion nach Zytokinstimulation. Promotoranalysen zeigten keine Veränderung der Induzierbarkeit des humanen 16 kb iNOS-Promotors in siPABP Zellen. RNA-Stabilitätsanalysen zeigten einen verstärkten Abbau der iNOS-mRNA in diesen Zellen, so dass davon auszugehen ist, dass die Regulation der humanen iNOS über die mRNA-Stabilität erfolgt. Reportergen-Analysen mit Plasmiden, welche die 5' und/oder 3'UTR Sequenzen der humanen iNOS mit den identifizierten PABP-Bindestellen oder Mutationen in diesen Bindestellen enthielten, zeigten, dass PABP die iNOS-mRNA über die 5'UTR stabilisiert und anscheinend über die 3'UTR einen destabilisierenden Effekt auf die mRNA ausübt. Ebenfalls scheint PABP über die 3'UTR die Translation der iNOS mRNA zu hemmen. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass PABP, über seine allgemeinen Funktionen hinaus, eine spezifische Rolle in der Regulation der Expression der humanen iNOS einnimmt.

Die rheumatoide Arthritis (RA) ist eine chronisch entzündliche Autoimmunerkrankung, welche überwiegend die peripheren Gelenke der Hände und Füße betrifft. Die aktuellen Therapiemöglichkeiten sind immer noch mit einer Vielzahl von Nebenwirkungen behaftet und führen nicht zur vollständigen Remission der Erkrankung, so dass die Entwicklung neuer Medikamente unerlässlich ist. In dieser Arbeit wurden die antiinflammatorischen Substanzen Gallielalacton (Gal) und Oxacyclododecindion (Oxa) im Mausmodell der kollagen-induzierten Arthritis (CIA) getestet. Leider waren beide Substanzen nicht in der Lage die Symptome der CIA zu vermindern, obwohl beide im Modell der LPS-induzierten akuten Entzündung die Expression proinflammatorischer Mediatoren senken konnten. Die Substanz S-Curvularin (SC) hat sich im CIA-Modell bereits bewährt und wurde in dieser Arbeit weiter untersucht. SC war in der Lage die Expression knorpel- und knochendestruktiver Markergene signifikant zu verringern.

In der vorliegenden Arbeit wurden neue microRNAs identifiziert, die in der Pathogenese der CIA eine Dysregulation zeigen. Die Expression dieser microRNAs wurde von SC wieder auf das Normalniveau gebracht, so dass SC eine vielversprechende Substanz in der Therapie chronisch inflammatorische Erkrankungen sein könnte. Die neu identifizierten CIA-relevanten microRNAs könnten als neue RA-Marker oder als Zielstrukturen für neue Medikamente dienen.

Abstract

The human inducible nitric oxide synthase (iNOS) plays an important role in multiple human diseases like asthma, tumor development, and rheumatoid arthritis. An aberrant regulation of iNOS-expression leads to a massive tissue destruction. Therefore it is important to understand the mechanisms of iNOS-regulation. Affinity purification using the 3'UTR of the human iNOS mRNA identified the cytosolic poly(A)-binding protein (PABP) as a direct interacting partner of the human iNOS 3'UTR. Further binding-analyses revealed a specific binding site of PABP in the 5'UTR and two binding sites in the AU-rich sequence of the 3'UTR. Downregulation of PABP expression by RNA interference (siPABP cells) resulted in a marked reduction of cytokine-induced iNOS mRNA expression and thereby in a reduction of iNOS-mediated NO-production. Reporter gene analyses showed no change of the inducibility of the human 16 kb iNOS promoter in siPABP cells. In contrast, the degradation of iNOS-mRNA was accelerated in siPABP cells. These results indicate a regulation of iNOS expression on mRNA-stability level. Reporter gene analyses with plasmids containing the PABP binding sites and mutations of these binding sites showed a stabilizing effect of PABP on iNOS-mRNA by binding to the 5'UTR. But PABP seems to have a destabilizing effect by binding to the 3'UTR on mRNA level as well as on translational level. These findings show that PABP, beside its normal functions, takes an important and specific role in the regulation of human iNOS expression.

Rheumatoid arthritis (RA) is a chronic inflammatory autoimmune disease predominantly affecting the peripheral joints of hands and feet. Recent therapies are afflicted with lots of severe side effects and cannot lead to remission. Therefore the development of new antiinflammatory drugs is essential. In this work the antiinflammatory compounds Gallielactone (Gal) and Oxacyclododecindion (Oxa) were tested in the mouse model of collagen induced arthritis (CIA). Unfortunately neither Gal nor Oxa had the ability to reduce the symptoms of CIA although both were able to reduce inflammatory marker genes in a mouse model of LPS-induced acute inflammation. The antiinflammatory compound S-Curvularin (SC) was able to reduce CIA-symptoms in earlier work and was further examined in this work. SC decreased the expression of marker genes involved in bone and cartilage destruction likely by reducing osteoclast proliferation.

Three microRNAs were newly identified to be dysregulated in the pathogenesis of CIA. SC was found to normalize the expression of these microRNAs back to the value of control mice. Therefore SC may serve as a promising structure for the development of new therapeutics for the treatment of chronic inflammatory diseases like RA. Further the newly identified microRNAs may be used as RA-marker or as targets for new therapeutic options.

Abkürzungsverzeichnis

| | |
|------------------------|---|
| ACPA | <i>Anti-citrullinated protein antibodies</i> |
| Ago | Argonaut-Proteine |
| AHP | Alkyl Hydroperoxide Reduktase |
| API | <i>Activating Protein1</i> |
| APC | Antigen-präsentierende Zellen |
| APS | Ammoniumpersulfat |
| ARE | AU-reiche Elemente |
| ARS | A-reiche Sequenz |
| ATP | Adenosintriphosphat |
| AUF1 | <i>ARE-mRNA decay factor</i> |
| BH₄ | 5,6,7,8-Tetrahydrobiopterin |
| bp | Baasenpaare |
| BSA | <i>Bovine serum albumin</i> |
| Ca²⁺ | Calcium-Ion |
| Calm | Calmodulin |
| CCL | <i>CC chemokine ligand</i> |
| Ccr4 | <i>CC chemokine receptor type 4</i> |
| cDNA | Komplementäre DNA |
| CFA | Komplettes freund'sches Adjuvans |
| CIA | Kollagen-induzierte Arthritis |
| CIAP | <i>calf intestinal alkaline phosphatase</i> |
| CII | Kollagen Typ II |
| CM | Zytokinmix |
| CO | Kontrolle |
| COX2 | Cyclooxygenase 2 |
| CRM1 | <i>Chromosome region maintenance 1</i> |
| CtsK | KatepsinK |
| CXCL | <i>Chemokine (C-X-C motif) ligand</i> |
| Dcp1/2 | <i>decapping protein</i> |
| DEPC | Diethylpyrocarbonat |
| Dex | Dexamethason |
| DGCR8 | <i>DiGeorge syndrome critical region gene 8</i> |
| DMARD | <i>disease modifying anti-rheumatic drugs</i> |
| DMEM | <i>Dulbecco's modified Eagle Medium</i> |
| DMSO | Dimethylsulfoxid |
| DNA | Desoxyribonukleinsäure (<i>deoxyribonucleic acid</i>) |
| dNTP | Desoxy Nukleotidtriphosphat |
| DTT | 1,4 Dithiothreitol |
| EDTA | Ethylendiamintetraacetat |
| eIF | Eukaryotischer Initiationsfaktor |
| ELAV | <i>embryonic lethal abnormal vision</i> |
| eNOS | Endotheliale NO-Synthase |
| EoE | <i>End over end</i> |
| eRF | Eukaryptischer <i>Release</i> -Faktor |

Abkürzungsverzeichnis

| | |
|---------------------------------|---|
| EtOH | Ethanol |
| FACS | Fluoreszenz aktiviertem Zell Sortieren |
| FCS | <i>fetal calf serum</i> |
| FGF | <i>Fibroblast growth factors</i> |
| FKBP | <i>FK506 binding protein</i> |
| FLS | <i>fibroblast-like synoviocytes</i> |
| FoxO | <i>Forkhead-Box-Protein</i> |
| Frag | Fragment |
| FRAP | <i>FKBP and rapamycin-associated protein</i> |
| FUR | <i>Ferric Uptake Regulatory protein</i> |
| Gal | Galiellalacton |
| GAPDH | Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase |
| GFP | grün fluoreszierende Protein |
| GIT | Guanidiniumisothiocyanat |
| GMP | Guanosinmonophosphat |
| GSH | <i>Glutathione</i> |
| GST | <i>Glutathione S-transferase</i> |
| GTP | Guanidintriphosphat |
| HLA-A | <i>human leukocyte antigen A</i> |
| HLA-DRB | <i>HLA class II histocompatibility antigen, DRB1-9 beta chain</i> |
| HMG1/Y | <i>High Mobility Group Family</i> |
| HuR | <i>Human antigen R</i> |
| ICAM | <i>intercellular adhesion molecules</i> |
| IFNR | Interferon Rezeptor 1/2 |
| IFN-γ | Interferon- |
| IgG | ImmunglobulinG |
| IKK | Inhibitor der κ B Kinase |
| IL | Interleukin |
| iNOS | Induzierbare NO-Synthase |
| IP | interperitoneal |
| IP-10 | <i>IFN-γ induced protein 10</i> |
| iPABP | Induzierbares PABP |
| IRAK | Interleukin-1 Rezeptor-assoziierte Kinase |
| IRF1 | <i>Interferon Response Factor1</i> |
| JAK | Janus Kinase |
| kb | Kilobaasen |
| KSRP | <i>KH-type splicing regulatory protein</i> |
| LBP | LPS-Bindeprotein |
| LPS | Lipopolysaccharid |
| Luc | Luciferase |
| MCP | <i>Membrane Cofactor Protein</i> |
| M-CSF | <i>Macrophage colony-stimulating factor</i> |
| Mip-1α | <i>Macrophage inflammatory protein-1α</i> |
| miRISC | <i>microRNA-induced silencing complex</i> |
| miRNA | Micro-Ribonukleinsäure |
| MKK2 | <i>Mitogen-activated Protein Kinase Kinase-2</i> |
| MMP | Matrixmetalloproteasen |

Abkürzungsverzeichnis

| | |
|-----------------------------------|--|
| mRNA | Boten-Ribonukleinsäure (<i>messenger ribonucleic acid</i>) |
| MS | Multiple Sklerose |
| mTOR | <i>mammalian target of rapamycin</i> |
| MTX | Methothrexat |
| MyD88 | <i>Myeloid Deffertiation Primary Response Gene88</i> |
| N₂O₃ | Distickstofftrioxid |
| NADPH | Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat |
| NES | Nukleäres Exportsignal |
| NF-AT | <i>Nuclear factor of activated T-cells</i> |
| NF-κB | <i>Nuclear Factor-κB</i> |
| NGD | <i>no-go-decay</i> |
| NMD | <i>nonsense-mediated decay</i> |
| nNOS | Neuronale NO-Synthase |
| NO | Stickstoffmonoxid |
| NO₃⁻ | Peroxynitrit |
| NSAID | <i>Nonsteroidal antiinflammatory drugs</i> |
| NSD | <i>non-stop-decay</i> |
| NTP | Nukleotidtriphosphat |
| Nxt | <i>NTF2-related export protein 1</i> |
| osk | <i>oskar</i> |
| Oxa | Oxacyclododecindion |
| OxyR | Peroxide Regulon |
| PABP | PolyA-bindendes Protein |
| PABPC1 | Zytosolisches PolyA-bindendes Protein |
| PABPN1 | Nukleäres PolyA-bindendes Protein |
| PACT | <i>protein activator of PKR</i> |
| Pan2/3 | <i>PAB-dependent poly(A)-specific ribonuclease subunit 2/3</i> |
| PARN | <i>Poly(A)-specific ribonuclease</i> |
| PBMC | periphere Blutmonozyten |
| PBS | <i>Phosphate buffered saline</i> |
| PCR | <i>Polymerase chain reaction</i> |
| PDGF | <i>Platelet-derived growth factor</i> |
| PLB | <i>passive lysis buffer</i> |
| Pol II | Große Untereinheit der RNA-Polymerase II |
| Pol2a | RNA-Polymerase II |
| PTB | <i>polypyrimidine tract-binding protein</i> |
| qRT-PCR | <i>Quantitative real time Polymerase chain reaction</i> |
| RA | Rheumatoide Arthritis |
| Ran | <i>RAs-related nuclear protein</i> |
| RANK | <i>receptor activator of NF-κB</i> |
| RANKL | <i>receptor activator of NF-κB ligand</i> |
| RANTES | <i>Regulated on Activation, Normal T cell Expressed and Secreted</i> |
| RF | Rheumafaktor |
| RNA-BP | Ribonukleinsäure-bindendes Protein |
| RRM | <i>RNA recognition motive</i> |
| rRNA | Ribosomale Ribonukleinsäure (<i>ribosomal ribonucleic acid</i>) |
| RT | Reverse Transkription |

Abkürzungsverzeichnis

| | |
|--------------------------------|--|
| SC | S-Curvularin |
| SDS | <i>sodium dodecyl sulfate</i> |
| SLE | Systemischer Lupus erythematoses |
| SMAD | <i>Small mothers against decapentaplegic</i> |
| SOD | Superoxide Dismutase |
| SoxRS | Superoxide Regulon |
| ST | <i>synovial tissue</i> |
| STAT | <i>Signal Transducer and Activator of Transcription</i> |
| TAB1 | TAK-bindendes Protein1 |
| TAE | <i>Tris-Acetate-EDTA</i> |
| TAP | <i>Transporter associated with antigen processing</i> |
| TBE | Tris-Borsäure-EDTA |
| TCR | T-Zell Rezeptor |
| TEMED | N, N, N, N-Tetramethylethylendiamin |
| TF | Transkriptionsfaktoren |
| TGF-β | <i>Transforming growth factor-β</i> |
| TLR4 | <i>Toll-Like-Rezeptor4</i> |
| TNF-α | <i>Tumor necrosis factor</i> |
| TOP | <i>terminal oligopyrimidine tract</i> |
| TPA | <i>Tissue plasminogen activator</i> |
| tPABP | Testis-PABP |
| TRAF | TNF Rezeptor-assoziiierter Faktor6 |
| TRAP | Tartrat-resistentente alkalische Phosphatase |
| TRBP | <i>RISC-loading complex subunit</i> |
| tRNA | Transfer-Ribonukleinsäure (<i>transfer ribonucleic acid</i>) |
| TTP | Tristetraprolin |
| UTP | Uridintriphosphat |
| UTR | Untranslatierte Region |
| VCAM | <i>Vascular cell adhesion protein</i> |
| VEGF | <i>Vascular endothelial growth factor</i> |
| Xrn1 | <i>exoribonuclease 1</i> |
| ZVTE | Zentrale Versuchstiereinrichtung |
| β2M | β -2-Mikroglobulin |

Tabellenverzeichnis

| | |
|--|----|
| Tabelle 1: Verwendete Geräte | 27 |
| Tabelle 2: Plastikwaren und Verbrauchsmaterialien | 28 |
| Tabelle 3: Verwendete Chemikalien und deren Hersteller/Bezugsfirma..... | 28 |
| Tabelle 4: Verwendete Reagenzien und Kits und deren Hersteller/Bezugsfirma | 30 |
| Tabelle 5: Verwendete Primärantikörper für Western Blot Analysen..... | 36 |
| Tabelle 6: Verwendete Sekundärantikörper für Western Blot Analysen..... | 36 |
| Tabelle 7: Verwendete Antikörper für FACS Analysen | 36 |
| Tabelle 8: Verwendete Enzyme..... | 37 |
| Tabelle 9: Verwendete Plasmide für Reporteranalysen | 37 |
| Tabelle 10: Verwendete Plasmide für stabile Transfektionen..... | 39 |
| Tabelle 11: Verwendete Plasmide zur <i>in vitro</i> Transkription von sense RNA Sonden. | 39 |
| Tabelle 12: Verwendete murine Primer/Sonden-Sets für qRT-PCR Analysen..... | 40 |
| Tabelle 13: Verwendete humane Primer/Sonden-Sets für qRT-PCR Analysen | 42 |
| Tabelle 14: Verwendete Zelllinien..... | 43 |
| Tabelle 15: Verwendete Substanzen..... | 44 |
| Tabelle 16: Färbeschema für V β -12 Typisierung | 61 |
| Tabelle 17: Bestimmung des Arthritisindex..... | 62 |

Abbildungsverzeichnis

| | |
|---|----|
| Abbildung 1: Schematische Darstellung der Transkriptionsmaschinerie von Pol II-transkribierten Genen..... | 2 |
| Abbildung 2: Mechanismus der NO-Synthese..... | 7 |
| Abbildung 3: Regulation der iNOS-Expression in murinen Makrophagen nach einer Infektion durch Bakterien..... | 10 |
| Abbildung 4: Die Beteiligung von PABP bei der Translation PolyA-Schwanz enthaltender mRNAs..... | 14 |
| Abbildung 5: Pathogenese der rheumatoiden Arthritis | 18 |
| Abbildung 6: Strukturformeln der Substanzen Galiellalacton, Oxacyclododecindion und S-Curvularin | 21 |
| Abbildung 7: Biogenese von microRNAs | 23 |
| Abbildung 8: MicroRNA-Expression in Gelenken von RA-Patienten..... | 24 |
| Abbildung 9: Herabregulation von PABP in DLD-1-siPABP Zellen. | 66 |
| Abbildung 10: Herabregulation der iNOS in DLD-1-siPABP Zellen..... | 67 |
| Abbildung 11: Herabregulation der NO-Produktion in DLD-1-siPABP Zellen..... | 68 |
| Abbildung 12: Herabregulation der mRNA-Expression von RANTES, Il-8 und COX2 in siPABP Zellen. | 68 |
| Abbildung 13: Die Induzierbarkeit des 16 kb-iNOS-Promotors war in DLD-1-siPABP Zellen unverändert. | 70 |
| Abbildung 14: Der Abbau der iNOS mRNA war in DLD-1-siPABP Zellen beschleunigt..... | 71 |
| Abbildung 15: Schematische Darstellung der mRNA der humanen iNOS. | 72 |
| Abbildung 16: UV-Crosslink Analysen mit GST-PABP zeigten eine Bindung von PABP an Bereiche der 5' und der 3'UTR der humanen iNOS. | 74 |
| Abbildung 17: Eingeführte Mutationen und Deletionen der PABP-Bindestellen | 75 |
| Abbildung 18: Streptavidin-Biotin gekoppelte RNA-Affinitätschromatographie mit Zellextrakten aus DLD-1 Zellen..... | 76 |
| Abbildung 19: Reporteragen-Analysen mit der 5'- und 3'UTRwt und mutierter bzw. deletierter PABP-Bindestelle im Exon 2 der 5'UTR der humanen iNOS | 78 |

| | |
|---|----|
| Abbildung 20: Reportergergen Analysen mit der human iNOS-3'UTR und mit Mutationen in der PABP-Bindestelle (mutA) und in den AREs 1-3 (mutB). | 79 |
| Abbildung 21: Reportergergen Analysen mit der 5'- und 3'UTR der human iNOS | 80 |
| Abbildung 22: Reportergergen Analysen mit Mutationen in der 5'- und 3'UTR der human iNOS | 81 |
| Abbildung 23: qRT-PCR Analysen mit Mutationen in der 5'- und der 3'UTR der human iNOS | 83 |
| Abbildung 24: Chemische Strukturformel von Galiellalacton..... | 85 |
| Abbildung 25: Expression proinflammatorischer Gene in PBMC und in der Milz im LPS-induzierten Entzündungsmodell nach Behandlung mit Galiellalacton (Gal). | 86 |
| Abbildung 26: Chemische Strukturformel von Oxacyclododecindion | 87 |
| Abbildung 27: Expression proinflammatorischer Gene in peripheren Blutmonocyten (PBMC), in der Leber und in der Milz im LPS-induzierten Entzündungsmodell nach Behandlung in Oxacyclododecindion (Oxa)..... | 88 |
| Abbildung 28: Bestimmung des Arthritis Index | 89 |
| Abbildung 29: Mittlerer Arthritis Index von CII-, CII+Dex- und CII + Gal-behandelten Tieren. | 90 |
| Abbildung 30: Expression proinflammatorischer Gene in peripheren Blutmonocyten (PBMC) von PBS-, CII- und CII + Gal-behandelten Tieren..... | 91 |
| Abbildung 31: Expression proinflammatorischer und knorpel- und knochendestruktiver Gene in Vorderpfoten von PBS-, CII- und CII + Gal-behandelten Tieren. | 93 |
| Abbildung 32: Expression proinflammatorischer Gene in PBMC von PBS-, CII- und CII + Oxa-behandelten Tieren..... | 95 |
| Abbildung 33: Mittlerer Arthritis Index von CII- und CII + Oxa(Öl)-behandelten Tieren. | 94 |
| Abbildung 34: Auswirkungen von Ölapplikationen auf die proinflammatorische Genexpression. | 95 |
| Abbildung 35: Mittlerer Arthritisindex von CII- und CII + Oxa-behandelten Tieren. . | 96 |
| Abbildung 36: Expression proinflammatorischer Gene in peripheren Blutmonocyten (PBMC) und in der Milz von PBS-, CII- und CII + Oxa-behandelten Tieren. | 97 |
| Abbildung 37: Expression proinflammatorischer und knorpel- und knochendestruktiver Gene in Hinterpfoten von PBS-, CII- und CII + Oxa-behandelten Tieren. | 98 |

Abbildung 38: Expression proinflammatorischer und knorpel- und knochendestruktiver Gene in Hinterpfoten von PBS-, CII-, CII + Dex- und CII + SC -behandelten Tieren. 100

Abbildung 39: Expression immunologisch relevanter microRNAs in CII-behandelten Tieren. 101

Abbildung 40: Expression von microRNAs in Pfoten von PBS-, CII- und CII + SC -behandelten Tieren..... 102

Abbildung 41: Expression von microRNAs in murinen Makrophagen (RAW-264.7)103

1 Einleitung

1.1 Regulationsebenen der Genexpression

Die Regulation der Genexpression in vielzelligen Eukaryoten findet auf zahlreichen Ebenen statt. Zunächst ist die Expression von Genen davon abhängig, wie zugänglich der DNA-Bereich ist, welcher transkribiert werden soll. Hierbei ist die Chromatinstruktur von entscheidender Bedeutung. Ist die DNA fest in die Histonkomplexe verpackt, kann die Transkriptionsmaschinerie nicht an die entsprechenden DNA-Abschnitte binden. Des Weiteren wird die Transkription selbst durch *cis*- und *trans*-agierende Mechanismen reguliert. Eine weitere Regulationsebene stellt die Prozessierung der prä-mRNA zu der reifen mRNA dar. Auch der Transport der reifen mRNA vom Kern in das Zytosol unterliegt strengen Kontrollmechanismen. Im Zytosol hängt die Expression von Genen wiederum von der Lebensdauer der mRNA und der Regulation der Translation ab. Weiter können Proteine auch posttranslationalen Modifikationen unterliegen. Die Prozesse vom Transkribieren der DNA bis zum vollständig funktionsfähigen Protein sind strikt reguliert und an jeder Station finden Qualitätsprüfungen statt.

1.1.1 Regulation der Transkription

Die Transkription bezeichnet das Umschreiben der DNA in RNA und wird von den RNA-Polymerasen I, II und III bewerkstelligt. Proteinkodierende Gene und Gene für microRNAs werden überwiegend von der RNA-Polymerase II transkribiert. Ribosomale RNA (rRNA) wird von der RNA-Polymerase I gebildet und transfer-RNAs (tRNA) von der RNA-Polymerase III. Die Transkription als eine Ebene der Genregulation wird durch zahlreiche Faktoren reguliert. Die Transkription proteinkodierender Gene beginnt mit der Initialisierung der Transkription, indem genspezifische Transkriptionsfaktoren an *cis*-regulierende DNA-Sequenzen binden und so das Signal dafür geben, welches Gen transkribiert werden soll. Jedes Gen besitzt einen basalen Promotor (meist eine TATA-Box), dessen Aktivität durch weitere DNA-Sequenzen wie GC-reichen Elemente, SP1-Boxen oder die CCAAT-Sequenz gesteigert werden kann [1, 2]. Des Weiteren kann die Transkription von *Enhancern* oder *Silencern* beeinflusst werden. Dies sind ebenfalls regulatorische DNA-Sequenzen, welche weit vor oder

hinter dem zu transkribierenden Gen liegen können. Nachdem das Gen bestimmt ist, welches transkribiert werden soll, wird der Präinitiationskomplex gebildet an dem neben der RNA-Polymerase II (Pol II) zahlreiche weitere Transkriptionsfaktoren, Mediatoren und chromatinmodifizierende und -remodulierende Faktoren beteiligt sind (**Abbildung 1**).

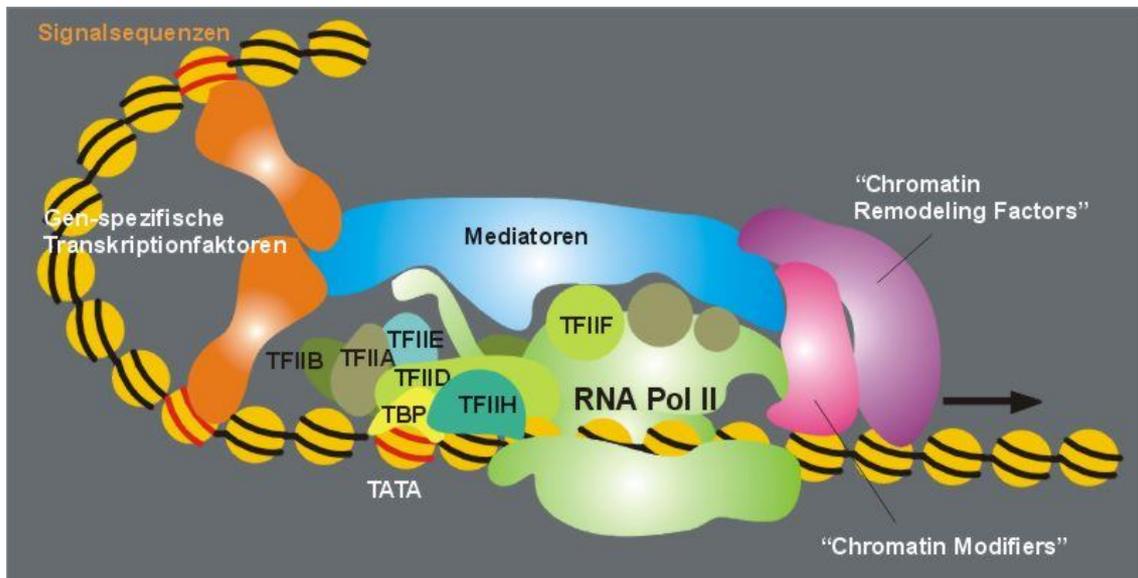


Abbildung 1: Schematische Darstellung der Transkriptionsmaschinerie von Pol II-transkribierten Genen

TBP: Tata-Box bindendes Protein, TFIIA, B, D, E, F und H: Transkriptionsfaktoren für die Pol II-vermittelte Transkription

http://biochemie.web.med.uni-muenchen.de/biotutor_2004/Transkriptionskomplex.jpg; 22.03.2013, 09:08 Uhr

Bei den Transkriptionsfaktoren handelt es sich zum einen um generelle Transkriptionsfaktoren (TFIIA-H), welche die Pol II benötigt und zum anderen um genspezifische Transkriptionsfaktoren, die ihrerseits vor Beginn der Transkription durch zahlreiche Signaltransduktionswege aktiviert werden. Sobald die Transkription der DNA begonnen hat, wird bereits während der Elongation das 5'-Ende der RNA von einem *Capping*-Enzym mit einem GMP-Rest versehen und von einer mRNA-*cap*-Methyltransferase an Position 7 methyliert. Die 5'-*Cap*-Struktur schützt die prä-mRNA vor dem vorzeitigem Abbau durch RNA-abbauende Enzyme und leitet die Translation im Zytosol ein. Die so entstandene prä-mRNA wird während und nach der Transkription weiter prozessiert, bevor diese den Zellkern verlässt.

1.1.2 mRNA-Prozessierung

Am Ende der Transkription eines Genes wird die Vorläufer-RNA (hnRNA) am 3'-Ende vom CPSF-(*Cleavage and polyadenylation specificity factor*)-Komplex (zumeist anhand der Sequenz AAUAAA als Polyadenylierungssignal) erkannt und der Komplex schneidet dann etwa 10–30 Nukleotide hinter dieser Sequenz die RNA. An das entstehende freie 3'-OH-Ende wird von der PolyA-Polymerase eine Abfolge von Adeninnukleotiden an das 3' Ende der prä-mRNA geheftet, so dass ein PolyA-Schwanz entsteht, welcher die RNA ebenfalls vor dem Abbau schützt. Noch während die Polyadenylierung stattfindet, wird der PolyA-Schwanz von nukleären PolyA-bindenden Proteinen (PABPN1) gebunden. Diese Bindung scheint die Prozessivität der PolyA-Polymerase zu erhöhen, so dass längere PolyA-Schwänze gebildet werden.

Nach der Transkription enthält die mRNA noch Introns, welche durch einen RNA-Proteinkomplex, das Spliceosom, aus der prä-mRNA entfernt werden müssen. Die fertige mRNA besteht aus einer 5'-*Cap*-Struktur, dem 5'untranslatierten Bereich (5'UTR) vor dem proteinkodierenden Bereich, einer untranslatierten Region am 3'-Ende (3'UTR) und dem PolyA-Schwanz. Die untranslatierten Regionen sind entscheidend für die posttranskriptionelle Regulation der Genexpression. Sie sind am Transport der mRNA aus dem Zellkern, an der Effektivität der Translation sowie der Stabilität der mRNA beteiligt [3, 4]. Wenn die mRNA fertig prozessiert ist, wird sie aus dem Zellkern in das Zytosol transportiert, wo dann die Translation und posttranslationelle Modifikationen stattfinden.

1.1.3 Kern-Zytoplasmtransport

In eukaryoten Zellen muss die mRNA aus dem Zellkern in das Zytoplasma transportiert werden, da dort die Translation der mRNA in Proteine stattfindet. Die Kernmembran ist mit zahlreichen Kernporen durchsetzt, welche sich aus großen Proteinkomplexen zusammensetzen und es nur kleinen Molekülen (9 nm oder < 20 kDa) erlauben durch die Kernmembran zu diffundieren. Der Transport größerer Proteine oder RNAs erfolgt aktiv durch Transportrezeptoren, den Karyopherinen. Für den Export aus dem Zellkern sind Exportine zuständig, welche Kernexport Signale (NES, *nuclear export signal*) an den zu transportierenden Molekülen erkennen. Der Export von RNAs aus dem Zellkern gehört ebenfalls zu den Regulationsmechanismen der Genexpression. Die RNAs im Zellkern werden während und nach der Transkription in Proteine verpackt, so dass sie einerseits vor dem

Abbau geschützt sind und andererseits ihren Bestimmungsort erreichen. Die Proteine TAP, Nxt, Aly und UAP56 sind wichtige Schlüsselkomponenten, welche die RNA nach ihrer Prozessierung zu den Kernporen dirigieren und durch ihre NES den Export der RNA in das Zytoplasma vermitteln [5-7]. Einige mRNAs werden jedoch über einen anderen Mechanismus aus dem Zellkern exportiert. Dazu gehören überwiegend mRNAs, welche AU-reiche Elemente (ARE) in ihrer 3'UTR enthalten. Diese werden sehr stark reguliert, da sie z. B. für Proteine kodieren, welche wichtige Rollen in Entzündungsprozessen einnehmen. Es konnte bereits gezeigt werden, dass der Export über CRM1 (*Chromosome region maintenance 1*) Teil der posttranskriptionellen Regulation der Gene für IFN α , COX2, die iNOS und HLA-A ist [8-11].

1.1.4 mRNA-Stabilität

Die mRNA-Stabilität bezeichnet die Lebensdauer von mRNAs im Zytosol. Sobald die mRNAs ins Zytosol transportiert wurden, unterliegen sie einem Gleichgewicht zwischen mRNA-Translation und -Abbau. Der Abbau von mRNAs kann auf drei verschiedenen Wegen stattfinden: über die Deadenylierung des PolyA-Schwanzes (3'-5'-Abbau), über die Degradation in 5'-3'-Richtung, welche mit der Entfernung der 5'-Cap-Struktur beginnt und in einigen Fällen über Endoribonukleasen. Der mRNA-Abbau in 3'-5'-Richtung ist der häufigste Abbau-Mechanismus in Säugerzellen und wird von insgesamt drei PolyA-Deadenylasen durchgeführt: (i) Die Pan2-Pan3 Deadenylase ist abhängig von dem cytosolischen PolyA-bindenden Protein (PABP) und initiiert die Deadenylierung. (ii) Der Ccr4-Not-Komplex führt dann die Deadenylierung fort [12]. (iii) Die dritte Deadenylase ist die PolyA-abhängige Exoribonuklease (PARN), welche den PolyA-Schwanz abbaut nachdem sie das 5'-Cap gebunden hat. Ist der PolyA-Schwanz abgebaut, wird das Exosom rekrutiert und führt den mRNA-Abbau zu Ende. Beim 5'-3'-mRNA-Abbau wird zunächst die 5'-Cap-Struktur durch einen Proteinkomplex aus Dcp1 und Dcp2 (*decapping protein*) und anderen Proteinen degradiert und die mRNA dann weiter durch Xrn1 (*exoribonuclease 1*) abgebaut [13]. Der mRNA-Abbau über Endoribonukleasen wird oft von kleinen nicht kodierenden RNAs (microRNAs) vermittelt (siehe 1.5.2).

Bei kurzlebigen mRNAs, welche z. B. bei Entzündungsprozessen eine zentrale Rolle einnehmen, da sie für proinflammatorische Proteine kodieren, finden sich oft AU-reiche, *cis*-regulatorische Elemente in der 3'UTR, die AREs. AREs werden in drei Klassen unterteilt:

Klasse I und II besitzen mehrere Kopien des Pentanukleotids AUUUA. Klasse I-AREs können die gleichmäßige Deadenylierung des PolyA-Schwanzes von mRNAs beeinflussen. Klasse II-AREs zeigen viele zusammenhängende oder überlappende AUUUA-Pentamere. Man findet sie häufig in der mRNA von Zytokinen wie IL-2 (Interleukin-2) oder TNF- α (Tumor Nekrose Faktor- α). Klasse III-AREs besitzen nur U-reiche Sequenzen. Mithilfe solcher AREs wird die Stabilität von vielen kurzlebigen mRNAs moduliert, indem sie von RNA-bindenden Proteinen (RNA-BP) erkannt werden. RNA-BP sind wichtige Faktoren in der Regulation der Genexpression. Sie sind an der mRNA-Prozessierung im Zellkern, dem Transport der reifen mRNAs ins Zytoplasma, der Lokalisation von mRNAs im Zytosol sowie der mRNA-Stabilität und der Translation beteiligt (zusammengefasst in [14]). Gut untersuchte RNA-BP sind z. B. die destabilisierenden Faktoren TTP (Tristetraprolin), KSRP (*KH-type splicing regulatory protein*) und AUF1 (*ARE-mRNA decay factor*). Als wichtigster stabilisierender Faktor wurde bisher HuR (*Human antigen R*) beschrieben. Des Weiteren hängt die mRNA-Stabilität von kleinen nicht proteinkodierenden einzellsträngigen RNA-Molekülen, den microRNAs (miRNA), ab. Die Funktion von miRNAs wird in **1.5.2** näher beschrieben.

1.1.5 Regulation der Translation

Die Translation ist ein wesentlicher Prozess der Genexpression und erfolgt an den Ribosomen im Zytosol. Bei der Regulation der Translation gibt es zwei Mechanismen. Zum einen wird die Translation über die Lokalisation der mRNA innerhalb der Zelle gesteuert und zum anderen über *cis*-agierende Sequenzen in der 5'- oder der 3'UTR und *trans*-regulierende Faktoren. Denn auch die Translation kann durch *enhancer* oder *silencer* in ihrer Aktivität beeinflusst werden. Die Lokalisation der mRNA innerhalb des Zytosols entscheidet darüber ob die mRNA translatiert, abgebaut oder gelagert wird [15]. Die Regulation der Lokalisation erfolgt sowohl über externe Stimuli als auch über interne Signalwege. Die Translation selbst wird unter anderem durch verschiedene Translationsinitiationsfaktoren und damit assoziierte Proteine gesteuert. Die Initiation der Translation wird von den Faktoren eIF-4E (*eucaryotic initiation factor 4E*), eIF-4G und PABP eingeleitet indem diese Faktoren die 40S-Untereinheit des Ribosoms und die daran befindlichen Initiationsfaktoren an die 5'UTR der zu transkribierenden mRNA rekrutieren [16]. Dieser Präinitiationskomplex scannt die mRNA bis zum Startkodon (AUG), an welchem die Translation dann beginnt. Die Translation kann

durch Modifikation der beteiligten Faktoren sowohl bei der Initiation, als auch bei der Elongation und der Termination reguliert werden. Auch über weiter vorne gelegene Signalwege wie z. B. den FRAP/mTOR-Signalweg (*FKBP and rapamycin-associated protein/mammalian target of rapamycin*) [17] kann die Regulation der Translation erfolgen.

Um die Translation nur von korrekt transkribierten und prozessierten mRNAs zu gewährleisten, gibt es Mechanismen, welche das Translatieren fehlerhafter mRNAs verhindern. Der *non-stop-decay* (NSD) verhindert die weitere Translation von mRNAs, welche kein Stoppcodon besitzen und führt diese mRNAs der Abbaumaschinerie zu. Der *no-go-decay* (NGD) initiiert den Abbau der mRNA, wenn die Elongation des Proteins zum Stocken gekommen ist. Und der *nonsense-mediated decay* (NMD) erkennt frühzeitige Stoppcodons auf der mRNA und verhindert so die Synthese von fehlerhaften Proteinen.

1.1.6 Posttranslationelle Modifikation

Posttranslationelle Modifikationen finden am endoplasmatischen Retikulum oder im Golgiapparat statt. Dort werden Proteine zunächst glykosyliert bevor sie die Zelle verlassen. Proteine, welche in die Zellmembran eingelagert werden oder an ihrer Oberfläche verankert werden, werden mit Lipidresten versehen.

Die Aktivität vieler Proteine wird über ihren Phosphorylierungsgrad gesteuert. Dazu müssen Kinasen schnell Phosphatgruppen anbringen oder Phosphatasen diese abspalten. Das Anfügen oder Abspalten solcher prosthetischer Gruppen ist dafür geeignet, schnelle Reaktionen in der Zelle auf sich ändernde Bedingungen zu gewährleisten.

Die Regulation der Genexpression auf allen bisher beschriebenen Ebenen ist essentiell für das Überleben und Differenzieren eines Organismus und Grundlage für eine angemessene Reaktion auf chemische Reize und sich verändernde Umweltbedingungen oder auf Infektionen durch Viren, Bakterien oder Pilze.

1.2 Die humane induzierbare NO-Synthase (iNOS)

1.2.1 Isoformen der NO-Synthase

NO-Synthasen haben ein Molekulargewicht von 130 – 160 kDa und synthetisieren Stickstoffmonooxid (NO) indem sie in Anwesenheit von NADPH (Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat) und O_2 die Aminosäure L-Arginin zu L-Citrullin umwandeln, wobei NO abgespalten wird. Als Co-Faktoren benötigen NO-Synthasen noch BH_4 (5,6,7,8-Tetrahydrobiopterin) und

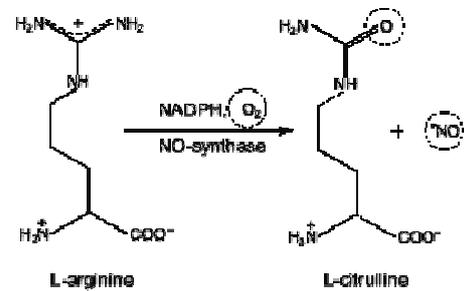


Abbildung 2: Mechanismus der NO-Synthase

<http://www.protein.bio.msu.ru/biokhimiya/contents/v63/full/63071029Fig2.gif>; 07.03.2013; 14:59 Uhr

Calmodulin. In Säugerzellen existieren drei Isoformen der NO-Synthasen: die endotheliale NO-Synthase (eNOS), die neuronale NO-Synthase (nNOS) und die induzierbare NO-Synthase (iNOS). Die Sequenzidentität der humanen NO-Synthasen beträgt weniger als 59 %, allerdings beträgt die Übereinstimmung der Sequenzen zwischen den Spezies 80 – 90 % für die einzelnen Isoformen [18]. Die nNOS wird in den Neuronen des zentralen und des peripheren Nervensystems, in spezialisierten Epithelzellen und in Skelettmuskelzellen exprimiert. Die endotheliale Isoform der NO-Synthasen wird überwiegend in Endothelzellen aber auch in glatten Muskelzellen exprimiert. Die induzierbare NO-Synthase wird in den meisten Zellen erst nach einem Stimulus durch bakterielles LPS (Lipopolysaccharid) oder durch Zytokine synthetisiert [19-21] und kann unabhängig von Ca^{2+} NO produzieren [20].

1.2.2 Funktionen von NO

Lange Zeit wurde Stickstoffmonooxid (NO) als Zellgift betrachtet. Erst in den 90er Jahren konnte gezeigt werden, dass NO auch physiologische Funktion im Körper übernimmt. NO ist das kleinste bisher bekannte Molekül mit bioaktiven Eigenschaften [22]. Als wichtiges Signalmolekül in Signaltransduktionswegen, wird NO in fast allen tierischen und pflanzlichen Zellen synthetisiert [23, 24]. Das von der eNOS produzierte NO bewirkt die Vasodilatation und hemmt die Adhäsion und die Aggregation von Thrombozyten in den Blutgefäßen [25-27]. Das von der nNOS gebildete NO ist in die Transmitterfreisetzung involviert und fungiert in einigen Zellen auch selbst als untypischer Neurotransmitter [18]. Des Weiteren beeinflusst

das von der nNOS gebildete NO die aktivitätsabhängige Änderung der Stärke der synaptischen Übertragung (synaptische Plastizität), die Neurogenese und die neuronale Genexpression [28-31]. Die NO-Produktion der iNOS kann bis zu 1000-fach höher sein als die NO-Menge, welche von der eNOS und nNOS gebildet wird. In gesunden Organismen spielt das von der iNOS produzierte NO eine wesentliche Rolle bei der unspezifischen Immunantwort [32-34]. Durch seine Affinität zu proteingebundenem Eisen kann NO zahlreiche Proteine inaktivieren und wirkt auf diese Weise zytotoxisch [35, 36]. Stickstoffintermediate wie Peroxynitrit (NO_3^-) oder Distickstofftrioxid (N_2O_3) können zu S-Nitrosylierung von Thiolen, Nitrierung von Tyrosinresten, Desaminierung von Nukleinsäuren und zu DNA-Strangbrüchen führen, was der Abwehr von Bakterien, Pilzen, Vieren und Parasiten dient. Diese Eigenschaften sind auch bei der Bekämpfung von Tumorzellen ein entscheidender Faktor [37-39]. Neben den physiologischen Eigenschaften von NO in einem gesunden Organismus ist es auch an vielfältigen pathophysiologischen Prozessen beteiligt. Bei einer aberranten Überexpression der iNOS wird so viel NO produziert, dass es körpereigene Zellen und Gewebe zerstört. So wird die Zerstörung der β -Zellen des Pankreas beim Diabetes mellitus Typ I wesentlich von NO beeinflusst [40-42]. Durch eine abnormale Regulation der iNOS bei chronischen Entzündungen wie Morbus Crohn und der Colitis ulcerosa [43, 44] oder bei Autoimmunerkrankungen wie der rheumatoiden Arthritis (RA) [45], multipler Sklerose (MS) [46, 47] oder systemischen Lupus erythematodes (SLE) [48] spielt NO eine zentrale Rolle in deren Pathogenese. Auch der massive Blutdruckabfall bei einem septischen Schock wird dem von der iNOS gebildeten NO zugeschrieben [49]. Die Rolle von NO bei der Tumorgenese ist bisher umstritten, da sowohl pro- als auch anti-tumorgene Funktionen beschrieben wurden [50, 51]. Die vielfältigen und widersprüchlichen Rollen von NO bei der Tumorgenese können durch die zahlreichen Ursachen und die komplexen Signaltransduktionswege in verschiedenen Tumorgeweben erklärt werden.

Die Menge von NO im Organismus wird überwiegend durch die Aktivität der iNOS bestimmt, da diese das meiste NO produzieren kann. Daher ist die Regulation der Expression der iNOS von entscheidender Bedeutung sowohl für das Verständnis von inflammatorischen Vorgängen als auch für die Behandlung chronisch inflammatorischer Erkrankungen.

1.2.3 Regulation der iNOS-Expression

Wie der Name bereits andeutet, wird die iNOS in einem gesunden Organismus nicht konstitutiv exprimiert. Die Induktion der iNOS-Expression bedarf eines äußeren Stimulus, wie einer Infektion, Entzündung oder Verletzung. Da die iNOS Ca^{2+} -unabhängig NO produziert, ist sie nach ihrer Induktion kontinuierlich aktiv und kann in ihrer Aktivität nur wenig beeinflusst werden [16, 28, 46, 47]. Die wenigen Beeinflussungsmöglichkeiten auf der Ebene der Enzymaktivität liegen in der Verhinderung der Dimerisierung [48-50], einer Reduktion der Argininverfügbarkeit [52, 53] oder in der Verminderung der intrazellulären BH_4 -Konzentration [54]. Um die Aktivität der iNOS zu beeinflussen sind die einzelnen Faktoren der zahlreichen Signaltransduktionswege, welche in die Induktion der iNOS-Expression involviert sind, wesentlich besser geeignet. **Abbildung 3** zeigt exemplarisch die Regulation der iNOS-Expression in murinen Makrophagen nach einer Infektion mit Bakterien. Der Zellwandbestandteil gram-negativer Bakterien LPS (Lipopolysaccharid) löst in Kombination mit $\text{IFN}\gamma$ (Interferon- γ), welches von benachbarten Zellen sekretiert wird, einen Signalweg aus, welcher neben zahlreichen weiteren Faktoren die Aktivierung der Transkriptionsfaktoren NF- κ B (*Nuclear Factor- κ B*) [55, 56] und STAT-1 α (*Signal Transducer and Activator of Transcription*) [57, 58] zur Folge hat. Die Beteiligung dieser Signaltransduktionswege an der Induktion der iNOS-Expression konnte sowohl in murinen als auch in humanen Zellen nachgewiesen werden [59-61]. Die Aktivierung von NF- κ B [62] und STAT-1 α führt zur Transkription des iNOS-Gens. Weiterhin spielen die Transkriptionsfaktoren IRF1 (*Interferon Response Factor1*) und AP1 (*Activating Protein1*) eine wichtige Rolle. AP1 scheint, im Gegensatz zu NF- κ B und IRF1, eine hemmende Wirkung auf die Promotoraktivität der humanen iNOS auszuüben [57, 63]. Analysen der Promotorsequenzen der iNOS-Promotoren von Maus, Ratte und Mensch zeigten hohe Homologien in den ersten 1000 bp bezüglich der Lage der Transkriptionsfaktorbindestellen, jedoch konnte das 1000 bp Promotorfragment des Menschen in humanen Zellen nicht durch Zytokine induziert werden [61-63] im Vergleich zu den murinen 1000 bp Promotoren [64-66]. Erst bei einer Länge von 16 kb konnte die bisher stärkste Aktivität des humanen iNOS-Promotors nach Zytokinstimulation festgestellt werden [62], welche um das 5-7-fache höher ist als die basale Promotoraktivität. In humanen Zellen konnte nach Zytokinstimulation jedoch eine 100-fache Steigerung der Expression der iNOS mRNA beobachtet werden, was

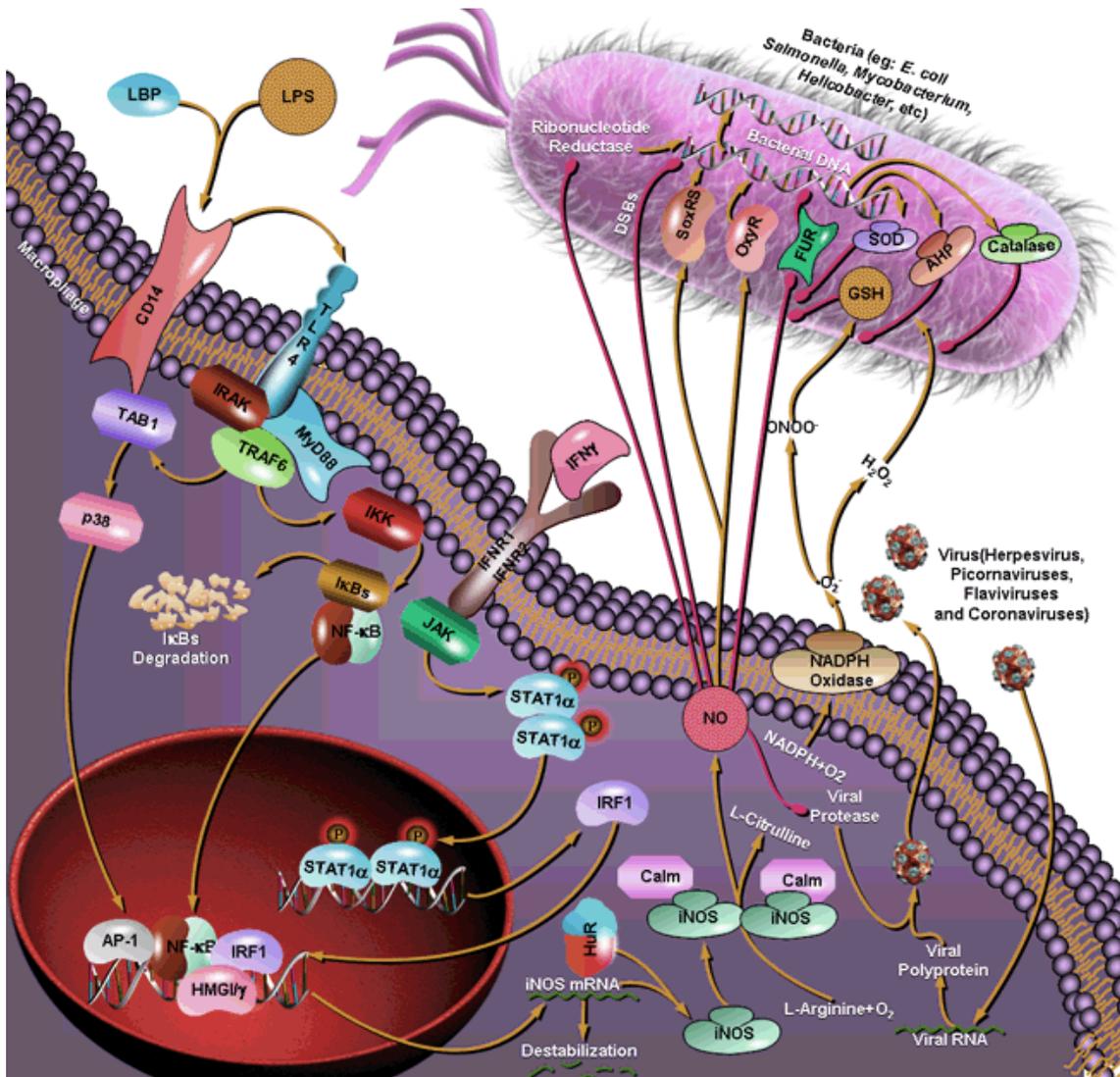


Abbildung 3: Regulation der iNOS-Expression in murinen Makrophagen nach einer Infektion durch Bakterien

LPS: Lipopolysaccharid; **LBP:** LPS-Bindeprotein; **TLR4:** Toll-Like-Rezeptor4; **IRAK:** Interleukin-1 Rezeptor-assoziierte Kinase; **MyD88:** Myeloid Differentiation Primary Response Gene88; **TRAF6:** TNF Rezeptor-assoziiierter Faktor6; **TAB1:** TAK-bindendes Protein1; **IKK:** Inhibitor der κ B Kinase; **NF- κ B:** Nuklear Faktor- κ B; **IFN γ :** Interferon γ ; **IFNR1/2:** Interferon Rezeptor 1/2; **JAK:** Janus Kinase; **STAT:** Signal Transducer and Activator of Transcription; **IRF1:** Interferon Response Factor1; **AP1:** Activating Protein1; **HMG1/Y:** High Mobility Group Family; **Calm:** Calmodulin; **GSH:** Glutathione; **SoxRS:** Superoxide Regulon; **SOD:** Superoxide Dismutase; **OxyR:** Peroxide Regulon; **AHP:** Alkyl Hydroperoxide Reductase; **FUR:** Ferric Uptake Regulatory protein;

<http://saweb2.sabiosciences.com/images/iNOSsignaling680.gif>, 13.03.2013, 15:29 Uhr

darauf schließen lässt, dass die Regulation der iNOS-Expression überwiegend auf posttranskriptioneller Ebene stattfindet. Hierfür sind die untranslatierten Regionen am 5'- und 3'-Ende der iNOS mRNA essentiell. Es konnte gezeigt werden, dass die 3'UTR der humanen iNOS mRNA fünf AU-reiche Elemente aufweist [64], welche wiederum für die

Destabilisierung von zahlreichen Zytokin- und Onkogen-mRNAs verantwortlich sind [65, 66]. Auch die 3'UTR der humanen iNOS mRNA konnte die Expression eines Reportergens verringern [67]. Zur posttranskriptionellen Regulation gehört auch der Transport von mRNAs aus dem Zellkern ins Zytoplasma. Die meisten mRNAs werden über den TAP/Nxt-Komplex exportiert. Für viele Zytokin-induzierte mRNAs, welche noch zusätzlich AREs enthalten, wurde ein Exportweg über CRM1 nachgewiesen [9]. Auch für die iNOS mRNA konnten Bollmann *et al.* einen Kernexport über CRM1 unter Beteiligung des eukaryotischen Translationsfaktors eIF-4E nachweisen [11]. Des Weiteren wurde eine direkte Interaktion des ELAV (*embryonic lethal abnormal vision*) Proteins HuR mit den AREs 4 und 5 in der iNOS-3'UTR nachgewiesen, was zu einer Stabilisierung der iNOS mRNA führte [67, 68]. Ein stabilisierender Einfluss von HuR konnte auch für andere induzierbare mRNAs nachgewiesen werden [69]. Weitere RNA-bindende Proteine wie KSRP (*KH-type splicing regulatory protein*), AUF1 (*ARE/poly(U)-binding/degradation factor 1*) und PTB (*polypyrimidine tract-binding protein*) spielen ebenfalls eine wichtige Rolle in der posttranskriptionellen Regulation der iNOS-Expression. KSRP bindet wie HuR an die beiden hinteren AREs der iNOS 3'UTR und konkurriert mit HuR um diese Bindestelle, wobei KSRP nach der Bindung an die AREs das Exosom rekrutiert und die mRNA somit abgebaut wird. Nach einer Stimulation durch Zytokine konnte allerdings eine verstärkte Bindung von HuR an die iNOS 3'UTR beobachtet werden, was vermutlich an der Phosphorylierung und somit der Inaktivierung von KSRP liegt [68]. AUF1 übt ebenfalls einen destabilisierenden Effekt auf die iNOS mRNA aus, indem es an die ersten drei AREs in der iNOS 3'UTR bindet [70], hierbei ist der genaue Mechanismus noch ungeklärt. PTB scheint die mRNA der iNOS zu stabilisieren indem es an eine UC-reiche Region in der iNOS 3'UTR bindet [71]. Das Zink-Finger Protein Tristetraprolin (TTP) bindet zwar nicht direkt an die iNOS mRNA, ist aber über Interaktionen mit KSRP ebenfalls an der posttranskriptionellen Regulation der iNOS-Expression beteiligt, indem es wahrscheinlich die Interaktion von KSRP mit der iNOS mRNA verhindert [68]. Die Beteiligung dieser vielfältigen Faktoren zeigt wie streng die iNOS-Expression reguliert wird und wie wichtig die untranslatierten Bereiche der mRNA für deren Stabilität sind. Eine Fehlregulation der iNOS kann zu massiven systemischen Schäden führen. Eine fehlerhafte Regulation auch nur eines Bestandteiles des Regulationsnetzes führt oft zu sehr ernsthaften Erkrankungen wie dem SLE, Diabetes mellitus Typ I, der RA oder Krebs.

