

**Post-transkriptionelle Regulation der Expression der
humanen induzierbaren NO-Synthase**

Dissertation
zur Erlangung des Grades
„Doktor der Naturwissenschaften“

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

Katrin Linker
geb. in Karlsruhe
Mainz, 2006

*Alles Wissen und alle Vermehrung unseres Wissens endet nicht mit einem
Schlusspunkt, sondern mit Fragezeichen.
Ein Plus an Wissen bedeutet ein Plus an Fragestellungen, und jede von ihnen wird
immer wieder von neuen Fragestellungen abgelöst.*

(Hermann Hesse)

gewidmet meiner Familie

Inhaltsverzeichnis

I	ABBILDUNGSVERZEICHNIS	1
II	TABELLENVERZEICHNIS	3
III	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	4
IV	EINLEITUNG	8
IV.1	NO und Isoformen der NO-Synthase	8
IV.1.1	iNOS	9
IV.2	Regulation der Genexpression	12
IV.2.1	Post-transkriptionelle Regulation der Genexpression	13
IV.2.1.1	Die Rolle der untranslatierten Regionen	13
IV.2.1.2	Mechanismen der Degradation von mRNA	14
IV.2.1.3	Regulation der mRNA-Stabilität durch AU-reiche Elemente.....	14
IV.2.1.4	Weitere Möglichkeiten der post-transkriptionellen Regulation.....	16
IV.3	Regulation der iNOS-Expression	18
IV.3.1	Signaltransduktionswege der Regulation der iNOS-Expression.....	18
IV.3.2	Regulation der Aktivität des iNOS-Promotors.....	20
IV.3.3	Regulation der iNOS-mRNA-Stabilität	21
IV.3.4	Regulation der iNOS-Proteinexpression und der iNOS-Proteinstabilität	22
IV.4	RNA-bindende Proteine	23
IV.4.1	Tristetraprolin (TTP)	23
IV.4.2	Das „KH-type splicing regulatory protein“ (KSRP)	25
IV.4.3	Das Polypyrimidin-Trakt-bindende Protein (PTB)	27
V	ZIEL DER UNTERSUCHUNG	29
VI	MATERIALIEN	30
VI.1	Chemikalien	30
VI.1.1	Spezielle Chemikalien.....	30
VI.1.2	Chemikalien zur Untersuchung der iNOS-Expression.....	31
VI.1.3	Radiochemikalien.....	31
VI.1.4	Reagenzien und Kits.....	32
VI.1.5	Marker	32
VI.2	Lösungen und Puffer	32
VI.2.1	Allgemeine Lösungen und Puffer	32

VI.2.2	Bakterienmedien.....	33
VI.2.3	Lösungen, Medien und Medienzusätze für die Zellkultur	33
VI.2.4	Puffer und Lösungen für die mRNA-Analyse.....	34
VI.2.5	Puffer und Lösungen für die Protein-Extraktion.....	35
VI.2.6	Puffer und Lösungen für Protein-Analysen	36
VI.2.7	Antikörper	37
VI.3	Enzyme	38
VI.4	Plasmide	39
VI.4.1	Plasmide zur <i>in vitro</i> -Transkription radioaktiv markierter antisense-RNA-Sonden	39
VI.4.2	Plasmide zur <i>in vitro</i> -Transkription von sense-RNA-Sonden.....	39
VI.4.3	Plasmide für die Expression und Aufreinigung von Fusionsproteinen.....	40
VI.4.4	Plasmide für die stabile Transfektion.....	41
VI.4.5	Plasmide für die transiente Transfektion.....	41
VI.4.6	Originalplasmide	42
VI.5	Oligonukleotide.....	42
VI.5.1	Sequenzen von Primern und Sonden für die qRT-PCR-Analysen.....	42
VI.5.2	Sequenzen von Oligonukleotiden für die <i>in vitro</i> -Transkription von siRNA ...	43
VI.6	Zelllinien.....	43
VI.7	Bakterien	44
VI.8	Laborgeräte.....	44
VI.8.1	Anlagen zur Elektrophorese	44
VI.8.2	Zentrifugen	44
VI.8.3	Messgeräte.....	45
VI.8.4	Sonstige Laborgeräte.....	45
VI.9	Sonstige Materialien.....	45
VI.9.1	Plastikwaren	45
VI.9.2	Weitere Verbrauchsmaterialien.....	46
VII	METHODEN.....	47
VII.1	Zellbiologische Arbeitsmethoden.....	47
VII.1.1	Kultivierung eukaryoter Zellen	47
VII.1.2	Kryokonservierung und Auftauen eukaryoter Zellen.....	47
VII.1.3	Bestimmung der Zellzahl eukaryoter Zellen	48
VII.1.4	Stimulation eukaryoter Zellen mit Zytokinen	48
VII.1.5	Transiente Transfektion eukaryoter Zellen	48
VII.1.6	Stabile Transfektion eukaryoter Zellen	49
VII.1.7	Transfektion von siRNA	49

VII.1.8	Analyse der NO-Produktion mittels Chemilumineszenz	52
VII.2	Molekularbiologische Arbeitsmethoden	52
VII.2.1	Restriktion von DNA	52
VII.2.2	Phenol-Chloroform-Extraktion und Ethanol-fällung von Nukleinsäuren	52
VII.2.3	Auffüllen überhängender 5'-Enden mit DNA-Polymerase.....	53
VII.2.4	5'-Dephosphorylierung	53
VII.2.5	Agarosegelelektrophorese zur Analyse von DNA	53
VII.2.6	Elution von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen.....	53
VII.2.7	Ligation von DNA.....	54
VII.2.8	Transformation von DNA in Bakterien.....	54
VII.2.9	Plasmid-DNA-Präparation	54
VII.2.10	Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	54
VII.2.11	Photometrische Quantifizierung von Nukleinsäuren	55
VII.2.12	Arbeitsbedingungen beim Arbeiten mit RNA.....	55
VII.2.13	Isolierung von RNA aus Zellen.....	55
VII.2.14	RNase-Verdauungsschutzanalyse	56
VII.2.15	Quantitative realtime RT-PCR (qRT-PCR)	57
VII.2.16	<i>In vitro</i> -mRNA-Degradations-Analyse	58
VII.2.17	Streptavidin-Biotin-gekoppelte RNA-Affinitätschromatographie.....	59
VII.2.18	Luciferase-Reporter-Gen-Assay.....	60
VII.3	Proteinbiochemische Arbeitsmethoden.....	61
VII.3.1	Gewinnung von Proteinextrakten aus Zellen	61
VII.3.2	Photometrische Konzentrationsbestimmung von Proteinen	61
VII.3.3	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	62
VII.3.4	Western-Blot-Analyse.....	63
VII.3.5	Bakterielle Expression und Aufreinigung von GST-Fusionsproteinen.....	64
VII.3.6	Bakterielle Expression und Aufreinigung von His-Tag-Fusionsproteinen.....	65
VII.3.7	UV-Crosslink	65
VII.3.8	Immunpräzipitation von Proteinen.....	67
VII.3.9	Immunpräzipitations-qRT-PCR-Assay	68
VII.3.10	Immunfluoreszenzfärbung	69
VII.4	Statistik.....	69
VIII	ERGEBNISSE	70
VIII.1	Wege der post-transkriptionellen Regulation der humanen iNOS-Expression	70
VIII.1.1	Einfluss der Hemmung der Translation durch Cycloheximid.....	70
VIII.1.2	Einfluss der Hemmung der p38-MAPK durch SB 203580.....	71

VIII.2 Regulation der humanen iNOS-Expression durch das RNA-bindende Protein Tristetraprolin (TTP)	74
VIII.2.1. TTP stabilisiert die humane iNOS-mRNA.....	76
VIII.2.2. TTP hat keinen Effekt auf den iNOS-Promotor.....	77
VIII.2.3. Die Expression von TTP ist in DLD-1-Zellen nach Zytokin-Stimulation erhöht.....	78
VIII.2.4. Hemmung der p38-MAPK mit SB 203580 vermindert die Zytokin-induzierte TTP-Expression in DLD-1-Zellen.....	79
VIII.3 Aufreinigung und Identifizierung von weiteren Proteinen, die mit der 3'-UTR der iNOS-mRNA interagieren	81
VIII.4 Das RNA-bindende Protein KSRP reguliert die Expression der humanen iNOS	83
VIII.4.1 Immundepletion von KSRP erhöht die Stabilität der iNOS-3'-UTR-mRNA in <i>in vitro</i> -mRNA-Degradations-Analysen.....	83
VIII.4.2 Überexpression von KSRP führt zu einer Herunterregulation der iNOS-Expression.....	85
VIII.4.3 Verminderung der KSRP-Expression erhöht die Expression der iNOS.....	87
VIII.4.3.1 Analyse nach Transfektion eines Konstrukts, das die KSRP-cDNA in antisense-Orientierung enthält.....	87
VIII.4.3.2 Analyse nach Transfektion einer siRNA gegen KSRP.....	89
VIII.4.4 KSRP destabilisiert die humane iNOS-mRNA.....	90
VIII.4.5 Stabile, aber nicht transiente Überexpression von KSRP reguliert die Aktivität des humanen iNOS-Promotors herunter.....	91
VIII.4.6 Keine Veränderung der KSRP-Expression nach Zytokin-Stimulation.....	93
VIII.4.7 KSRP interagiert mit der exosomalen Komponente PM-Scl 100.....	94
VIII.4.8 KSRP interagiert mit TTP.....	96
VIII.4.9 Die Interaktion von KSRP und TTP ist nach Hemmung der p38-MAPK durch SB 203580 vermindert.....	96
VIII.4.10 Überexpression einer nicht-bindenden KSRP-Mutante erhöht die Expression der iNOS.....	98
VIII.4.11 Bindung von KSRP an die iNOS-mRNA.....	100
VIII.4.11.1 KSRP bindet an den AU-reichen Teil der iNOS-3'-UTR-mRNA.....	100
VIII.4.11.2 KSRP bindet an das am 3'-Ende der iNOS-3'-UTR gelegene ARE.....	101
VIII.4.12 Konkurrenz von KSRP und HuR um die gleiche Bindungsstelle an der iNOS-mRNA.....	102
VIII.4.13 Keine Veränderung der Bindungsaffinität von KSRP an die iNOS-3'-UTR in RNA-Affinitätschromatographie- und Immunpräzipitations-UV-Crosslink-Analysen.....	102

VIII.4.14	Die endogene Bindung von KSRP an die iNOS-3'-UTR ist nach Zytokin-Stimulation verringert, während gleichzeitig die endogene Bindung von HuR zunimmt	104
VIII.5 Das Polypyrimidin-Trakt-bindende Protein (PTB) reguliert die humane iNOS-Expression		106
VIII.5.1	PTB und KSRP weisen die gleiche subzelluläre Lokalisation auf.....	106
VIII.5.2	PTB interagiert mit KSRP.....	107
VIII.5.3	Überexpression von PTB erhöht die Expression der iNOS	109
VIII.5.4	Verminderung der PTB-Expression erniedrigt die iNOS-mRNA-Expression	110
VIII.5.5	Keine Veränderung der Expression von PTB nach Zytokin-Stimulation	111
VIII.5.6	PTB bindet an die 3'-UTR und an die 5'-UTR der humanen iNOS-mRNA ..	112
IX	DISKUSSION	114
IX.1	Regulation der humanen iNOS-Expression durch post-transkriptionelle Mechanismen	114
IX.2	Regulation der iNOS-Expression durch TTP	116
IX.3	Regulation der iNOS-Expression durch KSRP	119
IX.4	Regulation der iNOS-Expression durch PTB.....	123
IX.5	Ein komplexes Zusammenspiel von RNA-bindenden Proteinen reguliert die humane iNOS-Expression	125
X	ZUSAMMENFASSUNG	128
XI	LITERATURVERZEICHNIS.....	130
XII	PUBLIKATIONEN.....	141

I Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Strukturelle Elemente für die post-transkriptionelle Regulation einer eukaryoten mRNA.....	17
Abbildung 2: Wirkmechanismus von siRNAs	50
Abbildung 3: Produktion von shRNA	51
Abbildung 4: Hemmung der Translation mit CHX vermindert die iNOS-mRNA-Expression, aber nicht die iNOS-Promotoraktivität	71
Abbildung 5: Hemmung der p38-MAPK durch SB 203580 verringert die iNOS-mRNA-Expression, aber nicht die iNOS-Promotoraktivität.....	72
Abbildung 6: Hemmung der p38-MAPK durch SB 203580 verringert die iNOS-Proteinexpression und die iNOS-vermittelte NO-Produktion.....	73
Abbildung 7: Expression von TTP in stabil transfizierten DLD-1-Zellen.....	74
Abbildung 8: TTP erhöht die Expression der humanen iNOS-mRNA	75
Abbildung 9: TTP bindet nicht an die iNOS-mRNA.....	76
Abbildung 10: TTP stabilisiert die humane iNOS-mRNA	77
Abbildung 11: TTP hat keinen Einfluss auf die iNOS-Promotoraktivität	78
Abbildung 12: Die TTP-Proteinexpression ist in DLD-1-Zellen nach Stimulation mit Zytokinen erhöht	79
Abbildung 13: Hemmung der p38-MAPK durch SB 203580 vermindert die Zytokin-induzierte TTP-Expression in DLD-1-Zellen	80
Abbildung 14: Aufreinigung von Proteinen, die mit der 3'-UTR der iNOS-mRNA interagieren.....	81
Abbildung 15: Identifizierung von Proteinen, die mit der iNOS-3'-UTR interagieren.....	82
Abbildung 16: Sonden und Extrakte für die <i>in vitro</i> -mRNA-Degradations-Analyse.....	83
Abbildung 17: Immundepletion von KSRP erhöht die Stabilität der iNOS-3'-UTR in <i>in vitro</i> -mRNA-Degradations-Analysen	84
Abbildung 18: Expression von KSRP in DLD-1-Zellen, die stabil mit einem KSRP-cDNA-Konstrukt transfiziert wurden.....	85
Abbildung 19: Überexpression von KSRP verringert die iNOS-Expression.....	86
Abbildung 20: Expression von KSRP in DLD-1-Zellen, die stabil mit einem Konstrukt transfiziert wurden, das die KSRP-cDNA in antisense-Orientierung enthielt.....	87
Abbildung 21: Expression einer KSRP-cDNA in antisense-Orientierung erhöht die iNOS-Expression	88
Abbildung 22: Verminderung der KSRP-Expression nach Transfektion einer siRNA gegen KSRP	89
Abbildung 23: Transfektion einer siRNA gegen KSRP erhöht die iNOS-Expression	90
Abbildung 24: KSRP destabilisiert die humane iNOS-mRNA.....	91

Abbildung 25: Stabile Überexpression von KSRP reguliert die Aktivität des iNOS-Promotors herunter.....	92
Abbildung 26: Transiente Überexpression von KSRP beeinflusst die Aktivität des iNOS- Promotors nicht	93
Abbildung 27: Keine Veränderung der KSRP-Expression nach Zytokin-Stimulation.....	94
Abbildung 28: KSRP interagiert mit der exosomalen Komponente PM-Scl 100.....	95
Abbildung 29 : KSRP interagiert mit TTP.....	96
Abbildung 30: Die Interaktion von KSRP und TTP ist nach Hemmung der p38-MAPK vermindert	97
Abbildung 31: Expression einer nicht-bindenden KSRP-Mutante in stabil transfizierten DLD-1-Zellen.....	98
Abbildung 32: Überexpression einer nicht-bindenden KSRP-Mutante erhöht die iNOS- Expression	99
Abbildung 33: Fragmente für UV-Crosslink-Experimente und ihre Lage in der iNOS-mRNA.....	100
Abbildung 34: KSRP bindet an den AU-reichen Teil der iNOS-mRNA.....	101
Abbildung 35: KSRP bindet an das am 3'-Ende der iNOS-3'-UTR-mRNA gelegene ARE	101
Abbildung 36: KSRP und HuR konkurrieren um die gleiche Bindungsstelle an der iNOS-3'-UTR-mRNA.....	102
Abbildung 37: Keine Veränderung der Bindungsaffinität von KSRP an eine iNOS-3'-UTR- Sonde.....	103
Abbildung 38: Zytokin-Stimulation verstärkt die Bindung von HuR an die iNOS-3'-UTR, während gleichzeitig die Bindung von KSRP abgeschwächt wird.....	105
Abbildung 39: PTB und KSRP weisen die gleiche subzelluläre Lokalisation auf	107
Abbildung 40: PTB interagiert mit KSRP.....	108
Abbildung 41: Überexpression von PTB erhöht die iNOS-Expression.....	109
Abbildung 42: Verminderung der PTB-Expression nach Transfektion einer siRNA.....	110
Abbildung 43: Verminderung der PTB-Expression erniedrigt die iNOS-mRNA-Expression ...	111
Abbildung 44: Keine Veränderung der PTB-Expression nach Zytokin-Stimulation	112
Abbildung 45: PTB interagiert mit der 3'- und 5'-UTR der iNOS-mRNA.....	113
Abbildung 46: Stabilisierung der iNOS-mRNA nach Stimulation mit Zytokinen	127

II Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Charakterisierung von RNA-bindenden Proteinen	16
Tabelle 2: Plasmide zur in vitro-Transkription radioaktiv markierter antisense-RNA-Sonden..	39
Tabelle 3: Plasmide zur in vitro-Transkription von sense-RNA-Sonden	40
Tabelle 4: Plasmide für die Expression und Aufreinigung von Fusionsproteinen.....	40
Tabelle 5: Plasmide für die stabile Transfektion.....	41
Tabelle 6: Plasmide für die transiente Transfektion.....	41
Tabelle 7: Originalplasmide	42
Tabelle 8: Sequenzen von Primern und Sonden für die qRT-PCR-Analysen.....	42
Tabelle 9: Sequenzen von Oligonukleotiden für die in vitro-Transkription von siRNA	43
Tabelle 10: Zelllinien	44
Tabelle 11: Effekte der untersuchten RNA-bindenden Proteine auf die Regulation der iNOS- Expression	125

III Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
A549/8	humane Alveolarepithel-Karzinomzellen
AKN-1	humane Leberzellen
Amp	Ampicillin
AP-1	Aktivator Protein-1
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ARE	AU-reiches Element
ATP	Adenosintriphosphat
BH ₄	5,6,7,8-Tetrahydrobiopterin
bp	Basenpaare
BRF	butyrate response factor
BSA	Rinderserumalbumin (bovine serum albumin)
ca.	circa
Cam	Chloramphenicol
cDNA	(zur mRNA) komplementäre DNA
C	Cytosin
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
cds	für ein Protein codierende Sequenz eines Gens (coding sequence)
CHX	Cycloheximid
CIAP	alkalische Phosphatase aus Kälberdarm (calf intestinal alkaline phosphatase)
CM	Zytokingemisch (cytokine mixture): IFN- γ (100 U/ml), IL-1 β (50 U/ml) und TNF- α (10 ng/ml)
Co	unbehandelte (nicht mit Zytokinen behandelte) Zellen
COX-2	Cyclooxygenase-2
cpm	counts per minute
CREB	cAMP-responsives Element-bindendes Protein
DAPI	4'-5-Diamidino-2-phenylindolhydrochlorid
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DLD-1	humane Kolon-Adenokarzinomzellen
DMEM	Dulbecco's modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNase	Desoxyribonuklease
DNA	Desoxyribonukleinsäure (deoxyribonucleic acid)
DTT	1,4-Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetrasessigsäure

EGFP	enhanced green fluorescent protein
ELAV	embryonic lethal abnormal vision
eNOS	endotheliale Isoform der NOS (NOS III)
ERK1/2	extrazellulär regulierte Kinase 1/2
FACS	Fluoreszenz-aktiviertes Zell-Sortieren
FAPP	Formamid-Probenpuffer
FBP	FUSE-(far upstream element-)bindendes Protein
FCS	Fötales Kälberserum (fetal calf serum)
FGF	Fibroblastenwachstumsfaktor (fibroblast growth factor)
g	Erdbeschleunigung bzw. Gramm
G	Guanin
G418	G418-Sulfat (Neomycinsulfat)
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GIT	Guanidiniumisothiocyanat-haltiger Puffer
GM-CSF	Granulozyten/Monozyten-Kolonie-stimulierender Faktor (granulocyte/monocyte colony stimulating factor)
GST	Glutathion-S-Transferase
GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunde
hc	schwere Kette eines Immunglobulins (heavy chain)
HEPES	2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl]-ethansulfonsäure
His	Histidin
hnRNP	heterogenes nukleäres Ribonukleoprotein (heterogeneous nuclear ribonucleoprotein)
hsp	Hitzeschockprotein
hTTP	humanes Tristetraprolin
IFN- γ	Interferon- γ
Ig	Immunglobulin
IL-1 β	Interleukin-1 β
IL-2, -4, -6, -10, -13	Interleukin-2, -4, -6, -10, -13
iNOS	induzierbare Isoform der NOS (NOS II)
IP	Immunpräzipitation
IPTG	Isopropyl-(β -)(D-)thiogalactopyranosid
IRES	interne Ribosomeneintrittsstelle (internal ribosome entry site)
IRF	Interferon-regulierter Faktor
JAK	Januskinase
JNK	c-jun N-terminale Kinase
kb	Kilo-Basen

kDa	Kilo-Dalton
KSRP	KH-type splicing regulatory protein
LPS	Lipopolysaccharid
LUC	Luciferase
MALDI-TOF	Matrix assisted laser desorption ionisation-time of flight
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
min	Minute
MK-2	Mitogen-aktivierte Proteinkinase-aktivierte Proteinkinase-2
μORF	upstream open reading frame
mRNA	messenger-RNA
NADH	Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid
NADPH	Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat
NF-κB	Nukleärer Faktor-κB
NMD	nonsense mediated decay
nNOS	neuronale Isoform der NOS (NOS I)
NO	Stickstoffmonoxid (nitric oxide)
NOS	Stickstoffmonoxid-Synthase (nitric oxide synthase)
nt	Nukleotide
OD	Extinktion (optical density)
p.a.	pro analysi
PABP	Poly-A-bindendes Protein
PARN	Poly-A-Ribonuklease
PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung (phosphate buffered saline)
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PDGF	platelet derived growth factor
PIPES	Piperazin-1,4-bis(2-ethansulfonsäure)-haltiger Puffer
PKA	Proteinkinase A
PKB	Proteinkinase B
PKC	Proteinkinase C
PKR	Proteinkinase R
Prä-IS	Präimmunsrum
PTB	Polypyrimidin-Trakt-bindendes Protein
qRT-PCR	quantitative realtime RT-PCR
RISC	RNA induced silencing complex
RNase	Ribonuklease
RNA	Ribonukleinsäure (ribonucleic acid)
RPM	rounds per minute (Umdrehungen pro Minute)
RT	Reverse Transkription

SDS	Natriumdodecylsulfat (sodium dodecyl sulfate)
sec	Sekunde
SEM	standard error of mean
shRNA	small hairpin RNA
siRNA	small interfering RNA
STAT-1 α	Signal-Transduktor und Aktivator der Transkription-1 α (signal transducer and activator of transcription-1 α)
T	Thymin
TBE	Tris-HCl-, Borsäure- und EDTA-haltiger Puffer
TBS	Tris-gepufferte Kochsalzlösung (tris buffered saline)
TEMED	N, N, N',N'-Tetramethylethyldiamin
TGF- β	Transformierender Wachstumsfaktor- β (transforming growth factor- β)
TIA-1	T-cell intracellular antigen-1
TIAR	TIA-1-related protein
TNF- α	Tumornekrosefaktor- α
TPA	Tetradecanoyl-Phorbol-13-Acetat, entspricht Phorbol-12-Myristat-13-Acetat (PMA)
t-RNA	transfer-RNA
TTP	Tristetraprolin
U	Uracil bzw. Units
UTP	Uridintriphosphat
UTR	untranslatierte Region eines Gens
UV	ultraviolett
VEGF	vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor (vascular endothelial growth factor)
vs.	versus

IV Einleitung

IV.1 NO und Isoformen der NO-Synthase

Stickstoffmonoxid ($\bullet\bar{N} = \bar{O}$; NO) ist das bisher kleinste bekannte bioaktive Molekül (Förstermann *et al.*, 1995a) und ein wichtiger Regulator verschiedenster biologischer Mechanismen. Es wird von fast allen tierischen oder pflanzlichen Zelltypen produziert (Choi *et al.*, 1995; Hausladen und Stamler, 1998) und ist an vielen physiologischen und pathophysiologischen Prozessen beteiligt. Daher ist zur Vermeidung unerwünschter Effekte eine präzise Regulation der Produktion von NO von großer Bedeutung.

Die Biosynthese von NO wird von dem Enzym NO-Synthase (NOS; EC 1.14.13.39) katalysiert. Die NO-Synthase existiert im Organismus von Säugetieren in drei verschiedenen Isoformen; der neuronalen NOS (nNOS), der induzierbaren NOS (iNOS) und der endothelialen NOS (eNOS) (Förstermann *et al.*, 1995a; Geller und Billiar, 1998). Alle drei Isoenzyme verwenden die basische Aminosäure L-Arginin als Substrat und Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat (NAPDH) und molekularen Sauerstoff (O_2) als Cosubstrate. Außerdem werden als weitere Cofaktoren 5,6,7,8-Tetrahydrobiopterin (BH_4) und Calmodulin benötigt. Nach einem Anstieg der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration bindet der Ca^{2+} -Calmodulin-Komplex an das NOS-Enzym und sorgt so für dessen Aktivierung. Die iNOS kann als einzige der drei Isoformen auch in Abwesenheit von Ca^{2+} Calmodulin binden und wird daher Ca^{2+} -unabhängig reguliert (Stuehr *et al.*, 1991). Während die nNOS und eNOS nach einem Anstieg der Ca^{2+} -Konzentration nur im Bereich von Minuten NO produzieren, zeichnet sich die iNOS durch eine andauernde Enzymaktivität aus. Dadurch erklärt sich die bis zu 1.000-fach höhere NO-Produktion der iNOS im Vergleich zur nNOS und eNOS (Geller und Billiar, 1998). Alle drei NOS-Isoformen sind nur als Homodimere katalytisch aktiv. Für die Dimerisierung scheint die Bindung von Calmodulin und BH_4 essentiell zu sein (Sennequier *et al.*, 1999; Siddhanta *et al.*, 1996).

Die drei NOS-Enzyme sind relativ große Proteine mit Molekulargewichten von 130 bis 160 kDa. Sie werden von drei verschiedenen Genen codiert, die auf den Chromosomen 12 (nNOS), 17 (iNOS) und 7 (eNOS) lokalisiert sind. Die humanen Isoformen der NOS weisen untereinander eine Sequenzhomologie von weniger als 59 % auf. Die Sequenzhomologie zwischen verschiedenen Spezies beträgt bei der iNOS 80 %, bei der nNOS und eNOS mehr als 90 %. Somit sind die NO-Synthasen hochgradig konservierte Enzyme (Förstermann *et al.*, 1994).

Die neuronale NOS (nNOS, NOS I) wird in Neuronen des zentralen und peripheren Nervensystems, in spezialisierten Epithelzellen und in Skelettmuskelzellen exprimiert (Förstermann *et al.*, 1998). Das von ihr gebildete NO spielt eine wichtige Rolle bei der Transmitterfreisetzung, der Neurogenese, der synaptischen Plastizität und bei der Regulation der neuronalen Genexpression. Ursprünglich wurde von einer konstitutiven Expression der nNOS ausgegangen; inzwischen sind jedoch eine Vielzahl von Stimuli bekannt, die die Expression der

nNOS regulieren (Boissel *et al.*, 2003; Chesler *et al.*, 2004; Förstermann *et al.*, 1998; Rife *et al.*, 2000).

Die induzierbare NO-Synthase (iNOS, NOS II) ist in den meisten Zelltypen nicht konstitutiv exprimiert; ihre Expression kann in Makrophagen und anderen Zellen durch Stimulation mit bakteriellem Lipopolysaccharid (LPS) oder Zytokinen induziert werden (Hevel *et al.*, 1991; Stuehr *et al.*, 1991; Yui *et al.*, 1991). Das von der iNOS gebildete NO ist an zahlreichen physiologischen und pathophysiologischen Vorgängen beteiligt (IV.1.1).

Die endotheliale NOS (eNOS) findet sich hauptsächlich in Endothelzellen. Das von ihr produzierte NO ist ein potenter Vasodilatator (Huang *et al.*, 1995) und hemmt die Adhäsion und Aggregation von Thrombozyten (Förstermann *et al.*, 1993). Der früheren Vorstellung, dass die eNOS konstitutiv exprimiert und allein durch die Höhe der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration reguliert wird, stehen inzwischen Hinweise auf eine transkriptionelle und post-transkriptionelle Regulation der eNOS-Expression entgegen (Drummond *et al.*, 2000; Förstermann *et al.*, 1998; Li *et al.*, 2002; Searles *et al.*, 1999).

IV.1.1 iNOS

Die induzierbare NO-Synthase wird unter physiologischen Bedingungen nicht oder nur in sehr geringer Konzentration exprimiert. Ihre Expression kann jedoch in Makrophagen und den meisten anderen untersuchten Zelltypen durch verschiedene proinflammatorische Substanzen, wie LPS oder Zytokine, induziert werden (Hevel *et al.*, 1991; Stuehr *et al.*, 1991; Yui *et al.*, 1991). Die cDNA der iNOS wurde erstmals aus murinen Makrophagen kloniert (Lowenstein *et al.*, 1992; Lyons *et al.*, 1992; Xie *et al.*, 1992). Eine Induktion der iNOS ist aber auch in einer Vielzahl weiterer Zellen möglich, unter anderem in Lymphozyten, neutrophilen und eosinophilen Granulozyten und Mastzellen der Ratte, in glatten Muskelzellen der Ratte (Bandaletova *et al.*, 1993), in Chondrozyten des Menschen (Charles *et al.*, 1993), in Hepatozyten (Geller *et al.*, 1993; Wood *et al.*, 1993), Astrozyten (Ding *et al.*, 1997) und Retinaepithelzellen von Mensch, Maus und Ratte (Hangai *et al.*, 1996; Park *et al.*, 1994) sowie in der humanen kolorektalen Adenokarzinomzelllinie DLD-1 (Sherman *et al.*, 1993b) und der Alveolarepithel-Karzinomzelllinie A549 (Sherman *et al.*, 1999). Eine konstitutive Expression der iNOS konnte im Bronchialepithel von Ratte und Mensch (Guo *et al.*, 1995; Kobzik *et al.*, 1993), im menschlichen Nasenepithel (Guo *et al.*, 1995), im Epithel des Ileums von Ratte und Mensch (Hoffman *et al.*, 1997; Zhang *et al.*, 1998), im Skelettmuskel des Meerschweinchens (Gath *et al.*, 1996) sowie in der Niere (Tojo *et al.*, 1994) und im Ovar von Ratten (Matsumi *et al.*, 1998) nachgewiesen werden.

Die iNOS ist als Ca^{2+} -unabhängiges Enzym nach ihrer Synthese permanent aktiv und produziert große Mengen an NO, das in hohen Konzentrationen zytotoxisch wirken kann. Durch seine hohe Affinität zu Protein-gebundenem Eisen kann NO an das katalytische Zentrum zahlreicher

Enzyme binden und diese dadurch blockieren. So können unter anderem die NADH-Ubichinon-Oxidoreduktase (Komplex I der Atmungskette), die Succinat-Ubichinon-Oxidoreduktase (Komplex II der Atmungskette), die *cis*-Aconitase und die Ribonukleotid-Reduktase inaktiviert werden (Kröncke *et al.*, 1994; Nathan und Hibbs, 1991). Weitere toxische Effekte werden durch die Stickstoffmonoxid-Intermediate Peroxynitrit oder Distickstofftrioxid (N₂O₃) vermittelt. Diese Verbindungen sind äußerst reaktiv und können zur S-Nitrosylierung von Thiolen, Nitrierung von Tyrosinresten, Desaminierung von Nukleotiden und DNA-Strangbrüchen führen (Kröncke *et al.*, 1995). Makrophagen und andere Zellen machen sich diese zytostatischen und zytotoxischen Eigenschaften von NO zunutze, um Bakterien, Pilze, Viren, Parasiten oder Tumorzellen abzutöten (Green *et al.*, 1990; Karupiah und Harris, 1995). Daher ist NO ein essentieller Bestandteil der unspezifischen Immunabwehr (Bogdan, 2001; Kröncke *et al.*, 1995; MacMicking *et al.*, 1997).

Des Weiteren ist von der iNOS produziertes NO auch für die Wundheilung von Bedeutung, da es die Synthese von VEGF und Kollagen steigert (Frank *et al.*, 1998; Thornton *et al.*, 1998). In Mäusen mit einem nicht-funktionellen iNOS-Gen (iNOS-knock-out; iNOS^(-/-)) wurde eine verzögerte Wundheilung beobachtet, die durch adenoviralen Retransfer des iNOS-Gens rückgängig gemacht werden konnte (Yamasaki *et al.*, 1998). Dem von der iNOS gebildeten NO werden außerdem hepatoprotektive Eigenschaften zugeschrieben (Bohlinger *et al.*, 1995; Harbrecht *et al.*, 1997; Kim *et al.*, 1997); der Mechanismus dabei ist jedoch noch nicht endgültig geklärt.

Neben diesen positiven Effekten ist die iNOS jedoch auch an zahlreichen pathophysiologischen Prozessen ursächlich beteiligt, meist durch Überexpression in Zellen, die unter physiologischen Bedingungen keine oder nur eine sehr geringe iNOS-Aktivität aufweisen (Bogdan, 2001; Kröncke *et al.*, 1998). Das zytotoxische Potential von NO richtet sich dann gegen körpereigene Zellen und ist so an der Pathogenese von zahlreichen Autoimmunerkrankungen und chronisch inflammatorischen Zuständen beteiligt. Beispielsweise ist beim Diabetes mellitus Typ I von der iNOS gebildetes NO wesentlich mitverantwortlich für die Zerstörung von β -Zellen des Pankreas (Corbett und McDaniel, 1992; Kolb und Kolb-Bachofen, 1992; Kolb-Bachofen, 1996). Außerdem spielt es eine wichtige Rolle bei der Entstehung von rheumatoider Arthritis (Stichtenoth und Frölich, 1998), chronisch entzündlichen Darmerkrankungen (M. Crohn und Colitis ulcerosa) (Kimura *et al.*, 1998; Singer *et al.*, 1996), multipler Sklerose (Bagasra *et al.*, 1995; De Groot *et al.*, 1997), Asthma bronchiale (Barnes, 1996; Hamid *et al.*, 1993), systemischem Lupus erythematoses und bestimmten Glomerulonephritiden und Vaskulitiden (Förstermann *et al.*, 1994; Mulligan *et al.*, 1991). Des Weiteren ist von der iNOS synthetisiertes NO an der unspezifischen Form der Gewebeabstoßungsreaktion beteiligt (Langrehr *et al.*, 1991). Beim septischen Schock scheint vor allem die iNOS-vermittelte NO-Produktion für den massiven Blutdruckabfall verantwortlich zu sein (MacMicking *et al.*, 1995). Die iNOS-Expression wird dabei in glatten Gefäßmuskelzellen als Antwort auf das in gram-negativen

Bakterien enthaltene LPS induziert. Daraufhin exzessiv gebildetes NO hat den gleichen Wirkmechanismus wie von der eNOS produziertes NO und führt durch Vasodilatation zu schwerer Hypotension und Mikrozirkulationsstörungen, die letztlich in einem Multiorganversagen enden können. Sowohl *in vitro*-Experimente, die zeigen, dass in glatten Muskelzellen die Expression der iNOS durch IL-1, TNF- α und LPS induziert werden kann (Busse und Mülsch, 1990; Kilbourn und Belloni, 1990), als auch *in vivo*-Studien mit NOS-Inhibitoren, die die Endotoxin-induzierte Hypotonie wieder aufheben können (Kilbourn *et al.*, 1990), bestätigen die Rolle von NO beim Blutdruckabfall im septischen Schock. Die iNOS scheint bei der Sepsis jedoch auch protektive Funktionen für die Niere (Markewitz *et al.*, 1993) und den Darm (MacKendrick *et al.*, 1993) zu besitzen.

Die Rolle der iNOS bei der Tumorentstehung und -progression wird kontrovers diskutiert. Einerseits stellt NO einen wirksamen Abwehrmechanismus gegen das Tumorwachstum dar, andererseits fördert NO aber auch die Vaskularisierung und Perfusion und damit die Tumorphiliferation (Chinje und Stratford, 1997). So korreliert beim murinen Retikulumzellsarkom eine verringerte Metastasierungsrate mit einer Steigerung der iNOS-vermittelten NO-Produktion, wohingegen beim humanen Mammakarzinom eine gesteigerte iNOS-Expression mit einer erhöhten Metastasierungsrate in die axillären Lymphknoten in Zusammenhang gebracht wird (Ambs *et al.*, 1998; Duenas-Gonzalez *et al.*, 1997). Des Weiteren scheinen sich die iNOS und das p53-Tumor-Suppressor-Gen gegenseitig zu beeinflussen. Durch NO hervorgerufene DNA-Schäden steigern die Aktivität des p53-Tumor-Suppressors, der seinerseits die Synthese der iNOS negativ beeinflusst (Ambs *et al.*, 1997). Neuere Studien jedoch betrachten von der iNOS produziertes NO bereits als eine Art Schlüsselmolekül für die Regulation der Tumorgenese. Eine erhöhte iNOS-Expression konnte in Tumoren des Darms (Lala und Chakraborty, 2001), der Lunge (Harmey *et al.*, 2002), des Oropharynx (Pukkila *et al.*, 2002), der reproduktiven Organe (Bulut *et al.*, 2005) und des Zentralnervensystems (Broholm *et al.*, 2001; Broholm *et al.*, 2003) festgestellt werden. Außerdem konnte gezeigt werden, dass von der iNOS produziertes NO und dessen reaktiver Metabolit Peroxynitrit die Aktivität der Cyclooxygenase-2 (COX-2) stimulieren. Dies führt zur Bildung von Prostaglandinen, die ihrerseits das Tumorwachstum fördern (Rao, 2004).

Die widersprüchlichen Effekte von NO auf das Tumorgeschehen können durch die Komplexität der Signaltransduktionswege in den Tumorzellen erklärt werden, die auf den Stimulus NO sehr unterschiedlich und in Abhängigkeit von dessen Konzentration reagieren.

IV.2 Regulation der Genexpression

Spätestens seit der vollständigen Analyse des humanen Genoms ist bekannt, dass nur ein kleiner Teil des genetischen Materials - ungefähr 1,5 % - letztendlich für Proteine codiert (Lander *et al.*, 2001; Venter *et al.*, 2001). Tatsächlich ist der weitaus größere Teil der genomischen DNA an der Regulation der Genexpression beteiligt. Der äußerst komplexe Ablauf der Regulation der eukaryoten Genexpression beinhaltet eine Reihe von präzise regulierten Schritten im Zellkern und im Zytoplasma. Im Zellkern werden die Gene in Prä-messenger-RNAs transkribiert, die einer Reihe von nukleären Reifungsschritten unterliegen. Reife mRNAs werden daraufhin ins Zytoplasma transportiert, wo die Translation in Proteine stattfindet. Gleichzeitig unterliegt die mRNA dort auch einem Abbauprozess. Früher ging man davon aus, dass diese Vorgänge individuell von verschiedenen DNA- und RNA-bindenden Proteinen reguliert werden, die sich entweder im Zellkern oder im Zytoplasma befinden. Heute weiß man, dass viele multifunktionelle Proteine an der Regulation der Genexpression sowohl im Zellkern als auch im Zytoplasma beteiligt sind. Dazu müssen diese Proteine in der Lage sein, zwischen Zellkern und Zytoplasma zu pendeln (Wilkinson und Shyu, 2001).

Die Kontrolle der Transkription wird vor allem durch Transkriptionsfaktoren, RNA-Polymerasen und eine Reihe von in der DNA lokalisierten *cis*-Elementen, wie Promotoren, Enhancern oder Silencern vermittelt. Diese Faktoren regulieren die Produktion der Prä-mRNA-Moleküle, die dann weiteren Reifungsschritten unterliegen, bevor sie funktionell aktiv sind. Diese Schritte beinhalten das Entfernen von Introns (Spleißen), das Anfügen einer 7-Methyl-Guanylat-Kopfgruppe am 5'-Ende des ersten Exons („Capping“) sowie eines Poly-A-Schwanzes aus 100 bis 250 Adenyl-Resten am 3'-Ende des letzten Exons. Bei vielen Genen dient das Spleißen jedoch nicht nur dem Entfernen von Introns, sondern führt durch alternativen Gebrauch von Exons zur Entstehung unterschiedlicher RNA-Transkripte. Dieser Vorgang des alternativen Spleißens ist eine häufig benutzte Möglichkeit, auf die Expression von Genen Einfluss zu nehmen. Dabei wird die Auswahl der Spleißstelle unter anderem von der Sekundärstruktur der Prä-mRNA und der Exongröße mitbestimmt. Sowohl in Exons als auch in Introns wurden Enhancer- und Repressor-RNA-Elemente beschrieben, die den Gebrauch von spezifischen Spleißstellen modulieren (Krecic und Swanson, 1999). In wenigen Fällen findet nach der Transkription ein Basenaustausch statt, der als „mRNA-Editing“ bezeichnet wird. Dadurch kann eine mRNA-Sequenz entstehen, die von der zugehörigen genomischen DNA-Sequenz abweicht. Die entstandene reife mRNA besitzt eine dreigeteilte Struktur: eine 5'-untranslatierte Region (5'-UTR), die codierende Sequenz (cds) und eine 3'-untranslatierte Region (3'-UTR). Die untranslatierten Regionen spielen eine wichtige Rolle für die post-transkriptionelle Regulation der Genexpression. Sie sind am Transport der mRNA aus dem Zellkern, der Effektivität der Translation (van der Velden und Thomas, 1999), der subzellulären Lokalisation (Jansen, 2001) sowie der Stabilität der mRNA (Bashirullah *et al.*, 2001) beteiligt. Die Bedeutung von untranslatierten Regionen wird dadurch unterstrichen, dass Mutationen in diesen Regionen

ernsthafte pathophysiologische Vorgänge zur Folge haben können (Conne *et al.*, 2000). Eine veränderte Expression bestimmter Gene durch Dysregulation der 3'-UTR-vermittelten Modulation der mRNA-Stabilität kann beispielsweise zu Hypertonie, Herzinsuffizienz und Myokardinfarkt führen (Misquitta *et al.*, 2001).

IV.2.1 Post-transkriptionelle Regulation der Genexpression

IV.2.1.1 Die Rolle der untranslatierten Regionen

Die untranslatierten Regionen besitzen eine Vielzahl von Möglichkeiten, auf die post-transkriptionelle Regulation der Genexpression Einfluss zu nehmen. Bestimmte Motive in der 5'- bzw. 3'-UTR können mit spezifischen RNA-bindenden Proteinen interagieren. Hierfür sind sowohl die Primär- als auch die Sekundärstruktur der mRNA von Bedeutung. Auch Interaktionen von komplementären nicht-codierenden RNAs, wie mikro-RNAs, mit Sequenz-Abschnitten der UTRs scheinen eine Schlüsselrolle bei der Regulation der Expression zu spielen (Xie *et al.*, 2005). Des Weiteren wurde gezeigt, dass repetitive Sequenz-Elemente für die Regulation der mRNA-Expression bedeutsam sind. Beispielsweise können CUG-bindende Proteine an repetitive CUG-Elemente in der 5'-UTR spezifischer RNAs binden und auf diese Weise die Effektivität der Translation beeinflussen (Timchenko, 1999).

Die durchschnittliche Länge der 5'-UTR ist in verschiedenen Spezies und Klassen relativ konstant und beträgt zwischen 100 und 200 Nukleotiden. Dagegen reicht die Länge der 3'-UTR von ungefähr 200 Nukleotiden in Pflanzen und Pilzen bis zu 800 Nukleotiden in menschlichen 3'-UTR-Sequenzen. Innerhalb einer Spezies kann die Länge der 5'-UTR und der 3'-UTR jedoch von einem Dutzend bis zu 1.000 Nukleotiden variieren (Pesole *et al.*, 2001). Es wurde sogar gezeigt, dass selbst ein einziges Nukleotid als 5'-UTR *in vitro* ausreichend ist, um die Translation zu initiieren (Hughes und Andrews, 1997). Die untranslatierten Regionen einer mRNA können auch Introns enthalten, die häufiger in der 5'-UTR als in der 3'-UTR auftreten (Grabowski und Black, 2001). Durch verschiedene Transkriptions-Startstellen, Polyadenylierungs- oder Spleißstellen können sich alternative untranslatierte Regionen ergeben, deren Vorkommen unter anderem vom Zelltyp, vom Entwicklungsstatus der Zelle oder von pathophysiologischen Vorgängen abhängt (Grabowski und Black, 2001). 5'- und 3'-UTR unterscheiden sich auch in der Basenzusammensetzung; dabei ist der GC-Gehalt der 5'-UTR meist höher als der der 3'-UTR-Sequenzen (Pesole *et al.*, 1997).

IV.2.1.2 Mechanismen der Degradation von mRNA

Die Degradation von mRNA findet in eukaryoten Zellen hauptsächlich über zwei Mechanismen statt. Meistens beginnt der mRNA-Abbau mit der Verkürzung des Poly-A-Schwanzes, der Deadenylierung, die durch verschiedene Enzyme katalysiert werden kann. Anschließend wird die 5'-Cap-Struktur durch einen Enzymkomplex aus zwei Untereinheiten, den „Decapping“-Enzymen Dcp1 und Dcp2, entfernt. Erst dann kann das Transkript durch eine 5'-3'-Exonuklease, Xrn1p, verdaut werden (Oliveira *et al.*, 2002).

Alternativ können mRNAs nach der Deadenylierung in 3'-5'-Richtung durch das Exosom, einem Komplex aus 3'-5'-Exonukleasen, abgebaut werden (He und Parker, 2001). Ursprünglich wurde das Exosom auch als PM-Scl-Komplex bezeichnet, da es zuerst als Autoantigenkomplex in Patienten mit einem überlappenden Polymyositis-Sklerodermie-Syndrom identifiziert wurde (Reichlin und Arnett, 1984; Treadwell *et al.*, 1984; Wolfe *et al.*, 1977). Später wurde gezeigt, dass die Hauptantigene PM-Scl 100 und PM-Scl 75 homolog zu den bakteriellen Exoribonukleasen RNase D und RNase PH sind (Mian, 1997). In humanen Zellen wird das Exosom durch RNA-bindende Proteine an instabile mRNAs rekrutiert (Chen *et al.*, 2001).

Weitere Abbaumechanismen führen entweder durch sequenzspezifische Endonukleasen oder als Folge der Bindung von mikro-RNAs oder „small interfering“ RNAs (siRNAs) zu einer endonukleolytischen Spaltung der mRNA (Dodson und Shapiro, 2002). Des Weiteren besitzen Zellen spezifische Möglichkeiten, um fehlerhafte RNAs schnell zu degradieren. Dazu zählt beispielsweise der Mechanismus des „nonsense mediated decay“ (NMD), der RNAs mit einem vorzeitigen Stopcodon erkennt und diese entweder unabhängig von der Deadenylierung oder durch beschleunigte Deadenylierung mit anschließendem 3'-5'-exonukleolytischem Verdau abbaut (Lejeune *et al.*, 2003).

IV.2.1.3 Regulation der mRNA-Stabilität durch AU-reiche Elemente

Die Modulation der mRNA-Stabilität ist ein entscheidender Faktor für die post-transkriptionelle Regulation der Genexpression. Die Halbwertszeit vieler instabiler RNAs wird durch *cis*-Elemente in der 3'-UTR, wie Adenylat- und Uridylat-reiche (AU-reiche) Elemente (AREs) kontrolliert. AREs stimulieren den Abbau von mRNA als Reaktion auf eine Vielzahl von spezifischen extra- und intrazellulären Signalen. Dabei sind sie die am weitesten verbreiteten und effizientesten Determinanten der mRNA-Stabilität in Mammalierzellen (Bevilacqua *et al.*, 2003). Die AREs in den 3'-untranslatierten Regionen der mRNAs von Zytokinen und Onkogenen sind zwischen verschiedenen Spezies hochgradig konserviert. Beispielsweise ist die Sequenzhomologie zwischen den AU-reichen Domänen der 3'-UTRs der murinen und humanen IL-3-mRNA wesentlich höher als die der entsprechenden codierenden Sequenzen (Dorssers *et al.*, 1987).

Es konnte gezeigt werden, dass das Auftreten des Pentamers AUUUA innerhalb eines funktionalen AREs einen destabilisierenden Effekt ausübt (Akashi *et al.*, 1994; Chen und Shyu, 1994; Stoecklin *et al.*, 1994). AU-reiche Elemente werden als potente Stimulatoren sowohl des „Decappings“ (Gao *et al.*, 2001) als auch der Deadenylierung (Xu *et al.*, 1997) beschrieben. Das Vorhandensein von AUUUA-Motiven bedeutet jedoch nicht zwangsläufig, dass die mRNA eine verringerte Stabilität besitzt.

AREs können in drei Klassen unterteilt werden: Klasse I und II zeichnen sich durch das Vorhandensein multipler Kopien des Pentanukleotids AUUUA aus, welches in Klasse III-AREs fehlt (Peng *et al.*, 1996). Klasse I-AREs kontrollieren die zytoplasmatische Deadenylierung von mRNAs durch eine gleichmäßige Degradation des Poly-A-Schwanzes, wobei Intermediate mit Poly-A-Schwänzen von 30-60 Nukleotiden entstehen. Sie finden sich häufig in mRNAs, die für nukleäre Transkriptionsfaktoren wie c-myc oder c-fos codieren. Das AUUUA-Element befindet sich hier zusätzlich in einer U-reichen Umgebung. Klasse II-AREs vermitteln eine unterschiedlich schnelle Deadenylierung von verschiedenen Transkripten. Sie sind durch das Vorhandensein vieler zusammenhängender oder überlappender AUUUA-Pentamere charakterisiert. Klasse II-AREs sind unter anderem in der mRNA von Zytokinen wie GM-CSF, Interleukin-2 oder dem Tumornekrosefaktor- α (TNF- α) vorhanden. Klasse III-AREs, die sich zum Beispiel in der c-jun-mRNA finden, besitzen nur U-reiche Segmente (Mignone *et al.*, 2002). An diese *cis*-Elemente der 3'-UTR der RNA können *trans*-agierende Faktoren, die ARE-bindenden Proteine, binden. Es wurden bereits zahlreiche dieser Proteine identifiziert und charakterisiert. Die Interaktion eines ARE-bindenden Proteins mit der mRNA kann verschiedene Effekte auf Prozesse wie Stabilität, Translation oder subzelluläre Lokalisation der mRNA zur Folge haben. Dabei kann die Funktion des jeweiligen Proteins auch von den spezifischen Degradationsbedingungen einer RNA abhängen (Bevilacqua *et al.*, 2003). Der genaue Mechanismus, über den ARE-bindende Proteine den Abbau von mRNA regulieren, ist jedoch noch nicht geklärt.

Tabelle 1 stellt einige wichtige RNA-bindende Proteine vor. Die in dieser Arbeit untersuchten Proteine sind unter IV.4 genauer beschrieben.

