



JOHANNES GUTENBERG  
UNIVERSITÄT MAINZ

# **Analyse der Expression der humanen induzierbaren NO-Synthase (iNOS)**

Einfluss der 5'-UTR auf die Expression der humanen iNOS

und

Expression der humanen iNOS in Modellen der neuronalen  
Differenzierung

**Dissertation**

zur Erlangung des Grades  
„Doktor der Naturwissenschaften“

im Promotionsfach Chemie  
am Fachbereich Chemie, Pharmazie und Geowissenschaften  
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

**Fabian Matthias Gather**  
geb. am 24.12.1988 in Neuss

Mainz, 2019



Dekan:

1. Berichtstatter:

2. Berichtstatterin:

Tag der mündlichen Prüfung: 21.02.2020





# EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG

Die vorgelegte Dissertation wurde von September 2015 bis November 2019 am Institut für Pharmakologie der Universitätsmedizin der Johannes Gutenberg-Universität Mainz zur Erlangung des Grades „Doktor der Naturwissenschaften“ angefertigt.

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation selbstständig und nur mit den angegebenen Hilfsmitteln angefertigt habe. Diese Dissertation wurde noch nicht als Prüfungsarbeit für eine andere Prüfung eingereicht. Zudem wurden bisher weder die gleiche noch Teile der Abhandlung als Dissertation bei einer anderen Fakultät oder einem anderen Fachbereich eingereicht.

---

Ort, Datum

Fabian Matthias Gather



„Der Mensch muss das Gute und Große wollen! Das Übrige hängt vom Schicksal ab.“

Alexander von Humboldt



# INHALTSVERZEICHNIS

Abbildungsverzeichnis .....	V
Tabellenverzeichnis .....	IX
Abkürzungsverzeichnis.....	XI
Zusammenfassung .....	XVII
Abstract.....	XIX
<b>1 Theoretischer Teil .....</b>	<b>1</b>
1.1 Einleitung .....	1
1.2 Regulation der Genexpression.....	1
1.2.1 <i>Transkriptionelle Genregulation</i> .....	1
1.2.2 <i>Post-transkriptionelle Genregulation</i> .....	3
1.2.3 <i>Nonsense-mediated mRNA decay (NMD)</i> .....	8
1.3 Die induzierbare NO-Synthase.....	11
1.3.1 <i>Die Struktur der iNOS</i> .....	12
1.3.2 <i>Regulation der iNOS-Expression</i> .....	15
1.4 Neuronale Differenzierung .....	19
1.4.1 <i>NO in der neuronalen Entwicklung</i> .....	21
<b>2 Zielsetzung.....</b>	<b>24</b>
<b>3 Material.....</b>	<b>25</b>
3.1 Laborgeräte.....	25
3.2 Verbrauchsmaterialien .....	27
3.3 Puffer, Lösungen und Reagenzien .....	27
3.3.1 <i>Reagenzien</i> .....	27
3.3.2 <i>Puffer und Lösungen</i> .....	29
3.3.3 <i>Kits</i> .....	32
3.3.4 <i>Cytokine</i> .....	33
3.3.5 <i>Marker</i> .....	33
3.3.6 <i>Enzyme</i> .....	33
3.3.7 <i>Oligonukleotide</i> .....	34
3.3.8 <i>Plasmide</i> .....	37
3.3.9 <i>Antikörper</i> .....	40
3.4 Bakterien.....	40
3.5 Zellen.....	40

<b>4</b>	<b>Methoden .....</b>	<b>43</b>
4.1	Zellbiologische Arbeitsmethoden .....	43
4.1.1	<i>Kultivierung eukaryotischer Zellen.....</i>	43
4.1.2	<i>Kryokonservierung und Rekultivierung eukaryoter Zellen.....</i>	43
4.1.3	<i>Bestimmung der Lebendzellzahlen .....</i>	44
4.1.4	<i>Transiente Transfektion eukaryoter Zellen mit Plasmid-DNA.....</i>	44
4.1.5	<i>Stabile Transfektion eukaryoter Zellen mit Plasmid-DNA.....</i>	45
4.1.6	<i>Knockout und Knockdown von Genen.....</i>	46
4.1.7	<i>Stimulation eukaryotischer Zellen.....</i>	51
4.1.8	<i>Analyse der mRNA-Stabilität mit Hilfe von DRB .....</i>	51
4.2	Molekularbiologische Arbeitsmethoden.....	52
4.2.1	<i>Klonierung von DNA-Fragmenten in Plasmide.....</i>	52
4.3	Proteinbiochemische Arbeitsmethoden .....	62
4.3.1	<i>Proteinextraktion aus Zellen .....</i>	62
4.3.2	<i>Photometrische Quantifizierung nach Bradford .....</i>	62
4.3.3	<i>Proteinfällung mit Methanol/Chloroform.....</i>	63
4.3.4	<i>Immundetektion mittels Western Blot-Analyse.....</i>	64
4.3.5	<i>Luciferase-Assay.....</i>	66
4.4	RNA-Analysen.....	67
4.4.1	<i>Isolierung von RNA aus Zellen.....</i>	67
4.4.2	<i>Photometrische Quantifizierung von Nukleinsäuren .....</i>	67
4.4.3	<i>DNase-Verdau.....</i>	68
4.4.4	<i>Reverse Transkription .....</i>	68
4.4.5	<i>quantitative Real-Time-PCR.....</i>	70
4.4.6	<i>5'-RACE zur Bestimmung des 5'-Endes der mRNA .....</i>	73
4.5	Bioinformatische Untersuchungen .....	76
4.6	Statistik.....	76
<b>5</b>	<b>Ergebnisse.....</b>	<b>77</b>
5.1	Phylogenetische Analyse des iNOS-Gens .....	77
5.2	Bestimmung des TSS mittels 5'-RACE .....	80
5.3	Translatierbarkeit des uORF .....	84
5.4	Funktion des uORF in der 5'-UTR der iNOS.....	87
5.4.1	<i>Mutation des uORF-ATG hat keinen Einfluss auf die Expression eines Reportergens.....</i>	87
5.4.2	<i>cap-Abhängigkeit der Translation des iNOS-Transkripts.....</i>	89
5.4.3	<i>iNOS-5'-UTR enthält keine IRES .....</i>	93
5.4.4	<i>Einfluss der uORF-Kozak-Sequenz auf die Expression eines Reportergens.....</i>	96

---

5.5	Einfluss des NMD auf die iNOS-Expression.....	101
5.5.1	<i>Vorversuche zum Einfluss von UPF1 auf die iNOS-Expression.....</i>	<i>101</i>
5.5.2	<i>UPF1-Knockdown und -Knockout nicht dauerhaft möglich.....</i>	<i>103</i>
5.5.3	<i>DRB-Analyse der iNOS-mRNA-Stabilität nach transientem siRNA-Knockdown von UPF1.....</i>	<i>107</i>
5.5.4	<i>Einfluss des ersten Introns der iNOS auf die Expression eines Reportergens.....</i>	<i>109</i>
5.6	iNOS-Expression in der neuronalen Differenzierung.....	112
5.6.1	<i>Voruntersuchungen und RNAseq-Analysen.....</i>	<i>112</i>
5.6.2	<i>qRT-Analysen zur iNOS-Expression während der Differenzierung .....</i>	<i>115</i>
5.6.3	<i>Bestimmung des TSS der iNOS in den Neuronen .....</i>	<i>121</i>
5.6.4	<i>iNOS-Expression in stabilen NPC-Linien.....</i>	<i>138</i>
<b>6</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>141</b>
6.1	Einfluss der 5'-UTR auf die Expression der humanen iNOS.....	141
6.1.1	<i>iNOS-5'-UTR enthält einen translatierbaren uORF.....</i>	<i>141</i>
6.1.2	<i>iNOS-Translation ist cap-abhängig.....</i>	<i>144</i>
6.1.3	<i>iNOS-Expression ist möglich durch leaky scanning .....</i>	<i>144</i>
6.2	NMD beeinflusst die Expression der iNOS.....	146
6.2.1	<i>Regulation durch NMD und leaky scanning unabhängig von der Stimulation ...</i>	<i>148</i>
6.2.2	<i>NMD nicht dauerhaft ausschaltbar .....</i>	<i>148</i>
6.3	Expression der humanen iNOS in Modellen der neuronalen Differenzierung.....	151
6.3.1	<i>iNOS wird während der neuronalen Differenzierung exprimiert.....</i>	<i>151</i>
6.3.2	<i>iNOS-Transkript in Neuronen unterscheidet sich vom regulären Transkript.....</i>	<i>154</i>
6.3.3	<i>iNOS wird nicht in stabilen NPC-Linien exprimiert.....</i>	<i>157</i>
6.3.4	<i>Neuronales iNOS-Transkript verfügt über andere Regulationsmöglichkeiten gegenüber dem regulären iNOS-Transkript.....</i>	<i>157</i>
6.3.5	<i>Potenzielle neuronale iNOS unterscheidet sich von der regulären iNOS.....</i>	<i>162</i>
6.3.6	<i>Welche Rolle spielt die iNOS in der Neurogenese?.....</i>	<i>164</i>
<b>7</b>	<b>Fazit und Ausblick .....</b>	<b>167</b>
<b>8</b>	<b>Anhang .....</b>	<b>171</b>
8.1	Verwendete Plasmide.....	171
8.2	Zusätzliche Daten der FANTOM5-Studie .....	174
8.3	Sequenzierung nach dem 5'-RACE.....	175
8.3.1	<i>DLD1-Zellen.....</i>	<i>175</i>
8.3.2	<i>Neuronen .....</i>	<i>178</i>
8.4	Putatives neuronales iNOS-Transkript.....	181
8.5	Daten zur iNOS-Expression während der Entwicklung verschiedener Organe in Säugetieren .....	183

<b>9</b>	<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>187</b>
<b>10</b>	<b>Danksagung.....</b>	<b>201</b>
<b>11</b>	<b>Liste der Veröffentlichungen.....</b>	<b>202</b>
<b>12</b>	<b>Lebenslauf.....</b>	<b>204</b>



# ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1-1: Schema des an den 5'-cap gebundenen Initiationskomplexes der cap-abhängigen Translation. ....	4
Abbildung 1-2: Translationsmechanismen bei Anwesenheit eines uORF. ....	6
Abbildung 1-3: schematische Darstellung des EJC-abhängigen NMD-Mechanismus.....	9
Abbildung 1-4: Synthesereaktion der NO-Synthasen. ....	11
Abbildung 1-5: Struktur des iNOS-Transkripts mit den wichtigsten Domänen und Phosphorylierungsstellen. ....	13
Abbildung 1-6: reguläres iNOS-Transkript im iNOS-Gen und weitere putative Transkripte ...	14
Abbildung 1-7: Regulation der iNOS in Makrophagen und anderen Zellen.....	16
Abbildung 1-8: ENCODE-Daten zur iNOS-mRNA-Expression in verschiedenen Zelltypen und Geweben. ....	22
Abbildung 4-1: <i>Knockdown</i> durch siRNA.....	47
Abbildung 4-2: Funktionsweise des CRISPR/Cas9-Systems. ....	50
Abbildung 4-3: Ablauf des 5'-RACE nach Michael Frohman. ....	74
Abbildung 5-1: Phylogenetischer Baum mit der die das Startcodon des iNOS-uORF umgebenden Gensequenz.....	78
Abbildung 5-2: Lage der Primer in der Gensequenz. ....	81
Abbildung 5-3: Agarosegel der PCR-Fragmente nach der zweiten PCR des 5'-RACE der DLD1-Proben. ....	81
Abbildung 5-4: <i>ClustalW-Alignment</i> der Sequenzen des iNOS-Transkripts und der 5'-RACE-Probe DLD1-1.....	82
Abbildung 5-5: Sequenzierungsergebnis für die möglicherweise mutierten Sequenzbereiche mit Unterschieden zum iNOS-Transkript.....	83
Abbildung 5-6: 5'-RACE-Produkt nach Sequenzierung bezogen auf das iNOS-Transkript.....	83
Abbildung 5-7: 5'-UTR des iNOS-Transkripts.....	84
Abbildung 5-8: Schema der uORF-EGFP-Konstrukte.....	85
Abbildung 5-9: Expression des uORF-EGFP-Fusionsproteins. ....	86
Abbildung 5-10: Schema der pcDNA4/TO-Luc-Konstrukte mit iNOS-5'-UTR.....	88
Abbildung 5-11: Luciferase-Aktivität in Zellen mit pcDNA4/TO-5UTR-Luc-Konstrukten.....	88
Abbildung 5-12: Schema der iNOS-5'-UTR-Konstrukte und der erzeugten Luciferase mRNA.....	90
Abbildung 5-13: Luciferase-Aktivität in DLD1-Zellen nach der Transfektion mit den SL-Struktur-Plasmiden bzw. ihren Kontrollen.....	91

Abbildung 5-14: Analysen zum DNase-Verdau und zum Transkriptionserfolg von pGL3-control_SL2_Ex1_Ex2. ....	92
Abbildung 5-15: Schema der pRLFL-Plasmide. ....	94
Abbildung 5-16: Luciferase-Aktivität in DLD1-Zellen nach der Transfektion mit den verschiedenen pRLFL-Plasmiden. ....	95
Abbildung 5-17: Luciferase-Aktivität transfizierter Reportergergenkonstrukte mit verschiedenen uORF-Kozak-Sequenzen. ....	97
Abbildung 5-18: Schema der Kozak-Konstrukte. ....	98
Abbildung 5-19: EGFP-Protein-Expression mit verschiedenen Kozak-Sequenzen am uORF der iNOS-5'-UTR-EGFP-Fusionskonstrukte. ....	99
Abbildung 5-20: Relative UPF1-Expression nach siRNA-Transfektion.....	101
Abbildung 5-21: iNOS-Expression in siUPF1-behandelten DLD1-Zellen.....	102
Abbildung 5-22: UPF1-Expression der psiRNAH1GFPzeohUPF1-Zellen im Vergleich zu den psiRNAH1GFPluc-Zellen. ....	104
Abbildung 5-23: Beispiel eines Western Blots für den <i>Knockout</i> von UPF1 durch CRISPR/Cas9. ....	105
Abbildung 5-24: Repräsentativer Western Blot für die Vereinzelung von Zelllinien nach dem <i>Knockout</i> von UPF1 durch CRISPR/Cas9. ....	106
Abbildung 5-25: UPF1-Expression in siRNA-transfizierten und DRB-behandelten DLD1-Zellen.....	107
Abbildung 5-26: iNOS-mRNA-Expression in siRNA- und DRB-behandelten Zellen. ....	108
Abbildung 5-27: Schema der 5'-UTR-Plasmide mit erstem iNOS-Intron.....	109
Abbildung 5-28: Luciferase-Aktivität in Zellen mit pcDNA4/TO-Ex1-In1-Ex2-Luc-Konstrukten.....	110
Abbildung 5-29: iNOS-mRNA-Expression in der Differenzierung von Neuronen nach der CORTECON-Studie.....	113
Abbildung 5-30: iNOS-mRNA-Expression in der Differenzierung von hiPSCs nach (Briggs 2013). ....	114
Abbildung 5-31: Analyse der iNOS-Expression in hESCs während der Differenzierung zu Neuronen. ....	115
Abbildung 5-32: iNOS-mRNA-Expression während der Differenzierung verschiedener Stammzelllinien.....	118
Abbildung 5-33: Zusammenfassung aller iNOS-mRNA-Expressionsdaten der neuronalen Differenzierung. ....	119
Abbildung 5-34: Expression von TBR1, FoxG1 und GAD1 in der Differenzierung der AG Peitz im Vergleich zur CORTECON-Studie.....	120
Abbildung 5-35: Expressionssignale der verschiedenen Exons an Tag 12 der CORTECON-Studie (van de Leemput 2014) bezogen auf die gesamte iNOS-Expression.....	121

---

Abbildung 5-36: Vergleich der Expression der ersten Exons mit der Gesamt-iNOS-Expression über den Differenzierungszeitraum. ....	123
Abbildung 5-37: Zahl der TSS-Fragmente nach CAGE-Analyse des Replikat 1 an Tag 6 der DS-Studie. ....	124
Abbildung 5-38: TSS im ersten Teil des iNOS-Gens nach CAGE-Analyse des Replikat 1 an Tag 6 der DS-Studie. ....	125
Abbildung 5-39: Auswertung der in der neuronalen Differenzierung von hESC transient gebildeten Neuro-iNOS-Transkripte und das <i>Read Mapping</i> der RNAseq-Daten. ....	126
Abbildung 5-40: Struktur der in der neuronalen Differenzierung von humanen ESC transient gebildeten Neuro-iNOS-mRNA im Vergleich zum regulären iNOS-Transkript.....	127
Abbildung 5-41: Struktur der in der neuronalen Differenzierung von humanen ESC transient gebildeten Neuro-iNOS-mRNA im Vergleich zur putativen iNOS-Transkriptvariante X2. ....	128
Abbildung 5-42: Lage der spezifischen PCR-Primer im Gen.....	129
Abbildung 5-43: Transkriptvarianten mit der Lage der spezifischen PCR-Primer.....	129
Abbildung 5-44: Agarosegel der qRT-PCR der Differenzierungsproben mit den ursprünglich verwendeten iNOS-Primern. ....	131
Abbildung 5-45: Agarosegel der PCRs mit den Primer-Varianten 1 und 4. ....	132
Abbildung 5-46: Agarosegel der Primer-Variante 2. ....	133
Abbildung 5-47: iNOS-mRNA-Expression in differenzierenden hiPSCs mit der Primer-Variante 2. ....	134
Abbildung 5-48: Agarosegel der zweiten PCR zum 5'-RACE der neuronalen Proben und der DLD1-Probe zum Vergleich .....	135
Abbildung 5-49: Graphische Darstellung der verschiedenen Transkripte und der Länge der Sequenzierung der 5'-RACE-Produkte. ....	136
Abbildung 5-50: graphische Darstellung der Sequenzierungsergebnisse nach der Klonierung. ....	138
Abbildung 5-51: iNOS-mRNA-Expression in verschiedenen stabilen NPCs.....	139
Abbildung 5-52: Western Blot der stabilen NPCs. ....	140
Abbildung 6-1: iNOS-Expression während der Entwicklung des menschlichen Gehirns.....	153
Abbildung 6-2: EGR1-mRNA-Expression während der neuronalen Differenzierung innerhalb der CORTECON-Studie. ....	159
Abbildung 6-3: H3K4me3-Methylierung im Bereich des regulären iNOS-Promotors und des neuronalen Exon 1 in verschiedenen Zelltypen.....	161
Abbildung 6-4: Struktur der in der neuronalen Differenzierung von humanen ESC transient gebildeten neuronalen iNOS-mRNA. ....	163
Abbildung 8-1: Plasmidkarte von pcDNA4/TO-EGFP. ....	171

Abbildung 8-2: Plasmidkarte von pcDNA4/TO-Luc.....	171
Abbildung 8-3: Plasmidkarte von pGL3control.....	172
Abbildung 8-4: Plasmidkarte von pRLFL. ....	172
Abbildung 8-5: Plasmidkarte von psiRNA-hH1-GFP-zeo.....	173
Abbildung 8-6: Plasmidkarte von pSpCas9(BB)-2A-Puro.....	173
Abbildung 8-7: Zahl der TSS-Fragmente nach CAGE-Analyse des Replikats 1 an Tag 6 der DS-Studie.....	174
Abbildung 8-8: Sequenzierungsdaten des Fragments DLD1-1. ....	175
Abbildung 8-9: Sequenzierungsdaten des Fragments DLD1-2. ....	176
Abbildung 8-10: Sequenzierungsdaten des Fragments DLD1-3. ....	177
Abbildung 8-11: Sequenzierungsdaten des Fragments C16-1. ....	178
Abbildung 8-12: Sequenzierungsdaten des Fragments C16-2. ....	179
Abbildung 8-13: Sequenzierungsdaten des Fragments C89-1. ....	179
Abbildung 8-14: Sequenzierungsdaten des Fragments C89-2. ....	180
Abbildung 8-15: Sequenzierungsdaten des Fragments C89-3. ....	180
Abbildung 8-16: Sequenz des berechneten neuronalen iNOS-Transkripts aus den Daten von Yuanyuan Li und Ran Wang et al. ....	182
Abbildung 8-17: iNOS-Expression während der Entwicklung verschiedener Organe des Menschen.....	183
Abbildung 8-18: iNOS-Expression während der Entwicklung verschiedener Organe von Säugetieren. ....	185

# TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 3-1: verwendete Geräte mit Angabe der Hersteller.....	25
Tabelle 3-2: verwendete Verbrauchsmaterialien mit Angabe der Hersteller.....	27
Tabelle 3-3: verwendete Chemikalien und vorgefertigte Medien mit Angabe der Hersteller .....	28
Tabelle 3-4: Allgemeine Puffer und Lösungen .....	29
Tabelle 3-5: verwendete Puffer und Lösungen für die Luciferase-Reportergen-Analyse .....	30
Tabelle 3-6: verwendete Puffer und Lösungen für Proteinanalysen mittels Western Blot.....	31
Tabelle 3-7: verwendete Puffer und Lösungen für die Kultivierung von Bakterien .....	31
Tabelle 3-8: verwendete Kits.....	32
Tabelle 3-9: verwendete Cytokine .....	33
Tabelle 3-10: verwendete Marker.....	33
Tabelle 3-11: verwendete Enzyme mit Angabe der Hersteller .....	33
Tabelle 3-12: verwendete Oligonukleotide und ihre Sequenzen .....	34
Tabelle 3-13: verwendete siRNA-Proben zur direkten, transienten siRNA-Transfektion.....	36
Tabelle 3-14: verwendete qRT-PCR-Primer und -Sonden.....	37
Tabelle 3-15: Plasmide zur transienten Transfektion .....	37
Tabelle 3-16: Plasmide zur stabilen Transfektion .....	39
Tabelle 3-17: Primärantikörper für Western Blot-Analysen .....	40
Tabelle 3-18: Sekundärantikörper für Western Blot-Analysen.....	40
Tabelle 3-19: verwendete Zelllinien und Zellproben .....	40
Tabelle 4-1: Transfektionsgemisch für die transiente Transfektion .....	45
Tabelle 4-2: Zusammensetzung der Restriktionsansätze.....	52
Tabelle 4-3: Reaktionsansatz für eine PCR mit der Q5-Polymerase von Qiagen .....	54
Tabelle 4-4: Temperaturprogramm für eine PCR mit der Q5-Polymerase von Qiagen.....	54
Tabelle 4-5: Zusammensetzung des Kinasierungsansatzes.....	55
Tabelle 4-6: Reaktionsansatz für eine QuikChange-Mutations-PCR.....	58
Tabelle 4-7: Temperaturprogramm für eine QuikChange-Mutations-PCR.....	58
Tabelle 4-8: Reaktionsansatz für eine Kolonie-PCR .....	61
Tabelle 4-9: Temperaturprogramm für eine Kolonie-PCR .....	61
Tabelle 4-10: Verdünnungsreihe für einen Bradford mit PLB.....	63
Tabelle 4-11: Verdünnungsreihe für einen Bradford mit RIPA .....	63
Tabelle 4-12: Zusammensetzung der SDS-Polyacrylamid-Gele .....	64

Tabelle 4-13: Ansatz für die Reverse Transkription mit dem <i>High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit</i> .....	69
Tabelle 4-14: Ansatz für die Reverse Transkription mit dem <i>M-MuLV Reverse Transcriptase Kit</i> von NEB.....	69
Tabelle 4-15: Temperaturprogramm für die reverse Transkription.....	70
Tabelle 4-16: Reaktionsansatz für eine sondenbasierte qRT-PCR.....	71
Tabelle 4-17: Temperaturprogramm für eine sondenbasierte qRT-PCR .....	71
Tabelle 4-18: Reaktionsansatz für eine sondenfreie qRT-PCR .....	72
Tabelle 4-19: Temperaturprogramm für eine sondenfreie qRT-PCR .....	72
Tabelle 4-20: Reaktionsansatz für eine PCR mit dem <i>AllTaq Master Mix Kit</i> .....	75
Tabelle 4-21: Temperaturprogramm für eine PCR mit dem <i>AllTaq Master Mix Kit</i> .....	75
Tabelle 5-1: Vergleich der iNOS-5'-UTR verschiedener Säugetiere und Angabe der verwendeten <i>Refseq accession numbers</i> .....	77
Tabelle 5-2: Vergleich der ersten beiden Exons des humanen und murinen iNOS-Gens bis zum Startcodon der iNOS-cds. ....	79
Tabelle 5-3: uORFs in den verschiedenen humanen NOS-Isoformen. ....	80
Tabelle 5-4: Lage der Primer in den Exons der verschiedenen putativen iNOS-Transkriptvarianten und Länge der jeweiligen PCR-Fragmente.....	130
Tabelle 5-5: Sequenzierungssequenz im neuronalen Exon 1 nach dem 5'-RACE und den CAGE-Analysen.....	137
Tabelle 6-1: Vergleich der ersten beiden Exons der regulären iNOS mit dem ersten Exon der neuronalen iNOS .....	162
Tabelle 6-2: Vergleich der unterschiedlichen Peptidsequenzen am Anfang der regulären und der putativen neuronalen iNOS.....	162

# ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

A	Adenin
AraC	Cytosin- $\beta$ -D-Arabinofuranosid-Hydrochlorid
ARE	AU-reiches Element
ARE-BP	ARE bindendes Protein
ATF4	aktivierender Transkriptionsfaktors 4 ( <i>activating transcription factor 4</i> )
ATF4-V1	Spleiß-Variante 1 des aktivierenden Transkriptionsfaktors 4
ATG	Startcodon
ATP	Adenosintriphosphat
AUF1	<i>AU-rich element RNA-binding factor 1</i>
BH <sub>4</sub>	(6R-)5,6,7,8-Tetrahydrobiopterin
BMP	<i>bone morphogenic protein</i>
bp	Basenpaare (Einheit)
BSA	Bovines Serum Albumin
bzw.	beziehungsweise
C	Cytosin
ca.	circa
CAGE	<i>cap analysis gene expression</i>
cap	7-Methyl-Gyanylat-Kopfgruppe am 5'-Ende einer mRNA
Cas	CRISPR-assoziierte Proteine
CAT	kationischer Aminosäuretransporter
CCR4	C-C-Chemokinrezeptor Typ 4
cDNA	komplementäre DNA (zur mRNA)
cds	für ein Protein kodierende Sequenz ( <i>coding sequence</i> )
CIAP	<i>calf intestinal alkaline phosphatase</i>
CM	Cytokingemisch
CRE	cAMP-responsives Element
CREB	CRE-bindendes Protein
CRISPR	<i>clustered regularly interspaced short palindromic repeats</i>
crRNA	kurze interferierende RNA aus CRISPR
CTCF	<i>CCCTC-binding factor</i>
DAF-2 DA	4,5-Diaminofluorescein-Diacetat
DAF-2T	Traizolfluorescein

DCP	<i>Decapping-Protein</i>
DCX	<i>Doublecortin</i>
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMEM	<i>Dulbecco's modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNMT	DNA-Methyl-Transferase
DRB	5,6-Dichlorobenzimidazol-1- $\beta$ -D-ribofuranosid
DTT	Dithiothreitol
ECR	evolutionär konservierte Regionen
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EEJ	Exon-Exon-Verbindungsstelle ( <i>exon-exon junction</i> )
EGR1	<i>early growth response 1</i>
eIF	eukaryotischer Initiationsfaktor
EJC	Exon-Verbindungskomplex ( <i>Exon-Junction-complex</i> )
EMCV	Encephalomyocarditis-Virus
ENCODE	<i>Encyclopedia of DNA elements</i>
eNOS	endotheliale NO-Synthase
eRF	<i>translation termination release factor</i>
ESC	embryonale Stammzelle ( <i>embryonic stem cell</i> )
et al.	und andere
FACS	<i>fluorescence-activated cell sorting</i>
FAD	Flavin-Adenin-Dinukleotid
FAM	Carboxyfluorescein
FANTOM5	<i>Functional ANnoTation Of the Mammalian genome 5</i>
FGF2	Fibroblasten-Wachstumsfaktor 2 ( <i>fibroblast growth factor 2</i> )
FMN	Flavinmononukleotid
FoxG1	<i>Forkhead box protein G1</i>
G	Guanin
GAD1	Glutamat-Decarboxylase 1
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GIT	Guanidiniumisothiocyanat
GTP	Guanosintriphosphat



---

h	Stunden
hESC	humane embryonale Stammzelle ( <i>human embryonic stem cell</i> )
hiPSC	humane induzierte pluripotente Stammzelle ( <i>human induced pluripotent stem cell</i> )
hnRNA	heteronukleäre RNA
HuR	humanes Antigen R
IFN $\gamma$	Interferon $\gamma$
IL1 $\beta$	Interleukin 1 $\beta$
iNOS	induzierbare NO-Synthase
IRES	interne Ribosom-Eintrittsstelle ( <i>internal ribosome entry site</i> )
kb	kilo-Basen
kDa	kilo-Dalton
KSRP	<i>KH-type splicing regulatory protein</i>
l	Liter
LIF	<i>leukaemia inhibitory factor</i>
lncRNA	<i>long non-coding RNA</i>
L-NMMA	N-Monomethyl-L-Arginin
LPS	Lipopolysaccharide
lt-NES	<i>long-term self-renewing neuroepithelial stem cell</i>
Luc	<i>Firefly-Luciferase</i>
MACS	magnetische Zellsortierung ( <i>magnetic activated cell sorting</i> )
Met	Methionin
Met-tRNA <sub>i</sub>	Initiations-tRNA mit gebundenem Methionin
min	Minuten
miRNA	Mikro-RNA
MP	Magermilchpulver
mRNA	<i>messenger-RNA</i>
n x g	n-fache Erdbeschleunigung
NADPH	Nikotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat
ncRNA	<i>non-coding RNA</i>
NF $\kappa$ B	Nuklearer Faktor $\kappa$ B
NGS	<i>next generation sequencing</i>
NMD	<i>Nonsense-mediated mRNA decay</i>
nNOS	neuronale NO-Synthase

## Abkürzungsverzeichnis

---

NO	Stickstoffmonoxid
NOT	<i>negative regulator of transcription</i>
NPC	Neuronale Vorläuferzelle ( <i>neural precursor cell</i> )
ns	nicht signifikant
nt	Nukleotide (Einheit)
OD	optische Dichte
PABP	Poly(A)-bindendes Protein
PAM	<i>protospacer adjacent motif</i>
PBMCs	<i>peripheral blood mononuclear cells</i>
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PEI	Polyethylenimin
PLB	<i>passive lysis buffer</i>
PLB	Passiver Lysispuffer ( <i>Passive Lysis Buffer</i> )
PNRC2	<i>proline rich nuclear receptor coactivator 2</i>
Pol II	Polymerase II
PTB	<i>polypyrimidine tract binding protein</i>
PTC	vorzeitiges Stopcodon ( <i>premature stop codon</i> )
qRT-PCR	quantitative Real-Time PCR
R	Purinbase
RACE	<i>rapid amplification of 5' complementary DNA ends</i>
Ren	<i>Renilla</i> -Luciferase
RGL-NPC	<i>hindbrain/spinal cord radial glia (RG)-like neural precursor cells</i>
RISC	<i>RNA-induced silencing complex</i>
RNA	Ribonukleinsäure
RNA-BP	RNA-bindendes Protein
RNase	Ribonuklease
ROCK	Rho-associated protein kinase
rRNA	ribosomale RNA
s	Sekunden
SDS	Natriumdodecylsulfat
SEM	<i>standard error of mean</i>
shRNA	<i>small hairpin RNA</i>

---

siRNA	<i>small interfering RNA</i>
SL	Haarnadelstruktur der RNA ( <i>stem loop</i> )
sm-NPC	<i>small molecule NPCs</i>
SNP	Natrium-Nitroprussid
SOX2	<i>SRY-box transcription factor 2</i>
STAT	<i>transducers and activators of transcription</i>
T	Thymin
TAMRA	Carboxytetramethylrhodamin
TBE	TRIS-Borat-EDTA
TBR1	<i>T-box brain protein 1</i>
TBS	TRIS-gepufferte Kochsalzlösung
TCR- $\beta$	T-Zellrezeptor $\beta$
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethan-1,2-diamin
Tet1	<i>Ten-eleven translocation methylcytosine dioxygenase 1</i>
TNF $\alpha$	Tumornekrosefaktor $\alpha$
tracrRNA	<i>trans activating crRNA</i>
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
tRNA	Transfer-RNA
TSS	Transkriptionsstart
TTP	Tristetraprolin
U	Uracil
uAUG	<i>upstream AUG</i>
uORF	stromaufwärts gelegenes offenes Leseraster ( <i>upstream open-reading frame</i> )
UPF	<i>UP-frameshift suppressor</i>
UTR	untranslatierte Region
V	Volumen
VEGF-A	<i>vascular endothelial growth factor A</i>



## ZUSAMMENFASSUNG

Nach Induktion der Expression der induzierbaren Stickstoffmonoxid-Synthase (iNOS) durch Cytokine produziert das Enzym hohe Mengen an NO, die vorteilhafte mikrobizide, antiparasitäre, antivirale und antitumorale Wirkungen haben können. Im Gegensatz dazu scheint die aberrante iNOS-Induktion Teil der Pathologie des septischen Schocks und vieler Autoimmunerkrankungen zu sein. Eine feinregulierte Kontrolle der Expression der iNOS ist daher für ihre Funktion in vielen Prozessen im menschlichen Körper unabdingbar. Das Auftreten eines für humane Zellen spezifischen offenen Leserasters (*upstream open reading frame*, uORF) in der 5'-untranslatierten Region (5'-UTR) impliziert eine translatorische Regulation der iNOS-Expression und könnte ein evolutionärer Vorteil sein, der eine zusätzliche Ebene der iNOS-Regulation eröffnen könnte.

Transfektionsexperimente mit Reporter-Gen-Plasmiden in humanen DLD1-Zellen ergaben, dass der uORF trotz seiner Translatierbarkeit den Translationsstart am eigentlichen iNOS-Startcodon nicht zu hemmen scheint. Die in dieser Arbeit präsentierten Daten zeigen deutlich, dass die humane iNOS-Translation cap-abhängig ist und dass die 5'-UTR der iNOS-mRNA keine interne Ribosomen-Eintrittsstelle enthält. Die Translation der iNOS-Kodierungssequenz wird höchstwahrscheinlich durch einen *leaky scanning*-Mechanismus vermittelt, der durch die schwache Kozak-Sequenz des uORF im Vergleich zur eigentlichen iNOS-Kozak-Sequenz erklärt werden kann.

Das uORF-Stopcodon befindet sich vor dem ersten Intron, was auf eine Beteiligung des *Nonsense-mediated mRNA Decay* (NMD) an der iNOS-Regulation hindeutet. Eine Herunterregulierung von UPF1 durch siRNA führte zu einer verstärkten endogenen Cytokin-induzierten iNOS-Expression in humanen DLD1-Zellen und einer höheren mRNA-Stabilität. Die Transfektion von Konstrukten, die iNOS-Exon 1, -Intron 1 und -Exon 2 vor einem Luciferase-Gen enthalten, zeigte einen deutlichen Effekt der Mutation des uORF-Startcodons auf die Luciferase-Reporter-Gen-Expression. Damit konnte gezeigt werden, dass der uORF die Intensität der iNOS-Expression und ihre Dauer über den NMD-Mechanismus verringert.

Neben der Wirkung der iNOS im Immunsystem scheint sie auch eine wichtige Rolle bei der neuronalen Entwicklung zu spielen. Hohe NO-Mengen, aber auch eine fehlerhafte iNOS-Expression oder NO-Produktion führen zu aberrativer Entwicklung und teratogenen Effekten. Datenbank- und qRT-PCR-Analysen zeigten eine Hochregulation der humanen iNOS-mRNA-Expression während der Differenzierung von hiPSC oder hESC zu Neuronen. Die 5'-RACE-Analyse zeigte, dass die in den differenzierenden hiPSC exprimierte iNOS-mRNA anstelle der ersten beiden

Exons des regulären iNOS ein alternatives neuronenspezifisches Exon 1 enthält. Damit wurden im Rahmen dieser Arbeit ein neues iNOS-Transkript und eine neue Isoform ermittelt, die in den ersten Stadien der neuronalen Entwicklung exprimiert wird und eine mögliche Zielstruktur für neue Therapien, zum Beispiel neurodegenerativer Erkrankungen, bieten kann.

## ABSTRACT

After induction of inducible nitric oxide synthase (iNOS) expression by cytokines, the enzyme produces high amounts of NO, which can have beneficial microbicidal, antiparasital, antiviral and antitumoral effects. In contrast, aberrant iNOS induction seems to be part of the pathology of septic shock and many autoimmune diseases. Thus, a fine-regulated control of the expression of the iNOS is essential for the function of many processes in the human body. The discovery of a human specific upstream open reading frame (uORF) in the 5'-untranslated region (5'-UTR) implying a translational regulation of iNOS expression and could be an evolutionary advantage which may open a new level of iNOS regulation.

Reportergene transfection experiments in human DLD1 cells revealed that the uORF, although translatable, seems not to inhibit the initiation of translation at the bona fide ATG. The data presented in this thesis clearly show that human iNOS translation is cap-dependent and the 5'-UTR of the iNOS mRNA contains no internal ribosome entry site. Translation of the bona fide coding sequence is most likely mediated by a leaky scanning mechanism, which is supported by the weak Kozak sequence of the uORF compared to the Kozak sequence of the main cds.

The uORF stop codon is located upstream of the first intron, which indicates an involvement of the nonsense mediated RNA decay (NMD) in iNOS regulation. Downregulation of UPF1 by siRNA resulted in enhanced endogenous cytokine induced iNOS expression in human DLD1 cells and higher mRNA stability. Transfection of constructs containing iNOS exon 1, intron 1 and exon 2 upstream of a luciferase coding sequence showed a clear effect on luciferase reportergene expression, when the uORF-ATG was mutated. Thus, it is indicated that the uORF reduces the intensity of iNOS expression and its duration via the NMD mechanism.

Besides the effect of the iNOS within the immune system, it seems to play an important role in neural development. High amounts of NO as well as the lack of iNOS expression or NO production lead to aberrative development and teratogenic effects. Sequence database and qRT-PCR analyses showed an upregulation of human iNOS mRNA expression during differentiation of hiPSC or hESC to neurons. 5'-RACE analysis showed that the iNOS mRNA expressed in the differentiating hiPSC contains an alternative neuron-specific exon 1 instead of the first two exons of the regular iNOS. Thus, this thesis presents a new iNOS transcript and isoform, which is expressed during the first stages of neural development and could be a target in new therapies, e.g. of neuro-degenerative diseases.





# 1 THEORETISCHER TEIL

## 1.1 Einleitung

Im Gegensatz zur genetischen Information (dem Genom) unterscheidet sich das Proteom, die Gesamtheit aller Proteine einer Zelle, innerhalb eines Organismus von Zelle zu Zelle. Die Zusammensetzung des Proteoms ist nicht nur für die Differenzierung der einzelnen Zellen und deren Funktion von Bedeutung, sondern auch für ein erfolgreiches Zusammenspiel aller Zellen. Dementsprechend kann die Dysregulation einer einzelnen Zelle Auswirkungen auf den gesamten Organismus haben und damit eine Ursache oder Begleiterscheinung von vielen Krankheiten sein. Die Kontrolle und Regulation des Proteoms finden auf verschiedenen Ebenen der Genexpression statt und bilden daher eine wichtige Grundlage für einen gesunden und funktionsfähigen Organismus (Thongboonkerd 2007). Kontrollmechanismen zur Regulation der Proteinexpression finden sich dabei auf allen Ebenen von der Transkription von DNA in RNA, der Prozessierung der Vorläufer-RNA zur Boten-RNA (*messenger RNA*, mRNA), dem Transport aus dem Zellkern, der Translation der mRNA zum Protein bis hin zum Abbau des Proteins (Wilkinson 2001, Thongboonkerd 2007).

Einen wichtigen Teil in diesen Regulationsmechanismen nehmen dabei auch die untranslatierten Regionen (UTR) der mRNA ein. Ihre Struktur und die Anwesenheit von verschiedenen Motiven zur Bindung von RNA-Bindeproteinen (RNA-BP) tragen wesentlich zur RNA-Stabilität und damit zur Expression des jeweiligen Proteins bei (Misquitta 2001, Mazumder 2003, Hinnebusch 2016).

## 1.2 Regulation der Genexpression

### 1.2.1 Transkriptionelle Genregulation

Die eukaryotische Genexpression startet im Zellkern mit der Transkription der genomischen DNA in heteronukleare RNA (hnRNA). Ihre Regulation erfolgt durch Transkriptionsfaktoren, den Promotor und die RNA-Polymerasen (Tjian 1994, Wilkinson 2001). Eukaryoten besitzen drei RNA-Polymerasen, die an der Transkription von DNA zu RNA beteiligt sind. Während die RNA-Polymerase I hauptsächlich ribosomale RNA (rRNA) (Thompson 1981) und die RNA-Polymerase III die Transfer-RNA (tRNA) (Maraia 2001) transkribieren, werden mRNA und ein

großer Teil der Mikro-RNA (miRNA) durch die RNA-Polymerase II transkribiert (Kornberg 2007). Dabei binden die Polymerasen an für sie spezifische Sequenzen in der Promotorregion des jeweiligen Gens, die sich im Normalfall stromaufwärts in 5'-Richtung zur proteinkodierenden Sequenz des jeweiligen Gens befinden. Die Promotorregion ist zusätzlich Bindestelle für weitere Proteine, wie zum Beispiel Transkriptionsfaktoren, die zusammen einen Präinitiationskomplex bilden. Dieser dient als Gerüst für die Bindung weiterer regulatorischer Proteine. Zu den wichtigsten Motiven für die Bindung von Enzymen gehören die TATA-Box, die in vielen Promotoren zu finden ist, sowie GC-reiche Sequenzen wie die CpG-Inseln, die CCAAT-Box und das cAMP-responsive Element (CRE). An solche Bindestellen binden nicht nur die für jede Transkription nötigen Transkriptionsfaktoren IIA, IIB, IID, IIE, IIF und IIH sondern auch spezifische regulatorische Transkriptionsfaktoren (Aktivatoren und Repressoren), wie der Nukleare Faktor  $\kappa$ B (NF $\kappa$ B), das CRE-bindende Protein (CREB) oder p53. Die Promotorsequenz selbst variiert von Gen zu Gen und besteht aus einer Variation verschiedener Bindestellen (Tjian 1994, Kornberg 2007).

Für die Bindung der verschiedenen Faktoren spielt neben der DNA-Sequenz auch die Zugänglichkeit der DNA eine große Rolle. Die genomische DNA liegt im Zellkern durch Bindung an Histone verdichtet und damit nicht zugänglich für viele Proteine vor. Bei starker Verdichtung können daher die zur Transkription nötigen Proteine nicht binden. Nur wenn die DNA entspiralisiert vorliegt, zum Beispiel durch Histon-Modifizierungen, kann eine Transkription initialisiert werden (Jenuwein 2001). Hierbei wird auch von einer epigenetischen Regulation gesprochen, da sie nicht direkt mit der DNA- bzw. RNA-Sequenz und Basenabfolge zusammenhängen und auch langfristige Änderungen der Genexpression bewirken können. Die Hauptmechanismen sind hierbei die erwähnte post-translationale Modifikation der Histone und die DNA-Methylierung (Szyf 2008, Delcuve 2009).

Die Regulation durch DNA-Methylierung bezieht sich vor allem auf die Methylierung von Cytosinen an CpG-Dinukleotiden durch eine DNA-Methyl-Transferase (DNMT). Etwa 60 bis 90 % der Cytosine aller CpGs der Wirbeltiere sind zu 5-Methylcytosin methyliert. Unmethylierte CpGs sind meist in Clustern (CpG-Inseln) zusammengefasst und kommen vor allem in GC-reichen Regionen vor, die oft mit einem Promotor assoziiert sind (Hsieh 1994, Delcuve 2009). Je höher der Grad der Methylierung, desto geringer ist die Bindung von Transkriptionsfaktoren und damit die Genexpression (Hsieh 1994).

Zu den post-translationalen Modifikationen der Histone gehören vor allem die Acetylierung und die Methylierung von Lysinresten. Bestimmte Modifikationen, wie zum Beispiel die Trimethylierung H3K4me3 und die Acetylierung H3K9/14Ac, werden mit aktiven Promotoren in Zusammenhang gebracht (Guenther 2007). Auch eine Verbindung zwischen CpG-Inseln und der Methylierung an H3K4me3 über CXXC1 und andere Enzyme wurde schon festgestellt (Clouaire 2014). Erst, wenn die DNA frei zugänglich vorliegt, kann sich der Initiationskomplex der Transkription am Promotor bilden (Delcuve 2009).

### 1.2.2 Post-transkriptionelle Genregulation

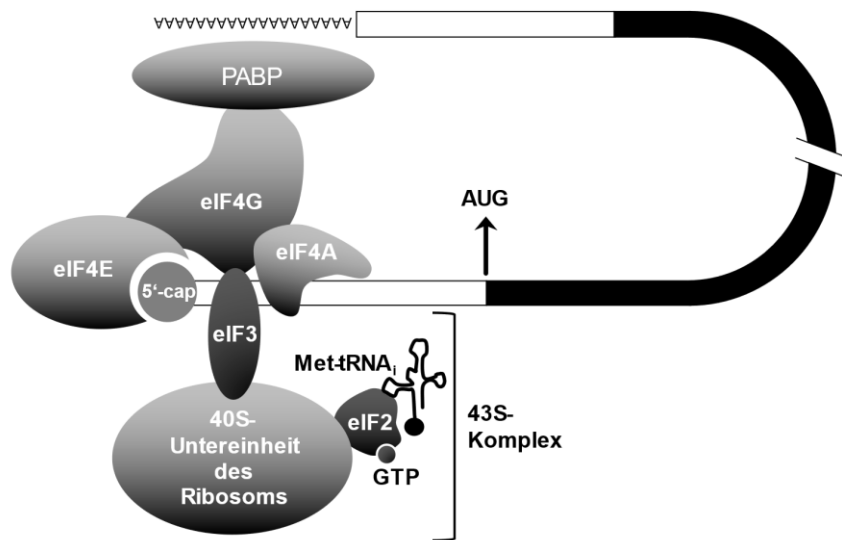
Im Gegensatz zur transkriptionellen Genregulation erlaubt die Regulation auf der Ebene der mRNA-Stabilität und Translation eine schnellere und damit feinere Regulation der Expression als Antwort auf zelluläre oder externe Stimuli (Sonenberg 2009, Jackson 2010).

Bereits während und insbesondere nach der Transkription im Zellkern erfolgt die Prozessierung der sogenannten heteronukleären RNA (hnRNA) durch die Anbindung einer 7-Methyl-Guanosin-Gruppe am 5'-Ende der RNA (5'-cap) und einer Poly(A)-Kette am RNA-3'-Ende (Chan 1977, Coutelle 1981). Zusätzlich werden durch das Spleißosom nicht-kodierende Abschnitte (Introns) herausgeschnitten (Wahl 2009). Durch diese Prozessierung wird aus der hnRNA die mRNA. Durch alternatives Spleißen können hierbei aus einer hnRNA unterschiedliche mRNAs entstehen, die für verschiedene Protein-Isoformen kodieren (Leff 1986, Stamm 2005).

Im weiteren Verlauf wird die mRNA ins Cytoplasma transportiert und dient bei der Translation als Matrix für die Proteinsynthese. Die RNA-Sequenz lässt sich in drei Teile unterteilen, die 5'-untranslatierte Region am 5'-Ende (5'-UTR), die kodierende Sequenz (*coding sequence*, *cds*) und die 3'-untranslatierte Region (3'-UTR). Die untranslatierten Regionen spielen eine wichtige Rolle bei der post-transkriptionellen Regulation. Sie bieten durch ihre Sequenz oder Sekundärstruktur Bindestellen für RNA-BP und haben dadurch Einfluss auf die RNA-Stabilität sowie den Transport der mRNA aus dem Zellkern und die Translationseffizienz (Misquitta 2001, Yaniv 2001, Hinnebusch 2016).

Bei der Translation bindet zunächst der 43S-Komplex, bestehend aus der 40S-Untereinheit des Ribosoms, den eukaryotischen Initiationsfaktoren (eIFs) eIF1, eIF3, eIF4A, eIF4B und eIF4F und einem ternären Komplex aus eIF2, GTP und Met-tRNA<sub>i</sub>, an die 5'-cap-Struktur der mRNA

und wandert entlang der mRNA Richtung 3'-Ende. eIF4A, eIF4B und eIF4F sind dabei für die Linearisierung möglicher RNA-Sekundärstrukturen am 5'-Ende und die eigentliche Bindung am 5'-cap verantwortlich. Zusätzlich wird über das Poly(A)-bindende Protein (PABP) eine Verbindung zum Poly(A)-Ende der mRNA hergestellt (siehe Abbildung 1-1) (Lopez-Lastra 2005, Jackson 2010).



**Abbildung 1-1: Schema des an den 5'-cap gebundenen Initiationskomplexes der cap-abhängigen Translation.**

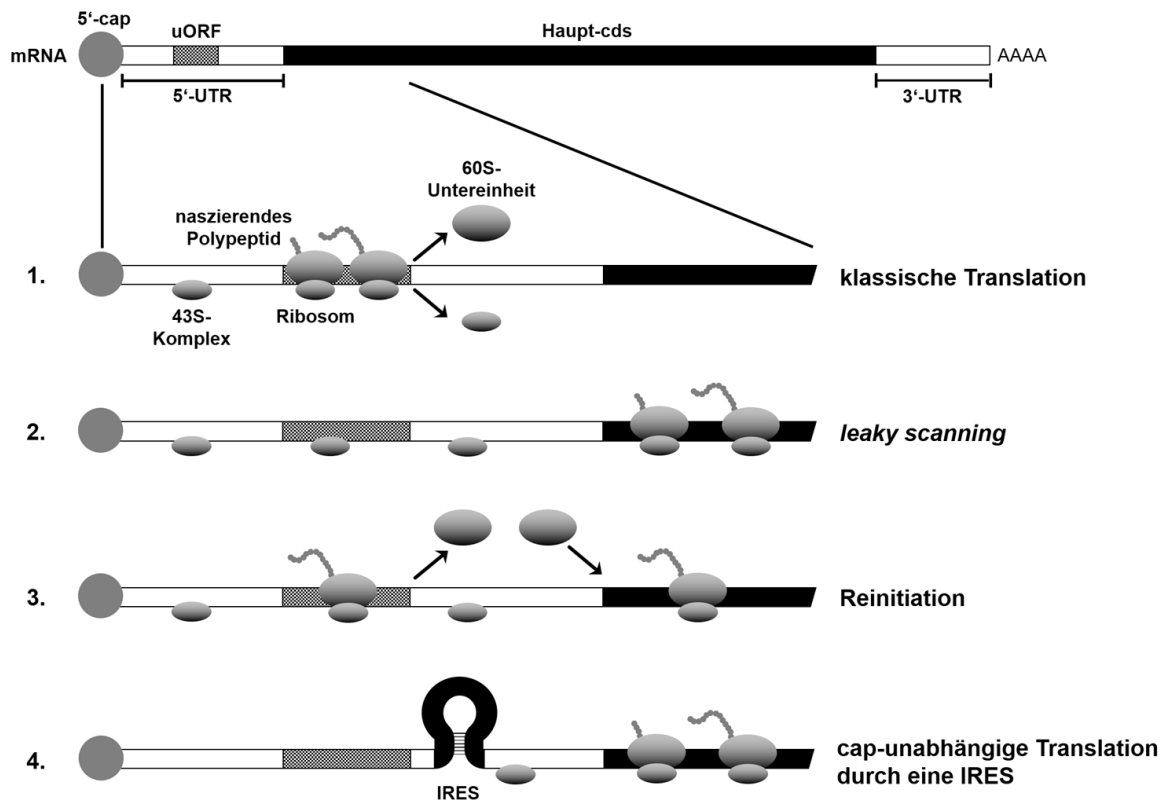
Die cap-abhängige Translation startet mit der Bindung des eIF4F-Komplexes bestehend aus eIF4E (bindet an die 5'-cap-Struktur), eIF4G (ein Gerüstprotein), eIF4A (eine Helicase) an die 5'-cap-Struktur. Mit Rekrutierung von eIF3 sowie der Bindung der 40S-Untereinheit des Ribosoms und des eIF2 ternären Komplexes, bestehend aus eIF2, GTP und der Met-tRNA<sub>i</sub>, bildet sich der 43S-Komplex. Dieser bewegt sich entlang der RNA bis zum ersten Startcodon (AUG). Zusätzlich stabilisiert wird er durch die Bindung von eIF4G an das Poly(A)-bindende Protein (PABP) und somit an das 3'-Ende der mRNA. Abbildung gestaltet nach Lopez-Lastra, et al., *Biol Res*, 2005. **38**(2-3): p. 121-46. (Lopez-Lastra 2005).

Sobald das Startcodon der cds erkannt wird, initiieren weitere Faktoren wie eIF5 und eIF5B durch Austausch von Initiationsfaktoren, Hydrolyse des an eIF2 gebundenen GTP und die Rekrutierung der 60S-Untereinheit die Ausbildung des Ribosoms (Jackson 2010, Hinnebusch 2017). Je nach umgebender Basenkomposition des Startcodons ist die Erkennung durch den 43S-Komplex und die Initiation der anschließenden Translation mehr oder weniger begünstigt. Forschungen zeigten eine optimale Sequenz, die auch Kozak-Sequenz genannt wird, mit der Basenfolge GCC<sup>A</sup>/<sub>6</sub>CC **AUG** G. Am wichtigsten scheinen hierbei das Purin an Position -3 und das Guanin an Position +4, da eine Mutation an diesen Stellen zu den größten Veränderungen in der Expression führte (Kozak 1987, Hinnebusch 2017).

Nach erfolgter Translation durch das Ribosom und Erreichen des Stopcodons, kommt es zur Bindung von *eukaryotic release factors* (eRFs), wodurch die Bindung des Polypeptids vom Ribosom hydrolysiert und dadurch das entstandene Protein freigesetzt wird. Zusätzlich löst sich das Ribosom durch die Freisetzung der 60S-Untereinheit auf und verlässt die RNA. Dies hat zur Folge, dass nur die erste cds abgelesen und translatiert wird und somit die eukaryotische mRNA im Normalfall nur für ein Protein kodiert, d.h. monocistronisch ist (Youngman 2008, Calvo 2009).

Ein Problem der cap-abhängigen Translation erschließt sich bei näherer Betrachtung der 5'-UTR. Je nach Quelle besitzen mehr als 40 % aller mRNAs der Säugetiere ein oder mehrere stromaufwärts gelegene offene Leseraster (*upstream open-reading frame*; uORF) (Calvo 2009, Young 2016). Im klassischen Modell der cap-abhängigen Translation könnte daher das eigentliche Protein nicht translatiert werden. Im Allgemeinen wird vermutet, dass uORFs als Translationsinhibitoren der eigentlichen cds dienen (siehe Abbildung 1-2 1). Der inhibitorische Effekt basiert auf der monocistronischen Translation der mRNA und dem Scanning-Prozess der Ribosomen mit Beginn am 5'-cap der mRNA (Calvo 2009).

Eine Erklärung für eine effiziente Translation der eigentlichen cds uORF-haltiger mRNAs ist die Anwesenheit einer internen Ribosom-Eintrittsstelle (IRES), wie sie zum Beispiel in viraler RNA (Martinez-Salas 2013) zu finden ist. Auch einige zelluläre mRNAs besitzen IRES-Sequenzen, zum Beispiel die Spleißvariante 1 (V1) des humanen *activating transcription factor 4* (ATF4-V1) (Chan 2013) und verschiedene Spleißvarianten des *vascular endothelial growth factor A* (VEGF-A) (Arcondeguy 2013). Dabei spielt weniger die eigentliche Sequenz, sondern vielmehr die Sekundärstruktur der RNA eine Rolle. Der Mechanismus, der hinter der Translationsinitiation bei Anwesenheit einer IRES steckt, ist nicht für alle Beispiele gleich. Teilweise bindet die 40S-Untereinheit des Ribosoms direkt an die IRES, bei anderen sind noch weitere Initiationsfaktoren nötig (Hellen 2001, Lopez-Lastra 2005). Bei starkem Stress oder in bestimmten Phasen des Zellzyklus (G2/M), bei denen die cap-abhängige Translation geschwächt oder verhindert ist, können diese Gene somit weiter exprimiert werden. Dadurch kann eine komplette Entkopplung von der cap-abhängigen Translation und damit von der mRNA-Sequenz stattfinden, die sich vor der IRES befindet (siehe Abbildung 1-2 4) (Hellen 2001, Lopez-Lastra 2005).



**Abbildung 1-2: Translationsmechanismen bei Anwesenheit eines uORF.**

Dargestellt sind verschiedene Mechanismen zur Umgehung eines **uORFs**. Die Abbildung wurde den Abbildungen in (Somers 2013) und (Zhang 2019) nachempfunden. Bei der klassischen Translation erkennt der **43S-Komplex** das Startcodon des uORF und bildet zusammen mit der 60S-Untereinheit das Ribosom, welches dann die Translation beginnt. Bei Erreichen des Stopcodons, wird das entstandene Polypeptid freigesetzt und das Ribosom spaltet sich wieder auf (1). Dadurch käme es zu keiner Translation der **Haupt-cds**. Beim leaky scanning wird der uORF nicht durch den 43S-Komplex erkannt, wodurch eine Translation der Haupt-cds möglich wird (2). Bei der Reinitiation werden sowohl uORF als auch die Haupt-cds abgelesen. Der 43S-Komplex verbleibt nach der Translation des uORF an der mRNA und wandert bis zum Startcodon der Haupt-cds, an dem die Translation durch erneute Bindung einer 60S-Untereinheit initiiert wird (3). Neben diesen cap-abhängigen Mechanismen besteht auch die Möglichkeit, dass die Translation der Haupt-cds durch eine IRES von der Translation des uORFs entkoppelt wird. Hier bindet ein Teil oder auch der komplette 43S-Komplex an der Sekundärstruktur der IRES und startet erst dort mit dem scannenden Mechanismus der Translation. Damit findet die Translation der Haupt-cds unabhängig von der Sequenz, die sich vor der IRES befindet, statt (4).

Andere Mechanismen zur Umgehung der monocistronischen Translation sind das uORF-abhängige *leaky scanning* oder die Reinitiation (Somers 2013). Hierbei wird trotz cap-abhängiger Translation die zweite cds abgelesen. Beim *leaky scanning* wird der uORF nicht durch den 43S-Komplex erkannt, wodurch eine Translation des Haupt-cds möglich wird (siehe Abbildung 1-2 2). Bei der Reinitiation werden sowohl uORF als auch die Haupt-cds abgelesen. Der 43S-Komplex verbleibt nach der Translation des uORF an der mRNA und wandert bis zum Startcodon der Haupt-cds, an dem die Translation durch erneute Bindung einer 60S-Untereinheit initiiert wird (siehe Abbildung 1-2 3) (Somers 2013, Zhang 2019).

Durch diese verschiedenen Mechanismen bieten uORFs die Möglichkeit, die Translation kontrolliert zu inhibieren oder sogar die Translationsinitiation durch externe Stimuli zu steuern (Andreev 2015, Zhang 2019). Ein Beispiel hierfür ist die Translation des murinen ATF4, der durch zwei uORFs abhängig von Stressbedingungen reguliert wird. Unter normalen Bedingungen folgt nach der Translation des ersten uORFs die Reinitiation am zweiten uORF, der inhibierend auf die Translation der Haupt-cds wirkt. Unter Stressbedingungen ist allerdings die Reaktivierung des eIF2 und damit die Bildung des ternären Komplexes aus eIF2, GTP und Met-tRNA<sub>i</sub> verlangsamt, wodurch die Zeit bis zu einer möglichen Reinitiation verlängert wird. Da der scannende Prozess an der ATF4-mRNA aber weiterläuft, wird nun nicht mehr das AUG der uORF2, sondern erst das AUG der Haupt-cds erkannt und ATF4 kann vermehrt exprimiert werden (Vattem 2004, Young 2016). Auch in *Arabidopsis* wurde eine uORF-abhängige Regulation durch externe Stimuli beobachtet. Durch die Bestrahlung von *Arabidopsis*-Zellen mit blauem Licht entstehen Transkripte mit alternativem Transkriptionsstart (TSS). Diese Transkripte besitzen dadurch keinen uORF mehr, sodass höhere Expressionsraten dieser lichtregulierten Gene messbar sind (Kurihara 2018).

Obwohl eine hohe Zahl an Transkripten uORFs enthält, treten vorzeitige AUGs weniger häufig auf, als eine gleichmäßige Verteilung der Basen erzeugen würde. uORFs scheinen daher nur da aufzutreten, wo sie entweder einen selektiven Vorteil in der Evolution durch eine zusätzliche Regulation der Genexpression bieten oder der Einfluss für den Gesamtorganismus vernachlässigbar ist (Neafsey 2007).

Befindet sich neben einem uORF noch ein Intron in der 5'-UTR eines Gens, sinkt die Translationseffizienz der Haupt-cds zusätzlich ab. So konnte eine negative Korrelation zwischen der Zahl von Exon-Exon-Verbindungen (*exon-exon-connection*, EEJ) in der 5'-UTR (*leader* EEJs) bzw. der Zahl von uORFs zur Translation festgestellt werden. Eine Kombination aus beiden, uORF und *leader* EEJs, führt zu den niedrigsten Translationsraten (Lim 2018). Die Kombination aus einem uORF und einem Intron ist zudem auch eine mögliche Zielsequenz des *nonsense mediated mRNA decay* (NMD), der ebenfalls zu einer Abnahme der Expressionsrate führen kann (Lim 2018, Lloyd 2018).

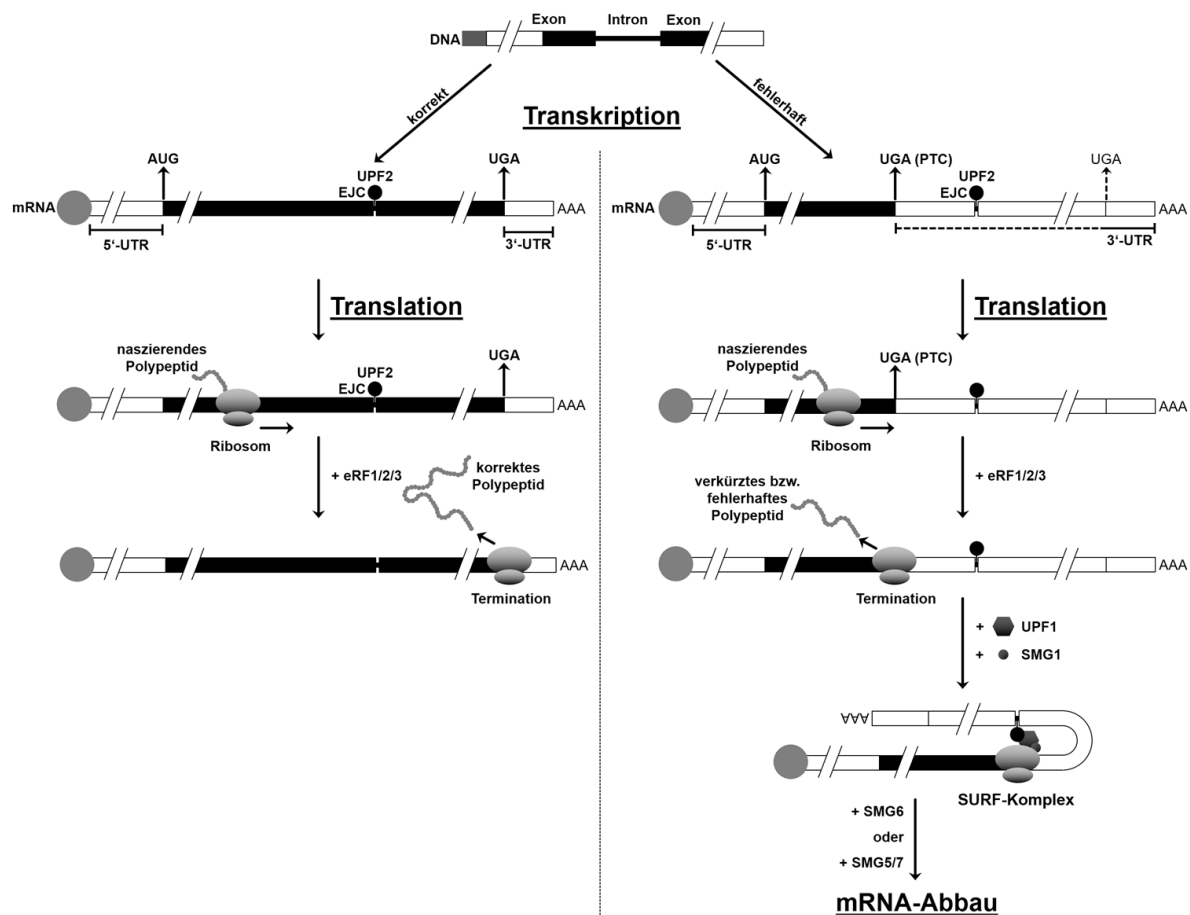
### 1.2.3 *Nonsense-mediated mRNA decay (NMD)*

Der NMD ist ein Kontrollmechanismus der mRNA-Expression und -Stabilität. Besitzt eine mRNA ein vorzeitiges Stopcodon (*premature termination codons*, PTC), so kann die Expression dieser mRNA zu verkürzten Proteinen führen, die oftmals toxisch für die produzierende Zelle sind. PTCs können zum Beispiel durch fehlerhaftes Ablesen der DNA, Leserasterverschiebungen oder Mutationen entstehen. Etwa ein Drittel aller genetisch vererbaren Krankheiten und Krebsformen werden durch PTCs verursacht (Frischmeyer 1999). Unter physiologischen Bedingungen werden diese PTCs während der ersten Translation durch Enzyme des NMD erkannt, die dann den Abbau der mRNA initiieren (Hug 2016, Lloyd 2018).

Die ersten Schritte des NMD beginnen schon beim Spleißen der hnRNA. Hierbei bleibt ein Teil der Proteine des Spleißosoms an der EEJ gebunden und bildet zusammen mit weiteren Proteinen (eIF4AIII, Y14 und UPF3 (*UP-frameshift suppressor 3*)) ca. 20–24 nt. vor der EEJ den Exon-Verbindungskomplex (*exon junction complex*, EJC). Beim Transport der mRNA in das Cytoplasma wird UPF2 an den EJC rekrutiert (Gehring 2003). Dieser EJC wird im Normalfall bei der ersten Translation durch das Ribosom von der mRNA entfernt. Wenn sich jedoch vor einer solchen Verbindungsstelle ein PTC befindet, so stoppt das Ribosom bevor es den EJC erreicht, und der EJC wird nicht entfernt (Hug 2016, Lloyd 2018, Raimondeau 2018).

Der Abbau der mRNA wird nun durch die Interaktion von UPF1 (*UP-frameshift suppressor 1* (Culbertson 1980), auch Rent1) mit UPF2 und dem EJC sowie durch die Phosphorylierung von UPF1 durch SMG1 initiiert. Zusammen mit den *translation termination release factors* eRF1 und eRF3 am Ribosom bilden sie den sogenannten SURF-Komplex (Kashima 2006, Silva 2009). UPF1 ist damit ein Schlüsselenzym des NMD (Mendell 2002, Colombo 2017). Die weitere Degradation kann nach zwei Mechanismen ablaufen: entweder unter Beteiligung von SMG6 oder einem SMG5/7-Heterodimer (Muhlemann 2010). Wenn SMG6 beteiligt ist, kommt es durch die Endonuklease-Aktivität von SMG6 zum Schnitt der RNA am PTC und daraufhin zum Abbau der mRNA (Huntzinger 2008, Eberle 2009). Erfolgt der Abbau über das SMG5/7-Heterodimer, so werden allgemeine mRNA-Abbau-Enzyme rekrutiert. Die mRNA wird durch den CCR4-NOT-Deadenylase-Komplex deadenyliert und die 5'-cap durch *Decapping*-Enzyme, wie DCP1, DCP2 und PNRC2, entfernt (Loh 2013). Abbildung 1-3 zeigt eine schematische Darstellung des EJC-abhängigen NMD-Mechanismus.





**Abbildung 1-3: schematische Darstellung des EJC-abhängigen NMD-Mechanismus.**

Dargestellt ist ein Vergleich der Mechanismen einer normalen Translation nach korrekter Transkription auf der linken Seite und des NMD nach fehlerhafter Transkription unter Erzeugung eines PTC vor einer EJC. Bei einem PTC kommt es zu einem verfrühten Abbruch der Translation und zu einem Halt des Ribosoms am PTC. Das dabei freigesetzte Polypeptid kann funktionsunfähig sein oder sogar toxische Effekte für die Zelle haben. Bei der Erkennung eines PTC (hier UAG) vor einem EJC durch das Ribosom, kommt es zur Ausbildung des SURF-Komplexes. Dieser besteht aus SMG1, UPF1, eRF1 und eRF3. Die Bindung an UPF2 rekrutiert weitere Enzyme des NMD und führt entweder über SMG6 oder das Heterodimer SMG5/7 anschließend zum Abbau der mRNA. Abbildung nach Wilke, C.O., *PLoS Genet*, 2011. 7(10): p. e1002296. (Wilke 2011).

Die 50 nt-Regel des NMD besagt, dass sich der PTC 50 nt oder mehr von der EJC entfernt befinden muss, damit der NMD stattfinden kann (Nagy 1998, Hillman 2004). Allerdings wurden Beispiele gefunden, in denen der NMD in abgeschwächter Form auch bei einem näheren Abstand noch für den Abbau der mRNA sorgt (Neu-Yilik 2004). So wurde bei Untersuchungen des T-Zellrezeptors (TCR)- $\beta$  festgestellt, dass sogar bis zu einem Abstand von nur 19 nt noch ein NMD-Effekt zu beobachten ist (Carter 1995).

Neben der Funktion als RNA-Kontrollmechanismus zur Reduktion von PTC-haltigen mRNAs spielt der NMD auch eine zentrale Rolle in der Regulation der Genexpression, wenn keine PTCs

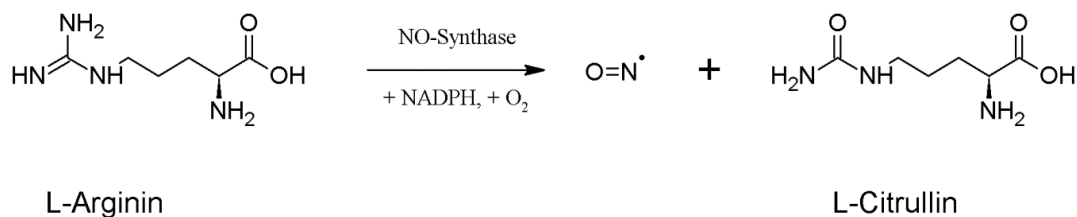
durch fehlerhafte Transkription vorhanden sind. Insbesondere unter Stressbedingungen und in der Immunantwort wurden dem NMD regulatorische Funktionen zugeschrieben (Lykke-Andersen 2015, Hug 2016). Expressionsprofil-Analysen des gesamten Genoms zeigten, dass uORF-beinhalten Transkripte in Säugetieren ein natürliches Ziel des NMD sind. Die Herunterregulation des NMD mit Hilfe einer siRNA gegen UPF1 in HeLa-Zellen erhöhte die Expression verschiedener mRNAs, die von Natur aus uORFs enthalten (Mendell 2004, Colombo 2017).

Ein wichtiger Gegenspieler des NMD ist PABP. Besitzt die mRNA eine PABP-Bindestelle, so kann das daran bindende PABP eine Interaktion mit eRF3 und damit mit dem Ribosom eingehen. Befindet sich diese Bindestelle näher am PTC, so wird durch die höhere Affinität von PABP zum Ribosom der NMD unterdrückt und die Translation weiter begünstigt. So tritt der NMD nicht nur bei PTCs auf, sondern kann auch bei sehr langen 3'-UTRs ausgelöst werden, bei denen der Abstand vom regulären Stopcodon zum Poly(A)-Ende und damit zum PABP sehr groß ist (Singh 2008).

Insgesamt betrachtet spielt der NMD somit nicht nur eine Rolle in der Reduktion fehlerhafter Transkripte, sondern auch über NMD-rekrutierende Motive der RNA (zum Beispiel uORFs, Introns nach regulären Stopcodons und lange 3'-UTRs) bei der Feinregulation der Genexpression verschiedenster Gene (Hug 2016).

### 1.3 Die induzierbare NO-Synthase

Stickstoffmonoxid (NO) ist das kleinste bekannte bioaktive Produkt von Säugetierzellen und kann in nahezu jeder Zelle produziert werden. Die Synthese von NO erfolgt durch NO-Synthasen (NOS), die unter Verbrauch von NADPH und Sauerstoff die Umwandlung von L-Arginin zu NO und L-Citrullin an einem Häm-Komplex katalysieren (Abbildung 1-4). Flavin-Adenin-Dinukleotid (FAD), Flavinmononukleotid (FMN) und (6R-)5,6,7,8-Tetrahydrobiopterin (BH<sub>4</sub>) dienen dabei als Cofaktoren (Thomas 2008).



**Abbildung 1-4: Synthesereaktion der NO-Synthasen.**

*NO-Synthasen synthetisieren NO durch die Katalyse der Reaktion von L-Arginin zu L-Citrullin unter Verbrauch von NADPH und Sauerstoff.*

Im humanen System existieren drei unterschiedliche NOS-Isoformen, die sich in ihrer Lokalisation, Struktur und Funktion unterscheiden. Die neuronale NOS (nNOS, NOS1) besitzt ihren Genlokus auf Chromosom 12 und kommt hauptsächlich in Neuronen vor, in denen das von ihr produzierte NO als Neurotransmitter dient (Förstermann 1995). Das Gen für die endotheliale NOS (eNOS, NOS3) befindet sich auf Chromosom 7 und wird hauptsächlich im Endothelgewebe exprimiert. Sie sorgt über G-Protein-gekoppelte Rezeptoren für eine Relaxation glatter Gefäßmuskelzellen und damit für eine Vasodilatation. Sie ist damit entscheidend an der Blutdruckregulation beteiligt und hat vasoprotektive und anti-atherosklerotische Wirkungen (Pautz 2010, Förstermann 2012). Sowohl die nNOS als auch die eNOS werden konstitutiv exprimiert und ihre NO-Produktion ist Ca<sup>2+</sup>-abhängig (Förstermann 1995). Die dritte NOS-Isoform ist die induzierbare NOS (iNOS, NOS2). Sie wird im Gegensatz zur nNOS und eNOS nur nach vorhergehendem Stimulus exprimiert. Dabei werden verglichen mit der nNOS und eNOS 100 bis 1000fach höhere Mengen NO produziert. Die NO-Synthese durch die iNOS ist Ca<sup>2+</sup>-unabhängig und hat durch die Reaktivität des NO hauptsächlich eine antivirale, mikrobizide, antiparasitäre und antitumorale Wirkung (Förstermann 1995, Bogdan 2000).

Der radikalische Charakter und die daraus resultierende Reaktivität des NO führen zur Nitrosylierung von DNA- und RNA-Molekülen und von Proteinen, die dadurch einen irreversiblen Funktionsverlust erleiden. Diese cytotoxischen Wirkungen stören damit den Stoffwechsel der Zellen, insbesondere von Bakterien und anderen Parasiten, weshalb die iNOS gerade bei Infektionen von Makrophagen und dem angrenzenden Gewebe exprimiert wird. Die iNOS ist damit Teil des angeborenen Immunsystems (Pautz 2010, Förstermann 2012).

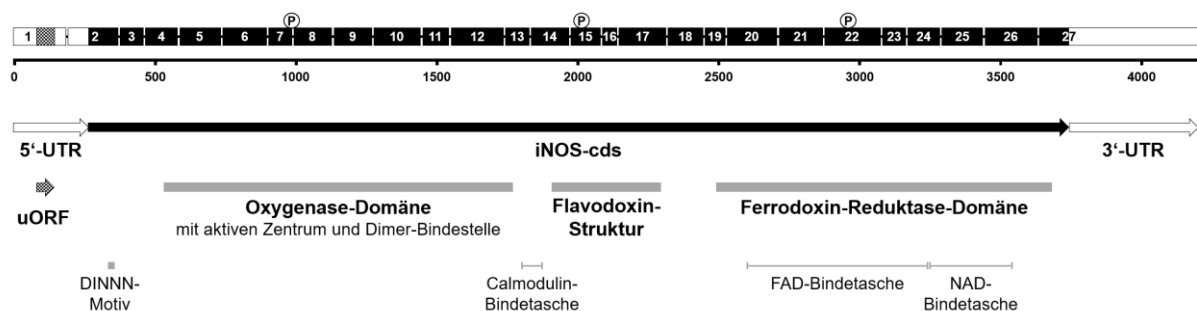
Aufgrund dieser cytotoxischen Wirkungen kann eine fehlerhafte Regulation der iNOS-Expression gefährliche Konsequenzen haben und wird mit vielen Krankheiten (wie zum Beispiel Asthma, Arthritis, Multiple Sklerose, Colitis, neurodegenerativen Erkrankungen, sowie in der Tumorentwicklung und Transplantat-Abstoßung) in Verbindung gebracht (Qidwai 2010). Besonders deutlich wird dies bei der Sepsis. Hier führt der massive Befall durch Bakterien zu sehr hohen iNOS-Expressionen in aktivierten Immunzellen, die daraufhin große Mengen NO produzieren. In den Blutgefäßen kann das so produzierte NO unter anderem zur Vasodilatation und damit zu massivem Blutdruckabfall und Organversagen, im schlimmsten Fall bis hin zum Tod führen (Kroncke 1998, Lechner 2005, Förstermann 2012). Auch im Tumorstadium wurden der iNOS sowohl positive Effekte als Abwehrmechanismus gegen die Tumorzellen, als auch negative Effekte durch Begünstigung des Tumorstadiums zugeschrieben (Bian 2012).

### 1.3.1 Die Struktur der iNOS

Das propagierte Transkript der iNOS wurde über die Zeit immer wieder untersucht und die verschiedenen funktionellen und regulierenden Strukturen aufgeklärt (Abbildung 1-5). Das iNOS-Gen ist insgesamt 43.764 bp lang und besitzt eine TATA-Box 30 bp vor dem TSS. Das aktuell postulierte Transkript (Refseq: NM\_000625.4 bzw. *Ensembl Transcript ID*: ENST00000313735.11) besteht aus 27 Exons und ist 4206 nt lang. Der Translationsstart der iNOS-cds befindet sich in Exon 2. Des Weiteren ist im ersten Exon ein uORF zu finden, dessen Stopcodon vor der ersten EEJ liegt. Das iNOS-Enzym besteht aus 1153 Aminosäuren (Pautz 2010). Verschiedene Domänen des aktiven Enzyms sind an der Katalyse beteiligt. Wie auch bei den anderen NOS stellt die Reduktase-Domäne aus dem NADPH über FAD die Elektronen

zur Verfügung, die dann weiter zur Oxygenase-Domäne transportiert werden, in deren aktiven Zentrum die Umwandlung von L-Arginin zu L-Citrullin und NO abläuft (Geller 1993, Groves 2000, Alderton 2001).

Über bestimmte Aminosäureketten der Oxygenase-Domäne erfolgt die Dimerisierung des iNOS-Proteins. Zusätzlich finden sich mehrere regulatorische Elemente in der Proteinstruktur der iNOS, wie phosphorylierte Serin- und Tyrosinreste, eine Calmodulin-Bindestelle, sowie eine Bindestelle für SPSB1, SPSB2 und SPSB4, das sogenannte DINNN-Motiv. (Groves 2000, Alderton 2001). An das DINNN-Motiv kann zum Beispiel SPSB2 über dessen SPRY-Domäne binden und den Abbau der iNOS im Proteasom durch die Rekrutierung einer E3-Ubiquitin-Ligase begünstigen (Kuang 2010, Nishiya 2011). Dies wurde zum Beispiel für die Entwicklung eines cyclischen Peptids als Inhibitor der Bindung von SPSBs genutzt, um den Abbau der iNOS zu senken und damit ihre Aktivitätsdauer zu erhöhen (Sadek 2018).

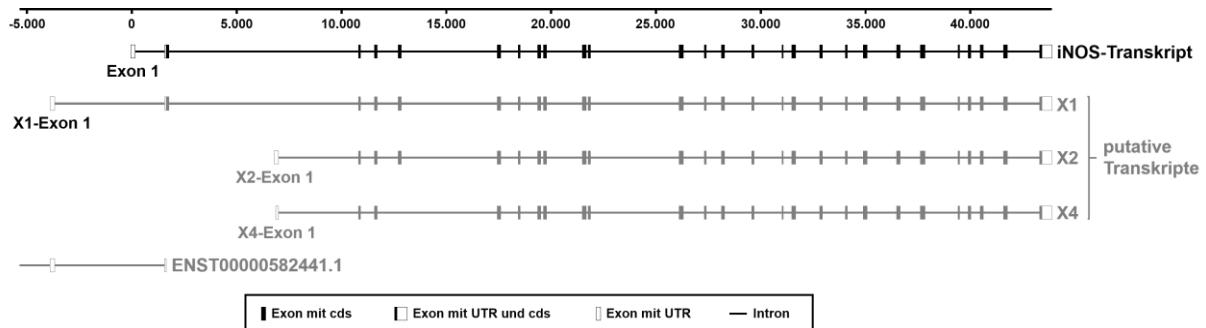


**Abbildung 1-5: Struktur des iNOS-Transkripts mit den wichtigsten Domänen und Phosphorylierungsstellen.**

Dargestellt ist die Struktur des iNOS-Transkripts. Es besteht aus 27 Exons (Kästchen oberhalb der Skala) und ist 4206 nt lang. In Exon 1 befindet sich ein uORF, der für 21 AS kodiert. Die eigentliche cds der iNOS beginnt in Exon 2. Die den einzelnen Bereichen der cds zugeordneten Domänen und Modifikationen des iNOS-Proteins sind ebenfalls dargestellt. Hierzu gehören das DINNN-Motiv im durch Exon 2 kodierten Proteinabschnitt, die Oxygenase-Domäne mit aktivem Zentrum und Dimer-Bindestelle und die Ferredoxin-Reduktase-Domäne mit den Bindetaschen für FAD und NAD. Auch die Phosphorylierungsstellen sind an den Exons dargestellt, die für die Aminosäuren kodieren, die am Protein phosphoryliert vorliegen können (Groves 2000, Alderton 2001, Kuang 2010, Nishiya 2011).

In älteren Veröffentlichungen (siehe Abbildung 1-6 und NCBI Homo sapiens *annotation release* 108, 07.06.2016) sind noch drei weitere potenzielle Transkripte mit einem anderen TSS annotiert. Die aktuell veröffentlichte Transkriptvariante entspricht dabei der Transkriptvariante X3 (mRNA-ID: XM\_011524861.1). Ihre Sequenz ist bis auf das Fehlen von Exon 13 nahezu vollständig identisch mit der ersten Veröffentlichung des iNOS-Transkripts (Chartrain 1994). Die anderen Transkriptvarianten (X1, X2 und X4) entsprangen im Gegensatz zum

regulären iNOS-Transkript Berechnungen aus dem Havana-Projekt und der Ensembl-Datenbank, sind aber zum aktuellen Stand bis auf eine abgewandelte Version von X2 auch nicht mehr in deren Veröffentlichungen zu finden (Zerbino 2017).