Neben LPS und $\text{IFN}\gamma$ gibt es weitere Induktoren der iNOS-Expression. In humanen Zellen wird meist ein Gemisch aus TNF α (*Tumor Necrosis Factor- α*), IL-1 β (Interleukin-1 β) und $\text{IFN}\gamma$ benötigt [72]. Die Induktion der iNOS-Expression kann auch durch Faktoren herbeigeführt werden, welche die zelluläre cAMP-Konzentration erhöhen wie Forskolin, 8-Bromo-cAMP und Dibutyryl-cAMP [73, 74]. Des Weiteren konnten auch Wachstumsfaktoren (PDGF, FGF) [75, 76] und Proteinkinase C-Aktivatoren (TPA) [77, 78] die iNOS-Expression induzieren. Eine Inhibition der iNOS-Expression kann durch anti-inflammatorische Zytokine wie IL-4, IL-10 oder IL-13, durch Inhibitoren von Tyrosinkinase oder den an der Transkription beteiligten Faktoren wie NF- κ B erfolgen. Es konnte gezeigt werden, dass auch Glukokortikoide eine hemmende Wirkung auf die iNOS-Expression haben [79-81]. Jedoch kommt es vor, dass ein Faktor sowohl stimulierend als auch inhibierend auf die iNOS-Expression wirkt. Der Wachstumsfaktor TGF- β wirkt in murinen Makrophagen und glatten Gefäßmuskelzellen der Ratte hemmend auf die iNOS-Expression, während er in murinen 3T3-Fibroblasten dazu in der Lage ist die Expression der iNOS zu induzieren [75, 82, 83]. Dies zeigt, dass die Regulation der iNOS-Expression spezies- und gewebespezifisch erfolgt.

1.3 PolyA-bindende Proteine (PABP)

PolyA-bindende Proteine gehören zu einer Familie von RNA-bindenden Proteinen, welche dazu in der Lage sind eine Abfolge von 10-12 Adenosinresten im PolyA-Schwanz von mRNAs zu binden [88-90]. Zytoplasmatische PABPs sind typischerweise ca. 70 kDa groß und tragen vier RNA-bindende Domänen (RRM: *RNA recognition motive*). Am C-terminalen Ende befindet sich eine Carboxydomäne aus fünf α -Helices, welche über eine unstrukturierte Prolin-reiche Region mit den RRMs verbunden ist [91, 92]. Es wird vermutet, dass die Prolin-reiche Region die Dimerisierung von PABPs vermittelt und die Carboxydomäne für Protein-Protein-Wechselwirkungen wichtig ist [84, 85].

1.3.1 Isoformen und Lokalisation von PolyA-bindenden Proteinen

In menschlichen Zellen konnten bisher fünf Isoformen der PolyA-bindenden Proteine identifiziert werden: das nukleäre PABP (PABPN1), das zytosolische PABP (PABPC1), das induzierbare PABP (iPABP), ein PABP, welches überwiegend in den Testis vorkommt (tPABP) und PABPC5, dessen Gen-Sequenz auf dem X-Chromosom von Mensch und Maus gefunden wurde [86]. Das PABPN1 ist im Nukleus lokalisiert und bindet den entstehenden PolyA-Schwanz der prä-mRNA. Es hat im Gegensatz zu den zytosolischen Isoformen nur ein RRM. Die carboxyterminale Domäne und der Prolin-reiche Bereich fehlen. Dadurch ist PABPN1 mit 32,8 kDa etwa um die Hälfte kleiner als die zytosolischen Isoformen. Es konnte gezeigt werden, dass PABPN1 maßgeblich an der Elongation des PolyA-Schwanzes beteiligt ist, indem es die Affinität der PolyA-Polymerase zur RNA erhöht und somit ein frühzeitiges Dissoziieren der Polymerase von der RNA verhindert (zusammengefasst in [87]). Überwiegend im Zytosol sind tPABP, iPABP, PABPC5 und PABPC1 lokalisiert. Man geht davon aus, dass tPABP eine wichtige Rolle in der Spermatogenese einnimmt, da es sowohl in der Maus als auch im Menschen nur in Hodengewebe vorkommt [88, 89]. Strukturell ähnelt tPABP PABPC1, allerdings gibt es einige Deletionen in den RRM-Bereichen und im Prolin-reichen Bereich, was zu einer niedrigeren Affinität zum PolyA-Schwanz führt. Das induzierbare PABP (iPABP) wurde erstmals in aktivierten T-Lymphozyten beschrieben. Es hat ebenfalls eine große Strukturähnlichkeit mit PABPC1, zeigt jedoch einige Aminosäuresubstitutionen in den RRM-Bereichen und beträchtliche Abweichungen in der Prolin-reichen Region [90]. Es konnte gezeigt werden, dass iPABP ebenfalls an den PolyA-Schwanz bindet und zusätzlich konnte eine Bindung an eRF3 (*eukaryotic release factor3*) nachgewiesen werden [91]. PABPC5 wird in vielen menschlichen Geweben auf einem sehr niedrigen Niveau exprimiert. Eine etwas höhere Expression konnte in Ovarien nachgewiesen werden. Im Gegensatz zu den bisher beschriebenen zytosolischen PABP, fehlt PABPC5 die Prolin-reiche Region und die carboxyterminale Domäne [86]. Funktionen von PABPC5 sind bisher nicht beschrieben worden. Das am besten beschriebene PABP ist jedoch PABPC1 (im weiteren Verlauf nur PABP genannt).

1.3.2 Funktionen von PABP

PABP übernimmt grundlegende Funktionen in der mRNA-Stabilität von PolyA-tragenden mRNAs und ist essentiell für die Initiation der Translation. Auch eine Rolle in der Translationstermination wurde für PABP beschrieben. Obwohl der PolyA-Schwanz nicht essentiell für die Translation von mRNAs ist, ist die Translationsrate PolyA-Schwanz enthaltender mRNAs um ein Vielfaches höher als die anderer mRNAs. Der PolyA-Schwanz und das daran gebundene PABP vermitteln zusammen mit dem 5'Cap und den daran befindlichen Translationsinitiationsfaktoren die Initiation der Translation [92]. Durch die

gleichzeitige Bindung von PABP an den PolyA-Schwanz und an den eukaryotischen Initiationsfaktor 4G (eIF4G) wird eine geschlossene Ringstruktur gebildet, welche die Translation initiiert und gleichzeitig die mRNA sowohl vor einem 3'-5'- als auch 5'-3'-Abbau schützt [93]. eIF4G ist Teil eines Komplexes, welcher über eIF4E an das 5'Cap bindet. Es konnte gezeigt werden, dass diese Protein-Protein-Interaktion die Affinität sowohl von eIF4E an das 5'Cap, als auch die von PABP an die PolyA-Sequenz erhöht [94, 95], so dass diese Faktoren die Untereinheiten des Ribosoms rekrutieren können [96].

Die carboxyterminale Domäne von PABP ist in der Lage mit eukaryotischen Entlassungsfaktor (eRF3) zu interagieren [97]. eRF3 erhöht die Aktivität von eRF1, welcher die Termination der Translation vermittelt [98]. Der eRF3/PABP-Komplex ist in der Lage eine Reinitiation der Translation zu vermitteln, indem es das Ribosom wieder an das 5'-Ende der mRNA dirigiert [99] oder den Abbau der mRNA indem eRF3 die Multimerisierung von PABP-Proteinen am PolyA-Schwanz aufhebt und so eine Deadenylierung und den 3'-5'-Abbau der mRNA begünstigt [97].

Die Stabilität von mRNAs wird dadurch erhöht, indem PABP zum einen den PolyA-Schwanz durch die dichte Proteinverpackung vor dem Abbau schützt und zum anderen, indem PABP

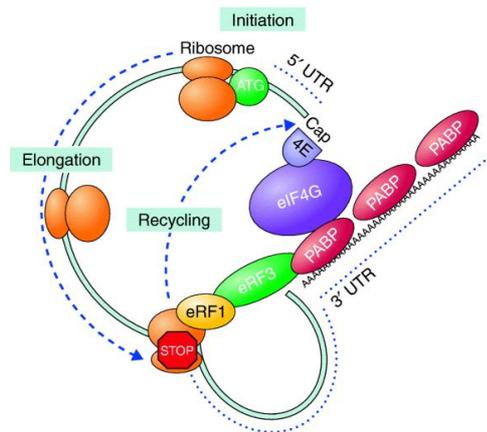


Abbildung 4: Die Beteiligung von PABP bei der Translation PolyA-Schwanz enthaltender mRNAs.

eIF: eukaryotischer Initiationsfaktor; **eRF:** eukaryotischer Freisetzungsfaktor (*eukaryotic release factor*); **PABP:** PolyA-bindendes Protein

<http://ars.els-cdn.com/content/image/1-s2.0-S0959440X03000095-gr2.gif>; 05.04.2013; 15:40

mit den Proteinen am 5'Cap interagiert und den PolyA-Schwanz so nah an die Translationsmaschinerie bringt, dass die Deadenylasen keinen Zugang mehr zum PolyA-Schwanz haben [97]. Weiter wird diskutiert, dass PABP in der Lage ist an die 5'-Cap-Struktur von mRNAs zu binden sobald die Translation beendet ist und auf diese Weise den mRNA-Abbau, unabhängig von eIF4E unterbinden kann [100]. Es konnte auch ein inhibitorischer Effekt unter physiologischen Bedingungen auf die Deadenylase PARN nachgewiesen werden [101]. PABP reguliert die mRNA-Stabilität aber nicht nur indem es die mRNA vor dem Abbau schützt. Uchida *et al.* konnten zeigen, dass PABP in einem Nukleasekomplex aus den Exoribonukleasen Pan2 und Pan3 (*PABP dependent polyA nuclease*) den Abbau des PolyA-Schwanzes begünstigt, indem es durch die Interaktion mit Pan3 die Affinität von Pan2 an den PolyA-Schwanz erhöht [102]. In weiteren Arbeiten konnte gezeigt werden, dass PABP auch die miRNA-vermittelte Deadenylierung durch Bindung an GW182, ein Hauptprotein des miRISC-Komplexes, fördert, solange es nicht an eIF4G gebunden ist [103]. Neben diesen allgemeinen Rollen in der Regulation der mRNA-Stabilität, konnte für PABP auch ein spezifischer Einfluss auf die Stabilität und Translation einiger mRNAs über regulatorische AREs in der 3'-UTR nachgewiesen werden [104]. Es konnte für die mRNAs von β -Casein [105] und MKK2 (*Mitogen-activated Protein Kinase Kinase-2*) [106] und der *osk*-mRNA in *Drosophila* Oozyten [107] eine spezifische Beteiligung von PABP an der mRNA-Stabilität und Regulation der Translation gezeigt werden. Des Weiteren wurde für PABP auch eine Rolle bei dem *nonsense-mediated decay* (NMD) beschrieben. Ivanov *et al.* konnten zeigen, dass PABP, abhängig von seiner relativen Positionierung zum Translations-Terminations Komplex, die Initiation des NMD inhibieren kann [108]. Linker *et al.* haben bei Affinitäts-Chromatographie-Analysen mit der 3'UTR der humanen iNOS mRNA ohne PolyA-Schwanz ebenfalls eine direkte Bindung von PABP an die 3'UTR nachweisen können [68].

1.3.3 Regulation von PABP

PABP mRNA wird in verschiedenen Geweben unterschiedlich stark exprimiert. Besonders in Krebsgewebe konnte eine erhöhte PABP-Expression beobachtet werden [109, 110]. Unter normalen Bedingungen wird die Expression von PABP durch Wachstumsfaktoren reguliert [111] und findet auf der posttranskriptionelle Ebene statt (zusammengefasst in[112]). In 3T3 Fibroblasten konnte gezeigt werden, dass die PABP mRNA nach Stimulation der Zellen

reaktiviert und nicht neu synthetisiert wurde [111]. In der 5'UTR der PABP mRNA befinden sich zwei *cis*-regulatorische Sequenzen, welche überwiegend für die Regulation der PABP-Expression verantwortlich sind. Im vorderen Bereich der 5'UTR befindet sich die TOP-Sequenz (*terminal oligopyrimidine tract*), über welche die Wachstumsfakoren-vermittelte Regulation stattfindet [113] und hinter dem TOP-Element folgt eine A-reiche Sequenz (ARS), an welche PABP selbst bindet und so seine eigene Translation inhibiert [114], wenn bereits zu viel PABP-Protein im Zytosol vorhanden ist. Des Weiteren kann PABP über posttranslationelle Modifikationen wie Phosphorylierung und Methylierung reguliert werden. In Weizenkeimzellen konnte gezeigt werden, dass die Bindung von PABP an das PolyA-Signal und an die Initiationsfaktoren nach seiner Phosphorylierung zugenommen hat [115].

1.4 Rheumatoide Arthritis (RA)

Die rheumatoide Arthritis (RA) ist eine destruktive und systemische chronisch-inflammatorische Autoimmunerkrankung, wobei überwiegend die kleinen peripheren Gelenke der Finger und Zehen betroffen sind. Durch die chronische Entzündung im Körper und vor allem in den Gelenken kommt es zu einem massiven Knochen- und Knorpelabbau. Häufig treten Folgeerkrankungen auf, die überwiegend das kardiovaskuläre System betreffen. Arteriosklerotische Veränderungen in den Blutgefäßen führen oft zum vorzeitigen Tod der Patienten durch kardiovaskuläre Ereignisse [116, 117]. Als Ursache für die Erkrankung werden genetische Prädispositionen oder äußere Umweltfaktoren diskutiert. Allele des Gens für das hoch polymorphe humane Leukozyten Antigen (HLA-DRB1) stehen im Zusammenhang mit dem Ausbruch der RA [118]. Die Bildung von Autoantikörpern gegen citrullinierte Proteine (ACPA) oder gegen den F_c-Teil des ImmunglobulinG (IgG), auch als Rheumafaktor (RF) bekannt, ist ein weiterer klinischer Befund zur RA [119]. Raucher oder Patienten mit einer pulmonalen Dysfunktion zeigen erhöhte Titer von Autoantikörpern und gehören zur Risikogruppe. Der genaue Auslöser für die Erkrankung ist allerdings bis heute unbekannt. Ein bisher unbekanntes Autoantigen wird als initialer Faktor in der Pathogenese der RA angesehen [120].

1.4.1 Die Pathogenese der RA

Die Pathogenese der RA ist sehr komplex. Immunologische und inflammatorische Vorgänge spielen dabei eine essentielle Rolle. Allgemein wird davon ausgegangen, dass ein bisher noch unbekanntes Antigen eine Autoimmunreaktion auslöst [120]. Nach Bindung des Autoantigens an antigenpräsentierende Zellen (APC) werden durch die Antigenpräsentation und proinflammatorische Zytokine wie IL-1, IL-12, TNF- α und IFN γ T-Lymphozyten aktiviert [121], die wiederum proliferieren und in die Gelenke einwandern. Dort werden weitere Zytokine und Chemokine sezerniert, welche Makrophagen, Fibroblasten, Chondrozyten und Osteoklasten aktivieren [125]. Dies führt zu einer abnormalen Akkumulation von Immunzellen im Gelenk [125]. Die Bildung des Pannus wird durch die Proliferation und Apoptose endothelialer Zellen bestimmt. Der Pannus lagert sich durch invasiv-destruktives Wachstum in den Knorpel ein und ruft so Knochenerosionen hervor. Auch Angiogenese spielt in der RA eine entscheidende Rolle. Die angiogenetischen Wachstumsfaktoren VEGF, FGF-1 und FGF-2 konnten im Synovium und in der Synovialis von RA-Patienten nachgewiesen werden [120, 121]. **Abbildung 5** zeigt eine vereinfachte Darstellung der komplexen Vorgänge in den Gelenken von RA-Patienten. Die Aktivierung der T-Zellen durch die APC führt zu einer Aktivierung von B-Lymphozyten, die weitere Autoantikörper bilden und das Komplementsystem aktivieren, was zu einer weiteren Infiltration von Immunzellen in die Synovia führt [122]. Die Akkumulation von Immunzellen in der Synovia von RA-Patienten führt zur Synthese eines komplexen Gemisches aus Zytokinen (TNF- α , IL-1, IL-6, IL-17, IFN γ), Chemokinen, (MCP-1, MCP-4, CCL-18), Adhäsionsmolekülen (ICAM-1, VCAM-1), Transkriptionsfaktoren (NF- κ B, STATs, AP-1, NF-AT) und proinflammatorischen Enzymen wie der iNOS oder COX-2 [123-126]. Dies wiederum aktiviert Fibroblasten, Chondrozyten und Osteoklasten, die durch die Sekretion von Matrixmetalloproteasen (MMP), Kollagenasen und anderen destruktiven Enzymen die Zerstörung des Knorpels und der Knochen verursachen [127]. Die pathophysiologischen Vorgänge in einem rheumatischen Gelenk befinden sich in sich selbst verstärkenden Kreisläufen. Fehlregulationen der Immunzellen führen zu einer massiven Dysregulation der proinflammatorischen Mediatoren des adaptiven Immunsystems, was wiederum zur Ausschüttung von Zytokinen und Chemokinen führt. Durch die andauernde Entzündung innerhalb des Gelenkes setzt bei 80 % der RA-Patienten die Zerstörung des Knorpels und der Knochen innerhalb des ersten Jahres nach der Diagnose ein [128, 129]. Synoviale Zytokine wie M-CSF (*macrophage colony-stimulating factor*) und

Einleitung

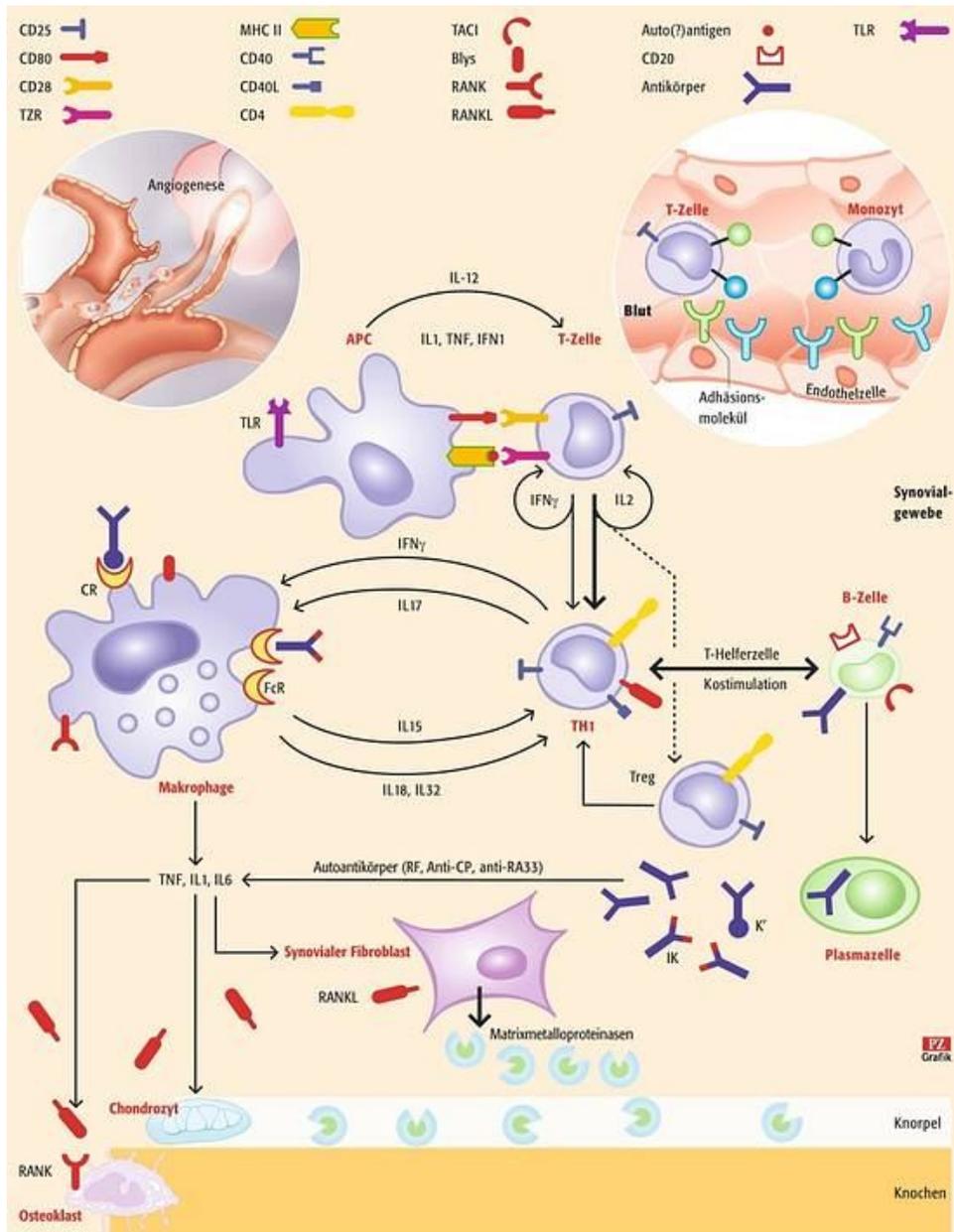


Abbildung 5: Pathogenese der rheumatoiden Arthritis

Blys: B-Lymphozytenstimulator, K': Komplement, CP: citrullinierte Peptide, KR: Komplementrezeptor, FcR: Rezeptor für den Fc-Anteil von IgG, IK: Immunkomplex, IFN: Interferon, IL: Interleukin, RF: Rheumafaktor, TAC1: transmembrärer Aktivator und Calicummodulator und Cyclophilin-Ligand-Interaktor, TZR: T-Zell-Rezeptor, Th1: T-Helfer-1-Zelle, TLR: Toll-like-Rezeptor, Treg: regulatorische T-Zelle

http://www.pharmazeutische-zeitung.de/uploads/pics/tit-titelgrafik-49_I_52042.jpg; 05.03.2013, 10:30 Uhr

RANKL (*receptor activator of NF- κ B ligand*) induzieren die Differenzierung von Osteoklasten und deren Einwanderung in den Gelenksknorpel [130]. TNF- α , IL-1 und IL-6 unterstützen und verstärken die Osteoklastendifferenzierung und-aktivierung [131]. In einem

gesunden Organismus sind Knochenaufbau und Knochenabbau im Gleichgewicht [132]. In den Gelenken von RA-Patienten ist das Gleichgewicht zwischen Osteoblasten und Osteoklasten zugunsten der Osteoklasten verschoben, da zytokininduzierte Mediatoren die Differenzierung der Osteoblasten inhibieren [133].

1.4.2 Behandlung der RA

Die Behandlung der RA kann in zwei Stufen untergliedert werden: eine akute Therapie, welche meist bei Schüben eingesetzt wird und eine Langzeittherapie, welche die allgemeine Symptomatik verringern und akute Schübe nach Möglichkeit vermeiden soll. Nicht steroidale anti-inflammatorische Medikamente (NSAIDs: *nonsteroidal antiinflammatory drugs*) wie Ibuprofen oder Diclofenac und Glukokortikoide wie Prednisolon werden meist während der akuten Phasen einer RA-Erkrankung eingesetzt. Allerdings finden Glukokortikoide auch in der Langzeittherapie in einer viel geringeren Konzentration Anwendung. Diese Medikamente wirken im Wesentlichen indem sie schnell die allgemeinen Entzündungsmarker inhibieren und so zum Abschwellen der Gelenke beitragen und die Schmerzen lindern [134, 135]. Obwohl diese Substanzen sehr erfolgreich in ihrer Anwendung sind, können sie oft nicht als Langzeittherapeutika verwendet werden, weil sie massive Nebenwirkungen zeigen. NSAIDs können die Magenschleimhaut schädigen und somit zur Ulkusbildung beitragen und wirken in hohen Dosen nierenschädigend. Glukokortikoide regulieren physiologisch den Stoffwechsel und führen in zu hohen Dosen zu Stoffwechselstörungen wie dem Cushing-Syndrom. Aus diesem Grund wird die Tageshöchstdosis von Glukokortikoiden bei der Langzeittherapie mit max. 7,5 mg/Tag Prednisolonäquivalent angesetzt. Für die Langzeittherapie von RA-Patienten werden krankheitsmodifizierende Medikamente (DMARDs: *disease modifying anti-rheumatic drugs*) wie Methothrexat (MTX), Leflunomid und Sulfasalacin niedrigdosiert eingesetzt. Diese Immunsuppressiva werden als Monotherapie oder in Kombination verwendet. Sie vermindern die RA-Aktivität und verlangsamen so deren Fortschreiten. Als Nebenwirkungen können Infektionen auftreten, da diese Substanzen die Reaktionen des Immunsystems verringern und der Körper dann nicht adäquat auf Infektionen durch Bakterien oder Viren reagieren kann. Leber- und Nierenschädigungen wurden ebenfalls beschrieben [136, 137].

Die zunehmende Entschlüsselung der molekularen Mechanismen der Pathogenese der RA führte zur Entwicklung von Therapien mit *Biologicals*. Diese *Biologicals* greifen spezifisch in zentrale Signaltransduktionswege ein, welche relevant für die Pathogenese der RA sind.

Zurzeit werden TNF α -Antagonisten wie anti-TNF α Antikörper (Adalimumab) oder rekombinante TNF α -Rezeptoren (Etanercept), Interleukin1-(Anakinra) und Interleukin6-Inhibitoren (Tocilizumab) und T-Zell Kostimulationsblocker (Abatacept) eingesetzt. Die *Biologicals* müssen parenteral verabreicht werden und sind zum aktuellen Zeitpunkt noch sehr teuer. Deshalb werden sie oft nur Patienten verabreicht, welche auf die herkömmliche Therapie mit DMARDs nicht ansprechen. Die Wirkung dieser Medikamente ist jedoch so stark, dass sie auch als Initialtherapie bei RA-Patienten in frühen Stadien diskutiert werden, obwohl es immer noch Patienten gibt, die nicht auf die Therapie mit den *Biologicals* reagieren. Zusätzlich zeigen neueste Studien, dass die Wirkung von Adalimumab mit der Zeit nachlassen kann. Bei einigen Patienten wurden Antikörper gegen die verabreichten *Biologicals* nachgewiesen, die die Wirkung negieren (zusammengefasst in [138]). Des Weiteren führt auch die Therapie mit den *Biologicals* zu einem erhöhten Infektionsrisiko. So dürfen Patienten mit einer Tuberkulose nicht mit TNF- α Antikörpern behandelt werden, da hier das Risiko für einen erneuten Ausbruch der Erkrankung enorm hoch ist.

Seit 2012 ist ein kleines chemisches Molekül, Tofacitinib, zur Behandlung der RA zugelassen. Tofacitinib ist ein JAK3-Inhibitor, welcher spezifisch den JAK/STAT-Signalweg inhibiert und so sowohl die Entzündung als auch die Schwellung der Gelenke senkt.

Auch wenn die Therapiemöglichkeiten der RA in den letzten Jahren zugenommen haben, so gibt es immer noch keine 100 % ige Remission der Patienten unter den bisher verfügbaren Medikamenten oder die Nebenwirkungen sind so massiv, dass man potente Medikamente nicht lange einnehmen kann. Aus diesen Gründen ist die Erforschung neuer Substanzen zur Behandlung der RA unumgänglich.

1.4.3 Sekundärmetabolite aus Pilzen als neue therapeutische Option

Pilze schützen sich vor Fressfeinden und Bakterienbefall indem sie biologisch wirksame Sekundärmetabolite synthetisieren. Erkel *et al.* isolieren diese Sekundärmetabolite aus den Pilzen und testen diese an Zellmodellen für chronisch inflammatorische Erkrankungen. In vergangenen Studien hat sich gezeigt, dass die Substanzen Galiellalacton (Gal), Oxacyclododecindion (Oxa) und S-Curvularin (SC) gezielt in pathophysiologische Signalwege eingreifen und so die Expression proinflammatorischer, fibrotischer und proangiogener Faktoren hemmen [139].

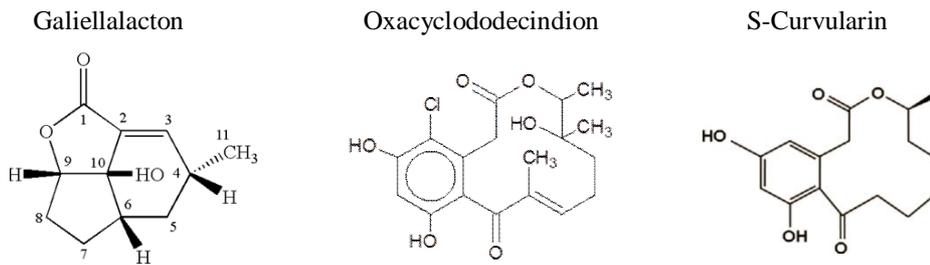


Abbildung 6: Strukturformeln der Substanzen Galiellalacton, Oxacyclododecindion und S-Curvularin

S-Curvularin wurde aus einer *Penicillium*-Art extrahiert und hemmt die Phosphorylierung und somit die Aktivierung von JAK2 und des Transkriptionsfaktors STAT-1 α . Hierdurch wird die Expression proinflammatorischer Mediatoren wie der iNOS, COX-2, IL-8 und TNF- α inhibiert. Die Untersuchungen der Wirkung von SC wurden *in vitro* an C28/I2 Zellen und *in vivo* an einem Tiermodell der RA, der kollagen-induzierten Arthritis (CIA) in Mäusen, durchgeführt. Da C28/I2-Zellen keinen Glukokortikoid-Rezeptor exprimieren, erfolgt die Wirkung von SC nicht durch die klassische Transrepression des aktivierten Glukokortikoid-Rezeptors und könnte bei Patienten mit einer Steroidresistenz eingesetzt werden. In der CIA war SC in der Lage die klinischen Symptome und die Expression proinflammatorischer Zytokine und Chemokine, welche für die Induktion und Aufrechterhaltung einer chronischen Entzündung verantwortlich, sind zu senken [140]. In weiteren Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass SC auch die Transkription von fibrose- und angiogeneseassoziierten TGF- β Zielgenen inhibieren kann [139].

Galiellalacton ist ein Macrolacton aus dem Pilz *Galiella rufa* und konnte als wirksamer Inhibitor des IL-6-Signaltransduktionsweges identifiziert werden. Gal verhindert die Bindung des aktiven STAT3-Komplexes an die DNA im Zellkern und inhibiert auf diese Weise die IL-6-induzierte Proteinexpression [141]. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass Gal auch die Expression TGF- β induzierter Gene wirksam herabreguliert [139]. Hausding *et al.* konnten bereits eine Wirkung von Gal im Mausmodell von allergischem Asthma nachweisen [142].

Oxacyclododecindion wurde aus dem imperfekten Pilz *Exsherothilum rostratum* isoliert. Oxa hat eine hohe strukturelle Ähnlichkeit zu SC, zeigt aber in Zellkultur-Experimenten eine 100-Fach höhere Potenz. Oxa hemmt die Promotoraktivität STAT1/2-, STAT3- und STAT6-

abhängiger Gene in HepG2-Zellen und ebenso die TGF- β und HIF-1 α Signaltransduktion. In stimulierten epithelialen Lungenkarzinomzellen (A549) konnte eine Hemmung der Expression proinflammatorischer Zytokine (IL-6, IL-27) und Chemokine (IL-8, CXCL10) nachgewiesen werden, ebenso wie die Hemmung von Transkriptionsfaktoren wie NF- κ B, IRF1 und IRF7. Die Wirkung von Oxa auf die proinflammatorische Genexpression scheint unabhängig vom Phosphorylierungsstatus der beteiligten Transkriptionsfaktoren zu sein und legt den Schluss nahe, dass Oxa die Rekrutierung des gemeinsamen transkriptionellen Co-Aktivators p300 inhibiert (bisher unveröffentlichte Daten der AG Erkel).

1.5 Die Rolle von microRNAs (miRNAs) in der rheumatoiden Arthritis (RA)

MicroRNAs (miRNA) sind kleine (~ 21 Nukleotide) nicht-kodierende RNAs, welche feinregulierende Funktionen in der Regulation der Genexpression erfüllen. Die Rolle von miRNAs wurde bisher in der mRNA-Lokalisation, bei der Polyadenylierung, der Regulation der mRNA-Stabilität und bei der Translationskontrolle beschrieben [143, 144].

1.5.1 Die Biogenese von microRNAs

Gene für miRNAs sind auf jedem Chromosom lokalisiert außer auf dem Y-Chromosom. Sie kommen als unabhängige Gene vor oder sind in Genklustern organisiert. Es wurden auch Gene für miRNAs in Introns von sowohl proteinkodierenden- als auch nicht-kodierenden Genen gefunden. Die Transkription der miRNA-Gene erfolgt über die RNA Polymerase II oder III [145, 146]. Das Primärtranskript (pri-miRNA) besitzt eine 5'Cap-Struktur und einen PolyA-Schwanz und kann zwischen 200 und mehreren tausend bp lang sein. Die pri-miRNAs zeigen eine ausgeprägte Sekundärstruktur aus unvollständig gepaarten Basenpaaren. Im Kern werden die pri-miRNAs durch die Endonuklease Drosha und das Protein DGCR8 (*DiGeorge syndrome critical region gene 8*) zu 70-100 bp langen pre-miRNAs (*precursor miRNA*) gespalten. Dabei rekrutiert DGCR8 die pri-miRNA indem es die Sekundärstruktur der pri-miRNA erkennt und Drosha schneidet sie etwa 11 bp von den RNA-Protein-Komplex zur pre-miRNA [147, 148]. Die pre-miRNA wird dann anschließend über Ran-GTP und Exportin 5

aus dem Zellkern in das Zytoplasma transportiert [149]. Dort wird die pre-miRNA dann über eine Helikase entwunden und von einem Dicer-TRBP-Komplex zu einer 21 Nukleotide langen Doppelstrang-RNA geschnitten [150]. Dabei entsteht der RISC-Komplex (*RNA-induced silencing complex*) mit Drosha, TRBP, PACT (*protein activator of PKR*) und einem von vier Argonaut-Proteinen (Ago1-4) [151]. Nachdem die Helikase den Doppelstrang entwunden hat, entsteht die native miRNA und ein dazu teilweise komplementärer Strang (miRNA*), welcher meistens abgebaut wird. Die Entscheidung welcher der beiden Doppelstränge zur nativen miRNA wird, liegt in den ersten Nukleotiden am 5'-Ende der RNA und ist zusätzlich davon abhängig welches der Ago-Proteine im RISC gebunden ist [152]. Obwohl die meisten miRNAs* abgebaut werden, wurden auch Funktionen oder differenzielle Regulation von ihnen beschrieben [153].

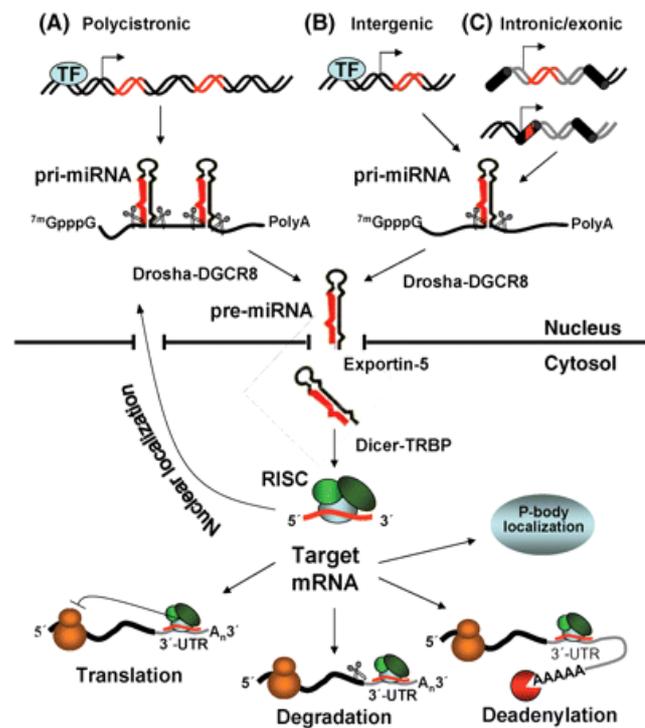


Abbildung 7: Biogenese von microRNAs

<http://cardiovascres.oxfordjournals.org/content/79/4/553/1.medium.gif>, 15.03.2013, 09:27 Uhr

1.5.2 Funktion von microRNAs

Sobald die miRNA im RISC gebunden ist, wird diese zu ihrer Ziel-mRNA gebracht und kann deren Expression beeinflussen. Die meisten Zielsequenzen der miRNAs befinden sich in der 3'UTR ihrer mRNAs. In einzelnen Fällen wurden auch Zielsequenzen in der 5'UTR und in der kodierenden Region beschrieben. Diese scheinen aber eher die Ausnahme zu sein und dienen der Feinregulation, da die Regulation über diese Sequenzen weniger effektiv ist [154, 155]. Die Basensequenz, welche meistens die Spezifität der miRNA zu ihrer mRNA ausmacht, befindet sich am 5'-Ende der miRNA in den Nukleotiden 2-8 und wird Seed-Region genannt [140]. Die Art der Regulation von mRNAs durch miRNAs hängt vom Grad der Basenpaarbindungen zwischen mRNA und miRNA ab. Liegt eine hohe Sequenzidentität (> 95 %) zwischen miRNA und Ziel-mRNA vor, so wird die gebundene mRNA durch eine

Endonukleaseaktivität des Ago2-Proteins im Bereich der Nucleotide 9-12 der miRNA geschnitten und anschließend der Abbaumaschinerie zugeführt [156]. Die meisten miRNAs zeigen allerdings keine hohe Sequenzidentität zwischen miRNA und Ziel-mRNA. In diesen Fällen wird die mRNA nicht abgebaut, sondern die Translation reprimiert [157]. Hierbei wird nur die Proteinmenge reduziert, nicht aber die Menge der Ziel-mRNA. Die dritte Funktion von miRNAs ist die Vermittlung der Deadenylierung über GW182 und PABP (siehe oben).

1.5.3 Die Rolle von microRNAs in der rheumatoiden Arthritis (RA)

Seit 2007 werden immer mehr miRNAs identifiziert, welche im Zusammenhang mit der Pathogenese der rheumatoiden Arthritis stehen (zusammengefasst in [158]). Die miR-16, miR-132, miR-146a und miR-155 sind in Patienten mit RA differenziell reguliert im Vergleich zu Patienten mit Osteoarthritis und gesunden Kontrollpatienten [159]. Die miR-146a wurde bisher in Synovialgewebe (ST: *synovial tissue*), in fibroblasten-artigen Synovialzellen (FLS: *fibroblast-like synoviocytes*), in Makrophagen, B-Zellen und T-Zellen beschrieben. Sie wird in den genannten Zellen und Geweben hochreguliert im Vergleich zu Patienten mit Osteoarthritis und gesunden Kontrollpatienten. Ebenso im Serum und in periphere Blutmonozyten. Auch die Expression von miR-16 und miR-155 ist spezifisch in den

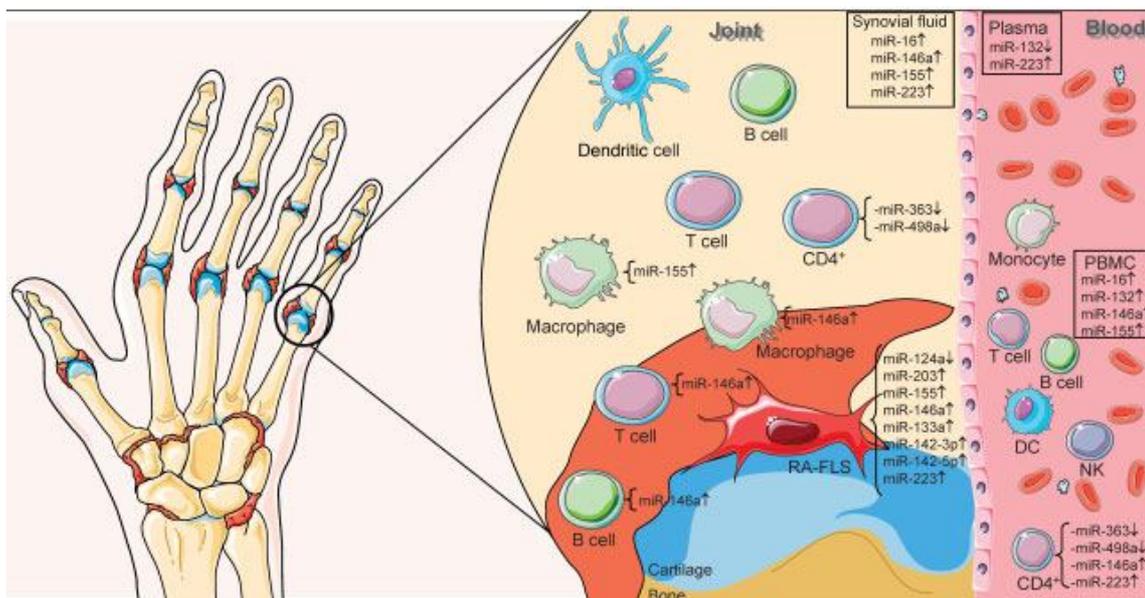


Abbildung 8: MicroRNA-Expression in Gelenken von RA-Patienten

RA-FLS: *fibroblast-like synoviocytes*; PBMC: periphere Blutmonozyten; DC: dendritische Zellen; NK: natürliche Killerzellen;

Modifiziert nach [1]

Gelenken von RA-Patienten erhöht. **Abbildung 8** zeigt die bisher beschriebenen miRNAs in RA-Patienten, wo sie gefunden wurden und wie sie reguliert werden. Für die miR-146a und die miR-155 konnte gezeigt werden, dass diese in die Entwicklung des angeborenen und adaptiven Immunsystems involviert sind [158, 159]. Im Fall der miR-146a und der miR-16 konnte eine Korrelation zwischen der verstärkten Expression dieser miRNAs und der Schwere der RA beobachtet werden [157].

Die Untersuchungen der Rollen von miRNAs in der RA haben gerade erst begonnen. Spezifische miRNAs könnten als biologische Marker für den Verlauf der RA dienen, anzeigen wann ein Schub bevorsteht oder aber zur Früherkennung der Erkrankung dienen. Je früher die Erkrankung diagnostiziert werden kann, desto eher kann eine Therapie beginnen. MiRNAs könnten auch als potentielle Ziele neuer Medikamente in Betracht gezogen werden. Obwohl bisher noch keine RA-spezifische miRNA im Plasma von RA-Patienten nachgewiesen werden konnte, stellen miRNAs dennoch eine vielversprechende Möglichkeit für die Therapie und Prognose der RA dar.

1.6 Das Tiermodell der Kollagen-induzierten Arthritis (CIA)

Um die Pathogenese von Erkrankungen untersuchen zu können und neue Substanzen zur Behandlung von verschiedenen Erkrankungen zu testen, sind Tiermodelle ein geeignetes Werkzeug. Durch die Verwendung von Inzuchtstämmen, meist nur bei kleineren Säugern, können genetische Einflüsse weitestgehend verhindert werden und so kann eine standardisierte Untersuchung von nur relevanten Faktoren gewährleistet werden. In Tiermodellen können verschiedene Stadien einer Erkrankung untersucht werden, wobei Menschen erst therapiert werden können wenn eine Diagnose vorliegt.

Die Kollagen-induzierte Arthritis (CIA) bei Mäusen stellt ein weltweit anerkanntes Modell der RA dar [160]. Das Kollagen Typ II (CII) kommt natürlicherweise in der extrazellulären Matrix von Knochen und Knorpeln vor und wird von Chondrozyten synthetisiert [161]. CII wird als potentielles Autoantigen für die rheumatoide Arthritis diskutiert. Bei der CIA im Mausmodell werden die Mäuse daher mit heterologem Kollagen Typ II in komplettem Freund'schen Adjuvans subkutan immunisiert und bilden daraufhin akute arthritische

Symptome aus wie eine Rötung und Schwellung der Gelenke [162, 163]. Des Weiteren ist die Immunantwort in der CIA wie bei der RA durch CII-spezifische T- und B-Zellen mediiert [163]. Auch die ausgeprägte Synovitis in den Pfoten ist der Gelenkscapselentzündung bei Patienten mit RA sehr ähnlich [164].

1.7 Lipopolysaccharid (LPS)-induziertes Inflammationsmodell in der Maus

Die Gabe von LPS löst bei Mäusen schnell eine akute und massive Entzündungsreaktion aus (siehe **Abbildung 3**, S. 10). Je nach Konzentration der LPS-Lösung treten schon wenige Stunden nach der Applikation die ersten Symptome auf. Dazu zählen Fieber, Tachykardie, Hypotonie, Mangel an Leukozyten, eine verstärkte Blutgerinnung und später dann Multiorganversagen. Mithilfe des LPS-induzierten Inflammationsmodells ist es möglich die frühen Entzündungsreaktionen in einem Organismus zu studieren und neue anti-inflammatorische Substanzen *in vivo* zu testen.