Protein	Lokalisation	Bekannte Funktionen für den mRNA-Abbau	Interaktion/ Regulation	Literatur
AUF 1/ hnRNP D 4 Isoformen	p42, p45: Zellkern p37, p40: Zytoplasma	mRNA-destabilisierend, mRNA-stabilisierend	hsp70; AUF 1; NSEP-1; NSAP-1; IMP-2	Moraes <i>et al.</i> , 2003; Wilson und Brewer, 1999
HuR	Zellkern, Zytoplasma	mRNA-stabilisierend, mRNA-Transport	p38-MAPK; SET- α , - β ; pp32; APRIL	Brennan und Steitz, 2001
TTP	Zytoplasma, Zellkern	mRNA-destabilisierend	p38-MAPK; p42-MAPK; MK-2; 14-3-3	Blackshear, 2002
BRF-1	Zytoplasma, Zellkern	mRNA-destabilisierend	PKB; 14-3-3	Schmidlin <i>et al.</i> , 2004
KSRP	Zellkern, Zytoplasma	mRNA-destabilisierend	unbekannt	Chen <i>et al.</i> , 2001
TIA-1, TIAR	Zellkern, Zytoplasma	mRNA-destabilisierend, Translation	unbekannt	Pieczyk <i>et al.</i> , 2000
hnRNP A1	Zellkern	mRNA-destabilisierend	unbekannt	Hamilton <i>et al.</i> , 1993
hnRNP I/ PTB	Zellkern, Zytoplasma	mRNA-stabilisierend Translation	PKA; hnRNP L	Valcarcel und Gebauer, 1997

Tabelle 1: Charakterisierung von RNA-bindenden Proteinen

IV.2.1.4 Weitere Möglichkeiten der post-transkriptionellen Regulation

Neben der Modulation der mRNA-Stabilität gibt es weitere Möglichkeiten zur Regulation der Genexpression auf post-transkriptioneller Ebene. Dazu zählt unter anderem die Beeinflussung der subzellulären Lokalisation von mRNAs. Auch diese wird über *cis*-Elemente in der 3'-UTR oder der 5'-UTR vermittelt. Solche Elemente sind beispielsweise die mRNA-„zip codes“, die mit sogenannten „zip code“-bindenden Proteinen, wie z. B. Staufen, interagieren und den Transport der mRNA aus dem Zellkern ins Zytoplasma regulieren (Mignone *et al.*, 2002).

Auch die Kontrolle der Translation spielt eine wichtige Rolle bei der Regulation der Genexpression. Eine Regulation der Translation wird meist über strukturelle Elemente der 5'-UTR vermittelt. mRNAs, die an Entwicklungsprozessen beteiligt sind und deren Expression

fein reguliert werden muss, wie beispielsweise die mRNAs von Wachstumsfaktoren, Transkriptionsfaktoren oder Proto-Onkogenen, besitzen größtenteils eine überdurchschnittlich lange 5'-UTR-Sequenz (Kozak, 1987). Viele dieser mRNAs enthalten sogenannte „upstream open reading frames“ (μ ORFs), die auch als regulatorische Elemente fungieren können (Iacono *et al.*, 2005). Die Translation von mRNAs mit μ ORFs erfolgt häufig über eine interne Initiation der Translation. Dieser alternative Mechanismus wurde zuerst in Picornaviren gefunden. Es handelt sich hierbei um ein Sequenzelement in der 5'-untranslatierten Region, das als interne Ribosomeneintrittsstelle (IRES) dient (Pelletier *et al.*, 1988). IRES-Elemente wurden in den mRNAs vieler regulatorischer Proteine und Wachstumsfaktoren wie z.B. c-myc oder dem Fibroblastenwachstumsfaktor (FGF) gefunden.

Abbildung 1 fasst nochmals die strukturellen Elemente zusammen, die für die post-transkriptionelle Regulation einer eukaryoten mRNA von Bedeutung sein können.

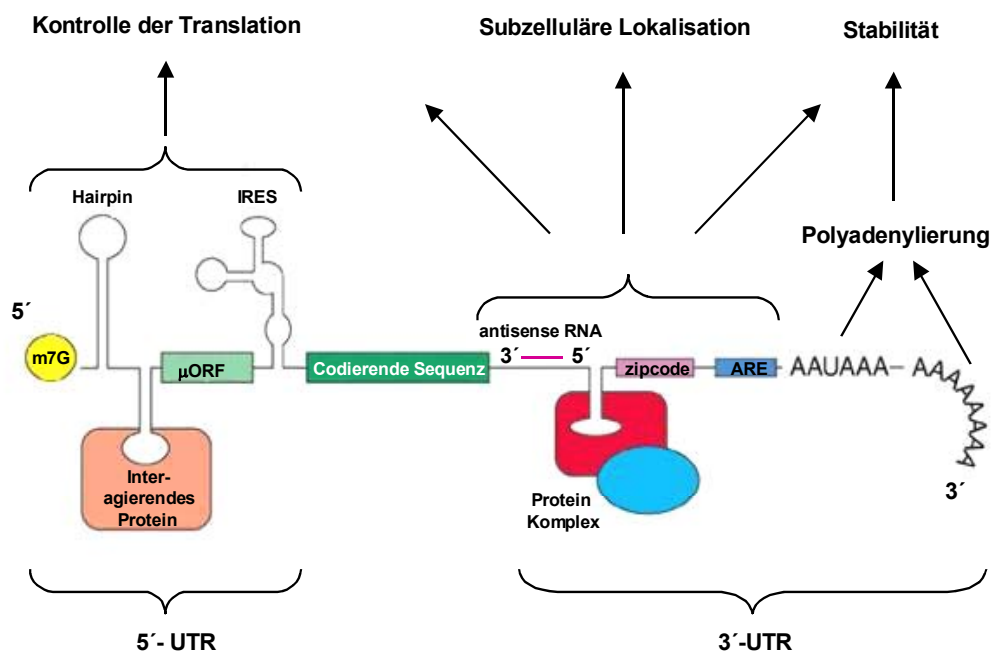


Abbildung 1: Strukturelle Elemente für die post-transkriptionelle Regulation einer eukaryoten mRNA

Verwendete Abkürzungen (vom 5'- zum 3'-Ende): UTR: untranslatierte Region; m7G: 7-Methyl-Guanosin-Cap-Struktur; Hairpin: haarnadelartige Sekundärstruktur; μ ORF: „upstream open reading frame“; IRES: interne Ribosomeneintrittsstelle; ARE: AU-reiches Element; AAUAAA: Polyadenylierungssignal
Modifiziert nach: Mignone *et al.*, 2002

IV.3 Regulation der iNOS-Expression

Die induzierbare NO-Synthase wird im Gegensatz zur endothelialen und neuronalen Isoform größtenteils über transkriptionelle und post-transkriptionelle Mechanismen reguliert. Da die iNOS Ca^{2+} als Cofaktor nicht benötigt, produziert sie nach ihrer Synthese bis zu ihrer Degradation kontinuierlich NO, sodass auf dieser Ebene nur wenige Möglichkeiten zur Beeinflussung der Enzymaktivität bestehen (Förstermann *et al.*, 1995a; Geller und Billiar, 1998; Kleinert *et al.*, 2000; Kleinert *et al.*, 2004; MacMicking *et al.*, 1997). Eine Regulation der iNOS-Aktivität durch Interaktion des Enzyms mit Proteinen, die die Dimerisierung verhindern (Daniliuc *et al.*, 2003; Ratovitski *et al.*, 1999a; Ratovitski *et al.*, 1999b), durch Verminderung der Arginin-Verfügbarkeit (Bruch-Gerharz *et al.*, 2003; Mori und Gotoh, 2000) sowie durch Veränderung der intrazellulären Konzentration des essentiellen Cofaktors Tetrahydrobiopterin (BH_4) (Muhl und Pfeilschifter, 1994) wurde beschrieben. Man geht jedoch davon aus, dass die Modulation der iNOS-Expression den wichtigsten Faktor für die Regulation der iNOS darstellt (Kleinert *et al.*, 2004; Kleinert *et al.*, 2003).

IV.3.1 Signaltransduktionswege der Regulation der iNOS-Expression

Die iNOS-Expression kann in murinen Zellen durch Stimulation mit bakteriellem Lipopolysaccharid (LPS) oder inflammatorischen Zytokinen wie $\text{IFN-}\gamma$, $\text{IL-1}\beta$, IL-6 oder $\text{TNF-}\alpha$ induziert werden. Für die Expression der iNOS in humanen Zellen wird meist ein komplexes Zytokingemisch bestehend aus $\text{IFN-}\gamma$, $\text{IL-1}\beta$ und $\text{TNF-}\alpha$ benötigt (Förstermann *et al.*, 1995b; Kleinert *et al.*, 2000). Weitere Induktoren der iNOS-Expression sind Forskolin, 8-Bromo-cAMP und Dibutyryl-cAMP, die die Konzentration von cAMP erhöhen (Eberhardt *et al.*, 1998; Koide *et al.*, 1993), sowie Proteinkinase C-Aktivatoren wie TPA (Hortelano *et al.*, 1993; Kleinert *et al.*, 1996b) und Wachstumsfaktoren wie PDGF und FGF (Gilbert und Herschman, 1993; Kunz *et al.*, 1997). Als Inhibitoren der iNOS-Induktion erwiesen sich anti-inflammatorische Zytokine wie IL-4 (Bogdan *et al.*, 1994; Sands *et al.*, 1994), IL-10 (Cunha *et al.*, 1992; MacMicking *et al.*, 1997), IL-13 (Saura *et al.*, 1996; Wright *et al.*, 1997), Wachstumsfaktoren (z.B. $\text{TGF-}\beta 1, 2, 3$) (Ding *et al.*, 1990; Vodovotz *et al.*, 1993), Tyrosinkinase-Inhibitoren (z.B. Genistein, Herbimycin A und Tyrphostin) (Dong *et al.*, 1993), Inhibitoren des Transkriptionsfaktors $\text{NF-}\kappa\text{B}$ (z.B. Pyrrolidindithiocarbamat) (Sherman *et al.*, 1993a) und Diethyldithiocarbamat (Mülsch *et al.*, 1993) sowie Glukokortikoide (de Vera *et al.*, 1997; Kleinert *et al.*, 1996a; Kunz *et al.*, 1996). Es kann jedoch auch ein und dieselbe Substanz in einem Zelltyp stimulierend und in einem anderen inhibierend auf die iNOS-Expression wirken. So ist beispielsweise $\text{TGF-}\beta$ in murinen Makrophagen und glatten Gefäßzellen der Ratte ein Inhibitor der iNOS-Expression, während die gleiche Substanz in murinen 3T3-Fibroblasten stimulierend wirkt (Ding *et al.*, 1990; Förstermann *et al.*, 1992; Gilbert und Herschman, 1993; Schini *et al.*, 1992). Dies verdeutlicht, dass die iNOS-Expression spezies- und gewebespezifisch reguliert wird.

Die Wirkung von Induktoren und Inhibitoren der iNOS-Expression wird über verschiedene Signaltransduktionswege vermittelt. Zentrale Mechanismen scheinen dabei vor allem die Aktivierung oder Inhibition des JAK/STAT-(Januskinase/Signal-Transduktor und Aktivator der Transkription-) und des NF- κ B-Signaltransduktionsweges zu sein (Kleinert *et al.*, 2004; Kleinert *et al.*, 2003). Eine Beteiligung des IFN- γ -JAK/STAT-Signaltransduktionsweges an der Induktion der iNOS-Expression konnte in murinen (Meraz *et al.*, 1996; Nishiya *et al.*, 1997; Singh *et al.*, 1996a), Ratten- (Doi *et al.*, 2002; Kitamura *et al.*, 1996) und humanen Zellen (Ganster *et al.*, 2001; Kleinert *et al.*, 1998a) nachgewiesen werden. In glatten Muskelzellen der Ratte ist eine dominant-negative Isoform von JAK2 in der Lage, die Expression der iNOS zu inhibieren (Doi *et al.*, 2002). Der Transkriptionsfaktor NF- κ B kann in murinen 3T3-Fibroblasten über den Zytokin- und Wachstumsrezeptor-Tyrosinkinase-Signaltransduktionsweg, den cAMP-Proteinkinase A-(PKA-) und den Proteinkinase C- (PKC-)Weg aktiviert werden (Kleinert *et al.*, 1996b). In humanen DLD-1-Zellen haben allerdings weder der cAMP/PKA- noch der PKC-Signaltransduktionsweg einen Einfluss auf die iNOS-Expression.

In zahlreichen Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass auch die Mitogen-aktivierten Proteinkinasen (MAP-Kinasen) an der Regulation der iNOS-Expression beteiligt sind. Die MAP-Kinasen sind eine Familie von Threonin- oder Serinkinasen, die in drei Untergruppen eingeteilt werden können: die extrazellulär regulierten Kinasen (ERKs), zu denen p44-MAPK (ERK1) und p42-MAPK (ERK2) gehören; die Stress-aktivierten Proteinkinasen (SAPKs), die auch als c-jun amino-terminale Kinasen (JNKs) bezeichnet werden, und die p38-MAP-Kinasen.

In Myozyten und kardialen Endothelzellen von Ratten konnte eine Beteiligung von ERK1/ERK2 an der IL-1 β - oder IFN- γ -vermittelten iNOS-Induktion gezeigt werden (Singh *et al.*, 1996b). In anderen Zelltypen, wie beispielsweise in murinen Makrophagen (Caivano, 1998) oder humanen DLD-1-Zellen (Kleinert *et al.*, 1998b) hat eine Inhibition von ERK keinen Effekt auf die Zytokin-induzierte iNOS-Expression. Behandlung von murinen Astrozyten mit einer Kombination aus IL-1 α und TNF- α induziert die iNOS-Expression und aktiviert alle drei MAP-Kinasen (ERK, p38, JNK). Hemmung der p38-MAPK, aber nicht der ERK vermindert die durch IL-1 α und TNF- α stimulierte iNOS-Expression (Da Silva *et al.*, 1997). Im Gegensatz dazu erweist sich die p38-MAPK in Ratten-Mesangialzellen als negativer Regulator der iNOS-Expression, da eine Hemmung dieses Enzyms den expressionssteigernden Effekt von IL-1 β auf die iNOS-Expression noch verstärkt (Guan *et al.*, 1997). Des Weiteren wurde gezeigt, dass verschiedene Isoformen der p38-MAPK unterschiedliche Effekte auf die iNOS-Expression ausüben können. Während die p38- α -Isoform in Ratten-Mesangialzellen einen positiven Effekt auf die iNOS-Expression zeigt, hat die p38- β -Isoform in den gleichen Zellen einen negativen Einfluss auf die Expression der iNOS (Lui *et al.*, 2004). Die Bedeutung der einzelnen MAP-Kinasen für die iNOS-Induktion ist demnach sowohl vom Zelltyp als auch vom jeweiligen Stimulus abhängig.

IV.3.2 Regulation der Aktivität des iNOS-Promotors

Die iNOS-Promotoren aller untersuchten Spezies beinhalten eine „TATA“-Box, die etwa 30 bp vom Transkriptionsstart entfernt gelegen ist, und Konsensussequenzen für die Bindung von zahlreichen Transkriptionsfaktoren. Der Sequenzvergleich der ersten 1.000 bp der iNOS-Promotoren von Maus, Ratte und Mensch zeigt zwar zwischen den beiden Nager-Promotoren eine etwas größere Homologie (73 %) als zwischen Nager- und humanem Promotor (Maus/Mensch 55 %, Ratte/Mensch 59 %), bezüglich der Lage der putativen Transkriptionsfaktor-Bindungsstellen sind sich jedoch alle drei Promotoren sehr ähnlich. Deshalb ist es umso erstaunlicher, dass die 1.000 bp iNOS-Promotor-Fragmente der Nager in Transfektions-Experimenten in Zellen sowohl homologer (Lowenstein *et al.*, 1993; Xie *et al.*, 1993) als auch heterologer (Kleinert *et al.*, 1996a) Spezies voll funktionsfähig sind, während das humane 1.000 bp iNOS-Promotor-Fragment in humanen Zellen zwar eine basale Aktivität aufweist, jedoch nicht durch Zytokine induzierbar ist (Chu *et al.*, 1998; de Vera *et al.*, 1996; Linn *et al.*, 1997). Nach Transfektion in heterologe RAW 264.7-Makrophagen ist im Gegensatz dazu eine deutliche Induzierbarkeit des humanen 1.000 bp iNOS-Promotor-Fragments durch LPS, IFN- γ und IL-1 β feststellbar (Kolyada *et al.*, 1996). „Nuclear-Run-On“-Experimente in humanen AKN-1- und DLD-1-Zellen zeigen bei gleichzeitigem Fehlen einer nachweisbaren iNOS-mRNA-Expression eine signifikante Basalaktivität des endogenen iNOS-Promotors, die durch Zytokin-Induktion um den Faktor zwei bis fünf steigerbar ist (de Vera *et al.*, 1996; Linn *et al.*, 1997). Ausgehend von einem 16 kb-Fragment führten de Vera *et al.* in humanen AKN-1-Zellen Deletionsanalysen durch. Dabei liegt die Promotoraktivität nach Stimulation mit einem aus IFN- γ (250 U/ml), IL-1 β (100 U/ml) und TNF- α (1.000 U/ml) bestehenden Zytokingemisch erst ab einer Promotorlänge von mehr als 3,8 kb über den Basalwerten. Bei einer Länge von 16 kb ist maximale Aktivität feststellbar; diese ist im Vergleich zur Basalaktivität um das Zehnfache gesteigert. Analysen der Promotor-Subfragmente (-3,8 bis -5,8; -5,8 bis -7,0 und -7,0 bis -16,0 kb) ergeben eine zwei- bzw. siebenfache Induzierbarkeit (de Vera *et al.*, 1996). Dies deutet darauf hin, dass die für die Zytokin-Antwort essentiellen Konsensussequenzen hauptsächlich zwischen -7,0 und -16,0 kb lokalisiert sind.

An der Regulation der iNOS-Promotoraktivität sind zahlreiche Transkriptionsfaktoren beteiligt. Eine zentrale Rolle kommt dabei dem NF- κ B zu (Ghosh *et al.*, 1998). So induzieren beispielsweise LPS, IL-1 β , TNF- α und oxidativer Stress die iNOS-Expression über eine Aktivierung von NF- κ B. Ebenso verläuft die Inhibition der iNOS-Expression durch Glukokortikoide, TGF- β 1, Antioxidantien wie PDTC (Pyrrolidindithiocarbamat) und Inhibitoren der phosphatidylcholinspezifischen Phospholipase (PC-PLC) über eine Inaktivierung von NF- κ B. Weitere wichtige Rollen für die Induktion der iNOS-Expression kommen STAT-1 α , dem Interferon-regulierten Faktor-1 (IRF-1) und den cAMP-induzierten Transkriptionsfaktoren CREB (cAMP-responsives Element-bindendes Protein) und C/EBP (CCAAT-Enhancer-Box-bindendes Protein) zu. Der durch Zusammenlagerung von c-jun- und c-fos-Proteinen gebildete

Transkriptionsfaktor AP-1 scheint im Gegensatz dazu einen negativen Einfluss auf die iNOS-Expression auszuüben. Überexpression von AP-1 in humanen DLD-1- und A549/8-Zellen durch Cotransfektion von c-jun- und c-fos-Expressionsvektoren ebenso wie Verbindungen, die die AP-1-Expression steigern, führen zu einer Verminderung der iNOS-Promotoraktivität (Kleinert *et al.*, 1999; Kleinert *et al.*, 1998b)

IV.3.3 Regulation der iNOS-mRNA-Stabilität

Im Gegensatz zum murinen System existieren in humanen Zellen große Unterschiede zwischen iNOS-Promotoraktivität und Expression der iNOS-mRNA. Obwohl in nicht-induzierten AKN-Hepatozyten oder DLD-1-Zellen keine iNOS-mRNA detektierbar ist, zeigen „Nuclear-Run-On“-Experimente eine basale Aktivität des iNOS-Promotors in diesen Zellen. Diese Promotoraktivität ist nach Zytokin-Stimulation aber nur noch um das Zwei- bis Fünffache steigerbar (de Vera *et al.*, 1996; Rodriguez-Pascual *et al.*, 2000). Demzufolge spielen post-transkriptionelle Mechanismen wie die Modulation der mRNA-Stabilität vor allem in humanen Zellen für die Regulation der iNOS-Expression eine wichtige Rolle. In der 3'-untranslatierten Region der iNOS-mRNA befinden sich fünf AU-reiche Elemente (Geller *et al.*, 1993), die für die Destabilisierung von Zytokin- und Onkogen-mRNAs verantwortlich gemacht werden (Caput *et al.*, 1986; Dean *et al.*, 2001). Die gleichen Sequenzmotive finden sich zweimal in der murinen iNOS-mRNA (Lyons *et al.*, 1992) und viermal in der iNOS-mRNA der Ratte (Galea *et al.*, 1994). In murinen Makrophagen erniedrigt TGF- β 1 die IFN- γ -induzierte iNOS-Expression durch Verminderung der iNOS-mRNA-Stabilität, Inhibition der iNOS-mRNA-Translation und Verringerung der iNOS-Protein-Stabilität (Vodovotz *et al.*, 1993). Inhibition der JNK in murinen J774-Makrophagen führt zu einer verminderten LPS-induzierten iNOS-Expression durch Destabilisierung der iNOS-mRNA (Lahti *et al.*, 2003). Des Weiteren wird die Erhöhung der LPS/IFN- γ -induzierten iNOS-Expression durch Zugabe von Tetrahydrobiopterin (BH₄) in glatten Muskelzellen der Ratte mit einem stabilisierenden Effekt von BH₄ auf die iNOS-mRNA erklärt (Linscheid *et al.*, 1998). Schließlich wurden in Leberextrakten von Mäusen die zwei RNA-bindenden Proteine hnRNP L und hnRNP I/PTB identifiziert, die nach Induktion eines septischen Schocks an die 3'-UTR der murinen iNOS-mRNA binden (Soderberg *et al.*, 2002). In Transfektionsexperimenten konnte gezeigt werden, dass die 3'-UTR der humanen iNOS-mRNA in der Lage ist, die Expression eines heterologen Reportergens zu reduzieren (Rodriguez-Pascual *et al.*, 2000). Des Weiteren konnte eine Interaktion des ELAV-(„embryonic lethal abnormal vision“-)Proteins HuR mit der 3'-UTR der iNOS-mRNA nachgewiesen werden. Dabei bindet HuR an das am distalen Ende der 3'-UTR gelegene AU-reiche Element (Rodriguez-Pascual *et al.*, 2000). Es ist bekannt, dass HuR die Stabilität verschiedener induzierbarer mRNAs erhöht (Brennan und Steitz, 2001). Überexpression von HuR in DLD-1-Zellen führt dementsprechend

zu einer Heraufregulation der Zytokin-induzierten iNOS-Expression (Rodriguez-Pascual *et al.*, 2000).

Ein weiteres RNA-bindendes Protein, das ARE-RNA-bindende Protein 1 (AUF 1), ist an der Destabilisierung ARE-haltiger mRNAs beteiligt. (Misquitta *et al.*, 2001; Mitchell und Tollervey, 2000). Auch die p37-Isoform von AUF 1 interagiert mit der iNOS-3'-UTR-mRNA; dabei bindet es allerdings an andere AUUUA-Elemente als HuR. Überexpression von AUF 1 in DLD-1-Zellen führt zu einer Verminderung der humanen iNOS-Expression (Kleinert *et al.*, 2002).

Da RNA-bindende Proteine eine wichtige Rolle für die Modulation der mRNA-Stabilität spielen, ist neben dem Einfluss von HuR und AUF 1 eine Beteiligung weiterer Proteine an der Regulation der iNOS-Expression sehr wahrscheinlich.

IV.3.4 Regulation der iNOS-Proteinexpression und der iNOS-Proteinstabilität

Auch auf Ebene der Translation findet eine Regulation der iNOS-Expression statt. So exprimieren beispielsweise humane primäre Kardiomyozyten *in vitro* nach Stimulation mit Zytokinen zwar iNOS-mRNA, jedoch kein iNOS-Protein (Luss *et al.*, 1997). In COS-Zellen, die mit der aus Kardiomyozyten isolierten iNOS-cDNA transfiziert wurden, war dagegen eine iNOS-Proteinexpression zu beobachten. Der Retransfer von cDNA-Fragmenten, die nur die für das Protein codierende Region enthielten, in die Kardiomyozyten führte ebenfalls zur Expression des iNOS-Proteins. Daraus kann geschlossen werden, dass die menschlichen Kardiomyozyten Faktoren exprimieren, welche die iNOS-Translation durch Interaktion mit der 5'- und/oder 3'-untranslatierten Region der iNOS-mRNA inhibieren (Luss *et al.*, 1997). Des Weiteren scheint die Inhibition der iNOS-Expression durch verschiedene Substanzen wie TGF- β 1 in primären murinen Makrophagen (Vodovotz *et al.*, 1993) oder Dexamethason in Ratten-Mesangialzellen (Kunz *et al.*, 1996) über eine Destabilisierung von iNOS-mRNA und iNOS-Protein vermittelt zu werden.

In humanen Nierenzellen (HEK293-Zellen), welche die iNOS überexprimieren, wurde gezeigt, dass das Proteasom am Abbau des iNOS-Proteins beteiligt ist (Musial und Eissa, 2001). Dementsprechend war in humanen Epithelzellen (RT4-Zellen) und murinen Makrophagen durch Zugabe des Proteasom-Inhibitors Lactacystin 48 Stunden nach Induktion der iNOS eine Steigerung der Expression des iNOS-Proteins feststellbar (Musial und Eissa, 2001). In humanen Karzinomzellen des Gastrointestinaltrakts (DLD-1- und HT-29-Zellen) war durch Interaktion von Caveolin-1 mit der iNOS ein gesteigerter Abbau des iNOS-Proteins durch das Proteasom zu beobachten, der durch Proteasom-Inhibitoren hemmbar war (Felley-Bosco *et al.*, 2000).

IV.4 RNA-bindende Proteine

RNA-bindende Proteine erfüllen viele regulatorische Funktionen sowohl im Zellkern als auch im Zytoplasma. Unter anderem sind sie an der Reifung der mRNA im Zellkern, an deren Export ins Zytoplasma sowie an der Regulation der subzellulären Lokalisation, Stabilität und Translation von mRNA beteiligt. Es wurden bereits viele verschiedene RNA-bindende Proteine beschrieben, die mit AU-reichen Sequenzen in der 3'-UTR instabiler mRNAs interagieren und deren Stabilität regulieren (IV.2.1). Auf welche Weise sie diese Funktion ausüben, ist noch nicht vollständig geklärt. Denkbar wäre zum Beispiel eine direkte Modulation der Deadenylase-Aktivität. Des Weiteren könnten ARE-bindende Proteine die Interaktion zwischen dem Poly-A-bindenden Protein und dem Poly-A-Schwanz oder dem Translations-Initiationsfaktor eIF4e und der 5'-Cap-Struktur modulieren (Wilusz *et al.*, 2001). Außerdem wurde bereits gezeigt, dass RNA-bindende Proteine für die Rekrutierung des Exosoms an ARE-haltige mRNA notwendig sind (Chen *et al.*, 2001). Im Folgenden sollen die RNA-bindenden Proteine, die in dieser Arbeit untersucht wurden, kurz vorgestellt werden.

IV.4.1 Tristetraprolin (TTP)

Tristetraprolin (TTP), auch als Nup 475, TIS 11 und GOS 24 bekannt (Heximer und Forsdyke, 1993; Ma und Herschman, 1991; Varnum *et al.*, 1991), ist das Genprodukt des „immediate-early response genes“ ZFP 36, das auf dem Chromosom 19q13.1 lokalisiert ist (Taylor *et al.*, 1991). TTP ist Stellvertreter einer Familie von Tandem-Zink-Finger-Proteinen, die Zink mit sehr hoher Affinität binden (Worthington *et al.*, 1996). Die Zink-Finger-Struktur besteht aus dem Motiv Cystein-Cystein-Cystein-Histidin (Lai *et al.*, 1999). Die beiden in TTP enthaltenen Zinkfinger liegen genau 18 Aminosäuren auseinander. Proteine mit Zinkfingern dieser Art sind weit verbreitet und hochgradig konserviert. TTP wird in vielen menschlichen Geweben exprimiert. Nach Stimulation mit Serum, Insulin oder Phorbolestern sind besonders starke Expressionsraten in der Milz, in Lymphknoten und im Thymus zu beobachten (Lai *et al.*, 1999; Lai *et al.*, 1990). Zunächst wurde TTP als Zellkernprotein sowohl in ruhenden als auch in Serum-stimulierten Fibroblasten beschrieben (DuBois *et al.*, 1990). Später wurde gezeigt, dass es nach Stimulation mit Serum oder Mitogenen vom Zellkern ins Zytoplasma transloziert (Taylor *et al.*, 1996b). Inzwischen geht man aufgrund von Experimenten in Makrophagen-Zelllinien und in primären murinen Makrophagen jedoch von einer überwiegend zytoplasmatischen Verteilung von TTP aus (Carballo *et al.*, 1998; Johnson *et al.*, 2002; Taylor *et al.*, 1996b).

TTP bindet an AU-reiche Elemente der TNF- α - (Carballo *et al.*, 1998), GM-CSF-, IL-3- (Raghavan *et al.*, 2001) und COX-2-mRNA (Sully *et al.*, 2004). Ein Einfluss von TTP auf die Regulation der Expression von TNF- α wurde zuerst in Studien mit Mäusen beschrieben, die ein nicht-funktionelles Tristetraprolin-Gen (Tristetraprolin-knock-out; Tristetraprolin^(-/-)) besitzen (Taylor *et al.*, 1996a). Diese Tiere wirken bei der Geburt normal, entwickeln aber schon in sehr

frühem Lebensalter ein komplexes inflammatorisches Syndrom bestehend aus Dermatitis, Alopezie, Konjunktivitis, Kachexie, Myelo-Hyperplasie begleitet von extramedullärer Hämatopoese, Autoimmunerkrankungen sowie Polyarthrit (Taylor *et al.*, 1996a), was auf die erhöhte Expression von TNF- α -mRNA und -Protein zurückzuführen ist. Auch LPS-induzierte COX-2-Proteinlevel sind in TTP^(-/-)-Mäusen im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen erhöht (Phillips *et al.*, 2004). Es wurde gezeigt, dass die TNF- α -mRNA in den Makrophagen der Knock-out-Tiere im Vergleich zu den Wildtyp-Tieren wesentlich stabiler ist. Daraus lässt sich schließen, dass TTP eine mRNA-destabilisierende Funktion ausübt (Carballo *et al.*, 1998). Diesen destabilisierenden Effekt scheint TTP über eine Förderung der Deadenylierung zu vermitteln. Dies wurde durch Expression von TTP in HEK 293-Zellen gezeigt, die endogen kein TTP exprimieren. In diesen Zellen wurde eine gesteigerte Deadenylierung einer Reporter-mRNA, die die AU-reichen Elemente der TNF- α -mRNA enthielt, beobachtet (Lai *et al.*, 1999). Auch die GM-CSF-mRNA ist in TTP^(-/-)-Makrophagen stabiler als in Wildtyp-Zellen und enthält zudem einen wesentlich längeren Poly-A-Schwanz (Carballo *et al.*, 2000). Des Weiteren zeigten *in vitro*-Experimente, dass TTP, nicht aber eine Mutante von TTP die Deadenylierung der TNF- α -mRNA durch die Polyribonuklease A (PARN) fördert (Lai *et al.*, 2003). TTP scheint aber auch unabhängig von der Deadenylierung an der Degradation von mRNAs beteiligt zu sein. In einem zellfreien Ansatz wurde gezeigt, dass TTP den Abbau von ARE-haltigen mRNAs in Anwesenheit des aus Jurkat-Zellen aufgereinigten Exosoms beschleunigt. Diese Erhöhung der mRNA-Degradation wurde jedoch nur bei Zugabe niedriger TTP-Konzentration zum Reaktionsansatz beobachtet, während größere TTP-Konzentrationen den Abbau verzögerten. Eine Erklärung für diese Beobachtung steht bislang noch aus (Chen *et al.*, 2001). Des Weiteren ist TTP für die Degradation von ARE-haltigen mRNAs durch mikro-RNAs erforderlich. Die mikro-RNA enthält dabei eine zu den AREs komplementäre Sequenz. TTP bindet nicht direkt an die mikro-RNA, scheint aber mit einem Proteinkomplex assoziiert zu sein, der für die Interaktion mit den AU-reichen Elementen verantwortlich ist (Jing *et al.*, 2005).

Auch TTP-Mutanten, die nicht in der Lage sind, an die 3'-UTR AU-reicher mRNAs zu binden, üben einen Effekt auf die Stabilität der mRNA aus. So wurde in Transfektions-Experimenten gezeigt, dass durch Punktmutation generierte nicht-bindende TTP-Mutanten im Gegensatz zum Wildtyp-TTP eine Steigerung der Expression von mRNAs mit AU-reichen Elementen verursachen. Actinomycin D-Experimente weisen darauf hin, dass dieser Effekt auf eine Hemmung des mRNA-Abbaus zurückzuführen ist. Der zugrunde liegende Mechanismus ist letztendlich jedoch bislang unklar (Lai *et al.*, 2002)

An der TTP-vermittelten Destabilisierung von mRNAs scheint auch der p38-MAP-Kinase-Signaltransduktionsweg beteiligt zu sein. Es wurde gezeigt, dass die p38-MAPK und deren Substrat MK-2 nach Aktivierung durch proinflammatorische Stimuli TTP phosphorylieren können; allerdings wird der Effekt dieser Kinasen auf die Aktivität von TTP kontrovers diskutiert (Carballo *et al.*, 2001; Mahtani *et al.*, 2001; Zhu *et al.*, 2001). Nach p38-vermittelter

Phosphorylierung kann TTP aus dem Zellkern ins Zytoplasma translozieren. Dieser Effekt scheint teilweise auch von der Bindung an 14-3-3-Proteine abhängig zu sein (Johnson *et al.*, 2002). Eine Komplexbildung von TTP mit 14-3-3-Proteinen soll zudem in der Lage sein, die Degradation ARE-haltiger Transkripte zu inhibieren (Stoecklin *et al.*, 2004). Des Weiteren gibt es Hinweise, dass phosphoryliertes TTP eine reduzierte Affinität zu AU-reicher RNA aufweist (Carballo *et al.*, 2001). In Bindungsstudien mit der TNF- α -mRNA hatte Phosphorylierung von TTP durch die p38-MAPK jedoch keinen Effekt auf die RNA-Bindung (Cao *et al.*, 2003). Der p38-MAPK-Signaltransduktionsweg wird außerdem für eine Erhöhung der Expression von TTP verantwortlich gemacht. Dies kann, zumindest teilweise, über eine Stabilisierung der TTP-mRNA, die selbst ein AU-reiches Element in ihrer 3'-UTR enthält, erklärt werden (Tchen *et al.*, 2004). Eine Induktion der TTP-Expression nach Aktivierung der p38-MAPK ist wahrscheinlich eine Art negativer Rückkopplungsmechanismus, der dazu dient, ARE-haltige mRNAs zu destabilisieren und somit eine weitere Genexpression zu verhindern (Dean *et al.*, 2004).

IV.4.2 Das „KH-type splicing regulatory protein“ (KSRP)

Das „K-homology-type splicing regulatory protein“ (KSRP) ist ein 75 kDa großes Protein, das zuerst als Spleißfaktor beschrieben wurde. Das für KSRP codierende Gen befindet sich auf dem humanen Chromosom 19p13.3 und dem Maus-Chromosom 17. Vergleichende Analysen des menschlichen und murinen Gens zeigten, dass diese Regionen zwischen den Spezies hochgradig konserviert sind (Ring *et al.*, 1999). KSRP wurde als Komponente eines Multiproteinkomplexes gefunden, der spezifisch an ein „intronic splicing enhancer element“ des neuronalen c-src N1-Exons bindet. Dabei veranlasst KSRP die Bindung von fünf weiteren Proteinen an das Enhancer-Element und aktiviert das Spleißen des N1-Exons (Min *et al.*, 1997). Die Sequenz der KSRP-cDNA weist vier K-homologe RNA-Bindedomänen auf und besitzt eine Prolin- und Glycin-reiche N-terminale Domäne sowie ein ungewöhnlich Glutamin-reiches carboxy-terminales Ende. Diese Struktur findet sich auch in dem Mammalierprotein FBP (FUSE-bindendes Protein) und dem „P-element somatic inhibitor“, einem Spleißfaktor in *Drosophila* (Min *et al.*, 1997). FBP-2 scheint mit KSRP identisch zu sein. Das DNA-bindende Protein FBP bindet *in vivo* und *in vitro* an das einzelsträngige „far upstream element“ oberhalb des c-myc-Gens und reguliert dessen Transkription (He *et al.*, 2000). Daneben weist FBP aber auch verschiedene weitere Funktionen beim Prozessieren der RNA sowie beim Transport und Abbau von RNA auf. Dafür scheint eine Art „Pendeln“ zwischen verschiedenen Stellen im Zellkern unerlässlich zu sein (He *et al.*, 2000). KSRP ist in fast allen Zellarten exprimiert, es befindet sich jedoch vor allem in neuronalen Zellen, wo es wahrscheinlich an der Regulation des Spleißens verschiedener Prä-mRNAs beteiligt ist. Es wurde aber auch gezeigt, dass aus Ratten-Lebern isoliertes KSRP durch Assoziation mit dem APOBEC-1-stimulierenden Protein (ASP) an der Stabilisierung des Enzymkomplexes beteiligt ist, der für das „Editing“ der ApoB-mRNA verantwortlich ist (Lellek

et al., 2000). Des Weiteren weist KSRP eine hohe Bindungsaffinität an mRNAs auf, die AU-reiche Elemente enthalten. In UV-Crosslink-Experimenten wurde eine spezifische Interaktion von KSRP mit der AU-reichen *c-fos*-mRNA, aber nicht mit einer Kontroll-RNA ohne AU-reiche Elemente beobachtet (Chen *et al.*, 2001). Außerdem interagiert KSRP mit dem Exosom, einem Komplex aus mindestens zehn Exonukleasen, der für den 3'-5'-Abbau von ARE-haltigen mRNAs verantwortlich ist (Mitchell *et al.*, 1997; van Hoof und Parker, 1999). Das Exosom alleine kann aber nicht an AU-reiche mRNAs binden und benötigt für eine Assoziation und anschließende Degradation einer RNA die Hilfe von RNA-bindenden Proteinen. Chen *et al.* zeigten, dass KSRP in der Lage ist, das Exosom an ARE-haltige mRNAs heranzuführen und so deren Abbau zu initiieren (Chen *et al.*, 2001). KSRP ist demnach ein RNA-destabilisierender Faktor. Das macht auch seine Rolle bei der Regulation der mRNA-Stabilität des Transkriptionsfaktors *Pitx2* deutlich. Hierbei wurde nach Aktivierung des Wnt/ β -Catenin-Weges eine Translokation von KSRP vom Zytoplasma in den Zellkern beschrieben. Gleichzeitig konnte ein Anstieg der Konzentration des RNA-bindenden Proteins HuR im Zytoplasma und ein Absinken von dessen Konzentration im Zellkern beobachtet werden. Die veränderte Lokalisation dieser beiden RNA-bindenden Proteine hat eine Abnahme der Bindungsaffinität von KSRP und eine Steigerung der Bindungsaffinität von HuR an die *Pitx2*-mRNA zur Folge. Dies führt schließlich zu einer Stabilisierung der mRNA (Briata *et al.*, 2003). Ein ähnliches Phänomen wurde auch für die IL-1 β -induzierte Stabilisierung der IL-8-mRNA beschrieben. Hierbei ist die Assoziation des stabilisierenden Proteins HuR mit der IL-8-mRNA deutlich höher als die Bindung des destabilisierenden KSRP an die gleiche mRNA (Suswam *et al.*, 2005). Auch *in vitro*- und *in vivo*-Experimente von Gherzi *et al.* unterstreichen die Rolle von KSRP als RNA-bindendes Protein, das den Abbau von ARE-haltigen mRNAs durch Rekrutierung des Degradationsapparates veranlasst. Dabei sind die KH-Domänen 3 und 4 essentiell für die Bindung von KSRP an die mRNA, wohingegen das dritte KH-Motiv für die Interaktion von KSRP mit dem Exosom verantwortlich zu sein scheint (Gherzi *et al.*, 2004). Demnach generiert Deletion der vierten KH-Domäne ein dominant-negatives KSRP-Protein, das zwar noch mit dem Exosom, aber nicht mehr mit der mRNA in Verbindung steht. Co-Immunpräzipitations-Analysen zeigen außerdem eine Interaktion von KSRP mit der Poly-A-Ribonuklease (PARN). KSRP scheint dabei auch für eine Vermittlung der Wechselwirkung von PARN mit dem Exosom notwendig zu sein (Gherzi *et al.*, 2004).

Untersuchungen der subzellulären Verteilung von KSRP zeigen eine vorrangige Lokalisation des Proteins im Zellkern, die der des Polypyrimidin-Trakt-bindenden Proteins (PTB) sehr ähnlich ist (Hall *et al.*, 2004). In murinen Neuroblastomzellen sind sowohl KSRP als auch PTB vornehmlich im perinukleolären Kompartiment lokalisiert. Beide Proteine sind am Spleißen der *src*-Prä-mRNA beteiligt. Dabei wurde erst nach Differenzierung der Zellen eine Colokalisation von KSRP mit PTB und dem *src*-Transkript beobachtet, die mit einer erhöhten Spleißrate einhergeht.

IV.4.3 Das Polypyrimidin-Trakt-bindende Protein (PTB)

Das Polypyrimidin-Trakt-bindende Protein (PTB) gehört zur Familie der hnRNPs (heterogene nukleäre Ribonukleoproteine) und ist auch als hnRNP I bekannt (Ghetti *et al.*, 1992). PTB existiert in mindestens drei Isoformen mit Molekulargewichten zwischen 55 und 62 kDa. Die zwei hauptsächlich vorkommenden Isoformen PTB 1 und PTB 4 werden durch alternatives Spleißen des Exon 9 generiert (Wollerton *et al.*, 2004). Zusätzlich zu diesen Isoformen existiert eine neuronale Form von PTB (nPTB) (Ashiya und Grabowski, 1997; Markovtsov *et al.*, 2000). In verschiedenen Spezies wurden bereits zahlreiche Homologe identifiziert, die eine hochgradig konservierte Funktion von PTB nahe legen (Wagner und Garcia-Blanco, 2001). PTB findet sich in vielen verschiedenen Geweben und Zellen, jedoch deutet eine recht unterschiedliche Expressionsrate des Proteins auf eine gewebe- und entwicklungspezifische Regulation hin (Patton *et al.*, 1991). PTB liegt in Form von Dimeren vor, die jeweils vier atypische RNA-Erkennungsdomänen und ein N-terminales Kernlokalisations-Signal enthalten (Ghetti *et al.*, 1992). Das zweite RNA-Erkennungsmotiv scheint für die Dimerisierung des Proteins verantwortlich zu sein, während die dritte und vierte RNA-Erkennungsdomäne für eine hochaffine, sequenzspezifische Bindung von PTB an die RNA sorgen (Oh *et al.*, 1998; Perez *et al.*, 1997b). Die optimale Bindungssequenz für PTB besteht aus dem Motiv „UCUU“ in einem möglichst pyrimidinreichen Kontext (Perez *et al.*, 1997b).

In Mammalierzellen wurde PTB zuerst als wichtiger Repressor des Spleißens identifiziert. Mulligan *et al.* zeigten, dass PTB an Sequenzen der β -Tropomyosin-Prä-mRNA bindet, die das Spleißen des Exon 7 verhindern (Mulligan *et al.*, 1992). PTB bindet an viele solcher „intronic splicing silencer“ (ISS) von alternativ gespleißten Prä-mRNAs, unter ihnen beispielsweise die *c-src*- (Chan und Black, 1997), die α -Actinin- (Southby *et al.*, 1999), die FGF-R 2- (Fibroblastenwachstumsfaktor-Rezeptor 2-) (Carstens *et al.*, 2000), die GABA γ 2- (Zhang *et al.*, 1999) sowie die α -Tropomyosin-Prä-mRNA (Gooding *et al.*, 1998).

Des Weiteren kann PTB auch seine eigene Expression durch alternatives Spleißen regulieren. Alternatives Entfernen des Exon 11 führt zur Bildung einer mRNA, die durch den Mechanismus des „nonsense mediated decay“ (NMD) degradiert wird. Auf diese Weise ist PTB in der Lage, seine Proteinexpression an die jeweiligen Erfordernisse der Zelle anzupassen (Wollerton *et al.*, 2004).

PTB übernimmt neben seiner Rolle als Spleißrepressor jedoch noch zahlreiche weitere Funktionen in der Zelle. So wurde eine Beteiligung von PTB unter anderem an der Transkription, der Polyadenylierung (Castelo-Branco *et al.*, 2004), der Cap-unabhängigen IRES-vermittelten Translation (Borman *et al.*, 1993; Niepmann *et al.*, 1997), der mRNA-Stabilisierung (Valcarcel und Gebauer, 1997) und der mRNA-Lokalisation im Zytoplasma (Cote *et al.*, 1999) beschrieben. Unter Basalbedingungen befindet sich PTB vor allem im Zellkern, wo es sich besonders im perinukleolären Raum anreichert (Hall *et al.*, 2004). Eine Regulation der Verteilung von PTB in der Zelle ist essentiell, da das Protein sowohl im Zellkern als auch im

Zytoplasma Funktionen übernimmt. Xie *et al.* konnten zeigen, dass PTB *in vitro* und *in vivo* durch die Proteinkinase A an Serin-16 phosphoryliert wird. Eine PTB-Mutante, die anstelle des Serin-16 eine Alanin-Mutation trägt, akkumuliert im Zellkern. Daraus lässt sich schließen, dass die Phosphorylierung von PTB seine Verteilung im Zytoplasma reguliert (Xie *et al.*, 2003).

Eine Beteiligung von PTB an der post-transkriptionellen Regulation wurde beispielsweise für die Insulin-mRNA beschrieben. Stimulation von β -Zellen aus Ratten mit Glucose führte zu einer Erhöhung der Expression von PTB und zu einer vermehrten Bindung des Proteins an die 3'-UTR der Insulin-mRNA. Nach Inhibition dieser Bindung durch Mutation der Bindungsstelle wurde eine Destabilisierung einer Reporter-gen-mRNA beobachtet (Tillmar und Welsh, 2002). Auch eine Bindung von PTB und einem ihm nahe verwandten Protein, dem hnRNP L, an die murine iNOS-mRNA wurde beschrieben. Dabei scheint eine Modulation dieser Interaktionen durch inflammatorische Bedingungen möglich zu sein (Soderberg *et al.*, 2002). Ein Yeast-Two-Hybrid-Screen identifizierte hnRNP L außerdem als PTB-interagierendes Protein (Hahm *et al.*, 1998b).

PTB kann aber auch durch Bindung an die 5'-untranslatierte Region eine mRNA-Stabilisierung vermitteln. Dies wurde am Beispiel der VEGF-mRNA deutlich gemacht (Coles *et al.*, 2004). Dabei wurde PTB als Komponente eines Multiproteinkomplexes identifiziert, der mit der VEGF-3'- und -5'-UTR interagiert. Eine Interaktion von PTB mit der 5'-UTR wurde auch für die mRNA des RNA-bindenden Proteins UNR („Upstream of n-ras“) gezeigt. Hier ist PTB negativ an der Regulation der IRES-vermittelten Translation beteiligt (Cornelis *et al.*, 2005).

V Ziel der Untersuchung

In der vorliegenden Arbeit sollte die post-transkriptionelle Regulation der Expression der humanen iNOS durch die RNA-bindenden Proteine TTP, KSRP und PTB genauer untersucht werden.

Vorarbeiten hatten gezeigt, dass die Induktion der iNOS-Expression in humanen Zellen nicht allein durch eine Steigerung der iNOS-Promotoraktivität erklärbar ist. Da der humane iNOS-Promotor bereits unter Basalbedingungen aktiv ist und sich diese Aktivität nach Zytokin-Stimulation nur noch um das Zwei- bis Fünffache steigern lässt, eine deutliche iNOS-mRNA-Expression aber erst nach Induktion mit Zytokinen messbar ist, ist eine Beteiligung post-transkriptioneller Mechanismen an der Regulation der humanen iNOS-Expression wahrscheinlich. Bisher wurde bereits ein stabilisierender Einfluss des RNA-bindenden Proteins HuR und ein destabilisierender Einfluss des ARE-RNA-bindenden Proteins 1 (AUF 1) auf die humane iNOS-mRNA beschrieben. Beide Proteine interagieren mit verschiedenen AU-reichen Elementen der iNOS-3'-UTR-mRNA. Vorarbeiten zeigten außerdem eine Beteiligung des RNA-bindenden Proteins TTP an der Regulation der iNOS-Expression.

Ziel dieser Arbeit war zunächst eine genauere Untersuchung des Effekts von TTP auf die iNOS-Expression. Dabei sollte auch eine mögliche Beteiligung des p38-MAP-Kinase-Signaltransduktionsweges analysiert werden.

Darüber hinaus sollten weitere Proteine, die mit der 3'-UTR der iNOS-mRNA interagieren, durch RNA-Affinitätschromatographie-Aufreinigungen identifiziert werden. Das auf diese Weise gefundene RNA-bindende Protein KSRP und sein Einfluss auf die Regulation der iNOS-Expression stellte den Gegenstand weiterer Untersuchungen dar.

Da bereits ein Effekt von PTB auf die murine iNOS beschrieben war, wurde auch dieses Protein und seine Funktion für die Regulation der humanen iNOS-Expression analysiert.

Schließlich sollte das Zusammenspiel dieser RNA-bindenden Proteine und der Mechanismus der von ihnen vermittelten post-transkriptionellen Regulation der iNOS-Expression aufgeklärt werden.

VI Materialien

VI.1 Chemikalien

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

VI.1.1 Spezielle Chemikalien

- Acrylamid 4K-Lösung (30 %) Mix 29:1 (Applichem)
- Acrylamid 4K-Lösung (40 %) Mix 19:1 (Applichem)
- Agarose (Roth)
- Ammoniumperoxodisulfat (APS) (Sigma)
- BCA-Lösung (Sigma)
- Biorad Protein Assay (Biorad)
- Bovines Serum Albumin, Fraktion V (Applichem)
- Bromphenolblau (Sigma)
- Coelenterazin (Biotrend)
- Coenzym A-Trilithiumsalz-Dihydrat (Applichem)
- Complete EDTA-free (Proteaseinhibitor-Tabletten) (Roche)
- Coomassie-Brillantblau (Fluka)
- DAPI (4'-5-Diamidino-2-phenylindolhydrochlorid) (Calbiochem)
- Diethylpyrocarbonat (DEPC) (Sigma)
- Dimethylsulfoxid (DMSO) (Sigma)
- D-Luciferin (Applichem)
- DTT (1,4 Dithiothreitol) (Biomol)
- GelSave-Lösung zur Behandlung von Glasplatten (Applichem)
- Glutathion (γ -Glu-Cys-Gly; GSH); reduzierte Form (Sigma)
- Glutathion-Sepharose 4B (Amersham)
- Glycin (Sigma)
- Glycerin (Roth)
- β -Glycerophosphat-Dinatriumsalz-Pentahydrat (Applichem)
- Guanidiniumisothiocyanat (Roth)
- Harnstoff (Roth)
- Heparin (Sigma)
- Imidazol (Sigma)
- IPTG dioxanfrei (C₉H₁₈O₅S) (Roth)
- Kreatinphosphat (Sigma)
- Magermilchpulver (Applichem)
- Methanol (Applichem)
- Natriumfluorid (Applichem)
- Natriumpyrophosphat-Decahydrat (Applichem)
- Natriumnitrit, NaNO₂ (Sigma)
- Natriumorthovanadat (Sigma)
- Nonidet P-40 (NP-40) (Sigma)
- NTP's und dNTP's (Pharmacia)
- 5x PLB (Passive Lysis Buffer) (Promega)

- Phosphokreatinkinase (Sigma)
- PIPES (Piperazin-1,4- (2-Ethansulfonsäure)) (Roth)
- Ponceau S (Sigma)
- Protein A-Agarose (Santa Cruz)
- Protein A/G plus-Agarose (Santa Cruz)
- RNase-Inhibitor (RNasin) 40 U/μl (Fermentas)
- SDS ultra pure (Roth)
- Streptavidin-Agarose (Sigma)
- Szintillationsflüssigkeit Lumasafe plus (Lumac)
- t-RNA (Sigma)
- TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylethylethylendiamin) (Sigma)
- Tween-20 (Sigma)
- Vanadylribonukleosid-Komplex (VRC) (BioChemica)
- Xylencyanol (Sigma)

VI.1.2 Chemikalien zur Untersuchung der iNOS-Expression

Zytokine (Strathmann)	exprimiert in:	Konzentration der Stammlösung	Konzentration im Inkubationsmedium
humanes rekombinantes IFN- γ	<i>E. coli</i>	1.000 U/μl	100 U/ml
humanes rekombinantes IL-1 β	<i>E. coli</i>	2.000 U/μl	50 U/ml
humanes rekombinantes TNF- α	<i>E. coli</i>	10 ⁶ U (10 ng)/μl	10 ng/ml

Die Zytokine wurden in sterilem PBS + 1 % BSA gelöst, aliquotiert und bei -70°C gelagert.