**Abbildung 1-6: reguläres iNOS-Transkript im iNOS-Gen und weitere putative Transkripte**

Dargestellt sind das reguläre iNOS-Transkript sowie die verschiedenen putativen Transkriptvarianten (X1, X2 und X4) der Veröffentlichung 108 des NCBI Genome Browsers vom 07.06.2016 in der Umgebung des iNOS-Gens. Die Rechtecke markieren die Exons, wobei ausgefüllte Rechtecke den Bereich der jeweiligen iNOS-cds markieren. Transkript X3 entspricht dem regulären iNOS-Transkript, das in der Veröffentlichung 109 mit Stand vom 01.04.2019 als einziges iNOS-Transkript annotiert ist (Veröffentlichung der Transkripte: NCBI Homo sapiens annotation release 108, 07.06.2016). Die Skala dient zur Orientierung. Das erste Nukleotid der Transkriptvariante 3 wurde dabei als Ursprung genutzt. Außerdem ist die Nomenklatur der ersten Exons der verschiedenen Transkriptvarianten angegeben. ENST00000582441.1 ist ein annotiertes Transkript, dessen letzten beiden Exons identisch mit dem X1-Exon 1 und einem Teil des regulären Exon 2 sind.

Die potenzielle Transkriptvariante X1 (mRNA-ID: XM\_011524861.1) besäße einen TSS der deutlich vor dem TSS der regulären iNOS liegt. Dadurch besäße diese Variante statt des regulären ersten Exons ein anderes Exon 1 (im folgenden X1-Exon 1). Das Transkript würde sich dementsprechend ebenfalls aus 27 Exons zusammensetzen und das Startcodon der cds befände sich ebenfalls auf Exon 2, wodurch diese Transkriptvariante für das gleiche iNOS-Protein kodieren würde.

Transkriptvariante X2 (mRNA-ID: XM\_011524860.2) wäre kürzer als das reguläre iNOS-Transkript. Anstelle von Exon 1 und 2 besäße es ein alternatives erstes Exon (im folgenden X2-Exon 1), auf dem sich auch der Transkriptionsstart der X2-iNOS befände. Eine vergleichbare Sequenz befindet sich unter dem Gen-Namen NOS2-203 (*Ensembl Transcript ID* ENST00000646938.1) auch in der Ensembl-Datenbank (Zerbino 2017).

Transkriptvariante X4 (mRNA-ID: XM\_011524860.2) wäre noch ein Stück kürzer als die Transkriptvariante X2. Ihr Exon 1 (X4-Exon 1) ist identisch mit dem hinteren Teil des

potenziellen X2-Exon 1. Außerdem würde Exon 5 des regulären iNOS-Transkripts fehlen. (Veröffentlichung der Transkripte: NCBI Homo sapiens *annotation release 108*, 07.06.2016).

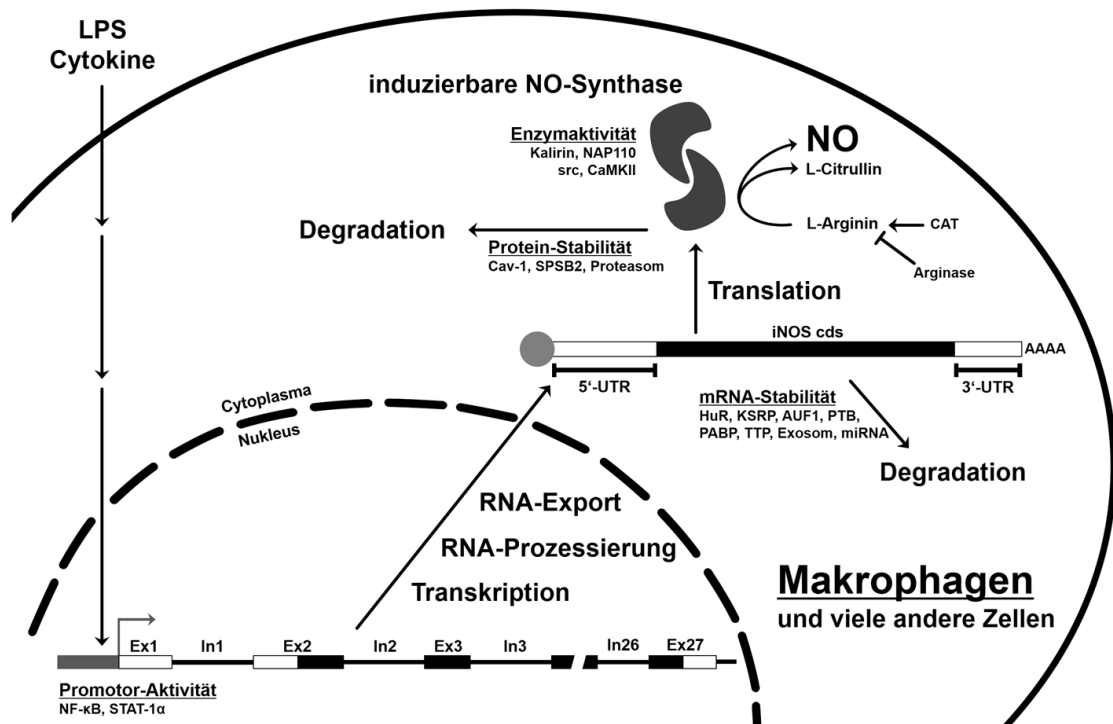
Diese potenziellen Transkriptvarianten beruhen auf Computerberechnungen oder RNAseq-Daten und konnten bis dato nicht auf andere Weise verifiziert werden, weshalb sie vermutlich bis auf NOS2-203 in der aktuellen Veröffentlichung nicht mehr erwähnt wurden.

Shan Chu et al. veröffentlichten 1995 auch eine Diversität in der 5'-UTR des iNOS-Transkripts. Dabei entsprach der Großteil der 5'-UTR des regulären Transkripts. In ein paar Transkripten fehlte allerdings das Exon 1 oder es gab ein zusätzliches Exon *upstream* vom bekannten iNOS-TSS (Chu 1995). Auch diese möglichen Transkripte sind nicht in den bekannten Referenz-Datenbanken zu finden.

Die Anwesenheit von möglichen Spleißvarianten des iNOS-Transkripts wurde ebenfalls bereits veröffentlicht. So existieren nach Tony Eissa et al. verschiedene Spleißvarianten in denen zum Beispiel das Exon 5 oder die Exons 15 und 16 fehlen (Eissa 1996). Nur die Isoform, bei der Teile von Exons 8 und 9 fehlen und daher eine Dimerisierung der iNOS nicht mehr möglich ist (Eissa 1998), ist unter der Transkriptvariante NOS2-202 im Ensembl *Genome browser* (*Ensembl Transcript ID: ENST00000621962.1*) zu finden. Alle anderen potenziellen Isoformen nach Tony Eissa et al. wurden nicht in die *Genome Browser* des NCBI, des Ensembl-Projektes oder des USCS aufgenommen.

### **1.3.2 Regulation der iNOS-Expression**

Aufgrund der beschriebenen cytotoxischen Wirkungen der iNOS bzw. des durch sie produzierten NO kann eine fehlerhafte Regulation ihrer Expression negative Konsequenzen für die exprimierenden Zellen, die Zellumgebung bis hin zum ganzen Organismus haben. Ein grundlegendes Verständnis der Regulationsmechanismen ist daher von essenzieller Bedeutung, um das fein abgestimmte System zu verstehen und potenzielle Ziele für die Therapie iNOS-gesteuerter und -beeinflusster Erkrankungen zu finden (Pautz 2010). Einige Mechanismen, die bei der iNOS-Expression eine Rolle spielen, sind in Abbildung 1-7 dargestellt.



**Abbildung 1-7: Regulation der iNOS in Makrophagen und anderen Zellen.**

Dargestellt sind die verschiedenen Regulationsmöglichkeiten der iNOS-Aktivität und -Expression. Die Abbildung ist der Abbildung in Pautz, A. et al., *Nitric Oxide*, 2010. **23**(2): p. 75-93 entlehnt. Nach Stimulation der Makrophagen (und vieler anderer Zellen) mit LPS oder Cytokinen wie  $TNF\alpha$ ,  $IL1\beta$  und  $INF\gamma$  wird über Signalkaskaden die Promotoraktivität durch die Transkriptionsfaktoren  $NF\kappa B$  und  $STAT1$  reguliert. Weitere Ebenen der Regulation sind in der Transkription zu finden. Wichtige Regulationsmechanismen befinden sich auf der Ebene der post-transkriptionellen Regulation, wie der RNA-Prozessierung und dem RNA-Export sowie der mRNA-Stabilität. Auch auf Proteinebene gibt es Regulationsmechanismen, die vor allen in der Substratverfügbarkeit über kationische Aminosäuretransporter (CAT) und Arginasen sowie in der Proteinstabilität und der Enzymaktivität liegen (Pautz 2010).

Die Expression der iNOS wird durch transkriptionelle und post-transkriptionelle Regulationsmechanismen kontrolliert (Pautz 2010). Bei der Analyse der Promotoraktivität durch Transfektionsanalysen mit einem 16 kb großen Promotorfragment der humanen iNOS in DLD1-, AKN- und A549-Zellen zeigte sich eine niedrige basale Aktivität. Nach Behandlung der Zellen mit einem Cytokinmix (CM), bestehend aus  $TNF\alpha$ ,  $IL1\beta$  und  $INF\gamma$ , erfolgte eine Induktion der iNOS-Expression um den Faktor 5–10. An der Regulation der Promotoraktivität sind hauptsächlich die Transkriptionsfaktoren Nuklearer Faktor  $\kappa B$  ( $NF\kappa B$ ) und *signal transducers and activators of transcription 1* (STAT1) beteiligt, die beide die zentralen Zielproteine in der Aktivierung und Inhibition der iNOS-Expression zu sein scheinen. Die Zugabe von LPS,  $TNF\alpha$ ,  $IL1\beta$  sowie die Erzeugung oxidativen Stresses in verschiedenen Zelltypen führten zur Induktion



der iNOS-Expression über NFκB. Im Gegensatz dazu wirkt sich die Inaktivierung von NFκB durch TGFβ1, Glucocorticoide oder Antioxidantien wie Pyrrolidindithiocarbamat (PDTCT) hemmend auf die iNOS-Expression aus (Kleinert 1998, Pautz 2010).

Neben der Regulation der Promotoraktivität über Transkriptionsfaktoren spielt auch die Zugänglichkeit der DNA eine wichtige Rolle in der Aktivierung und Expression der iNOS. Untersuchungen zum Methylierungsgrad an CpG-Dinukleotiden im Promotorbereich der iNOS zeigten Unterschiede zwischen verschiedenen Zelllinien. Dabei besaßen Zellen, deren iNOS-Expression durch Cytokine induzierbar war, einen niedrigeren Methylierungsgrad, als Zellen, die nicht stimulierbar waren. Bei Gabe von 5-Azacytidin, einem DNA-Methyltransferase-Inhibitor, sank sowohl der globale als auch der iNOS-Promotor-spezifische Methylierungsgrad der CpGs. Dadurch stieg die Induzierbarkeit der iNOS-Expression an (Chan 2005).

Analysen der iNOS-mRNA-Expression ergaben, dass in DLD1-, AKN- und A549-Zellen in Abwesenheit von Cytokinen keine mRNA detektiert werden konnte. Dies steht im Gegensatz zur vorher in Transfektionsanalysen beschriebenen basalen Promotoraktivität, die auch ohne Cytokinstimulation messbar war. Zusätzlich wurde gezeigt, dass eine Stimulation mit Cytokinen zu einer mehr als 50fachen Induktion auf der mRNA-Ebene führt. Im Vergleich dazu war bei den Promotoraktivitätsanalysen nur eine 5 bis 10fache Induktion festgestellt worden. Diese Tatsache spricht dafür, dass noch weitere post-transkriptionelle Mechanismen, eine wichtige Rolle in der Regulation der iNOS-Expression spielen (Pautz 2010). Es konnte bereits gezeigt werden, dass besonders RNA-BP, wie zum Beispiel HuR und KSRP (Pautz 2010), sowie miRNAs, wie miR-26a und miR-939, durch ihre Interaktion mit der 5'- oder 3'-UTR der humanen iNOS-mRNA an der Regulation der iNOS beteiligt sind (Guo 2012, Rasheed 2016). Gerade die 3'-UTR der iNOS bietet mit ihren vielen AU-reichen Elementen (AREs) eine gute Möglichkeit für die Bindung von RNA-BPs, die meist destabilisierend auf mRNAs proinflammatorischer Proteine wirken (Geller 1998, Eberhardt 2007). So bindet zum Beispiel das *KH-type splicing regulatory protein* (KSRP) an die AREs der iNOS-mRNA und beschleunigt so deren Abbau über das Exosom (Linker 2005). HuR wiederum bindet an die gleichen AREs und führt zu einer Stabilisierung der mRNA (Rodriguez-Pascual 2000).

Auch auf Proteinebene gibt es Formen der Regulation und Interaktion. So kann die Enzymaktivität durch den Entzug des Substrats L-Arginin reguliert werden. Dabei spielen zum Beispiel die Arginase und Transportproteine kationischer Aminosäuren (*cationic amino acid*

*transporter*, CAT) eine wichtige Rolle. Auch der Entzug von Cofaktoren wie BH<sub>4</sub> kann die Enzymaktivität beeinflussen (Pautz 2010). Der Abbau der iNOS wird zusätzlich über das DINNN-Motiv am N-Terminus des Enzyms reguliert. Durch Bindung von Enzymen, die eine SPRY-Domäne enthalten (zum Beispiel die SPSBs) kann die E3-Ubiquitin-Ligase rekrutiert und durch die Ubiquitinierung der Abbau der iNOS im Proteasom begünstigt werden (Kuang 2010, Nishiya 2011).

## 1.4 Neuronale Differenzierung

In Zeiten des demographischen Wandels nimmt auch die Häufigkeit vieler altersspezifischer, insbesondere neurodegenerativer, Krankheiten zu (Rocca 2018). Zusätzlich scheint auch ein geänderter Lebensstil zu einer Häufung solcher Erkrankungen, wie zum Beispiel Parkinson, zu führen (Savica 2016). Humane induzierte pluripotente Stammzellen (*human induced pluripotent stem cells*, hiPSCs) bergen durch ihre Differenzierbarkeit zu Neuronen und neuronalen Vorläuferzellen das Potential sowohl in der regenerativen Medizin als auch in der Erforschung von Krankheiten als Krankheitsmodell und in der Entwicklung neuer Arzneimittel eine Anwendung zu finden. Die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse und Differenzierungsbedingungen sowie die möglichst große Nähe zum tatsächlichen Differenzierungsablauf der Zellen im menschlichen Körper spielen dabei eine entscheidende Rolle. Außerdem ist es notwendig große Mengen undifferenzierter Stammzellen ausschließen zu können, da sie nicht nur die Spezifität der Untersuchungen beeinflussen können. Sie neigen zu unspezifischen Differenzierungen und können zu Stammzelltumoren führen, wodurch sie bei einer möglichen Anwendung von neuronalen Vorläuferzellen (NPCs) und anderen Vorstufen in der Transplantations-therapie eine große Gefahr darstellen (Conti 2010, Rodrigues 2014).

Die Differenzierungsprotokolle für solche Untersuchungen und möglichen Therapieansätze orientieren sich an der natürlichen Entwicklung von Neuronen beim menschlichen Embryo. Dabei entwickelt sich nach der Befruchtung der Eizelle im Mutterleib aus der Zygote über die Blastomere zunächst der Embryoblast, der sich weiter in das äußere (Ektoderm) und das innere Keimblatt (Entoderm) sowie den Trophoblast spaltet. Der Trophoblast dient im Nachfolgenden der Verbindung zum mütterlichen Gewebe und der Ernährung des Embryos. In der 3. Entwicklungswoche bildet sich aus einigen abwandernden Zellen des Ektoderms das Mesoderm als drittes Keimblatt. Während sich aus dem Entoderm hauptsächlich die Epithelien des Darm, der Atmungsorgane und die damit verbundenen Drüsen bilden, entsteht aus dem Mesoderm vor allem Bindegewebe, Knorpel, Knochen, Muskelzellen und die Zellen des Blutes und der Lymphe (Mutschler 2007, Vieira 2010). Das Ektoderm entwickelt sich zum Teil weiter zur Neuralplatte, die sich durch morphologische Veränderung in der sogenannten Neurulation zum Neuralrohr formt, aus dem sich später das Gehirn und das Rückenmark bilden. Aus dem restlichen Ektoderm formen sich das Epithel der Haut und das Sinnesepithel von Nase, Ohr

und Auge. Insgesamt entsteht so das gesamte Nervensystem aus dem Ektoderm (Colas 2001, Conti 2010).

Um gezielt aus hiPSCs oder hESCs Neurone zu differenzieren, wird sich an dieser Entwicklung des Nervensystems orientiert und es werden die schon bekannten Mechanismen genutzt, um eine effiziente Entwicklung von Neuronen zu bewerkstelligen. Dafür wurde das Protokoll der dual-SMAD Inhibition entwickelt (Chambers 2009, Rodrigues 2014). Durch Zugabe von SMAD-Inhibitoren wird die Entwicklung von Meso- und Entodermzellen sowie Trophoblastenzellen geblockt und die Entwicklung des Neuroektoderms gefördert, sodass sich >80 % der hiPSCs zu Neuronen entwickeln (Chambers 2009). Die Effektivität kann weiter erhöht werden durch die Aufreinigung über magnetische Zellsortierung (*magnetic activated cell sorting*; MACS) anhand hiPSCs-spezifischer Antigene (Rodrigues 2014) oder durch Verwendung spezifischer Medien und Wachstumsfaktoren (Koch 2009, de Boni 2018). Über die Zeit wurden die anfangs eingesetzten Proteine sowie die Verwendung sogenannter *Feeder*-Zellen, die für die Versorgung und Lebenserhaltung der Stammzellen eingesetzt wurden, immer mehr durch *small molecules*, also kleine organische, leichter zu synthetisierende Moleküle, ersetzt (Morizane 2011, Chambers 2012). Verschiedene Plattformen und Konsortien entwickeln Standards und stellen Protokolle und Zelllinien zur Verfügung. Ein Beispiel dafür ist die *European Bank for induced pluripotent Stem Cells* (EBiSC; <https://ebisc.org/>) (Rodrigues 2014, De Sousa 2017).

Die spezifische Differenzierung ist hierbei nach dem aktuellen Stand schon sehr weit und die Protokolle werden stetig verbessert. Dennoch ist es weiterhin wichtig, entscheidende Schritte und Mechanismen in der Neurogenese zu kennen und gezielt adressieren zu können (Rodrigues 2014, De Sousa 2017).

Aber nicht nur die vollständige Differenzierung von Neuronen ist für die Forschung von Interesse, auch die Verwendung stabiler Zwischenstufen birgt ein hohes Potential zur Aufklärung entscheidender Mechanismen in der Entwicklung. Stabile NPCs bieten daher die Möglichkeit bestimmte Stufen der Entwicklung von Neuronen nachzustellen und zugrundeliegende Mechanismen genauer zu untersuchen. So gibt es Zellen, die mit Zugabe von *small molecules* generiert und in ihrem Entwicklungsstadium gehalten werden. Sie werden *small molecule NPCs* (sm-NPCs) genannt (Reinhardt 2013, Sheng 2018). Eine weitere NPC-Linie sind die lt-NES (*long-term self-renewing neuroepithelial stem cell*), die das erste Mal aus hESCs generiert wurden. Diese Neuroepithel-Stammzellen können sich über einen langen Zeitraum

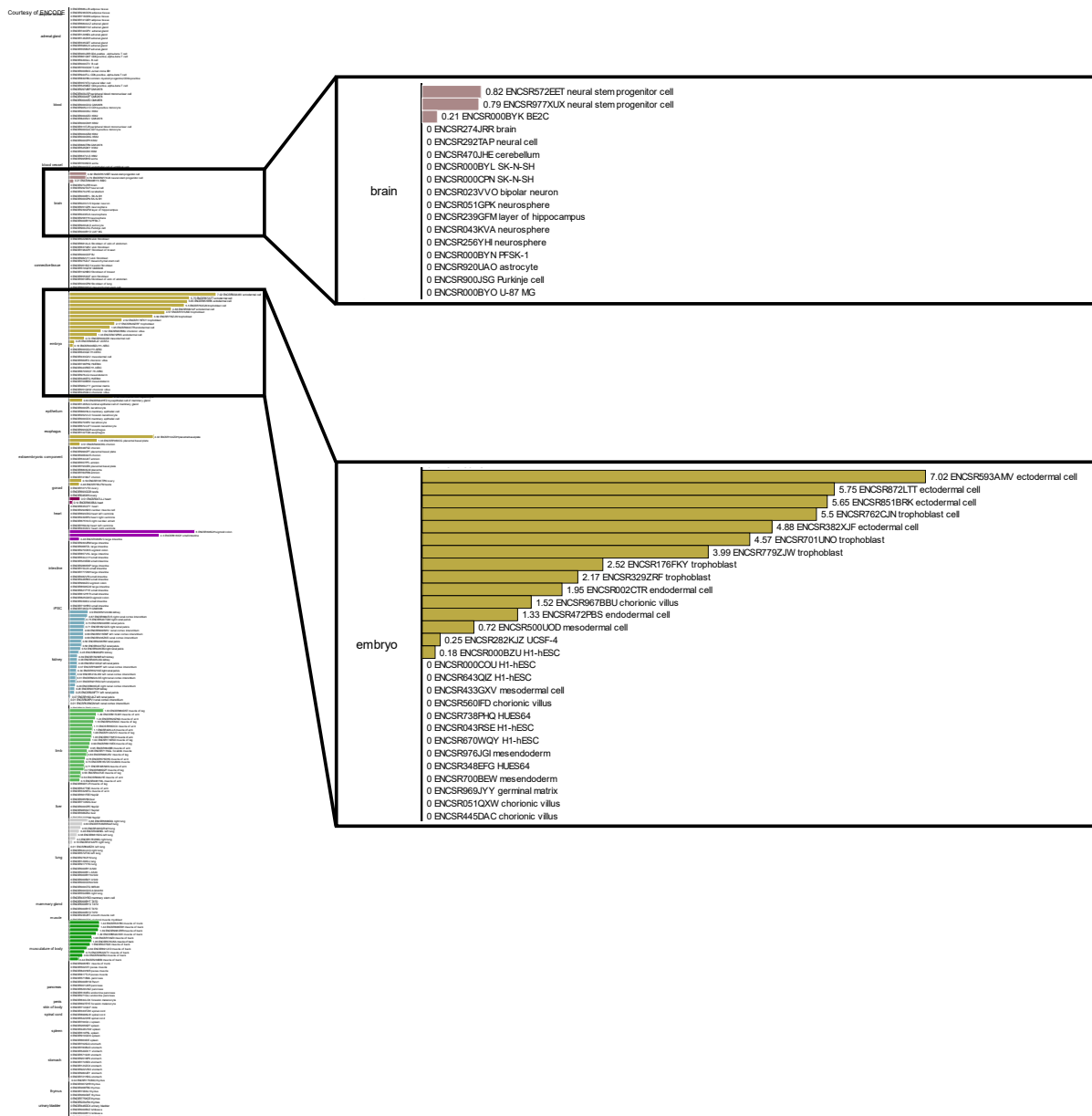
selbst erneuern (Koch 2009), sind bezogen auf den Differenzierungsgrad näher an den ausgereiften Neuronen als die sm-NPCs und lassen sich auch aus hiPSCs entwickeln (Roese-Koerner 2016). Noch näher an ausdifferenzierten Zellen sind RGL-NPCs (*hindbrain/spinal cord radial glia (RG)-like neural precursor cells*), neuronale Vorläuferzellen die eine Radialglia-ähnliche Morphologie besitzen (Gorris 2015). Damit ergibt sich ein breites Spektrum an Zelllinien, die als Grundlage für die Erforschung der neuronalen Entwicklung und neuronaler Erkrankungen genutzt werden können (Conti 2010, Sheng 2018).

#### **1.4.1 NO in der neuronalen Entwicklung**

Bei Untersuchungen zur neuronalen Entwicklung konnte auch ein wesentlicher Einfluss von NO auf eben diese festgestellt werden (Gibbs 2003). So wiesen Nazanin Haghghat et al. nach, dass eine erhöhte NO-Konzentration in mesenchymalen Stammzellen des Knochenmarks der Ratte eine erhöhte Expression neuronaler Differenzierungsgene (Nestin und DCX) und eine morphologische Änderung zu Neuronen zur Folge hat (Haghghat 2017). Andererseits wurde die Teratogenität von sowohl zu hohen als auch zu niedrigen NO-Konzentrationen während der embryonalen Entwicklung in weiteren Studien belegt (Brown 2010, Tiboni 2014). So führte die Gabe von L-NMMA, einem NOS-Inhibitor, an Rattenembryos zu Defekten am Neuralrohr, während die Gabe von Natrium-Nitroprussid (SNP), einem NO-Donor, zu massivem Zelltod im Mesencephalon führte (Lee 1994).

Das produzierte NO steht dabei in direktem Zusammenhang mit der Expression der verschiedenen NOS (Chong 2018). Nicht nur die Gabe von NOS-Inhibitoren, sondern auch die Überexpression der verschiedenen NOS kann dazu führen, dass die Proliferation von neuronalen Stammzellen oder NPCs gestört wird. Dahingegen konnten auch positive Effekte der Expression von NOS in NSCs und NPCs beobachtet werden. So führte eine durch den *leukemia inhibitory factor* (LIF) erhöhte Expression der iNOS in olfaktorischen Epithelzellkulturen, olfaktorischen NPCs und *Neurosphere*-Kulturen zu einer erhöhten Proliferation. Die Gabe eines LIF- oder iNOS-Inhibitors senkte den Proliferationsgrad. Dieser Effekt konnte mit der Gabe eines NO-Donors wieder aufgehoben werden (Lopez-Arenas 2012). Weiterhin wurde ein Zusammenhang zwischen SOX2 (ein Stammzellmarker) und iNOS festgestellt, wobei beobachtet wurde, dass beide Proteine nur zu bestimmten Zeiten und in bestimmten Stufen in der Neurogenese exprimiert werden (Palumbo 2017). Diese Abhängigkeit vom Zeitpunkt konnte

auch in der olfaktorischen (Arnhold 1997) und vestibulo-okulären Rezeptorzellgenese in der Maus beobachtet werden (Arnhold 1999, Arnhold 2002). Verschiedene Mutationen des iNOS-Gens tauchen zudem in Zusammenhang mit Depressionen (Galecki 2011) und teratogenen Veränderungen bei der Schließung des Neuralrohrs auf (Tiboni 2014). Weitere Analysen zeigten, dass die iNOS am Wachstum humaner Gliom-Zellen und damit an der Entwicklung von Hirntumoren beteiligt ist (Eyler 2011, Palumbo 2018).



**Abbildung 1-8: ENCODE-Daten zur iNOS-mRNA-Expression in verschiedenen Zelltypen und Geweben.**

Dargestellt ist das Expressionsprofil der iNOS in verschiedenen Zell- und Gewebetypen, das über RNAseq-Daten ermittelt und im ENCODE-Projekt zusammengefasst wurde. Die vollständige Liste kann dem ENCODE-Browser entnommen werden (<http://screen.encodeproject.org/search/?q=NOS2&uuid=0&assembly=hg19>, 12.07 2019).

Es gibt viele Studien, die sich in Zeiten von RNAseq-Analysen und *next generation sequencing* (NGS) mit dem Transkriptom verschiedener Zellen beschäftigen. Im Projekt der *Encyclopedia of DNA elements* (ENCODE-Projekt) sind viele dieser Daten zusammengefasst (Consortium 2012). Ein Überblick der gemessenen iNOS-Expressionen mit Hervorhebung der Expression in humanem Gehirn- und Embryonalgewebe ist in Abbildung 1-8 zu sehen. Insbesondere in NPCs und im Ektoderm werden hohe iNOS-Expressionen gemessen (Consortium 2012).

Damit spielt sowohl der Grad der Expression der NOS, insbesondere der iNOS, als auch die richtige Menge des erzeugten NOs eine wichtige Rolle für die erfolgreiche und gesunde Entwicklung von Neuronen. Umgekehrt stehen die Einflüsse von NO auf die Neurogenese in direktem Zusammenhang mit der Expression der NOS (Chong 2018).

Umso wichtiger ist es, die Regulation der iNOS in der Neurogenese zu erforschen und zu verstehen, um somit das Potential als möglichen Faktor in der Erzeugung von verschiedenen NPCs, in der Therapie neurodegenerativer Erkrankungen und in der Qualitätskontrolle der Differenzierung abschätzen zu können. Auch zum Verständnis der embryonalen Entwicklung und der verschiedenen Stufen bis zum ausgereiften Organismus, kann die Erforschung der iNOS und der damit zusammenhängenden Mechanismen beitragen. Es stellt sich die Frage, ob eine generelle Abgrenzung von der Regulation und Funktion in der Immunantwort möglich ist.

## 2 ZIELSETZUNG

Das durch die iNOS produzierte NO nimmt eine wichtige Rolle sowohl in physiologischen als auch pathophysiologischen Prozessen des menschlichen Körpers ein. Aufgrund seiner zytotoxischen Wirkungen kann eine fehlerhafte Regulation der iNOS-Expression gefährliche Konsequenzen haben und wird mit vielen Krankheiten in Verbindung gebracht (Qidwai 2010). Daher ist es besonders wichtig die verschiedenen Regulationsmechanismen der iNOS-Expression zu erforschen, um das fein abgestimmte System zu verstehen und potenzielle Ziele für die Therapie solcher Erkrankungen zu finden (Pautz 2010). Einen wichtigen Teil in der Regulation der iNOS nehmen dabei die untranslatierten Regionen (UTR) der mRNA ein. Ihre Struktur und die Anwesenheit von verschiedenen RNA-BP-Motiven trägt wesentlich zur posttranskriptionellen Regulation der Genexpression bei (Misquitta 2001, Mazumder 2003, Hinnebusch 2016).

Ein besonderes Merkmal des postulierten iNOS-Transkripts ist ein uORF, dessen Stopcodon sich kurz vor dem ersten Intron in der 5'-UTR der iNOS befindet (Pautz 2010). Dies deutet auf vielfältige Regulationsmöglichkeiten der iNOS-Expression hin, die bis dato noch nicht untersucht wurden. Im Rahmen dieser Doktorarbeit sollte nun die Rolle der 5'-UTR und des darin befindlichen uORF auf die iNOS-Expression untersucht werden.

Neben der Rolle im Immunsystem spielt die iNOS auch eine wichtige Rolle in der Entwicklung von Nervenzellen. Die genauen Mechanismen dahinter sind allerdings bisher nicht vollständig bekannt (Gibbs 2003, Chong 2018). In Zeiten immer mehr aufkommender neurodegenerativer Erkrankungen, wie zum Beispiel Parkinson, steigt auch der Bedarf an grundlegendem Verständnis der Neurogenese zur Schaffung neuer Therapieansätze. Hierfür sollen in dieser Doktorarbeit erste Grundlagen für das Verständnis der Funktion der iNOS in der neuronalen Entwicklung und damit abseits des Immunsystems durch Analyse ihrer Expression und Struktur in Abhängigkeit von der Differenzierung geschaffen werden, um damit ihr Potential in der Therapie neurodegenerativer Erkrankungen und in der Qualitätskontrolle der Differenzierung zu ergründen.



### 3 MATERIAL

#### 3.1 Laborgeräte

Die während der Doktorarbeit verwendeten Geräte sind in Tabelle 3-1 aufgelistet.

Tabelle 3-1: verwendete Geräte mit Angabe der Hersteller

Funktion	Gerät	Bezeichnung	Hersteller
Elektrophorese	Gleichstromquelle für die Agarose-Gelelektrophorese	GPS 200/400	Pharmacia
	Gleichstromquelle für die SDS-PAGE und für die Semi-Dry-Blotter	Power Pac Basic Power Pac HC	Biorad
	Horizontal-Gelelektrophorese-Kammer		Biorad
	Vertikal-Gelelektrophorese-Kammer	Mini-Protean 3 Cell	Biorad
	Semi-Dry-Blotter	Trans-Blot	Biorad
Kühlung	+4 °C-Kühlschrank	Profi line	Liebherr
		verschiedene Modelle	Bosch
	-20 °C-Gefrierschrank	Protan Comfort	Liebherr
	-80 °C-Gefrierschrank	Herafreeze	Heraeus
Messung	Chemilumineszenz-Detektor	ChemiDoc™ XRS	Biorad
	Platten-Luminometer	Centro LB 960	Berthold
	PCR-Gerät	MyCycler	BioRad
		MyiQ Cycler	
		CFX Connect™	
	pH-Meter	Wtw	InoLab
Spektrometer	NanoDrop-2000	NanoDrop	
	Sunrise	Tecan	
Präzisionswaagen	Analytic AC120 S (0,1 mg/121 g)	Satorius	
	Kern 444-35 N (0,01400 g)	Kern	
	Kern PCB (0,14000 g)	Kern	

<b>Funktion</b>	<b>Gerät</b>	<b>Bezeichnung</b>	<b>Hersteller</b>
Pipetten	Einkanalpipetten	0,510 µl	Brand
		10100 µl	Und
		1001000 µl	Eppendorf
	Mehrkanalpipette	Multipette Plus (0,510 µl)	Eppendorf
	Pipettierhilfe	Pipetboy	IBS
Zellkultur	Brutschrank	Hera Cell 150	Heraeus
	Mikroskop	Leica DMIL	Leica
	Sterile Werkbank	Herasafe	Heraeus
	Zählkammer	Neubauer-Zählkammer	Labotec
Zentrifugen	Kühlzentrifuge	MicroStar 17R	VWR
		Megafuge 1.0R	Heraeus
		Biofuge fresco	Heraeus
		Avanti™ J-30 I	Beckmann
Tischzentrifuge	Biofuge 12	Heraeus	
	Galaxy Mini	Merck	
Sonstige Geräte	Autoklav	Laboklav	VWR
	Bunsenbrenner	Fireboy eco	IBS
	Eismaschine		Ziegara
	Heizblock		Peqlab
	Inkubationsschrank	B28	Binder
	Magnetrührer	Ikamag RCT	IKA
		Combimag RCT	Labortechnik
		Big-Squid Ikamag	
	Mikrowelle		MDA
	Präzisionswaagen	Kern 444-35 n, Kern EW	Kern
		KS 250 Basic	IKA
	Schüttler	Innova® 40	NBS
		DRS-12	NeoLab
	Ultraschallbad	Bioruptor plus	Diagenode
	UV-Transilluminators		Intas
Vakuumpumpe	Vacunsafe Comfort	IBS	
Wasseraufbereitung	Milli-Q plus	Millipore	
Wasserbad	Julabo TW20	Julabo	

## 3.2 Verbrauchsmaterialien

Die während der Doktorarbeit verwendeten Verbrauchsmaterialien sind in Tabelle 3-2 aufgelistet.

Tabelle 3-2: verwendete Verbrauchsmaterialien mit Angabe der Hersteller

Artikel	Beschreibung	Hersteller
Beschichtete Gewebekultur-Petrischalen	Durchmesser: 9,4 cm; Wachstumsfläche: 58 cm <sup>2</sup>	Cellstar
Einweg-Auslaufpipetten	5 ml	Greiner
	10 ml	
	25 ml	
Kunststoff-Pipettenspitzen	0,5-10 µl	Greiner/ Sarstedt
	10-100 µl	
	100-1000 µl	
Reaktionsgefäße	0,2 ml	Peqlab/ Sarstedt
	1,5 ml	
	2,2 ml	
	5 ml	
Zellkulturflaschen Filter Top	25 cm <sup>2</sup> (50 ml)	Greiner
	75 cm <sup>2</sup> (250 ml)	
6-Loch-Zellkulturplatten	Kulturfläche je Vertiefung: 9,6 cm <sup>2</sup>	Cellstar
24-Loch-Zellkulturplatten	Kulturfläche je Vertiefung: 1,75 cm <sup>2</sup>	Cellstar
Parafilm		Parafilm
Zellschaber	steril, 24 cm	TPP
PCR-Gefäße	96-Loch-Platte für cDNA-Synthese	Biozym
	96-Loch-Platte für qRT-PCR	Greiner
	8-Loch-Streifen mit Deckel	Peqlab
Zentrifugenröhrchen	15 ml und 50 ml	Greiner
Nitrocellulose-Membran	Protran BA 83	Whatman
Whatman 3 mm Papier	3469	Whatman

## 3.3 Puffer, Lösungen und Reagenzien

### 3.3.1 Reagenzien

In Tabelle 3-3 sind die während der Doktorarbeit verwendeten Chemikalien und vorgefertigten Medien aufgelistet.

Tabelle 3-3: verwendete Chemikalien und vorgefertigte Medien mit Angabe der Hersteller

Substanz	Hersteller
Acrylamid 4K-Lösung (30 %) Mix 29:1	Roth
Adenosintriphosphat (ATP)	AppliChem
Agarose	Roth
Ammoniumchlorid	Sigma Aldrich
Ampicillin	Roth
APS (Ammoniumperoxodisulfat)	Sigma Aldrich
Bradford-Reagenz	BioRad
Bromphenolblau	Sigma Aldrich
BSA (Bovines Serum Albumin, Fraktion V)	AppliChem
Calciumchlorid (CaCl)	Roth
Chloroform	AppliChem
Coelenterazin	PJK
Coenzym A-Trilithiumsalz-Dihydrat	AppliChem
DEPC (Diethylpyrocarbonat)	Sigma Aldrich
D-Luciferin	PJK
DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium)	Sigma Aldrich
DMSO (Dimethylsulfoxid)	Sigma Aldrich
dNTPs (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)	Peqlab
5,6-Dichlorobenzimidazol-1- $\beta$ -D-ribofuranosid (DRB)	Sigma-Aldrich
DTT (1,4-Dithiothreitol)	AppliChem
EDTA (Ethyldiamintetraacetat)	AppliChem
Ethanol	AppliChem
FCS ( <i>fetal calf serum</i> )	PAA
GIT (Guanidiniumisothiocyanat)	Roth
Glycerin	Roth
Glycin	Roth
Isoamylalkohol	AppliChem
Isopropanol	AppliChem
Kaliumchlorid (KCl)	Roth
Kaliumhydrogenphosphat	AppliChem
L-Glutamin	Sigma Aldrich
Magermilchpulver (MP)	AppliChem
Magnesiumchlorid (MgCl <sub>2</sub> )	AppliChem
Methanol	AppliChem
Natriumacetat (NaAc)	Roth
Natriumchlorid (NaCl)	Roth
Opti-MEM™ I <i>Reduced Serum Medium</i>	GIBCO

Substanz	Hersteller
PBS	GIBCO
Penicillin/Streptomycin (PenStrep), 100x	GIBCO
Phenol, wassergesättigt	Roth
PLB, 5x ( <i>Passive Lysis Buffer</i> )	Promega
Puromycin	
Pyruvat	Roth
Roti-safe	Roth
Salzsäure	Roth
SDS ultra-pure	Roth
TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylethan-1,2-diamin)	Sigma Aldrich
TRIS (Tris(hydroxymethyl)-aminomethan)	AppliChem
Trypanblau, 4 %	Serva
Trypsin/EDTA-Lösung, 10x	PAA
Tween-20	Sigma Aldrich
Xylencyanolblau	AppliChem
Zeocin	Invitrogen
$\beta$ -Mercaptoethanol	Sigma Aldrich

### 3.3.2 Puffer und Lösungen

Die während der Doktorarbeit verwendeten Puffer und Lösungen sowie ihre Zusammensetzung bzw. Hersteller sind in den Tabelle 3-4 bis Tabelle 3-7 aufgelistet.

Tabelle 3-4: Allgemeine Puffer und Lösungen

Name	Zusammensetzung
Chloroform/Isoamylalkohol	5 Vol% Isoamylalkohol in Chloroform
DEPC-Wasser	DNA-H <sub>2</sub> O mit 0,1 Vol% DEPC, autoklaviert
DNA-H <sub>2</sub> O	autoklaviertes, deionisiertes Wasser
DNA-Probenpuffer (10x)	50 % Glycerin 0,1 % Bromphenolblau 0,1 % Xylencyanolblau in DNA-H <sub>2</sub> O
dNTPs, 10 mM	10 mM dATP 10 mM dCTP 10 mM dGTP 10 mM dTTP in H <sub>2</sub> O
Ethanol, 70 %	70 % Ethanol in DNA-H <sub>2</sub> O

Name	Zusammensetzung
Ethanol, 80 %	80 % Ethanol in DEPC-H <sub>2</sub> O
GIT-Puffer	4 M GIT 2 mM Natriumcitrat 0,5 % Sarcosyl 0,1 M β-Mercaptoethanol (frisch hinzugegeben) in DEPC-H <sub>2</sub> O
Maniatis I	50 mM Glucose 25 mM TRIS-HCl 10 mM EDTA in H <sub>2</sub> O pH 8,8
Maniatis II	0,2 M NaOH 1 % SDS in H <sub>2</sub> O
Maniatis III	3 M KAc in H <sub>2</sub> O, pH 4,8
NaAc, 2 M	2 M NaAc in DEPC-H <sub>2</sub> O
NaAc, 3 M	3 M NaAc in DNA-H <sub>2</sub> O
PEI, 0,1 M	0,1 M Polyethylenimin (PEI) in DNA-H <sub>2</sub> O
Phenol/Chloroform	1:1 Gemisch von Phenol und Chloroform
PLB, 1x	20 % 5xPLB in H <sub>2</sub> O
RNAse A	0,73 mM RNAse A in H <sub>2</sub> O
TAE-Puffer, 10x	400 mM TRIS 20 mM Na <sub>2</sub> EDTA · 2H <sub>2</sub> O 1,142 % Essigsäure in H <sub>2</sub> O pH 8,0

Tabelle 3-5: verwendete Puffer und Lösungen für die Luciferase-Reportergen-Analyse

Name	Zusammensetzung
Luciferase-Puffer, 2x	60 mM Tricin 0,2 mM EDTA 30 mM MgSO <sub>4</sub> 20 mM DTT in H <sub>2</sub> O
Luciferase-Substrat	2x Luciferase-Puffer 12,5 mM D-Luciferin 27 μM Coenzym A 100 mM ATP in H <sub>2</sub> O

Name	Zusammensetzung
Renilla-Substrat	0,1 M NaCl 25 mM TRIS-HCl 1 mM CaCl <sub>2</sub> 0,9 µM Coelenterazin in H <sub>2</sub> O pH 7,5

Tabelle 3-6: verwendete Puffer und Lösungen für Proteinanalysen mittels Western Blot

Name	Zusammensetzung
Laemmli-Puffer, 5x	312,5 mM TRIS-HCl 5 mM EDTA 15 % SDS 0,015 % Bromphenolblau 50 % Glycerin 40 mM DTT (immer frisch hinzugegeben) in H <sub>2</sub> O pH 6,8
Laufpuffer, 5x	124 mM TRIS-HCl 959 mM Glycin 17 mM SDS in H <sub>2</sub> O pH 8,3
MP-Lösung	5 % MP in TBST
TBS, 10x	100 mM TRIS 150 mM NaCl in H <sub>2</sub> O pH 7,8
Transferpuffer	25 mM TRIS-HCl 192 mM Glycin 20 % Methanol in H <sub>2</sub> O pH 8,3
Waschpuffer (TBST)	0,1 % Tween in 1xTBS

Tabelle 3-7: verwendete Puffer und Lösungen für die Kultivierung von Bakterien

Name	Zusammensetzung
LB-Medium	1 % Bactotrypton (Casein) 1 % NaCl 0,5 % Hefeextrakt in H <sub>2</sub> O, autoklaviert

Name	Zusammensetzung
<i>low salt</i> LB-Medium	1 % Bactotrypton (Casein) 0,5 % NaCl 0,5 % Hefeextrakt in H <sub>2</sub> O, autoklaviert
LB-Amp-Medium	LB-Medium mit 100 µg/mL Ampicillin
LB-Zeo-Medium	<i>low salt</i> LB-Medium mit 25 µg/mL Zeocin
LB-Amp-Agarplatten	LB-Amp-Medium mit 15 mg/mL Bactoagar
LB-Zeo-Agarplatten	LB-Zeo-Medium mit 15 mg/mL Bactoagar

### 3.3.3 Kits

Die während der Doktorarbeit verwendeten Kits sowie ihre Verwendung und Hersteller sind in Tabelle 3-8 aufgelistet.

Tabelle 3-8: verwendete Kits

Name	Verwendung	Hersteller
TURBO DNA-free™	DNase-Verdau	Ambion®
High Capacity cDNA Reverse Transcription	Reverse Transkription	Applied Biosystems
M-MuLV Reverse Transcriptase	Reverse Transkription	New England Biolabs
OneTaq® 2X Master Mix	Polymerase für PCR	New England Biolabs
Q5® High-Fidelity DNA Polymerase	Polymerase für PCR	New England Biolabs
AllTaq Master Mix Kit	Polymerase für PCR	Qiagen
PrecisionPlus MasterMix SYBRGreen	SybrGreen-PCR	PrimerDesign
Pierce™ ECL Western Blotting Substrate	Western Blot Substrat	Thermo Scientific
HiPure Plasmid Filter Midiprep Kit	Midi-Präparation	Invitrogen
Monarch® DNA Gel Extraction Kit	Extraktion von DNA-Fragmenten <1000 bp	New England Biolabs
Monarch® PCR & DNA Cleanup Kit	DNA-Aufreinigung	New England Biolabs
High Pure PCR Product Purification Kit	DNA-Aufreinigung	Roche
5'/3' RACE Kit (2nd Generation)	5'-RACE	Roche
GeneJuice®	Transfektionsreagenz	
Lipofectamine® 2000	Transfektionsreagenz	Invitrogen



### 3.3.4 Cytokine

Die während der Doktorarbeit verwendeten Cytokine sind in Tabelle 3-9 aufgelistet.

Tabelle 3-9: verwendete Cytokine

Name	Konzentration der Stammlösung	Hersteller
humanes rekombinantes TNF $\alpha$	50 $\mu\text{g}/\text{mL}$	Miltenyi Biotec
humanes rekombinantes IL1 $\beta$	10 $\mu\text{g}/\text{mL}$	Miltenyi Biotec
humanes rekombinantes IFN $\gamma$	100 $\mu\text{g}/\text{mL}$	Miltenyi Biotec

### 3.3.5 Marker

Die während der Doktorarbeit verwendeten Marker für SDS-PAGE- und Agarose-Gelelektrophorese-Analysen sind in Tabelle 3-10 aufgelistet.

Tabelle 3-10: verwendete Marker

Name	Verwendung	Hersteller
PAGE Ruler, Prestained Protein Ladder	SDS-PAGE	Thermo Scientific
1kb Gene Ruler DNA Ladder	Agarose-GE	Thermo Scientific
Quick-Load <sup>®</sup> 50 bp DNA Ladder	Agarose-GE	New England Biolabs
Quick-Load <sup>®</sup> 2-Log DNA Ladder (0,1-10,0 kb)	Agarose-GE	New England Biolabs

### 3.3.6 Enzyme

Die während der Doktorarbeit verwendeten Enzyme sind in Tabelle 3-11 aufgelistet.

Tabelle 3-11: verwendete Enzyme mit Angabe der Hersteller

Substanz	Beschreibung	Hersteller
<i>Acc65I</i>	Restriktionsenzym	New England Biolabs
<i>AflII</i>	Restriktionsenzym	New England Biolabs
<i>AgeI</i>	Restriktionsenzym	New England Biolabs
<i>BbsI</i>	Restriktionsenzym	New England Biolabs
BSA	Referenzprotein	AppliChem
CIAP (Alkaline Phosphatase)	5'-Dephosphorylierung	Roche
<i>Clal</i>	Restriktionsenzym	New England Biolabs
<i>DpnI</i>	Restriktionsenzym	New England Biolabs
<i>EcoRI</i>	Restriktionsenzym	New England Biolabs

Substanz	Beschreibung	Hersteller
<i>EcoRV</i>	Restriktionsenzym	New England Biolabs
<i>HindIII</i>	Restriktionsenzym	New England Biolabs
Klenow (DNA Polymerase I, Large Fragment)	Polymerase zum Auffüllen von DNA-Überhängen	New England Biolabs
<i>NarI</i>	Restriktionsenzym	New England Biolabs
<i>NcoI</i>	Restriktionsenzym	New England Biolabs
PNK (T4 Polynucleotid-Kinase)	Kinasierung	New England Biolabs
RNAse A	RNA-Verdau	Sigma
T4-DNA Ligase	Ligase	New England Biolabs
<i>XbaI</i>	Restriktionsenzym	New England Biolabs

### 3.3.7 Oligonukleotide

Der Hersteller aller verwendeten Oligonukleotide war Sigma-Aldrich. Die während der Doktorarbeit zur Klonierung verwendeten Oligonukleotide sowie ihre Sequenzen sind in Tabelle 3-12 aufgelistet.

Tabelle 3-12: verwendete Oligonukleotide und ihre Sequenzen

Name	Sequenz (5'→3')	Verwendung
uORF-EGFP-5p	GCG TTT AAA CTT AAG CAT AAC TTT GTA GCG AGT CG	Klonierung des 5'-UTR-uORF-Fragments vor EGFP
uORF-EGFP-3P	CCT CGC CCT TGC TCA CAC CAG GAA GAG ACC TGT GCC TTG	
Ex1-In1-Ex2-5P	GGA AGC TTA TAA CTT TGT AGC GAG TCG AAA ACT G	Klonierung der iNOS-5'-UTR in ein Reporter-gen-Plasmid
Ex1-In1-Ex2-3P	GGC CAT GGC TAT GGC TTT ACA AAG CAG GTC AC	
mut-uORFup	CGG GAC TGT CTA AAA CTG CCC AGT CCG AAT TCC AAA GGT GGC CGA GAG ATT TTA AAG C	Mutation des uORF-ATGs zu einer <i>EcoRI</i> -Schnittstelle
mut-uORFdown	GCT TTA AAA TCT CTC GGC CAC CTT TGG AAT TCG GAC TGG GCA GTT TTA GAC AGT CCC G	Mutation des uORF-ATGs zu einer <i>EcoRI</i> -Schnittstelle

Name	Sequenz (5'→3')	Verwendung
SL_up	AGC TTC CAC CAC GGC CCC CTG TAC ATG GGG GCC GTG GTG GA	Teil des Fragment zur Erzeugung einer Stem Loop-Struktur
SL_down	AGC TTC CAC CAC GGC CCC CAT GTA CAG GGG GCC GTG GTG GA	Teil des Fragment zur Erzeugung einer Stem Loop-Struktur
KOZAK-for	CCT CAT TCC TGC TTT AAA ATC TCT CGG CCA GCC ACC ATG GGG GGA CTG GGC AGT TC	Mutation des uORF-ATGs zu einer optimalen Kozak-Sequenz
KOZAK-rev	GAA CTG CCC AGT CCC CCC ATG GTG GCT GGC CGA GAG ATT TTA AAG CAG GAA TGA GG	
iNOS_cds_5part	CAT GGC CCC ATT CAT TGC ATA CTG	Klonierung des iNOS-EGFP-Fusionsplasmid
sihUPF1_Ajamian-2_for	ACC TCG CAG CCA CAT TGT AAA TCA TAT CGA TTG ATT TAC AAT GTG GCT GCT T	Teil des Fragments zur Klonierung von psiRNA-GFP-AjasiUPF1_BBS
sihUPF1_Ajamian-2_rev	CAA AAA GCA GCC ACA TTG TAA ATC AAT CGA TAT GAT TTA CAA TGT GGC TGC G	Teil des Fragments zur Klonierung von psiRNA-GFP-AjasiUPF1_BBS
sihUPF1_Chen_for	ACC TCG ATG CAG TTC CGC TCC ATT TAT CGA TAA TGG AGC GGA ACT GCA TCT T	Teil des Fragments zur Klonierung von psiRNA-GFP-ChensiUPF1_BBS
sihUPF1_Chen_rev	CAA AAA GAT GCA GTT CCG CTC CAT TAT CGA TAA ATG GAG CGG AAC TGC ATC G	Teil des Fragments zur Klonierung von psiRNA-GFP-ChensiUPF1_BBS
huiNOS_5P1_FG_qRT	TCC CGA AGT TCT CAA GGC AC	
huiNOS_3P1_FG_qRT	GGG GAC TCA TTC TGC TGC TT	
huiNOS_5P2_FG_qRT	ACC TCA GCA AGC AGC AGA AT	
huiNOS_3P2_FG_qRT	AGA AGC TCA TCT GGA GGG GT	Primer für die Untersuchung der Transkriptvarianten
huiNOS_5P3_FG_qRT	AAT GTG GAG AAA GCC CCC TG	
huiNOS_3P3_FG_qRT	ATC TGG AGG GGT AGG CTT GT	
huiNOS_5P4_FG_qRT	CGC AGA GAA CTC AGC CTC AT	
huiNOS_3P4_FG_qRT	ATT CTG CTG CTT GCT GAG GT	

Name	Sequenz (5'→3')	Verwendung
hUPF1 CAS4 Ex1 up	CAC CGC GGA GGC ACC ATG AGC GTG GAG G	Oligonukleotide für die Erzeugung der CRISPR/Cas9-Leit-RNA CAS4
hUPF1 CAS4 Ex1 down	AAA CCC TCC ACG CTC ATG GTG CCT CCG C	
hUPF1 CAS5 Ex1 up	CAC CGC GCA GGT GAG CGG CAC ATG GCG G	Oligonukleotide für die Erzeugung der CRISPR/Cas9-Leit-RNA CAS5
hUPF1 CAS5 Ex1 down	AAA CCC GCC ATG TGC CGC TCA CCT GCG C	
hUPF1 CAS6 Ex2 up	CAC CGC GAA GGC ATC CTG CAG AAC GGG G	Oligonukleotide für die Erzeugung der CRISPR/Cas9-Leit-RNA CAS6
hUPF1 CAS6 Ex2 down	AAA CCC CCG TTC TGC AGG ATG CCT TCG C	
hUPF1 CAS7 Ex2 up	CAC CGG TTG GCT GAG TTG AAC TTC GAG G	Oligonukleotide für die Erzeugung der CRISPR/Cas9-Leit-RNA CAS7
hUPF1 CAS7 Ex2 down	AAA CCC TCG AAG TTC AAC TCA GCC AAC C	

Tabelle 3-13 zeigt die verwendeten siRNA-Proben zur direkten, transienten siRNA-Transfektion.

**Tabelle 3-13: verwendete siRNA-Proben zur direkten, transienten siRNA-Transfektion**

Name	Spezifikation	Sequenz	Hersteller
siUPF1 (SI03120432)	siUPF1	UGG CGU CAU CAU UGU GGG CAA	Qiagen
AllStars Neg. Control siRNA	Kontroll-siRNA	Mix verschiedener Sequenzen	Qiagen

Primer und Sonden, die für PCR- und qRT-PCR-Analysen verwendet wurden, sind in Tabelle 3-14 aufgelistet.

Tabelle 3-14: verwendete qRT-PCR-Primer und -Sonden.

Name	5'-Primer	3'-Primer	Sonde	Kit
Ex1_Luc	CAC AGG TCT CTT CCT GGT TTG	TCT TCC AGC GGA TAG AAT GG		SybrGreen
huGAPDH	CCC ATG TTC GTC ATG GGT GT	TGG TCA TGA GTC CTT CCA CGA TA	CTG CAC CAC CAA CTG CTT AGC ACC C	OneTaq
huiNOS	TGC AGA CAC GTG CGT TAC TCC	GGT AGC CAG CAT AGC GGA TG	TGG CAA GCA CGA CTT CCG GGT G	OneTaq
huRent1	AGG AGT CCC AGA CTC AAG ATA ACA TC	CAT GTC AGA GTC AGT CTT GGG C	CCT GGG CCT TAA CAA GAA GAG AAT CGC C	OneTaq
Luc	ACT GGG ACG AAG ACG AAC AC	GCC CTT CTT GGC CTT TAT G		SybrGreen
Gl3	CTA GCA AAA TAG GCT GTC CC	CTT TAT GTT TTT GGC GTC TTC C		SybrGreen
18S	CGG CTA CCA CAT CCA AGG AA	GCT GGA ATT ACC GCG GCT		SybrGreen
GAD1	CTT GTG AGT GCC TTC AAG GAG	TGC TCC TCA CCG TTC TTA GC		SybrGreen
TBR1	TCT CGA CCA CTG ACA ACC TG	CCG TCC AAG ACA GGA GAG AG		SybrGreen
FOXG1	CTG GCG GCT CTT AGA GAT	CCC TCC CAT TTC TGT ACG TTT		SybrGreen

### 3.3.8 Plasmide

Die während der Doktorarbeit verwendeten Plasmide zur transienten bzw. stabilen Transfektion sind in Tabelle 3-15 bzw. Tabelle 3-16 aufgelistet. Detailliertere Karten und Klonierungsschemata sind im Kapitel Ergebnisse und im Anhang.

Tabelle 3-15: Plasmide zur transienten Transfektion

Name	Beschreibung	Hersteller
pcDNA4TO-EGFP	Plasmid mit der cds für das grün-fluoreszierende Protein (GFP)	AG Kleinert
pcDNA4TO-uORF-GFP	pcDNA4TO-EGFP mit einem Teil der 5'-UTR der iNOS-mRNA (einschließlich des uORFs) anstelle der GFP-Kozak-Sequenz	AG Kleinert

Name	Beschreibung	Hersteller
pcDNA4TO_mutORF_EGFP	pcDNA4TO-uORF-GFP mit einer Mutation in der Kozak-Sequenz des uORFs	AG Kleinert
pRLEF1 $\alpha$	Referenz-Plasmid mit der cds für die <i>Renilla</i> -Luciferase	AG Bros (Bros 2006)
pcDNA4/TO-Ex1-Ex2-Luc	Reportergen-Plasmid mit der cds für die <i>Firefly</i> -Luciferase hinter der iNOS-5'-UTR	AG Kleinert
pcDNA4/TO-Ex1-Ex2-Luc-mut-uORF	pcDNA4/TO-Ex1-Ex2-Luc mit Mutation des uORF-Start-ATGs zu einer EcoRI-Schnittstelle	AG Kleinert
pcDNA4/TO-Ex1-Ex2-Luc-mut-KOZAK	pcDNA4/TO-Ex1-Ex2-Luc mit Mutation der uORF-Kozak-Sequenz zu einer optimalen Kozak-Sequenz (GCC ACC <b>ATG</b> G)	Gather, F. Vogt, L.-M.
pGL3-control	Plasmid mit SV40-Promotor vor der cds für die <i>Firefly</i> -Luciferase	Promega
pGL3-control_SL2	pGL3-control mit einer <i>Stem-Loop</i> -Sequenz zwischen Promotor und Luciferasegen	AG Kleinert
pGL3-control_Ex1_Ex2	pGL3-control mit der 5'-UTR der humanen iNOS (Ex1Ex2)	AG Kleinert
pGL3-control_SL2_Ex1_Ex2	pGL3control_Ex1_Ex2 mit einer <i>Stem-Loop</i> -Sequenz zwischen Promotor und der 5'-UTR der humanen iNOS	AG Kleinert
pRLFL1	Plasmid mit <i>Renilla</i> - und <i>Firefly</i> -Luciferase direkt hintereinander	Jin et al. (Chan 2013)
pRLV1FL	pRLFL1 mit der IRES-Sequenz der ATF4-V1 zwischen den cds der <i>Renilla</i> - und <i>Firefly</i> -Luciferase	Jin et al. (Chan 2013)
pRL-Ex1-Ex2-FL	pRLFL1 mit der 5'-UTR der humanen iNOS-RNA zwischen den cds der <i>Renilla</i> - und <i>Firefly</i> -Luciferase	Gather, F. (Gather 2015)
pRL-mut-uORF-FL	pRL-Ex1-Ex2-FL mit mutiertem Start-ATG des uORF	Gather, F.
pcDNA4/TO-iNOS-5UTR-5p_cds-EGFP	pcDNA4TO-EGFP mit der iNOS-5'-UTR und einem Teil der iNOS-cds anstelle des ATG der EGFP-cds	Gather, F.
pcDNA4/TO-iNOS-5UTR-5p_cds-EGFP-mutORF	pcDNA4/TO-iNOS-5UTR-5p_cds-EGFP mit Mutation des uORF-Start-ATGs zu einer EcoRI-Schnittstelle	Gather, F.

Name	Beschreibung	Hersteller
pcDNA4/TO-iNOS-5UTR-5p_cds-EGFP_KOZAK	pcDNA4/TO-iNOS-5UTR-5p_cds-EGFP mit Mutation der uORF-Kozak-Sequenz zu einer optimalen Kozak-Sequenz (GCC ACC <b>ATG</b> G)	Gather, F.
pcDNA4/TO-Ex1-In1-Ex2-Luc	Reportergen-Plasmid mit der cds für die <i>Firefly</i> -Luciferase hinter der iNOS-5'-UTR inklusive erstem Intron der iNOS	AG Kleinert
pcDNA4/TO-Ex1-In1-Ex2-Luc-mut-uORF	pcDNA4/TO-Ex1-In1-Ex2-Luc mit Mutation des uORF-Start-ATGs zu einer EcoRI-Schnittstelle	AG Kleinert

Tabelle 3-16: Plasmide zur stabilen Transfektion

Name	Beschreibung	Hersteller
psiRNA_H1_GFPzeo	Plasmid mit einem H1-Promotor und Zeocin-Resistenz für die Synthese einer siRNA	InvivoGen
psiRNA_GFP_Luc	psiRNA_H1_GFPzeo mit einem Fragment für die Synthese einer siRNA gegen Luc	AG Kleinert
psiRNAhH1GFPzeohUPF1	psiRNA_H1_GFPzeo mit einem Fragment für die Synthese einer siRNA gegen UPF1	AG Kleinert
psiRNA-GFP-AjasiUPF1_BBS	psiRNA_H1_GFPzeo mit einem Fragment für die Synthese einer siRNA gegen UPF1 nach Lara Ajamian et al. (Ajamian 2008)	Gather, F.
psiRNA-GFP-ChensiUPF1_BBS	psiRNA_H1_GFPzeo mit einem Fragment für die Synthese einer siRNA gegen UPF1 nach Sheng-di Chen (Xu 2012)	Gather; F.
pSpCas9(BB)-2A-Puro	Plasmid zur Erzeugung des Cas9-Protein des CRISPR/Cas9-Systems mit einem Promotor zur Erzeugung einer Leit-RNA	Feng Zhang RRID: Addgene_62988 (Ran 2013)
pSpCas9(BB)-2A-Puro_CASX	Plasmid zur Erzeugung des Cas9-Protein des CRISPR/Cas9-Systems mit einem Promotor zur Erzeugung der Leit-RNA CASX (Sequenzen für CAS47 siehe Tabelle 3-12)	Gather; F.

### 3.3.9 Antikörper

Die während der Doktorarbeit verwendeten Primärantikörper, ihre Verdünnungen, Zweitantikörper und Hersteller sind in Tabelle 3-17 aufgelistet.

**Tabelle 3-17: Primärantikörper für Western Blot-Analysen**

Name	Verdünnung	Zweitantikörper	Hersteller
anti- $\beta$ -Tubulin	1:2000 in 5 % MP	anti-mouse	Sigma Aldrich
anti-UPF1	1:1000 in 5 % MP	anti-rabbit	Millipore
anti-EGFP	1:1000 in 5 % MP	anti-mouse	Roche
anti-GAPDH	1:1000 in 5 % MP	anti-mouse	SC Biotech
anti-Renilla	1:1000 in 5 % MP	anti-rabbit	Invitrogen
anti-iNOS	1:500 in 5 % MP	anti-rabbit	SC Biotech

Die während der Doktorarbeit verwendeten Sekundärantikörper, ihre Verdünnungen und ihre Hersteller sind in Tabelle 3-18 aufgelistet.

**Tabelle 3-18: Sekundärantikörper für Western Blot-Analysen**

Name	Verdünnung	Hersteller
anti-mouse	1:10000 in 5 % MP	Sigma Aldrich
anti-rabbit	1:3500 in 5 % MP	Sigma Aldrich

### 3.4 Bakterien

Die Transformation von Plasmiden erfolgte ausschließlich in kompetente *E.coli* DH5 $\alpha$  oder TOP10 von BioLabs.

### 3.5 Zellen

Die während der Doktorarbeit verwendeten Zelllinien sowie die Medienzusätze, die dem DMEM hinzugefügt wurden, sind in Tabelle 3-19 aufgelistet.

**Tabelle 3-19: verwendete Zelllinien und Zellproben**

Name	Bemerkung	Mediumzusätze	Hersteller
DLD1	Humane Kolon-Adenokarzinom-Zellen	10 % FCS 1 % PenStrep 1 % Pyruvat	ATCC (CCL-221)



Name	Bemerkung	Mediumzusätze	Hersteller
DLD1-psiRNAhH1GFPluc	DLD1, stabil transfiziert mit psiRNAhH1GFPluc, dienen als Kontrollzellen für DLD1-psiRNAhH1GFPzeohUPF1	10 % FCS 1 % PenStrep 1 % Pyruvat 0,2 mg/ml Zeocin	Gather, F.
DLD1-psiRNAhH1GFPzeohUPF1	DLD1, stabil transfiziert mit psiRNAhH1GFPzeohUPF1, das für eine siRNA gegen UPF1 codiert	10 % FCS 1 % PenStrep 1 % Pyruvat 0,2 mg/ml Zeocin	Gather, F.
DLD1-psiRNA-GFP_Luc	DLD1, stabil transfiziert mit psiRNA-GFP-Luc, das für eine siRNA gegen Luc codiert	10 % FCS 1 % PenStrep 1 % Pyruvat 0,2 mg/ml Zeocin	Gather, F.
DLD1-psiRNA-GFP-AjasiUPF1-BBS	DLD1, stabil transfiziert mit psiRNA-GFP-AjasiUPF1-BBS, das für eine siRNA gegen UPF1 codiert	10 % FCS 1 % PenStrep 1 % Pyruvat 0,2 mg/ml Zeocin	Gather, F.
DLD1-psiRNA-GFP-ChensiUPF1-BBS	DLD1, stabil transfiziert mit psiRNA-GFP-ChensiUPF1-BBS, das für eine siRNA gegen UPF1 codiert	10 % FCS 1 % PenStrep 1 % Pyruvat 0,2 mg/ml Zeocin	Gather, F.
DLD1-pSpCas9(BB)-2A-Puro	DLD1, stabil transfiziert mit pSpCas9(BB)-2A-Puro, dienen als Kontrolle für die Zellen DLD1-pSpCas9(BB)-2A-Puro_CASX verwendet wurde	10 % FCS 1 % PenStrep 1 % Pyruvat 2 µg/ml Puromycin	Gather, F.
DLD1-pSpCas9(BB)-2A-Puro_CASX	DLD1, stabil transfiziert mit pSpCas9(BB)-2A-Puro_CASX, welches für die Leitsequenz mit der Nummer X und das Cas9-Protein des CRISPR/Cas9-Systems kodiert	10 % FCS 1 % PenStrep 1 % Pyruvat 2 µg/ml Puromycin	Gather, F.
iLB-C16bm	hiPSC-Linie eines männlichen Probanden (C16bm)	Differenzierung durch die AG Peitz	Peitz, M.; Bloschies, M. *

Name	Bemerkung	Mediumzusätze	Hersteller
iLB-C89bf	hiPSC-Linie einer weiblichen Probandin (C89bf)	Differenzierung durch die AG Peitz	Peitz, M.; Bloeschies, M. *
iLB-C133bm	hiPSC-Linie eines männlichen Probanden (C133bm)	Differenzierung durch die AG Peitz	Peitz, M.; Bloeschies, M. *
iLB-C16bm-2	Wie iLB-C16bm: hiPSC-Linie eines männlichen Probanden (C16bm)	Differenzierung durch die AG Peitz	Peitz, M.; Bloeschies, M. *
lt-NES	<i>long-term self-renewing neuroepithelial stem cell</i> , stabile NPC-Linie	Kultivierung durch die AG Peitz	Peitz, M.; Bloeschies, M. *
sm-NPC	<i>small molecule NPCs</i> , stabile NPC-Linie	Kultivierung durch die AG Peitz	Peitz, M.; Bloeschies, M. *
RGL-NPC	<i>hindbrain/spinal cord radial glia (RG)-like neural precursor cells</i> , stabile NPC-Linie	Kultivierung durch die AG Peitz	Peitz, M.; Bloeschies, M. *

\* Institut für Rekonstruktive Neurobiologie, Universitätsklinikum Bonn.

## **4 METHODEN**

### **4.1 Zellbiologische Arbeitsmethoden**

#### **4.1.1 Kultivierung eukaryotischer Zellen**

Zur Kontaminationsvermeidung wurden alle Arbeiten mit eukaryoten Zellen unter sterilen Bedingungen in einer Reinluftwerkbank durchgeführt. Zusätzlich wurden ausschließlich steril filtrierte, autoklavierte oder steril verpackte Materialien, Lösungen und Substanzen verwendet. Die Zellen wurden in Filter-Top-Zellkulturflaschen, 24-Lochplatten, 6-Lochplatten oder 10 cm Schalen bei 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>-Begasung und 100 % Luftfeuchtigkeit kultiviert. Alle verwendeten Kulturmedien wurden vor der Benutzung auf Raumtemperatur erwärmt. Um eine Kontaktinhibition der adhärennten DLD1-Zellen zu vermeiden, wurden sie alle drei bis vier Tage mit 1x PBS gewaschen und mit 5x Trypsin/EDTA vom Flaschenboden gelöst. Anschließend wurden je nach Zelldichte 5–50 % der Zellen in 20 ml DMEM mit ihren jeweiligen Zusätzen (siehe Tabelle 3-19) subkultiviert.

#### **4.1.2 Kryokonservierung und Rekultivierung eukaryoter Zellen**

Um eine gleichbleibende Qualität der Zellkultur sowie die Lagerung von Zellen zu ermöglichen wurden Zellaliquots in flüssigem Stickstoff kryokonserviert. Dazu wurden die Zellen wie in Kapitel 4.1.1 beschrieben mit 1x PBS gewaschen und mit 5x Trypsin/EDTA vom Flaschenboden gelöst. Die Zellsuspension wurde bei 1200 x g zentrifugiert. Anschließend wurde das Zellpellet in FCS mit 10 % DMSO resuspendiert und die Zellsuspension in 1,5 ml-Kryokonservierungsgefäßen überführt. Für eine verlangsamtetes Abkühlen wurden die Kryokonservierungsgefäße dann zunächst 24 h in einer mit Isopropanol gefüllten Box bei -80 °C eingefroren, bevor sie dauerhaft in flüssigem Stickstoff gelagert wurden.

Die Rekultivierung der Zellen erfolgte durch schnelles Auftauen der Proben bei 37 °C und Überführung in eine Zellkulturflasche mit 20 ml Medium. Nach 24 h Inkubation im Brutschrank wurde das Medium gewechselt und je nach Zelllinie und Qualität der Zellen mit Selektionsantibiotikum versetzt.

### 4.1.3 Bestimmung der Lebendzellzahlen

Zur Bestimmung der Lebendzellzahlen und der Qualität der Zellkultur wurde Trypanblau verwendet, ein Farbstoff, der nur tote Zellen anfärbt, da er nicht durch intakte Zellmembrane diffundieren kann. Die jeweilige Zellsuspension wurde im Verhältnis 1:2 mit Trypanblau-Lösung gemischt und auf eine Neubauer-Zählkammer aufgetragen. Diese besitzt 3x3 Großquadrate mit jeweils einer Fläche von 1 mm<sup>2</sup>. Durch das Auflegen eines Deckglases entsteht ein definiertes Volumen von 0,1 mm<sup>3</sup> pro Quadrat. Die Anzahl der Zellen wurde mit folgender Formel bestimmt:

$$\text{Zellzahl/ml} = \sum_{i=1}^n x_i \cdot n^{-1} \cdot \text{Kammerfaktor} \cdot 3 \quad (4.1)$$

Hierbei ist  $x_i$  die Zahl der Zellen im Großquadrat  $i$  und  $n$  die Anzahl der ausgezählten Großquadrate. Der Kammerfaktor der Zählkammer beträgt  $10^4$ . Die toten Zellen werden von der Gesamtzahl der Zellen abgezogen.

### 4.1.4 Transiente Transfektion eukaryoter Zellen mit Plasmid-DNA

Die transiente Transfektion wird genutzt, um Plasmide mit Hilfe eines Transfektionsreagenz vorübergehend in eukaryote Zellen einzubringen. Als Transfektionsreagenz wurde GeneJuice<sup>®</sup> von Sigma-Aldrich mit einem optimierten Protokoll verwendet.

Zunächst wurden die zu transfizierenden Zellen auf Zellkulturplatten ausgesät. Sollten im Anschluss Proteinanalysen mittels Western Blot durchgeführt werden, so wurden  $3 \cdot 10^5$  Zellen in 2 ml Medium pro Vertiefung in einer 6-Lochplatte ausgesät. Bei Genexpressions-Analysen oder Luciferase-Aktivitäts-Bestimmungen wurden  $6 \cdot 10^4$  Zellen in 0,5 ml Medium pro Vertiefung in einer 24-Lochplatte ausgesät.

Nach 24 h Inkubation wurde das Zellkulturmedium gegen frisches Medium getauscht und das Transfektionsgemisch wie in Tabelle 4-1 aufgelistet angesetzt. Dazu wurde zunächst das FCS-freiem Medium mit dem GeneJuice<sup>®</sup>-Reagenz für 5 min inkubiert, bevor die Plasmid-DNA hinzugegeben wurde. Bei einem *Firefly*-Luciferase-Assay mit pRLEF1 $\alpha$  (Bros 2006) als Referenz wurde die DNA in einem Verhältnis von 3:1 Firefly-Konstrukt zu pRLEF1 $\alpha$  eingesetzt. Bei anderen Kotransfektionen wurde im Verhältnis 1:1 transfiziert. Nach weiteren 20 min Inkubationszeit des Transfektionsgemisches wurden je 25  $\mu$ l pro Vertiefung einer 24-Lochplatte zu

den Zellen gegeben. Bei einer 6-Lochplatte wurde der vierfache Ansatz pro Vertiefung verwendet.

**Tabelle 4-1: Transfektionsgemisch für die transiente Transfektion**

	<b>einfache Transfektion</b>	<b>pRLEF1<math>\alpha</math>- Kotransfektion</b>	<b>normale Kotransfektion</b>
FCS-freies Medium	25 $\mu$ l	25 $\mu$ l	25 $\mu$ l
1. Plasmid	0,4 $\mu$ g	0,3 $\mu$ g	0,175 $\mu$ g
2. Plasmid			0,175 $\mu$ g
pRLEF1 $\alpha$		0,1 $\mu$ g	
GeneJuice <sup>®</sup>	1,6 $\mu$ l	1,6 $\mu$ l	1,6 $\mu$ l

24 h nach der Transfektion wurde das Medium erneut abgesaugt. Für Proteinanalysen wurden die Zellen nun mit je 100  $\mu$ l PLB oder RIPA (24-Lochplatte) bzw. 200  $\mu$ l PLB oder RIPA (6-Lochplatte) lysiert. Für mRNA-Analysen wurden stattdessen 200  $\mu$ l GIT-Puffer hinzugegeben. Sollten die Zellen noch zur iNOS-Expression stimuliert werden, so wurde das Medium abgesaugt und die Zellen für weitere 16-18 h in FCS-freiem Medium inkubiert und anschließend stimuliert (siehe Kapitel 4.1.7).

#### **4.1.5 Stabile Transfektion eukaryoter Zellen mit Plasmid-DNA**

Die stabile Transfektion dient zum dauerhaften Einbringen von Plasmiden in eukaryote Zellen und damit zur dauerhaften Expression der jeweiligen Gene. Als Transfektionsreagenz wurde hier entweder PEI (für die shRNA-generierenden Plasmide und für erste Versuche mit dem CRISPR/Cas9-System) oder ebenfalls GeneJuice<sup>®</sup> (für das CRISPR/Cas9-System) verwendet.

Für die Transfektion mit PEI wurden zunächst  $3 \cdot 10^5$  Zellen in 2 ml Medium pro Vertiefung in einer 6-Lochplatte ausgesät. Nach 24 h Inkubationszeit wurden die Zellen mit 120  $\mu$ l DNA-Mix, bestehend aus 3  $\mu$ g des zu transfizierenden Plasmids in 85  $\mu$ l FCS-freiem Medium und 35  $\mu$ l PEI (0,1 M PEI-Lösung 1:20 in FCS-freiem Medium) in frischem Medium transfiziert. Zur Selektionskontrolle wurden Zellen einer Vertiefung nur mit einem Mix aus FCS-freiem Medium und PEI ohne Plasmid versetzt. Nach 4 h Inkubationszeit wurde das Medium durch frisches Medium ersetzt. 24 h später wurden die Zellen auf 10 cm-Schalen überführt und nach weiteren 24 h wurde ein Mediumwechsel zum jeweiligen Selektionsmedium (0,2 M Zeocin

oder 2 µg/ml Puromycin in DMEM) durchgeführt. Von da an wurde das Medium täglich gewechselt, bis davon ausgegangen werden konnte, dass nur noch stabil transfizierte Zellen überlebt und proliferiert haben. Als Anhaltspunkt dienten Zellen mit der Kontrollbehandlung ohne Plasmid, bei der zu genau diesem Zeitpunkt keine Zellen mehr überlebt haben sollten. Die Zellkolonien auf den Platten wurden entweder einzeln oder als Gemisch durch Ablösen mit 5x Trypsin/EDTA vom Plattenboden und Resuspension im Selektionsmedium in Zellkulturflaschen überführt und weiter kultiviert.

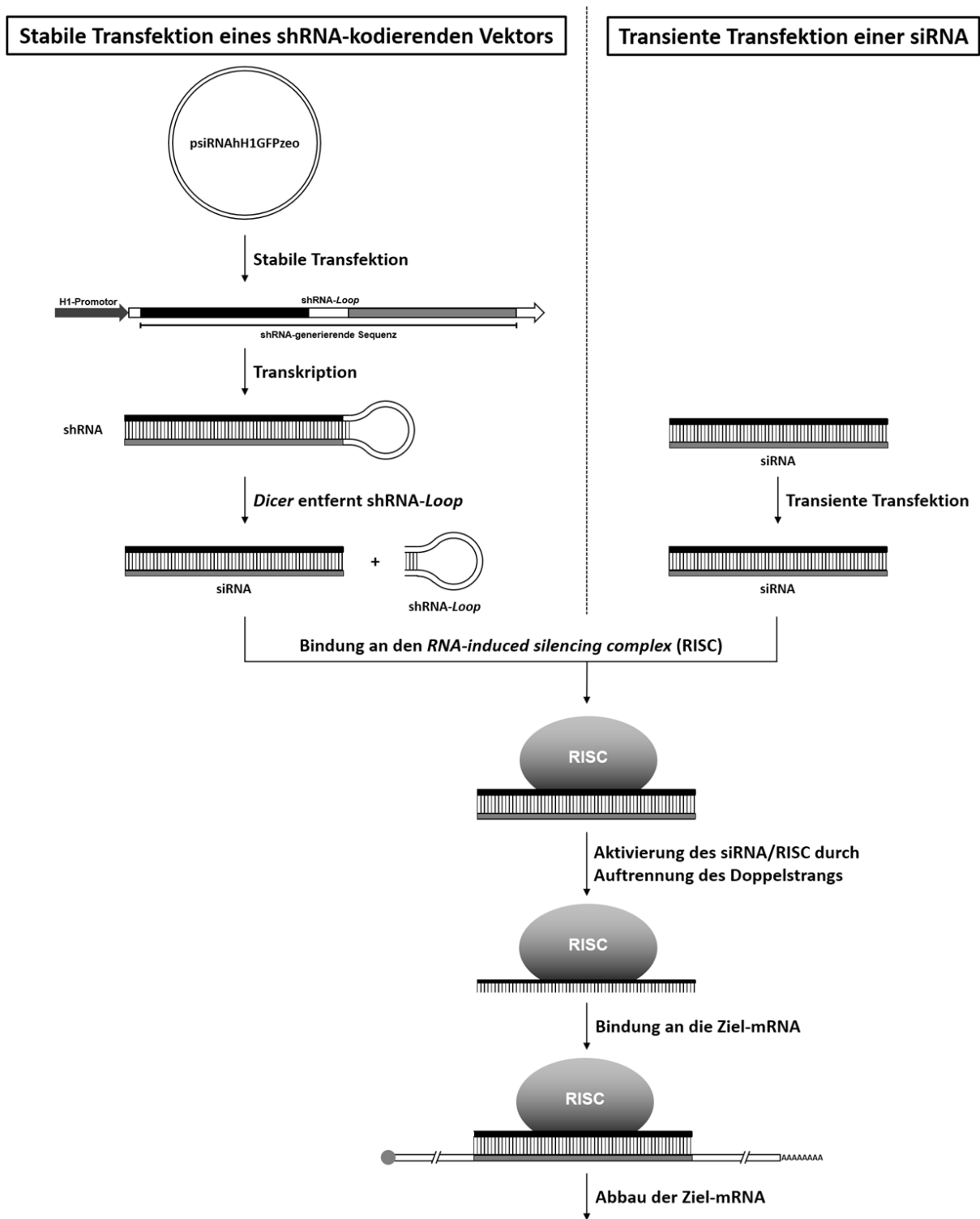
Sollten im Anschluss Proteinanalysen mittels Western Blot durchgeführt werden, so wurden  $1 \cdot 10^6$  Zellen in 8 ml Medium auf einer 10 cm-Schale ausgesät. Für eine mRNA-Analyse wurden  $8 \cdot 10^4$  Zellen in 0,5 ml Medium pro Vertiefung in einer 24-Lochplatte ausgesät. Bei 70–80 % Konfluenz wurden die Zellen entweder mit 200 µl GIT (24-Lochplatte) bzw. 300 µl PLB oder RIPA (10 cm-Schale) lysiert oder für eine nachfolgende Stimulation (siehe Kapitel 4.1.7) ein Mediumwechsel zu FCS-freiem Medium durchgeführt.

Bei der Transfektion mit GeneJuice wurde wie bei der transienten Transfektion transfiziert (siehe Kapitel 4.1.4). Es erfolgte keine Kotransfektion. Nach der Transfektion erfolgte die Selektion und Kultivierung der Zellen wie bei der Transfektion mit PEI.

### **4.1.6 Knockout und Knockdown von Genen**

#### **4.1.6.1 Gen-Knockdown durch siRNA**

*Small interfering RNAs* (siRNAs) stellen eine Möglichkeit dar, auf die Expression endogener Proteine Einfluss zu nehmen. siRNAs sind kurze doppelsträngige RNA-Moleküle mit einer Sequenz, die einem kurzen Sequenzabschnitt der Ziel-mRNA entspricht. Wie die zelleigenen miRNAs werden sie durch den *RNA-induced silencing complex* (RISC) gebunden, der für den Abbau komplementärer RNA sorgt (Jinek 2008). Dabei können die siRNAs entweder direkt transfiziert werden, wodurch transient eine Herunterregulation (*Knockdown*) möglich ist, oder dauerhaft mit Hilfe eines shRNA-produzierenden Vektors in Zellen gebracht werden. Eine Übersicht des Mechanismus ist in Abbildung 4-1 gezeigt.



**Abbildung 4-1: Knockdown durch siRNA.**

siRNAs können auf verschiedene Weise in eine Zelle gebracht werden. Die in dieser Doktorarbeit verwendeten Methoden waren zum einen die direkte transiente Transfektion mit dem Oligonukleotid und zum anderen die stabile Transfektion über ein Plasmid, das shRNAs produziert. Im Fall der stabilen Transfektion wird die produzierte shRNA durch den zelleigenen DICER weiter zur siRNA prozessiert, welche von einem RISC-Komplex (RISC) gebunden wird. Durch die Separation der beiden Stränge kann nun die siRNA als Schablone zur Erkennung der Ziel-mRNA dienen, die daraufhin vom RISC abgebaut wird. Dadurch kommt es zu einer verringerten Expression des Ziel-Proteins (Jinek 2008).