2 Material

2.1 Geräte

Tabelle 1: Verwendete Geräte

| Gerät | Hersteller/Bezugsfirma |
|--|------------------------|
| Brutschrank Hera Cell 150 | Heraeus |
| Gleichstromquelle PowerPac 300, PowerPac HC | BioRad |
| Homogenisator Tissue Lyser LT | Quiagen |
| Homogenisator Ultra Turrax T25 | Janke & Kunkel |
| Kapillarelektrophorese Experion | BioRad |
| Kühlzentrifuge Biofuge fresco | Heraeus |
| Mikroskop Leitz DMIL | Leica |
| Multipette 1-20 µl | Eppendorf |
| PCR-Gerät iCycler | BioRad |
| PCR-Gerät MyCycler | BioRad |
| pH-Meter φ32 | Beckmann |
| Photometer FluoStar Optima | BMG |
| Photometer NanoDrop ND-1000 | PeqLab |
| Pipetten 1-20 µl, 10-100 µl, 100-1000 µl | Brand |
| Präzisionswaagen 440-35 n, EW | Kern |
| Semi-Dry-Blot Trans-Blot | BioRad |
| Sterile Werkbank Vacusafe comfort | Hera safe |
| Tischzentrifuge Biofuge 13 | Heraeus |
| Vertikal-Gelelektrophoresekammer Mini Protean II | BioRad |
| Wasseraufbereitungsanlage Milli-Q plus | Millipore |
| Zählkammer für Zellen Neubauer Zählkammer | Labotec |

2.2 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 2: Plastikwaren und Verbrauchsmaterialien

| Materialien | Beschreibung |
|--------------------------------|--|
| Dialyseschlauch | Porengröße: 12 – 14 kDa (NoeLab) |
| Einweg-Auslaufpipetten | 1 ml, 5 ml, 10 ml und 25 ml |
| Gewebekultur-Petrischalen | Durchmesser/Wachstumsfläche (cm/cm ²): 14,4/145, 9,4/58 und 6,0/21 |
| Nitrocellulose-Membran | Whatman Potran BA 83; 0,2 µm (Roth) |
| PCR-Gefäße | 96-Loch-Platte, 8-Loch Streifen, |
| Photomaterialien | Entwickler- und Fixierer-Lsg. (Kodak), Röntgenfilme (Agfa) |
| Plastikpipettenspitzen | 0,5-10 µl, 10-100 µl und 100-1000 µl |
| Reaktionsgefäße | 0,4 ml, 1,5 ml, 2,0 ml Safe-Lock, 1,5 ml mit Schraubverschluss und Kryoröhrchen |
| Whatman 3 mm Papier | 3469 (Schleicher und Schuell) |
| Zellkulturflaschen, Filter Top | Kulturflasche/Volumen (cm ² /ml): 75/250 und 25/50 |
| Zellkulturplatten, 12-Loch | Kulturfläche: 3,8 cm ² |
| Zellkulturplatten, 24-Loch | Kulturfläche: 1,75 cm ² |
| Zellkulturplatten, 6-Loch | Kulturfläche: 9,6 cm ² |
| Zentrifugenröhrchen | 15 und 50 ml Spitzboden, 14 ml Rundboden |

Alle Plastikwaren für die Zellkultur wurden steril von den Firmen Greiner oder BD Biosciences bezogen.

2.3 Chemikalien

Allgemein verwendete Chemikalien wurden von den Firmen Roth, Applichem oder Sigma in p.a.-Qualität bezogen.

Tabelle 3: Verwendete Chemikalien und deren Hersteller/Bezugsfirma

| Chemikalie | Hersteller/Bezugsfirma |
|-------------------------------|------------------------|
| 1,4 Dithiothreitol (DTT) | Biomol |
| Acrylamid 4K-Lsg. (30 %) 29:1 | Applichem |

Material

| | |
|---|---------------|
| Agarose | Roth |
| Ammoniumperoxodisulfat (APS) | Sigma |
| Bradford Reagenz | BioRad |
| Bromphenolblau | Sigma |
| Coelenteracin | PJK |
| Coenzym A Trilithiumsalz-Dihydrat | Appllichem |
| Collagen Type II (Hühnchen) | Sigma |
| Diethylpyrocarbonat (DEPC) | Sigma |
| Dimethylsulfoxid (DMSO) | Sigma |
| D-Luciferin | PJK |
| Ethanol | Sigma |
| Glycerin | Roth |
| Glycin | Sigma |
| Guanidiniumisothiocyanat (GIT) | Roth |
| Heparin | Sigma |
| Isopropanol | Sigma |
| Komplettes Freud'sches Adjuvans | Otto Nordwald |
| Magermilchpulver | Appllichem |
| Natriumnitrit (NaNO ₂) | Sigma |
| Nonidet P-40 (NP-40/ IGPal) | Sigma |
| NTP's und dNTP's | PeqLab |
| Ponceau S | Sigma |
| Protein A/G Agarose | Santa Cruz |
| Rinderserum Albumin, Fraktion V | Appllichem |
| RNase Inhibitor 40 U/μl | Fermentas |
| SDS ultra pure | Roth |
| Streptavidin Beads | Sigma |
| TEMED (N, N, N', N'-Tetramethylethylendiamin) | Sigma |
| tRNA | Sigma |
| Tween-20 | Sigma |

2.4 Reagenzien und Kits

Tabelle 4: Verwendete Reagenzien und Kits und deren Hersteller/Bezugsfirma

| Reagenzien und Kits | Hersteller/Bezugsfirma |
|--|------------------------|
| Biotin RNA Labeling Mix, 10x | Roche |
| DMEM (Dulbeco´s modified Eagle Medium) mit 1 g/l Glukose, ohne L-Glutamin, mit Phenolrot | Sigma |
| DNA-Marker Gene Ruler 50 bp DNA Ladder | Fermentas |
| DNA-Marker λ DNA/Eco 91I (117 – 20995 bp) | Fermentas |
| Fötales Kälberserum (fetal calf serum, FCS), hitzeinaktiviert | HyClone |
| GeneJuice | Calbiochem |
| Gibco TripLE Express Trypanblaulösung (0,4 % Trypanblau in PBS) | Invitrogen |
| High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit | Applied Biosystems |
| iProof High Fidelity DNA Polymerase Kit | BioRad |
| L-Glutamin (100x konz., 200 mM) | PAN Biotech |
| miRNeasy Isolation Kit | Qiagen |
| Natrium-Pyruvat (100x konz., 100 mM) | Sigma |
| Page Ruler, Prestained Protein Ladder | Thermo Scientific |
| pcDNA1 x HinfI (22 – 1058 bp) | Eigene Herstellung |
| Penicillin/Streptomycin (100x konz., 10000 U bzw. 10 mg/ml) | Sigma |
| PLB (passive lysis buffer) | Promega |
| Pyruvat (100x konz., 100 mM) | Roth |
| TaqMan MicroRNA Reverse Transcription Kit | Applied Biosystems |
| RNeasy Kit | Qiagen/ PeqLab |
| RT ² miRNA First Strand Kit (MA-03) | SA Biosciences |
| RT ² miRNA PCR Array Mouse Inflammation (MAM-105A) | SA Biosciences |
| RT ² Real-Time TM Sybr Green/Fluorescein PCR master mix (PA-011) | SA Biosciences |
| Steriles PBS | PAA |
| Streptavidin Beads | Sigma |
| T3 RNA Polymerase | Roche |
| T7 RNA Polymerase | Roche |

| | |
|--|--------------------|
| TaqMan MicroRNA Assay (mumiR-16, mumiR-34a, mumiR-93, mumiR-182) | Applied Biosystems |
| Trypsin/EDTA-Lösung (10x konz., 5 % Verdünnung mit PBS) | Sigma |
| Western Lightning, Chemilumineszens-Reagenz | PerkinElmer |
| Zeocin | InVivoGen |

2.5 Lösungen und Puffer

Alle Lösungen und Puffer wurden, wenn nicht anders angegeben, mit Aqua bidest. (Millipore) angestezt. Puffer und Lösungen für Experimente mit RNA wurden mit DEPC-Wasser angesetzt.

DEPC-Wasser 1 l Aqua bidest. wurde mit 1 ml DEPC versetzt, 16 h gerührt und 2x 60 min autoklaviert.

10x TBE-Puffer 890 mM TrisHCl, pH = 8,0
 890 mM Borsäure
 20 mM EDTA

DNA-Probenpuffer 20 % Ficoll 500
 0,1 % Bromphenolblau
 0,1 % Xylencyanol
 in TBE-Puffer

GIT-Puffer 4 M Guanidiniumisothiocyanat
 2 mM Natriumcitrat, pH = 7,0
 0,5 % Laurylsarcosin
 0,1 M β -Mercaptoethanol (frisch dazugegeben)

2x Taq-Puffer 1 M Tris/HCl, pH = 8,7
 1 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$
 1 M MgCl_2

Bakterienmedien

LB-Medium, pH = 7,0 10 g Bactotrypton (Casein)
 10 g NaCl
 5 g Hefeextrakt
 ad. 1 l Aqua bidest., 20 min autoklavieren

Niedrigsalzmedium 10 g Bactotrypton (Casein)
 5 g NaCl
 5 g Hefeextrakt
 ad 1 l Aqua bidest., 20 min autoklavieren

Selektionsmedien LB-Medium + 100 µg/ml Ampicillin
 Niedrigsalzmedium + 25 µg/ml Zeocin

Selektionsagarplatten Selektionsmedium + 15 g Bactoagar

Plasmid-DNA-Präparation

Maniatis I 9,9 g Glukose (50mM)
 12,5 ml 1 M Tris/HCl (25mM, pH = 8,8)
 10 ml 0,5 M EDTA (10mM, pH = 8,8)
 ad. 500 ml Aqua bidest.

Maniatis II 200 µl 10 N NaOH
 1 ml SDS, 10 %
 9,3 ml Aqua bidest.

Maniatis III 3 M KAc, pH = 4,8

Protein-Analysen

| | | |
|--------------------|--------|--------------------|
| RIPA-Puffer | 50 mM | Tris/HCl, pH = 7,4 |
| | 150 mM | NaCl |
| | 1 % | NP-40 |
| | 2 mM | EDTA |
| | 10 % | Glycerin |

Protease- und Phosphataseinhibitoren (Roche) werden nach Herstellerangaben frisch zugegeben.

| | | |
|--------------------------|--------|--------------------|
| 2x Laemmli-Puffer | 125 mM | Tris/HCl, pH = 6,8 |
| | 2 mM | EDTA |
| | 4 % | SDS |
| | 20 % | Glycerin |
| | 0,02 % | Bromphenolblau |

Vor Gebrauch wird DTT in einer 40 mM Endkonzentration zugesetzt.

| | | |
|----------------------|--------|--------------------|
| 5x Laufpuffer | 125 mM | Tris/HCl, pH = 8,8 |
| | 960 mM | Glycin |
| | 0,5 % | SDS |

| | | |
|-----------------------|--------|--------------------|
| Transferpuffer | 25 mM | Tris/HCl, pH = 8,3 |
| | 960 mM | Glycin |
| | 20 % | Methanol |

| | | |
|------------|--------|--------------------|
| TBS | 10 mM | Tris/HCl, pH = 7,8 |
| | 150 mM | NaCl |

| | | |
|-------------|--------|--------------------|
| TBST | 10 mM | Tris/HCl, pH = 7,8 |
| | 150 mM | NaCl |
| | 0,01 % | Tween 20 |

| | | |
|--------------------------------|-------|-----------|
| Ponceau S – Färbelösung | 0,5 % | Ponceau S |
| | 1 % | Eisessig |

| | | |
|------------------------------|-------|----------------------|
| Coomassie Färbelösung | 0,1 % | Coomassie Blue 250 G |
| | 40 % | Methanol |
| | 10 % | Essigsäure |

Material

| | | |
|------------------------|-----|------------|
| Entfärberlösung | 5 % | Methanol |
| | 7 % | Essigsäure |

Pull down Experimente

| | | |
|------------------------------|-----------|-------------------|
| Bindepuffer 40 mM KCl | 10 mM | HEPES, pH = 7,9 |
| | 3 mM | MgCl ₂ |
| | 5 mM | EDTA, pH = 8,0 |
| | 2 mM | DTT |
| | 5 % | Glycerin |
| | 0,5 % | NP-40 |
| | 3 mg/ml | Heparin |
| | 0,5 mg/ml | t-RNA |
| | 40 mM | KCl |

in DEPC-Wasser.

| | | |
|-------------------------------|-----------|-------------------|
| Bindepuffer 300 mM KCl | 10 mM | HEPES, pH = 7,9 |
| | 3 mM | MgCl ₂ |
| | 5 mM | EDTA, pH = 8,0 |
| | 2 mM | DTT |
| | 5 % | Glycerin |
| | 0,5 % | NP-40 |
| | 3 mg/ml | Heparin |
| | 0,5 mg/ml | t-RNA |
| | 300 mM | KCl |

in DEPC-Wasser.

| | | |
|-------------------------------|-------|-------------------|
| Elutionspuffer 2 M KCl | 10 mM | HEPES, pH = 7,9 |
| | 3 mM | MgCl ₂ |
| | 5 mM | EDTA, pH = 8,0 |
| | 2 mM | DTT |
| | 0,2 % | Glycerin |
| | 2 M | KCl |

in DEPC-Wasser.

Lösungen für die Blutaufbereitung und CII-Immunisierung

| | | |
|--------------------|--------|------------------|
| EDTA-Puffer | 30 mM | EDTA |
| | 0,01 % | NaN ₃ |

in PBS.

| | | |
|----------------------------|--------|--------------------|
| ACK-Puffer pH = 7,3 | 150 mM | NH ₄ Cl |
| | 1 mM | KHCO ₃ |
| | 0,1 mM | EDTA |

| | | |
|------------------|--------|------------------|
| GM-Puffer | 0,5 % | BSA |
| | 5 mM | EDTA |
| | 0,01 % | NaN ₃ |

in PBS.

| | | |
|-------------------|--------|-------------------|
| CII-Lösung | 100 mg | CII |
| | 25 ml | 0,01 M Essigsäure |

Reportegen Analysen

| | | |
|-------------------------------|--------|--------------------|
| Renilla-Substratpuffer | 25 mM | Tris/HCl, pH = 7,5 |
| | 0,1 M | NaCl |
| | 1 mM | CaCl ₂ |
| | 0,9 µM | Coelenterazin |

| | | |
|----------------------------------|--------|-------------------|
| Luciferase-Substratpuffer | 25 mM | D-Luciferin |
| | 27 µM | CoenzymA |
| | 100 mM | ATP |
| | 30 mM | Tricin, pH = 7,8 |
| | 0,1 mM | EDTA |
| | 15 mM | MgSO ₄ |
| | 10 mM | DTT |

2.6 Antikörper

Tabelle 5: Verwendete Primärantikörper für Western Blot Analysen

| Primär-antikörper | Klasse/Herkunft | Firma | Größe (kDa) | Verdünnung | Blockier- und Verdünnungspuffer |
|-----------------------|-----------------------|-------------------|----------------|------------|---------------------------------|
| Anti AUF1 (HNRPD) | Polyklonal, Kaninchen | Sigma | 37, 40, 42, 45 | 1:1000 | 5 % Milchpulver in TBST |
| Anti GAPDH | Monoklonal, Maus | Santa Cruz | 37 | 1:1000 | 5 % Milchpulver in TBST |
| Anti iNOS | Monoklonal, Kaninchen | R&D | 125 | 1:1000 | 5 % Milchpulver in TBST |
| Anti PABP | Monoklonal, Maus | Abcam / Immoquest | 72 | 1:1000 | 5 % Milchpulver in TBST |
| Anti β -Tubulin | Monoklonal, Kaninchen | Sigma | 55 | 1:10000 | 5 % Milchpulver in TBST |

Tabelle 6: Verwendete Sekundärantikörper für Western Blot Analysen

| Sekundärantikörper | Firma | Verdünnung | Verdünnungspuffer |
|--------------------------------------|-------|------------|-------------------------|
| Anti Kaninchen, Peroxidase-gekoppelt | Sigma | 1:10000 | 5 % Milchpulver in TBST |
| Anti Maus, Peroxidase-gekoppelt | Sigma | 1:10000 | 5 % Milchpulver in TBST |

Tabelle 7: Verwendete Antikörper für FACS Analysen

| Antikörper | Firma | Verdünnung | Verdünnungspuffer |
|----------------------------------|---|------------|-------------------|
| Anti Maus CD4-PE (L3/4)(H129.19) | BD Biosciences | 1:400 | GM-Puffer |
| Anti Maus IgG ₁ -FITC | CALTAC Laboratories | 1:200 | GM-Puffer |
| Anti Maus IgG _{2a} -PE | BD Biosciences | 1:400 | GM-Puffer |
| Anti Maus TCR-V β 12 | E. Schmitt, Institut für Immunologie, Universitätsmedizin Mainz | 1:100 | GM-Puffer |

2.7 Enzyme

Tabelle 8: Verwendete Enzyme

| Enzym | Firma | Beschreibung |
|--|-------------|---|
| CIAP (calf intestinal alkaline phosphatase) | Roche | Dephosphoryliert 5' Enden der DNA |
| DNaseI, RNase frei | Roche | Doppelstrangspezifische Endonuklease |
| DNA-Taq-Polymerase | AG Kleinert | DNA Amplifikation bei PCR-Analysen |
| Klenow-Fragment der DNA-Polymerase I aus <i>E. coli</i> | NEB | Füllt 5' überhängende DNA Enden auf |
| Restriktionsendonukleasen des Typ II: <i>EcoRI, EcoRV, HindIII, XbaI, XhoI</i> | NEB | Schneiden DNA an palindromischen Sequenzen und können, je nach Enzym, glatte oder überhängende Enden hinterlassen |
| RNaseA | Sigma | Pyrimidinspezifische Endonuklease, die einzelsträngige RNA abbaut |
| T3 RNA Polymerase | Roche | DNA-abhängige RNA Polymerase spezifisch für den T3-Promotor |
| T4 DNA Ligase | NEB | Ligation von DNA |
| T7 RNA Polymerase | Roche | DNA-abhängige RNA Polymerase spezifisch für den T7-Promotor |

2.8 Plasmide

Tabelle 9: Verwendete Plasmide für Reporteranalysen

| Plasmid | Beschreibung | Transfizierte Zellart | Hersteller |
|--------------------------------|--|-----------------------|-------------|
| pcDNA4/TO-Ex1In1Ex2delPABP-Luc | Enthält die 5'UTR mit Intron 1 der humanen iNOS ohne PABP-Bindestelle in Exon 2 unter der Kontrolle eines CMV-Promotors vor dem Luc-Gen | DLD-1 | AG Kleinert |
| pcDNA4/TO-Ex1In1Ex2-Luc | Enthält die 5'UTR mit Intron 1 der humanen iNOS unter der Kontrolle eines CMV-Promotors vor dem Luc-Gen | DLD-1 | AG Kleinert |
| pcDNA4/TO-Ex1In1Ex2mutPABP-Luc | Enthält die 5'UTR mit Intron 1 der humanen iNOS mit einer Mutation in der PABP-Bindestelle in Exon 2 unter der Kontrolle eines CMV-Promotors vor dem Luc-Gen | DLD-1 | AG Kleinert |
| pGl3control | Enthält ein Luc-Gen unter der Kontrolle eines SV40-Promotors/ <i>Enhancers</i> | DLD-1 | Promega |

Material

| | | | |
|--|---|-------|-------------|
| pGl3control-3'UTR | Enthält die 3'UTR der human iNOS hinter dem Luciferase-Gen | DLD-1 | AG Kleinert |
| pGl3control-3'UTRmutA | Enthält die 3'UTR der human iNOS hinter dem Luc-Gen mit Mutationen in der PABP-Bindestelle | DLD-1 | AG Kleinert |
| pGl3control-3'UTRmutAmutB | Enthält die 3'UTR der human iNOS hinter dem Luc-Gen mit Mutationen in der PABP-Bindestelle und Mutationen in den AREs 1-3 | DLD-1 | AG Kleinert |
| pGl3control-3'UTRmutB | Enthält die 3'UTR der human iNOS hinter dem Luc-Gen mit Mutationen in den AREs 1-3 | DLD-1 | AG Kleinert |
| pGl3control-Ex1Ex2-Luc | Enthält die 5'UTR der human iNOS vor dem Luc-Gen ohne Intron 1 | DLD-1 | AG Kleinert |
| pGl3control-Ex1Ex2-Luc-3'UTR | Enthält die 5'UTR der human iNOS vor dem Luc-Gen ohne Intron und die 3'UTR hinter dem Luc-Gen | DLD-1 | AG Kleinert |
| pGl3control-Ex1In1Ex2del μ ORF-Luc-3'UTR | Enthält die 5'UTR mit Intron 1 der human iNOS vor dem Luc-Gen mit deletiertem μ ORF in Exon 2 und die 3'UTR hinter dem Luc-Gen | DLD-1 | AG Kleinert |
| pGl3control-Ex1In1Ex2del μ ORF-Luc-3'UTRmutA | Enthält die 5'UTR mit Intron 1 der human iNOS vor dem Luc-Gen mit deletiertem μ ORF in Exon 2 und die 3'UTR hinter dem Luc-Gen mit mutierter PABP-Bindestelle | DLD-1 | AG Kleinert |
| pGl3control-Ex1In1Ex2del μ ORF-Luc-3'UTRmutB | Enthält die 5'UTR mit Intron 1 der human iNOS vor dem Luc-Gen mit deletiertem μ ORF in Exon 2 und die 3'UTR hinter dem Luc-Gen mit mutierten AREs 1-3 | DLD-1 | AG Kleinert |
| pGl3control-Ex1In1Ex2-Luc | Enthält die 5'UTR mit Intron 1 der human iNOS vor dem Luc-Gen | DLD-1 | AG Kleinert |
| pGl3control-Ex1In1Ex2-Luc-3'UTR | Enthält die 5'UTR mit Intron 1 der human iNOS vordem Luc-Gen und die 3'UTR hinter dem Luc-Gen | DLD-1 | AG Kleinert |
| pGl3control-Ex1In1Ex2-Luc-3'UTRmutA | Enthält die 5'UTR mit Intron 1 der human iNOS vor dem Luc-Gen und die 3'UTR hinter dem Luc-Gen mit Mutation in der PABP-Bindestelle | DLD-1 | AG Kleinert |
| pGl3control-Ex1In1Ex2-Luc-3'UTRmutB | Enthält die 5'UTR mit Intron 1 der human iNOS vor dem Luc-Gen und die 3'UTR hinter dem Luc-Gen mit Mutationen in den AREs 1-3 | DLD-1 | AG Kleinert |
| pGl3control-Ex1In1Ex2mutPABP-Luc-3'UTR | Enthält die 5'UTR mit Intron 1 der human iNOS vor dem Luc-Gen mit mutierter PABP-Bindestelle in Exon 2 und die 3'UTR hinter dem Luc-Gen | DLD-1 | AG Kleinert |

Material

| | | | |
|--|--|---------------------------------|------------------------------------|
| pGI3control-Ex1In1Ex2mutPABP-Luc-3'UTRmutA | Enthält die 5'UTR mit Intron 1 der human iNOS vor dem Luc-Gen mit mutierter PABP-Bindestelle in Exon 2 und die 3'UTR hinter dem Luc-Gen mit Mutation in der PABP-Bindestelle | DLD-1 | AG Kleinert |
| pGI3control-Ex1In1Ex2mutPABP-Luc-3'UTRmutB | Enthält die 5'UTR mit Intron 1 der human iNOS vor dem Luc-Gen mit mutierter PABP-Bindestelle in Exon 2 und die 3'UTR hinter dem Luc-Gen mit Mutationen in den AREs 1-3 | DLD-1 | AG Kleinert |
| pRHCglo | Enthält einen humanen RSV Promotor, Exon 1-3 und Intron 1 + 2 des humanen β -Globin Gens | DLD-1 | Dr. T. Cooper, Houston, Texas, USA |
| pRL-EF1 α | Humaner EF-1 α Promotor in Renilla Expressionsplasmid | DLD-1 | Dr. M. Bros. |
| pXP2-16kb | Enthält ein Luc-Gen unter der Kontrolle des humanen iNOS-Promotors (16 kb) | DLD-1-EGFP C1, DLD-1-siPABPpTer | D. Geller |

Tabelle 10: Verwendete Plasmide für stabile Transfektionen

| Plasmid | Beschreibung | Transfizierte Zellart | Hersteller |
|----------|--|-----------------------|----------------|
| pTerEGFP | Expressionsplasmid für die Expression von GFP unter dem CMV-Promotor | DLD-1 | Dr. E. Bockamp |

Tabelle 11: Verwendete Plasmide zur *in vitro* Transkription von sense RNA Sonden

| Plasmid | Beschreibung | Linearisiert mit | Transkribiert mit | Hersteller |
|--------------------|--|------------------|-------------------|----------------------|
| pAUUUA_B_mutARE1-3 | 104 bp Fragment der humanen iNOS 3'UTR Position 329 – 432, enthält Mutationen in den AREs 1-3 | <i>EcoRI</i> | T3 Polymerase | AG Kleinert |
| pAUUUAfrag A | 98 bp Fragment der humanen iNOS 3'UTR in pXcmI kloniert (Position 234 – 331, enthält keine AREs) | <i>NcoI</i> | T3 Polymerase | F. Rodriguez-Pascual |
| pAUUUAfrag B | 104 bp Fragment der humanen iNOS 3'UTR in pXcmI kloniert (Position 329 – 432, enthält 3 AREs) | <i>EcoRI</i> | T3 Polymerase | F. Rodriguez-Pascual |
| pCR-huiNOS-3'UTR | pCRSkript, enthält die 3'UTR der human iNOS in der <i>HindIII</i> Schnittstelle | <i>BamHI</i> | T7-Polymerase | F. Rodriguez-Pascual |

| | | | | |
|-------------------------------|--|--------------|---------------|----------------------|
| pCR-huiNOS-Ex1ExHdNar2 | pCRSkript, enthält das Exon 1 und Exon 2 der human iNOS 5'UTR in der <i>HindIII</i> Schnittstelle | <i>NcoI</i> | T7-Polymerase | AG Kleinert |
| pCR-huiNOS-Ex1ExHdNar2delPABP | pCRSkript, enthält das Exon 1 und Exon 2 der human iNOS 5'UTR in der <i>HindIII</i> Schnittstelle mit deletierter PABP-Bindestelle in Exon 2 | <i>NcoI</i> | T7 Polymerase | AG Kleinert |
| pCR-huiNOSEx2mutPABP | pCRSkript, enthält das Exon 1 und Exon 2 der human iNOS 5'UTR in der <i>HindIII</i> Schnittstelle mit mutierter PABP-Bindestelle in Exon 2 | <i>NcoI</i> | T7-Polymerase | AG Kleinert |
| pCR-huiNOS-Ex2wt | pCRSkript, enthält das Exon 2 der human iNOS 5'UTR in der <i>HindIII</i> Schnittstelle | <i>NcoI</i> | T7-Polymerase | AG Kleinert |
| pCRmutAqc2delHdST | 98 bp Fragment der humanen iNOS 3'UTR in pCR-Skript kloniert (Position 234 – 331, enthält keine AREs), Mutationen in der PABP-Bindestelle | <i>BanHI</i> | T7-Polymerase | AG Kleinert |
| pXcmIATTT A B | 254 bp Fragment der humanen iNOS 3'UTR in pXcmI kloniert (Position 234 – 479, enthält 5 AREs) | <i>EcoRI</i> | T3 Polymerase | F. Rodriguez-Pascual |
| pXcmInonATTT A B | 245 bp Fragment der humanen iNOS 3'UTR in pXcmI kloniert (Position 1 – 245, enthält keine AREs) | <i>EcoRI</i> | T3 Polymerase | F. Rodriguez-Pascual |

2.9 Oligonukleotide

Alle verwendeten Sonden waren mit den Farbstoffen FAM und TAMRA markiert.

Tabelle 12: Verwendete murine Primer/Sonden-Sets für qRT-PCR Analysen

| Primer/Sonde | Sequenz |
|--------------------|------------------------------------|
| muPol2a sense | ACC ACG TCC AAT GAT ATT GTG GAG |
| muPol2a antisense | ATG TCA TAG TGT CAC ACA GGA GAG |
| muPol2a Sonde | CTG GGC ATT GAG GCT GTG CGG AA |
| muS100A8 sense | CTC CGT CTT CAA GAC ATC GTT TG |
| muS100A8 antisense | TCA TTC TTG TAG AGG GCA TGG TG |
| muS100A8 Sonde | CAA TGC CGT CTG AAC TGG AGA AGG CC |

Material

| | |
|---------------------------|---|
| muTNF α sense | CAT CTT CTC AAA ATT CGA GTG ACA A |
| muTNF α antisense | TGG GAG TAG ACA AGG TAC AAC CC |
| muTNF α Sonde | CAC GTC GTA GCA AAC CAC CAA GTG GA |
| muINOS sense | CAG CTG GGC TGT ACA AAC CTT |
| muINOS antisense | CAT TGG AAG TGA AGC GTT TCG |
| muINOS Sonde | CTG GGC ATT GAG GCT GTG CGG AA |
| muIL-1 β sense | CAA CCA ACA AGT GAT ATT CTC CAT G |
| muIL-1 β antisense | GAT CCA CAC TCT CCA GCT GCA |
| muIL-1 β Sonde | CTG TGT AAT GAA AGA CGG CAC ACC CAC C |
| muIL-6 sense | GAG GAT ACC ACT CCC AAC AGA CC |
| muIL-6 antisense | AAG TGC ATC ATC GTT GTT CAT ACA |
| muIL-6 Sonde | CAG AAT TGC CAT TGC ACA ACT CTT TTC TCA |
| muMip1 α sense | CTG CAA CCA AGT CTT CTC AGC |
| muMip1 α antisense | CTG CCT CCA AGA CTC TCA GG |
| muMip1 α Sonde | ACT GCC TGC TGC TTC TCC TAC AGC C |
| muIFN γ sense | TCA AGT GGC ATA GAT GTG GAA GAA |
| muIFN γ antisense | TGG CTC TGC AGG ATT TTC ATG |
| muIFN γ Sonde | TCA CCA TCC TTT TGC CAG TTC CTC CAG |
| muRANKL sense | CCC AGC CAT TTG CAC ACC |
| muRANKL antisense | CTT GGC CCA GCC TCG ATC |
| muRANKL Sonde | CAT CGG GTT CCC ATA AAG TCA CTT TGT CCT |
| muRANK sense | TGC CTA CAG CAT GGG CTT T |
| muRANK antisense | AGA GAT GAA CGT GGA GTT ACT GTT T |
| muRANK Sonde | CCA GTG AAG CAG CAG CCA GCA T |
| muTRAP sense | CTC CCA CCC TGA GAT TTG TG |
| muTRAP antisense | TCT CCT GGA ACC TCT TGT CG |
| muTRAP Sonde | TAC TTC ACT GGA GTG CAC GAT GCC A |
| muMMP3 sense | TGG AGA TGC TCA CTT TGA CG |
| muMMP3 antisense | ATG GAA ACG GGA CAA GTC TG |
| muMMP3 Sonde | CAC TCA GCC AAG GCT GAA GCT CTG A |
| muCXCL10 sense | GTC TGA GTG GGA CTC AAG GGA TC |
| muCXCL10 antisense | CAC TGG CCC GTC ATC GAT AT |
| muCXCL10 Sonde | TCT CGC AAG GAC GGT CCG CTG |

Tabelle 13: Verwendete humane Primer/Sonden-Sets für qRT-PCR Analysen

| Primer/Sonde | Sequenz |
|---------------------|---|
| huGAPDH sense | CCC ATG TTC GTC ATG GGT GT |
| huGAPDH antisense | TGG TCA TGA GTC CTT CCA CGA TA |
| huGAPDH Sonde | CTG CAC CAC CAA CTG CTT AGC ACC C |
| huPol2a sense | GCA CCA CGT CCA ATG ACA T |
| huPol2a antisense | GTG CGG CTG CTT CCA TAA |
| huPol2a Sonde | TAC CAC GTC ATC TCC TTT GAT GGC TCC TAT |
| huiNOS sense | TGC AGA CAC GTG CGT TAC TCC |
| huiNOS antisense | GGT AGC CAG CAT AGC GGA TG |
| huiNOS Sonde | TGG CAA GCA CGA CTT CCG GGT G |
| huPABP sense | GCT CAG GGT GCC AGA CGT C |
| huPABP antisense | GGA GCA GCT GGG CGG |
| huPABP Sonde | TCC ATT CCA AAA TAT GCC CGG TGC T |
| huIL-8 sense | GCC GTG GCT CTC TTG GC |
| huIL-8 antisense | TAG CAC TCC TTG GCA AAA CTG C |
| huIL-8 Sonde | CTT CCT GAT TTC TGC AGC TCT GTG TGA AGG |
| huRANTES sense | ACA CCA GTG GCA AGT GCT CC |
| huRANTES antisense | GCA CAC ACT TGG CGG TTC TT |
| huRANTES Sonde | ACC CAG CAG TCG TCT TTG TCA CCC G |
| Ren sense | TTC GCA ACG GGT TTG CG |
| Ren antisense | TGT TTA CAT CTG GCC CAC CAC |
| Ren Sonde | AGC CAC CAT GAT CCA G |
| RHCglo sense | CATTCACCACATTGGTGTGC |
| RHCglo antisense | GGAACCTACAAGATTGCTGGAG |
| RHCglo Sonde | AGCTCCGGACTCGGGATCCATCTAC |
| Ex1Luc sense | CACAGGTCTCTTCCTGGTTTG |
| Ex1Luc antisense | TCTTCCAGCGGATAGAATGG |
| Ex1Luc Sonde | CAGCTGCAAGCCCCACAGTGAAG |

2.10 Zelllinien

Tabelle 14: Verwendete Zelllinien

| Zellen | Beschreibung | Nährmedium | Hersteller |
|--------------------|--|--|----------------|
| DLD-1 | Humane Kolon-Adenokarzinomzellen | DMEM + 10 % FCS + 1 % Pen./Strep. + 1 % Pyruvat | ATCC (CCL-221) |
| DLD-1-EGFP C1 | Humane Kolon-Adenokarzinomzellen, stabil transfiziert mit pcDNA4/TOGFPC1, exprimieren GFP | DMEM + 10 % FCS + 1 % Pen./Strep. + 1 % Pyruvat + 0,2 mg/ml Zeocin | AG Kleinert |
| DLD-1-EGFPpTer | Humane Kolon-Adenokarzinomzellen, stabil transfiziert mit pTer-eGFP-tetR A, exprimieren GFP | DMEM + 10 % FCS + 1 % Pen./Strep. + 1 % Pyruvat + 0,2 mg/ml Zeocin | I. Casper |
| DLD-1-siLucpsiRNA | Humane Kolon-Adenokarzinomzellen, stabil transfiziert mit psiRNA-hH1-GFPzeo-siLuc, exprimieren eine siRNA gegen Luciferase | DMEM + 10 % FCS + 1 % Pen./Strep. + 1 % Pyruvat + 0,2 mg/ml Zeocin | I. Casper |
| DLD-1-siLucpTer | Humane Kolon-Adenokarzinomzellen, stabil transfiziert mit pTer-EGFP-siLuc-tetR A, exprimieren eine siRNA gegen Luciferase | DMEM + 10 % FCS + 1 % Pen./Strep. + 1 % Pyruvat + 0,2 mg/ml Zeocin | S. Nowag |
| DLD-1-siPABPpTer | Humane Kolon-Adenokarzinomzellen, stabil transfiziert mit pTer-EGFP-siPABP-tetR A, exprimieren eine siRNA gegen PABP | DMEM + 10 % FCS + 1 % Pen./Strep. + 1 % Pyruvat + 0,2 mg/ml Zeocin | S. Nowag |
| DLD-1-siUPF1psiRNA | Humane Kolon-Adenokarzinomzellen, stabil transfiziert mit psiRNA-hH1-GFPzeo-siUPF1, exprimieren eine siRNA gegen RentI | DMEM + 10 % FCS + 1 % Pen./Strep. + 1 % Pyruvat + 0,2 mg/ml Zeocin | I. Casper |
| RAW-264.7 | Murine Makrophagen Leukämie Zell-Linie | DMEM + 10 % FCS + 1 % Pen./Strep. + 1 % Pyruvat | ATCC |

2.11 Bakterien

Top 10 *E. coli* Stamm

DH5α *E. coli* Stamm

2.12 Substanzen

Tabelle 15: Verwendete Substanzen

| Substanz | Gewonnen aus | Hersteller |
|-------------------------|------------------------------|--------------------------|
| Dexamethason | Chemisch hergestellt | Sigma |
| Gallielalaktone | <i>Galiellarufa</i> | G. Erkel, Kaiserslautern |
| Lipopolysaccharid (LPS) | <i>Escherichia coli</i> | Sigma |
| Oxacyclododecindion | <i>Exserohilum rostratum</i> | G. Erkel, Kaiserslautern |
| S-Curvularin | <i>Penicillium spec.</i> | G. Erkel, Kaiserslautern |

3 Methoden

3.1 Zellbiologische Methoden

3.1.1 Kultivierung eukaryoter Zellen

Um Kontaminationen mit Luftkeimen wie Pilzen und Bakterien zu vermeiden, wurden sämtliche zellbiologischen Arbeiten unter einer sterilen Werkbank mit nach außen gerichtetem Luftfluss durchgeführt. Des Weiteren wurde ausschließlich mit sterilen Materialien gearbeitet. Die Zellen wurden in Kulturflaschen mit Filtertop in Inkubatoren mit 5 % iger CO₂-Atmosphäre und gesättigter Wasserdampf-atmosphäre bei 37° C kultiviert. Alle 3 – 4 Tage wurden die Zellen passagiert indem diese zunächst mit PBS gewaschen und anschließend mit Trypsin-PBS vom Flaschenboden abgelöst wurden. Zur Fortführung der Stammkultur wurde ein 1/10 der Zellen wieder in eine Kulturflasche eingesät. Die restlichen Zellen wurden bei Bedarf für Experimente in Zellkulturschalen bzw. Lochplatten ausgesät, eingefroren oder verworfen. Nach 10 – 20 Passagen wurden die Zellen verworfen und ein neues Aliquot rekultiviert. Die Zusammensetzung der Medien für die verschiedenen Zelllinien ist **Tabelle 14** zu entnehmen.

3.1.2 Kryokonservierung und Rekultivierung eukaryoter Zellen

Zur dauerhaften Konservierung der Zellen wurden diese nach dem Ablösen vom Flaschenboden in 5 ml Kulturmedium resuspendiert, in 15 ml Spitzbodenröhrchen überführt und 5 min bei 1200 UpM zentrifugiert. Nach dem Zentrifugieren wurde der Überstand verworfen und das Zellpellet in FCS mit 10 % DMSO aufgenommen und in 1,5 ml Kryoröhrchen überführt. Die Zellen wurden dann über Nacht bei -80° C eingefroren, bevor sie in einem stickstoffgekühlten Aufbewahrungstank gelagert wurden.

Zur Rekultivierung wurden die Zellen schnell aufgetaut und in ein 15 ml Spitzbodenröhrchen mit 5 ml Kulturmedium überführt. Die Zellen wurden 5 min bei 1200 UpM zentrifugiert und anschließend das Zellpellet in geeignetem Kulturmedium in eine Kulturflasche eingebracht.

3.1.3 Bestimmung der Lebendzellzahl

Zur Bestimmung der Lebendzellzahl wurden 50 µl der abgelösten Zellen in 100 µl einer 0,4 % igen Trypanblaulösung eingebracht, gut gemischt und auf eine Neubauer Zählkammer aufgetragen. Der Farbstoff kann eine intakte Membran nicht passieren, so dass nur tote Zellen angefärbt werden. Um die Genauigkeit der Zählung zu erhöhen, wurden 3 Großquadrate ausgezählt und daraus der Mittelwert bestimmt. Die so ermittelte Zellzahl wurde mit der Kammerkonstanten (10^4) multipliziert um die Anzahl der lebenden Zellen pro ml zu erhalten.

3.1.4 Stimulation eukaryoter Zellen

Zur Induktion proinflammatorischer Gene, insbesondere der iNOS, wurden humane Zellen mit einem Zytokinmix aus TNF α (50 ng/ml), IFN γ (100 U/ml) und IL-1 β (50 U/ml) stimuliert. Für murine Zellen wurde Lipopolysaccharid (LPS) (2 µg/ml) und murines IFN γ (100 U/ml) verwendet. Wenn die Zellen ca. 80 – 90 % konfluent waren, wurden sie auf FCS-freies Medium gesetzt, um alle Zellen in dieselbe Phase des Zellzyklus zu bringen. Nach 16 h in FCS-freiem Medium wurde den Zellen der Zytokinmix zugegeben. Die Stimulationsdauer hing von der Fragestellung der Experimente ab und ist bei den jeweiligen Versuchen angegeben.

3.1.5 Transfektion eukaryoter Zellen

Transiente Transfektion

Bei einer transienten Transfektion wird Fremd-DNA vorübergehend in eine Zielzelle eingebracht. Hierfür wurden $\sim 2 \times 10^5$ oder $0,5 \times 10^5$ Zellen in 12-Loch oder 24-Loch Platten ausgesät. Wenn die Zellen ca. 80 % konfluent waren, wurden die Plasmide (1,2 oder 0,6 µg/DNA) mittels Lipofektion eingebracht. Um die Transfektionseffizienz zu bestimmen wurden Kontrollplasmid (pRHCGlo und pRL-EF1 α , 0,2 µg) mit den zu untersuchenden Plasmiden kotransfiziert. Hier wurden 3µl GeneJuice pro 1 µg DNA eingesetzt. Ca. 24 h nach der Transfektion wurden die Zellen auf FCS-freies Medium gesetzt, um alle Zellen in dieselbe Phase des Zellzyklus zu bringen. Nach weiteren 16 h wurden die Zellen entweder mit GIT-Puffer (RNA-Analysen) oder PLB (Reportergen-Analysen) abgestoppt oder erst mit Zytokinen und/oder anderen Substanzen behandelt.

Stabile Transfektion

Bei einer stabilen Transfektion wird die zu untersuchende Fremd-DNA in das Genom der Zielzelle integriert, so dass diese DNA an Tochterzellen weitergegeben werden kann. Um die transfizierten Zellen zu selektionieren, befindet sich zusätzlich zum gewünschten Genkonstrukt ein Antibiotikum-Resistenzgen auf dem transfizierten Plasmid, so dass Wildtypzellen im entsprechenden Selektionsmedium absterben. Wenn sich auf dem eingebrachten Plasmid ein Gen für das grün fluoreszierende Protein (GFP) befindet, können die transfizierten Zellen mittels Fluoreszenz aktiviertem Zell Sortieren (FACS) angereichert werden. Für eine stabile Transfektion wurden $\sim 2 \times 10^5$ Zellen in 6-Loch Platten ausgesät und mit 5 μg DNA transfiziert, wenn die Zellen eine Konfluenz von ca. 80 % erreicht haben. 24 h nach der Transfektion wurden die Zellen wie in **3.1.1** beschrieben abtrypsinisiert, in 10 cm Kulturplatten überführt und mit Medium überschichtet. Nach weiteren 24 h wurde das normale Medium durch ein entsprechendes Selektionsmedium ersetzt. Jeden zweiten Tag wurde ein Mediumwechsel durchgeführt um die abgestorbenen Wildtypzellen zu entfernen. Wenn die Sterberate der Wildtypzellen stark abgenommen hat, wurden die transfizierten Zellen in eine Kulturflasche mit Filtertop überführt und kultiviert. Mittels qRT-PCR-, Western Blot- oder FACS-Analysen wurde überprüft ob die Zellen das gewünschte Gen enthielten. Exprimierten die Zellen das gewünschte Gen, wurden mehrere Aliquots wie in **3.1.2** beschrieben kryokonserviert.

3.2 Proteinbiochemische Methoden

3.2.1 Isolierung von Proteinen aus Zellen und Geweben

Für proteinbiochemische Untersuchungen wurden Zellen in RIPA-Puffer (**2.5**) aufgenommen, mit einer Spritze homogenisiert und anschließend für 10 min in einem End over End (EoE) Schüttler inkubiert. Um die Zelltrümmer und Lipide zu entfernen wurden die Proben bei 4° C und 13000 UpM für 5 min zentrifugiert. Zelltrümmer sammeln sich am Boden des Reaktionsgefäßes und die Lipide schwimmen als Pfropf oben auf. Die wässrige Phase wurde vorsichtig in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Das so gewonnene Zellextrakt wurde dann bei -80° C aufbewahrt. Für Reporter-gen-Analysen wurden die Zellen in 24-Loch Platten mit 100 μl PLB lysiert und für mindestens 1 h bei -20° C eingefroren. Zur Untersuchung von

Proteinen aus Geweben, wurde ein Teil der in Stickstoff eingefrorenen Organe in RIPA-Puffer gegeben und mit einem Ultra Turrax oder einem Tissue Lyser homogenisiert. Anschließend wurden die Proben zentrifugiert um die Proteine von nicht homogenisiertem Gewebe zu trennen. Die so gewonnen Extrakte wurden bei -80°C aufbewahrt.

3.2.2 Photometrische Quantifizierung von Gesamtprotein nach Bradford

Die Konzentrationsbestimmung der Proteinextrakte erfolgte photometrisch nach der Methode von Marion M. Bradford [165]. Der Farbstoff Coomassie Brilliant Blue G-250 bildet Komplexe mit Proteinen und kann durch die Veränderung seines Extinktionskoeffizienten photometrischverfolgt werden. Die ungebundene Form hat ein Absorptionsmaximum bei 470 nm. Nach der Komplexierung mit Proteinen verschiebt sich das Absorptionsmaximum hin zu 595 nm, so dass die Zunahme der Absorption bei 595 nm proportional zur Proteinkonzentration ist. Die Proteinkonzentration wurde durch Abgleich mit einer BSA-Kalibrierung ermittelt.

3.2.3 Anreicherung von Proteinen

Um Proteine zu konzentrieren wurde das Protokoll von Wessel und Flügge [166] verwendet. Hierfür wurde die gewünschte Extraktmenge auf 100 μl mit Wasser aufgefüllt, mit 400 μl Methanol und 100 μl Chloroform überschichtet. Anschließend wurden 300 μl Wasser hinzugegeben und die Proben gut durchgemischt. Zur Phasentrennung wurden die Proben 5 min bei 4°C und 13000 UpM zentrifugiert. Die Proteine werden in der Interphase angereichert. Anschließend wurde die obere wässrige Phase vorsichtig abgenommen und die Proteine mit 300 μl Methanol gefällt. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt (5 min, 4°C , 13000 UpM) wurde der Überstand vorsichtig abgeschüttet und das Pellet ein paar Minuten luftgetrocknet. Die Resuspendierung erfolgte in einfachem Laemmli-Puffer (2.5).

3.2.4 SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Zur Analyse der Proteine aus den Extrakten wurde die eindimensionale SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-PAGE) nach Laemmli [167] verwendet. Hierbei werden die Proteine in einer Polyacrylamidgelmatrix ihrer Größe entsprechend aufgetrennt. Durch das im Laemmli-Puffer und im Gel enthaltene SDS wird die Eigenladung der Proteine maskiert, so dass diese nach einer vollständigen Denaturierung bei 95°C in einem elektrischen Feld nach

ihrer Molekülgröße getrennt werden. Bei der SDS-PAGE setzt sich das Polyacrylamidgel aus zwei Phasen zusammen. Das Sammelgel dient zur Anreicherung der Proteine an der Phasengrenze zum Trenngel, welches feinporiger ist und zur eigentlichen Trennung der Proteine dient. Für die in dieser Arbeit durchgeführten Experimente wurde das Mini-Protean-System 3 von BioRad und 10 % ige, 1,5 mm dicke SDS-Polyacrylamidgele verwendet.

Zusammensetzung für 2 Gele:

| | | | |
|-----------|--------|----|-------------------------------|
| Sammelgel | 975 | μl | 30:0,8 Acrylamid/Bisacrylamid |
| | 4,6 | ml | H ₂ O |
| | 1875 | μl | 0,5 M TRIS/HCl, pH = 6,8 |
| | 75 | μl | 10 % SDS |
| | 9,75 | μl | TEMED |
| | 49,5 | μl | 10 % APS |
| Trenngel | 5,625 | ml | 30:0,8 Acrylamid/Bisacrylamid |
| | 6,695 | ml | H ₂ O |
| | 4,22 | ml | 1,5 M TRIS/HCl, pH = 6,8 |
| | 168,75 | μl | 10 % SDS |
| | 11,25 | μl | TEMED |
| | 112,5 | μl | 10 % APS |

Zunächst wurde das Trenngel in die Gelkammer gegeben und, um eine glatte, waagerechte Trennlinie zu erhalten, mit 70 % igem EtOH überschichtet. Wenn das Trenngel vollständig polymerisiert war wurde das Sammelgel gegossen. Der Gelkamm wurde sofort nach dem Gießen des Sammelgels eingesetzt. Wenn die Gele nicht sofort gebraucht wurden, wurden sie in feuchtes Papier geschlagen und in einer Plastiktüte im Kühlschrank für max. 3 Tage aufbewahrt. Die Proteine wurden in Laemli-Puffer aufgenommen und 10 min bei 95° C denaturiert. Während dessen wurde das Gel in die Laufkammer gespannt und diese mit Laufpuffer (2.5) gefüllt. Anschließend wurden die Proben auf das Gel aufgetragen und eine Initialspannung von 85 V angelegt. Sobald die Proteine in das Trenngel eingelaufen waren, wurde die Spannung auf 115 V erhöht. Die Spannung wurde so lange beibehalten bis die Lauffront gerade eben herauslief. Als Größenmarker wurde ein Proteinstandard verwendet.

3.2.5 Immundetektion mittels Western Blot Analyse

Die Western Blot-Analyse dient dem Nachweis von Proteinen aus einem Proteingemisch. Dabei werden Proteine von einem Polyacrylamidgel elektrophoretisch auf eine Trägermembran transferiert und anschließend mit spezifischen Antikörpern nachgewiesen. Bei den hier verwendeten Nitrocellulosemembranen werden die Proteine über ionische polare Wechselwirkungen auf der Membran verhaftet und sind weiteren Behandlungen zugänglich. Die Proteine werden nachgewiesen indem proteinspezifische Primärantikörper auf die Membran gegeben werden. Durch Markierung des Protein-Antikörperkomplexes mit einem Peroxidase-gekoppelten Sekundärantikörper, welcher das Fc-Fragment des Primärantikörpers erkennt, kann das markierte Protein durch ein ECL-System (WesternLightning Chemiluminescence Reagent Plus) auf einem Röntgenfilm sichtbar gemacht werden.

Nach der SDS-Gelelektrophorese wurde das Polyacrylamidgel 10 min in Transferpuffer (2.5) äquilibriert und die auf Gelgröße zugeschnittene Nitrocellulosemembran 1 min ebenfalls in Transferpuffer aktiviert. Da hier die Semi-Dry-Blot Variante angewendet wurde, wurde auch das auf Gelgröße zugeschnittene Whatmanpapier in Transferpuffer eingelegt, um eine leichte Feuchtigkeit bei dem Transfer zu erhalten. Zunächst wurden drei Blätter Whatmanpapier auf die Anodenplatte gelegt, anschließend folgten die Nitrocellulosemembran und das Polyacrylamidgel und zum Schluss wieder drei Blätter Whatmanpapier. Es wurde sorgfältig darauf geachtet, dass sich keine Luftblasen zwischen Gel und Membran befanden bevor die Kathodenplatte aufgelegt wurde. Der Transfer erfolgte bei 12 V. Die Transferdauer ist von der Proteingröße abhängig und wurde mit $\frac{3}{4}$ min pro kDa angesetzt. Nach dem Transfer wurde die Membran 1 – 1,5 h in Blockierpuffer (2.5) geschwenkt um unspezifische Bindestellen abzusättigen, bevor der Primärantikörper (Tabelle 5) auf die Membran gegeben wurde. Die Membran wurde dann über Nacht bei 4° C in der Primärantikörper-Lösung geschwenkt. Bevor der Sekundärantikörper für 1 h auf die Membran gegeben wurde, wurde diese 3x 5 min in TBST (2.5) gewaschen. Nach der Inkubation mit dem Sekundärantikörper wurde die Membran wieder 3x 5 min in TBST gewaschen bevor diese in TBS (2.5) bis zur Entwicklung verwahrt wurde. Die Detektion erfolgte mit dem ECL-System von Perkin Elmer.