Inhibitoren (Calbiochem)	Inhibitor der	Konzentration der Stammlösung	Konzentration im Inkubationsmedium
Cycloheximid (CHX)	Translation	10 mM	10 μM
SB 203580	p38-MAPK	10 mM	10 μM
Actinomycin D	Transkription	20 mg/ml	10 μg/ml

Die Substanzen wurden in DMSO gelöst; die Stammlösung wurde bei -20°C gelagert.

VI.1.3 Radiochemikalien

Die verwendeten Radionukleotide wurden von der Firma MP Biomedicals bezogen.

- [α -³²P]-UTP spezifische Aktivität: 29,6 Tbq/mmol
β-Strahler, Halbwertszeit: 14,3 Tage
- [γ -³²P]-ATP spezifische Aktivität: 185,6 Tbq/mmol
β-Strahler, Halbwertszeit: 14,3 Tage

[α -P³²]-UTP wurde zur *in vitro*-Transkription bei der Herstellung von Sonden für die RNase-Verdauungsschutzanalyse (VII.2.14), UV-Crosslink-Experimente (VII.3.7) und *in vitro*-mRNA-Degradationsanalysen (VII.2.16) eingesetzt. Für die Markierung des Molekulargewichts-Markers der RNase-Verdauungsschutzanalyse wurde [γ -³²P]-ATP eingesetzt.

VI.1.4 Reagenzien und Kits

- Biotin RNA Labeling Mix, 10x (Roche)
- Fugene Transfektionsreagenz (Roche)
- Kit zur Herstellung eines radioaktiv markierten DNA-Markers (Promega)
- Message muter shRNAi production kit (Epicentre)
- mMessage mMachine T7 Kit (Ambion)
- One Step RT-PCR Kit (Qiagen)
- Plasmid Maxi Kit (Qiagen)
- Proof Start PCR-Kit (Qiagen)
- QIAEX II Gel Extraction Kit (Qiagen)
- QiaExpress Kit (Qiagen)
- QiaQuick PCR Purification Kit (Qiagen)
- Quantitect Probe RT-PCR Kit (Qiagen)
- Quick Spin Columns für RNA (Roche)
- RNAifect-Transfektionsreagenz (Qiagen)
- RNeasy MinElute Cleanup Kit (Qiagen)

VI.1.5 Marker

Für Protein:

- Page Ruler prestained protein ladder (10-180 kDa) (Fermentas)

Für DNA:

- pcDNA1 x *Hinf* I (22-1.058 kb)
- λ DNA/*Eco* 91I (117-20.995 kb) (Fermentas)

VI.2 Lösungen und Puffer

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

VI.2.1 Allgemeine Lösungen und Puffer

- **DEPC-Wasser**

1 l Aqua bidest. wurde mit 200 μ l Diethylpyrocarbonat (DEPC) versetzt, 16 Stunden lang geschüttelt und zweimal 60 Minuten autoklaviert.

- **PBS (phosphate buffered saline), pH 7,4**

137 mM NaCl

2,7 mM KCl

6,5 mM Na₂HPO₄, pH 7,4

1,5 mM KH₂PO₄

- **10x TBE (Tris-Borat-EDTA)- Puffer**

890 mM Tris-HCl, pH 8,0
890 mM Borsäure
20 mM EDTA

- **DNA-Probenpuffer**

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

VI.2.2 Bakterienmedien

- **LB-Medium, pH 7,0**

10 g Bactotrypton (Casein)
10 g NaCl
5 g Hefeextrakt
mit Aqua bidest. auf 1 l auffüllen, 20 Minuten autoklavieren

- **LB-Amp-Medium:** LB-Medium +100 mg/ml Ampicillin

- **LB-Amp-Cam-Medium:** LB-Medium +100 mg/ml Ampicillin+ 34 µg/ml Chloramphenicol

- **LB-Platten:** 1 l LB-Medium + 15 g Bactoagar

- **LB-Amp-Platten:** 1 l LB-Amp-Medium + 15 g Bactoagar

- **LB-Amp-Cam-Platten:** 1 l LB-Amp-Cam-Medium + 15 g Bactoagar

VI.2.3 Lösungen, Medien und Medienzusätze für die Zellkultur

Lösungen:

- Steriles PBS (PAA)
- Trypsin/EDTA-Lösung (10x konzentriert, 5 %, Verdünnung mit PBS) (Sigma)
- Trypanblaulösung (0,4 % Trypanblau in PBS)

Medium:

- DMEM (Dulbecco's modified Eagle Medium) mit 1 g/l Glucose ohne L-Glutamin und Phenolrot

Medienzusätze:

- Fötale Kälberserum (fetal calf serum, FCS), hitzeinaktiviert (HyClone)
- L-Glutamin (100x konzentriert, 200 mM) (PAN Biotech GmbH)
- Natrium-Pyruvat (100x konzentriert, 100 mM) (Sigma)
- Penicillin/Streptomycin (100x konzentriert, 10.000 U bzw. 10 mg/ml) (Sigma)
- G418-Sulfat (Calbiochem)
- Zeocin (InVivoGen)

VI.2.4 Puffer und Lösungen für die mRNA-Analyse

- **10x Transkriptionspuffer, pH 7,5**

400 mM Tris-HCl, pH 7,5
100 mM NaCl
60 mM MgCl₂
20 mM Spermidin

- **FAPP (Formamid-Probenpuffer)**

80 % Formamid entionisiert
0,1 % SDS
10 mM EDTA
1 mg/ml Xylencyanol
1 mg/ml Bromphenolblau

- **Gellösung für ein 6 %iges, denaturierendes Polyacrylamid-Harnstoffgel**

12 g Harnstoff
2,5 ml 10 x TBE
4 ml Acrylamidlösung (40 %)

mit Aqua bidest. auf 25 ml auffüllen, direkt vor dem Gießen 20 µl TEMED und 200 µl APS zum Starten der Polymerisationsreaktion zugeben

- **Gellösung für ein 5 %iges, denaturierendes Polyacrylamid- Harnstoffgel**

10,5 g Harnstoff
2,5 ml 10 x TBE
3 ml Acrylamidlösung (40 %)

mit Aqua bidest. auf 25 ml auffüllen, direkt vor dem Gießen 20 µl TEMED und 200 µl APS zum Starten der Polymerisationsreaktion zugeben

VI.2.5 Puffer und Lösungen für die Protein-Extraktion

- **RIPA-Puffer**
 - 50 mM Tris-HCl pH 7,4
 - 150 mM NaCl
 - 1 % NP-40
 - 2 mM EDTA
 - 10 % Glycerol
 - Protease-Inhibitor-Cocktail 1:25(wenn erforderlich: Zusatz von Phosphatase-Inhibitoren)

- **Puffer für Zytoplasma-Extrakte (Mix I)**
 - 10 mM Hepes-KOH, pH 7,9
 - 1,5 mM MgCl₂
 - 10 mM KCl
 - 0,1 % NP-40
 - 0,5 mM DTT
 - Protease-Inhibitor-Cocktail 1:25(wenn erforderlich: Zusatz von Phosphatase-Inhibitoren)

- **Puffer für Kernextrakte (Mix II)**
 - 2 mM Hepes-KOH, pH 7,9
 - 25 % Glycerin
 - 420 mM NaCl
 - 0,15 mM MgCl₂
 - 0,5 mM DTT
 - 0,02 mM EDTA
 - Protease-Inhibitor-Cocktail 1:25(wenn erforderlich: Zusatz von Phosphatase-Inhibitoren)

- **Puffer D**
 - 20 mM Hepes-KOH, pH 7,9
 - 20 % Glycerin
 - 2 mM MgCl₂
 - 100 mM KCl
 - 0,5 mM DTT
 - 0,2 mM EDTA

- **Phosphatase-Inhibitoren**
 - 40 mM β-Glycerophosphat
 - 50 mM NaF
 - 10 mM Natriumpyrophosphat
 - 10 mM Na₃VO₄
 - 10 nM Okadaische Säure

VI.2.6 Puffer und Lösungen für Protein-Analysen

- **Coomassie-Färbe-Lösung:**
 - 0,25 g Coomassie-Brillantblau
 - 45 ml Methanol
 - 45 ml H₂O
 - 10 ml Eisessig
- **Coomassie-Entfärbe-Lösung:**
 - 45 ml Methanol
 - 45 ml H₂O
 - 10 ml Eisessig
- **5x Laemmli-Probenpuffer**
 - 312,5 mM Tris-HCl, pH 6,8
 - 5 mM EDTA
 - 15 % SDS
 - 50 % Glycerin
 - 0,015 % Bromphenolblau
 - 40 mM DTT
- **5x Laufpuffer**
 - 125 mM Tris-HCl, pH 8,8
 - 960 mM Glycin
 - 0,5 % SDS
- **Ponceau S-Färbelösung**
 - 0,5 % Ponceau S
 - 1 % Eisessig
- **TBS**
 - 10 mM Tris-HCl, pH 7,8
 - 150 mM NaCl

VI.2.7 Antikörper

Primärantikörper für die Western-Blot-Analyse:

Name des Primärantikörpers	Klasse	Hersteller	Verdünnung	Blockier- und Verdünnungspuffer
iNOS-Antikörper	monoklonal	R&D Systems	1:5.000	5 % Milchpulver 0,1% Tween-20 in TBS
TTP-Antikörper	polyklonal	Rigby, W. F. ¹	1:1.000	3 % Milchpulver 0,1% Tween-20 in TBS
Tubulin-Antikörper	monoklonal	Sigma	1:1.000	5 % Milchpulver 0,1% Tween-20 in TBS
KSRP-Antikörper	monoklonal	Black, D.L. ²	1:50	5 % Milchpulver 0,1% Tween-20 in TBS
PM-Scl 100-Antikörper	polyklonal	Pruijn, ³ G.J.M. ³	1:500	4 % Milchpulver 0,1% NP-40 in PBS
HuR-Antikörper	monoklonal	Molecular Probes	1:1.000	5 % Milchpulver 0,1% Tween-20 in TBS
PTB-Antikörper	monoklonal	Zymed	1:1.000	5 % Milchpulver 0,1% Tween-20 in TBS

¹ beschrieben in: Brooks *et al.*, 2002

² beschrieben in: Hall *et al.*, 2004

³ beschrieben in: Brouwer *et al.*, 2001

Primärantikörper für Immunpräzipitationen:

Name des Primärantikörpers	Klasse	Hersteller	Verdünnung
KSRP-Antikörper	polyklonal	Chen, C.Y. ⁴	1:500
Maus-IgG	monoklonal	Sigma	1:500
HuR-Antikörper	polyklonal	Sigma	1:500

⁴ beschrieben in: Gherzi *et al.*, 2004

Sekundärantikörper:

- anti-Maus-IgG aus der Ziege, Peroxidase-gekoppelt (Sigma)
- anti-Kaninchen-IgG aus der Ziege, Peroxidase-gekoppelt (Sigma)
- Cy3-konjugiertes anti-Maus-IgG aus der Ziege (Jackson Immuno Research)

Die Sekundärantikörper wurden für die Western-Blot-Analysen 1:10.000 verdünnt in 5 % Milchpulver und 0,1 % Tween-20 in TBS eingesetzt. Für die Immunfluoreszenzfärbungen wurde der Sekundärantikörper 1:200 in PBS und 1 % BSA verdünnt.

VI.3 Enzyme

Enzym	Herkunft	Beschreibung
<i>T3 RNA-Polymerase</i> , 10 U/μl	Roche	DNA-abhängige RNA-Polymerase, spezifisch für den T3-Promotor
<i>T7 RNA-Polymerase</i> 10 U/μl	Roche	DNA-abhängige RNA-Polymerase, spezifisch für den T7-Promotor
<i>DNase I</i> , RNase-frei, 10 U/μl	Roche	Doppelstrang-spezifische Endonuklease
<i>RNase A</i> , 10 U/μl	Sigma	Pyrimidin-spezifische Endonuklease, die einzelsträngige RNA verdaut
<i>RNase T1</i> , 100 U/μl	Roche	Verdau einzelsträngiger RNA vom 3'-Ende bis zum ersten G
<i>Proteinase K</i> (EC 3.4.21.14)	Roche	Gewonnen aus <i>Tritirachium album</i>
<i>T4 DNA-Ligase</i>	New England Biolabs	Ermöglicht die Ligation von DNA
<i>Klenow-Fragment der DNA-Polymerase I von E. coli</i>	New England Biolabs	Zum Auffüllen nach Verdau mit 5'-überhängend schneidenden Enzymen
<i>CIAP</i> (calf intestinal alkaline phosphatase), 1 U/μl	Roche-Diagnostics	Alkalische Phosphatase; dephosphoryliert 5'-Enden von DNA
Restriktionsendonukleasen	New England Biolabs	Folgende Restriktionsenzyme wurden mit dem jeweils beigefügten Puffer verwendet: <i>Bam</i> HI, <i>Bgl</i> II, <i>Eag</i> I, <i>Eco</i> 81I, <i>Eco</i> ICRI, <i>Eco</i> RI, <i>Eco</i> RV, <i>Hind</i> III, <i>Not</i> I, <i>Pvu</i> II, <i>Sma</i> I, <i>Xba</i> I, <i>Xho</i> I

VI.4 Plasmide

VI.4.1 Plasmide zur *in vitro*-Transkription radioaktiv markierter antisense-RNA-Sonden

Name	Beschreibung	Hersteller
pCR-INDNO5A3A-human del Sma I	pCR-Skript mit einem 382 bp-cDNA-Fragment der humanen iNOS-mRNA (Position 3472-3853); beschrieben in: Geller <i>et al.</i> , 1993	Kleinert, H.
pKs- β aktin-hu-delEco/Nar	pKs-Vektor mit einem 110 bp-cDNA-Fragment des humanen β -Aktin	Rodriguez-Pascual, F.
pCR-luc-pG12	pCR-Skript mit einem 230 bp-cDNA-Fragment der Luciferase aus <i>P. pyralis</i>	Rodriguez-Pascual, F.

Tabelle 2: Plasmide zur *in vitro*-Transkription radioaktiv markierter antisense-RNA-Sonden

VI.4.2 Plasmide zur *in vitro*-Transkription von sense-RNA-Sonden

Name	Beschreibung	Hersteller
pCR-iNOS-3'-UTR	Durch <i>Hind</i> III verdautes PCR-Fragment der humanen iNOS (3'-UTR) in pCR-Skript kloniert	Rodriguez-Pascual, F.
pCR-NOSII-5'-UTR	Durch <i>Hind</i> III verdautes PCR-Fragment der humanen iNOS (5'-UTR) in pCR-Skript kloniert	Kleinert, H.
pXcmI-ATTTA*	254 bp-Fragment der iNOS-3'-UTR in pXcmI kloniert (Position 234-479; enthält fünf AREs)	Rodriguez-Pascual, F.
pXcmI-nonATTTA*	245 bp-Fragment der iNOS-3'-UTR in pXcmI kloniert (Position 1-245; enthält keine AREs)	Rodriguez-Pascual, F.
pAUUUA-FragA*	98 bp-PCR-Fragment der iNOS-3'-UTR in pXcmI kloniert (Position 234-331; enthält keine AREs)	Rodriguez-Pascual, F.
pAUUUA-FragB*	104 bp-PCR-Fragment der iNOS-3'-UTR in pXcmI kloniert (Position 329-432; enthält drei AREs)	Rodriguez-Pascual, F.
pAUUUA-FragC*	99 bp-PCR-Fragment der iNOS-3'-UTR in pXcmI kloniert (Position 389-479; enthält zwei AREs)	Rodriguez-Pascual, F.
pCR-FragC-mut1	Durch <i>Eco</i> RV und <i>Hind</i> III verdautes PCR-Fragment von Fragment C mit Mutation in ARE 4 in pCR-Skript kloniert	Linker, K.

pCR-FragC-mut2	Durch <i>Eco</i> RV und <i>Hind</i> III verdautes PCR-Fragment von Fragment C mit Mutation in ARE 5 in pCR-Skript kloniert	Linker, K.
pCR-FragC-mut1+2	Durch <i>Eco</i> RV und <i>Hind</i> III verdautes PCR-Fragment von Fragment C mit Mutation in ARE 4 und 5 in pCR-Skript kloniert	Linker, K.
pCR-5'-UTR-Ex1	140 bp-Fragment des Exon1 der humanen iNOS-5'-UTR in pCR-Skript kloniert (Position 1-140 der iNOS-5'-UTR)	Hubrich, T.
pCR-5'-UTR-Ex2	26 bp-Fragment des Exon 1 und 73 bp-Fragment des Exon 2 der humanen iNOS-5'-UTR in pCR-Skript kloniert (Position 114-213 der iNOS-5'-UTR)	Hubrich, T.
pCR-3'-UTR-polyA	iNOS-3'-UTR (Position 1-478) mit 100 nt-Poly-A-Schwanz in pCR-Skript kloniert	Rodriguez-Pascual, F.
pCR-nonAU-polyA	245 bp-Fragment der iNOS-3'-UTR mit 100 nt-Poly-A-Schwanz in pCR-Skript kloniert (Position 1-245; enthält keine AREs)	Rodriguez-Pascual, F.
pG13-T7-basic	Durch <i>Acc</i> 65I und <i>Spe</i> I verdautes PCR-Fragment der T7-Polymerase in pG13-basic kloniert	Bros, M.

* beschrieben in: Rodriguez-Pascual *et al.*, 2000

Tabelle 3: Plasmide zur *in vitro*-Transkription von sense-RNA-Sonden

VI.4.3 Plasmide für die Expression und Aufreinigung von Fusionsproteinen

Name	Beschreibung	Hersteller
pGEX-2T	Plasmid zur bakteriellen Expression von Fusionsproteinen; enthält als Fusionspartner Gluthation-S-Transferase und ein Lac-Operon-System zur Induktion mit IPTG	Amersham Pharmacia Biotech
pGEX-KSRP	humane KSRP-cDNA in die <i>Bam</i> HI-Schnittstelle von pGEX-2T kloniert; beschrieben in: Lellek <i>et al.</i> , 2000	Greeve, J.
pGEX-HuR	<i>Bam</i> HI- und <i>Eco</i> RI-verdautes PCR-Fragment der humanen HuR-cDNA in pGEX-2T kloniert; beschrieben in: Rodriguez-Pascual <i>et al.</i> , 2000	Rodriguez-Pascual, F.
pGEX-PTB	<i>Bam</i> HI- und <i>Eco</i> RI-verdautes Fragment der humanen PTB-cDNA in pGEX-2T kloniert	Ihrig-Biedert, I.
pET15b-HisKSRP	humane KSRP-cDNA in pET-15b kloniert; beschrieben in: Min <i>et al.</i> , 1997	Black, D.L.

Tabelle 4: Plasmide für die Expression und Aufreinigung von Fusionsproteinen

VI.4.4 Plasmide für die stabile Transfektion

Name	Beschreibung	Hersteller
pcDNA3	Plasmid, welches das Neomycin-Resistenzgen enthält	Invitrogen, Groningen, Niederlande
pcDNA3.1HisKSRP (= pcDNA-HisKSRP)	Humane KSRP-cDNA in pcDNA3.1 kloniert; beschrieben in: Min <i>et al.</i> , 1997	Black, D.L.
pcDNA3.1HisKSRP-antisense (= pcDNA-KSRPas)	<i>Eco</i> R1/ <i>Xba</i> I-Fragment aus pcDNA3.1HisKSRP in antisense-Orientierung in pcDNA3.1HisKSRP kloniert	Linker, K.
pcDNA3.1HisKSRP-delRBS4 (= pcDNA-KSRPdel)	Deletion des <i>Eco</i> 81I/ <i>Xba</i> I-Fragments (entspricht der 4. RNA-Bindungsdomäne) aus pcDNA3.1HisKSRP	Linker, K.
pEGFPc1	Plasmid, welches das Neomycin-Resistenzgen enthält und für EGFP codiert	Invitrogen, Groningen, Niederlande
pEGFP-PTB	<i>Nde</i> I/ <i>Sal</i> I-verdautes Fragment der humanen PTB-cDNA in pEGFP kloniert; beschrieben in: Hahm <i>et al.</i> , 1998a	Hahm, B.

Tabelle 5: Plasmide für die stabile Transfektion

VI.4.5 Plasmide für die transiente Transfektion

Name	Beschreibung	Hersteller
pRL-EF1 α	Humaner EF-1 α Promotor in Renilla-Luciferase Expressionsvektor	Bros, M.
pXP2-16kb	Luciferase-Reportergen unter der Kontrolle eines 16 kb-Fragments des humanen iNOS-Promotors (16 kb des humanen iNOS-Promotors in pXP2); beschrieben in: de Vera <i>et al.</i> , 1996	Geller, D.
pZeoSV2- (= pZeo)	Plasmid, welches das Zeocin-Resistenzgen enthält	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
pZeo-hTTP-Flag-sense (= pZeo-hTTPs)	<i>Hind</i> III-Fragment aus pCMV-hTTP-Flag in sense-Orientierung in pZeoSV2-kloniert ; beschrieben in: Fechir <i>et al.</i> , 2005a	Fechir, M.
pZeo-hTTP-Flag-antisense (= pZeo-hTTPas)	<i>Hind</i> III-Fragment aus pCMV-hTTP-Flag in antisense-Orientierung in pZeoSV2-kloniert; beschrieben in: Fechir <i>et al.</i> , 2005a	Fechir, M.
pcDNA3	VI.4.4	VI.4.4
pcDNA3.1HisKSRP	VI.4.4	VI.4.4

Tabelle 6: Plasmide für die transiente Transfektion

VI.4.6 Originalplasmide

Name	Beschreibung	Hersteller
pCR-Skript	zur Klonierung von PCR-Fragmenten	Stratagene
pXcml	zur Klonierung von PCR-Fragmenten; hergestellt aus pBluescript II SK(+); beschrieben in: Borovkov und Rivkin, 1997	Borovkov, A.

Tabelle 7: Originalplasmide

VI.5 Oligonukleotide

VI.5.1 Sequenzen von Primern und Sonden für die qRT-PCR-Analysen

Alle Primer und Sonden für die qRT-PCR-Analysen (VII.2.15) wurden von MWG-Biotech bezogen. Die Sonden sind am 5'-Ende mit 6-Carboxyfluorescein (FAM) als Reporterfluorophor und am 3'-Ende mit Carboxytetramethylrhodamin (TAMRA) als Quencher markiert.

Primer/Sonden	Sequenz	Position in der cDNA
iNOS sense:	TGCAGACACGTGCGTACTCC	946-966
iNOS antisense:	GGTAGCCAGCATAGCGGATG	1056-1075
iNOS Sonde:	TGGCAAGCACGACTTCCGGGTG	1020-1041
GAPDH sense	CCCATGTTTCGTCATGGGTGT	3780-3799
GAPDH antisense:	TGGTCATGAGTCCTTCCACGATA	3994-4012
GAPDH Sonde:	CTGCACCACCAACTGCTTAGCACCC	3940-3964
TTP sense:	TTCGCCCACTGCAACCTC	1198-1215
TTP antisense:	CGCCCACTCTCTGAGAAGGTC	1252-1272
TTP Sonde :	CCCCTCGCGCTACAAGACTGAGCTATG	1222-1248
LUC sense:	AAAAAGTTGCGCGGAGGAG	1528-1546
LUC antisense:	TTTTTCTTGCCTCGAGTTTTCC	1582-1603
LUC Sonde :	TGTGTTTGTGGACGAAGTACCGAAAGGTCTTAC	1548-1580
KSRP sense:	TGCAGCAAGCCTGTGAGATG	972-991
KSRP antisense:	TCCGTACTCATTCCGGTCCC	1032-1051
KSRP Sonde :	TGGACATCCTCCGGGAACGTGACC-	996-1019
PTB sense:	CCTGACCAAGGACTACGGCA	1440-1459
PTB antisense:	GAAGTTCTTGGAGCCCGGC	1485-1503
PTB Sonde :	CTCACCCCTGCACCGCTTCAAGA	1461-1483

Tabelle 8: Sequenzen von Primern und Sonden für die qRT-PCR-Analysen

Primer und Sonden wurden in RNase-freiem Wasser zu je 100 pmol/ μ l gelöst und bei -20°C gelagert.

VI.5.2 Sequenzen von Oligonukleotiden für die *in vitro*-Transkription von siRNA

Alle Oligonukleotide für die *in vitro*-Transkription von siRNA wurden von MWG Biotech bezogen. Die Sequenzen wurden so gewählt, dass sie am 3'-Ende eine T7-Promotor-Sequenz enthielten.

siRNA	Sequenz	Position in der cDNA
LUC	CGUACGCGGAAUACUUCGA beschrieben in: Elbashir <i>et al.</i> , 2002	155-173 (aus pGI2basic)
KSRP	GAUCAACCGGAGAGCAAGA beschrieben in: Gherzi <i>et al.</i> , 2004	443-461
PTB	AACTTCCATCATTCCAGAGAA beschrieben in: Wagner und Garcia-Blanco, 2002	1796-1816

Tabelle 9: Sequenzen von Oligonukleotiden für die *in vitro*-Transkription von siRNA

VI.6 Zelllinien

Zellen	Beschreibung	Quelle/Hersteller
DLD-1	humane Kolon-Adenokarzinomzellen	ATCC (CCL-221)
A549/8	humane Alveolarepithel-Karzinomzellen	Edgell, J. University of North Carolina at Chapel Hill, USA
DLD-1-16kb	DLD-1-Zellen, die ein Luciferase-Reportergen unter der Kontrolle eines 16 kb-Fragmentes des iNOS-Promotors enthalten	Kleinert, H.
A549/8-16kb	A549/8-Zellen, die ein Luciferase-Reportergen unter der Kontrolle eines 16 kb-Fragmentes des iNOS-Promotors enthalten.	Kleinert, H.
DLD-1-pZeo	DLD-1-Zellen, die ein Zeocin-Resistenzgen enthalten	Fechir, M.
DLD-1-pZeo-hTTPs	DLD-1-Zellen mit Zeocin-Resistenzgen, die die hTTP-cDNA in sense-Orientierung enthalten	Fechir, M.
DLD-1-pZeo-hTTPas	DLD-1-Zellen mit Zeocin-Resistenzgen, die die hTTP-cDNA in antisense-Orientierung enthalten	Fechir, M.

DLD-1-pcDNA3	DLD-1-Zellen, die ein Neomycin-Resistenzgen enthalten	Linker, K.
DLD-1-pcDNA-HisKSRP	DLD-1-Zellen mit Neomycin-Resistenzgen, die die KSRP-cDNA mit HisTag in sense-Orientierung enthalten	Linker, K.
DLD-1-pcDNA-KSRPas	DLD-1-Zellen mit Neomycin-Resistenzgen, die die KSRP-cDNA mit HisTag in antisense-Orientierung enthalten	Linker, K.
DLD-1-pcDNA-KSRPdel	DLD-1-Zellen mit Neomycin-Resistenzgen, die die KSRP-cDNA nach Deletion der vierten RNA-Bindungsdomäne mit HisTag enthalten	Linker, K.
DLD-1-pEGFP	DLD-1-Zellen, die ein Neomycin-Resistenzgen enthalten und EGFP exprimieren	Linker, K.
DLD-1-pEGFP-PTB	DLD-1-Zellen, die ein Neomycin-Resistenzgen enthalten und ein EGFP-PTB-Fusionsprotein exprimieren	Linker, K.

Tabelle 10: Zelllinien

VI.7 Bakterien

- **DH5 α** (*E. coli*-Stamm)
- **TOP10** (*E. coli*-Stamm)
- **BL21(DE3)LysS** (*E. coli*-Stamm)

VI.8 Laborgeräte

VI.8.1 Anlagen zur Elektrophorese

- **Gleichstromquellen:** GPS 2000/400 (Pharmacia), Electrophoresis Power Supply EPS 3500 (Pharmacia) und Power Pac 3000 (Biorad)
- **Vertikal-Gelelektrophoresekammer mit Zubehör:** Mini Protean II (Biorad)
- **Geltrockner:** Modell 583 und 543 Gel Dryer mit Kühlfalle, Vapor Trap (Biorad)

VI.8.2 Zentrifugen

- **Tischzentrifugen:** Biofuge 13 (Heraeus); Zentrifuge 5417 C (Eppendorf)
- **Kühlzentrifugen:** Biofuge fresco (Heraeus); Megafuge 1,0R (Heraeus)
- **Hochgeschwindigkeitszentrifuge:** J2-MC mit Rotor JA 13.1, JA 14 (Beckmann)
- **Vakuumzentrifuge:** Speed Vac SC-110 mit Kühlfalle und Vapor Trap RVT 100 (Savant)

VI.8.3 Messgeräte

- **Photometer:** Uvikon 941 Spectrophotometer (Kontron) und FluoStar Optima (BMG)
- **Luminometer:** Centro LB 960 (Berthold)
- **Szintillationszähler:** Tri-Carb 460 CD Liquid Scintillation System (Packard)
- **Molecular Imager:** Personal Molecular Imager FX (Biorad)
- **NO-Analyzer:** Sievers Nitric Oxide Analyzer NOA (FMI GmbH)
- **PCR-Gerät:** iCycler (Biorad)

VI.8.4 Sonstige Laborgeräte

- **Pipetten:** 1-20 μl , 20-200 μl , 200-1.000 μl (Gilson)
- **Multipipette:** Multipipette (Eppendorf)
- **Mikroliterspritze:** 50 μl (Hamilton)
- **pH-Meter:** ϕ 32 pH-Meter (Beckmann)
- **Wasseraufbereitungsanlage:** Milli-Q plus (Millipore Waters)
- **Sterile Werkbank:** Biohazard, Mikrobiologische Sicherheitswerkbank (BDK)
- **Zählkammer für Zellen:** Neubauer-Zählkammer (Labotec)
- **Brutschrank:** Hera Cell 150 (Heraeus)
- **Ultraschall-Homogenisator:** Sonicator, ultrasonic processor XL (Heat System)
- **pH-Elektrode:** Ingold (Mettler-Toledo AG)
- **Semi-Dry-Blot:** Trans-Blot (Biorad)
- **UV-Cross-Linker:** GS-Gene-Linker (Biorad)
- **Mikroskope:** Leitz DMIL und Leitz DMRB (Leica)

VI.9 Sonstige Materialien

VI.9.1 Plastikwaren

Alle Plastikwaren für die Zellkultur wurden steril von Greiner oder Sarstedt bezogen.

- **Zellkulturflaschen, Filter Top:** Kulturflasche/Volumen (cm^2/ml): 75/250 und 25/50
- **beschichtete Gewebekultur-Petrischalen:** Durchmesser/Wachstumsfläche (cm/cm^2): 14,5/145; 9,4/58 und 6,0/21
- **Einweg-Auslaufpipetten:** 1 ml, 5 ml, 10 ml und 25 ml
- **Zellkulturplatten, 6-Loch:** Kulturfläche je Loch: 9,6 cm^2
- **Zellkulturplatten, 12-Loch:** Kulturfläche je Loch: 3,8 cm^2
- **Zellkulturplatten, 24-Loch:** Kulturfläche je Loch: 1,75 cm^2
- **Mikroplatten, 96-Loch**
- **Zentrifugenröhrchen:** 15 und 50 ml Spitzboden, 14 ml Rundboden
- **Reaktionsgefäße :** 0,4 ml, 1,5 ml und 2,0 ml Safe-Lock, 1,5 ml mit Schraubverschluss und Kryo-Röhrchen
- **Plastikpipettenspitzen:** 0,5-10 μl , 10-100 μl und 100-1.000 μl
- **Mikroküvetten:** 1 ml

VI.9.2 Weitere Verbrauchsmaterialien

- **Whatman 3 MM Papier:** 3469 (Schleicher und Schuell)
- **Nitrocellulose-Membran:** Protran B3 (Schleicher und Schuell)
- **Photomaterialien:** Entwickler- und Fixierer-Lösung (Kodak), Röntgenfilme (Agfa)
Röntgenfilm-Fluoreszenzschirme (Agfa)

VII Methoden

VII.1 Zellbiologische Arbeitsmethoden

VII.1.1 Kultivierung eukaryoter Zellen

Alle Arbeiten mit Zellen wurden unter Verwendung von sterilisierten Geräten sowie steril filtrierte, autoklavierten oder bereits steril gekaufte Substanzen unter einem Laminar Flow durchgeführt. Die Kultivierung der Zellen erfolgte in einem Brutschrank bei 37°C mit 5 % CO₂-Begasung und 100 % Luftfeuchtigkeit in Zellkulturflaschen mit Filter-Top. Alle Kulturmedien wurden vor dem Kontakt mit Zellen auf 37°C erwärmt.

DLD-1-Zellen wurden in phenolrothaltigem DMEM mit 10 % fötalem Kälberserum (FCS), A549/8-Zellen in DMEM mit 5 % FCS inkubiert. Das FCS wurde zuvor zur Inaktivierung von Komplementfaktoren 40 Minuten lang auf 56°C erwärmt. Dem Kulturmedium wurden zusätzlich 2 mM L-Glutamin, 1 mM Pyruvat sowie 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin zugesetzt.

Zum Passagieren wurden die Zellen, sobald sie konfluent waren, zunächst mit 10 ml PBS gewaschen und dann mit 1 ml 0,5 %iger Trypsin-Lösung versetzt, sodass sie sich nach 2-10 Minuten vom Boden der Zellkulturflasche ablösten. Die Zellen wurden dann in frischem Medium aufgenommen. Ein Aliquot davon wurde zur Weiterführung der Stammkultur wieder in eine Kulturflasche eingesät. Die restlichen Zellen wurden je nach Bedarf für Versuche in Zellkulturschalen ausgesät, eingefroren oder verworfen.

VII.1.2 Kryokonservierung und Auftauen eukaryoter Zellen

Zum Einfrieren wurden die Zellen nach der Trypsininkubation in 10 ml Medium aufgenommen, in ein 15 ml-Spitzbodenröhrchen überführt und zehn Minuten bei 120 x g und 4°C zentrifugiert. Anschließend wurde das Zellpellet nach Absaugen des Überstandes in einer Mischung aus FCS und 10 % DMSO aufgenommen und in 1,5 ml-Kryo-Röhrchen überführt. Die Lagerung erfolgte zunächst bei -70°C, später in flüssigem Stickstoff bei -196°C. Zum Auftauen wurde die Zellsuspension im Kryoröhrchen zunächst auf 37°C erwärmt, dann in 10 ml Medium aufgenommen und zehn Minuten bei 120 x g zentrifugiert, um die Konzentration des zytotoxischen DMSO im Medium herabzusetzen. Anschließend wurde das Zellpellet in 10 ml frischem Medium resuspendiert und in eine Zellkulturflasche eingesät.

VII.1.3 Bestimmung der Zellzahl eukaryoter Zellen

Die Bestimmung der Zellzahl zum Aussäen von eukaryoten Zellen erfolgte mit Hilfe der Neubauer Zählkammer. Dazu wurden die Zellen nach der Trypsinbehandlung in Medium aufgenommen und mit 0,4 %iger Trypanblau-Lösung im Verhältnis 1:3 verdünnt. Durch Färbung mit Trypanblau konnten vitale Zellen von toten Zellen unterschieden werden, die durch Eindringen des sauren Farbstoffs im Lichtmikroskop blau erschienen. Die Lösung wurde in ein Zählfeld der Zählkammer eingebracht und drei von vier Quadranten ausgezählt. Die auf diese Weise ermittelte Zahl wurde mit 10.000 multipliziert und ergab so die Zellzahl pro Milliliter Zellsuspension.

VII.1.4 Stimulation eukaryoter Zellen mit Zytokinen

Zur Induktion der iNOS-Expression wurden die Zellen mit einem Zytokingemisch („cytokine mixture“, CM) behandelt, wenn sie zu ungefähr 70 % konfluent waren. 18 Stunden vor Beginn der Stimulation wurde ein Mediumwechsel mit Serum-freiem Medium durchgeführt, sodass sich alle Zellen in der gleichen Phase des Zellzyklus befanden. Dies erleichterte die Induktion der iNOS-Expression.

Das Zytokingemisch bestand aus IFN- γ (100 U/ml), IL-1 β (50 U/ml) und TNF- α (10 ng/ml) in Serum-freiem Medium. Die Induktion erfolgte dann für die jeweils angegebenen Zeitperioden.

Bei Einsatz von Inhibitoren wie Cycloheximid (CHX) oder SB 203580 wurden die Zellen mit diesen in der jeweils angegebenen Konzentration eine Stunde vor Stimulation der iNOS-Expression vorinkubiert.

VII.1.5 Transiente Transfektion eukaryoter Zellen

Bei der transienten Transfektion wird ein Plasmid mit Hilfe eines Transfektionsreagenz in eine Zelle eingeschleust. Transiente Transfektionen wurden in 24-Loch-Platten durchgeführt; pro Loch wurden dazu 5×10^4 Zellen ausgesät. Die Zellen wurden dann für 24 Stunden kultiviert. Zum Ansetzen des Transfektionsgemisches wurden zunächst 3 μ l Fugene-Transfektionsreagenz in Serum-freiem Medium verdünnt, sodass das Gesamtvolumen 100 μ l betrug. Anschließend wurden 2 μ g Plasmid-DNA zugegeben, gemischt und für mindestens 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, damit sich die Komplexe aus DNA und Transfektionsreagenz ausbilden konnten. Anschließend wurde das Gemisch langsam auf die Zellen gegeben und diese für weitere 30 Stunden inkubiert, sodass die transfizierte DNA exprimiert werden konnte. Daraufhin schloss sich eine Stimulation der Zellen mit einem Zytokinmix zur Induktion der iNOS-Expression an.

VII.1.6 Stabile Transfektion eukaryoter Zellen

Bei der stabilen Transfektion wird im Gegensatz zur transienten Transfektion die transfizierte DNA stabil ins Genom integriert. Somit wird sie permanent exprimiert und an Tochterzellen weitergegeben. Die Selektion von Zellen, die das Gen aufgenommen haben, erfolgt bei der stabilen Transfektion mit Hilfe von Selektionsmedien, die Antibiotika enthalten. Da die Selektionsmedien für Wildtyp-Zellen toxisch sind, können nur die Zellen überleben, die ein Resistenzgen gegen das Antibiotikum aufgenommen haben. Die Information für diese Resistenz liegt meist auf dem gleichen Plasmid wie das zu exprimierende Gen, sodass man annimmt, dass Zellen, die selektioniert werden, auch die Information für das transfizierte Gen enthalten.

Für die stabile Transfektion wurden 2×10^5 Zellen pro Loch in einer 6-Loch-Platte ausgesät und diese für 24 Stunden im Brutschrank inkubiert. Der Transfektionsmix wurde mit 5 µg DNA und 15 µl Fugene-Transfektionsreagenz angesetzt wie beschrieben (VII.1.5). 24 Stunden nach der Transfektion wurden die Zellen mit PBS gewaschen und mit Trypsin von der Zellkulturschale abgelöst. Die Zellen wurden dann in Medium aufgenommen, das das Selektionsantibiotikum enthielt und in eine Ø 10 cm-Zellkulturschale ausgesät. Nun wurde in regelmäßigen Zeitabständen das Medium gewechselt, um die abgestorbenen Wildtyp-Zellen zu entfernen. Die nach einiger Zeit entstandenen Zellklone (üblicherweise mehr als 30) wurden zusammengeführt und mittels RT-PCR oder Western-Blot-Analysen auf die Expression des transfizierten Gens überprüft. Zellen, die mit einem EGFP-Konstrukt transfiziert wurden, konnten anschließend mittels FACS (Fluoreszenz-aktiviertes Zell-Sortieren) angereichert werden.

VII.1.7 Transfektion von siRNA

siRNAs (small interfering RNAs) sind kurze doppelsträngige RNA-Moleküle, die in der Zelle sequenzspezifisch zur Degradation von mRNA führen (Elbashir *et al.*, 2001). Sie können entweder exogen als synthetische Agenzien oder endogen als Gen-codierte siRNAs in die Zelle eingebracht werden. Lange doppelsträngige RNAs werden in der Zelle durch eine Typ III-RNase (Dicer) zu siRNAs prozessiert, die 21-23 Nukleotide enthalten. Diese werden ATP-abhängig entwunden und dann als einzelsträngige siRNAs in den hochmolekularen Proteinkomplex RISC (RNA-induced silencing complex) integriert. Dieser wird nun in seine aktive Form umgewandelt und bindet an eine komplementäre mRNA-Sequenz, deren zugehörige mRNA daraufhin degradiert wird (Abbildung 2).

Auf diese Weise können spezifisch mRNAs in der Zelle herunterreguliert und der Effekt ihrer verminderten Expression beobachtet werden. Ein Vorteil dieser Methode verglichen mit der antisense-Strategie ist das Umgehen der PKR-vermittelten Aktivierung proinflammatorischer Gene durch die Verwendung von kurzen RNA-Molekülen.

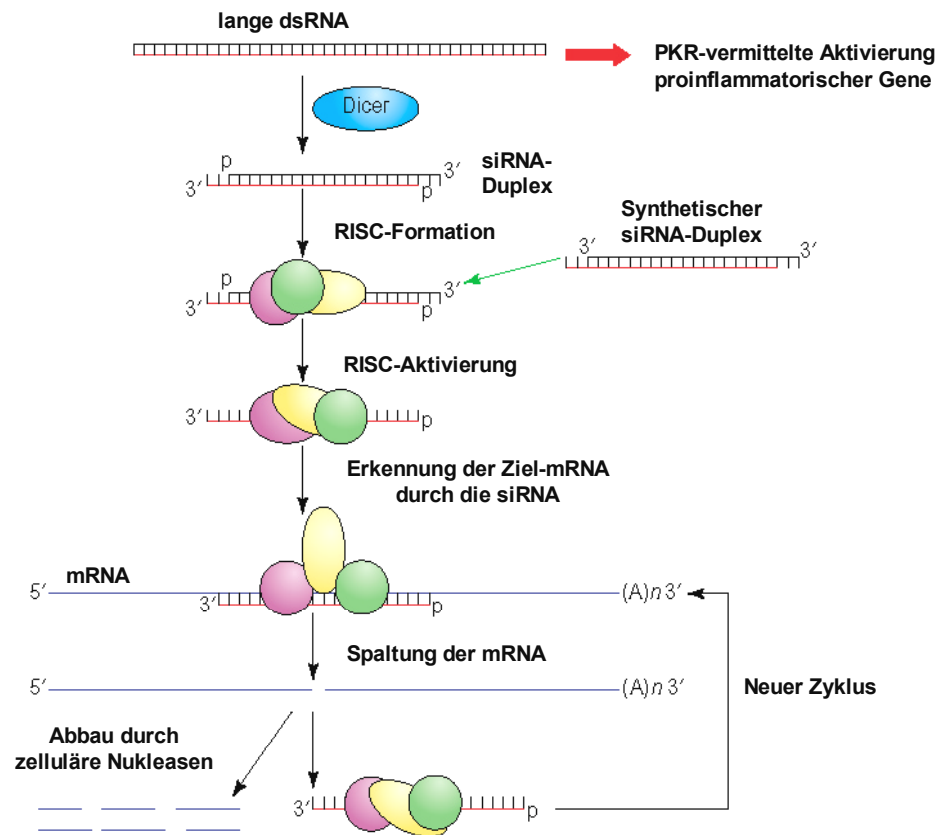


Abbildung 2: Wirkmechanismus von siRNAs

Lange, doppelsträngige RNA-Moleküle werden von der Typ III-RNase Dicer zu siRNAs prozessiert, die den RNA-Interferenzweg aktivieren. Auf diese Weise produzierte oder synthetische, in die Zelle eingebrachte siRNAs werden in den Multiproteinkomplex RISC eingebaut und ATP-abhängig durch eine Helikase entwunden. Dadurch wird der RISC-Komplex aktiviert und durch den antisense-Strang der siRNA spezifisch zur mRNA geleitet, die zunächst gespalten und dann mit Hilfe von zellulären Nucleasen abgebaut wird. Im Gegensatz zu langer, doppelsträngiger RNA ist die synthetische oder *in vivo*-exprimierte siRNA in der Lage, die PKR-vermittelte Aktivierung proinflammatorischer Gene zu umgehen und auf diese Weise unspezifische Effekte zu vermeiden.

Modifiziert nach: Sioud, 2004

siRNAs wurden in Form von shRNAs (short hairpin RNAs), die eine charakteristische Haarnadelstruktur besitzen, in die Zellen eingebracht und dort durch das Enzym Dicer zu kurzen, doppelsträngigen siRNAs prozessiert. Die für die Transfektion benötigten shRNAs wurden durch *in vitro*-Transkription von Oligonukleotiden mit dem MessageMuter Kit generiert. Die Oligonukleotide wurden dabei so gewählt, dass sie neben der Zielsequenz der zu herunterregulierenden mRNA am 3'-Ende eine T7-Promotor-Sequenz enthielten.

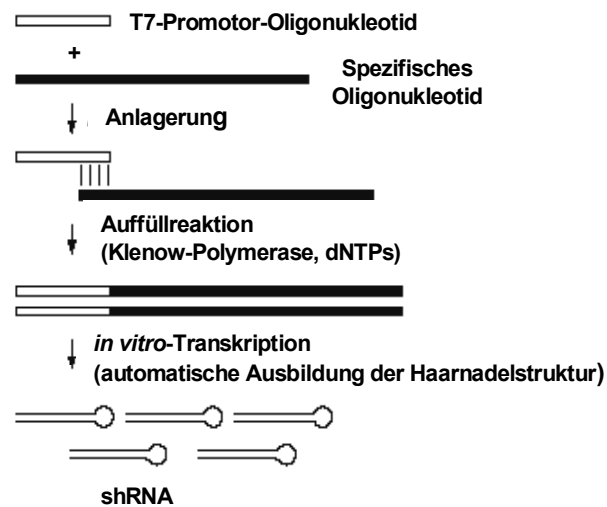


Abbildung 3: Produktion von shRNA

Zur Produktion von shRNAs wurde an das spezifische Oligonukleotid zunächst ein T7-Promotor-Oligonukleotid angelagert. Anschließend wurden die überhängenden Enden mit Hilfe einer Klenow-DNA-Polymerase und dNTPs aufgefüllt. Die so generierte doppelsträngige DNA diente als Matrize für die *in vitro*-Transkription. Die *in vitro*-transkribierte mRNA nahm automatisch die Haarnadelstruktur der shRNA an und konnte nach Aufreinigung in die Zellen transfiziert werden.

Modifiziert nach: MessageMuterTM shRNAiProduction Kit (Epicentre)

Zur Produktion von shRNA wurde zunächst durch Erhitzen auf 75°C und anschließendes Abkühlen auf Raumtemperatur ein T7-Promotor-Oligonukleotid an das spezifische Oligonukleotid angelagert. Dann wurden die überhängenden Enden mit Hilfe einer Klenow-DNA-Polymerase unter Zugabe von dNTPs aufgefüllt, sodass eine lineare, doppelsträngige DNA entstand, die als Matrize für die *in vitro*-Transkription diente. Nun wurde für 90 Minuten bei 42°C transkribiert. Das entstandene *in vitro*-Transkript nahm spontan die Haarnadelstruktur an und konnte direkt über Säulenchromatographie (Quick Spin Columns) aufgereinigt werden (Abbildung 3).

Diese shRNA wurde dann in DLD-1- oder A549/8-Zellen transfiziert. Dazu wurden 1×10^5 Zellen pro Loch in eine 12-Loch-Platte ausgesät und diese für 24 Stunden bei 37°C und 5 % CO₂ inkubiert. Die Transfektion erfolgte mit dem RNAifect Kit. 2 µg der shRNA wurden mit ECR-Puffer zu einem Gesamtvolumen von 100 µl verdünnt. Zu diesem Ansatz wurden 6 µl RNAifect-Transfektionsreagenz gegeben und vorsichtig gemischt. Die Lösung wurde dann für 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, sodass sich aus RNA und Transfektionsreagenz Komplexe bilden konnten. In dieser Zeit wurde auf die Platten 0,5 ml frisches Medium pro Loch gegeben und anschließend tropfenweise der Transfektionsmix zugefügt. Nach 30 Stunden Inkubation erfolgte ein Mediumwechsel mit Serum-freiem Medium. Am nächsten Tag wurden die transfizierten Zellen mit Zytokinen stimuliert (VII.1.4). Der Erfolg der Reduktion der Genexpression und der Effekt auf die iNOS-Expression wurden mit qRT-PCR- und Western-Blot-Analysen überprüft.

VII.1.8 Analyse der NO-Produktion mittels Chemilumineszenz

Die iNOS-vermittelte NO-Produktion nach Stimulation der Zellen mit einem Zytokinmix wurde durch Nachweis der Nitritmenge im Zellkulturüberstand ermittelt. Dies ist möglich, da das von den Zellen produzierte NO sehr schnell zu NO_2^- oxidiert wird. Die Messung erfolgte in einem NO-Analyzer mittels Chemilumineszenz. Dazu wurden 50 μl der Zellkulturüberstände in ein Gefäß eingespritzt, das eine Lösung aus 100 mM Kaliumiodid in 10 mM schwefliger Säure enthielt. Unter diesen Bedingungen wurde das NO_2^- im Überstand wieder zu gasförmigem NO reduziert, das nun in den NO-Analyzer gelangte und dort mit Ozon unter Emission von Licht reagierte. Die Menge der emittierten Lichtquanten ist dabei dem gebildeten NO proportional. Zum Vergleich wurde eine Standardkurve mit definierten Nitritmengen gemessen.

VII.2 Molekularbiologische Arbeitsmethoden

VII.2.1 Restriktion von DNA

Zum Verdau von Plasmid-DNA wurden bakterielle Restriktionsendonukleasen eingesetzt. Diese erkennen eine definierte palindromische Sequenz und schneiden die doppelsträngige DNA überhängend oder stumpf. Restriktionsendonukleasen wurden sowohl zur Charakterisierung von DNA als auch zur Präparation von definierten DNA-Fragmenten für die Klonierung eingesetzt. Zum analytischen Verdau wurden 0,1-1 μg Plasmid-DNA mit 3 U Enzym unter den vom Hersteller angegebenen Puffer- und Temperaturbedingungen in einem Gesamtvolumen von 20 μl für mindestens drei Stunden inkubiert. Für präparative Zwecke wurden 20-40 μg DNA eingesetzt; das Gesamtvolumen wurde dementsprechend angepasst.