Für die transiente Transfektion von siRNA in DLD1-Zellen wurden geringere Zelldichten als bei der üblichen Transfektion benötigt. Es wurden  $2 \cdot 10^4$  Zellen in 0,5 ml Medium pro Vertiefung in einer 24-Lochplatte ausgesät. Nach 24 h Inkubation wurde wie im Protokoll für die siRNA-Transfektion mit Hilfe von Lipofectamine® 2000 von Invitrogen™ beschrieben vorgegangen. Zunächst wurde das Medium durch je 0,5 ml neues Medium pro Vertiefung ersetzt. Für eine Vertiefung wurden 20 pmol der siRNA in 50 µl Gibco™ Opti-MEM™ I *Reduced Serum* Medium gelöst und gemischt. In einem zweiten Reaktionsgefäß wurden pro Vertiefung 1 µl Lipofectamine 2000 in 50 µl Gibco™ Opti-MEM™ I *Reduced Serum* Medium gelöst und ebenfalls gemischt. Nach fünfminütiger Inkubation wurden die Lösungen vereint, vorsichtig gemischt und für weitere 20 min inkubiert. Anschließend wurde der komplette Ansatz zum Medium einer Vertiefung gegeben. Nach 48 h Inkubation im Brutschrank wurden das Medium gegen FCS-freies Medium ausgetauscht und weitere 18 h später wurden die Zellen, wie in Kapitel 4.1.7 oder 4.1.8 beschrieben, stimuliert.

Die stabile Transfektion von shRNA-produzierenden Vektoren wurde wie in Kapitel 4.1.5 beschrieben durchgeführt. Als Vektor diente psiRNAhH1GFPzeo von InvivoGen. Er besitzt einen humanen H1-Promotor, hinter den die Sequenz zur Erzeugung der shRNA kloniert wurde. Außerdem besitzt der Vektor eine Zeocin-Resistenz durch ein EGFP-Zeocin-Fusionsgen (GFP-Zeo). Die jeweiligen Sequenzen, die zur Erzeugung der shRNA dienten, wurden durch Schnitt des Vektors mit *BbsI* (siehe Kapitel 4.2.1.1) und Ligation mit verschiedenen hybridisierten Oligo-DNA-Molekülen (siehe Kapitel 4.2.1.2) kloniert. Als Selektionsantibiotikum diente Zeocin.

### **4.1.6.2 Gen-Knockout durch CRISPR/Cas9**

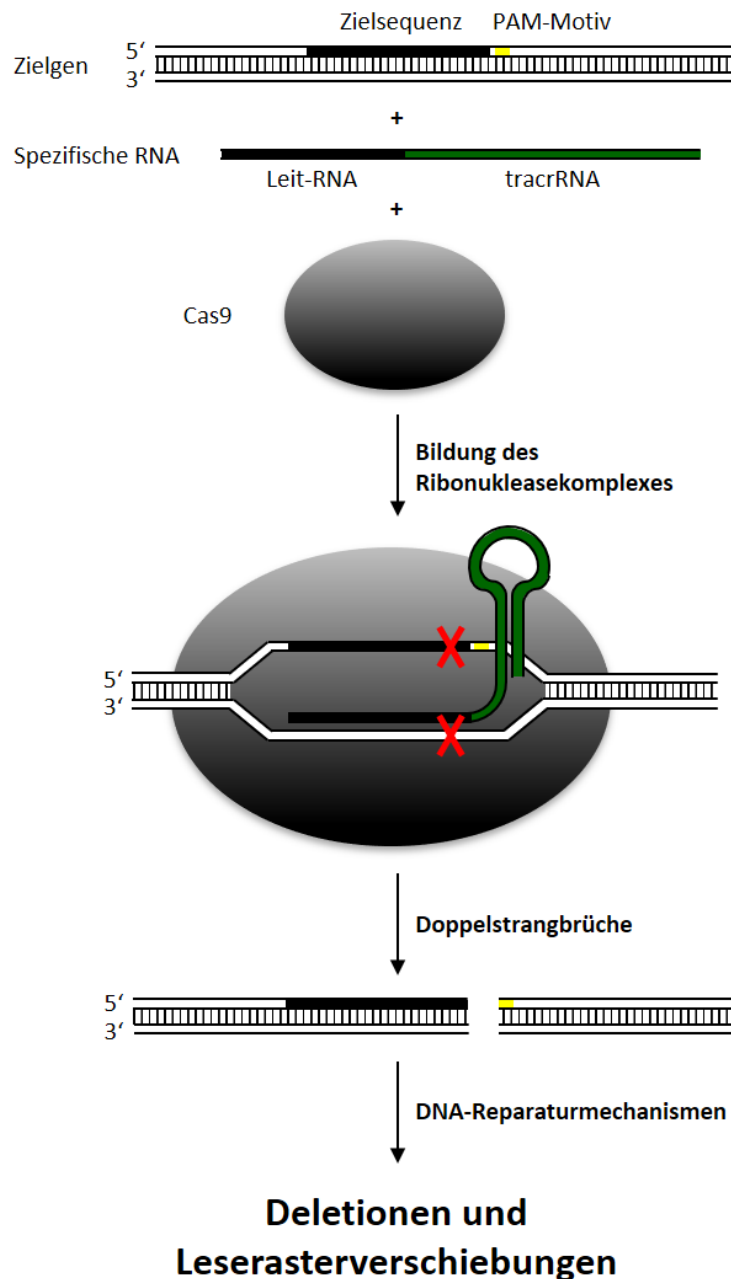
Eine relativ neue Methode der spezifischen Veränderung genomischer DNA ist die CRISPR/Cas9-Methode. Diese kann genutzt werden, um Gene in das Genom einer Zelle einzuführen, aber auch eine komplette Deletion oder das Ausschalten von Genen mittels eingeführter SNPs zu bewerkstelligen. Ursprünglich handelt es sich dabei um einen Verteidigungsmechanismus von Bakterien gegen Bakteriophagen (Labrie 2010). Der Locus der *clustered regularly interspaced short palindromic repeats* (CRISPR) besteht aus einem Cluster von verschiedenen kurzen palindromischen Sequenzen. CRISPR-assoziierte Proteine (Cas) verarbeiten Transkripte dieser CRISPR zu kurzen interferierenden RNAs (crRNAs), die als Teil



eines Ribonukleasekomplexes zur Erkennung von Fremd-DNA dient. Dieser Ribonukleasekomplex besteht aus Cas9, einer tracrRNA (*trans activating crRNA*) und der Leit-RNA, die der Zielsequenz entspricht. Da diese CRISPR auch durch Einbau in die genomische DNA mit neuen Fremd-DNA-Sequenzen ergänzt werden kann, handelt es sich dabei um eine Art adaptives Immunsystem, das zudem vererbbar ist (Richter 2012). Zur Verwendung dieses Mechanismus zur Editierung von Genen ist somit nur die Einbringung eines solchen Ribonukleasekomplexes in die Zelle nötig.

Eine Methode hierbei ist die Verwendung eines Vektorsystems in Form eines Plasmides, das sowohl für das Enzym Cas9 als auch die RNA-Sequenzen codiert. Ein Beispiel ist das Plasmid pSpCas9(BB)-2A-Puro (siehe Anhang 8.1 Verwendete Plasmide), das uns von Feng Zhang (Addgene Plasmid # 62988; <http://n2t.net/addgene:62988>; RRID:Addgene\_62988) zur Verfügung gestellt wurde. Es besitzt die cds für Cas9 hinter einem CBh-Promotor und einen humanen U6-Promotor, hinter den mit Hilfe von QuikChange (siehe Kapitel 4.2.1.11) verschiedene Sequenzen zur Erzeugung der Leit-RNA kloniert wurden (Ran 2013). Die Oligonukleotid-Sequenzen sind in Tabelle 3-12 zu finden. Die stabile Transfektion dieses Plasmids in Zellen führt zu einer langanhaltenden Expression von Cas9 und der spezifischen RNA für die Erkennung und den Schnitt der Ziel-DNA-Sequenz (siehe Abbildung 4-2).

Die anschließende stabile Transfektion erfolgte wie in Kapitel 4.1.5 beschrieben. Als Selektionsantibiotikum diente Puromycin. Die Analyse der Zellen auf einen erfolgreichen *Knockout* erfolgte anschließend durch einen Western Blot (siehe Kapitel 4.3.4) und qRT-PCR-Analysen (siehe Kapitel 4.4).



**Abbildung 4-2: Funktionsweise des CRISPR/Cas9-Systems.**

Beim CRISPR/Cas9-System zum Knockout eines Zielgens kommen in der Zelle das Cas9-Enzym und eine spezifische RNA-Sequenz, bestehend aus der Leit-RNA und tracrRNA (grün), an der genomischen DNA zusammen. Die Leit-RNA ist identisch mit der Zielsequenz (schwarz) und dient Cas9 zur Orientierung. In 3'-Richtung der Zielsequenz im Genom muss sich zudem ein PAM-Motiv (gelb) befinden. Die tracrRNA bildet eine Haarnadelstruktur aus und unterstützt dadurch die Bindung von Cas9 an die Zielsequenz sowie die spätere Restriktion. Durch den Schnitt des Ribonukleasekomplexes entsteht ein Doppelstrangbruch, der durch DNA-Reparaturmechanismen der Zelle repariert wird. Diese sind fehlerbehaftet, sodass Deletionen und Leserasterverschiebungen entstehen können. PAM: protospacer adjacent motif, Cas: CRISPR-assoziiertes Protein, tracrRNA: trans activating crRNA.

#### 4.1.7 Stimulation eukaryotischer Zellen

DLD1-Zellen lassen sich zur Expression pro-inflammatorischer Gene wie der iNOS mit einem Cytokin-Mix stimulieren (Pautz 2010). Zunächst wurde für 16–18 h das Kulturmedium zu FCS-freiem Medium getauscht. Dadurch wurde erreicht, dass sich die Zellen zum Start der Stimulation in der G0-Phase des Zellzyklus befanden und sie damit synchronisiert vorlagen. Danach wurden sie für 6 h bzw. 8 h Stunden mit verschiedenen Cytokinen behandelt. Das hierzu verwendete Cytokingemisch (CM) bestand aus 37,5 ng/mL TNF $\alpha$ , 30 ng/mL IFN $\gamma$  und 3 ng/mL IL1 $\beta$  in FCS-freiem Medium. Gleichzeitig wurden Zellen zur Kontrolle mit FCS-freiem Medium ohne Zusatz von Cytokinen behandelt (Co). Für Luciferase-Assays wurden die Zellen im Anschluss mit je 100  $\mu$ l PLB (24-Lochplatte) lysiert. Für Western Blot-Analysen nach einer transienten Transfektion mit pRLEF1 $\alpha$  wurden die Zellen mit je 100  $\mu$ l PLB 3 Vertiefungen einer 6-Lochplatte lysiert und die Lysate vereint. Bei Western Blot-Analysen stabiler Zellen wurden 150  $\mu$ l RIPA zur Lyse der Zellen einer Vertiefung einer 6-Lochplatte bzw. 300  $\mu$ l RIPA für die Lyse der Zellen einer 10 cm-Schale verwendet. Für mRNA-Analysen wurden stattdessen 200  $\mu$ l GIT verwendet. Vor der Lyse der Zellen wurde das Medium entfernt.

#### 4.1.8 Analyse der mRNA-Stabilität mit Hilfe von DRB

DRB (5,6-Dichlorobenzimidazol-1- $\beta$ -D-ribofuranosid) besitzt eine ähnliche Struktur wie Adenosin und kann dadurch die Elongation der RNA-Polymerase II-vermittelten Transkription hemmen (Sehgal 1976). Zellen, die mit DRB behandelt wurden, können somit keine neue mRNA mehr bilden. mRNA-Analysen nach unterschiedlich langer DRB-Inkubation lassen somit Rückschlüsse auf die Stabilität verschiedener mRNAs zu.

Für die Stabilitätsmessungen wurden DLD-1-Zellen in 24-Lochplatten ausgesät und wie in Kapitel 4.1.7 beschrieben stimuliert. Nach vierstündiger Stimulation wurde DRB in einer Endkonzentration von 25  $\mu$ g/ml zu den Zellen gegeben, bevor die Zellen nach 2, 4 bzw. 6 Stunden in GIT-Puffer lysiert wurden. Anschließend wurde die RNA aus den Zellen isoliert (siehe Kapitel 4.4.1), in komplementäre DNA (*complementary* DNA, cDNA) umgeschrieben (siehe Kapitel 4.4.4) und die mRNA-Expression mittels qRT-PCR (siehe Kapitel 4.4.5) analysiert.

## 4.2 Molekularbiologische Arbeitsmethoden

### 4.2.1 Klonierung von DNA-Fragmenten in Plasmide

Als Klonierung wird die Integration von DNA-Fragmenten in einen DNA-Vektor bezeichnet. Das Produkt einer Klonierung kann durch Transformation in Bakterien vervielfältigt werden. Die Vektoren wurden dazu größtenteils in der klassischen Methode durch Restriktionsenzyme geschnitten und anschließend mit einem DNA-Fragment, das entweder ebenfalls durch Restriktionsenzyme, durch PCR oder durch das Zusammenführen von Oligonukleotiden hergestellt wurde, ligiert. Ein weiterer Teil der Plasmide wurde über die QuikChange-Methode von Agilent erzeugt. Zum Verdünnen der Proben und Reaktionsansätze wurde immer mit DNA-H<sub>2</sub>O gearbeitet.

#### 4.2.1.1 Restriktion von DNA

Bei der Restriktion von DNA werden DNA-Doppelstränge durch Restriktionsendonukleasen an spezifischen palindromischen Erkennungssequenzen geschnitten. Je nach Enzym können hierbei Schnittstellen mit glatten Enden (*blunt ends*) oder 3'- bzw. 5'-überhängenden Enden entstehen. Die Schnittstellen können sich innerhalb der Erkennungssequenz befinden oder in einem bestimmten Abstand dazu. Es wurden 1–2 U Restriktionsenzym pro µg DNA eingesetzt.

**Tabelle 4-2: Zusammensetzung der Restriktionsansätze**

Substanz	präparative Restriktion	analytische Restriktion
Puffer	10 µl	2 µl
Restriktionsenzym	20–60 U	1 U
DNA	20–30 µg	500 ng
Wasser	Auf 100 µl	Auf 20 µl

Die Restriktionsansätze für präparative und analytische Restriktionen sind in Tabelle 4-2 aufgelistet. Sie wurden für 3 h bei der für das Restriktionsenzym angegebenen Reaktionstemperatur inkubiert. Zur Kontrolle eines präparativen Schnittes wurden 2 µl dieses Ansatzes mit 6 µl DNA-H<sub>2</sub>O und 2 µl Auftragspuffer gemischt und auf ein analytisches Gel aufgetragen. Bei analytischen Restriktionen wurde der komplette Ansatz auf ein analytisches Gel aufgetragen. Diente der analytische Schnitt zur Überprüfung der Klonierung, so wurde ein

Restriktionsenzym gewählt, bei dessen Schnitt erfolgreich ligierter Plasmide spezifische DNA-Fragmente entstanden, die sich in ihrer Länge eindeutig vom geschnittenen Vektor unterscheiden. Die Restriktionsenzyme und ihre Hersteller sind in Tabelle 3-11 aufgelistet.

#### **4.2.1.2 Klonierung von DNA-Fragmenten aus Oligonukleotiden**

DNA-Fragmente können nicht nur durch die Restriktion aus Vektoren, sondern auch durch das Zusammenführen von Oligonukleotiden gewonnen werden. Hierzu wurden die komplementären Einzelstränge (erworben über Sigma-Aldrich, siehe Tabelle 3-12) zunächst im Wasserbad für 5 min auf 95 °C erhitzt, um mögliche Sekundärstrukturen zu lösen, und anschließend durch langsames Abkühlen über Nacht hybridisiert. Der Reaktionsansatz bestand aus je 1 µl der beiden Oligonukleotide (100 pmol/µl) mit 5 µl Annealing-Puffer und 43 µl DNA-H<sub>2</sub>O.

#### **4.2.1.3 Synthese von DNA-Fragmenten über PCR**

Eine weitere Möglichkeit ein DNA-Fragment herzustellen, ist dessen Synthese über eine Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR). Hierbei wird unter Verwendung einer Polymerase und zweier spezifischer Oligo-DNA-Moleküle (Primer) das gewünschte Fragment synthetisiert. Als Matrize für die Synthese können sowohl cDNA als auch genomische DNA oder Plasmid-DNA dienen. Nach der Trennung des DNA-Doppelstrangs durch erhöhte Temperatur (Denaturierung), können die Primer über ihre komplementäre Struktur an die Matrizen-DNA binden (Oligo-Hybridisierung). Damit grenzen der *forward*- und der *reverse*-Primer einen DNA-Bereich ein, der im Anschluss durch eine DNA-Polymerase in 5'-3'-Richtung unter Verbrauch von dNTPs amplifiziert wird. Mit jedem Zyklus der PCR wird so die Zahl der DNA-Fragmente verdoppelt (Saiki 1988). Die Primer können dabei auch so gestaltet werden, dass sie eine Restriktionsschnittstelle für die weitere Klonierung enthalten oder um eine solche Restriktionsschnittstelle ergänzt werden. 20 oder mehr Nukleotide (nt) sollten dabei komplementär zur Matrizen-DNA sein, um eine spezifische Bindung zu ermöglichen und wenige unspezifische Bindungen und Nebenprodukte zuzulassen. Für die Synthese von DNA-Fragmenten zur anschließenden Verwendung in der Klonierung wurde die Q5® *High-Fidelity DNA Polymerase* von New England Biolabs verwendet, da sie eine Kontrolllesefunktion besitzt. Ein Reaktionsansatz für die Q5-Polymerase ist in Tabelle 4-3 aufgelistet, das entsprechende Temperaturprogramm für den MyCycler (Biorad) ist in Tabelle 4-4 zu finden. Die verwendete

Temperatur der Oligo-Hybridisierung war abhängig von der Schmelztemperatur ( $T_m$ ) der Primer. Die Zeit der Elongation wurde in Abhängigkeit von der Länge des gewünschten Amplifikats angepasst.

**Tabelle 4-3: Reaktionsansatz für eine PCR mit der Q5-Polymerase von Qiagen**

Substanz	V in $\mu$ l
5x Q5 Reaction Buffer	5
10 mM dNTPs	0,5
forward-Primer	1,25
reverse-Primer	1,25
Q5 High-Fidelity DNA Polymerase	0,25
5x Q5 High GC Enhancer	5
DNA-Lösung	(300 ng gen. DNA oder cDNA bzw. 2 ng Plasmid-DNA)
Wasser	auf 25 $\mu$ l auffüllen

**Tabelle 4-4: Temperaturprogramm für eine PCR mit der Q5-Polymerase von Qiagen**

Temperatur in $^{\circ}$ C	Dauer in s	Schritt	
94	180	Initiale Denaturierung	
94	30	Denaturierung	
$T_m(\text{Primer})-5^{\circ}\text{C}$	60	Oligo-Hybridisierung	45x
72	60/kB	Elongation	
72	420	Finale Elongation	
8		Lagerung	

Anschließend wurde ein analytisches Gel zur Überprüfung des Erfolgs der PCR durchgeführt. Je nach Reinheit der Proben wurden sie entweder mittels eines präparatives Agarosegel aufgetrennt und die gewünschten DNA-Fragmente isoliert oder der gesamte PCR-Ansatz mit dem Monarch<sup>®</sup> PCR & DNA Cleanup Kit von New England Biolabs aufgereinigt.

### 4.2.1.4 Kinasierung

Nach der Ausbildung des DNA-Doppelstrangs bei der Hybridisierung von Oligonukleotiden (siehe Kapitel 4.2.1.2) oder der Synthese von DNA-Fragmenten mittels einer PCR (siehe

Kapitel 4.2.1.3) mussten die DNA-Fragmente für die anschließende Ligation kinasiert, d.h. am 5'-Ende mit einer Phosphatgruppe versehen werden. Hierzu wurde der Kinasierungsansatz mit der T4-Polynukleotid-Kinase (T4-PNK) von New England Biolabs, wie in Tabelle 4-5 aufgelistet, gemischt und für 1 h bei 37 °C inkubiert.

**Tabelle 4-5: Zusammensetzung des Kinasierungsansatzes**

<b>Substanz</b>	<b>Menge</b>
10x PNK-Puffer	10 µl
synthetisierte DNA	20–60 U
10 mM ATP	2 µl
T4-PNK	2 µl
Wasser	Auf 100 µl

#### **4.2.1.5 5'-Dephosphorylierung**

Der Erfolg der Klonierung kann dadurch gesteigert werden, dass eine Religation des geschnittenen Vektors verhindert wird. Dazu wurden überschüssige Phosphatgruppen mit Zugabe von 3 µl einer alkalischen Phosphatase (CIAP) zum präparativen Restriktionsansatz und einstündiger Inkubation bei 37 °C abgespalten. CIAP besitzt in allen NEB-Puffern eine ausreichende Aktivität, sodass keine vorherige Aufreinigung der DNA notwendig war.

#### **4.2.1.6 Phenol-Chloroform-Aufreinigung von DNA**

Die Anwesenheit verschiedener Salze und Enzyme kann die weiteren Schritte in der Klonierung negativ beeinflussen, weshalb die DNA-Fragmente zwischen den einzelnen Schritten aufgereinigt werden müssen. Eine mögliche Methode ist die Phenol-Chloroform-Aufreinigung, bei der die Reaktionsansätze zunächst mit einem Gemisch aus Phenol und Chloroform vermengt und anschließend die unterschiedlichen Phasen durch Zentrifugation wieder getrennt werden. Dabei verbleibt die DNA in der wässrigen Phase, während sich die Proteine in der Phenol/Chloroform-Phase und der Interphase sammeln. Beim anschließenden Fällen und Waschen der DNA werden auch die Salze und anderen Pufferbestandteile entfernt.

Zunächst wurden die Proben mit dem gleichen Volumen Phenol/Chloroform und 1/10 des Volumens 3 M NaAc versetzt, gemischt und 5 min bei 4 °C und 16000 x g zentrifugiert. Die wässrige Phase wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt, die 1,5fache Menge des

Ausgangsvolumens Isopropanol zugegeben und für mindestens 1 h bei -20 °C inkubiert. Die dabei ausgefallene DNA wurde durch Zentrifugation (15 min bei 4 °C und 16000 x g) und anschließendes vorsichtiges Abgießen der Flüssigkeit von der alkoholischen Lösung getrennt. Das DNA-Präzipitat wurde mit 70 %igem Ethanol gewaschen und unter gleichen Bedingungen erneut zentrifugiert. Nach Verwerfen des Überstandes und Trocknen des Präzipitats wurde dieses in 30 µl DNA-H<sub>2</sub>O gelöst.

### **4.2.1.7 Klenow-Reaktion**

Für eine erfolgreiche Ligation müssen die Enden von DNA-Fragment und Vektor kombinierbar sein. Entstehen bei der Restriktion Überhänge deren Sequenzen nicht komplementär zueinander sind, ist eine Ligation dieser Enden nicht möglich. Es besteht allerdings die Möglichkeit, überhängende Enden für eine erfolgreiche Ligation zu glatten Enden aufzufüllen. Hierzu eignet sich das Klenow-Fragment der DNA-Polymerase I von *E. coli*. Dieses besitzt eine 5'-3'-Polymerase- und eine 3'-5'-Exonukleaseaktivität ohne die 5'-3'-Exonukleaseaktivität. Somit können 5'-Überhänge aufgefüllt und 3'-Überhänge abgebaut werden.

Das Präzipitat der aufgereinigten DNA wurde dazu in 85 µl DNA-H<sub>2</sub>O gelöst, mit 10 µl Puffer 2, 4 µl dNTPs und 1 µl Klenow-Enzym versetzt und 1 h bei 37 °C inkubiert.

### **4.2.1.8 Agarose-Gelelektrophorese**

Die Polymerstruktur, die beim Erkalten einer Agarose-Lösung in Form eines Gels entsteht, eignet sich sehr gut für die fragmentlängenspezifische Auftrennung von DNA-Proben. Der Grad der Vernetzung der Agarose, einem linearen Polysaccharid aus D-Galactose und 3,6-Anhydro-L-Galactose, steigt mit der Agarose-Konzentration. Bei Anlegen einer Spannung und Erzeugung eines elektrischen Feldes, wandern die negativ geladenen DNA-Moleküle zur Anode. Je kleiner dabei das DNA-Molekül ist, desto schneller diffundiert es in Richtung Anode. Kleine DNA-Fragmente (bis zu 1000 bp) lassen sich daher am besten in höherprozentigen und damit kleinporigeren (1,5–2 % Agarose in TAE-Puffer) auftrennen, während für die Auftrennung größerer Fragmente die Agarose-Konzentration auf bis zu 0,8 % erniedrigt werden kann. Für die Bildung des Gels wurden 0,8–2 % Agarose in TAE-Puffer durch Erhitzen gelöst und zu Gelen gegossen. Zur Anfärbung der DNA wurden 3 µl Roti® Safe-GelStain von Roth zu 100 µl der heißen Agarose-Lösung gegeben. Der darin enthaltene Farbstoff bildet mit der DNA



fluoreszierende Komplexe. Das bei der Bestrahlung mit UV-Strahlung emittierte Licht wurde mit einer Kamera detektiert (UV-Transilluminator).

Zur Erhöhung der Dichte der einzelnen Proben wurden diese im Verhältnis 4:1 mit DNA-Ladepuffer versetzt, bevor sie in die Geltaschen überführt wurden. Dadurch wurde garantiert, dass die DNA nicht zu stark vor Anlegen des elektrischen Feldes diffundieren konnte. Als Größenstandard wurde eine Tasche mit 6 µl eines DNA-Markers (siehe Tabelle 3-10) befüllt. Die Auftrennung erfolgte in einer horizontalen Gelkammer mit einer angelegten Spannung von 80 bis 120 V. Der Fortschritt der Trennung wurde mit Hilfe eines UV-Transilluminators kontrolliert. Bei einem präparativen Gel wurde anschließend die gewünschte Bande mit einem Skalpell ausgeschnitten und in ein Reaktionsgefäß überführt.

#### **4.2.1.9 Gel-Elution von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen**

DNA-Fragmente, die über eine Agarose-Gelelektrophorese separiert wurden, konnten zur weiteren Analyse oder Klonierung aus dem Agarosegel eluiert werden. Kleine Fragmente (<1000 bp) wurden mit Hilfe des Monarch® *DNA Gel Extraction Kits*, größere Fragmente über die Elektroelution isoliert und aufgereinigt werden.

Die Aufreinigung mit dem Monarch® *DNA Gel Extraction Kit* wurde wie im beigefügten Protokoll beschrieben durchgeführt. Bei der Elektroelution wurden die ausgeschnittenen Gelstücke in einen mit 1 ml TAE-Puffer gefüllten Dialyseschlauch überführt und fest verschlossen für 1 h bei 100 V in eine Gelkammer gelegt. Im Anschluss wurden die Schläuche für 5 min herumgedreht, um eventuell an der Schlauchwand hängende DNA zu lösen. Der DNA-haltige TAE-Puffer wurde aus den Schläuchen in Reaktionsgefäße überführt. Die DNA wurde daraufhin mit Hilfe der Phenol/Chloroform-Aufreinigung (siehe Kapitel 4.2.1.6) isoliert und in 30 µl DNA-H<sub>2</sub>O gelöst.

#### **4.2.1.10 Ligation**

Die Ligation von Vektor und Fragment erfolgte mit Hilfe der DNA-Ligase des Bakteriophagen T4 von NEB. Hierzu wurden Vektor und Fragment im Verhältnis 1:3 in insgesamt 17 µl DNA-H<sub>2</sub>O gelöst und mit 2 µl Ligationspuffer und 1 µl T4-DNA-Ligase versetzt. Nach Inkubation über Nacht bei 18 °C oder für 2 h bei 25 °C erfolgte die Transformation in Bakterien.

#### 4.2.1.11 QuikChange-PCR

Die QuikChange-Methode von Agilent bietet die Möglichkeit mittels einer PCR Fragmente in ein Plasmid einzubauen oder Mutationen zu erzeugen, die zu neuen Plasmiden führen. In dieser Arbeit wurde die QuikChange-PCR verwendet, um die Kozak-Sequenz des uORF-ATGs und den uORF-ATG selbst zu verändern. Dazu wurden DNA-Oligonukleotide kreiert, die in 5'- und 3'-Richtung der zu verändernden Stelle komplementär zum Plasmid sind und dazwischen die gewünschte Mutation enthielten. Dabei wurde eine Überlappung von ca. 20 nt in beide Richtungen von der Mutation aus angestrebt. Mit diesen DNA-Oligonukleotiden und dem verdünnten Vektor wurde anschließend eine PCR durchgeführt.

Tabelle 4-6: Reaktionsansatz für eine QuikChange-Mutations-PCR

Substanz	V in $\mu\text{l}$
5x Q5 Reaction Buffer	5
10 mM dNTPs	0,5
forward-Primer	1,25
reverse-Primer	1,25
Q5 High-Fidelity DNA Polymerase	0,25
5x Q5 High GC Enhancer	5
Vektor-Lösung	2 ng Plasmid-DNA
Wasser	auf 25 $\mu\text{l}$ auffüllen

Tabelle 4-7: Temperaturprogramm für eine QuikChange-Mutations-PCR

Temperatur in $^{\circ}\text{C}$	Dauer in s	Schritt	
95	180	Initiale Denaturierung	
95	30	Denaturierung	
$T_m(\text{Primer})-5\text{ }^{\circ}\text{C}$	30	Oligo-Hybridisierung	30x
72	720	Elongation	
72	600	Finale Elongation	
8		Kühlung bis zur Weiterverwendung	

Sollte ein komplettes DNA-Fragment über die QuikChange-Methode in einen Vektor gebracht werden, wurde zunächst wie in Kapitel 4.2.1.3 beschrieben das Fragment über eine PCR erzeugt. Die verwendeten Primer hierzu waren um eine den späteren Vektor überlappende

Sequenz ergänzt, sodass ein PCR-Fragment entstand, das sowohl am 3'-als auch am 5'-Ende überlappende Sequenzen zum Vektor besaß. Dieser sogenannte Megaprimer wurde dann anstelle der Primer in der QuikChange-PCR eingesetzt.

Nach der QuikChange-PCR wurden die Reaktionsansätze mit dem Restriktionsenzym *DpnI* geschnitten. Dieses Restriktionsenzym schneidet nur methylierte DNA und damit nur die ursprüngliche Vektor-DNA, da diese durch Bakterien synthetisiert wurde. Die PCR-Produkte werden nicht restringiert. Für diesen Restriktionsverdau wurde 1 µl *DpnI* zu 50 µl PCR-Ansatz gegeben und für 1 h bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden die Proben mit dem Monarch® *PCR & DNA Cleanup Kit* von New England Biolabs aufgereinigt.

#### **4.2.1.12 Transformation in Bakterien**

Bakterien bieten durch ihre hohe Aufnahmebereitschaft für Plasmide und ihre hohe Replikationsrate eine gute Möglichkeit, DNA effizient zu vervielfältigen. Die verwendeten Plasmide enthalten hierfür verschiedene Replikationsursprungssequenzen (Ori; zum Beispiel F1-Ori, pUC-Ori oder pMB1-Ori), an denen die DNA-Polymerase der Bakterien binden und die Replikation starten kann. Durch ein Resistenzgen auf den Plasmiden konnten bei Verwendung von Antibiotika-behandelten Agarplatten nur die Bakterien wachsen, bei denen die Transformation erfolgreich verlief.

Für das Einbringen der ligierten Plasmide in Bakterien wurden je 50 µl der kompetenten Bakterien (DH5α oder TOP10) auf Eis aufgetaut, mit 5 µl Ligationsansatz oder der Negativkontrolle (Ligationsansatz ohne Fragment) bzw. 1 µl aufgereinigtem QuikChange-Produkt gemischt und für 30 min auf Eis inkubiert. Nach einem Hitzeschock für 30 s bei 42 °C und weiterer fünfminütiger Inkubation auf Eis wurden 400 µl LB-Medium zu den Bakterien gegeben und diese für 1 h bei 37 °C auf dem Bakterienrüttler mit 220 rpm geschüttelt und inkubiert. Danach wurde der komplette Ansatz auf einer Agarplatte mit entsprechendem Antibiotikum zur Selektion steril ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

#### **4.2.1.13 Plasmid-DNA-Präparation**

Um den Erfolg der Ligation und Transformation zu überprüfen, muss die Plasmid-DNA zunächst aus den Bakterien isoliert werden. Dazu wurde eine Plasmid-DNA-Präparation nach der Methode der alkalischen Lyse durchgeführt. Hierbei werden die Zellen zunächst mit SDS

lysiert und die chromosomale DNA durch pH-Änderung mittels NaOH denaturiert. Durch Zugabe von Kaliumacetat werden Proteine und chromosomale DNA gefällt und können so von der gelösten Plasmid-DNA getrennt werden (Birnboim 1979).

Zunächst wurden die gewachsenen Bakterienkolonien mit Hilfe eines sterilen Zahnstochers von der Agarplatte gelöst und in 3 ml LB-Medium mit Antibiotikum überführt. Nach Inkubation über Nacht bei 37 °C auf einem Schüttler wurden 1,5 ml der Suspension in ein Reaktionsgefäß gegeben und für 1 min bei 4 °C und 16000 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet wurde mit 100 µl Maniatis I (siehe Tabelle 3-4) resuspendiert. Nach Zugabe von 200 µl Maniatis II wurden die Proben vorsichtig gemischt, 5 min auf Eis inkubiert und mit 150 µl Maniatis III versetzt. Nach erneutem vorsichtigem Mischen wurden die Proben für 15 min bei 4 °C und 16000 x g zentrifugiert. Nun wurde der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt und die Plasmid-DNA durch die Zugabe von 400 µl Isopropanol gefällt. Nach zweiminütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurden die Proben 5 min und 16000 x g zentrifugiert, der Überstand verworfen, die Pellets über Kopf getrocknet und zum Schluss in 50 µl DNA-H<sub>2</sub>O gelöst. 5 µl davon wurden für eine Kontrollrestriktion in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit 2 µl Restriktionspuffer und 2 U Restriktionsenzym in insgesamt 20 µl DNA-H<sub>2</sub>O bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden der Erfolg der Restriktion und Transformation durch Auftragung des Restriktionsverdauproduktes auf ein Agarosegel analysiert.

### **4.2.1.14 Kolonie-PCR**

Eine weitere Möglichkeit den Erfolg der Ligation und Transformation zu überprüfen ist eine sogenannte Kolonie-PCR. Hierbei wurden Primer verwendet, von denen entweder ein Primer komplementär zu einem Bereich des Vektors und einer zu einem Bereich des Fragmentes war (zum Beispiel bei den Stem-Loop-Konstrukten) oder beide Primer auf dem Vektor zu finden waren und durch den Einbau des Fragments ein größeres PCR-Produkt entstand als ohne Fragment. Dazu wurden zunächst mehrere Bakterienkolonien mit Hilfe einer 100 µl-Pipettenspitze in jeweils ein Reaktionsgefäß mit 20 µl DNA-H<sub>2</sub>O überführt. Anschließend wurden 2 µl dieser Bakteriensuspension in einer PCR mit der REDTaq<sup>®</sup> DNA Polymerase unter den in Tabelle 4-8 (Reaktionsansatz) und Tabelle 4-9 (Temperaturprogramm) aufgeführten Bedingungen eingesetzt.

Tabelle 4-8: Reaktionsansatz für eine Kolonie-PCR

Substanz	V in $\mu\text{l}$
2xREDTaq <sup>®</sup> -Mix	12,5
forward-Primer	3
reverse-Primer	3
Wasser	4,5
Bakterien-Suspension	2

Tabelle 4-9: Temperaturprogramm für eine Kolonie-PCR

Temperatur in $^{\circ}\text{C}$	Dauer in s	Schritt	
95	300	Initiale Denaturierung	
94	30	Denaturierung	
60	60	Oligo-Hybridisierung	45x
60	60	Elongation	
8		Kühlung bis zur Weiterverwendung	

#### 4.2.1.15 Sequenzierung

Eine noch genauere Kontrolle der Sequenz der erzeugten Plasmide bietet die Sanger-Sequenzierung. Diese wurde von StarSEQ<sup>®</sup> GmbH in Mainz durchgeführt. Dazu wurden 500–700 ng DNA mit 10 nmol eines ausgewählten Primers in 7  $\mu\text{l}$  DNA-H<sub>2</sub>O gelöst und an StarSEQ<sup>®</sup> geschickt. Der Vergleich der erhaltenen mit der erwünschten Sequenz erfolgte mit MacVector 17 und lokalen bzw. *ClustalW-Alignments* (Thompson 1994).

## **4.3 Proteinbiochemische Arbeitsmethoden**

### **4.3.1 Proteinextraktion aus Zellen**

Für proteinbiochemische Untersuchungen müssen die Proteine zunächst aus den Zellen isoliert werden. Hierzu wurden diese entweder mit RIPA oder PLB lysiert und ggf. mit Hilfe eines Schabers in ein geeignetes Reaktionsgefäß überführt. Nach der Homogenisierung in einem Bioruptor mittels Ultraschall für acht Mal 30 s und je 30 s Unterbrechung, wurden die Zelltrümmer durch fünfminütige Zentrifugation bei 16000 x g abgetrennt. Der Überstand, in dem sich die isolierten Proteine befanden, wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und die Proben bei -20 °C gelagert.

### **4.3.2 Photometrische Quantifizierung nach Bradford**

Die Gesamtproteinmenge von Zelllysaten kann durch eine photometrische Bestimmung nach Bradford gemessen werden. Das Prinzip dieser Technik beruht auf der Änderung des Absorptionsspektrums des Farbstoffs Coomassie-Brilliant-Blau von rot in der unkomplexierten, kationischen Form zu blau in der proteingebundenen, anionischen Form bei einer Wellenlänge von 595 nm (Bradford 1976). Der Komplex aus Protein und Coomassie-Brilliant-Blau entsteht dabei durch hydrophobe Wechselwirkungen mit hydrophoben Aminosäuren wie Phenylalanin und Tryptophan sowie heteropolare Wechselwirkungen mit basischen Aminosäuren wie Arginin. Durch die vielen Wechselwirkungen spielen auch die Anwesenheit von Detergenzien und Salzen im Puffer eine entscheidende Rolle, weshalb zur Quantifizierung eine Verdünnungsreihe unter gleichen Pufferbedingungen mit definierten Mengen BSA als Referenz gemessen wurde (Georgiou 2008). Die gemessene Extinktion ist proportional zur Menge der in der Lösung enthaltenen Proteine (Bradford 1976). Mit den Extinktionswerten bei 595 nm der Verdünnungsreihe wurde eine lineare Regression durchgeführt und darüber die Proteinkonzentration in den Zelllysaten bestimmt.

Im Fall der mit PLB lysierten Zellen wurde die Tabelle 4-10 gezeigte Verdünnungsreihe verwendet und in eine 96-Lochplatte pipettiert. Für die Messung der Proben wurden 1–2 µl Zelllysate in 98–88 µl Wasser gelöst und in eine Vertiefung einer 96-Lochplatte gegeben. Im Anschluss wurden sie mit 100 µl 40 %igem Bradford-Reagenz versetzt und die Absorption bei 595 nm mit einem Spektrometer gemessen.

Tabelle 4-10: Verdünnungsreihe für einen Bradford mit PLB

BSA-Konzentration (in $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ )	0	0,25	0,5	1	1,5	2	2,5	3	3,5	4	5	6
BSA (1x; in $\mu\text{l}$ )	0	2,5	5	10	15	20	25	30	35	40	50	60
Wasser (in $\mu\text{l}$ )	100	97,5	95	90	85	80	75	70	65	60	50	40

Wurden die Zellen in RIPA lysiert, wurden eine andere Verdünnungsreihe verwendet (siehe Tabelle 4-11). Die Zelllysate wurden zunächst verdünnt (1–2  $\mu\text{l}$  der Proben mit RIPA auf 10  $\mu\text{l}$  aufgefüllt) und anschließend in 790  $\mu\text{l}$  Wasser aufgenommen. Alle Proben wurden mit 200  $\mu\text{l}$  unverdünntem Bradford-Reagenz versetzt und gemischt. Für eine Doppelbestimmung wurden je zwei Vertiefungen mit je 200  $\mu\text{l}$  einer Probe gefüllt und die Absorption bei 595 nm mit einem Spektrometer gemessen.

Tabelle 4-11: Verdünnungsreihe für einen Bradford mit RIPA

BSA-Konzentration (in $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ )	0	1	2	4	6	8	10	12	14	16	18	20
BSA (10x; in $\mu\text{l}$ )	0	1	2	4	6	8	10	12	14	16	18	20
RIPA (in $\mu\text{l}$ )	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
Wasser (in $\mu\text{l}$ )	790	789	788	786	784	782	780	778	776	774	772	770

### 4.3.3 Proteinfällung mit Methanol/Chloroform

Bei sehr kleinen Proteinkonzentration (kleiner als 4  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) wurden die für weitere Proteinbestimmungen nötige Proteinmenge gefällt und anschließend in Laemmli-Puffer gelöst. Hierzu wurden 100–150  $\mu\text{g}$  Protein in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß gegeben und das Volumen auf 200  $\mu\text{l}$  mit Millipore- $\text{H}_2\text{O}$  aufgefüllt. Anschließend wurden 400  $\mu\text{l}$  Methanol, 100  $\mu\text{l}$  Chloroform und 300  $\mu\text{l}$  Millipore-Wasser hinzugegeben und alles gemischt. Nach 15 min Zentrifugation bei 13000 rpm und 4 °C wurde die obere Phase vorsichtig mit der Pipette abgenommen und verworfen. Zum Rest (Interphase und untere Phase) wurden 400  $\mu\text{l}$  Methanol zugegeben und erneut gemischt. 15 min Zentrifugation bei 13000 rpm und 4 °C ließen die Proteine präzipitieren. Der flüssige Überstand wurde vollständig abgesaugt und das Präzipitat an der Luft getrocknet.

Die Präzipitate wurden in je 40 µl Laemmli-Puffer aufgenommen, bei 95 °C für 5 min denaturiert und kurz herunterzentrifugiert. Sie wurden direkt in einem Western Blot eingesetzt oder bei -20 °C gelagert.

### 4.3.4 Immundetektion mittels Western Blot-Analyse

Die Analyse der Proteinexpression erfolgte über eine Western Blot-Analyse nach vorangegangener Auftrennung der Proteine durch eine SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE).

Durch die Zugabe des anionischen Detergens Natriumdodecylsulfat (SDS) wird die Eigenladung der Proteine überdeckt und durch Zugabe von 1,4-Dithiothreitol (DTT) werden Disulfidbrücken gespalten. Die Denaturierung erfolgt durch Erhitzen der Proben für 5 min bei 95 °C in SDS- und DTT-haltigen Laemmli-Puffer. Dadurch erfolgt die Proteinauftrennung bei der SDS-PAGE ausschließlich nach der Größe der Proteine (Laemmli 1970, Burnette 1981). Das Polyacrylamidgel selbst besteht aus zwei Komponenten: dem niederprozentigen Sammelgel, welches ein hochprozentiges Trenngel überschichtet. Das grobporige Sammelgel dient der Konzentrierung der Proteine, wodurch sie sich an der Phasengrenze zum engporigen Trenngel sammeln. Im Trenngel erfolgt dann die eigentliche Trennung der Proteine. Die Zusammensetzung von Sammel- und Trenngel für je zwei 1,5 mm dicke Gele ist in Tabelle 4-12 beschrieben. Die Zusammensetzungen der verwendeten Puffer sind in Tabelle 3-6 aufgelistet.

**Tabelle 4-12: Zusammensetzung der SDS-Polyacrylamid-Gele**

<b>Reagenz</b>	<b>Sammelgel (4 %)</b>	<b>Trenngel (10 %)</b>
H <sub>2</sub> O	4,60 ml	6,70 ml
1,5 M TRIS-HCl (pH 8,8)	1,88 ml	4,22 ml
10 % SDS	75,0 µl	168,8 µl
30 % Acrylamid	975 µl	5,63 ml
TEMED	9,75 µl	11,25 µl
10 % APS	49,5 µl	112,5 µl

Nach der Polymerisation des Gels wurde es in eine mit 1x Laufpuffer gefüllte Laufkammer eingespannt. Die in Laemmli-Puffer aufgenommenen Proben (100 µg Protein in 32 µl Wasser und 8 µl 5x Laemmli-Puffer oder die nach der Fällung in Laemmli-Puffer aufgenommenen



Präzipitate (siehe Kapitel 4.3.3)) wurden für 5 min bei 95 °C im Heizblock denaturiert, kurz zentrifugiert und in die Taschen des Gels eingefüllt. Als Größenmarker wurde ein Proteinstandard (siehe Tabelle 3-10) verwendet. Bis zum Einlaufen der Proben in das Trenngel wurde eine Spannung von 80 V angelegt. Anschließend wurde die Spannung auf 120 V erhöht, bis die Lauffront gerade aus dem Gel hinausgelaufen war.

Nach der Gelelektrophorese wurden die Proteine auf eine Nitrocellulosemembran übertragen und konnten dort durch spezifische Antikörper nachgewiesen werden (Towbin 1979, Burnette 1981). Zum Übertragen der Proteine auf die Nitrocellulosemembran wurde zunächst das Gel von den Glasplatten gelöst, das Sammelgel abgetrennt und das Trenngel für 15 min in Transferpuffer inkubiert. Die Nitrocellulosemembran und sechs Stücke Whatman®-Papier wurden auf die Größe des Gels zugeschnitten und ebenfalls in Transferpuffer inkubiert. Es wurde ein Stapel aus drei Lagen Whatman®-Papier, der Nitrocellulosemembran, dem Gel und drei weiteren Lagen Whatman®-Papier in die Trans-Blot® SD Semi-Dry Transfer-Zelle gelegt und für 45–50 min einer Spannung von 12 V ausgesetzt. Anschließend wurde die Nitrocellulosemembran für 1 h in MP-Lösung geschwenkt, um ungesättigte Bindungsstellen zu blockieren. Danach wurde der in MP-Lösung gelöste Primärantikörper hinzugegeben und über Nacht bei 4 °C inkubiert. Dieser Primärantikörper bindet spezifisch an das zu analysierende Protein. Am nächsten Tag wurde nach drei fünfminütigen Waschschritten mit Waschpuffer der Sekundärantikörper für 1 h bei RT an den Primärantikörper gebunden. Nach erneutem Waschen der Membran für je dreimal 5 min mit Waschpuffer wurde die Membran mit Hilfe des ECL-Systems von Thermo Scientific entwickelt.

Eine Liste der verwendeten Primärantikörper befindet sich in Tabelle 3-17. Die Sekundärantikörper wiederum binden an die Primärantikörper und sind in Tabelle 3-18 aufgelistet. Ihre Bindung an die Primärantikörper potenziert die Zahl gebundener Antikörper und erhöht zusätzlich die Nachweisgrenze. Für die Entwicklung eines Signals besitzen sie eine Peroxidase-Domäne. Die verwendete Meerrettich-Peroxidase katalysiert die Oxidation von Luminol unter Lichtemission. Dieses wird in Form eines Zweikomponenten-Chemilumineszenz-Substrates auf die Membran gegeben. Die dabei entstehende Chemilumineszenz kann über einem Positivfilm oder mit Hilfe des ChemiDoc™ XRS detektiert werden.

Die Expression der untersuchten Proteine wurde mit Hilfe eines konstitutiv exprimierten Proteins (zum Beispiel  $\beta$ -Tubulin oder GAPDH) normiert. Die Intensität der Chemilumineszenz-

Reaktion wurde mit der Software *Image Lab* (Version 4.1 *build* 16) von Bio-Rad Laboratories densitometrisch ausgewertet.

### 4.3.5 Luciferase-Assay

Reportergenanalysen sind eine geeignete Methode zur Untersuchung regulatorischer Elemente von Genen, zum Beispiel den 3'- oder 5'-UTRs sowie den Promotoren. Hierbei wird der zu analysierende Bereich vor oder hinter ein Reportergen kloniert und zur Analyse in Zellen transfiziert. Als Reportergene eignen sich vor allem Gene, deren Proteinexpression relativ einfach und schnell analysiert werden kann, wie zum Beispiel mittels Chemilumineszenz. Beispiele hierfür sind das Luciferasegen des Leuchtkäfers (*Firefly*-Luciferase) oder das der Seefeder (*Renilla*-Luciferase). Die Menge des exprimierten Proteins kann dabei über einen Enzymaktivitätstest nachgewiesen werden. Die *Firefly*-Luciferase wandelt D-Luciferin unter Einwirkung der Cofaktoren ATP, Coenzym A und  $Mg^{2+}$  in Oxyluciferin um. Die *Renilla*-Luciferase hat hingegen Coelenterazin als Substrat und setzt dieses zu Coelenteramid um. In beiden Reaktion wird Energie in Form von Licht frei. Diese Biolumineszenz kann in einem Luminometer ermittelt werden und ist proportional zur Expression des jeweiligen Gens (Kricka 1983, de Wet 1987, Inouye 1997).

Die Normierung der so erhaltenen Aktivität kann über verschiedene Methoden erfolgen. Entweder kann die Gesamtproteinmenge der Proben (Bestimmung nach Bradford, Kapitel 4.3.2) oder die Luciferase-Aktivität einer bei der transienten Transfektion kotransfizierten anderen Luciferase genutzt werden. Diese zweite Luciferase kann sich auf demselben Plasmid oder einem zweiten kotransfizierten Plasmid befinden. Im Rahmen dieser Doktorarbeit besaßen die transfizierten Plasmide pRL-FL1, pRLV1FL3J, pRL-iNOS-5UTR\_wt\_FL und pRL-iNOS-5UTR\_mutORF\_FL die cds beider Luciferasen, wobei das zu untersuchende regulatorische Element genau zwischen die beiden Luciferasen kloniert war (siehe Abbildung 5-15). Alle anderen *Firefly*-Luciferase-Plasmide wurden hingegen mit dem Plasmid pRLEF1 $\alpha$  (Bros 2006) kotransfiziert, welches für die *Renilla*-Luciferase codiert.

Zur Bestimmung der Luciferase-Aktivitäten wurden die Zellen zunächst in jeweils 100  $\mu$ l PLB lysiert und anschließend jeweils 10  $\mu$ l davon in eine 96-Lochplatten vorgelegt. 5 s nach Zugabe

von je 100 µl Luciferase-Substrat wurde die Lichtemission mit dem Centro LB 960 Lumino-  
meter von Berthold gemessen. Als Blindwert diente der Emissionswert von 1x PLB. Die *Renilla*-  
Luciferase-Messung erfolgte auf die gleiche Weise, allerdings mit 100 µl des entsprechenden  
*Renilla*-Substrats. Die Normierung erfolgte durch Quotientenbildung von *Firefly*-Luciferase-  
Werten zu *Renilla*-Luciferase-Werten nach Abzug der Blindwerte bzw. zu den Proteinkonzent-  
rationen der jeweiligen Proben. Bei der Transfektion von EGFP-Konstrukten diente die  
*Renilla*-Aktivität zusätzlich zur Überprüfung der Transfektionseffizienz und wurde daher vor  
der Durchführung eines Western Blots bestimmt.

## 4.4 RNA-Analysen

### 4.4.1 Isolierung von RNA aus Zellen

Die Isolierung von RNA aus Zellen erfolgte nach der Methode von Piotr Chomczynski und  
Nicoletta Sacchi (Chomczynski 1987). Die in GIT-Puffer lysierten Zellen wurden in ein  
Reaktionsgefäß überführt und das gleiche Volumen H<sub>2</sub>O-gesättigtem Phenol und 1/10 des  
Volumens 2 M NaAc hinzugegeben. Die Proben wurden gemischt und zur Trennung von DNA,  
Proteinen und RNA mit 0,5 Volumeneinheiten Chloroform/Isoamylalkohol versetzt, erneut  
kräftig gemischt und für 15 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Proben 20 min bei  
4 °C und 16000 x g zentrifugiert und die wässrige Phase in ein neues Reaktionsgefäß  
überführt. Nach Zugabe von 1,5 Volumeneinheiten Isopropanol (-20 °C) wurden die Proben  
für mind. 1 h bei -20 °C eingefroren. Nach nochmaliger Zentrifugation (20 min bei 4 °C und  
16000 x g) wurde der Überstand abgegossen, das Präzipitat mit 300 µl 80 %igem Ethanol  
gewaschen und erneut 5 min bei 4 °C und 16000 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde  
verworfen und die RNA über Kopf getrocknet. Nach dem Lösen in 30 µl DEPC-H<sub>2</sub>O konnte die  
RNA-Konzentration photometrisch bestimmt werden (siehe Kapitel 4.4.2).

### 4.4.2 Photometrische Quantifizierung von Nukleinsäuren

Die Konzentration von DNA- und RNA-Proben lässt sich über das Lambert-Beersche Gesetz  
bestimmen. Die Höhe der Absorption ist dabei proportional zur Konzentration der ab-  
sorbierenden Substanz. DNA- und RNA-Moleküle haben ein Absorptionsmaximum bei einer  
Wellenlänge von 260 nm, welches sich daher besonders zur Konzentrationsbestimmung  
eignet. Die Absorption wurde mit dem Nano-Drop® ND-2000-Spektrometer gemessen und

mit dem Programm NanoDrop 2000 ausgewertet. Über das Absorptionsverhältnis von 260 nm zu 280 nm wurde zudem der Reinheitsgrad bestimmt, da Proteine, die die Proben verunreinigen könnten, ein Absorptionsmaximum bei 280 nm besitzen. Als rein galt RNA bzw. DNA mit einem Quotienten von mindestens 1,8. Eine weitere mögliche Verunreinigung durch Ethanol, Phenol oder andere organische Lösungsmittel konnte durch die Absorption bei einer Wellenlänge von 230 nm bestimmt werden. Der Quotient aus den Absorptionen bei 260 nm und 230 nm liegt im Idealfall bei 2.

### 4.4.3 DNase-Verdau

Zur Vermeidung von Verunreinigung der RNA-Proben durch DNA, besonders bei transient transfizierten Zellen, wurde bei einigen Proben im Anschluss an die Aufreinigung ein DNase-Verdau durchgeführt. Hierzu wurde das TURBO DNA-free™ Kit von Ambion nach einem optimierten Protokoll verwendet.

Die RNA-Proben wurden zunächst auf eine Konzentration von 200 ng/μl verdünnt. 50 μl dieser Lösung wurden für 1 min bei 95 °C und anschließend für 1 min auf Eis inkubiert. Nach Zugabe von 1 μl DNase und 5 μl DNase-Puffer wurden die Proben für 1 h bei 37 °C inkubiert. Nach der Hälfte der Zeit wurde erneut 1 μl DNase zugegeben. Danach wurden die Proben mit 11 μl Inaktivierungspuffer versetzt, 5 min bei Raumtemperatur inkubiert und bei 10000 x g 90 s zentrifugiert. Der Überstand mit der RNA wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und die RNA-Konzentration erneut bestimmt.

### 4.4.4 Reverse Transkription

Für die Untersuchung der mRNA-Expression wurden in zwei Schritten zunächst die isolierte RNA in einer reversen Transkriptionsreaktion in einzelsträngige cDNA umgeschrieben und diese dann anschließend als Matrize in einer quantitativen Real-Time-PCR (qRT-PCR) eingesetzt (siehe Kapitel 4.4.5).

Zur reversen Transkription wurde entweder das *High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit* Applied Biosystems (für siRNA-behandelte Zellen und neuronale Zellproben) oder das *M-MuLV Reverse Transcriptase Kit* von NEB (für RNA aus sonstigen Zellen) verwendet. Beide Kits enthalten jeweils eine RNA-abhängige DNA-Polymerase (reverse Transkriptase), die durch

Bindung kurzer einzelsträngiger DNA-Stücke (Primer) an die RNA und anschließende reverse Transkription die entsprechende cDNA synthetisiert.

Die RNA-Proben wurden zunächst auf eine Konzentration von 50 ng/μl verdünnt und die Reaktionsgemische wie in Tabelle 4-13 bzw. Tabelle 4-14 angegeben in 200 μl-Reaktionsgefäßen angesetzt.

**Tabelle 4-13: Ansatz für die Reverse Transkription mit dem *High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit***

<b>Substanz</b>	<b>V in μl</b>
10x RT-Puffer	2
HexaN-Primer	2
dNTP Mix (100 mM)	0,8
MultiScribe™-Reverse Transcriptase, 50 U/μl	0,5
Wasser	4,7
RNA-Lösung (50 ng/μl)	10

**Tabelle 4-14: Ansatz für die Reverse Transkription mit dem *M-MuLV Reverse Transcriptase Kit* von NEB**

<b>Substanz</b>	<b>V in μl</b>
10x M-MuLV-Puffer	2
HexaN-Primer	2
dNTP Mix (100mM)	0,8
M-MuLV Reverse Transkriptase	0,175
Wasser	5,025
RNA-Lösung (50 ng/μl)	10

Die cDNA-Synthese erfolgte im *MyCycler* (BioRad) nach dem in Tabelle 4-15 gezeigten Temperaturprogramm, das für beide Transkriptase-Reaktionen verwendet wurde. Nach der RT-Reaktion wurden die Proben bei -20 °C gelagert.

Tabelle 4-15: Temperaturprogramm für die reverse Transkription

Temperatur in °C	Dauer in min	Schritt
25	10	Primer-Bindung
37	120	reverse Transkription
85	5	Inaktivierung der Transkriptase
4		Kühlung bis zur Weiterverwendung

#### 4.4.5 quantitative Real-Time-PCR

Mit Hilfe der quantitativen *Real-Time*-Polymerase-Ketten-Reaktion (qRT-PCR) kann eine Matrizen-cDNA gleichzeitig amplifiziert und quantifiziert werden (Higuchi 1992). Hierbei wird zwischen zwei verschiedenen qRT-PCR-Arten, der sondenbasierten und der sondenfreien qRT-PCR, unterschieden.

Bei der sondenbasierten qRT-PCR erfolgt die Quantifizierung der cDNA-Menge über spezifische *TaqMan*-Sonden. Diese *TaqMan*-Sonden sind, wie auch die Primer, sequenzspezifische Oligonukleotide und binden im Bereich zwischen den Primerbindestellen an die Matrizen-cDNA. Zusätzlich besitzen sie am 5'-Ende einen fluoreszierenden Reporterfarbstoff (in diesem Fall 6-Carboxyfluorescein (FAM)) und am 3'-Ende einen *Quencher* (in diesem Fall Carboxytetramethylrhodamin (TAMRA)). Bei der Bestrahlung mit einem Laser wird das vom Reporterfarbstoff emittierte Licht durch die räumliche Nähe vom *Quencher* absorbiert. Dies geschieht unabhängig davon, ob die *TaqMan*-Sonde an die Matrizen-DNA gebunden oder ungebunden vorliegt. Während der Elongation wird nun durch die 5'-3'-Exonukleaseaktivität der genutzten DNA-Polymerase der Reporterfarbstoff von der an der cDNA (bzw. Matrizen-DNA) gebundenen Sonde abgespalten. Diese räumliche Trennung von Reporterfarbstoff und *Quencher* führt nun dazu, dass der *Quencher* nicht mehr das emittierte Licht des Reporterfarbstoffs absorbieren kann, wodurch das Fluoreszenzsignal messbar wird. Mit steigender DNA-Menge steigt somit auch die Konzentration an freiem Reporterfarbstoff, wodurch ein immer stärkeres Fluoreszenzsignal entsteht, das proportional zur Menge der amplifizierten DNA ist. Durch den Vergleich mit einem konstitutiv exprimierten Gen, zum Beispiel GAPDH, kann das Fluoreszenzsignal und damit die Menge der untersuchten mRNA normiert werden.

Für eine sondenbasierte qRT-PCR wurden 2 µl der durch reverse Transkription hergestellten cDNA mit den in Tabelle 3-14 angegebenen Primern und Sonden nach dem in Tabelle 4-16 gezeigten Reaktionsansatz gemischt. Tabelle 4-17 zeigt das Temperaturprogramm für die sondenbasierte qRT-PCR mit dem MyiQ Cyclor bzw. CFX Connect™ von BioRad.

**Tabelle 4-16: Reaktionsansatz für eine sondenbasierte qRT-PCR**

<b>Substanz</b>	<b>V in µl</b>
OneTaq Mix (NEB)	12,5
forward-Primer	2
reverse-Primer	2
Sonde	1
Wasser	5,5
DNA-Lösung	2

**Tabelle 4-17: Temperaturprogramm für eine sondenbasierte qRT-PCR**

<b>Temperatur in °C</b>	<b>Dauer in s</b>	<b>Schritt</b>
95	300	Initiale Denaturierung
94	15	Denaturierung
60	60	<i>Annealing</i> /Elongation
8		Kühlung bis zur Weiterverwendung

Eine andere Methode zur Quantifizierung von cDNA und damit zur Analyse der RNA-Expression ist die sondenfreie qRT-PCR. Hierbei wird ein DNA-Farbstoff (ähnlich wie SybrGreen®) verwendet, der durch Interkalieren in die amplifizierte, doppelsträngige DNA sequenzunspezifisch die Produkte der PCR anfärbt. Durch die Bildung eines Komplexes aus DNA und Farbstoff ändert sich das Emissionsmaximum im Vergleich zum freien Farbstoff. Das erzeugte Fluoreszenzsignal kann damit wie bei der sondenbasierten qRT-PCR zur Quantifizierung der cDNA herangezogen werden, da es in diesem neuen Emissionsmaximum proportional zu der Menge an amplifizierter DNA ist. Auch hier werden die Werte mit einem konstitutiv exprimierten Gen verglichen. Da bei dieser Methode das dritte spezifische Oligonukleotid (die Sonde) fehlt, wird die Spezifität der genutzten Primer nach der eigentlichen qRT-PCR-Reaktion über eine Schmelzkurve ermittelt. Hierbei wird die Temperatur schrittweise von 60 °C auf 95 °C erhöht. Bei der für das jeweilige Fragment spezifischen

Schmelztemperatur trennt sich der Doppelstrang und das Fluoreszenzsignal nimmt ab. Da die spezifischen PCR-Produkte durch die maximale Ausbildung von Wasserstoffbrücken eine höhere Schmelztemperatur besitzen als zum Beispiel unspezifische Primer-Dimere, ist eine Unterscheidung mit Hilfe der Schmelztemperaturen möglich.

Auch bei der sondenfreien qRT-PCR wurden 2 µl der cDNA aus der reversen Transkription eingesetzt. Tabelle 4-18 und Tabelle 4-19 zeigen den entsprechenden Ansatz und das Temperaturprogramm für die PCR mit dem MyiQ Cyclor bzw. CFX Connect™ von BioRad.

**Tabelle 4-18: Reaktionsansatz für eine sondenfreie qRT-PCR**

Substanz	V in µl
SybrGreen MasterMix (PrimerDesign)	10
forward-Primer	0,6
reverse-Primer	0,6
Wasser	6,8
DNA-Lösung	2

**Tabelle 4-19: Temperaturprogramm für eine sondenfreie qRT-PCR**

Temperatur in °C	Dauer in s	Schritt
95	300	Initiale Denaturierung
94	15	Denaturierung
60	60	<i>Annealing</i> /Elongation
95	30	Terminale Denaturierung
60 --> 95	10	Schmelzkurve
8		Kühlung bis zur Weiterverwendung

Die Messung des Fluoreszenzsignals erfolgte nach der Elongation. Bei Messungen mit interkalierendem Farbstoff erfolgte zusätzlich eine Messung des Fluoreszenzsignals nach jedem Erhöhen der Schmelztemperatur. Als Richtwert für die Quantifizierung der Ergebnisse wurde der Schwellenwert C(T) genutzt, welcher dem PCR-Zyklus entspricht, bei dem sich die Fluoreszenzintensität der DNA gerade deutlich von dem Hintergrundsignal abhebt. Die Auswertung der Ergebnisse bei sondenbasierten und sondenfreien qRT-PCRs erfolgte mit Hilfe der  $2^{-\Delta\Delta C(T)}$ -Methode, bei der die jeweiligen C(T)-Werte jeder Probe auf die Werte der



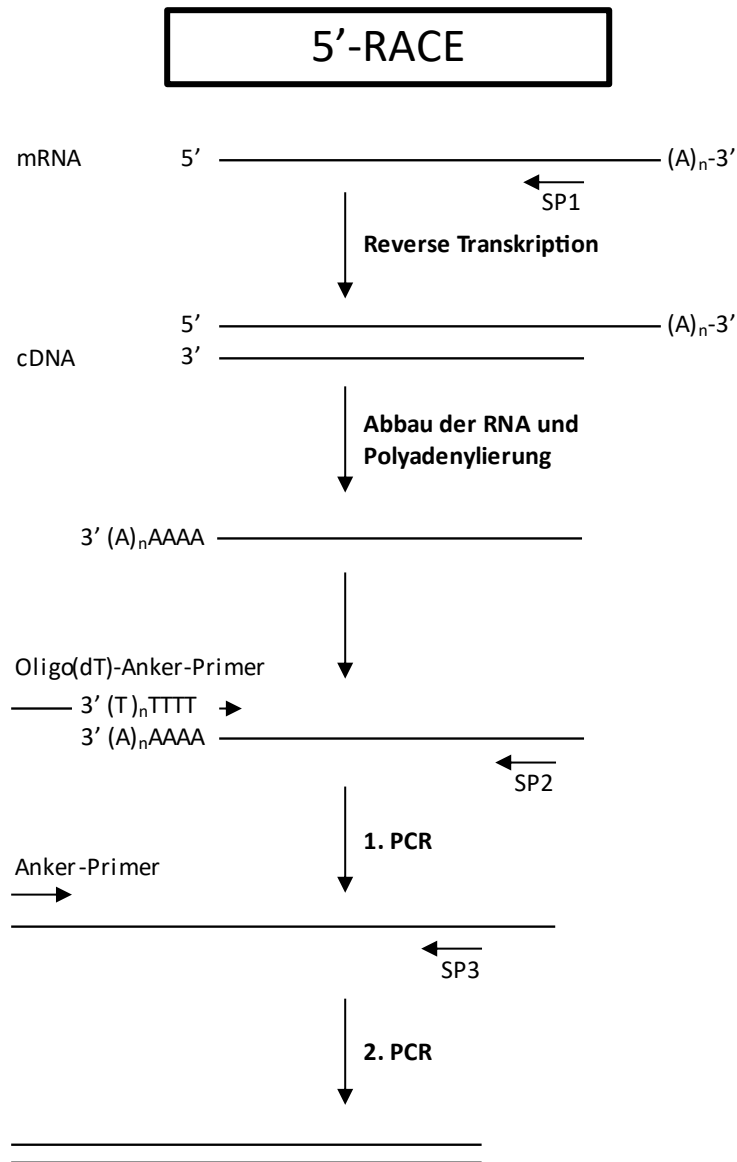
konstitutiv exprimierten Gene bezogen werden und diese anschließend auf eine Kontrollgruppe normiert werden (Livak 2001).

#### 4.4.6 5'-RACE zur Bestimmung des 5'-Endes der mRNA

Die untranslatierten Regionen der mRNA spielen eine entscheidende Rolle in der Regulation der Genexpression (Misquitta 2001, Mazumder 2003, Hinnebusch 2016). Daher ist es wichtig für die Untersuchung der Regulationsmechanismen, diese Sequenzen und sowohl Anfang und Ende der mRNA genau zu kennen. Eine Methode zur Bestimmung dieser Sequenzbereiche ist der 5'-RACE (*rapid amplification of 5' cDNA ends*). Hierbei wird zunächst die mRNA in cDNA umgeschrieben, amplifiziert und anschließend sequenziert. Da das Ende der mRNA allerdings unbekannt ist, muss hierbei ein Trick angewendet werden, um trotzdem ein Primerpaar für die PCR benutzen zu können (Frohman 1988). Es wurde nach dem im *5'/3' RACE Kit (2nd Generation)* von Roche vorgeschlagenem Protokoll vorgegangen (siehe Abbildung 4-3).

Im ersten Schritt wird die mRNA mit einem für das zu untersuchende Gen spezifischen Primer und der reversen Transkriptase des Kits in cDNA umgeschrieben. Der für die iNOS verwendete Primer war huiNOS\_rev (GGT AGC CAG CAT AGC GGA TG). Nach der Aufreinigung der RNA mit dem *High Pure PCR Product Purification Kit* wird mit Hilfe der Transferase des 5'/3' RACE Kits das entstandene 3'-Ende der cDNA (entspricht dem 5'-Ende der mRNA) polyadenyliert. Bis zu diesem Schritt wurde wie in den Protokollen der beiden Kits beschrieben vorgegangen.

Die Polyadenylierung liefert die Bindestelle für den ersten Primer der PCR, den Oligo(dT)-Anker-Primer (Frohman 1988). Der zweite Primer (SP2) wird so gewählt, dass er zwischen 5'-Ende und dem Primer, der zur cDNA-Synthese verwendet wurde (huiNOS\_rev), liegt.



**Abbildung 4-3: Ablauf des 5'-RACE nach Michael Frohman.**

Gezeigt ist der Ablauf eines klassischen 5'-RACE, wie es das Protokoll des 5'/3' RACE Kit (2nd Generation) von Roche vorgibt. Zunächst wird die mRNA mit Hilfe einer RT und einem genspezifischen Primer (**SP1**) in cDNA umgeschrieben. Diese cDNA wird dann aufgereinigt durch die Degradation der mRNA und anschließend mit einer terminalen Transferase und dATP an ihrem 3'-Ende polyadenyliert. Diese cDNA dient danach als Matrize für die PCR mit einem Oligo(dT)-Anker-Primer und einem weiteren spezifischen Primer (**SP2**) für das zu untersuchende Gen. Eine zweite PCR mit dem Anker-Primer und einem dritten spezifischen Primer (**SP3**) ist optional.

Die PCR wurde mit dem *AllTaq Master Mix Kit* von Qiagen durchgeführt. Der Reaktionsansatz ist in Tabelle 4-20 aufgelistet. Das Temperaturprogramm in Tabelle 4-21.

Tabelle 4-20: Reaktionsansatz für eine PCR mit dem *AllTaq Master Mix Kit*

Substanz	V in $\mu\text{l}$
4x AllTaq Master Mix	10
<i>forward</i> -Primer (10 nM)	5
<i>reverse</i> -Primer (10 nM)	5
polyadenylierte cDNA	10
Wasser	10

Tabelle 4-21: Temperaturprogramm für eine PCR mit dem *AllTaq Master Mix Kit*

Temperatur in $^{\circ}\text{C}$	Dauer in s	Schritt
95	300	Initiale Denaturierung
95	15	Denaturierung
55	30	<i>Annealing</i> 45x
72	60	Elongation
72	600	Finale Elongation
8		Kühlung bis zur Weiterverwendung

Anschließend wurden die PCR-Produkte auf ein 2 %iges Agarosegel aufgetragen (siehe Kapitel 4.2.1.8) und ein Teil mit dem *High Pure PCR Product Purification Kit* aufgereinigt. 1  $\mu\text{l}$  des aufgereinigten PCR-Produktes wurden 1:10 mit DNA- $\text{H}_2\text{O}$  verdünnt und in einer zweiten PCR mit dem *AllTaq Master Mix Kit*, dem Anker-Primer und einem weiteren Primer (SP3), der idealerweise zwischen SP2 und dem 5'-Ende des Transkripts liegt, amplifiziert. Erneut wurden die Proben auf ein 2 %iges Agarosegel aufgetragen (siehe Kapitel 4.2.1.8) und getrennt. Die verschiedenen Banden wurden ausgeschnitten und wie in Kapitel 4.2.1.9 beschrieben mit dem *NEB Monarch Gel Extraction Kit* aufgereinigt. Je nach Ausbeute, wurde ein Teil der aufgereinigten cDNA mit dem Primer SP3 sequenziert (siehe Kapitel 4.2.1.15). Der Rest wurde kinasiert und als DNA-Fragment in einen mit *EcoRV* geschnittenen und mit CIAP behandelten Vektor pCR-Script kloniert. Die transformierten Bakterienkolonien wurden in einer Kolonie-PCR mit den Primern pCR-universal und pCR-reverse auf die transformierten Plasmide hin untersucht. Geeignete Kolonien wurden gepickt, über Nacht in 3 ml LB-Amp-Medium kultiviert, mit dem Monarch<sup>®</sup> Plasmid Miniprep Kit von New England Biolabs aufgereinigt und die DNA-Proben sequenziert (siehe Kapitel 4.2.1).

## 4.5 Bioinformatische Untersuchungen

Phylogenetische Untersuchungen wurden mit MacVector 17 und *ClustalW-Alignments* (Thompson 1994) durchgeführt. Zur Bestimmung der Abstände wurde die *Neighbor-Joining*-Methode verwendet und die absoluten Differenzen dargestellt. Die nötigen Gen- und Transkriptsequenzen wurden der Refseq-Datenbank entnommen. Die Referenznummern sind in Tabelle 5-1 und in den jeweiligen Ergebnissen angegeben.

Für weitere Analysen von RNAseq-Daten im Rahmen der Expressionen der iNOS in Neuronen wurden die Daten den jeweiligen Datenbanken entnommen und mit RStudio (Version 1.2.1335; 2019), dem Bioconductor-Paket (Gentleman 2004, Huber 2015), *CLC Genomics Workbench 12* von Qiagen, Microsoft Excel 2010 und GraphPad Prism (Version 5.02) analysiert. Die Quellen für die einzelnen Datenbanken sind in den Ergebnissen angegeben.

## 4.6 Statistik

Die statistischen Auswertungen dieser Arbeit wurden mit den Programmen Microsoft Excel 2010 und GraphPad Prism (Version 5.02) durchgeführt. Alle dargestellten Daten entsprechen den Mittelwerten  $\pm$  SEM (Standardfehler der Mittelwerte). Die Signifikanz wird mit einem Stern (\*) dargestellt. Dabei entspricht ein Stern einem p-Wert unter 0,05, zwei Sterne einem p-Wert von unter 0,01 und drei Sterne einem p-Wert unter 0,001. Zum Vergleich zweier Gruppen wurden zweiseitige t-Tests durchgeführt. Für den Vergleich mehrerer Gruppen mit nur einer Variablen wurden hingegen *one-way* ANOVA (*analysis of variance*) bzw. bei mehreren Variablen *two-way* ANOVA mit anschließendem Bonferroni oder Tukey *multiple comparison*-Test verwendet.

## 5 ERGEBNISSE

### 5.1 Phylogenetische Analyse des iNOS-Gens

Aufgrund der cytotoxischen Wirkungen von NO kann eine fehlerhafte Regulation der iNOS-Expression gefährliche Konsequenzen für die exprimierende Zelle, deren Umgebung bis hin zum ganzen Organismus haben und wird daher mit vielen Krankheiten, insbesondere mit Autoimmunerkrankungen und der Entwicklung von Tumoren, in Verbindung gebracht (Qidwai 2010). Daher ist die Erforschung der Regulationsmechanismen, um das fein abgestimmte System zu verstehen und potenzielle Ziele für die Therapie solcher Erkrankungen zu finden, von essenzieller Bedeutung (Pautz 2010). Eine wichtige Rolle spielen bei der post-transkriptionellen Regulation der Genexpression auch die UTRs der mRNA. Ihre Struktur, Sequenz und die Anwesenheit von verschiedenen Bindungsmotiven für RNA-BPs trägt wesentlich zur post-transkriptionellen Regulation der Genexpression bei (Misquitta 2001, Mazumder 2003, Hinnebusch 2016).

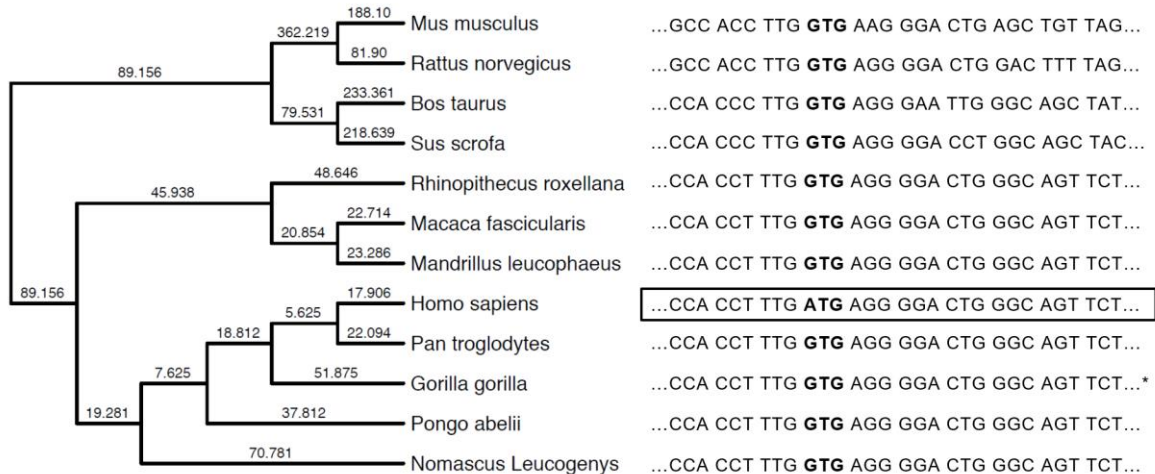
**Tabelle 5-1: Vergleich der iNOS-5'-UTR verschiedener Säugetiere und Angabe der verwendeten Refseq accession numbers.**

Spezies	Start iNOS-cds	Anzahl uORFs	Transkript-Länge	Refseq accession number
<i>Homo sapiens</i>	Exon 2	1	4206 bp	NM_000625
<i>Mus musculus</i>	Exon 2	1	4164 bp	NM_010927
<i>Rattus norvegicus</i>	Exon 2	0	3793 bp	NM_012611
<i>Bos taurus</i>	Exon 2	2	4269 bp	XM_024979645
<i>Sus scrofa</i>	Exon 2	2	3948 bp	NM_001143690
<i>Rhinopithecus roxellana</i>	Exon 2	0	4197 bp	XM_010372301
<i>Macaca fascicularis</i>	Exon 2	0	4197 bp	XM_005583198
<i>Mandrillus leucophaeus</i>	Exon 2	0	4177 bp	XM_011997545
<i>Pan troglodytes</i>	Exon 2	0	4523 bp	XM_024350675
<i>Gorilla gorilla</i>	Exon 2	0	4131 bp	XM_019028405
<i>Pongo abelii</i>	Exon 2	0	4205 bp	XM_024235442
<i>Nomascus leucogenys</i>	Exon 2	0	4206 bp	XM_003277085

Bei der Betrachtung der Sequenz des iNOS-Gens und iNOS-Transkripts (Refseq accession number: NM\_000625.4, annotation release 109, April 2019 bzw. ENST00000313735.11 in der Ensembl-Datenbank) fällt auf, dass in der 5'-UTR der entstehenden mRNA ein uORF

vorhanden ist (Pautz 2010). Ein Vergleich der postulierten iNOS-5'-UTRs verschiedener Spezies zeigt, dass auch andere Spezies, wie zum Beispiel Maus, Rind und Schwein, einen oder mehrere uORFs in der 5'-UTR der iNOS-mRNA besitzen (siehe Tabelle 5-1). Außerdem zeigt der Vergleich der 5'-UTRs, dass alle iNOS-cds im jeweiligen zweiten Exon beginnen und somit ein Intron in der 5'-UTR vorhanden ist.

Die detailliertere Betrachtung der Transkripte durch *ClustalW-Alignment* (Thompson 1994) und die *Neighbor-Joining-Methode* (Saitou 1987) mit MacVector liefert den in Abbildung 5-1 gezeigten phylogenetischen Baum. Beim *Gorilla gorilla* befindet sich das postulierte Exon 1 an einer anderen Stelle im Genom, sodass das Transkript eine andere 5'-UTR besitzt. Betrachtet man nun die Sequenz, die das Startcodon des iNOS-uORFs umgibt bzw. die korrespondierenden Sequenzen in den anderen untersuchten Spezies, zeigt sich spezienübergreifend eine hohe Homologie. Die Homologie ist, wie zu erwarten, am höchsten unter den Menschenaffen, gefolgt von weiteren Affenarten und schließlich von anderen Säugetieren, wie Ratte, Maus, Schwein und Rind. Allerdings besitzt nur die humane iNOS ein Startcodon in diesem Sequenzbereich.



**Abbildung 5-1: Phylogenetischer Baum mit der die das Startcodon des iNOS-uORF umgebenden Gensequenz.**

Gezeigt ist der phylogenetische Baum der bekannten bzw. postulierten iNOS-Transkripte verschiedener Spezies nach der Analyse mit MacVector 17 und ClustalW-Alignments. Die gezeigten absoluten Abstände wurden nach der Neighbor-Joining-Methode bestimmt (Saitou 1987). Auf der rechten Seite sind die hoch-konservierten DNA-Sequenzen im ersten Exon der Transkripte um den humanen uORF-Start (**ATG**) gezeigt. Die dazugehörigen Refseq accession numbers sind in Tabelle 5-1 gelistet. \*: diese Sequenz befindet sich nur im Genom der Spezies, aber nicht auf dem postulierten Transkript.

Der uORF ist somit humanspezifisch, weswegen sein Einfluss nur im humanen Modell untersucht werden kann. Ein Vergleich der ersten beiden Exons der humanen und murinen

iNOS bis zum Startcodon der iNOS-cds ist in Tabelle 5-2 gezeigt. Der murine uORF liegt deutlich näher am TSS und hat keine Überschneidung mit dem humanen uORF.

Tabelle 5-2: Vergleich der ersten beiden Exons des humanen und murinen iNOS-Gens bis zum Startcodon der iNOS-cds.

murin	human
CTGGAGGGGT ATAAATACCT <b>GATGGCTGCT</b>	ATAACTTTGT AGCGAGTCGA AAACTGAGGC
<b>GCCAGGGTCA</b> CAACTTTACA <b>GGGAGTTGAA</b>	TCCGGCCGCA GAGAACTCAG CCTCATTCTT
<b>GACTGAGACT</b> CTGGCCCCAC GGGACACAGT	GCTTTAAAAT CTCTCGGCCA CCTTTG <b>ATGA</b>
GTCACTGGTT TGAAACTTCT <u>CAGCCACCTT</u>	<b>GGGGACTGGG</b> <b>CAGTTCTAGA</b> <b>CAGTCCCGAA</b>
<u><b>GTGA</b>AAGGGA</u> CTGAGCTGTT <u>AGAGACACTT</u>	<b>GTTCTCAAGG</b> <b>CACAGGTCTC</b> <b>TTCCTGGTTT</b>
<u>CTGAGGCTCC</u> TCACGCTTGG <u>GTCTTGTTCA</u>	<b>GA</b> CTGTCCTT ACCCCGGGGA GGCAGTGCAG
<u>CTCCACGGAG</u> TAGCCTAGTC AACTGCAAG/	CCAGCTGCAA G/CCCCACAG TGAAGAACAT
AGAACGGAGA ACGTTGGATT TGGAGCAGAA	CTGAGCTCAA ATCCAGATAA GTGACATAAG
GTGCAAAGTC TCAGAC <b>ATG</b>	TGACCTGCTT TGTAAGCCA TAGAG <b>ATG</b>

**NNN** = uORF; **NNN** = uORF-Region der humanen iNOS projiziert auf die murine Sequenz;

**NNN** = Sequenz aus Abbildung 5-1; **ATG** = Startcodon des humanen iNOS-uORFs;

/ = Exon-Exon-Grenze; **ATG** = Startcodon der iNOS-cds

Die Umgebung des Startcodons ist sehr wichtig für dessen Erkennung und hat damit einen entscheidenden Einfluss auf die Translationsraten des ORF. Die optimale Sequenz ist GCC<sup>A</sup>/<sub>G</sub>CC **ATG** G (bzw. GCC<sup>A</sup>/<sub>G</sub>CC **AUG** G auf mRNA-Ebene) (Kozak 1987). Die Kozak-Sequenz des uORFs ist CCA CCT TTG **ATG** A (bzw. CCA CCU UUG **AUG** A in der iNOS-mRNA). Es fällt auf, dass sich weder an der -3-Stelle eine Purinbase noch an der Stelle +4 ein Guanin befindet, weshalb von einer schwachen Kozak-Sequenz gesprochen werden kann. Die Kozak-Sequenz der iNOS-cds ist GCC ATA GAG **ATG** G (bzw. GCC AUA GAG **AUG** G in der iNOS-mRNA). Sie entspricht damit ebenfalls nicht der optimalen Kozak-Sequenz, weist aber die Purinbase Guanin an Position -3 und Guanin an Position +4 auf (Kozak 1987, Pautz 2010).