3.2.6 Luciferase Reportergen Analysen

Luciferase Reportergen Analysen werden zur Untersuchungen von Promotoren und anderen regulatorisch wirkenden DNA- oder RNA-Regionen wie z.B. der 5' oder 3' untranslatierten

Bereiche eingesetzt. Da Luciferasen in menschlichen Zellen nicht exprimiert werden, eignen sie sich als Reporter von Regulationsexperimenten. Die Luciferase aus dem Leuchtkäfer setzt ihr Substrat, das D-Luciferin, mithilfe von Cofaktoren wie ATP, Coenzym A und Mg^{2+} in Oxyluciferin um. Die dabei emittierte Biolumineszenz kann mit einem Luminometer quantifiziert werden. In dieser Arbeit wurde immer ein Plasmid mit einer Renilla-Luciferase unter der Kontrolle des EF1 α -Promotors als Normierung kotransfiziert. Hierbei wurde die Umsetzung des Renillasubstrates Coelenteracin detektiert.

Für Reportegen Analysen wurden Zellen transient transfiziert (3.1.5) und nach der Stimulation mit Zytokinen (3.1.4) in PLB lysiert. 20 μ l des Zelllysates wurden in 96-Loch Platten vorgelegt. Die Messung im Luminometer erfolgte 5 sec nachdem 100 μ l der Substratlösung (2.5) auf das Zelllysate gegeben wurden. Es wurde zunächst die Luciferaseaktivität bestimmt und anschließend zur Normierung die Renilla-Luciferaseaktivität gemessen. Zur Normierung wurden die Luciferasewerte durch die Renillawerte geteilt. Um die Hintergrundaktivität zu ermitteln wurden Leerwerte mit 20 μ l PLB gemessen.

3.3 Molekularbiologische Methoden

3.3.1 Isolierung von Ribonukleinsäuren (RNA) aus Zellen und Geweben

Für alle Arbeiten mit RNA wurden sterile Pipettenspitzen und sterile Reaktionsgefäße verwendet. Alle Lösungen wurden mit autoklaviertem DEPC-H₂O angesetzt. Die Isolierung von Gesamt-RNA aus Gewebe und Zellen erfolgte nach der Methode von Chomczynski und Sacchi [168]. Gewebeproben wurden zunächst in GIT-Puffer (2.5) mit einem Ultra Turrax oder mit einem Tissue lyser zerkleinert und Zellen wurden mit GIT-Puffer überschichtet und in 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt. Falls die Extraktion nicht sofort durchgeführt wurde, konnten das Gewebe und die Zellen so bis zur Weiterverwertung bei -20° C gelagert werden. Für die Extraktion wurden 1/10 des Probenvolumens (Vol) an 2 M NaAc (pH = 4) dazugegeben, gut durchmischt und anschließend mit 1 Vol saurem, H₂O-gesättigtem Phenol überschichtet und wieder gut durchgemischt. Danach wurde 1/2 Vol Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) dazugegeben, gut durchgemischt und 15 min auf Eis inkubiert. Zur Phasentrennung wurden die Proben 20 min bei 4° C und 13000 UpM zentrifugiert. Die DNA befand sich in der sauren Phenol-Phase während die Proteine sich an

der Phasengrenze zwischen Phenol und wässriger Phase konzentrierten. So konnte die RNA in der wässrigen Phase vorsichtig abgenommen und in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt werden. Die Fällung der RNA erfolgte mit Isopropanol für mind. 1h bei -20°C . Nach der Fällung wurden die Proben 20 min bei 4°C und 13000 UpM zentrifugiert um die RNA zu pelletieren. Nachdem die RNA mit 70 % EtOH gewaschen wurde, wurde diese über Kopf getrocknet und je nach Pelletgröße in 30 – 50 μl DEPC- H_2O aufgenommen.

3.3.2 Quantifizierung von Nukleinsäuren

Die Quantifizierung gereinigter RNA- und DNA-Proben erfolgte mit dem NanoDrop[®]-ND-1000-Spektrometer. Zur Analyse wurden 2 μl der Probe eingesetzt. Die Konzentrationsbestimmung wurde durch das Messen eines Absorptionsspektrums bei 260 nm vorgenommen. Eine Absorptionseinheit bei 260 nm entspricht 40 μg ssRNA oder 50 μg dsDNA pro ml. Ein Maß für die Reinheit der Nukleinsäuren ist das Verhältnis A_{260}/A_{280} . Für reine Nukleinsäuren liegt das Verhältnis bei 1,8 für RNA und 2,1 bei DNA. Ein niedrigeres A_{260}/A_{280} Verhältnis zeigt Verunreinigungen durch Phenol oder Proteine an.

3.3.3 Reverse Transkription

mRNA

Für quantitative Untersuchungen der RNA-Expression mittels qRT-PCR (3.3.4) muss die RNA zunächst in eine komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben werden. Hierfür wird eine RNA-abhängige reverse Transkriptase eingesetzt, welche mithilfe von unspezifisch bindenden Primern eine komplementäre einzelsträngige DNA aller RNAs synthetisiert. Für die reverse Transkriptionsreaktion wurde folgender Ansatz aus dem High Capacity cDNA RT Kit verwendet:

| | | |
|-----|---------------|-----------------------------|
| 2 | μl | 10x RT Puffer |
| 0,8 | μl | 25x dNTP-Mix (100 mM) |
| 2 | μl | 10x Random Primer |
| 0,5 | μl | Multiscribe RT |
| 4,7 | μl | H_2O |
| 10 | μl | RNA (50 ng/ μl) |

Die angegebenen Volumina gelten für einen Ansatz.

Die Transkriptionsreaktion wurde im iCycler nach folgendem Programm durchgeführt:

| | | | |
|----|-----|----------------------|--------------------------------------|
| 10 | min | 25°C | Oligonukleotide binden an RNA |
| 2 | h | 37°C | Reverse Transkription |
| 5 | sec | 85°C | Denaturierung der rev. Transkriptase |
| 5 | min | 4°C | Kühlung |

microRNA

Da microRNAs eine Länge von nur 18 – 21 Nukleotiden haben, wird die cDNA Synthese hier mit spezifischen Primern für die zu untersuchenden microRNAs durchgeführt. Zusätzlich wird ein RNase-Inhibitor zugesetzt um einen Abbau dieser kurzen Nukleotide auf jeden Fall zu verhindern. Für die reverse Transkription von microRNAs wurde folgender Ansatz aus dem TaqMan MicroRNA Reverse Transcription Kit verwendet:

| | | |
|------|----|-------------------------------------|
| 1,5 | µl | 10x RT-Puffer |
| 0,15 | µl | 25x dNTPs (100 mM) |
| 0,2 | µl | RNase Inhibitor |
| 1 | µl | Multiscribe RT |
| 4,15 | µl | H ₂ O |
| 5 | µl | RNA (10 ng/µl) |
| 3 | µl | miR spezifische RT-Primer Verd. 1:5 |

Auch bei der Transkriptionsreaktion wurden die Zeiten der einzelnen Schritte auf die Länge der microRNAs angepasst. Die Transkriptionsreaktion wurde im iCycler nach folgendem Programm durchgeführt:

| | | | |
|----|-----|-------|--------------------------------------|
| 30 | min | 16° C | Primer binden an RNA |
| 30 | min | 42° C | Reverse Transkription |
| 5 | sec | 85° C | Denaturierung der rev. Transkriptase |
| 5 | min | 8° C | Kühlung |

3.3.4 Quantitative *Real Time* Polymerasekettenreaktion (qRT-PCR)

Die Polymerasekettenreaktion (PCR) dient zur Vervielfältigung von DNA-Fragmenten. Hierbei wird eine DNA-Vorlage mithilfe von spezifischen Primern von einer DNA-Polymerase amplifiziert. Bei der qRT-PCR handelt es sich um eine visualisierte Polymerasekettenreaktion bei der die amplifizierte DNA nach jedem Elongationsschritt quantifiziert werden kann. Bei Untersuchungen der Genexpression ist es wichtig die Menge eines exprimierten Gens bestimmen zu können, um Aussagen darüber machen zu können, ob dieses Gen reguliert wird. Bei der qRT-PCR mit dem TaqMan®-System werden genspezifische Primer synthetisiert, die in sense und in antisense-Richtung binden. Die Sonde mit dem Fluorophor (z.B. Carboxyfluorescein (FAM)) und dem Quencher (z.B. Carboxytetramethylrhodamin (TAMRA)) bindet zwischen den beiden Primerpaaren. Während der Elongationsphase wird die Sonde durch die 5'3'-Exonukleaseaktivität der Taq-Polymerase gespalten, so dass der Abstand des Fluorophors und des Quenchers zueinander

zunimmt und die Fluoreszenz nicht mehr gelöscht wird. Dieses Fluoreszenzsignal ist proportional zur amplifizierten DNA Menge und kann gemessen werden. Die Quantifizierung des regulierten Gens geschieht über eine Normierung mit einem oder mehreren Kontrollgenen, welche durch den Versuchsaufbau und die –Bedingungen nicht beeinflusst werden. Für die qRT-PCR Analysen wurden folgende Komponenten pro Ansatz pipettiert:

| | | |
|------|----|--------------------|
| 12,5 | µl | 2x Taq-Puffer |
| 1 | µl | dNTP-Mix (10 mM) |
| 2 | µl | sense Primer |
| 2 | µl | antisense Primer |
| 1 | µl | Sonde |
| 0,5 | µl | DNA-Taq-Polymerase |
| 4 | µl | H ₂ O |
| 2 | µl | cDNA |

Die qRT-PCR wurde unter folgenden Bedingungen im iQ-Cycler durchgeführt.

| | | | | |
|----|-----|-------|------------------------|-------------|
| 15 | min | 95° C | Initiale Denaturierung | } 40 – 45 x |
| 15 | sec | 95° C | Denaturierung | |
| 1 | min | 60° C | Anealing/Elongation | |
| ∞ | | 4° C | Kühlung | |

Die Fluoreszenzmessung erfolgte nach jedem Elongationszyklus.

Für die Quantifizierung der microRNA-Expression wurde das TaqMan MicroRNA Assay Kit verwendet. Folgende Komponenten wurden pro Ansatz pipettiert und die PCR wurde unter den oben beschriebenen Bedingungen durchgeführt:

| | | |
|-----|----|-------------------------|
| 10 | µl | 2x Taq-Puffer |
| 1 | µl | dNTP-Mix (10 mM) |
| 1 | µl | Real Time Mix AB miRNA |
| 0,5 | µl | DNA-Taq-Polymerase |
| 5,5 | µl | H ₂ O |
| 2 | µl | cDNA (miRNA-spezifisch) |

Alle Primer/Sonden-Sets wiesen Effizienzen von 100 % (+/- 10 %) auf. Für die Auswertung der relativen Genexpression wurde die $2^{-\Delta\Delta C(T)}$ -Methode verwendet [169]. Dabei wurden die Schwellenwerte (C(T)-Werte) jeder Probe auf die C(T)-Werte der Referenzgene normiert. Als Referenzgene für die mRNA-Expression wurden die RNA-Polymerase II (Pol2a) und Glycerinaldehydphosphat-Dehydrogenase (GAPDH) verwendet. Für microRNA-Analysen wurde die snRNA U6, welche Bestandteil des Splicosomes ist, verwendet.

3.3.5 microRNA PCR-Arrays

Für die microRNA PCR-Array Analysen wurden microRNAs aus Gewebe verwendet. Hierfür wurden die microRNAs mit dem miRNeasy Kit (**Tabelle 4**) von Qiagen nach Herstellerangaben extrahiert und mit dem Experion mittels Kapillarelektrophorese (**3.3.6**) auf ihre Integrität überprüft. Anschließend wurde mit dem RT²miRNA First Strand Kit (**Tabelle 4**) die cDNA synthetisiert. Für die qRT-PCR wurde der RT²Real-Time™ Sybr Green/Fluorescein PCR master mix und PCR-Platten (**Tabelle 4**) die schon mit spezifischen Primern (RT²miRNA PCR Array Mouse Inflammation) beschichtet waren verwendet. Bei einer qRT-PCR mit Sybr Green wird die Quantität der amplifizierten DNA durch den Farbstoff Sybr Green gemessen, welcher in DNA-Doppelstränge interkaliert. Diese Methode ist unspezifisch, da Sybr Green in jede Vorhandene DNA interkaliert, so dass auch unspezifische PCR-Produkte detektiert werden. Hierbei muss zusätzlich eine DNA-Schmelzkurve aufgenommen werden um die Länge der PCR-Produkte zu verifizieren. Die cDNA-Synthese und die qRT-PCR wurden nach Herstellerangaben durchgeführt. Die Auswertung erfolgte nach der $2^{(-\Delta\Delta C(T))}$ -Methode.

3.3.6 Kontrolle der RNA-Integrität

Die Integrität der isolierten microRNA für die microRNA PCR-Array Analysen wurde mit dem Experion (BioRad) ermittelt. Hierbei wird das Prinzip der Kapillarelektrophorese angewendet. Mit dem Experion ist eine Qualitätsbestimmung von zehn RNA-Proben gleichzeitig möglich. Die einzelnen Fraktionen der rRNA (5S, 18S, 28S), die mRNA sowie bereits degradierte RNAs werden der Größe nach aufgetrennt und in einem Elektropherogramm sowie als virtuelles Gelbild dargestellt. Das Experion Programm berechnet das Verhältnis zwischen 28S/18S rRNA und generiert den RNA Quality Index (RQI), mit dessen Hilfe die RNA – Integrität bestimmt werden kann. Ein Wert von 10 zeigt eine intakte, nicht degradierte und nicht fragmentierte RNA von sehr hoher Qualität an und 1 steht für komplett degradierte und fragmentierte RNA mit geringster Qualität. In dieser Arbeit wurden die Experion RNA StdSens Chips und das dazugehörige RNA StdSens Kit (BioRad) verwendet. Die Durchführung erfolgte nach Herstellerangaben.

3.3.7 *In vitro* Transkription zur Herstellung biotinylierter RNA-Sonden

Bei einer *in vitro* Transkription handelt es sich um eine zellfreie Transkription wobei eine gereinigte DNA-Vorlage verwendet wird. Die Plasmide aus Tabelle 11 wurden mit den angegebenen Restriktionsenzymen linearisiert. Anschließend wurde 1 µg linearisierte DNA in Anwesenheit von BiotinUTP *in vitro* transkribiert. Der Reaktionsansatz enthielt folgende Bestandteile:

| | | |
|---|----|-----------------------------|
| 1 | µg | DNA |
| 2 | µl | 10x RNA Biotin Labeling Mix |
| 2 | µl | Transkriptionspuffer |
| 2 | µl | T7/T3-RNA-Polymerase |

ad 18 µl H₂O. Der Transkriptionsansatz wurde für 2 h bei 37° C inkubiert. Anschließend wurden 2 µl RNase-freie DNaseA hinzugegeben und für weitere 15 min bei 37° C inkubiert. Die Reaktion wurde mit 1 µl 0,5 M EDTA abgestoppt. Zur Aufbewahrung wurde der Reaktionsansatz mit 1 V Isopropanol vermischt und bei -20° C eingefroren.

3.3.8 Streptavidin-Biotin gekoppelte RNA-Affinitätschromatographie – Pull down Experimente

Um Interaktionen zwischen RNA und Proteinen nachweisen zu können wurde eine Streptavidin-Biotin gekoppelte RNA-Affinitätschromatographie [170] angewendet. Hierfür wurde biotingekoppelte RNA an Streptavidin Agarose gebunden und anschließend mit Proteinextrakten inkubiert. Auf diese Weise können RNA-Protein-Interaktionen untersucht werden.

Zunächst wurden Zellextrakte hergestellt indem DLD-1 Zellen in 14 cm Ø Kulturschalen für 3 – 4 Tage kultiviert wurden. Sobald die Zellen konfluent waren, wurden sie in 1 ml RIPA-Puffer aufgenommen, mit einer Spritze homogenisiert, für 10 min im EoE-Schüttler lysiert und für 5 min bei 4° C und 13000 UpM zentrifugiert um Zelltrümmer zu entfernen. Anschließend wurde eine Konzentrationsbestimmung nach Bradford (3.2.2) durchgeführt. Um die Proteinextrakt vorzuklären, wurden diese auf 50 µl Streptavidinagarose gegeben und 2 h bei 4° C im EoE-Schüttler vermischt, so dass unspezifische Proteinbindungen an die Streptavidinagarose abgesättigt wurden. Nach dem Vorklären wurden die Proben für 5 min bei 4° C und 13000 UpM zentrifugiert und das Zellextrakt dann vorsichtig in ein neues

Reaktionsgefäß überführt. Wenn die Proteine nicht sofort verwendet wurden, wurden sie bei -80°C gelagert. Die biotinylierte RNA (3.3.7) wurde nach Zugabe von 1/10 Vol 2 M NaAc pelletiert, mit 70 % EtOH gewaschen und in 20 μl DEPC- H_2O aufgenommen. 100 μl der Streptavidinagarose wurden zunächst mit 100 μl DEPC- H_2O gewaschen bevor die RNA und 100 μl Bindepuffer (40 mM KCl) (2.5) dazugegeben wurden. Die Proben wurden 6 h bei 4°C im EoE-Schüttler inkubiert. Nach 6 h wurden die RNA-Beads 5 min bei 4°C und 13000 UpM zentrifugiert und der Überstand verworfen. Anschließend wurde das Zellextrakt (5 mg/ml Gesamtprotein) im Verhältnis 1:1 mit Bindepuffer (40 mM KCl) auf die RNA-gekoppelte Streptavidinagarose gegeben und über Nacht bei 4°C im EoE-Schüttler inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Streptavidinagarose gewaschen. Die Proben wurden zentrifugiert (5 min bei 4°C und 13000 UpM) und die Überstände in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Nach dem neuer Bindepuffer darauf gegeben wurde, wurden die Proben zunächst 5 min bei 4°C im EoE-Schüttler gewaschen und anschließend wieder zentrifugiert. Es wurde insgesamt 3x mit je 100 μl Bindepuffer (40 mM KCl) und 2x mit je 100 μl Bindepuffer (300 mM KCl) (2.5) gewaschen, bevor mit 100 μl 2 M KCl Elutionspuffer (2.5) eluiert wurde (30 min, 4°C , EoE-Schüttler). Sämtliche Überstände aus den Waschschrinen wurden aufgehoben und nach Wessel und Flügge angereichert (3.2.3). Die gebundenen Proteine wurden mittels Western Blot (3.2.5) nachgewiesen.

3.3.9 Klonierung von DNA Fragmenten

Die Klonierung dient zur Vervielfältigung von DNA, welche man näher untersuchen möchte. Dazu wird das gewünschte DNA-Fragment (z.B. ein Gen oder regulatorische Bereiche eines Gens) in einen Vektor integriert, welcher dann in geeigneten Bakterien oder eukaryoten Zellen vervielfältigt werden kann. Bei Klonierungen wurde die DNA nach jedem Schritt mittels Phenol-Chloroform Extraktion gereinigt.

Restriktion von DNA

Restriktionsendonukleasen sind Enzyme, welche palindromische DNA-Sequenzen von 4 – 8 Basenpaaren (bp) erkennen und doppelsträngige DNA an diesen Stellen restringieren und dabei glatte oder überhängende Enden hinterlassen. Natürlicherweise kommen die meisten Endonukleasen in Bakterien vor und dienen dort zur Phagenabwehr. In der Molekularbiologie werden Endonukleasen eingesetzt um DNA an definierten Stellen zu restringieren. Für einen analytischen Ansatz wurden 1 μg DNA und 3 U Enzym mit 2 μl des vom Hersteller

angegebenen Puffers und je nach Bedarf mit oder ohne BSA verwendet. Für einen präparativen Ansatz wurden 20 – 40 µg DNA eingesetzt und die Mengen der anderen Komponenten entsprechend angepasst. Die Restriktionsansätze wurden 3 – 16 h bei 37° C (wenn nicht anders angegeben) inkubiert. Mittels Agarose-Gelelektrophorese (siehe unten) wurde die Restriktion überprüft.

Phenol-Chloroform Extraktion von Nukleinsäuren

Um Salze und Proteine aus dem Restriktionsansatz zu entfernen, wurden 1/10 Vol 3 M NaAc zu dem Restriktionsansatz gegeben. Anschließend wurde mit 1 Vol Tris gesättigtem Phenol-Chloroform (1:1) überschichtet, gut gemischt und 5 min bei 4° C und 13000 UpM zentrifugiert. Die DNA wurde mit der wässrigen Phase in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und mit 1 Vol Chloroform vermengt, wieder 5 min bei 4° C und 1300 UpM zentrifugiert und die wässrige Phase in ein weiteres 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Zur Fällung der DNA wurden 2 Vol EtOH (100 %) hinzugegeben und für mind. 1h bei -20° C inkubiert. Um die DNA zu pelletieren wurde diese für 20 min bei 4° C und 13000 UpM zentrifugiert und anschließend mit 70 % EtOH gewaschen. Nach dem Trocknen wurde die DNA je nach Pelletgröße in 30 – 50 µl sterilem H₂O aufgenommen.

Auffüllen überhängender 5'-Enden

Wenn Vektor und Fragment nicht mit demselben Enzym geschnitten werden konnten, mussten die überhängenden Enden aufgefüllt werden, damit Vektor und Fragment ligiert werden konnten. Hierfür wurde das Klenow-Fragment der DNA-Polymerase I aus *E. coli* verwendet. Durch seine 5' - 3'-Polymerasefunktion wurden 5'überhängende Enden aufgefüllt, wodurch glatte Enden generiert werden konnten. Für einen Ansatz wurde die gereinigte DNA in sterilem H₂O aufgenommen und 1 mM dNTPs, 10 µl Klenow-Puffer und 3 U Klenow dazugegeben. Die Reaktion wurde auf 100 µl mit sterilem H₂O aufgefüllt und 2 h bei 37° C inkubiert.

5' Dephosphorylierung

Damit die Vektor-DNA während der Ligation nicht religieren kann, wurde diese mit der alkalischen Phosphatase (CIAP) an dem 5'-Ende dephosphoryliert. Hierfür wurde die gereinigte DNA in 87 µl sterilem H₂O aufgenommen und mit 10 µl CIAP-Puffer und 3 U CIAP versetzt und für 2 h bei 37° C inkubiert.

Agarose-Gelelektrophorese

Um Restriktionen zu überprüfen und gewünschte DNA-Fragmente zu isolieren, wurde die Agarose-Gelelektrophorese angewendet. Der Gehalt an Agarose richtete sich nach der Größe der zu untersuchenden DNA. Für große DNA-Fragmente wurden 0,8 % Agarose in TAE-Puffer (2.5) und für kleine Fragmente ab 100 bp wurden 2 % Agarose in TAE-Puffer verwendet. Dafür wurde die Agarose in TAE-Puffer gegeben und in einer Mikrowelle so lange erhitzt bis diese sich gelöst hat. Nachdem die Agarose unter Rühren auf Raumtemperatur abgekühlt war, wurde sie in eine horizontale Gelkammer gegossen und zum Polymerisieren stehen gelassen. Anschließend wurde das Gel in eine waagerechte Elektrophoresekammer eingebracht und mit den zu analysierenden Proben beladen. Es wurde eine Initialspannung von 85 V angelegt. Sobald die Proben vollständig in das eingelaufen waren, wurde die Spannung auf 110 V erhöht. Die Spannung wurde solange beibehalten bis die erste Lauffront den unteren Gelbereich erreicht hat. Die Detektion der DNA erfolgte mittels Fluoreszenz in einem UV-Transluminator. Wenn mit der restringierten DNA weiter gearbeitet wurde, wurden die Banden mit den gewünschten Fragmenten ausgeschnitten und in einen Dialyseschlauch mit 600 µl TAE-Puffer verbracht. Der Dialyseschlauch wurde luftblasenfrei verschlossen und die DNA 1 h bei 100 V eluiert. Anschließend wurde der DNA-enhaltende TAE-Puffer aus dem Dialyseschlauch in ein Reaktionsgefäß überführt und die DNA mittels Phenol/Chloroform Extraktion gereinigt.

Ligation von Fragment und Vektor

Die Verknüpfung kompatibler DNA-Enden wird als Ligation bezeichnet. Hierfür wurden Vektor und Fragment im Verhältnis 1:3 mit 10 µl Ligase-Puffer und 1 U T4-DNA-Ligase vermischt und auf 20 µl Gesamtvolumen mit sterilem H₂O aufgefüllt. Der Ligationsansatz wurde dann für ca. 16 – 18 h bei 18° C inkubiert. Als Kontrolle wurde der gleiche Ansatz ohne Insertionsfragment pipettiert.

Transformation von kompetenten Bakterien mit DNA

Bei einer Transformation wird Fremd-DNA in kompetente Bakterien eingebracht und dort vervielfältigt. Hierfür wurden 10 µl des Ligationsansatzes mit 100 µl einer Bakterienlösung für mind. 30 min bei 0° C inkubiert, um eine Anlagerung der DNA an die Bakterien zu ermöglichen. Anschließend wurden die Bakterien einem Hitzeschock (45 s 42° C) unterzogen, damit die Zellwand für die DNA durchlässig wird. Nach weiteren 2 min bei 0° C

wurde den Bakterien 400 µl LB-Medium zugesetzt und zur Ausprägung der Antibiotikaresistenz, welche der Selektion dient, wurden diese für 1h bei 37° C geschüttelt. 100 µl der Bakterienlösung wurden auf Selektions-Agar-Platten ausgestrichen und über Nacht bei 37° C inkubiert. Es wuchsen nur die Bakterien, welche mit dem Plasmid auch ein Resistenzgen aufgenommen haben.

Präparation von Plasmid-DNA

Um die Vervielfältigte Plasmid-DNA aus den Bakterien zu isolieren wurde die Methode der Alkalischen Lyse [171] angewendet. Zur Überprüfung der Plasmide durch geeignete Restriktion wurde zunächst eine Minipräparation durchgeführt, bevor in einer Midipräparation mit einem Präparationskit saubere DNA für die Sequenzierung und für weitere Analysen extrahiert wurde. Bei der alkalischen Lyse werden die Bakterien mit SDS lysiert und die chromosomale DNA mit NaOH denaturiert. Nach einer Neutralisation mit NaAc fallen die SDS-Proteinkomplexe und die chromosomale DNA aus und können durch Zentrifugation von der Plasmid-DNA getrennt werden.

Für eine Minipräparation wurden die über Nacht gewachsenen Kolonien mit einem sterilen Zahnstocher in 3 ml LB-Selektionsmedium überführt und über Nacht bei 37° C geschüttelt um die Bakterien anzureichern. Am nächsten Tag wurde 1 ml der Bakterienlösung in ein Reaktionsgefäß überführt und für 1 min bei Raumtemperatur (RT) und 1300 UpM zentrifugiert um die Bakterien zu pelletieren. In 100 µl Maniatis I (2.5) wurde das Pellet resuspendiert und 5 min bei RT inkubiert. Anschließend wurden die Proben mit 200 µl Maniatis II (2.5) vorsichtig vermischt und 5 min bei 0° C inkubiert. Nach der Inkubation wurden 150 µl Maniatis III (2.5) hinzugegeben und für weitere 5 min bei 0° C inkubiert. Zur Entfernung der chromosomalen DNA und der Proteine wurden die Proben 15 min bei RT und 13000 UpM zentrifugiert und der Überstand mit der Plasmid-DNA in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Die Fällung der Plasmid-DNA erfolgte mit 400 µl EtOH (95 %) 2 min bei Raumtemperatur. Zum Pelletieren wurde die Plasmid-DNA für 15 min bei 4° C und 13000 UpM zentrifugiert und mit 70 % EtOH gewaschen. Nach dem Trocknen wurde die Plasmid-DNA in 50 µl sterilem H₂O aufgenommen.

Für die Präparation größerer DNA-Mengen wurden die Bakterien mit dem gewünschten Plasmid in 100 ml LB-Selektionsmedium angereichert und mit einem Plasmid-Präparationskit die DNA nach Anleitung des Herstellers extrahiert.

3.4 Tierversuche

Für die Tierversuche wurden C57BL/6- und TCR-V β 12-tg Mäuse verwendet. Die TCR-V β 12-tg Mäuse wurden in der ZVTE gehalten und gezüchtet. Die C57BL/6-Mäuse wurden von der ZVTE bezogen. Die Haltung der Tiere erfolgte unter kontrolliert pathogenfreien Bedingungen mit einem 12 h Tag/Nacht-Zyklus. Die Tiere hatten ständigen Zugang zu Wasser und Futter.

3.4.1 Typisierung von Mäusen

Die Typisierung der TCR-V β 12-tg Mäuse erfolgte durch indirekte oder direkte Doppelfluoreszenzfärbung der Oberflächenmoleküle V β 12 und CD4 mittels FACS-Analysen. Hierfür wurden den Mäusen 3 – 4 Tropfen Blut aus der Schwanzvene entnommen und in 1 ml EDTA-Puffer (2.5) aufgefangen um eine Gerinnung des Blutes zu verhindern. Das EDTA-Blut wurde 5 min bei 4° C und 2500 UpM zentrifugiert um die zellulären Blutbestandteile vom Plasma zu trennen. Der Überstand wurde verworfen, das Zellpellet wurde in 5 ml kaltem ACK-Puffer (2.5) resuspendiert und für 15 min bei 0° C inkubiert. Dabei wurden die Erythrozyten durch Aufplatzen entfernt, so dass nach einem weiteren Zentrifugationsschritt (10 min, 4° C und 2500 UpM) und dem Verwerfen des Überstandes nur noch periphere mononukleäre Blutzellen übrig waren. Diese Zellen wurden dann nach folgendem Schema gefärbt:

Tabelle 16: Färbeschema für V β -12 Typisierung

| V β -12tg-pos. Kontrollmäuse | 1. Färbeschritt | 2. Färbeschritt | 3. Färbeschritt |
|------------------------------------|-----------------|------------------------|-----------------------|
| Isotopenkontrolle -/- | GM-Puffer | IgG ₁ -FITC | IgG _{2a} -PE |
| Negativkontrolle +/- | aV β -12 | IgG ₁ -FITC | IgG _{2a} -PE |
| Negativkontrolle -/+ | GM-Puffer | IgG ₁ -FITC | aCD4-PE |
| Positivkontrolle +/+ | aV β -12 | IgG ₁ -FITC | aCD4-PE |
| Testmäuse+/+ | aV β -12 | IgG ₁ -FITC | aCD4-PE |

Die Zellen wurden in folgender Reihenfolge mit den Antikörpern inkubiert: aV β -12, IgG₁-FITC, PE-Konjugate. Die Inkubationszeit betrug 20 min bei 4° C. Zwischen jedem

Färbeschritt wurde 2x mit GM-Puffer (2.5) gewaschen. Nach den Färbeschritten wurden die gefärbten Zellen mit 400 µl GM-Puffer in sterile FACS-Röhrchen überführt und im FACS gemessen. Die Isotopenkontrolle (IgG_{2a}) diente hierbei der Einstellung des Durchflusszytometers und der Bestimmung der Hintergrundfluoreszenz. Bei der FACS-Messung wurden die Fluoreszenzfarbstoffe mit einem Argon-Strahl (488 nm) angeregt und die dabei entstandene Emission gemessen. Detektiert wurde die Stärke der Ablenkung der Zellen im elektrischen Feld, welche proportional zu den gebundenen Fluoreszenzfarbstoffen ist und somit zur Dichte des zu detektierenden Antigens.

3.4.2 Das Modell der kollagen-induzierten Arthritis (CIA)

Das Kollagen TypII (CII) kommt natürlicherweise in der extrazellulären Matrix von Knochen und Knorpeln vor und wird von Chondrozyten synthetisiert. CII wird als potentielles Autoantigen für die rheumatoide Arthritis diskutiert. Die TCR-Vβ12-tg Mäuse exprimieren eine transgene β-Kette eines T-Zell-Rezeptors auf Kollagen Typ II (CII)-spezifischen, arthritogenen T-Zellen und sind dadurch sehr empfindlich gegenüber einer Immunisierung mit heterologem Kollagen Typ II (CII) [172].

Vβ12-tg Mäuse wurden an Tag 1 mit einer Emulsion aus gleichen Teilen einer wässrigen CII-Lösung (4 mg/ml in 0,01 % Essigsäure) und komplettem Freud'schen Adjuvans (CFA, Mineralölfraction und hitzeinaktivierte Mycobakterien) immunisiert, indem 200 µg CII appliziert wurden. Je 50 µl der CII-Lösung wurden subkutan hinter die beiden Ohrmuscheln und 100 µl wurden subkutan an die Schwanzbasis injiziert. An den Tagen 11 und 21 nach der Immunisierung wurden den Mäusen weitere 100 µg CII in CFA subkutan an die Schwanzbasis appliziert. Als Negativkontrolle wurden Mäuse mit PBS gespritzt. Schon nach der zweiten Folgeapplikation konnten pathologische Veränderungen bei den CII-Mäusen beobachtet werden. Die Schwere der Arthritis wurde am Grad der Pfotenschwellung beurteilt und in Indices eingeteilt:

Tabelle 17: Bestimmung des Arthritisindex

| Index | Merkmale |
|-------|---|
| 0 | Keine Schwellung an Zehen oder Gelenken |
| 1 | Schwellung an einem Zeh |
| 2 | Schwellung von 2 – 3 Zehen oder nur des Knöchelbereiches |
| 3 | Schwellung des Knöchelbereichs und des Metatarsus/-carpus |
| 4 | Schwellung aller Zehen, des Metatarsus und des Knöchelbereiches |

Die Indices jeder Pfote wurden pro Maus addiert, so dass eine Maus einen maximalen Gesamtindex von 16 erreichen konnte. Der Arthritisindex für jede Versuchsgruppe wurde durch Bildung der Mittelwerte aller Tiere jeder Versuchsgruppe bestimmt.

3.4.3 Behandlung der kollagen-induzierten Arthritis (CIA)

Zur klinischen Behandlung der CIA wurden Sekundärmetabolite aus Pilzen eingesetzt, welche zuvor in Zellkultur-Experimenten eine anti-inflammatorische Wirkung zeigten. Als Positivkontrolle wurde Dexamethason appliziert und als Negativkontrolle das Lösungsmittel verabreicht.

| Substanz | Verabreichte Konzentration[$\mu\text{g/g}$ Körpergewicht] | Lösungsmittel |
|---------------------|--|------------------|
| Dexamethason | 0,5 | 10 % EtOH in PBS |
| Galiellalacton | 1 | 10 % EtOH in PBS |
| Oxacyclododecindion | 0,1 | 10 % EtOH in PBS |
| S-Curvularin | 0,1 | 10 % EtOH in PBS |

Behandlungsbeginn war der erste Tag nach der zweiten Folgeapplikation von CII (Tag 22 nach Immunisierung). Die Tiere wurden, je nach applizierter Substanz, jeden oder jeden zweiten Tag interperitoneal gespritzt. Der Arthritis Index wurde an jedem Behandlungstag bis zur Organentnahme festgestellt. Nach verschiedenen Zeitintervallen wurden Tiere aus jeder Versuchsgruppe getötet und die Organe zu weiteren Untersuchungen entnommen.

3.4.4 Lipopolysaccharid (LPS)-induziertes Inflammationsmodell

Lipopolysaccharide (LPS) sind Zellbestandteile gramnegativer Bakterien und wirken in Säugerzellen als endogene Pyrogene. Zur Auslösung einer akuten Inflammationsreaktion wurde den Tieren 5 $\mu\text{g/g}$ Körpergewicht LPS interperitoneal verabreicht. Als Kontrollgruppe dienten Tiere, welchen 0,9 % ige NaCl-Lösung appliziert wurde. Zur Behandlung der LPS-induzierten Inflammation wurden die in 3.4.3 beschriebenen Substanzen 2 – 48 h vor LPS-Gabe appliziert. Nach 6 h LPS-Inkubation wurden die Tiere zur Organentnahme getötet.

3.5 Statistik

Alle statistischen Auswertungen wurden mit dem Programm GraphPad Prism 5.0d durchgeführt. Wenn zwei Gruppen miteinander verglichen wurden, wurde der studentische T-

Test angewendet. Bei einem Vergleich von mehr als zwei Gruppen wurde ein faktorieller ANOVA (analysis of variance) angewendet. Wurden mehrere Gruppen mit einer Kontrollgruppe verglichen, wurde der „Dunnett’s multiple comparison test“ durchgeführt. Bei einem Vergleich aller Versuchsgruppen untereinander wurde der „Tukey’s multiple comparison test“ angewendet. Dabei wurden p-Werte $< 0,05$ als signifikant bewertet.

4 Ergebnisse

4.1 Regulation der proinflammatorischen Genexpression durch das zytosolische PolyA-bindende Protein (PABP)

Die zytosolische Isoform des PolyA-bindenden Proteins (PABP) ist in zahlreiche posttranskriptionelle Mechanismen der Regulation der Expression proinflammatorischer Gene involviert [87, 173]. Bei biotinkgekoppelten Affinitätschromatographie-Analysen konnte eine direkte Bindung von PABP an die 3'UTR der humanen iNOS nachgewiesen werden [68]. Um den Einfluss von PABP auf die proinflammatorische Genexpression am Beispiel der humanen induzierbaren NO-Synthase (iNOS) zu untersuchen, wurden stabil transfizierte Zellen generiert, in welchen siRNAs gegen PABP gebildet werden, wodurch die Expression von PABP gehemmt ist. Des Weiteren wurden Reporteragen-Analysen mit verschiedenen Konstrukten der 5'- und 3'UTR der humanen iNOS durchgeführt, um die Funktion von PABP bei der posttranskriptionellen Regulation stark regulierter Gene wie der iNOS verstehen zu können.

4.1.1 Herabregulation von PABP in DLD-1 Zellen

DLD-1 Zellen wurden mit dem Plasmid pTER-EGFP-shPABP (DLD-1-siPABP) stabil transfiziert. Dieses Plasmid kodiert für eine shRNA (*short hairpin* RNA) gegen die PABP mRNA und verringerte so die Expression von PABP in transfizierten Zellen. Als Kontrolle für den Mechanismus siRNA-mediierter Herabregulation der Genexpression wurden DLD-1 Zellen mit dem Plasmid pTER-EGFP-siLuc (DLD-1-siLuc) stabil transfiziert. **Abbildung 9** zeigt die Herabregulation von PABP in DLD-1-siPABP Zellen sowohl auf mRNA (**A**)- als auch Proteinebene (**B**). Auf mRNA-Ebene konnte eine zytokinunabhängige Herabregulation von PABP um 50 % in siPABP Zellen im Vergleich zu siLuc Zellen erreicht werden. Auf Proteinebene zeigten Western Blot-Analysen ebenfalls eine deutliche Abnahme von PABP in siPABP Zellen im Vergleich zu siLuc Zellen. Auch hierwar die Herabregulation von PABP zytokinunabhängig.

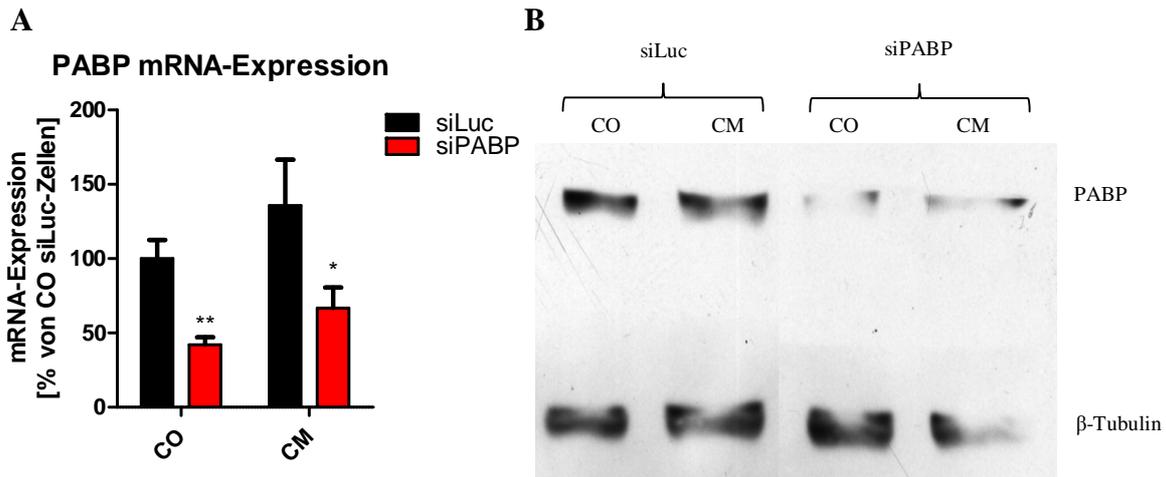


Abbildung 9: Herabregulation von PABP in DLD-1-siPABP Zellen.

DLD-1 Zellen wurden mit dem Plasmid pTER-EGFP-shPABP stabil transfiziert und in Selektionsmedium mit 0,2 mg/ml Zeocin kultiviert. Die DLD-1-siPABP Zellen exprimierten eine siRNA gegen PABP, so dass die Expression von PABP in diesen Zellen gehemmt war. Als Kontrolle wurden DLD-1 Zellen mit einer siRNA gegen Luciferase (siLuc) verwendet.

A: PABP mRNA-Expression in DLD-1-siPABP Zellen. DLD-1-siLuc und -siPABP Zellen wurden für 6 h mit (CM) und ohne (CO) Zytokinmix inkubiert. Anschließend wurden die Zellen in GIT-Puffer lysiert, die RNA isoliert und qRT-PCR - Analysen durchgeführt. Dargestellt sind die Mittelwerte und die Standardfehler aus 3 Zellkulturexperimenten mit jeweils n = 3. **: p < 0,01 im Bezug zu CO siLuc Zellen; *: p < 0,05 im Bezug zu CM siLuc Zellen

B: Western Blot zur Analyse der PABP- und β -Tubulin-Expression. DLD-1-siLuc und -siPABP Zellen wurden für 6 h mit (CM) und ohne (CO) Zytokinmix inkubiert. Anschließend wurden die Zellen in RIPA-Puffer lysiert und eine Immundetektion mittels Western Blot - Analyse durchgeführt. Die Proteine PABP und β -Tubulin wurden mit spezifischen Antikörpern detektiert. Der Western Blot ist exemplarisch für drei weitere Western Blots.

Diese Daten wurden von S. Nowag zur Verfügung gestellt.

Durch die Generierung von Zellen, welche weniger PABP exprimieren, konnte nun der Einfluss von PABP auf die proinflammatorische Genexpression untersucht werden.

4.1.2 Wirkung der Herabregulation von PABP auf proinflammatorische Mediatoren

Um zu überprüfen, ob die Bindung von PABP an die humane iNOS mRNA die iNOS-Expression beeinflusst, wurde die iNOS mRNA- und die Protein-Expression in DLD-1-siPABP und DLD-1-siLuc Zellen untersucht. **Abbildung 10** zeigt die mRNA-Expression (**A**) der iNOS in DLD-1-siPABP und -siLuc Zellen unter Kontrollbedingungen (CO) und nach Zytokinmixinkubation (CM) sowie eine von insgesamt drei Western Blot-Analysen (**B**) von

CO- und CM-behandelten DLD-siPABP und –siLuc Zellen. Die iNOS-Expression war sowohl auf mRNA- als auch Proteinebene stark reduziert.

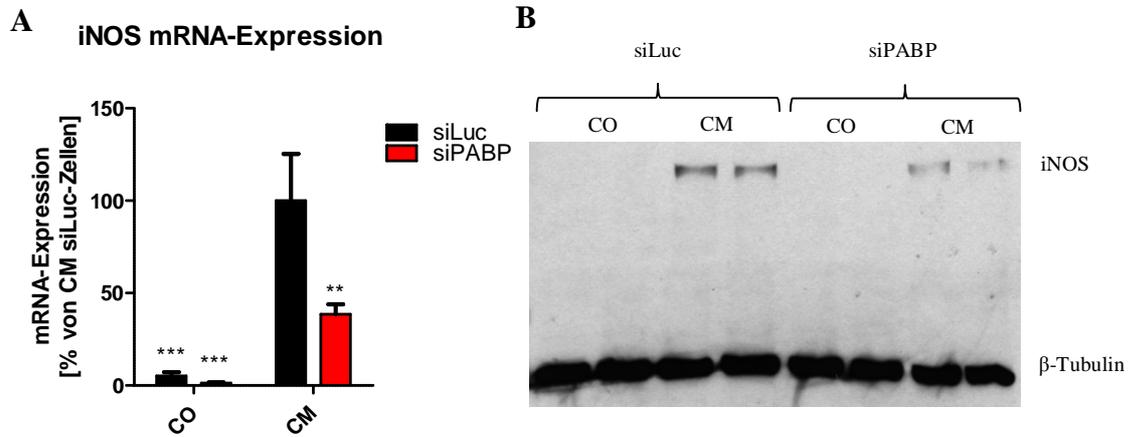


Abbildung 10: Herabregulation der iNOS in DLD-1-siPABP Zellen.

DLD-1 Zellen wurden mit dem Plasmid pTER-EGFP-shPABP stabil transfiziert und in Selektionsmedium mit 0,2 mg/ml Zeocin kultiviert. Die DLD-1-siPABP Zellen exprimierten eine siRNA gegen PABP, so dass die Expression von PABP in diesen Zellen gehemmt war. Als Kontrolle wurden DLD-1 Zellen mit einer siRNA gegen Luciferase verwendet. In den siPABP Zellen war die iNOS weniger stark exprimiert.

A: iNOS mRNA-Expression in DLD-1-siPABP Zellen. DLD-1-siLuc und –siPABP Zellen wurden für 6 h mit (CM) und ohne (CO) Zytokinmix inkubiert. Anschließend wurden die Zellen in GIT-Puffer lysiert, die RNA isoliert und qRT-PCR - Analysen durchgeführt. Dargestellt sind die Mittelwerte und die Standardfehler aus 3 Zellkulturexperimenten mit jeweils n = 3. **: p < 0,01; ***: p < 0,001 im Bezug zu CM siLuc Zellen

B: Western Blot gegen iNOS und β-Tubulin. DLD-1-siLuc und –siPABP Zellen wurden für 8 h mit (CM) und ohne (CO) Zytokinmix inkubiert. Anschließend wurden die Zellen in RIPA-Puffer lysiert und eine Immundetektion mittels Western Blot - Analyse durchgeführt. Die Proteine iNOS und β-Tubulin wurden mit spezifischen Antikörpern detektiert. Der Western Blot ist exemplarisch für drei weitere Western Blots.

Diese Daten wurden von S. Nowag zur Verfügung gestellt.

Die iNOS war nur in CM-behandelten Zellen induziert. In siPABP Zellen sank die iNOS mRNA-Expression auf unter 50 % im Vergleich zu siLuc Zellen. Auch auf Proteinebene ist zu erkennen, dass die Expression des Proteins in siPABP Zellen im Vergleich zu siLuc Zellen stark abgenommen hatte. Dieser Befund legt den Schluss nahe, dass PABP einen positiven Effekt auf die iNOS-Expression ausübt.

Auch das von der iNOS produzierte NO war in siPABP Zellen stark reduziert im Vergleich zu siLuc Zellen. **Abbildung 11** zeigt die NO-Produktion in stimulierten (CM) und unstimulierten (CO) siPABP und siLuc Zellen. Die unter CM-Bedingungen stark erhöhte NO-Menge in siLuc Zellen war in siPABP Zellen signifikant geringer.

Ergebnisse

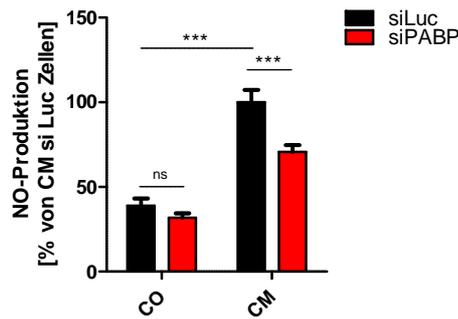


Abbildung 11: Reduzierte NO-Produktion in DLD-1-siPABP Zellen.

DLD-1 Zellen wurden mit dem Plasmid pTER-EGFP-shPABP stabil transfiziert und in Selektionsmedium mit 0,2 mg/ml Zeocin kultiviert. Die DLD-1-siPABP Zellen exprimierten eine siRNA gegen PABP, so dass die Expression von PABP in diesen Zellen gehemmt war. Als Kontrolle wurden DLD-1 Zellen mit einer siRNA gegen Luciferase verwendet. DLD-1-siLuc und –siPABP Zellen wurden für 24 Stunden h mit (CM) und ohne (CO) Zytokinmix inkubiert. Der Überstand der Zellen wurde anschließend mit Hilfe des Sievers NO-Analyzer untersucht und die jeweils entstandenen Mengen an NO bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwert und Standardfehler aus 6 NO-Analysen. ***: $p < 0,001$ im Bezug zu CM siLuc Zellen; ns: nicht signifikant.

Diese Daten wurden von S. Nowag zur Verfügung gestellt.

Untersuchungen weiterer proinflammatorischer Gene zeigten, dass die Herabregulation von PABP auch Auswirkungen auf weitere stark regulierte Gene zeigte. In **Abbildung 12** ist zu

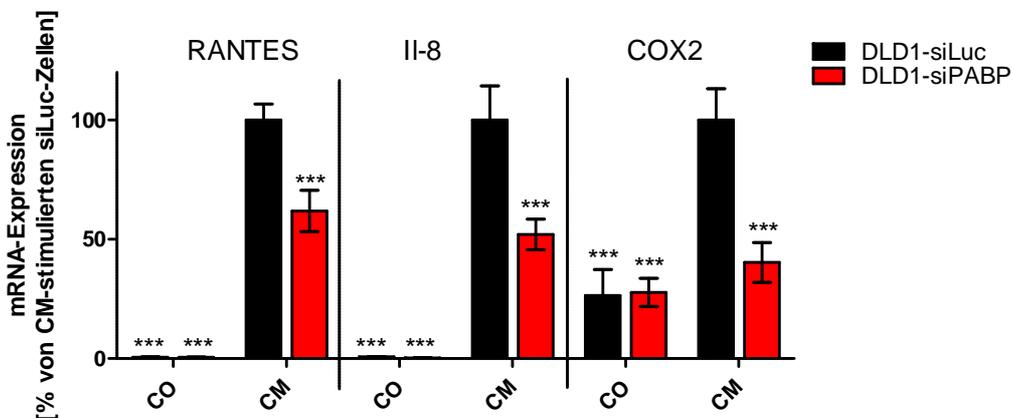


Abbildung 12: Herabregulation der mRNA-Expression von RANTES, Il-8 und COX2 in siPABP Zellen.