VII.2.2 Phenol-Chloroform-Extraktion und Ethanolfällung von Nukleinsäuren

Zur Entfernung von Salzen oder Proteinen sowie zur Konzentrierung von Nukleinsäuren wurde 1/10 des Volumens 3M Natriumacetat-Lösung (pH 4,8) und 1 Volumen einer 1:1-Mischung aus Tris-gesättigtem Phenol und Chloroform zugegeben. Dann wurde für fünf Minuten bei 20.000 x g und 4°C zentrifugiert. Anschließend wurde die obere Phase in ein neues Gefäß überführt und mit dem 2,5-fachen Volumen Ethanol (100 %) versetzt. Dann wurde eine Stunde bei -20°C inkubiert und anschließend 20 Minuten bei 20.000 x g und 4°C zentrifugiert. Das entstandene Pellet wurde mit 70 %igem Ethanol gewaschen, erneut zentrifugiert, getrocknet und in Aqua bidest. gelöst.

VII.2.3 Auffüllen überhängender 5'-Enden mit DNA-Polymerase

Zum Auffüllen 5'-überhängender DNA-Enden wurde das Klenow-Fragment der DNA-Polymerase aus *E. coli* verwendet. Dieses besitzt nur die 5'-3'-Polymeraseaktivität und die 3'-5'-Exonukleaseaktivität bei fehlender 5'-3'-Exonukleaseaktivität. Dazu wurde die DNA in einem Gesamtvolumen von 100 µl in EcoPol-Puffer mit 1 mM dNTPs und 3 U Klenow-Enzym versetzt und eine Stunde lang bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde eine Phenol-Chloroform-Extraktion mit anschließender Ethanolfällung durchgeführt (VII.2.2).

VII.2.4 5'-Dephosphorylierung

Zur Vermeidung der Religation einer Vektor-DNA wurde diese mit Hilfe der alkalischen Phosphatase (CIAP) am 5'-Ende dephosphoryliert. Dazu wurden nach dem Restriktionsverdau direkt 5 U CIAP zum Ansatz gegeben und eine Stunde bei 37°C inkubiert.

VII.2.5 Agarosegelelektrophorese zur Analyse von DNA

Zur Überprüfung eines Restriktionsverdaus mit erwarteten Fragmentlängen größer als 100 kb wurden analytische Agarosegele verwendet. Dazu wurde die Agarose je nach Größe der Fragmente in 0,8-2 %iger Konzentration eingesetzt. Als Laufpuffer diente TBE. Zur Elektrophorese wurden die Proben mit DNA-Probenpuffer versetzt, aufgetragen und eine Spannung von 4-5 V/cm angelegt. Zur Detektion der DNA wurde dem Gel der interkalierende Farbstoff Ethidiumbromid in einer Konzentration von 5 ng/ml zugesetzt. Auf diese Weise konnten die einzelnen Fragmente durch Fluoreszenz unter dem UV-Transilluminator sichtbar gemacht werden.

VII.2.6 Elution von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Die Aufreinigung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen erfolgte bei Fragmenten, die kleiner als 500 kb waren, mit Hilfe des QIAEX II Gel Extraction Kit. Größere Fragmente wurden mittels Dialyse aus dem Gel eluiert. Dazu wurde das Gelstück, das die DNA enthielt, in einen mit TBE befüllten Dialyseschlauch eingebracht und in einer Elektrophoresekammer für eine Stunde bei 100 Volt eluiert. Um eventuell am Dialyseschlauch anhaftende DNA in Lösung zu bringen, wurde danach für zwei Minuten bei umgekehrter Polarität dialysiert. Anschließend wurde die DNA-Lösung aus dem Dialyseschlauch in ein Reaktionsgefäß überführt und mittels Phenol-Chloroform-Extraktion und Ethanolfällung aufgereinigt (VII.2.2).

VII.2.7 Ligation von DNA

Zur Verknüpfung kompatibler überhängender oder stumpfer DNA-Enden wurde die DNA-Ligase des Bakteriophagen T4 verwendet. Diese verknüpft benachbarte 3'-Hydroxyl- und 5'-Phosphatenden unter Spaltung von ATP. Zur Ligation wurden geeignete Mengen von Vektor und Fragment (das molare Verhältnis sollte 1:3 betragen) in einem Gesamtvolumen von 20 µl in Ligasepuffer mit 1 U T4-DNA-Ligase versetzt und über Nacht bei 16°C inkubiert. Als Negativkontrolle wurde ein Ansatz ohne Zugabe des Insertionsfragmentes mitgeführt.

VII.2.8 Transformation von DNA in Bakterien

Zum Einbringen von Plasmid-DNA in Bakterien wurden 5 µl des Ligationsansatzes zunächst mit 100 µl eines kompetenten DH5α- oder TOP10-Bakterienstammes für 20 Minuten auf Eis inkubiert. Die Transformation der DNA erfolgte dann durch Hitzeschock für 70 Sekunden bei 42°C. Anschließend wurden 400 µl LB-Medium zugefügt und für eine Stunde bei 37°C geschüttelt. 200 µl dieser Bakteriensuspension wurden dann auf antibiotikahaltige Agarplatten ausgestrichen, die nur das Wachstum derjenigen Bakterien erlaubten, die das Plasmid mit dem Antibiotikaresistenzgen aufgenommen hatten.

VII.2.9 Plasmid-DNA-Präparation

Zur Überprüfung von Bakterienklonen wurde die DNA aus einer 3 ml Kultur präpariert (DNA-Minipräparation), bei Bedarf an größeren Mengen wurde die DNA aus einer 500 ml Kultur gewonnen (DNA-Maxipräparation). Für die DNA-Minipräparation wurden die Bakterien durch eine hyperosmolare Lösung lysiert (Sambrook *et al.*, 1989) und die DNA nach Ausfällung der Proteine mit Hilfe einer Tris-gesättigten Phenol/Chloroform-Mischung extrahiert. Anschließend wurde die DNA in Ethanol gefällt, mit 70 %igem Ethanol gewaschen und schließlich in TE-Puffer (10 mM Tris-HCl, pH 7,5; 1 mM EDTA) aufgenommen. Die DNA-Maxipräparation wurde mit dem Plasmid Maxi Kit durchgeführt. Dabei erfolgte die Aufreinigung der DNA über Säulenchromatographie.

VII.2.10 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Zum Amplifizieren von DNA-Fragmenten für die Klonierung wurde das Proof Start PCR Kit verwendet. Die darin enthaltene Proof Start DNA-Polymerase stammt ursprünglich aus einer hyperthermophilen *Pyrococcus*-Spezies und besitzt eine 3'-5'-Exonuklease-Aktivität, die dafür sorgt, dass falsch eingebaute Desoxynukleotide erkannt und entfernt werden. Das PCR-Programm bestand dabei aus folgenden Schritten: zunächst wurde für fünf Minuten auf 95°C erhitzt, um die Proof Start DNA-Polymerase zu aktivieren; anschließend folgten 40 Zyklen, die jeweils aus den folgenden drei Schritten bestanden:

- 0,5-1 min bei 94°C (initiale Denaturierung der DNA-Matrize)
- 0,5-1 min bei 5°C unterhalb der Schmelztemperatur der Primer (Annealing; Hybridisierung der Primer an die DNA-Matrize)
- 0,5-1 min bei 72°C (Extension; Synthese des komplementären DNA-Stranges)

Abschließend erfolgte ein weiterer zehnminütiger Schritt bei 72°C, um unvollständig synthetisierte DNA-Fragmente aufzufüllen. Die Anzahl der Zyklen sowie die Zeiten für die einzelnen Schritte und die Annealing-Temperatur wurden je nach Experiment variiert.

Die PCR wurde in 50 µl-Ansätzen im iCycler durchgeführt. Die Primer wurden dabei in einer Konzentration von 1 µM eingesetzt. Im Anschluss an die PCR wurden die Produkte mit dem QiaQuick PCR Purification Kit über Säulenchromatographie aufgereinigt.

VII.2.11 Photometrische Quantifizierung von Nukleinsäuren

Die Konzentrationsbestimmung von DNA und RNA erfolgte durch Messung der optischen Dichte (OD) bei einer Wellenlänge von 260 nm im Photometer. Die Proben sollten dabei so verdünnt werden, dass die gemessenen Extinktionen zwischen 0,1 und 1 liegen. Somit ist das Lambert-Beer'sche Gesetz erfüllt und es besteht eine direkte Proportionalität zwischen OD und Konzentration der Lösung. Eine OD von 1 entspricht dabei einer Konzentration von 50 µg/ml doppelsträngiger DNA bzw. 40 µg/ml RNA. Durch zusätzliche Messung der OD bei einer Wellenlänge von 280 nm lassen sich eventuelle Verunreinigungen feststellen. Dabei sollte der Quotient aus $OD_{260}:OD_{280}$ mindestens 1,8 betragen.

VII.2.12 Arbeitsbedingungen beim Arbeiten mit RNA

Um bei Arbeiten mit RNA einer Kontamination mit RNasen vorzubeugen, wurden folgende Schutzmaßnahmen getroffen:

- Hitzebehandlung aller Gefäße und Materialien, die mit RNA in Berührung kamen
- Gebrauch von RNase-freien Artikeln
- Tragen von Handschuhen
- Ansetzen aller benötigten Puffer und Lösungen mit DEPC-H₂O

VII.2.13 Isolierung von RNA aus Zellen

Die Isolierung von Gesamt-RNA aus Zellen erfolgte nach der Methode von Chomczynski und Sacchi (Chomczynski und Sacchi, 1987). Nach Absaugen des Inkubationsmediums wurden die Zellen dabei zunächst in GIT-Puffer (4 M Guanidiniumisothiocyanat; 2 mM Natriumcitrat, pH 7,0; 0,5 % Laurylsarcosin; 0,1 M β-Mercaptoethanol, frisch zugegeben) lysiert. Dann wurden 0,1 Volumeneinheiten Natriumacetat (pH 4,0) und 1 Volumen saures, wassergesättigtes Phenol zugegeben und kräftig gemischt. Anschließend wurden 0,2 Volumenanteile einer

Chloroform/Isoamylalkohol-Mischung (24:1) hinzugefügt und nach erneutem kräftigem Mischen 15 Minuten auf Eis inkubiert. Nach 20-minütiger Zentrifugation bei 20.000 x g und 4°C wurde die obere, wässrige Phase von der unteren organischen Phase und der proteinhaltigen Interphase abgetrennt; die RNA wurde dann durch Zugabe von 1 ml eiskaltem Isopropanol und mindestens einstündiger Lagerung bei -20°C präzipitiert.

Durch 20-minütige Zentrifugation bei 20.000 x g und 4°C wurde die RNA pelletiert, der Überstand entfernt und die RNA mit 80 %igem Ethanol gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation (10 min; 20.000 x g; 4°C) wurde der Überstand verworfen und das Pellet getrocknet. Die RNA wurde schließlich in DEPC-Wasser aufgenommen.

VII.2.14 RNase-Verdauungsschutzanalyse

Die RNase-Verdauungsschutzanalyse (Lee und Costlow, 1987; Zinn *et al.*, 1983) dient zum Nachweis einer bestimmten mRNA aus einem Gemisch von RNAs. Dazu werden spezifische, radioaktiv markierte antisense-RNA-Sonden verwendet. Diese Sonden werden mit der Gesamt-RNA hybridisiert. Anschließend wird ein RNase-Verdau durchgeführt. Nur die RNAs, die mit den Sonden ein Hybrid gebildet haben, werden dabei vor dem Abbau geschützt. Nach Aufreinigung der Reaktionsprodukte werden diese gelelektrophoretisch aufgetrennt und mittels Autoradiographie sichtbar gemacht. Zur quantitativen Auswertung wird im gleichen Versuchsansatz die mRNA-Menge eines in der Zelle konstitutiv exprimierten Gens (z.B. β -Aktin) bestimmt, sodass auf diese Werte normiert werden kann.

Die RNase-Verdauungsschutzanalyse wurde durchgeführt wie von Rodriguez-Pascual *et al.* beschrieben (Rodriguez-Pascual *et al.*, 2000).

Zur Herstellung der radioaktiv markierten antisense-Sonden wurden folgende Plasmide eingesetzt:

Plasmid	Restriktions- enzym	RNA- Polymerase	unverdaute Sonde	geschütztes Fragment
pCR-INDNO5A3A-human del Sma I	<i>Not</i> I	T7	471 nt	380 nt
pKs- β aktin-hu-delEco/Nar	<i>Hind</i> III	T7	180 nt	109 nt
pCR-luc-pGl2	<i>Bam</i> HI	T7	306 nt	230 nt

Die Plasmide wurden mit den angegebenen Enzymen linearisiert und unter Verwendung von [α -³²P]-UTP (800Ci/mMol) *in vitro*-transkribiert. Die Transkription erfolgte für mindestens eine Stunde bei 37°C im Wasserbad. Anschließend wurde ein DNase-Verdau durchgeführt (20 U; 30 min; 37°C) und die Sonden wurden über Säulenchromatographie aufgereinigt. Die Radioaktivität der Sonden wurde durch Messung mit einem Szintillationszähler bestimmt.

Jeweils 30 µg der zu untersuchenden RNA wurden mit je 300.000 cpm der radioaktiv markierten Sonde für die RNA und 30.000 cpm einer Sonde für β-Aktin versetzt, durch Ethanolfällung aufgereinigt und anschließend in Hybridisierungspuffer (40 mM PIPES; 1 mM EDTA; 400 mM NaCl; 50 % Formamid) bei 50°C über Nacht hybridisiert. Daraufhin wurde die einzelsträngige RNA, die kein Hybrid gebildet hatte, unter Zugabe von 40 µg/ml RNase A und 2 µg/ml RNase T1 in RNase A/T1-Verdauungspuffer (300 mM NaCl; 10 mM Tris-HCl, pH7,5; 5 mM EDTA) abgebaut. Der Verdau wurde durch Zugabe von SDS abgestoppt und es schloss sich ein Proteinase K-Verdau an. Nach Aufreinigung durch Phenol/Chloroform-Extraktion und Ethanolfällung wurden die Proben zunächst lyophilisiert, dann in Formamid-Probenpuffer (VI.2.4) aufgenommen und schließlich in 6 %igen, denaturierenden Polyacrylamid-Harnstoffgelen (VI.2.4) analysiert. Nach Trocknung der Gele wurden diese auf einen Röntgenfilm oder Phosphoimager-Screen exponiert. Zur densitometrischen Auswertung wurde zunächst von jeder Bande die Hintergrundaktivität abgezogen und die Werte daraufhin auf den dazugehörigen Wert des Haushaltgens (β-Aktin) normiert.

VII.2.15 Quantitative realtime RT-PCR (qRT-PCR)

Die quantitative realtime RT-PCR (Reverse Transkription-Polymerase-Kettenreaktion) ist eine weitere Methode zur Bestimmung der Menge einer spezifischen mRNA in einem Gemisch von RNAs, das aus Zellen isoliert wurde. Dabei wird die eingesetzte RNA zunächst mit Hilfe einer Reversen Transkriptase in cDNA umgeschrieben. In einem zweiten Schritt wird die DNA dann in einer PCR-Reaktion mit Hilfe einer thermostabilen DNA-Polymerase aus *Thermus aquaticus*, der *Taq*-Polymerase, und Zugabe von sequenzspezifischen Primern amplifiziert. Der Einsatz von zweifach markierten, sequenzspezifischen Sonden ermöglicht dabei die Quantifizierung der amplifizierten DNA. Diese Sonden enthalten am 5'-Ende ein Fluorophor (z.B. 6-Carboxyfluorescein (FAM)) und am 3'-Ende einen Quencher (z.B. Carboxytetramethylrhodamin (TAMRA)). Solange sie intakt und an die komplementäre mRNA gebunden sind, wird aufgrund der räumlichen Nähe von Fluorophor und Quencher keine Fluoreszenz emittiert. Während der Extensionsphase der PCR wird die Sonde durch die 5'-3'-Exonuklease-Aktivität der *Taq*-Polymerase gespalten, sodass Fluorophor und Quencher getrennt werden und ein Fluoreszenzsignal messbar ist. Dieses Signal ist direkt proportional zur Menge des akkumulierten PCR-Produkts. Zum Vergleich wird neben der Menge der gesuchten mRNA in einem Parallelansatz auch die Menge der mRNA eines in der Zelle konstitutiv exprimierten Gens (z.B. GAPDH) analysiert.

Die quantitative RT-PCR wurde mit dem QuantiTect Probe RT-PCR Kit durchgeführt. Dazu wurde zunächst für jede zu bestimmende mRNA-Spezies ein Master Mix vorbereitet, der neben den im Kit enthaltenen Puffern und Enzymen die spezifischen Primer in einer Konzentration von 0,4 µM und die Sonde in einer Konzentration von 0,2 µM enthielt. Das Gesamtvolumen pro

Reaktion betrug 25 μ l. Der Master Mix wurde auf Eis in eine optische 96-Loch-PCR-Platte vorgelegt und dann jeweils 5 μ l der zu 0,1 μ g/ μ l verdünnten RNA hinzugefügt. Für jede RNA-Probe wurde neben der Menge der zu bestimmenden mRNA auch die RNA-Menge eines Haushaltgens (z.B. GAPDH) zur Normierung analysiert.

Die PCR wurde im iCycler unter folgenden Bedingungen durchgeführt:

RT	Reverse Transkription	30 min	50°C
PCR	Initialer Aktivierungsschritt	15 min	95°C
	40 Zyklen:		
	Denaturierung	15 sec	94 °C
	Annealing/Extension	60 sec	60°C

Die Fluoreszenzmessung erfolgte jeweils im Annealing/Extension-Schritt. Alle Primer-Sonden-Kombinationen wiesen Effizienzen von 100 % (\pm 10 %) auf. Zur Auswertung der relativen Expressionen wurde die $2^{-[\Delta\Delta C(T)]}$ -Methode angewendet (Livak und Schmittgen, 2001). Dabei wurden die Schwellenwerte (C(T)-Werte) jeder Probe auf den jeweiligen GAPDH-C(T)-Wert normiert. Die Proben aus unbehandelten Zellen wurden als 100 % gesetzt und die anderen Proben jeweils darauf bezogen.

VII.2.16 *In vitro*-mRNA-Degradations-Analyse

Zur Überprüfung der Stabilität einer *in vitro*-transkribierten RNA in Gegenwart von zellulären Proteinextrakten wurden *in vitro*-mRNA-Degradations-Analysen durchgeführt. Dazu wurden Zellextrakte vor oder nach Depletion eines RNA-bindenden Proteins mit *in vitro*-transkribierten, radioaktiv markierten Sonden inkubiert und die Geschwindigkeit des Abbaus der Sonden verglichen.

Die eingesetzten Plasmide enthielten entweder die gesamte iNOS-3'-UTR (pCR-3'-UTR-polyA) oder nur den Teil der iNOS-3'-UTR, in dem sich keine AREs befinden (pCR-nonAU-polyA). Beide Plasmide wurden mit *Eco* ICRI linearisiert und durch Phenol/Chloroform-Extraktion und Ethanol-fällung aufgereinigt. Die *in vitro*-Transkription von „5'-gecappten“ und 3'-polyadenylierten Sonden erfolgte mit dem MessageMachine Kit unter Einsatz von [α - 32 P]-UTP. Nach dem DNase-Verdau (20 U; 30 min; 37°C) wurden die Sonden über Säulenchromatographie aufgereinigt.

Die *in vitro*-mRNA-Degradations-Analyse erfolgte wie von Chen *et al.* beschrieben (Chen *et al.*, 2000). 125 μ g Zytoplasma-Extrakt in Assay-Puffer (1 M Kaliumacetat; 20 mM Magnesiumacetat; 1 μ g Phosphokreatinkinase; 100 mM Kreatinphosphat; 10 mM ATP; 4 mM GTP; 1 mM Spermin; 20 mM DTT) wurden in einem Gesamtvolumen von 125 μ l mit 100.000 cpm der *in vitro*-transkribierten Sonde versetzt und bei 37°C im Wasserbad inkubiert.

Jeweils nach 0, 10, 20 und 30 Minuten wurde ein Fünftel des Gesamtvolumens entnommen und in Gefäße überführt, die den Stop-Puffer (400 mM NaCl; 25 mM Tris-HCl, pH 7,6; 0,1 % SDS; 0,2 M Natriumacetat, pH 4,0; 20 µg tRNA; 20.000 cpm β-Aktin) enthielten. Das radioaktiv markierte, *in vitro*-transkribierte β-Aktin diente dabei zur Normierung der weiteren Aufreinigungsschritte. Die RNA wurde mit Phenol/Chloroform extrahiert, mit Isopropanol gefällt und mit 80 %igem Ethanol gewaschen. Anschließend wurden die Proben lyophilisiert und in 7 µl Formamid-Probenpuffer (VI.2.4) aufgenommen. Nach dem Denaturieren (5 min, 95°C) wurden die Proben in einem 5 %igen, denaturierenden Polyacrylamid-Harnstoffgel (VI.2.4) aufgetrennt. Die Gelelektrophorese erfolgte bei 25 mA für 90 Minuten. Anschließend wurden die Gele in Fixierlösung (10 % Essigsäure und 10 % Methanol) inkubiert, getrocknet und auf einen Phosphoimager-Screen exponiert. Zur Auswertung wurden die Banden auf die jeweiligen β-Aktin-Werte normiert. Der 0-Minuten-Wert jedes Ansatzes wurde als 100 % gesetzt und die restlichen Werte darauf bezogen.

VII.2.17 Streptavidin-Biotin-gekoppelte RNA-Affinitätschromatographie

Zur Identifizierung von Proteinen, die mit der mRNA der iNOS-3'-UTR interagieren, wurde die Streptavidin-Biotin-gekoppelte RNA-Affinitätschromatographie angewendet (Grosset *et al.*, 2000). Dabei wurde eine *in vitro*-transkribierte, biotinylierte Sonde mit Proteinextrakten aus DLD-1-Zellen inkubiert, um die Bindung von RNA-bindenden Proteinen an die RNA-Sonde zu ermöglichen. Anschließend wurde durch die Bindung des Biotins an Streptavidin-Agarose die Sonde mit den gebundenen Proteinen eluiert. Die Interaktion zwischen Biotin und Streptavidin ist sehr spezifisch und die stärkste bekannte, nicht kovalente Bindung. Die Proteine konnten dann in SDS-Polyacrylamidgelen aufgetrennt und mittels MALDI-TOF-(Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation-Time Of Flight-)Analysen identifiziert werden.

Zur Herstellung der biotinylierten sense-RNA-Sonden wurden die Plasmide pCR-iNOS-3'-UTR und pCR-iNOS-3'-UTRnonAU mit *Bam* HI linearisiert, aufgereinigt und mit dem Biotin RNA Labeling Mix *in vitro*-transkribiert.

Für die Affinitätsaufreinigung wurden zunächst 200 mg zytoplasmatische Proteine mit 3 ml Streptavidin-Agarose in 50 ml Bindepuffer (10 mM HEPES, pH 7,9; 3 mM MgCl₂; 5 mM EDTA, pH 8,0; 2 mM DTT; 5 % Glycerin; 0,5 % NP-40; 3 mg/ml Heparin; 0,5 mg/ml t-RNA) mit 40 mM KCl durch dreistündiges Schütteln bei 4°C vorgeklärt. Nach Zentrifugation (1.500 x g; 10 min; 4°C) wurde der Überstand mit 600 µg biotinylierter RNA versetzt und zwei Stunden bei 4°C geschüttelt. Anschließend wurden 3 ml Streptavidin-Agarose zugegeben und erneut für zwei Stunden bei 4°C inkubiert. Nach Zentrifugation (1.500 x g; 10 min; 4°C) wurde das Pellet dreimal mit Bindepuffer mit 40 mM KCl und zweimal mit Bindepuffer mit 300 mM KCl gewaschen. Die isolierten Proteine wurden schließlich durch 20-minütige Inkubation des Pellets mit Elutionspuffer (10 mM HEPES pH 7,9; 3 mM MgCl₂; 5 mM EDTA,

pH 8,0; 2 mM DTT; 5 % Glycerin; 2 M KCl) von der Streptavidin-Agarose gelöst und in SDS-Polyacrylamid-Gelen elektrophoretisch aufgetrennt. Die Gele wurden dann mit Coomassie-Färbelösung angefärbt, die Banden ausgeschnitten und die Proteine mit MALDI-TOF-Analysen (Toplab, München) identifiziert. Außerdem wurde die eluierte Fraktion in Western-Blot-Analysen überprüft. Für Bindungsanalysen von Proteinen an die iNOS-3'-UTR zum Vergleich von unbehandelten und Zytokin-stimulierten Zellen wurde der Versuch mit 1/10 der oben beschriebenen Mengen und Volumina durchgeführt.

VII.2.18 Luciferase-Reporter-Gen-Assay

Der Luciferase-Reporter-Gen-Assay wurde zur Untersuchung der Promotoraktivität verwendet. Da humane Zellen nicht über ein endogenes Luciferase-Gen verfügen, ist die Luciferase, wenn ihre Expression unter die Kontrolle eines zu untersuchenden Promotors gestellt wird, ein ideales Reporterprotein für die Analyse der Promotoraktivität (Inouye und Shimomura, 1997). Die Luciferase ist eine Oxygenase, die in Gegenwart der Cofaktoren ATP, Mg^{2+} und Coenzym A ihr Substrat Luciferin mit molekularem Sauerstoff zu Oxyluciferin oxidiert. Das bei der Reaktion emittierte Licht kann unter Zuhilfenahme eines Luminometers quantifiziert werden.

Zur Überprüfung der iNOS-Promotoraktivität wurden transiente Transfektionen mit einem Plasmid durchgeführt, das ein 16 kb-Fragment des iNOS-Promotors vor einem Luciferase-Reporter-Gen enthielt (pXP2-16kb). Zur Kontrolle der Transfektionseffizienz wurde jeweils das Renilla-Luciferase-Gen unter der Kontrolle des EF-1 α -Promotors (pRL-EF1 α) cotransfiziert. Die Transfektionen erfolgten wie beschrieben (VII.1.5). Nach 24-stündiger Inkubation bei 37°C und 5 % CO₂ erfolgte die Stimulation der iNOS-Expression wie beschrieben (VII.1.4). Nach sechs Stunden wurden die Zellen durch Zugabe von 200 μ l PLB (Passive Lysis Buffer) pro Loch lysiert und 15 Minuten bei 20.000 x g zentrifugiert. Vom Überstand wurden je 20 μ l zur Messung der Luciferase- und Renilla-Luciferase-Aktivität in eine 96-Loch-Platte pipettiert. Die Messung erfolgte mit einem Platten-Luminometer nach automatischer Injektion von jeweils 100 μ l der Luciferase-Substrat-Lösung (25 mM D-Luciferin; 27 μ M Coenzym A; 100 mM ATP; 30 mM Tricin, pH 7,8; 0,1 mM EDTA; 15 mM MgSO₄; 10 mM DTT) bzw. der Renilla-Substrat-Lösung (0,1 M NaCl; 25 mM Tris-HCl pH 7,5; 1 mM CaCl₂; 0,9 μ M Coelenterazin). Die Hintergrundaktivität wurde durch Messung eines Leerwertes, der nur den Lysepuffer enthielt, bestimmt. Zur Normierung wurden dann die jeweiligen Luciferase-Aktivitäten auf die Renilla-Aktivitäten bezogen.

VII.3 Proteinbiochemische Arbeitsmethoden

VII.3.1 Gewinnung von Proteinextrakten aus Zellen

Zur Proteinextraktion wurden DLD-1-Zellen in Ø 14 cm-Zellkulturschalen ausgesät und die iNOS-Expression induziert wie beschrieben (VII.1.4).

Zur Gewinnung von Gesamtzellextrakten wurden die Zellen zunächst mit eiskaltem PBS gewaschen und anschließend in 400 µl RIPA-Puffer (VI.2.5) pro Zellkulturschale lysiert und 30 Minuten bei 4°C geschüttelt. Zum Homogenisieren wurde das Lysat daraufhin 20-mal durch eine 0,7 x 30 mm Kanüle gezogen und schließlich bei 20.000 x g und 4°C für 15 Minuten abzentrifugiert. Das Pellet der Zentrifugation wurde verworfen und der Überstand bei -70°C gelagert.

Die Gewinnung von Zytoplasma- und Kernextrakten erfolgte nach der von Dignam beschriebenen Methode (Dignam *et al.*, 1983). Dazu wurden die Zellen in PBS abgeschabt, bei 1.000 x g und 4°C zehn Minuten zentrifugiert und in 2 ml PBS pro Zellkulturschale aufgenommen. Dann wurde die Zellzahl mit Hilfe der Neubauer Zählkammer ermittelt, die Zellen erneut zentrifugiert und pro 10⁷ Zellen in 200 µl Mix I (VI.2.5) aufgenommen. Das Lysat wurde dann 30 Minuten bei 4°C geschüttelt und anschließend zum Homogenisieren 20-mal durch eine Spritze mit einer 0,7 x 30 mm Kanüle gezogen. Nach Zentrifugation (15 min; 20.000 x g; 4°C) wurde der Überstand, der die zytoplasmatischen Proteine enthielt, mit 20 % Glycerin versetzt und bei -70°C gelagert. Das Pellet wurde in 50 µl Mix II (VI.2.5) aufgenommen und erneut 15 Minuten bei 4°C geschüttelt. Dann wurde wiederum abzentrifugiert (15 min; 20.000 x g; 4°C) und der Überstand, der die Kernproteine enthielt, in einem neuen Gefäß mit 250 µl Puffer D (VI.2.5) versetzt und bei -70°C gelagert.

VII.3.2 Photometrische Konzentrationsbestimmung von Proteinen

Die Bestimmung der Proteinkonzentration von Zytoplasma- und Kernextrakten erfolgte mittels Bradford-Analyse (Bradford, 1976; Redinbaugh und Campbell, 1985; Sedmak und Grossberg, 1977). Das Absorptionsmaximum des im Bradford-Reagenz enthaltenen Farbstoffs verschiebt sich durch Bindung an Proteine von 465 nm nach 595 nm. Die bei einer Wellenlänge von 595 nm gemessenen Extinktionen sind somit der Proteinkonzentration proportional. Zur Messung wurden je 10 µl Proteinextrakt mit 90 µl Wasser und 100 µl einer 40 %igen Bradford-Lösung versetzt und die Extinktion bei 595 nm im Photometer im Vergleich mit einer Standardkurve (0-6 µg BSA) gemessen.

Die Konzentrationsbestimmung von mit RIPA-Puffer lysierten Zellextrakten erfolgte mittels BCA-(„Bicinchoninic Acid“-)Assay, da die relativ hohe Detergenz-Konzentration des RIPA-Puffers bei der Bradford-Analyse stört. Grundlage des BCA-Assay (Smith *et al.*, 1985) ist die Biuret-Reaktion (Wiechelman *et al.*, 1988). In alkalischer Lösung bilden Stoffe, die mindestens zwei Peptidbindungen enthalten, mit Cu²⁺-Ionen einen violetten Farbkomplex. Die Intensität der

Violett-färbung ist der Anzahl der Peptidbindungen und somit der Proteinkonzentration proportional. Zur Messung wurden 10 µl jeder Probe mit 200 µl einer Mischung aus einem Teil CuSO₄-Lösung und 49 Teilen BCA-Lösung versetzt und 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde die Extinktion bei einer Wellenlänge von 540 nm im Photometer gemessen. Die Proteinkonzentrationen der untersuchten Proben wurden durch Extinktionsvergleich mit einer Eichgeraden ermittelt.

VII.3.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Zur Identifizierung von Proteinen wurde die eindimensionale SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) nach Laemmli (Laemmli, 1970) angewendet. Durch das im Gel enthaltene SDS werden die Proteine denaturiert und proportional zu ihrem Molekulargewicht negativ geladen. Somit ist die Wanderungsgeschwindigkeit der Proteine im elektrischen Feld zu ihrem Molekulargewicht und der Porengröße des Gels proportional. Für die Gelelektrophorese wurde das Mini-Protean-System 3 der Firma Biorad verwendet. Dabei kamen Gelsysteme bestehend aus Trenn- und Sammelgel zum Einsatz.

	7,5% Trenngellösung	10% Trenngellösung
H ₂ O	7,2 ml	5,95 ml
1,5 M Tris-HCl, pH 8,8	3,75 ml	3,75 ml
10 % SDS	150 µl	150 µl
Acrylamidlösung (29 % Acrylamid, 1 % Bisacrylamid)	3,75 ml	5 ml
TEMED	10 µl	10 µl
10 % APS	100 µl	100 µl

	4 % Sammelgellösung
H ₂ O	6,1 ml
0,5 M Tris-HCl, pH 6,8	2,5 ml
10 % SDS	100µl
Acrylamidlösung (29 % Acrylamid, 1 % Bisacrylamid)	1,3 ml
TEMED	13 µl
10 % APS	66 µl

Das Trenngel enthielt je nach Molekulargewicht des zu detektierenden Proteins unterschiedliche Polyacrylamidkonzentrationen (7,5 % oder 10 %). Das Sammelgel bestand immer aus 4 % Acrylamid. Aufgrund der unterschiedlichen Vernetzungsgrade von Trenn- und Sammelgel sowie des pH-Sprungs werden die Proteine beim Übergang in das Trenngel konzentriert. Das Trenngel wurde nach dem Gießen mit n-Butanol überschichtet, um einen frühzeitigen

Polymerisationsabbruch an der Oberfläche zu vermeiden. Vor dem Gießen des Sammelgels wurde das n-Butanol abgegossen und Reste durch Spülen mit Wasser entfernt.

Die Gelelektrophorese erfolgte unter Verwendung von 1x Laufpuffer bei einer konstanten Spannung von 200 Volt. Als Größenstandard diente ein Proteinmarker.

VII.3.4 Western-Blot-Analyse

Die Western-Blot-Analyse dient zum Nachweis bestimmter Proteine aus einem Proteingemisch mit Hilfe von spezifischen Antikörpern (Burnette, 1981; Towbin *et al.*, 1992). Dabei werden gelelektrophoretisch aufgetrennte Proteine in einem vertikal zur Oberfläche angelegten elektrischen Feld aus dem Gel auf eine Nitrocellulose-Membran transferiert. Nach dem Transfer wird das Protein mit Hilfe von spezifischen Antikörpern (Primärantikörpern) detektiert. Entstandene Antigen-Antikörper-Komplexe werden dann mittels eines Enzym-gekoppelten Sekundärantikörpers, der gegen das Fc-Fragment des Primärantikörpers gerichtet ist, sichtbar gemacht. Durch die gekoppelten Enzyme können vorher undetektierbare Substrate in eine nachweisbare Form umgewandelt werden.

Für die Western-Blot-Analyse wurden die SDS-Gele nach Beendigung der Elektrophorese zunächst 15 Minuten in Transferpuffer (25 mM Tris-HCl, pH 8,3; 960 mM Glycin; 20 % Methanol) äquilibriert, bevor die Proteine mit Hilfe eines Semidry-Blot-Systems auf eine Nitrocellulosemembran übertragen wurden. Dazu wurden auf die Anodenplatte drei Whatman 3 MM Papiere aufeinandergeschichtet, gefolgt von der in Transferpuffer äquilibrierten Nitrocellulosemembran. Darauf folgte das Polyacrylamidgel, auf das wiederum drei Whatman 3 MM Papiere geschichtet wurden. Der Transfer erfolgte für 60 Minuten bei 12 Volt. Danach wurde die Nitrocellulosemembran zum Überprüfen der Transfereffizienz in Ponceau S-Lösung angefärbt und anschließend durch Spülen mit Wasser wieder entfärbt. Die Membran wurde dann für eine Stunde im jeweiligen Blockierpuffer (VI.2.7) inkubiert, um unspezifische Bindungsstellen abzusättigen und später die Antikörperbindung nur an spezifische Bindungsstellen zu ermöglichen. Anschließend wurde die Membran dreimal mit Waschpuffer (0,1 % Tween-20 in TBS) gewaschen, bevor der erste Antikörper im jeweiligen Verdünnungspuffer (VI.2.7) hinzugegeben wurde. Der Blot wurde mit dem Antikörper über Nacht bei 4°C geschüttelt. Daraufhin wurde erneut mit Waschpuffer gewaschen, bevor die Inkubation mit dem entsprechenden Peroxidase-gekoppelten Sekundärantikörper (1:10.000 in Blockierpuffer) für eine Stunde bei Raumtemperatur erfolgte. Nach erneutem Waschen mit Waschpuffer und TBS wurde der Blot schließlich mit Hilfe des ECL-Systems (Western Lightning Chemiluminescence Reagent Plus, Perkin Elmer) detektiert. Die dabei entstandene Chemilumineszenz konnte auf einen Röntgenfilm übertragen werden.

VII.3.5 Bakterielle Expression und Aufreinigung von GST-Fusionsproteinen

Zur bakteriellen Expression von GST-Fusionsproteinen wurde der Vektor pGEX-2T eingesetzt, der eine Ampicillin-Resistenz enthält und für Glutathion-S-Transferase (GST) codiert. Mit Hilfe eines ebenfalls vorhandenen Lac-Operons kann die Synthese der Glutathion-S-Transferase durch IPTG (Isopropyl-(β -)(D-)thiogalactopyranosid) induziert werden. In diesen Vektor wurde die für das aufzureinigende Protein codierende cDNA-Sequenz hinter die für GST codierende Sequenz kloniert, sodass nach der Expression in Bakterien und Induktion mit IPTG das dementsprechende Fusionsprotein gebildet wurde. Das GST-Fusionsprotein konnte dann nach Lyse der Bakterien über Glutathion-Sepharose, die eine hohe Affinität zum GST-Anteil des Proteins besitzt, aufgereinigt werden.

Zur Aufreinigung wurden zunächst DH5 α -Bakterien, die mit den jeweiligen pGEX-2T-Konstrukten transformiert worden waren, in 80 ml LB-Amp-Medium angeimpft und bei 37°C über Nacht auf einem Bakterienschüttler inkubiert (140 RPM). Am nächsten Tag wurden 200 ml LB-Amp-Medium hinzugegeben und so lange weitergeschüttelt, bis eine optische Dichte (OD) von 0,5-0,6 bei einer Wellenlänge von 600 nm erreicht wurde. Anschließend wurden zur Induktion 325 μ l einer IPTG-Lösung (200 mg/ml) zugegeben und für weitere vier Stunden bei 37°C geschüttelt. Daraufhin wurde die Kultur abzentrifugiert (15 min; 6.000 x g; 4°C); der Überstand wurde verworfen und das Bakterienpellet in 15 ml kaltem PBS resuspendiert. Nach wiederholter Zentrifugation (10 min; 500 x g; 4°C) wurde der Überstand verworfen und das Pellet erneut in 15 ml kaltem PBS resuspendiert. Dann wurde die Bakterienzellsuspension viermal für jeweils 15 Sekunden mit Ultraschall behandelt. Zur vollständigen Lyse wurden schließlich 1,6 ml 10 % Triton X-100 (entsprechend 1 % Triton X-100 im Gesamtvolumen) zugegeben und gemischt. Anschließend wurde zentrifugiert (20 min; 500 x g; 4°C) und das Pellet verworfen. Während der Zentrifugation erfolgte die Äquilibration der Glutathion-Sepharose. Dabei wurden 1,3 ml der Suspension zunächst bei 500 x g für fünf Minuten bei 4°C zentrifugiert, dann zweimal mit 10 ml PBS gewaschen und schließlich in 1 ml PBS resuspendiert. Das Lysat wurde daraufhin mit der äquilibrierten Glutathion-Sepharose inkubiert und 30 Minuten bei Raumtemperatur geschüttelt. Anschließend wurde 15 Minuten lang zentrifugiert (500 x g; 4°C). Das Pellet wurde dreimal mit je 5 ml PBS gewaschen. Zur Elution des GST-Fusionsproteins wurden 5 ml Elutionspuffer (10 mM reduziertes Glutathion in 50 mM Tris-HCl, pH 8,0) zugegeben, das Pellet wurde resuspendiert und 20-30 Minuten bei Raumtemperatur sanft geschüttelt. Anschließend wurde zentrifugiert (5 min; 500 x g). Der Überstand, der das aufgereinigte Fusionsprotein enthielt, wurde mit 20 % Glycerin versetzt und bei -70°C gelagert. Der Elutionsschritt wurde noch zweimal wiederholt, sodass insgesamt drei Elutionsfraktionen gewonnen werden konnten. Die Konzentration der aufgereinigten Proteine wurde schließlich durch SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese und anschließende Coomassie-Färbung durch Vergleich der Bandenintensität mit der Intensität definierter BSA-Konzentrationen ermittelt.

VII.3.6 Bakterielle Expression und Aufreinigung von His-Tag-Fusionsproteinen

Zur bakteriellen Expression von His-Tag-Fusionsproteinen wurde die entsprechende DNA-Sequenz zunächst in den pET-15b-Expressionsvektor kloniert. Dieser enthält eine N-terminale His-Tag-Sequenz von sechs aufeinanderfolgenden Histidinen und eine Ampicillin-Resistenz. Die so generierten Konstrukte wurden dann in BL21(DE3)LysS-Bakterien transformiert, die ein T7-RNA-Polymerase-Gen unter der Kontrolle des *lacUV5*-Promotors enthalten und so erst nach Induktion mit IPTG die Synthese des Fusionsproteins erlauben. Des Weiteren trägt dieser Bakterienstamm ein pET-kompatibles Plasmid, das für T7-Lysozym codiert. T7-Lysozym ist ein Inhibitor der T7-RNA-Polymerase, der ohne Induktion die basale Expression des Proteins, für das das pET-Konstrukt codiert, unterdrückt. Außerdem enthält der BL21(DE3)LysS-Bakterienstamm eine Chloramphenicol-Resistenz. Nach Transformation des pET-15b-Konstrukts in die Bakterien und Expression des His-Tag-Fusionsproteins durch Induktion mit IPTG wie unter VII.3.5 beschrieben erfolgte die Aufreinigung des Fusionsproteins mit dem Qiaexpress-System von Qiagen. Dazu wurde das nach der Zentrifugation erhaltene Bakterienpellet zunächst mit Lysepuffer (50 mM NaH₂PO₄; 300 mM NaCl; 10 mM Imidazol) lysiert und anschließend mit Lysozym behandelt. Zum Homogenisieren wurde das Lysat dann durch eine Spritze mit einer 0,7 x 30 mm Kanüle gezogen und sonifiziert. Anschließend wurde bei 10.000 x g für 30 Minuten bei 4°C zentrifugiert und der Überstand mit 1 ml Ni-NTA-(„Nitriloacetic acid“-)Agarose pro 4 ml Lösung versetzt. Dann wurde für eine Stunde bei 4°C geschüttelt, um die Bindung des His-Tag-Proteins an die Ni-NTA-Matrix zu erlauben. Anschließend wurde die Lysat-Ni-NTA-Mischung auf eine Säule gegeben. Nach dem Durchlaufen der Lösung wurde zweimal mit einem Waschpuffer gewaschen, der 20 mM Imidazol enthielt, bevor das His-Tag-Fusionsprotein mit einem Elutionspuffer mit 250 mM Imidazol eluiert werden konnte. Die Konzentration der aufgereinigten Proteine wurde mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese und anschließender Coomassie-Färbung durch Vergleich der Bandenintensität mit der Intensität definierter BSA-Konzentrationen ermittelt.

VII.3.7 UV-Crosslink

Mittels UV-Crosslink-Experimenten können Protein-RNA-Interaktionen analysiert und Bindungsstellen von Proteinen lokalisiert werden (Thomson *et al.*, 1999). Dabei werden rekombinante, aufgereinigte Proteine mit *in vitro*-transkribierten radioaktiv markierten sense-RNA-Sonden inkubiert und mit UV-Licht bestrahlt, was zu einer kovalenten Bindung der Proteine an die RNA führt. Durch einen darauf folgenden RNase-Verdau wird RNA, die nicht durch Protein-RNA-Interaktion geschützt ist, abgebaut. Die Proben werden dann mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese aufgetrennt und durch Autoradiographie sichtbar gemacht.

Zunächst wurden die Plasmide, die Fragmente der iNOS-mRNA enthielten, linearisiert und in Gegenwart von [α - 32 P]-UTP *in vitro*-transkribiert wie unter VII.2.14 beschrieben.

Sonde	Restriktionsenzym	RNA-Polymerase
pCR-iNOS-3'-UTR	<i>Bam</i> HI	T7
pCR-NOSII-5'-UTR	<i>Xho</i> I	T3
pXcmI-ATTTA	<i>Eco</i> RI	T3
pXcmI-nonATTTA	<i>Eco</i> RI	T3
pAUUUA-FragA	<i>Eco</i> RI	T3
pAUUUA-FragB	<i>Eco</i> RI	T3
pAUUUA-FragC	<i>Bam</i> HI	T7
pCR-FragC-mut1	<i>Bam</i> HI	T7
pCR-FragC-mut2	<i>Bam</i> HI	T7
pCR-FragC-mut1+2	<i>Bam</i> HI	T7
pCR-5'-UTR-Ex1	<i>Xho</i> I	T3
pCR-5'-UTR-Ex2	<i>Hind</i> III	T3

Für jede Probe wurden 1.000.000-3.000.000 cpm der Sonde eingesetzt.

Folgender Reaktionsansatz wurde zusammenpipettiert:

Komponente	Volumen
GST-Fusionsprotein	maximal 10 μ l
10 mg/ml BSA	2,4 μ l
Cyt-10-Puffer	2 μ l
40 mM DTT	1 μ l
60 mg/ml Heparin	1 μ l
10 mg/ml t-RNA	1 μ l
10 % NP-40	1 μ l
RNA-Sonde	x μ l
DEPC-Wasser	y μ l
Gesamtvolumen	20 μ l

Der Cyt-10-Puffer bestand aus 80 mM HEPES (pH 7,9), 27 mM MgCl₂, 380 mM KCl und 500 mM EDTA.

Als Negativkontrolle wurde aufgereinigtes GST oder BSA eingesetzt.

Die Ansätze wurden für 20 Minuten bei 37°C im Wasserbad inkubiert, um die Bindungsreaktion zwischen RNA und Protein zu ermöglichen. Daraufhin wurden die Proben auf Eis im UV-

Crosslinker bei 125 mJ für 30 Minuten mit UV-Licht bestrahlt. Anschließend erfolgte der RNase-Verdau (30 min, 30°C) durch Zugabe von 4 µl Verdauungs-Mix (2 µl RNase A (10 µg/µl) und 0,2 µl RNase T1 (100 U/µl) in RNase A/T1-Puffer (300 mM NaCl; 10 mM Tris-HCl, pH 7,5; 5 mM EDTA)). Schließlich wurden zu jeder Probe 6 µl 5x Laemmli-Auftragungspuffer hinzugefügt. Die Proben wurden dann bei 80°C zehn Minuten lang denaturiert und in SDS-Polyacrylamidgelen elektrophoretisch aufgetrennt. Die Gele wurden anschließend getrocknet und auf einen Röntgenfilm oder Phosphoimager-Screen exponiert.

VII.3.8 Immunpräzipitation von Proteinen

Interaktionen verschiedener Proteine untereinander wurden mit Co-Immunpräzipitations-Analysen überprüft. Dazu wird dem Zelllysate ein spezifischer Antikörper zugesetzt, der das zu untersuchende Protein bindet. Anschließend wird Protein A (bei Fällung mit polyklonalem Antikörper) oder Protein G (bei Präzipitation mit monoklonalem Antikörper) zugegeben, das durch Bindung an Agarose immobilisiert ist. Die Immunkomplexe werden an Protein A bzw. G gebunden und können durch Zentrifugation pelletiert werden. Proteine, die mit dem zu untersuchenden Protein assoziiert sind, werden auf diese Weise copräzipitiert und können anschließend mittels Western-Blot-Analysen untersucht werden.

Um auszuschließen, dass Proteine indirekt über Bindung an eine gemeinsame RNA aufgereinigt werden, wurde zunächst ein RNase-Verdau durchgeführt. Dazu wurde 1 mg des Extrakts, der später für die Immunpräzipitation eingesetzt wurde, mit 40 µg RNase A und 500 U RNase T1 behandelt und 30 Minuten bei 30°C inkubiert. Anschließend wurde der Extrakt in einem Gesamtvolumen von 500 µl in RIPA-Puffer (VI.2.5) mit 20 µl Protein A- oder G-Agarose versetzt und eine Stunde lang vorgeklärt. Nach Zentrifugation (5 min; 1.200 x g; 4°C) wurde der Überstand mit dem jeweiligen Antikörper (1:100) versetzt und über Nacht bei 4°C geschüttelt. Am nächsten Tag wurden 50 µl Protein A- oder G-Agarose zugegeben und es wurde mindestens fünf Stunden lang bei 4°C geschüttelt. Nach dreimaligem Waschen mit RIPA-Puffer wurden die präzipitierten Proteine in Laemmli-Puffer aufgenommen und durch zehnmütiges Erhitzen auf 85°C von der Agarose gelöst. Der Erfolg der Immunpräzipitation sowie die Identität copräzipitierter Proteine wurden anschließend mit Western-Blot-Analysen überprüft.

VII.3.9 Immunpräzipitations-qRT-PCR-Assay

Zur Untersuchung der Bindung von Proteinen an endogene mRNA wurden Immunpräzipitations-qRT-PCR-Analysen durchgeführt. Dabei wurden unter Zusatz von RNase-Inhibitoren gewonnene Proteinextrakte mit einem Antikörper gegen das entsprechende Protein immunpräzipitiert und anschließend die mitpräzipitierte mRNA in qRT-PCR-Analysen quantifiziert. Als Negativkontrolle dienten Immunpräzipitationen mit einem IgG-Antikörper. Diese Methode ermöglichte einen relativen Vergleich der intrazellulären Bindung verschiedener RNA-bindender Proteine unter Kontrollbedingungen und nach Zytokin-Stimulation.

Zur Gewinnung der Proteinextrakte wurden DLD-1-Zellen in Ø 14 cm-Zellkulturschalen ausgesät und die iNOS-Expression für vier Stunden mit Zytokinen induziert wie beschrieben (VII.1.4). Die Lyse der Zellen erfolgte unter Zugabe von 400 µl Lysepuffer (10 mM HEPES pH 7,9; 1,5 mM MgCl₂; 10 mM KCl; 0,5 mM DTT; 0,1 % NP-40; 50 mM NaF; 10 mM Na₃VO₄; 10 mM Natriumpyrophosphat; 50 mM β-Glycerophosphat; 10 nM Okadaische Säure; 0,2 % VRC; 100 U/ml RNasin und 1/25 v/v Protease-Inhibitor-Cocktail) pro Zellkulturschale. Das Lysat wurde 30 Minuten bei 4°C geschüttelt, durch Aufziehen in einer Spritze mit einer 0,7 x 30 mm Kanüle homogenisiert und schließlich bei 20.000 x g und 4°C zehn Minuten lang zentrifugiert. Im Überstand wurde anschließend die Proteinkonzentration bestimmt.