Auch der Vergleich der verschiedenen humanen NOS-Isoformen, wie in Tabelle 5-3 dargestellt, weist für die verschiedenen publizierten Transkripte uORFs auf. Die nNOS kann sogar bis zu fünf uORFs auf ihrem Transkript besitzen. Allerdings gibt es große Unterschiede in deren Größe, Sequenz und Lokalisation, die in den sehr unterschiedlichen 5'-UTR-Sequenzen

begründet liegt. In der Tabelle sind nur die verifizierten Transkripte aufgelistet. Die nicht aufgelisteten anderen putativen iNOS-Transkriptvarianten (siehe Kapitel 1.3.1) enthalten keinen uORF.

**Tabelle 5-3: uORFs in den verschiedenen humanen NOS-Isoformen.**

<b>Isoform</b>	<b>mRNA-Transkript</b>	<b>Länge des 5'-UTR (nt)</b>	<b>Zahl der uORF <math>\geq</math> 15 nt</b>	<b>Refseq accession number</b>
NOS1 (nNOS)	1	535	3	NM_000620
	2	711	5	NM_001204218
	3	311	2	NM_001204213
	4	306	2	NM_001204214
NOS2 (iNOS)	1	264	1	NM_000625
NOS3 (eNOS)	1	335	3	NM_000603
	2	0	0	NM_001160109
	3	0	0	NM_001160110
	4	0	0	NM_001160111

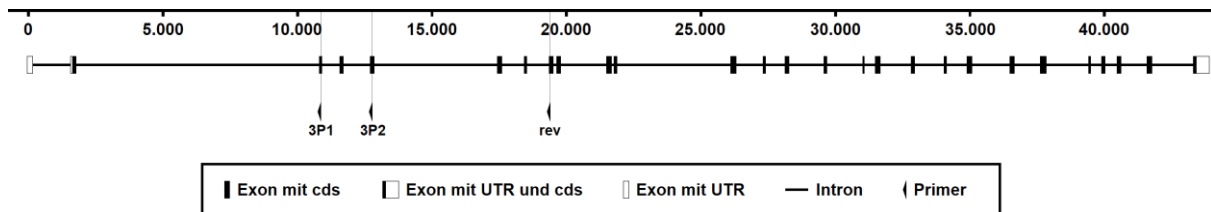
## 5.2 Bestimmung des TSS mittels 5'-RACE

Zur Analyse der iNOS-Expression und deren Regulation eignen sich unter anderem DLD1-Zellen, eine stabile Kolonkarzinom-Zelllinie (RRID: CVCL\_0248), da in diesen die iNOS-Expression durch Behandlung mit Cytokinen induziert werden kann (Kleinert 1998). Eine wichtige Grundlage für die Erforschung dieser Regulationsmechanismen ist die Sequenz des Gens und seines Transkripts. Das postulierte iNOS-Transkript besitzt einen uORF in der 5'-UTR (*Refseq accession number* NM\_000625.4).

Um sicherzugehen, dass die induzierten DLD1-Zellen dieses Transkript mit dem angegebenen uORF exprimieren und die exprimierte iNOS-mRNA der damit einhergehenden Struktur entspricht, wurde ein 5'-RACE für die iNOS-mRNA durchgeführt. Hierbei wurde die iNOS-mRNA zunächst mit Hilfe eines spezifischen Primers (huiNOS\_rev) in cDNA umgeschrieben und anschließend mittels einer Transferase polyadenyliert. Dadurch erhielt die cDNA ein polyadenyliertes 3'-Ende (entsprechend dem 5'-Ende der mRNA) und konnte mit einem Oligo(dT)-Anker-Primer und einem weiteren spezifischen iNOS-Primer (iNOS\_3P2\_qRT\_FG)



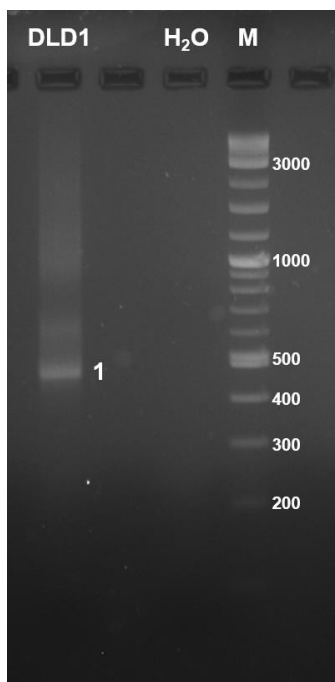
über eine PCR vervielfältigt werden. Mit einer zweiten PCR erfolgte im Anschluss unter Verwendung des Anker-Primers und eines weiteren spezifischen iNOS-Primers (iNOS\_3P1\_qRT\_FG) eine noch spezifischere Vervielfältigung der iNOS-5'-Region. Die Lage der verwendeten Primer relativ zum Transkript in der Gensequenz der iNOS ist in Abbildung 5-2 dargestellt. Abbildung 5-6 zeigt die Lage der Primer in einer vergrößerten Darstellung. Die Sequenzen sind in Tabelle 3-12 aufgelistet.



**Abbildung 5-2: Lage der Primer in der Gensequenz.**

Dargestellt ist das iNOS-Transkript mit den verwendeten Primern iNOS\_3P1\_qRT\_FG, iNOS\_3P2\_qRT\_F und huiNOS\_rev in der Sequenzumgebung des humanen iNOS-Gens.

Nach der Agarose-Gelelektrophorese der PCR-Produkte wurden die DNA-Fragmente durch Bestrahlung mit UV-Licht sichtbar gemacht, wodurch das in Abbildung 5-3 dargestellte Bild erhalten wurde.



**Abbildung 5-3: Agarosegel der PCR-Fragmente nach der zweiten PCR des 5'-RACE der DLD1-Proben.**

Die RNA stimulierter DLD1-Zellen wurde mit dem 5'/3' RACE Kit (2nd Generation) von Roche und dem iNOS-spezifischen Primer huiNOS\_rev in cDNA umgeschrieben, mit dem High Pure PCR Product Purification Kit aufgereinigt, polyadenyliert und anschließend mit dem AllTaq Master Mix Kit von Qiagen und den Primern Oligo(dT)-Anker-Primer und huiNOS\_3P2\_FG\_qRT amplifiziert. Nach Aufreinigung mit dem High Pure PCR Product Purification Kit wurde eine zweite PCR mit dem Anker-Primer und iNOS\_3P1\_FG\_qRT durchgeführt und die Produkte auf ein 2%iges Agarosegel aufgetragen. Durch Anlegung von Spannung (120 V) wurden die DNA Fragmente der Größe nach aufgetrennt. Das hier gezeigte Bild wurde nach der Gelelektrophorese aufgenommen. Die Spur **DLD1** zeigt die aufgetrennten PCR-Produkte für die RNA aus DLD1-Zellen und **H<sub>2</sub>O** die Negativkontrolle. Als Größenmarker (**M**) diente der 2-Log DNA Ladder von New England Biolabs und die Markerbanden sind mit der jeweiligen Größe in bp beschriftet.

Das Gel zeigt eine Bande (**1**) bei einer Größe von ca. 480 bp und keine Bande in der Negativkontrolle. Damit lässt sich das erzeugte PCR-Fragment der DLD1-RNA und dem iNOS-Transkript zuordnen. Die Bande wurde aus dem Gel ausgeschnitten und mit dem *Monarch Gel Extraction Kit* von New England Biolabs aufgereinigt. Anschließend wurde die Probe von Star-SEQ® sequenziert. Die Sequenz befindet sich im Anhang (siehe Anhang 8.3). Sie wurde mit dem iNOS-Transkript verglichen. Abbildung 5-4 zeigt das Ergebnis des *Alignments* der Sequenzen des iNOS-Transkripts und der 5'-RACE-Probe DLD1-1. Das Oligo(dT)-Signal am Anfang entspricht dem polyadenylierten 5'-Ende der cDNA und ist daher nicht Teil des eigentlichen Transkripts.



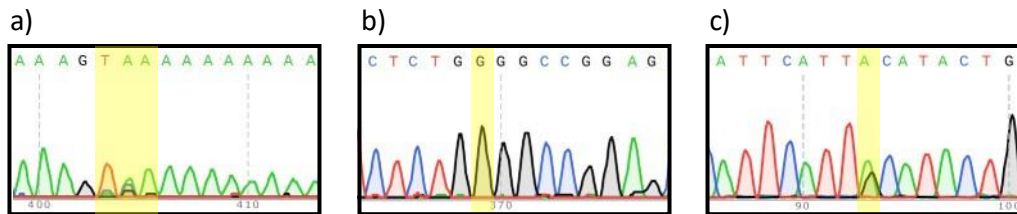
NNN = Primer (iNOS\_3P1\_qRT\_FG); **NNN** = keine Übereinstimmung  
NNN = Exon 1 der regulären iNOS-Transkriptvariante;  
**NNN** = uORF der regulären iNOS-Transkriptvariante

**Abbildung 5-4: ClustalW-Alignment der Sequenzen des iNOS-Transkripts und der 5'-RACE-Probe DLD1-1.**

Gezeigt ist das ClustalW-Alignment der Sequenzen des iNOS-Transkripts und der 5'-RACE-Probe DLD1-1 (siehe Kapitel 5.2 und Abbildung 5-3).

Das Sequenzierungsergebnis weist eine nahezu vollständige Homologie zu den Exons 1 bis 3 des iNOS-Transkripts auf. Der TSS selbst liegt laut den Sequenzierungsdaten um 3 nt stromaufwärts verschoben. Auch eine Punktmutation oder fehlerhafte Sequenzierung der Base 38 von G zu C sowie der Base 316 von C zu T (bzw. U auf Ebene der RNA) des postulierten iNOS-Transkripts taucht auf. Bei näherer Betrachtung des Sequenzierungsergebnisses (siehe Abbildung 5-5) zeigt sich für die Mutation der Base 38, dass sie eindeutig gemessen wurde. Dabei handelt es sich um die Mutation rs10459953, die je nach Studie bei bis 30–50 % der Menschen auftritt (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/rs10459953>). Für die Mutation der

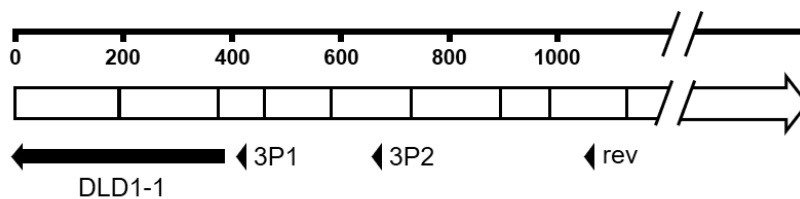
Base 316 ergibt sich eine Überlagerung von zwei Sequenzierungssignalen (A und G). Damit liegen auch Transkripte mit der Base C und somit entsprechend dem postulierten iNOS-Transkript vor. Für das Ende der Sequenzierung wurden ebenfalls verschiedene Signale gemessen, sodass die Verschiebung um 3 nt nicht eindeutig gezeigt werden kann.



**Abbildung 5-5: Sequenzierungsergebnis für die möglicherweise mutierten Sequenzbereiche mit Unterschieden zum iNOS-Transkript.**

Gezeigt sind Ausschnitte der Sequenzierungsdaten für die Sequenzierung des DLD1-1-PCR-Produktes. Von links nach rechts sind zunächst die Sequenz um den TSS des iNOS-Transkripts (a) und daneben die Sequenzen um die möglichen Mutationen der Base 38 (b) und der Base 316 (c) dargestellt. Die entscheidenden Basen sind gelb hinterlegt. Die Farbcodierung der Signale ergibt sich wie folgt: rot = T, grün = A, blau = C und schwarz = G. Das vollständige Sequenzierungsergebnis ist in Abbildung 8-8 gezeigt.

Eine maßstabsgetreue, schematische Darstellung der Homologie ist in Abbildung 5-6 zu sehen.



**Abbildung 5-6: 5'-RACE-Produkt nach Sequenzierung bezogen auf das iNOS-Transkript.**

Dargestellt ist das iNOS-Transkript mit dem Ergebnis der Sequenzierung des 5'-RACE-Produktes der DLD1-RNA in maßstabsgetreuer Weise. Die Primer der cDNA-Synthese (*huiNOS\_rev*), der Primer der ersten PCR (*huiNOS\_3P2\_FG\_qRT*) und der Primer der zweiten PCR (*huiNOS\_3P1\_FG\_qRT*) sind ebenfalls dargestellt.

Insgesamt entspricht der Beginn der iNOS-mRNA in den DLD1-Zellen bis auf die genannten Ausnahmen dem postulierten iNOS-Transkript (Annotation 109 bzw. *Refseq accession number* NM\_000625.4). Abbildung 5-7 zeigt die Struktur der iNOS-5'-UTR.

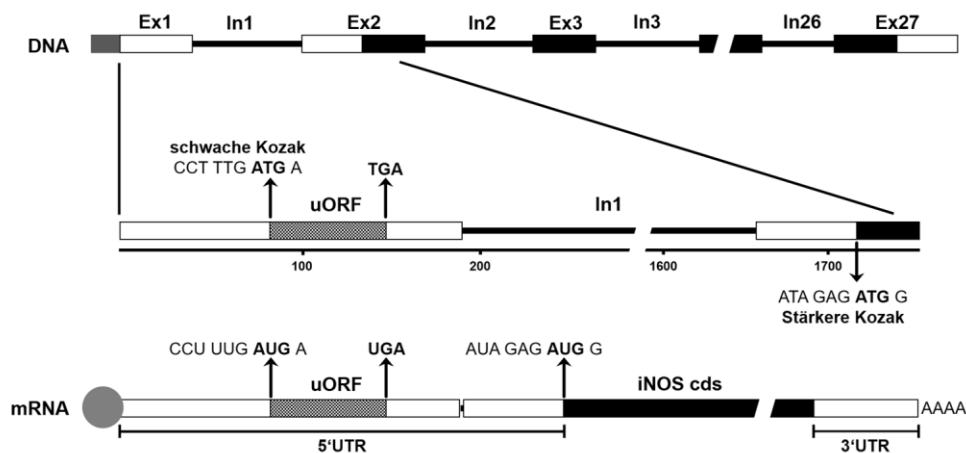


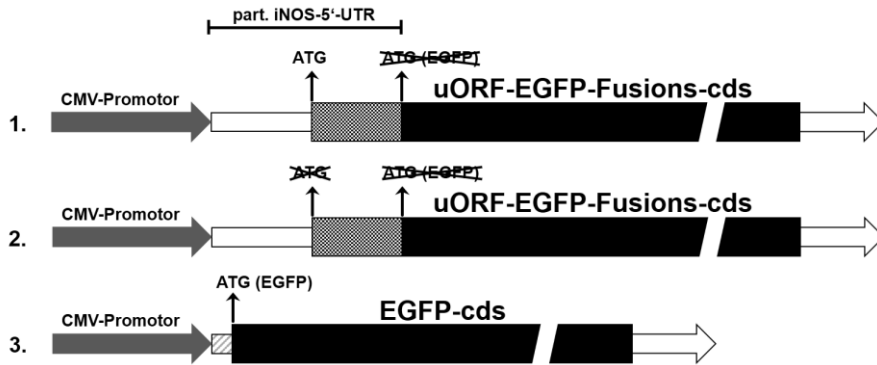
Abbildung 5-7: 5'-UTR des iNOS-Transkripts.

Gezeigt ist die Struktur der 5'-UTR der iNOS. Sie besteht aus dem 192 nt langen Exon 1 und den ersten 72 nt des Exon 2. Auf dem ersten Exon befindet sich ein 66 nt langer uORF beginnend mit Nukleotid 87. Das Stoppcodon befindet sich 39 nt vor der EEJ. Das herausgespleißte Intron 1 hat eine Länge von 1455 nt. Sowohl die Kozak-Sequenz des uORFs als auch der iNOS-cds sind gezeigt.

### 5.3 Translatierbarkeit des uORF

Die Anwesenheit eines uORFs in der 5'-UTR einer mRNA ist ein Indiz für eine Inhibition der Translation der Haupt-cds (Calvo 2009). Im klassischen Modell der cap-abhängigen, monocistronischen Translation sollte es nach der Translation des uORF nicht mehr zur Translation der Haupt-cds kommen. Dementgegen steht die Expression der iNOS trotz eines uORFs in ihrer 5'-UTR. Die Kozak-Sequenz des iNOS-uORFs ist sehr schwach im Vergleich zur iNOS-cds und besonders schwach gegenüber der optimalen Kozak-Sequenz ( $GCC^A/GCC \mathbf{AUG} G$  (Kozak 1987)). Es galt daher zu untersuchen, inwieweit der uORF die Translation der iNOS beeinflusst und ob der uORF für eine Regulation der iNOS durch den NMD sorgt (Gather 2019).

Zunächst sollte überprüft werden, ob der uORF translatierbar ist. Dafür wurden mehrere Reporter-genkonstrukte kloniert. Als Positivkontrolle diente ein pcDNA4/TO-EGFP-Plasmid mit CMV-Promotor und nachgeschalteter cds für das grün fluoreszierende Protein (*enhanced green fluorescent protein*; EGFP). Außerdem wurde ein Plasmid mit einer Fusion aus uORF und EGFP-cds und als Negativkontrolle eine uORF-EGFP-Fusions-cds mit mutiertem ATG verwendet. Abbildung 5-8 zeigt eine schematische Darstellung der entscheidenden Sequenzbereiche.



**Abbildung 5-8: Schema der uORF-EGFP-Konstrukte.**

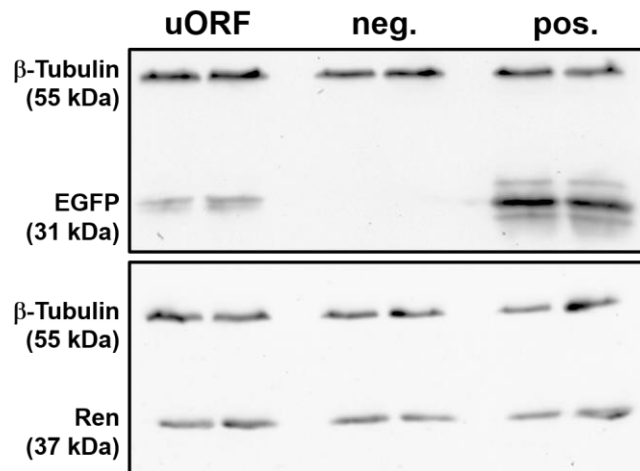
Dargestellt sind die entscheidenden Bereiche der verschiedenen EGFP-Konstrukte für die Expression des EGFP. Zwischen den CMV-Promotor des Vektors pcDNA4/TO-EGFP und die cds des EGFP (**EGFP-cds**) wurde die 5'-UTR der iNOS bis und einschließlich des uORFs ohne dessen Stopcodon kloniert. Variante **1** entspricht dem Plasmid pcDNA4/TO-uORF-EGFP und damit der Wildtyp-Variante. Das ATG des EGFP wurde dabei durch den uORF mit dem uORF-ATG ersetzt. Variante **2** ist pcDNA4/TO-mutORF-EGFP mit dem mutierten ATG des uORF. Sie wurde als Negativkontrolle eingesetzt, da sie durch die Mutation keinen ORF besitzt, welcher zu einem funktionsfähigen EGFP translatiert werden könnte. Struktur **3** zeigt den ursprünglichen Vektor pcDNA4/TO-EGFP, der gleichzeitig die Positivkontrolle ist.

Das zu untersuchende Reportergenkonstrukt wurde aus der Positivkontrolle pcDNA4/TO-EGFP und dem ersten Teil der 5'-UTR der iNOS kloniert, sodass das Startcodon des EGFP durch den uORF der iNOS ohne dessen Stopcodon ersetzt wurde. Hierzu wurde zunächst ein Megaprimer mit den Primern uORF-EGFP-5p (5'-GCG TTT AAA CTT AAG CAT AAC TTT GTA GCG AGT CG-3') und uORF-EGFP-3P (5'-CCT CGC CCT TGC TCA CAC CAG GAA GAG ACC TGT GCC TTG-3') sowie dem Plasmid pcDNA4/TO-Ex1-Ex2-Luc als Matrize erzeugt und anschließend in einer QuikChange-PCR in den Vektor **pcDNA4/TO-EGFP** kloniert. Dadurch wurde das Plasmid **pcDNA4/TO-uORF-EGFP** erhalten.

Für die Negativkontrolle wurde das Startcodon des uORF so mutiert, dass keine Expression des uORF-EGFP-Fusionsproteins mehr stattfinden konnte. Dies erfolgte mittels einer QuikChange-PCR mit den Primern mut-uORFup (5'-CGG GAC TGT CTA AAA CTG CCC AGT CCG AAT TCC AAA GGT GGC CGA GAG ATT TTA AAG C-3') und mut-uORFdown (5'-GCT TTA AAA TCT CTC GGC CAC CTT TGG AAT TCG GAC TGG GCA GTT TTA GAC AGT CCC G-3'). Die Kozak-Sequenz des uORF (CCA CCT TTG **ATG** AGG) wurde dadurch zu einer EcoRI-Schnittstelle (CCA CCT TTG **GAA** TTC). Das entstandene Plasmid ist **pcDNA4/TO-mutORF-EGFP**.

Nach der Transfektion von DLD1-Zellen mit den Plasmiden und 24 h Inkubationszeit wurden die Zellen lysiert und anschließend die Proteinexpression mittels SDS-PAGE und Western Blot

analysiert. Zur Normierung wurden dafür die Proteinkonzentrationen der lysierten Zellen nach Bradford bestimmt und für alle Proben die gleiche Proteinmenge eingesetzt. Zur Ermittlung der Transfektionseffizienz wurde jeweils zusätzlich das Plasmid pRLEF1 $\alpha$  (Bros 2006) kotransfiziert und anschließend deren *Renilla*-Luciferase-Aktivität bzw. die *Renilla*-Expression mittels Western Blot mit *Renilla*-Antikörper analysiert. In Abbildung 5-9 sind zwei repräsentative Western Blots von insgesamt acht Western Blots gezeigt.



**Abbildung 5-9: Expression des uORF-EGFP-Fusionsproteins.**

*DLD1*-Zellen wurden transient mit *pcDNA4/TO-uORF-EGFP* (**uORF**), *pcDNA4/TO-mutORF-EGFP* (**neg.**), *pcDNA4/TO-EGFP* (**pos.**) transfiziert und für 48 h inkubiert. Zur Überprüfung der Transfektionseffizienz wurden die Zellen mit pRLEF1 $\alpha$  kotransfiziert. Anschließend wurden die Zellen lysiert und die Proteinkonzentrationen mit einem Bradford-Assay bestimmt. Jeweils die gleiche Proteinmenge wurde auf ein SDS-Gel aufgetragen. Nach der Gelelektrophorese und dem Übertragen auf eine Nitrocellulose-Membran wurden die Proteine mit Antikörpern gegen **EGFP**, die *Renilla*-Luciferase (**Ren**) und  **$\beta$ -Tubulin** markiert und mit Sekundärantikörpern und dem ECL-System von Thermo Scientific sichtbar gemacht. Die Chemilumineszenz-Reaktion wurde mit dem ChemiDoc™ XRS detektiert. Da EGFP und die *Renilla*-Luciferase ähnlich groß sind, wurden sie auf separaten Western Blots untersucht.  $\beta$ -Tubulin diente als jeweilige Ladekontrolle. Gezeigt sind zwei repräsentative Blots von acht Western Blots.

Sowohl bei den Zellen mit der Positivkontrolle (pos.) als auch bei den Zellen mit dem uORF-Konstrukt sind deutliche Banden auf der Höhe des Markers von ca. 31 kDa zu erkennen. Damit konnte sowohl das EGFP der Positivkontrolle als auch das Fusionsprotein aus uORF und EGFP exprimiert werden. Allerdings war die Expression des uORF-EGFP-Fusionsprotein deutlich geringer als die Expression von GFP in der Positivkontrolle. Wie zu erwarten war, wurde nach der Transfektion der Negativkontrolle kein EGFP oder uORF-EGFP-Fusionsprotein exprimiert und es ist keine Bande auf Höhe des EGFP oder des EGFP-uORF-Fusionsprotein sichtbar. Damit ist der uORF der iNOS-5'-UTR translatierbar. Die Mutation des ATG hebt diese Translatierbarkeit auf. Die *Renilla*-Detektionsbanden sind in allen Proben ähnlich stark ausgeprägt,

sodass von einer guten Transfektionseffizienz ausgegangen werden kann. Die Unterschiede in der Expression der EGFP-Varianten liegen somit nicht an einer unterschiedlich erfolgreichen Transfektion. Diese Ergebnisse wurden bereits in *Nitric Oxide* veröffentlicht (Gather 2019).

## 5.4 Funktion des uORF in der 5'-UTR der iNOS

### 5.4.1 Mutation des uORF-ATG hat keinen Einfluss auf die Expression eines Reportergens

Wie in Kapitel 5.3 gezeigt wurde, ist der uORF translatierbar. Damit hat er potenziell eine inhibierende Wirkung auf die iNOS-cds (Calvo 2009). Im Folgenden wurde daher überprüft, ob die Anwesenheit des uORFs in der 5'-UTR einen Einfluss auf die Expression eines Reportergens hat.

Als Grundlage diente ein pcDNA4/TO-Luc-Vektor mit der cds der *Firefly*-Luciferase als Reportergen. Vor die Luciferase-cds wurde die 5'-UTR der iNOS kloniert. Dazu wurde zunächst mittels einer PCR mit den Primern Ex1-In1-Ex2-5P (5'-GGA AGC TTA TAA CTT TGT AGC GAG TCG AAA ACT G-3') und Ex1-In1-Ex2-3P (5'-GGC CAT GGC TAT GGC TTT ACA AAG CAG GTC AC-3') sowie der cDNA stimulierter DLD1 ein DNA-Fragment erzeugt. Dieses wurde mit den Restriktionsenzymen *HindIII* und *NcoI* geschnitten und in einen mit *HindIII* und *NcoI* geschnittenen pGL3-control-Vektor kloniert. Dadurch entstand als Zwischenprodukt das Plasmid pGL3-control\_Ex1\_Ex2. Durch Restriktion mit *HindIII* and *NarI* wurde aus diesem die 5'-UTR der iNOS wieder ausgeschnitten und in einen mit *HindIII* und *NarI* geschnittenen pcDNA4/TO-Luc-Vektor kloniert. Dadurch entstand das Wildtyp-Plasmid **pcDNA4/TO-Ex1-Ex2-Luc**.

Ein weiteres Plasmid wurde durch Mutation des uORF-ATGs von pcDNA4/TO-Ex1-Ex2-Luc erzeugt. Dabei wurde die Kozak-Sequenz des uORF-ATG wie bei den EGFP-Konstrukten (siehe Kapitel 5.3) mittels QuikChange® gegen eine *EcoRI*-Schnittstelle ausgetauscht, wodurch keine Translation mehr möglich ist. Das dadurch erzeugte Plasmid war **pcDNA4/TO-Ex1-Ex2-Luc-mut-uORF**. Abbildung 5-10 zeigt ein Schema dieser Konstrukte.

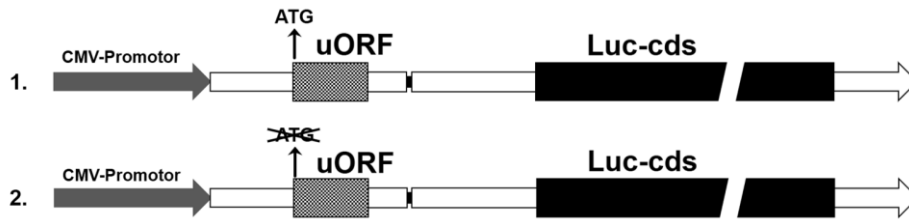


Abbildung 5-10: Schema der pcDNA4/TO-Luc-Konstrukte mit iNOS-5'-UTR.

Gezeigt ist eine schematische Darstellung der entscheidenden Plasmid-Sequenzen. Zwischen den **CMV-Promotor** des Vektors pcDNA4/TO-Luc und die *cds* der Firefly Luciferase (**Luc-cds**) wurde die 5'-UTR der iNOS kloniert. Variante **1** entspricht dem Plasmid **pcDNA4/TO-Ex1-Ex2-Luc** und damit der Wildtyp-Variante. Variante **2** ist **pcDNA4/TO-Ex1-Ex2-Luc-mut-uORF** mit dem mutierten ATG am **uORF** der iNOS.

Die beiden Plasmide wurden jeweils transient in DLD1 transfiziert und 24 h inkubiert. Zusätzlich wurde das Plasmid pRLEF1 $\alpha$  (Bros 2006) kotransfiziert (siehe Kapitel 4.1.4). Nach 24 h wurde das Medium zu FCS-freiem Medium gewechselt, erneut für 18 h inkubiert und anschließend die Hälfte der Zellen mit CM stimuliert (siehe Kapitel 4.1.7). Nach sechsstündiger Stimulation wurden die Zellen mit PLB lysiert.

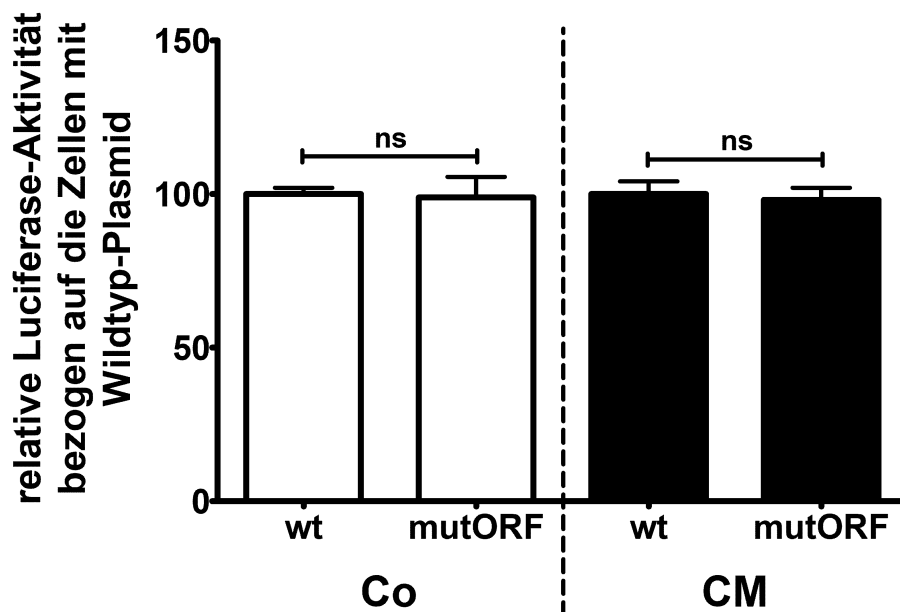


Abbildung 5-11: Luciferase-Aktivität in Zellen mit pcDNA4/TO-5UTR-Luc-Konstrukten.

Dargestellt ist die relative Luciferase-Aktivität der DLD1, die mit pcDNA4/TO-Ex1-Ex2-Luc (**wt**) oder pcDNA-Ex1-Ex2-Luc-mut-uORF (**mutORF**) transfiziert wurden. Zur Normierung wurde pRLEF1 $\alpha$  in allen Zellen kotransfiziert. Nach der Transfektion wurden die Zellen für 24 h in DMEM und für 18 h in FCS-freiem Medium inkubiert und anschließend für 6 h mit einem Cytokin-Mix (**CM**) bzw. ohne Cytokine (**Co**) behandelt. Anschließend wurden die Zellen mit PLB lysiert und ein Luciferase-Assay durchgeführt. Gezeigt sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM von  $n = 6-8$  Experimenten nach Normierung auf die Renilla-Aktivität und Bezug auf die wt-transfizierten Zellen (ns = nicht signifikant, ungepaarter t-Test).



Mit den lysierten Zellproben wurde anschließend ein Luciferase-Assay (siehe Kapitel 4.3.5) durchgeführt. Abbildung 5-11 zeigt eine Zusammenfassung der zuvor erhaltenen Ergebnisse von Katja Schmitz (Schmitz 2012) und Kathrin Koch (Koch 2011) und wurden bereits in den entsprechenden Diplomarbeiten sowie in *Nitric Oxide* veröffentlicht (Gather 2019).

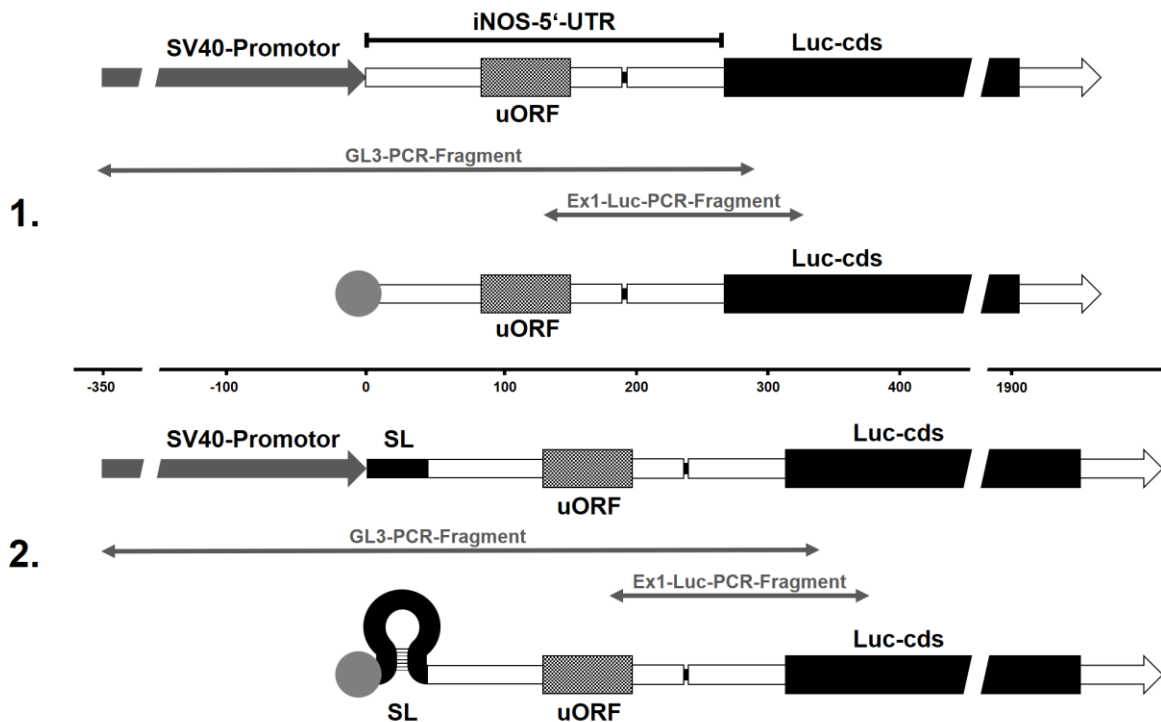
Die Ergebnisse zeigen keine Unterschiede in der Luciferase-Aktivität. Somit hat das ATG des uORF weder in den stimulierten noch in den unstimulierten Zellen einen Einfluss auf die Reporterexpression.

#### **5.4.2 cap-Abhängigkeit der Translation des iNOS-Transkripts**

Die Abwesenheit eines Effekts der Mutation des uORF-ATGs auf die Expression des Reportergens (siehe Kapitel 5.4.1) trotz der Translatierbarkeit des uORF (siehe Kapitel 5.3) könnte durch eine cap-unabhängige Translation erklärt werden. Um dies zu überprüfen, wurden die Eigenschaften von RNA-Sekundärstrukturen genutzt. Diese Strukturen der RNA können von einfachen Schleifen bis hin zu komplexen räumlichen Strukturen reichen und die Bindung von Translationsfaktoren verhindern. Damit stören sie den scannenden Prozess der Translation und können bei günstiger Klonierung, zum Beispiel nahe des TSS, die cap-abhängige Translation behindern (Kozak 1986). Zu den einfachsten Sekundärstrukturen gehören die *Stem-Loop*-Strukturen (SL-Strukturen). Durch komplementäre Basenpaarung bildet sich eine Haarnadelschleife, die eine stabile Sekundärstruktur darstellt (Svoboda 2006, Chan 2013).

Zur Überprüfung der cap-Abhängigkeit der iNOS-Translation wurden DLD1-Zellen mit verschiedenen Plasmiden transient transfiziert. Die Transfektionen mit pGL3-control und pGL3-control\_SL2 dienten als Kontrolle. pGL3-control codiert für eine *Firefly*-Luciferase unter Kontrolle eines SV40-Promotors. pGL3-control\_SL2 besitzt eine Sequenz vor der Luciferase-cds, die für die Ausbildung einer SL-Struktur in der mRNA kodiert und damit zu einer Unterbrechung der cap-abhängigen Translation der *Firefly*-Luciferase-cds (Luc-cds) führt. pGL3-control\_Ex1\_Ex2 besitzt vor der Luc-cds die 5'-UTR der iNOS, gleiches gilt für pGL3-control\_SL2\_Ex1\_Ex2, welches zusätzlich die SL-Struktur vor der 5'-UTR ausbilden sollte. Die SL-Strukturen wurden nach der Anlagerung der Oligonukleotide SL-up (5'-AGC TTC CAC CAC GGC CCC CTG TAC ATG GGG GCC GTG GTG GA-3') und SL-down (5'-AGC TTC CAC CAC GGC CCC

CAT GTA CAG GGG GCC GTG GTG GA-3') und deren Kinasierung in die mit dem Restriktionsenzym *Hind*III geschnittenen Vektoren **pGL3-control** und **pGL3-control\_Ex1\_Ex2** (siehe Kapitel 5.4.1) kloniert. Dadurch entstanden die Plasmide **pGL3-control\_SL2** und **pGL3-control\_SL2\_Ex1\_Ex2**. Abbildung 5-12 zeigt ein Schema der iNOS-5'-UTR-Konstrukte und der erzeugten Luciferase-mRNA.

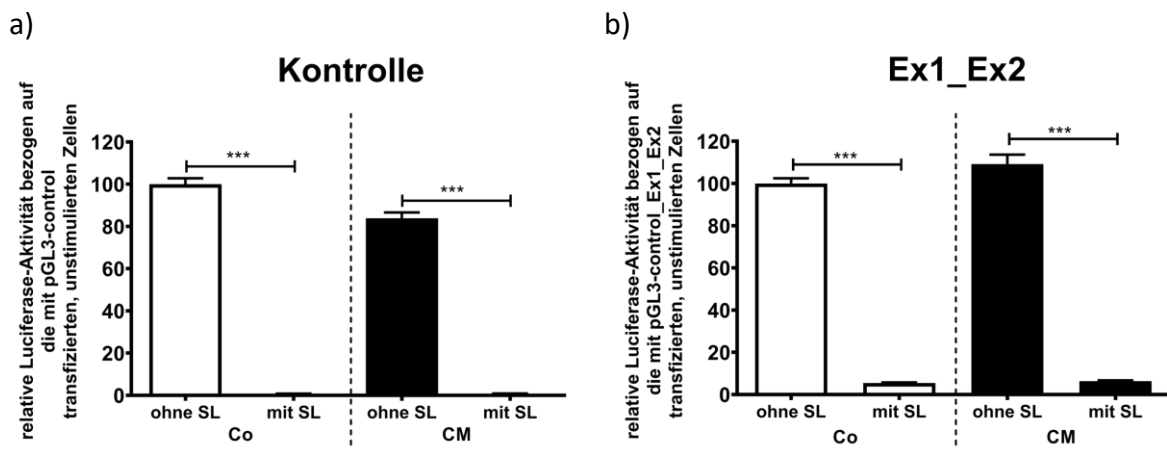


**Abbildung 5-12: Schema der iNOS-5'-UTR-Konstrukte und der erzeugten Luciferase mRNA.**

Zu sehen sind die entscheidenden Sequenzen und Transkripte der verwendeten Plasmide. Variante 1 zeigt die Struktur und das Transkript des **pGL3-control\_Ex1\_Ex2**. Im Plasmid befindet sich vor der **iNOS-5'-UTR** mit **uORF** ein **SV40-Promotor**. Hinter der 5'-UTR liegt die **cds** einer Firefly-Luciferase (**Luc-cds**). Im Transkript liegt folglich die 5'-cap vor der 5'-UTR der iNOS und diese wiederum vor der **Luc-cds**. Die **SL**-Struktur führt bei der Transkription des Plasmids **pGL3-control\_SL2\_Ex1\_Ex2** (Variante 2) zur Bildung einer RNA-Sekundärstruktur zwischen 5'-cap und der eigentlichen 5'-UTR der iNOS. Diese führt dazu, dass der Initiationskomplex nicht mehr erfolgreich an der 5'-cap binden und nach dem klassischen scannenden Mechanismus die mRNA entlang wandern kann. Die beiden nicht gezeigten Kontrollen **pGL3-control** und **pGL3-control\_SL2** erzeugen entsprechende Transkripte ohne die iNOS-5'-UTR. Außerdem sind die PCR-Fragmente für Primerpaare **GL3\_for** und **GL3\_rev** (**GL3-PCR-Fragment**) und **Ex1-Luc\_for** und **Ex1-Luc\_rev** (**Ex1-Luc-PCR-Fragment**) dargestellt.

Zum Ausgleich der Schwankungen in der Transfektionseffizienz und als interner Standard wurde pRLEF1 $\alpha$  (Bros 2006) kotransfiziert. Nach einer Inkubationszeit von 24 h wurden die Zellen für weitere 18 h in FCS-freiem Medium inkubiert und dann für 6 h mit Stimulationsmedium (CM oder Co) behandelt, bevor sie in PLB (für einen Luciferase-Assay) bzw. GIT (für

RNA-Analysen) lysiert wurden. Abbildung 5-13 zeigt die Luciferase-Aktivitäten der transfizierten Zellen.



**Abbildung 5-13: Luciferase-Aktivität in DLD1-Zellen nach der Transfektion mit den SL-Struktur-Plasmiden bzw. ihren Kontrollen.**

Die Plasmide pGL3-control, pGL3-control\_SL2, pGL3-control\_Ex1\_Ex2 und pGL3-control\_SL2\_Ex1\_Ex2 wurden transient in DLD1-Zellen transfiziert. Zur Normierung wurde pRLEF1 $\alpha$  in allen Zellen kotransfiziert. Nach einer Inkubationszeit von 24 h in DMEM und weiteren 18 h Inkubation in FCS-freiem Medium wurden die Hälfte der Zellen für 6 h mit CM stimuliert. Die andere Hälfte wurde für diesen Zeitraum in FCS-freiem Medium inkubiert (Co). Nach der Zellyse in PLB wurde die Firefly-Luciferase und Renilla-Luciferase-Aktivität bestimmt. Zur Analyse wurden die Luciferase-Werte durch die Renilla-Werte geteilt.

a) Hier sind die Werte für die Zellen, die mit pGL3-control bzw. pGL3-control\_SL2 transfiziert wurden, gezeigt. Alle Werte sind auf die unstimulierten, mit pGL3-control transfizierten Zellen bezogen. Die Höhe der Balken entspricht dem Mittelwert  $\pm$  SEM von drei Versuchsreihen mit jeweils sechs Proben pro Transfektion und Stimulation. Die statistische Auswertung erfolgte durch einen two-way ANOVA (\*\*\*:  $p < 0,001$ ).

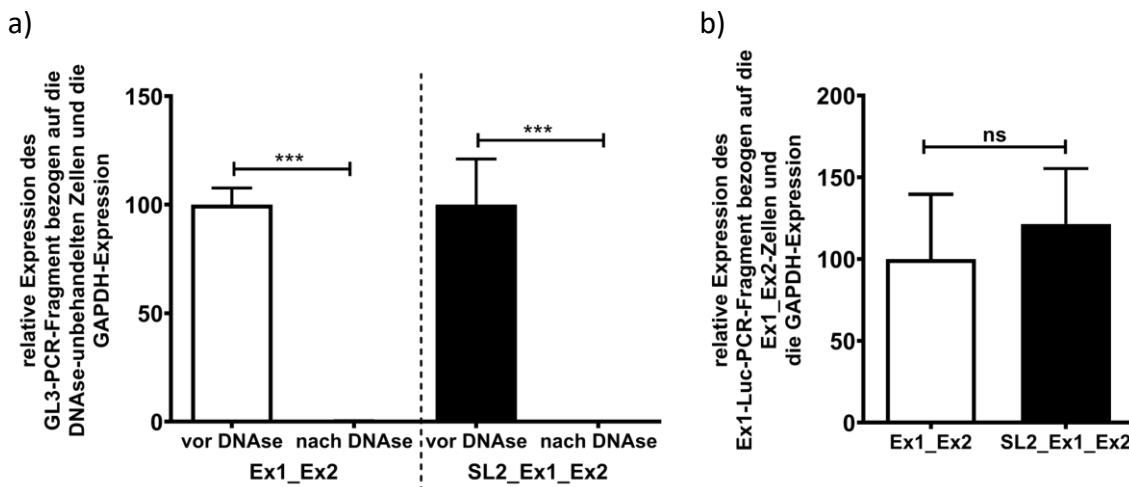
b) Dargestellt sind die Werte für die Zellen, die mit pGL3-control\_Ex1\_Ex2 bzw. pGL3-control\_SL2\_Ex1\_Ex2 transfiziert wurden, bezogen auf die unstimulierten, mit pGL3-control\_Ex1\_Ex2 transfizierten Zellen. Die Höhen der Balken entsprechen dem Mittelwert  $\pm$  SEM von drei Versuchsreihen mit jeweils sechs Proben pro Transfektion und Stimulation. Die statistische Auswertung erfolgte durch einen two-way ANOVA (\*\*\*:  $p < 0,001$ ).

Die Einführung einer SL-Struktur in das Kontrollplasmid sowie das Plasmid mit der iNOS-5'-UTR führt zu einem signifikanten Abfall der Luciferase-Aktivität. Dieser Effekt ist in Zellen mit und ohne CM-Behandlung zu beobachten und scheint daher unabhängig von der Stimulation der Zellen zu sein.

Da dieser Verlust der Aktivität auch in einer niedrigeren Expression von Luciferase-mRNA begründet sein kann, wurde auch die mRNA-Expression mit Hilfe einer qRT-PCR bestimmt. Ein Problem bei der Aufreinigung von Zellproben, die mit Plasmiden transfiziert wurden, ist die Trennung von RNA und Plasmid-DNA. Unter den Bedingungen des verwendeten Protokolls, kann die RNA noch mit Plasmid-DNA verunreinigt sein. Daher wurden die RNA-Proben zusätzlich mit einer DNase behandelt (siehe Kapitel 4.4.3) und sowohl aus DNase-unbehandelten

als auch DNase-behandelten RNA-Proben cDNA synthetisiert. Bei der anschließenden qRT-PCR wurden zwei PCR-Fragmente miteinander verglichen. Das Primerpaar GL3\_for und GL3\_rev erzeugte ein Fragment, das nur aus der Plasmid-DNA, nicht aber von der cDNA aus vervielfältigt werden konnte. Wie Abbildung 5-12 zu entnehmen ist, erstreckt sich das PCR-Fragment der GL3-Primer über den SV40-Promotor und das iNOS-5'-UTR-Fragment. Die qRT-PCR mit diesem Primerpaar gibt somit Aufschluss über den Erfolg des DNase-Verdau. Bei einem vollständigen DNase-Verdau, sollte kein GL3-PCR-Fragment mehr detektierbar sein. Abbildung 5-14a zeigt das Ergebnis für die iNOS-5'-UTR-Konstrukte.

Ein zweites Primerpaar (Ex1-Luc\_for und Ex1-Luc\_rev) wurde verwendet, um die Expression der mRNA zu bestimmen. Das damit erzeugte PCR-Fragment erstreckt sich über einen Teil der 5'-UTR bis zur Luciferase-cds (siehe Abbildung 5-12). Das Primerpaar führt somit sowohl mit dem Plasmid als auch mit der cDNA als Matrize zur Amplifikation des Fragments. Abbildung 5-14b zeigt das Ergebnis für die iNOS-5'-UTR-Konstrukte mit dem Ex1-Luc-Primerpaar nach dem DNase-Verdau.



**Abbildung 5-14: Analysen zum DNase-Verdau und zum Transkriptionserfolg von pGL3-control\_SL2\_Ex1\_Ex2.**

Die Plasmide pGL3-control\_Ex1\_Ex2 und pGL3-control\_SL2\_Ex1\_Ex2 wurden transient in DLD1-Zellen transfiziert. Nach 24 h Inkubation in DMEM wurden die Zellen in GIT-Puffer lysiert. Im Anschluss an einen DNase-Verdau und reverse Transkription wurde eine qRT-PCR der DNase-verdauten sowie der unbehandelten Proben mit den GL3-, Ex1\_Luc- und GAPDH-Primern durchgeführt.

a) Dargestellt ist die GL3-PCR-Fragment-Expression bezogen auf die unbehandelten RNA-Proben. Die Höhen der Balken entsprechen dem Mittelwert  $\pm$  SEM von jeweils sechs Proben. Die statistische Auswertung erfolgte durch einen t-Test (\*\*\*:  $p < 0,001$ ).

b) Dargestellt ist die relative Expression des Ex1\_Luc-PCR-Fragments für die Proben nach dem DNase-Verdau. Die Höhen der Balken entsprechen dem Mittelwert  $\pm$  SEM von jeweils sechs Proben. Die statistische Auswertung erfolgte durch einen t-Test (ns: nicht signifikant).

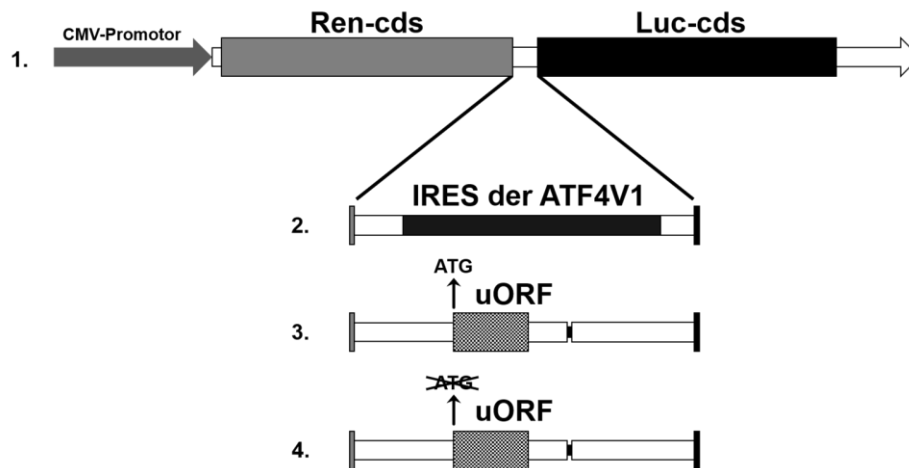
Abbildung 5-14a zeigt, dass nach dem DNase-Verdau nahezu kein GL3-PCR-Fragment mehr amplifiziert wurde, wodurch auf einen erfolgreichen DNase-Verdau zu schließen ist.

Abbildung 5-14b zeigt zudem, dass es keinen signifikanten Unterschied in der Messung des Ex1-Luc-PCR-Fragments nach DNase-Verdau zwischen den Zellen gibt, die mit pGL3-control\_SL2 oder pGL3-control\_SL2\_Ex1\_Ex2 transfiziert wurden. Damit müssten die mRNA-Konzentrationen in den Zellen ungefähr gleich hoch gewesen sein und die Messungen der Luciferase-Aktivität unabhängig von der mRNA-Expression. Die Änderung der Luciferase-Aktivität kann daher durch eine Behinderung der cap-abhängigen Translation durch die SL-Struktur begründet werden.

Diese Daten wurden bereits in Vorversuchen analysiert und sind in *Nitric Oxide* veröffentlicht (Gather 2015, Gather 2019).

### 5.4.3 iNOS-5'-UTR enthält keine IRES

Ein weiteres Experiment, das hinsichtlich der Mechanismen zur Umgehung der klassischen Translation durchgeführt wurde, war die Untersuchung auf eine IRES. Hierfür wurden verschiedene Reporter-genkonstrukte kloniert. Als Vektor und Negativkontrolle diente pRLFL1J. Dieser Ursprungsvektor besteht aus einem CMV-Promotor vor zwei unterschiedlichen Reporter-genen, der *Renilla*-Luciferase und der *Firefly*-Luciferase. Die cds dieser beiden Luciferasen sind nur durch eine *multiple cloning site* (MCS) voneinander getrennt. Bei einer Transkription dieses Plasmides entsteht so ein Transkript, welches zwei cds enthält. Nach der klassischen cap-abhängigen Translation wird nur die *Renilla*-Luciferase exprimiert, nicht aber die *Firefly*-Luciferase. Durch Klonierung verschiedener Sequenzen zwischen beide cds können diese Sequenzen auf eine potenzielle IRES untersucht werden. Ist eine IRES vorhanden, so steigt die Expression der *Firefly*-Luciferase. Durch das Verhältnis von *Firefly*-Luciferase-Aktivität zu *Renilla*-Luciferase-Aktivität lassen sich so verschiedene Sequenzen miteinander vergleichen (Chan 2013). Der Vektor ist im Anhang (siehe Anhang 8.1) gezeigt und ein Schema der verwendeten Konstrukte ist in Abbildung 5-15 dargestellt.

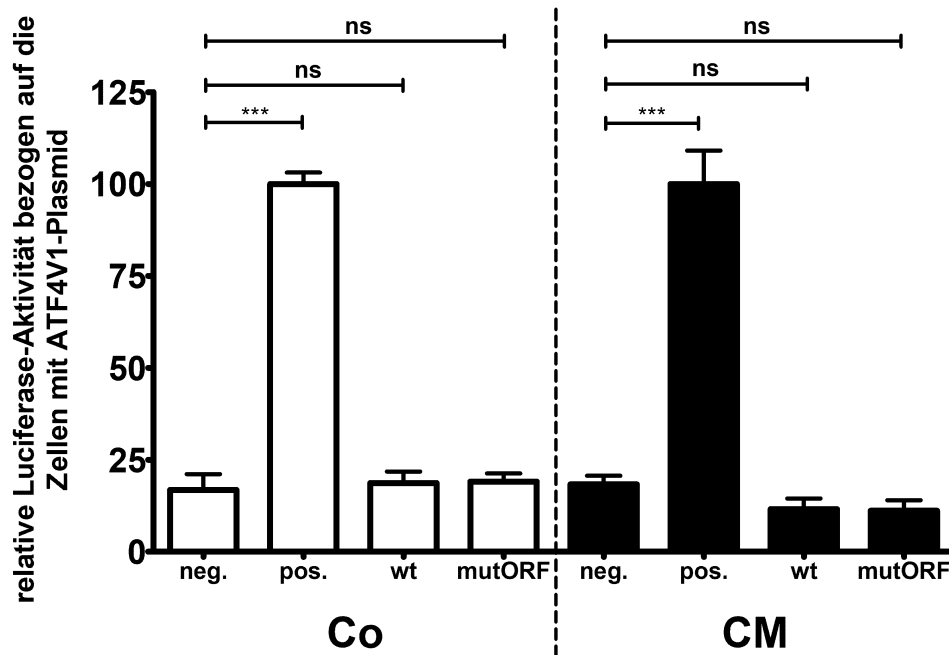


**Abbildung 5-15: Schema der pRLFL-Plasmide.**

Gezeigt ist eine schematische Darstellung der entscheidenden Sequenzen der bicistronischen pRLFL-Plasmide. Hinter dem CMV-Promotor des Vektors befindet sich die cds der Renilla-Luciferase (*Ren-cds*) und dahinter die cds der Firefly-Luciferase (*Luc-cds*). Dazwischen befindet sich eine multiple cloning site (MCS), in die verschiedene DNA-Sequenzen kloniert wurden. **pRL-V1-FL (2)** enthält die IRES der ATF4V1. **pRL-Ex1-Ex2-FL (3)** enthält die 5'-UTR der iNOS und **pRL-mut-uORF-FL (4)** die 5'-UTR der iNOS mit dem mutierten ATG am uORF.

Die MCS des Vektors **pRLFL1J** wurde genutzt, um verschiedene Sequenzen zwischen die Luciferase-cds zu klonieren. pRLFL1J wurde hierzu mit Acc65I geschnitten und mit Klenow behandelt. Die Fragmente für die Wildtyp- und mutierte iNOS-5'-UTR wurden durch Restriktion von pGL3control-Ex1-Ex2-Luc bzw. pGL3control-mutORF-Luc mit *HindIII* and *NcoI* und anschließender Klenow-Behandlung erzeugt. Die Ligation lieferte die Plasmide **pRL-Ex1-Ex2-FL** und **pRL-mut-uORF-FL**. Damit enthalten sie die vollständige Wildtyp-5'-UTR der iNOS bzw. die mutierte 5'-UTR der iNOS ohne Start-ATG des uORF zwischen beiden Luciferase-cds. Für die Positivkontrolle wurde ein Plasmid mit der IRES des ATF4V1 verwendet (**pRL-V1-FL**). pRLFL1J und pRL-V1-FL wurden von Dr. Dong-Yan Jin (*Department of Biochemistry, The University of Hong Kong, Pokfulam, Hong Kong*) zur Verfügung gestellt (Chan 2013).

DLD1-Zellen wurden mit den auf diese Weise erzeugten Plasmiden transfiziert und für 24 h inkubiert. Nach weiteren 18 h Inkubationszeit in FCS-freiem Medium wurden die Zellen entweder mit Co oder mit CM für 6 h stimuliert und anschließend in PLB lysiert. Die Luciferase-Aktivität wurde, wie in Kapitel 4.3.5 beschrieben, für die *Firefly*- und die *Renilla*-Luciferase gemessen. Nach Normierung der *Firefly*-Werte auf die *Renilla*-Werte zum Ausgleich der Transfektionseffizienz und nach Bezug auf die jeweiligen Positivkontrollen wurde das in Abbildung 5-16 gezeigte Ergebnis erhalten.



**Abbildung 5-16: Luciferase-Aktivität in DLD1-Zellen nach der Transfektion mit den verschiedenen pRLFL-Plasmiden.**

DLD1-Zellen wurden transient mit verschiedenen bicistronischen pRLFL-Varianten transfiziert. Die Negativkontrolle war pRLFL (**neg.**). Als Positivkontrolle wurde pRL-V1-FL verwendet (**pos.**). Untersuchungsobjekt waren die Transfektionen von pRLFL-Plasmiden mit der iNOS-5'-UTR zwischen den beiden Luciferase-cds: pRL-Ex1-Ex2-FL (**wt**) bzw. pRL-mut-uORF-FL (**mutORF**) mit mutierten iNOS-uORF-ATG. Nach 24 h Inkubationszeit in DMEM und weiteren 18 h Inkubationszeit ohne FCS wurden die Zellen für weitere 6 h mit einem Cytokinmix (**CM**, schwarze Balken) bzw. ohne Cytokine (**Co**; weiße Balken) stimuliert. Die Luciferase-Aktivitäten beider Luciferasen wurden gemessen und die Firefly-Luciferase-Aktivität auf die Renilla-Luciferase-Aktivität normiert. Anschließend wurden die erhaltenen Werte auf die jeweiligen Positivkontrollen (Co bzw. CM) bezogen. Gezeigt ist der jeweilige Mittelwert  $\pm$  SEM von  $n = 6-8$  Experimenten (\*\*\*)  $p < 0.001$ ; ns = nicht signifikant vs. pRL-FL-transfizierte DLD-1 Zellen mit one-way ANOVA und Tukey-Test).

Die Positivkontrolle hat eine sechsfach höhere Firefly-Luciferase-Aktivität als die Negativkontrolle. Sowohl die iNOS-Wildtyp-Proben als auch die Proben mit mutiertem uORF-Startcodon unterscheiden sich nicht signifikant von der Negativkontrolle. Diese Beobachtungen treffen sowohl auf die unstimulierten als auch die stimulierten Zellen zu. Damit befindet sich keine IRES in der 5'-UTR der iNOS. Auch die Stimulation und die Translatierbarkeit des uORF nehmen keinen Einfluss darauf. Ein Teil der Daten ohne pRL-mut-uORF-FL wurden bereits 2015 veröffentlicht (Gather 2015), das vollständige Ergebnis 2019 in *Nitric Oxide* (Gather 2019).

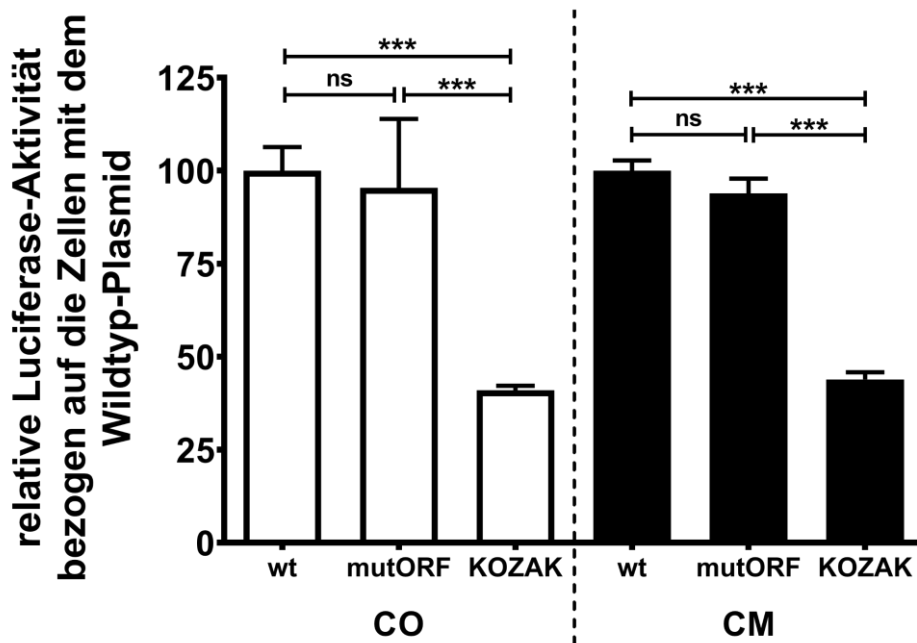
#### 5.4.4 Einfluss der uORF-Kozak-Sequenz auf die Expression eines Reportergens

Eine weitere Erklärung ist neben der Anwesenheit einer IRES ein *leaky scanning*-Mechanismus oder eine Reinitiation. Die Kozak-Sequenz des uORF ist laut der Definition (Kozak 1987) deutlich schwächer als die Kozak-Sequenz der iNOS (siehe Kapitel 5.2). Um den direkten Einfluss der Kozak-Sequenz des uORF auf die iNOS-Expression zu untersuchen, wurden verschiedene Reportergergenkonstrukte mit verschiedenen Kozak-Sequenzen verwendet.

Neben den schon verwendeten Plasmiden **pcDNA4/TO-Ex1-Ex2-Luc** und **pcDNA4/TO-Ex1-Ex2-Luc-mut-uORF** (siehe Abbildung 5-10) wurde hierzu zunächst ein weiteres Plasmid mit einer optimierten Kozak-Sequenz kloniert. Dazu wurde eine QuikChange-PCR mit dem Plasmid pcDNA4/TO-Ex1-Ex2-Luc und den Primern KOZAK-for (5'-CCT CAT TCC TGC TTT AAA ATC TCT CGG CCA GCC ACC ATG GGG GGA CTG GGC AGT TC-3') und KOZAK-rev (5'-GAA CTG CCC AGT CCC CCC ATG GTG GCT GGC CGA GAG ATT TTA AAG CAG GAA TGA GG-3') durchgeführt, sodass die Kozak-Sequenz des uORF in dem neuen Plasmid **pcDNA4/TO-Ex1-Ex2-Luc-mut-KOZAK** der optimalen Kozak-Sequenz mit der Basenabfolge GCC ACC **ATG** G entspricht.

Die so erzeugten Plasmide wurden zusammen mit pRLEF1 $\alpha$  (Bros 2006) transient in DLD1-Zellen transfiziert und für 24 h inkubiert. Anschließend erfolgte eine Inkubation für 18 h in Medium ohne FCS, gefolgt von der Stimulation mit CM bzw. Co. Nach der Lyse der Zellen in PLB wurde ein Luciferase-Assay durchgeführt und die gemessene *Firefly*-Luciferase-Aktivität auf die *Renilla*-Luciferase-Aktivität normiert. Die Messung der Luciferase-Reportergergenkonstrukte wurden zusammen mit Lea-Marie Vogt im Rahmen ihrer Masterarbeit durchgeführt (Vogt 2018) und sind in *Nitric Oxide* veröffentlicht (Gather 2019). Das Ergebnis, bezogen auf die mit pcDNA4/TO-Ex1-Ex2-Luc transfizierten Zellen, ist in Abbildung 5-17 dargestellt.





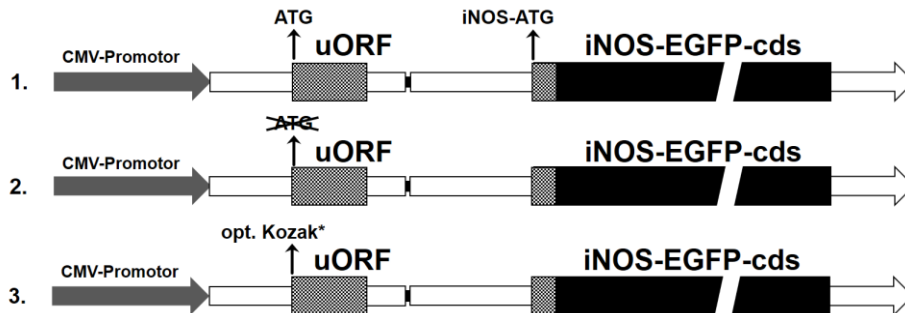
**Abbildung 5-17: Luciferase-Aktivität transfizierter Reporter-genkonstrukte mit verschiedenen uORF-Kozak-Sequenzen.**

DLD1-Zellen wurden transient mit *pcDNA4/TO-Ex1-Ex2-Luc (wt)*, *pcDNA4/TO-Ex1-Ex2-Luc-mut-uORF (mutORF)* bzw. *pcDNA4/TO-Ex1-Ex2-Luc-mut-KOZAK (KOZAK)* transfiziert. Nach 24 h Inkubationszeit in DMEM, weiteren 18 h Inkubationszeit in FCS-freiem Medium und sechsständiger Stimulation mit **CM** bzw. ohne Cytokine (**CO**) wurden die Zellen in PLB lysiert und ein Luciferase-Assay durchgeführt. Als Referenz wurde *pRLEF1 $\alpha$*  (Bros 2006) kotransfiziert. Die relativen Luciferase-Aktivitäten wurden auf die *wt*-transfizierten Zellen bezogen. Gezeigt sind jeweils die Mittelwerte  $\pm$  SEM von  $n = 6-8$  Experimenten. (\*\*\*)  $p < 0,001$ , ns = nicht signifikant, one-way ANOVA).

Wie schon in Kapitel 5.4.1 beschrieben wurde und hier erneut bestätigt wird, hatte die Mutation des uORF-Startcodons zu einer *EcoRI*-Schnittstelle und der damit einhergehende Verlust der Translatierbarkeit des uORFs keine Auswirkung auf die Expression des Luciferase-Reportergens. Die mit *pcDNA4/TO-Ex1-Ex2-Luc (wt)* bzw. *pcDNA4/TO-Ex1-Ex2-Luc-mut-uORF (mutORF)* transfizierten Zellen weisen keine signifikanten Unterschiede in der Luciferase-Aktivität auf. Die mit *pcDNA4/TO-Ex1-Ex2-Luc-mut-KOZAK (KOZAK)* transfizierten Zellen zeigen hingegen eine um mehr als 50 % signifikant reduzierte Luciferase-Aktivität. Damit führte die Optimierung der uORF-Kozak-Sequenz zu einer Senkung der Expression des Reportergens.

Für einen direkteren Vergleich der Kozak-Sequenzen mit dem iNOS-Gen und zur Untersuchung des Zusammenspiels von uORF- und iNOS-Kozak-Sequenz wurde ein weiteres Reporter-gen-System verwendet. Dieses beinhaltete den Vektor *pcDNA4/TO-EGFP* mit verschiedenen 5'-UTR-Fragmenten der iNOS, wobei die EGFP-cds mit dem ersten Teil der iNOS-

cds fusioniert wurde. Damit hat die iNOS-EGFP-cds die Kozak-Sequenz der iNOS und bietet einen direkteren Bezug auf die iNOS-Translation. Ein Schema ist in Abbildung 5-18 dargestellt.



**Abbildung 5-18: Schema der Kozak-Konstrukte.**

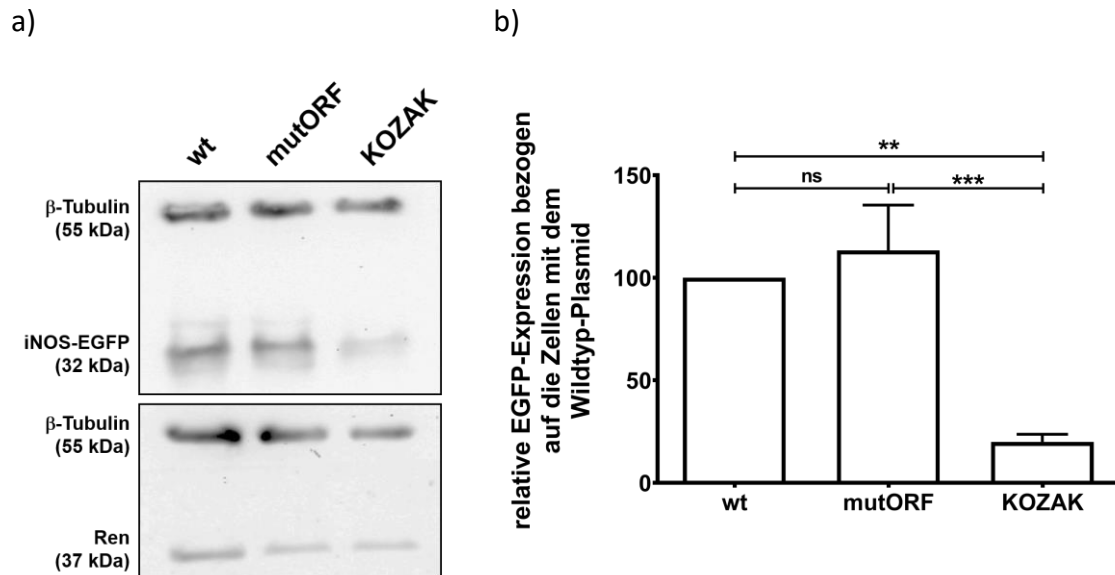
Gezeigt ist eine schematische Darstellung der entscheidenden Plasmid-Sequenzen. Wie schon bei den uORF-EGFP-Konstrukten (siehe Abbildung 5-8) wurde das ATG der EGFP-cds des Vektors pcDNA4/TO-EGFP gegen eine andere Sequenz ausgetauscht. In Variante 1 (pcDNA4/TO-iNOS-5UTR-5p\_cds-EGFP) wurde das ATG der EGFP-cds durch die 5'-UTR der iNOS mit den ersten 60 Basen der iNOS-cds (kodierend für die ersten 20 AS: MACPWKFLFKTKFHQYAMNG) ersetzt. In Variante 2 (pcDNA4/TO-iNOS-5UTR-5p\_cds-EGFP-mutORF) wurde das Startcodon des uORF durch Mutation zerstört, in Variante 3 (pcDNA4/TO-iNOS-5UTR-5p\_cds-EGFP\_KOZAK) durch eine optimierte Kozak-Sequenz (**opt. Kozak**) ersetzt. \* GCC ACC **ATG** G.

Dazu wurden zunächst mit der cDNA stimulierter DLD1 und den Primern Ex1-In1-Ex2-5P (5'-GGA AGC TTA TAA CTT TGT AGC GAG TCG AAA ACT G-3') und iNOS\_cds\_5part (5'-CAT GGC CCC ATT CAT TGC ATA CTG-3') ein DNA-Fragment amplifiziert, das nach der Kinasierung in den mit *Agel* geschnittenen und mit Klenow behandelten Vektor pcDNA4/TO-EGFP kloniert wurde. Das erzeugte Plasmid **pcDNA4/TO-iNOS-5UTR-5p\_cds-EGFP** wurde anschließend wie oben beschrieben in einer QuikChange-PCR mit den Primern KOZAK-for und KOZAK-rev zum Plasmid **pcDNA4/TO-iNOS-5UTR-5p\_cds-EGFP\_KOZAK** mutiert, welches nun eine optimale Kozak-Sequenz am uORF besitzt.

Zudem wurde durch den Schnitt von pcDNA4/TO-Ex1-Ex2-Luc-mutORF mit *Xba*I und *Afl*III ein Fragment erzeugt, das nach der Ligation mit pcDNA4/TO-iNOS-5UTR-5p\_cds-EGFP (ebenfalls mit *Xba*I und *Afl*III geschnitten) die mutierte Variante der 5'-UTR und damit das Plasmid **pcDNA4/TO-iNOS-5UTR-5p\_cds-EGFP-mutORF** lieferte.

Die Plasmide wurden zusammen mit pRLEF1 $\alpha$  (Bros 2006) transient in DLD1-Zellen transfiziert. Nach 48 h Inkubationszeit wurden die Zellen in PLB lysiert und die Protein-Konzentration mit Hilfe eines Bradford-Assays bestimmt. Über die *Renilla*-Luciferase-Aktivität wurde die Transfektionseffizienz überprüft. Anschließend wurde eine SDS-PAGE und ein

Western Blot mit den Antikörpern gegen EGFP bzw. die *Renilla*-Luciferase durchgeführt. Als Ladekontrolle diente der Nachweis von  $\beta$ -Tubulin. Abbildung 5-19 zeigt die Auswertung der Western Blots.



**Abbildung 5-19: EGFP-Protein-Expression mit verschiedenen Kozak-Sequenzen am uORF der iNOS-5'-UTR-EGFP-Fusionskonstrukte.**

DLD1-Zellen wurden transient mit pcDNA4/TO-iNOS-5UTR-5p\_cds-EGFP (**wt**), pcDNA4/TO-iNOS-5UTR-5p\_cds-EGFP-mutORF (**mutORF**) und pcDNA4/TO-iNOS-5UTR-5p\_cds-EGFP\_KOZAK (**KOZAK**) transfiziert und für 48 h inkubiert. Zur Überprüfung der Transfektionseffizienz wurden die Zellen mit pRL1 $\alpha$  kotransfiziert. Anschließend wurden die Zellen lysiert und die Proteinkonzentrationen mit einem Bradford-Assay bestimmt. Es wurde jeweils die gleiche Proteinmenge auf ein SDS-Gel aufgetragen. Nach der Gelelektrophorese und dem Übertragen auf eine Nitrocellulose-Membran wurde die Membran mit Antikörpern gegen **EGFP**, die *Renilla*-Luciferase (**Ren**) und  **$\beta$ -Tubulin** behandelt.  $\beta$ -Tubulin diente als jeweilige Ladekontrolle.

- a) Gezeigt sind zwei repräsentative Blots von acht Western Blots.
- b) Gezeigt ist die statistische Auswertung der densitometrischen Analyse aller Western Blots mittels Image Lab von Bio-Rad. Die Werte für EGFP bzw. Ren wurden zunächst auf die Werte der  $\beta$ -Tubulin-Ladekontrolle bezogen. Anschließend wurde die EGFP-Expression auf die Ren-Expression bezogen und die relative EGFP-Expression in den wt-transfizierten Zellen als Referenz auf 100 % gesetzt. Gezeigt ist der Mittelwert  $\pm$  SEM von  $n = 4$  Experimenten. (\*\* $p < 0.001$ ; \*\* $p < 0.01$ ; ns = nicht signifikant gegenüber wt-transfizierter DLD1-Zellen; one-way ANOVA).

Die *Renilla*-Detektionsbanden sind in allen Proben ähnlich stark ausgeprägt, sodass von einer guten Transfektionseffizienz ausgegangen werden kann. Um trotzdem leichte Schwankungen bei der Detektion mit dem ChemiDoc™ XRS auszugleichen, wurde zusätzlich eine densitometrische Analyse der Bandenintensitäten durchgeführt und die Intensitäten der iNOS-EGFP-Banden auf die Intensitäten der jeweiligen *Renilla*-Detektionsbanden bezogen.

In allen Proben war nach Behandlung mit dem Antikörper gegen EGFP eine Bande bei ca. 32 kDa zu erkennen und es konnte somit die Expression des iNOS-EGFP-Fusionsprotein

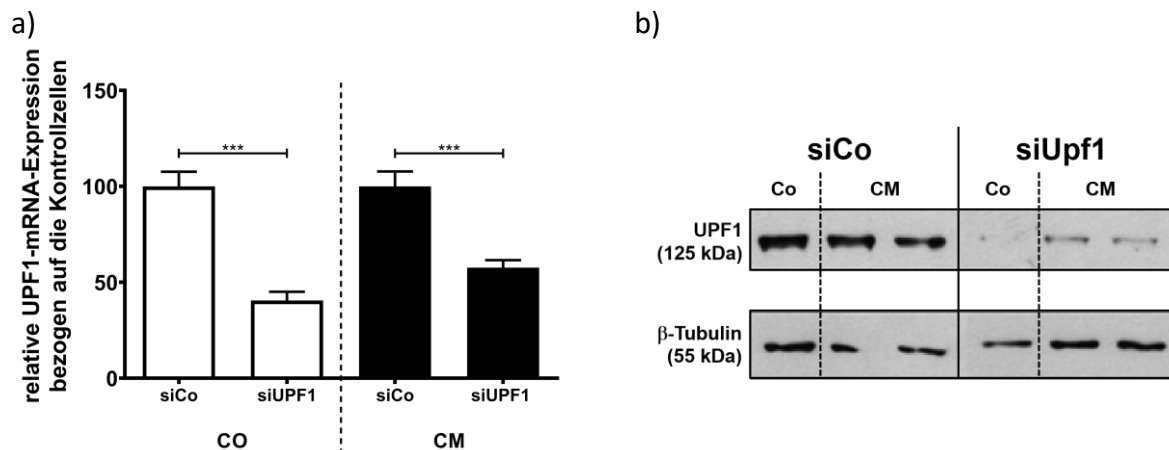
detektiert werden. Allerdings unterschied sich die Intensität des gemessenen Lichtsignals zwischen den verschiedenen Proben. Wie bereits auf dem repräsentativen Western Blot zu erkennen ist, wurde in den Zellen, die mit dem optimierten Kozak-Plasmid transfiziert wurden, die geringste iNOS-EGFP-Expression gemessen. Sie liegt nach statistischer Auswertung bei ca. 20 % der iNOS-EGFP-Expression in den Wildtyp-Konstrukten. Die Expression des iNOS-EGFP-Fusionsprotein in den mit pcDNA4/TO-iNOS-5UTR-5p\_cds-EGFP-mutORF transfizierten Zellen ist zwar geringfügig höher als in den Wildtyp-Zellen, jedoch ist der Unterschied, wie auch schon bei den Luciferase-Reporterexperimenten, nicht signifikant.

Beide Reporterexperimente zeigen, dass die Abwesenheit des uORF keinen signifikanten Effekt auf die Expression eines Reportergens hat, während die Optimierung der uORF-Kozak-Sequenz zu einer Abnahme der Reporterexpression um mehr als die Hälfte führt. Auch hier waren die Ergebnisse unabhängig von der Stimulation der Zellen.

## 5.5 Einfluss des NMD auf die iNOS-Expression

### 5.5.1 Vorversuche zum Einfluss von UPF1 auf die iNOS-Expression

Wie schon vielfach in Hefen und auch Säugetierzellen gezeigt, hat der NMD nicht nur eine Korrekturfunktion durch den Abbau fehlerhafter Transkripte, sondern auch eine regulatorische Funktion, insbesondere bei Anwesenheit eines uORFs oder einer langen 3'-UTR. Dabei ist UPF1 ein wichtiges Schlüsselenzym (Lykke-Andersen 2000, Rebbapragada 2009, Nicholson 2010). Die Herunterregulation von UPF1 durch siRNAs führte zu Expressionsänderungen vieler Gene (Mendell 2004, McGlincy 2010). Die iNOS-mRNA bietet durch die Anwesenheit des uORFs und das Intron in der 5'-UTR eine mögliche Zielstruktur für den NMD. In vorangegangenen Diplom- und Masterarbeiten der Arbeitsgruppe Kleinert wurden erste Versuche zum *Knockdown* und *Knockout* von UPF1 als ein Schlüsselfaktor des NMD durchgeführt. Die Verwendung einer siRNA gegen UPF1 führte zu den im Folgenden dargestellten Ergebnissen. Zunächst wurden DLD1-Zellen ausgesät, 24 h später transient mit einer siRNA gegen UPF1 (siUPF1) bzw. einer Kontroll-siRNA-Mix (siCo) (siehe Kapitel 4.1.6.1), für 48 h inkubiert und danach, wie in Kapitel 4.1.7 beschrieben, stimuliert. Anschließend wurde die Zellen sowohl für RNA-Analysen als auch Western Blots lysiert und aufbereitet. Abbildung 5-20 zeigt die Ergebnisse für die qRT-Analysen und Western Blots gegen UPF1.



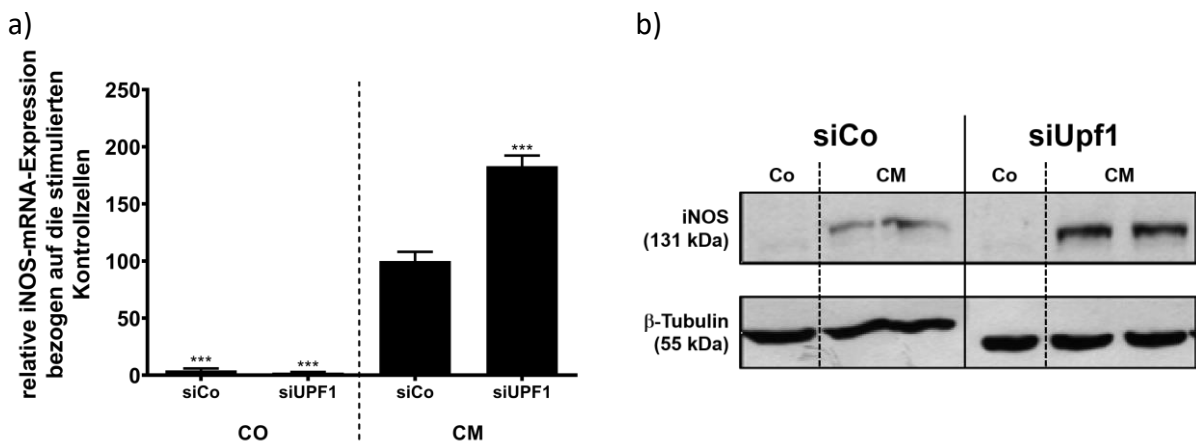
**Abbildung 5-20: Relative UPF1-Expression nach siRNA-Transfektion.**

DLD1-Zellen wurden für 48 h mit einer siRNA gegen UPF1 (**siUPF1**) bzw. einer Kontroll-siRNA (**siCo**) behandelt, für 18 h in FCS-freiem Medium inkubiert und anschließend für 6 h (RNA) bzw. 8 h (Protein) mit einem Cytokinmix (**CM**) bzw. ohne Cytokine (**CO**) stimuliert. RNA bzw. Proteine wurden isoliert und die UPF1-Expression durch eine qRT-PCR (a) bzw. einen Western Blot (b) analysiert.

- Zusammenfassung von sechs qRT-PCR-Analysen: Die Expressionen der siCo-behandelten Zellen wurden auf 100 % gesetzt. Gezeigt sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM. (\*\*\*)  $p < 0,001$ , ungepaarter t-Test).
- Gezeigt ist ein repräsentativer Blot von insgesamt drei Western Blots. Verwendet wurden spezifische Antikörper gegen UPF1 und  $\beta$ -Tubulin.