DLD-1 Zellen wurden mit dem Plasmid pTER-EGFP-shPABP stabil transfiziert und in Selektionsmedium mit 0,2 mg/ml Zeocin kultiviert. Die DLD-1-siPABP Zellen exprimierten eine siRNA gegen PABP, so dass die Expression von PABP in diesen Zellen gehemmt war. Als Kontrolle wurden DLD-1 Zellen mit einer siRNA gegen Luciferase verwendet. Für die Untersuchungen der mRNA-Expression von RANTES und Il-8 wurden DLD-1-siLuc und –siPABP Zellen für 6 h mit (CM) und ohne (CO) Zytokinmix inkubiert. Für die Analyse der mRNA-Expression von COX2 wurden DLD-1-siLuc und –siPABP Zellen für 2 h mit (CM) und ohne (CO) Zytokinmix inkubiert. Anschließend wurden die Zellen in GIT-Puffer lysiert, die RNA isoliert und qRT-PCR - Analysen durchgeführt. Dargestellt sind die Mittelwerte und die Standardfehler aus 3 Zellkulturexperimenten mit jeweils $n = 3$. ***: $p < 0,001$ im Bezug zu CM siLuc Zellen

erkennen, dass die Expression von RANTES, IL-8 und COX2 in zytokinstimulierten siLuc Zellen stark erhöht war und im Gegensatz dazu in zytokinstimulierten siPABP Zellen abnahm. RANTES, IL-8 und COX2 nehmen wichtige Schlüsselrollen im Entzündungsgeschehen ein. Die Herabregulation dieser Gene in siPABP Zellen legt den Schluss nahe, dass PABP eine wichtige Funktion in der Regulation inflammatorischer stark regulierter Gene innehat.

4.1.3 Wirkung der Herabregulation der PABP-Expression auf die Promotoraktivität des humanen iNOS-Promotrs

Eines der Ziele dieser Arbeit war es, den Regulationsmechanismus näher zu untersuchen, über den PABP Einfluss auf die Regulation der Genexpression nimmt. Ein wichtiger Regulationsmechanismus ist die Steuerung der Promotoraktivität von Genen und somit die Transkriptionsrate der betroffenen Gene. Um zu überprüfen, ob die Herabregulierung von PABP die Promotoraktivität des humanen iNOS-Promotors beeinflusst, wurden Reporter-Gen-Analysen durchgeführt. Da die siLuc Zellen bei diesen Experimenten nicht genutzt werden konnten, wurden DLD-1 Zellen mit dem Plasmid pTER-EGFP ohne shRNA stabil transfiziert und mit DLD-1-EGFP bezeichnet. Für die Promotor-Analysen wurden DLD-1-siPABP und DLD-1-EGFP Zellen mit den Plasmiden pXP2-16kb und pRL-EF1 α transient kotransfiziert. Das Plasmid pXP2-16kb enthielt ein 16 kb Fragment des humanen iNOS Promotors vor einem Luciferasegen, so dass die Luciferaseexpression unter dessen Kontrolle stand. 48 h nachdem die Zellen transfiziert wurden, wurden diese in PLB lysiert und der Überstand für die Reporter-Genanalysen verwendet. **Abbildung 13** zeigt, dass der iNOS-Promotor nach Zytokinstimulation (CM) sowohl in EGFP, als auch in siPABP Zellen 5-fach induziert war. Somit unterschied sich die Induzierbarkeit des humanen iNOS-Promotors in siPABP Zellen nicht von der in EGFP Zellen. Dies bedeutet, dass die Regulation der iNOS-Expression durch PABP nicht über die Promotoraktivität stattfindet. Da die Expression der iNOS in siPABP Zellen aber deutlich reduziert ist, wurde im Folgenden die mRNA-Stabilität der iNOS-mRNA in den siPABP Zellen untersucht.

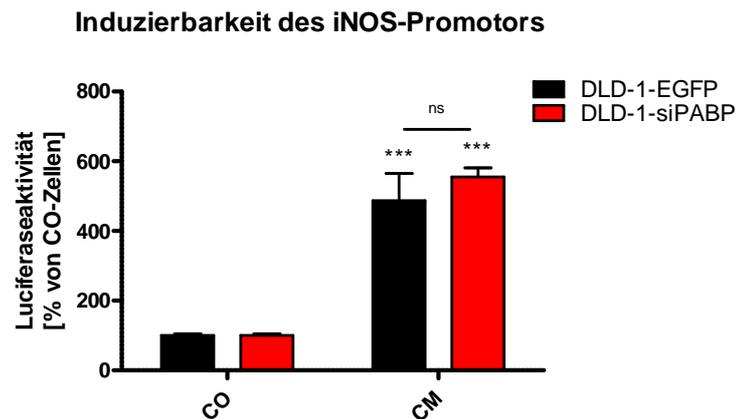


Abbildung 13: Die Induzierbarkeit des 16 kb-iNOS-Promotors war in DLD-1-siPABP Zellen unverändert.

Für die Untersuchungen der Promotoraktivität des human 16 kb-iNOS-Prpmotors wurden DLD-1-EGFP und -siPABP Zellen mit dem Plasmid pXP2-16kb transient transfiziert und nach 48 h für 6 h mit (CM) und ohne (CO) Zytokinmix inkubiert. Anschließend wurden die Zellen in PLB lysiert und Luciferase-Reporteranalysen durchgeführt. Dargestellt sind die Mittelwerte und die Standardfehler aus 5 Zellkulturexperimenten mit jeweils $n = 3$. ***: $p < 0,001$ im Bezug auf CO-behandelte Zellen; ns: nicht signifikant verschieden von DLD-1-EGFP Zellen.

4.1.4 Einfluss von PABP auf die mRNA-Stabilität

Sowohl die Expression proinflammatorischer Gene wie der iNOS, RANTES, IL-8 und COX2 als auch das von der iNOS produzierte NO waren in DLD-1-siPABP Zellen deutlich reduziert, während die Promotoraktivität des humanen iNOS-Promotors in DLD-1-siPABP Zellen nicht verändert war. Um die Rolle von PABP für die Genexpression weiter zu untersuchen, wurde der mRNA-Abbau in DLD-1-siPABP und in DLD-1-siLuc Zellen untersucht. **Abbildung 14** zeigt, dass der Abbau der iNOS mRNA in siPABP Zellen wesentlich schneller abläuft als in den Kontrollzellen. Bereits nach 4 h war die Hälfte der iNOS mRNA in siPABP Zellen abgebaut, wohingegen in den Kontrollzellen noch über 65 % der iNOS mRNA vorhanden war. Dieses Ergebnis zeigt, dass PABP an der posttranskriptionellen Regulation der iNOS-Genexpression beteiligt ist.

Ergebnisse

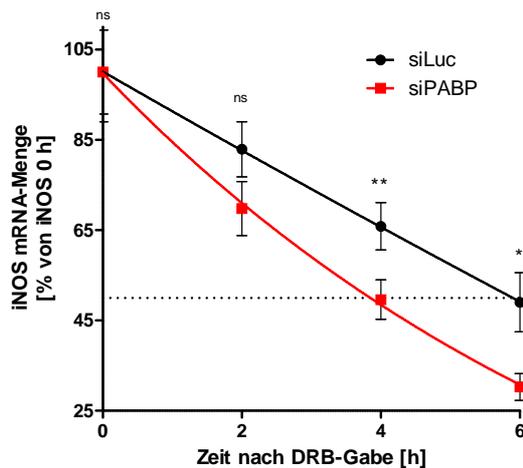


Abbildung 14: Der Abbau der iNOS mRNA war in DLD-1-siPABP Zellen beschleunigt.

DLD-1-siLuc und -siPABP Zellen wurden für 4 h mit einem Zytokinmix inkubiert. Danach wurden 25 µg/µl DRB hinzugegeben und die Zellen nach 2 h, 4 h und 6 h in GIT-Puffer lysiert, die RNA isoliert und qRT-PCR-Analysen durchgeführt. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardfehler der relativen iNOS mRNA-Mengen in Bezug auf die iNOS mRNA-Menge nach 0 h DRB-Inkubation. *: $p < 0.05$; **: $p < 0.01$.

Diese Daten wurden von S. Nowag zur Verfügung gestellt.

4.1.5 Bindung von PABP an die 5'- und 3'UTR der humanen iNOS

Wie sich in Affinitätschromatographie-Analysen der AG Kleinert [68] zeigte, konnte PABP als eines der Proteine identifiziert werden, welche direkt an die iNOS 3'UTR binden. Um die genauen Bindestellen von PABP an die iNOS mRNA zu lokalisieren, wurden UV-crosslink- und RNA-Pull-down-Analysen durchgeführt. Dazu wurden verschiedene Fragmente der iNOS mRNA in Plasmide kloniert, die durch *in-vitro* Transkription die Herstellung von RNA-Sonden mit dem jeweiligen RNA-Abschnitt erlaubten. Ebenso wurden Reporter-gen-Konstrukte hergestellt, die die gleichen Fragmente der iNOS mRNA, vor oder hinter das Luciferase-Reportergen kloniert, enthielten. Mit diesen Konstrukten wurden dann transiente Transfektionen in DLD-1-Zellen durchgeführt.

Die 3'UTR der iNOS wurde zunächst in zwei Bereiche unterteilt: einen Bereich mit AU-reichen Elementen (ARE) und einen Bereich ohne AU-reiche Elemente. Der Bereich mit den AU-reichen Elementen wurde weiter in drei Subfragmente unterteilt. Der mit FragA bezeichnete Bereich enthält eine Sequenz, welche eine Sequenzähnlichkeit zu der PABP-

Bindestelle in der 5'UTR der humanen PABP mRNA aufweist (5'-AAAAAATCCAAAAAAAATCTAAAAAATCTTTTAAAAAACCCCAAAAAA-TTTACAAAAA-3'[112]). FragB enthielt die ersten drei AU-reichen Elemente des 3'UTR der iNOS mRNA und FragC enthielt die AU-reichen Elemente 4 und 5. Ebenso wurde die 5'UTR der humanen iNOS in ein Fragment mit dem Exon 1 und ein Fragment mit dem Exon 2 unterteilt. Das Exon 2 der iNOS 5'UTR enthält ebenfalls einen Bereich, der eine Sequenzähnlichkeit zu der PABP-Bindestelle in der 5'UTR der PABP mRNA aufweist. Gleichermäßen wurde ein Konstrukt erzeugt, das nur den kodierenden Bereich (cds) der humanen iNOS mRNA enthält.

Abbildung 15 zeigt eine schematische Darstellung der iNOS mRNA mit der 5'UTR, dem kodierenden Bereich, der 3'UTR und dem PolyA-Schwanz. Des Weiteren sind die PABP-Bindestellen und die Bereiche mit den AU-reichen Elementen angezeigt. Diese Bereiche wurden in geeignete Plasmide kloniert und für Bindungsexperimente und Reporter-gen-Analysen verwendet.

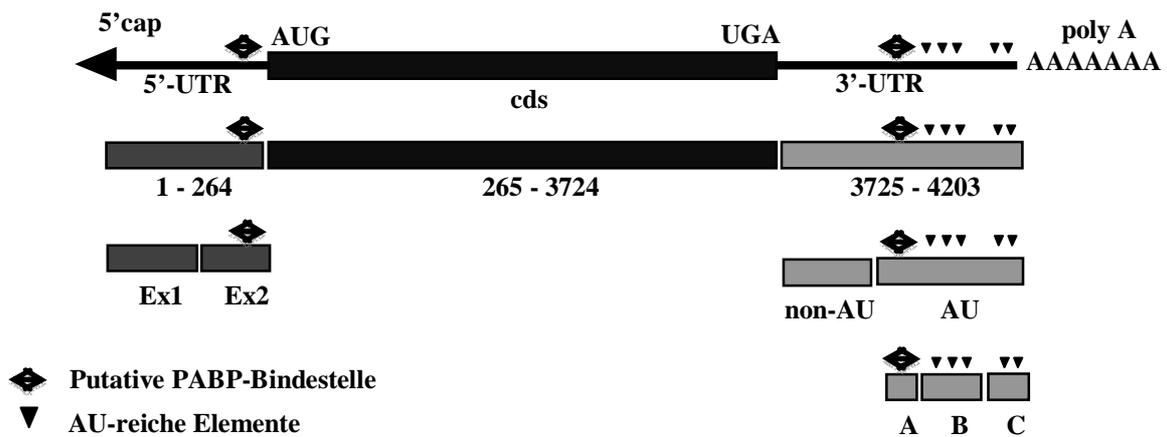


Abbildung 15: Schematische Darstellung der mRNA der humanen iNOS.

Dargestellt sind die 5' und 3'UTR sowie der kodierende Bereich der humanen iNOS mRNA. Im 5'UTR sind die Exons 1 und 2 und die PABP-Bindestelle angezeigt. Die 3'UTR ist zunächst in einen Bereich ohne AU-reiche Elemente (nonAU) und einen Bereich mit AU-reichen Elementen (AU) unterteilt. Weiter wird der AU-reiche Bereich in die Fragmente A mit der PABP-Bindestelle, das Fragment B mit den AU-reichen Elementen 1-3 und das Fragment C mit den AU-reichen Elementen 4-5 gegliedert.

UV-Crosslink-Experimente

Um zu überprüfen an welche Bereiche der iNOS mRNA PABP bindet, wurden von Sebastian Nowag und Dr. Thomas Hubrich UV-Crosslink-Experimente durchgeführt. Durch *in vitro* Transkription mit ^{32}P -markiertem UTP wurden RNA-Sonden hergestellt, welche mit isoliertem GST-PABP und GST als Kontrolle inkubiert und anschließend mit UV-Licht bestrahlt wurden. Nach einem darauffolgenden RNase-Verdau blieb nur die durch UV-Licht irreversibel an das Protein gebundene RNA übrig. Diese RNA-Protein-Komplexe wurden dann mittels SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt und konnten so durch die Belichtung eines Röntgenfilmes detektiert werden kann. Wo eine Schwärzung des Filmes auftrat, befand sich der RNA-Protein Komplex. Zunächst wurden die Plasmide pCR-NOSII-5'UTR (5'-UTR), pCR-huiNOS-cds (cds) und pCR-huiNOS-3'UTR (3'UTR) *in vitro* transkribiert um RNA-Sonden mit der 5'UTR, der kodierenden Region und der 3'UTR der humanen iNOS zu erhalten. **Abbildung 16 A** zeigt eine deutliche Bindung von GST-PABP an die 5' - und die 3'UTR, nicht aber an den kodierenden Bereich der iNOS mRNA. Die Kontrolle mit GST alleine zeigte weder eine Bindung an die 5' - noch an die 3'UTR von GST und auch nicht an den kodierenden Bereich (Daten nicht gezeigt). Für Untersuchungen der genauen Bindestelle in der 5'UTR wurden die Plasmide pCR-5'UTR-Ex1 und pCR-5'UTR-Ex2 *in vitro* transkribiert und so RNA-Sonden mit dem ersten Exon (Ex1) und dem zweiten Exon (Ex2) der 5'UTR der humanen iNOS hergestellt. In **Abbildung 16 B** ist zu erkennen, dass GST-PABP nur an das Exon 2 der humanen iNOS, nicht aber an das Exon 1 gebunden hatte. Die GST-Kontrolle zeigte weder eine Bindung an Exon1 noch an Exon 2. **Abbildung 16 C und D** zeigen, dass GST-PABP im Bereich der humanen iNOS 3'UTR an den Bereich mit den AU-reichen Elementen (AU) aber nicht an den Bereich ohne AREs (nonAU) gebunden hatte. Im Bereich mit den AU-reichen Elementen zeigte GST-PABP eine Bindung an das FragA mit der putativen Bindestelle für PABP und das FragB mit den ersten drei AREs aber nicht an das FragC mit den AREs 4 und 5. Die GST-Kontrolle zeigte keine Bindung an die eingesetzten RNAs mit den Sequenzen der 3'UTR der humanen iNOS.

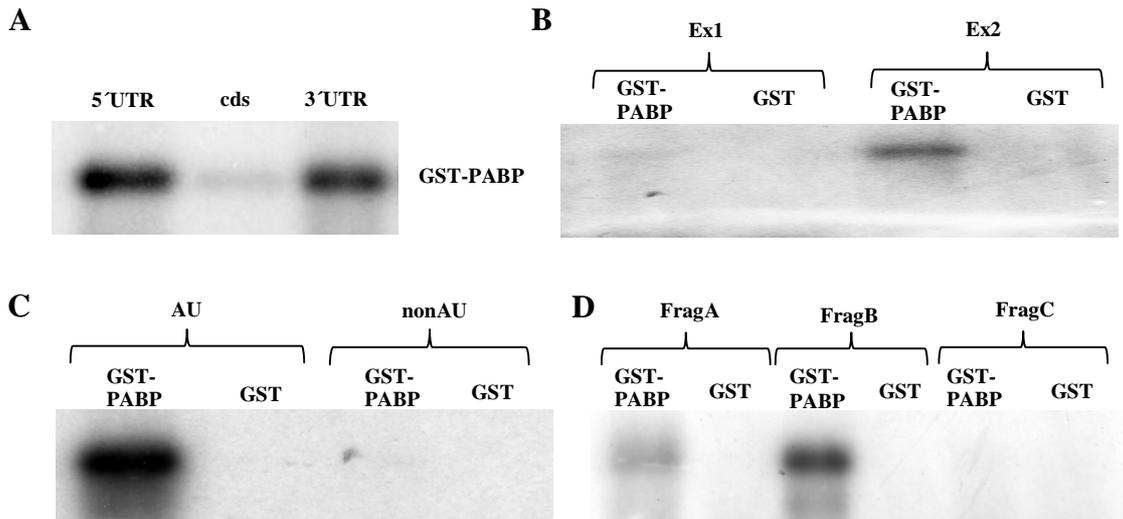


Abbildung 16: UV-Crosslink Analysen mit GST-PABP zeigten eine Bindung von PABP an Bereiche der 5' und der 3'UTR der humanen iNOS.

Dargestellt sind Autoradiogramme von repräsentativen Gelen von UV-Crosslink-Experimenten. ³²P-markierte RNA-Transkripte wurden mit GST-PABP, sowie als Negativkontrolle mit GST inkubiert. Die Positionen der RNA-Protein-Komplexe sind angezeigt.

A:Die Plasmide pCR-NOSII-5'UTR, pCR-huiNOS-cds und pCR-huiNOS-3'UTR wurden in Anwesenheit von ³²P *in vitro* transkribiert, um RNA-Sonden mit dem 5'UTR, der kodierenden Region (cds) und dem 3'UTR der humanen iNOS zu erhalten.

B:Die Plasmide pCR-5'UTR-Ex1 und pCR-5'UTR-Ex2 wurden in Anwesenheit von ³²P *in vitro* transkribiert, um RNA-Sonden mit dem Exon 1 (Ex1) und dem Exon 2 (Ex2) der 5'UTR der humanen iNOS zu erhalten

C:Die Plasmide pXcmI-ATTTA und pXcmI-nonATTTA wurden in Anwesenheit von ³²P *in vitro* transkribiert, um RNA-Sonden mit dem ARE-enthaltenden Bereich (AU) und einem Bereich ohne AREs(nonAU) im Bereich der 3'UTR der humanen iNOS zu erhalten

D:Die Plasmide pAUUUA-FragA, pAUUUA-FragB und pAUUUA-FragC wurden in Anwesenheit von ³²P *in vitro* transkribiert, um RNA-Sonden mit den Fragmenten A, B und C aus dem ARE-haltigen Bereich der 3'UTR der humanen iNOS zu erhalten.

Diese Abbildungen wurden von Dr. T. Hubrich und S. Nowag zur Verfügung gestellt.

Ergebnisse

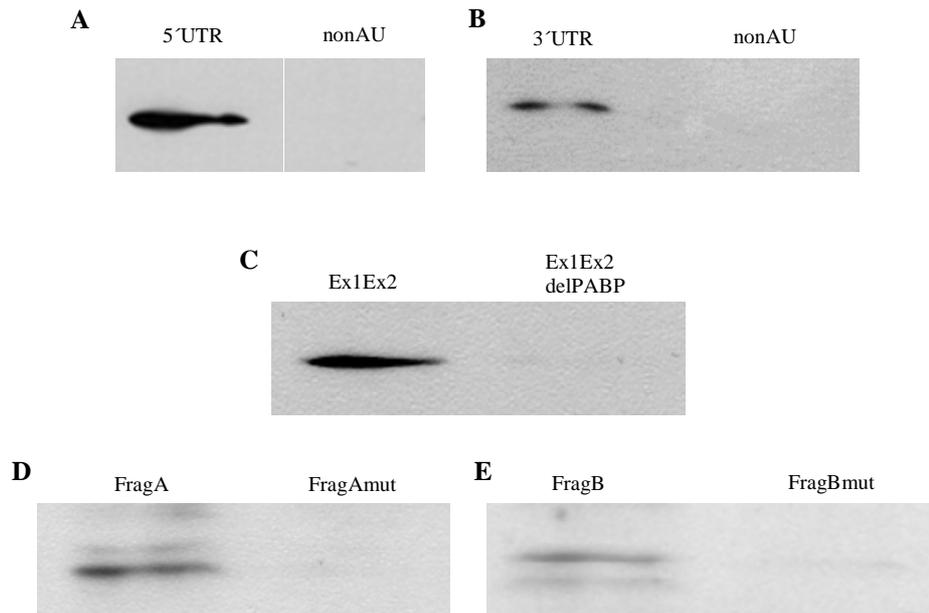


Abbildung 18: Streptavidin-Biotin gekoppelte RNA-Affinitätschromatographie mit Zellextrakten aus DLD-1 Zellen.

1 µg der Plasmide pXcmInonATTTA (**nonAU**), pCR-huiNOS-3'UTR(**3'UTR**), pCR-huiNOS-Ex1ExHdNar2(**Ex1Ex2**), pCR-huiNOS-Ex1ExHdNar2delPABP(**Ex1Ex2delPABP**), pAUUUAfragA (**FragA**), pCRmutAqc2delHdST(**FragAmut**), pAUUUAfragB (**FragB**) und pAUUUA_B_mutARE1-3 (**FragBmut**) wurden in Anwesenheit von biotinyliertem UTP *in vitro* transkribiert und die so entstandenen RNA-Sonden wurden für 6 h mit Streptavidin Agarose inkubiert. Anschließend wurden 10 mg vorgeklärtes Zellextrakt aus DLD-1 Zellen auf die RNA-Streptavidin Agarose gegeben und über Nacht inkubiert. Nach einigen Waschschritten wurde dann das an die RNA-Sonde gebundene Protein eluiert und mittels SDS-PAGE und Western Blot-Analyse detektiert.

A: Dargestellt ist die Western blot-Analyse des Eluates aus einem Pull down-Experiment mit DLD-1 Extrakten und der 5'UTR der humanen iNOS. Als Negativkontrolle wurde der Bereich ohne AREs aus dem 3'UTR der iNOS verwendet.

B: Dargestellt ist die Western blot-Analyse des Eluates aus einem Pull down-Experiment mit DLD-1 Extrakten und der 3'UTR der humanen iNOS. Als Negativkontrolle wurde der Bereich ohne AREs aus dem 3'UTR der iNOS verwendet.

C: Dargestellt ist die Western blot-Analyse des Eluates aus einem Pull down-Experiment mit DLD-1 Extrakten und der 5'UTR der humanen iNOS und der 5'UTR ohne die PABP-Bindestelle im Exon 2.

D: Dargestellt ist die Western blot-Analyse des Eluates aus einem Pull down-Experiment mit DLD-1 Extrakten und dem Fragment A aus der 3'UTR der humanen iNOS mit der Bindestelle für PABP und einer Mutation der PABP-Bindestelle.

E: Dargestellt ist die Western blot-Analyse des Eluates aus einem Pull down-Experiment mit DLD-1 Extrakten und dem Fragment B aus der 3'UTR der humanen iNOS mit den AREs 1-3 und einer Mutation aller drei AREs.

pCR-huiNOS-3'UTR (**3'UTR**), pCR-huiNOS-Ex1ExHdNar2 (**Ex1Ex2**), pCR-huiNOS-Ex1ExHdNar2delPABP (**Ex1Ex2delPABP**), pAUUUAfragA (**FragA**), pCRmutAqc2delHdST (**FragAmut**), pAUUUAfragB (**FragB**) und pAUUUA_B_mutARE1-3

(FragBmut). Die Pull down-Experimente mit der 5'- und der 3'UTR der humanen iNOS bestätigten die UV-Crosslink-Analysen von S. Nowag und Dr. T. Hubrich. Es war eine Bindung von endogenem PABP sowohl an die 5'- als auch an die 3'UTR der iNOS zu erkennen nicht aber an den Bereich ohne AREs in der 3'UTR (**Abbildung 18 A + B**). Nach der Deletion der PABP-Bindestelle im Exon 2 der 5'UTR fand keine Bindung von PABP mehr statt (**Abbildung 18 C**). Mutierte man die Bindestellen für PABP im Fragmenten A und die AREs 1-3 im Fragment B war ebenfalls keine Bindung mehr von PABP an diese Fragmente zu erkennen (**Abbildung 18 D + E**).

Die gezeigten Effekte der Herabregulation der PABP-Expression auf die iNOS-Expression in intakten DLD-1-Zellen, sowie die nachgewiesene Bindung von PABP an die Bindestellen in der iNOS mRNA lassen vermuten, dass PABP neben seinen allgemeinen Funktionen auf die generelle Translation und mRNA-Stabilität auch eine spezifische Rolle in der posttranskriptionellen Regulation der Genexpression der humanen iNOS einnimmt. Wie diese Regulation durch PABP aussieht sollte in Reporter-gen-Analysen mit den verschiedenen 5'- und 3'UTR-Konstrukten geklärt werden.

4.1.6 Reporter-gen-Analysen mit Konstrukten der 5'- und 3'UTR der humanen iNOS mRNA

Wie in früheren Arbeiten gezeigt werden konnte [67], hat schon die 3'UTR der humanen iNOS alleine einen destabilisierenden Effekt auf die mRNA. In den folgenden Experimenten wurden verschiedene Konstrukte der 5'- und der 3'UTR der humanen iNOS vor bzw. hinter eine Luciferase kloniert und Reporter-gen-Analysen durchgeführt. Des Weiteren wurden qRT-PCR Analysen durchgeführt, um die Expression der mRNA dieser Konstrukte zu untersuchen. Hierfür wurden Primer entworfen, welche spezifisch an Exon-Exon Grenzen binden um eine Detektion der transfizierten DNA zu vermeiden.

Für diese Experimente wurden DLD-1 Zellen in 24-Loch Platten ausgesät und mit den in **Tabelle 9** beschriebenen Plasmiden transient transfiziert. 24 h nach der Transfektion wurde Medium ohne FCS auf die Zellen gegeben um denselben Zellzyklus der Zellen zu gewährleisten. Nach 16 h in FCS-freiem Medium wurde eine Hälfte der Zellen mit einem Zytokingemisch (CM) aus TNF- α , IL-1 β und IFN γ für 6 h inkubiert und die andere Hälfte zur Kontrolle (CO) in FCS-freiem Medium belassen. Anschließend wurden die Zellen für Reporter-gen-Analysen in PLB und für mRNA-Analysen in GIT-Puffer lysiert. Hier wurden

die gleichen Mutanten verwendet wie bereits in den UV-Crosslink-Analysen und den Pull down-Experimenten, die keine Bindung von PABP an die entsprechenden Mutanten zeigten.

Reporter-Gen-Analysen mit Konstrukten der Wildtyp-5'UTR der humanen iNOS und Konstrukten mit einer Mutation oder Deletion der PABP-Bindestelle in der 5'UTR (**Abbildung 19**) zeigten eine signifikant verringerte Luciferaseaktivität in den Zellen, welche die Konstrukte mit der mutierten oder deletierten PABP-Bindestelle enthielten.

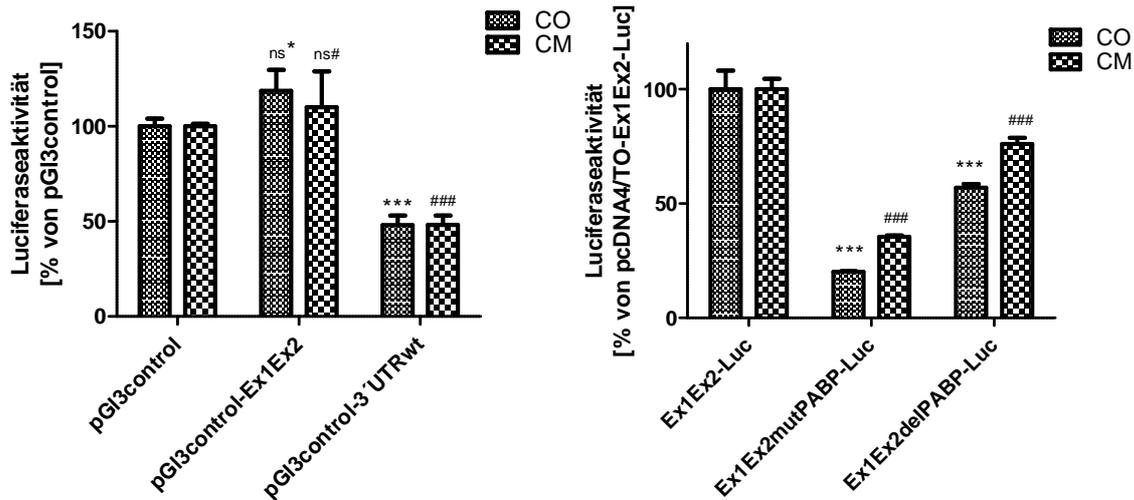


Abbildung 19: Reporter-Gen-Analysen mit der 5'- und 3'UTRwt und mutierter bzw. deletierter PABP-Bindestelle im Exon 2 der 5'UTR der humanen iNOS

DLD-1 Zellen wurden mit der 5'- und 3'UTRwt und mit Konstrukten der 5'UTR der humanen iNOS transient transfiziert, welche eine Mutation (**mutPABP**) oder Deletion (**delPABP**) der PABP-Bindestelle im Exon 2 der 5'UTR enthielten. Als Transfektionskontrolle und zur Normierung wurde der Plasmid pRL-EF1 α kotransfiziert. 48 h nach der Transfektion wurden die Zellen mit (CM) und ohne (CO) Zytokine für 6 h inkubiert. Anschließend wurden die Zellen in PLB lysiert und der Überstand für Reporter-Gen-Analysen verwendet. Dargestellt sind die Mittelwerte und die Standardfehler aus 3 unabhängigen Zellkulturexperimenten mit jeweils n = 3. ns* nicht signifikant verschieden von CO pG13control; ns#: nicht signifikant verschieden von CM pG13control; ***: p < 0,001 zu CO Ex1Ex2-Luc; ###: p < 0,001 zu CM Ex1Ex2-Luc.

Dabei hatte im Vergleich zum Ausgangsplasmid (**pG13control**) die Wildtyp 5'UTR-Sequenz (**Ex1Ex2**), im Gegensatz zu der Wildtyp 3'UTR-Sequenz (siehe auch **Abbildung 21**), keinen signifikanten Effekt auf die Luciferaseaktivität in den transfizierten Zellen. Sowohl die Mutation (**mutPABP**), als auch die Deletion (**delPABP**) der PABP-Bindestelle im Exon 2 reduzierte die Aktivität der Luciferase signifikant im Vergleich zu der Wildtyp 5'UTR.

Abbildung 20 zeigt Reporter-Gen-Analysen mit dem Luciferase-Expressions Plasmid pGI3-control, mit der 3'UTR der humanen iNOS hinter der Luciferase und mit Mutationen in der PABP-Bindestelle (**mutA**) und in den AREs 1-3 (**mutB**). Wie bereits erwähnt, hat die 3'UTR der humanen iNOS einen negativen Effekt auf die Luciferase-Expression, da die Stabilität der Luciferase mRNA reduziert wird. Die Mutation der PABP-Bindestelle im Fragment A (**mutA**) hob den destabilisierenden Effekt der 3'UTR auf. Die Mutation der AREs 1-3 hatte keinen signifikanten Effekt auf die Luciferaseaktivität im Vergleich zu der 3'UTR ohne Mutationen.

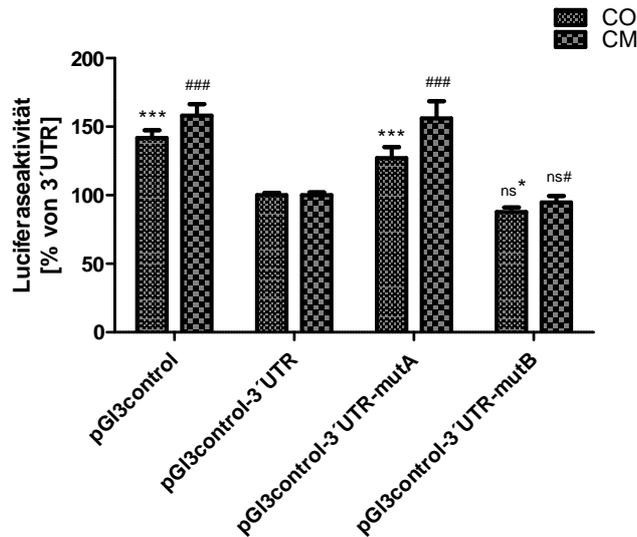


Abbildung 20: Reporter-Gen Analysen mit der human iNOS-3'UTR und mit Mutationen in der PABP-Bindestelle (mutA) und in den AREs 1-3 (mutB).

DLD-1 Zellen wurden mit den Plasmiden pGI3control, pGI3control-3'UTR, pGI3control-3'UTRmutA und pGI3control-3'UTRmutB transient transfiziert. Als Transfektionskontrolle und zur Normierung wurde der Plasmid pRL-EF1 α kotransfiziert. 48 h nach der Transfektion wurden die Zellen mit (CM) und ohne (CO) Zytokinen für 6 h inkubiert. Anschließend wurden die Zellen in PLB lysiert und der Überstand für Reporter-Gen-Analysen verwendet. Dargestellt sind die Mittelwerte und die Standardfehler aus 3-6 unabhängigen Zellkulturexperimenten mit jeweils n = 3. ***: p < 0,001; ns*: nicht signifikant verschieden von mit pGI3control-3'UTR transfizierten CO-Zellen. ###: p < 0,001; ns#: nicht signifikant verschieden von mit pGI3control-3'UTR transfizierten und CM-stimulierten Zellen

Es ist überraschend, dass die Mutation der PABP-Bindestelle im Fragment A (**mutA**) nicht zu einer geringeren Luciferaseaktivität führt, da die Experimente mit DLD-1-siPABP Zellen gezeigt hatten, dass PABP die iNOS mRNA stabilisiert. Somit sollte die Luciferaseaktivität in den mit pGI3control-3'UTRmutA transfizierten Zellen abnehmen. Die Mutation der AREs 1-3 (**mutB**) sollte die Luciferaseaktivität erhöhen im Vergleich zu pGI3control-3'UTR

transfiziertem Zellen, da die AREs1-3 auch wichtige Bindestellen für das destabilisierende Protein AUF1 sind [70]. Eine mögliche Erklärung für die unerwarteten Ergebnisse könnte das Fehlen der 5'UTR sein. Deshalb wurden DLD-1 Zellen mit Konstrukten transfiziert, welche in den Zellen zu der Expression von Luziferase-mRNAs führen sollten, die sowohl die 5'- als auch die 3'UTR der humanen iNOS enthalten. Hierbei wurden Konstrukte benutzt, die neben dem Exon 1 und dem Exon 2 (bis zum ATG) auch das Intron 1 des humanen iNOS Gens enthalten (**Ex1-In1-Ex2**).

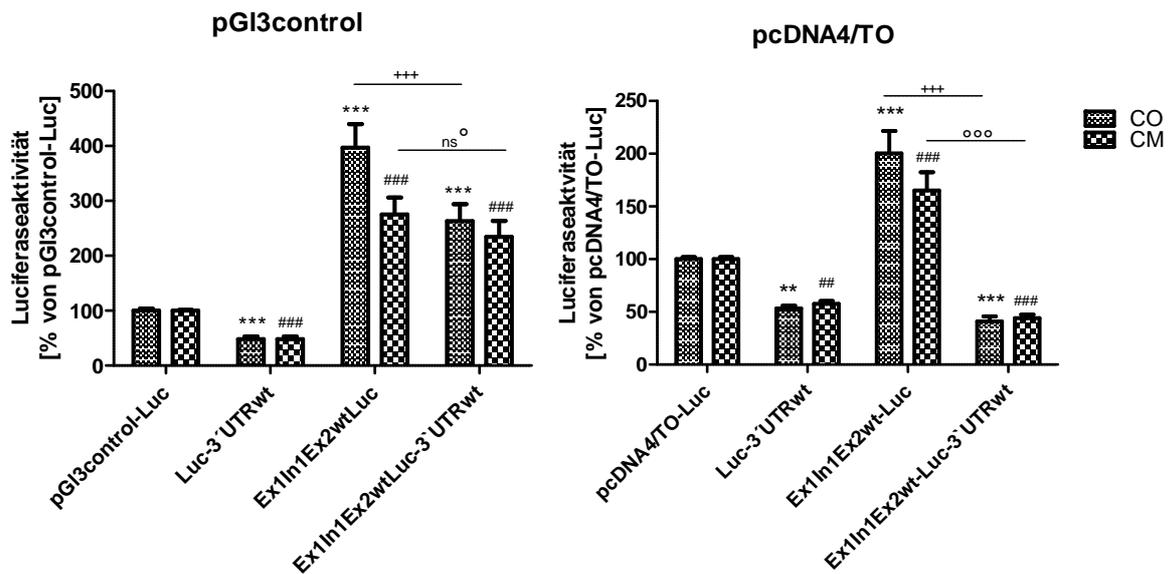


Abbildung 21: Reporteragen Analysen mit der 5'- und 3'UTR der human iNOS

DLD-1 Zellen wurden mit Plasmiden transfiziert, die die Ex1In1Ex2- und 3'UTR-Sequenz der humanen iNOS einzeln und in Kombination enthalten. Als Transfektionskontrolle und zur Normierung wurde der Plasmid pRL-EF1 α kotransfiziert. 48 h nach der Transfektion wurden die Zellen mit (CM) und ohne (CO) Zytokine für 6 h inkubiert. Anschließend wurden die Zellen in PLB lysiert und der Überstand für Reporteragen Analysen verwendet. Dargestellt sind die Mittelwerte und die Standardfehler aus 3-6 unabhängigen Zellkulturexperimenten mit jeweils $n = 3$. ***: $p < 0,001$; **: $p < 0,01$; ns*: nichtsignifikant verschieden von CO-Zellen. ###: $p < 0,001$; ##: $p < 0,01$; #: $p < 0,05$. +++: $p < 0,001$ im Vergleich zu einander; °°°: $p < 0,001$ im Vergleich zu einander; ns°: nicht signifikant verschieden voneinander. Die statistische Auswertung wurde mit dem „Tukey's multiple comparison test“ durchgeführt.

Diese Konstrukte erlauben bei der Analyse der mRNA-Expression mittels qRT-PCR die Unterscheidung von transfizierter DNA und in den Zellen gebildeter mRNA. Damit Einflüsse des Expressionsplasmids ausgeschlossen werden konnten, wurden diese Experimente sowohl mit dem pGI3-control- als auch mit dem pcDNA4/TO-Luc-Plasmid durchgeführt. In **Abbildung 21** ist zu erkennen, dass die Integration des Intron 1 in die 5'-UTR-Sequenz, wie

erwartet [174], einen stark erhöhenden Effekt auf die Luciferaseexpression ausübte. Auch in diesen Konstrukten führte die 3'-UTR-Sequenz zu einer signifikanten Abnahme der Luciferaseexpression. Auch die Effekte der Mutationen in den Fragmenten A und B wurden in Anwesenheit der Ex1In1Ex2-Sequenz analysiert. Zusätzlich wurde die Mutation in der PABP-Bindestelle im Exon 2 untersucht und die Auswirkungen von gleichzeitigen Mutationen in der 5'- und 3'UTR. **Abbildung 22** zeigt für die Mutation im Fragment A (**mutA**) eine Erhöhung der Luciferaseaktivität wie zuvor bereits beschrieben (**Abbildung 20**). Jedoch zeigte hier die Mutation der AREs 1-3 im Fragment B (**mutB**) in Anwesenheit der Wildtyp 5'UTR wie erwartet [70] eine erhöhte Luciferaseaktivität im Vergleich zu dem Wildtyp der 3'UTR im Gegensatz zu dem Ergebnis ohne 5'UTR (**Abbildung 20**).

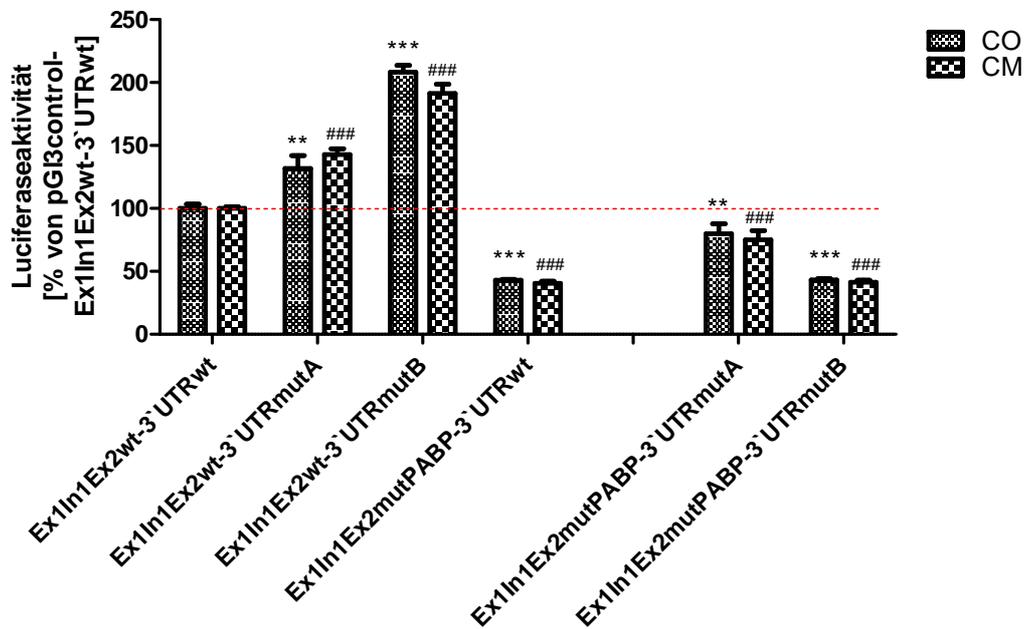


Abbildung 22: Reporteragen Analysen mit Mutationen in der 5'- und 3'UTR der human iNOS

DLD-1 Zellen wurden mit Konstrukten der 5'- und 3'UTR der humanen iNOS transfiziert, welche Mutationen in den PABP-Bindestellen (**mutA** und **Ex1In1Ex2mutPABP**) und in den AREs 1-3 (**mutB**) enthalten und mit Doppelmutanten, welche Mutationen in den PABP-Bindestellen sowohl in der 5'- als auch in der 3'UTR (**Ex1In1Ex2mutPABP-3'UTRmutA**) und mit der mutierten PABP-Bindestelle in der 5'UTR und den mutierten AREs 1-3 (**Ex1In1Ex2mutPABP-3'UTRmutB**) enthielten. Als Transfektionskontrolle und zur Normierung wurde der Plasmid pRL-EF1 α kotransfiziert. 48 h nach der Transfektion wurden die Zellen mit (CM) und ohne (CO) Zytokine für 6 h inkubiert. Anschließend wurden die Zellen in PLB lysiert und der Überstand für Reporteragen Analysen verwendet. Dargestellt sind die Mittelwerte und die Standardfehler aus 3 unabhängigen Zellkulturexperimenten mit jeweils n = 3. ***: p < 0,001; **: p < 0,01 im Vergleich zu CO Ex1In1Ex2wt-3'UTRwt. ###: p < 0,001 zu CM Ex1In1Ex2wt-3'UTRwt

Die Mutation der PABP-Bindestelle im Exon 2 der 5'UTR senkte die Luciferaseaktivität im Vergleich zu dem Wildtyp-Plasmid. Die Doppelmutation der PABP-Bindestellen sowohl in der 5'- als auch in der 3'UTR zeigte eine Verringerung der Luciferaseaktivität im Vergleich zu den Zellen, welche mit dem Wildtyp-Plasmid transfiziert wurden und eine leichte Erhöhung im Vergleich zu den mit dem Ex1In1Ex2mutPABP-3'UTRwt transfizierten Zellen. Die Luciferaseaktivität in den Zellen mit dem Ex1In1Ex2mutPABP-3'UTRmutARE1-3 – Konstrukt war ähnlich der mit mutPABP transfizierten Zellen und damit deutlich geringer als in den Zellen mit dem Wildtyp-Plasmid und den Zellen, welche nur das mutARE1-3-Konstrukt enthielten.

Dies bestätigte die Ergebnisse mit den siPABP Zellen und legt den Schluss nahe, dass die PABP-Bindestelle in der 5'UTR der iNOS eine größere Bedeutung für die Regulation der iNOS hat als die Bindestellen in der 3'UTR.

Untersuchungen der mRNA-Expression der transfizierten Zellen bestätigten die Ergebnisse aus den Reportergergen-Analysen für die 5'UTR der humanen iNOS (**Abbildung 19**).

Abbildung 23 zeigt qRT-PCR-Analysen von transfizierten Zellen mit Mutationen der Bindestellen für PABP im Exon 2 der 5'UTR und im FragA der 3'UTR und mit Mutationen der AREs 1-3 im Fragment B der humanen iNOS mRNA. Die Mutationen in der 3'UTR zeigten im Gegensatz zu den Ergebnissen aus den Reportergergen-Analysen keine veränderte Expression der mRNA weder mit (CM) Zytokinstimulation noch ohne (CO). Wohingegen die Mutation der PABP-Bindestelle im Exon 2 der 5'UTR die mRNA-Expression der Luciferaseunter Zytokinstimulation (CM) signifikant verringerte. Unter CO-Bedingungen konnte eine tendenzielle Abnahme der Luciferase mRNA-Expression beobachtet werden. Die Doppelmutante der PABP-Bindestellen in der 5'- und der 3'UTR erhöhte unerwarteter Weise die Luciferase mRNA-Expression was den Schluss nahelegt, dass die Sequenz im FragmentA der iNOS 3'UTR für die Bindung anderer, destabilisierend wirkender Proteine von Bedeutung sein könnte.

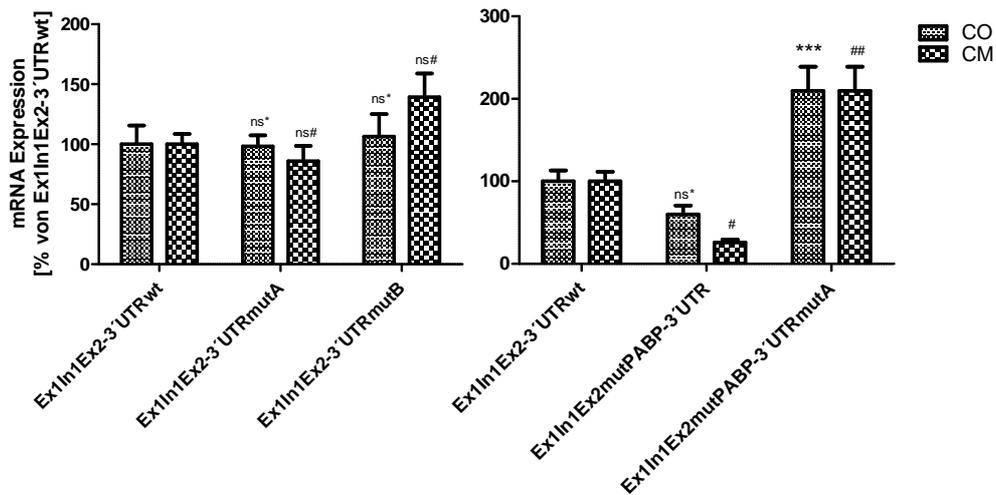


Abbildung 23: qRT-PCR Analysen mit Mutationen in der 5'- und der 3'UTR der human iNOS

DLD-1 Zellen wurden mit Konstrukten der 5'- und 3'UTR der humanen iNOS transient transfiziert, welche Mutationen in den PABP-Bindestellen in der 3'UTR (**mutA**) und in der 5'UTR (**mutPABP**) und in den AREs 1-3 (**mutB**) enthalten. Als Transfektionskontrolle und zur Normierung wurde das Plasmide pRL-EF1 α kotransfiziert. 48 h nach der Transfektion wurden die Zellen mit (CM) und ohne (CO) Zytokine für 6 h inkubiert. Anschließend wurden die Zellen in GIT-Puffer lysiert und qRT-PCR Analysen durchgeführt. Dargestellt sind die Mittelwerte und die Standardfehler aus 3-4 unabhängigen Zellkulturexperimenten mit jeweils n = 4. ***: p < 0,001; ns*: nicht signifikant verschieden von CO Ex1In1Ex2-3'UTR; ##: p < 0,01; #: p < 0,05; ns#: nicht signifikant verschieden von CM Ex1In1Ex2-3'UTR

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die Reduktion der PABP-Expression in DLD-1-siPABP Zellen die iNOS-Expression sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene signifikant verringerte. Die Induzierbarkeit des humanen 16 kb-iNOS Promotors war durch die Herabregulation von PABP nicht beeinflusst, jedoch erfolgte der Abbau der iNOS-mRNA in siPABP Zellen schneller als in Kontrollzellen. Bindeexperimente mittels UV-Crosslink-Analysen und Pull down-Experimenten konnten zeigen, dass PABP direkt mit der iNOS-mRNA interagiert und diese Interaktion nach Mutation oder Deletion der PABP-Bindestellen nicht mehr vorhanden war. In Reportergergen-Analysen konnte gezeigt werden, dass Mutationen oder Deletionen in den PABP-Bindestellen einen Einfluss auf die Luciferaseaktivität in transfizierten Zellen hatten. Die gezeigten Ergebnisse lassen vermuten, dass PABP neben seinen allgemeinen Funktionen auf die generelle Translation und mRNA-Stabilität auch eine spezifische Rolle in der posttranskriptionellen Regulation der Genexpression der humanen iNOS einnimmt.

4.2 Regulation proinflammatorischer Mediatoren im Modell der kollagen-induzierten Arthritis (CIA)

Die rheumatoide Arthritis (RA) ist eine chronisch-inflammatorische Autoimmunerkrankung in deren Pathogenese die Dysregulation von proinflammatorischen Mediatoren wie der iNOS, TNF- α oder IL-1 β eine zentrale Rolle einnimmt [121]. Durch die chronische Entzündung in den peripheren Gelenken kommt es zu einem zunehmenden Abbau von Knochen- und Knorpelgewebe und somit zu einer Destruktion der betroffenen Gelenke [127]. Die kollageninduzierte Arthritis (CIA) bei Mäusen zeigt ähnliche Symptome wie die humane RA. Auch die CIA verläuft schubweise und zeigt eine Erhöhung der typischen RA-Marker. Aus diesem Grund ist die CIA ein geeignetes Modell um neue anti-inflammatorische Substanzen *in vivo* zu testen. In dieser Arbeit wurden die Pilzsekundärmetabolite Galiellalacton (Gal) und Oxacyclododecindion (Oxa) nach ihrer erfolgreichen Testung in Zellkultur-Experimenten erstmalig in einem Tiermodell der RA eingesetzt. Der Sekundärmetabolit S-Curvularin (SC) hatte sich bereits in vorangegangenen Studien als eine potente Substanz zur Behandlung der CIA herausgestellt [140]. In dieser Arbeit wurde die Wirkung von SC auch auf die Expression von knochen- und knorpeldestruktiven Markergenen und auf die Expression immunologisch relevante microRNAs (miRNA) weiter untersucht.