Für die Immunpräzipitation wurden zunächst 50 µl Protein A/G plus-Agarose in 475 µl NT-2-Puffer (50 mM Tris-HCl, pH 7,4; 150 mM NaCl; 1 mM MgCl₂; 0,05 % NP-40), 200 µg t-RNA und 0,5 mg/ml Heparin mit 5 µl spezifischem Antikörper über Nacht bei 4°C inkubiert. Am nächsten Tag wurde einmal mit NT-2-Puffer gewaschen, dann wurden 1,5 mg des zuvor mit 20 µl Protein A/G plus-Agarose vorgeklärten Extrakts (in einem Gesamtvolumen von 500 µl in NT-2-Puffer mit 50 mM NaF; 10 mM Na₃VO₄; 10 mM Natriumpyrophosphat; 50 mM β-Glycerophosphat; 10 nM Okadaische Säure; 0,2 % VRC; 100 U/ml RNasin und 1/25 v/v Protease-Inhibitor-Cocktail) zugegeben. Außerdem wurden 1 mM DTT und 15 mM EDTA zugefügt. Das EDTA sorgte dabei durch Entzug der Mg²⁺-Ionen für eine Freisetzung der RNA von den Ribosomen, sodass diese besser für Bindungen verfügbar war (Tenenbaum *et al.*, 2002). Die Mischung wurde für mindestens drei Stunden bei 4°C geschüttelt, dann wurde zentrifugiert (5 min; 1.200 x g; 4°C) und das Pellet viermal mit NT-2-Puffer, der 0,2 % VRC enthielt, gewaschen. Anschließend wurde das Pellet in 100 µl NT-2-Puffer mit 0,1 % SDS und 0,5 mg/ml Proteinase K aufgenommen und die Proteine für 15 Minuten bei 55°C verdaut. Zur Normierung wurde vor der RNA-Aufreinigung 1 ng *in vitro*-transkribierte Luciferase (Plasmid pGl3-T7-basic) zugegeben. Die RNA wurde dann über Säulenchromatographie mit dem RNeasy MinElute Cleanup Kit aufgereinigt.

Anschließend wurde mittels qRT-PCR-Analysen die gebundene Menge an iNOS-mRNA und die Menge der Luciferase-mRNA bestimmt. Zur Auswertung wurde zunächst auf den jeweiligen Luciferase-C(T)-Wert bezogen und anschließend der durch Immunpräzipitation mit einem IgG-Antikörper ermittelte Hintergrundwert subtrahiert.

VII.3.10 Immunfluoreszenzfärbung

Für die Immunfluoreszenz-Analysen zur Überprüfung der Lokalisation von Proteinen wurden die Zellen auf sterile Deckgläschen in 6-Loch-Platten ausgesät und die Expression der iNOS induziert wie beschrieben (VII.1.4). Nach vierstündiger Zytokin-Inkubation wurden die Zellen mit PBS gewaschen und anschließend durch Zugabe von 4 %igem Paraformaldehyd in PBS bei Raumtemperatur 15 Minuten lang fixiert. Anschließend wurde mit PBS rehydriert und unspezifische Bindungsstellen durch Zugabe von 1 % BSA in PBS geblockt. Dann wurde zweimal mit PBS gewaschen, bevor die Inkubation mit dem ersten Antikörper erfolgte. Dazu wurden 100 µl des 1:50 verdünnten Primärantikörpers in Blockierpuffer für eine Stunde direkt auf das Deckglas gegeben. Nach erneutem Waschen mit PBS wurde eine 1:200-Verdünnung des fluoreszenzmarkierten Sekundärantikörpers in Blockierpuffer auf das Deckglas gegeben und eine Stunde lang bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Danach wurde dreimal mit PBS gewaschen und zur Anfärbung der Zellkerne eine Minute lang mit 2 µl DAPI-Lösung (1 mg/ml DAPI in Methanol) im Dunkeln inkubiert. Nach erneutem Waschen mit PBS wurde das Deckglas auf einen Objektträger aufgebracht und die emittierte Fluoreszenz mit einem Fluoreszenzmikroskop analysiert.

VII.4 Statistik

Statistische Auswertungen erfolgten mittels faktorieller ANOVA (analysis of variance), gefolgt von Fisher's PLSD-(protected least significant difference-)Test. Sie wurden mit dem Computer-Programm StatView (ABACUS) durchgeführt. $p < 0,05$ wurde als signifikant betrachtet. Die Berechnung von Halbwertszeiten erfolgte mit Hilfe des Programms Graphpad Prism (Graphpad Software).

VIII Ergebnisse

VIII.1 Wege der post-transkriptionellen Regulation der humanen iNOS-Expression

Die Expression der induzierbaren NO-Synthase (iNOS) in humanen Zellen wird durch Behandlung mit inflammatorischen Stimuli wie Zytokinen oder Lipopolysaccharid (LPS) erreicht (Kleinert *et al.*, 2004). Während unter Basalbedingungen keine iNOS-mRNA- und iNOS-Proteinexpression detektierbar ist, weist der iNOS-Promotor bereits eine messbare Aktivität auf, die nach der Stimulation nur noch um das Zwei- bis Fünffache gesteigert werden kann (Förstermann *et al.*, 2003; Kleinert *et al.*, 2004). Die iNOS-mRNA- und -Proteinexpression ist nach Zytokinbehandlung jedoch um ein Vielfaches davon erhöht, sodass die Induktion der iNOS-Expression nicht allein durch eine Steigerung der Transkriptionsrate erklärt werden kann. Frühere Studien unserer Arbeitsgruppe zeigten bereits eine Beteiligung der 3'-untranslatierten Region der iNOS-mRNA und des RNA-bindenden Proteins HuR an der post-transkriptionellen Regulation der iNOS-Expression durch Modulation der mRNA-Stabilität (Rodriguez-Pascual *et al.*, 2000). Im Folgenden sollte nun der Mechanismus der post-transkriptionellen Regulation der iNOS-Expression weiterführend untersucht werden.

VIII.1.1 Einfluss der Hemmung der Translation durch Cycloheximid

Zunächst wurde der Einfluss von kurzlebigen, labilen Proteinen auf die Regulation der iNOS-Expression durch Hemmung der Translation mit Cycloheximid (CHX) untersucht. Diese Studien wurden in humanen Alveolarepithel-Karzinomzellen (A549/8) durchgeführt, die stabil mit einem Konstrukt transfiziert worden waren, das ein 16 kb-Fragment des humanen iNOS-Promotors vor einem Luciferase-Reportergen enthielt (A549/8-16kb). Auf diese Weise konnten die Aktivität des transfizierten iNOS-Promotors durch Messung der Luciferase-Expression und die endogene iNOS-mRNA-Expression getrennt voneinander betrachtet werden. Die Zellen wurden nach 18-stündiger Inkubation in Serum-freiem Medium zunächst eine Stunde lang entweder in DMSO oder in CHX (1 oder 10 µg/ml in DMSO) vorinkubiert, bevor die iNOS-Expression durch Zugabe eines Zytokingemisches (CM), bestehend aus TNF- α (10 ng/ml), IFN- γ (100 U/ml) und IL-1 β (50 U/ml) (VII.1.4), für sechs Stunden stimuliert wurde. Nach dieser Inkubationszeit ist eine maximale Expression der iNOS-mRNA zu erwarten. Kontrollzellen wurden sechs Stunden lang in Serum-freiem Medium ohne Zytokine inkubiert (Co). Anschließend wurde RNA isoliert (VII.2.13) und RNase-Verdauungsschutzanalysen mit Sonden gegen die iNOS- und Luciferase-mRNA durchgeführt (VII.2.14). Zur Auswertung wurde jeweils die iNOS- bzw. Luciferase-mRNA-Expression in Zytokin-stimulierten Zellen, die nicht mit CHX behandelt wurden, als 100 % gesetzt. In Kontrollzellen ohne Zytokinbehandlung ist kaum eine iNOS-mRNA-Expression erkennbar, während die Luciferase-mRNA deutlich exprimiert ist, was auf die basale Aktivität des iNOS-Promotors zurückzuführen ist. Nach Zugabe des Zytokingemisches wird die

iNOS-mRNA-Expression stimuliert; unter dem Einfluss steigender Mengen an CHX nimmt diese Expression jedoch um bis zu 75 % ab. Die Luciferase-mRNA-Menge, die die Promotoraktivität widerspiegelt, wird von der CHX-Behandlung nicht signifikant beeinflusst (Abbildung 4). Labile Proteine scheinen demzufolge einen Einfluss auf die iNOS-mRNA-Stabilität, nicht jedoch auf die iNOS-Promotoraktivität zu haben.

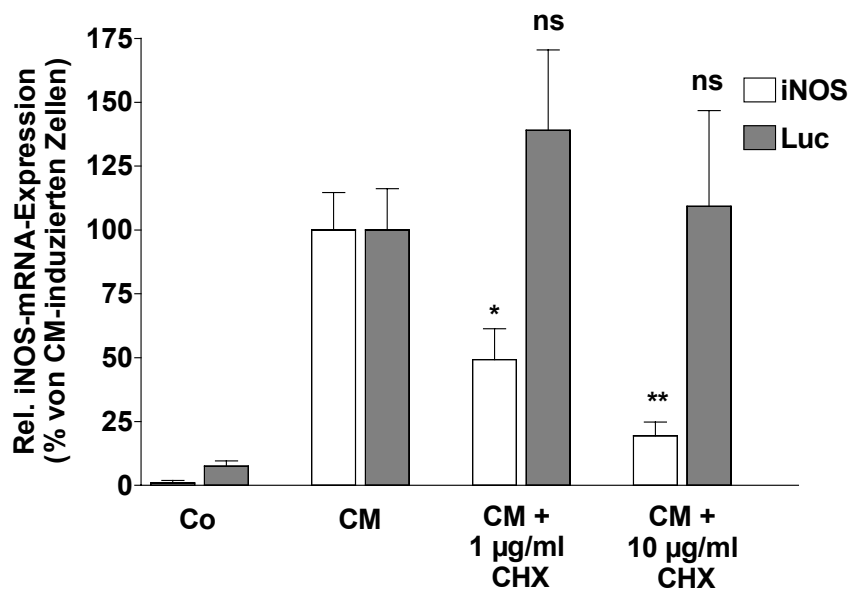


Abbildung 4: Hemmung der Translation mit CHX vermindert die iNOS-mRNA-Expression, aber nicht die iNOS-Promotoraktivität

Densitometrische Auswertung von sechs unabhängigen Gelen von RNase-Verdauungsschutzanalysen mit radioaktiv markierten antisense-Sonden gegen die iNOS-mRNA und gegen die Luciferase-mRNA (Luc). A549/8-Zellen, die stabil mit einem Konstrukt transfiziert worden waren, das ein 16 kb-Fragment des humanen iNOS-Promotors vor einem Luciferase-Reportergen enthielt, wurden für eine Stunde in DMSO oder mit 1 oder 10 µg/ml CHX vorinkubiert und für sechs Stunden mit Zytokinen stimuliert (CM). Zur Kontrolle wurden Zellen für sechs Stunden in Serum-freiem Medium ohne Zytokine inkubiert (Co). Die Säulen (Mittelwert ± SEM) repräsentieren die relativen iNOS- bzw. Luciferase-mRNA-Mengen in Bezug auf die iNOS- bzw. Luciferase-mRNA-Menge in CM-stimulierten A549/8-16kb-Zellen (*: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$ vs. relative mRNA-Menge in CM-stimulierten Zellen).

VIII.1.2 Einfluss der Hemmung der p38-MAPK durch SB 203580

Da die p38-MAPK (Mitogen-aktivierte Proteinkinase) an der Stabilisierung von mRNAs beteiligt ist, die AU-reiche Elemente enthalten (Kracht und Saklatvala, 2002), wurde der Effekt der p38-MAPK auf die iNOS-Promotoraktivität und die iNOS-mRNA-Expression durch pharmakologische Hemmung mit SB 203580 überprüft. SB 203580 hemmt spezifisch die α - und β -Isoform der p38-MAPK (Cuenda *et al.*, 1997; Dashti *et al.*, 2001; Enslin *et al.*, 1998). Diese Studien wurden in A549/8-16kb-Zellen und in DLD-1-16kb-Zellen (humanen Kolon-Adenokarzinomzellen) durchgeführt. Beide Zelllinien enthielten stabil integriert ein Konstrukt aus einem 16 kb-Fragment des humanen iNOS-Promotors vor einem Luciferase-Reportergen. Die Zellen wurden nach 18-stündiger Inkubation in Serum-freiem Medium zunächst eine Stunde lang mit verschiedenen Konzentrationen von SB 203580 (0-10 µM) in DMSO vorbehandelt,

bevor die iNOS-Expression durch Zugabe eines Zytokingemisches (VII.1.4) für sechs Stunden induziert wurde (CM). Kontrollzellen wurden für sechs Stunden in Serum-freiem Medium ohne Zytokine inkubiert (Co). Dann wurde RNA isoliert und die iNOS- und Luciferase-mRNA-Konzentrationen mittels qRT-PCR-Analysen (VII.2.15) bestimmt. Zur Auswertung wurde jeweils die iNOS- bzw. Luciferase-mRNA-Expression in Zytokin-stimulierten Zellen, die nicht mit SB 203580 behandelt wurden, als 100 % gesetzt. Auch hier ist anhand der Expression der Luciferase-mRNA eine Basalaktivität des iNOS-Promotors zu erkennen, wohingegen die Expression der iNOS-mRNA erst nach Zytokin-Stimulation signifikant induziert wird. Hemmung der p38-MAPK vermindert die iNOS-mRNA-Expression konzentrationsabhängig mit einem maximalen Effekt einer ca. 70 %igen Reduktion. Ein Einfluss der p38-MAPK auf die Luciferase-mRNA-Expression und somit auf die iNOS-Promotoraktivität ist nicht vorhanden (Abbildung 5).

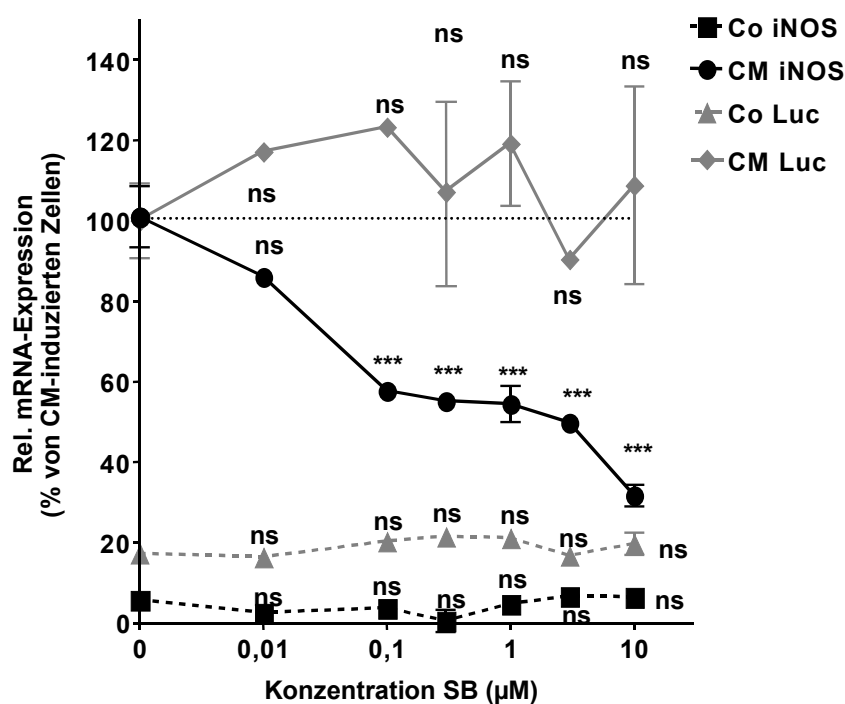


Abbildung 5: Hemmung der p38-MAPK durch SB 203580 verringert die iNOS-mRNA-Expression, aber nicht die iNOS-Promotoraktivität

DLD-1-16kb-Zellen wurden zunächst für eine Stunde mit dem p38-MAPK-Inhibitor SB 203580 (0-10 µM) in DMSO vorinkubiert. Dann wurde zusätzlich die iNOS-Expression mit einem Zytokingemisch induziert (CM). Die jeweiligen Kontrollzellen (Co) wurden nicht mit Zytokinen behandelt. Anschließend wurden die iNOS-mRNA-Expression und die Luciferase-mRNA-Expression (Luc) mittels qRT-PCR-Analysen bestimmt. Die Messpunkte (Mittelwert ± SEM) aus vier unabhängigen qRT-PCR-Analysen repräsentieren die relativen iNOS- bzw. Luciferase-mRNA-Mengen in Bezug auf die iNOS- bzw. Luciferase-mRNA-Menge in CM-stimulierten DLD-1-16kb-Zellen, die nicht mit SB behandelt wurden (***: $p < 0,001$; ns: nicht signifikant verschieden von CM-stimulierten Zellen).

Für die Bestimmung der iNOS-Proteinexpression nach Hemmung der p38-MAPK wurden die DLD-1-Zellen zunächst eine Stunde lang in 10 µM SB 203580 (SB+) oder DMSO (SB-) vorinkubiert. Die Induktion der iNOS-Expression erfolgte daraufhin durch zusätzliche

Inkubation mit Zytokinen (CM) für acht Stunden (VII.1.4). Zur Kontrolle wurden Zellen ohne Zytokine in Serum-freiem Medium inkubiert (Co). Dann wurden die Zellen lysiert (VII.3.1) und Western-Blot-Analysen mit einem monoklonalen Antikörper gegen die humane iNOS durchgeführt. Als Kontrolle für eine gleichmäßige Ladung des Gels wurde zusätzlich die Expression von β -Tubulin bestimmt. Nach Inkubation mit SB 203580 konnte eine verminderte Expression des iNOS-Proteins nach Zytokin-Stimulation detektiert werden (Abbildung 6A), was den positiv regulierenden Effekt der p38-MAPK auf die iNOS-Expression bestätigt. Des Weiteren ist auch die iNOS-vermittelte NO-Produktion nach Behandlung von DLD-1-Zellen mit 10 μ M SB 203580 (SB+) im Vergleich zu nur in DMSO inkubierten Zellen (SB-) um ca. 40 % abgeschwächt (Abbildung 6B). Das von den Zellen produzierte NO wurde dabei nach 48-stündiger Zytokin-Inkubation (CM) im Zellkulturüberstand als kumulatives Nitrit mit dem NO-Analyser gemessen. Kontrollzellen wurden für 48 Stunden in Serum-freiem Medium ohne Zytokine inkubiert (Co).

Neben dem Vorhandensein von regulierenden Proteinen spielt demzufolge auch der p38-MAPK-Signaltransduktionsweg eine Rolle für die post-transkriptionelle Regulation der iNOS-Expression.

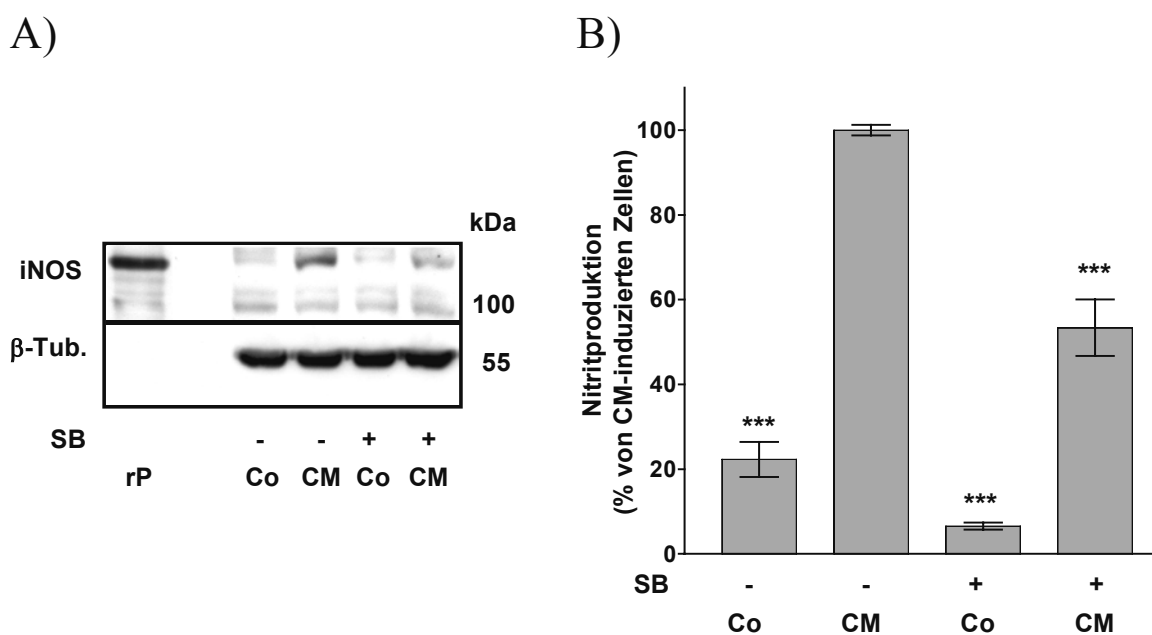


Abbildung 6: Hemmung der p38-MAPK durch SB 203580 verringert die iNOS-Proteinexpression und die iNOS-vermittelte NO-Produktion.

A) Repräsentativer Blot für drei unabhängige Western-Blot-Analysen mit monoklonalen Antikörpern gegen iNOS und β -Tubulin (β -Tub.). Analysiert wurden je 50 μ g zytoplasmatische Proteinextrakte aus unstimulierten (Co) oder für acht Stunden mit Zytokinen behandelten (CM) DLD-1-Zellen in Gegenwart (SB+) oder Abwesenheit (SB-) von 10 μ M SB 203580. Als Positivkontrolle diente bakteriell exprimiertes, humanes iNOS-Protein (rP).

B) Analyse der iNOS-vermittelten NO-Produktion in DLD-1-Zellen nach Inkubation mit 10 μ M SB 203580 (SB+) oder DMSO (SB-). Die NO-Produktion wurde nach 48-stündiger Behandlung mit (CM) oder ohne (Co) Zytokine als Nitrit im Zellkulturüberstand gemessen. Die Säulen (Mittelwert \pm SEM) repräsentieren relative Nitritmengen in Bezug auf die Nitritmenge in CM-stimulierten DLD-1-Zellen, die nicht mit SB behandelt wurden. (***: $p < 0,001$ vs. CM-inkubierte DLD-1-Zellen).

VIII.2 Regulation der humanen iNOS-Expression durch das RNA-bindende Protein Tristetraprolin (TTP)

Das RNA-bindende Protein Tristetraprolin (TTP) ist an der exosomalen Degradation von ARE-haltigen mRNAs beteiligt (Chen *et al.*, 2001), und es gibt einige Hinweise, dass die Expression und post-translationale Modifikation von TTP von der p38-MAPK entweder direkt oder über deren Substrat MK-2 (MAPK-aktivierte Proteinkinase 2) reguliert wird (Carballo *et al.*, 2001; Tchen *et al.*, 2004). Daher wurde zunächst der Effekt des RNA-bindenden Proteins TTP auf die Expression der humanen iNOS untersucht. Dazu wurden DLD-1-Zellen stabil mit einem Konstrukt transfiziert, das eine Expression der TTP-cDNA unter der Kontrolle des SV40-Promotors ermöglichte (DLD-1-pZeo-hTTPs). Um Zellen mit verminderter TTP-Expression zu generieren, wurden DLD-1-Zellen mit einem Konstrukt transfiziert, das eine TTP-cDNA in antisense-Orientierung ebenfalls unter der Kontrolle des SV40-Promotors enthielt (DLD-1-pZeo-hTTPas).

Zunächst wurde die Expression von TTP in den DLD-1-pZeo-hTTPs- und DLD-1-pZeo-hTTPas-Zellen analysiert. Als Vergleich dienten DLD-1-Zellen, die nur mit dem Resistenzvektor gegen Zeocin transfiziert waren (DLD-1-pZeo). Mit Proteinextrakten aus diesen Zellen wurden Western-Blot-Analysen mit einem polyklonalen Antikörper gegen TTP durchgeführt. Zur Ladungskontrolle wurde außerdem die Expression von β -Tubulin bestimmt. Wie erwartet, zeigen die DLD-1-pZeo-hTTPs-Zellen eine deutlich höhere und die DLD-1-pZeo-hTTPas-Zellen eine geringere TTP-Expression als die Kontrollzellen (Abbildung 7).

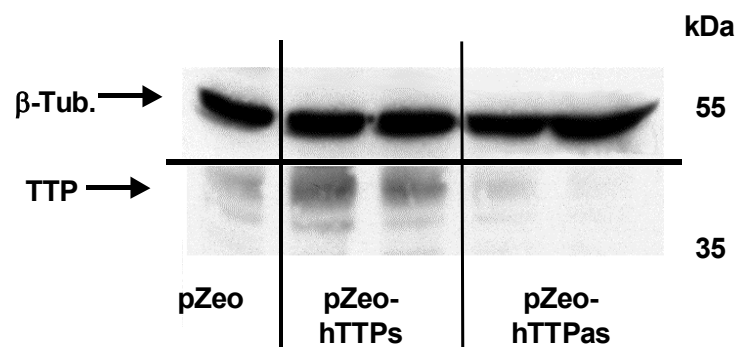


Abbildung 7: Expression von TTP in stabil transfizierten DLD-1-Zellen

Repräsentativer Blot für drei unabhängige Western-Blot-Analysen mit einem polyklonalen Antikörper gegen TTP und einem monoklonalen Antikörper gegen β -Tubulin (β -Tub.). Analysiert wurden je 50 μ g zytoplasmatische Proteinextrakte aus Kontrollzellen (DLD-1-pZeo) oder aus DLD-1-Zellen, die mit Konstrukten transfiziert worden waren, die eine TTP-cDNA in sense- (pZeo-hTTPs) oder antisense-Orientierung (pZeo-hTTPas) enthielten.

Vorarbeiten in unserer Arbeitsgruppe ergaben, dass TTP einen positiven Effekt auf die iNOS-Expression ausübt (Fechir *et al.*, 2005a), was im Gegensatz zu seinen bisher beschriebenen destabilisierenden Eigenschaften steht (Blackshear, 2002). Dazu wurden DLD-1-pZeo-, DLD-1-pZeo-hTTPs- und DLD-1-pZeo-hTTPas-Zellen für zwei bis 24 Stunden mit dem unter VII.1.4

beschriebenen Zytokingemisch inkubiert. Zur Kontrolle wurden alle Zelllinien für sechs Stunden in Serum-freiem Medium ohne Zytokine inkubiert (Co). Anschließend wurde aus diesen Zellen RNA isoliert und RNase-Verdauungsschutzanalysen mit einer Sonde gegen die iNOS-mRNA durchgeführt. Die iNOS-mRNA-Expression ist unter dem Einfluss der Überexpression von TTP nach vier- bis sechsständiger Zytokin-Stimulation um ca. das Sechsfache erhöht (Abbildung 8A). Auch die iNOS-vermittelte NO-Produktion ist in TTP-überexprimierenden Zellen deutlich gesteigert (Fechir *et al.*, 2005a). Dementsprechend zeigen die DLD-1-Zellen mit verminderter TTP-Expression eine um die Hälfte reduzierte Zytokin-stimulierte iNOS-mRNA-Expression (Abbildung 8B) und iNOS-vermittelte NO-Produktion (Fechir *et al.*, 2005a).

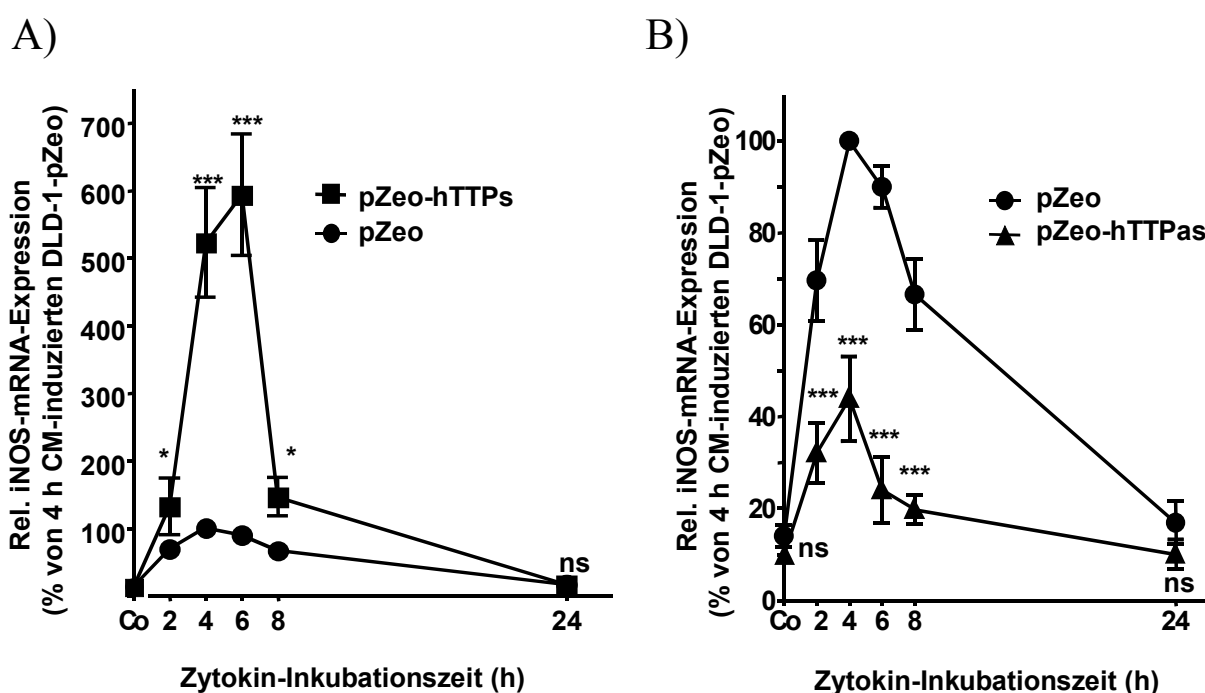


Abbildung 8: TTP erhöht die Expression der humanen iNOS-mRNA

DLD-1-pZeo-, DLD-1-pZeo-hTTPs- und DLD-1-pZeo-hTTPas-Zellen wurden für zwei bis 24 Stunden mit Zytokinen stimuliert. Zur Kontrolle wurden Zellen für sechs Stunden ohne Zytokine (Co) inkubiert. Dann wurde RNA isoliert und RNase-Verdauungsschutzanalysen mit einer Sonde gegen die iNOS-mRNA durchgeführt.

A) Densitometrische Auswertung von sieben unabhängigen Gelen von RNase-Verdauungsschutzanalysen mit RNA aus DLD-1-pZeo- und DLD-1-pZeo-hTTPs-Zellen. Die Messpunkte (Mittelwert \pm SEM) entsprechen den relativen iNOS-mRNA-Mengen in Bezug auf die iNOS-mRNA-Menge in für vier Stunden CM-stimulierten DLD-1-pZeo-Zellen (*: $p < 0,05$; ***: $p < 0,001$; ns: nicht signifikant verschieden von gleich behandelten DLD-1-pZeo-Zellen).

B) Densitometrische Auswertung von sechs unabhängigen Gelen von RNase-Verdauungsschutzanalysen mit RNA aus DLD-1-pZeo- und DLD-1-pZeo-hTTPas-Zellen. Die Messpunkte (Mittelwert \pm SEM) entsprechen den relativen iNOS-mRNA-Mengen in Bezug auf die iNOS-mRNA-Menge in für vier Stunden CM-stimulierten DLD-1-pZeo-Zellen (***: $p < 0,001$; ns: nicht signifikant verschieden von gleich behandelten DLD-1-pZeo-Zellen).

Weitere Vorarbeiten zeigten, dass TTP nicht an die humane iNOS-mRNA bindet. Dies wurde in UV-Crosslink-Experimenten mit ^{32}P -markierten, *in vitro*-transkribierten Sonden der iNOS-

mRNA (3'-UTR, cds, 5'-UTR) und aufgereinigtem GST-TTP-Fusionsprotein untersucht (Abbildung 9). Die Bindung von GST-HuR an die iNOS-3'-UTR (Rodriguez-Pascual *et al.*, 2000) diente dabei als Positivkontrolle zur Überprüfung der Sonden. Die Funktionalität des aufgereinigten TTP-Fusionsproteins wurde durch die in der Literatur beschriebene Bindung an die c-fos-mRNA (Worthington *et al.*, 2002) gezeigt. Als Negativkontrollen wurden aufgereinigtes GST oder das zur Stabilisierung in den Proben enthaltene BSA eingesetzt.

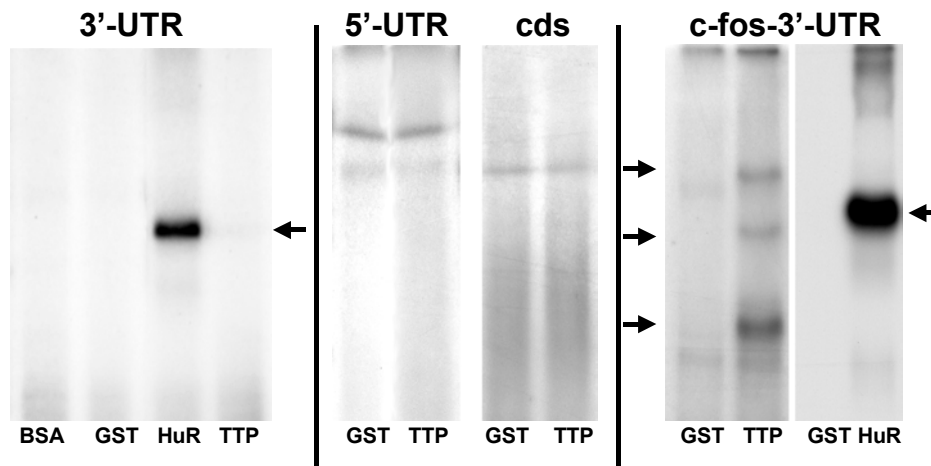


Abbildung 9: TTP bindet nicht an die iNOS-mRNA

Repräsentative Autoradiographie von UV-Crosslink-Experimenten. Verschiedene in Gegenwart von [α - 32 P]-UTP transkribierte RNA-Sonden (iNOS-3'-UTR (3'-UTR), iNOS-5'-UTR (5'-UTR), iNOS-codierende Sequenz (cds), c-fos-3'-UTR) wurden mit 0,6 μ g BSA, GST, GST-HuR (HuR) oder GST-TTP (TTP) inkubiert. Die Pfeile zeigen die Bildung von RNA-Protein-Komplexen an.

VIII.2.1. TTP stabilisiert die humane iNOS-mRNA

Um zu überprüfen, ob der Effekt von TTP auf die humane iNOS-Expression durch Modulation der mRNA-Stabilität ausgeübt wird, wurden Actinomycin D-Experimente durchgeführt. Dazu wurden DLD-1-pZeo-, DLD-1-pZeo-hTTPs- und DLD-1-pZeo-hTTPas-Zellen zur Induktion der iNOS-Expression für sechs Stunden mit dem unter VII.1.4 beschriebenen Zytokingemisch inkubiert. Anschließend wurde zum Stoppen der Transkription Actinomycin D (10 μ g/ml) zugegeben und nach null, zwei, vier, sechs und 18 Stunden RNA isoliert. Dann wurde die iNOS-mRNA-Expression mittels qRT-PCR-Analysen bestimmt. Zur Auswertung wurde der 0 h-Actinomycin D-Wert der jeweiligen Zelllinie als 100 % gesetzt und die restlichen Werte jeweils darauf bezogen. Verglichen mit DLD-1-pZeo-Kontrollzellen ($t_{1/2} = 3,95 \pm 0,24$ h) erhöht die Überexpression von TTP die Halbwertszeit der iNOS-mRNA um ungefähr den Faktor zwei ($t_{1/2} = 6,76 \pm 0,64$ h). Dementsprechend ist die Stabilität der iNOS-mRNA in DLD-1-pZeo-hTTPas-Zellen verringert ($t_{1/2} = 3,12 \pm 0,16$ h) (Abbildung 10).

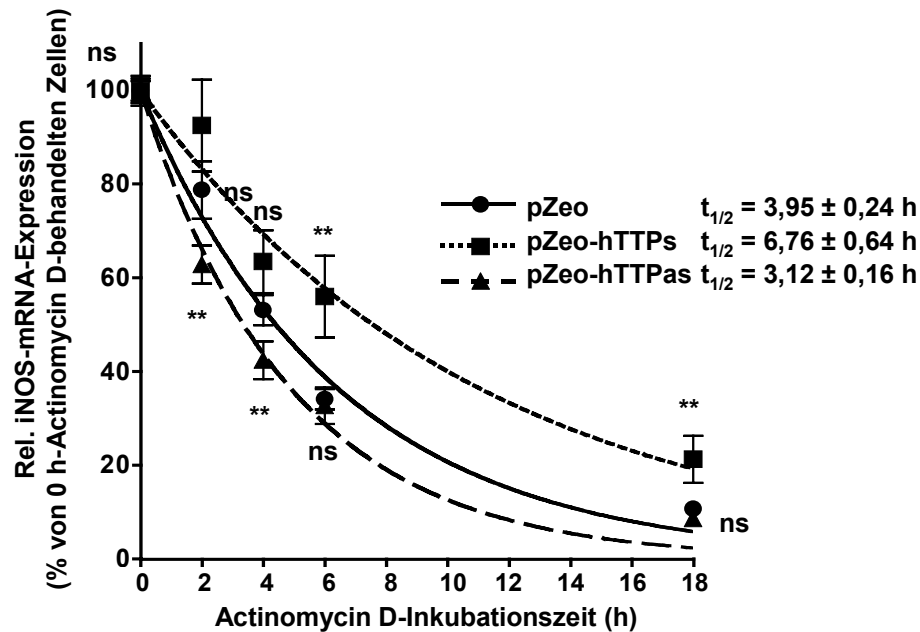


Abbildung 10: TTP stabilisiert die humane iNOS-mRNA

DLD-1-pZeo-, DLD-1-pZeo-hTTPs- und DLD-1-pZeo-hTTPas-Zellen wurden zur Induktion der iNOS-Expression für sechs Stunden mit einem Zytokingemisch inkubiert. Dann wurden 10 µg/ml Actinomycin D zugegeben und nach null bis 18 Stunden RNA isoliert. Die relative iNOS-mRNA-Expression wurde mittels qRT-PCR-Analysen bestimmt. Dargestellt ist die Auswertung von sechs unabhängigen qRT-PCR-Analysen. Die Messpunkte (Mittelwert ± SEM) stellen relative iNOS-mRNA-Mengen in Bezug auf die iNOS-mRNA-Menge des 0 h-Actinomycin D-Werts dar (*: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; ns: nicht signifikant verschieden von gleich behandelten DLD-1-pZeo-Zellen).

VIII.2.2. TTP hat keinen Effekt auf den iNOS-Promotor

Einige RNA-bindende Proteine sind neben ihren RNA-regulierenden Eigenschaften auch in der Lage, DNA zu binden und die Promotoraktivität zu beeinflussen (Donev *et al.*, 2002; Fiset und Chabot, 2001; He *et al.*, 2000; Katahira *et al.*, 2001). Aus diesem Grund wurde ein möglicher Effekt von TTP auf die iNOS-Promotoraktivität mittels Luciferase-Reporteranalysen überprüft. Dazu wurden die DLD-1-pZeo-, DLD-1-pZeo-hTTPs- und DLD-1-pZeo-hTTPas-Zellen transient mit pXP2-16kb, einem Konstrukt mit einem 16 kb-Fragment des humanen iNOS-Promotors vor einem Luciferase-Reporter, transfiziert (VII.1.5). Zur Normierung der Transfektionseffizienz wurde pRL-EF1α, ein Renilla-Konstrukt unter der Kontrolle des EF1α-Promotors, cotransfiziert. 30 Stunden nach der Transfektion wurden die Zellen zunächst für 18 Stunden in Serum-freiem Medium und anschließend für sechs Stunden in Gegenwart (CM) oder Abwesenheit (Co) eines Zytokingemisches (VII.1.4) inkubiert. Nach Lyse der Zellen wurde die Luciferase- und Renilla-Aktivität mit einem Luminometer bestimmt. Zur Auswertung wurde jeweils der Wert der unstimulierten Zellen als 100 % gesetzt. In allen drei Zelllinien war nach Zytokin-Stimulation ein gleich starker Anstieg der Promotoraktivität um ungefähr das Dreifache zu beobachten (Abbildung 11). TTP hat demnach keinen Einfluss auf die iNOS-

Promotoraktivität. Daraus lässt sich folgern, dass der Effekt von TTP auf die iNOS-Expression ausschließlich über post-transkriptionelle Mechanismen vermittelt wird.

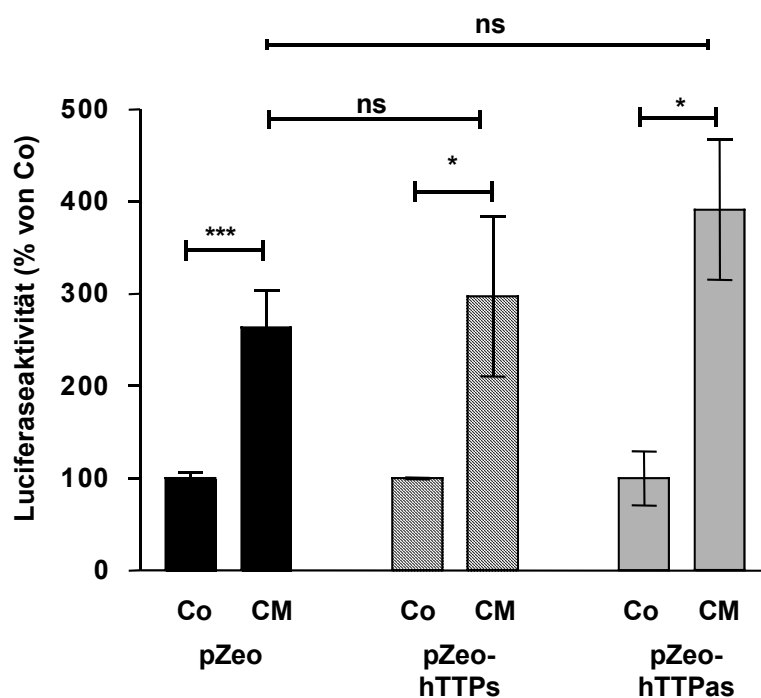


Abbildung 11: TTP hat keinen Einfluss auf die iNOS-Promotoraktivität

DLD-1-pZeo-, DLD-1-pZeo-hTTPs- und DLD-1-pZeo-hTTPas-Zellen wurden mit einem Luciferase-Reportergen unter der Kontrolle eines 16 kb-Fragments des humanen iNOS-Promotors (pXP2-16kb) und pRL-EF1 α transfiziert und die iNOS-Expression durch Inkubation mit einem Zytokingemisch (CM) für sechs Stunden induziert. Zur Kontrolle wurden Zellen für sechs Stunden in Serum-freiem Medium inkubiert (Co). Nach Lyse der Zellen wurde die Luciferase- und Renilla-Aktivität bestimmt. Dargestellt ist die Auswertung von vier unabhängigen Luciferasemessungen. Die Säulen (Mittelwert \pm SEM) repräsentieren die relative Luciferase-Aktivität der CM-inkubierten Zellen in Bezug auf die Luciferase-Aktivität der jeweiligen unstimulierten Zellen (: $p < 0,05$; ***: $p < 0,001$ vs. unstimulierte Zellen; ns: nicht signifikant verschieden von gleich behandelten DLD-1-pZeo-Zellen).*

VIII.2.3. Die Expression von TTP ist in DLD-1-Zellen nach Zytokin-Stimulation erhöht

Um einen genaueren Einblick in den Mechanismus der TTP-vermittelten Regulation der iNOS-Expression zu bekommen, wurde die Proteinexpression von TTP nach Stimulation der iNOS-Expression mit Zytokinen untersucht. Dazu wurden Wildtyp-DLD-1-Zellen für zwei, vier, sechs, acht, zehn oder 24 Stunden mit einem Zytokingemisch stimuliert (VII.1.4) (CM). Zur Kontrolle wurden DLD-1-Zellen in Serum-freiem Medium ohne Zytokine für sechs oder 24 Stunden inkubiert (Co). Aus den Zellen wurden dann zytoplasmatische Proteinextrakte gewonnen. Mit diesen Extrakten wurden Western-Blot-Analysen mit einem polyklonalen Antikörper gegen TTP durchgeführt. Zur Ladungskontrolle wurde außerdem die β -Tubulin-Expression analysiert. Man erkennt einen deutlichen Anstieg der TTP-Proteinexpression nach Behandlung der Zellen mit

Zytokinen mit einer maximalen Expression nach sechsständiger Zytokin-Stimulation (Abbildung 12). Die Zeitkurve der TTP-Expression weist einen ähnlichen Verlauf auf wie bereits für die Expression der iNOS-mRNA bekannt. Es ist deshalb wahrscheinlich, dass eine erhöhte TTP-Expression für die Stabilisierung der iNOS-mRNA nach Stimulation mit Zytokinen verantwortlich ist.

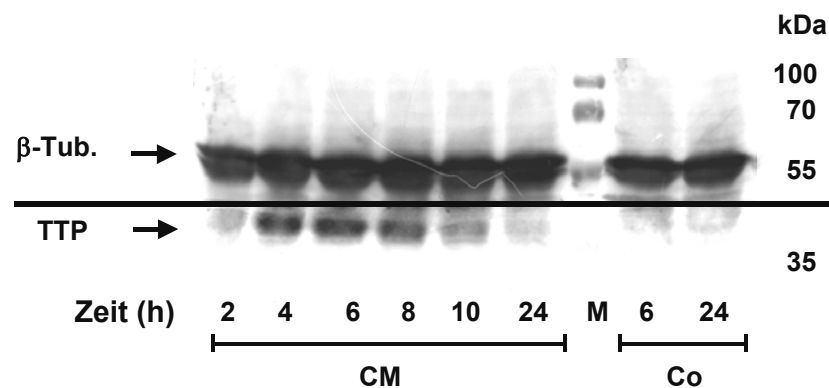


Abbildung 12: Die TTP-Proteinexpression ist in DLD-1-Zellen nach Stimulation mit Zytokinen erhöht

In DLD-1-Zellen wurde die iNOS-Expression durch Zugabe eines Zytokingemisches für zwei, vier, sechs, acht, zehn oder 24 Stunden induziert (CM). Zur Kontrolle wurden Zellen für sechs oder 24 Stunden ohne Zytokine inkubiert (Co). Mit 50 μ g zytoplasmatischen Proteinextrakten aus diesen Zellen wurden dann Western-Blot-Analysen mit einem polyklonalen Antikörper gegen TTP und einem monoklonalen Antikörper gegen β -Tubulin (β -Tub.) durchgeführt. Zur Größenkontrolle wurde ein Proteinmarker aufgetragen (M). Dieser Blot ist für drei weitere, unabhängige Western-Blot-Analysen repräsentativ.

VIII.2.4. Hemmung der p38-MAPK mit SB 203580 vermindert die Zytokin-induzierte TTP-Expression in DLD-1-Zellen

Um ein mögliches Zusammenspiel von TTP und der p38-MAPK bei der Regulation der iNOS-Expression untersuchen zu können, wurde der Effekt der Hemmung der p38-MAPK durch SB 203580 auf die Expression von TTP in DLD-1-Zellen analysiert. Dazu wurden Wildtyp-DLD-1-Zellen nach 18-stündiger Inkubation in Serum-freiem Medium zunächst für eine Stunde mit 10 μ M SB 203580 (SB+) oder DMSO (SB-) vorinkubiert, bevor die iNOS- und TTP-Expression durch Zugabe eines Zytokingemisches (VII.1.4) für sechs Stunden induziert wurde (CM). Kontrollzellen wurden für sechs Stunden in Serum-freiem Medium ohne Zytokine inkubiert (Co). Aus diesen Zellen wurde dann entweder RNA isoliert oder es wurden zytoplasmatische Proteinextrakte gewonnen. Die RNA wurde mittels qRT-PCR-Analysen mit einer Sonde gegen die humane TTP-mRNA untersucht. Die TTP-Proteinexpression wurde in Western-Blot-Analysen mit einem polyklonalen Antikörper gegen TTP bestimmt. Zur Normierung der aufgetragenen Proteinmenge wurde zusätzlich die Expression von β -Tubulin analysiert. Sowohl auf mRNA- (Abbildung 13A) als auch auf Proteinebene (Abbildung 13B) ist eine deutlich verringerte Zytokin-stimulierte TTP-Expression nach Hemmung der p38-MAPK zu

erkennen. Die Zytokin-vermittelte Aktivierung der p38-MAPK ist somit sehr wahrscheinlich für den Anstieg der TTP-Expression nach Stimulation mit Zytokinen mitverantwortlich.

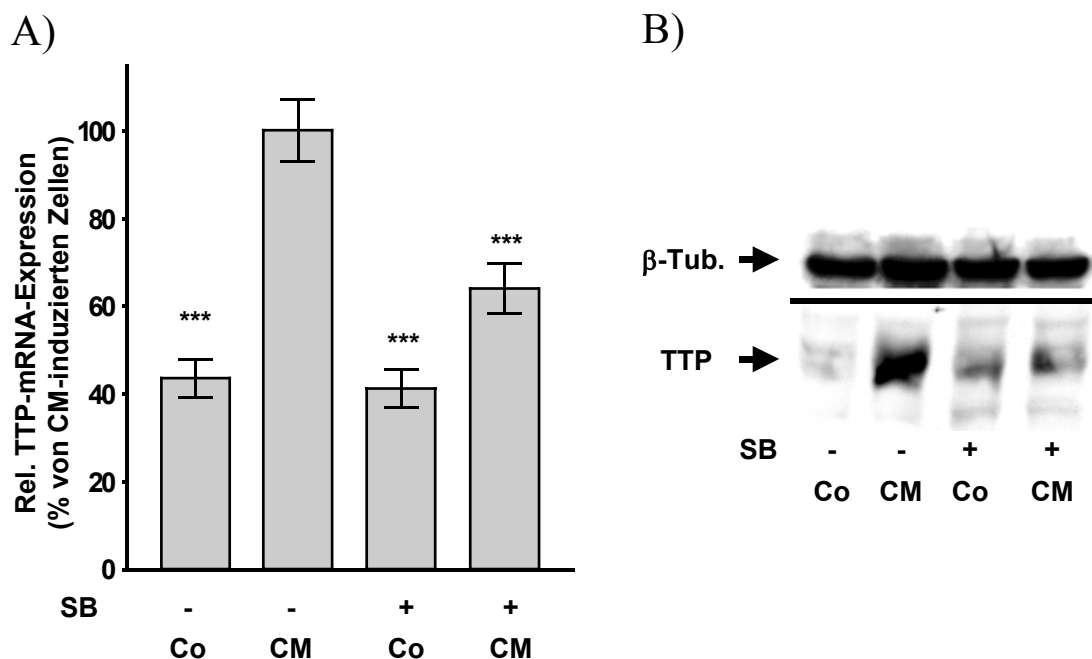


Abbildung 13: Hemmung der p38-MAPK durch SB 203580 vermindert die Zytokin-induzierte TTP-Expression in DLD-1-Zellen

DLD-1-Zellen wurden für eine Stunde in Gegenwart (SB+) oder Abwesenheit (SB-) von 10 μ M SB 203580 in DMSO inkubiert und dann für sechs Stunden mit einem Zytokingemisch behandelt (CM). Zur Kontrolle wurden Zellen für sechs Stunden in Serum-freiem Medium ohne Zytokine inkubiert (Co). Dann wurde entweder RNA isoliert oder es wurden zytoplasmatische Proteine gewonnen.