Die UPF1-Expression war in den siUPF1-behandelten DLD1-Zellen deutlich geringer als in den Zellen, die mit einer Kontroll-siRNA behandelt wurden. Sie lag auf mRNA-Ebene bei etwa 50 % im Vergleich zur Kontrolle (siehe Abbildung 5-20a). Auch der Western Blot zeigt eine deutlich verminderte Expression von UPF1 nach siUPF1-Behandlung (siehe Abbildung 5-20b). Dieser Effekt war unabhängig von der Cytokin-Behandlung.

Bei der Analyse der iNOS-Expression wurden die in Abbildung 5-21 gezeigten Ergebnisse erhalten.



**Abbildung 5-21: iNOS-Expression in siUPF1-behandelten DLD1-Zellen.**

DLD1-Zellen wurden für 48 h mit einer siRNA gegen UPF1 (**siUPF1**) bzw. eine Kontroll-siRNA (**siCo**) behandelt, für 18 h in FCS-freiem Medium inkubiert und anschließend für 6 h (RNA) bzw. 8 h (Protein) mit einem Cytokinmix (**CM**) bzw. ohne Cytokine (**CO**) stimuliert. RNA bzw. Protein wurden isoliert und die iNOS-Expression durch eine qRT-PCR (a) bzw. einen Western Blot analysiert.

- c) Zusammenfassung von acht qRT-PCR-Analysen: Die Expressionen der siCo-behandelten und CM-stimulierten Zellen wurden auf 100 % gesetzt. Gezeigt sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM von  $n = 6-8$  Experimenten. (\*\*\*)  $p < 0,001$ , one-way ANOVA).
- d) Gezeigt ist ein repräsentativer Blot von insgesamt vier Western Blots. Verwendet wurden spezifische Antikörper gegen iNOS und  $\beta$ -Tubulin.

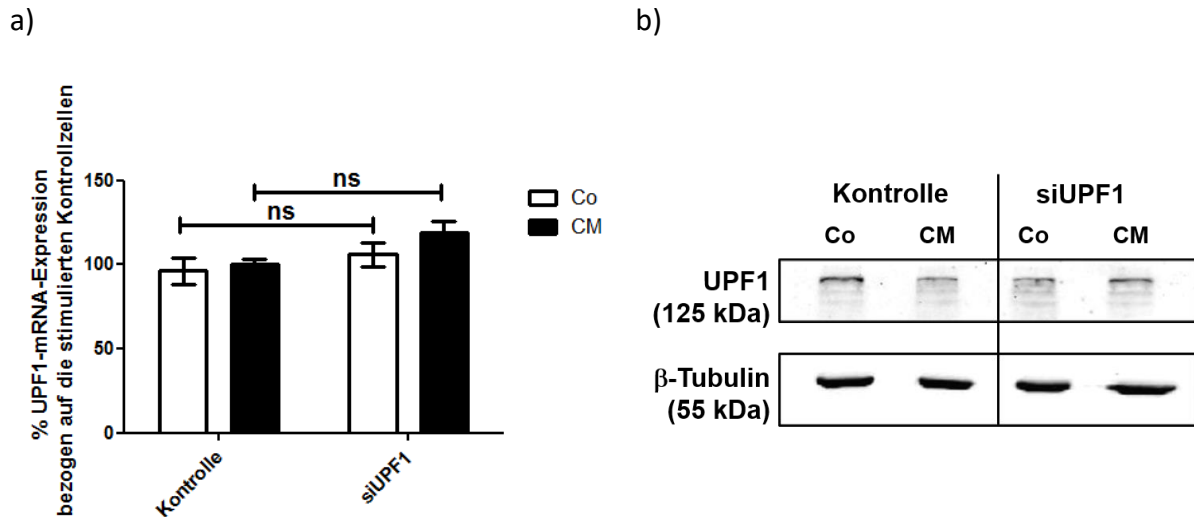
Sowohl die qRT-PCR (siehe Abbildung 5-21a) als auch der Western Blot (siehe Abbildung 5-21b) zeigen eine deutlich erhöhte iNOS-Expression in den stimulierten und mit siUPF1 behandelten Zellen gegenüber den Kontrollzellen. Auf mRNA-Ebene liegt diese fast doppelt so hoch wie in den Kontrollzellen. Ohne Stimulation der Zellen war keine iNOS-Expression messbar. Damit hat der *Knockdown* von UPF1 einen direkten oder indirekten Einfluss auf die iNOS-Expression. Die Ergebnisse sind in *Nitric Oxide* veröffentlicht (Gather 2019).

### 5.5.2 UPF1-*Knockdown* und -*Knockout* nicht dauerhaft möglich

Um eine längerfristige Auswirkung des NMD auf die iNOS-Expression zu untersuchen und die Frage klären zu können, ob die iNOS direkt oder nur indirekt durch den NMD reguliert wird, sollten Zellen generiert werden, die dauerhaft weniger oder kein UPF1 exprimieren. Mögliche Techniken waren die dauerhafte Einbringung eines siRNA-produzierenden Gens oder die Mutation des UPF1-Gens durch CRISPR/Cas9. Die Verwendung einer siRNA gegen UPF1 über einen shRNA-generierenden Vektor wurde schon in vorherigen Experimenten untersucht (Gather 2015) und wird im Folgenden zusammengefasst.

Zunächst wurden verschiedene siRNA-generierende Sequenzen in den Vektor psiRNAhH1-GFPzeo kloniert. Anschließend wurden diese stabil in DLD1 transfiziert (siehe Kapitel 4.1.5 und 4.1.6.1). Als Kontrolle wurden DLD1 mit psiRNAhH1GFPluc mit einer siRNA-generierenden Sequenz gegen die in den Zellen nicht vorhandene *Firefly*-Luciferase transfiziert und eine Kontroll-Zelllinie generiert. Die Analyse der stabilen Zelllinien erfolgte nach Aussäen der Zellen, 24 h Inkubationszeit und Co/CM-Stimulation (siehe Kapitel 4.1.7). Abbildung 5-22 zeigt das Ergebnis für die Zellen die stabil mit psiRNAhH1GFPzeohUPF1 bzw. psiRNAhH1GFPluc als Kontrolle transfiziert wurden. psiRNAhH1GFPzeohUPF1 erzeugt dabei eine siRNA, die identisch mit der in Kapitel 5.6.1 verwendeten siRNA ist.

DLD1-psiRNAhH1GFPluc-Zellen und DLD1-psiRNAhH1GFPzeohUPF1-Zellen wurden auf 6- bzw. 24-Lochplatten ausgesät. Nach 24 h Inkubationszeit wurden die Zellen für 16 h in FCS-freiem Medium inkubiert und anschließend für 6 h stimuliert. Nach der Lyse der Zellen mit GIT (24-Lochplatten) bzw. PLB (6-Lochplatten) wurden die Proben für die Analyse der RNA-Expression mittels qRT-PCR bzw. die Proteinanalyse mittels SDS-PAGE und Western Blot verwendet.



**Abbildung 5-22: UPF1-Expression der psiRNAhH1GFPzeohUPF1-Zellen im Vergleich zu den psiRNAhH1GFPluc-Zellen.**

a) Dargestellt ist das Ergebnis der qRT-PCR-Analysen der UPF1-mRNA-Expression. DLD1-psiRNAhH1GFPluc-Zellen (**Kontrolle**) und DLD1-psiRNAhH1GFPzeohUPF1-Zellen (**siUPF1**) wurden auf 24-Lochplatten ausgesät. Nach 24 h Inkubation wurden die Zellen für 16 h in FCS-freiem Medium inkubiert und anschließend für 6 h stimuliert. Nach Lyse der Zellen in GIT-Puffer wurde die RNA isoliert, revers transkribiert und eine qRT-PCR zur Detektion von UPF1 und GAPDH durchgeführt. Die Höhen der Balken entsprechen dem Mittelwert  $\pm$  SEM von drei Versuchsreihen mit jeweils sechs Proben pro Zelllinie und Stimulation. Die statistische Auswertung erfolgte durch einen two-way ANOVA (ns: nicht signifikant).

b) Für Proteinanalysen wurden DLD1-psiRNAhH1GFPzeohUPF1-Zellen (**siUPF1**) und DLD1-psiRNAhH1GFPluc-Zellen (**Kontrolle**) in 6-Lochplatten ausgesät und für 24 h in DMEM inkubiert. Nach weiteren 16 h Inkubationszeit in FCS-freiem Medium wurden die Zellen für 8 h stimuliert und anschließend in PLB lysiert. Nach Homogenisierung, Aufreinigung und Konzentrationsbestimmung der Proben erfolgte die Western Blot-Analyse. Hierzu wurden 100  $\mu$ g Protein durch eine SDS-PAGE aufgetrennt und mit dem Semi-Dry-Blotter auf eine Nitrocellulose-Membran übertragen. Als Primärantikörper dienten anti-UPF1 sowie anti-GAPDH zur Normalisierung. Die Detektion erfolgte durch den ChemiDoc™ XRS.

Wie der Abbildung zu entnehmen ist, gibt es weder auf der Ebene der mRNA-Expression noch der Proteinexpression einen Unterschied in der UPF1-Expression zwischen den siUPF1- und den Kontrollzellen. Auch die Verwendung weiterer siRNA-Sequenzen, die zum Beispiel bereits von Sheng-di Cheng (Xu 2012) und Lara Ajamian (Ajamian 2008) erfolgreich zum transienten *Knockdown* von UPF1 genutzt wurden, führte nicht zu einem *Knockdown* der UPF1-Expression nach deren Klonierung in shRNA-generierende Plasmide (psiRNA-GFP-ChensiUPF1\_BBS und psiRNA-GFP-AjasiUPF1\_BBS) und stabiler Transfektion in DLD1-Zellen (Daten nicht gezeigt).

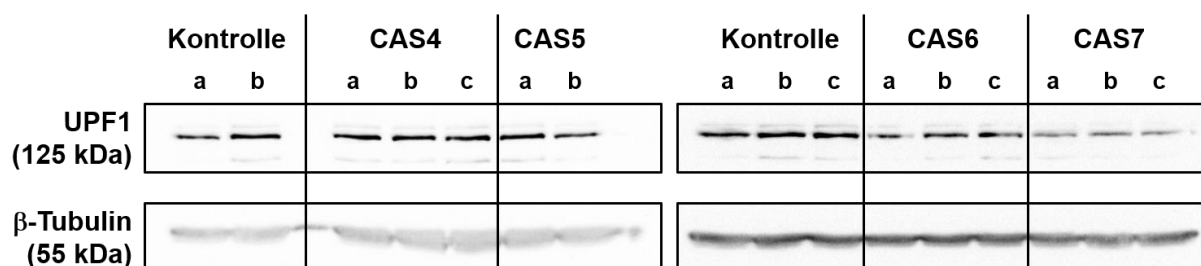
Eine weitere Möglichkeit ist der *Knockout* von UPF1 mit dem CRISPR/Cas9-System (siehe Kapitel 4.1.6.2). Hierbei wird sich ein bakterieller Verteidigungsmechanismus zu Nutze gemacht. Das Enzym Cas9 sorgt zusammen mit einer für das Zielgen spezifischen Leit-RNA und einer tracrRNA für einen Doppelstrangbruch im Zielgen, der anschließend durch DNA-Reparaturmechanismen repariert wird. Diese sind fehlerbehaftet, sodass es zu einer Mutation oder



Leserasterverschiebung kommen kann und damit die Expression des Zielgens verhindert wird bzw. ein verkürztes oder fehlerhaftes Protein exprimiert wird. Im Rahmen dieser Doktorarbeit wurde ein Plasmid verwendet, das sowohl für das Cas9-Protein als auch die Leit-RNA und tracrRNA codiert (Ran 2013).

Es wurden zunächst verschiedene Sequenzen, die als Leit-RNA für das CRISPR/Cas9-System dienen sollten, in den Vektor pSpCas9(BB)-2A-Puro (siehe Anhang 8.1) kloniert. Anschließend wurden DLD1-Zellen stabil mit diesen Plasmiden transfiziert. Als Kontroll-Zelllinie wurde ein Aliquot DLD1 simultan mit dem Leervektor pSpCas9(BB)-2A-Puro transfiziert. Die Selektion erfolgte mit dem Antibiotikum Puromycin. Nachdem nur noch einzelne Kolonien auf den Platten wuchsen, wurden jeweils mehrere Einzelklone entnommen und in eigene Zellkulturflaschen überführt. Sobald die Zellen konfluent waren, wurden sie nach Lyse mit RIPA mittels SDS-PAGE und Western Blot auf ihre UPF1-Expression untersucht.

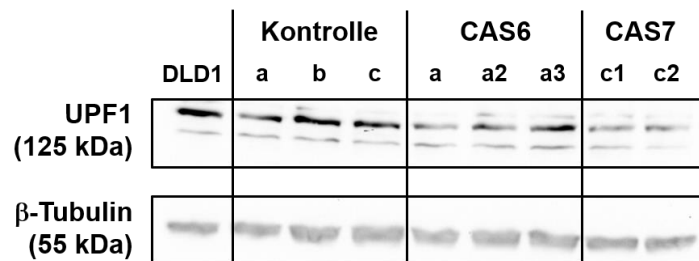
Ein Beispiel für einen Western Blot ist in Abbildung 5-23 abgebildet. Die Buchstaben a, b und c beschreiben jeweils die Zelllinien, die aus einem vereinzelt Zellkonglomerat hervorgegangen sind. Die Bezeichnungen CAS4 – CAS7 stehen für die Zelllinien, die stabil mit dem Vektor pSpCas9(BB)-2A-Puro mit der jeweiligen Leitsequenz CAS4 – CAS7 transfiziert wurden. Die Ladekontrollbanden sind in allen Zelllinienproben nahezu gleich intensiv. Sie wurden durch die Behandlung mit einem Antikörper gegen  $\beta$ -Tubulin sichtbar gemacht. In den Lysaten aller Zelllinien ist außerdem eine Bande bei 125 kDa zu erkennen. Damit konnte in allen Zelllinien UPF1 detektiert werden und es wurde in keiner der Zelllinien mit den CAS-Leitsequenzen 4, 5, 6 oder 7 ein vollständiger *Knockout* von UPF1 erreicht.



**Abbildung 5-23: Beispiel eines Western Blots für den *Knockout* von UPF1 durch CRISPR/Cas9.**

Stabil transfizierte Zellen mit verschiedenen CRISPR/Cas9-Leitsequenzen wurden in 6-Lochplatten ausgesät, für 24 h inkubiert und anschließend mit RIPA lysiert. Die Proteinkonzentration wurde mit einem Bradford-Assay bestimmt und jeweils die gleiche Menge Protein auf ein SDS-Gel aufgetragen. Nach Übertragung auf eine Nitrocellulose-Membran wurden die Banden mit den Antikörpern gegen UPF1 und  $\beta$ -Tubulin sichtbar gemacht. Die Detektion erfolgte durch den ChemiDoc™ XRS. Gezeigt ist ein repräsentativer Blot von mehreren verschiedenen Zelllinien, Leit-RNAs und Experimenten.

Die Zelllinie CAS6a, das heißt die Zellen, die aus dem Einzelklon a einer mit pSpCas9(BB)-CAS6-2A-Puro stabil transfizierten Zelllinie hervorgingen, weisen eine möglicherweise leicht geringere UPF1-Expression auf. Das gleiche gilt für die Zelllinie CAS7c. Diese Zelllinien wurden noch einmal vereinzelt und es wurden jeweils drei weitere Einzelklone subkultiviert. Die Einzelklone CAS6a1 und CAS7c3 starben, sodass nur die die Einzelklone CAS6a2, CAS6a3, CAS7c1 und CAS7c2 bis zur vollständigen Konfluenz kultiviert werden konnten. Ein Beispiel für einen Western Blot gegen UPF1 mit Zellen dieser Einzelklon-Kolonien ist in Abbildung 5-24 dargestellt.



**Abbildung 5-24: Repräsentativer Western Blot für die Vereinzlung von Zelllinien nach dem *Knockout* von UPF1 durch CRISPR/Cas9.**

Die stabil transfizierten Zelllinien CAS6a und CAS7c wurden ausgesät und vereinzelt. Konfluente Zelllinien wurden in eine 6-Lochplatte ausgesät und nach 24 h Inkubationszeit mit RIPA-Puffer lysiert. Die Proteinkonzentration wurde mit einem Bradford-Assay bestimmt und jeweils die gleiche Menge Protein auf ein SDS-Gel aufgetragen. Nach Übertragung auf eine Nitrocellulose-Membran wurden die Banden mit den Antikörpern gegen UPF1 und β-Tubulin sichtbar gemacht. Die Detektion erfolgte durch den ChemiDoc™ XRS. Gezeigt ist ein repräsentativer Blot von mehreren verschiedenen Zelllinien, Leit-RNAs und Experimenten.

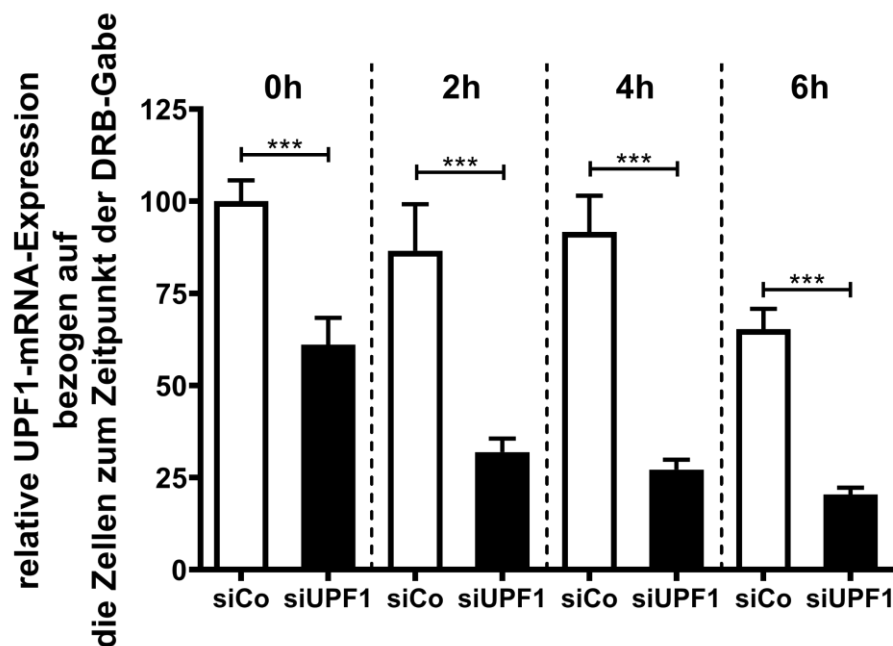
Dieser Western Blot zeigt ebenfalls gleichmäßig intensive Ladekontrollbanden. Auch die UPF1-Bande tritt in allen Proben der stabilen Zelllinien auf. Damit wurde in keiner der vereinzelt Zelllinien ein vollständiger *Knockout* von UPF1 erreicht. Auch die Verwendung weiterer Leit-RNA-Sequenzen und die Wiederholung der Transfektionen und Vereinzlungen führte zu keiner UPF1-*Knockout*-Zelllinie.

Damit konnte weder über die Transfektion eines siRNA-generierenden Plasmids noch über das CRISPR/Cas9-System ein erfolgreicher dauerhafter *Knockdown* oder *Knockout* von UPF1 erreicht werden.

### 5.5.3 DRB-Analyse der iNOS-mRNA-Stabilität nach transientem siRNA-Knockdown von UPF1

Die Stabilität einer mRNA lässt sich über die Behandlung von Zellen mit DRB bestimmen. DRB ist eine Substanz, die die Elongation der RNA-Polymerase II-vermittelten Transkription hemmt, wodurch keine weitere mRNA synthetisiert wird. Für einen Versuch mit DRB konnten die siRNA-transfizierten Zellen verwendet werden. Nach 24 h Inkubationszeit ausgesäeter DLD1-Zellen wurden sie mit einer siRNA gegen UPF1 bzw. einer Kontroll-siRNA transfiziert und für 48 h inkubiert (siehe Kapitel 4.1.6.1). Anschließend wurden sie für 4 h mit CM stimuliert und dann mit DRB versetzt (siehe Kapitel 4.1.8). Proben wurden nach 0, 2, 4 und 6 h DRB-Behandlung in GIT lysiert. Nach Aufreinigung der RNA und nachträglicher cDNA-Synthese wurden qRT-PCRs durchgeführt.

Abbildung 5-25 zeigt zunächst die Analyse der UPF1-Expression.

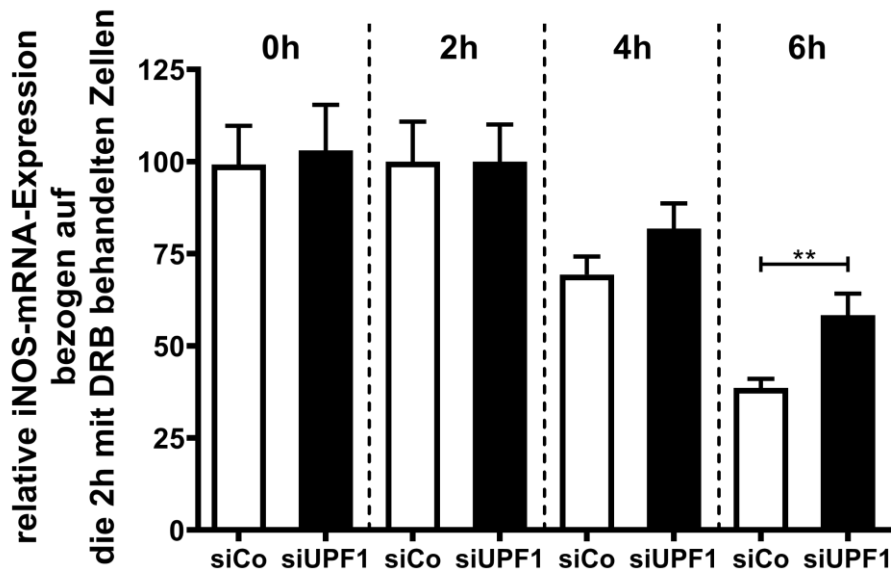


**Abbildung 5-25: UPF1-Expression in siRNA-transfizierten und DRB-behandelten DLD1-Zellen.**

DLD1-Zellen wurden für 48 h mit einer siRNA gegen UPF1 (**siUPF1**) bzw. eine Kontroll-siRNA (**siCo**) behandelt, für 18 h in FCS-freiem Medium inkubiert und anschließend für 4 h mit einem Cytokinmix stimuliert. Zum Stimulationsmedium wurde anschließend für 0, 2, 4 bzw. 6 h DRB gegeben. Danach erfolgte die Lyse der Zellen in GIT, die Isolation der RNA und nach reverser Transkription eine qRT-PCR mit Primern für UPF1 bzw. GAPDH. Gezeigt sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM von  $n = 2$  Experimenten mit je 4 bzw. 6 Proben pro Zeitpunkt und siRNA-Behandlung. (\*\*\*:  $p < 0,001$ , ungepaarter t-Test für jeden Zeitpunkt).

Zu allen Zeitpunkten ist die Expression von UPF1 niedriger als in den siCo-behandelten Zellen. Insgesamt nimmt in beiden Versuchsreihen die Expression von UPF1 ab. Nach sechsstündiger Behandlung mit DRB sind in den Kontrollzellen nur noch drei Viertel der UPF1-Expression messbar. In den mit siUPF1-behandelten Zellen sind es unter 25 % im Vergleich zur Kontrollprobe zum Zeitpunkt der DRB-Gabe.

Die qRT-Analyse der iNOS-Expression ergab das in Abbildung 5-26 gezeigte Diagramm.



**Abbildung 5-26: iNOS-mRNA-Expression in siRNA- und DRB-behandelten Zellen.**

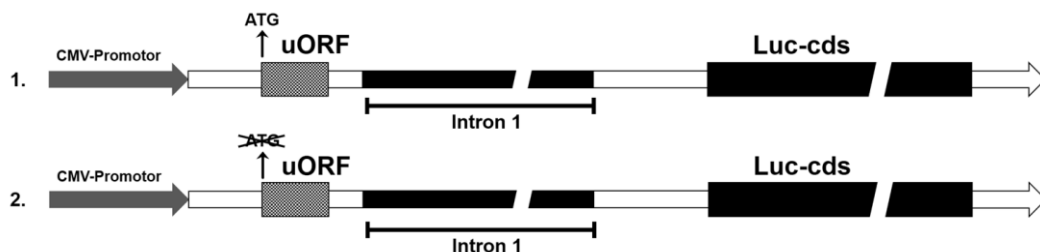
*DLD1-Zellen wurden für 48 h mit einer siRNA gegen UPF1 (siUPF1) bzw. eine Kontroll-siRNA (siCo) behandelt, für 18 h in FCS-freiem Medium inkubiert und anschließend für 4 h mit einem Cytokinmix stimuliert. Zum Stimulationsmedium wurde anschließend für 0, 2, 4 bzw. 6 h DRB gegeben. Nach Lyse der Zellen, Isolation der RNA und Synthese der cDNA wurde eine qRT-PCR mit Primern für iNOS bzw. GAPDH durchgeführt. Die erhaltenen Werte wurden auf die iNOS-Expression nach zweistündiger DRB-Behandlung bezogen. Gezeigt sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM von  $n = 2$  Experimenten mit je 4 bzw. 6 Proben pro Zeitpunkt und siRNA-Behandlung. (\*\*\*:  $< 0,001$ , ungepaarter t-Test für jeden Zeitpunkt).*

Um eine Aussage über die mRNA-Stabilität der iNOS-mRNA treffen zu können, wurden die erhaltenen Werte auf die iNOS-Expression nach sechsstündiger Stimulation mit CM bezogen, da zu diesem Zeitpunkt das Maximum der iNOS-Expression erreicht ist. Dies entspricht dem Zeitpunkt der zweistündigen Behandlung mit DRB. Nach vierstündiger DRB-Behandlung sinkt die iNOS-Expression. In den Kontrollzellen liegt sie bei etwa 75 % der Maximalexpression, während sie bei den siUPF1-behandelten Zellen noch bei ca. 80 % liegt. Aufgrund der Schwankungen der Messwerte ist dieser Unterschied nicht signifikant. Der Trend setzt sich jedoch bis zur sechsten Stunde der DRB-Behandlung fort, sodass hier ein signifikanter

Unterschied zwischen den siUPF1- und den Kontrollzellen messbar ist. Der *Knockdown* von UPF1 durch die transiente Transfektion führt somit zu einem verlangsamten iNOS-mRNA-Abbau und damit zu einer höheren iNOS-mRNA-Stabilität.

#### 5.5.4 Einfluss des ersten Introns der iNOS auf die Expression eines Reportergens

Das Stopcodon des uORF liegt vor dem ersten Intron des iNOS-Transkripts und könnte dadurch wie eine PTC zur Rekrutierung von UPF1 führen und den NMD der iNOS-mRNA auslösen (Hug 2016). Um herauszufinden, ob der NMD durch den uORF einen direkten regulatorischen Einfluss auf die iNOS-Expression hat und ob der uORF in Kombination mit dem ersten Intron für die gemessenen Effekte in den siUPF1-behandelten Zellen verantwortlich sein kann, wurden verschiedene Reporter-genkonstrukte verwendet. Wie schon bei der Analyse des Einflusses des uORFs in der 5'-UTR der iNOS-mRNA (siehe Kapitel 5.4.1) wurde der Luciferase-Vektor pcDNA4/TO-Luc genutzt. Vor die Luciferase wurde ein DNA-Fragment eingefügt, welches aus Exon 1, Intron 1 und Exon2 (bis zum Start-ATG der iNOS-cds) besteht (siehe Abbildung 5-27).



**Abbildung 5-27: Schema der 5'-UTR-Plasmide mit erstem iNOS-Intron.**

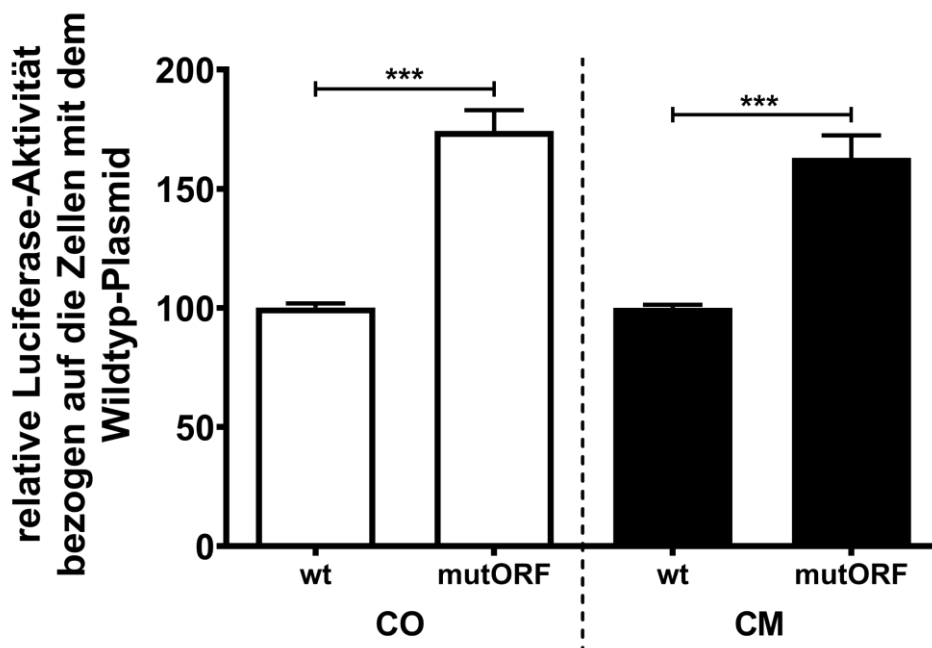
Gezeigt ist eine schematische Darstellung der entscheidenden Plasmid-Sequenzen. Zwischen dem CMV-Promotor des Vektors pcDNA4/TO-Luc und die cds der Firefly Luciferase (**Luc-cds**) wurde die 5'-UTR der iNOS mit dem ersten Intron (**Intron 1**) kloniert. Variante 1 entspricht dem Plasmid pcDNA4/TO-Ex1-In1-Ex2-Luc und damit der Wildtyp-Variante. Variante 2 ist pcDNA4/TO-Ex1-In1-Ex2-Luc-mut-uORF mit dem mutierten ATG am uORF der iNOS.

Dazu wurde zunächst ein Fragment durch eine PCR mit den Primern Ex1-In1-Ex2-5P (5'-GGA AGC TTA TAA CTT TGT AGC GAG TCG AAA ACT G-3') und Ex1-In1-Ex2-3P (5'-GGC CAT GGC TAT GGC TTT ACA AAG CAG GTC AC-3') sowie der genomischer DNA aus DLD1-Zellen erzeugt. Dieses wurde mit *Hind*III und *Nco*I geschnitten und in einen mit *Hind*III und *Nco*I geschnittenen pGL3-control-Vektor kloniert. Durch Restriktion mit *Hind*III und *Nar*I wurde aus diesem die 5'-

UTR der iNOS mit erstem Intron wieder ausgeschnitten und in einen mit *HindIII* und *NarI* geschnittenen pcDNA4/TO-Luc-Vektor kloniert. Dadurch entstand das Plasmid **pcDNA4/TO-Ex1-In1-Ex2-Luc**.

In einem weiteren Schritt wurde der uORF-Start, wie schon in Kapitel 5.4.1 beschrieben, zu einer *EcoRI*-Schnittstelle mutiert, sodass das Plasmid **pcDNA4/TO-Ex1-In1-Ex2-Luc-mut-uORF** erhalten wurde. Somit enthält pcDNA4/TO-Ex1-In1-Ex2-Luc den Wildtyp-uORF, während pcDNA4/TO-Ex1-In1-Ex2-Luc-mut-uORF den mutierten uORF enthält (siehe Abbildung 5-27).

Anschließend wurden DLD1-Zellen transient mit pcDNA4/TO-Ex1-In1-Ex2-Luc bzw. pcDNA4/TO-Ex1-In1-Ex2-Luc-mut-uORF zusammen mit pRLEF1 $\alpha$  (Bros 2006) transfiziert. Ein klassischer Luciferase-Assay wurde durchgeführt und ergab das in Abbildung 5-28 gezeigte Bild. Die Daten wurden zum Teil schon in Vorversuchen von Katja Schmitz und Kathrin Koch ermittelt und veröffentlicht (Gather 2019). Abbildung 5-28 zeigt die Zusammenfassung der Auswertung aller Daten.



**Abbildung 5-28: Luciferase-Aktivität in Zellen mit pcDNA4/TO-Ex1-In1-Ex2-Luc-Konstrukten.**

DLD1-Zellen wurden transient mit pcDNA4/TO-Ex1-In1-Ex2-Luc (**wt**) oder pcDNA-Ex1-In1-Ex2-Luc-mut-uORF (**mutORF**) transfiziert, für 24 h mit und 16 h ohne FCS inkubiert und anschließend für 6 h mit einem Cytokin-Mix (**CM**) oder Medium ohne Cytokine (**CO**) stimuliert. Nach der Lyse der Zellen wurde ein Luciferase-Assay durchgeführt. Als interner Standard diente die Kotransfektion mit pRLEF1 $\alpha$  (Bros 2006). Die relativen Luciferase-Expressionen der mit pcDNA4/TO-Ex1-In1-Ex2-Luc transfizierten Zellen wurden auf 100 % gesetzt und die Signifikanz mit einem ungepaarten t-Test errechnet. Gezeigt sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM von  $n = 6-8$  Experimenten (\*\*\*:  $p < 0,001$  bezogen auf die wt-transfizierten Zellen).

Die Zellen, die mit der mutierten uORF-Variante transfiziert wurden, weisen eine 1,6–1,8fach höhere Luciferase-Aktivität auf. Dieser Effekt ist unabhängig von der Stimulation der Zellen. Damit führt die Anwesenheit des uORF zu einer schwächeren Expression der iNOS und hat in Anwesenheit des Introns einen negativ-regulatorischen Effekt. Wie schon in den Versuchen mit der siRNA gegen UPF1 (Kapitel 5.5.1) lässt dies auf eine Regulation durch den NMD schließen, an der sowohl das erste Intron als auch der uORF beteiligt sind.

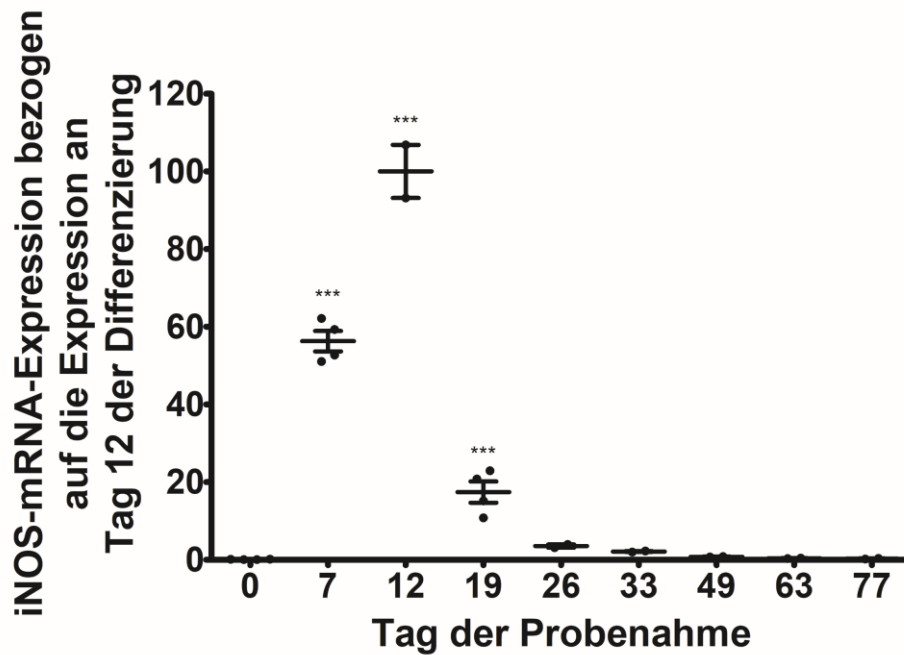
## 5.6 iNOS-Expression in der neuronalen Differenzierung

### 5.6.1 Voruntersuchungen und RNAseq-Analysen

Der Einfluss von NO auf die neuronale Entwicklung (Gibbs 2003, Haghighat 2017), die Teratogenität von sowohl zu hohen als auch zu niedrigen NO-Konzentrationen während der embryonalen Entwicklung (Tiboni 2014), aber auch die positiven Effekte von NO auf die Proliferation von neuronalen Vorläuferzellen (Lopez-Arenas 2012) deuten auf eine wichtige Rolle der iNOS in der Neurogenese hin. Ihr Beitrag an einem geregelten und abgepassten NO-Haushalts scheint ein wichtiger Faktor für die gesunde Entwicklung von Nervenzellen zu sein (Chong 2018). ENCODE-Expressionsanalysen ist zu entnehmen, dass in neuronalen Vorläuferzellen, aber nicht in anderen untersuchten Zellen des Gehirns, eine Expression der iNOS zu messen ist. Die höchste Expression wurde dabei im Ektoderm von verschiedenen Embryo-Proben gemessen (siehe Abbildung 1-8).

Die Anwesenheit der iNOS in diesen entscheidenden Schritten der embryonalen und neuronalen Entwicklung und ihre schon in verschiedensten Studien erforschten positiven und negativen Einflüsse darauf veranlassten eine genauere Betrachtung weiterer zugänglicher RNAseq-Studien, die sich spezifischer mit der Neurogenese beschäftigen. Eine Studie des temporalen Transkriptom während der neuronalen Differenzierung ist die CORTECON-Studie von Joyce van de Leemput und Nathan Boles et al. des *Neural Stem Cell Institute* (<http://neuralsci.org/>). Hierbei wurden insgesamt vier Differenzierungsreihen von hESCs zu Neuronen mit unterschiedlichen Zeitpunkten der Probenahme auf das Transkriptom hin untersucht (van de Leemput 2014). Die veröffentlichten Daten ermöglichen auch eine Analyse der Expression der iNOS. Abbildung 5-29 zeigt die Expression der iNOS in Bezug auf den Tag der Probenahme, der auch dem Tag nach Start der Differenzierung entspricht.





**Abbildung 5-29: iNOS-mRNA-Expression in der Differenzierung von Neuronen nach der CORTECON-Studie.**

Zu sehen ist die Expression der iNOS-mRNA anhand von RNAseq-Analysen innerhalb der CORTECON-Studie. Zwei verschiedene Differenzierungsreihen mit unterschiedlichen Zeitpunkten der Probenahme wurden nach RNAseq-Analyse normiert (van de Leemput 2014) und auf die Expression der Proben von Tag 12 bezogen. Gezeigt sind die Mittelwerte der relativen Expression mit SEM. (n=24, \*\*\*:  $p < 0,05$  gegenüber den Proben von Tag 0 nach one-way ANOVA mit anschließendem Bonferroni-Test).

Während die hESCs keine iNOS-mRNA exprimieren, steigt die Expression in den differenzierenden Zellen bis Tag 7 signifikant an und erreicht die Hälfte der gemessenen Maximal-expression. Das Maximum der iNOS-mRNA-Expression wird an Tag 12 erreicht. Zum Tag 19 sinkt die Expression auf etwa 20 % ab und ist ab Tag 26 nicht mehr signifikant höher als in den hESCs.

In einer Studie, bei der die Differenzierung von Stammzellen im Zusammenhang mit dem Down-Syndrom (DS) untersucht wurde, konnte ein ähnlicher Trend ermittelt werden (Briggs 2013). Sie ist Teil des FANTOM5-Projektes, bei dem Daten zum Transkriptom verschiedenster Zelllinien zusammengefasst wurden (Forrest 2014). Die Ergebnisse hierzu sind in Abbildung 5-30 dargestellt. Die Neuronen wurden bei diesen Analysen nach einem anderen, kürzeren Differenzierungsprotokoll über 18 Tage aus hiPSCs der Patienten (je drei Kontrollen und drei DS-Patienten) generiert (Chambers 2009, Kawaji 2017).

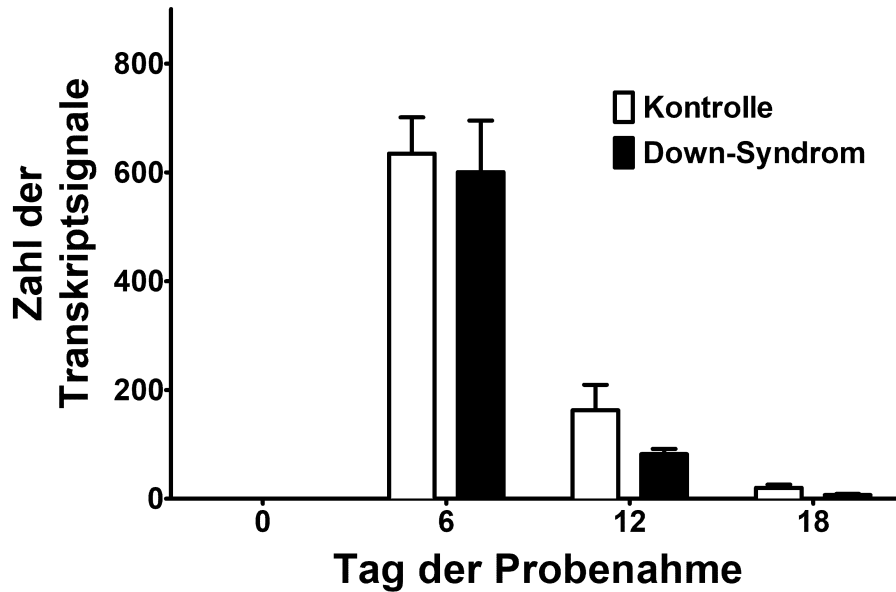


Abbildung 5-30: iNOS-mRNA-Expression in der Differenzierung von hiPSCs nach (Briggs 2013).

Zu sehen ist die Expression der iNOS-mRNA anhand von RNAseq-Analysen von Christine Wells innerhalb der FANTOM5-Studie. Drei Replikate der Wildtyp- (**Kontrolle**) bzw. **Down-Syndrom**-Proben mit unterschiedlichen Zeitpunkten der Probenahme wurden nach RNAseq-Analyse normiert (Forrest 2014) und die Zahl der Transkripte pro Tag aufgetragen.

Die höchste iNOS-Expression ist in beiden Gruppen nach sechs Tagen der Differenzierung zu beobachten, wobei sie sich nicht signifikant zwischen DS-Patienten und Kontrollprobanden unterscheidet.

Auch durch Analysen der totalen mRNA-Expressionsdaten von hESCs (Li 2017) während der neuronalen Differenzierung konnte eine transiente Erhöhung der iNOS-Expression mit einem Maximum an Tag 14 beobachtet werden (siehe Abbildung 5-31). Yuanyuan Li und Ran Wang et al. entnahmen Proben in einem Abstand von 2 Tagen und ermöglichten daher eine höhere Auflösung der mRNA-Expressionen. Sie definierten fünf Stufen der neuronalen Differenzierung (Li 2017), wobei die iNOS-Expression in der Stufe der Proliferation der NPCs und im Beginn der neuronalen Differenzierung am höchsten war.

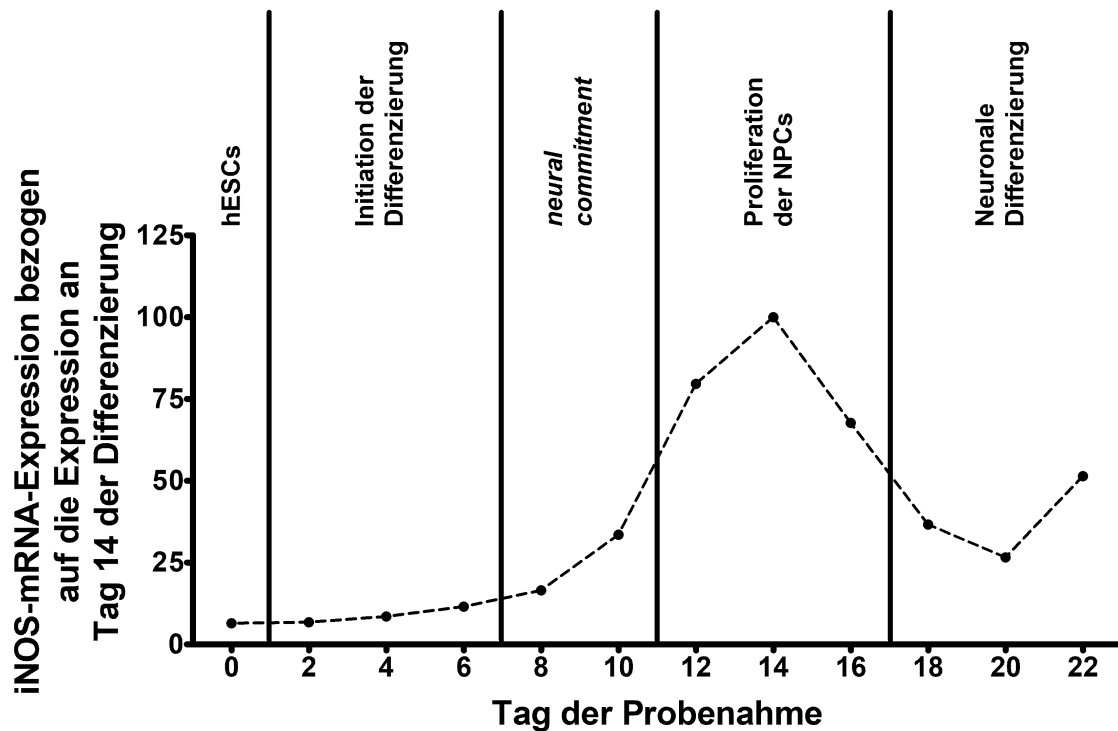


Abbildung 5-31: Analyse der iNOS-Expression in hESCs während der Differenzierung zu Neuronen.

Dargestellt ist die Expression während der Differenzierung von hESCs zu Neuronen nach Yuanyuan Li und Ran Wang et al. Die Daten sind den zusätzlichen Informationen der Publikation entnommen (Li 2017). Es handelt sich dabei um die RNAseq-Daten einer Differenzierungsreihe mit einer Probennahme an jedem zweiten Tag. Zusätzlich sind die von Yuanyuan Li und Ran Wang et al. beschriebenen Stufen der Differenzierung in der Grafik dargestellt. Zu einer einfacheren Darstellung wurden die Expressionen auf die höchste Expression an Tag 14 bezogen und prozentual dargestellt. Die Daten sind unter der Nummer GSE103715 im NCBI Gene Expression Omnibus (Edgar 2002) zu finden.

Somit konnte in den drei dargestellten Studien und nach Auswertung der darin erzeugten RNAseq-Datensätze eine Abhängigkeit der iNOS-Expression vom Differenzierungstag beobachtet werden, wobei die Expression während der Tage 6 bis 18 je nach Protokoll der Differenzierung am höchsten war.

### 5.6.2 qRT-Analysen zur iNOS-Expression während der Differenzierung

Die obigen Ergebnisse sollten im Folgenden durch qRT-PCR-Analysen verifiziert werden. Hierfür wurden Proben einer Differenzierung von hiPSCs der Arbeitsgruppe von PD Dr. Michael Peitz des Instituts für Rekonstruktive Neurobiologie (Universitätsklinikum Bonn) untersucht.

Analysiert wurden insgesamt vier hiPSC-Linien, die aus Blutproben (*peripheral blood mononuclear cells*, PBMCs) verschiedener Probanden nach einem Protokoll von Emile van den

Akker et al. generiert wurden (van den Akker 2010, Peitz 2018). Bei den Linien iLB-C16bm und iLB-C16bm-2 handelt es sich um verschiedene Stammzellproben, die vom gleichen Probanden stammen. iLB-C133bm und iLB-C16bm sind männliche, iLB-C89bf weibliche Stammzelllinien. iLB-C16bm und iLB-C89bf wurden über 60 Tage von der Arbeitsgruppe von PD Dr. Michael Peitz differenziert, iLB-C133bm und iLB-C16bm-2 wurden nach demselben Protokoll über 48 Tage zu glutamatergen kortikalen Neuronen differenziert (Rehbach 2019).

Bis zur Differenzierung wurden die hiPSCs in mTeSR (StemCell Technologies) oder StemMACS™ iPS-Brew (Miltenyi Biotec) kultiviert und mit Hilfe von EDTA passagiert (Beers 2012). Nach der Dissoziation der Zellen mit Accutase wurden die vereinzelt Zellen in dem jeweiligen hiPSC-Medium mit ROCK-Inhibitor ausgesät, welcher durch die Inhibition bestimmter Kinasen die Überlebensrate der Stammzellen erhöht (Ichikawa 2011).

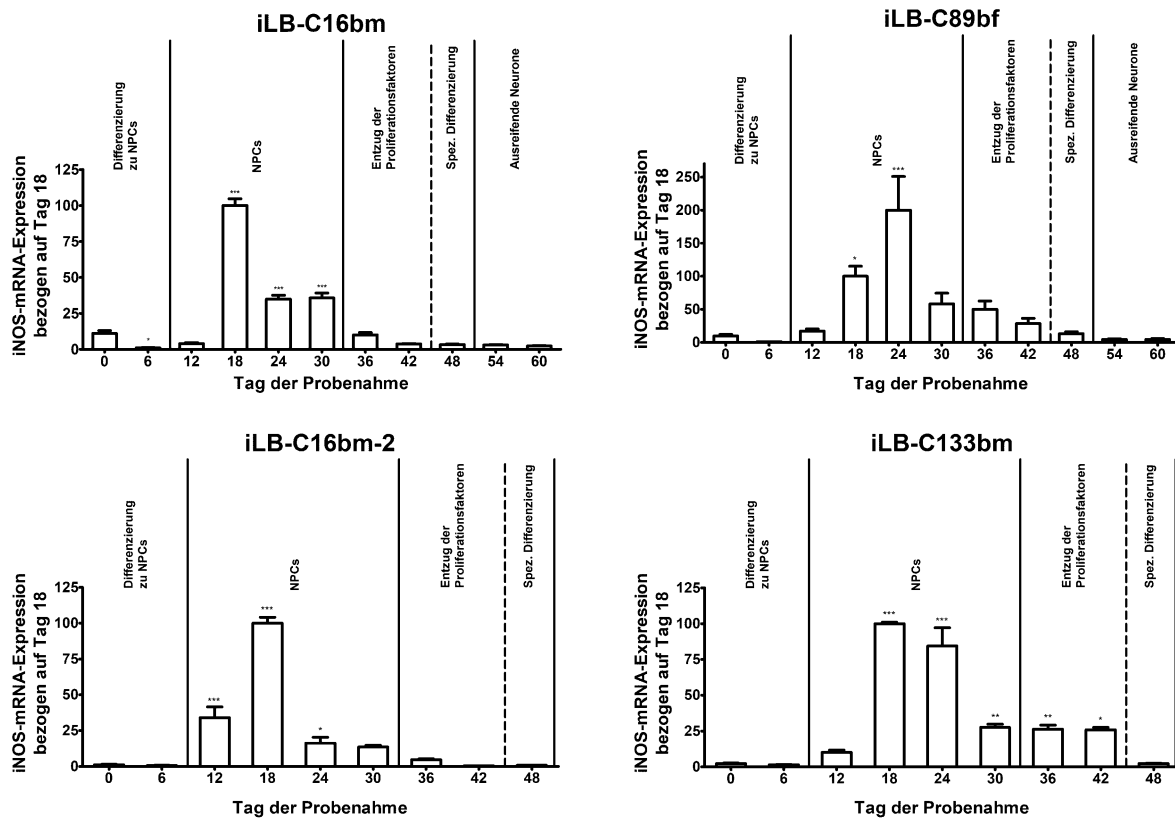
Die Differenzierung wurde eingeleitet mit dem Wechsel zu *GLUT neural induction medium*, einer Kombination aus DMEM/F12 und Neurobasal-Medium mit *N2-* und *B27-supplement* (im Folgenden N2/B27-Medium), welche die Überlebensrate der Stammzellen erhöhten und eine *feeder*-freie Kultur der Stammzellen ermöglichen (Baxter 2009). Außerdem wurden noch Dorsomorphin, SB431542 und LDN-193189 hinzugegeben, die durch die Inhibition des *bone morphogenic protein* (BMP) bzw. TGFβ/Activin/Nodal-Signalwegs die Entwicklung von NPCs unterstützen (Morizane 2011, Chambers 2012).

Innerhalb der ersten zehn bis zwölf Tage entwickelten sich Neuralrohr-ähnliche Strukturen mit ersten rosettenförmigen neuronalen Kolonien, unterstützt durch die Zugabe des Wachstumsfaktors FGF2 ab Tag 10. Diese NPC-Kolonien wurden durch Behandlung mit Accutase vereinzelt und auf Matrigel-beschichteten Zellkulturschalen in N2/B27-Medium unter Zugabe von FGF2 und ROCK-Inhibitor kultiviert. An Tag 12 und 13 wurde das Medium durch N2/B27-Medium ohne Zusätze ausgetauscht. Ab Tag 14 wurden FGF2 und Heparin zum Kulturmedium gegeben. An Tag 17 und 22 wurden die Zellen mit Accutase voneinander und von der Zellkulturschale gelöst und jeweils die Hälfte der Zellen neu ausgesät. Ab Tag 31 wurden dann die Proliferations- und Wachstumsfaktoren entzogen und die Zellen nur noch in N2/B27-Medium mit zugesetztem ROCK-Inhibitor kultiviert, damit die postmitotische Differenzierung der Zellen eingeleitet werden konnte.

An Tag 44 wurden die Zellen erneut aufgeteilt und am Folgetag die spezifische Differenzierungsfaktoren zum N2/B27-Medium gegeben, die schließlich zu einer Ausdifferenzierung der Zellen in Neurone führten. Hierzu gehörten PD0325901, ein MAPK-Inhibitor (Qi 2017), und DAPT, welches als  $\gamma$ -Secretase-Inhibitor den Notch-Signalweg blockiert (Boissart 2013). Die endgültige Differenzierung der NPCs wurde ab Tag 49 mit Hilfe von AraC (Cytosin- $\beta$ -D-Arabinofuranosid-Hydrochlorid) eingeleitet, welches die Zellteilung verhindert und dadurch sowohl die postmitotische Ausdifferenzierung der Neurone fördert als auch deren Ausbeute durch die Selektion gegenüber sich teilenden Zellen erhöht (González-Burguera 2016). Eine genaue Beschreibung der Differenzierung ist unter Rehbach et al. zu finden (Rehbach 2019).

Die hierfür verwendeten Medien enthielten keine Cytokine, wie zum Beispiel IL6, TNF $\alpha$ , IFN $\gamma$  oder IL1 $\beta$ , die laut Literatur eine Induktion der humanen iNOS-Expression auslösen. Die Medien wurden auch auf die Anwesenheit von Endotoxinen getestet, welche nicht nur die Differenzierung behindern, sondern ebenfalls für eine Induktion der iNOS-Expression sorgen könnten.

Zellproben für die Analyse der RNA-Expression wurden ab der ersten Aussaat der hiPSCs alle sechs Tage genommen und bis zur Verwendung bei -80 °C eingefroren. Nach der Aufreinigung der RNA wurde diese mit Hilfe des *High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit* von Applied Biosystems in cDNA umgeschrieben und mehrere qRT-PCRs zur Bestimmung der iNOS-Expression durchgeführt. Abbildung 5-32 zeigt das Ergebnis dieser qRT-PCRs für die einzelnen differenzierten Zelllinien.



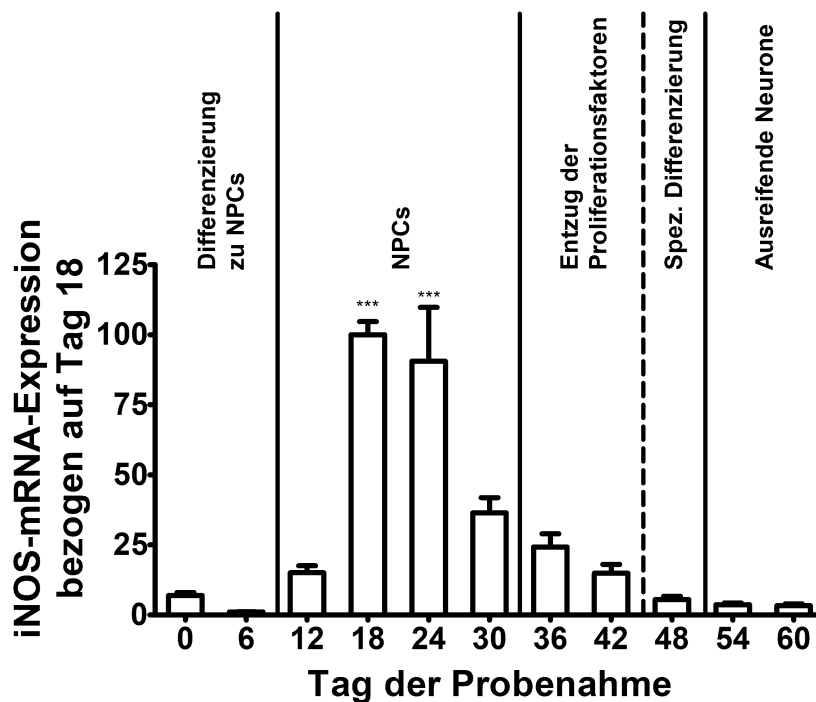
**Abbildung 5-32: iNOS-mRNA-Expression während der Differenzierung verschiedener Stammzelllinien.**

Die von der Arbeitsgruppe von Michael Peitz erhaltenen RNA-Proben wurden zur cDNA-Synthese mit dem High Capacity Kit zunächst am NanoDrop zur Konzentrationsbestimmung und Qualitätskontrolle vermessen und anschließend verdünnt. qRT-Analysen wurden mit den Primern *h1iNOS\_for* und *h1iNOS\_rev* für die iNOS-Expression und *18S\_for* und *18S\_rev* als Referenzexpression durchgeführt. Dabei wurden jeweils Duplikate der einzelnen Zellproben gemessen. Die qRT-Analysen für die iNOS-Expression wurden insgesamt drei Mal für die Zelllinien iLB-C16bm und iLB-C89bf bzw. zwei Mal für die Linien iLB-C133bm und iLB-C16bm-2 wiederholt und auf zwei verschiedene Verdünnungen (1:10 und 1:100) der 18S-Messungen bezogen. Die Auswertung erfolgte nach der  $2^{-\Delta\Delta C(T)}$ -Methode. Die erhaltenen Werte wurden auf die iNOS-mRNA-Expression an Tag 18 bezogen. Dargestellt ist jeweils der Mittelwert mit SEM. Zur Bestimmung der Signifikanz wurde ein one-way ANOVA mit anschließendem Tukey-Test durchgeführt ( $n = 8-12$ ; Signifikanz: \*:  $p < 0,05$ ; \*\*:  $p < 0,01$ ; \*\*\*:  $p < 0,001$  in Bezug auf die Expression an Tag 0).

Wie bei allen Zelllinien zu sehen ist, stieg die iNOS-mRNA-Expression während der Entwicklung der Zellen zu NPCs signifikant an. Je nach Zelllinie zeigte sich das Maximum an Tag 18 (iLB-C16bm, iLB-C16bm-2 und iLB-C133bm) oder an Tag 24 (iLB-C89bf). Schon vor dem Entzug der Proliferationsfaktoren fiel die iNOS-Expression wieder signifikant ab, sodass in den ausdifferenzierten Zellen kaum bis gar keine iNOS-mRNA-Expression gemessen wurde.

Abbildung 5-33 zeigt die Zusammenfassung aller Daten der verschiedenen Zelllinien. Aus der Zusammenfassung ergibt sich eine signifikant höhere iNOS-Expression 18 bis 24 Tage nach dem Start des Differenzierungsprotokolls. Danach sinkt die iNOS-Expression langsam wieder

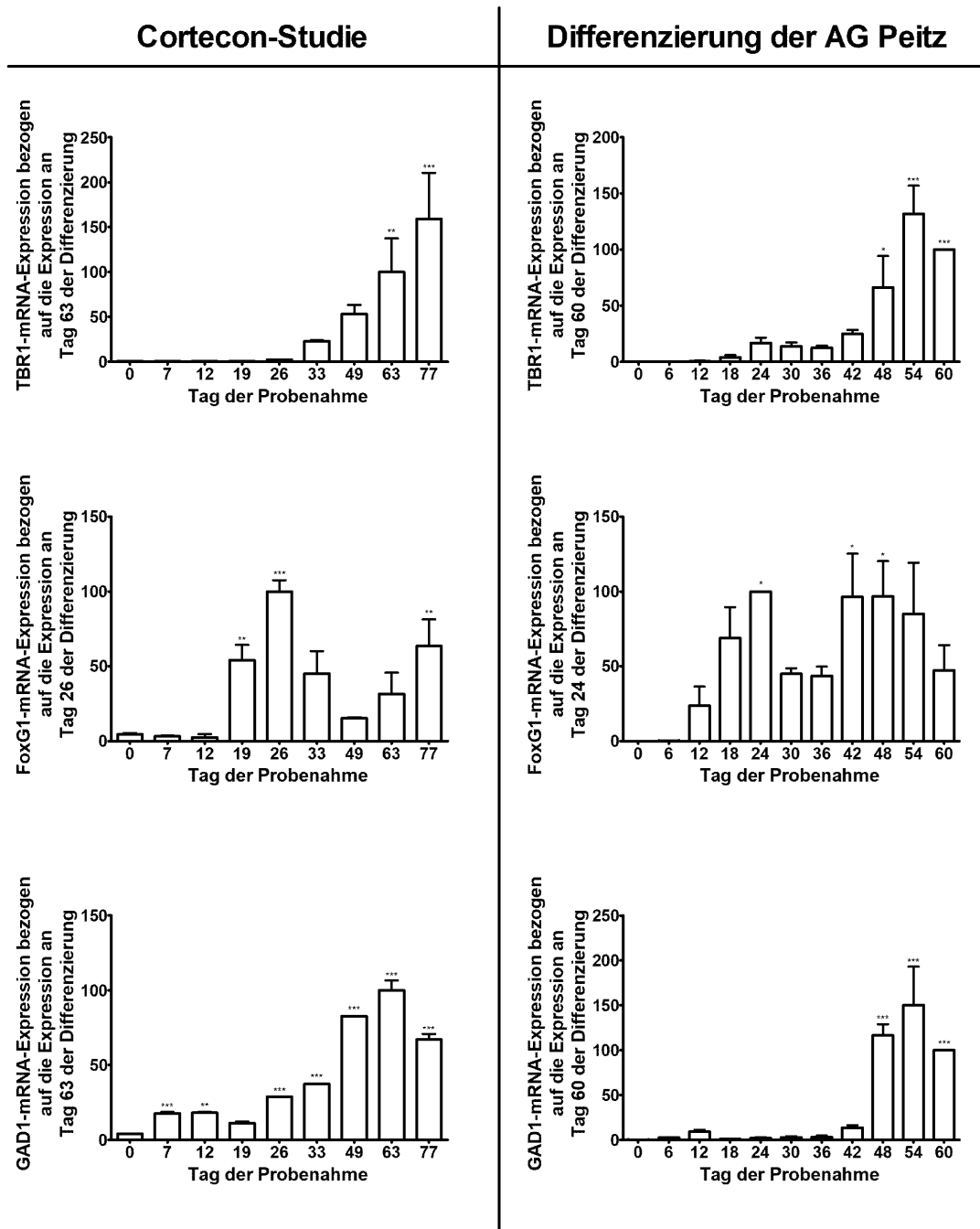
auf das Niveau der Stammzellen ab, welches es nach Start der spezifischen neuronalen Differenzierung in den ausreifenden Neuronen erreicht.



**Abbildung 5-33: Zusammenfassung aller iNOS-mRNA-Expressionsdaten der neuronalen Differenzierung.**

Dargestellt ist die Zusammenfassung aller qRT-Analysen der Zelllinien iLB-C16bm, iLB-C89bf, iLB-C133bm und iLB-C16bm-2 mit den Primern *huiNOS\_for* und *huiNOS\_rev* für die iNOS-Expression und *18S\_for* und *18S\_rev* als Referenzexpression. Die erhaltenen Werte wurden auf die iNOS-mRNA-Expression der jeweiligen Zelllinie an Tag 18 bezogen und der Mittelwert mit SEM gebildet. Zur Bestimmung der Signifikanz wurde ein one-way ANOVA mit anschließendem Tukey-Test durchgeführt ( $n = 40$ ; Signifikanz: \*:  $p < 0,05$ ; \*\*:  $p < 0,01$ ; \*\*\*:  $p < 0,01$ ).

Zur Qualitätskontrolle wurden außerdem verschiedene Marker untersucht. Das *Forkhead box protein G1* (FoxG1) spielt eine wichtige Rolle in der Differenzierung (Kawauchi 2009) und wurde schon in der CORTECON-Studie als Marker für die Differenzierung genutzt (van de Leemput 2014). Des Weiteren wurden die Expression der Glutamat-Decarboxylase 1 (GAD1), die ein Marker für glutamaterge Neurone ist und daher in einem Teil der ausgereiften Neuronen exprimiert wird, und das *T-box brain protein 1* (TBR1) als weiterer Marker für die Differenzierung betrachtet. Die Expressionsprofile während der Differenzierung wurden der CORTECON-Studie entnommen (van de Leemput 2014) und in Abbildung 5-34 auf der linken Seite dargestellt. Die entsprechende Analyse der mRNA-Expression in den Differenzierungsproben der AG Peitz ist auf der rechten Seite zu sehen. Die Primer für die qRT-PCR-Analysen sind in Tabelle 3-14 aufgelistet.



**Abbildung 5-34: Expression von TBR1, FoxG1 und GAD1 in der Differenzierung der AG Peitz im Vergleich zur CORTECON-Studie.**

Dargestellt ist das Ergebnis der qRT-PCR-Analysen der differenzierenden Zellen der AG Peitz im Vergleich zu den Ergebnissen der CORTECON-Studie. Die Daten der CORTECON-Studie wurden den veröffentlichten zusätzlichen Daten entnommen. Sie sind EdgeR und Deseq normiert (van de Leemput 2014) und wurden anschließend auf die Expression an Tag 63 (TBR1 und GAD1) bzw. 26 (FoxG1) bezogen. Die Höhen der Balken entsprechen dem Mittelwert  $\pm$  SEM von jeweils zwei bis vier Proben pro Zeitpunkt. Die statistische Auswertung erfolgte durch einen one-way ANOVA (\*:  $p < 0,05$ ; \*\*:  $p < 0,01$ ; \*\*\*:  $p < 0,001$ ).

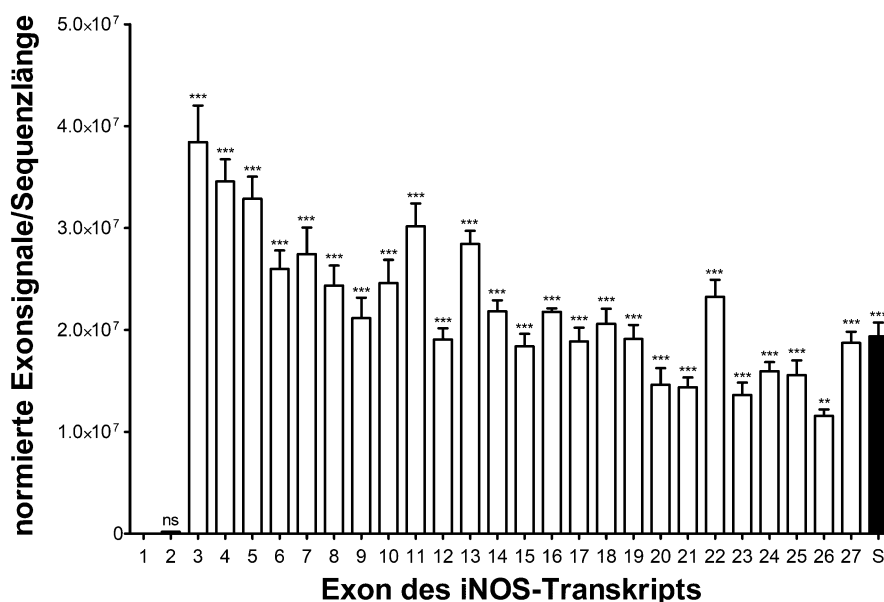
Die RNA der Proben der AG Peitz wurde in cDNA umgeschrieben und eine qRT-PCR durchgeführt. Verwendet wurden hierbei Primer zur Detektion von FoxG1, TBR1, GAD1 und 18S. Die Höhen der Balken entsprechen dem Mittelwert  $\pm$  SEM von jeweils zwei Proben pro Zeitpunkt bezogen auf die Expression an Tag 60 (TBR1 und GAD1) bzw. 24 (FoxG1). Die statistische Auswertung erfolgte durch einen one-way ANOVA (\*:  $p < 0,05$ ; \*\*:  $p < 0,01$ ; \*\*\*:  $p < 0,001$ ).



Wie Abbildung 5-34 zu entnehmen ist, ergaben beide Analysen ähnliche Expressionsprofile für die untersuchten Marker. TBR1 und GAD1 wurden höher exprimiert, je weiter die Neuronen ausreifen. Die FoxG1-Expression stieg bis Tag 24 (AG Peitz) bzw. 26 (CORTECON-Studie) an, sank dann wieder und stieg in den ausreifenden Neuronen wieder an. Obwohl die Fehlerwerte der Analysen sehr hoch sind und damit ein quantitativer Vergleich schwierig ist, ist zu erkennen, dass die allgemeinen Verläufe der Marker-Expressionen insgesamt sehr ähnlich waren. Folglich scheint die Differenzierung der hESCs der CORTECON-Studie und der hiPSC der AG Peitz einem ähnlichen molekularbiologischen Programm zu folgen.

### 5.6.3 Bestimmung des TSS der iNOS in den Neuronen

Neben den Analysen der Expression der vollständigen Transkripte wurden die CORTECON-Daten auch mithilfe des DEXSeq-Pakets (Anders 2012, Reyes 2013) im Hinblick auf die Expression einzelner Exons untersucht (van de Leemput 2014). Nach der Division der normierten Signale der einzelnen Exons bzw. des Gesamt-iNOS-Signals durch die jeweilige Sequenzlänge ergibt sich für den Tag der höchsten iNOS-Expression in der neuronalen Entwicklung (Tag 12) der in Abbildung 5-35 gezeigte Graph.

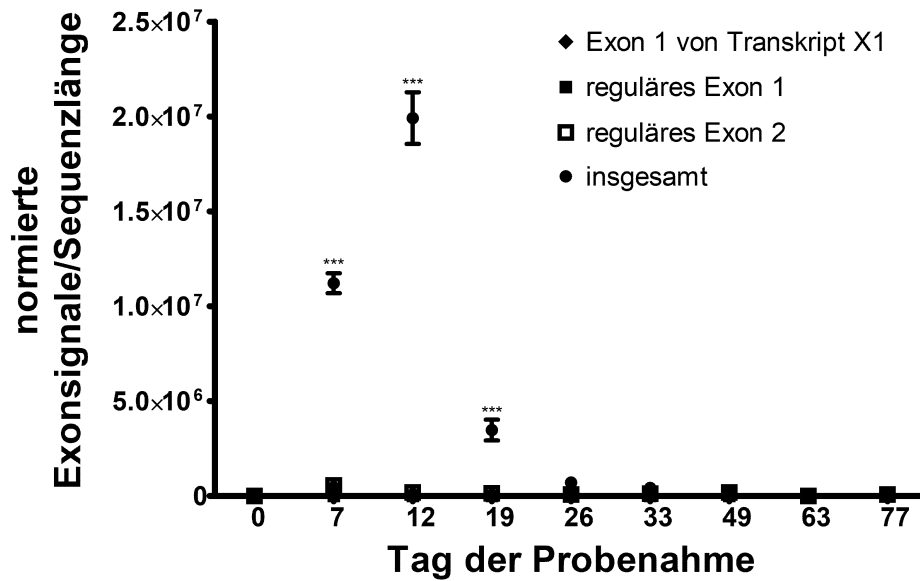


**Abbildung 5-35: Expressionssignale der verschiedenen Exons an Tag 12 der CORTECON-Studie (van de Leemput 2014) bezogen auf die gesamte iNOS-Expression.**

Gezeigt sind die normierten Signale der Exons aus der CORTECON-Studie (van de Leemput 2014) geteilt durch ihre Sequenzlänge (weiße Balken) und die Summe aller Signale geteilt durch die Gesamtlänge der iNOS-mRNA (S). Die gezeigte Signifikanz wurde mit einem one-way ANOVA mit anschließendem Bonferroni-Test ermittelt und auf den Wert für das Exon 1 bezogen ( $n = 2-4$ ; ns=nicht signifikant; \*\*\*:  $p > 0,005$ ).

Wie in Abbildung 5-35 gezeigt, wurden die beiden ersten Exons im Vergleich zu den anderen Exons und zur Summe der Signale aller Exons signifikant geringer bzw. gar nicht exprimiert. Die Expressionen der ersten beiden Exons unterscheiden sich nicht signifikant. Damit stellt sich die Frage, ob hier möglicherweise ein anderes iNOS-Transkript exprimiert wird als das in der Referenzdatenbank annotierte iNOS-Transkript. Bis zum jetzigen Zeitpunkt fanden sich zwar verschiedene mögliche Transkripte in der NCBI-Datenbank und im *Ensembl Genome Browser* oder dem *USCS-Genome Browser* (siehe Kapitel 1.3.1), in der aktuellsten Version ist allerdings nur noch das Transkript zu finden, das im Rahmen dieser Arbeit auch für die DLD1-Zellen bestätigt werden konnte (siehe Kapitel 5.2). Lediglich der *Ensembl Genome Browser* führt in der aktuellsten Veröffentlichung (*Ensembl Release 98*, Stand September 2019) ein weiteres putatives Transkript mit einem alternativen TSS (NOS2-203: ENST00000646938.1), das zum Großteil dem früher unter der Bezeichnung X2 geführten Transkript der NCBI-Datenbank entspricht.

Dadurch, dass im Datensatz für das Genom, das den Analysen des CORTECON-Projektes zugrunde lag, nur das bekannte iNOS-Transkript annotiert ist (GeneID:4843 in hg19/GRCh37), wurden in der Auswertung durch Joyce van de Leemput und Nathan Boles et al. keine Daten zu den möglichen alternativen Exons erhoben. Lediglich für die Expression des ersten Exons der ehemals putativen Transkriptvariante X1 liegen Daten vor, da es mit dem vorletzten Exon des Transkripts ENST00000582441.1, einem Transkript mit hoher Homologie zu LYRM9, übereinstimmt (siehe Abbildung 1-6). Ein Vergleich der Expression der beiden ersten iNOS-Exons und des alternativen Exons X1-Exon 1 mit der Expression der Gesamt-iNOS ist in Abbildung 5-36 gezeigt.



**Abbildung 5-36: Vergleich der Expression der ersten Exons mit der Gesamt-iNOS-Expression über den Differenzierungszeitraum.**

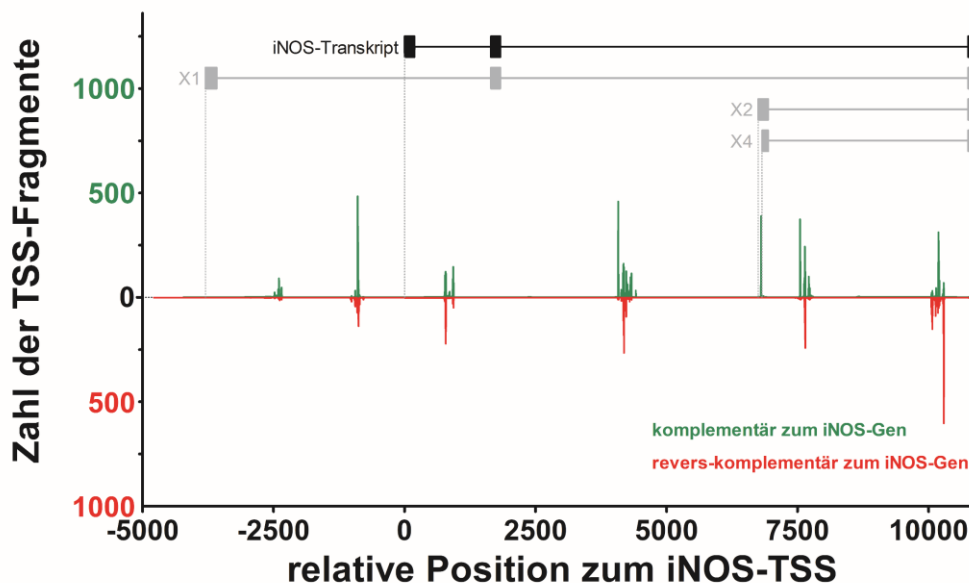
Die normierten Expressionen der ersten zwei iNOS-Exons aus der CORTECON-Studie (van de Leemput 2014) wurden durch die Sequenzlänge geteilt und der Mittelwert zusammen mit dem SEM abhängig vom Tag der Probenahme aufgetragen. Als Vergleich wurde zusätzlich der Wert für die Gesamt-iNOS geteilt durch die Transkript-Länge aufgetragen. Auch die Daten zum ersten Exon der putativen Transkriptvariante X1 sind gezeigt. Die Signifikanz wurde mit Hilfe eines two-way ANOVA berechnet und auf den Gesamt-iNOS-Wert bezogen. (\*\*\*:  $p < 0,001$ ).

Das reguläre Exon 2 und das X1-Exon 1 zeigen niedrige Expressionssignale, während das reguläre Exon 1 kein Signal zeigt. Das kann durch die Überschneidung des Transkripts ENST00000582441 mit dem putativen iNOS-Transkript X1 erklärt werden, da beide Exons (X1-Exon 1 und das reguläre Exon 2) Teil des Transkripts ENST00000582441 und des putativen iNOS-Transkripts X1 sind. Das Exon 1 des iNOS-Transkripts, für das kein Signal gemessen wurde, ist allerdings nicht Exon des Transkripts ENST00000582441. Damit scheinen die Exons 1 und 2 nicht Teil des neuronalen iNOS-Transkripts zu sein, welches während der Differenzierung der Stammzellen exprimiert wird, womit nach diesen Daten sowohl das bekannte iNOS-Transkript als auch das putative Transkript X1 ausgeschlossen werden könnten.

Auch die FANTOM5-Daten konnten für weitere Analysen bezüglich des iNOS-Transkripts genutzt werden, da sie mittels *cap analysis gene expression* (CAGE) erzeugt wurden (Kawaji 2017). Dabei handelt es sich um eine Methode, den TSS über die cap-Struktur zu ermitteln. Zuerst wurde die RNA in einzelsträngige cDNA umgeschrieben und mit einem biotinylierten *Linker* ligiert, der spezifisch an die 5'-cap-Struktur bindet und zum Beispiel eine *MmeI*-

Erkennungssequenz besitzt. Danach wurde der zweite Strang der cDNA synthetisiert. Durch einen Restriktionsverdau (zum Beispiel mit *MmeI*) wurden die cDNAs auf eine Länge von 18-20 bp verkürzt. Diese DNA-Fragmente, die dem 5'-Ende der mRNA entsprechen, wurden anschließend weiter aufgereinigt, amplifiziert und sequenziert (Shiraki 2003, de Hoon 2008).

Werden nun die SRA-Daten, die bei der Sequenzierung erhalten wurden, mit einer bestimmten Sequenz des Genoms verglichen, können darüber potenzielle TSS ermittelt werden. Dies ist zum Beispiel mit dem von NCBI zur Verfügung gestellten BlastN möglich (Altschul 1997). Für eine Analyse der exprimierten Transkript-Fragmente in den verschiedenen Patientenproben in Bezug auf die iNOS-Sequenz wurden die Daten mit der Gensequenz verglichen, die den regulären TSS der iNOS umgibt. Die Zahl der exprimierten Fragmente für das Replikat 1 der Wildtyp-Proben an Tag 6 der Differenzierung (Library-ID: CNhs14046, *iPS differentiation to neuron, control donor C11-CRL2429*) im Vergleich zu ihrer Position sind in Abbildung 5-37 dargestellt.



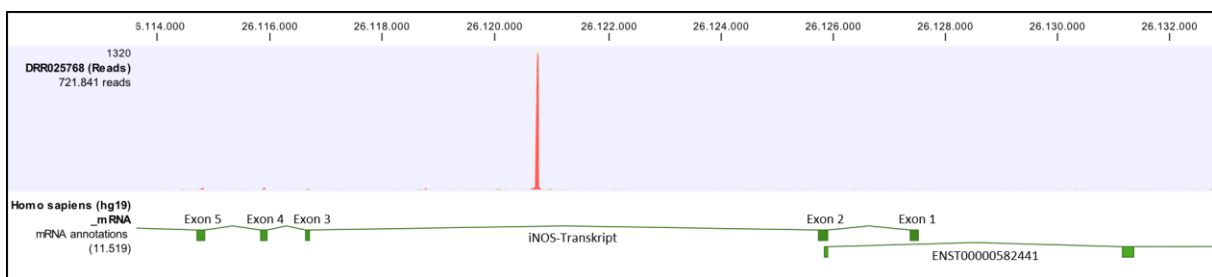
**Abbildung 5-37: Zahl der TSS-Fragmente nach CAGE-Analyse des Replikats 1 an Tag 6 der DS-Studie.**

Aus den CAGE-Daten der FANTOM5-Studien zur DS wurden die absoluten Signale bezogen auf die relative Position der TSS in Bezug zum regulären iNOS-TSS dargestellt. Die Zahl der Fragmente für das Replikat 1 der Wildtyp-Proben an Tag 6 der Differenzierung (Library-ID: CNhs14046, *iPS differentiation to neuron, control donor C11-CRL2429*) wurde über BlastN (Altschul 1997) gegen die den regulären iNOS-TSS umgebende Sequenz aligniert. Dabei wurden die Fragmente, die komplementär zum iNOS-Gen sind im grünen und die revers-komplementären Fragmente im roten Teil des Diagramms gezeigt. Zur besseren Orientierung ist die Position der ersten Exons des iNOS-Transkripts dargestellt. Auch die putativen ersten Exons der berechneten möglichen Transkriptvarianten (X1, X2 und X4) sind als graue Balken und die jeweils annotierten TSS mit senkrechten Linien gekennzeichnet.

Es wurden komplementäre (grün) und revers-komplementäre (rot) Fragmente getrennt voneinander betrachtet. Zur besseren Orientierung sind die ersten Exons des iNOS-Transkripts (schwarz) und die der drei ehemals putativen Transkriptvarianten der iNOS (grau) eingezeichnet.

Deutlich erkennbar ist die Messung mehrerer möglicher TSS-Fragmente weit im zweiten Intron des eigentlichen iNOS-Transkripts. Einer dieser TSS befindet sich im ersten Exon der putativen Transkriptvariante X2. Es befinden sich dagegen keine TSS-Fragmente innerhalb der anderen möglichen ersten Exons. Hinzu kommt, dass für diesen möglichen TSS in X2-Exon 1 nur *Alignments* mit komplementären Fragmenten gemessen wurden und keine revers-komplementären Fragmente wie bei den anderen Signalen. Diese Beobachtung trifft auch auf alle anderen Wildtyp-Proben der Messungen von Christine Wells zu (siehe Anhang 8.2 Abbildung 8-7) und spricht dafür, dass es sich hierbei um den TSS des neuronalen iNOS-Transkripts handelt.