4.2.1 Wirkung von Sekundärmetaboliten aus Pilzen im LPS-induzierten Entzündungsmodell

Lipopolysaccharide (LPS) sind Zellbestandteile gramnegativer Bakterien und wirken in Säugerzellen als endogene Pyrogene. Sie lösen eine akute Entzündungsreaktion mit Fieber, Durchfall und allgemeinem Unwohlseinaus. Bevor ein aufwendiger Tierversuch zur Testung der Substanzen in der CIA durchgeführt wurde, wurden die Substanzen zunächst an wenigen ($n = 4/\text{Gruppe}$) Tieren im LPS-Modell getestet, um zu überprüfen, ob sich neben der erfolgreichen anti-inflammatorischen Wirkung *in vitro* auch eine Wirkung auf allgemeine Entzündungsmarker *in vivo* im Tier feststellen lässt.

Galiellalacton (Gal)

Galiellalacton (Gal) ist ein Sekundärmetabolit aus dem Pilz *Galiella rufa*, welcher den Pilz vor Fressfeinden wie z. B. Nematoden schützt. In Zellkultur-Experimenten mit HepG2 Zellen konnte gezeigt werden, dass Gal den IL-6-Signalweg inhibiert. Um zu überprüfen ob Gal allgemeine Entzündungsmarker herabreguliert und in welchen Zeitabschnitten dieses verabreicht werden soll, wurden C57BL/6-Mäuse 2, 24 und 48 h vor der LPS-Applikation mit 10 µg/g Körpergewicht Gal behandelt. Als Positivkontrolle

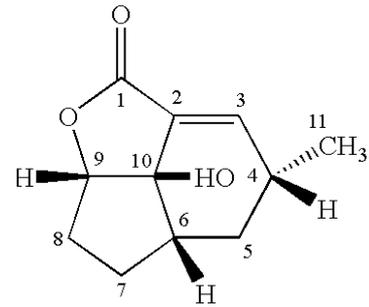


Abbildung 24: Chemische Strukturformel von Galiellalacton

einer anti-inflammatorisch gut wirksamen Substanz wurde den Mäusen 5 µg/g Dexamethason (Dex) und als Negativkontrolle 0,9 % NaCl in H₂O verabreicht. LPS wurde in einer Konzentration von 5 µg/g Körpergewicht appliziert. 6 h nach der LPS-Gabe wurden den Mäusen Blut und Organe entnommen. Das Blut wurde wie in 3.4.1 beschrieben aufbereitet. Die Organe wurden bis zur Weiterverwertung in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80° C gelagert. Es wurde die mRNA aus PBMCs und der Milz untersucht. **Abbildung 25** zeigt die mRNA-Expression von TNF-α, IL-1β, iNOS und S100A8 in PBMCs und der Milz nach 2, 24 und 48 h Gal-Behandlung. Fast alle untersuchten Marker waren im Vergleich zu NaCl-behandelten Tieren in LPS-behandelten Tieren signifikant erhöht. Auch die mRNA-Expression von S100A8 war tendenziell erhöht, dies war aufgrund der großen Standardfehler jedoch nicht signifikant. Die Behandlung mit Gal bzw. Dex senkte tendenziell die Expression aller untersuchten Marker, wobei die Wirkung von Gal nach 24 h am stärksten war. In den PBMCs zeigte die Behandlung mit Gal nach 24 h sogar eine höhere Wirkung auf die Expression von TNF-α und IL-1β als die Behandlung mit Dex.

Aufgrund der hohen Wirksamkeit der Gal-Behandlung für 24 h, wurde in den später beschriebenen CIA-Versuchen ein Applikationszeitraum für Gal von 24 h gewählt.

Ergebnisse

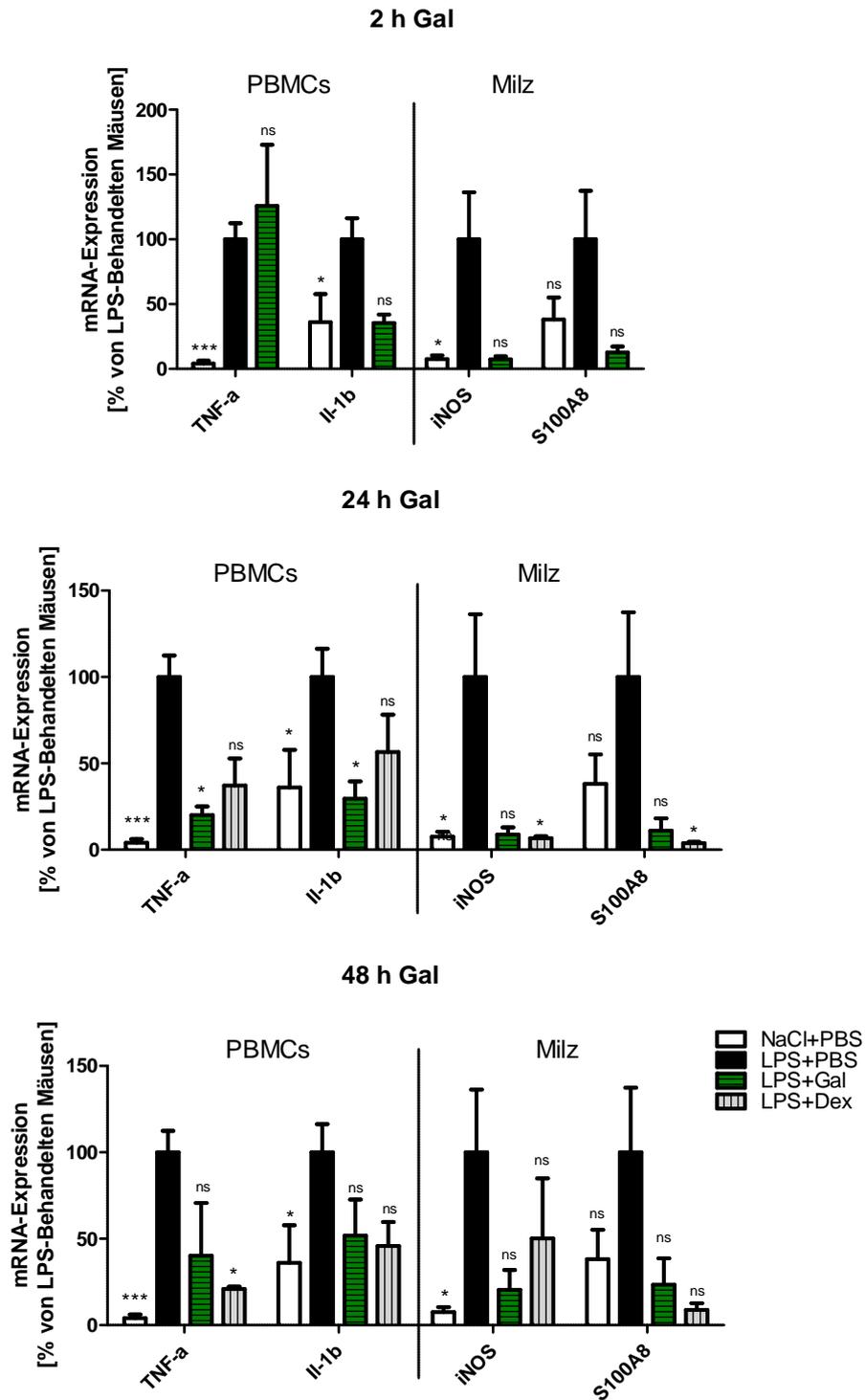


Abbildung 25: Expression proinflammatorischer Gene in PBMC und in der Milz im LPS-induzierten Entzündungsmodell nach Behandlung mit Gallielalacton (Gal).

C57/BL6 Mäusen wurden 2, 24 und 48 h vor LPS-Gabe 10 µg/g Gallielalactone (Gal) interperitoneal (IP) verabreicht. Als Positivkontrolle wurde den Mäusen 24 und 48 h vor LPS-Gabe 5 µg/g Dexamethason (Dex) injiziert. Anschließend wurde den Mäusen 5 µg/g LPS IP appliziert. Nach 6h LPS-Inkubation wurden die Organe entnommen und die RNA isoliert. Mittels qRT-PCR Analyse wurde die Expression verschiedener proinflammatorischer Gene untersucht. *: $p < 0,05$; ***: $p < 0,001$ ns: nicht signifikant verschieden von LPS-behandelten Tieren.

Oxacyclododecindion (Oxa)

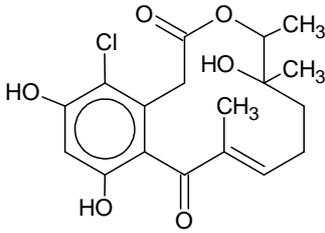
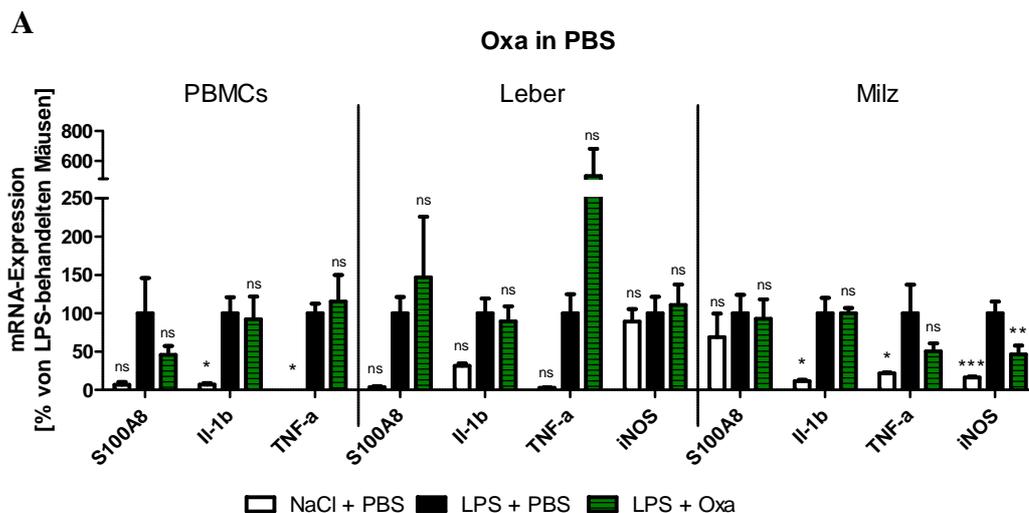


Abbildung 26: Chemische Strukturformel von Oxacyclododecindion

Oxacyclododecindion ist ein Sekundärmetabolit aus dem Pilz *Exserohilum rostratum*. In Zellkultur-Experimenten konnte gezeigt werden, dass Oxa den TGF- β - und IL-4-Signalweg inhibiert. Auch Oxa wurde vor der Anwendung in einem CIA-Versuch zunächst im LPS-Modell getestet. Da die Löslichkeit des chemisch verwandten S-Curvularin in PBS sehr schlecht ist, wurde Oxa zusätzlich zu PBS auch in nativem Olivenöl gelöst. Es sollte getestet werden ob die Wirkung von Oxa in Öl im Vergleich zu

PBS durch die bessere Löslichkeit erhöht werden konnte. Hierfür wurde der gleiche Versuchsaufbau wie oben gewählt. Die Vorbehandlung mit Oxa [1 $\mu\text{g/g}$] wurde für 2 h festgesetzt. **Abbildung 27** zeigt die Expression proinflammatorischer Gene in den PBMCs, in der Leber und in der Milz. Es wurde die mRNA-Expression von S100A8, IL-1 β , TNF- α und iNOS untersucht. Die Expression fast aller untersuchten Markergene waren im Vergleich zu NaCl-behandelten Tieren in LPS-behandelten Tieren erhöht. Eine signifikante Herabregulation der proinflammatorischen Gene konnte nur für die iNOS in der Milz in Oxa/PBS-behandelten Tieren (**A**) nachgewiesen werden und für TNF- α in der Milz und S100A8 in der Leber von Oxa/Öl-behandelten Tieren (**B**). Tendenziell waren fast alle Gene in den Oxa/Öl-behandelten Tieren geringer exprimiert als in den LPS/Öl-behandelten Tieren (**B**). In den Oxa/PBS-behandelten Tieren waren im Gegensatz dazu nur wenige Gene tendenziell geringer exprimiert als in LPS/PBS-behandelten Tieren (**A**).



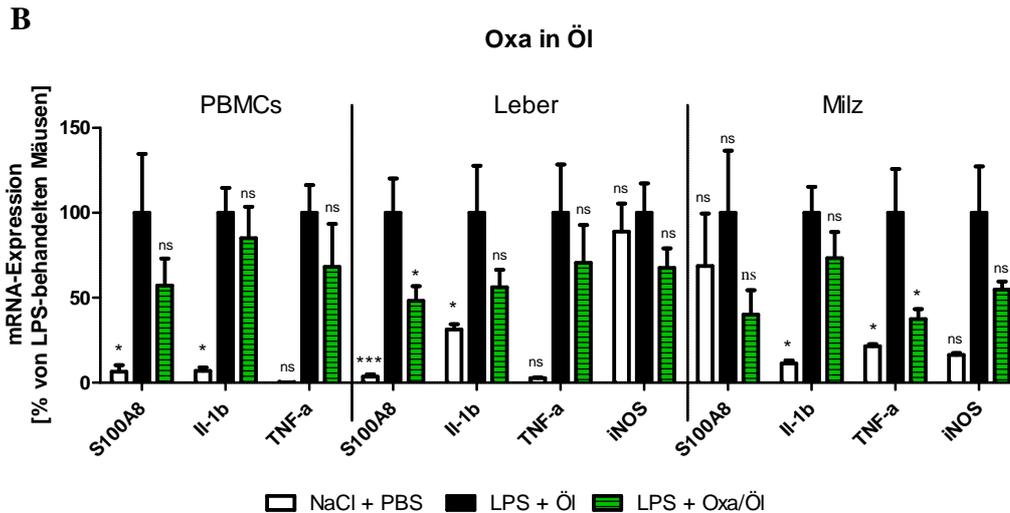


Abbildung 27: Expression proinflammatorischer Gene in peripheren Blutmonocyten (PBMC), in der Leber und in der Milz im LPS-induzierten Entzündungsmodell nach Behandlung in Oxacyclododecindion (Oxa).

C57/BL6 Mäusen wurden 2 h vor LPS-Gabe 1 µg/g Oxacyclododecindion (Oxa) in PBS/EtOH gelöst (A) oder in nativem Olivenöl gelöst (B) interperitoneal (IP) verabreicht. Anschließend wurde den Mäusen 5 µg/g LPS IP appliziert. Nach 6h LPS-Inkubation wurden die Organe entnommen und die RNA isoliert. Mittels qRT-PCR Analyse wurde die Expression verschiedener proinflammatorischer Gene untersucht. *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$; ns: nicht signifikant verschieden von LPS-behandelten Tieren; n = 4 Tiere/Gruppe

Da Oxa in Öl gelöst eine höhere Wirkung auf die allgemeinen Inflammationsmarker zu haben schien als Oxa in PBS gelöst, wurde für den nachfolgend beschriebenen CIA-Versuch das in Öl gelöste Oxa verwendet.

4.2.2 Wirkung von Sekundärmetaboliten aus Pilzen in der kollagen-induzierten Arthritis (CIA)

Für die Versuche der kollageninduzierten Arthritis (CIA) wurden TCR-Vβ12-tg Mäuse mit 200 µg heterologem Kollagen Typ II (CII) in komplettem Freund'schen Adjuvans (CFA) immunisiert. Zur Verstärkung der Immunantwort wurden den Mäusen an den Tagen 11 und 21 nach der Immunisierung weitere 100 µg CII in CFA appliziert. Die Behandlung der Mäuse und die Dokumentation des Arthritis Index erfolgten ab Tag 22 im 1 - 2-Tages-Rhythmus. Die Bestimmung des Arthritis Index erfolgte nach dem in **Abbildung 28** dargestellten Schema.

Ergebnisse



Abbildung 28:Bestimmung des Arthritis Index

Dargestellt sind die verschiedenen Schwellungsgrade einer arthritischen Pfote mit dem entsprechenden Index

Diese Aufnahmen wurden von Dr. N. Schmidt zur Verfügung gestellt.

Eine normale Pfote hatte den Index 0, eine Pfote mit nur einem geschwollenen Zeh hatte den Index 1, für die Schwellung von 2 -3 Zehen wurde der Index 2 vergeben, die Schwellung von einigen Zehen und des Ballens wurde mit Index 3 bewertet und die Schwellung der gesamten Pfote hatte den Index 4. Die Indizes jeder Pfote wurden für jede Maus addiert, so dass für ein Tier maximal der Index 16 vergeben werden konnte.

Galiellacton (Gal)

Für den CIA-Versuch mit Galiellacton (Gal) wurde ein Applikationsrythmus von 24 h und eine Endkonzentration von 10 µg/g Körpergewicht gewählt, da Vorversuche (**Abbildung 25**) gezeigt hatten, dass Gal nach 24 h eine höhere Wirkung zeigte als nach 48 h. Als Positivkontrolle für eine erfolgreiche Behandlung wurde Dexamethason [2,5 µg/g] (Dex)

verwendet, als Negativkontrolle wurde CII-behandelten Tieren PBS/EtOH (10:1) injiziert. Um die Schwere der Erkrankung von CII-Tieren beurteilen zu können, wurden Tiere mit PBS zur Immunisierung und PBS/EtOH zur Therapie behandelt. Die Organentnahme erfolgte an den Tagen 25, 29 und 33 nach der Immunisierung. **Abbildung 29** zeigt den mittleren Arthritis

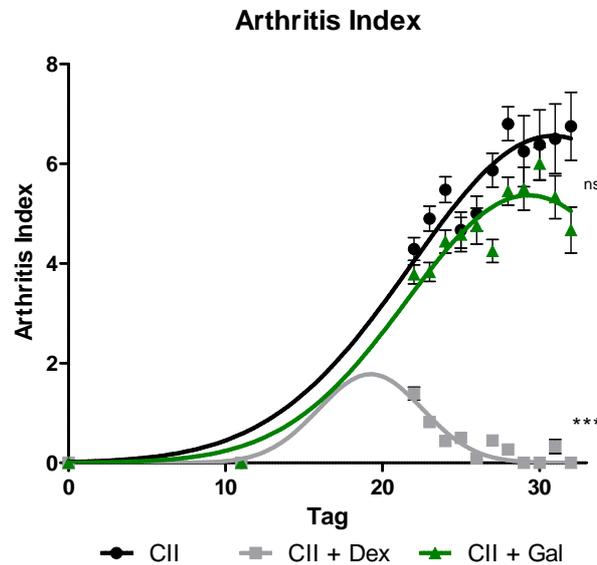


Abbildung 29: Mittlerer Arthritis Index von CII-, CII+Dex- und CII + Gal-behandelten Tieren.

DBA/1-V β 12 transgene Mäuse wurden mit 200 μ g CII in CFA immunisiert. An den Tagen 11 und 21 erfolgte eine Folgeapplikation mit 100 μ g CII in CFA. Ab Tag 22 wurden die Mäuse mit PBS, Dex und Gal behandelt. Die Applikation von PBS, Dex [2,5 μ g/g] und Gal [10 μ g/g] erfolgte im 24 h Rhythmus. An Tag 25, 29 und 33 nach Immunisierung wurden den Mäusen die Organe entnommen und der Arthritis Index festgehalten. ***: $p < 0,001$ im Bezug zu CII-behandelten Tieren; ns: nicht signifikant verschieden von CII-behandelten Tieren; $n = 5-8$ Tiere/Gruppe

Index von CII-, CII + Dex- und CII + Gal-behandelten Tieren. Der Arthritis Index in CII-immunisierten Tieren ohne Behandlung stieg exponentiell an und endete in einem Plateau. Es ist zu erkennen, dass bei Dex-behandelten Tieren der Arthritis Index nach Behandlungsbeginn wieder abnahm. Der Arthritis Index von Gal-behandelten Tieren zeigte hingegen keinen signifikanten Unterschied zu CII-Tieren.

Die Analyse der mRNA-Expression proinflammatorischer Mediatoren wie S100A8, Mip-1 α , TNF- α und IL-1 β in den peripheren Blutmonozyten (PBMCs) zeigt keine Wirkung von Gal auf deren mRNA-Expression (**Abbildung 30**). Überraschenderweise zeigte nur S100A8 eine erhöhte Expression in CII-immunisierten Tieren im Vergleich zu PBS-immunisierten Tieren. Des Weiteren zeigten an Tag 25 die mit PBS immunisierten Mäuse eine starke Erhöhung von

Mip-1 α und an Tag 33 eine signifikante Erhöhung von TNF- α im Vergleich zu CII-immunisierten Mäusen. An Tag 29 war die Expression von S100A8 in Gal-behandelten Mäusen tendenziell geringer als in CII-Mäusen.

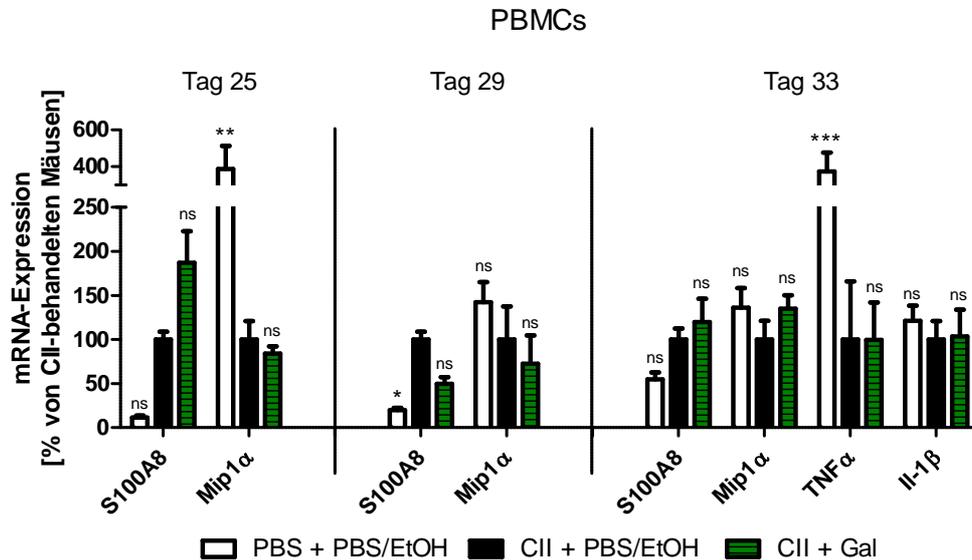


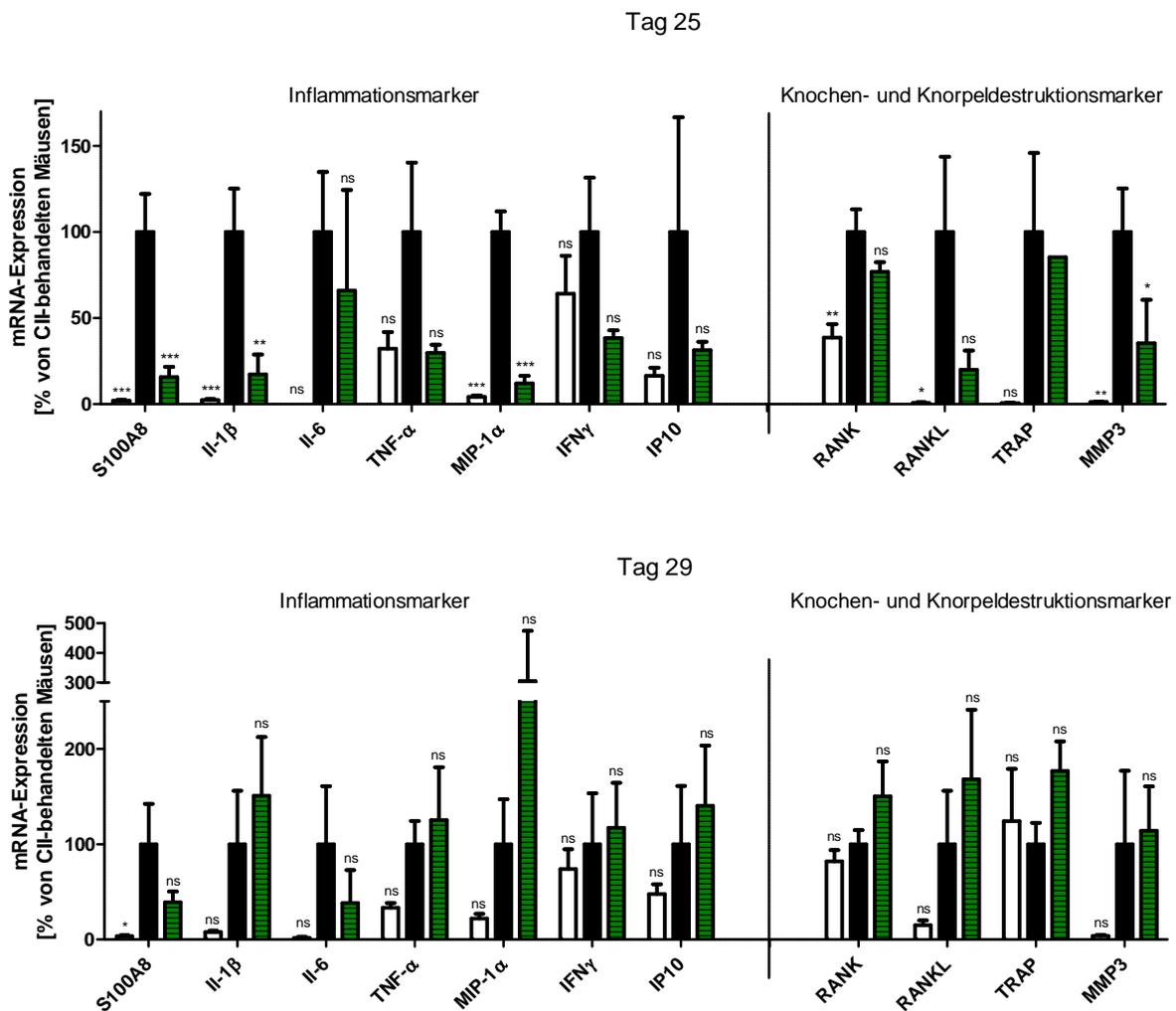
Abbildung 30: Expression proinflammatorischer Gene in peripheren Blutmonocyten (PBMC) von PBS-, CII- und CII + Gal-behandelten Tieren.

DBA/1-V β 12 transgene Mäuse wurden mit 200 μ g CII in CFA immunisiert. An den Tagen 11 und 21 erfolgte eine Folgeapplikation mit 100 μ g CII in CFA. Ab Tag 22 wurden die Mäuse mit PBS und Gal behandelt. Die Applikation von PBS und Gal [10 μ g/g] erfolgte im 24 h Rhythmus. An Tag 25, 29 und 33 nach Immunisierung wurden den Mäusen die Organe entnommen und qRT-PCR-Analysen durchgeführt. *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$; ns: nicht signifikant verschieden von CII-behandelten Tieren; $n = 5-8$ Tiere/Gruppe

Die rheumatoide Arthritis (RA) ist eine systemische Erkrankung. Allerdings sind die Gelenke der Extremitäten am stärksten betroffen. Deswegen wurde bei den Analysen der proinflammatorischen Genexpression in der CIA auch ein verstärktes Augenmerk auf das Krankheitsgeschehen in den Pfoten gelegt. Durch die chronische Entzündung in den Pfoten kommt es zu einer Destruktion von Knochen- und Knorpelgewebe. Typische Marker für den Knochen- und Knorpelabbau sind RANK, RANKL und TRAP, welche in die Prozesse der Entstehung und des Einwanderns von Osteoklasten involviert sind, und MMP3, welches direkt am Abbau des Gewebes beteiligt ist. Neben den typischen Entzündungsmarkern wurde auch die Expression dieser Destruktionsmarker in den Pfoten analysiert. **Abbildung 31** zeigt die Expression proinflammatorischer und knochen- und knorpeldestruktiver Gene in den

Ergebnisse

Vorderpfoten von PBS-, CII- und CII + Gal-behandelten Tieren. An Tag 25 nach der Immunsierung waren alle untersuchten Gene in CII-immunisierten Tieren signifikant oder tendenziell erhöht im Vergleich zu PBS-immunisierten Tieren. Auch an den Tagen 29 und 33 waren die meisten untersuchten Gene in CII-Tieren induziert. Eine Herabregulation dieser Gene in den Gal-behandelten Tieren war allerdings nur an Tag 25 zu erkennen. Zu späteren Zeitpunkten war keine Wirkung von Gal auf die Expression der untersuchten Marker zu erkennen.



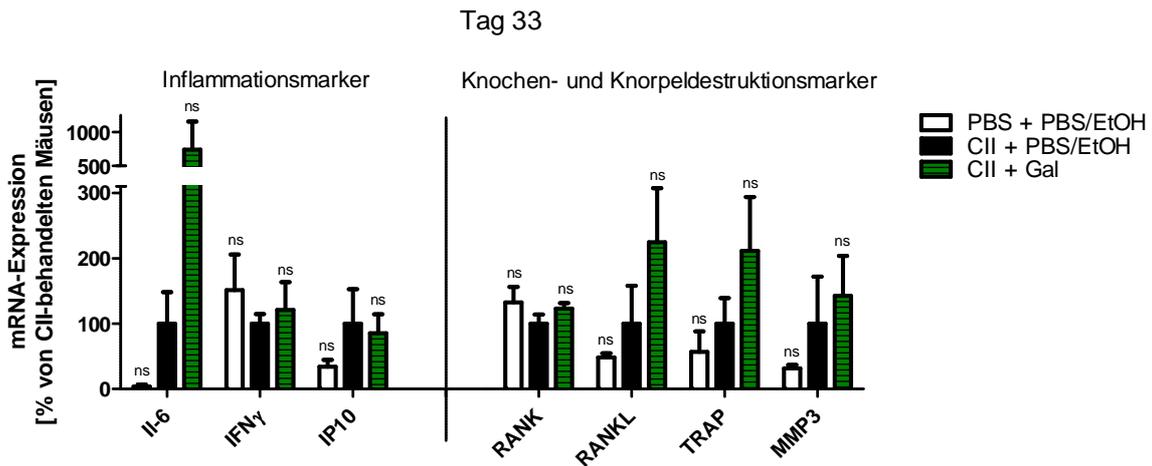


Abbildung 31: Expression proinflammatorischer und knorpel- und knochendestruktiver Gene in Vorderpfoten von PBS-, CII- und CII+Gal-behandelten Tieren.

DBA/1-V β 12 transgene Mäuse wurden mit 200 μ g CII in CFA immunisiert. An den Tagen 11 und 21 erfolgte eine Folgeapplikation mit 100 μ g CII in CFA. Ab Tag 22 wurden die Mäuse mit PBS, Dex und Gal behandelt. Die Applikation von PBS und Gal [10 μ g/g] erfolgte im 24 h Rhythmus. An Tag 25, 29 und 33 nach Immunisierung wurden den Mäusen die Organe entnommen, die RNA isoliert und qRT-PCR-Analysen durchgeführt. *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$; ns: nicht signifikant verschieden von CII-behandelten Tieren; $n = 5-8$ Tiere/Gruppe

Wegen der mangelnden Wirkung von Gal auf die Genexpression proinflammatorischer und knochen- und knorpeldestruktiver Marker wurde auf weitere Analysen verzichtet.

Oxacyclododecindion (Oxa)

Für den CIA-Versuch mit Oxacyclododecindion (Oxa) wurde Oxa [Endkonz. 1 μ g/g] in nativem Olivenöl gelöst, da Vorversuche gezeigt hatten, dass die Wirkung von Oxa in Öl tendenziell höher ist als die Wirkung von Oxa in PBS. Es wurde ein Applikationsrhythmus von 48 h gewählt. Um die Gruppengröße in einem statistisch auswertbaren Bereich zu halten, wurde in diesem Versuch auf die Positivkontrolle mit Dexamethason (Dex) verzichtet.

Abbildung 32 zeigt den mittleren Arthritis Index von CII- und CII + Oxa/Öl-behandelten Tieren. Es gab keinen Unterschied zwischen CII- und CII + Oxa/Öl-behandelten Tieren.

Arthritis Index

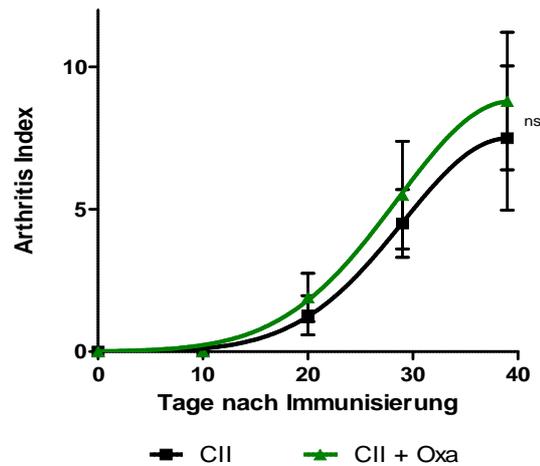


Abbildung 32: Mittlerer Arthritis Index von CII- und CII+Oxa(Öl)-behandelten Tieren.

DBA/1-V β 12 transgene Mäuse wurden mit 200 μ g CII in CFA immunisiert. An den Tagen 11 und 21 erfolgte eine Folgeapplikation mit 100 μ g CII in CFA. Ab Tag 22 wurden die Mäuse mit Öl und Oxa(Öl) behandelt. Die Applikation von und Oxa [1 μ g/g] erfolgte im 48 h Rhythmus. An Tag 29 und 39 nach Immunisierung wurden den Mäusen die Organe entnommen und der Arthritis Index festgehalten. ns: nicht signifikant verschieden von CII-behandelten Tieren; n = 5-6 Tiere/Gruppe

Die Analyse der proinflammatorischen Genexpression in den PBMCs (**Abbildung 33**) zeigte, dass Oxa die mRNA-Expression von S100A8 und TNF- α nicht herabregulierte, aber auch, dass die proinflammatorischen Marker in CII-immunisierten Tieren im Vergleich zu PBS-immunisierten Tieren nicht induziert waren.

Ergebnisse

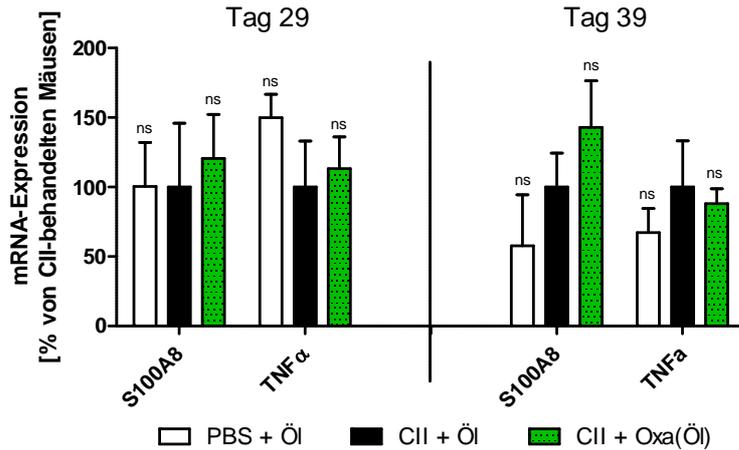


Abbildung 33: Expression proinflammatorischer Gene in PBMC von PBS-, CII- und CII + Oxa-behandelten Tieren.

DBA/1-Vβ12 transgene Mäuse wurden mit 200 µg CII in CFA immunisiert. An den Tagen 11 und 21 erfolgte eine Folgeapplikation mit 100 µg CII in CFA. Ab Tag 22 wurden die Mäuse mit Öl und Oxa(Öl) behandelt. Die Applikation von und Oxa [1 µg/g] erfolgte im 48 h Rhythmus. An Tag 29 und 39 nach Immunisierung wurden den Mäusen die Organe entnommen, die RNA isoliert und qRT-PCR-Analysen durchgeführt. ns: nicht signifikant verschieden von CII-behandelten Tieren; n = 5-6 Tiere/Gruppe

Ein Vergleich zwischen PBS-immunisierten Tieren aus dem CIA-Versuch mit Gal, welche PBS/EtOH erhielten und den mit Öl gespritzten PBS-immunisierten Tieren aus dem aktuellen Versuch zeigte, dass die Expression proinflammatorischer Gene in den Tieren, welche mit Öl behandelt wurden, deutlich erhöht war im Vergleich zu den Tieren, welche PBS/EtOH

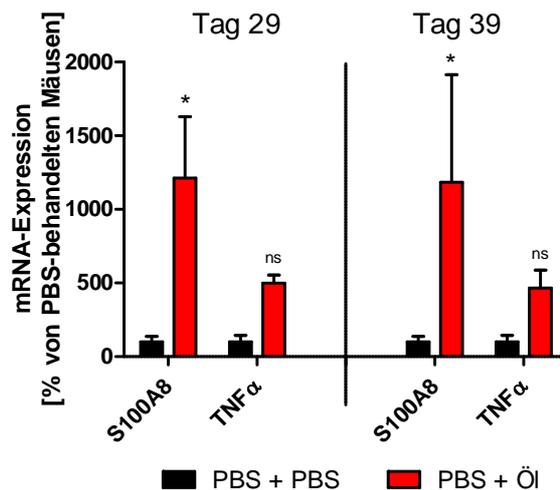


Abbildung 34: Auswirkungen von Ölapplikationen auf die proinflammatorische Genexpression.

Dargestellt ist die Expression von S100A8 und TNFα in PBS- und Öl-behandelten Mäusen. *: p < 0,05; ns: nicht signifikant verschieden von PBS-Behandelten Mäusen.

erhielten (**Abbildung 34**). Aus den vorangegangenen Experimenten geht hervor, dass Öl als Lösungsmittel für die Behandlung der CIA ungeeignet ist.

In einem weiteren CIA-Versuch mit Oxa wurde diesmal als Lösungsmittel für Oxa PBS/EtOH verwendet. **Abbildung 35** zeigt den mittleren Arthritis Index von CII- und CII + Oxa-behandelten Tieren. Der Index in CII-immunisierten Tieren stieg exponentiell an und hatte an den Tagen 29 und 33, an denen die Organentnahme stattfand noch nicht sein Plateau erreicht. Wohingegen der Arthritis Index in Oxa-behandelten Tieren zum Ende des Versuches hin sein Plateau bereits erreicht hatte. Der Unterschied zwischen CII- und CII + Oxa-behandelten Tieren war zwar nicht signifikant, jedoch war eine Tendenz zur Verringerung des Index erkennbar

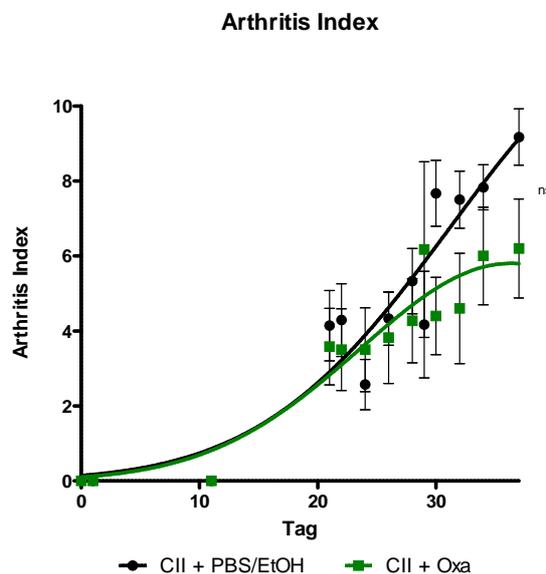


Abbildung 35: Mittlerer Arthritisindex von CII- und CII+Oxa-behandelten Tieren.

DBA/1-V β 12 transgene Mäuse wurden mit 200 μ g CII in CFA immunisiert. An den Tagen 11 und 21 erfolgte eine Folgeapplikation mit 100 μ g CII in CFA. Ab Tag 22 wurden die Mäuse mit PBS und Oxa behandelt. Die Applikation von und Oxa [1 μ g/g] erfolgte im 48 h Rhythmus. An Tag 29 und 37 nach Immunisierung wurden den Mäusen die Organe entnommen und der Arthritisindex festgehalten. ns: nicht signifikant verschieden von CII-behandelten Tieren; n = 5-6 Tiere/Gruppe

Die Analyse der proinflammatorischen Genexpression in PBMCs und in der Milz zeigte keine Wirkung von Oxa auf die mRNA-Expression der untersuchten proinflammatorischen Mediatoren (**Abbildung 36**). Sowohl in den PBMCs als auch in der Milz war nur die Expression von S100A8 in CII-immunisierten Mäusen signifikant erhöht im Vergleich zu

PBS-immunisierten Mäusen. Die anderen untersuchten Gene waren nur tendenziell oder gar nicht verstärkt exprimiert in CII-immunisierten Mäusen. In den PBMCs war die Expression von TNF- α , IL-6, und Mip-1 α an Tag 29 und S100A8 und IL-6 an Tag 37 nach Oxa-Behandlung nur leicht reduziert.

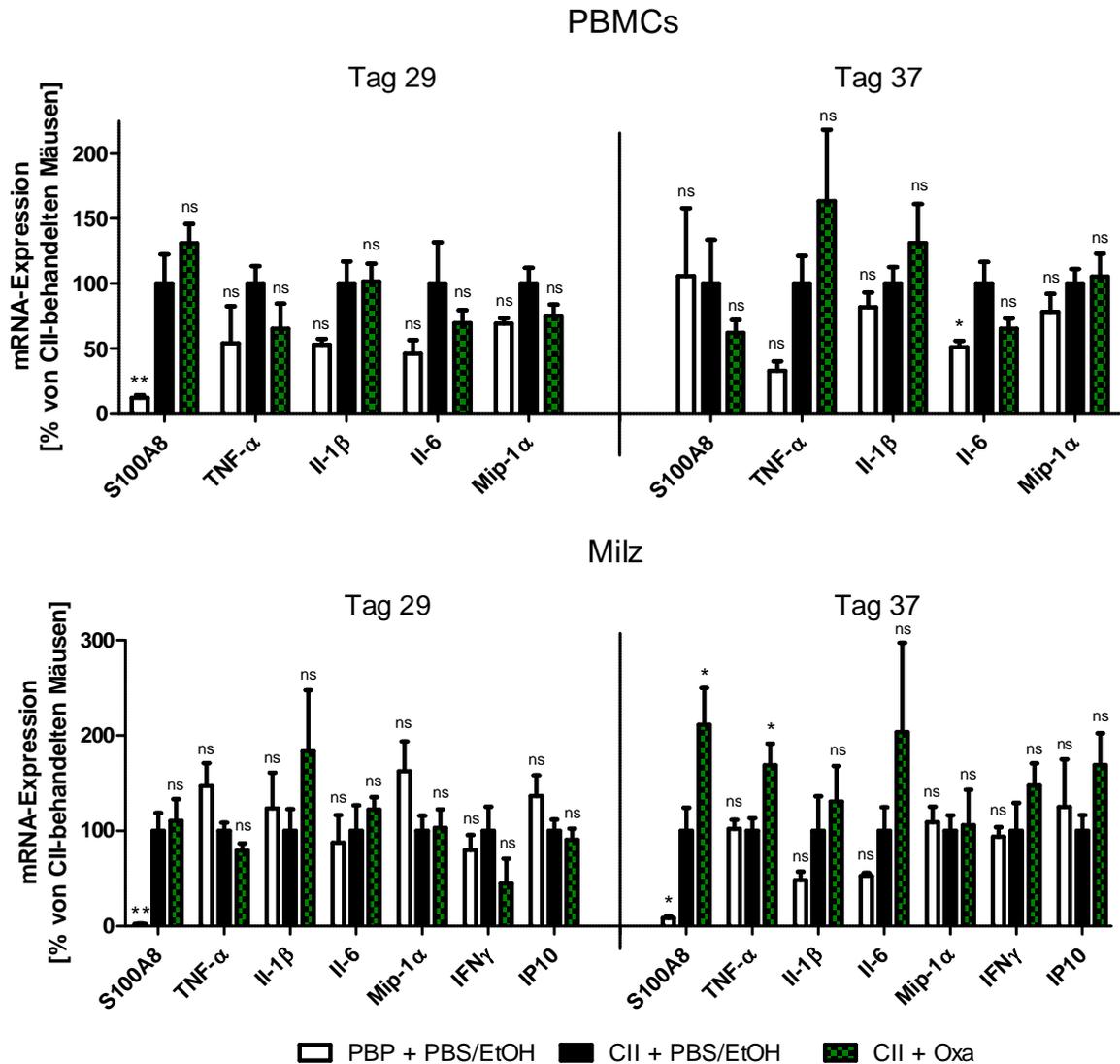


Abbildung 36: Expression proinflammatorischer Gene in peripheren Blutmonocyten (PBMC) und in der Milz von PBS-, CII- und CII + Oxa-behandelten Tieren.

DBA/1-V β 12 transgene Mäuse wurden mit 200 μ g CII in CFA immunisiert. An den Tagen 11 und 21 erfolgte eine Folgeapplikation mit 100 μ g CII in CFA. Ab Tag 22 wurden die Mäuse mit PBS und Oxa behandelt. Die Applikation von PBS und Oxa [1 μ g/g] erfolgte im 48 h Rhythmus. An Tag 29 und 37 nach Immunisierung wurden den Mäusen die Organe entnommen, die RNA isoliert und qRT-PCR-Analysen durchgeführt. *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; ns: nicht signifikant verschieden von CII-behandelten Tieren; $n = 5-6$ Tiere/Gruppe

In der Milz wurde die Expression von S100A8, TNF- α und IL-6 durch Oxa sogar noch verstärkt.

Die Analyse der Genexpression in den Hinterpfoten (**Abbildung 37**) zeigte eine erhöhte

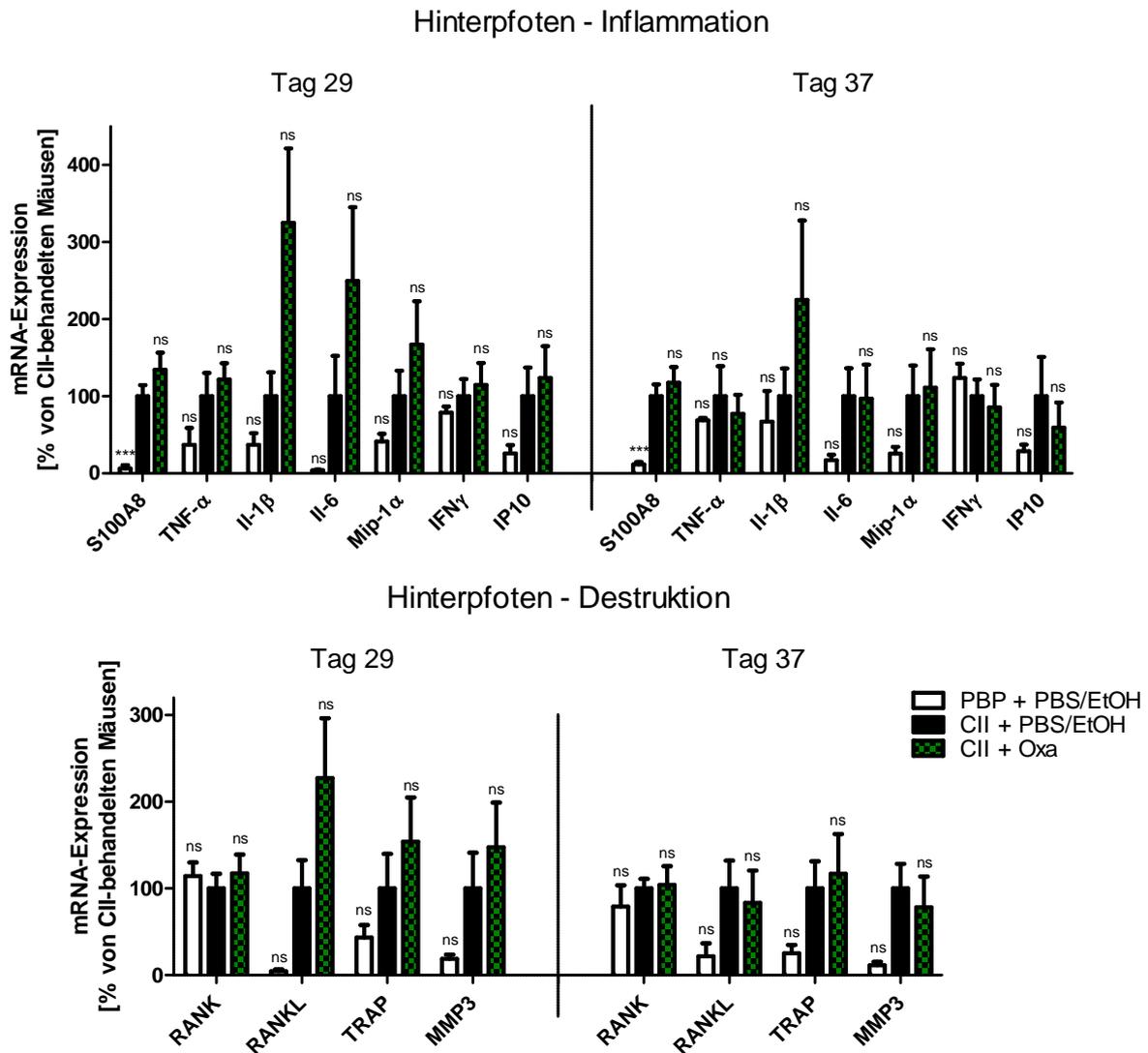


Abbildung 37: Expression proinflammatorischer und knorpel- und knochendestruktiver Gene in Hinterpfoten von PBS-, CII- und CII+Oxa-behandelten Tieren.

DBA/1-V β 12 transgene Mäuse wurden mit 200 μ g CII in CFA immunisiert. An den Tagen 11 und 21 erfolgte eine Folgeapplikation mit 100 μ g CII in CFA. Ab Tag 22 wurden die Mäuse mit PBS und Oxa behandelt. Die Applikation von PBS und Oxa [1 μ g/g] erfolgte im 48 h Rhythmus. An Tag 29 und 37 nach Immunisierung wurden den Mäusen die Organe entnommen, die RNA isoliert und qRT-PCR-Analysen durchgeführt. ***: $p < 0,001$; ns: nicht signifikant verschieden von CII-behandelten Tieren; $n = 5-6$ Tiere/Gruppe

Expression der untersuchten proinflammatorischen Marker in CII-immunisierten Tieren im Vergleich zu PBS-immunisierten Tieren. Auch die knochen- und knorpeldestruktiven Marker waren bis auf RANK in den CII-immunisierten erhöht. Die Behandlung mit Oxa zeigte keinen Effekt auf die Expression der untersuchten Gene. In einigen Fällen (IL-1 β und IL-6) wurde deren Expression sogar noch erhöht.

Somit scheint Oxa ebenfalls nicht für eine erfolgreiche Therapie der CIA geeignet zu sein.

Da beide, bisher untersuchten Substanzen keine Wirkung in der CIA gezeigt haben, wurden weiterführende Untersuchungen zur Beeinflussung der Expression von knochen- und knorpeldestruktiven Markergenen und immunologisch relevanten miRNAs im CIA-Modell mit S-Curvularin (SC), einer bereits erprobten Substanz, durchgeführt.