A) Auswertung von sieben unabhängigen qRT-PCR-Analysen mit einer Sonde gegen die TTP-mRNA. Die Säulen (Mittelwert \pm SEM) repräsentieren relative TTP-mRNA-Mengen in Bezug auf die TTP-mRNA-Menge in CM-inkubierten DLD-1-Zellen (***: $p < 0,001$ vs. CM-inkubierte DLD-1-Zellen).

B) Repräsentativer Blot für drei weitere, unabhängige Western-Blot-Analysen mit 50 μ g zytoplasmatischen Proteinextrakten und einem polyklonalen Antikörper gegen TTP sowie einem monoklonalen Antikörper gegen β -Tubulin (β -Tub.).

VIII.3 Aufreinigung und Identifizierung von weiteren Proteinen, die mit der 3'-UTR der iNOS-mRNA interagieren

Zur Identifizierung von weiteren Proteinen, die mit der 3'-UTR der iNOS-mRNA interagieren und damit auch an der Regulation der iNOS-Expression beteiligt sein könnten, wurden Streptavidin-Biotin-gekoppelte RNA-Affinitätschromatographie-Aufreinigungen durchgeführt. Als Sonden hierfür wurden biotinylierte iNOS-3'-UTR-RNA-Transkripte eingesetzt. Zur Aufreinigung wurde eine iNOS-3'-UTR-RNA verwendet, die alle AU-reichen Sequenzen enthielt (3'-UTR); als Negativkontrolle diente ein Transkript der iNOS-3'-UTR-RNA ohne AU-reiche Elemente (3'-UTR Δ -ARE). Diese RNA-Sonden wurden mit zytoplasmatischen Extrakten aus für vier Stunden mit Zytokinen stimulierten (CM) oder unbehandelten (Co) DLD-1-Zellen (VII.1.4) inkubiert. Nach Bindung der biotinylierten Sonden an Streptavidin-Agarose und mehreren Waschschrritten wurden die an die RNA gebundenen Proteine eluiert und in SDS-Polyacrylamidgelen elektrophoretisch aufgetrennt. Die mittels Coomassie-Färbung sichtbar gemachten Banden wurden ausgeschnitten und anschließend die Identität der Proteine durch MALDI-TOF-Analysen ermittelt. (Diese Versuche wurden in Kooperation mit C. Schneid durchgeführt.) Auf diese Weise konnten das „KH-type splicing regulatory protein“ (KSRP), das Poly-A-bindende Protein (PABP) und das heterogene nukleäre Ribonukleoprotein E1 (hnRNP E1) als Proteine identifiziert werden, die an die 3'-UTR-Sequenz der humanen iNOS-mRNA binden.

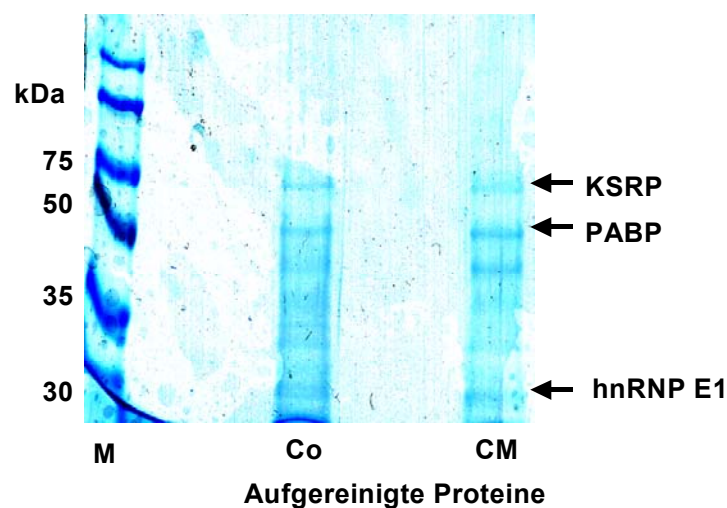


Abbildung 14: Aufreinigung von Proteinen, die mit der 3'-UTR der iNOS-mRNA interagieren

Repräsentatives Gel der Analyse einer Streptavidin-Biotin-gekoppelten RNA-Affinitätschromatographie unter Verwendung von 200 mg zytoplasmatischen Extrakten aus DLD-1-Zellen und 60 μ g biotinylierter iNOS-3'-UTR-RNA-Sonde.

Die zytoplasmatischen Extrakten wurden aus DLD-1-Zellen gewonnen, die zur Induktion der iNOS-Expression für sechs Stunden mit einem Zytokingemisch behandelt worden waren (CM). Zur Kontrolle wurden Extrakten aus DLD-1-Zellen gewonnen, die für sechs Stunden ohne Zytokine inkubiert worden waren (Co). Nach Inkubation der Extrakten mit den RNA-Transkripten und Streptavidin-Agarose wurden nach mehreren Waschschrritten die Proteine eluiert, über SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese aufgetrennt, durch Coomassie-Färbung sichtbar gemacht und mittels MALDI-TOF-Analysen identifiziert. Zur Größenkontrolle wurde ein Proteinmarker aufgetragen (M).

Zur Überprüfung der Methode wurden mit den aufgereinigten Eluaten Western-Blot-Analysen mit einem monoklonalen Antikörper gegen HuR durchgeführt, da bereits bekannt war, dass HuR an die iNOS-3'-UTR bindet (Rodriguez-Pascual *et al.*, 2000). Tatsächlich wurde HuR im Eluat der mit der iNOS-3'-UTR-RNA durchgeführten Aufreinigung gefunden, nicht aber im Eluat der Aufreinigung mit der iNOS-3'-UTR ohne AU-reiche Elemente (Abbildung 15A). Um die Ergebnisse der Aufreinigung zu bestätigen, wurde außerdem mit den gleichen Eluaten eine Western-Blot-Analyse mit einem monoklonalen Antikörper gegen KSRP durchgeführt. Auch KSRP fand sich erwartungsgemäß in der Aufreinigung mit der iNOS-3'-UTR wieder, nicht aber nach Verwendung der 3'-UTR ohne AU-reiche Sequenzen (Abbildung 15B).

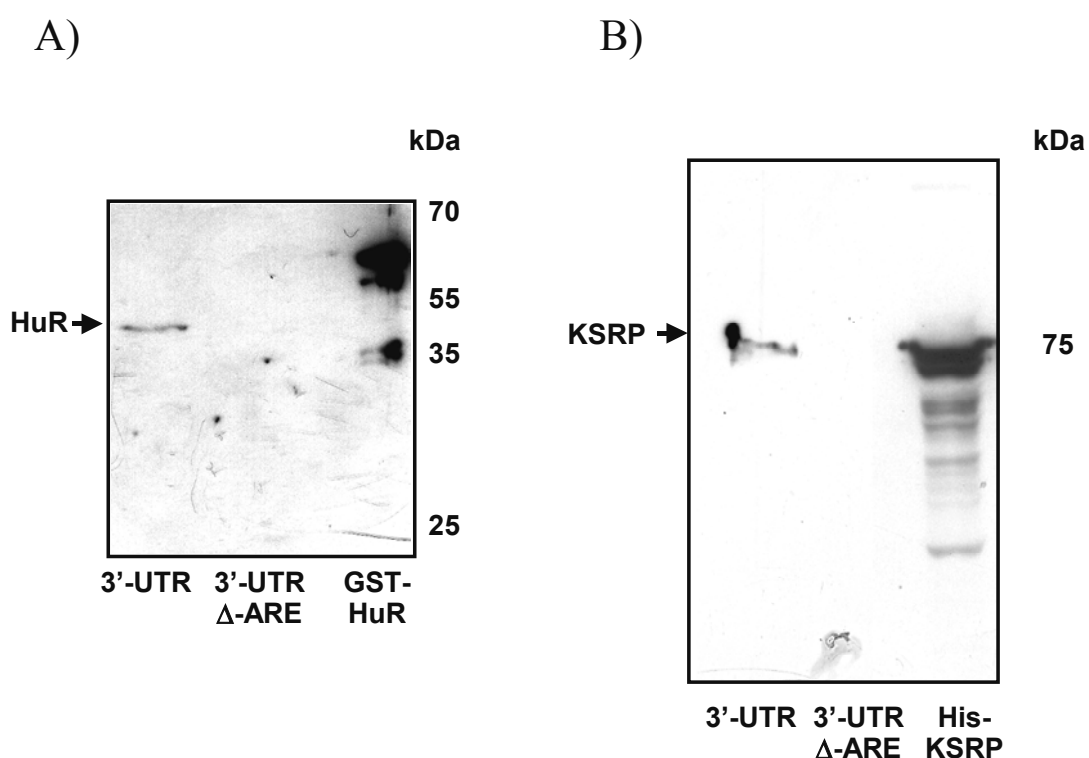


Abbildung 15: Identifizierung von Proteinen, die mit der iNOS-3'-UTR interagieren

Für die RNA-Affinitätschromatographie wurden zunächst zytoplasmatische Extrakte aus DLD-1-Zellen gewonnen, die für sechs Stunden mit einem Zytokingemisch stimuliert worden waren. Diese Extrakte wurden mit biotinylierten iNOS-3'-UTR-Transkripten mit (3'-UTR) oder ohne (3'-UTRΔ-ARE) AU-reiche Sequenzen und Streptavidin-Agarose inkubiert. Nach mehreren Waschschrritten konnten die gebundenen Proteine eluiert werden.

A) Repräsentativer Western-Blot für zwei weitere Western-Blot-Analysen, die mit affinitätschromatographisch aufgereinigten Extrakten und einem monoklonalen Antikörper gegen HuR durchgeführt wurden. Als Positivkontrolle diente bakteriell exprimiertes und aufgereinigtes GST-HuR.

B) Repräsentativer Western-Blot für zwei weitere Western-Blot-Analysen, die mit affinitätschromatographisch aufgereinigten Extrakten und einem monoklonalen Antikörper gegen KSRP durchgeführt wurden. Als Positivkontrolle diente bakteriell exprimiertes und aufgereinigtes His-KSRP.

VIII.4 Das RNA-bindende Protein KSRP reguliert die Expression der humanen iNOS

Da das RNA-bindende Protein KSRP eine der prominentesten Banden bei der Aufreinigung der iNOS-mRNA-3'-UTR-bindenden Proteine darstellte, wurde zuerst seine Beteiligung an der Regulation der humanen iNOS-Expression untersucht.

VIII.4.1 Immundepletion von KSRP erhöht die Stabilität der iNOS-3'-UTR-mRNA in *in vitro*-mRNA-Degradations-Analysen

Da KSRP an der exosomalen Degradation von ARE-haltigen mRNAs beteiligt ist (Chen *et al.*, 2001; Gherzi *et al.*, 2004), wurde zunächst der Effekt von KSRP auf die iNOS-Expression in *in vitro*-mRNA-Degradations-Analysen (VII.2.16) untersucht. Dazu wurden *in vitro*-generierte ³²P-markierte Transkripte der iNOS-3'-UTR eingesetzt, die entweder alle AU-reichen Sequenzen enthielten (iNOS-3'-UTR) oder deren AREs deletiert worden waren (non-AU). Die Transkripte besaßen jeweils eine 5'-Cap-Struktur und einen Poly-A-Schwanz (Abbildung 16A). Die Degradation der Transkripte wurde nach Inkubation mit zytoplasmatischen Proteinextrakten analysiert. Die Extrakte dafür wurden aus DLD-1-Zellen gewonnen, die für vier Stunden mit einem Zytokingemisch (VII.1.4) stimuliert worden waren (Kontrolle). Um den Effekt von KSRP auf die Degradation der Transkripte untersuchen zu können, wurde ein Teil dieser Extrakte mit einem polyklonalen Antikörper gegen KSRP immundepletiert (KSRP-depletiert). Der Erfolg der Depletion wurde in Western-Blot-Analysen mit einem Antikörper gegen KSRP überprüft. Zur Normierung der aufgetragenen Proteinmenge wurde auch die Expression von β -Tubulin analysiert (Abbildung 16B).

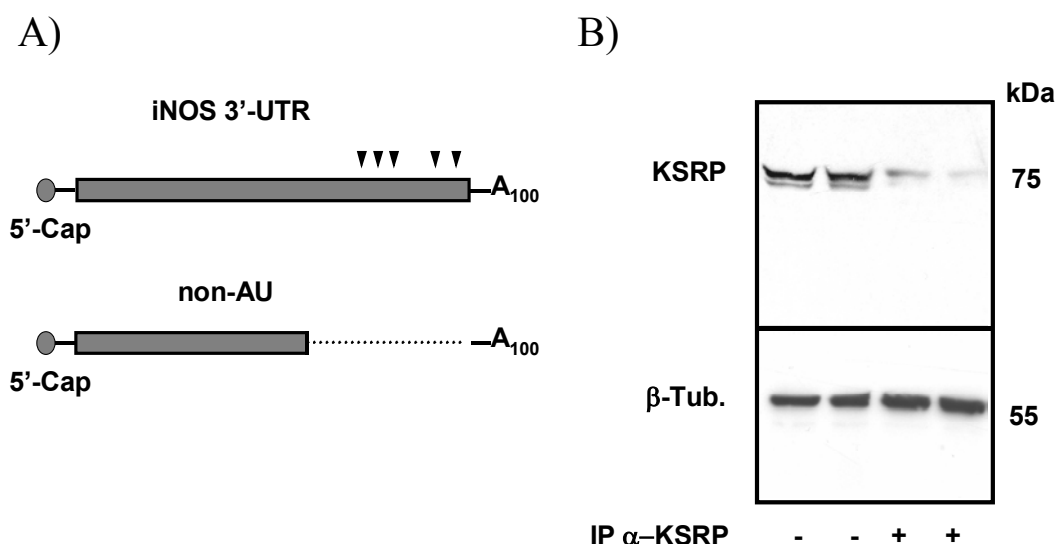


Abbildung 16: Sonden und Extrakte für die *in vitro*-mRNA-Degradations-Analyse

A) Schema der humanen iNOS-3'-UTR-RNA-Transkripte mit 5'-Cap-Struktur und Poly-A-Schwanz, die für die *in vitro*-mRNA-Degradations-Analysen eingesetzt wurden. Die Positionen der AREs sind mit Pfeilen markiert.

B) Verschiedene KSRP-depletierte Extrakte (IP α -KSRP+) wurden zur Überprüfung der Depletion im Vergleich zu den Ausgangsextrakten (IP α -KSRP-) in Western-Blot-Analysen mit monoklonalen Antikörpern gegen KSRP und β -Tubulin (β -Tub.) untersucht.

Für die *in vitro*-mRNA-Degradations-Analysen wurde die iNOS-3'-UTR- oder non-AU-RNA für 0, 10, 20 oder 30 Minuten mit den zytoplasmatischen Extrakten inkubiert. Nach Abstoppen der Degradation wurden die Transkripte aufgereinigt und über Polyacrylamid-Harnstoffgele aufgetrennt. Immundepletion von KSRP erhöht die Stabilität der iNOS-3'-UTR ($t_{1/2}$ Kontrolle= 13,46 \pm 0,96 min; $t_{1/2}$ KSRP-depletiert= 32,18 \pm 2,93 min) (Abbildung 17A), hat aber keinen Einfluss auf den Abbau der non-AU-RNA ($t_{1/2}$ Kontrolle= 38,81 \pm 2,34 min; $t_{1/2}$ KSRP-depletiert= 42,10 \pm 5,26 min) (Abbildung 17B). Wie aufgrund der destabilisierenden Eigenschaften der AREs (Bevilacqua *et al.*, 2003; Chen und Shyu, 1995) zu erwarten, ist das Transkript ohne AU-reiche Sequenzen unter Kontrollbedingungen deutlich stabiler als dasjenige mit AREs.

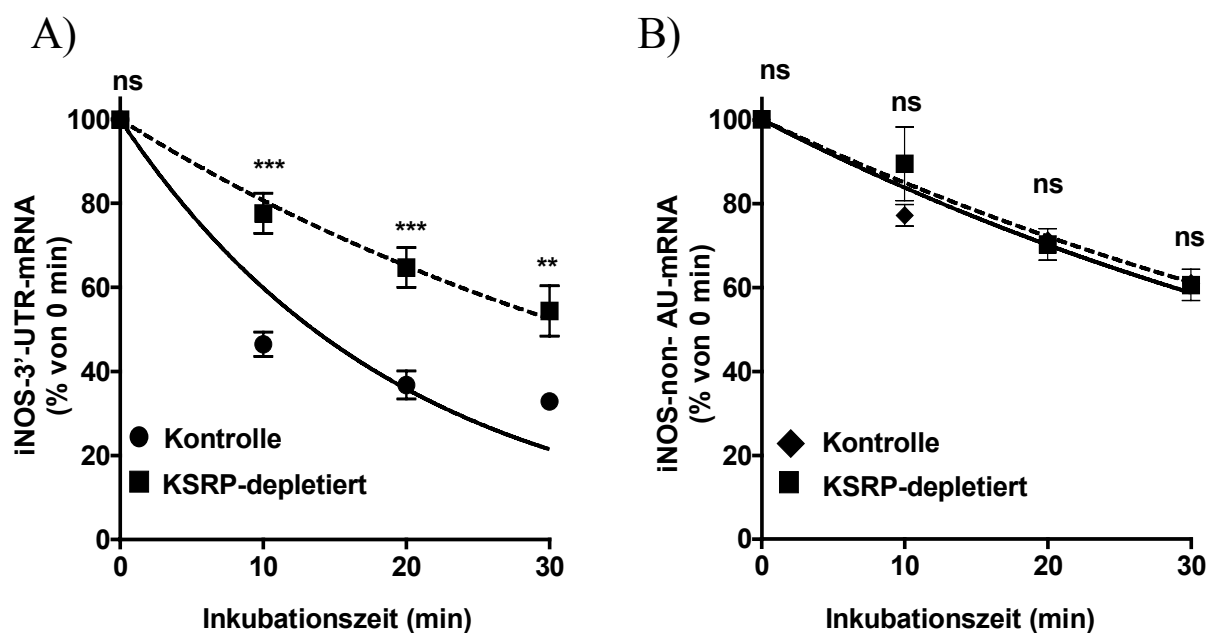


Abbildung 17: Immundepletion von KSRP erhöht die Stabilität der iNOS-3'-UTR in *in vitro*-mRNA-Degradations-Analysen

In DLD-1-Zellen wurde die iNOS-Expression durch Zugabe eines Zytokingemisches für vier Stunden stimuliert. Dann wurden zytoplasmatische Proteinextrakte gewonnen (Kontrolle). Ein Teil dieser Extrakte wurde mit einem polyklonalen Antikörper gegen KSRP immundepletiert (KSRP-depletiert). Die Extrakte wurden mit 32 P-markierten RNA-Transkripten der iNOS-3'-UTR mit (iNOS-3'-UTR) oder ohne AREs (non-AU), die eine 5'-Cap-Struktur und einen Poly-A-Schwanz enthielten, für 0-30 Minuten inkubiert. Der Abbau wurde durch Zugabe von SDS gestoppt und die isolierte RNA in denaturierenden Polyacrylamid-Harnstoffgelen analysiert.

A) Densitometrische Auswertung von acht unabhängigen Gelen von *in vitro*-mRNA-Degradations-Analysen unter Verwendung von iNOS-3'-UTR-RNA mit AREs. Die Messpunkte (Mittelwert \pm SEM) repräsentieren relative iNOS-3'-UTR-RNA-Mengen (100 % = 0 Minuten Inkubation; Kreise: zytoplasmatische Extrakte aus CM-stimulierten DLD-1-Zellen; Quadrate: KSRP-depletierte-Extrakte aus CM-stimulierten DLD-1-Zellen; ***: $p < 0,001$; **: $p < 0,01$; ns: nicht signifikant verschieden von undepletierten Extrakten).

B) Densitometrische Auswertung von fünf unabhängigen Gelen von *in vitro*-mRNA-Degradations-Analysen unter Verwendung von iNOS-non-AU-RNA ohne AREs. Die Messpunkte (Mittelwert \pm SEM) repräsentieren relative iNOS-non-AU-RNA-Mengen (100 % = 0 Minuten Inkubation; Rauten: zytoplasmatische Extrakte aus CM-stimulierten DLD-1-Zellen; Quadrate: KSRP-depletierte-Extrakte aus CM-stimulierten DLD-1-Zellen; ns: nicht signifikant verschieden von undepletierten Extrakten).

VIII.4.2 Überexpression von KSRP führt zu einer Herunterregulation der iNOS-Expression

Um zu untersuchen, ob KSRP auch in lebenden Zellen eine Rolle für die Regulation der iNOS-Expression spielt, wurden DLD-1-Zellen stabil mit einem Konstrukt transfiziert, das die KSRP-cDNA unter der Kontrolle des CMV-Promotors enthielt (DLD1-pcDNA-HisHSRP). Zur Kontrolle wurden DLD-1-Zellen generiert, die nur den Klonierungsvektor exprimierten (DLD-1-pcDNA3). Die KSRP-Überexpression der stabil transfizierten Zellen im Vergleich zu den Kontrollzellen wurde in Western-Blot-Analysen mit einem monoklonalen Antikörper gegen KSRP überprüft (Abbildung 18). Zur Normierung der aufgetragenen Proteinmenge wurde parallel auch die Expression von β -Tubulin analysiert.

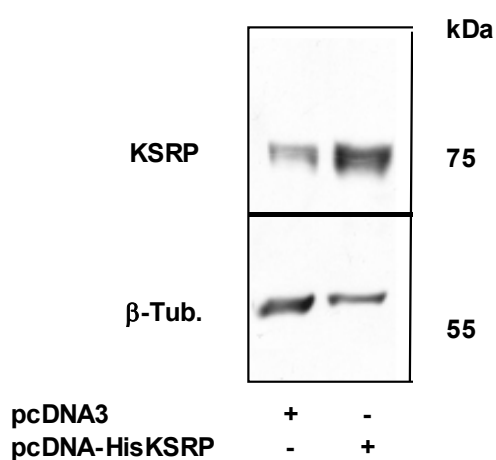


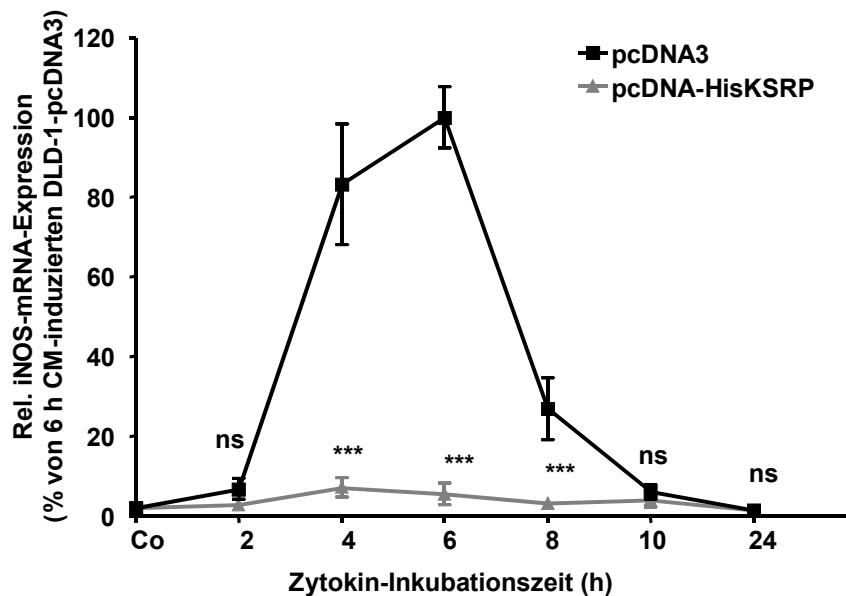
Abbildung 18: Expression von KSRP in DLD-1-Zellen, die stabil mit einem KSRP-cDNA-Konstrukt transfiziert wurden

Repräsentativer Blot für drei unabhängige Western-Blot-Analysen mit 50 μ g Extrakten aus stabil transfizierten DLD-1-Zellen (pcDNA3, pcDNA-HisKSRP) und monoklonalen Antikörpern gegen KSRP und β -Tubulin (β -Tub.).

Zur Analyse der iNOS-mRNA-Expression in diesen Zellen wurde für verschiedene Zeiten mit einem Zytokingemisch stimuliert (VII.1.4). Zur Kontrolle wurden Zellen für sechs Stunden ohne Zytokine inkubiert (Co). Anschließend wurde RNA isoliert und qRT-PCR-Analysen mit einer Sonde gegen die humane iNOS-mRNA durchgeführt. Zur Auswertung wurde die iNOS-mRNA-Expression in für sechs Stunden mit Zytokinen stimulierten DLD-1-pcDNA3-Zellen als 100 % gesetzt. In den KSRP-überexprimierenden Zellen (pcDNA-HisKSRP) ist die Expression der iNOS-mRNA auf weniger als 10 % der iNOS-mRNA-Expression in DLD-1-pcDNA3-Kontrollzellen verringert (Abbildung 19A). Für die Bestimmung der iNOS-vermittelten NO-Produktion wurden die Zellen für sechs bis 48 Stunden mit Zytokinen stimuliert. Zur Kontrolle wurden Zellen für sechs Stunden in Serum-freiem Medium ohne Zytokine inkubiert (Co). Dann wurde die kumulative Nitritmenge im Zellkulturüberstand mit dem NO-Analyzer gemessen (Abbildung 19B). Die Nitritproduktion in Kontrollzellen, die für 48 Stunden mit Zytokinen stimuliert worden waren, wurde als 100 % gesetzt. Auch auf Ebene der NO-Produktion ist eine

deutliche Verminderung der iNOS-Expression um bis zu 60 % unter dem Einfluss der Überexpression von KSRP zu beobachten.

A)



B)

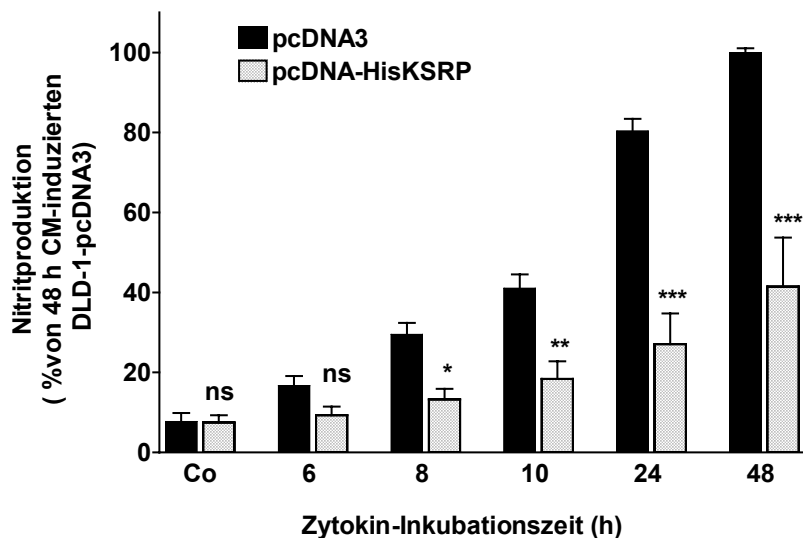


Abbildung 19: Überexpression von KSRP verringert die iNOS-Expression

DLD-1-pcDNA3- und DLD-1-pcDNA-HisKSRP-Zellen wurden für zwei bis 48 Stunden mit einem Zytokingemisch stimuliert. Zur Kontrolle wurden Zellen für sechs Stunden in Serum-freiem Medium inkubiert (Co).

A) Auswertung von sechs unabhängigen qRT-PCR-Analysen mit RNA aus DLD-1-pcDNA3- und DLD-1-pcDNA-His-KSRP-Zellen und einer Sonde gegen die iNOS-mRNA. Die Messpunkte (Mittelwert \pm SEM) repräsentieren relative iNOS-mRNA-Mengen in Bezug auf die iNOS-mRNA-Menge in für sechs Stunden mit Zytokinen behandelten DLD-1-pcDNA3-Zellen (***: $p < 0,001$; ns: nicht signifikant verschieden von gleich behandelten DLD-1-pcDNA3).

B) Auswertung von zwölf unabhängigen Nitritmessungen von Überständen aus DLD-1-pcDNA3- und DLD-1-pcDNA-His-KSRP-Zellen. Die Säulen (Mittelwert \pm SEM) repräsentieren relative Nitritmengen in Bezug auf die Nitritmenge in für 48 Stunden mit Zytokinen behandelten DLD-1-pcDNA3-Zellen (***: $p < 0,001$; **: $p < 0,01$; *: $p < 0,05$; ns: nicht signifikant verschieden von gleich behandelten DLD-1-pcDNA3-Zellen).

VIII.4.3 Verminderung der KSRP-Expression erhöht die Expression der iNOS

VIII.4.3.1 Analyse nach Transfektion eines Konstrukts, das die KSRP-cDNA in antisense-Orientierung enthält

Um den Effekt der Verminderung der KSRP-Expression untersuchen zu können, wurden DLD-1-Zellen stabil mit einem Konstrukt transfiziert, das die KSRP-cDNA in antisense-Orientierung enthielt (DLD-1-pcDNA-KSRPas). Der Effekt dieser Transfektion auf die KSRP-Expression wurde zunächst im Vergleich zu DLD-1-pcDNA3-Kontrollzellen in Western-Blot-Analysen mit einem monoklonalen Antikörper gegen KSRP untersucht. Zur Normierung wurde zusätzlich die β -Tubulin-Expression analysiert (Abbildung 20).

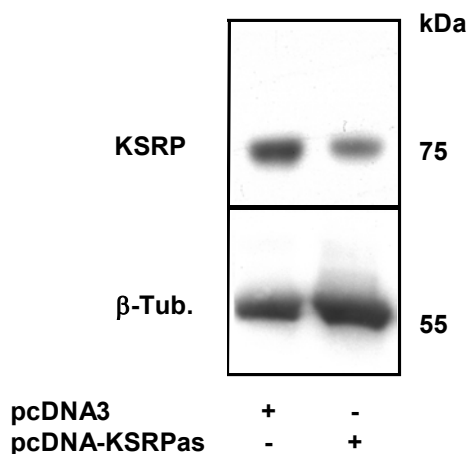


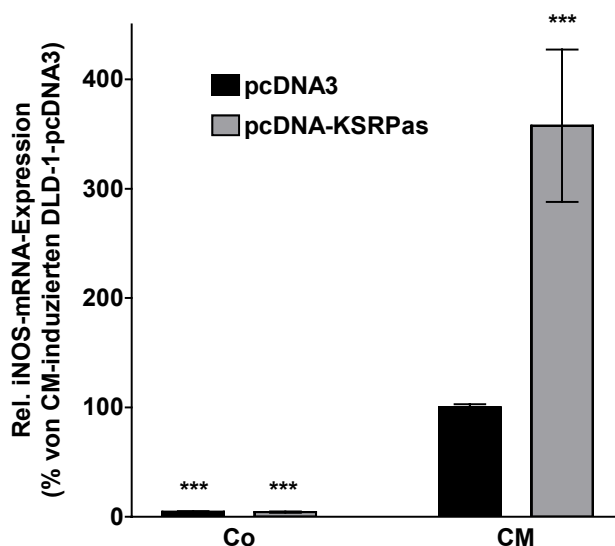
Abbildung 20: Expression von KSRP in DLD-1-Zellen, die stabil mit einem Konstrukt transfiziert wurden, das die KSRP-cDNA in antisense-Orientierung enthält

Repräsentativer Blot für drei unabhängige Western-Blot-Analysen mit 50 μ g Extrakten aus stabil transfizierten DLD-1-Zellen (pcDNA3, pcDNA-KSRPas) und monoklonalen Antikörpern gegen KSRP und β -Tubulin (β -Tub.).

In den DLD-1-pcDNA3- und DLD-1-pcDNA-KSRPas-Zellen wurde die iNOS-Expression mit Zytokinen induziert (VII.1.4). Nach sechs Stunden wurde aus Zytokin-stimulierten (CM) oder unbehandelten Zellen (Co) RNA isoliert und qRT-PCR-Analysen mit einer Sonde gegen die iNOS-mRNA durchgeführt. Zur Auswertung wurde die iNOS-mRNA-Menge in CM-stimulierten DLD-1-pcDNA3-Zellen als 100 % gesetzt. In DLD-1-Zellen mit verminderter KSRP-Expression (pcDNA-KSRPas) ist die iNOS-mRNA-Expression auf mehr als das Dreifache erhöht (Abbildung 21A). Für die Bestimmung der iNOS-vermittelten NO-Produktion wurden die Zellen 24 Stunden lang mit (CM) oder ohne (Co) Zytokine inkubiert und die kumulative Nitritmenge im Zellkulturüberstand gemessen. In Übereinstimmung mit den Ergebnissen auf mRNA-Ebene ist nach Verminderung der KSRP-Expression auch eine

gesteigerte NO-Produktion im Vergleich zu DLD-1-pcDNA3-Kontrollzellen festzustellen (Abbildung 21B).

A)



B)

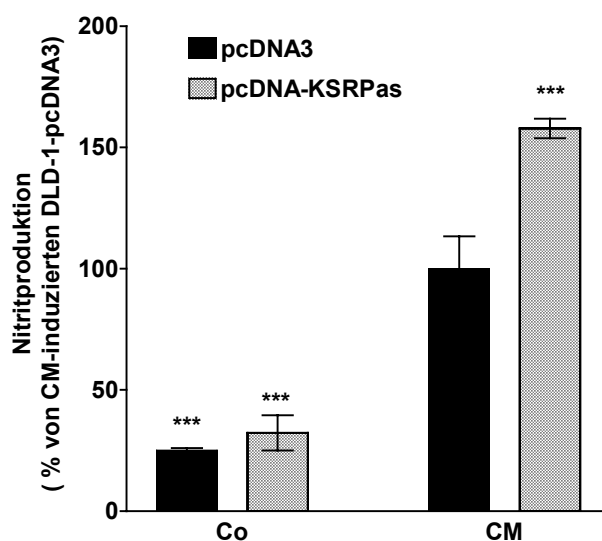


Abbildung 21: Expression einer KSRP-cDNA in antisense-Orientierung erhöht die iNOS-Expression

DLD-1-pcDNA3- und DLD-1-pcDNA-KSRPas-Zellen wurden für sechs oder 24 Stunden mit einem Zytokingemisch stimuliert (CM). Zur Kontrolle wurden Zellen für sechs oder 24 Stunden ohne Zytokine inkubiert (Co).

A) Auswertung von sechs unabhängigen qRT-PCR-Analysen mit RNA aus DLD-1-pcDNA3- und DLD-1-pcDNA-KSRPas-Zellen und einer Sonde gegen die iNOS-mRNA. Die Messpunkte (Mittelwert \pm SEM) repräsentieren relative iNOS-mRNA-Mengen in Bezug auf die iNOS-mRNA-Menge in für sechs Stunden mit Zytokinen behandelten DLD-1-pcDNA3-Zellen (***: $p < 0,001$ vs. CM-behandelte DLD-1-pcDNA3-Zellen).

B) Auswertung von zwölf unabhängigen Nitritmessungen von Überständen aus DLD-1-pcDNA3- und DLD-1-pcDNA-KSRPas-Zellen. Die Säulen (Mittelwert \pm SEM) repräsentieren relative Nitritmengen in Bezug auf die Nitritmenge in für 24 Stunden mit Zytokinen behandelten DLD-1-pcDNA3-Zellen (***: $p < 0,001$ vs. CM-behandelte DLD-1-pcDNA3-Zellen).

VIII.4.3.2 Analyse nach Transfektion einer siRNA gegen KSRP

Um den negativ regulierenden Effekt von KSRP auf die iNOS-Expression zu bestätigen, wurden RNA-Interferenz-Versuche durchgeführt. Diese Methode hat im Gegensatz zum antisense-Ansatz den Vorteil, dass sie durch die relativ kurzen siRNA-Moleküle die PKR-vermittelte Aktivierung proinflammatorischer Gene umgeht. Dazu wurden DLD-1- oder A549/8-Zellen mit einer siRNA gegen KSRP (siKSRP) transfiziert (VII.1.7). Zur Kontrolle wurden Zellen mit einer siRNA gegen Luciferase (siLUC) transfiziert, da diese in humanen Zellen endogen nicht exprimiert wird. 30 Stunden nach der Transfektion wurden die Zellen für weitere 18 Stunden in Serum-freiem Medium inkubiert, bevor die Expression der iNOS durch Zugabe eines Zytokingemisches stimuliert wurde (VII.1.4). Nach sechsständiger Inkubation mit (CM) oder ohne Zytokine (Co) wurde RNA isoliert und zunächst zur Überprüfung des Transfektionserfolgs die KSRP-mRNA-Expression in qRT-PCR-Analysen bestimmt. Im Vergleich zu mit siLUC transfizierten Zellen ist die KSRP-Expression in mit siKSRP transfizierten Zellen Zytokin-unabhängig um ca. 40 % reduziert (Abbildung 22).

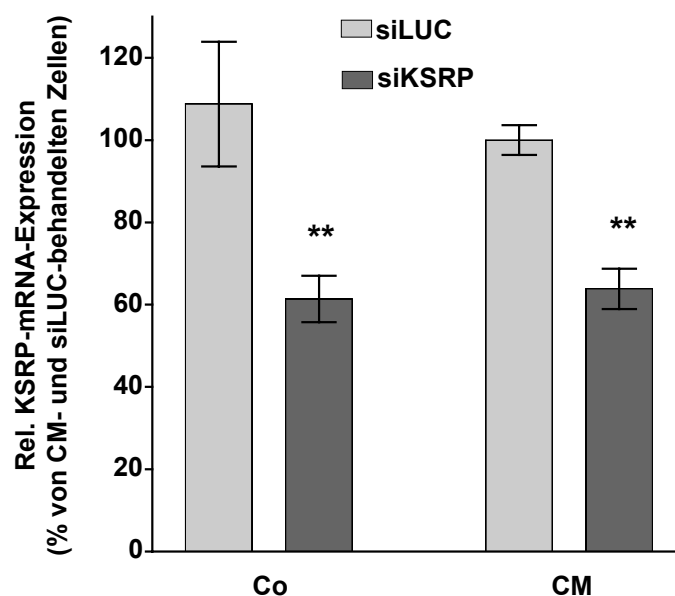


Abbildung 22: Verminderung der KSRP-Expression nach Transfektion einer siRNA gegen KSRP

DLD-1-Zellen wurden mit einer siRNA gegen KSRP (siKSRP) oder zur Kontrolle mit einer siRNA gegen Luciferase (siLUC) transfiziert. Nach 30 Stunden wurden die Zellen für 18 Stunden in Serum-freiem Medium inkubiert; anschließend wurde die iNOS-Expression durch Zugabe eines Zytokingemisches für sechs Stunden stimuliert (CM). Zur Kontrolle wurden Zellen für sechs Stunden ohne Zytokine inkubiert (Co). Dargestellt ist die Auswertung von sechs unabhängigen qRT-PCR-Analysen mit einer Sonde gegen die KSRP-mRNA zum Überprüfen der Herunterregulation der KSRP-mRNA-Expression. Die Säulen (Mittelwert \pm SEM) repräsentieren relative KSRP-mRNA-Mengen in Bezug auf die KSRP-mRNA-Menge in siLUC-transfizierten DLD-1-Zellen (**: $p < 0,01$ vs. siLUC-behandelte Zellen).

Um den Effekt der verminderten KSRP-Expression nach der siRNA-Transfektion auf die iNOS-Expression zu untersuchen, wurde die gleiche RNA in qRT-PCR-Analysen mit einer Sonde gegen die iNOS-mRNA eingesetzt. Zur Auswertung wurde die iNOS-mRNA-Menge in siLUC-transfizierten und CM-stimulierten DLD-1-Zellen als 100 % gesetzt. Die Verminderung der KSRP-Expression um 40 % führt zu einem fast vierfachen Anstieg der iNOS-mRNA-Expression (Abbildung 23).

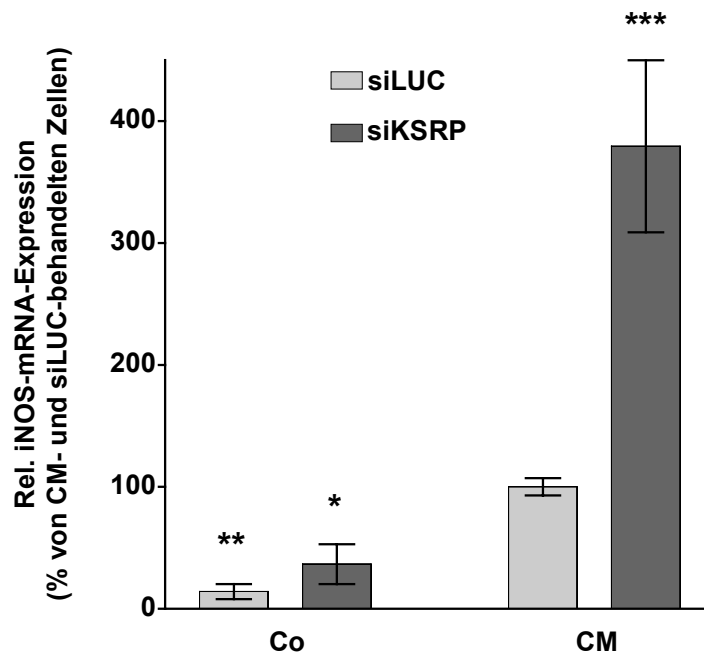


Abbildung 23: Transfektion einer siRNA gegen KSRP erhöht die iNOS-Expression

DLD-1-Zellen wurden mit einer siRNA gegen KSRP (siKSRP) oder zur Kontrolle mit einer siRNA gegen Luciferase (siLUC) transfiziert. Nach 30 Stunden wurden die Zellen für 18 Stunden in Serum-freiem Medium inkubiert; anschließend wurde die iNOS-Expression durch Zugabe eines Zytokingemisches für sechs Stunden stimuliert (CM). Zur Kontrolle wurden Zellen für sechs Stunden ohne Zytokine inkubiert (Co). Dargestellt ist die Auswertung von sechs unabhängigen qRT-PCR-Analysen mit einer Sonde gegen die iNOS-mRNA. Die Säulen (Mittelwert \pm SEM) repräsentieren relative iNOS-mRNA-Mengen in Bezug auf die iNOS-mRNA-Menge in siLUC- und CM-behandelten DLD-1-Zellen (*: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$ vs. siLUC- und CM-behandelte Zellen).

VIII.4.4 KSRP destabilisiert die humane iNOS-mRNA

Um zu prüfen, ob der KSRP-vermittelte Effekt auf die humane iNOS-Expression auch in lebenden Zellen über eine Destabilisierung der iNOS-mRNA zustande kommt, wurden Actinomycin D-Experimente durchgeführt. Dazu wurden DLD-1-pcDNA3- und DLD-1-pcDNA-KSRPas-Zellen zunächst für sechs Stunden mit dem unter VII.1.4 beschriebenen Zytokingemisch inkubiert. Anschließend wurde zum Stoppen der Transkription Actinomycin D (10 μ g/ml) zugegeben, und nach null, zwei, vier, sechs und 18 Stunden RNA isoliert. Dann wurde die iNOS-mRNA-Expression mittels qRT-PCR-Analysen bestimmt. Zur Auswertung

wurde der 0 h-Actinomycin D-Wert der jeweiligen Zelllinie als 100 % gesetzt und die restlichen Werte jeweils darauf bezogen. Verglichen mit DLD-1-pcDNA3-Kontrollzellen ($t_{1/2} = 4,21 \pm 0,30$ h) stabilisiert die Überexpression einer antisense-KSRP-cDNA die iNOS-mRNA und erhöht deren Halbwertszeit um ungefähr den Faktor zwei ($t_{1/2} = 7,68 \pm 1,26$ h) (Abbildung 24). Daraus lässt sich schließen, dass KSRP die iNOS-Expression auf posttranskriptioneller Ebene moduliert.

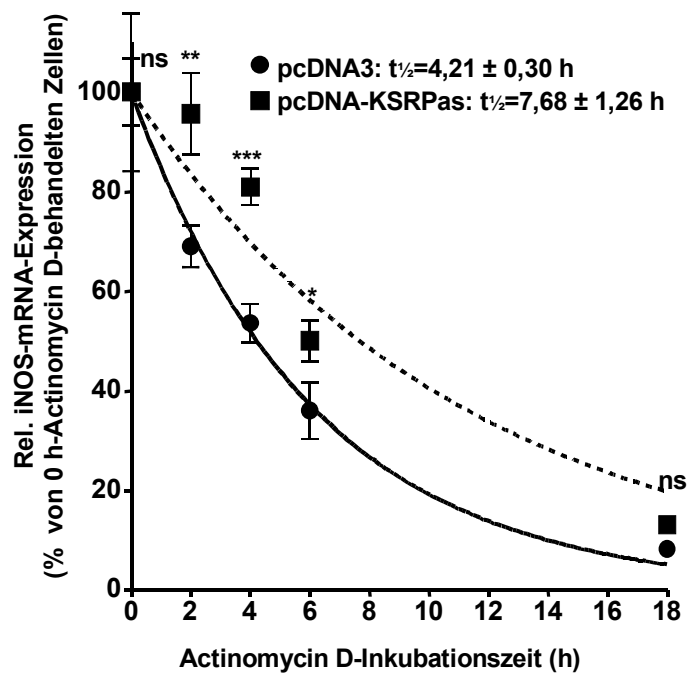


Abbildung 24: KSRP destabilisiert die humane iNOS-mRNA

DLD-1-pcDNA3- und DLD-1-pcDNA-KSRPas-Zellen wurden für sechs Stunden mit einem Zytokingemisch stimuliert. Dann wurden 10 µg/ml Actinomycin D zugegeben und nach null bis 18 Stunden RNA isoliert. Die iNOS-mRNA-Expression wurde mittels qRT-PCR-Analysen bestimmt. Dargestellt ist die Auswertung von vier unabhängigen qRT-PCR-Analysen. Die Messpunkte (Mittelwert ± SEM) stellen relative iNOS-mRNA-Mengen in Bezug auf die iNOS-mRNA-Menge des 0 h-Actinomycin D-Werts dar (*: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$; ns: nicht signifikant verschieden von gleich behandelten DLD-1-pcDNA3-Zellen).

VIII.4.5 Stabile, aber nicht transiente Überexpression von KSRP reguliert die Aktivität des humanen iNOS-Promotors herunter

Da für KSRP und verwandte Proteine auch DNA-bindende Eigenschaften beschrieben sind (He *et al.*, 2000), wurde ein möglicher Effekt von KSRP auf die Aktivität des humanen iNOS-Promotors untersucht. Dazu wurden zunächst DLD-1-pcDNA3- und DLD-1-pcDNA-HisKSRP-Zellen transient mit pXP2-16kb, einem Konstrukt mit einem 16 kb-Fragment des humanen iNOS-Promotors vor einem Luciferase-Reportergen, transfiziert. Zur Normierung der Transfektionseffizienz wurde pRL-EF1α, ein Renilla-Konstrukt unter der Kontrolle des EF1α-Promotors, cotransfiziert. 30 Stunden nach der Transfektion (VII.1.5) wurden die Zellen

zunächst für 18 Stunden in Serum-freiem Medium und anschließend für sechs Stunden in Gegenwart (CM) oder Abwesenheit (Co) eines Zytokingemisches (VII.1.4) inkubiert. Nach Lyse der Zellen wurde die Luciferase- und Renilla-Aktivität mit einem Luminometer bestimmt. Zur Auswertung wurde jeweils der Wert der unstimulierten Zellen als 100 % gesetzt. Unter diesen Bedingungen ist auch auf die Zytokin-stimulierte iNOS-Promotoraktivität ein negativ regulatorischer Effekt von KSRP festzustellen (Abbildung 25).

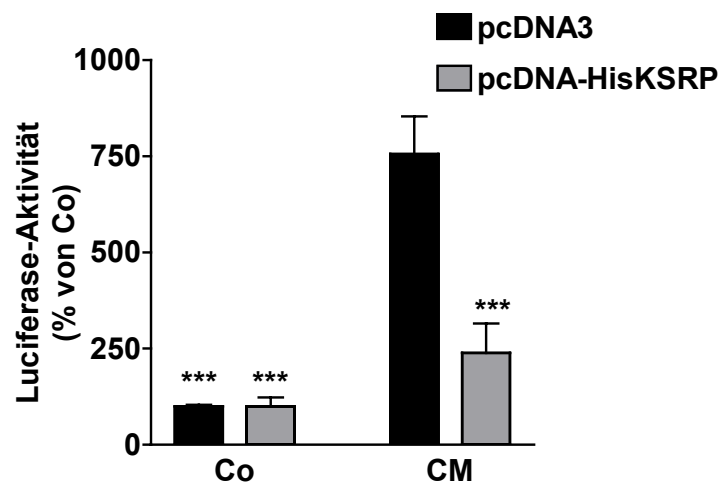


Abbildung 25: Stabile Überexpression von KSRP reguliert die Aktivität des iNOS-Promotors herunter
*DLD-1-pcDNA3- und DLD-1-pcDNA-HisKSRP-Zellen wurden transient mit pXP2-16kb und pRL-EF1 α transfiziert. 30 Stunden nach der Transfektion wurden die Zellen zunächst für 18 Stunden in Serum-freiem Medium inkubiert und anschließend für sechs Stunden mit Zytokinen behandelt (CM). Zur Kontrolle wurden Zellen für sechs Stunden ohne Zytokine inkubiert (Co). Nach Lyse der Zellen wurde die Luciferase- und Renilla-Aktivität bestimmt. Dargestellt ist die Auswertung von vier unabhängigen Luciferasemessungen. Die Säulen (Mittelwert \pm SEM) repräsentieren die relative Luciferase-Aktivität in Bezug auf die Luciferase-Aktivität in Co-behandelten Zellen (***: $p < 0,001$ vs. CM-behandelte DLD-1-pcDNA3-Zellen).*

Um den Effekt von KSRP auf die iNOS-Promotoraktivität genauer zu analysieren, wurden DLD-1-Wildtyp-Zellen transient mit pcDNA3 oder pcDNA-HisKSRP sowie jeweils mit pXP2-16kb cotransfiziert (VII.1.5). Zur Normierung der Transfektionseffizienz wurde auch hier zusätzlich mit pRL-EF1 α transfiziert. Diese transient transfizierten Zellen wurden dann weiterbehandelt wie oben beschrieben. Zur Auswertung wurde auch hier jeweils die Luciferase-Aktivität in unstimulierten Zellen als 100 % gesetzt. Nach transienter Transfektion ist kein Effekt von KSRP auf die iNOS-Promotoraktivität festzustellen (Abbildung 26). Aufgrund des kürzeren Zeitraums der KSRP-Überexpression bei der transienten Transfektion spricht dies für eine indirekte Beeinflussung des iNOS-Promotors durch KSRP.