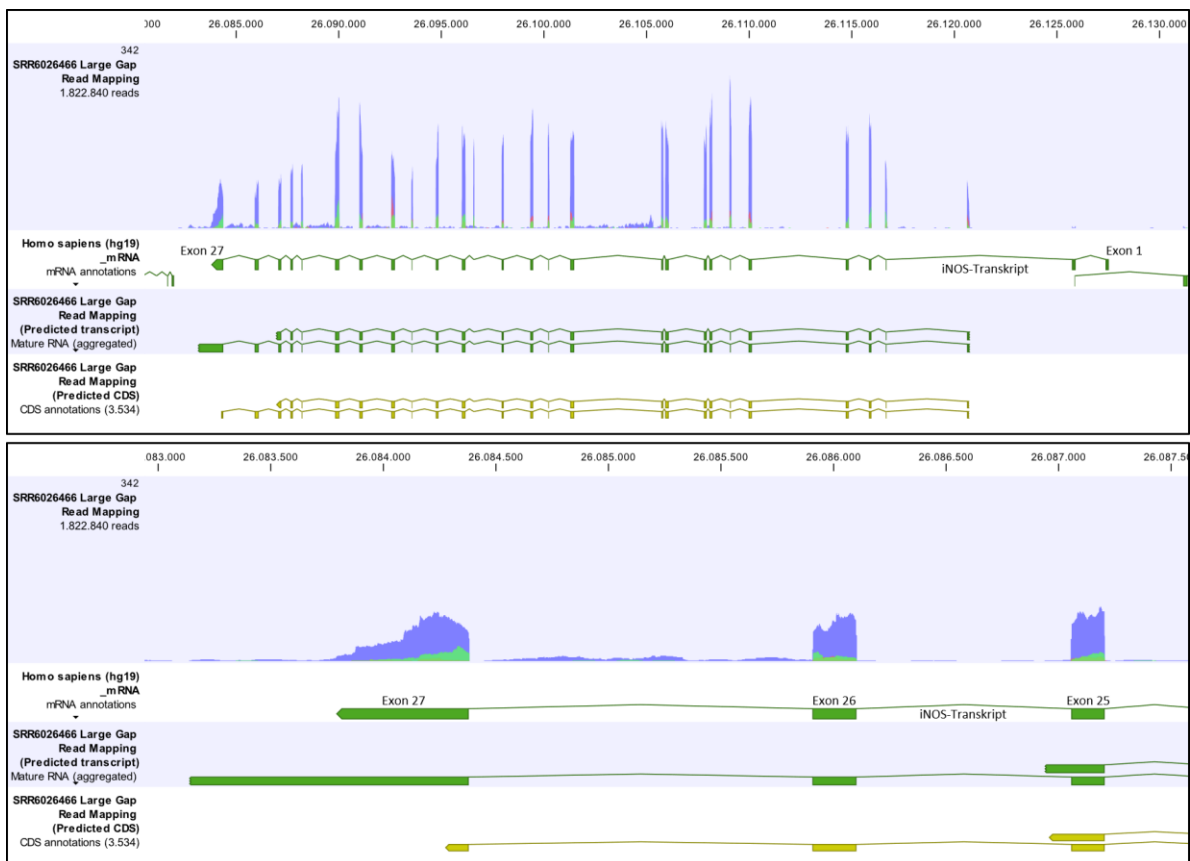
Bei einer Analyse der Daten mit dem Programm *CLC Genomic workbench* und einem *Alignment* gegen das gesamte Referenzgenom hg19, fallen die zusätzlichen Signale weg und es bleibt nur ein möglicher TSS übrig, der sich in Intron 2 des regulären iNOS-Transkripts befindet (siehe. Alle anderen Sequenzen sind Stellen im Genom zugeordnet worden, die eine höhere Homologie aufweisen. Der mögliche TSS nach dieser Berechnung befindet sich an gleicher Stelle wie auch der TSS, der sich aus den BlastN-Analysen ergibt (siehe Abbildung 5-37).



**Abbildung 5-38: TSS im ersten Teil des iNOS-Gens nach CAGE-Analyse des Replikats 1 an Tag 6 der DS-Studie.**

Aus den CAGE-Daten der FANTOM5-Studien zur DS wurden die absoluten Signale im Bereich der ersten Exons des iNOS-Transkripts dargestellt. Die Zahl der Fragmente für das Replikats 1 der Wildtyp-Proben an Tag 6 der Differenzierung (Library-ID: CNhs14046, *iPS differentiation to neuron, control donor C11-CRL2429*) wurde über das Programm *CLC Genomic workbench* ermittelt. Der obere Teil der Abbildung zeigt das read Mapping dieser Fragmente. Zur besseren Orientierung ist die Position der ersten Exons des iNOS-Transkripts dargestellt. Da sich das iNOS-Gen auf dem reversen DNA-Strang des Referenz-Genoms (hg19) befindet, sind die Transkripte in umgekehrter Reihenfolge dargestellt. Die Skala zeigt die Position auf Chromosom 17 des Referenzgenoms hg19.

Auch die Daten zur Differenzierung von hESCs zu Neuronen, die von Yuanyuan Li und Ran Wang et al. gesammelt wurden (Li 2017) und im *NCBI Gene Expression Omnibus* (Edgar 2002) unter der Nummer GSE103715 zu finden sind, lassen sich auf das Transkript der iNOS hin untersuchen. Dazu wurden die publizierten SRA-Daten des 14. Tag der Differenzierung (SRR6026466) mit dem Programms *CLC Genomic workbench* ausgewertet und mit Hilfe des *Transcript Discovery Plugin* von Qiagen prozessiert. Als Referenzgenom diente hg19. Aufgrund der geringen *reads* wurde die *Minimum spliced coverage ratio* von 0,05 auf 0,01 gesetzt. Abbildung 5-39 zeigt eine Zusammenfassung der möglichen ermittelten Transkripte im Bereich der ebenfalls gezeigten RNAseq-Sequenzen (*reads*). Da sich das iNOS-Gen auf dem *reverse*-Strang des Referenz-Genoms (hg19) befindet, sind die Transkripte in umgekehrter Reihenfolge dargestellt.

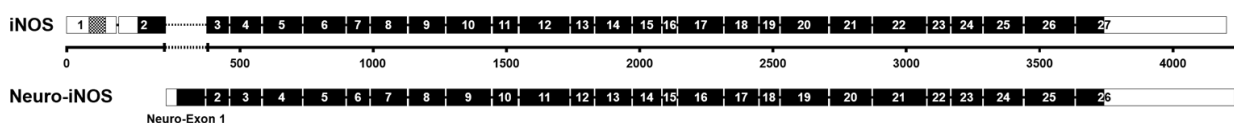


**Abbildung 5-39: Auswertung der in der neuronalen Differenzierung von hESC transient gebildeten Neuro-iNOS-Transkripte und das Read Mapping der RNAseq-Daten.**

Dargestellt ist die Struktur des neuronalen iNOS-Transkripts nach der Berechnung mit dem Programm *CLC Genomic workbench* und dem *Transcript Discovery Plugin* von Qiagen aus den Daten, die von Yuanyuan Li und Ran Wang et al. zur Verfügung gestellt wurden. Im oberen Bereich ist das Read Mapping für den gesamten Sequenzbereich um das annotierte iNOS-Transkript gezeigt. Außerdem sind das annotierte iNOS-Transkript aus hg19, die berechneten Transkripte (predicted transcript) und die berechneten putativen cds (predicted cds) dargestellt. Der untere Teil der Abbildung zeigt eine Nahaufnahme der letzten Exons. Die Skala zeigt die Position auf Chromosom 17 des Referenzgenoms hg19 an.

Bei näherer Betrachtung des *Read-Mappings*, d. h. der Häufung der verschiedenen *reads* für einen Sequenzabschnitt, fällt auf, dass die ersten Exons des iNOS-Transkripts wie auch schon in der CORTECON-Studie nicht durch *reads* abgedeckt sind. Stattdessen wurden Sequenzen gemessen, die zu einem Sequenzbereich im zweiten Intron des iNOS-Transkripts passen, wie es auch schon die FANTOM5-Daten vermuten ließen. Die Berechnung durch das *Transcript Discovery Plugin* von Qiagen ergibt zwei mögliche Transkripte, wobei das letzte Exon der kürzeren Transkriptvariante nicht vollständig durch RNAseq-Sequenzen abgedeckt ist. Die zweite Transkriptvariante hat eine objektiv höhere Abdeckung durch die verschiedenen *reads*. Allerdings ist die Abdeckung des letzten Exons nicht bis zum Ende konstant hoch (siehe Abbildung 5-39 unten). Die Abdeckung durch RNAseq-Fragmente in diesem Exon entspricht einem Muster, wie es vom letzten Exon des annotierten iNOS-Transkripts zu erwarten wäre. Aufgrund der höheren Abdeckung durch RNAseq-Daten, wurde für weitere Analysen mit der längeren der berechneten putativen Transkriptvarianten gearbeitet. Die Sequenz dieses Transkripts befindet sich im Anhang (siehe Abbildung 8-16)

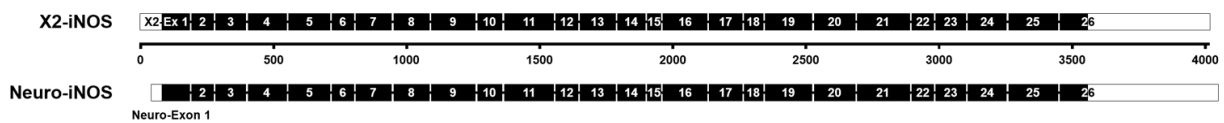
Das *Alignment* dieses möglichen neuronalen iNOS-Transkripts mit dem bekannten iNOS-Transkript zeigt, dass die Sequenz, welche die Exons 3 bis 27 des bekannten iNOS-Transkripts umfasst, in beiden iNOS-Transkripten auftaucht. Das neuronale iNOS-Transkript ist in 3'-Richtung deutlich länger als das bekannte iNOS-Transkript, während die Exons 1 und 2 des regulären iNOS-Transkripts beim neuronale iNOS-Transkript fehlen.



**Abbildung 5-40: Struktur der in der neuronalen Differenzierung von humanen ESC transient gebildeten Neuro-iNOS-mRNA im Vergleich zum regulären iNOS-Transkript.**

Dargestellt ist die Struktur des neuronalen iNOS-Transkripts (*Neuro-iNOS*) im Vergleich zum regulären iNOS-Transkript. Die Länge und Position der Exons wurden, sofern die Sequenzen homolog waren, vom regulären iNOS-Transkript auf das berechnete neuronale iNOS-Transkript übertragen. Durch das Fehlen der ersten beiden Exons und die Anwesenheit des alternativen neuronalen Exon 1 (*Neuro-Exon1*) besitzt das neuronale Transkript eine andere 5'-UTR mit unterschiedlichem Beginn der iNOS-cds allerdings mit demselben Leseraster, sodass es ab Exon 2 für die gleiche Proteinsequenz kodiert.

Ein *Alignment* mit der putativen Transkriptvariante X2 bzw. dem im *Ensembl Genome Browser* annotiertem NOS2-203 (ENST00000646938.1) weist eine weitaus höhere Übereinstimmung auf. In diesem Fall stimmen die Sequenzen bis auf zwei Ausnahmen überein. Das 5'-Ende ist 49 nt kürzer als in den beiden annotierten Sequenzen des NCBI und des *Ensembl Genome Browsers* und das 3'-Ende ist (genauso wie beim Vergleich mit dem regulären iNOS-Transkript) gegenüber der putativen Transkriptvariante X2 bzw. dem im *Ensembl Genome Browser* annotiertem NOS2-203 deutlich verlängert. Damit entspricht das berechnete Transkript am ehesten dieser Transkriptvariante.

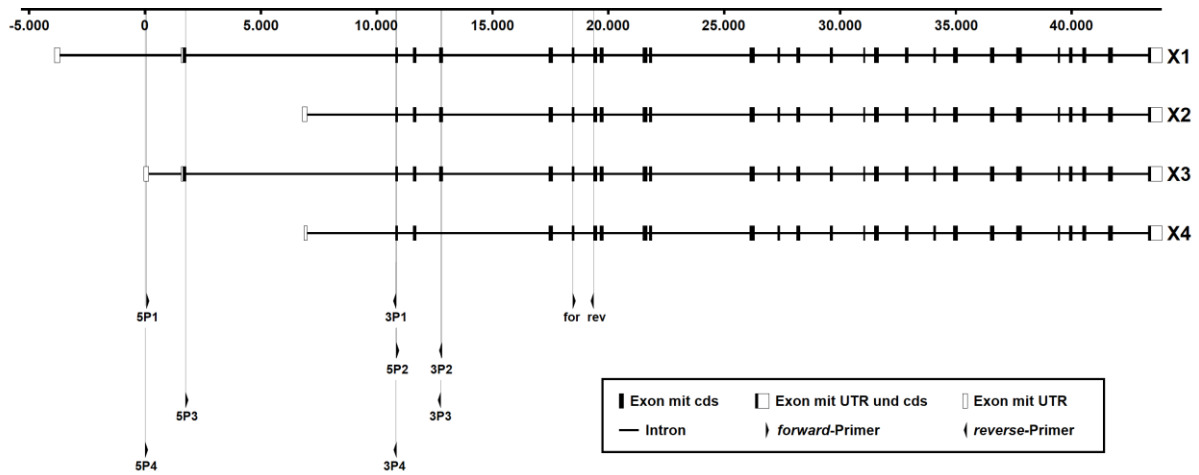


**Abbildung 5-41: Struktur der in der neuronalen Differenzierung von humanen ESC transient gebildeten Neuro-iNOS-mRNA im Vergleich zur putativen iNOS-Transkriptvariante X2.**

Dargestellt ist die Struktur des neuronalen iNOS-Transkripts im Vergleich zur Transkriptvariante X2. Die Länge und Position der Exons wurde von der regulären iNOS auf die neuro-iNOS übertragen. Durch das verkürzte Neuro-Exon 1 im Vergleich zum X2-Exon 1 (**X2-Ex 1**) besitzt das Transkript zwar eine kürzere 5'-UTR aber dieselbe cds (schwarz markiert).

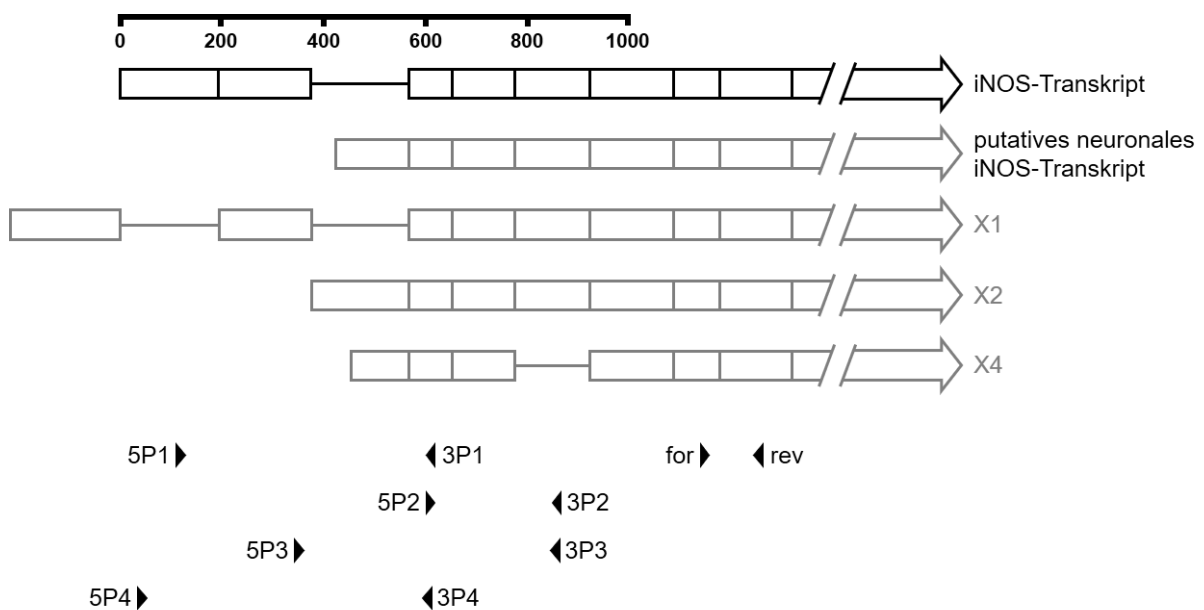
Um auch in den zur Verfügung gestellten Proben der Arbeitsgruppe von Michael Peitz zu überprüfen, ob es sich bei der in der neuronalen Entwicklung exprimierten iNOS-mRNA um eines der beschriebenen putativen Transkripte handeln könnte, wurden sowohl PCRs mit spezifischen Primern als auch 5'-RACE-Analysen durchgeführt. Abbildung 5-42 zeigt die verschiedenen Primerpaare zur Analyse der Expression verschiedener Exons in der Gensequenz des iNOS-Transkripts (Veröffentlichung der Transkripte: NCBI Homo sapiens *annotation release 108*, 07.06.2016). Abbildung 5-43 zeigt die Primer-Positionen im Bereich der ersten Exons der jeweiligen putativen Transkriptvarianten.





**Abbildung 5-42: Lage der spezifischen PCR-Primer im Gen.**

Dargestellt sind das iNOS-Transkript und die weiteren putativen Transkriptvarianten (X1, X2 und X4) der Veröffentlichung 108 des NCBI Genome Browsers vom 07.06.2016 in der Umgebung des iNOS-Gens. Die Primer sind durch Pfeile dargestellt und mit den jeweiligen Abkürzungen beschriftet (siehe Tabelle 5-4).



**Abbildung 5-43: Transkriptvarianten mit der Lage der spezifischen PCR-Primer.**

Dargestellt sind die ersten Exons des iNOS-Transkripts, des berechneten putativen neuronalen iNOS-Transkripts und der weiteren putativen Transkriptionsvarianten (X1, X2 und X4) der Veröffentlichung 108 des NCBI Genome Browsers vom 07.06.2016 und die Lage der verwendeten Primer. Sie sind durch Pfeile dargestellt und mit den jeweiligen Abkürzungen beschriftet (siehe Tabelle 5-4).

In der nachfolgenden Tabelle 5-4 ist die Benennung der Primer mit den Positionen der Bindung in den jeweiligen Exons der putativen iNOS-Transkriptvarianten sowie die Länge der aus einer PCR entstehenden Fragmente (mit und ohne Intron) aufgelistet. Die Sequenzen sind in Tabelle 3-14 zu finden.

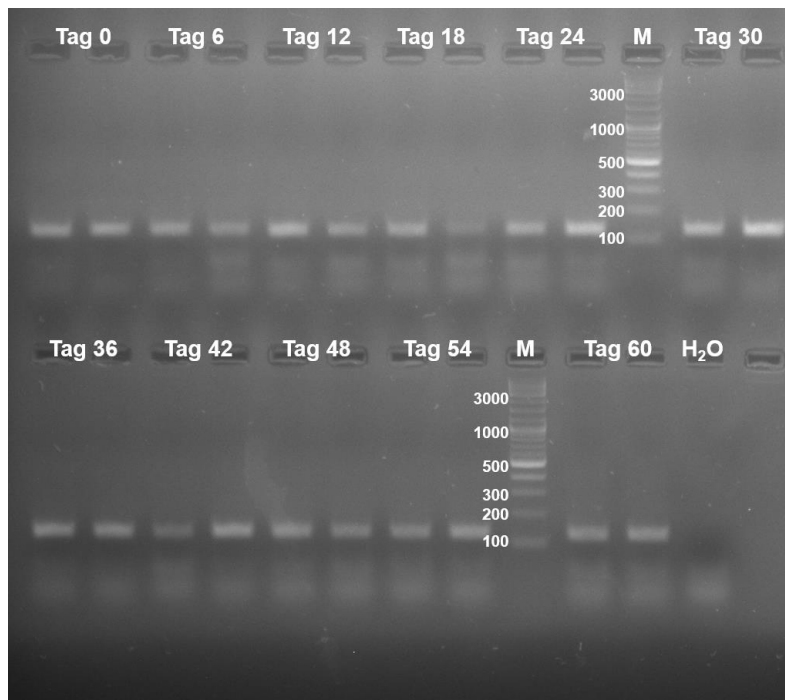
**Tabelle 5-4: Lage der Primer in den Exons der verschiedenen putativen iNOS-Transkriptvarianten und Länge der jeweiligen PCR-Fragmente.**

Nr.	Name	Abk.	Position im iNOS-Transkript	Position in X1	Position in X2	Position in X4	Länge (mit Introns)
alt	huiNOS_for	for	Exon 7	Exon 7	Exon 6	Exon 5	130 (967)
	huiNOS_rev	rev	Exon 8	Exon 8	Exon 7	Exon 6	
	huiNOS_probe		Exon 8	Exon 8	Exon 7	Exon 6	
1	huiNOS_5P1_FG_qRT	5P1	Exon 1	-	-	-	321 (10788)
	huiNOS_3P1_FG_qRT	3P1	Exon 3	Exon 3	Exon 2	Exon 2	
2	huiNOS_5P2_FG_qRT	5P2	Exon 3	Exon 3	Exon 2	Exon 2	277 (1931)
	huiNOS_3P2_FG_qRT	3P2	Exon 5	Exon 5	Exon 5	-	
3	huiNOS_5P3_FG_qRT	5P3	Exon 2	Exon 2	-	-	333 (10998)
	huiNOS_3P3_FG_qRT	3P3	Exon 5	Exon 5	Exon 5	-	
4	huiNOS_5P4_FG_qRT	5P4	Exon 1	-	-	-	390 (10857)
	huiNOS_3P4_FG_qRT	3P4	Exon 3	Exon 3	Exon 2	Exon 2	

\* bzw. des putativen Transkripts NOS2-203 (ENST00000646938.1) oder des berechneten neuronalen iNOS-Transkripts

Zur Analyse des während der Differenzierung der hiPSCs transient exprimierten iNOS-Transkripts wurde die zuvor synthetisierte cDNA der Differenzierungsproben (siehe Kapitel 5.6.2) als Matrize für PCRs mit den genannten Primern eingesetzt. Um die spezifische Bindung der neuen Primer an die reguläre iNOS-mRNA zu überprüfen, wurden die PCRs zusätzlich mit cDNA aus DLD1-Zellen durchgeführt. In den folgenden Abbildungen ist die Auftrennung der PCR-Amplifikate in Agarosegelen dargestellt.

Zunächst wurde mit den ursprünglich verwendeten Primern (huiNOS\_for und huiNOS\_rev) gearbeitet und die Proben der qRT-PCRs (siehe Kapitel 5.6.2) mittels Agarose-Gelelektrophorese analysiert. Abbildung 5-44 zeigt die Position der Fragmente im Agarosegel nach der Auftrennung.

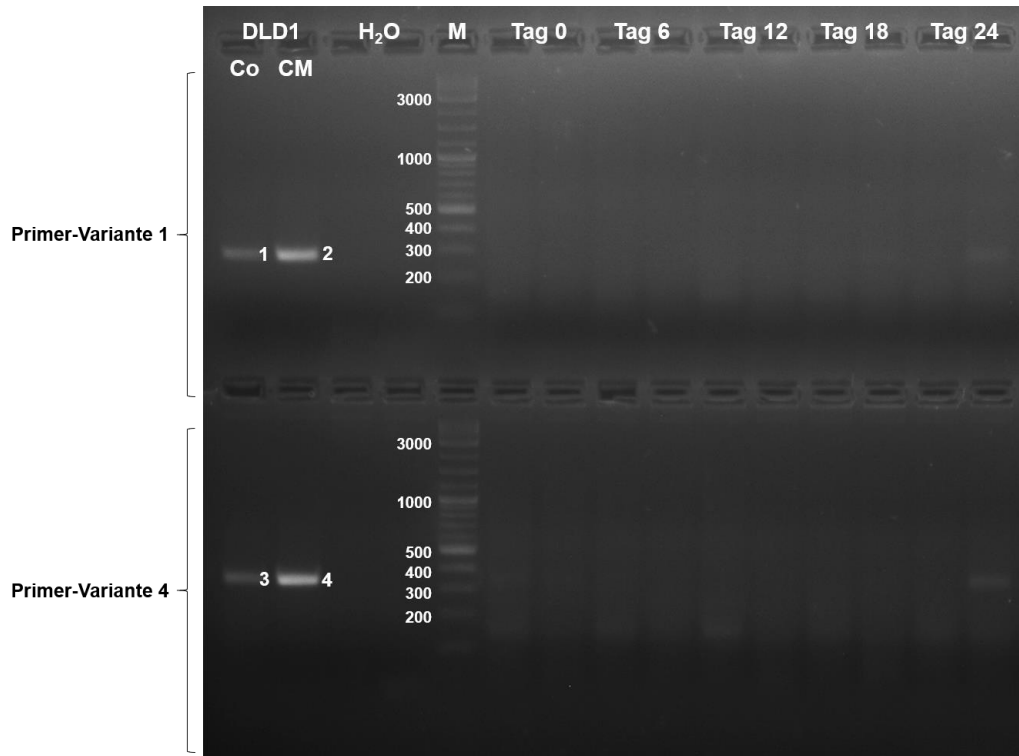


**Abbildung 5-44: Agarosegel der qRT-PCR der Differenzierungsproben mit den ursprünglich verwendeten iNOS-Primern.**

Dargestellt ist das Bild eines 2%igen Agarosegels mit den aufgetrennten Proben nach der qRT-PCR der cDNA-Proben mit den Primern *huiNOS\_for* und *huiNOS\_rev* (alte iNOS-Primer). Als Negativkontrolle diente eine Wasserprobe. Der verwendete Marker ist der 2-Log DNA Ladder von New England Biolabs und die Markerbanden sind mit der jeweiligen Größe in bp beschriftet.

In allen Proben ist eine Bande bei ca. 130 bp zu sehen. In der Wasserkontrolle ist keine Bande zu erkennen. Damit wird in den Zellen der neuronalen Differenzierung ein Fragment exprimiert, das dem Fragment der iNOS entspricht, welches durch die Verwendung der ursprünglichen Primer amplifiziert wird.

Abbildung 5-45 zeigt die PCR-Fragmente von cDNA-Proben der ersten 24 Tage der Differenzierung mit den Primerpaaren 1 (*huiNOS\_5P1\_FG\_qRT* und *huiNOS\_3P1\_FG\_qRT*) und 4 (*huiNOS\_5P4\_FG\_qRT* *huiNOS\_3P4\_FG\_qRT*). Als Positivkontrolle wurde die cDNA unstimulierter (Co) und stimulierter (CM) DLD1-Zellen verwendet.

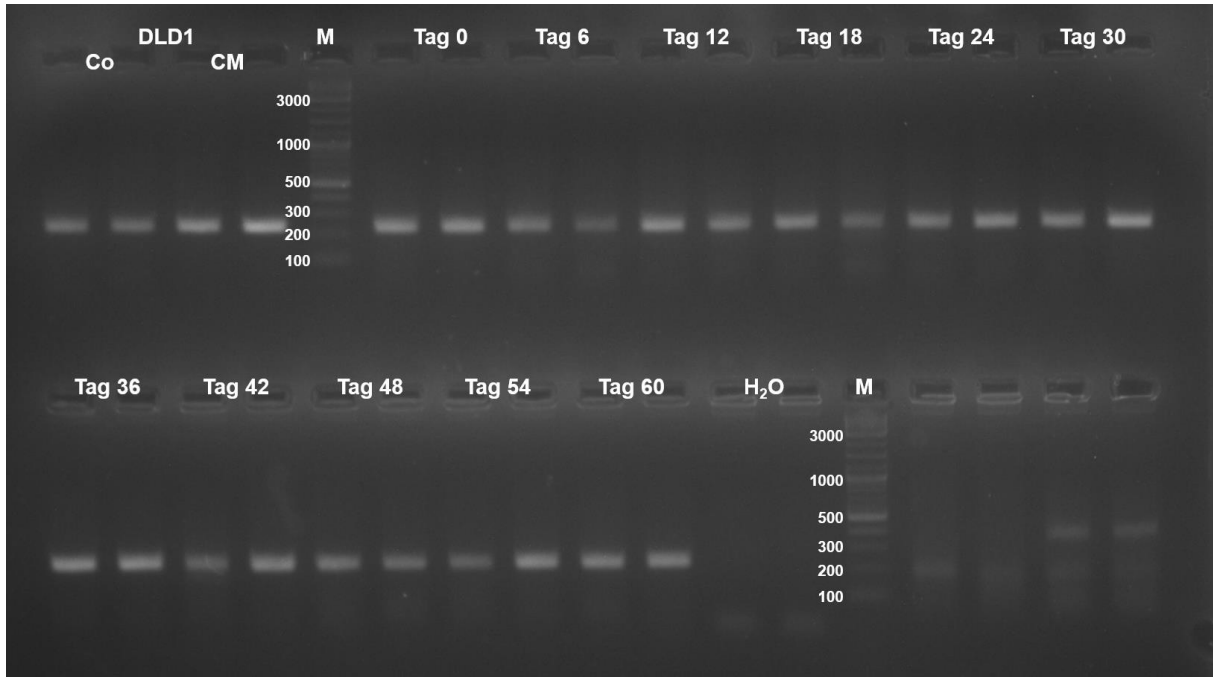


**Abbildung 5-45: Agarosegel der PCRs mit den Primer-Varianten 1 und 4.**

Dargestellt ist das Bild eines Agarosegels nach der Auftrennung der PCR-Fragmente der neuronalen cDNA-Proben mit den Primern *huiNOS\_5P1\_FG\_qRT* und *huiNOS\_3P1\_FG\_qRT* (Primer-Variante 1) bzw. *huiNOS\_5P4\_FG\_qRT* und *huiNOS\_3P4\_FG\_qRT* (Primer-Variante 4). Zum Vergleich wurden unstimulierte (Co) und stimulierte (CM) DLD1-Proben aufgetragen. Als Negativkontrolle diente eine Wasserprobe. Der verwendete Marker ist der 2-Log DNA Ladder von New England Biolabs und die Markerbanden sind mit der jeweiligen Größe in bp beschriftet.

Hierbei entstand in den Positivkontrollen der DLD1-Zellen jeweils ein Fragment von ca. 300 bp (Primer-Variante 1) bzw. 400 bp (Primer-Variante 2). Damit wurde das jeweils erwartete Fragment erzeugt. Erwartungsgemäß fällt die Bande der unstimulierten Zellen deutlich schwächer aus als die der stimulierten DLD1. Wie zu erkennen ist, wird aus der cDNA der Differenzierungsproben weder bei der Verwendung der Primer-Variante 1 noch der Primer-Variante 4 ein PCR-Fragment erzeugt. Somit kann es sich bei der während der Differenzierung exprimierten iNOS-mRNA nicht um das reguläre iNOS-Transkript handeln. In den neuronalen iNOS-Transkripten fehlen folglich die für die Primerbindung entscheidenden Sequenzen des Exons 1 oder 3 oder beider Exons.

Bei der PCR mit der Primer-Variante 2 (*huiNOS\_5P2\_FG\_qRT* und *huiNOS\_3P2\_FG\_qRT*) und anschließender Auftragung auf eine Agarosegel entstand das in Abbildung 5-46 gezeigte Bild. Wieder wurden DLD1-Proben als Positivkontrolle verwendet.

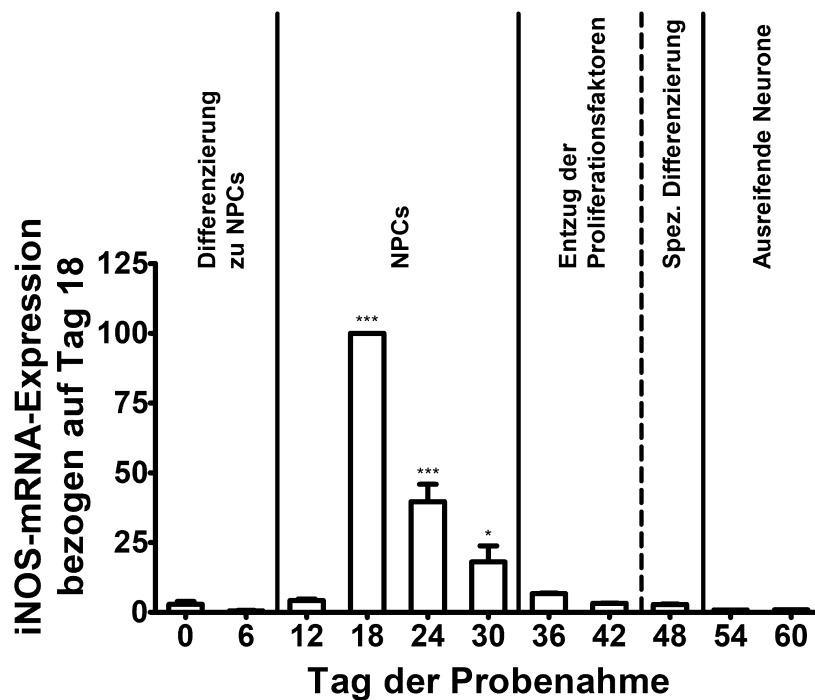


**Abbildung 5-46: Agarosegel der Primer-Variante 2.**

Dargestellt ist das Bild eines Agarosegels der PCR-Fragmente der neuronalen cDNA-Proben mit den Primern *huiNOS\_5P2\_FG\_qRT* und *huiNOS\_3P2\_FG\_qRT*. Zum Vergleich wurden unstimulierte (Co) und stimulierte (CM) DLD1-Proben aufgetragen. Als Negativkontrolle diente eine Wasserprobe. Der verwendete Marker ist der 2-Log DNA Ladder von New England Biolabs und die Markerbanden sind mit der jeweiligen Größe in bp beschriftet.

Sowohl bei den Positivkontrollen als auch den Differenzierungsproben ist deutlich eine Bande knapp unter 300 bp zu sehen. Damit kann davon ausgegangen werden, dass es sich bei diesem Fragment um das zu erwartende iNOS-Fragment von 277 bp handelt. Beide Primer-Sequenzen müssen somit in der Sequenz der neuronalen iNOS enthalten sein. Dies spricht dafür, dass auch die Sequenzlänge dieser Fragmente mit der des iNOS-Transkripts übereinstimmt und damit die Exons 3 bis 5 im neuronalen Transkript vertreten sind.

Mit der Primer-Variante 2 wurde zusätzlich eine qRT-PCR durchgeführt. Das Ergebnis ist in Abbildung 5-47 gezeigt.



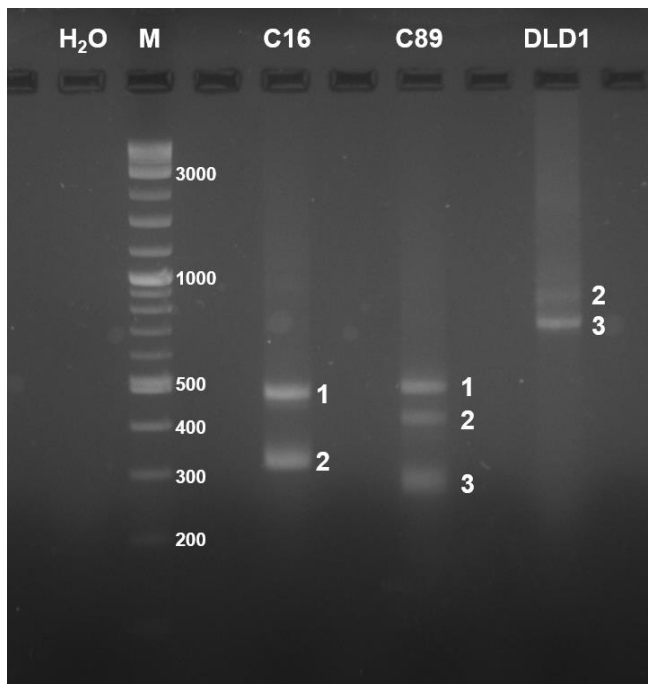
**Abbildung 5-47: iNOS-mRNA-Expression in differenzierenden hiPSCs mit der Primer-Variante 2.**

Die von der Arbeitsgruppe von Michael Peitz erhaltenen RNA-Proben wurden zur cDNA-Synthese mit dem High Capacity Kit zunächst am NanoDrop vermessen und anschließend verdünnt. qRT-Analysen wurden mit den Primern *huiNOS\_5P2\_FG\_qRT* und *huiNOS\_3P2\_FG\_qRT* für die iNOS-Expression und *18S\_for* und *18S\_rev* als Referenzexpression durchgeführt. Dabei wurden jeweils Duplikate der einzelnen Zellproben gemessen. Die qRT-Analysen für die iNOS-Expression wurden auf zwei verschiedene Verdünnungen (1:10 und 1:100) der 18S-Messungen bezogen. Die Auswertung erfolgte nach der  $2^{-\Delta\Delta C(T)}$ -Methode. Die erhaltenen Werte wurden auf die iNOS-mRNA-Expression an Tag 18 bezogen. Dargestellt ist jeweils der Mittelwert mit SEM. Zur Bestimmung der Signifikanz wurde ein one-way ANOVA mit anschließendem Tukey-Test durchgeführt ( $n=40$ ; Signifikanz: \*:  $p<0,05$ ; \*\*:  $p<0,01$ ; \*\*\*:  $p<0,01$ ).

Das Ergebnis entspricht dem Verlauf, der auch schon bei Verwendung der ursprünglichen iNOS-Primer beobachtet wurde (siehe Abbildung 5-32 und Abbildung 5-33). Ein Maximum der iNOS-Expression ist an Tag 18 der Differenzierung zu beobachten. Danach sinkt die Expression wieder auf das Niveau der hiPSCs ab.

Um die Anfangssequenz der in der Differenzierung exprimierten iNOS-mRNA zu überprüfen, wurde außerdem ein 5'-RACE durchgeführt (Kapitel 4.4.6). Hierbei wurde die RNA zunächst mit dem Primer *huiNOS\_rev* in cDNA umgeschrieben, anschließend die RNA abgebaut, die cDNA an ihrem 3'-Ende polyadenyliert und eine PCR durchgeführt. Verwendet wurden der Oligo(dT)-Anker-Primer des *5'/3' RACE Kit (2nd Generation)* von Roche sowie der Primer *huiNOS\_3P2\_FG\_qRT*. Danach erfolgte eine zweite PCR mit dem Anker-Primer des Kits und

huiNOS\_3P3\_FG\_qRT. Die verschiedenen mittels PCR amplifizierten DNA-Fragmente wurden über ein Agarose-Gel aufgetrennt. Das Ergebnis ist in Abbildung 5-48 dargestellt.

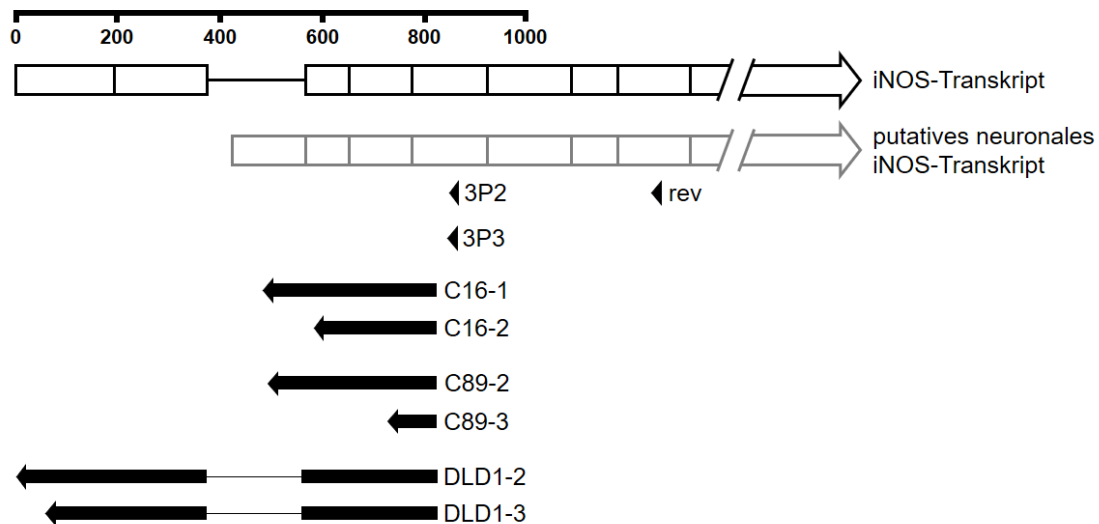


**Abbildung 5-48: Agarosegel der zweiten PCR zum 5'-RACE der neuronalen Proben und der DLD1-Probe zum Vergleich**

Dargestellt ist das Ergebnis des 5'-RACE nach der zweiten PCR. Als Negativkontrolle diente eine Wasserprobe ( $H_2O$ ). Der verwendete Marker (**M**) ist der 2-Log DNA Ladder von New England Biolabs und die Markerbanden sind mit der jeweiligen Größe in bp beschriftet. Die Spur **C16** enthält die PCR-Produkte der Proben der Zelllinie iLB-C16bm von Tag 18, die Spur **C89** Proben der iLB-C89bf-Zellen von Tag 24 und **DLD1** die Proben, die aus der cDNA stimulierter DLD1-Zellen generiert wurden.

Die Auftrennung der 5'-RACE-Produkte der RNA der C16-Proben (C16) von Tag 18 führt zu einer Bande (C16-1) bei ca. 500 bp und einer Bande (C16-2) bei etwa 320 bp. Die Probe aus der RNA der C89-Zellen von Tag 24 trennt sich in drei Banden auf: C89-1 bei ca. 500 bp, C89-2 bei ca. 450 bp und C89-3 bei ca. 280 bp. Die Vergleichsprobe von DLD1-Zell-RNA zeigt ebenfalls zwei Banden, DLD1-2 bei ca. 900 bp und DLD1-3 bei ca. 750 bp.

Die Fragmente wurden aus dem Gel ausgeschnitten, mit dem Monarch *PCR & DNA Cleanup Kit* von New England Biolabs® aufgereinigt und von Star-SEQ® sequenziert. Die vollständigen Sequenzierungsergebnisse befinden sich im Anhang (siehe Anhang 8.3). Eine Darstellung der Länge der Sequenzierungen orientiert an den Längen und Positionen der Exons des regulären iNOS-Transkripts und des putativen neuronalen iNOS-Transkripts ist in Abbildung 5-49 dargestellt. Die Sequenzierung der DNA in Bande C89-1 ergab keine Übereinstimmung mit der iNOS-mRNA. Sie kommt vermutlich durch eine Verunreinigung der Proben oder unspezifische Primerbindung zustande.



**Abbildung 5-49: Graphische Darstellung der verschiedenen Transkripte und der Länge der Sequenzierung der 5'-RACE-Produkte.**

Dargestellt sind die ersten Exons des iNOS-Transkripts und des berechneten putativen neuronalen iNOS-Transkripts mit den Ergebnissen der Sequenzierungen der 5'-RACE-Produkte der verschiedenen Zelllinien iLB-C16bm, iLB-C89bf und DLD1 in maßstabsgetreuer Weise. Sequenzbereiche, die nicht Teil eines Transkripts oder einer Sequenzierung sind, sind als dünne Linien dargestellt. Die Primer der cDNA-Synthese (huiNOS\_rev) sowie der Primer der ersten (huiNOS\_3P2\_FG\_qRT) und zweiten PCR (huiNOS\_3P3\_FG\_qRT) sind ebenfalls dargestellt.

Es ist zu erkennen, dass das jeweils größere Fragment (C16-1 und C89-2) in das erste Exon des berechneten putativen neuronalen iNOS-Transkripts ragt und dieses damit als Teil der mRNA identifiziert. Ein detaillierter Vergleich ist in der Tabelle 5-5 gezeigt. Das jeweils kleinere Fragment (C16-2 und C89-3) lässt keine eindeutige Zuordnung zu einem der Transkripte zu. Die Überschreitung der Exon-Exon-Grenzen lässt zudem eine falsch-positive Messung durch Verunreinigung mit genomischer DNA ausschließen. Durch die Positivkontrolle der DLD1-Zellen, deren Sequenzierung bis zum Exon 1 des regulären iNOS-Transkripts reicht, konnten auch die Ergebnisse aus Kapitel 5.2 bestätigt werden. Die Präsenz dieser Banden in der DLD1-Probe, aber nicht in den Differenzierungsproben, deutet wie schon zuvor darauf hin, dass es sich bei den in den Differenzierungsproben exprimierten iNOS-Transkripten nicht um die reguläre iNOS-mRNA handelt.

Auch hier traten, wie schon bei der Sequenzierung der 5'-RACE-Proben in Kapitel 5.2, vermeintliche Mutationen auf, die aber bei näherer Betrachtung der Sequenzierungsergebnisse (siehe Anhang 8.3.2) durch eine Überlagerung mehrerer Signale und damit einer nicht eindeutigen Sequenzierung relativiert werden können.



Tabelle 5-5: Sequenzierungssequenz im neuronalen Exon 1 nach dem 5'-RACE und den CAGE-Analysen.

```

CGTGGAGCCA GCGGAGCTGC GCCTAAGGAG CCGGGCCATG CGCGAGGGGC TGGGCGCGGC
GTGCGAGGCC GCCGGGCCCC GGCTGTGCAG GCTGCTCTGC AGGATCCTCC GGCCGAAGCC
TGACTGCTGC CCGCGCAGAG CCAG

```

**NNN** = Sequenzierung der 5'-RACE-Probe C16-1

**NNN** = Sequenzierung der 5'-RACE-Probe C89-2

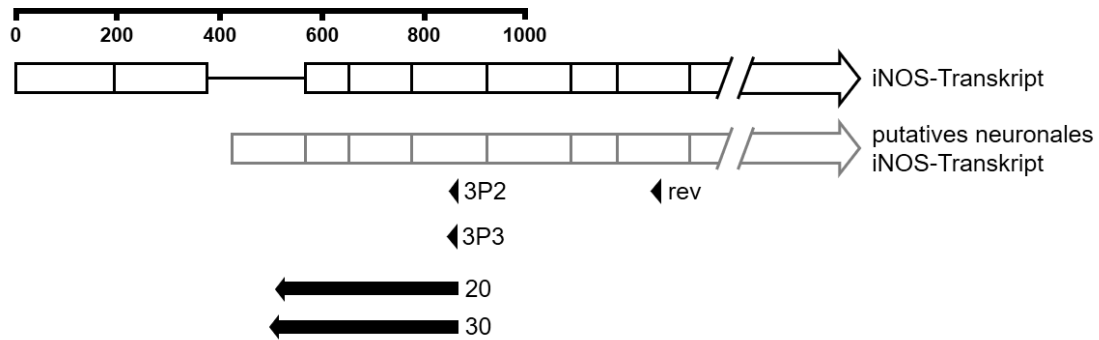
**ATG** = Startcodon der iNOS-cds der Transkriptvariante X2

**GAGCCAG** = Bereich des TSS nach der CAGE-Analyse der FANTOM5-Daten

Die von StarSEQ® identifizierten Sequenzen sind allerdings, wie Tabelle 5-5 zu entnehmen, nicht so lang, wie für das neuronale iNOS-Transkript nach den Berechnungen des TSS aus den FANTOM5-Daten oder dem berechnetem Transkript der Studie von Yuanyuan Li und Ran Wang et al. erwartet und reichen nicht bis zum ATG der potenziellen iNOS-cds. Aufgrund des hohen GC-Anteil von 76 % im neuronalen Exon 1, kann sowohl die reverse Transkription als auch die weiteren PCRs insoweit beeinflusst worden sein, sodass nur kürzere Fragmente amplifiziert werden konnten.

In einem weiteren Schritt wurden die Fragmente in einen mit *EcoRV* geschnittenen Vektor pCR-Skript kloniert. Hierzu wurden die Proben zunächst kinasiert und anschließend mit dem Vektor ligiert. Nach der Transformation in DH5α gewachsene Kolonien wurden mit einer PCR auf den Erfolg der Klonierung hin untersucht (siehe Kapitel 4.2.1.14) und jeweils mit pCR-Skript-spezifischen Primern (pCR-universal und pCR-reverse) noch einmal sequenziert. Ein schematisches Bild ist in Abbildung 5-50 dargestellt.

Die sequenzierten Abschnitte in den pCR-Skript-Klonen unterscheiden sich kaum von den StarSEQ®-Sequenzierungen der aus dem Agarosegel ausgeschnittenen PCR-Fragmente. Die Sequenzen reichen zwar bis in das neuronale Exon 1 hinein, brechen aber ebenfalls vor dem ATG der potenziellen iNOS ab.



**Abbildung 5-50: graphische Darstellung der Sequenzierungsergebnisse nach der Klonierung.**

Dargestellt sind die ersten Exons des iNOS-Transkripts und des berechneten putativen neuronalen iNOS-Transkripts mit den Ergebnissen der Sequenzierungen der 5'-RACE-Produkte der Zelllinien iLB-C16bm (Kolonie 30) und iLB-C89bf (Kolonie 20) und der Klonierungen dieser Fragmente in pCR-Skript in maßstabsgetreuer Weise. Sequenzbereiche, die nicht Teil eines Transkripts sind, sind als dünne Linien dargestellt. Der Primer der cDNA-Synthese (huiNOS\_rev) sowie der Primer der ersten (huiNOS\_3P2\_FG\_qRT) und zweiten PCR (huiNOS\_3P3\_FG\_qRT) sind ebenfalls dargestellt.

Somit konnte auch mit dem 5'-RACE gezeigt werden, dass es sich bei dem während der Differenzierung der hiPSCs der Arbeitsgruppe von Michael Peitz transient exprimierten iNOS-mRNA nicht um das reguläre iNOS-Transkript, sondern vermutlich um das putative neuronale iNOS-Transkript handelt, das sich auch aus den Analysen der RNAseq- und CAGE-Daten ergab. Dieses besitzt gegenüber dem regulären iNOS anstelle der ersten beiden Exons ein alternatives Exon 1.

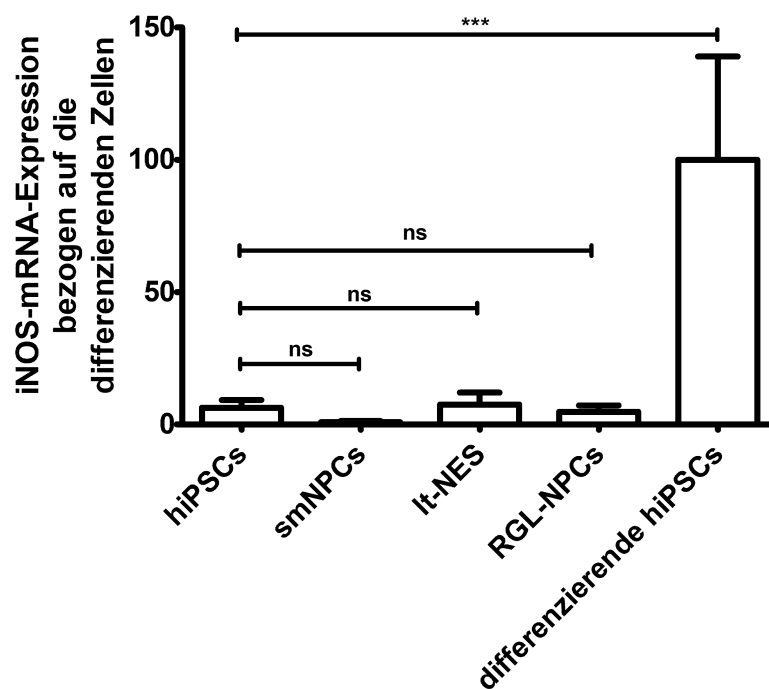
#### 5.6.4 iNOS-Expression in stabilen NPC-Linien

Stabile NPCs bieten die Möglichkeit bestimmte Stufen der Entwicklung von Neuronen nachzustellen und Mechanismen genauer zu untersuchen (siehe Kapitel 1.4). So gibt es Zellen, die nur mit Zugabe von *small molecules* generiert und in ihrem Entwicklungsstadium gehalten werden. Sie werden *small molecule* NPCs (sm-NPCs) genannt (Reinhardt 2013). Eine weitere NPC-Linie sind die It-NES, Neuroepithel-Stammzellen, die sich über einen langen Zeitraum selbst erneuern. Sie sind bezogen auf den Differenzierungsgrad näher an den ausgereiften Neuronen als die sm-NPCs (Koch 2009, Poppe 2018). Noch näher an ausdifferenzierten Zellen sind RGL-NPCs (Gorris 2015).

Um herauszufinden, ob sich diese NPC-Linien als potenzielle Kandidaten zur Analyse der iNOS in der neuronalen Differenzierung eignen, wurde eine qRT-PCR-Analyse der RNA-Proben dieser Zelllinien durchgeführt. Die Zellproben sowie Kontrollproben von hiPSCs wurden uns

von der AG Peitz zur Verfügung gestellt. Dabei wurden die sm-NPCs nach einem Protokoll von Chao Sheng et al. generiert (Sheng 2018), die lt-NES nach einem Protokoll von Beate Roese-Koerner und Laura Stappert et al. (Roese-Koerner 2016) und die RGL-NPCs nach einem Protokoll von Raphaela Gorris und Julia Fischer et al. (Gorris 2015).

Ein Teil der Zellproben wurde in GIT aufgenommen, die RNA isoliert und cDNA synthetisiert. Als Positivkontrolle wurden cDNA-Proben der Zelllinien iLB-C16bm und iLB-C89bf von Tag 18 verwendet. Das Ergebnis der qRT-PCR mit iNOS-Primern ist in Abbildung 5-51 dargestellt. Als Haushaltsgen diente 18S.

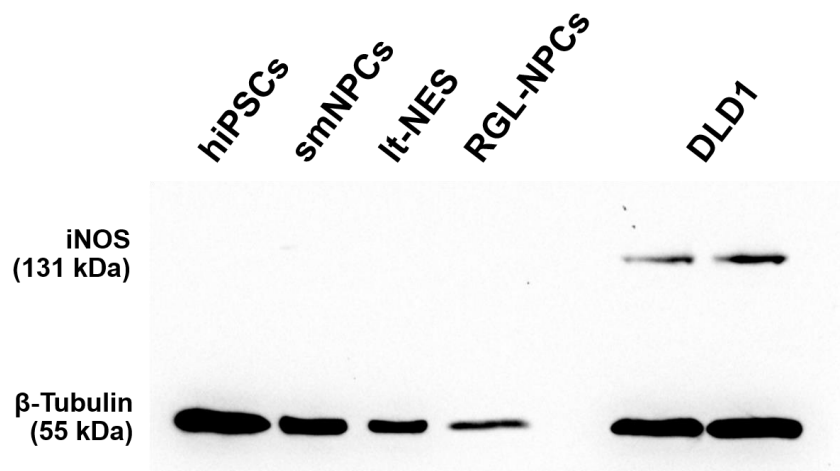


**Abbildung 5-51: iNOS-mRNA-Expression in verschiedenen stabilen NPCs.**

Dargestellt ist das Ergebnis der qRT-PCR-Analysen der stabilen NPC-Linien der AG Peitz im Vergleich zu den differenzierenden hiPSCs von Tag 18. Die RNA der Proben wurde in cDNA umgeschrieben und eine qRT-PCR durchgeführt. Verwendet wurden hierbei Primer zur Detektion von iNOS und 18S. Die Höhen der Balken entsprechen dem Mittelwert  $\pm$  SEM von jeweils zwei Proben pro Zeitpunkt. Die statistische Auswertung erfolgte durch einen one-way ANOVA (ns: nicht signifikant; \*\*\*:  $p < 0,001$ ).

Die Werte der iNOS-mRNA-Expression in den stabilen NPCs liegen deutlich unter der Expression in den differenzierenden hiPSCs-Proben der Zelllinien iLB-C16bm und iLB-C89bf von Tag 18 und unterscheiden sich nicht signifikant von der Expression in den undifferenzierten hiPSCs.

Um in den stabilen NPC-Linien zusätzlich die iNOS-Expression auf Proteinebene zu untersuchen, wurde der andere Teil der Zellen, die von der AG Peitz zur Verfügung gestellt wurden, in RIPA-Puffer lysiert. Nach Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford wurden gleiche Proteinmengen auf ein Polyacrylamid-Gel aufgetragen und eine SDS-PAGE mit anschließendem Western Blot durchgeführt. Die verwendeten Antikörper waren anti-iNOS und anti- $\beta$ -Tubulin. Als Sekundärantikörper dienten anti-mouse ( $\beta$ -Tubulin) bzw. anti-rabbit (iNOS). Das Bild wurde mit dem ChemiDoc™ XRS aufgenommen und ist in Abbildung 5-52 zu sehen.



**Abbildung 5-52: Western Blot der stabilen NPCs.**

Dargestellt ist das Ergebnis des Western Blots der stabilen NPC-Linien der AG Peitz im Vergleich zu stimulierten DLD1-Zellen. Die Zellen wurden in RIPA lysiert, die Konzentration mit Hilfe eines Bradfords bestimmt und jeweils 100  $\mu$ g Protein auf ein Polyacrylamid-Gel aufgetragen. Als Antikörper kamen anti-iNOS und anti- $\beta$ -Tubulin zum Einsatz. Als Sekundärantikörper dienten anti-mouse ( $\beta$ -Tubulin) bzw. anti-rabbit (iNOS). Das Bild wurde mit dem ChemiDoc™ XRS aufgenommen.

In den zwei stimulierten DLD1-Proben sind sowohl Banden für  $\beta$ -Tubulin bei 55 kD als auch iNOS bei 131 kD zu sehen. Die verschiedenen NPCs weisen wie auch die hiPSCs keine Banden bei 131 kDa auf. Hier konnte nur die Ladekontrolle  $\beta$ -Tubulin bei 55 kDa nachgewiesen werden. Damit ist in den stabilen NPC-Linien weder auf mRNA- noch auf Proteinebene eine nennenswerte iNOS-Expression messbar.

## 6 DISKUSSION

### 6.1 Einfluss der 5'-UTR auf die Expression der humanen iNOS

Die Induktion der iNOS in den falschen Zellen zum falschen Zeitpunkt kann durch die cytotoxische Wirkung des produzierten NO weitreichende Konsequenzen für den Organismus haben und scheint Ursache und Begleiterscheinung vieler Krankheiten zu sein (Qidwai 2010). Daher ist eine genaue Regulation der iNOS-Expression für den menschlichen Körper unabdingbar. In den letzten Jahren wurden diverse Mechanismen der Regulation der iNOS erforscht und publiziert (Pautz 2010). Ein wichtiger Teil der Regulation scheint dabei über die Kontrolle der mRNA-Stabilität und die Translatierbarkeit stattzufinden. So konnte die Arbeitsgruppe von Professor Kleinert verschiedene Proteine identifizieren, die die mRNA-Stabilität der iNOS regulieren. Hierzu gehören hauptsächlich RNA-BPs wie AUF1, HuR, KSRP, PABP, PTB, TIAR und TTP, die mit spezifischen Abschnitten der 5'- oder 3'-UTR der humanen iNOS-mRNA interagieren können (Linker 2005, Pautz 2010, Casper 2013).

Die Anwesenheit eines Introns und eines uORFs in der 5'-UTR einer mRNA wird als Indikator für niedrige translationale Effizienz des eigentlichen Peptids angesehen (Lim 2018). Der Vergleich der verschiedenen NOS-Isoformen zeigt, dass nicht nur die iNOS, sondern auch die nNOS und eNOS Transkript-Varianten mit uORFs generieren können (aktueller Stand April 2019: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/refseq/>). Diese variieren allerdings stark in ihrer Länge und Sequenz (siehe Tabelle 5-3).

Der erste Teil dieser Arbeit beschäftigte sich daher mit der spezifischen Regulation der iNOS-Expression unter dem Einfluss der 5'-UTR und des uORFs.

#### 6.1.1 iNOS-5'-UTR enthält einen translatierbaren uORF

Der Vergleich der iNOS unter verschiedenen Säugetieren, insbesondere der Primaten, zeigt eine hohe Sequenzhomologie. Trotzdem enthalten nur wenige der analysierten iNOS-Transkripte uORFs. Bei näherer Betrachtung der 5'-UTR fällt zudem die Einzigartigkeit des humanen uORFs auf. Es scheint in der späten Entwicklung des Menschen durch eine Punktmutation aus dem sehr konservierten GTG ein ATG und damit der Start des uORFs entstanden zu sein. Die

diese Punktmutation umgebende Sequenz ist stark homolog in allen untersuchten Säugetierarten erhalten (siehe Abbildung 5-1 und Tabelle 5-1). Auch der Vergleich mit der 5'-UTR der murinen iNOS, die ebenfalls einen uORF besitzt, zeigt noch einmal die Besonderheit des humanen iNOS-Gens. So befindet sich der murine uORF nicht nur näher am murinen TSS, sondern besitzt auch eine andere Sequenz (siehe Tabelle 5-2). Damit scheint dieser uORF einzigartig für die humane iNOS zu sein, womit die Untersuchung der Rolle des uORFs für die iNOS-Regulation und in iNOS-assoziierten Erkrankungen nur auf humane Zellen beschränkt wurde.

DLD1-Zellen eignen sich besonders gut zur Untersuchung der iNOS-Regulation, da durch deren Behandlung mit Cytokinen die iNOS-Expression induzierbar ist. Um zu überprüfen, ob das iNOS-Transkript dieser Zellen den uORF enthält, wurde ein 5'-RACE durchgeführt. Diese Analysen bestätigten, dass der annotierte uORF Teil des in DLD1 vorkommenden iNOS-Transkripts ist und dass es sich bei dem DLD1-iNOS-Transkript um das postulierte iNOS-Transkript handelt. Die Mutation der Base 38 von G zu C ist eine sehr häufig auftretende Mutation. Sie ist unter der Nummer rs10459953 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/rs10459953>) im NCBI *Genome Browser* zu finden. Je nach Population tritt die Mutation bei 30–50 % der Menschen auf (Auton 2015). Die Mutation der Base 315 von C zu T tauchte nicht in den Datenbanken auf. Sie kann aber auch durch eine fehlerhafte PCR oder cDNA-Synthese entstanden sein, da die annotierte Base C (bzw. die komplementäre Base G) ebenfalls gemessen wurde, aber deren Signal überlagert vorliegt (siehe Abbildung 5-5). Auch eine fehlerhafte Sequenzierung kann eine Ursache der Überlagerung der Signale gewesen sein. Das in Cytokin-induzierten DLD1 exprimierte iNOS-Transkript stimmte daher nahezu vollständig mit dem in verschiedenen *Genome Browsern* unter der Refseq-Nr. NM\_000625.4 veröffentlichten iNOS-Transkript überein. Deutliche Unterschiede in der 5'-UTR wie auch das teilweise Fehlen des ersten Exons, wie sie von Shan Chu et al. gemessen wurden (Chu 1995), konnten in den verwendeten DLD1-Zellen nicht beobachtet werden. Damit eigneten sich die DLD1-Zellen zur Untersuchung des Einflusses des uORF auf die iNOS-Expression.

Die Anwesenheit eines uORFs ist für ca. 49 % der humanen Transkripte mit einer 5'-UTR beschrieben (Calvo 2009). In einigen Fällen inhibiert dieser uORF die Translation der Haupt-cds (Hinnebusch 2016), da die effiziente Translation nach dem scannenden Mechanismus durch den uORF unterbrochen wird und nur der erste ORF translatiert wird (Morris 2000).

Trotz der hohen Zahl von Transkripten mit uORFs treten vorzeitige AUGs weniger häufig auf, als durch eine gleichmäßige Basenverteilung vermutet werden könnte. uORFs scheinen daher nur da aufzutreten, wo sie entweder einen selektiven Vorteil in der Evolution bieten, zum Beispiel durch eine zusätzliche Regulation der Genexpression, oder der Einfluss vernachlässigbar ist (Neafsey 2007).

Bei der Betrachtung der Kozak-Sequenzen fällt auf, dass die Kozak-Sequenz des uORF (CCA CCU UUG **AUG** A) deutlich von der optimalen Kozak-Sequenz (GCC<sup>A</sup>/<sub>G</sub>CC **AUG** G; (Kozak 1991, Kozak 2002)) abweicht. Weder befindet sich an der -3-Stelle eine Purinbase noch an der Stelle +4 ein Guanin, weshalb von einer schwachen Kozak-Sequenz gesprochen werden kann. Deshalb stellt sich die Frage, inwieweit der uORF die Translation der iNOS beeinflusst und ob der uORF für eine Regulation der iNOS durch den NMD sorgt (Gather 2019). Die Kozak-Sequenz der *bona fide* iNOS-cds ist GCC AUA GAG **AUG** G. Auch wenn sie damit nicht der optimalen Kozak-Sequenz entspricht, bietet sie nach Kozak et al. ein besseres RNA-Motiv zur Translationsinitiation als die uORF-Kozak-Sequenz, da sie die Purinbase Guanin an Position -3 und Guanin an Position +4 aufweist (Kozak 1987, Pautz 2010).

Mit Hilfe von Western Blot-Analysen unter Verwendung von Proteinextrakten aus mit uORF-EGFP-Konstrukten transfizierten DLD1-Zellen konnte gezeigt werden, dass der uORF trotz der schwachen Kozak-Sequenz translatierbar ist (siehe Abbildung 5-9). Auch wenn die Expression des uORF-EGFP-Proteins deutlich schwächer war (ca. 10 % im Vergleich zur Positivkontrolle), wurde ein Protein unter den Bedingungen der iNOS-5'-UTR und der schwachen uORF-Kozak-Sequenz gebildet. Bei Mutation dieses Startcodons zu einer *EcoRI*-Schnittstelle und der damit einhergehenden Zerstörung des Translationsstartes entstand, wie zu erwarten, kein EGFP-Fusionsprotein. Die Translatierbarkeit des uORF begründet die weitere Untersuchung des Einflusses dieses uORFs auf die iNOS-Expression.

Unter Verwendung von Luciferase-Reportergen-Assays mit Konstrukten, bei denen die 5'-UTR der humanen iNOS vor das ATG der Luciferase-cds kloniert worden war, konnte im Anschluss gezeigt werden, dass der uORF selbst keinen Einfluss auf die Expression der Luciferase hat. Die Zerstörung des Startcodons des uORFs in gleicher Weise wie schon in den EGFP-Konstrukten zeigte keine Veränderung in der Luciferase-Aktivität. Dieser Effekt war unabhängig davon, ob die Zellen, wie für die Expression der iNOS essenziell, mit einem Cytokinmix stimuliert wurden oder nicht (siehe Abbildung 5-11). Eine besondere Aktivierung des uORFs

bzw. eine stressbedingte unterschiedliche Wirkung des uORFs, wie es zum Beispiel bei ATF4 der Fall ist (Vattem 2004, Young 2016), scheint damit unter den für die iNOS typischen Bedingungen nicht der Fall zu sein. Damit stellte sich die Frage, wie die iNOS trotz translatierbarem uORF exprimiert werden kann.

### 6.1.2 iNOS-Translation ist cap-abhängig

Es gibt mehrere mögliche Erklärungen, wie eine cds trotz der Existenz eines uORFs translatiert werden kann. Hierzu gehören das *leaky scanning*, die Reinitiation oder auch eine cap-unabhängige Translation, zum Beispiel über eine IRES (Munzarova 2011, Palam 2011, Pichon 2012, Somers 2013, Zhang 2019).

Zur Überprüfung der cap-Abhängigkeit der iNOS-Expression wurde ein Reportergenkonstrukt verwendet, bei dem durch eine SL-Struktur (eine stabile RNA-Sekundärstruktur) die cap-abhängige Translation verhindert ist (Kozak 1986, Chan 2013). Die Einführung einer SL-Struktur hinter die 5'-cap von Reportergen-Konstrukten bewirkte sowohl in den Kontroll-Plasmiden als auch in den Plasmiden mit der iNOS-5'-UTR den Verlust der Luciferase-Aktivität und bestätigte daher die cap-Abhängigkeit der Translation der iNOS (siehe Kapitel 5.4.2).

Daneben wurde die iNOS-5'-UTR auch mit Hilfe eines bicistronischen Reportergen-Konstrukts direkt auf eine IRES untersucht. Der Vergleich der Aktivität einer *Renilla*-Luciferase-Aktivität mit der Aktivität der direkt dahinter codierten *Firefly*-Luciferase lieferte das Verhältnis der Expression der beiden Cistrone. Konstrukte mit der iNOS-5'-UTR zwischen beiden Luciferase-cds zeigten keinen Unterschied zur Negativkontrolle. Damit konnte auch die Existenz einer IRES ausgeschlossen werden (siehe Kapitel 5.4.3).

Es konnte somit nachgewiesen werden, dass die iNOS-Expression cap-abhängig ist und dass keine IRES vorhanden ist. Als mögliche Umgehungsstrategien für den uORF bleiben nur eine Reinitiation oder ein *leaky scanning*-Mechanismus.

### 6.1.3 iNOS-Expression ist möglich durch *leaky scanning*

Während die Zerstörung des uORF-ATGs und der damit verbundene Verlust der Translatierbarkeit des uORFs keinen Einfluss auf die iNOS-Expression hatten, konnte mit der Optimierung der uORF-Kozak-Sequenz in Reportergen-Konstrukten gezeigt werden, dass die Expression



des Reportergens durchaus vom uORF beeinflusst werden kann. Die Optimierung der Kozak führte sowohl in Luciferase-Konstrukten als auch den EGFP-Konstrukten zu deutlich geringeren Expressionen des Reportergens (siehe Kapitel 5.4.4). Damit ist die iNOS-Expression beeinflussbar durch die Kozak-Sequenz des uORF. Je stärker die Kozak-Sequenz des uORF ist, desto geringer ist die Expression des Reportergens und damit der iNOS. Damit scheint die natürliche Kozak-Sequenz vergleichsweise schwach zu sein, sodass keine signifikanten Unterschiede in der Reportergenexpression der Konstrukte mit natürlicher 5'-UTR und der 5'-UTR ohne translatierbaren uORF zu beobachten sind.

Insgesamt spricht dies gegen eine reine Reinitiation und für einen *leaky scanning*-Mechanismus, der eine Expression der iNOS trotz uORF ermöglicht.

An dieser Stelle bleibt zu untersuchen, ob der uORF auch unter physiologischen Bedingungen translatiert wird oder bei Betrachtung des kompletten iNOS-Transkripts trotz Translatierbarkeit keine uORF-Translation mehr stattfindet. Hierüber könnte ein *Ribosome Profiling* Auskunft geben (Weaver 2019, Zhang 2019). Dabei werden Zellen zunächst mit Cycloheximid (CHX) behandelt, welches die Elongation durch das Ribosom stoppt. Anschließend werden die Zellen lysiert und mit RNase behandelt. Dabei werden nur die RNA-Abschnitte gespalten, die nicht an ein Ribosom gebunden sind. Mit einer Sucrose-Gradienten-Zentrifugation können dann die RNA-Abschnitte nach Dichte, d.h. der Beladung mit Ribosomen, aufgetrennt werden. Die durch einzelne Ribosomen geschützten mRNA-Fragmente (*ribosome-protected mRNA fragments*, RPFs) werden anschließend von den Ribosomen getrennt und mittels RNAseq analysiert (Ingolia 2009, Ingolia 2012, Hrdlickova 2017). Das Problem vieler dieser Datensätze ist, dass keine Zellen verwendet wurden, die die iNOS exprimieren oder zur iNOS-Expression stimuliert wurden. Daher gibt es zum aktuellen Zeitpunkt keine Daten, die in diesem Zusammenhang auf die Expression der iNOS bzw. des iNOS-uORFs hin untersucht werden können.

Auch die Verwendung des CRISPR/Cas9-System für eine Mutation des uORF-ATGs der iNOS und der Vergleich von Wildtyp-Zellen mit uORF-*Knockout*-Zellen könnte verwendet werden, um zusätzliche Auskunft über die Wirkung des uORF zu untersuchen.

## 6.2 NMD beeinflusst die Expression der iNOS

Eine weitere Eigenschaft von uORFs in Kombination mit einem Intron ist die mögliche Rekrutierung von NMD-Faktoren und die damit verbundene Schwächung der mRNA-Stabilität (Mendell 2004, Lloyd 2018). Der NMD erkennt PTC-enhaltende mRNAs und baut diese ab. Dabei spielt auch die Nähe dieses PTC zum nächsten Intron eine wichtige Rolle, da ein Komplex aus dem EJC, der beim Spleißen in der Nähe der EEJ platziert wird, und PTC-erkennenden Proteinen gebildet wird. Die Kombination eines uORF mit Stopcodon vor einem Intron, wie es in der iNOS-mRNA zu finden ist, ähnelt einem durch fehlerhafte Transkription entstandenem PTC und ist ein mögliches Ziel für den NMD (Hug 2016).

Um den Einfluss des NMD auf die iNOS-Expression zu überprüfen, wurde zunächst versucht, den NMD durch einen *Knockdown* bzw. *Knockout* von UPF1, einem Schlüsselfaktor des NMD, soweit zu schwächen, dass das Ausmaß des Einflusses des NMD auf die mRNA-Stabilität bestimmbar ist. Die Verwendung einer siRNA gegen UPF1 ergab zunächst einen *Knockdown* von UPF1 um ca. 50 %. Dies hatte zur Folge, dass sowohl die iNOS-mRNA- als auch Protein-Expression fast auf das Doppelte anstieg. Damit konnte gezeigt werden, dass die iNOS-Expression direkt oder indirekt durch den NMD reguliert ist.

Anschließend kamen verschiedene Techniken zur Anwendung, um den Einfluss des NMD über einen längeren Zeitraum bestimmen zu können. UPF1 sollte dabei dauerhaft herunterreguliert oder das Gen so mutiert werden, dass UPF1 nicht mehr exprimiert wird. Aber sowohl siRNA-produzierende Plasmide aus vorangegangenen Untersuchungen (Gather 2015) und die Fortführung mit weiteren siRNA-Varianten als auch die durch CRISPR/Cas9 generierten *Knockout*-Zellen zeigten keine dauerhafte Herunterregulation von UPF1 und waren daher keine verlässlichen Modelle für die Analyse des NMD-Einflusses.

Zuletzt wurde die transiente siRNA-Transfektion gegen UPF1 mit der mRNA-Stabilitätsanalyse bei Behandlung mit DRB kombiniert. Über einen Zeitraum von 6 h zeigte sich ein verlangsamter Abbau der iNOS-mRNA in siUPF1-behandelten Zellen. Diese vergleichsweise gering aber signifikant erhöhte iNOS-Expression nach sechsständiger Behandlung mit DRB spricht ebenfalls für einen Einfluss des NMD.

Eine mögliche Erklärung für den geringen Anstieg ist das *leaky scanning* durch die schwache Kozak-Sequenz des uORFs. Wird der uORF durch den ersten Translationskomplex übergangen,

so werden alle nachfolgenden EJs entfernt. Erst beim ersten Ablesen des uORFs kann das uORF-Stopcodon zusammen mit dem EJC, der sich durch das Spleißen des ersten Intron bildet, erkannt werden und zur Rekrutierung von UPF1 und letztendlich zum Abbau der mRNA führen.

Die 50 nt-Regel des NMD besagt, dass sich der PTC 50 nt oder mehr von der EEJ entfernt befinden muss, damit der NMD stattfinden kann (Nagy 1998, Hillman 2004). Der Abstand zwischen dem iNOS-uORF-Stopcodon und der Exon-Exon-Grenze entspricht mit 39 nt nicht mehr der 50 nt-Regel und ist kleiner als für den NMD üblich. Allerdings existieren auch Ausnahmen zu dieser Regel. So wurde bei Untersuchungen des T-Zellrezeptors (TCR)- $\beta$  festgestellt, dass sogar bis zu einem Abstand von nur 19 nt noch ein schwacher, aber messbarer NMD-Effekt zu beobachten ist (Carter 1995). Somit scheint die 50 nt-Regel nicht überall zu gelten oder nur eine Orientierung bieten zu können, bei welchem Abstand der NMD-Effekt optimal bzw. maximal ausfällt. Der geringe Abstand zwischen dem Stopcodon des iNOS-uORFs und der Exon-Exon-Grenze kann den Einfluss des NMD somit ebenfalls gesenkt haben. Trotz dieser beiden Hindernisse für den NMD ist ein Effekt auf die iNOS-Expression messbar.

Um einen direkten Einfluss der 5'-UTR und des NMD zu überprüfen, wurden daher Reporter-genkonstrukte kloniert, die anders als in den ersten Experimenten auch das Intron 1 der iNOS enthalten. Während die Konstrukte ohne Intron unabhängig von der Anwesenheit des uORF-Startcodons keine Änderung der Luciferase-Aktivität aufwiesen (siehe Abbildung 5-11), verdoppelte sich nun in Anwesenheit des ersten Introns durch Zerstörung des uORF-Startcodons die Luciferase-Aktivität nahezu (siehe Abbildung 5-28). Da der Effekt des *leaky scannings* Intron-unabhängig ist, der NMD aber durch die Anwesenheit des Introns und des uORF-Stopcodons ausgelöst werden kann, kann daraus geschlossen werden, dass für diesen Effekt der erhöhten Luciferase-Aktivität der NMD verantwortlich ist.

Damit kann von einer direkten Regulation der iNOS-Expression durch den NMD ausgegangen werden.

### **6.2.1 Regulation durch NMD und *leaky scanning* unabhängig von der Stimulation**

Promotoraktivitätsanalysen mit einem 16 kb großen Promotorfragment der humanen iNOS in verschiedenen Zelllinien zeigten sowohl eine niedrige, aber signifikante basale Promotoraktivität als auch eine Induktion um den Faktor 5–10 bei Zugabe eines Cytokinmixes. Die Verwendung eines nur 1 kb großen Promotor-Fragments zeigte zwar ebenso eine niedrige, aber signifikante basale Promotoraktivität, allerdings war diese Cytokin-unabhängig (de Vera 1996, Chan 2005).

Im Gegensatz dazu zeigten Analysen der iNOS-mRNA-Expression in denselben Zelllinien, dass in Abwesenheit von Cytokinen trotz der basalen Promotoraktivität keine mRNA detektiert werden kann (Pautz 2010). Diese Beobachtung konnte, wie in Abbildung 5-21 zu erkennen ist, auch im Rahmen dieser Doktorarbeit bestätigt werden.

Wie die Experimente zum direkten Einfluss des uORFs in der 5'-UTR auf die Luciferase-Expression und -Aktivität von Reportergenkonstrukten mit oder ohne Intron zeigten (siehe Abbildung 5-11, Abbildung 5-13, Abbildung 5-16 und Abbildung 5-28), ist kein Unterschied zwischen den stimulierten und unstimulierten Zellen zu beobachten. Damit scheint es sich bei der Regulation durch den NMD, wie auch schon beim *leaky scanning*, um basale, Cytokin-unabhängige Regulationsmechanismen zu handeln. Möglicherweise kann dadurch auch schon im niedrigen Bereich von wenigen mRNAs verhindert werden, dass die iNOS überhaupt exprimiert wird. Damit könnten der NMD und der uORF die iNOS-Expression unter physiologischen Bedingungen regulieren.

Zusätzlich zeigten die mRNA-Stabilitätsanalysen, dass der NMD eine schnellere Abnahme der iNOS-mRNA-Expression ermöglicht. Damit kommt es zu einer verkürzten Dauer der iNOS-Expression, wodurch auch die negativen Effekte der iNOS und des produzierten NO auf den Organismus selbst gemindert würden.

### **6.2.2 NMD nicht dauerhaft ausschaltbar**

Ein Problem stellte der dauerhafte *Knockdown* oder *Knockout* von UPF1 mittels siRNA bzw. CRISPR/Cas9 dar. Weder mit dem shRNA-generierenden Plasmid noch mit verschiedenen Leit-RNA-Sequenzen für das CRISPR/Cas9-System konnte die UPF1-Expression und damit der NMD

dauerhaft niedrig gehalten werden. Eine mögliche Ursache könnte hierbei die enorme Rolle für die Vitalität der Zellen spielen, die dem NMD zugeschrieben wird. Der NMD ist ein Mechanismus, der verhindert, dass fehlerhafte Transkripte entstehen bzw. in einer Zelle verweilen und zu fehlerhaften Proteinen führen. Zusätzlich besitzen viele Gene, die an der Apoptose beteiligt sind, Zielsequenzen für den NMD und werden dadurch reguliert. Ein andauernder *Knockout* von UPF1 als eines der Schlüsselenzyme kann daher zu einer vermehrten Bildung von fehlerhaften Proteinen und zur Apoptose führen (Popp 2015). Zusätzlich wurde Puromycin zur Selektion der CRISPR/Cas9-behandelten Zellen verwendet, welches ebenfalls zu einer fehlerhaften Translation führt. Durch seine Nukleosid-ähnliche Struktur sorgt es für einen frühzeitigen Abbruch der Translation (Nathans 1964) und hat damit einen ähnlichen Effekt wie eine PTC. Der darauffolgende Stillstand des Ribosoms verwandelt die mRNA fälschlicherweise in eine Zielstruktur für den NMD, wodurch die Zahl der NMD-Zielstrukturen steigt. Bei zu hohen Puromycin-Konzentrationen oder zu schwacher Puromycin-Resistenz könnte dies zusätzlich zu einer Überlastung des NMD-Mechanismus führen, sodass der NMD die Zelle nicht mehr ausreichend vor toxischen Produkten aus fehlerhafter Transkription und Translation schützen kann und weniger überlebensfähig als eine Zelle ist, die noch ausreichend UPF1 exprimiert. Dieser Effekt wird umso mehr dadurch verstärkt, dass zusätzlich durch die gewollte fehlerhafte Reparatur nach dem Doppelstrangbruch durch Cas9 eine PTC entstehen kann, die die Menge an PTC-haltiger mRNA und damit an NMD-Zielstrukturen ebenfalls erhöht.

Ein weiteres Problem des CRISPR/Cas9-Systems tritt bei der Verwendung diploider Zellen auf. Bei einem heterozygoten *Knockout* von UPF1 könnte trotzdem weiter UPF1 exprimiert werden und der NMD wäre nicht herunterreguliert. Eine Verwendung von haploiden Zelllinien, wie zum Beispiel bei haploiden hESCs (Horii 2015), könnte die Effektivität des CRISPR/Cas9-Systems steigern. Allerdings müssten diese Zellen auch zur Expression der iNOS stimulierbar sein. Bisherige Untersuchungen des Transkriptoms von Zellen mit transientem UPF1-*Knockdown* wurden in unstimulierten Zellen durchgeführt, sodass diese Datensätze keine iNOS-Expressionsdaten enthalten.

Die Entwicklung eines effizienten *Knockdowns* von UPF1 mit einer transient transfizierten siRNA und die Einstellung der besten Bedingungen für einen maximalen NMD-*Knockdown* war

nicht zuletzt wegen der Instabilität der siRNA und der unterschiedlichen Transfektionseffizienz verschiedener Transfektionsmedien sehr arbeits-, zeit- und kostenintensiv. Die Verwendung eines induzierbaren siRNA-codierenden Plasmids wäre eine weitere Möglichkeit, die Schwankungen in der Transfektionseffizienz von reinen siRNAs zu umgehen und die Effektivität und Verlässlichkeit der Experimente zu erhöhen.

## **6.3 Expression der humanen iNOS in Modellen der neuronalen Differenzierung**

NO und die iNOS, als ein NO synthetisierendes Enzym, haben einen großen Einfluss auf die neuronale Entwicklung (Gibbs 2003, Haghghat 2017). Sowohl die Teratogenität von zu hohen oder zu niedrigen NO-Konzentrationen während der embryonalen Entwicklung (Tiboni 2014), als auch die positiven Effekte auf die Proliferation von neuronalen Vorläuferzellen (Lopez-Arenas 2012) deuten auf eine wichtige Rolle der iNOS in der Neurogenese hin. Ein geregelter und abgepasster NO-Haushalt scheint daher entscheidend für die gesunde Entwicklung von Nervenzellen zu sein (Chong 2018). Im Zuge der Erforschung neuer Therapien und Arzneimittel und der vermehrten Nutzung von Stammzellen und deren neuronaler Differenzierung für verschiedene Krankheitsmodelle wird es immer wichtiger, verlässliche Differenzierungsprotokolle zu entwickeln und grundlegende Mechanismen der neuronalen Differenzierung zu ergründen, um diese Mechanismen direkt adressieren zu können (Rodrigues 2014, De Sousa 2017).

Der zweite Teil dieser Arbeit beschäftigte sich daher mit der Expression der humanen iNOS in verschiedenen Modellen der neuronalen Differenzierung sowie der Aufklärung der iNOS-mRNA-Struktur und möglicher Regulationsmechanismen der iNOS-Expression in der Neurogenese.