S-Curvularin (SC)

Die CIA-Versuche mit S-Curvularin (SC) wurden von Dr. N. Schmidt durchgeführt. Die Versuche wurden wie oben beschrieben gestaltet. Es wurde eine Endkonzentration von 10 $\mu\text{g/g}$ Körpergewicht SC und 5 $\mu\text{g/g}$ Dex eingesetzt. Die Applikation erfolgte im 48 h Rhythmus. Für die Analyse der knochen- und knorpeldestruktiven Marker und der proinflammatorischen Mediatoren IFN γ und IP10 wurde die RNA aus den bei -80° C gelagerten Organen isoliert. In **Abbildung 38** ist zu erkennen, dass die untersuchten knochen- und knorpeldestruktiven Marker und IP10 in CII-immunisierten Mäusen induziert waren. IFN γ war nicht induziert und deren Expression wurde von SC und Dex sogar noch verstärkt. An Tag 25 wurde die Expression der untersuchten Marker nach SC- bzw. Dex-Behandlung tendenziell herabreguliert. An Tag 29 waren alle Destruktionsmarker signifikant erhöht, jedoch war, mit Ausnahme von RANK, keine Herabregulation nach SC-Gabe zu erkennen. Dagegen zeigte die Dex-Behandlung bei allen untersuchten Markergenen eine signifikante Herabregulation der Expression. An Tag 33 waren die Destruktionsmarker bis auf RANK ebenfalls noch stark erhöht, wurden zu diesem Zeitpunkt sowohl von Dex wie von SC signifikant herabreguliert. Hier war die hemmende Wirkung von SC auf die Genexpression der knochen- und knorpeldestruktiven Marker sogar stärker als die Wirkung von Dex. Wie Schmidt *et al* bereits zeigen konnte, ist SC auch in der Lage die Expression der allgemeinen proinflammatorischen Marker herab zu regulieren [140]. Um die Wirkung von SC weiter zu untersuchen, wurden microRNA-Analysen durchgeführt.

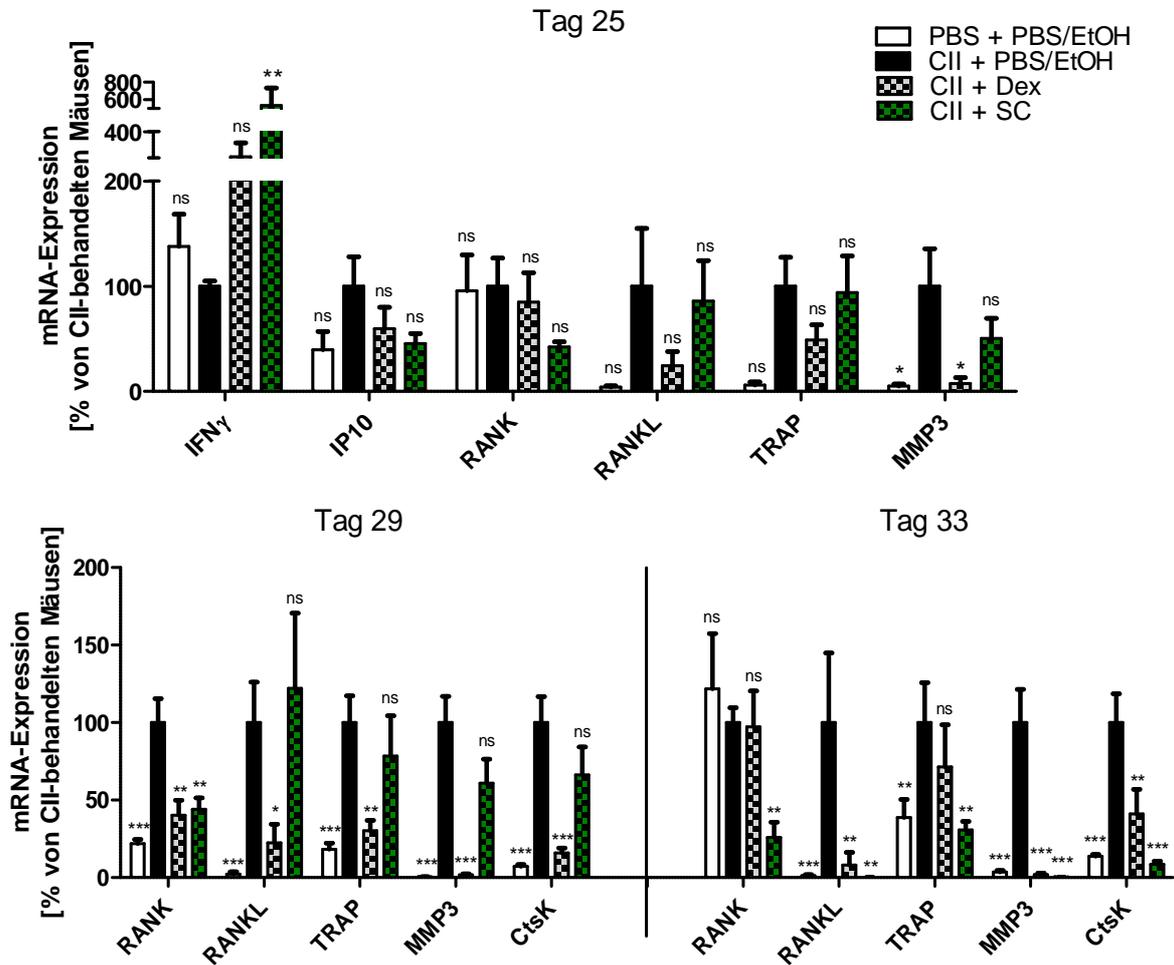


Abbildung 38: Expression proinflammatorischer und knorpel- und knochendestruktiver Gene in Hinterpfoten von PBS-, CII-, CII+ Dex- und CII+ SC-behandelten Tieren.

DBA/1-V β 12 transgene Mäuse wurden mit 200 μ g CII in CFA immunisiert. An den Tagen 11 und 21 erfolgte eine Folgeapplikation mit 100 μ g CII in CFA. Ab Tag 22 wurden die Mäuse mit PBS, Dex und SC behandelt. Die Applikation von PBS, Dex [5 μ g/g] und SC [10 μ g/g] erfolgte im 48 h Rhythmus. An Tag 25, 29 und 33 nach Immunisierung wurden den Mäusen die Organe entnommen, die RNA isoliert und qRT-PCR-Analysen durchgeführt. *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$; ns: nicht signifikant verschieden von CII-behandelten Tieren; $n = 5-6$ Tiere/Gruppe

4.2.3 Regulation von microRNAs in der kollagen-induzierten Arthritis (CIA)

Entzündliche Prozesse unterliegen strengen und sehr vielfältigen Kontrollen. Die Regulation proinflammatorischer Mediatoren findet meist auf unterschiedlichen Ebenen statt, um eine schnelle und effektive Wirkung zu gewährleisten. In den letzten Jahren konnte gezeigt werden, dass miRNAs eine essentielle Rolle in der Regulation des molekularen Krankheitsgeschehens vieler Erkrankungen einnehmen. Es sind bereits zahlreiche miRNAs bekannt, welche in den Krankheitsverlauf der rheumatoiden Arthritis (RA) involviert sind. Ein Ziel dieser Arbeit war es, neue miRNAs zu identifizieren, die in CII-immunisierten Mäusen im Vergleich zu gesunden Kontrollmäusen differentiell reguliert sind. Für diese Untersuchungen wurden miRNAs aus Pfoten von PBS- und CII-behandelter Tiere isoliert. Um einen möglichst umfangreichen Überblick zu erhalten, wurden die miRNAs aus den Pfoten einer Versuchsgruppe gepoolt und damit miRNA-PCR-Array-Analysen durchgeführt. **Abbildung 39** zeigt miRNAs, welche in CII-Tieren verschieden von PBS-Tieren reguliert wurden.

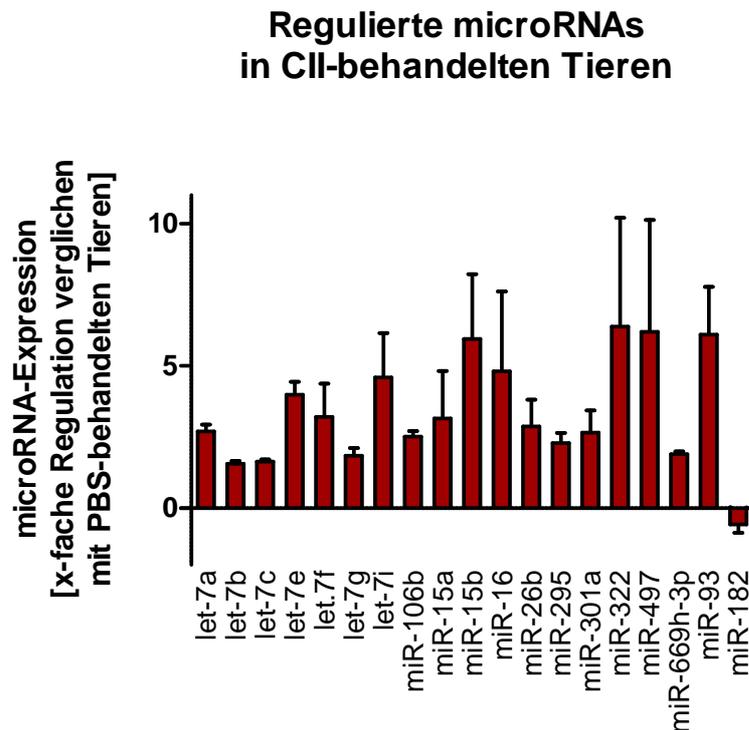


Abbildung 39: Expression immunologisch relevanter microRNAs in CII-behandelten Tieren.

DBA/1-V β 12 transgene Mäuse wurden mit 200 μ g CII in CFA immunisiert. An den Tagen 11 und 21 erfolgte eine Folgeapplikation mit 100 μ g CII in CFA. Für die microRNA-PCR-Arrays wurden microRNAs aus Pfoten von PBS- und CII-Mäusen verwendet.

Aus den diesen PCR-Array-Analysen wurden die miR-16 und die miR-182 ausgewählt, um deren Expression in qRT-PCR-Analysen zu verifizieren und um zu überprüfen, ob SC eine Wirkung auf deren Expression zeigt. Die miR-16 wurde in der Literatur schon oft im Zusammenhang mit der rheumatoiden Arthritis beschrieben [158]. Die miR-182 war die einzige miRNA, welche in CII-behandelten Tieren herabreguliert wurde. Des Weiteren wurde die Expression der miR-34a untersucht, da Zellkulturexperimente in humanen Zellen gezeigt hatten, dass die miR-34a-Expression bei Entzündungsprozessen herabreguliert wird und durch SC wieder auf Normalniveau ansteigt (bisher unveröffentlichte Daten der AG Erkel). **Abbildung 40** zeigt, dass die miR-34a und miR-182 wie erwartet in CII-Tieren herabreguliert wurden und durch die Behandlung mit SC wieder das Expressionsprofil von PBS-behandelten Tieren erreichte. Die verstärkte Expression der miR-16 in CII-Tieren konnte nicht bestätigt werden. Allerdings zeigte die Behandlung mit SC einen Anstieg der miR-16.

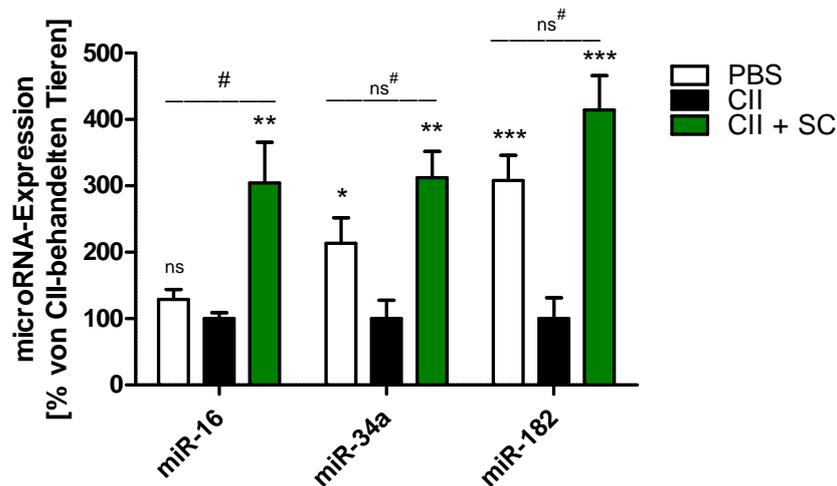


Abbildung 40: Expression von microRNAs in Pfoten von PBS-, CII- und CII+ SC -behandelten Tieren.

DBA/1-V β 12 transgene Mäuse wurden mit 200 μ g CII in CFA immunisiert. An den Tagen 11 und 21 erfolgte eine Folgeapplikation mit 100 μ g CII in CFA. Ab Tag 22 wurden die Mäuse mit PBS und SC behandelt. Die Applikation von PBS und SC [10 μ g/g] erfolgte im 48 h Rhythmus. An Tag 29 nach Immunisierung wurden den Mäusen die Organe entnommen, die RNA isoliert und qRT-PCR-Analysen durchgeführt. *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$; ns: nicht signifikant verschieden von CII-behandelten Tieren; #: $p < 0,05$; ns#: nicht signifikant verschieden von PBS-Tieren; n = 5-6 Tiere/Gruppe

Für die microRNA-Analysen wurde die RNA aus der gesamten Pfote verwendet. Da die Expression von microRNAs jedoch überwiegend zellspezifisch ist und um ein mögliches

zelluläres Modell zu erkunden, wurden murine Makrophagen (RAW-264.7) auf ihre microRNA-Expression hin untersucht.

4.2.4 Regulation von microRNAs in murinen Makrophagen

Leider war es nicht möglich einzelne Zellarten aus den Pfoten zu isolieren um die microRNA-Expression zellspezifisch untersuchen zu können. Da Makrophagen maßgeblich an der Pathogenese der RA beteiligt sind und auch schon in den *in vitro*-Studien verwendet wurden, lag der Schluss nahe, die miRNA-Expression in RAWs zu untersuchen. Für diese Analysen wurden RAWs zunächst für 1 h mit SC vorbehandelt und anschließend mit einem Mix aus LPS und murinem IFN γ stimuliert. In qRT-PCR-Analysen wurde die Expression der miR-16, miR-34a und der miR-182 untersucht.

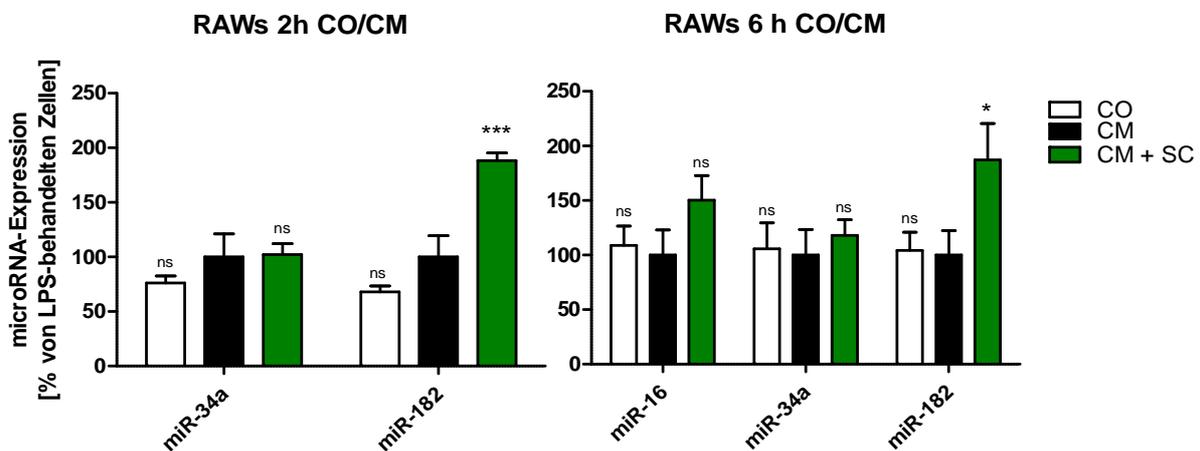


Abbildung 41: Expression von microRNAs in murinen Makrophagen (RAW-264.7)

RAWs wurden in 6-Loch-Platten ausgesät und wenn sie konfluent waren auf FCS-freies Medium gesetzt damit alle Zellen im gleichen Zellzyklus sind. Nach 16 h auf FCS-freiem Medium wurden die Zellen für 1 h mit SC vorbehandelt bevor diese mit LPS und murinem IFN γ für 2 und 6 h stimuliert wurden. Anschließend wurden die Zellen in GIT-Puffer lysiert, die RNA isoliert und qRT-PCR-Analysen durchgeführt. *: $p < 0,05$; ***: $p < 0,001$; ns: nicht signifikant verschieden von LPS/IFN γ -behandelten Zellen; $n = 4$.

Abbildung 41 zeigt, dass weder nach 2 noch nach 6 h LPS/IFN γ -Stimulation die Expression der untersuchten miRNAs verändert war. Überraschenderweise zeigt die miR-182 eine Regulation durch SC obwohl keine Induktion der Expression in stimulierten Zellen zu erkennen war.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die Sekundärmetabolite Galiellalacton (Gal) und Oxacyclododecindion (Oxa) die Genexpression proinflammatorischer Marker in einem akuten, LPS-induzierten Entzündungsmodell herabregulierten. Die Expression von proinflammatorischen und knochen- und knorpeldestruktiven Genen wurde hingegen in der CIA weder von Gal noch Oxa beeinflusst. S-Curvularin (SC) war in der Lage neben seiner, bereits beschriebenen, anti-inflammatorischen Wirkung auch die Expression von Genen herab zu regulieren, welche maßgeblich am Abbau von Knorpel- und Knochengewebe beteiligt sind. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass die miR-34a und die miR-182 in der CIA differenziell reguliert wurden und dass SC auch einen positiven Einfluss auf deren Expression zeigte. Weiter konnte gezeigt werden, dass RAWs als Zellmodell für in vitro-Studien für die miR-16, miR-34a und die miR-182 ungeeignet waren.

5 Diskussion

5.1 Einfluss des zytosolischen PolyA-bindenden Proteins (PABP) auf die Genexpression der humanen induzierbaren NO-Synthase (iNOS)

Die humane induzierbare NO-Synthase (iNOS) ist an zahlreichen physiologischen und pathophysiologischen Prozessen beteiligt [175, 176]. Eine fehlerhafte Regulation der Expression der iNOS kann zu massiven Gewebeschäden führen [42, 45]. Einer der wichtigsten Mechanismen in der Regulation der Genexpression ist die Regulation der mRNA-Stabilität. Es konnte bereits gezeigt werden, dass eine Vielzahl von RNA-bindenden Proteinen an der Regulation der iNOS-Expression beteiligt sind [68, 70].

In Affinitäts-Chromatographie-Analysen wurde das zytosolische PolyA-bindende Protein (PABP) als eines der Proteine identifiziert, welche direkt mit der 3'UTR der humanen iNOS interagieren [68].

Um den Einfluss von PABP auf die iNOS-Expression untersuchen zu können, generierte S. Nowag während seiner Doktorarbeit DLD-1 Zellen, welche mittels siRNA die Expression von PABP zytokinunabhängig herabregulierten (**Abbildung 9**, S. 66). In diesen DLD-1-siPABP Zellen war die iNOS-Expression im Vergleich zu DLD-1-siLuc Zellen nach Zytokininduktion sowohl auf mRNA-Ebene als auch auf Proteinebene stark reduziert (**Abbildung 10**, S. 67). Untersuchungen der mRNA-Expression von Pol2a und β 2M zeigten keine Veränderung der mRNA- oder der Proteinexpression in siPABP Zellen im Vergleich zu siLuc Zellen (Doktorarbeit von S. Nowag, [177]). Diese Befunde zeigen, dass die Wirkung der Herabregulation von PABP auf die iNOS-Expression nicht einer generellen Repression der Translation zugrunde gelegt werden kann. Des Weiteren konnte S. Nowag zeigen, dass auch die iNOS-abhängige Produktion von NO in zytokinstimulierten siPABP Zellen signifikant abnahm (**Abbildung 11**, S. 68). Eine unveränderte Expression der Transkriptionsfaktoren STAT-1 α und NF- κ B (Doktorarbeit S. Nowag) und die Tatsache, dass die Induzierbarkeit des 16 kb iNOS Promotors in siPABP Zellen unverändert blieb (**Abbildung 13**, S. 70), legen den

Schluss nahe, dass der Einfluss von PABP auf die iNOS-Expression auf posttranskriptioneller Eben stattfindet.

Versuche mit 5,6-Dichlor-1-D-ribofuranosyl-benzimidazol (DRB), welches die RNA-Polymerase II inhibiert, und somit die Transkription stoppt, konnten zeigen, dass die mRNA der iNOS in siPABP Zellen wesentlich schneller abgebaut wird als in siLuc Zellen (**Abbildung 14**, S. 71). Im Gegensatz dazu blieb der Abbau der mRNAs der Pol2a und von β 2M in siPABP Zellen unverändert. Diese Experimente zeigen, dass die Regulation der iNOS-Expression durch PABP über die Stabilität der iNOS mRNA erfolgt. Da die Stabilität anderer mRNAs durch die Herabregulation von PABP unbeeinflusst blieb, ist davon auszugehen, dass PABP, neben seinen zahlreichen anderen Funktionen, spezifisch in die Regulation der iNOS-Expression involviert ist.

Neben der Herabregulation der iNOS in zytokinstimulierten siPABP Zellen wurden auch die proinflammatorischen Mediatoren COX2, IL-8 und RANTES in zytokinstimulierten siPABP Zellen geringer exprimiert als in zytokinstimulierten siLuc Zellen (**Abbildung 12**, S. 68). Die COX2 gehört zur Familie der induzierbaren Oxygenasen und oxidiert Arachidonsäure zu Prostaglandin H₂. Die COX2 wird natürlicherweise bei Verletzungen und Entzündungen durch Zytokine und Mitogene induziert. In der 3'UTR der COX2-mRNA befinden sich ebenfalls mehrere AREs, welche für eine stringente Regulation der COX2-Expression sorgen, und ein Bereich, der ebenfalls eine hohe Sequenzidentität zur PABP-Bindestelle in der PABP mRNA aufweist. Des Weiteren wurde aber auch beschrieben, dass von der iNOS produziertes NO maßgeblich an der Regulation der COX2-Expression beteiligt ist [178]. Die verringerte Expression der COX2 in den siPABP Zellen könnte neben der Regulation durch PABP auch auf die geringere NO-Menge zurückgeführt werden. IL-8 ist ein Chemokin, welches neutrophile Granulozyten in entzündetes Gewebe rekrutiert. In der 3'UTR von IL-8 befinden sich 10 AREs und sowohl in der 5'- als auch in der 3'UTR konnten Bereiche mit einer hohen Sequenzidentität zur PABP-Bindestelle in der PABP mRNA identifiziert werden. Auch bei RANTES (*Regulated on Activation, Normal T cell Expressed and Secreted*), ebenfalls ein Chemokin, welches T-Zellen, Eosinophile und Basophile bei Entzündungsreaktionen rekrutiert, konnten Bereiche mit ähnlicher Sequenzidentität zur PABP-Bindestelle der PABP mRNA gefunden werden, jedoch besitzt die 3'UTR der RANTES mRNA keine AREs. Die Herabregulation der COX2-, IL-8- und RANTES-Expression in stimulierten siPABP Zellen im Vergleich zu siLuc Zellen liefert einen Hinweis darauf, dass PABP auch in die Regulation

dieser Mediatoren involviert sein könnte. Um dies zu bestätigen müssen jedoch noch weitere Untersuchungen zur spezifischen Bindung von PABP an diese mRNAs sowie Reporter-Gen-Analysen erfolgen.

Die Vermutung, dass PABP spezifisch die iNOS-Expression reguliert, konnte durch UV-Crosslink-Experimente mit rekombinantem GST-PABP von S. Nowag und durch in der vorliegenden Arbeit durchgeführte Pull down-Analysen mit endogen exprimiertem PABP aus DLD-1 Zelllysaten untermauert werden. Es konnte eine Bindung von PABP sowohl an die 5'- als auch an die 3'UTR der humanen iNOS-mRNA gezeigt werden (**Abbildung 16 A + B**, S. 74). In der 5'UTR bindet PABP an eine Sequenz im Exon 2, welche eine hohe Sequenzidentität zur PABP-Bindesequenz in der 5'UTR der PABP mRNA aufweist. Nach der Deletion dieser Sequenz (**Abbildung 17C**, S. 75) erfolgte keine PABP-Bindung mehr an die 5'UTR der iNOS (**Abbildung 18**, S. 76). Und obwohl die 5'UTR der iNOS in Reporter-Gen-Analysen keine Wirkung auf die Expression des Reportergens zeigte, wurde die Reporter-Gen-Expression zytokinunabhängig sowohl durch die Mutation, als auch durch die Deletion der PABP-Bindestelle verringert (**Abbildung 19**, S. 78). Durch die zahlreichen Funktionen von PABP in der Translation [92, 97, 99] könnte dieser Effekt auf eine verringerte Translationsrate zurückgeführt werden. Jedoch zeigten Analysen der mRNA-Expression des Reportergens ebenfalls eine geringere Menge an mRNA in den Zellen, welche mit Konstrukten der mutierten PABP-Bindestelle transfiziert worden waren (**Abbildung 23**, S. 83). Dies legt den Schluss nahe, dass PABP über die Bindung in der 5'UTR der humanen iNOS mRNA eine spezifische Rolle in der mRNA-Stabilität inne hat. Es wurde bereits beschrieben, dass PABP unabhängig von eIF-4E an das 5'Cap von polyadenylierten mRNAs binden kann und diese vor dem *Decapping*-Enzym Dcp2 schützt und somit die Lebensdauer der mRNA verlängert [100]. Obwohl bei Khanna *et al.* keine Bindung an eine RNA-Sequenz vorliegt so wäre es denkbar, dass PABP in diesem Fall über die räumliche Nähe der Bindestelle im 5'UTR der iNOS mRNA zum 5'Cap durch seine Fähigkeit das 5'Cap und die RNA gleichzeitig zu binden die mRNA vor dem 5'-3'-Abbau schützt.

Die Bindung von PABP an die 3'UTR der humanen iNOS mRNA konnte von S. Nowag auf einen AU-reichen Bereich, und innerhalb des AU-reich Bereiches auf die Fragmente A und B eingeschränkt werden (**Abbildung 16 C + D**, S. 74). Im Fragment A liegt ebenfalls eine Sequenz, welche eine hohe Homologie zu der PABP-Bindesequenz in der PABP mRNA aufweist und im Fragment B befinden sich die ersten drei von insgesamt fünf AREs

(**Abbildung 15**, S. 72). Mutationen sowohl im Fragment A, als auch im Fragment B (**Abbildung 17**, S. 75) führten zur Aufhebung der Bindung von PABP an diese Bereiche. Dies deutet, wie auch schon die Bindung in der 5'UTR, auf einen spezifischen Effekt von PABP auf die iNOS-Expression hin.

Reporter-Gen-Analysen mit der 3'UTR der humanen iNOS und mit Konstrukten, welche Mutationen im Fragment A oder Fragment B enthielten, zeigten überraschende Ergebnisse. Die geringere Luciferaseaktivität in mit der 3'UTR transfizierten Zellen im Vergleich zu den Zellen, welche nur mit dem Reporterplasmid transfiziert wurden, wurde bereits in früheren Arbeiten gezeigt [67]. Sollte PABP die iNOS mRNA über die Bindung an Bereiche der 3'UTR stabilisieren, würde die Luciferaseaktivität in den Zellen, welche mit den Mutanten (mutA und mutB) transfiziert wurden, abnehmen im Vergleich zu den Zellen mit der Wildtyp 3'UTR. Die Ergebnisse zeigen allerdings eine erhöhte Luciferaseaktivität in Zellen mit dem mutA-Konstrukt und keine Veränderung mit dem mutB-Konstrukt im Vergleich zu den Zellen mit der Wildtyp 3'UTR (**Abbildung 20**, S. 79). Der Befund, dass die Luciferaseaktivität in den Zellen mit dem mutA-Konstrukt eine höhere Luciferaseaktivität aufweist als die Zellen mit der Wildtyp 3'UTR, obwohl die PABP-Bindestelle mutiert ist und somit keine Bindung von PABP mehr stattfindet, könnte bedeuten, dass die stabilisierende Wirkung anderer RNA-BP wie HuR einen stärkeren Effekt auf die iNOS-Expression, und somit auf die hier untersuchte Luciferaseaktivität, haben als die fehlende Bindung von PABP. Die AREs 1-3 in der iNOS 3'UTR werden außer von PABP auch von AUF1 gebunden, was die Stabilität der mRNA verringert [70]. Die unveränderte Luciferaseaktivität in den Zellen mit dem mutB-Konstrukt könnte damit erklärt werden, dass der stabilisierende Einfluss von PABP und der destabilisierende Effekt von AUF1 sich gegenseitig aufheben und es somit zu keiner veränderten Luciferaseaktivität kommt.

Natürlicherweise kommen die 5'- und die 3'UTR aber nicht voneinander getrennt vor. Eine weitere Erklärung für die unerwarteten Ergebnisse aus **Abbildung 20** könnte also das Fehlen der 5'UTR sein. Daher wurden Reporterplasmide generiert, welche sowohl die 5'- als auch die 3'UTR der humanen iNOS enthalten. Zusätzlich wurde auch das erste Intron in der 5'UTR verwendet, damit bei qRT-PCR-Analysen die mRNA von der transfizierten DNA unterschieden werden konnte. Reporter-Gen-Analysen mit zwei verschiedenen Reporterplasmiden (pGl3control und pcDNA4/TO) zeigten, wie erwartet, den destabilisierenden Effekt der 3'UTR und die Erhöhung der Luciferaseaktivität durch die Integration des Intron 1 in die

5'UTR. Auch in Kombination mit der Ex1In1Ex2-Sequenz der 5'UTR zeigt die 3'UTR eine Verringerung der Luciferaseaktivität (**Abbildung 21**, S. 80). Aus diesen Experimenten geht hervor, dass die Reporterplasmide sich wie erwartet verhalten und für die Analyse der Mutationen in den PABP-Bindestellen in Kombination mit der Ex1In1Ex2-Sequenz geeignet sind.

Die Transfektion von DLD-1 Zellen mit dem Konstrukt **Ex1In1Ex2wt-3'UTRmutA** zeigte wieder eine höhere Luciferaseaktivität in diesen Zellen als für die Zellen mit den Wildtyp-UTR, so dass hier zumindest kein dominanter stabilisierender Effekt der PABP-Bindestelle im Fragment A der iNOS 3'UTR vorliegt. Zellen, welche mit dem **Ex1In1Ex2mutPABP-3'UTRmutA**-Konstrukt transfiziert wurden, zeigten hingegen eine geringere Luciferaseaktivität als Zellen mit den Wildtyp-UTR und auch als Zellen mit dem mutA-Konstrukt, jedoch eine etwas höhere Luciferaseaktivität als Zellen, welche nur mit dem Konstrukt mit einer singulären Mutation der PABP-Bindestelle in der 5'UTR transfiziert wurden (**Abbildung 22**, S. 81). Dies bedeutet, dass die Expressionsrate der Luciferase durch die fehlende Bindung von PABP an die 5'UTR massiv abnimmt, aber durch eine zusätzliche fehlende PABP-Bindung im Fragment A der 3'UTR wieder etwas zunimmt. Dieser Befund spricht dafür, dass die Bindung von PABP an die Stelle im Fragment A einen destabilisierenden Effekt auf die iNOS mRNA ausübt. Dies wird durch die mRNA-Daten aus **Abbildung 22** (S. 81) untermauert, da hier die mRNA-Menge nach der zusätzlichen Mutation der Bindestelle im Fragment A zunimmt. Im Umkehrschluss bedeutet es, dass die stabilisierende Wirkung von PABP in der 5'UTR durch eine destabilisierende Wirkung im Fragment A zumindest teilweise aufgehoben wird.

Reportergen-Analysen mit den mutierten AREs 1-3 (mutB) in Kombination mit der Wildtyp 5'UTR zeigten eine stark erhöhte Luciferaseaktivität im Vergleich zu dem Wildtyp-UTR-Konstrukt. Wohingegen die Doppelmutante (**Ex1In1Ex2mutPABP-3'UTRmutB**) zu einer viel geringeren Luciferaseaktivität führte als in den mit den Wildtyp-UTR transfizierten Zellen (**Abbildung 22**, S. 81). Die Regulation der iNOS-Expression durch PABP scheint ein komplexes Zusammenspiel von Stabilisierung und Destabilisierung zu sein. Wobei die singulären Mutationen der PABP-Bindestellen in der 3'UTR (mutA und mutB) nicht an der mRNA-Stabilität beteiligt zu sein scheinen, da die mRNA-Expression, in den mit diesen Konstrukten transfizierten Zellen, sich nicht veränderte (**Abbildung 23**, S. 83). Die PABP-Bindestelle in der 5'UTR scheint jedoch bei der Stabilisierung der mRNA eine wichtige Rolle

zu spielen, da sich die Mutation in dieser Bindestelle auch auf die mRNA-Expression auswirkt und nicht nur auf die Protein-Expression beschränkt ist (**Abbildung 23**, S. 83). Dieser Effekt wird allerdings durch die zusätzliche Mutation im Fragment A nicht nur aufgehoben, sondern die mRNA sogar noch weiter stabilisiert.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass PABP, durch seine spezifische Bindung an Bereiche der 5'- und der 3'UTR der humanen iNOS mRNA und die beobachteten Effekt auf die iNOS-Expression und die damit verbundene, geringere NO-Produktion in siPABP Zellen, maßgeblich an der posttranskriptionellen Regulation der iNOS-Expression beteiligt ist. Aus den Transfektionsexperimenten geht hervor, dass zumindest die separaten Bindestellen in der 3'UTR keinen Einfluss auf die mRNA-Stabilität ausüben, sondern eher an der Translationskontrolle beteiligt sind. Mutiert man hingegen die Bindestelle in der 5'UTR, so ist ein Effekt sowohl auf der mRNA- als auch auf der Proteinebene zu beobachten, was dafür spricht, dass diese PABP-Bindung eher für eine Stabilisierung der iNOS mRNA sorgt und somit auch mit den Ergebnissen aus den siPABP Zellen im Einklang steht.

Die PABP-Bindestelle im Fragment A der iNOS 3'UTR scheint eher eine destabilisierende Funktionen einzunehmen, aber nur in Kombination mit der PABP-Bindestelle in der 5'UTR. Die Mutation dieser Bindestelle alleine zeigt lediglich eine Erhöhung in der Luciferaseaktivität nicht aber in der mRNA-Menge, und nur in Kombination mit einer Mutation in der 5'UTR PABP-Bindestelle auch eine Erhöhung der mRNA-Expression.

Für die Bindestelle im Fragment B kann hier nur gesagt werden, dass die singuläre Mutation die Luciferaseaktivität erhöht, was auf die fehlende Bindung von AUF1 zurückgeführt werden könnte [70]. Allerdings stehen die mRNA-Daten aus **Abbildung 23** (S. 83) im Gegensatz dazu, da hier keine signifikante Erhöhung der mRNA-Menge beobachtet werden konnte wie von Pautz *et al.* postuliert. Auch hier scheint die PABP-Bindung in der 5'UTR, zumindest auf Proteinebene, eine dominantere Rolle zu spielen als die Bindung an die AREs 1-3, da die zusätzliche Mutation der Bindestelle in der 5'UTR zu einer signifikant geringeren Luciferaseaktivität führte im Vergleich zu den Wildtyp-UTR und auch im Vergleich zu der singulären Mutation im Fragment B (**Abbildung 22**, S. 81).

Der genaue Mechanismus wie PABP die Expression der humanen iNOS beeinflusst, muss noch geklärt werden. Fest steht, dass die hier diskutierten Befunde bisher einzigartig sind in der aktuellen Literatur und die Rollen von PABP bei der Regulation der Genexpression noch

lange nicht vollständig untersucht sind. Ein denkbarer Mechanismus könnte darin bestehen, dass die PABP-Bindestelle in der 5'UTR der humanen iNOS essentiell ist für eine Ringstruktur der mRNA unabhängig von eIF4e und eIF4G ist und auf diese Weise die Stabilität der iNOS mRNA auch nach der Initiation der Translation aufrecht erhalten werden kann. Eine weitere Möglichkeit wäre die Regulation der mRNA-Stabilität durch Inhibierung des NMD. Ivanov *et al.* konnten zeigen, dass PolyA-gebundenes PABP in der Lage ist den NMD zu inhibieren [108]. Da die iNOS mRNA einen, dem eigentlichen Transkriptionsstart vorgelagerten, offenen Leserahmen (μ ORF) aufweist, wäre die iNOS mRNA auch ein mögliches Substrat für den NMD [179]. Seit einiger Zeit wird dem NMD über seine natürliche Funktion hinaus auch eine regulatorische Funktion zugewiesen [180]. Wie diese jedoch aussieht und welche Rolle PABP dabei spielt muss noch geklärt werden.

5.2 Wirkung von Sekundärmetaboliten aus Pilzen auf proinflammatorische Mediatoren

Pilze schützen sich vor Fressfeinden und Bakterienbefall indem sie biologisch wirksame Sekundärmetabolite synthetisieren. Erkel *et al.* zeigten, dass die Substanzen Galiellalacton (Gal) und Oxacyclododecindion (Oxa) gezielt in pathophysiologische Signalwege eingreifen, indem sie die Bindung wichtiger Transkriptionsfaktoren an die DNA verhindern (siehe **1.4.3**) und so in der Lage sind die Expression proinflammatorischer Faktoren zu hemmen [139]. In dieser Arbeit wurden diese Sekundärmetabolite im Hinblick auf ihre antiinflammatorische Wirkung in der kollagen-induzierten Arthritis bei Mäusen untersucht. Hierfür wurden TCR-V β 12-tg Mäuse verwendet, welche die β -Kette eines T-Zellrezeptors aus einem arthritogenen T-Zellklon exprimieren und so viel anfälliger auf heterologes CII reagieren [172]. Nach einer Immunisierung mit heterologem CII in komplettem Freund'schen Adjuvans und zwei Folgeapplikationen entwickelten diese Mäuse eine massive Arthritis, deren Schwere über den Arthritisindex bestimmt wurde (**Abbildung 28**, S. 89). Des Weiteren wurden die Chemokine Mip-1 α und IP-10 (CXCL10) und die Zytokine TNF- α , IL-1 β , IL-6 und IFN- γ untersucht, da diese Mediatoren bei der systemischen Entzündung während der RA und der CIA eine große Rolle spielen. Mip-1 α wird von Makrophagen synthetisiert und spielt eine wesentliche Rolle bei der Aktivierung von Granulozyten und bei der Freisetzung von TNF- α und IL-1 aus Fibroblasten und Makrophagen. Eine erhöhte Mip-1 α -Expression wurde in der synovialen Flüssigkeit von RA-Patienten nachgewiesen wo es zur Entzündung des Gelenkes beitrug [181]. IP-10 (*IFN- γ induced protein 10*) wird von Monozyten, endothelialen Zellen und Fibroblasten nach einem Stimulus mit IFN- γ sekretiert und ist beteiligt an der Rekrutierung von Makrophagen und T-Zellen [182]. Außerdem wurde es in der synovialen Flüssigkeit und in der synovialen Membran von RA-Patienten beschrieben [183, 184]. TNF- α , IL-1 β , IL-6 und IFN- γ sind Hauptmediatoren in der Pathogenese der RA und nehmen wichtige Schlüsselpositionen in der Entstehung und Aufrechterhaltung der entzündlichen und destruktiven Prozesse im Gelenk ein [123-126]. Zusätzlich wurden Marker untersucht, welche den Grad der Zerstörung von Knorpel und Knochen anzeigen. RANK und RANKL spielen eine wichtige Rolle im Knochenstoffwechsel. RANK wird an der Oberfläche von Osteoklasten-Vorläuferzellen exprimiert und induziert nach der Bindung seines Liganden (RANKL) die Differenzierung zu Osteoklasten, welche dann Knochen und Knorpel abbauen.

In gesunden Organismen sind der Knochenaufbau und –abbau im Gleichgewicht. Bei RA-Patienten wird RANKL vermehrt exprimiert, sodass das Gleichgewicht zugunsten der Osteoklasten verschoben ist und es somit zu vermehrtem Knochen- und Knorpelabbau kommt, aber der Knorpel- und Knochenaufbau unterdrückt wird [185]. Die Tartrat resistente alkalische Phosphatase (TRAP) kommt nur in ausdifferenzierten Osteoklasten vor und dient als Marker für die Osteoklastenbildung. Matrixmetalloproteasen (MMP) gehören zu den Hauptenzymen, welche den Knochen- und Knorpelabbau bewerkstelligen. Sie sind in den Gelenken von RA-Patienten ebenfalls stark erhöht [186]. Des Weiteren wurde das kalziumbindende Protein S100A8 untersucht, welches ebenfalls in entzündliche Prozesse involviert ist indem es nach einer Stimulation durch Zytokine weitere Immunzellen in die Gelenke von RA-Patienten rekrutiert und somit die Entzündung noch weiter verstärkt [187, 188]. Für seine Funktionen bildet S100A8 mit S100A9 ein Heterodimer aus. Dieses Heterodimer wurde bereits in Seren von RA-Patienten nachgewiesen und wird als möglicher Biomarker diskutiert, da die Menge an S100A8/A9 mit der Krankheitsaktivität korreliert [189].

5.2.1 Wirkung von Gallielalacton (Gal) im LPS-induzierten Entzündungsmodell und in der kollagen-induzierten Arthritis (CIA)

Bevor die Wirkung von Galiellalacton (Gal) in einem aufwendigen CIA-Versuch untersucht werden konnten, wurde dessen antiinflammatorisches Potential im LPS-induzierten Entzündungsmodell an einer kleinen Versuchsgruppe untersucht. Gal erwies sich bereits in Zellkulturexperimenten und in einem Mausmodell für allergisches Asthma als eine wirksame Substanz zur Senkung der proinflammatorischen Genexpression über die Inhibierung der IL-6-induzierten Proteinexpression [141, 142] indem es die Bindung des Transkriptionsfaktors STAT3 an die DNA verhindert. Um den Applikationsrythmus für die Gal-Gabe herauszufinden wurde C57BL/6-Mäusen 10 µg/g Gal in PBS/EtOH 2, 24 und 48 h vor der LPS-Applikation IP verabreicht. Es wurde die mRNA-Expression in den PBMCs und in der Milz untersucht. Die untersuchten proinflammatorischen Gene TNF- α , IL-1 β , iNOS und S100A8 waren in allen LPS-behandelten Tieren induziert. Gal zeigte bei der Vorbehandlung für 24 h die größte Wirkung und senkte die Expression von TNF- α und IL-1 β sogar stärker als die Positivkontrolle Dex (**Abbildung 25**, S. 86). Auch nach 2 und 48 h wurde eine Wirkung von Gal auf die untersuchten Gene beobachtet, jedoch war die Wirkung nach 24 h am

überzeugendsten, so dass für den CIA-Versuch ein Applikationsrythmus von 24 h gewählt wurde.

Die Behandlung der CII-immunisierten Mäuse mit Gal begann am Tag 21 nach der Immunisierung. An den Tagen 25, 29 und 33 nach der Immunisierung wurden den Mäusen die Organe entnommen, um den Krankheitsverlauf untersuchen zu können. Der Arthritisindex wurde jeden zweiten Tag nach Behandlungsbeginn dokumentiert. Der Arthritisindex von Gal-behandelten Mäusen zeigte keinen Unterschied zu den kranken CII-Tieren im Gegensatz zum Arthritisindex der Dex-behandelten Kontrollgruppe. Bei den Dex-behandelten Tieren war sofort nach Behandlungsbeginn eine signifikante Verbesserung im Schwellungszustand der Pfoten erkennbar (**Abbildung 29**, S. 90). Leider konnte auch in den PBMCs keine Wirkung von Gal beobachtet werden (**Abbildung 30**, S. 91). Die Untersuchung der Inflammations- und Destruktionsmarker in den Pfoten zeigten eine hemmende Wirkung von Gal auf die untersuchten Markernur an Tag 25, nicht aber an den Tagen 29 und 33. Die vermeintlich positive Wirkung von Gal an Tag 25 könnte damit erklärt werden, dass die Gruppe der Gal-behandelten Tiere, welchen an Tag 25 die Organe entnommen wurden, insgesamt nicht gut auf die Immunisierung durch das CII angesprochen hat und somit unabhängig von der Gal-Behandlung bereits weniger Krankheitssymptome zeigte. Es ist überraschend, dass Gal die allgemeinen Inflammationsmarker S100A8, TNF- α , IL-1 β und besonders IL-6 im CIA-Modell nicht senken konnte, obwohl eine Wirkung im LPS-Modell (**Abbildung 25**, S. 86) und auch in Zellkulturexperimenten nachgewiesen werden konnte [190]. Eine mögliche Erklärung könnte der Zeitpunkt der Applikation sein. Sowohl in den Zellkulturexperimenten als auch im LPS-Modell wurde Gal vor der Induktion der Entzündungsreaktion verabreicht. Es könnte sein, dass Gal zwar präventiv die Induktion proinflammatorischer Gene durch die Inhibierung von STAT3 verhindern kann, jedoch nicht in der Lage ist bereits induzierte Zytokine und Chemokine zu senken.

Hausding *et al.* konnten eine Wirkung von Gal in einem Mausmodell für allergisches Asthma nachweisen [142]. Auch hier wurde Gal entweder vor oder gleichzeitig mit dem Allergen gegeben, sodass eine präventive Wirkung von Gal plausibel scheint. Des Weiteren spielen beim allergischen Asthma eher T_H2-Zytokine wie IL-4 und IL-10 eine entscheidende Rolle bei der Pathogenese, wohingegen in der RA und der CIA eher T_H1- und T_H17-Zytokine maßgeblich in die Pathogenese involviert sind. Dies könnte eine weitere Erklärung für die mangelnde Wirkung von Gal in der CIA sein. Und obwohl Gal sowohl *in vitro* als auch *in*

in vivo starke antiinflammatorische Wirkungen gezeigt hat, ist es für die Behandlung der CIA und somit für die Behandlung der humanen RA ungeeignet.

5.2.2 Wirkung von Oxacyclododecindion (Oxa) im LPS-induzierten Entzündungsmodell und in der kollagen-induzierten Arthritis (CIA)

Auch die antiinflammatorische Wirkung von Oxacyclododecindion (Oxa) wurde zunächst am LPS-induzierten Entzündungsmodell getestet, bevor der CIA-Versuch durchgeführt wurde. Hierfür wurde Oxa einmal in PBS/EtOH und einmal in nativem Olivenöl gelöst, um zu untersuchen, ob die bessere Löslichkeit von Oxa in Öl einen Einfluss auf die Wirksamkeit von Oxa zeigt. Dieser Versuch zeigte, dass in Öl gelöstes Oxa die untersuchten Faktoren S100A8, IL-1 β , TNF- α und iNOS in den PBMCs, der Leber und der Milz senken konnte, wohingegen Oxa in PBS gelöst nur die Expression von S100A8 in den PBMCs und die Expression der iNOS und von TNF- α in der Milz senkte (**Abbildung 27**, S. 88). Im CIA-Versuch mit Oxa in Öl gelöst war jedoch kein Unterschied der Arthritisindizes zwischen CII- und Oxa-behandelten Tieren zu erkennen (**Abbildung 32**, S. 94). Zudem war die Expression von S100A8 und TNF- α in den PBMCs nicht induziert und von Oxa auch nicht herabreguliert. Ein Vergleich von PBS-immunisierten, Öl-behandelten Mäusen mit PBS-immunisierten, PBS/EtOH-behandelten Mäusen zeigte, dass die Öl-behandelten Mäuse eine starke Expression von S100A8 und TNF- α zeigten, was darauf schließen lässt, dass die Applikation von Öl alleine die proinflammatorischen Faktoren heraufreguliert (**Abbildung 34**, S. 95).

Im CIA-Versuch mit in PBS gelöstem Oxa zeigte der mittlere Arthritisindex einen vielversprechenden Verlauf. Die Indizes von Oxa-behandelten Mäusen waren ab Tag 30 nach der Immunisierung im Mittel tendenziell geringer als die Indizes PBS-behandelter Mäuse (**Abbildung 35**, S.96). Dies legte den Schluss nahe, dass Oxa in der Lage ist die Schwellung der Pfoten zu reduzieren. Die Analyse der mRNA-Expression in den PBMCs und in der Milz zeigte jedoch keine Veränderung der Expression proinflammatorischer Faktoren zwischen PBS- und Oxa-behandelten Tieren (**Abbildung 36**, S 97). Auch die Untersuchungen der Inflammations- und Destruktionsmarker in den Pfoten zeigte keine Wirkung von Oxa auf deren Expression. Es hat die Expression von IL-1 β , IL-6 und RANKL tendenziell sogar noch erhöht (**Abbildung 37**, S. 98). Die Untersuchung der Wirksamkeit von Oxa *in vivo* fand erstmals in dieser Arbeit statt, sodass keine geeignete Diskussionsgrundlage in der Literatur für die Wirkung von Oxa in Tiermodellen existiert. Aus den hier gewonnenen Ergebnissen

lässt sich nur sagen, dass Oxa nicht für die Behandlung der CIA geeignet ist, obwohl die Untersuchungen in Zellkulturexperimenten vielversprechend sind. Ein möglicher Grund für die mangelnde Wirkung von Oxa könnte in der Verfügbarkeit der Substanz liegen. Oder Oxa könnte, wie schon für Gal diskutiert, nur präventiv eine Wirkung auf die proinflammatorische Genexpression haben, da auch hier Zellkulturexperimente zeigten, dass Oxa die Bindung von Transkriptionsfaktoren wie STAT6, SMAD2/3 und NF- κ B an die DNA blockiert [139, 191]. Ein weiteres Indiz für die mangelnde Wirkung von Oxa könnte auch in der T-Zellantwort liegen. Oxa wurde als antiinflammatorische Substanz identifiziert, indem es die IL-4 abhängige Signaltransduktion inhibierte [191]. Jedoch zählt IL-4 zu den T_H2-Zytokinen, so dass die Wirkung von Oxa für den Verlauf der CIA irrelevant ist.

5.2.3 Wirkung von S-Curvularin (SC) in der kollagen-induzierten Arthritis (CIA)

Die antiinflammatorische Wirkung von S-Curvularin (SC) im Modell der LPS-induzierten Entzündung bei Mäusen und im Mausmodell der kollagen-induzierten Arthritis (CIA) wurde bereits von Dr. N. Schmidt untersucht [140]. Sie konnte zeigen, dass SC wirkungsvoll die Schwellung der Pfoten reduzieren kann und die Expression allgemeiner Entzündungsmarker wie TNF- α und IL-1 β sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene hemmen kann [140]. Ein Ziel dieser Arbeit war es die Wirkung von SC auf die Knochen- und Knorpeldestruktionsmarker weiter zu bestimmen und neue, differenziell regulierte microRNAs und die Wirkung von SC auf diese zu untersuchen.