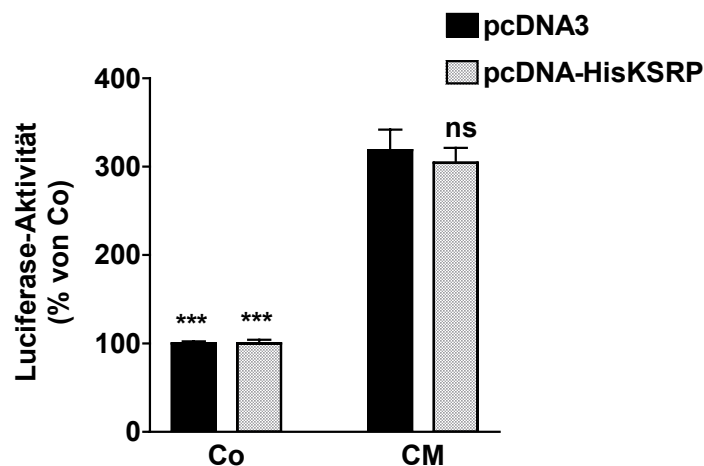


Abbildung 26: Transiente Überexpression von KSRP beeinflusst die Aktivität des iNOS-Promotors nicht
 DLD-1-Wildtyp-Zellen wurden transient mit pcDNA3 oder pcDNA-HisKSRP sowie mit pXP2-16kb und pRL-EF1 α transfiziert. 30 Stunden nach der Transfektion wurden die Zellen zunächst für 18 Stunden in Serum-freiem Medium inkubiert und anschließend für sechs Stunden mit Zytokinen behandelt (CM). Zur Kontrolle wurden Zellen für sechs Stunden ohne Zytokine inkubiert (Co). Nach Lyse der Zellen wurde die Luciferase- und Renilla-Aktivität bestimmt. Dargestellt ist die Auswertung von vier unabhängigen Luciferasemessungen. Die Säulen (Mittelwert \pm SEM) repräsentieren die relative Luciferase-Aktivität in Bezug auf die Luciferase-Aktivität in Co-behandelten Zellen (***: $p < 0,001$; ns: nicht signifikant verschieden von CM-behandelten DLD-1-Zellen, die transient mit pcDNA3 transfiziert wurden).

VIII.4.6 Keine Veränderung der KSRP-Expression nach Zytokin-Stimulation

Um den Mechanismus der KSRP-vermittelten Destabilisierung der iNOS-mRNA genauer zu untersuchen, wurde zunächst die Expression von KSRP nach Zytokin-Stimulation in DLD-1-Zellen analysiert. Dazu wurden DLD-1-Wildtyp-Zellen zur Induktion der iNOS-Expression für verschiedene Zeiten mit einem Zytokingemisch (CM) behandelt (VII.1.4). Zur Kontrolle wurden DLD-1-Zellen für sechs oder 24 Stunden in Serum-freiem Medium ohne Zytokine inkubiert (Co). Aus diesen Zellen wurden dann Proteinextrakte gewonnen und Western-Blot-Analysen mit einem monoklonalen Antikörper gegen KSRP durchgeführt. Zur Ladungskontrolle wurde außerdem die Expression von β -Tubulin analysiert. Dabei ist keine Veränderung der KSRP-Proteinexpression nach Zytokin-Stimulation festzustellen (Abbildung 27).

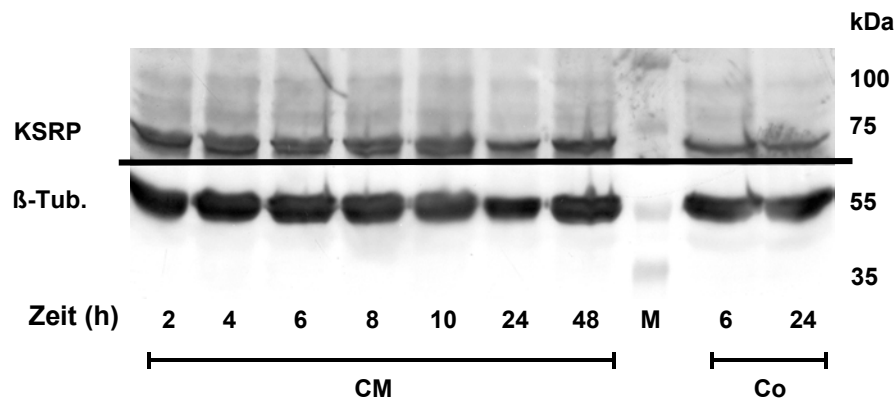


Abbildung 27: Keine Veränderung der KSRP-Expression nach Zytokin-Stimulation

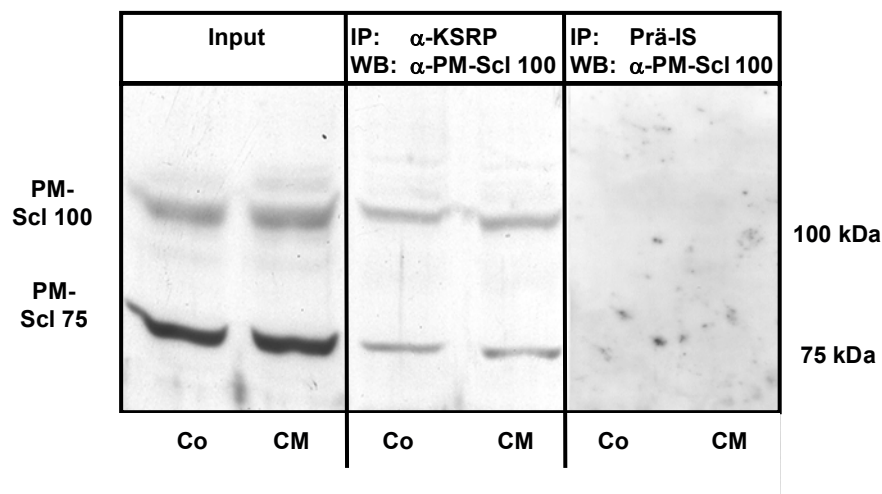
In DLD-1-Zellen wurde die iNOS-Expression durch Zugabe eines Zytokingemisches für zwei, vier, sechs, acht, zehn, 24 oder 48 Stunden induziert (CM). Zur Kontrolle wurden Zellen für sechs oder 24 Stunden ohne Zytokine inkubiert (Co). Mit 50 µg zytoplasmatischen Proteinextrakten aus diesen Zellen wurden dann Western-Blot-Analysen mit monoklonalen Antikörpern gegen KSRP und β-Tubulin (β-Tub.) durchgeführt. Zur Größenkontrolle wurde ein Proteinmarker aufgetragen (M). Dieser Blot ist für drei weitere, unabhängige Western-Blot-Analysen repräsentativ.

VIII.4.7 KSRP interagiert mit der exosomalen Komponente PM-Scl 100

Bisher wurde gezeigt, dass KSRP an der post-transkriptionellen Regulation der iNOS-Expression beteiligt ist, ohne dass sich nach Zytokin-Stimulation die Menge an KSRP in der Zelle ändert. Es ist deshalb wahrscheinlich, dass KSRP seinen Effekt auf die iNOS im Zusammenspiel mit anderen Proteinen vermittelt. Da KSRP ein essentieller Bestandteil des Degradationsapparates ist, der für den exosomal vermittelten Abbau von ARE-haltigen mRNAs verantwortlich ist (Chen *et al.*, 2001; Gherzi *et al.*, 2004), wurde zunächst in Co-Immunpräzipitations-Analysen (VII.3.8) eine mögliche Interaktion von KSRP mit PM-Scl 100, einer Hauptkomponente des Exosoms (Brouwer *et al.*, 2001), untersucht. Dazu wurden zunächst Proteinextrakte aus unbehandelten (Co) oder für vier Stunden mit Zytokinen stimulierten (CM) (VII.1.4) DLD-1-Zellen gewonnen. Diese wurden dann mit RNase behandelt, um RNA-unabhängige Interaktionen betrachten zu können. Anschließend wurde eine Immunpräzipitation mit einem polyklonalen Antikörper gegen KSRP durchgeführt und die präzipitierten Proteine mittels Western-Blot-Analysen dargestellt. Als Negativkontrolle wurde eine Immunpräzipitation mit einem Präimmenserum (Prä-IS) durchgeführt. Für die Western-Blot-Analysen wurde ein Antikörper gegen den PM-Scl-Komplex verwendet, der neben der Hauptkomponente PM-Scl 100 auch die PM-Scl 75-Komponente erkennt. Zum Vergleich wurden außerdem 5 % des eingesetzten Extrakts analysiert (Input). Zwischen KSRP und der exosomalen Komponente PM-Scl 100 war eine deutliche Interaktion zu beobachten. Allerdings konnte keine Zytokin-bedingte Veränderung dieser Wechselwirkung festgestellt werden (Abbildung 28A). Zum Überprüfen des Erfolgs der Immunpräzipitation von KSRP wurde außerdem eine Western-Blot-Analyse mit einem polyklonalen Antikörper gegen KSRP durchgeführt. Man erkennt eine gleichmäßige Präzipitation von KSRP und die schwere

Kette des Antikörpers, der für die Immunpräzipitation eingesetzt wurde (hc: „heavy chain“). Auch hier wurden die eingesetzten Extrakte mit analysiert (Input). Zur Normierung wurde zusätzlich die Expression von β -Tubulin bestimmt (Abbildung 28B).

A)



B)

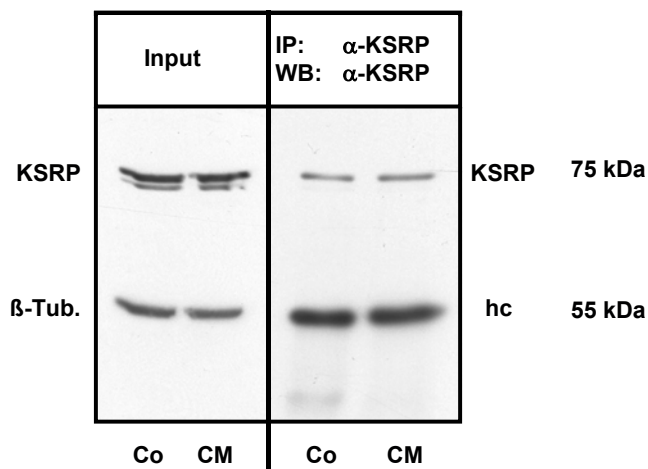


Abbildung 28: KSRP interagiert mit der exosomal Komponente PM-Scl 100

DLD-1-Zellen wurden für vier Stunden mit Zytokinen behandelt (CM) oder in Serum-freiem Medium inkubiert (Co). Dann wurden die Zellen lysiert und die Extrakte zur Vermeidung RNA-bedingter Interaktionen mit RNase behandelt. A) Repräsentativer Blot für drei weitere Western-Blot-Analysen mit einem Antikörper gegen PM-Scl 100 (WB: PM-Scl 100). Eingesetzt wurden zum Vergleich 5 % des Ausgangsextrakts (Input) sowie präzipitiertes Material aus Immunpräzipitationen mit einem polyklonalen Antikörper gegen KSRP (IP: α -KSRP) oder als Negativkontrolle mit einem Präimmenserum (IP: Prä-IS). Die Banden für PM-Scl 100 und PM-Scl 75 sind angezeigt.

B) Western-Blot-Analyse mit einem polyklonalen Antikörper gegen KSRP (WB: α -KSRP) zur Überprüfung der Effizienz der Immunpräzipitation (IP: α -KSRP). Neben KSRP wird auch die schwere Kette des zur Präzipitation eingesetzten Antikörpers erkannt (hc). Zum Vergleich wurden 5 % des Ausgangsextrakts (Input) eingesetzt; dabei wurde zur Normierung zusätzlich eine Western-Blot-Analyse mit einem monoklonalen Antikörper gegen β -Tubulin (β -Tub.) durchgeführt. Dieser Blot ist für drei weitere Western-Blot-Analysen repräsentativ.

VIII.4.8 KSRP interagiert mit TTP

Im Folgenden wurde untersucht, ob KSRP auch mit TTP interagieren kann. Hierfür wurden Co-Immunpräzipitations-Analysen mit einem polyklonalen Antikörper gegen TTP durchgeführt. Die im Versuch eingesetzten Gesamtzellextrakte wurden aus für vier Stunden mit Zytokinen stimulierten (CM) (VII.1.4) oder unbehandelten (Co) DLD-1-Zellen gewonnen. Zunächst wurden diese Extrakte mit RNase behandelt, um eine RNA-vermittelte Interaktion ausschließen zu können. Mit den Präzipitaten wurden dann Western-Blot-Analysen mit einem monoklonalen Antikörper gegen KSRP durchgeführt. Hierbei zeigt sich eine Interaktion von TTP und KSRP, die nach Zytokin-Stimulation deutlich verstärkt ist. Eine Immunpräzipitation mit einem Präimmenserum als Negativkontrolle zeigt keine Präzipitation von KSRP. Zum Vergleich wurden 5 % des eingesetzten Extrakts analysiert (Input) (Abbildung 29).

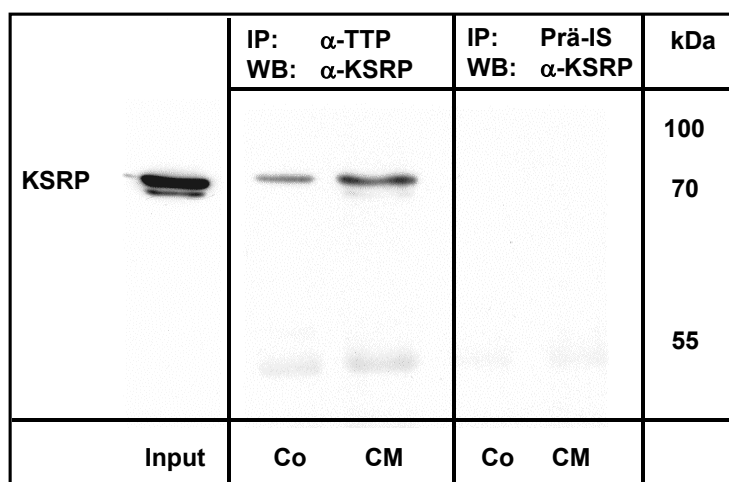


Abbildung 29 : KSRP interagiert mit TTP

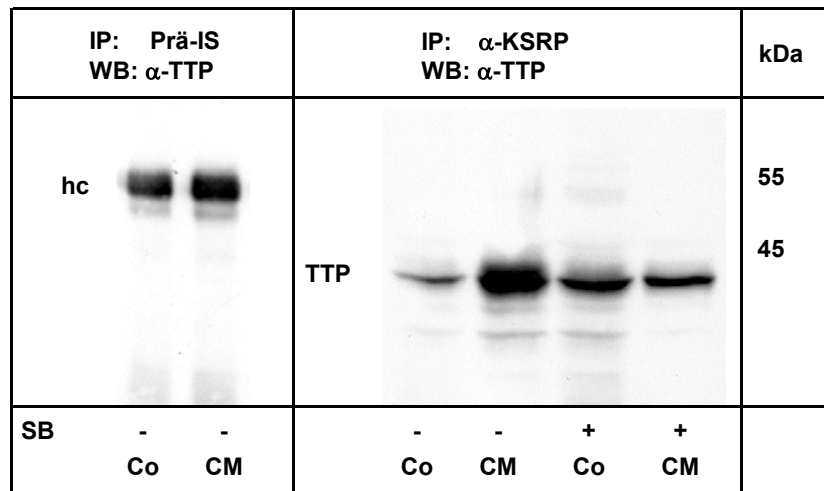
DLD-1-Zellen wurden für vier Stunden mit Zytokinen (CM) oder in Serum-freiem Medium (Co) inkubiert. Anschließend wurden Gesamtzellextrakte gewonnen und ein RNase-Verdau durchgeführt. Dann wurden die Extrakte mit einem polyklonalen Antikörper gegen TTP (IP: α -TTP) oder mit Präimmenserum (IP: Prä-IS) inkubiert. Copräzipitiertes KSRP wurde in Western-Blot-Analysen mit einem monoklonalen Antikörper gegen KSRP analysiert (WB: α -KSRP). Zum Vergleich wurden 5 % des eingesetzten Extrakts aufgetragen (Input). Dieser Western-Blot ist repräsentativ für insgesamt drei Co-Immunpräzipitations-Analysen.

VIII.4.9 Die Interaktion von KSRP und TTP ist nach Hemmung der p38-MAPK durch SB 203580 vermindert

Um zusätzlich einen Effekt des p38-MAPK-Inhibitors SB 203580 auf die TTP-KSRP-Interaktion zu analysieren, wurden DLD-1-Zellen vor der Stimulation mit Zytokinen (VII.1.4) für eine Stunde mit 10 μ M SB 203580 (SB+) oder DMSO (SB-) vorbehandelt. Mit den gewonnenen Extrakten wurden nach einem RNase-Verdau Immunpräzipitationen mit einem monoklonalen Antikörper gegen KSRP durchgeführt. Western-Blot-Analysen mit einem polyklonalen KSRP-Antikörper zeigen eine gleichmäßige Präzipitation von KSRP in allen Extrakten. Zum Vergleich wurden 5 % des eingesetzten Extrakts aufgetragen (Input)

(Abbildung 30B). Die Analyse der TTP-Proteinexpression zeigt nach Hemmung der p38-MAPK eine Abschwächung der unter Zytokinen verstärkten Interaktion von KSRP und TTP (Abbildung 30A). Als Negativkontrolle wurde ein Präimmunsereum für die Immunpräzipitation eingesetzt; hier war nur die schwere Kette des Immunglobulins (hc: „heavy chain“) detektierbar.

A)



B)

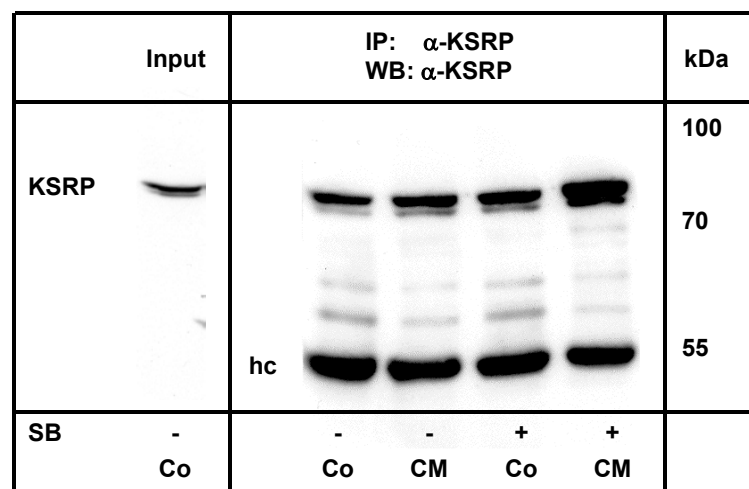


Abbildung 30: Die Interaktion von KSRP und TTP ist nach Hemmung der p38-MAPK vermindert

DLD-1-Zellen wurden für eine Stunde mit $10 \mu\text{M}$ SB 203580 (SB+) oder DMSO (SB-) und anschließend für vier Stunden mit (CM) oder ohne Zytokine (Co) inkubiert. Dann wurden Gesamtzellextrakte gewonnen, mit RNase behandelt und anschließend eine Immunpräzipitation mit einem monoklonalen Antikörper gegen KSRP durchgeführt (IP: α -KSRP). Als Negativkontrolle diente die Inkubation mit einem Präimmunsereum (IP: Prä-IS).

A) Copräzipitiertes TTP wurde in Western-Blot-Analysen unter Verwendung eines polyklonalen Antikörpers analysiert (WB: α -TTP). In der Negativkontrolle erkennt man die schwere Kette (hc: „heavy chain“) des Immunglobulins. Der Blot ist für insgesamt drei Western-Blot-Analysen repräsentativ.

B) Zur Normierung des präzipitierten KSRP wurden Western-Blot-Analysen mit einem polyklonalen Antikörper gegen KSRP durchgeführt (WB: α -KSRP). Zur Kontrolle wurden zusätzlich 5 % des eingesetzten Extrakts aufgetragen (Input). Die Banden für KSRP (KSRP) und für die schwere Kette des Immunglobulins (hc) sind markiert.

VIII.4.10 Überexpression einer nicht-bindenden KSRP-Mutante erhöht die Expression der iNOS

Da TTP die iNOS-mRNA stabilisiert, ohne mit ihr zu interagieren, wurde der Effekt der Bindung von KSRP an die iNOS-mRNA überprüft. Deletion der carboxy-terminalen RNA-Bindungsdomäne (KH4) von KSRP erzeugt eine dominant-negative KSRP-Isoform, die mit dem Exosom interagieren kann, aber nicht mehr in der Lage ist, an ARE-haltige mRNAs zu binden (Gherzi *et al.*, 2004). Um den Effekt dieser nicht-bindenden Mutante auf die iNOS-Expression zu analysieren, wurden DLD-1-Zellen generiert, die diese stabil überexprimierten (DLD-1-pcDNA-KSRPdel). Zunächst wurde die Expression der KSRP-Mutante in diesen Zellen mit Western-Blot-Analysen überprüft. Zum Vergleich wurden DLD-1-pcDNA3-Kontrollzellen analysiert (Abbildung 31).

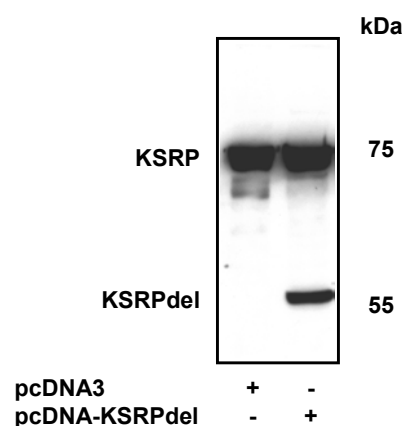
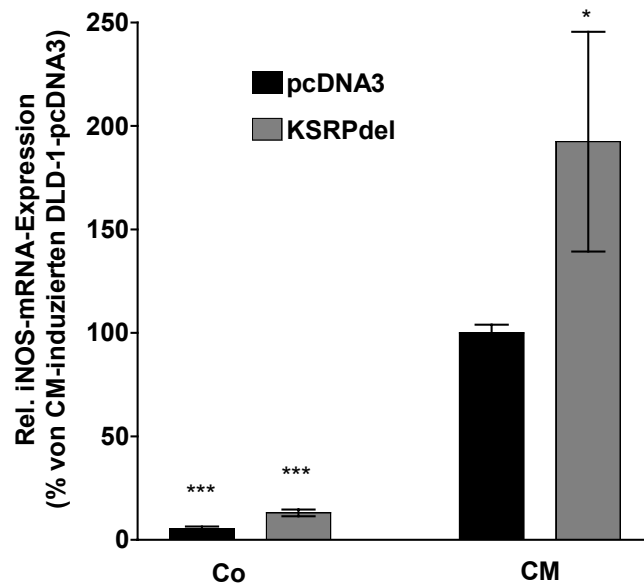


Abbildung 31: Expression einer nicht-bindenden KSRP-Mutante in stabil transfizierten DLD-1-Zellen

Repräsentativer Blot für drei unabhängige Western-Blot-Analysen mit einem monoklonalen Antikörper gegen KSRP. Eingesetzt wurden 50 µg Extrakte aus stabil transfizierten DLD-1-Zellen (pcDNA3, pcDNA-KSRPdel). Die Positionen von KSRP und der nicht-bindenden KSRP-Mutante (KSRPdel) sind angezeigt.

Die DLD-1-pcDNA3- und DLD-1-pcDNA-KSRPdel-Zellen wurden für sechs Stunden mit Zytokinen stimuliert (CM) (VII.1.4) oder in Serum-freiem Medium inkubiert (Co). Dann wurde RNA isoliert und die iNOS-mRNA-Expression mittels qRT-PCR-Analysen untersucht. Zur Auswertung wurde die iNOS-mRNA-Menge in CM-stimulierten DLD-1-pcDNA3-Zellen als 100 % gesetzt. Im Vergleich zu den Kontrollzellen ist die Zytokin-stimulierte iNOS-Expression in DLD-1-Zellen, die die nicht-bindende KSRP-Mutante exprimieren, auf ungefähr das Doppelte erhöht (Abbildung 32A). Zusätzlich wurde auch die iNOS-vermittelte NO-Produktion als kumulatives Nitrit im Zellkulturüberstand dieser Zellen nach 24-stündiger Inkubation mit (CM) oder ohne Zytokine (Co) gemessen. Verglichen wurde wiederum mit CM-stimulierten DLD-1-pcDNA3-Zellen. Auch die NO-Produktion ist in den DLD-1-pcDNA-KSRPdel-Zellen auf mehr als das Doppelte erhöht (Abbildung 32B). Die Bindung von KSRP an die iNOS-mRNA ist demnach für die Vermittlung des destabilisierenden Effekts notwendig.

A)



B)

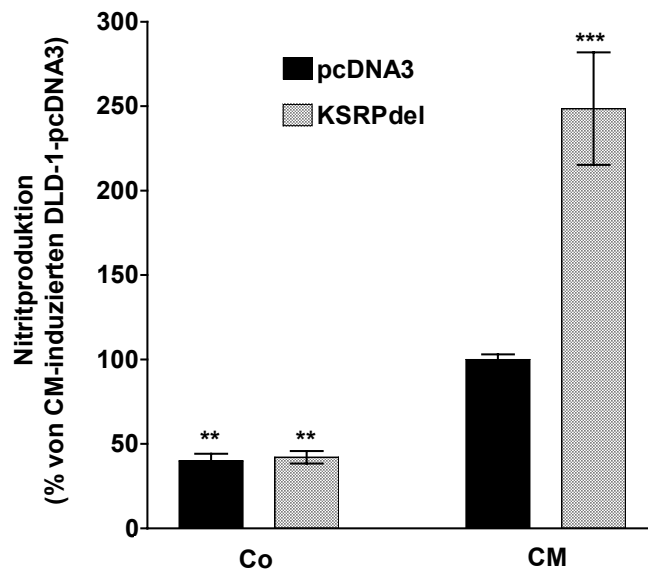


Abbildung 32: Überexpression einer nicht-bindenden KSRP-Mutante erhöht die iNOS-Expression

Mit *pcDNA3* oder *pcDNA-KSRPdel* stabil transfizierte DLD-1-Zellen wurden für sechs oder 24 Stunden mit einem Zytokingemisch stimuliert (CM). Zur Kontrolle wurden Zellen für sechs oder 24 Stunden in Serum-freiem Medium inkubiert (Co).

A) Auswertung von fünf unabhängigen qRT-PCR-Analysen mit RNA aus DLD-1-*pcDNA3*- und DLD-1-*pcDNA-KSRPdel*-Zellen und einer Sonde gegen die iNOS-mRNA. Die Säulen (Mittelwert \pm SEM) repräsentieren relative iNOS-mRNA-Mengen in Bezug auf die iNOS-mRNA-Menge in für sechs Stunden mit Zytokinen inkubierten DLD-1-*pcDNA3*-Zellen (***: $p < 0,001$; *: $p < 0,05$ in Bezug auf CM-inkubierte DLD-1-*pcDNA3*-Zellen).

B) Auswertung von fünf unabhängigen Nitritmessungen von Überständen aus DLD-1-*pcDNA3*- und DLD-1-*pcDNA-KSRPdel*-Zellen. Die Säulen (Mittelwert \pm SEM) repräsentieren relative Nitritmengen in Bezug auf die Nitritmenge in für 24 Stunden mit Zytokinen inkubierten DLD-1-*pcDNA3*-Zellen (***: $p < 0,001$; **: $p < 0,01$ in Bezug auf CM-inkubierte DLD-1-*pcDNA3*-Zellen).

VIII.4.11 Bindung von KSRP an die iNOS-mRNA

Um die Bindungsstelle von KSRP an der iNOS-mRNA genauer lokalisieren zu können, wurden UV-Crosslink-Experimente (VII.3.7) mit einem GST-KSRP-Fusionsprotein und verschiedenen Fragmenten der 3'-UTR der iNOS-mRNA als Sonden durchgeführt. Die eingesetzten Fragmente und ihre Lage in der iNOS-3'-UTR sind in Abbildung 33 dargestellt.

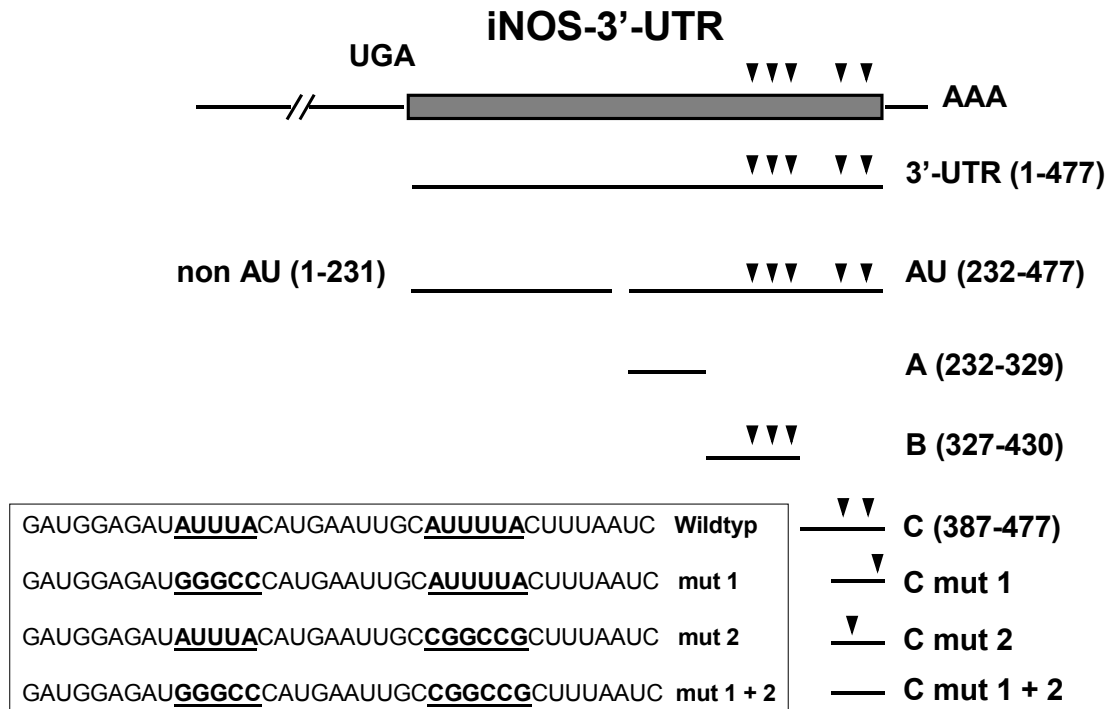


Abbildung 33: Fragmente für UV-Crosslink-Experimente und ihre Lage in der iNOS-mRNA

Schema der humanen iNOS-3'-UTR-mRNA (477 nt) und der Transkripte für UV-Crosslink-Experimente. Die initiale UGA-Sequenz entspricht dem Stopcodon für die Translation. AUUUA und AUUUUA-Sequenzen sind mit Pfeilspitzen angezeigt. Außerdem sind die Sequenzen der Mutationen in Fragment C dargestellt.

VIII.4.11.1 KSRP bindet an den AU-reichen Teil der iNOS-3'-UTR-mRNA

Zunächst wurde die Bindung von KSRP an die 3'-UTR der iNOS-mRNA überprüft. Wie aufgrund der RNA-Affinitätschromatographie-Aufreinigung zu erwarten, interagiert KSRP mit der iNOS-3'-UTR. Als Negativkontrolle diente der GST-Anteil des Fusionsproteins oder BSA, das keine Bindung aufwies. Als Positivkontrolle ist die bereits bekannte Bindung von HuR an die iNOS-3'-UTR dargestellt (Rodriguez-Pascual *et al.*, 2000). In weiteren UV-Crosslink-Analysen konnte festgestellt werden, dass KSRP nur mit dem Teil der iNOS-3'-UTR interagiert, der die AU-reichen Sequenzen enthält (Abbildung 34).

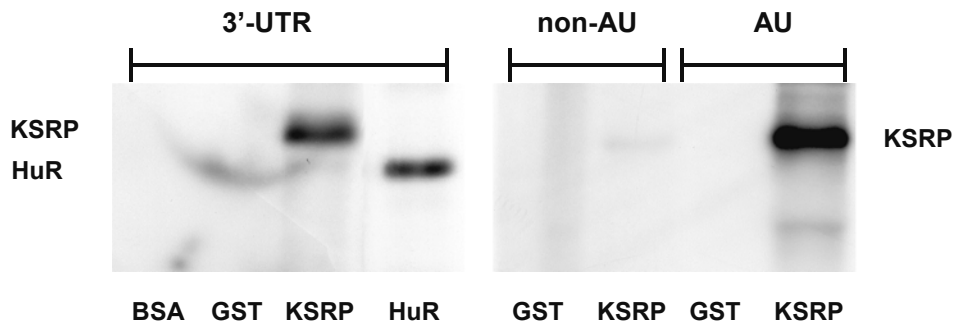


Abbildung 34: KSRP bindet an den AU-reichen Teil der iNOS-mRNA

Autoradiographie eines repräsentativen Gels von UV-Crosslink-Experimenten. ^{32}P -markierte RNA-Transkripte (3'-UTR, non-AU, AU (Abbildung 33)) wurden mit BSA, GST, GST-KSRP (KSRP) oder GST-HuR (HuR) inkubiert. Die Positionen der RNA-Protein-Komplexe sind angezeigt.

VIII.4.11.2 KSRP bindet an das am 3'-Ende der iNOS-3'-UTR gelegene ARE

Es erfolgte eine weitere Aufgliederung des AU-reichen Teils der iNOS-3'-UTR in die Fragmente A, B und C (Abbildung 33). Von diesen enthält Fragment A kein AU-reiches Element; in Fragment B befinden sich drei und in Fragment C zwei AU-reiche Sequenzen. In UV-Crosslink-Experimenten mit diesen Transkripten zeigt das GST-KSRP-Fusionsprotein die höchste Affinität zu Fragment C (Abbildung 35). Daraufhin wurden die beiden AU-Motive in Fragment C einzeln oder getrennt zu GC-reichen Sequenzen mutiert (Abbildung 33). Auch diese Transkripte wurden mit GST-KSRP inkubiert. Es zeigt sich, dass KSRP nach Mutation des ersten AREs noch an das Fragment binden kann, jedoch ist nach Mutation des zweiten AREs oder nach Mutation beider AREs in Fragment C keine Interaktion mehr von KSRP mit den Transkripten festzustellen (Abbildung 35). Demzufolge bindet KSRP an das am 3'-Ende der iNOS-3'-UTR-mRNA gelegene AU-reiche Element.

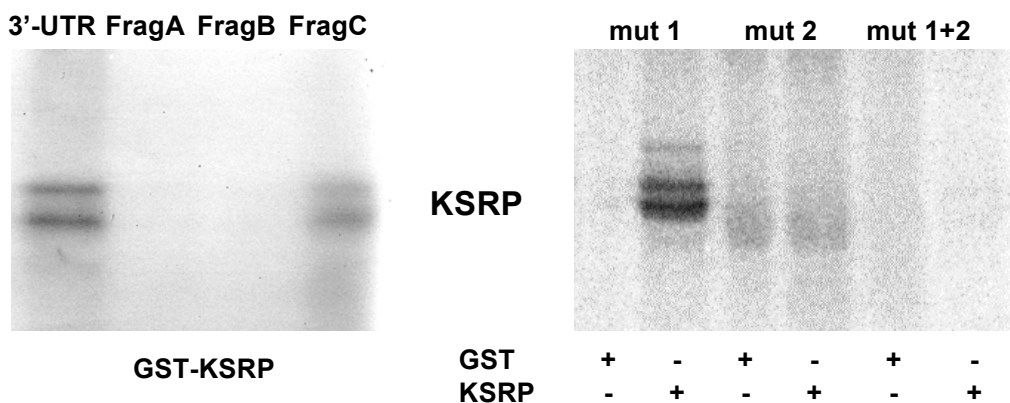


Abbildung 35: KSRP bindet an das am 3'-Ende der iNOS-3'-UTR-mRNA gelegene ARE

Autoradiographie eines repräsentativen Gels von UV-Crosslink-Experimenten. ^{32}P -markierte Transkripte der iNOS-3'-UTR, Fragment A (FragA), Fragment B (FragB) und Fragment C (FragC) (Abbildung 33) wurden mit GST-KSRP (KSRP) inkubiert. Die Positionen der RNA-Protein-Komplexe sind angezeigt (linke Bildhälfte).

^{32}P -markierte Transkripte von Fragment C mit Mutation des 5'-AREs (mut 1), des 3'-AREs (mut 2) oder beider AREs (mut 1+2) wurden mit GST oder GST-KSRP (KSRP) inkubiert. Die Positionen der RNA-Protein-Komplexe sind angezeigt (rechte Bildhälfte).

VIII.4.12 Konkurrenz von KSRP und HuR um die gleiche Bindungsstelle an der iNOS-mRNA

Neben KSRP interagiert auch das RNA-bindende Protein HuR mit dem am 3'-Ende der iNOS-3'-UTR-mRNA gelegenen ARE (Rodriguez-Pascual *et al.*, 2000). Im Folgenden wurde deshalb untersucht, ob KSRP und HuR um diese Bindungsstelle konkurrieren. Dazu wurden UV-Crosslink-Experimente mit ^{32}P -markierten Transkripten von Fragment C, gleichbleibenden Mengen von GST-HuR und steigenden Mengen von GST-KSRP durchgeführt. Ebenso wurde das Bindungsverhalten von gleichbleibenden Mengen GST-KSRP unter Zugabe steigender Mengen von GST-HuR untersucht. Beide Versuche zeigen, dass sowohl KSRP als auch HuR in der Lage sind, sich gegenseitig von ihrer Bindungsstelle zu verdrängen (Abbildung 36).

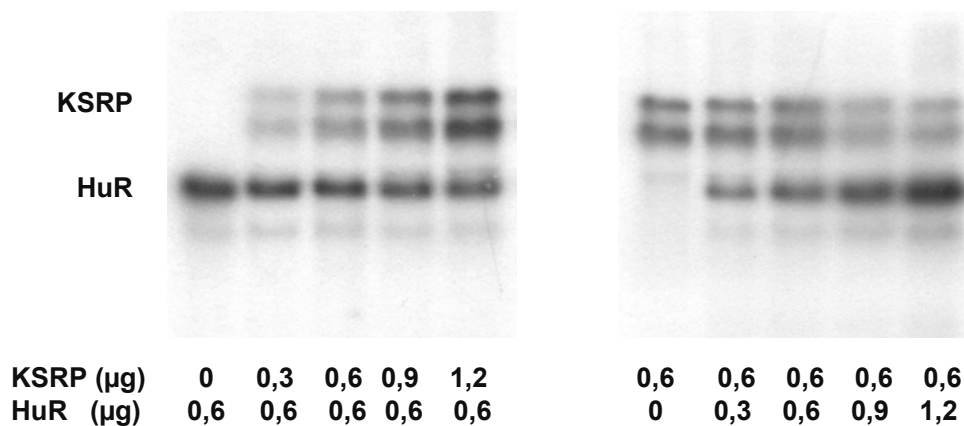


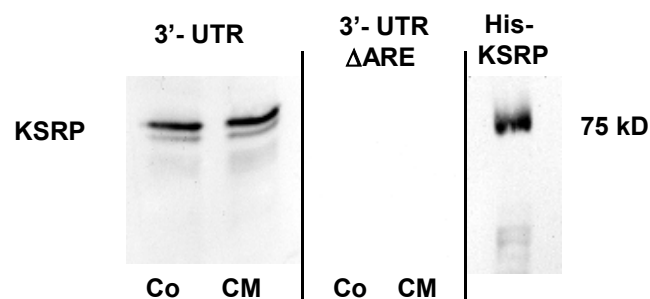
Abbildung 36: KSRP und HuR konkurrieren um die gleiche Bindungsstelle an der iNOS-3'-UTR-mRNA
 Autoradiographie eines repräsentativen Gels von UV-Crosslink-Experimenten. ^{32}P -markierte Transkripte von Fragment C wurden gleichzeitig mit gleichbleibenden Mengen GST-HuR (HuR; 0,6 µg) und ansteigenden Mengen GST-KSRP (KSRP; 0-1,2 µg) (linke Bildhälfte) oder mit gleichbleibenden Mengen GST-KSRP (KSRP; 0,6 µg) und ansteigenden Mengen GST-HuR (HuR; 0-1,2 µg) (rechte Bildhälfte) inkubiert. Die RNA-Proteinkomplexe von KSRP und HuR sind angezeigt.

VIII.4.13 Keine Veränderung der Bindungsaffinität von KSRP an die iNOS-3'-UTR in RNA-Affinitätschromatographie- und Immunpräzipitations-UV-Crosslink-Analysen

Um zu überprüfen, ob sich nach Stimulation der iNOS-Expression mit Zytokinen die Affinität der Bindung von KSRP an die iNOS-3'-UTR-mRNA verändert, wurden zunächst erneut RNA-Affinitätschromatographie-Aufreinigungen (VII.2.17) mit 2 mg zytoplasmatischen Extrakten aus unbehandelten (Co) oder Zytokin-stimulierten (CM) (VII.1.4) DLD-1-Zellen und einer biotinylierten Sonde der iNOS-3'-UTR mit (3'-UTR) oder ohne AREs (3'-UTRΔARE) durchgeführt. In anschließenden Western-Blot-Analysen mit einem monoklonalen Antikörper gegen KSRP wurde wie erwartet eine Bindung von KSRP nur an das ARE-haltige Transkript

gefunden. Allerdings war kein Unterschied der Bindungsaffinität nach Inkubation von Extrakten aus Kontrollzellen oder Zytokin-stimulierten Zellen festzustellen. Zum Vergleich wurde aufgereinigtes His-KSRP aufgetragen (Abbildung 37A). Eine mögliche Änderung der Bindungsaffinität von KSRP an die iNOS-3'-UTR wurde weiterhin mithilfe einer zweiten Methode, der kombinierten Immunpräzipitations-UV-Crosslink-Analyse, untersucht. Hierbei wurden Extrakte aus unbehandelten (Co) oder für verschiedene Zeiten mit Zytokinen stimulierten DLD-1-Zellen (VII.1.4) mit einem polyklonalen Antikörper gegen KSRP immunpräzipitiert. Mit den Präzipitaten wurden anschließend UV-Crosslink-Experimente unter Verwendung eines ^{32}P -markierten iNOS-3'-UTR-Transkripts durchgeführt. Auch hier ergab sich keine Änderung der Bindungsaffinität von KSRP an die iNOS-3'-UTR nach Zytokin-Stimulation (Abbildung 37B). Demnach ändert sich die Affinität der Bindung von KSRP an die iNOS-3'-UTR nach Zugabe einer *in vitro*-transkribierten Sonde zu Extrakten aus unbehandelten oder Zytokin-stimulierten DLD-1-Zellen nicht.

A)



B)

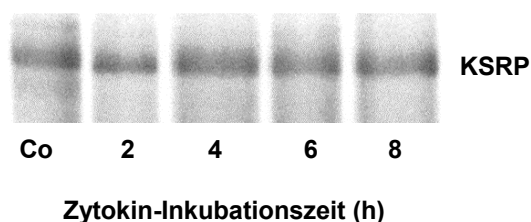


Abbildung 37: Keine Veränderung der Bindungsaffinität von KSRP an eine iNOS-3'-UTR-Sonde

A) Eine repräsentative Western-Blot-Analyse von drei RNA-Affinitätschromatographie-Aufreinigungen. DLD-1-Zellen wurden für vier Stunden mit (CM) oder ohne (Co) Zytokine behandelt. Nach Lyse der Zellen wurden 2 mg zytoplasmatische Extrakte mit biotinylierten iNOS-3'-UTR-Transkripten mit (3'-UTR) oder ohne AREs (3'-UTR Δ ARE) inkubiert und die daran gebundenen Proteine eluiert. Anschließende Western-Blot-Analysen wurden mit einem monoklonalen Antikörper gegen KSRP durchgeführt. Als Positivkontrolle wurde ein His-KSRP-Fusionsprotein aufgetragen.

B) Repräsentativer Immunpräzipitations-UV-Crosslink für insgesamt vier Analysen. DLD-1-Zellen wurden für zwei, vier, sechs oder acht Stunden mit einem Zytokingemisch behandelt. Zur Kontrolle wurden Zellen für vier Stunden ohne Zytokine inkubiert (Co). Extrakte aus diesen Zellen wurden mit einem polyklonalen Antikörper gegen KSRP immunpräzipitiert; mit dem Präzipitat und einem ^{32}P -markierten Transkript der iNOS-3'-UTR wurden dann UV-Crosslink-Experimente durchgeführt. Die RNA-Protein-Komplexe sind angezeigt.

VIII.4.14 Die endogene Bindung von KSRP an die iNOS-3'-UTR ist nach Zytokin-Stimulation verringert, während gleichzeitig die endogene Bindung von HuR zunimmt

Da sich die Affinität der Bindung von KSRP an die iNOS-3'-UTR nach Zytokin-Stimulation nicht zu ändern scheint, sollte nun die Relevanz der Konkurrenz von KSRP und HuR um die gleiche Bindungsstelle an der iNOS-3'-UTR analysiert werden. Dazu wurden die endogenen Bindungsverhältnisse mittels kombinierter Immunpräzipitations-qRT-PCR-Analysen (VII.3.9) untersucht. Verwendet wurden dazu Extrakte aus für vier Stunden mit Zytokinen stimulierten (CM) (VII.1.4) oder unbehandelten (Co) DLD-1-Zellen. Nach Immunpräzipitation der Extrakte mit monoklonalen Antikörpern gegen HuR oder KSRP unter RNase-freien Bedingungen wurde die präzipitierte iNOS-mRNA in qRT-PCR-Analysen detektiert. Zum Normieren wurde vor der Aufreinigung der präzipitierten RNA *in vitro*-transkribierte Luciferase zugegeben, die dann auch in qRT-PCR-Analysen bestimmt wurde. Als Negativkontrolle wurde eine Immunpräzipitation mit einem IgG-Antikörper durchgeführt. Die in diesem Ansatz detektierte iNOS-mRNA-Menge wurde im Verlauf der weiteren Auswertung als Hintergrundwert jeweils von der iNOS-mRNA-Menge nach Immunpräzipitation mit dem KSRP- oder HuR-Antikörper abgezogen. Dann wurde die von HuR gebundene iNOS-mRNA-Menge durch die von KSRP gebundene iNOS-mRNA-Menge dividiert, sodass das Verhältnis der Bindung von HuR und KSRP mit oder ohne Zytokinbehandlung dargestellt werden konnte. Dabei konnte festgestellt werden, dass sich das Verhältnis der HuR-Bindung zur Bindung von KSRP an die iNOS-mRNA nach Zytokin-Stimulation um ungefähr das Dreifache erhöht (Abbildung 38). Das bedeutet, dass unter dem Einfluss von Zytokinen die Bindung von HuR an die iNOS-3'-UTR zunimmt, wohingegen gleichzeitig die Bindung von KSRP an diese Bindungsstelle abgeschwächt wird.

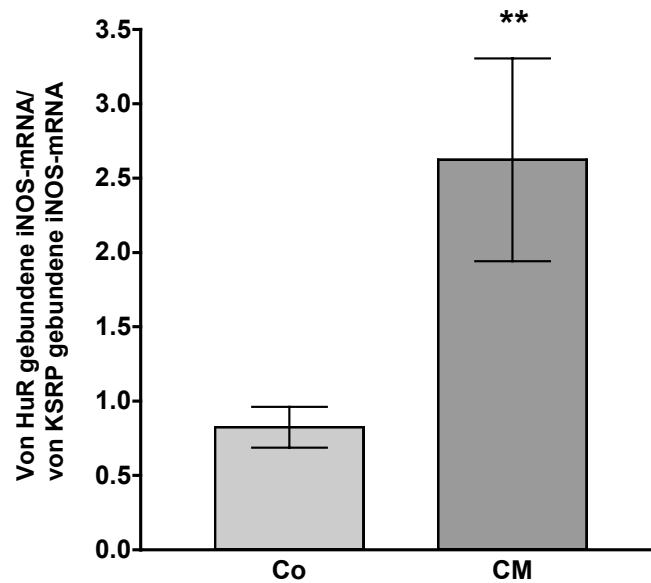


Abbildung 38: Zytokin-Stimulation verstärkt die Bindung von HuR an die iNOS-3'-UTR, während gleichzeitig die Bindung von KSRP abgeschwächt wird

*DLD-1-Zellen wurden für vier Stunden mit (CM) oder ohne (Co) Zytokine inkubiert. Nach Lyse der Zellen wurde die von HuR oder KSRP gebundene iNOS-mRNA mit spezifischen Antikörpern präzipitiert und in qRT-PCR-Analysen quantifiziert. Zur Normierung wurde vor der Aufreinigung der präzipitierten RNA in vitro-transkribierte Luciferase zugegeben und in den qRT-PCR-Analysen mitbestimmt. Als Hintergrundwert wurde die durch Inkubation mit einem IgG-Antikörper präzipitierte iNOS-mRNA subtrahiert. Dann wurde der Wert der HuR-gebundenen iNOS-mRNA-Menge durch den Wert der KSRP-gebundenen iNOS-mRNA-Menge geteilt, sodass das Verhältnis beider Bindungen dargestellt werden konnte. Gezeigt ist eine repräsentative Analyse von zwölf unabhängigen IP-qRT-PCR-Experimenten. Die Säulen (Mittelwert ± SEM) repräsentieren die von HuR gebundene iNOS-mRNA-Menge dividiert durch die von KSRP gebundene iNOS-mRNA-Menge (**: $p < 0,01$ in Bezug auf das Bindungsverhältnis ohne Zytokin-Stimulation).*

VIII.5 Das Polypyrimidin-Trakt-bindende Protein (PTB) reguliert die humane iNOS-Expression

Da für KSRP und PTB ein ähnliches Verteilungsmuster in der Zelle beschrieben wurde (Hall *et al.*, 2004) und bekannt ist, dass PTB mit der murinen iNOS interagiert (Soderberg *et al.*, 2002), wurde auch eine mögliche Beteiligung von PTB an der Regulation der humanen iNOS-Expression analysiert.

VIII.5.1 PTB und KSRP weisen die gleiche subzelluläre Lokalisation auf

Zunächst wurde die Verteilung von KSRP und PTB in der Zelle untersucht. Dafür wurden DLD-1-Zellen stabil mit einem EGFP-PTB-Konstrukt transfiziert, das zur Expression eines Fusionsproteins aus dem „enhanced green fluorescent protein“ und PTB führte (DLD-1-pEGFP-PTB). Mittels FACS (Fluoreszenz-aktiviertes Zell-Sortieren) wurden die EGFP-positiven Zellen angereichert. In diesen Zellen konnte dann auch die PTB-Lokalisation direkt durch die grüne Fluoreszenz des EGFP-Anteils des EGFP-PTB-Fusionsproteins analysiert werden. Als Kontrolle dienten DLD-1-Zellen, die nur den EGFP-Leervektor enthielten (DLD-1-pEGFP). Die Zellen wurden zunächst für vier Stunden mit Zytokinen stimuliert (CM) oder in Serum-freiem Medium inkubiert (Co). Dann wurden sie fixiert und Immunfluoreszenzfärbungen (VII.3.10) unter Verwendung eines monoklonalen Antikörpers gegen KSRP durchgeführt. Die Bindung des Primärantikörpers an KSRP wurde durch Kopplung an einen Cy3-markierten Sekundärantikörper sichtbar gemacht. Außerdem wurde zur besseren Unterscheidung der Zellkompartimente der Zellkern mit DAPI angefärbt. In den Fluoreszenzfärbungen der DLD-1-pEGFP-PTB-Zellen ist deutlich zu erkennen, dass sowohl PTB als auch KSRP vornehmlich im Zellkern lokalisiert sind. Es fällt jedoch auf, dass sich PTB meist in der Nähe des Nukleolus punktförmig anreichert, während KSRP etwas diffuser verteilt zu sein scheint. Nach Zytokin-Stimulation ändert sich aber weder die Lokalisation von PTB noch die Verteilung von KSRP in der Zelle (Abbildung 39). Die DLD-1-pEGFP-Kontrollzellen zeigen eine gleichmäßige Verteilung von EGFP im Zellkern und im Zytoplasma, sodass der EGFP-Anteil des EGFP-PTB-Fusionsproteins die Lokalisation von PTB nicht beeinflusst (Daten hier nicht gezeigt).