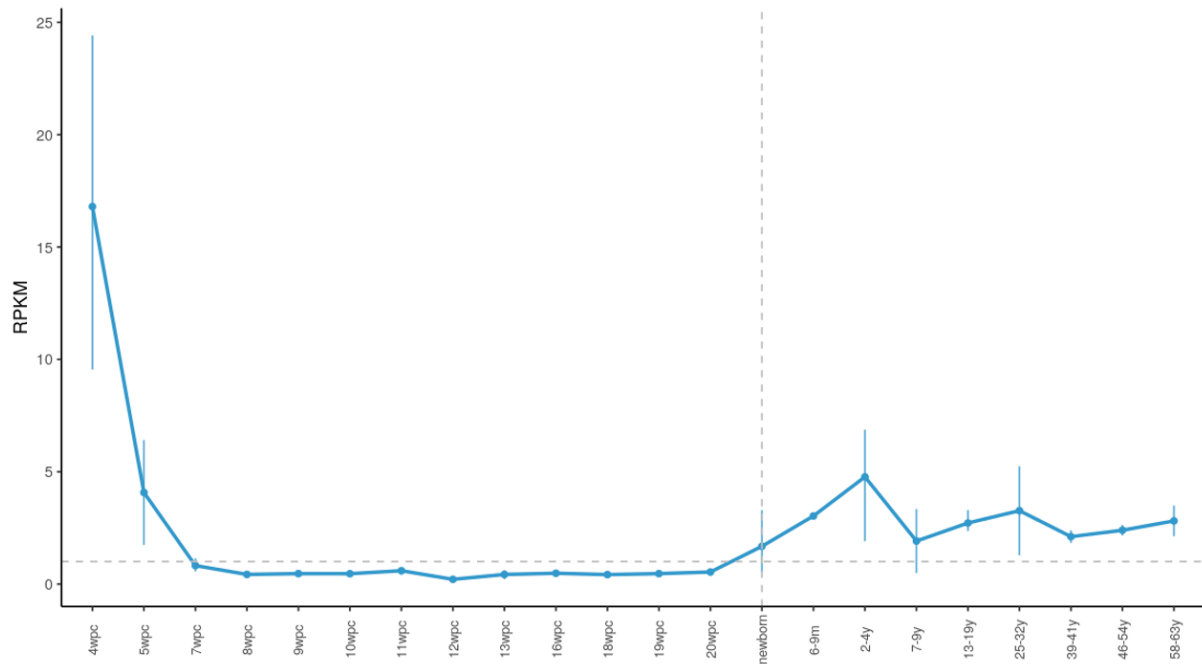
### **6.3.1 iNOS wird während der neuronalen Differenzierung exprimiert**

In verschiedenen Datenbanken sind Analysen und Daten zum Transkriptom von Stammzellen und verschiedenen Zwischenstufen auf dem Weg zu Neuronen zu finden. Dazu zählen zum Beispiel das FANTOM5-Projekt (Forrest 2014, Kawaji 2017) mit Daten zur Differenzierung von hiPSCs zu Neuronen oder auch die CORTECON-Studie (van de Leemput 2014) sowie Daten von Yuanyuan Li und Ran Wang et al. zur neuronalen Differenzierung von hESC (Li 2017). Diese Datenbanken wurden zur Analyse der iNOS-Expression in der Neurogenese herangezogen. Es zeigt sich dabei, dass unabhängig von den verschiedenen Differenzierungsprotokollen und unabhängig davon, ob hiPSCs oder hESCs differenziert wurden, eine Expression der iNOS in den ersten Tagen der Differenzierung messbar ist (siehe Abbildung 5-29, Abbildung 5-30 und Abbildung 5-31).

Auch in den Differenzierungsproben, die von der Arbeitsgruppe von Michael Peitz des Instituts für Rekonstruktive Neurobiologie zur Verfügung gestellt wurden, konnte ein solcher Expressionsanstieg der iNOS-mRNA innerhalb der ersten Tage beobachtet werden (siehe Abbildung 5-33). In allen verwendeten Zelllinien aus verschiedenen Probanden-hiPSCs wurde die höchste iNOS-mRNA-Expression zwischen Tag 18 und 24 gemessen. In den Zellen der weiblichen Probandin trat eine leichte Verschiebung des Maximums der iNOS-Expression zu Tag 24 auf (siehe Abbildung 5-32). Gerade weibliche Stammzellen variieren stärker im Differenzierungsverlauf, da während des Beginns der Differenzierung die Inaktivierung des zweiten X-Chromosoms eine wichtige Rolle spielt. Je nach Differenzierungsprotokoll variiert die Stärke dieses Effekts, der sich zumeist in einer Verlängerung der Differenzierungsdauer zeigt (Schulz 2014, Bar 2019). Demnach kann dieser Einfluss des zweiten X-Chromosoms die Ursache für die Verschiebung des iNOS-Expressions-Maximums sein. Nach Erreichen des Expressionsmaximums fiel die iNOS-Expression in allen untersuchten Zelllinien wieder ab und spätestens nach Gabe der spezifischen Differenzierungsfaktoren war die iNOS-Expression so niedrig wie in den Stammzellen.

Neben den Analysen zur Differenzierung von humanen Stammzellen zu Neuronen *in vitro* gibt es auch Transkriptom-Analysen zur Entwicklung verschiedener Gewebe *in vivo*. Die in der Einleitung gezeigten hohen Expressionsraten der iNOS in NPCs sowie im Ektoderm (siehe Abbildung 1-8) sind ein Indiz dafür, dass die iNOS auch *in vivo* und nicht nur *in vitro* eine wichtige Rolle für die menschliche Entwicklung und im Besonderen für die Neurogenese spielen könnte. Auch eine 2019 veröffentlichte Studie zur Genexpression während der Entwicklung verschiedener Organe in Säugetieren gibt Aufschluss über die Entstehung von Nervenzellen im Gehirn. Zur Betrachtung der Expression verschiedener Gene haben Margarida Cardoso-Moreira et al. eine Website (<https://apps.kaessmannlab.org/evodevoapp/>, Stand 30.09.2019) zur Verfügung gestellt, mit Hilfe derer das in Abbildung 6-1 gezeigte Diagramm der iNOS-Expression erstellt wurde (Cardoso-Moreira 2019).





**Abbildung 6-1: iNOS-Expression während der Entwicklung des menschlichen Gehirns.**

Gezeigt sind die RPKM-Werte (reads per kilobase of exon model per million mapped reads) der iNOS-Expression im Gehirn für die verschiedenen Entwicklungszeitpunkte nach Normalisierung der RNAseq-Daten mit EdgeR (v.3.14.0). wpc: Wochen nach der Befruchtung der Eizelle (weeks post-conception) (Cardoso-Moreira 2019).

Deutlich zu erkennen ist eine hohe iNOS-Expression in der frühen Entwicklung des Gehirns innerhalb der ersten 4–5 Wochen nach der Befruchtung der Eizelle (*weeks post-conception*, wpc) und in geringerem Ausmaß auch während (*newborn*) bzw. nach der Geburt. Im Gegensatz zu den menschlichen Proben ist keine iNOS-Expression oberhalb des Untergrundrauschens in Rhesusaffen, Mäusen, Kaninchen und Opossum messbar. Bei den Rhesusaffenproben (*macaque*, siehe Anhang 8.5) standen Margarida Cardoso-Moreira et al. für eine Betrachtung der frühen Entwicklung allerdings keine Proben zur Verfügung. Damit ist ein Vergleich mit den ersten humanen Proben, insbesondere 4. und 5. wpc, nicht möglich.

Interessant für eine weitere Untersuchung wäre somit auch, ob die iNOS-Expression während der neuronalen Entwicklung humanspezifisch ist. Weil aber der Einfluss von NO und der iNOS auf die Entwicklung von Neuronen auch in Versuchen mit Ratten und Mäusen beobachtet werden konnte (siehe Kapitel 1.4.1), liegt die Vermutung näher, dass die iNOS-Expression nur in einem kurzen Zeitraum der Neurogenese stattfindet, so dass sie durch die Wahl der Messzeitpunkte nicht in diesen Expressionsanalysen beobachtbar ist.

In Anbetracht der vielen verschiedenen positiven wie negativen Effekte von NO auf die Differenzierung von Neuronen scheint eine punktgenaue Regulation der NO-Konzentration und damit auch der NOS-Expression, insbesondere der iNOS-Expression, sehr wichtig zu sein. Das Expressionsprofil der iNOS, das sowohl in den verschiedenen Studien als auch in eigenen Messungen bestätigt werden konnte, ist ein weiteres Indiz dafür. Die iNOS scheint gerade in den ersten Tagen der Differenzierung und in den stammzellnahen NPCs eine wichtige Rolle zu spielen, da hier ihre Expression am höchsten ist. Eine Analyse der zugrundeliegenden Mechanismen scheint somit gerade in dieser Zeitspanne am sinnvollsten, um allgemeine Aussagen über die Bedeutung und den Mechanismus der iNOS in der Neurogenese treffen zu können.

### **6.3.2 iNOS-Transkript in Neuronen unterscheidet sich vom regulären Transkript**

Die verwendeten Studien, das FANTOM5-Projekt (Forrest 2014, Kawaji 2017), die CORTECON-Studie (van de Leemput 2014) und die Studie von Yuanyuan Li und Ran Wang et al. (Li 2017), stellen nicht ausschließlich Daten zu den einzelnen Genexpressionen zur Verfügung. Während die CORTECON-Studie auch die Expression verschiedener Spleiß-Varianten anhand der Expression der einzelnen Exons betrachtete, untersuchte das FANTOM5-Projekt mit Hilfe der CAGE-Methode die Lage der TSS (siehe Kapitel 5.6.3). Beim Vergleich der Daten konnte festgestellt werden, dass laut der CORTECON-Studie die Exons 1 und 2 des regulären iNOS-Transkripts nicht transkribiert und exprimiert werden (siehe Abbildung 5-35 und Abbildung 5-36). Bei der Analyse der FANTOM5-Ergebnisse wurde außerdem festgestellt, dass der TSS der in der neuronalen Differenzierung exprimierten iNOS nicht dem regulären iNOS-TSS entspricht. Ein möglicher TSS befindet sich stattdessen im zweiten Intron (siehe Abbildung 5-37).

Die Berechnung des iNOS-Transkripts mit Hilfe der Daten von Yuanyuan Li und Ran Wang et al. (Li 2017) ergab ein Transkript, das sich deutlich vom regulären iNOS-Transkript unterscheidet. Die Zuordnung der Exons, deren Lage durch das Programm *CLC Genomic workbench* und das *Transcript Discovery Plugin* von Qiagen berechnet wurde, erzeugte mehrere mögliche Exon-Zusammenstellungen (siehe Abbildung 5-39). Während der Sequenzbereich, der die Exons 3 bis 27 des regulären iNOS-Transkripts umfasst, auch im berechneten neuronalen iNOS-Transkript vorhanden ist, fehlen die ersten beiden Exons vollständig. Stattdessen besitzt dieses Transkript ein alternatives Exon 1. Das *Alignment* mit den verschiedenen möglichen

Transkripten, die neben dem eigentlichen iNOS-Transkript in älteren Veröffentlichungen des NCBI *Genome Browsers* erwähnt werden (siehe Kapitel 1.3.1), ergab die höchste Übereinstimmung mit dem putativen Transkript X2 bzw. dem im *Ensembl Genome Browser* annotiertem NOS2-203 (siehe Abbildung 1-6 und Abbildung 5-41). Auch der TSS, der sich aus den CAGE-Analysen des FANTOM5-Projektes ergab, ist Teil dieses putativen neuronalen iNOS-Transkripts und spricht damit wie auch die geringen Expressionsraten der ersten beiden regulären iNOS-Exons in der CORTECON-Studie für die Expression dieser Transkriptvariante während der neuronalen Differenzierung von humanen Stammzellen.

Zur Strukturaufklärung des iNOS-Transkripts in den von der Arbeitsgruppe von PD Dr. Michael Peitz zur Verfügung gestellten Differenzierungsproben, wurde dieses mit verschiedenen PCRs und einem 5'-RACE analysiert. Die Verwendung unterschiedlicher transkriptspezifischer Oligonukleotide unterstützte die These, dass es sich bei der neuronalen iNOS-mRNA um die oben beschriebene putative neuronale iNOS-mRNA handelt. Nur bei der Verwendung von Primerpaaren, die in dieser Transkriptvariante binden, konnten PCR-Amplifikate im Agarosegel nachgewiesen werden (siehe Abbildung 5-44 bis Abbildung 5-46).

Der durchgeführte 5'-RACE unterstützte dieses Ergebnis. Die Sequenzierung der 5'-RACE-Produkte und der in pCR-Skript klonierten Fragmente zeigten eine hohe Übereinstimmung mit dem putativen neuronalen Transkript und reichten bis in das spezifische neuronale Exon 1 hinein. Allerdings waren die erzeugten Fragmente kürzer als für die putative neuronale iNOS-mRNA erwartet und spannten nicht das ATG der entsprechenden iNOS-cds ein. Würde das iNOS-Transkript an dem TSS beginnen, der sich aus dem 5'-RACE-Sequenzen ergibt, so würde dessen Translation zu keinem iNOS-Enzym führen. Die Auswirkungen von NO auf die neuronale Entwicklung sowie der nachgewiesene Zusammenhang mit der iNOS sprechen allerdings für die Anwesenheit eines iNOS-Enzyms, welches durch die Translation der iNOS-mRNA exprimiert werden könnte, die sich aus den Datenbank-Analysen ergibt. Eine Überprüfung der iNOS-Expression auf Proteinebene mit den Proben der Differenzierungsreihe und iNOS-spezifischen Antikörpern steht noch aus. Auch ein *Ribosome Profiling* (siehe Kapitel 6.1.3) könnte weiterhin Aufschluss über die Translationsraten und die Struktur der neuronalen iNOS liefern.

Bei Betrachtung des neuronalen Exon 1 und der umgebenden Sequenz fällt der hohe GC-Anteil auf. Das Exon selbst hat einen GC-Anteil von 76 %. Wird die größere Umgebung

betrachtet, so ergibt sich über eine Sequenz von 575 bp (Position chr17:27793344-27793918 des Datensatzes für hg38/Human) ein GC-Anteil von 71,3 %. Der hohe GC-Anteil kann zu Problemen bei der cDNA-Synthese und der PCR führen und einen unvollständigen 5'-RACE zur Folge haben (Shi 2006). Der GC-Anteil ist eine mögliche Erklärung dafür, dass das Start-ATG des neuronalen iNOS-cds nicht mehr innerhalb der Sequenzierung gemessen werden konnte und beim 5'-RACE mehrere verschiedene PCR-Amplifikate entstanden sind. Selbst in den DLD1-Proben wurden zwei verschiedene Fragmente erzeugt, die ebenfalls für eine unvollständige 5'-RACE sprechen. Somit kann durchaus ein längeres Transkript existieren als die bis heute sequenzierten Fragmente vermuten lassen. Die Verwendung anderer Polymerasen und anderer Primerpaare brachte keine Ergebnisse. Möglicherweise ließe sich die Effizienz der 5'-RACE durch eine andere Protokollführung (Shi 2006) oder eine ausschließliche cDNA-Synthese von mRNA mit 5'-cap verbessern (Schmidt 1999). Hierbei wird durch die Anwesenheit von Mangan(II)-chlorid während der reversen Transkription die Addition von 3–4 dCMP-Resten an das 3'-Ende der cDNA begünstigt. Diese zusätzlichen Basen werden nur dann an die cDNA ligiert, wenn die RNA-Matrize an ihrem 5'-Ende eine cap-Struktur besitzt. Durch anschließende Behandlung mit ATP und einer Terminalen Transferase wird insgesamt ein 3'-Ende der Form 5'-dC<sub>3-4</sub>rA<sub>3-4</sub> erzeugt. Nach Ligation mit einem doppelsträngigen DNA-Adapter mit dT<sub>3-4</sub>dG<sub>3-4</sub>-3'-Überhang kann eine Gen-spezifische PCR wie bei dem verwendeten 5'-RACE-Protokoll (siehe Kapitel 4.4.6) durchgeführt werden (Schmidt 1999). Auch eine cap-spezifische cDNA-Synthese wie beim CAGE durch Bindung eines biotinylierten *Linker* (Carninci 1999, Shiraki 2003), wie in Kapitel 6.3.2 beschrieben, wäre eine Möglichkeit, unvollständige cDNA-Sequenzen auszuschließen und die Effektivität des 5'-RACE zu erhöhen.

Auch die 3'-UTR einer mRNA hat einen wesentlichen Einfluss auf die Regulation der Expression. Ein Analyse der 3'-UTR-Sequenz des neuronalen iNOS-Transkripts steht noch aus und könnte mit dem *5'/3' RACE Kit (2nd Generation)* von Roche durchgeführt werden. Das *Read Mapping* der RNAseq Daten (siehe Abbildung 5-41) spricht für eine hohe Homologie zwischen den letzten Exons des regulären und des neuronalen iNOS-Transkripts.

### **6.3.3 iNOS wird nicht in stabilen NPC-Linien exprimiert**

Eine Möglichkeit, sich zugrundeliegende Mechanismen der neuronalen Differenzierung genauer anzuschauen, ist die Verwendung von stabilen NPC-Linien. Hierzu gehören unter anderem die sm-NPCs, It-NES und RGL-NPCs. In allen drei Zelllinien konnte allerdings weder auf mRNA-Ebene (siehe Abbildung 5-51) noch auf Proteinebene (siehe Abbildung 5-52) eine iNOS-Expression gemessen werden. Dies kann daran liegen, dass die Zellen in ihrem Entwicklungsstadium gehalten werden und die iNOS in diesem Zeitfenster der Neurogenese nicht exprimiert wird. Bei Betrachtung der iNOS-Expression fällt auf, dass die Maximal-expression nur in einem kleinen Zeitrahmen der Neurogenese nachzuweisen ist (siehe Kapitel 5.6.1 und 5.6.2 bzw. 6.3.19). Die Studie von Yuanyuan Li und Ran Wang et al. hat die kleinste zeitliche Auflösung und hier ist die Expression nur von Tag 12 bis 16, also in einem Zeitraum von 4 Tagen erhöht (siehe Abbildung 5-31). Möglicherweise liegen die Entwicklungsstadien der NPCs nicht in diesem Zeitraum oder die iNOS-Expression steigt nur im Übergang von einem Zustand in den nächsten signifikant an. Ein anderer wichtiger Punkt ist, dass das Protokoll der Differenzierung der hiPSCs der Arbeitsgruppe von Michael Peitz zur Generierung von glutamatergen kortikalen Nervenzellen genutzt wird (Rehbach 2019). Auch die CORTECON-Studie (van de Leemput 2014) und die Studie von Yuanyuan Li und Ran Wang et al. (Li 2017) verwendeten in ihren Differenzierungsreihen Protokolle zur Generation kortikaler Neurone. Die FANTOM5-Analysen beruhen auf einem allgemeineren Protokoll, das auch die Generation von dopaminergen Neuronen des Mittelhirns oder von Motoneuronen erlaubt (Chambers 2009). Damit könnte die iNOS-Expression auch auf die Differenzierung zu bestimmten Neuronen oder die Entwicklung einiger bestimmter Hirnregionen beschränkt sein.

### **6.3.4 Neuronales iNOS-Transkript verfügt über andere Regulationsmöglichkeiten gegenüber dem regulären iNOS-Transkript**

Die 575 bp-lange GC-reiche Sequenz (GC-Anteil von 71,3 %, Position: chr17:27793344-27793918 des Datensatzes für hg38/Human) in der Umgebung des putativen neuronalen Exon 1 besteht aus 61 CpGs. Damit ist das Verhältnis aus beobachteten zu erwarteten CpGs 0,85. Nach der Definition von Margaret Gardiner-Garden und Marianne Frommer handelt es sich damit um eine CpG-Insel (Gardiner-Garden 1987). Sie ist ein erster Hinweis auf einen separaten Promotor für diese iNOS-Transkriptvariante.

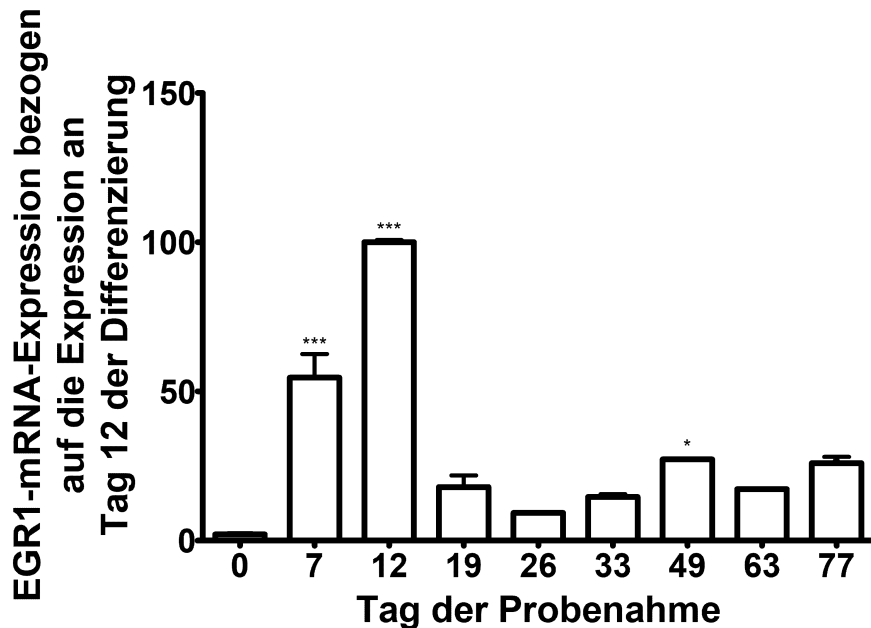
Weitere Indizien auf einen möglichen Promotor des neuronalen iNOS-Transkript liefert das ENCODE-Projekt. Die dort gesammelten Daten entstammen der Untersuchung verschiedener Datensätze, die unter anderem durch CHIP-seq und DNase-seq erzeugt wurden. Dabei handelt es sich um Methoden, bei denen genomische DNA-Abschnitte aufgrund bestimmter Eigenschaften zunächst isoliert und anschließend sequenziert werden. Bei der Chromatin-Immunpräzipitation (ChIP) werden die Proteine, die an DNA gebunden vorliegen und zum Beispiel als Transkriptionsfaktoren dienen, zunächst kovalent an die DNA gebunden. Im Anschluss wird die DNA geschnitten und die Protein-DNA-Komplexe mit Hilfe von spezifischen Antikörpern gegen die Proteine isoliert. Die Sequenzierung der gebundenen DNA-Abschnitte und das *Alignment* mit dem humanen Genom liefert anschließend mögliche Bindestellen für die jeweiligen untersuchten Proteine. Beim DNase-seq wird hingegen ausgenutzt, dass Promotorregionen für die Transkription offen und nicht an Histone gebunden vorliegen. Dadurch sind sie zugänglich für das Enzym DNaseI, welches die DNA an diesen Stellen schneidet. Diese Loci werden auch DNase-hypersensible Sequenzen (DHS) genannt (Consortium 2012).

Bei Betrachtung der Sequenz, die die beschriebene CpG-Insel und das erste Exon des neuronalen iNOS-Gens umgibt, finden sich mehrere DHS. Die DHS p114359 im Bereich chr17: 27793600-27793750 und p114360 im Bereich chr17: 27794240-27794390 (Datensatz: hg38/Human) wurden auch in hESCs gemessen. Insbesondere in der Nähe von CpG-Inseln können diese auf einen möglichen Promotor hinweisen (Sheffield 2013). Allerdings liegen dem ENCODE-Projekt keine Daten für die Differenzierung dieser Stammzellen zu Neuronen, sondern nur zu Muskelzellen zugrunde. Eine detaillierte DNase-seq zu verschiedenen Zeitpunkten der neuronalen Differenzierung von Stammzellen könnte diese Wissenslücke in Zukunft schließen.

Im Bereich des ersten Exons sind außerdem potenzielle Bindestellen für verschiedene Proteine, insbesondere Transkriptionsfaktoren, zu finden. Hierzu gehören zum Beispiel EGR1 (*early growth response 1*, ORegAnno ID: OREG1493247) und CTCF (ENSR00000552324 und ENSR00000552325) (Lesurf 2016).

EGR1 (auch Zif268, NGFI-A, Krox-24 oder ZENK) ist ein Transkriptionsfaktor, der unter anderem bei der Neurogenese im adulten Gehirn exprimiert wird. Er wird vor allem mit neuronaler Differenzierung von NPCs und der sich daraus ergebenden neuronalen Plastizität

in Verbindung gebracht (Knapska 2004, Karimipour 2019). Über die Regulation der *Ten-eleven translocation methylcytosine dioxygenase 1* (Tet1) ist EGR1 zudem an der Demythylierung von CpG-Inseln beteiligt (Kwon 2018). Werden die CORTECON-Daten auf die Expression des EGR1 hin untersucht, ist eine signifikant höhere Expression an Tag 6 und Tag 12 und damit vor und zeitgleich zur iNOS-Expression zu beobachten (siehe Abbildung 6-2).



**Abbildung 6-2:** EGR1-mRNA-Expression während der neuronalen Differenzierung innerhalb der CORTECON-Studie.

Zu sehen ist die Expression der EGR1-mRNA anhand von RNAseq-Analysen innerhalb der CORTECON-Studie. Zwei verschiedene Differenzierungsreihen mit unterschiedlichen Zeitpunkten der Probenahme wurden nach RNAseq normiert (van de Leemput 2014) und auf die Expression der Proben von Tag 12 bezogen ( $n=2-4$ , \*\*\*:  $p<0,05$ ).

All diese Indizien sprechen dafür, dass es sich um einen separaten Promotor handeln könnte (Kim 2005), der bereits im *Ensembl Genome Browser* annotiert ist, aber nur in wenigen Zelllinien als aktiver Promotor gemessen werden konnte (siehe ENSR00000552323 im *Ensembl Genome Browser*) (Zerbino 2017).

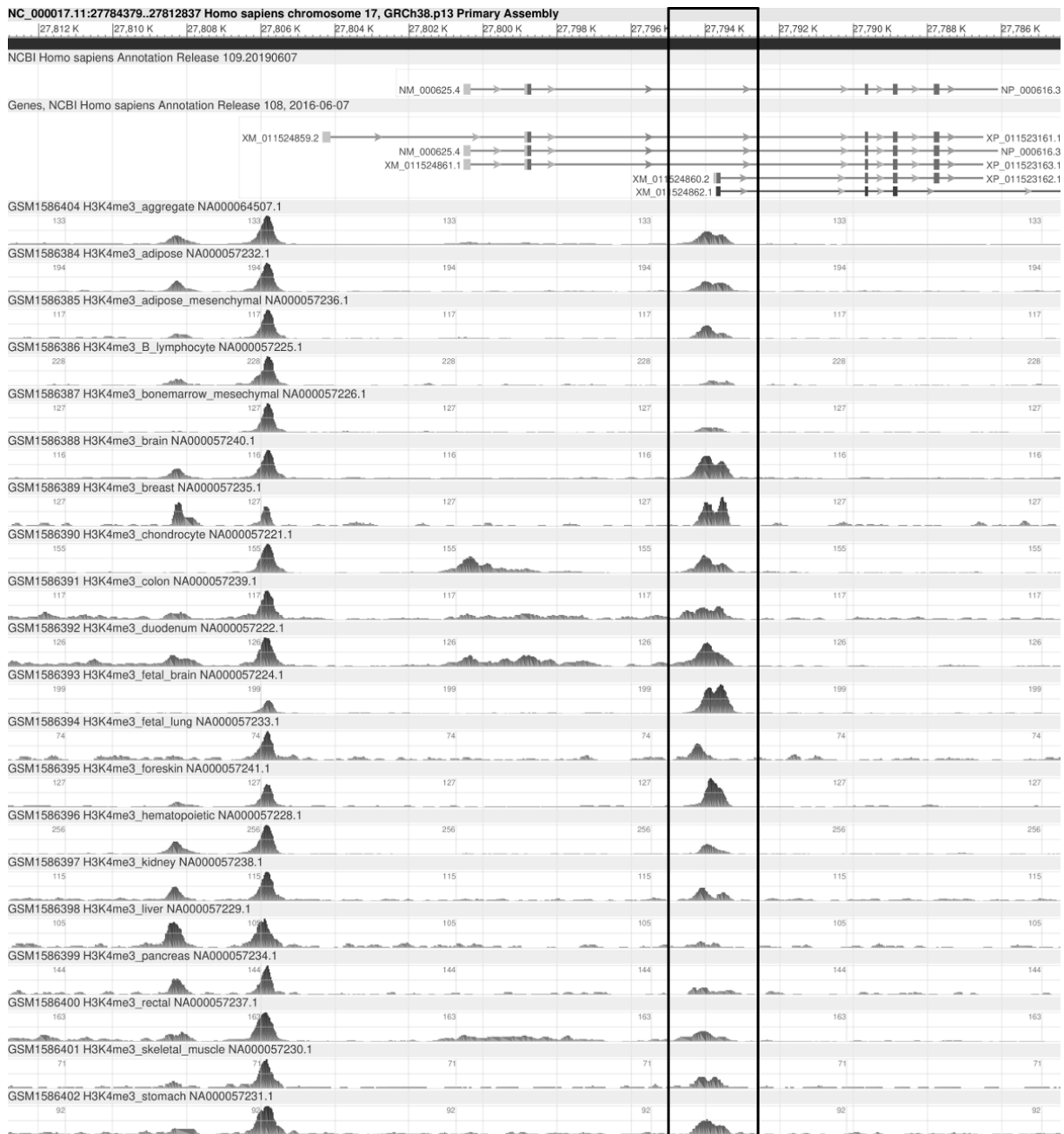
Die Analyse dieser Promotoraktivität, unter anderem während der Neurogenese, wird in Zukunft eine wichtige Grundlagen für die Untersuchung der Bedeutung der neuronalen iNOS sein. Dazu könnten Reporter-gen-Analysen, zum Beispiel durch die Klonierung dieser möglichen Promotorsequenz vor eine *Luciferase-cds*, durchgeführt werden. Da aber eine

Transfektion dieser Reportergenkonstrukte in Zellen wie DLD1 nur eine allgemeine Promotoraktivität widerspiegeln kann, sollte eine Promotoranalyse in Zellen angestrebt werden, die diese Form der neuronalen iNOS exprimieren. Interessant wäre eine Einbringung von Reportergenen in hiPSCs-Zellen vor der Differenzierung oder in eine stabile NPC-Linie, die die neuronale iNOS exprimiert.

Auch die Verwendung der Affinitätschromatografie (zum Beispiel ein Streptavidin-Agarose-*Pulldown*) könnte Aufschluss über die mögliche Promotorregion und die Proteine geben, die an der Expression der neuronalen iNOS beteiligt sind. Hierbei werden die zu untersuchenden Proben (Proteine, DNA oder RNA) zunächst biotinyliert und dadurch an Streptavidin-Agarose gebunden. Bei Inkubation der gebundenen Proben mit Zelllysaten interagieren die möglichen Interaktionspartner mit den gebundenen Proben und werden so aus der Lösung entfernt. Eine anschließende Untersuchung dieser Proteine mit Western Blot-Analysen durch spezifische Antikörper oder des gesamten Spektrums der interagierenden Proteine durch massenspektrometrische Messungen lässt Rückschlüsse auf die Regulationsmechanismus und Signalwege zu (Wu 2006). Für die Analyse der neuronalen iNOS-Expression könnten verschiedene Sequenzen des putativen Promotors als biotinylierte DNA-Fragmente an Streptavidin-Agarose gebunden und mit Proteinextrakten der differenzierenden humanen Stammzellen behandelt werden.

Neben DNA-bindenden Proteinen spielt auch die Epigenetik, zum Beispiel über Histon-Modifizierungen und DNA-Methylierungen, eine wichtige Rolle in der Regulation der transkriptionellen Genexpression (siehe Kapitel 1.2.1). Der unterschiedliche Histonmethylierungsstand (H3K4me3) im Bereich der CpG-Insel und des potenziellen Promotors der neuronalen iNOS in verschiedenen Zelllinien, welcher dem NCBI *Genome Browser* entnommen werden kann (siehe Abbildung 6-3), weist auf eine möglicherweise unterschiedliche Promotoraktivität und Regulation der iNOS-Expression in verschiedenen Zelltypen hin (Guenther 2007).





**Abbildung 6-3: H3K4me3-Methylierung im Bereich des regulären iNOS-Promotors und des neuronalen Exon 1 in verschiedenen Zelltypen.**

Analyse der H3K4me3-Methylierung des putativen neuronalen iNOS-Promotors mit Hilfe des NCBI-Genome Browser für verschiedene Zelltypen (mit Referenznummern, Stand 12.07.2019). Zur Orientierung sind im oberen Bereich die beiden Annotationen 108 und 109 des iNOS Gens dargestellt (NCBI Homo sapiens annotation release 108 und 109).

Eine Untersuchung der Histonmethylierungen und weiterer epigenetischer Marker in diesem Bereich während der neuronalen Differenzierung humaner Stammzellen, könnte zur Aufklärung der Mechanismen beitragen, die für die Expression der neuronalen iNOS verantwortlich sind.

### 6.3.5 Potenzielle neuronale iNOS unterscheidet sich von der regulären iNOS

Der Vergleich des neuronalen iNOS-Transkript mit dem regulären iNOS-Transkript zeigte nicht nur, dass dessen TSS an einer anderen Stelle im iNOS-Gen liegt, sondern deutet auch auf eine unterschiedliche Beschaffenheit der 5'-UTR und des ersten Teils des iNOS-ORFs bzw. iNOS-Proteins hin. Tabelle 6-1 und Tabelle 6-2 zeigen die Gegenüberstellung der unterschiedlichen DNA- bzw. daraus resultierender Peptid-Sequenzen.

Tabelle 6-1: Vergleich der ersten beiden Exons der regulären iNOS mit dem ersten Exon der neuronalen iNOS

Exon 1 und 2 der regulären iNOS	Exon 1 der neuronalen iNOS
ATAACTTTGT AGCGAGTCGA AACTGAGGC	CGTGGAGCCA GCGGAGCTGC GCCTAAGGAG
TCCGGCCGCA GAGAACTCAG CCTCATTCT	CCGGGCCATG CGCGAGGGGC TGGGCGCGGC
GCTTTAAAAT CTCTCGGCCA CCTTTGATGA	GTGCGAGGCC GCCGGGCCCC GGCTGTGCAG
GGGGACTGGG CAGTTCTAGA CAGTCCCGAA	GCTGCTCTGC AGGATCCTCC GGCCGAAGCC
GTTCTCAAGG CACAGGTCTC TTCCTGTTT	TGACTGCTGC CCGCGCAGAG CCAG
GA	
ACTGTCCTT ACCCCGGGGA GGCAGTGCAG	
CCAGCTGCAA G/CCCCACAG TGAAGAACAT	
CTGAGCTCAA ATCCAGATAA GTGACATAAG	
TGACCTGCTT TGTAAGCCA TAGAGATGGC	
CTGTCCTTGG AAATTTCTGT TCAAGACCAA	
ATTCCACCAG TATGCAATGA ATGGGGAAAA	
AGACATCAAC AACAATGTGG AGAAAGCCCC	
CTGTGCCACC TCCA	

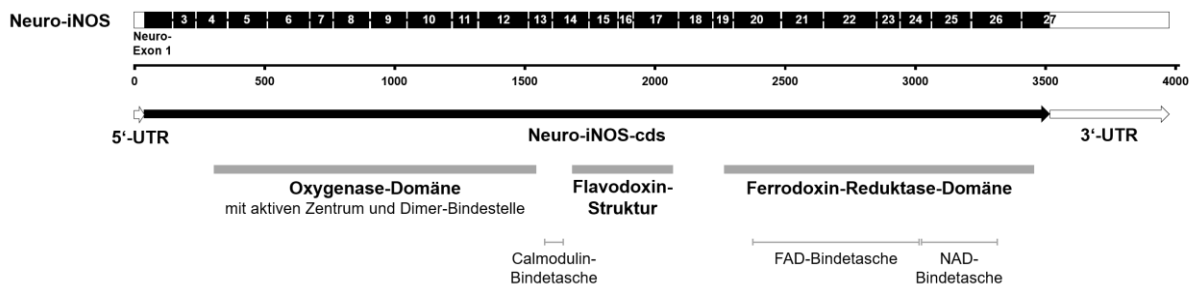
NNN = uORF; ATG = Startcodon des humanen iNOS-uORFs; / = Exon-Exon-Grenze; ATG = Startcodon der iNOS-cds; NNN = TSS des Transkripts aus den Daten von Yuanyuan Li und Ran Wang et al.

Tabelle 6-2: Vergleich der unterschiedlichen Peptidsequenzen am Anfang der regulären und der putativen neuronalen iNOS

reguläre iNOS	neuronale iNOS
MACPWKFLFKTKFHQYAMNGEKDINNNVEKA	MREGLGAACEAAGPRLCRLLCRILRPKPDCCPR
PCATS...	RAS...

A, G, I, L, M, P, V = unpolare, aliphatische AS; F, W, Y = aromatische AS; C, N, Q, S, T = polare AS  
 D, E = negative geladene/saure AS; H, K, R = positiv geladene/basische AS

Abbildung 6-4 zeigt eine Zusammenführung des ermittelten neuronalen iNOS-Transkripts mit den bekannten Domänen der regulären iNOS.



**Abbildung 6-4: Struktur der in der neuronalen Differenzierung von humanen ESC transient gebildeten neuronalen iNOS-mRNA.**

Dargestellt ist die Struktur des neuronalen iNOS-Transkripts. Die Nummerierung der Exons entspricht zur besseren Orientierung der Exon-Nummerierung der regulären iNOS. Potenzielle Domänen und Bindestellen, wie sie im regulären iNOS-Protein zu finden sind, sind ebenfalls dargestellt (vgl. Abbildung 1-5).

Bei der Betrachtung der Domänen der regulären iNOS und dem Vergleich der Transkripte fällt auf, dass sich das DINNN-Motiv, welches durch Exon 2 der regulären iNOS kodiert wird, nicht in der Proteinsequenz des neuronalen iNOS-Proteins befindet. Dieser Umstand und auch die Unterschiede in der 5'-UTR weisen auf eine potenziell veränderte Regulation der neuronalen iNOS auf post-transkriptioneller Ebene hin. Die mRNA-Stabilität, die Wirkung von RNA-BP und die Proteininstabilität kann bei dieser Variante auf andere Weise als bei der der regulären iNOS reguliert werden. Aufschluss darüber können auch hier Reportergenexperimente zur Analyse der Auswirkung der unterschiedlichen 5'-UTRs sowie *Pulldown*- und Immunpräzipitationsexperimente zum Einfluss von RNA-BPs und Protein-Protein-Interaktionen geben. Auch eine Aktivitätsanalyse beider Isoformen ist ein Experiment, das in Zukunft durchgeführt werden sollte.

Die Ausweitung dieser Experimente auf die Analyse der iNOS-Proteinexpression während der Differenzierung könnte Aufschluss über die Regulationsmechanismen und die Translatierbarkeit des Transkripts und damit die Anwesenheit und Funktionalität des Proteins selbst liefern.

### **6.3.6 Welche Rolle spielt die iNOS in der Neurogenese?**

Insgesamt deuten die Beobachtungen auf eine unterschiedliche Regulation der regulären iNOS und der neuronalen iNOS hin, die nicht final charakterisiert werden konnte. Dementsprechend sind weitere Analysen zur Promotoraktivität, zum Methylierungsstatus der CpG-Inseln, der mRNA- und Proteinstabilität und der Wirkung möglicher Transkriptionsfaktoren und RNA-BPs nötig, um eine genaue Aussagen treffen zu können, welche Rolle der neuronalen iNOS an der Entwicklung von Nervenzellen und möglicherweise an der frühen Entwicklung des Ektoderms (siehe Abbildung 1-8) zuzuschreiben ist.

Während der iNOS für die Differenzierung von Stammzellen zu Neuronen aber auch in der natürlichen Entwicklung des Menschen nachweislich eine wichtige Rolle zugeschrieben wird, ist die exakte Funktion der iNOS in der Neurogenese sowie der mögliche zugrundeliegende Mechanismus weiterhin unbekannt.

Eine mögliche Funktion könnte in der Regulation der DNA-Methylierung durch das produzierte NO liegen. So fanden Daniela Kremer et al. bei exogener Zugabe von NO-Induktoren in A549-Zellen und primären Keratinozyten eine erhöhte Remethylierung des gesamten Genoms vor. Sie erklärten dies durch eine NO-bedingte Steigerung der Aktivität von DNMT1 und DNMT3b und eine erleichterte DNA-Methylierung durch die S-Nitrosierung der an der enzymatischen Reaktion beteiligten Thiole (Kremer 2010). DNMTs, wie DNMT1 und DNMT3b, sind wiederum beteiligt an der Embryogenese. So wird ein Teil der unterschiedlichen CpG-Methylierungsmuster zwischen Stammzellen und Neuronen auf die Aktivität der DNMT3-Familie, zu der auch DNMT3b gehört, zurückgeführt (Lee 2017). Eine Fehlregulation der DNMTs wird wiederum mit verschiedensten Krankheiten, unter anderem neuropsychiatrischen und neurodegenerativen Erkrankungen, in Verbindung gebracht (Mohan 2016, Wen 2016). Ein möglicher Kreis schließt sich durch die Beobachtung einer Hypomethylierung des iNOS-Gens im Zusammenhang mit der Entwicklung einer Parkinson-Erkrankung (Searles Nielsen 2015). Auch EGR1, welches eine potenzielle Bindestelle am putativen Promotor der neuronalen iNOS besitzt, ist involviert in der Regulation verschiedener Gene der Neurogenese sowie in der Demethylierung von CpG-Inseln (siehe Kapitel 6.3.4).

Für weitere Untersuchung könnte daher zunächst die Analyse der iNOS-Expression in der Neurogenese auf Proteinebene durch Western Blot-Analysen mit Proteinextrakten

verschiedener Differenzierungsproben erfolgen. Bei Anwesenheit des iNOS-Enzyms während der Neurogenese könnte dessen Aktivität zum Beispiel mit Hilfe von 4,5-Diaminofluorescein-Diacetat (DAF-2 DA) nachgewiesen werden. DAF-2 DA reagiert, nachdem es durch eine Esterase in der Zelle prozessiert wurde, mit NO und Sauerstoff zu Traizolfluorescein (DAF-2T). DAF-2T ist ein Fluoreszenzfarbstoff mit einer Absorptionswellenlänge von 505 nm und einer Emissionswellenlänge von 518 nm. Die qualitative und quantitative Bestimmung der NO-Produktion einer NO-Synthase kann anhand der Fluoreszenz von DAF-2T durch Zuhilfenahme des *fluorescence-activated cell sorting* (FACS) oder durch Fluoreszenzdetektoren bzw. Fluoreszenzmikroskopie erfolgen (Strijdom 2004). Bei Vorversuchen zur Detektion von NO in stimulierten DLD1-Zellen im Rahmen dieser Doktorarbeit zeigte sich, dass eine zusätzliche Gabe von L-Arginin bei der Gabe von DAF-2 DA zu den Zellen nötig ist, um einen deutlichen Unterschied zwischen Cytokin-stimulierten und unstimulierten DLD1-Zellen zu erkennen (Daten nicht gezeigt). Eine mögliche Erklärung ist die dauerhafte Synthese von NO durch die iNOS, der deutlich über der NO-Produktion der eNOS und nNOS liegt, und der dadurch bedingte hohe Verbrauch von L-Arginin. Eine weitere Optimierung der Methode und eine Anpassung an die differenzierenden Stammzellen steht noch aus.

Des Weiteren kann der Einfluss von NO und der iNOS auf die Neurogenese untersucht werden, indem bei Anwesenheit des iNOS-Enzyms während der Differenzierung die iNOS-Aktivität durch spezifische iNOS-Inhibitoren, zum Beispiel 1400W (Garvey 1997), unterbunden wird. Auch die Resubstitution von NO durch L-NAME oder einen anderen NO-Donor nach Inhibition der iNOS wäre denkbar, um die zugrundeliegenden Mechanismen aufzudecken.

Zusätzlich kann ein *Knockdown* oder *Knockout* der iNOS weitere Erklärungen zur Rolle der iNOS in der Neurogenese liefern. Unabhängig von der Proteinexpression könnte die iNOS-Expression mit Hilfe des CRISPR/Cas9-Systems in den humanen Stammzellen (hESCs oder hiPSCs) durch Mutation dauerhaft ausgeschaltet werden. Eine morphologische und molekularbiologische Untersuchung einer anschließenden neuronalen Differenzierung dieser Zellen und der Vergleich mit einer Kontrollzelllinie würde Aufschluss über einen Einfluss der iNOS auf die Differenzierung und die Expression anderer Gene liefern. Insbesondere die Betrachtung der Methylierungsmuster und die Verwendung von RNAseq zur Analyse des Transkriptoms wären dabei sinnvolle Methoden zur Überprüfung der epigenetischen Funktion der iNOS. Die Leitsequenz für das CRISPR/Cas9-System könnte dabei so gestaltet werden, dass sie

im ersten Exon des neuronalen iNOS-Gens bindet und so im Idealfall nicht die reguläre iNOS beeinflusst. Auch die Verwendung einer siRNA für einen transienten *Knockdown* zu bestimmten Zeitpunkten der Differenzierung wäre denkbar.

Ließe sich die iNOS-Expression nicht nur in humanen, sondern auch in murinen Zellen (oder anderen Tiermodellen) nachweisen wäre auch eine Analyse der iNOS-Expression abhängig vom Gewebe während der Entwicklung von Mausembryos denkbar. Hier könnte die iNOS-Expression auf Proteinebene mittels immunhistochemischer Färbung durch fluoreszenzmarkierte Antikörper und die iNOS-mRNA mit einer *in-situ*-Hybridisierung durch iNOS-spezifische Oligonukleotide untersucht werden. Auch eine Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung, bei der fluoreszenzmarkierte zelsequenzspezifische Oligonukleotide eingesetzt werden, könnte zur Detektion der iNOS-mRNA genutzt werden. Um die Expression auch in lebenden Zellen über den gesamten Zeitraum der neuronalen Differenzen nachverfolgen zu können, ließe sich dieses System mit einem veränderten Cas9-Protein des CRISPR/Cas9-Systems erweitern. Dabei werden eine fluoreszenzmarkierte Leit-RNA und ein Cas9-Protein mit durch Mutation deaktivierter Nuklease-Aktivität (dCas9) eingesetzt. Die Leit-RNA und das dCas9 binden an der Zielsequenz und machen sie auf diese Weise sichtbar, ohne dass sie geschnitten wird. Im Gegensatz zur *in-situ*-Hybridisierung kann diese Methode auch in lebendigen Zellen durchgeführt werden (Wang 2019).

## 7 FAZIT UND AUSBLICK

Das durch die iNOS produzierte NO hat sowohl in physiologischen als auch in pathophysiologischen Prozessen des menschlichen Körpers eine wichtige Funktion. Aufgrund seiner cytotoxischen Wirkungen ist eine genaue Regulation der iNOS-Expression unabdingbar für einen funktionierenden Organismus und eine fehlerhafte Regulation der iNOS wird mit vielen Krankheiten in Verbindung gebracht (Qidwai 2010).

Die humane iNOS besitzt in der 5'-UTR ihres regulären Transkripts einen uORF, der anscheinend an der Regulation der iNOS-Expression beteiligt ist. Die phylogenetische Untersuchung des iNOS-Gens zeigte, dass zwar auch einige andere Säugetiere einen oder mehrere uORFs im iNOS-Transkript besitzen, aber das Startcodon des humanen uORF in seiner Sequenzumgebung einmalig ist. Vermutlich entstand dieses Startcodon erst in der späten Entwicklung des Menschen, da es selbst bei Primaten trotz hoher Sequenzhomologie nicht zu finden ist. Eine genaue Analyse der Sequenzumgebung des uORF-ATGs wies jedoch auf eine schwache Kozak-Sequenz hin, welche die Translatierbarkeit des uORFs in Frage stellte.

Transfektionsexperimente in humanen DLD1-Zellen zeigten, dass der uORF zwar generell translatierbar ist, aber nicht den Translationsstart an der *bona fide* iNOS-cds inhibiert. Außerdem konnte gezeigt werden, dass die iNOS-Translation cap-abhängig ist und dass die 5'-UTR keine IRES enthält. Bei einer inaktivierenden Mutation des uORF-ATGs zeigte sich keine Änderung in der Expression eines Reportergens. Wurde hingegen die Kozak-Sequenz des uORF optimiert, konnte eine deutliche Abnahme der Expression des Reportergens festgestellt werden. Damit wird die Translation der *bona fide* iNOS-cds am ehesten durch einen *leaky scanning*-Mechanismus beschrieben.

Die 5'-UTR der iNOS setzt sich aus dem ersten und einem Teil des zweiten iNOS-Exons zusammen, wobei das Stopcodon des uORF 39 nt vor der EEJ liegt. Dies lässt auf einen Einfluss durch den NMD schließen. Der *Knockdown* von UPF1 als Schlüsselenzym des NMD durch eine siRNA führte zu einer erhöhten Expression sowie Stabilität der iNOS-mRNA. Auch die Mutation des uORF in Reportergen-Konstrukten mit dem ersten iNOS-Intron vor einer Luciferase-cds führte zu einer erhöhten Expression des Reportergens. Diese Ergebnisse weisen auf eine direkte Regulation der iNOS-Expression durch den NMD hin.

Der gemessene Einfluss des NMD und des *leaky scanning*-Mechanismus war in allen durchgeführten Experimenten unabhängig von der Stimulation der Zellen mit Cytokinen. Das spricht dafür, dass es sich um basale Mechanismen handelt, welche die iNOS-Expression auch unter physiologischen Bedingungen ohne externe Stimuli regulieren.

Eine Untersuchung der Expression des uORFs durch ein *Ribosome Profiling* (Weaver 2019, Zhang 2019) könnte darüber hinaus Auskunft geben, ob der uORF in humanen Zellen exprimiert wird. Auch eine Mutation des uORF-ATGs durch CRISPR/Cas9 wäre eine Möglichkeit mehr über den uORF und die Funktion eines potenziell exprimierten Oligopeptids herauszufinden. Falls ein Oligopeptid translatiert wird, könnte dessen Einfluss auf die Stärke der iNOS-Expression, deren Dauer oder auch die gesamte Zelle überprüft werden. Hierfür könnte eine Überexpression zum Beispiel durch zusätzliche Transfektion eines Plasmids, welches für das uORF-Peptid kodiert, induziert werden.

Neben der Rolle im Immunsystem spielt die iNOS auch eine wichtige Rolle in der Entwicklung von Nervenzellen. Die genauen Mechanismen dahinter sind allerdings bisher nicht vollständig bekannt (Gibbs 2003, Chong 2018). In Zeiten immer häufiger aufkommender neurodegenerativer Erkrankungen, wie zum Beispiel Parkinson, steigt auch der Bedarf an grundlegendem Verständnis der Neurogenese zur Schaffung neuer Therapieansätze. Hierfür sollten in dieser Doktorarbeit erste Grundlagen zum Verständnis der Funktion der iNOS in der neuronalen Entwicklung und damit abseits des Immunsystems geschaffen werden. Durch Analyse ihrer Expression und Struktur in Abhängigkeit vom Zeitpunkt innerhalb der Differenzierung von humanen Stammzellen zu Neuronen sollte das Potential in der Therapie neurodegenerativer Erkrankungen und in der Qualitätskontrolle der Differenzierung ergründet werden.

Datenbank- und qRT-Analysen zeigten neben der iNOS-Expression in der frühen embryonalen Entwicklung des menschlichen Gehirns eine Expression der iNOS in den ersten Tagen der Differenzierung humaner iPSCs und ESCs nach unterschiedlichen Differenzierungsprotokollen. Sequenzspezifische Analysen zum Zeitpunkt der höchsten iNOS-Expression zeigten zudem sowohl eine signifikant geringere Expression der ersten beiden Exons des regulären iNOS-Transkripts als auch einen im Vergleich zum regulären iNOS-Transkript verschobenen TSS. 5'-RACE-Experimente bestätigten das Fehlen der ersten beiden Exons, das Auftauchen eines anderen Exons im Transkript der iNOS und somit die aus den Sequenzanalysen ermittelte



---

neue iNOS-Transkriptvariante. Das neuronale Exon 1 befindet sich im Bereich des ersten Exons der früher annotierten iNOS-Transkriptvariante X2 (bzw. NOS2-203) und damit in der Gensequenz des zweiten Introns der regulären iNOS. Damit besitzt das neuronale iNOS-Transkript eine andere 5'-UTR sowie eine andere protein-kodierende Sequenz. Aufgrund dessen fehlt der uORF der regulären iNOS-mRNA und das DINNN-Motiv in der Peptidsequenz. Sequenzanalysen zeigten zudem eine mögliche Promotorstelle durch eine CpG-Insel am TSS dieser Transkriptvariante, mehrere potenzielle Bindestellen für Transkriptionsfaktoren und verschiedene Methylierungsmuster je nach Zelllinie. Damit könnte die neuronale iNOS schon auf Promotorebene anders reguliert sein als die reguläre, an der Immunantwort beteiligte iNOS. Aufgrund der Strukturähnlichkeit zur iNOS ist die neuronale iNOS zudem auch abzugrenzen von der nNOS, die in ausgereiften Neuronen eine entscheidende Rolle als Produzent von NO als Neurotransmitter spielt.

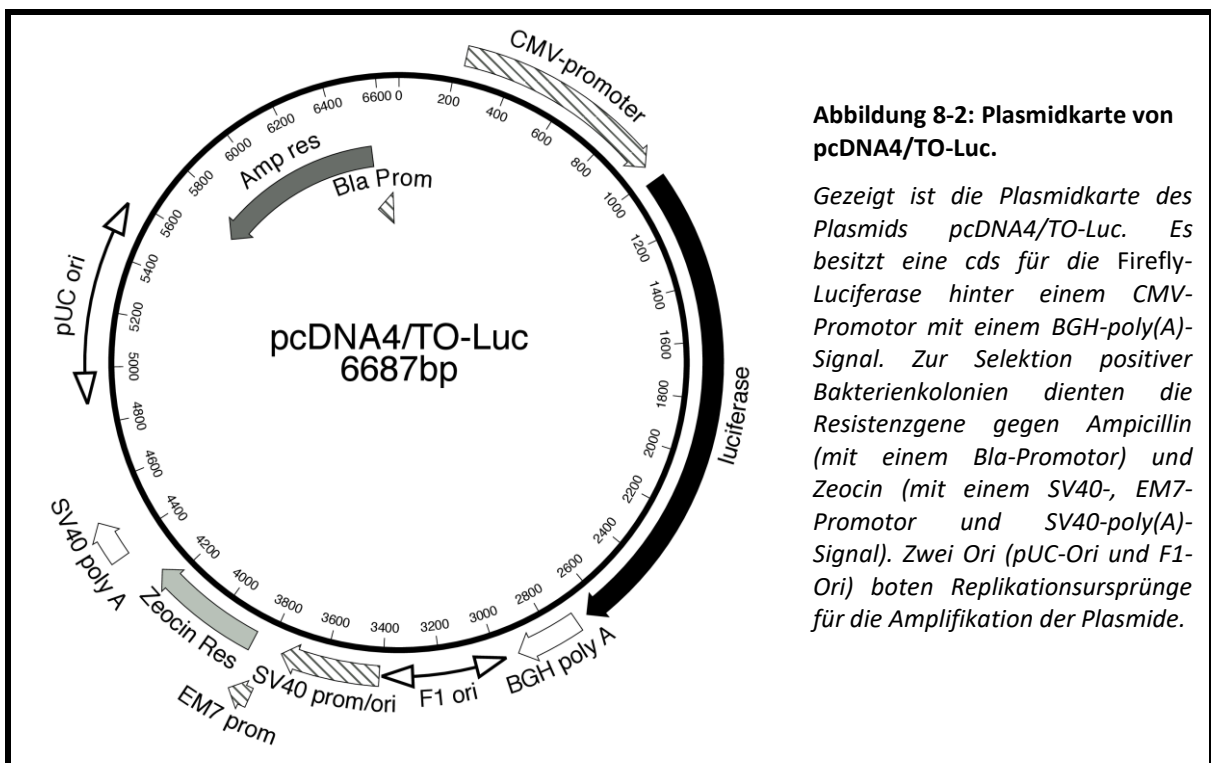
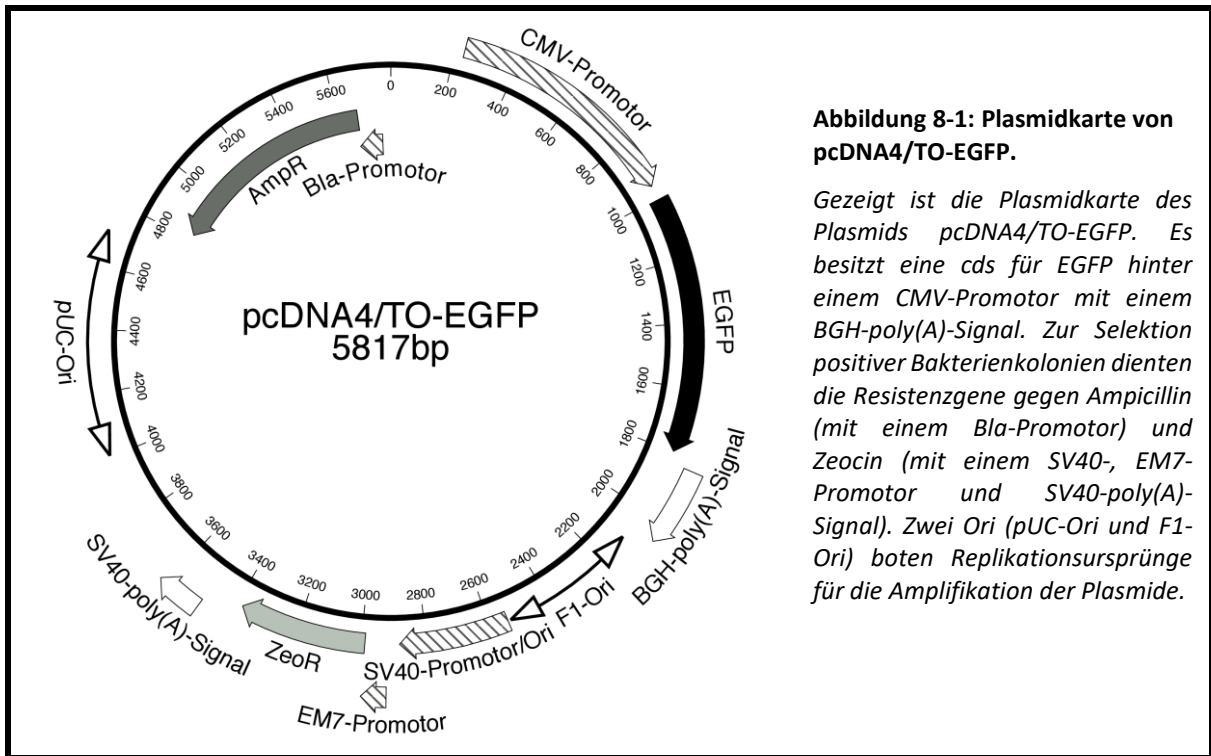
Eine weitere Analyse der neuronalen iNOS-Expression unter dem Gesichtspunkt der Promotorregulation sowie eine Funktionsanalyse des veränderten iNOS-Proteins im Vergleich zur regulären iNOS könnte Auskünfte über die allgemeine Funktion der iNOS in der neuronalen Differenzierung liefern. So könnten mit Reportergenexperimenten und *Pulldown*-Versuchen die verschiedenen Mechanismen, die an der Regulation der neuronalen iNOS-Expression beteiligt sind, untersucht werden. Mit Hilfe von DAF-2 DA könnte die Aktivität der iNOS während der Differenzierung nachverfolgt werden. Durch dauerhaften *Knockout* der iNOS, zum Beispiel mit Hilfe des CRISPR/Cas9-Systems oder transienten *Knockdown* mit Hilfe einer siRNA, wäre eine morphologische und transkriptomweite Untersuchung des Einflusses der iNOS möglich. Die Hypothese, dass die iNOS an der DNA-Methylierung durch DNMTs beteiligt ist, könnte in diesen Zelllinien ebenfalls durch Analyse der allgemeinen sowie spezifischer DNA-Methylierungsmuster überprüft werden.

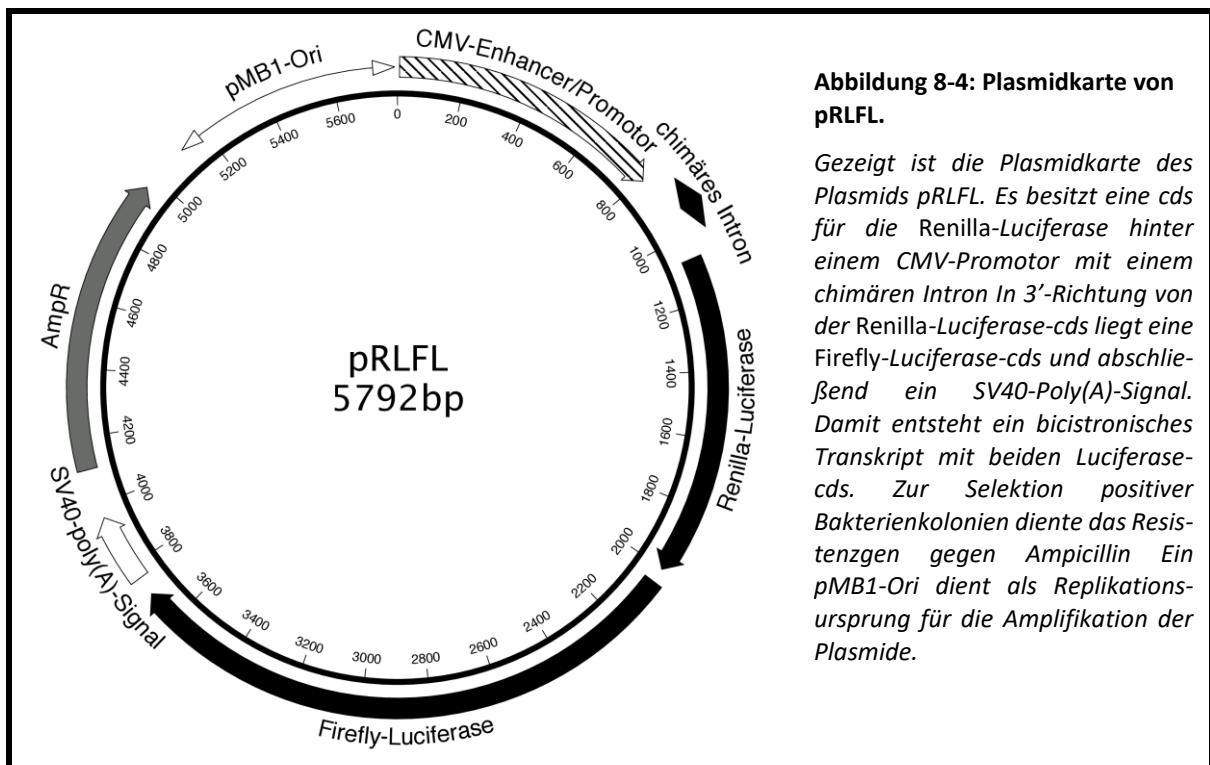
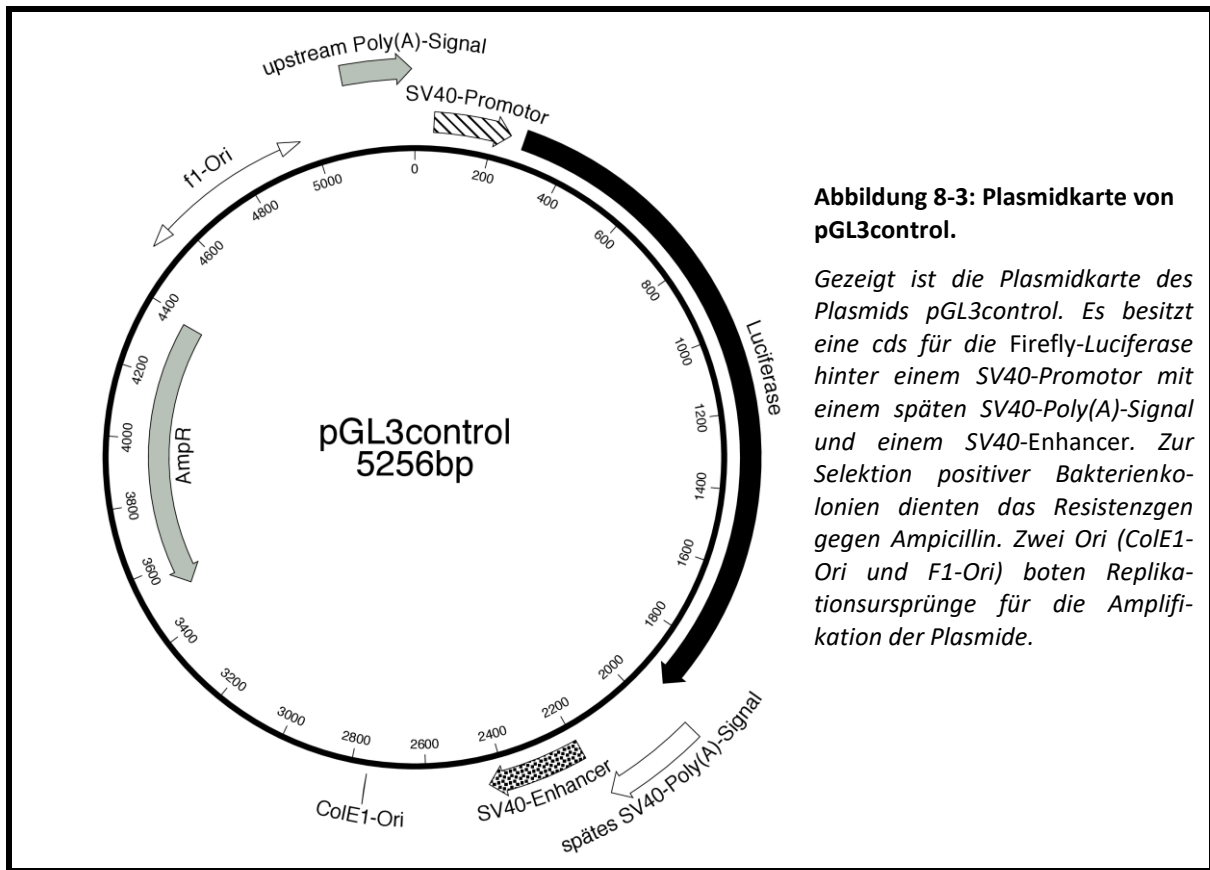
Insgesamt konnte gezeigt werden, welche wichtige Rolle der uORF in der Regulation der regulären iNOS durch *leaky scanning* und den NMD einnimmt und dass die Funktion der iNOS in der neuronalen Entwicklung auf eine andere Isoform der iNOS zurückgeführt werden kann. Die neuronale iNOS kann damit von der regulären iNOS und ihrer Funktion im Immunsystem getrennt betrachtet werden und es bleibt weiterhin zu untersuchen wie stark die Unterschiede in der Regulation und Funktion beider Isoformen sind. Dadurch bieten sich neue Ziele

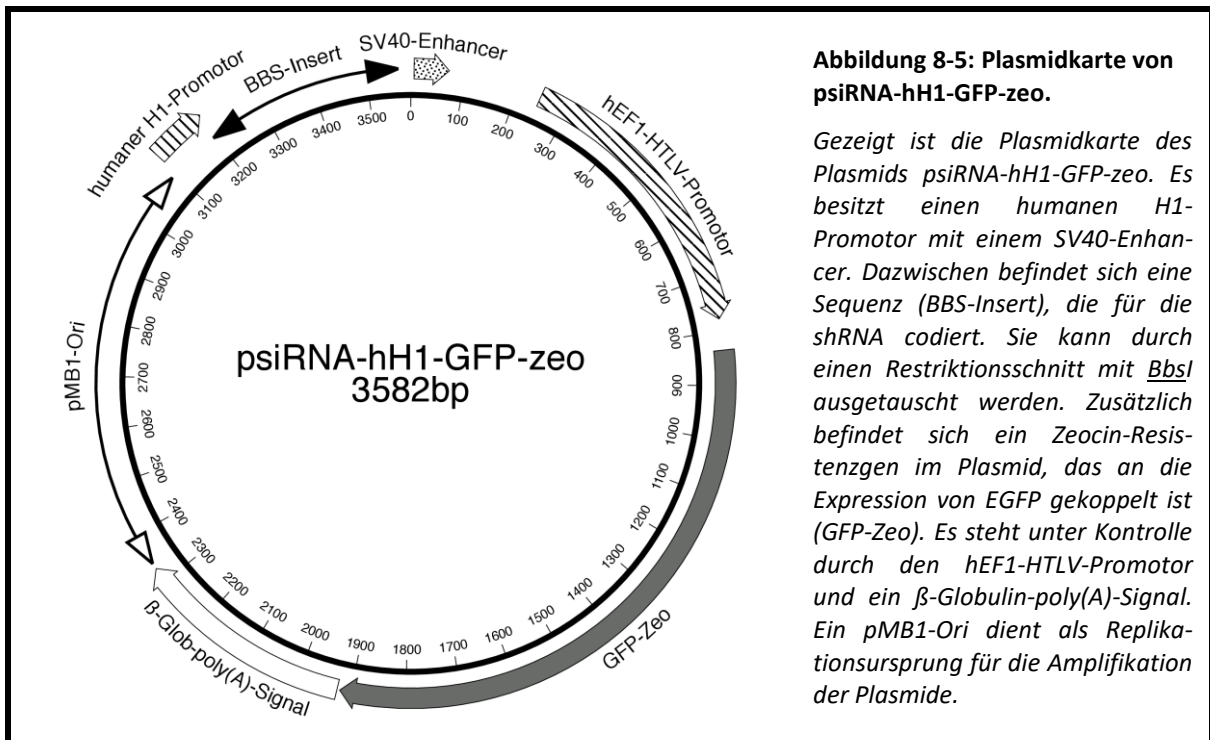
für Therapien und die Adressierung der verschiedenen iNOS-Formen zur gezielteren Beeinflussung ihrer Funktion im Immunsystem oder der Neurogenese.

## 8 ANHANG

### 8.1 Verwendete Plasmide

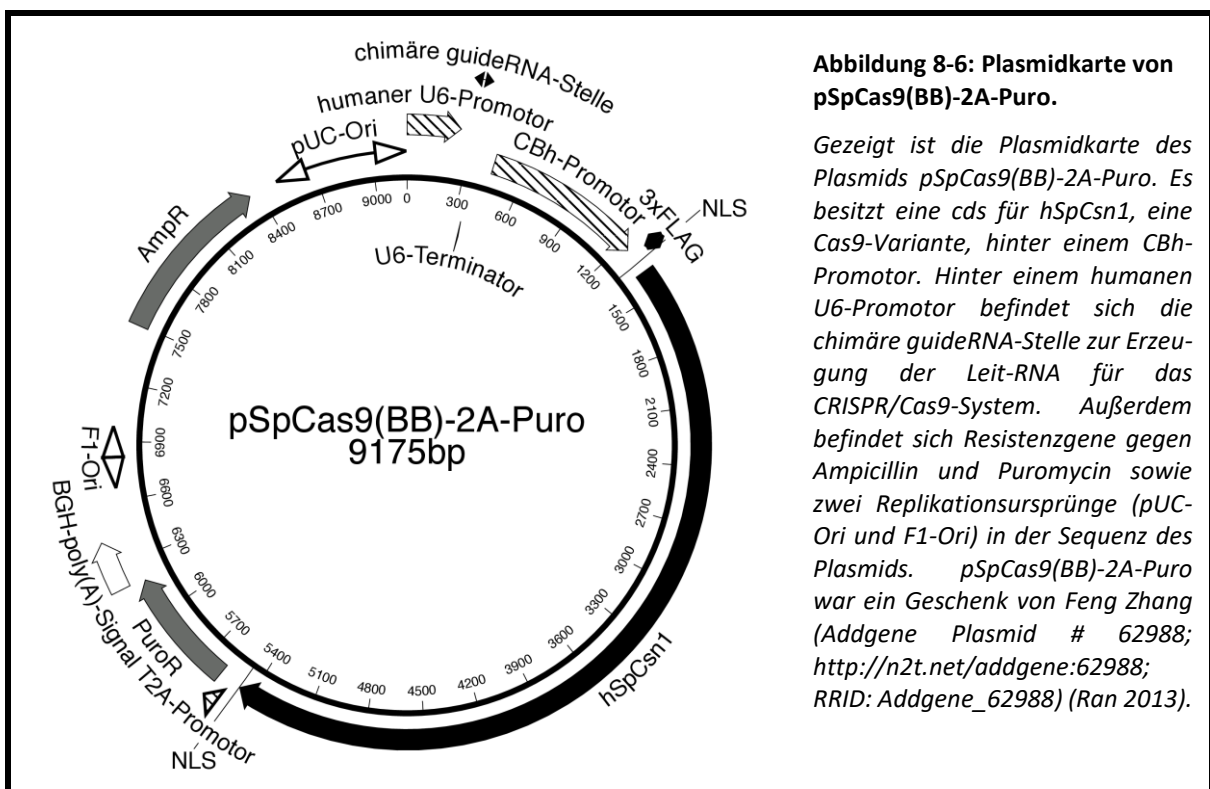






**Abbildung 8-5: Plasmidkarte von psiRNA-hH1-GFP-zeo.**

Gezeigt ist die Plasmidkarte des Plasmids psiRNA-hH1-GFP-zeo. Es besitzt einen humanen H1-Promotor mit einem SV40-Enhancer. Dazwischen befindet sich eine Sequenz (BBS-Insert), die für die shRNA codiert. Sie kann durch einen Restriktionsschnitt mit *BbsI* ausgetauscht werden. Zusätzlich befindet sich ein Zeocin-Resistenzgen im Plasmid, das an die Expression von EGFP gekoppelt ist (GFP-Zeo). Es steht unter Kontrolle durch den hEF1-HTLV-Promotor und ein  $\beta$ -Globulin-poly(A)-Signal. Ein pMB1-Ori dient als Replikationsursprung für die Amplifikation der Plasmide.

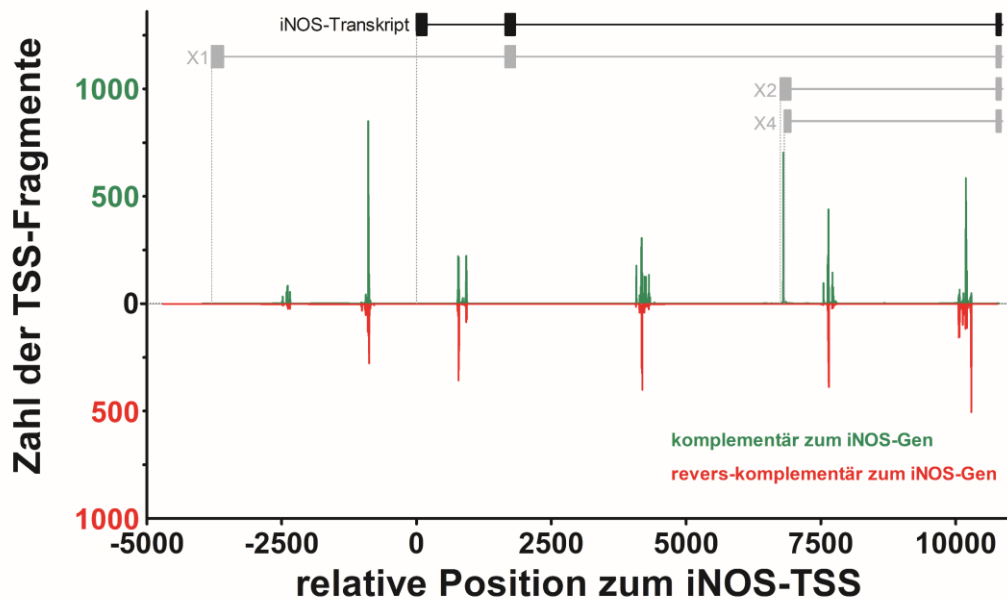


**Abbildung 8-6: Plasmidkarte von pSpCas9(BB)-2A-Puro.**

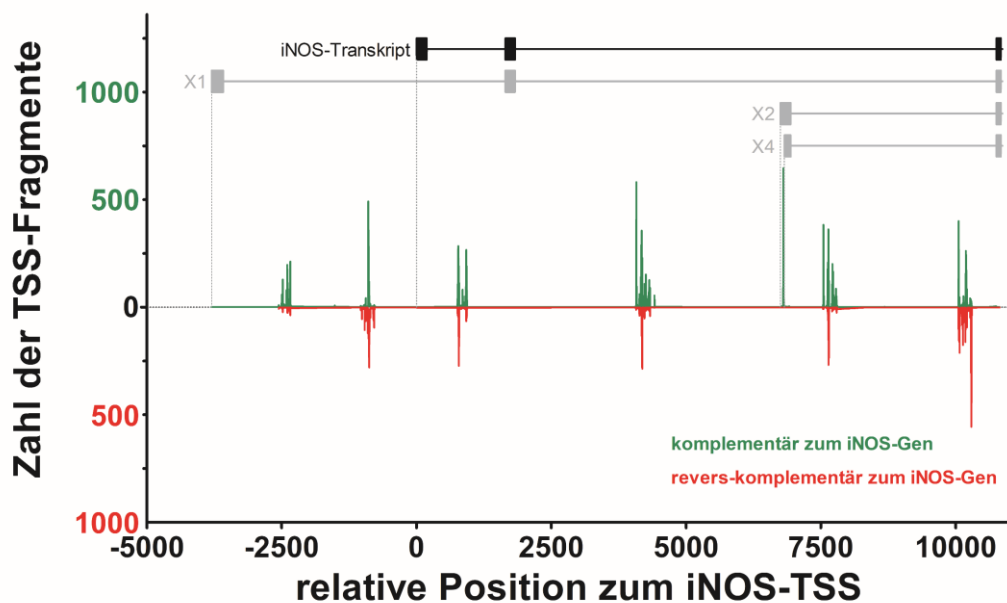
Gezeigt ist die Plasmidkarte des Plasmids pSpCas9(BB)-2A-Puro. Es besitzt eine cds für hSpCsn1, eine Cas9-Variante, hinter einem CBh-Promotor. Hinter einem humanen U6-Promotor befindet sich die chimäre guideRNA-Stelle zur Erzeugung der Leit-RNA für das CRISPR/Cas9-System. Außerdem befindet sich Resistenzgene gegen Ampicillin und Puromycin sowie zwei Replikationsursprünge (pUC-Ori und F1-Ori) in der Sequenz des Plasmids. pSpCas9(BB)-2A-Puro war ein Geschenk von Feng Zhang (Addgene Plasmid # 62988; <http://n2t.net/addgene:62988>; RRID: Addgene\_62988) (Ran 2013).

## 8.2 Zusätzliche Daten der FANTOM5-Studie

a)



b)



**Abbildung 8-7: Zahl der TSS-Fragmente nach CAGE-Analyse des Replikats 1 an Tag 6 der DS-Studie.**

Aus den CAGE-Daten der FANTOM5-Studien zur DS wurden die absoluten Signale bezogen auf die relative Position der TSS im Bezug zum regulären iNOS-TSS dargestellt. Die Zahl der Fragmente für das Replikate 2 (a) und 3 (b) der Wildtyp-Proben an Tag 6 der Differenzierung (Library-ID: CNhs13823 (a) bzw. CNhs14050 (b), iPS differentiation to neuron, control donor C11-CRL2429) wurde über BlastN (Altschul 1997) in Bezug auf die den regulären iNOS-TSS umgebende Sequenz berechnet. Dabei wurden die Fragmente, die komplementär zum iNOS-Gen sind im grünen und die revers-komplementären Fragmente im roten Teil des Diagramms gezeigt. Zur besseren Orientierung sind sowohl die Exons des regulären iNOS-Transkripts als auch der verschiedenen putativen Transkriptionsvarianten (X1, X2 und X4) als schwarze bzw. graue Balken und der jeweils annotierte TSS mit senkrechten Linien dargestellt.

## 8.3 Sequenzierung nach dem 5'-RACE

In den folgenden Abbildungen sind die Sequenzierungsdaten nach dem 5'-RACE gezeigt. Nach der Aufreinigung der PCR-Fragmente wurden sie von der StarSEQ® GmbH in Mainz sequenziert. Die Diagramme zeigen die gemessenen Signale für die Basen, wobei aufgrund der Sequenzierung mit einem reverse-Primer die Sequenzen revers-komplementär zur mRNA-Sequenz des 5'-RACE sind.