Die Reduzierung der Schwellung der Pfoten CII-immunisierter Tiere hat schon angezeigt, dass SC die Entzündung im Gelenk vermindern kann. Die Analyse der mRNA-Expression von RANK, seinem Liganden RANKL, der TRAP, von MMP3 und CtsK (KatepsinK) zeigte, dass SC auch wirksam die Differenzierung von Osteoklasten verhindern kann und vermutlich auf diesem Weg die Schwellung der Pfoten reduziert. Zwar setzte die Wirkung von SC erst langsam ein, so dass an den Tagen 25 und 29, nur eine tendenzielle Wirkung von SC zu beobachten war, jedoch war am Ende des Versuche die Wirkung von SC sogar höher als die von der Positivkontrolle Dex (**Abbildung 38**, S. 100). Unerwarteter Weise wurde die Expression von IFN- γ an Tag 25 sowohl von Dex als auch von SC stark erhöht. Dieser Befund steht im Gegensatz zu den Ergebnissen von Dr. N. Schmidt, welche eine Senkung der IFN- γ -Expression durch SC beobachtet hat. Jedoch ist die IFN- γ -Expression der CII-

immunisierten Tiere im Vergleich zu den PBS-immunisierten Tieren nicht erhöht, wie von Dr. N. Schmidt beschrieben. IFN- γ scheint eine bivalente Rolle in der CIA zu spielen. Jacob *et al.* konnten zeigen, dass IFN- γ in frühen Stadien die Schwere der Arthritis erhöht, in späteren Stadien hat IFN- γ eher einen protektiven Effekt auf den Krankheitsverlauf [192]. Im vorliegenden Fall könnte es bedeuten, dass IFN- γ bereits eine protektive Rolle spielt und durch Dex und SC weiter erhöht wird und auf diese Weise zur Verbesserung der Symptomatik beiträgt.

5.2.4 microRNAs im Modell der kollagen-induzierten Arthritis (CIA)

In den letzten Jahren wurden immer mehr microRNAs identifiziert, welche eine entscheidende Rolle in der Pathogenese zahlreicher Erkrankungen spielen [159, 193]. Ihre genauen Funktionen und die Ermittlung von Ziel-mRNAs sind derzeit Gegenstand der Forschung. Auch wenn die Rolle der microRNAs im Krankheitsgeschehen vieler Krankheiten noch ungeklärt ist, so eignen sich zirkulierende microRNAs als Biomarker für eine frühe Diagnose oder für eine Einschätzung des Krankheitsverlaufes [194].

Ein Ziel dieser Arbeit war es neue microRNAs für den Verlauf der kollagen-induzierten Arthritis (CIA) zu identifizieren und näher zu charakterisieren. Dazu wurden PCR-Array-Analysen mit Primern für verschiedene microRNAs verwendet, wobei die microRNAs im Bezug zu Entzündungen oder Autoimmunerkrankungen stehen. Es wurde die miR-Expression in Pfoten von gesunden PBS-Tieren mit der von CII-immunisierten Tieren verglichen. Die in **Abbildung 39** (S. 101) dargestellten microRNAs wurden in CII-Tieren differenziell reguliert. Es wurden die miR-16 und die miR-182 ausgewählt, um zum einen die Ergebnisse aus den PCR-Array-Analysen zu verifizieren und zum anderen um diese microRNAs näher zu untersuchen. Die miR-16 wurde bereits in der Pathogenese der RA beschrieben, und da die Funktion der miR-16 noch weitgehend unklar ist, sollte sie in dieser Arbeit weiter untersucht werden. Da sie sowohl im Blutplasma, als auch in der Synovialflüssigkeit und in PBMCs von RA-Patienten nachgewiesen werden konnte und mit der Schwere des Krankheitsverlaufes korreliert, wird sie als möglicher Biomarker für RA-Patienten diskutiert [159, 195]. Leider bestätigten sich die Ergebnisse aus den PCR-Arrays nicht und stehen im Gegensatz zu der Literatur. Weitere Untersuchungen der miR-16 in den Pfoten CII-immunisierter Tiere zeigten keine Heraufregulation der microRNA im Vergleich zu PBS-immunisierten Tieren. Wohingegen eine signifikant höhere Expression der miR-16 in

SC-behandelten Tieren beobachtet wurde (**Abbildung 40**, S. 102). Dieser Befund ist derzeit nicht erklärbar. Man könnte vielleicht vermuten, dass die Erhöhung der miR-16-Expression durch SC das Krankheitsgeschehen positiv beeinflussen könnte.

In den PCR-Array-Analysen wurde miR-182 als einzige microRNA detektiert, welche in CII-immunisierten Tieren geringer exprimiert wurde als in PBS-immunisierten Tieren. Dieses Ergebnis bestätigte sich in weiteren Analysen mit PBS- und CII-Tieren. Durch die Behandlung mit SC wurde die Expression der miR-182 wieder auf das gleiche Niveau gebracht wie in gesunden PBS-Tieren (**Abbildung 40**, S. 102). Die hier durchgeführten Untersuchungen legen den Schluss nahe, dass die miR-182 hemmend auf die CIA wirken könnte und deshalb in CII-immunisierten Tieren herabreguliert wird. Stittrich *et al.* konnten zeigen, dass die miR-182 die klonale Expansion von T-Helfer Zellen durch Inhibierung des Transkriptionsfaktors FoxO1 massiv begünstigt. Jedoch starben die Zellen durch die Aufrechterhaltung der Expression der miR-182 nach deren Differenzierung [196]. Die in dieser Arbeit beobachtete positive Wirkung der miR-182 könnte von der Eliminierung ausdifferenzierter T-Helfer Zellen rühren. Auf der anderen Seite wurde die miR-182 als negativer Regulator der Osteoblastendifferenzierung beschrieben. Durch die Inhibierung von FoxO1 verhindert die miR-182 die Osteogenese [197]. Dadurch, dass SC die Expression der miR-182 erhöht wäre ein negativer Effekt von SC auf die Knochenbildung möglich.

Als dritte microRNA wurde die miR-34a untersucht. Zellkulturexperimente mit stimulierten C28/I2-Zellen zeigten eine Herabregulation der miR-34a nach Zytokinstimulation und eine Erhöhung der miR-34a-Expression nach SC-Behandlung (bisher unveröffentlichte Daten der AG Erkel). Durch bioinformatische Methoden wurde das Chemokin IP10 (CXCL10) als mögliche Zielstruktur der miR-34a identifiziert und durch Reporter-gen-Analysen bestätigt. Dr. N. Schmidt konnte mittels Proteom-profile-Analysen zeigen, dass das Chemokin IP10 in CII-immunisierten Tieren hoch exprimiert wurde und durch SC wieder herabreguliert wurde [140]. Auch die mRNA-Expression von IP10 in den Pfoten CII-immunisierter Mäuse wurde durch SC wieder herabreguliert (**Abbildung 38**, S. 100). In dieser Arbeit wurde die Expression der miR-34a in Pfoten von CII-immunisierten Mäusen untersucht. Die Analysen bestätigen die Zellkulturexperimente. Die miR-34a wird in CII-immunisierten Tieren geringer exprimiert als in gesunden PBS-immunisierten Tieren und wird in SC-behandelten Tieren wieder heraufreguliert (**Abbildung 40**, S. 102). Durch die Heraufregulation der miR-34a durch SC und somit eine verringerte Expression von IP10 ist SC in der Lage die Rekrutierung

von weiteren Immunzellen in das entzündete Gelenk zu verhindern. Des Weiteren hat die miR-34a wichtige Rollen im Zellzyklus, in der Differenzierung und in der Apoptose [198] inne. Somit würde SC durch die Heraufregulation der miR-34a die eingewanderten Zellen im Gelenk durch Einleitung der Apoptose zerstören und zur Rückbildung des Panus beitragen oder die weitere Ausbildung verhindern. Auf der anderen Seite wurde die miR-34a als Suppressor der Knorpelneubildung beschrieben [199, 200], so dass eine Knorpeldegeneration durch langfristige SC-Behandlung nicht ausgeschlossen werden kann.

5.2.5 Regulation von microRNAs in murinen Makrophagen

MicroRNAs werden meistens zell- oder gewebsspezifisch exprimiert [158, 198]. Leider war es hier nicht möglich einzelne Zellpopulationen oder Gewebe aus den Pfoten der Mäuse zu isolieren, so dass für die weiteren Untersuchungen der microRNAs ein geeignetes Zellkulturmodell bestimmt werden sollte. Da Makrophagen eine entscheidende Rolle in der Pathogenese der RA einnehmen, wurden Zellkulturexperimente mit murinen Makrophagen (RAW-264.7) durchgeführt. Hierfür wurden die Zellen zunächst mit SC 1 h vorbehandelt und anschließend für 2 und 6 h mit einem Gemisch aus LPS und IFN- γ stimuliert. Leider konnte zu keinem Zeitpunkt eine differenzielle Regulation der untersuchten microRNAs in unstimulierten und stimulierten Zellen nachgewiesen werden (**Abbildung 41**, S. 103), sodass die Expression der microRNAs an anderen Zellarten weiter untersucht werden muss. Überraschenderweise wurde die Expression der miR-182 durch die Behandlung mit SC stark induziert (**Abbildung 41**, S. 103). Bisher ist nur wenig bekannt über die Regulation der miR-182. Stittrich *et al.* konnten bei ihren Untersuchungen die Expression der miR-182 durch IL-2 induzieren, wobei STAT-5 als wichtiger Transkriptionsfaktor für die miR-182 identifiziert wurde [196]. Für SC ist bisher nur bekannt, dass es die Phosphorylierung von JAK2 und STAT-1 α hemmt, aber nicht inwieweit es in andere Signalwege involviert ist. Dieser Befund könnte als Grundlage für weitere Untersuchungen des Wirkmechanismus von SC dienen.

6 Literatur

1. Dynan, W.S., et al., *Transcription factor Sp1 recognizes promoter sequences from the monkey genome that are simian virus 40 promoter*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1985. **82**(15): p. 4915-9.
2. McKnight, S. and R. Tjian, *Transcriptional selectivity of viral genes in mammalian cells*. Cell, 1986. **46**(6): p. 795-805.
3. Yaniv, K. and J.K. Yisraeli, *Defining cis-acting elements and trans-acting factors in RNA localization*. Int Rev Cytol, 2001. **203**: p. 521-39.
4. Newbury, S.F., O. Muhlemann, and G. Stoecklin, *Turnover in the Alps: an mRNA perspective*. Workshops on mechanisms and regulation of mRNA turnover. EMBO Rep, 2006. **7**(2): p. 143-8.
5. Saavedra, C., B. Felber, and E. Izaurralde, *The simian retrovirus-1 constitutive transport element, unlike the HIV-1 RRE, uses factors required for cellular mRNA export*. Curr Biol, 1997. **7**(9): p. 619-28.
6. Pasquinelli, A.E., et al., *The constitutive transport element (CTE) of Mason-Pfizer monkey virus (MPMV) accesses a cellular mRNA export pathway*. EMBO J, 1997. **16**(24): p. 7500-10.
7. Gruter, P., et al., *TAP, the human homolog of Mex67p, mediates CTE-dependent RNA export from the nucleus*. Mol Cell, 1998. **1**(5): p. 649-59.
8. Jang, B.C., et al., *Leptomycin B, an inhibitor of the nuclear export receptor CRM1, inhibits COX-2 expression*. J Biol Chem, 2003. **278**(5): p. 2773-6.
9. Kimura, T., et al., *CRM1-dependent, but not ARE-mediated, nuclear export of IFN-alpha mRNA*. J Cell Sci, 2004. **117**(Pt 11): p. 2259-70.
10. Browne, S.K., et al., *Differential IFN-gamma stimulation of HLA-A gene expression through CRM-1-dependent nuclear RNA export*. J Immunol, 2006. **177**(12): p. 8612-9.
11. Bollmann, F., et al., *Human inducible nitric oxide synthase (iNOS) expression depends on chromosome region maintenance 1 (CRM1)- and eukaryotic translation initiation factor 4E (eIF4E)-mediated nucleocytoplasmic mRNA transport*. Nitric Oxide, 2013.
12. Yamashita, A., et al., *Concerted action of poly(A) nucleases and decapping enzyme in mammalian mRNA turnover*. Nat Struct Mol Biol, 2005. **12**(12): p. 1054-63.
13. Fenger-Gron, M., et al., *Multiple processing body factors and the ARE binding protein TTP activate mRNA decapping*. Mol Cell, 2005. **20**(6): p. 905-15.
14. Wu, X. and G. Brewer, *The regulation of mRNA stability in mammalian cells: 2.0*. Gene, 2012. **500**(1): p. 10-21.
15. Casadio, A., et al., *A transient, neuron-wide form of CREB-mediated long-term facilitation can be stabilized at specific synapses by local protein synthesis*. Cell, 1999. **99**(2): p. 221-37.
16. Klann, E. and T.E. Dever, *Biochemical mechanisms for translational regulation in synaptic plasticity*. Nat Rev Neurosci, 2004. **5**(12): p. 931-42.
17. Gingras, A.C., B. Raught, and N. Sonenberg, *Regulation of translation initiation by FRAP/mTOR*. Genes Dev, 2001. **15**(7): p. 807-26.
18. Forstermann, U., et al., *Nitric oxide synthase isozymes. Characterization, purification, molecular cloning, and functions*. Hypertension, 1994. **23**(6 Pt 2): p. 1121-31.

19. Hevel, J.M., K.A. White, and M.A. Marletta, *Purification of the inducible murine macrophage nitric oxide synthase. Identification as a flavoprotein.* J Biol Chem, 1991. **266**(34): p. 22789-91.
20. Stuehr, D.J., et al., *Purification and characterization of the cytokine-induced macrophage nitric oxide synthase: an FAD- and FMN-containing flavoprotein.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1991. **88**(17): p. 7773-7.
21. Yui, Y., et al., *Purification of nitric oxide synthase from rat macrophages.* J Biol Chem, 1991. **266**(19): p. 12544-7.
22. Forstermann, U., et al., *Isoforms of nitric oxide synthase. Properties, cellular distribution and expressional control.* Biochem Pharmacol, 1995. **50**(9): p. 1321-32.
23. Choi, S.K., et al., *Occurrence of novel types of nitric oxide synthase in the silkworm, Bombyx mori.* Biochem Biophys Res Commun, 1995. **207**(1): p. 452-9.
24. Hausladen, A. and J.S. Stamler, *Nitric oxide in plant immunity.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(18): p. 10345-7.
25. Huang, P.L., et al., *Hypertension in mice lacking the gene for endothelial nitric oxide synthase.* Nature, 1995. **377**(6546): p. 239-42.
26. Forstermann, U., et al., *Isoforms of nitric oxide synthase: functions in the cardiovascular system.* Eur Heart J, 1993. **14 Suppl I**: p. 10-5.
27. Forstermann, U., J.S. Pollock, and M. Nakane, *Nitric oxide synthases in the cardiovascular system.* Trends Cardiovasc Med, 1993. **3**(3): p. 104-10.
28. Forstermann, U., J.P. Boissel, and H. Kleinert, *Expressional control of the 'constitutive' isoforms of nitric oxide synthase (NOS I and NOS III).* FASEB J, 1998. **12**(10): p. 773-90.
29. Boissel, J.P., et al., *Transcription of different exons 1 of the human neuronal nitric oxide synthase gene is dynamically regulated in a cell- and stimulus-specific manner.* Biol Chem, 2003. **384**(3): p. 351-62.
30. Chesler, D.A., J.A. McCutcheon, and C.S. Reiss, *Posttranscriptional regulation of neuronal nitric oxide synthase expression by IFN-gamma.* J Interferon Cytokine Res, 2004. **24**(2): p. 141-9.
31. Rife, T.K., et al., *The 5'2 promoter of the neuronal nitric oxide synthase dual promoter complex mediates inducibility by nerve growth factor.* Brain Res Mol Brain Res, 2000. **75**(2): p. 225-36.
32. Bogdan, C., *Nitric oxide and the immune response.* Nat Immunol, 2001. **2**(10): p. 907-16.
33. Kroncke, K.D., K. Fehsel, and V. Kolb-Bachofen, *Inducible nitric oxide synthase and its product nitric oxide, a small molecule with complex biological activities.* Biol Chem Hoppe Seyler, 1995. **376**(6): p. 327-43.
34. MacMicking, J., Q.W. Xie, and C. Nathan, *Nitric oxide and macrophage function.* Annu Rev Immunol, 1997. **15**: p. 323-50.
35. Kroncke, K.D., et al., *Nitric oxide destroys zinc-sulfur clusters inducing zinc release from metallothionein and inhibition of the zinc finger-type yeast transcription activator LAC9.* Biochem Biophys Res Commun, 1994. **200**(2): p. 1105-10.
36. Nathan, C.F. and J.B. Hibbs, Jr., *Role of nitric oxide synthesis in macrophage antimicrobial activity.* Curr Opin Immunol, 1991. **3**(1): p. 65-70.
37. Green, S.J., et al., *Cellular mechanisms of nonspecific immunity to intracellular infection: cytokine-induced synthesis of toxic nitrogen oxides from L-arginine by macrophages and hepatocytes.* Immunol Lett, 1990. **25**(1-3): p. 15-9.

38. Karupiah, G. and N. Harris, *Inhibition of viral replication by nitric oxide and its reversal by ferrous sulfate and tricarboxylic acid cycle metabolites*. J Exp Med, 1995. **181**(6): p. 2171-9.
39. Harris, N., R.M. Buller, and G. Karupiah, *Gamma interferon-induced, nitric oxide-mediated inhibition of vaccinia virus replication*. J Virol, 1995. **69**(2): p. 910-5.
40. Corbett, J.A. and M.L. McDaniel, *Does nitric oxide mediate autoimmune destruction of beta-cells? Possible therapeutic interventions in IDDM*. Diabetes, 1992. **41**(8): p. 897-903.
41. Kolb, H. and V. Kolb-Bachofen, *Type 1 (insulin-dependent) diabetes mellitus and nitric oxide*. Diabetologia, 1992. **35**(8): p. 796-7.
42. Kolb-Bachofen, V., *Intra-islet expression of inducible nitric oxide synthase and islet cell death*. Biochem Soc Trans, 1996. **24**(1): p. 233-4.
43. Kimura, H., et al., *Increased expression of an inducible isoform of nitric oxide synthase and the formation of peroxynitrite in colonic mucosa of patients with active ulcerative colitis*. Gut, 1998. **42**(2): p. 180-7.
44. Singer, II, et al., *Expression of inducible nitric oxide synthase and nitrotyrosine in colonic epithelium in inflammatory bowel disease*. Gastroenterology, 1996. **111**(4): p. 871-85.
45. Stichtenoth, D.O. and J.C. Frolich, *Nitric oxide and inflammatory joint diseases*. Br J Rheumatol, 1998. **37**(3): p. 246-57.
46. Bagasra, O., et al., *Activation of the inducible form of nitric oxide synthase in the brains of patients with multiple sclerosis*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1995. **92**(26): p. 12041-5.
47. De Groot, C.J., et al., *Immunocytochemical characterization of the expression of inducible and constitutive isoforms of nitric oxide synthase in demyelinating multiple sclerosis lesions*. J Neuropathol Exp Neurol, 1997. **56**(1): p. 10-20.
48. Mulligan, M.S., et al., *Tissue injury caused by deposition of immune complexes is L-arginine dependent*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1991. **88**(14): p. 6338-42.
49. MacMicking, J.D., et al., *Altered responses to bacterial infection and endotoxic shock in mice lacking inducible nitric oxide synthase*. Cell, 1995. **81**(4): p. 641-50.
50. Ambs, S., et al., *Frequent nitric oxide synthase-2 expression in human colon adenomas: implication for tumor angiogenesis and colon cancer progression*. Cancer Res, 1998. **58**(2): p. 334-41.
51. Duenas-Gonzalez, A., et al., *Expression of inducible nitric oxide synthase in breast cancer correlates with metastatic disease*. Mod Pathol, 1997. **10**(7): p. 645-9.
52. Bruch-Gerharz, D., et al., *Arginase 1 overexpression in psoriasis: limitation of inducible nitric oxide synthase activity as a molecular mechanism for keratinocyte hyperproliferation*. Am J Pathol, 2003. **162**(1): p. 203-11.
53. Mori, M. and T. Gotoh, *Regulation of nitric oxide production by arginine metabolic enzymes*. Biochem Biophys Res Commun, 2000. **275**(3): p. 715-9.
54. Muhl, H. and J. Pfeilschifter, *Tetrahydrobiopterin is a limiting factor of nitric oxide generation in interleukin 1 beta-stimulated rat glomerular mesangial cells*. Kidney Int, 1994. **46**(5): p. 1302-6.
55. Kleinert, H., et al., *Regulation of the expression of inducible nitric oxide synthase*. Eur J Pharmacol, 2004. **500**(1-3): p. 255-66.
56. Kleinert, H., P.M. Schwarz, and U. Forstermann, *Regulation of the expression of inducible nitric oxide synthase*. Biol Chem, 2003. **384**(10-11): p. 1343-64.

57. Kleinert, H., et al., *Cytokine induction of NO synthase II in human DLD-1 cells: roles of the JAK-STAT, AP-1 and NF-kappaB-signaling pathways*. Br J Pharmacol, 1998. **125**(1): p. 193-201.
58. Ganster, R.W., et al., *Complex regulation of human inducible nitric oxide synthase gene transcription by Stat 1 and NF-kappa B*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **98**(15): p. 8638-43.
59. Meraz, M.A., et al., *Targeted disruption of the Stat1 gene in mice reveals unexpected physiologic specificity in the JAK-STAT signaling pathway*. Cell, 1996. **84**(3): p. 431-42.
60. Nishiya, T., et al., *Activation of Stat1 and subsequent transcription of inducible nitric oxide synthase gene in C6 glioma cells is independent of interferon-gamma-induced MAPK activation that is mediated by p21ras*. FEBS Lett, 1997. **408**(1): p. 33-8.
61. Singh, A., et al., *Inducible nitric oxide synthase in vascular smooth muscle cells from prehypertensive spontaneously hypertensive rats*. Am J Hypertens, 1996. **9**(9): p. 867-77.
62. Ghosh, S., M.J. May, and E.B. Kopp, *NF-kappa B and Rel proteins: evolutionarily conserved mediators of immune responses*. Annu Rev Immunol, 1998. **16**: p. 225-60.
63. Kleinert, H., et al., *Estrogens increase transcription of the human endothelial NO synthase gene: analysis of the transcription factors involved*. Hypertension, 1998. **31**(2): p. 582-8.
64. Geller, D.A., et al., *Molecular cloning and expression of inducible nitric oxide synthase from human hepatocytes*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1993. **90**(8): p. 3491-3495.
65. Caput, D., et al., *Identification of a common nucleotide sequence in the 3'-untranslated region of mRNA molecules specifying inflammatory mediators*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1986. **83**(6): p. 1670-4.
66. Dean, J.L., et al., *The 3' untranslated region of tumor necrosis factor alpha mRNA is a target of the mRNA-stabilizing factor HuR*. Mol Cell Biol, 2001. **21**(3): p. 721-30.
67. Rodriguez-Pascual, F., et al., *Complex contribution of the 3'-untranslated region to the expressional regulation of the human inducible nitric-oxide synthase gene. Involvement of the RNA-binding protein HuR*. J Biol Chem, 2000. **275**(34): p. 26040-26049.
68. Linker, K., et al., *Involvement of KSRP in the post-transcriptional regulation of human iNOS expression-complex interplay of KSRP with TTP and HuR*. Nucleic Acids Res, 2005. **33**(15): p. 4813-27.
69. Brennan, C.M. and J.A. Steitz, *HuR and mRNA stability*. Cell Mol Life Sci, 2001. **58**(2): p. 266-77.
70. Pautz, A., et al., *Similar regulation of human inducible nitric-oxide synthase expression by different isoforms of the RNA-binding protein AUF1*. J Biol Chem, 2009. **284**(5): p. 2755-66.
71. Pautz, A., et al., *The polypyrimidine tract-binding protein (PTB) is involved in the post-transcriptional regulation of human inducible nitric oxide synthase expression*. J Biol Chem, 2006. **281**(43): p. 32294-302.
72. Forstermann, U., et al., *Expression and expressional control of nitric oxide synthases in various cell types*. Adv Pharmacol, 1995. **34**: p. 171-86.
73. Eberhardt, W., et al., *Molecular mechanisms of inducible nitric oxide synthase gene expression by IL-1beta and cAMP in rat mesangial cells*. J Immunol, 1998. **160**(10): p. 4961-9.

74. Koide, M., et al., *Cyclic AMP-elevating agents induce an inducible type of nitric oxide synthase in cultured vascular smooth muscle cells. Synergism with the induction elicited by inflammatory cytokines.* J Biol Chem, 1993. **268**(33): p. 24959-66.
75. Gilbert, R.S. and H.R. Herschman, *Transforming growth factor beta differentially modulates the inducible nitric oxide synthase gene in distinct cell types.* Biochem Biophys Res Commun, 1993. **195**(1): p. 380-4.
76. Kunz, D., et al., *Platelet-derived growth factor and fibroblast growth factor differentially regulate interleukin 1beta- and cAMP-induced nitric oxide synthase expression in rat renal mesangial cells.* J Clin Invest, 1997. **100**(11): p. 2800-9.
77. Hortelano, S., A.M. Genaro, and L. Bosca, *Phorbol esters induce nitric oxide synthase and increase arginine influx in cultured peritoneal macrophages.* FEBS Lett, 1993. **320**(2): p. 135-9.
78. Kleinert, H., et al., *In murine 3T3 fibroblasts, different second messenger pathways resulting in the induction of NO synthase II (iNOS) converge in the activation of transcription factor NF-kappaB.* J Biol Chem, 1996. **271**(11): p. 6039-44.
79. De Vera, M.E., et al., *Dexamethasone suppresses iNOS gene expression by upregulating I-kappa B alpha and inhibiting NF-kappa B.* Am J Physiol, 1997. **273**(6 Pt 1): p. G1290-6.
80. Kleinert, H., et al., *Glucocorticoids inhibit the induction of nitric oxide synthase II by down-regulating cytokine-induced activity of transcription factor nuclear factor-kappa B.* Mol Pharmacol, 1996. **49**(1): p. 15-21.
81. Kunz, D., et al., *Molecular mechanisms of dexamethasone inhibition of nitric oxide synthase expression in interleukin 1 beta-stimulated mesangial cells: evidence for the involvement of transcriptional and posttranscriptional regulation.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. **93**(1): p. 255-9.
82. Forstermann, U., et al., *Induced RAW 264.7 macrophages express soluble and particulate nitric oxide synthase: inhibition by transforming growth factor-beta.* Eur J Pharmacol, 1992. **225**(2): p. 161-5.
83. Schini, V.B., et al., *The induction of nitric oxide synthase activity is inhibited by TGF-beta 1, PDGFAB and PDGFBB in vascular smooth muscle cells.* Eur J Pharmacol, 1992. **216**(3): p. 379-83.
84. Roy, G., et al., *Paip1 interacts with poly(A) binding protein through two independent binding motifs.* Mol Cell Biol, 2002. **22**(11): p. 3769-82.
85. Gray, N.K., et al., *Multiple portions of poly(A)-binding protein stimulate translation in vivo.* EMBO J, 2000. **19**(17): p. 4723-33.
86. Blanco, P., et al., *A novel poly(A)-binding protein gene (PABPC5) maps to an X-specific subinterval in the Xq21.3/Yp11.2 homology block of the human sex chromosomes.* Genomics, 2001. **74**(1): p. 1-11.
87. Kuhn, U. and E. Wahle, *Structure and function of poly(A) binding proteins.* Biochim Biophys Acta, 2004. **1678**(2-3): p. 67-84.
88. Feral, C., G. Guellaen, and A. Pawlak, *Human testis expresses a specific poly(A)-binding protein.* Nucleic Acids Res, 2001. **29**(9): p. 1872-83.
89. Kleene, K.C., et al., *Developmental expression of poly(A) binding protein mRNAs during spermatogenesis in the mouse.* Molecular reproduction and development, 1994. **39**(4): p. 355-64.
90. Yang, H., C.S. Duckett, and T. Lindsten, *iPABP, an inducible poly(A)-binding protein detected in activated human T cells.* Molecular and cellular biology, 1995. **15**(12): p. 6770-6.

91. Cosson, B., et al., *Poly(A)-binding protein and eRF3 are associated in vivo in human and Xenopus cells*. Biol Cell, 2002. **94**(4-5): p. 205-16.
92. Gallie, D.R., *A tale of two termini: a functional interaction between the termini of an mRNA is a prerequisite for efficient translation initiation*. Gene, 1998. **216**(1): p. 1-11.
93. Wilkie, G.S., K.S. Dickson, and N.K. Gray, *Regulation of mRNA translation by 5'- and 3'-UTR-binding factors*. Trends Biochem Sci, 2003. **28**(4): p. 182-8.
94. Haghghat, A. and N. Sonenberg, *eIF4G dramatically enhances the binding of eIF4E to the mRNA 5'-cap structure*. J Biol Chem, 1997. **272**(35): p. 21677-80.
95. Le, H., et al., *Translation initiation factors eIF-iso4G and eIF-4B interact with the poly(A)-binding protein and increase its RNA binding activity*. J Biol Chem, 1997. **272**(26): p. 16247-55.
96. Tarun, S.Z., Jr. and A.B. Sachs, *A common function for mRNA 5' and 3' ends in translation initiation in yeast*. Genes Dev, 1995. **9**(23): p. 2997-3007.
97. Hoshino, S., et al., *The eukaryotic polypeptide chain releasing factor (eRF3/GSPT) carrying the translation termination signal to the 3'-Poly(A) tail of mRNA. Direct association of erf3/GSPT with polyadenylate-binding protein*. The Journal of biological chemistry, 1999. **274**(24): p. 16677-80.
98. Hershey, J.W., N. Sonenberg, and M.B. Mathews, *Principles of translational control: an overview*. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2012. **4**(12).
99. Uchida, N., et al., *A novel role of the mammalian GSPT/eRF3 associating with poly(A)-binding protein in Cap/Poly(A)-dependent translation*. J Biol Chem, 2002. **277**(52): p. 50286-92.
100. Khanna, R. and M. Kiledjian, *Poly(A)-binding-protein-mediated regulation of hDcp2 decapping in vitro*. The EMBO journal, 2004. **23**(9): p. 1968-76.
101. Korner, C.G. and E. Wahle, *Poly(A) tail shortening by a mammalian poly(A)-specific 3'-exoribonuclease*. J Biol Chem, 1997. **272**(16): p. 10448-56.
102. Uchida, N., S. Hoshino, and T. Katada, *Identification of a human cytoplasmic poly(A) nuclease complex stimulated by poly(A)-binding protein*. J Biol Chem, 2004. **279**(2): p. 1383-91.
103. Fabian, M.R., et al., *Mammalian miRNA RISC recruits CAF1 and PABP to affect PABP-dependent deadenylation*. Mol Cell, 2009. **35**(6): p. 868-80.
104. Sladic, R.T., et al., *Human PABP binds AU-rich RNA via RNA-binding domains 3 and 4*. European journal of biochemistry / FEBS, 2004. **271**(2): p. 450-7.
105. Nagaoka, K., et al., *Stability of casein mRNA is ensured by structural interactions between the 3'-untranslated region and poly(A) tail via the HuR and poly(A)-binding protein complex*. Biochimica et biophysica acta, 2006. **1759**(3-4): p. 132-40.
106. Ma, S., T. Musa, and J. Bag, *Reduced stability of mitogen-activated protein kinase kinase-2 mRNA and phosphorylation of poly(A)-binding protein (PABP) in cells overexpressing PABP*. J Biol Chem, 2006. **281**(6): p. 3145-56.
107. Vazquez-Pianzola, P., H. Urlaub, and B. Suter, *Pabp binds to the osk 3'UTR and specifically contributes to osk mRNA stability and oocyte accumulation*. Developmental biology, 2011. **357**(2): p. 404-18.
108. Ivanov, P.V., et al., *Interactions between UPF1, eRFs, PABP and the exon junction complex suggest an integrated model for mammalian NMD pathways*. The EMBO journal, 2008. **27**(5): p. 736-47.
109. Dizin, E., et al., *BRCA1 interacts with poly(A)-binding protein: implication of BRCA1 in translation regulation*. The Journal of biological chemistry, 2006. **281**(34): p. 24236-46.

110. Penalva, L.O., et al., *RNA-binding proteins to assess gene expression states of co-cultivated cells in response to tumor cells*. Mol Cancer, 2004. **3**: p. 24.
111. Berger, L.C., J. Bag, and B.H. Sells, *Translation of poly(A)-binding protein mRNA is regulated by growth conditions*. Biochem Cell Biol, 1992. **70**(9): p. 770-8.
112. Bag, J. and R.B. Bhattacharjee, *Multiple levels of post-transcriptional control of expression of the poly(A)-binding protein*. RNA Biol, 2010. **7**(1).
113. Hornstein, E., et al., *The expression of poly(A)-binding protein gene is translationally regulated in a growth-dependent fashion through a 5'-terminal oligopyrimidine tract motif*. The Journal of biological chemistry, 1999. **274**(3): p. 1708-14.
114. Wu, J. and J. Bag, *Negative control of the poly(A)-binding protein mRNA translation is mediated by the adenine-rich region of its 5'-untranslated region*. J Biol Chem, 1998. **273**(51): p. 34535-42.
115. Le, H., K.S. Browning, and D.R. Gallie, *The phosphorylation state of poly(A)-binding protein specifies its binding to poly(A) RNA and its interaction with eukaryotic initiation factor (eIF) 4F, eIFiso4F, and eIF4B*. J Biol Chem, 2000. **275**(23): p. 17452-62.
116. Sherer, Y. and Y. Shoenfeld, *Mechanisms of disease: atherosclerosis in autoimmune diseases*. Nat Clin Pract Rheumatol, 2006. **2**(2): p. 99-106.
117. Kitas, G.D. and S.E. Gabriel, *Cardiovascular disease in rheumatoid arthritis: state of the art and future perspectives*. Ann Rheum Dis, 2011. **70**(1): p. 8-14.
118. Winchester, R., *The molecular basis of susceptibility to rheumatoid arthritis*. Adv Immunol, 1994. **56**: p. 389-466.
119. Nishimura, K., et al., *Meta-analysis: diagnostic accuracy of anti-cyclic citrullinated peptide antibody and rheumatoid factor for rheumatoid arthritis*. Ann Intern Med, 2007. **146**(11): p. 797-808.
120. Voulgari, P.V. and A.A. Drosos, *Catastrophic rheumatoid arthritis*. J Rheumatol, 2008. **35**(10): p. 2062-3.
121. Voll, R.E. and J.R. Kalden, *Do we need new treatment that goes beyond tumor necrosis factor blockers for rheumatoid arthritis?* Ann N Y Acad Sci, 2005. **1051**: p. 799-810.
122. Afuwape, A.O., S. Kiriakidis, and E.M. Paleolog, *The role of the angiogenic molecule VEGF in the pathogenesis of rheumatoid arthritis*. Histol Histopathol, 2002. **17**(3): p. 961-72.
123. Elenkov, I.J. and G.P. Chrousos, *Stress hormones, proinflammatory and antiinflammatory cytokines, and autoimmunity*. Ann N Y Acad Sci, 2002. **966**: p. 290-303.
124. Firestein, G.S., *Evolving concepts of rheumatoid arthritis*. Nature, 2003. **423**(6937): p. 356-61.
125. LaDuca, J.R. and A.A. Gaspari, *Targeting tumor necrosis factor alpha. New drugs used to modulate inflammatory diseases*. Dermatol Clin, 2001. **19**(4): p. 617-35.
126. Smolen, J.S. and G. Steiner, *Therapeutic strategies for rheumatoid arthritis*. Nat Rev Drug Discov, 2003. **2**(6): p. 473-88.
127. Korb, A., et al., *Differential tissue expression and activation of p38 MAPK alpha, beta, gamma, and delta isoforms in rheumatoid arthritis*. Arthritis Rheum, 2006. **54**(9): p. 2745-56.
128. van der Heijde, D.M., *Joint erosions and patients with early rheumatoid arthritis*. Br J Rheumatol, 1995. **34 Suppl 2**: p. 74-8.

129. Visser, H., et al., *How to diagnose rheumatoid arthritis early: a prediction model for persistent (erosive) arthritis*. *Arthritis Rheum*, 2002. **46**(2): p. 357-65.
130. Gravallese, E.M., et al., *Identification of cell types responsible for bone resorption in rheumatoid arthritis and juvenile rheumatoid arthritis*. *Am J Pathol*, 1998. **152**(4): p. 943-51.
131. Schett, G. and S.L. Teitelbaum, *Osteoclasts and Arthritis*. *J Bone Miner Res*, 2009. **24**(7): p. 1142-1146.
132. Raisz, L.G., *Physiology and pathophysiology of bone remodeling*. *Clin Chem*, 1999. **45**(8 Pt 2): p. 1353-8.
133. Diarra, D., et al., *Dickkopf-1 is a master regulator of joint remodeling*. *Nat Med*, 2007. **13**(2): p. 156-63.
134. Barnes, P.J. and I.M. Adcock, *How do corticosteroids work in asthma?* *Ann Intern Med*, 2003. **139**(5 Pt 1): p. 359-70.
135. Leung, D.Y. and J.W. Bloom, *Update on glucocorticoid action and resistance*. *J Allergy Clin Immunol*, 2003. **111**(1): p. 3-22; quiz 23.
136. Kremer, J.M., et al., *Concomitant leflunomide therapy in patients with active rheumatoid arthritis despite stable doses of methotrexate. A randomized, double-blind, placebo-controlled trial*. *Ann Intern Med*, 2002. **137**(9): p. 726-33.
137. Zachariae, H., *Renal toxicity of long-term cyclosporin*. *Scand J Rheumatol*, 1999. **28**(2): p. 65-8.
138. Curtis, J.R. and J.A. Singh, *Use of biologics in rheumatoid arthritis: current and emerging paradigms of care*. *Clin Ther*, 2011. **33**(6): p. 679-707.
139. Rudolph, K., A. Serwe, and G. Erkel, *Inhibition of TGF-beta signaling by the fungal lactones (S)-curvularin, dehydrocurvularin, oxacyclododecindione and galiellalactone*. *Cytokine*, 2013. **61**(1): p. 285-96.
140. Schmidt, N., et al., *The anti-inflammatory fungal compound (S)-curvularin reduces proinflammatory gene expression in an in vivo model of rheumatoid arthritis*. *J Pharmacol Exp Ther*, 2012. **343**(1): p. 106-14.
141. Weidler, M., et al., *Inhibition of interleukin-6 signaling and Stat3 activation by a new class of bioactive cyclopentenone derivatives*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2000. **276**(2): p. 447-53.
142. Hausding, M., et al., *Induction of tolerogenic lung CD4+ T cells by local treatment with a pSTAT-3 and pSTAT-5 inhibitor ameliorated experimental allergic asthma*. *Int Immunol*, 2011. **23**(1): p. 1-15.
143. Ambros, V., *The functions of animal microRNAs*. *Nature*, 2004. **431**(7006): p. 350-5.
144. Bartel, D.P., *MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function*. *Cell*, 2004. **116**(2): p. 281-97.
145. Lee, Y., et al., *MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II*. *EMBO J*, 2004. **23**(20): p. 4051-60.
146. Borchert, G.M., W. Lanier, and B.L. Davidson, *RNA polymerase III transcribes human microRNAs*. *Nat Struct Mol Biol*, 2006. **13**(12): p. 1097-101.
147. Han, J., et al., *The Drosha-DGCR8 complex in primary microRNA processing*. *Genes Dev*, 2004. **18**(24): p. 3016-27.
148. Han, J., et al., *Molecular basis for the recognition of primary microRNAs by the Drosha-DGCR8 complex*. *Cell*, 2006. **125**(5): p. 887-901.
149. Lund, E., et al., *Nuclear export of microRNA precursors*. *Science*, 2004. **303**(5654): p. 95-8.

150. Kawamata, T., H. Seitz, and Y. Tomari, *Structural determinants of miRNAs for RISC loading and slicer-independent unwinding*. Nat Struct Mol Biol, 2009. **16**(9): p. 953-60.
151. Landthaler, M., et al., *Molecular characterization of human Argonaute-containing ribonucleoprotein complexes and their bound target mRNAs*. RNA, 2008. **14**(12): p. 2580-96.
152. Takeda, A., et al., *The mechanism selecting the guide strand from small RNA duplexes is different among argonaute proteins*. Plant Cell Physiol, 2008. **49**(4): p. 493-500.
153. Niederer, F., et al., *Downregulation of microRNA-34a* in rheumatoid arthritis synovial fibroblasts promotes apoptosis resistance*. Arthritis & Rheumatism, 2011: p. n/a-n/a.
154. Lytle, J.R., T.A. Yario, and J.A. Steitz, *Target mRNAs are repressed as efficiently by microRNA-binding sites in the 5' UTR as in the 3' UTR*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. **104**(23): p. 9667-72.
155. Gu, S., et al., *Biological basis for restriction of microRNA targets to the 3' untranslated region in mammalian mRNAs*. Nat Struct Mol Biol, 2009. **16**(2): p. 144-50.
156. Liu, J., et al., *MicroRNA-dependent localization of targeted mRNAs to mammalian P-bodies*. Nat Cell Biol, 2005. **7**(7): p. 719-23.
157. Valencia-Sanchez, M.A., et al., *Control of translation and mRNA degradation by miRNAs and siRNAs*. Genes Dev, 2006. **20**(5): p. 515-24.
158. Duroux-Richard, I., C. Jorgensen, and F. Apparailly, *What do microRNAs mean for rheumatoid arthritis?* Arthritis & Rheumatism, 2012. **64**(1): p. 11-20.
159. Pauley, K.M., et al., *Upregulated miR-146a expression in peripheral blood mononuclear cells from rheumatoid arthritis patients*. Arthritis Res Ther, 2008. **10**(4): p. R101.
160. Trentham, D.E., *Collagen arthritis as a relevant model for rheumatoid arthritis*. Arthritis Rheum, 1982. **25**(8): p. 911-6.
161. Cremer, M.A., E.F. Rosloniec, and A.H. Kang, *The cartilage collagens: a review of their structure, organization, and role in the pathogenesis of experimental arthritis in animals and in human rheumatic disease*. J Mol Med (Berl), 1998. **76**(3-4): p. 275-88.
162. Courtenay, J.S., et al., *Immunisation against heterologous type II collagen induces arthritis in mice*. Nature, 1980. **283**(5748): p. 666-8.
163. Wooley, P.H., et al., *Type II collagen-induced arthritis in mice. I. Major histocompatibility complex (I region) linkage and antibody correlates*. J Exp Med, 1981. **154**(3): p. 688-700.
164. Stuart, J.M., A.S. Townes, and A.H. Kang, *Type II collagen-induced arthritis*. Ann N Y Acad Sci, 1985. **460**: p. 355-62.
165. Bradford, M.M., *A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding*. Anal Biochem, 1976. **72**: p. 248-54.
166. Wessel, D. and U.I. Flugge, *A method for the quantitative recovery of protein in dilute solution in the presence of detergents and lipids*. Anal Biochem, 1984. **138**(1): p. 141-3.
167. Laemmli, U.K., *Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4*. Nature, 1970. **227**: p. 680-685.

168. Chomczynski, P. and N. Sacchi, *Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction*. Anal Biochem, 1987. **162**(1): p. 156-159.
169. Livak, K.J. and T.D. Schmittgen, *Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method*. Methods, 2001. **25**(4): p. 402-8.
170. Grosset, C., et al., *A mechanism for translationally coupled mRNA turnover: interaction between the poly(A) tail and a c-fos RNA coding determinant via a protein complex*. Cell, 2000. **103**(1): p. 29-40.
171. Birnboim, H.C. and J. Doly, *A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA*. Nucleic Acids Res, 1979. **7**(6): p. 1513-23.
172. Mori, L., et al., *Expression of a transgenic T cell receptor beta chain enhances collagen-induced arthritis*. J Exp Med, 1992. **176**(2): p. 381-8.
173. Gorgoni, B. and N.K. Gray, *The roles of cytoplasmic poly(A)-binding proteins in regulating gene expression: a developmental perspective*. Brief Funct Genomic Proteomic, 2004. **3**(2): p. 125-41.
174. Le Hir, H., A. Nott, and M.J. Moore, *How introns influence and enhance eukaryotic gene expression*. Trends Biochem Sci, 2003. **28**(4): p. 215-20.
175. Bogdan, C., M. Rollinghoff, and A. Diefenbach, *Reactive oxygen and reactive nitrogen intermediates in innate and specific immunity*. Curr Opin Immunol, 2000. **12**(1): p. 64-76.
176. Kroncke, K.D., K. Fehsel, and V. Kolb-Bachofen, *Inducible nitric oxide synthase in human diseases*. Clin Exp Immunol, 1998. **113**(2): p. 147-56.
177. Casper, I.N., S.; Koch, K.; Hubrich, T.; Bollmann, F.; Henke, J.; Schmitz, K.; Kleinert, H.; Pautz, A., *Post-transcriptional regulation of the human inducible nitric oxide synthase (iNOS) expression by the cytosolic poly(A)-binding protein (PABP)*. Nitric oxide, 2013.
178. Rao, C.V., *Nitric oxide signaling in colon cancer chemoprevention*. Mutat Res, 2004. **555**(1-2): p. 107-19.
179. Cui, Y., et al., *Identification and characterization of genes that are required for the accelerated degradation of mRNAs containing a premature translational termination codon*. Genes Dev, 1995. **9**(4): p. 423-36.
180. Kervestin, S. and A. Jacobson, *NMD: a multifaceted response to premature translational termination*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2012. **13**(11): p. 700-12.
181. Koch, A.E., et al., *Macrophage inflammatory protein-1 alpha. A novel chemotactic cytokine for macrophages in rheumatoid arthritis*. J Clin Invest, 1994. **93**(3): p. 921-8.
182. Taub, D.D., et al., *Recombinant human interferon-inducible protein 10 is a chemoattractant for human monocytes and T lymphocytes and promotes T cell adhesion to endothelial cells*. J Exp Med, 1993. **177**(6): p. 1809-14.
183. Loetscher, P. and B. Moser, *Homing chemokines in rheumatoid arthritis*. Arthritis Res, 2002. **4**(4): p. 233-6.
184. Lee, E.Y., Z.H. Lee, and Y.W. Song, *CXCL10 and autoimmune diseases*. Autoimmun Rev, 2009. **8**(5): p. 379-83.
185. McInnes, I.B. and G. Schett, *Cytokines in the pathogenesis of rheumatoid arthritis*. Nat Rev Immunol, 2007. **7**(6): p. 429-42.
186. McInnes, I.B., *The Pathogenesis of Rheumatoid Arthritis*. The new england journal of medicine, 2011. **365**: p. 2205-2219.

187. Goebeler, M., et al., *Expression and complex formation of S100-like proteins MRP8 and MRP14 by macrophages during renal allograft rejection*. Transplantation, 1994. **58**(3): p. 355-61.
188. Roth, J., et al., *Complex pattern of the myelo-monocytic differentiation antigens MRP8 and MRP14 during chronic airway inflammation*. Immunobiology, 1992. **186**(3-4): p. 304-14.
189. Foell, D., et al., *Phagocyte-specific calcium-binding S100 proteins as clinical laboratory markers of inflammation*. Clin Chim Acta, 2004. **344**(1-2): p. 37-51.
190. Weidler, M., et al., *Inhibition of interleukin-6 signaling by gallic acid*. FEBS Lett, 2000. **484**(1): p. 1-6.
191. Erkel, G., et al., *Oxacyclododecandione, a novel inhibitor of IL-4 signaling from Exserohilum rostratum*. J Antibiot (Tokyo), 2008. **61**(5): p. 285-90.
192. Jacob, C.O., et al., *Heterogeneous effects of IFN-gamma in adjuvant arthritis*. J Immunol, 1989. **142**(5): p. 1500-5.
193. Rottiers, V. and A.M. Näär, *MicroRNAs in metabolism and metabolic disorders*. Nature Reviews Molecular Cell Biology, 2012. **13**(4): p. 239-250.
194. Dai, R. and S.A. Ahmed, *MicroRNA, a new paradigm for understanding immunoregulation, inflammation, and autoimmune diseases*. Transl Res, 2011. **157**(4): p. 163-79.
195. Wittmann, J. and H.M. Jack, *microRNAs in rheumatoid arthritis: midget RNAs with a giant impact*. Annals of the Rheumatic Diseases, 2011. **70**(Suppl 1): p. i92-i96.
196. Stittrich, A.B., et al., *The microRNA miR-182 is induced by IL-2 and promotes clonal expansion of activated helper T lymphocytes*. Nat Immunol, 2010. **11**(11): p. 1057-62.
197. Kim, K.M., et al., *miR-182 is a negative regulator of osteoblast proliferation, differentiation, and skeletogenesis through targeting FoxO1*. J Bone Miner Res, 2012. **27**(8): p. 1669-79.
198. Chen, F. and S.J. Hu, *Effect of microRNA-34a in cell cycle, differentiation, and apoptosis: a review*. J Biochem Mol Toxicol, 2012. **26**(2): p. 79-86.
199. Kim, D., *MicroRNA-34a regulates migration of chondroblast and Il-1 β -induced degeneration of chondrocytes by targeting EphA5*. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2011. **415**: p. 551-557.
200. Kim, D., et al., *MicroRNA-34a Modulates Cytoskeletal Dynamics through Regulating RhoA/Rac1 Cross-talk in Chondroblasts*. Journal of Biological Chemistry, 2012. **287**(15): p. 12501-12509.

7 Publikationen

- 2013** Post-transcriptional regulation of the human inducible nitric oxide synthase (iNOS) expression by the cytosolic poly(A)-binding protein (PABP)
Casper, I.; Nowag, S.; Koch, K.; Hubrich, T.; Bollmann, F.; Henke, J.; Schmitz, K.; Kleinert, H.; Pautz, A.

Nitric Oxide: Biology and Chemistry 2013, Zur Publikation angenommen

- 2012** qRT-PCR: a method and its difficulties
Bollmann F, Casper I, Henke J, Pautz A.

Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol. 2012 Oct;385(10):949-951.

- 2012** The anti-inflammatory fungal compound (S)-curvularin reduces proinflammatory gene expression in an in vivo model of rheumatoid arthritis
Schmidt N, Art J, Forsch I, Werner A, Erkel G, Jung M, Horke S, Kleinert H, Pautz A.

J Pharmacol Exp Ther. 2012 Oct;343(1):106-114.

- 2011** Publierte Abstracts der FJT der DGPT 2011:

The cytoplasmic poly(A) binding protein (PABP) post-transcriptionally regulates human iNOS expression - involvement of the 5'-untranslated mRNA sequence.
Forsch, I., Koch, K., Art, J., Bollmann, F., Nowag S., Kleinert, H., Pautz, A.

The mRNA binding protein KSRP is regulated in rheumatoid arthritis.
Art, J., Schmidt, N., Forsch, I., Bollmann, F., Koch, K., Kleinert, H., Pautz, A

S100A8 a new biomarker for chronic inflammatory diseases - gender specific expression in systemic lupus erythematosus?
Pautz, A., Art, J., Menke, J., Bollmann, F., Schmidt, N., Forsch, I., Kleinert, H.

Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol. 2011 Oct;383 Supplement 32-33