### 8.3.1 DLD1-Zellen

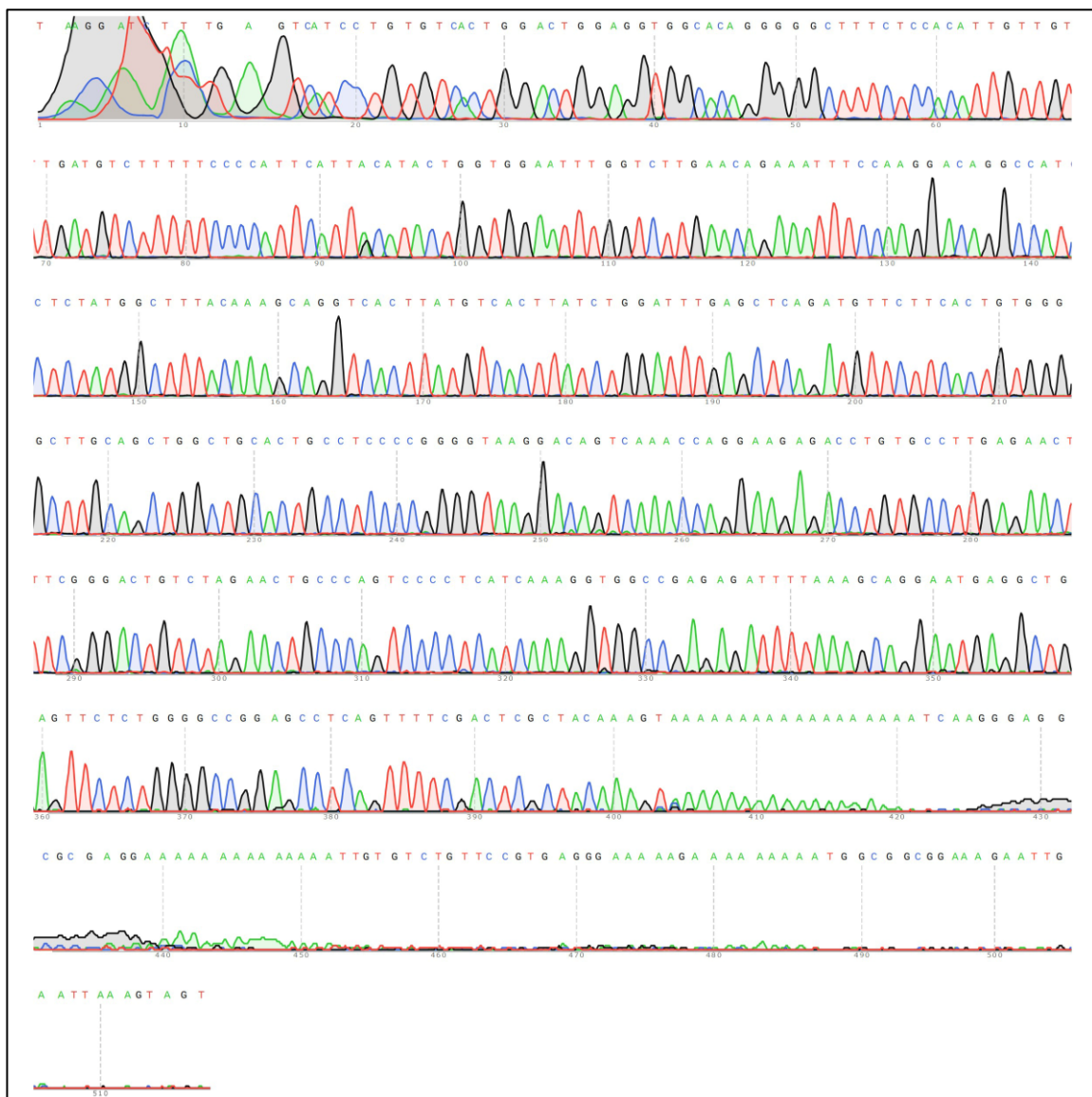
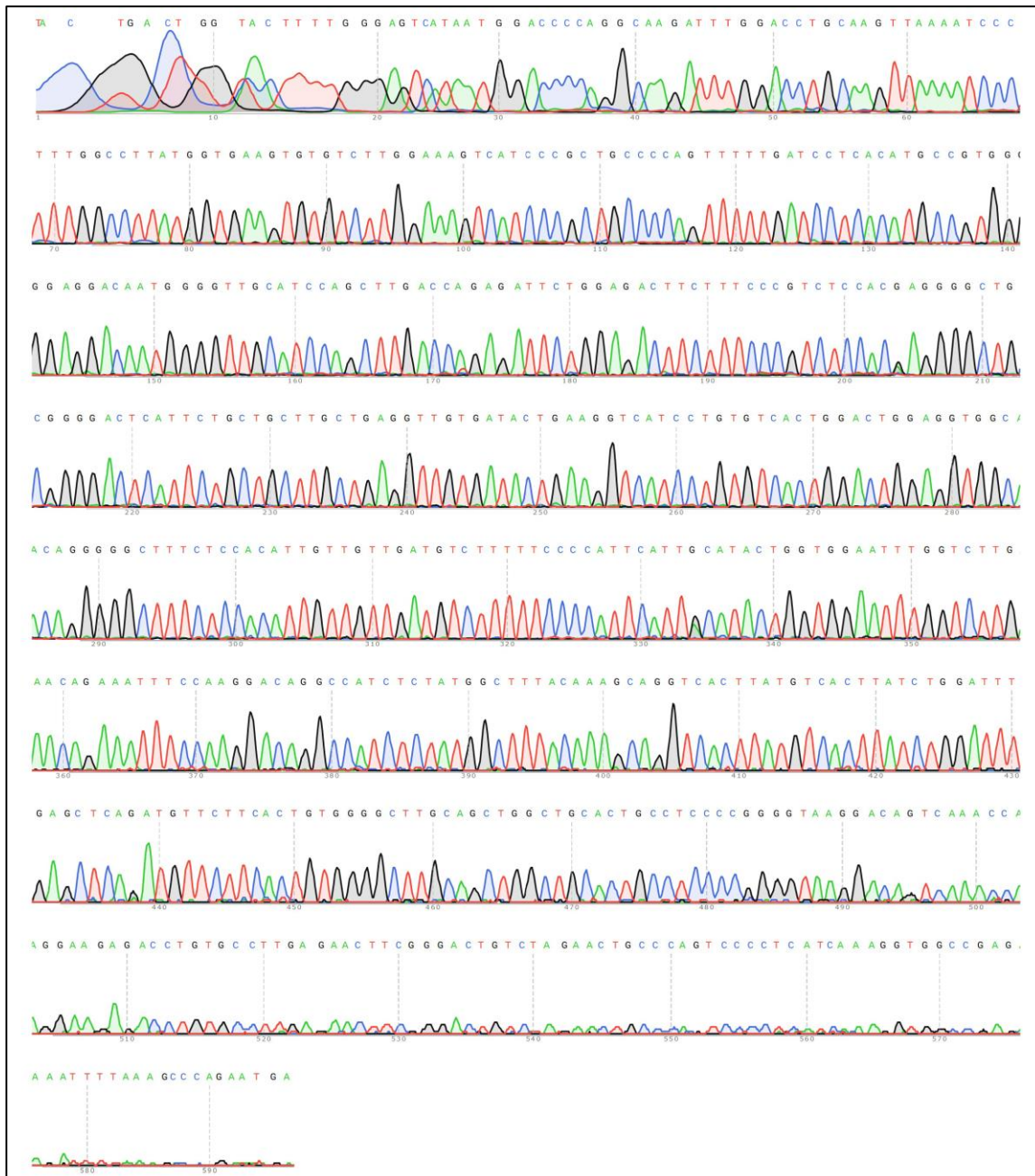


Abbildung 8-8: Sequenzierungsdaten des Fragments DLD1-1.

Gezeigt ist das Sequenzierungsergebnis der Sequenzierung des PCR-Fragments DLD1-1 (siehe Kapitel 5.2 und Abbildung 5-3).





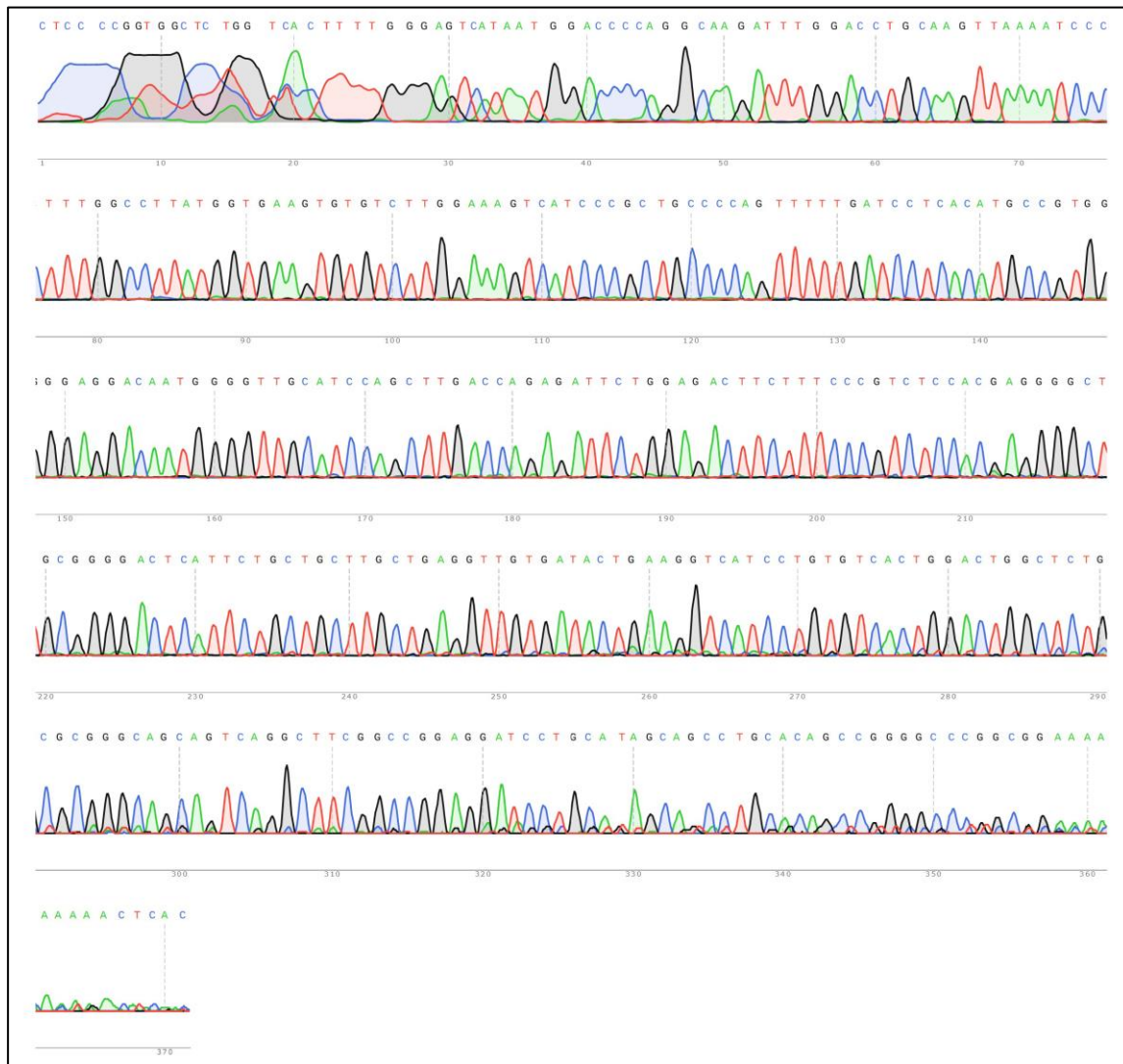
**Abbildung 8-9: Sequenzierungsdaten des Fragments DLD1-2.**

Gezeigt ist das Sequenzierungsergebnis der Sequenzierung des PCR-Fragments DLD1-2 (siehe Kapitel 5.6.3 und Abbildung 5-48).





## 8.3.2 Neuronen



**Abbildung 8-11: Sequenzierungsdaten des Fragments C16-1.**

Gezeigt ist das Sequenzierungsergebnis der Sequenzierung des PCR-Fragments C16-1 (siehe Kapitel 5.6.3 und Abbildung 5-48).







## 8.4 Putatives neuronales iNOS-Transkript

CGTGGAGCCA GCGGAGCTGC GCCTAAGGAG CCGGGCCATG CGCGAGGGGC TGGGCGCGGC  
GTGCGAGGCC GCCGGGCCCC GGCTGTGCAG GCTGCTCTGC AGGATCCTCC GGCCGAAGCC  
TGACTGCTGC CCGCGCAGAG CCAGTCCAGT GACACAGGAT GACCTTCAGT ATCACAACT  
CAGCAAGCAG CAGAATGAGT CCCCGCAGCC CCTCGTGGAG ACGGGAAAGA AGTCTCCAGA  
ATCTCTGGTC AAGCTGGATG CAACCCCAT GTCCTCCCA CGGCATGTGA GGATCAAAAA  
CTGGGGCAGC GGGATGACTT TCCAAGACAC ACTTCACCAT AAGGCCAAAG GGATTTTAAC  
TTGCAGGTCC AAATCTTGCC TGGGGTCCAT TATGACTCCC AAAAGTTTGA CCAGAGGACC  
CAGGGACAAG CCTACCCCTC CAGATGAGCT TCTACCTCAA GCTATCGAAT TTGTCAACCA  
ATATTACGGC TCCTTCAAAG AGGCAAAAAT AGAGGAACAT CTGGCCAGGG TGGAAGCGGT  
AACAAAGGAG ATAGAAACAA CAGGAACCTA CCAACCTGACG GGAGATGAGC TCATCTTCGC  
CACCAAGCAG GCCTGGCGCA ATGCCCCACG CTGCATTGGG AGGATCCAGT GGTCCAACCT  
GCAGGTCTTC GATGCCCGCA GCTGTTCCAC TGCCCGGGAA ATGTTTGAAC ACATCTGCAG  
ACACGTGCGT TACTCCACCA ACAATGGCAA CATCAGGTGC GCCATCACCG TGTTCCCCCA  
GCGGAGTGAT GGCAAGCACG ACTTCCGGGT GTGGAATGCT CAGCTCATCC GCTATGCTGG  
CTACCAGATG CCAGATGGCA GCATCAGAGG GGACCCTGCC AACGTGGAAT TCACTCAGCT  
GTGCATCGAC CTGGGCTGGA AGCCCAAGTA CGGCCGCTTC GATGTGGTCC CCCTGGTCCT  
GCAGGCCAAT GGCCGTGACC CTGAGCTCTT CGAAATCCCA CCTGACCTTG TGCTTGAGGT  
GGCCATGGAA CATCCCAAAT ACGAGTGGTT TCGGGAACTG GAGCTAAAGT GGTACGCCCT  
GCCTGCAGTG GCCAACATGC TGCTTGAGGT GGGCGCCTG GAGTTCCCAG GGTGCCCTT  
CAATGGCTGG TACATGGGCA CAGAGATCGG AGTCCGGGAC TTCTGTGACG TCCAGCGCTA  
CAACATCCTG GAGGAAGTGG GCAGGAGAAT GGGCTGGAA ACGCACAAGC TGGCCTCGCT  
CTGGAAAGAC CAGGCTGTCG TTGAGATCAA CATTGCTGTG CTCCATAGTT TCCAGAAGCA  
GAATGTGACC ATCATGGACC ACCACTCGGC TGCAGAATCC TTCATGAAGT ACATGCAGAA  
TGAATACCGG TCCCGTGGGG GCTGCCCGGC AGACTGGATT TGGCTGGTCC CTCCCATGTC  
TGGGAGCATC ACCCCGTGT TTCACCAGGA GATGCTGAAC TACGTCCTGT CCCCTTTCTA  
CTACTATCAG GTAGAGGCCT GGAAAACCCA TGTCTGGCAG GACGAGAAGC GGAGACCCAA  
GAGAAGAGAG ATTCCATTGA AAGTCTTGGT CAAAGCTGTG CTCTTTGCCT GTATGCTGAT  
GCGCAAGACA ATGGCGTCCC GAGTCAGAGT CACCATCCTC TTTGCGACAG AGACAGGAAA  
ATCAGAGGCG CTGGCCTGGG ACCTGGGGGC CTTATTACAGC TGTGCCTTCA ACCCCAAGGT  
TGTCTGCATG GATAAGTACA GGCTGAGCTG CCTGGAGGAG GAACGGCTGC TGTTGGTGGT  
GACCAGTACG TTTGGAATG GAGACTGCC TGGCAATGGA GAGAACTGA AGAAATCGCT  
CTTCATGCTG AAAGAGCTCA ACAACAAATT CAGGTACGCT GTGTTTGGCC TCGGCTCCAG  
CATGTACCCT CGTCTGCG CCTTTGCTCA TGACATTGAT CAGAAGCTGT CCCACCTGGG  
GGCCTCTCAG CTCACCCCGA TGGGAGAAGG GGATGAGCTC AGTGGGCAGG AGGACGCCTT  
CCGCAGCTGG GCCGTGCAA CCTTCAAGGC AGCCTGTGAG ACGTTTGATG TCCGAGGCAA  
ACAGCACATT CAGATCCCCA AGCTCTACAC CTCCAATGTG ACCTGGGACC CGCACCACTA  
CAGGCTCGTG CAGGACTCAC AGCCTTTGGA CCTCAGCAA GCCCTCAGCA GCATGCATGC  
CAAGAACGTG TTCACCATGA GGCTCAAATC TCGGCAGAAT CTACAAAGTC CGACATCCAG  
CCGTGCCACC ATCCTGGTGG AACTCTCCTG TGAGGATGGC CAAGGCCTGA ACTACCTGCC  
GGGGGAGCAC CTTGGGGTTT GCCCAGGCAA CCAGCCGGCC CTGGTCCAAG GTATCCTGGA  
GCGAGTGGTG GATGGCCCCA CACCCACCA GACAGTGCGC CTGGAGGCC TGGATGAGAG

```

TGGCAGCTAC TGGGTCAGTG ACAAGAGGCT GCCCCCCTGC TCACTCAGCC AGGCCCTCAC
CTACTTCCTG GACATCACCA CACCCCAAC CCAGCTGCTG CTCCAAAAGC TGGCCCAGGT
GGCCACAGAA GAGCCTGAGA GACAGAGGCT GGAGGCCCTG TGCCAGCCCT CAGAGTACAG
CAAGTGGAAG TTCACCAACA GCCCCACATT CCTGGAGGTG CTAGAGGAGT TCCCCTCCCT
GCGGGTGTCT GCTGGCTTCC TGCTTTCCCA GCTCCCCATT CTGAAGCCA GGTTCTACTC
CATCAGCTCC TCCCGGGATC ACACGCCAC AGAGATCCAC CTGACTGTGG CCGTGGTCAC
CTACCACACC CGAGATGGCC AGGGTCCCCT GCACCACGGC GTCTGCAGCA CATGGCTCAA
CAGCCTGAAG CCCCAAGACC CAGTGCCCTG CTTTGTGCGG AATGCCAGCG GCTTCCACCT
CCCCGAGGAT CCCTCCCATC CTTGCATCCT CATCGGGCCT GGCACAGGCA TCGCGCCCTT
CCGCAGTTTC TGGCAGCAAC GGCTCCATGA CTCCAGCAC AAGGGAGTGC GGGGAGGCCG
CATGACCTTG GTGTTTGGGT GCCGCCGCC AGATGAGGAC CACATCTACC AGGAGGAGAT
GCTGGAGATG GCCAGAAGG GGGTGCTGCA TGCGGTGCAC ACAGCCTATT CCCGCCTGCC
TGGCAAGCCC AAGGTCTATG TTCAGGACAT CCTGCGGCAG CAGCTGGCCA GCGAGGTGCT
CCGTGTGCTC CACAAGGAGC CAGGCCACCT CTATGTTTGC GGGGATGTGC GCATGGCCCG
GGACGTGGCC CACACCCTGA AGCAGCTGGT GGCTGCCAAG CTGAAATTGA ATGAGGAGCA
GGTCGAGGAC TATTTCTTTC AGCTCAAGAG CCAGAAGCGC TATCACGAAG ATATCTTTGG
TGCTGTATTT CTTACGAGG CGAAGAAGGA CAGGGTGGCG GTGCAGCCCA GCAGCCTGGA
GATGTCAGCG CTCTGAGGGC CTACAGGAGG GGTTAAAGCT GCCGGCACAG AACTTAAGGA
TGGAGCCAGC TCTGCATTAT CTGAGGTCAC AGGGCCTGGG GAGATGGAGG AAAGTGATAT
CCCCAGCCT CAAGTCTTAT TTCCTCAACG TTGCTCCCA TCAAGCCCTT TACTTGACCT
CCTAACAAGT AGCACCTGG ATTGATCGGA GCCTCCTCTC TCAAAGTGGG GCCTCCCTGG
TCCCTTGAG ACAAAATCTT AAATGCCAGG CCTGGCAAGT GGGTGAAAGA TGGAAGTTGC
TGCTGAGTGC ACCACTTCAA GTGACCACCA GGAGGTGCTA TCGCACCCT GTGTATTTAA
CTGCCTTG TG TACAGTTATT TATGCCTCTG TATTTAAAAA ACTAACACCC AGTCTGTTCC
CCATGGCCAC TTGGGTCTTC CCTGTATGAT TCCTTGATGG AGATATTTAC ATGAATTGCA
TTTTACTTTA ATCACACTGT ATGCGTGTGT GGGTGTTTTG TAGGGAAAGC TCTTCTCAGA
GTGGGGAGCT GGTGGGTGTC ACAGCCTGGA CAGATCCCCG ACAGAGGGAC ACCCCAGCCA
GTCCATGGCT CCTCTGAAAT GGCTGCCAGG TGTGCCAGCA GCAGATGGAG CTTCGTGCTG
GTCCAAAGAC CTGTGGTAGG GCAGGGGGCG CAGGCCTGCC TCCCACACAA AGTATCTGAA
ACGGGGTCTG GTGAGGGTGG GATTGTGCGA TAAGGCCAGT GTTTCGAGGA AGGCCTTGAG
CTTCTTCTTG GACACTGTCT TAGAAAGCGT TTTGCTCTGG GGCCACCAGT CTCATGCGAG
ACTGTGCCTT GGCCAGTACG GATGTGGTCC CTGGGAAGGC AGCGTGTGCGA GCGAGTGTG
GGCCACAGCA TCCTCGCCTG AGGACTGGG GACCCTCTTG GGTTTGGAGC AGGCCAAGGA
AGCCTTCTTA GGAGAGTGGG CCCCCTTCC TTCTCCTGGT CAGAACCAA AAAGGAGCTC
AGCGGCGGCC ACTGGGTCC TGGCAACACA CGGCTCCCAG CTTAGGTTTG GCCTCTGCCT
CCTGGGTGCC CTGGCCGACT TCACCCCTT GCCCGCCACC TTCCCCTTCT AGCAGTAGCA
TCTCAGGGGC

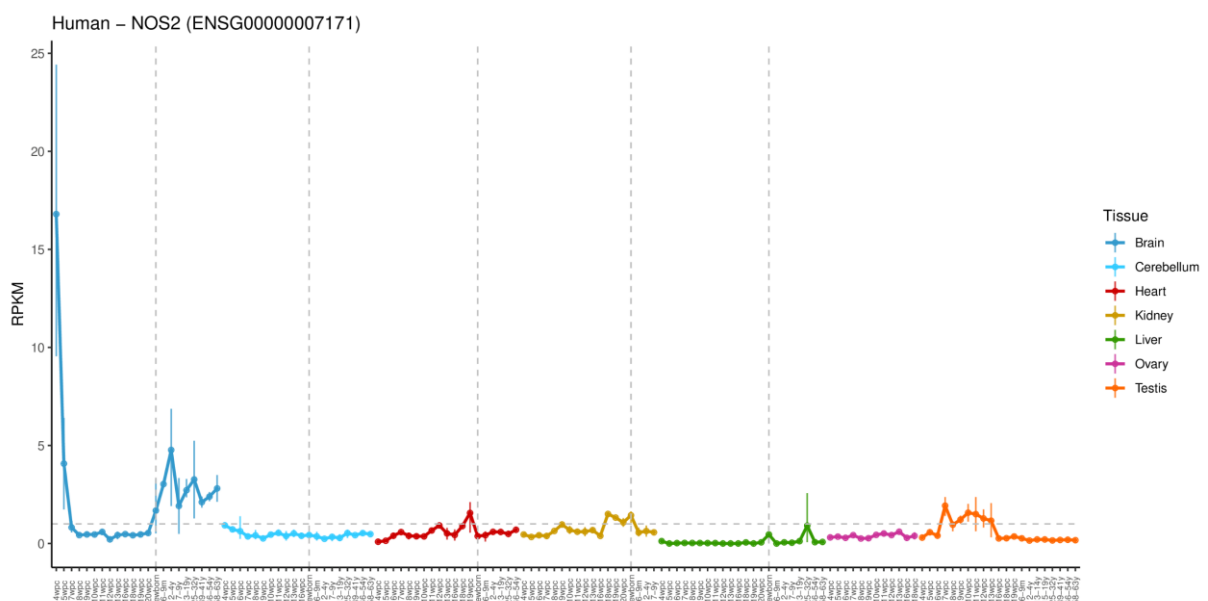
```

**Abbildung 8-16: Sequenz des berechneten neuronalen iNOS-Transkripts aus den Daten von Yuanyuan Li und Ran Wang et al.**

Dargestellt ist die Sequenz des neuronalen iNOS-Transkripts, die mit Hilfe des Programms CLC Genomic workbench und dem Transcript Discovery Plugin von Qiagen berechnet wurde. Als Grundlage dienten die RNAseq-Daten der Zellproben von Tag 14 der neuronalen Differenzierung von hESC durch Yuanyuan Li und Ran Wang et al. (Li 2017). Die homologen Sequenzen zum regulären iNOS-Transkript (unterstrichen) und die cds (grau hinterlegt) sind markiert.

## 8.5 Daten zur iNOS-Expression während der Entwicklung verschiedener Organe in Säugetieren

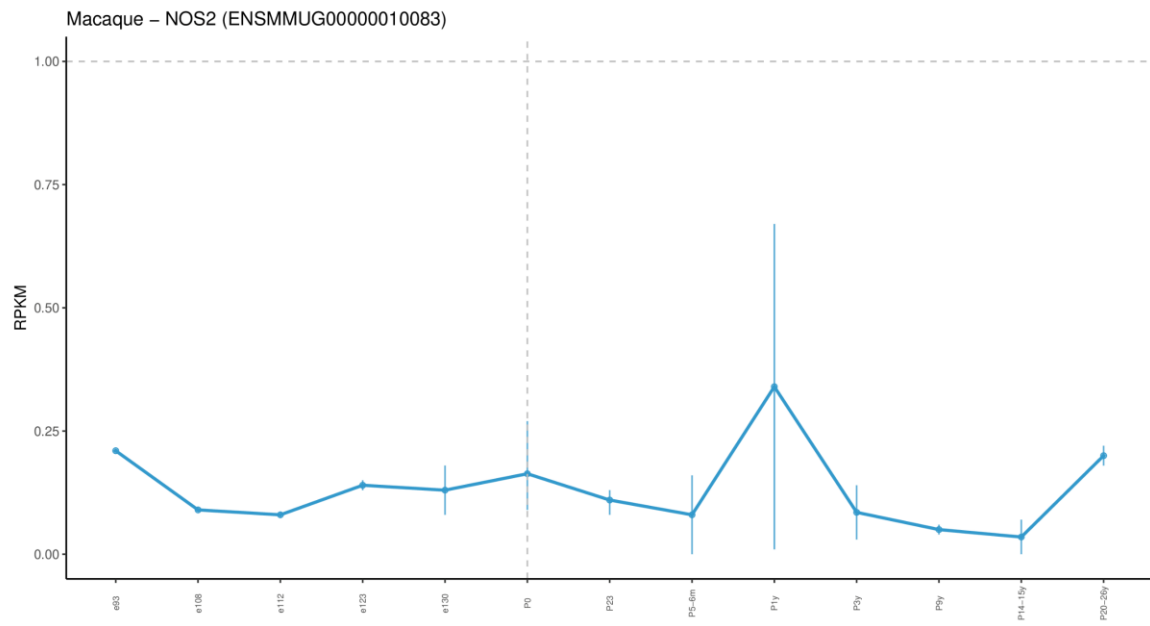
In den folgenden Abbildungen sind zusätzliche Daten des Transkriptom-Projekts von Margarida Cardoso-Moreira et al. gezeigt, die sie auf ihrer Internetseite <https://apps.kaessmannlab.org/evodevoapp/> (30.09.2019) zur Verfügung gestellt haben. Abbildung 8-17 zeigt die Expression der iNOS in allen untersuchten Organen (Gehirn, Kleinhirn, Herz, Niere, Leber, Eierstöcke und Hoden). Abbildung 8-18 zeigt die Expression der iNOS in der Entwicklung des Gehirns verschiedener Säugetiere (Makak, Maus, Opossum und Kaninchen). Daten zur Expression der iNOS in der Ratte waren nicht vorhanden. Im Gegensatz zu den humanen Proben liegen bei den anderen Säugetieren keine Proben der frühen Entwicklung im Mutterleib vor. Bei den Makakenproben stammt die erste Probe von Embryos 93 Tage nach der Befruchtung der Eizelle (e93), bei den Mausproben 10,5 Tage (10,5), bei den Opossumproben existiert nur eine Probe vor der Geburt (e13,5) und beim Kaninchen beginnen die Proben mit e12, also 12 Tage nach der Befruchtung. In allen Gehirnproben dieser Säugetiere wurde die RPKM von 1 nicht überschritten und es konnte damit keine signifikante iNOS-Expression gemessen werden (Cardoso-Moreira 2019).



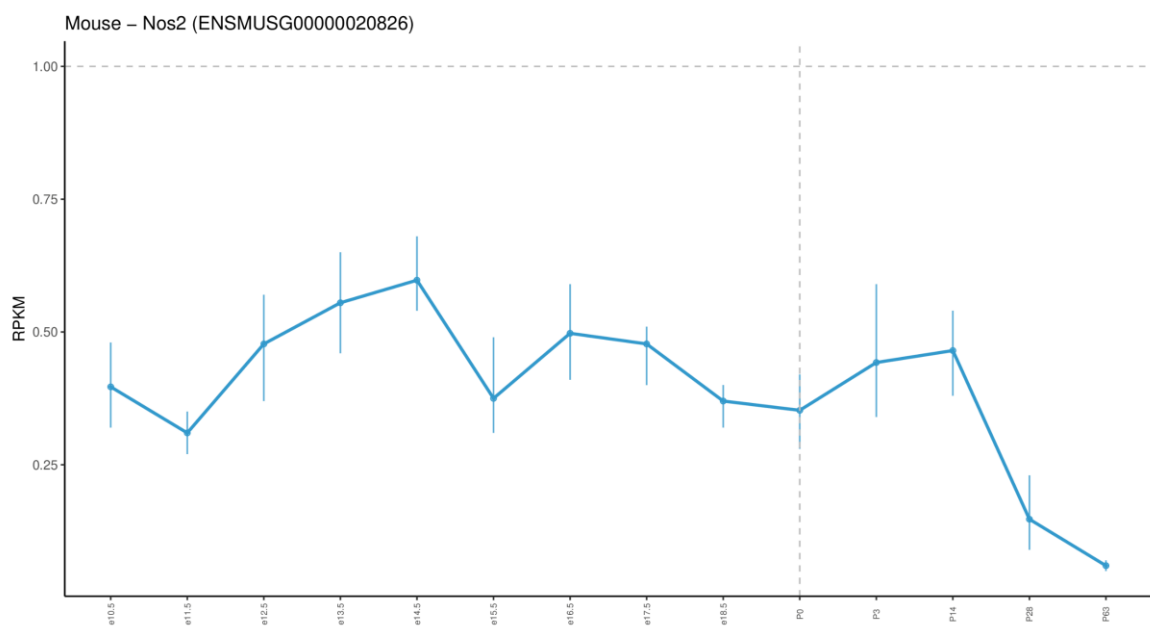
**Abbildung 8-17: iNOS-Expression während der Entwicklung verschiedener Organe des Menschen.**

Gezeigt sind die RPKM-Werte (reads per kilobase of exon model per million mapped reads) der iNOS-Expression in verschiedenen Organen für die verschiedenen Entwicklungszeitpunkte nach Normalisierung der RNAseq-Daten mit EdgeR (v.3.14.0). wpc: Wochen nach der Befruchtung der Eizelle (weeks post-conception) (Cardoso-Moreira 2019)

a)

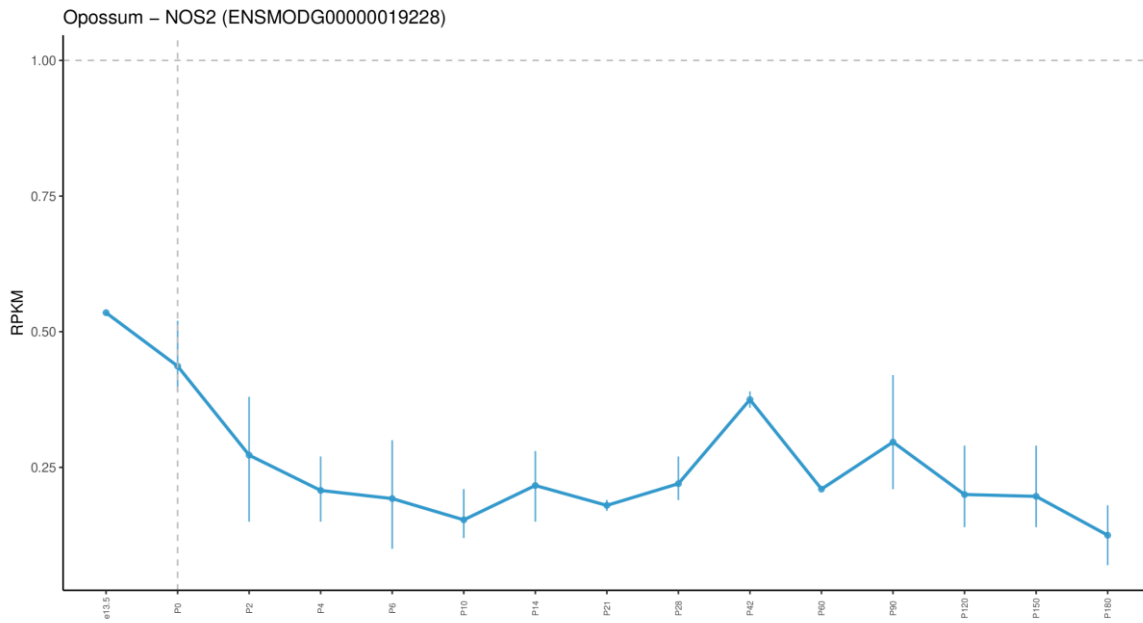


b)

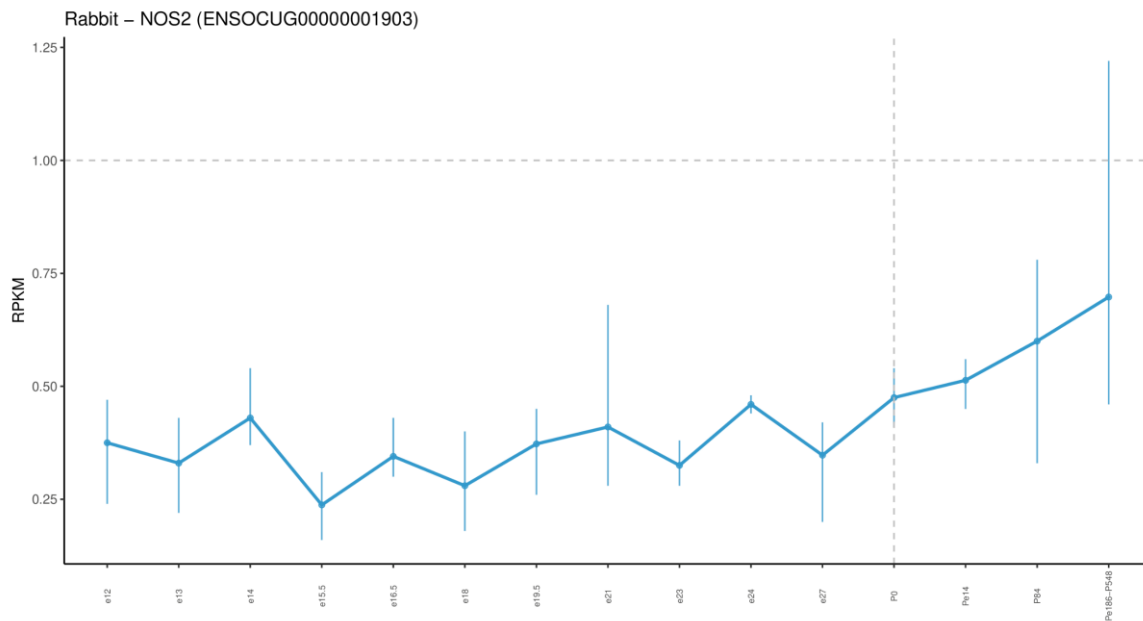




c)



d)



**Abbildung 8-18: iNOS-Expression während der Entwicklung verschiedener Organe von Säugetieren.**

Gezeigt sind die RPKM-Werte (reads per kilobase of exon model per million mapped reads) der iNOS-Expression im Gehirn verschiedener Säugetiere für die verschiedenen Entwicklungszeitpunkte nach Normalisierung der RNAseq-Daten mit EdgeR (v.3.14.0). e: Tage nach der Befruchtung der Eizelle, P: Tage nach der Geburt (Cardoso-Moreira 2019) a) Makak, b) Maus, c) Opossum, d) Kaninchen.



## 9 LITERATURVERZEICHNIS

**Ajamian, L.; Abrahamyan, L.; Milev, M.; Ivanov, P. V. et al.** (2008). "Unexpected roles for UPF1 in HIV-1 RNA metabolism and translation." *RNA* 14(5): 914-927.

**Alderton, W. K.; Cooper, C. E. und Knowles, R. G.** (2001). "Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition." *Biochem J* 357(Pt 3): 593-615.

**Altschul, S. F.; Madden, T. L.; Schaffer, A. A.; Zhang, J. et al.** (1997). "Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs." *Nucleic Acids Res* 25(17): 3389-3402.

**Anders, S.; Reyes, A. und Huber, W.** (2012). "Detecting differential usage of exons from RNA-seq data." *Genome Res* 22(10): 2008-2017.

**Andreev, D. E.; O'Connor, P. B.; Fahey, C.; Kenny, E. M. et al.** (2015). "Translation of 5' leaders is pervasive in genes resistant to eIF2 repression." *Elife* 4: e03971.

**Arcondeguy, T.; Lacazette, E.; Millevoi, S.; Prats, H. et al.** (2013). "VEGF-A mRNA processing, stability and translation: a paradigm for intricate regulation of gene expression at the post-transcriptional level." *Nucleic Acids Res* 41(17): 7997-8010.

**Arnhold, S.; Andressen, C.; Bloch, W.; Mai, J. K. et al.** (1997). "NO synthase-II is transiently expressed in embryonic mouse olfactory receptor neurons." *Neurosci Lett* 229(3): 165-168.

**Arnhold, S.; Klinz, F. J.; Bloch, W.; Hess, A. et al.** (1999). "Selective expression of the NOS II isoform during mouse vestibulocochlear receptorogenesis." *Eur J Neurosci* 11(6): 2187-2193.

**Arnhold, S.; Fassbender, A.; Klinz, F. J.; Kruttwig, K. et al.** (2002). "NOS-II is involved in early differentiation of murine cortical, retinal and ES cell-derived neurons-an immunocytochemical and functional approach." *Int J Dev Neurosci* 20(2): 83-92.

**Auton, A.; Brooks, L. D.; Durbin, R. M.; Garrison, E. P. et al.** (2015). "A global reference for human genetic variation." *Nature* 526(7571): 68-74.

**Bar, S. und Benvenisty, N.** (2019). "Epigenetic aberrations in human pluripotent stem cells." *Embo j* 38(12).

**Baxter, M. A.; Camarasa, M. V.; Bates, N.; Small, F. et al.** (2009). "Analysis of the distinct functions of growth factors and tissue culture substrates necessary for the long-term self-renewal of human embryonic stem cell lines." *Stem Cell Res* 3(1): 28-38.

**Beers, J.; Gulbranson, D. R.; George, N.; Siniscalchi, L. I. et al.** (2012). "Passaging and colony expansion of human pluripotent stem cells by enzyme-free dissociation in chemically defined culture conditions." *Nat Protoc* 7(11): 2029-2040.

**Bian, K.; Ghassemi, F.; Sotolongo, A.; Siu, A. et al.** (2012). "NOS-2 signaling and cancer therapy." *IUBMB Life* 64(8): 676-683.

**Birnboim, H. C. und Doly, J.** (1979). "A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA." *Nucleic Acids Res* 7(6): 1513-1523.

**Bogdan, C.; Rollinghoff, M. und Diefenbach, A.** (2000). "The role of nitric oxide in innate immunity." *Immunological reviews* 173: 17-26.

- Boissart, C.; Poulet, A.; Georges, P.; Darville, H. et al.** (2013). "Differentiation from human pluripotent stem cells of cortical neurons of the superficial layers amenable to psychiatric disease modeling and high-throughput drug screening." *Translational Psychiatry* 3(8): e294-e294.
- Bradford, M. M.** (1976). "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding." *Anal Biochem* 72: 248-254.
- Briggs, J. A.; Sun, J.; Shepherd, J.; Ovchinnikov, D. A. et al.** (2013). "Integration-free induced pluripotent stem cells model genetic and neural developmental features of down syndrome etiology." *Stem Cells* 31(3): 467-478.
- Bros, M.; Boissel, J. P.; Gödtel-Armbrust, U. und Förstermann, U.** (2006). "Transcription of human neuronal nitric oxide synthase mRNAs derived from different first exons is partly controlled by exon 1-specific promoter sequences." *Genomics* 87(4): 463-473.
- Brown, G. C.** (2010). "Nitric oxide and neuronal death." *Nitric Oxide* 23(3): 153-165.
- Burnette, W. N.** (1981). "Western blotting": electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate--polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A." *Anal Biochem* 112(2): 195-203.
- Calvo, S. E.; Pagliarini, D. J. und Mootha, V. K.** (2009). "Upstream open reading frames cause widespread reduction of protein expression and are polymorphic among humans." *Proc Natl Acad Sci U S A* 106(18): 7507-7512.
- Cardoso-Moreira, M.; Halbert, J.; Valloton, D.; Velten, B. et al.** (2019). "Gene expression across mammalian organ development." *Nature* 571(7766): 505-509.
- Carninci, P. und Hayashizaki, Y.** (1999). "High-efficiency full-length cDNA cloning." *Methods Enzymol* 303: 19-44.
- Carter, M. S.; Doskow, J.; Morris, P.; Li, S. et al.** (1995). "A regulatory mechanism that detects premature nonsense codons in T-cell receptor transcripts in vivo is reversed by protein synthesis inhibitors in vitro." *J Biol Chem* 270(48): 28995-29003.
- Casper, I.; Nowag, S.; Koch, K.; Hubrich, T. et al.** (2013). "Post-transcriptional regulation of the human inducible nitric oxide synthase (iNOS) expression by the cytosolic poly(A)-binding protein (PABP)." *Nitric Oxide* 33C: 6-17.
- Chambers, S. M.; Fasano, C. A.; Papapetrou, E. P.; Tomishima, M. et al.** (2009). "Highly efficient neural conversion of human ES and iPS cells by dual inhibition of SMAD signaling." *Nat Biotechnol* 27(3): 275-280.
- Chambers, S. M.; Qi, Y.; Mica, Y.; Lee, G. et al.** (2012). "Combined small-molecule inhibition accelerates developmental timing and converts human pluripotent stem cells into nociceptors." *Nat Biotechnol* 30(7): 715-720.
- Chan, C. P.; Kok, K. H.; Tang, H. M.; Wong, C. M. et al.** (2013). "Internal ribosome entry site-mediated translational regulation of ATF4 splice variant in mammalian unfolded protein response." *Biochim Biophys Acta* 1833(10): 2165-2175.
- Chan, G. C.; Fish, J. E.; Mawji, I. A.; Leung, D. D. et al.** (2005). "Epigenetic basis for the transcriptional hyporesponsiveness of the human inducible nitric oxide synthase gene in vascular endothelial cells." *J Immunol* 175(6): 3846-3861.

- 
- Chan, L.; Harris, S. E.; Rosen, J. M.; Means, A. R. et al.** (1977). "Processing of nuclear heterogeneous RNA: recent developments." *Life Sci* 20(1): 1-15.
- Chartrain, N. A.; Geller, D. A.; Koty, P. P.; Sitrin, N. F. et al.** (1994). "Molecular cloning, structure, and chromosomal localization of the human inducible nitric oxide synthase gene." *Journal of Biological Chemistry* 269(9): 6765-6772.
- Chomczynski, P. und Sacchi, N.** (1987). "Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction." *Anal Biochem* 162(1): 156-159.
- Chong, C.-M.; Ai, N.; Ke, M.; Tan, Y. et al.** (2018). "Roles of Nitric Oxide Synthase Isoforms in Neurogenesis." *Molecular Neurobiology* 55(3): 2645-2652.
- Chu, S. C.; Wu, H. P.; Banks, T. C.; Eissa, N. T. et al.** (1995). "Structural diversity in the 5'-untranslated region of cytokine-stimulated human inducible nitric oxide synthase mRNA." *J Biol Chem* 270(18): 10625-10630.
- Clouaire, T.; Webb, S. und Bird, A.** (2014). "Cfp1 is required for gene expression-dependent H3K4 trimethylation and H3K9 acetylation in embryonic stem cells." *Genome Biol* 15(9): 451.
- Colas, J. F. und Schoenwolf, G. C.** (2001). "Towards a cellular and molecular understanding of neurulation." *Dev Dyn* 221(2): 117-145.
- Colombo, M.; Karousis, E. D.; Bourquin, J.; Bruggmann, R. et al.** (2017). "Transcriptome-wide identification of NMD-targeted human mRNAs reveals extensive redundancy between SMG6- and SMG7-mediated degradation pathways." *Rna* 23(2): 189-201.
- Consortium, E. P.** (2012). "An integrated encyclopedia of DNA elements in the human genome." *Nature* 489(7414): 57-74.
- Conti, L. und Cattaneo, E.** (2010). "Neural stem cell systems: physiological players or in vitro entities?" *Nat Rev Neurosci* 11(3): 176-187.
- Coutelle, C.** (1981). "The precursor to animal cell messenger RNA." *Biochem J* 197(1): 1-6.
- Culbertson, M. R.; Underbrink, K. M. und Fink, G. R.** (1980). "Frameshift suppression *Saccharomyces cerevisiae*. II. Genetic properties of group II suppressors." *Genetics* 95(4): 833-853.
- de Boni, L.; Gasparoni, G.; Haubenreich, C.; Tierling, S. et al.** (2018). "DNA methylation alterations in iPSC- and hESC-derived neurons: potential implications for neurological disease modeling." *Clin Epigenetics* 10: 13.
- de Hoon, M. und Hayashizaki, Y.** (2008). "Deep cap analysis gene expression (CAGE): genome-wide identification of promoters, quantification of their expression, and network inference." *Biotechniques* 44(5): 627-628, 630, 632.
- De Sousa, P. A.; Steeg, R.; Wachter, E.; Bruce, K. et al.** (2017). "Rapid establishment of the European Bank for induced Pluripotent Stem Cells (EBiSC) - the Hot Start experience." *Stem Cell Res* 20: 105-114.
- de Vera, M. E.; Shapiro, R. A.; Nussler, A. K.; Mudgett, J. S. et al.** (1996). "Transcriptional regulation of human inducible nitric oxide synthase (NOS2) gene by cytokines: initial analysis of the human NOS2 promoter." *Proc Natl Acad Sci U S A* 93(3): 1054-1059.

- de Wet, J. R.; Wood, K. V.; DeLuca, M.; Helinski, D. R. et al.** (1987). "Firefly luciferase gene: structure and expression in mammalian cells." *Mol Cell Biol* 7(2): 725-737.
- Delcuve, G. P.; Rastegar, M. und Davie, J. R.** (2009). "Epigenetic control." *J Cell Physiol* 219(2): 243-250.
- Eberhardt, W.; Doller, A.; Akool el, S. und Pfeilschifter, J.** (2007). "Modulation of mRNA stability as a novel therapeutic approach." *Pharmacol Ther* 114(1): 56-73.
- Eberle, A. B.; Lykke-Andersen, S.; Muhlemann, O. und Jensen, T. H.** (2009). "SMG6 promotes endonucleolytic cleavage of nonsense mRNA in human cells." *Nat Struct Mol Biol* 16(1): 49-55.
- Edgar, R.; Domrachev, M. und Lash, A. E.** (2002). "Gene Expression Omnibus: NCBI gene expression and hybridization array data repository." *Nucleic Acids Res* 30(1): 207-210.
- Eissa, N. T.; Strauss, A. J.; Haggerty, C. M.; Choo, E. K. et al.** (1996). "Alternative splicing of human inducible nitric-oxide synthase mRNA. tissue-specific regulation and induction by cytokines." *J Biol Chem* 271(43): 27184-27187.
- Eissa, N. T.; Yuan, J. W.; Haggerty, C. M.; Choo, E. K. et al.** (1998). "Cloning and characterization of human inducible nitric oxide synthase splice variants: a domain, encoded by exons 8 and 9, is critical for dimerization." *Proc Natl Acad Sci U S A* 95(13): 7625-7630.
- Eyler, C. E.; Wu, Q.; Yan, K.; MacSwords, J. M. et al.** (2011). "Glioma stem cell proliferation and tumor growth are promoted by nitric oxide synthase-2." *Cell* 146(1): 53-66.
- Forrest, A. R.; Kawaji, H.; Rehli, M.; Baillie, J. K. et al.** (2014). "A promoter-level mammalian expression atlas." *Nature* 507(7493): 462-470.
- Förstermann, U. und Kleinert, H.** (1995). "Nitric oxide synthase: expression and expressional control of the three isoforms." *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 352(4): 351-364.
- Förstermann, U. und Sessa, W. C.** (2012). "Nitric oxide synthases: regulation and function." *Eur Heart J* 33(7): 829-837, 837a-837d.
- Frischmeyer, P. A. und Dietz, H. C.** (1999). "Nonsense-mediated mRNA decay in health and disease." *Hum Mol Genet* 8(10): 1893-1900.
- Frohman, M. A.; Dush, M. K. und Martin, G. R.** (1988). "Rapid production of full-length cDNAs from rare transcripts: amplification using a single gene-specific oligonucleotide primer." *Proc Natl Acad Sci U S A* 85(23): 8998-9002.
- Galecki, P.; Maes, M.; Florkowski, A.; Lewinski, A. et al.** (2011). "Association between inducible and neuronal nitric oxide synthase polymorphisms and recurrent depressive disorder." *J Affect Disord* 129(1-3): 175-182.
- Gardiner-Garden, M. und Frommer, M.** (1987). "CpG islands in vertebrate genomes." *J Mol Biol* 196(2): 261-282.
- Garvey, E. P.; Oplinger, J. A.; Furfine, E. S.; Kiff, R. J. et al.** (1997). "1400W is a slow, tight binding, and highly selective inhibitor of inducible nitric-oxide synthase in vitro and in vivo." *J Biol Chem* 272(8): 4959-4963.
- Gather, F.** (2015). "Analysen zur post-transkriptionellen und epigenetischen Regulation der induzierbaren NO-Synthase." Diplomarbeit, Johannes Gutenberg-Universität Mainz.

- 
- Gather, F.; Schmitz, K.; Koch, K.; Vogt, L. M. et al.** (2019). "Regulation of human inducible nitric oxide synthase expression by an upstream open reading frame." *Nitric Oxide* 88: 50-60.
- Gehring, N. H.; Neu-Yilik, G.; Schell, T.; Hentze, M. W. et al.** (2003). "Y14 and hUpf3b form an NMD-activating complex." *Molecular cell* 11(4): 939-949.
- Geller, D. A.; Lowenstein, C. J.; Shapiro, R. A.; Nussler, A. K. et al.** (1993). "Molecular cloning and expression of inducible nitric oxide synthase from human hepatocytes." *Proc Natl Acad Sci U S A* 90(8): 3491-3495.
- Geller, D. A. und Billiar, T. R.** (1998). "Molecular biology of nitric oxide synthases." *Cancer Metastasis Rev* 17(1): 7-23.
- Gentleman, R. C.; Carey, V. J.; Bates, D. M.; Bolstad, B. et al.** (2004). "Bioconductor: open software development for computational biology and bioinformatics." *Genome Biol* 5(10): R80.
- Georgiou, C. D.; Grintzalis, K.; Zervoudakis, G. und Papapostolou, I.** (2008). "Mechanism of Coomassie brilliant blue G-250 binding to proteins: a hydrophobic assay for nanogram quantities of proteins." *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 391(1): 391-403.
- Gibbs, S. M.** (2003). "Regulation of neuronal proliferation and differentiation by nitric oxide." *Mol Neurobiol* 27(2): 107-120.
- González-Burguera, I.; Ricobaraza, A.; Aretxabala, X.; Barrondo, S. et al.** (2016). "Highly efficient generation of glutamatergic/cholinergic NT2-derived postmitotic human neurons by short-term treatment with the nucleoside analogue cytosine  $\beta$ -d-arabinofuranoside." *Stem Cell Research* 16(2): 541-551.
- Gorris, R.; Fischer, J.; Erwes, K. L.; Kesavan, J. et al.** (2015). "Pluripotent stem cell-derived radial glia-like cells as stable intermediate for efficient generation of human oligodendrocytes." *Glia* 63(12): 2152-2167.
- Groves, J. T. und Wang, C. C.** (2000). "Nitric oxide synthase: models and mechanisms." *Curr Opin Chem Biol* 4(6): 687-695.
- Guenther, M. G.; Levine, S. S.; Boyer, L. A.; Jaenisch, R. et al.** (2007). "A chromatin landmark and transcription initiation at most promoters in human cells." *Cell* 130(1): 77-88.
- Guo, Z.; Shao, L.; Zheng, L.; Du, Q. et al.** (2012). "miRNA-939 regulates human inducible nitric oxide synthase posttranscriptional gene expression in human hepatocytes." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109(15): 5826-5831.
- Haghighat, N.; Abdolmaleki, P.; Parnian, J. und Behmanesh, M.** (2017). "The expression of pluripotency and neuronal differentiation markers under the influence of electromagnetic field and nitric oxide." *Mol Cell Neurosci* 85: 19-28.
- Hellen, C. U. und Sarnow, P.** (2001). "Internal ribosome entry sites in eukaryotic mRNA molecules." *Genes Dev* 15(13): 1593-1612.
- Higuchi, R.; Dollinger, G.; Walsh, P. S. und Griffith, R.** (1992). "Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences." *Biotechnology (N Y)* 10(4): 413-417.
- Hillman, R. T.; Green, R. E. und Brenner, S. E.** (2004). "An unappreciated role for RNA surveillance." *Genome Biol* 5(2): R8.
- Hinnebusch, A. G.; Ivanov, I. P. und Sonenberg, N.** (2016). "Translational control by 5'-untranslated regions of eukaryotic mRNAs." *Science* 352(6292): 1413-1416.

- Hinnebusch, A. G.** (2017). "Structural Insights into the Mechanism of Scanning and Start Codon Recognition in Eukaryotic Translation Initiation." *Trends Biochem Sci* 42(8): 589-611.
- Horii, T. und Hatada, I.** (2015). "Genome Editing Using Mammalian Haploid Cells." *Int J Mol Sci* 16(10): 23604-23614.
- Hrdlickova, R.; Toloue, M. und Tian, B.** (2017). "RNA-Seq methods for transcriptome analysis." *Wiley Interdiscip Rev RNA* 8(1).
- Hsieh, C. L.** (1994). "Dependence of transcriptional repression on CpG methylation density." *Mol Cell Biol* 14(8): 5487-5494.
- Huber, W.; Carey, V. J.; Gentleman, R.; Anders, S. et al.** (2015). "Orchestrating high-throughput genomic analysis with Bioconductor." *Nature Methods* 12: 115.
- Hug, N.; Longman, D. und Caceres, J. F.** (2016). "Mechanism and regulation of the nonsense-mediated decay pathway." *Nucleic Acids Res* 44(4): 1483-1495.
- Huntzinger, E.; Kashima, I.; Fauser, M.; Sauliere, J. et al.** (2008). "SMG6 is the catalytic endonuclease that cleaves mRNAs containing nonsense codons in metazoan." *RNA* 14(12): 2609-2617.
- Ichikawa, H.; Yoshie, S.; Shirasawa, S.; Yokoyama, T. et al.** (2011). "Freeze-thawing single human embryonic stem cells induce e-cadherin and actin filament network disruption via g13 signaling." *Cryo Letters* 32(6): 516-524.
- Ingolia, N. T.; Ghaemmaghami, S.; Newman, J. R. und Weissman, J. S.** (2009). "Genome-wide analysis in vivo of translation with nucleotide resolution using ribosome profiling." *Science* 324(5924): 218-223.
- Ingolia, N. T.; Brar, G. A.; Rouskin, S.; McGeachy, A. M. et al.** (2012). "The ribosome profiling strategy for monitoring translation in vivo by deep sequencing of ribosome-protected mRNA fragments." *Nat Protoc* 7(8): 1534-1550.
- Inouye, S. und Shimomura, O.** (1997). "The use of Renilla luciferase, Oplophorus luciferase, and apoaequorin as bioluminescent reporter protein in the presence of coelenterazine analogues as substrate." *Biochem Biophys Res Commun* 233(2): 349-353.
- Jackson, R. J.; Hellen, C. U. und Pestova, T. V.** (2010). "The mechanism of eukaryotic translation initiation and principles of its regulation." *Nat Rev Mol Cell Biol* 11(2): 113-127.
- Jenuwein, T. und Allis, C. D.** (2001). "Translating the histone code." *Science* 293(5532): 1074-1080.
- Jinek, M. und Doudna, J. A.** (2008). "A three-dimensional view of the molecular machinery of RNA interference." *Nature* 457: 405.
- Karimipour, M.; Rahbarghazi, R.; Tayefi, H.; Shimia, M. et al.** (2019). "Quercetin promotes learning and memory performance concomitantly with neural stem/progenitor cell proliferation and neurogenesis in the adult rat dentate gyrus." *International Journal of Developmental Neuroscience* 74: 18-26.
- Kashima, I.; Yamashita, A.; Izumi, N.; Kataoka, N. et al.** (2006). "Binding of a novel SMG-1-Upf1-eRF1-eRF3 complex (SURF) to the exon junction complex triggers Upf1 phosphorylation and nonsense-mediated mRNA decay." *Genes Dev* 20(3): 355-367.



- 
- Kawaji, H.; Kasukawa, T.; Forrest, A.; Carninci, P. et al.** (2017). "The FANTOM5 collection, a data series underpinning mammalian transcriptome atlases in diverse cell types." *Scientific Data* 4: 170113.
- Kawauchi, S.; Santos, R.; Kim, J.; Hollenbeck, P. L. et al.** (2009). "The role of foxg1 in the development of neural stem cells of the olfactory epithelium." *Ann N Y Acad Sci* 1170: 21-27.
- Kim, T. H.; Barrera, L. O.; Zheng, M.; Qu, C. et al.** (2005). "A high-resolution map of active promoters in the human genome." *Nature* 436(7052): 876-880.
- Kleinert, H.; Wallerath, T.; Fritz, G.; Ihrig-Biedert, I. et al.** (1998). "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* 125(1): 193-201.
- Knapska, E. und Kaczmarek, L.** (2004). "A gene for neuronal plasticity in the mammalian brain: Zif268/Egr-1/NGFI-A/Krox-24/TIS8/ZENK?" *Progress in Neurobiology* 74(4): 183-211.
- Koch, K.** (2011). "Analysen zur Bedeutung des „nonsense mediated decay“, nicht kodierender RNAs und des nucleocytoplasmatischen Transports für die Expression der humanen induzierbaren NO-Synthase." Diplomarbeit, Johannes Gutenberg-Universität Mainz.
- Koch, P.; Opitz, T.; Steinbeck, J. A.; Ladewig, J. et al.** (2009). "A rosette-type, self-renewing human ES cell-derived neural stem cell with potential for in vitro instruction and synaptic integration." *Proc Natl Acad Sci U S A* 106(9): 3225-3230.
- Kornberg, R. D.** (2007). "The molecular basis of eukaryotic transcription." *Proc Natl Acad Sci U S A* 104(32): 12955-12961.
- Kozak, M.** (1986). "Influences of mRNA secondary structure on initiation by eukaryotic ribosomes." *Proc Natl Acad Sci U S A* 83(9): 2850-2854.
- Kozak, M.** (1987). "An analysis of 5'-noncoding sequences from 699 vertebrate messenger RNAs." *Nucleic Acids Res* 15(20): 8125-8148.
- Kozak, M.** (1991). "An analysis of vertebrate mRNA sequences: intimations of translational control." *J Cell Biol* 115(4): 887-903.
- Kozak, M.** (2002). "Pushing the limits of the scanning mechanism for initiation of translation." *Gene* 299(1-2): 1-34.
- Kremer, D.** (2010). "Entzündung und epigenetische Regulation der Genexpression - Funktion durch Stickstoffmonoxid." Dissertation, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf.
- Kricka, L. J. und Thorpe, G. H. G.** (1983). "Chemiluminescent and bioluminescent methods in Analytical Chemistry. A review." *Analyst* 108(1292): 1274-1296.
- Kroncke, K. D.; Fehsel, K. und Kolb-Bachofen, V.** (1998). "Inducible nitric oxide synthase in human diseases." *Clin Exp Immunol* 113(2): 147-156.
- Kuang, Z.; Lewis, R. S.; Curtis, J. M.; Zhan, Y. et al.** (2010). "The SPRY domain-containing SOCS box protein SPSB2 targets iNOS for proteasomal degradation." *J Cell Biol* 190(1): 129-141.
- Kurihara, Y.; Makita, Y.; Kawashima, M.; Fujita, T. et al.** (2018). "Transcripts from downstream alternative transcription start sites evade uORF-mediated inhibition of gene expression in *Arabidopsis*." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 115(30): 7831-7836.

- Kwon, W.; Kim, H.-S.; Jeong, J.; Sung, Y. et al.** (2018). "Tet1 overexpression leads to anxiety-like behavior and enhanced fear memories via the activation of calcium-dependent cascade through Egr1 expression in mice." *The FASEB Journal* 32(1): 390-403.
- Labrie, S. J.; Samson, J. E. und Moineau, S.** (2010). "Bacteriophage resistance mechanisms." *Nat Rev Microbiol* 8(5): 317-327.
- Laemmli, U. K.** (1970). "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4." *Nature* 227(5259): 680-685.
- Lechner, M.; Lirk, P. und Rieder, J.** (2005). "Inducible nitric oxide synthase (iNOS) in tumor biology: the two sides of the same coin." *Semin Cancer Biol* 15(4): 277-289.
- Lee, J. H.; Park, S. J. und Nakai, K.** (2017). "Differential landscape of non-CpG methylation in embryonic stem cells and neurons caused by DNMT3s." *Sci Rep* 7(1): 11295.
- Lee, Q. P. und Juchau, M. R.** (1994). "Dysmorphogenic effects of nitric oxide (NO) and NO-synthase inhibition: studies with intra-amniotic injections of sodium nitroprusside and NG-monomethyl-L-arginine." *Teratology* 49(6): 452-464.
- Leff, S. E.; Rosenfeld, M. G. und Evans, R. M.** (1986). "Complex transcriptional units: diversity in gene expression by alternative RNA processing." *Annu Rev Biochem* 55: 1091-1117.
- Lesurf, R.; Cotto, K. C.; Wang, G.; Griffith, M. et al.** (2016). "ORegAnno 3.0: a community-driven resource for curated regulatory annotation." *Nucleic Acids Res* 44(D1): D126-132.
- Li, Y.; Wang, R.; Qiao, N.; Peng, G. et al.** (2017). "Transcriptome analysis reveals determinant stages controlling human embryonic stem cell commitment to neuronal cells." *J Biol Chem* 292(48): 19590-19604.
- Lim, C. S.; SJ, T. W.; Kleffmann, T. und Brown, C. M.** (2018). "The exon-intron gene structure upstream of the initiation codon predicts translation efficiency." *Nucleic Acids Res* 46(9): 4575-4591.
- Linker, K.; Pautz, A.; Fehir, M.; Hubrich, T. et al.** (2005). "Involvement of KSRP in the post-transcriptional regulation of human iNOS expression-complex interplay of KSRP with TTP and HuR." *Nucleic Acids Res* 33(15): 4813-4827.
- Livak, K. J. und Schmittgen, T. D.** (2001). "Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method." *Methods* 25(4): 402-408.
- Lloyd, J. P. B.** (2018). "The evolution and diversity of the nonsense-mediated mRNA decay pathway." *F1000Res* 7: 1299.
- Loh, B.; Jonas, S. und Izaurralde, E.** (2013). "The SMG5-SMG7 heterodimer directly recruits the CCR4-NOT deadenylase complex to mRNAs containing nonsense codons via interaction with POP2." *Genes Dev* 27(19): 2125-2138.
- Lopez-Arenas, E.; Mackay-Sim, A.; Bacigalupo, J. und Sulz, L.** (2012). "Leukaemia inhibitory factor stimulates proliferation of olfactory neuronal progenitors via inducible nitric oxide synthase." *PLoS One* 7(9): e45018.
- Lopez-Lastra, M.; Rivas, A. und Barria, M. I.** (2005). "Protein synthesis in eukaryotes: the growing biological relevance of cap-independent translation initiation." *Biol Res* 38(2-3): 121-146.

- 
- Lykke-Andersen, J.; Shu, M. D. und Steitz, J. A.** (2000). "Human Upf proteins target an mRNA for nonsense-mediated decay when bound downstream of a termination codon." *Cell* 103(7): 1121-1131.
- Lykke-Andersen, S. und Jensen, T. H.** (2015). "Nonsense-mediated mRNA decay: an intricate machinery that shapes transcriptomes." *Nat Rev Mol Cell Biol* 16(11): 665-677.
- Maraia, R. J.** (2001). "La protein and the trafficking of nascent RNA polymerase iii transcripts." *J Cell Biol* 153(4): F13-18.
- Martinez-Salas, E.; Lozano, G.; Fernandez-Chamorro, J.; Francisco-Velilla, R. et al.** (2013). "RNA-binding proteins impacting on internal initiation of translation." *Int J Mol Sci* 14(11): 21705-21726.
- Mazumder, B.; Seshadri, V. und Fox, P. L.** (2003). "Translational control by the 3'-UTR: the ends specify the means." *Trends Biochem Sci* 28(2): 91-98.
- McGlinchy, N. J.; Tan, L. Y.; Paul, N.; Zavolan, M. et al.** (2010). "Expression proteomics of UPF1 knockdown in HeLa cells reveals autoregulation of hnRNP A2/B1 mediated by alternative splicing resulting in nonsense-mediated mRNA decay." *BMC Genomics* 11: 565.
- Mendell, J. T.; ap Rhys, C. M. und Dietz, H. C.** (2002). "Separable roles for rent1/hUpf1 in altered splicing and decay of nonsense transcripts." *Science* 298(5592): 419-422.
- Mendell, J. T.; Sharifi, N. A.; Meyers, J. L.; Martinez-Murillo, F. et al.** (2004). "Nonsense surveillance regulates expression of diverse classes of mammalian transcripts and mutates genomic noise." *Nat Genet* 36(10): 1073-1078.
- Misquitta, C. M.; Iyer, V. R.; Werstiuk, E. S. und Grover, A. K.** (2001). "The role of 3'-untranslated region (3'-UTR) mediated mRNA stability in cardiovascular pathophysiology." *Mol Cell Biochem* 224(1-2): 53-67.
- Mohan, K. N.** (2016). "Stem Cell Models to Investigate the Role of DNA Methylation Machinery in Development of Neuro-psychiatric Disorders." *Stem Cells Int* 2016: 4379425.
- Morizane, A.; Doi, D.; Kikuchi, T.; Nishimura, K. et al.** (2011). "Small-molecule inhibitors of bone morphogenic protein and activin/nodal signals promote highly efficient neural induction from human pluripotent stem cells." *J Neurosci Res* 89(2): 117-126.
- Morris, D. R. und Geballe, A. P.** (2000). "Upstream open reading frames as regulators of mRNA translation." *Mol Cell Biol* 20(23): 8635-8642.
- Muhlemann, O. und Lykke-Andersen, J.** (2010). "How and where are nonsense mRNAs degraded in mammalian cells?" *RNA Biol* 7(1): 28-32.
- Munzarova, V.; Panek, J.; Gunisova, S.; Danyi, I. et al.** (2011). "Translation reinitiation relies on the interaction between eIF3a/TIF32 and progressively folded cis-acting mRNA elements preceding short uORFs." *PLoS Genet* 7(7): e1002137.
- Mutschler, E.; Schaible, H.-G. und Vaupel, P.** (2007). *Anatomie, Physiologie, Pathophysiologie des Menschen : 563 Abbildungen und 140 Tabellen*. Stuttgart: 35 f.
- Nagy, E. und Maquat, L. E.** (1998). "A rule for termination-codon position within intron-containing genes: when nonsense affects RNA abundance." *Trends Biochem Sci* 23(6): 198-199.

**Nathans, D.** (1964). "Puromycin inhibition of protein synthesis: Incorporation of puromycin into peptide chains." *Proc Natl Acad Sci U S A* 51(4): 585-592.

**Neafsey, D. E. und Galagan, J. E.** (2007). "Dual Modes of Natural Selection on Upstream Open Reading Frames." *Molecular Biology and Evolution* 24(8): 1744-1751.

**Neu-Yilik, G.; Gehring, N. H.; Hentze, M. W. und Kulozik, A. E.** (2004). "Nonsense-mediated mRNA decay: from vacuum cleaner to Swiss army knife." *Genome Biol* 5(4): 218.

**Nicholson, P.; Yepiskoposyan, H.; Metze, S.; Zamudio Orozco, R. et al.** (2010). "Nonsense-mediated mRNA decay in human cells: mechanistic insights, functions beyond quality control and the double-life of NMD factors." *Cellular and molecular life sciences* : CMLS 67(5): 677-700.

**Nishiya, T.; Matsumoto, K.; Maekawa, S.; Kajita, E. et al.** (2011). "Regulation of inducible nitric-oxide synthase by the SPRY domain- and SOCS box-containing proteins." *J Biol Chem* 286(11): 9009-9019.

**Palam, L. R.; Baird, T. D. und Wek, R. C.** (2011). "Phosphorylation of eIF2 facilitates ribosomal bypass of an inhibitory upstream ORF to enhance CHOP translation." *J Biol Chem* 286(13): 10939-10949.

**Palumbo, P.; Miconi, G.; Cinque, B.; Lombardi, F. et al.** (2017). "NOS2 expression in glioma cell lines and glioma primary cell cultures: correlation with neurosphere generation and SOX-2 expression." *Oncotarget* 8(15): 25582-25598.

**Palumbo, P.; Lombardi, F.; Siragusa, G.; Dehcordi, S. R. et al.** (2018). "Involvement of NOS2 Activity on Human Glioma Cell Growth, Clonogenic Potential, and Neurosphere Generation." *Int J Mol Sci* 19(9).

**Pautz, A.; Art, J.; Hahn, S.; Nowag, S. et al.** (2010). "Regulation of the expression of inducible nitric oxide synthase." *Nitric Oxide* 23(2): 75-93.

**Peitz, M.; Bechler, T.; Thiele, C. C.; Veltel, M. et al.** (2018). "Blood-derived integration-free iPS cell line UKBi011-A from a diagnosed male Alzheimer's disease patient with APOE varepsilon4/varepsilon4 genotype." *Stem Cell Res* 29: 250-253.

**Pichon, X.; Wilson, L. A.; Stoneley, M.; Bastide, A. et al.** (2012). "RNA binding protein/RNA element interactions and the control of translation." *Curr Protein Pept Sci* 13(4): 294-304.

**Popp, M. W. und Maquat, L. E.** (2015). "Attenuation of nonsense-mediated mRNA decay facilitates the response to chemotherapeutics." *Nature Communications* 6: 6632.

**Poppe, D.; Doerr, J.; Schneider, M.; Wilkens, R. et al.** (2018). "Genome Editing in Neuroepithelial Stem Cells to Generate Human Neurons with High Adenosine-Releasing Capacity." *Stem Cells Transl Med* 7(6): 477-486.

**Qi, Y.; Zhang, X. J.; Renier, N.; Wu, Z. et al.** (2017). "Combined small-molecule inhibition accelerates the derivation of functional cortical neurons from human pluripotent stem cells." *Nat Biotechnol* 35(2): 154-163.

**Qidwai, T. und Jamal, F.** (2010). "Inducible nitric oxide synthase (iNOS) gene polymorphism and disease prevalence." *Scandinavian journal of immunology* 72(5): 375-387.

**Raimondeau, E.; Bufton, J. C. und Schaffitzel, C.** (2018). "New insights into the interplay between the translation machinery and nonsense-mediated mRNA decay factors." *Biochem Soc Trans* 46(3): 503-512.

---

**Ran, F. A.; Hsu, P. D.; Wright, J.; Agarwala, V. et al.** (2013). "Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system." *Nat Protoc* 8(11): 2281-2308.

**Rasheed, Z.; Al-Shobaili, H. A.; Rasheed, N.; Mahmood, A. et al.** (2016). "MicroRNA-26a-5p regulates the expression of inducible nitric oxide synthase via activation of NF-kappaB pathway in human osteoarthritis chondrocytes." *Arch Biochem Biophys* 594: 61-67.

**Rebbapragada, I. und Lykke-Andersen, J.** (2009). "Execution of nonsense-mediated mRNA decay: what defines a substrate?" *Current opinion in cell biology* 21(3): 394-402.

**Rehbach, K.; Kesavan, J.; Hauser, S.; Ritzenhofen, S. et al.** (2019). "Multiparametric rapid screening of neuronal process pathology for drug target identification in HSP patient-specific neurons." *Sci Rep* 9(1): 9615.

**Reinhardt, P.; Glatza, M.; Hemmer, K.; Tsytsyura, Y. et al.** (2013). "Derivation and expansion using only small molecules of human neural progenitors for neurodegenerative disease modeling." *PLoS One* 8(3): e59252.

**Reyes, A.; Anders, S.; Weatheritt, R. J.; Gibson, T. J. et al.** (2013). "Drift and conservation of differential exon usage across tissues in primate species." *Proc Natl Acad Sci U S A* 110(38): 15377-15382.

**Richter, C.; Chang, J. T. und Fineran, P. C.** (2012). "Function and regulation of clustered regularly interspaced short palindromic repeats (CRISPR) / CRISPR associated (Cas) systems." *Viruses* 4(10): 2291-2311.

**Rocca, W. A.** (2018). "The burden of Parkinson's disease: a worldwide perspective." *Lancet Neurology* 17(11): 928-929.

**Rodrigues, G. M.; Matos, A. F.; Fernandes, T. G.; Rodrigues, C. A. et al.** (2014). "Integrated platform for production and purification of human pluripotent stem cell-derived neural precursors." *Stem Cell Rev* 10(2): 151-161.

**Rodriguez-Pascual, F.; Hausding, M.; Ihrig-Biedert, I.; Furneaux, H. et al.** (2000). "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* 275(34): 26040-26049.

**Roese-Koerner, B.; Stappert, L.; Berger, T.; Braun, N. C. et al.** (2016). "Reciprocal Regulation between Bifunctional miR-9/9(\*) and its Transcriptional Modulator Notch in Human Neural Stem Cell Self-Renewal and Differentiation." *Stem Cell Reports* 7(2): 207-219.

**Sadek, M. M.; Barlow, N.; Leung, E. W. W.; Williams-Noonan, B. J. et al.** (2018). "A Cyclic Peptide Inhibitor of the iNOS-SPSB Protein-Protein Interaction as a Potential Anti-Infective Agent." *ACS Chem Biol* 13(10): 2930-2938.

**Saiki, R. K.; Gelfand, D. H.; Stoffel, S.; Scharf, S. J. et al.** (1988). "Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase." *Science* 239(4839): 487-491.

**Saitou, N. und Nei, M.** (1987). "The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees." *Molecular Biology and Evolution* 4(4): 406-425.

**Savica, R.; Grossardt, B. R.; Bower, J. H.; Ahlskog, J. E. et al.** (2016). "Time Trends in the Incidence of Parkinson DiseaseTime Trends in the Incidence of Parkinson DiseaseTime Trends in the Incidence of Parkinson Disease." *JAMA Neurology* 73(8): 981-989.

- Schmidt, W. M. und Mueller, M. W.** (1999). "CapSelect: a highly sensitive method for 5' CAP-dependent enrichment of full-length cDNA in PCR-mediated analysis of mRNAs." *Nucleic Acids Res* 27(21): e31.
- Schmitz, K.** (2012). "Analysen zur post-transkriptionellen Regulation der mRNA-Expression der induzierbaren NO-Synthase." Diplomarbeit, Johannes Gutenberg-Universität Mainz.
- Schulz, E. G.; Meisig, J.; Nakamura, T.; Okamoto, I. et al.** (2014). "The two active X chromosomes in female ESCs block exit from the pluripotent state by modulating the ESC signaling network." *Cell Stem Cell* 14(2): 203-216.
- Searles Nielsen, S.; Checkoway, H.; Criswell, S. R.; Farin, F. M. et al.** (2015). "Inducible nitric oxide synthase gene methylation and parkinsonism in manganese-exposed welders." *Parkinsonism Relat Disord* 21(4): 355-360.
- Sehgal, P. B.; Darnell, J. E. und Tamm, I.** (1976). "The inhibition of DRB (5,6-dichloro-1- $\beta$ -d-ribofuranosylbenzimidazole) of hnRNA and mRNA production in HeLa cells." *Cell* 9(3): 473-480.
- Sheffield, N. C.; Thurman, R. E.; Song, L.; Safi, A. et al.** (2013). "Patterns of regulatory activity across diverse human cell types predict tissue identity, transcription factor binding, and long-range interactions." *Genome Res* 23(5): 777-788.
- Sheng, C.; Jungverdorben, J.; Wiethoff, H.; Lin, Q. et al.** (2018). "A stably self-renewing adult blood-derived induced neural stem cell exhibiting patternability and epigenetic rejuvenation." *Nat Commun* 9(1): 4047.
- Shi, X. und Jarvis, D. L.** (2006). "A new rapid amplification of cDNA ends method for extremely guanine plus cytosine-rich genes." *Anal Biochem* 356(2): 222-228.
- Shiraki, T.; Kondo, S.; Katayama, S.; Waki, K. et al.** (2003). "Cap analysis gene expression for high-throughput analysis of transcriptional starting point and identification of promoter usage." *Proc Natl Acad Sci U S A* 100(26): 15776-15781.
- Silva, A. L. und Romao, L.** (2009). "The mammalian nonsense-mediated mRNA decay pathway: to decay or not to decay! Which players make the decision?" *FEBS Lett* 583(3): 499-505.
- Singh, G.; Rebbapragada, I. und Lykke-Andersen, J.** (2008). "A competition between stimulators and antagonists of Upf complex recruitment governs human nonsense-mediated mRNA decay." *PLoS biology* 6(4): e111.
- Somers, J.; Poyry, T. und Willis, A. E.** (2013). "A perspective on mammalian upstream open reading frame function." *Int J Biochem Cell Biol* 45(8): 1690-1700.
- Sonenberg, N. und Hinnebusch, A. G.** (2009). "Regulation of translation initiation in eukaryotes: mechanisms and biological targets." *Cell* 136(4): 731-745.
- Stamm, S.; Ben-Ari, S.; Rafalska, I.; Tang, Y. et al.** (2005). "Function of alternative splicing." *Gene* 344: 1-20.
- Strijdom, H.; Muller, C. und Lochner, A.** (2004). "Direct intracellular nitric oxide detection in isolated adult cardiomyocytes: flow cytometric analysis using the fluorescent probe, diaminofluorescein." *J Mol Cell Cardiol* 37(4): 897-902.
- Svoboda, P. und Di Cara, A.** (2006). "Hairpin RNA: a secondary structure of primary importance." *Cell Mol Life Sci* 63(7-8): 901-908.
- Szyf, M.; McGowan, P. und Meaney, M. J.** (2008). "The social environment and the epigenome." *Environ Mol Mutagen* 49(1): 46-60.

- 
- Thomas, D. D.; Ridnour, L. A.; Isenberg, J. S.; Flores-Santana, W. et al.** (2008). "The chemical biology of nitric oxide: implications in cellular signaling." *Free Radic Biol Med* 45(1): 18-31.
- Thompson, E. A., Jr.; Keith, R. H., Jr.; Cavanaugh, A. H. und Wood, K. M.** (1981). "The relationship between the activity of DNA-dependent RNA polymerase I and the rate of synthesis of rRNA in hepatoma cells in culture." *Biochem J* 194(1): 43-51.
- Thompson, J. D.; Higgins, D. G. und Gibson, T. J.** (1994). "CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice." *Nucleic Acids Res* 22(22): 4673-4680.
- Thongboonkerd, V.** (2007). "Proteomics." *Forum Nutr* 60: 80-90.
- Tiboni, G. M. und Ponzano, A.** (2014). "Nitric oxide and teratogenesis: an update." *Curr Pharm Des* 20(34): 5443-5447.
- Tjian, R. und Maniatis, T.** (1994). "Transcriptional activation: A complex puzzle with few easy pieces." *Cell* 77(1): 5-8.
- Towbin, H.; Staehelin, T. und Gordon, J.** (1979). "Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications." *Proc Natl Acad Sci U S A* 76(9): 4350-4354.
- van de Leemput, J.; Boles, N. C.; Kiehl, T. R.; Corneo, B. et al.** (2014). "CORTECON: a temporal transcriptome analysis of in vitro human cerebral cortex development from human embryonic stem cells." *Neuron* 83(1): 51-68.
- van den Akker, E.; Satchwell, T. J.; Pellegrin, S.; Daniels, G. et al.** (2010). "The majority of the in vitro erythroid expansion potential resides in CD34(-) cells, outweighing the contribution of CD34(+) cells and significantly increasing the erythroblast yield from peripheral blood samples." *Haematologica* 95(9): 1594-1598.
- Vattem, K. M. und Wek, R. C.** (2004). "Reinitiation involving upstream ORFs regulates ATF4 mRNA translation in mammalian cells." *Proc Natl Acad Sci U S A* 101(31): 11269-11274.
- Vieira, C.; Pombero, A.; Garcia-Lopez, R.; Gimeno, L. et al.** (2010). "Molecular mechanisms controlling brain development: an overview of neuroepithelial secondary organizers." *Int J Dev Biol* 54(1): 7-20.
- Vogt, L. M.** (2018). "Mechanismen der Regulation der Expression der induzierbaren NO-Synthase." Masterarbeit, Johannes Gutenberg-Universität Mainz.
- Wahl, M. C.; Will, C. L. und Luhrmann, R.** (2009). "The spliceosome: design principles of a dynamic RNP machine." *Cell* 136(4): 701-718.
- Wang, H.; Nakamura, M.; Abbott, T. R.; Zhao, D. et al.** (2019). "CRISPR-mediated live imaging of genome editing and transcription." *Science* 365(6459): 1301-1305.
- Weaver, J.; Mohammad, F.; Buskirk, A. R. und Storz, G.** (2019). "Identifying Small Proteins by Ribosome Profiling with Stalled Initiation Complexes." *MBio* 10(2).
- Wen, K. X.; Milic, J.; El-Khodori, B.; Dhana, K. et al.** (2016). "The Role of DNA Methylation and Histone Modifications in Neurodegenerative Diseases: A Systematic Review." *PLoS One* 11(12): e0167201.

**Wilke, C. O.** (2011). "Transcriptional robustness complements nonsense-mediated decay in humans." *PLoS Genet* 7(10): e1002296.

**Wilkinson, M. F. und Shyu, A. B.** (2001). "Multifunctional regulatory proteins that control gene expression in both the nucleus and the cytoplasm." *Bioessays* 23(9): 775-787.

**Wu, K. K.** (2006). "Analysis of protein-DNA binding by streptavidin-agarose pulldown." *Methods Mol Biol* 338: 281-290.

**Xu, W. Y.; Gu, M. M.; Sun, L. H.; Guo, W. T. et al.** (2012). "A nonsense mutation in DHTKD1 causes Charcot-Marie-Tooth disease type 2 in a large Chinese pedigree." *Am J Hum Genet* 91(6): 1088-1094.

**Yaniv, K. und Yisraeli, J. K.** (2001). "Defining cis-acting elements and trans-acting factors in RNA localization." *Int Rev Cytol* 203: 521-539.

**Young, S. K. und Wek, R. C.** (2016). "Upstream Open Reading Frames Differentially Regulate Gene-specific Translation in the Integrated Stress Response." *J Biol Chem* 291(33): 16927-16935.

**Youngman, E. M.; McDonald, M. E. und Green, R.** (2008). "Peptide release on the ribosome: mechanism and implications for translational control." *Annu Rev Microbiol* 62: 353-373.

**Zerbino, D. R.; Achuthan, P.; Akanni, W.; Amode, M R. et al.** (2017). "Ensembl 2018." *Nucleic Acids Research* 46(D1): D754-D761.

**Zhang, H.; Wang, Y. und Lu, J.** (2019). "Function and Evolution of Upstream ORFs in Eukaryotes." *Trends Biochem Sci*.



## **10 DANKSAGUNG**

# 11 LISTE DER VERÖFFENTLICHUNGEN

## Publikationen

- *Regulation of human inducible nitric oxide synthase expression by an upstream open reading frame;*  
Gather, F.; Schmitz, K.; Koch, K.; Vogt, L.-M.; Pautz, A. und Kleinert, H.;  
**Nitric Oxide**, 2019. 88: p. 50-60
- *The KH-type splicing regulatory protein (KSRP) regulates type III interferon expression post-transcriptionally;*  
Schmidtke, L.; Schrick, K.; Saurin, S.; Käfer, R.; Gather, F.; Weinmann-Menke, J.; Kleinert, H. und Pautz, A.;  
**Biochem J.**, 2019. 476(2): p. 333-352

## Vorträge und Poster

- *Role of the upstream open reading frame (uORF) in the human inducible nitric oxide synthase (iNOS) mRNA and the influence of the nonsense mediated mRNA decay (NMD) on iNOS expression;*  
Gather, F.; Schmitz, K.; Koch, K.; Pautz, A. und Kleinert, H.;  
Vortrag, **German Pharm-Tox Summit, Göttingen, Deutschland**  
26. Februar – 1. März 2017
- *Role of the upstream open reading frame (uORF) in the human inducible nitric oxide synthase (iNOS) mRNA and the influence of the nonsense mediated mRNA decay (NMD);*  
Gather, F.; Schmitz, K.; Koch, K.; Pautz, A. und Kleinert, H.;  
Posterpräsentation, **Annual Meeting of the RNA Society, Prag, Tschechien**  
30. Mai – 3. Juni 2017
- *Role of the upstream open reading frame (uORF) in the human inducible nitric oxide synthase (iNOS) mRNA;*  
Gather, F.; Pautz, A. und Kleinert, H.;  
Posterpräsentation, **German Pharm-Tox Summit, Berlin, Deutschland**  
29. Februar – 3. März 2016



## **12 LEBENSLAUF**