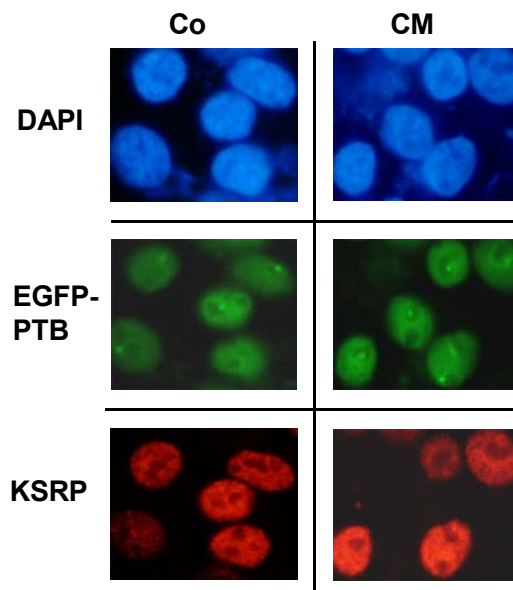


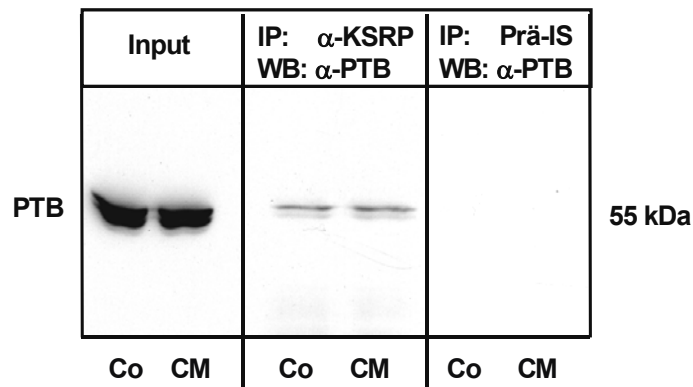
Abbildung 39: PTB und KSRP weisen die gleiche subzelluläre Lokalisation auf

DLD-1-pEGFP-PTB-Zellen wurden für vier Stunden mit einem Zytokingemisch stimuliert (CM). Zur Kontrolle wurden Zellen für vier Stunden ohne Zytokine inkubiert (Co). Nach Fixierung der Zellen erfolgte die Inkubation mit einem monoklonalen KSRP-Antikörper; dessen Bindung an KSRP wurde durch Inkubation mit einem fluoreszenzmarkierten Sekundärantikörper sichtbar gemacht. PTB konnte direkt durch die grüne Fluoreszenz des EGFP-Anteils des Fusionsproteins analysiert werden. Zellkerne wurden mit DAPI angefärbt. Die Lokalisation der Proteine wurde dann mittels Fluoreszenzmikroskopie sichtbar gemacht. Eine repräsentative von insgesamt drei Immunfluoreszenzfärbungen ist hier dargestellt.

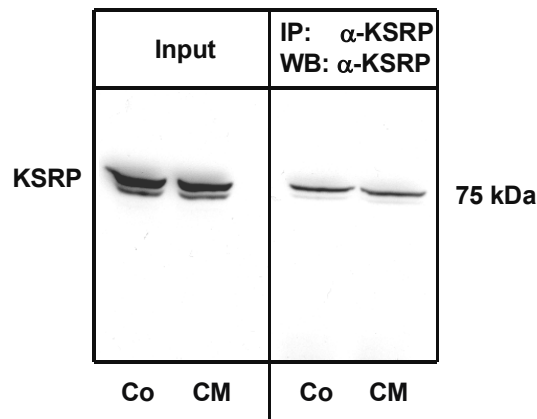
VIII.5.2 PTB interagiert mit KSRP

Aufgrund der räumlichen Nähe erschien es wahrscheinlich, dass auch PTB und KSRP miteinander interagieren können. Um dies zu testen, wurden Co-Immunpräzipitations-Analysen mit einem polyklonalen Antikörper gegen KSRP durchgeführt (IP: α -KSRP). Dazu wurden Gesamtzellextrakte aus unbehandelten (Co) oder für vier Stunden mit Zytokinen stimulierten (CM) DLD-1-Zellen (VII.1.4) eingesetzt. Diese wurden zunächst mit RNase behandelt, um die Detektion RNA-vermittelter Interaktionen zwischen Proteinen zu vermeiden. Als Negativkontrolle wurde eine Immunpräzipitation mit einem Präimmenserum (IP: Prä-IS) durchgeführt. Anschließende Western-Blot-Analysen mit einem monoklonalen Antikörper gegen PTB zeigen eine deutliche Interaktion zwischen KSRP und PTB (Abbildung 40A). Zum Vergleich wurden auch 5 % des eingesetzten Extrakts analysiert (Input). Der Erfolg der Immunpräzipitation von KSRP wurde in einer Western-Blot-Analyse mit einem monoklonalen Antikörper gegen KSRP überprüft (Abbildung 40B). Zytokinbehandlung der DLD-1-Zellen verursacht keine Veränderung der Wechselwirkung zwischen KSRP und PTB.

A)



B)

**Abbildung 40: PTB interagiert mit KSRP**

In DLD-1-Zellen wurde die iNOS-Expression durch Zugabe eines Zytokingemisches für vier Stunden stimuliert (CM). Zur Kontrolle wurden Zellen für vier Stunden in Serum-freiem Medium inkubiert (Co). Dann wurden Gesamtzellextrakte gewonnen. Diese wurden zunächst mit RNase vorbehandelt, um die Detektion RNA-bedingter Interaktionen zwischen Proteinen zu vermeiden. Dann wurden mit einem polyklonalen Antikörper gegen KSRP (IP: α -KSRP) oder einem Präimmenserum (IP: Prä-IS) Co-Immunpräzipitations-Analysen durchgeführt. Die präzipitierten Proteine wurden mittels Western-Blot-Analysen sichtbar gemacht.

A) Repräsentativer Blot für drei Western-Blot-Analysen mit einem monoklonalen Antikörper gegen PTB (WB: α -PTB). Zum Vergleich wurden 5 % des Ausgangsextrakts (Input) eingesetzt.

B) Western-Blot-Analyse mit einem monoklonalen Antikörper gegen KSRP (WB: α -KSRP) zur Überprüfung der Effizienz der Immunpräzipitation. Zum Vergleich wurden 5 % des Ausgangsextrakts (Input) eingesetzt. Dieser Blot ist für drei Western-Blot-Analysen repräsentativ.

VIII.5.3 Überexpression von PTB erhöht die Expression der iNOS

Um zu überprüfen, ob PTB einen Einfluss auf die Expression der humanen iNOS hat, wurden DLD-1-pEGFP-PTB-Zellen und Kontrollzellen (DLD-1-pEGFP) für sechs Stunden mit Zytokinen (CM) stimuliert oder in Serum-freiem Medium ohne Zytokine (Co) inkubiert (VII.1.4). Dann wurde RNA isoliert und die iNOS-mRNA-Expression in qRT-PCR-Analysen bestimmt. Zur Auswertung wurde die iNOS-mRNA-Menge in CM-stimulierten DLD-1-pEGFP-Zellen als 100 % gesetzt. In diesen Versuchen ist eine bis zu dreifache Steigerung der Zytokin-stimulierten iNOS-mRNA-Expression in den PTB-überexprimierenden Zellen im Vergleich zu Kontrollzellen erkennbar (Abbildung 41A). Auch auf Ebene der iNOS-vermittelten NO-Produktion bestätigt sich der positiv regulatorische Effekt von PTB auf die iNOS-Expression (Abbildung 41B). Hierzu wurden die DLD-1-pEGFP- und DLD-1-pEGFP-PTB-Zellen für 24 Stunden mit Zytokinen stimuliert (CM) oder in Serum-freiem Medium ohne Zytokine inkubiert (Co), bevor im Zellkulturüberstand die kumulative Nitritmenge mittels NO-Analyser bestimmt wurde. Hier ist in den DLD-1-pEGFP-PTB-Zellen eine Verdoppelung der Zytokin-stimulierten NO-Produktion im Vergleich zu Kontrollzellen festzustellen. Überexpression von PTB erhöht demnach die Expression der humanen iNOS.

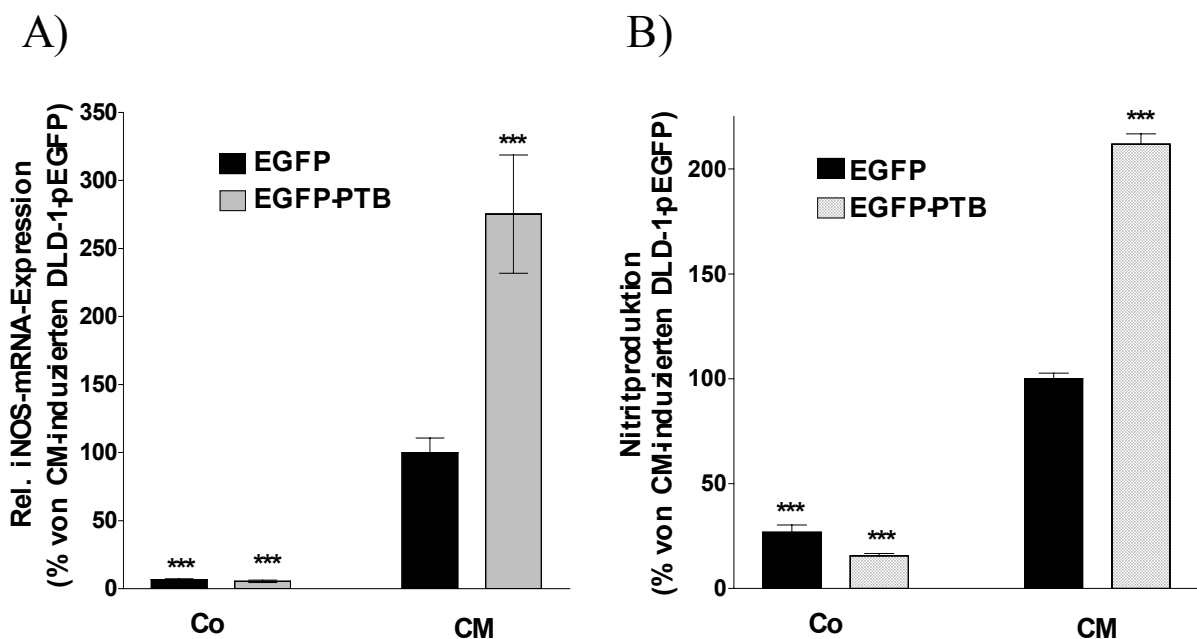


Abbildung 41: Überexpression von PTB erhöht die iNOS-Expression

DLD-1-pEGFP- und DLD-1-pEGFP-PTB-Zellen wurden für sechs oder 24 Stunden mit einem Zytokingemisch (CM) stimuliert. Zur Kontrolle wurden Zellen für sechs oder 24 Stunden in Serum-freiem Medium inkubiert (Co).

A) Auswertung von sechs unabhängigen qRT-PCR-Analysen mit RNA aus DLD-1-pEGFP- und DLD-1-pEGFP-PTB-Zellen und einer Sonde gegen die iNOS-mRNA. Die Messpunkte (Mittelwert \pm SEM) repräsentieren relative iNOS-mRNA-Mengen in Bezug auf die iNOS-mRNA-Menge in für sechs Stunden mit Zytokinen behandelten DLD-1-pEGFP-Zellen (***: $p < 0,001$ vs. CM-behandelte DLD-1-pEGFP-Zellen).

B) Auswertung von neun unabhängigen Nitritmessungen von Überständen aus DLD-1-pEGFP- und DLD-1-pEGFP-PTB-Zellen. Die Säulen (Mittelwert \pm SEM) repräsentieren relative Nitritmengen in Bezug auf die Nitritmenge in für 24 Stunden mit Zytokinen behandelten DLD-1-pEGFP-Zellen (***: $p < 0,001$ vs. CM-behandelte DLD-1-pEGFP-Zellen).

VIII.5.4 Verminderung der PTB-Expression erniedrigt die iNOS-mRNA-Expression

Um auch den Effekt der Verminderung der PTB-Expression auf die iNOS-Expression untersuchen zu können, wurde eine siRNA gegen PTB (siPTB) transient in DLD-1-Zellen transfiziert. Als Negativkontrolle diente die transiente Transfektion einer siRNA gegen Luciferase (siLUC). Nach 30 Stunden erfolgte zunächst eine 18-stündige Inkubation in Serumfreiem Medium, bevor die iNOS-Expression durch Zugabe von Zytokinen (VII.1.4) für sechs Stunden induziert wurde (CM). Zur Kontrolle wurden Zellen für sechs Stunden ohne Zytokine inkubiert (Co). Nach Isolierung der RNA wurde zunächst der Erfolg der Herunterregulation der PTB-Expression durch qRT-PCR-Analysen mit einer Sonde gegen die PTB-mRNA überprüft. Abbildung 42A zeigt eine um ungefähr 40 % verringerte mRNA-Expression von PTB unabhängig von der Zytokinbehandlung im Vergleich zu mit einer siRNA gegen Luciferase transfizierten Zellen. Des Weiteren wurden nach Lyse der mit siRNA transfizierten Zellen Western-Blot-Analysen mit einem monoklonalen Antikörper gegen PTB durchgeführt. Zur Ladungskontrolle wurde die Expression von β -Tubulin analysiert. Auch auf Proteinebene ist die Expression von PTB vermindert (Abbildung 42B).

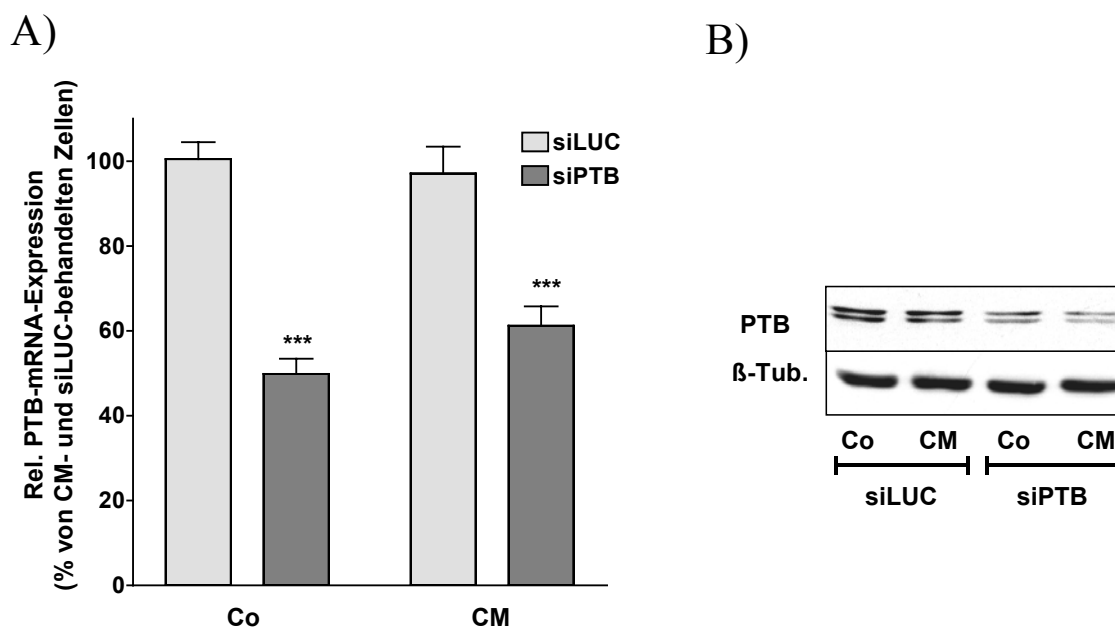


Abbildung 42: Verminderung der PTB-Expression nach Transfektion einer siRNA

DLD-1-Zellen wurden mit einer siRNA gegen PTB (siPTB) oder zur Kontrolle mit einer siRNA gegen Luciferase (siLUC) transfiziert. Dann wurde die iNOS-Expression durch Zugabe eines Zytokingemisches für sechs Stunden stimuliert (CM). Zur Kontrolle wurden Zellen für sechs Stunden ohne Zytokine inkubiert (Co).

A) Auswertung von sechs unabhängigen qRT-PCR-Analysen mit einer Sonde gegen die PTB-mRNA zum Überprüfen der Herunterregulation der PTB-mRNA-Expression. Die Säulen (Mittelwert \pm SEM) repräsentieren relative PTB-mRNA-Mengen in Bezug auf die PTB-mRNA-Menge in siLUC-behandelten Zellen (***: $p < 0,001$ vs. siLUC-behandelte Zellen).

B) Repräsentativer Blot für drei Western-Blot-Analysen mit monoklonalen Antikörpern gegen PTB und β -Tubulin (β -Tub.) zur Überprüfung der Herunterregulation der PTB-Expression nach Transfektion von siRNA auf Proteinebene.

Um den Effekt der verminderten PTB-Expression nach der siRNA-Transfektion auf die iNOS-Expression zu untersuchen, wurde die gleiche RNA in qRT-PCR-Analysen mit einer Sonde gegen die iNOS-mRNA eingesetzt. Zur Auswertung wurde die iNOS-mRNA-Menge in siLUC-transfizierten und CM-stimulierten DLD-1-Zellen als 100 % gesetzt. Die Verminderung der PTB-Expression führte zu einer etwas mehr als 20 %igen Verringerung der iNOS-mRNA-Expression (Abbildung 43).

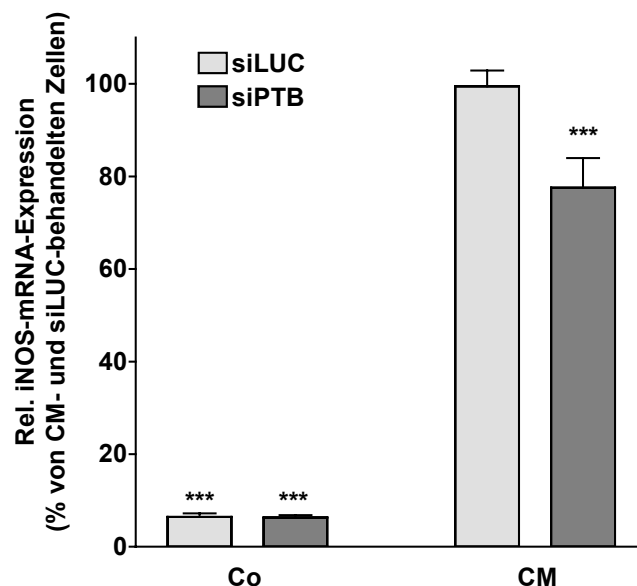


Abbildung 43: Verminderung der PTB-Expression erniedrigt die iNOS-mRNA-Expression

DLD-1-Zellen wurden mit einer siRNA gegen PTB (siPTB) oder Luciferase (siLUC) transfiziert. Dann wurde die iNOS-Expression durch Zugabe eines Zytokingemisches für sechs Stunden stimuliert (CM). Zur Kontrolle wurden Zellen für sechs Stunden ohne Zytokine inkubiert (Co). Dargestellt ist die Auswertung von sechs unabhängigen qRT-PCR-Analysen mit einer Sonde gegen die iNOS-mRNA. Die Säulen (Mittelwert \pm SEM) repräsentieren relative iNOS-mRNA-Mengen in Bezug auf die iNOS-mRNA-Menge in siLUC- und CM-behandelten DLD-1-Zellen (***: $p < 0,001$ vs. siLUC- und CM-behandelte Zellen).

VIII.5.5 Keine Veränderung der Expression von PTB nach Zytokin-Stimulation

Nun wurde untersucht, ob sich die Expression von PTB nach Induktion der iNOS-Expression mit Zytokinen verändert. Dazu wurden DLD-1-Zellen für verschiedene Zeiten mit Zytokinen behandelt (CM) (VII.1.4). Zur Kontrolle wurden DLD-1-Zellen für 24 Stunden in Serum-freiem Medium ohne Zytokine inkubiert (Co). Anschließend wurden aus diesen Zellen Proteinextrakte gewonnen. Die PTB-Expression wurde dann mittels Western-Blot-Analysen mit einem monoklonalen Antikörper gegen PTB untersucht. Zur Normierung der aufgetragenen Proteinmenge wurde auch die Expression von β -Tubulin bestimmt. Es war jedoch keine Veränderung der PTB-Expression nach Stimulation mit Zytokinen festzustellen (Abbildung 44).

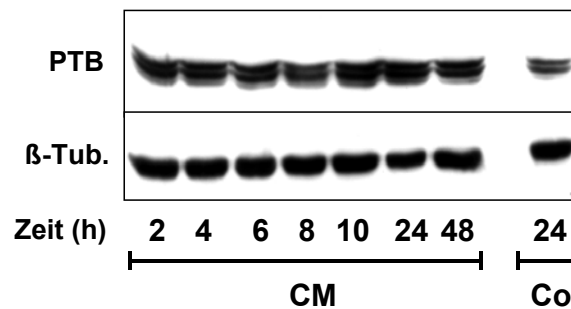


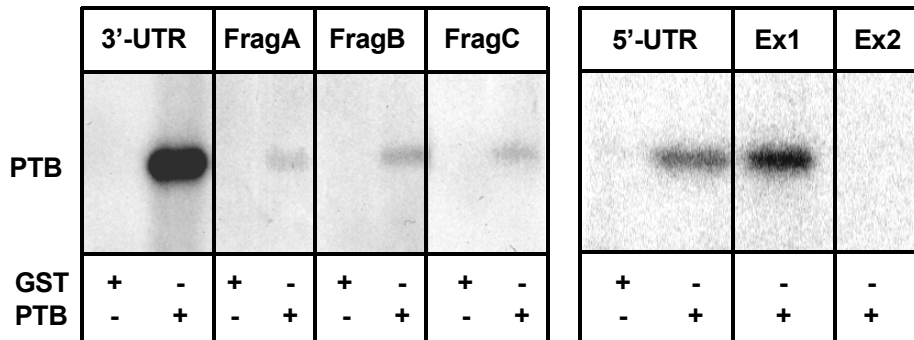
Abbildung 44: Keine Veränderung der PTB-Expression nach Zytokin-Stimulation

In DLD-1-Zellen wurde die iNOS-Expression durch Zugabe eines Zytokingemisches für zwei, vier, sechs, acht, zehn, 24 oder 48 Stunden induziert (CM). Zur Kontrolle wurden Zellen für 24 Stunden ohne Zytokine inkubiert (Co). Mit je 50 µg Proteinextrakten aus diesen Zellen wurden dann Western-Blot-Analysen mit monoklonalen Antikörpern gegen PTB und β-Tubulin (β-Tub.) durchgeführt. Dieser Blot ist repräsentativ für drei Western-Blot-Analysen.

VIII.5.6 PTB bindet an die 3'-UTR und an die 5'-UTR der humanen iNOS-mRNA

Des Weiteren wurde analysiert, ob PTB mit der humanen iNOS-mRNA interagiert. Dazu wurden UV-Crosslink-Experimente mit einem GST-PTB-Fusionsprotein und *in vitro*-transkribierten, ³²P-markierten Sonden von verschiedenen Fragmenten der iNOS-mRNA durchgeführt. Als Negativkontrolle wurde GST verwendet, das mit keinem der Fragmente interagiert. GST-PTB zeigt eine deutliche Bindung nicht nur an die iNOS-3'-UTR, sondern auch an die iNOS-5'-UTR (Abbildung 45A). Eine weitere Aufteilung der 3'-UTR in die Fragmente A, B und C wie unter VIII.4.11 beschrieben zeigt eine schwache Interaktion von PTB mit allen Fragmenten. Da PTB an polypyrimidinreiche Sequenzen mit der Konsensussequenz „UCUU“ bindet (Perez *et al.*, 1997a), wurde das Vorkommen dieser Elemente in der iNOS-3'-UTR-Sequenz überprüft. Tatsächlich enthält jedes der Fragmente A, B und C ein „UCUU“-Element (Abbildung 45B). Eine weitere Unterteilung der iNOS-5'-UTR in Exon 1 (Ex1) und Exon 2 (Ex2) lässt eine klare Bindung von PTB an Exon 1 erkennen (Abbildung 45A). Dieses enthält auch ein „UCUU“-Element in einem zusätzlich pyrimidinreichen Kontext (Abbildung 45B). Demnach bindet PTB wahrscheinlich an die „UCUU“-Sequenzen der 3'- und 5'-untranslatierten Regionen der iNOS-mRNA.

A)



B)

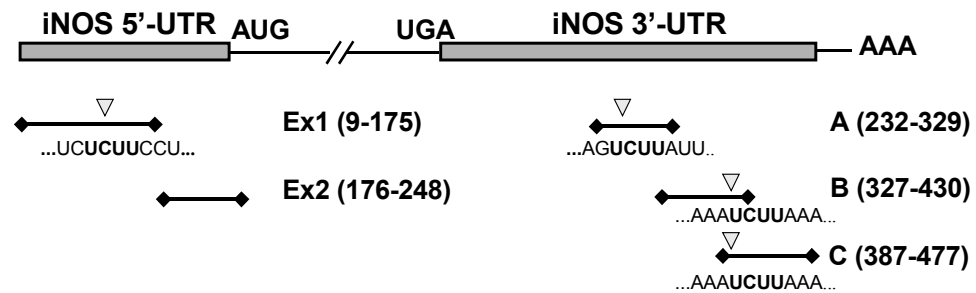


Abbildung 45: PTB interagiert mit der 3'- und 5'-UTR der iNOS-mRNA

A) Autoradiographie eines repräsentativen Gels von UV-Crosslink-Experimenten. ^{32}P -markierte RNA-Transkripte (3'-UTR, FragA, FragB, FragC, 5'-UTR, Ex1, Ex2) (Abbildung 41B) wurden mit GST oder GST-PTB (PTB) inkubiert. Die Positionen der RNA-Protein-Komplexe sind angezeigt.

B) Schema der humanen iNOS-mRNA und der Transkripte für UV-Crosslink-Experimente. Start- (AUG) und Stopcodon (UGA) der Translation sind angegeben. UCUU-Sequenzen sind mit Pfeilspitzen angezeigt.

IX Diskussion

IX.1 Regulation der humanen iNOS-Expression durch post-transkriptionelle Mechanismen

Die Expression eukaryoter Gene wird sowohl durch transkriptionelle als auch durch post-transkriptionelle Mechanismen reguliert. Ein zentraler Teil der post-transkriptionellen Modulation der Genexpression wird dabei über Regulation der mRNA-Stabilität vermittelt. Die Stabilität verschiedener mRNAs variiert beträchtlich und kann durch eine Vielzahl extrazellulärer Stimuli beeinflusst werden (Wilusz *et al.*, 2001). Eine genaue Kontrolle der mRNA-Stabilität ermöglicht es den Zellen, die Expression bestimmter Gene fein abzustimmen. Durch Veränderungen der Menge einer RNA kann letztendlich auch die Produktion des entsprechenden Proteins schnell an die erforderlichen Gegebenheiten angepasst werden. Die Geschwindigkeit des RNA-Abbaus wird von in der mRNA lokalisierten *cis*-Elementen bestimmt, die von *trans*-agierenden Faktoren erkannt werden. Eine Dysregulation der Expression dieser RNA-bindenden Proteine oder Mutationen in den Sequenzen der *cis*-Elemente und damit verbunden einhergehende Funktionsstörungen der Regulation der mRNA-Stabilität werden mit verschiedenen Krankheitsbildern, wie chronisch inflammatorischen Erkrankungen (Kontoyiannis *et al.*, 1999), Tumorentstehung (Gouble *et al.*, 2002) oder M. Alzheimer (Hollams *et al.*, 2002) in Verbindung gebracht. Die am besten charakterisierten *cis*-Elemente, die für den Abbau von mRNA in eukaryoten Zellen verantwortlich gemacht werden, sind die AU-reichen Elemente (AREs). AREs befinden sich vor allem in den 3'-untranslatierten Regionen (3'-UTRs) der mRNA von Zytokinen, Proto-Onkogenen und Wachstumsfaktoren, deren Expression eine exakte Regulation erfordert (Bakheet *et al.*, 2001). Diese AU-reichen Sequenzen sind an der Deadenylierung und am mRNA-Abbau beteiligt (Shyu *et al.*, 1991); sie spielen aber auch eine Rolle beim „5'-Decapping“ (Gao *et al.*, 2001). Inzwischen sind mehr als 15 Proteine bekannt, die an AU-reiche Elemente binden (Hollams *et al.*, 2002), jedoch wurde erst für wenige eine Beteiligung an der Regulation der mRNA-Stabilität beschrieben. Zu diesen zählen beispielsweise das ARE-RNA-bindende Protein 1 (AUF 1) (Zhang *et al.*, 1993), die ELAV-Proteine, wie z.B. HuR (Brennan und Steitz, 2001), KSRP (Chen *et al.*, 2001) und die Tristetraprolin-Familie der Zinkfinger-RNA-bindenden Proteine (Lai *et al.*, 1999).

Die Regulation der Expression der humanen iNOS findet auf verschiedenen Ebenen statt. Da die Induktion der iNOS-Expression nach Stimulation mit LPS oder Zytokinen nicht alleine durch eine Steigerung der Promotoraktivität erklärbar ist, ist eine Beteiligung post-transkriptioneller Mechanismen an der Regulation der iNOS-Expression wahrscheinlich. Die 3'-UTR der humanen iNOS-mRNA enthält fünf AU-reiche Elemente. In Transfektionsexperimenten konnte bereits gezeigt werden, dass die humane iNOS-3'-UTR eine heterologe Reporter-mRNA destabilisiert (Rodriguez-Pascual *et al.*, 2000). Des Weiteren wurde HuR als Faktor beschrieben, der die iNOS-mRNA stabilisiert. Dabei bindet HuR an die 3'-UTR der iNOS-mRNA. Eine Veränderung

der Expression von HuR nach Zytokin-Stimulation konnte jedoch nicht festgestellt werden (Rodriguez-Pascual *et al.*, 2000).

Um zu untersuchen, ob weitere Proteine an der Regulation der iNOS-mRNA-Stabilität beteiligt sind, wurde in A549/8-Zellen, die ein Konstrukt aus einem 16 kb-Fragment des humanen iNOS-Promotors vor einem Luciferase-Reporter gen enthielten, die Translation mit Cycloheximid blockiert, sodass keine weitere Proteinbiosynthese stattfinden konnte. Anschließend wurde die iNOS-Expression mit Zytokinen stimuliert. Der Effekt der Inhibition der Proteinsynthese konnte dann auf Ebene der Promotoraktivität und auf mRNA-Ebene getrennt analysiert werden. Cycloheximid-Behandlung der Zellen verursachte eine Verminderung der iNOS-mRNA-Expression, aber nicht der iNOS-Promotoraktivität (Abbildung 4). Diese Beobachtung liefert einen ersten Hinweis darauf, dass mehrere labile Proteine mit einer kurzen Halbwertszeit über post-transkriptionelle Mechanismen an der Regulation der iNOS-Expression beteiligt sind.

Ein wichtiger Signaltransduktionsweg, der an der Regulation der Expression von ARE-haltigen mRNAs beteiligt ist, ist der p38-MAP-Kinase-Signaltransduktionsweg (Kracht und Saklatvala, 2002). Hemmung der p38-MAPK durch pharmakologische Inhibition oder Überexpression einer dominant-negativen p38-MAPK führen zu einem gesteigerten Abbau von verschiedenen mRNAs mit AU-reichen Sequenzen, wie der Cyclooxygenase-2-mRNA (Ridley *et al.*, 1998) und der IL-1 β -mRNA (Kracht und Saklatvala, 2002), sowie zu einer verringerten Expression der iNOS in Ratten-Mesangialzellen und murinen Makrophagen (Lui *et al.*, 2004).

Um den Effekt der Inhibition der p38-MAPK auf die iNOS-Promotoraktivität sowie auf die iNOS-mRNA- und die iNOS-Proteinexpression zu analysieren, wurden DLD-1-Zellen verwendet, die stabil mit einer Plasmid-DNA transfiziert worden waren, die ein 16 kb-Fragment des humanen iNOS-Promotors vor einem Luciferase-Reporter gen enthielt. qRT-PCR-Analysen, Western-Blot-Experimente und Nitritbestimmungen zeigten, dass eine Inhibition der p38-MAPK durch SB 203580 die iNOS-mRNA- und die iNOS-Proteinexpression vermindert, aber keinen Einfluss auf die Expression der Luciferase und damit auf die iNOS-Promotoraktivität ausübt (Abbildung 5 und 6). Die gleichen Ergebnisse wurden auch durch Inhibition der p38-MAPK mittels Überexpression einer dominant-negativen Isoform erzielt (Fechir *et al.*, 2005a). Ein negativer Effekt der Hemmung der p38-MAPK auf die iNOS-Expression wurde auch in humanen osteoarthritischen Chondrozyten (Martel-Pelletier *et al.*, 1999) und in humanen Nierenepithelzellen (Poljakovic *et al.*, 2003) gezeigt. In transienten Transfektionen mit Fragmenten des humanen oder Ratten-iNOS-Promotors konnte eine Verminderung der LPS- und/oder Zytokin-induzierten Promotoraktivität nach SB 203580-vermittelter Hemmung des p38-MAPK-Signaltransduktionsweges beobachtet werden (Bhat *et al.*, 2002; Kristof *et al.*, 2001). Die Versuche in den DLD-1-16kb-Zellen zeigen jedoch deutlich, dass die Aktivität eines stabil transfizierten humanen iNOS-Promotors von der Hemmung der p38-MAPK nicht beeinflusst wird. Demnach scheint die p38-MAPK die iNOS-Expression in DLD-1-Zellen über post-transkriptionelle Mechanismen zu regulieren.

IX.2 Regulation der iNOS-Expression durch TTP

Der genaue Mechanismus der p38-vermittelten Stabilisierung von ARE-haltigen mRNAs ist nicht bekannt. Es wurde aber beschrieben, dass die p38-MAP-Kinase entweder direkt (Carballo *et al.*, 2001) oder über ihr Substrat MAPKAP-2/MK-2 (Tchen *et al.*, 2004) die Expression und Phosphorylierung des RNA-bindenden Proteins Tristetraprolin (TTP) positiv beeinflusst. Dies deutet darauf hin, dass die p38-MAPK-vermittelte Stabilisierung AU-reicher mRNAs zumindest teilweise über eine Modulation der Expression oder Aktivität von TTP stattfindet.

Aus diesem Grund wurde eine Beteiligung von TTP an der Regulation der iNOS-Expression untersucht. Für TTP wurde bisher ein destabilisierender Einfluss auf AU-reiche mRNAs wie beispielsweise die TNF- α -mRNA (Carballo *et al.*, 1998) oder die GM-CSF-mRNA (Carballo *et al.*, 2000) beschrieben. In Vorarbeiten mit DLD-1-Zellen, die mit einem eukaryoten Expressionsvektor transfiziert worden waren, der für TTP codierte, wurde die iNOS-Expression auf mRNA-Ebene und auf Ebene der iNOS-vermittelten NO-Produktion analysiert. Die Überexpression von TTP führte unerwarteterweise zu einer gesteigerten Zytokin-induzierten iNOS-mRNA-Expression und NO-Produktion im Vergleich zu Kontrollzellen, die stabil mit dem pZeo-Expressionsvektor transfiziert waren (Abbildung 8A). Dementsprechend war die iNOS-Expression in DLD-1-Zellen, die die TTP-cDNA in antisense-Orientierung enthielten, verringert (Abbildung 8B) (Fechir *et al.*, 2005a). Um diese Ergebnisse zu bestätigen, wurden zusätzlich RNA-Interferenz-Experimente mit einer siRNA gegen TTP in DLD-1- und A549/8-Zellen durchgeführt. Dazu wurden die Zellen stabil mit einem Vektor transfiziert, der für eine siRNA codierte, die gegen die humane TTP-mRNA gerichtet war. Als Kontrollzellen dienten Zellen, die nur mit dem Vektor transfiziert waren. In beiden Zelllinien konnte auf diese Weise eine ca. 50 %ige Verminderung der TTP-mRNA- und der TTP-Proteinexpression erreicht werden. Die verringerte TTP-Expression führte zu einer Herunterregulation der Zytokin-induzierten iNOS-mRNA-Expression um ungefähr 70 % (Fechir *et al.*, 2005a) und bestätigte somit die Ergebnisse in den TTP-überexprimierenden Zellen. Demnach erhöht TTP im Gegensatz zu seinen bisher beschriebenen destabilisierenden Eigenschaften (Carballo *et al.*, 1998) die Expression der humanen iNOS.

In weiteren Vorarbeiten wurde die Bindung von TTP an die humane iNOS-mRNA untersucht. Erstaunlicherweise konnte in UV-Crosslink-Experimenten keine Interaktion eines GST-TTP-Fusionsproteins mit verschiedenen Fragmenten der iNOS-mRNA (3'-UTR, codierende Sequenz, 5'-UTR) nachgewiesen werden (Abbildung 9). Das gleiche GST-TTP-Fusionsprotein war jedoch in der Lage, die bereits beschriebenen Bindungen an die c-fos-3'-UTR (Worthington *et al.*, 2002) (Abbildung 9) und an die humane TNF- α -3'-UTR (Carballo *et al.*, 1998) (Daten nicht gezeigt) einzugehen, sodass davon ausgegangen werden kann, dass nicht eine fehlende Funktionalität des Fusionsproteins für das Ausbleiben der Bindung von TTP an die iNOS-mRNA verantwortlich ist. Folglich interagiert TTP nicht durch direkte Bindung mit der iNOS-mRNA.

In dieser Arbeit sollte nun der Mechanismus der TTP-vermittelten Erhöhung der iNOS-Expression untersucht werden. Zunächst wurden mit den stabil transfizierten Zellen (DLD-1-pZeo, DLD-1-pZeo-hTTPs, DLD-1-pZeo-hTTPas) Actinomycin D-Experimente durchgeführt, um nachzuweisen, ob der Effekt von TTP auf die iNOS über eine Veränderung der mRNA-Stabilität vermittelt wird. Tatsächlich war nach Actinomycin D-Zugabe die Halbwertszeit der iNOS-mRNA in den TTP-überexprimierenden Zellen verglichen mit den Kontrollzellen erhöht. Dementsprechend war die Stabilität der iNOS-mRNA in Zellen mit verminderter TTP-Expression erniedrigt (Abbildung 10). Daraus lässt sich folgern, dass die TTP-vermittelte Modulation der iNOS-Expression über post-transkriptionelle Effekte von TTP zustande kommt. Da aber für einige RNA-bindende Proteine wie AUF 1 (Fuentes-Panana *et al.*, 2000) oder hnRNP A1 (Shen und Masters, 2001) auch DNA-bindende Eigenschaften beschrieben sind und diese Proteine auch Effekte auf die Promotoraktivität verschiedener Gene ausüben können, wurde zusätzlich ein möglicher Effekt von TTP auf den iNOS-Promotor untersucht. Dazu wurde pXP2-16kb, ein Plasmid mit einem 16 kb-Fragment des humanen iNOS-Promotors vor einem Luciferase-Reporter gen, transient in die DLD-1-pZeo-, DLD-1-pZeo-hTTPs- und DLD-1-pZeo-hTTPas-Zellen transfiziert und die Luciferase-Aktivität bestimmt. In diesen Versuchen konnte keine Veränderung der Zytokin-induzierten iNOS-Promotoraktivität festgestellt werden (Abbildung 11). Dementsprechend reguliert TTP die Expression der iNOS ausschließlich über post-transkriptionelle Mechanismen.

Um den Mechanismus, über den TTP diese post-transkriptionellen Effekte ausübt, genauer zu charakterisieren, wurde zunächst die Expression von TTP nach Zytokin-Stimulation in DLD-1-Zellen analysiert. Dabei konnte festgestellt werden, dass Inkubation der Zellen mit Zytokinen, die die Expression der iNOS induzieren, auch eine Steigerung der Expression von TTP sowohl auf mRNA-Ebene (Fechir *et al.*, 2005a) als auch auf Proteinebene zur Folge hat (Abbildung 12). Dabei war die Zeitkurve der Induktion der TTP-Expression vergleichbar mit der der iNOS-mRNA-Expression nach Stimulation mit Zytokinen (Rodriguez-Pascual *et al.*, 2000). Das Maximum sowohl der iNOS-mRNA-Expression als auch der TTP-Expression lag bei ungefähr vier bis sechs Stunden. Des Weiteren fiel der Zeitpunkt der Abnahme der iNOS-mRNA-Expression mit dem Rückgang der TTP-Proteinexpression zusammen. Diese Versuche zeigen demnach, dass TTP eine wichtige Rolle bei der Stabilisierung der iNOS-mRNA spielt. Dabei wird der stabilisierende Effekt wahrscheinlich über eine erhöhte Expression von TTP nach Zytokin-Stimulation vermittelt. Der Rückgang der TTP-Expression nach sechs bis acht Stunden könnte über einen negativen Rückkopplungsmechanismus zu erklären sein, wobei TTP seine eigene mRNA durch Bindung an die TTP-3'-UTR destabilisiert (Tchen *et al.*, 2004).

Da Behandlung von DLD-1-Zellen mit SB 203580 die Zytokin-induzierte iNOS-Expression verminderte, wurde auch der Effekt der Hemmung der p38-MAPK auf die Zytokin-induzierte TTP-Expression analysiert. Tatsächlich erniedrigte eine Inkubation von DLD-1-Zellen mit SB 203580 die Expression von TTP auf mRNA- und Proteinebene (Abbildung 13). Ein ähnlicher

Effekt der p38-MAPK auf die post-transkriptionelle Regulation von TTP wurde in murinen RAW-Makrophagen beschrieben (Tchen *et al.*, 2004). Es ist demzufolge wahrscheinlich, dass der stabilisierende Effekt der p38-MAPK auf die iNOS-mRNA über eine Erhöhung der Expression des stabilisierenden Proteins TTP zustande kommt.

Auch über eine Phosphorylierung von TTP durch die p38-MAPK und deren Substrat MK-2 nach Aktivierung durch proinflammatorische Stimuli wurde berichtet (Carballo *et al.*, 2001; Mahtani *et al.*, 2001; Zhu *et al.*, 2001). Nach p38-vermittelter Phosphorylierung kann TTP in Abhängigkeit von Bindung an 14-3-3-Proteine aus dem Zellkern ins Zytoplasma translozieren (Johnson *et al.*, 2002). Eine Translokation von TTP konnte in DLD-1-Zellen bisher aber nicht beobachtet werden. Außerdem gibt es Hinweise, dass eine Phosphorylierung von TTP dessen Bindungsaffinität an mRNA vermindern kann (Carballo *et al.*, 2001). Das in den UV-Crosslink-Experimenten eingesetzte GST-TTP-Fusionsprotein zeigte jedoch unabhängig von einer Phosphorylierung keine Bindung an die iNOS-mRNA. Dennoch kann ein Effekt einer p38-vermittelten Phosphorylierung von TTP auf die iNOS-Expression nicht ausgeschlossen werden.

Die bisher beschriebenen destabilisierenden Effekte von TTP wurden jeweils durch eine direkte Interaktion von TTP mit der jeweiligen mRNA (TNF- α , GM-CSF, c-fos, Interleukin-3, IFN- β - und - γ) vermittelt (Carballo *et al.*, 2000; Lai und Blackshear, 2001; Worthington *et al.*, 2002). Es wurde aber auch beschrieben, dass nicht-bindende TTP-Mutanten in der Lage sind, die TNF- α -mRNA zu stabilisieren. Dabei konnte die Expression der TTP-Mutanten den destabilisierenden Effekt des Wildtyp-TTPs inhibieren. Es wird jedoch angenommen, dass TTP mit weiteren Enzymen oder Proteinkomplexen interagiert und dadurch deren Fähigkeit zur Deadenylierung und zum weiteren Abbau von mRNA funktionell stimuliert (Lai *et al.*, 2002). Da Wildtyp-TTP nicht an die iNOS-mRNA bindet, scheint der stabilisierende Effekt von TTP auf die iNOS-Expression demnach indirekt ausgeübt zu werden. Das macht eine Beteiligung weiterer regulatorischer Proteine an der Modulation der iNOS-mRNA-Stabilität wahrscheinlich. Beispielsweise könnte TTP die mRNA-Stabilität anderer RNA-bindender Proteine beeinflussen, die ihrerseits die iNOS-mRNA stabilisieren oder destabilisieren. Des Weiteren könnte eine Interaktion von anderen Proteinen mit TTP deren Bindungsaffinität an die iNOS-mRNA verändern und auf diese Weise die Expression der iNOS beeinflussen. Es wurde beispielsweise beschrieben, dass eine Komplexbildung von TTP mit 14-3-3-Proteinen die Degradation ARE-haltiger mRNAs inhibiert (Stoecklin *et al.*, 2004). Außerdem ist bekannt, dass TTP für die Aktivierung des Exosoms, welches den 3'-5'-Abbau von mRNAs initiiert, notwendig ist (Chen *et al.*, 2001). So könnte auch eine Inaktivierung des Exosoms durch ein Verhindern von dessen Interaktion mit der iNOS-mRNA eine Stabilisierung der mRNA zur Folge haben.

IX.3 Regulation der iNOS-Expression durch KSRP

Da der indirekt vermittelte Effekt von TTP auf die Stabilisierung der iNOS-mRNA die Beteiligung weiterer Faktoren erfordert, wurden zur Isolierung von Proteinen, die mit der 3'-UTR der iNOS-mRNA interagieren, RNA-Affinitätschromatographie-Aufreinigungen durchgeführt. Auf diese Weise konnten das „KH-type splicing regulatory protein“ (KSRP), das Poly-A-bindende Protein (PABP) und das heterogene nukleäre Ribonukleoprotein E1 (hnRNP E1) als iNOS-mRNA-bindende Proteine identifiziert werden (Abbildung 14). hnRNP E1 ist nicht nur an der Regulation der Translation verschiedener mRNAs beteiligt (Ostareck-Lederer *et al.*, 2002), sondern wurde auch als Regulator der mRNA-Stabilität für die humane Renin-mRNA (Morris *et al.*, 2004) und die Kollagen-Typ I- und III-mRNA (Thiele *et al.*, 2004) beschrieben. PABP bindet an den Poly-A-Schwanz von mRNAs und scheint für verschiedene post-transkriptionelle Regulationsmechanismen von Bedeutung zu sein (Mangus *et al.*, 2003). Es gibt jedoch auch Hinweise auf eine Bindung von PABP an AU-reiche Elemente von mRNAs (Bollig *et al.*, 2003; Dean *et al.*, 2004; Sladic *et al.*, 2004). KSRP spielt eine wichtige Rolle bei der exosomal vermittelten Degradation von ARE-haltigen mRNAs (Chen *et al.*, 2001; Gherzi *et al.*, 2004).

In dieser Arbeit wurde zunächst die Beteiligung von KSRP an der Regulation der iNOS-Expression weiterführend untersucht.

Mittels *in vitro*-mRNA-Degradations-Analysen konnte gezeigt werden, dass die Stabilität einer „5'-gecappten“ und 3'-polyadenylierten iNOS-3'-UTR-RNA nach Inkubation mit KSRP-depletierten Extrakten im Vergleich zur Inkubation mit Kontrollextrakten erhöht war (Abbildung 17). Deletion der AU-reichen Elemente der iNOS-3'-UTR führte ebenfalls zu einer Erhöhung der iNOS-mRNA-Stabilität. Bemerkenswert ist hierbei, dass Immundepletion von KSRP keinen Einfluss auf den Abbau der Transkripte ohne AREs hatte. Diese *in vitro*-Versuche geben einen ersten Hinweis auf die Bedeutung von KSRP für die ARE-vermittelte Regulation der iNOS-mRNA-Stabilität.

Zur Analyse des Einflusses von KSRP auf die iNOS-Expression in lebenden Zellen wurden stabil transfizierte DLD-1-Zelllinien mit erhöhter (DLD-1-pcDNA-HisKSRP) oder erniedrigter (DLD-1-pcDNA-KSRPas) KSRP-Expression generiert. In diesen Zellen konnte ein negativ regulatorischer Effekt von KSRP auf die Zytokin-induzierte iNOS-mRNA-Expression und auf die iNOS-vermittelte NO-Produktion festgestellt werden (Abbildung 19 und 20). In DLD-1- und A549/8-Zellen (Linker *et al.*, 2005) durchgeführte RNA-Interferenz-Experimente mit siRNAs gegen die humane KSRP-mRNA bestätigten diese Ergebnisse (Abbildung 23). Des Weiteren konnte auch eine verringerte TNF- α -mRNA-Expression in KSRP-überexprimierenden DLD-1-Zellen beobachtet werden (Daten nicht gezeigt), was einen Hinweis darauf gibt, dass der destabilisierende Einfluss von KSRP auf ARE-haltige mRNAs einen allgemein gültigen Mechanismus darstellt.

Um zu überprüfen, ob KSRP die iNOS-Expression über eine Modulation der mRNA-Stabilität verringert, wurden Actinomycin D-Experimente durchgeführt. In den KSRP-überexprimierenden DLD-1-Zellen war eine Messung des mRNA-Abbaus jedoch nicht möglich, da die iNOS-mRNA-Expression aufgrund des destabilisierenden Effekts von KSRP zu gering war. Eine Hemmung der Transkription mit Actinomycin D in den DLD-1-pcDNA-KSRPas-Zellen hatte aber eine Erhöhung der Halbwertszeit der iNOS-mRNA zur Folge. Demnach wird der Effekt von KSRP auf die iNOS-Expression auch in lebenden Zellen über eine Destabilisierung der iNOS-mRNA vermittelt.

Da, wie bereits erwähnt, einige RNA-bindende Proteine auch in der Lage sind, DNA zu binden und die Promotoraktivität zu modulieren, wurde auch für KSRP eine mögliche Beteiligung an der Regulation der iNOS-Promotoraktivität untersucht. Dazu wurden die DLD-1-pcDNA-HisKSRP-Zellen und die DLD-1-pcDNA3-Kontrollzellen transient mit pXP2-16kb (einem Konstrukt mit einem 16 kb-Fragment des humanen iNOS-Promotors vor einem Luciferase-Reportergen) transfiziert. Die Bestimmung der Luciferase-Aktivität zeigte eine deutlich erniedrigte Zytokin-induzierte Promotoraktivität in den KSRP-überexprimierenden Zellen (Abbildung 25), sodass zunächst ein negativer Effekt von KSRP auch auf die iNOS-Promotoraktivität angenommen wurde. Dies würde für eine Doppelfunktion von KSRP bei der Regulation der iNOS-Expression durch Destabilisierung der iNOS-mRNA auf posttranskriptioneller Ebene und Verminderung der Promotoraktivität auf transkriptioneller Ebene sprechen. Um diese Doppelfunktion zu bestätigen, wurden weitere Transfektionsexperimente durchgeführt. Hierbei wurden DLD-1-Wildtyp-Zellen verwendet, die sowohl mit pXP2-16kb als auch mit pcDNA-HisKSRP oder dem Expressionsvektor pcDNA3 transient transfiziert wurden. Die Bestimmung der Luciferase-Aktivität nach dieser transienten Transfektion ergab keinen Hinweis auf eine veränderte Promotoraktivität in den DLD-1-Zellen, die KSRP transient überexprimierten (Abbildung 26). Eine mögliche Erklärung für diese Divergenz wäre ein negativ regulatorischer Effekt von KSRP auf für die iNOS-Promotoraktivität wichtige Transkriptionsfaktoren wie STAT-1 α oder NF- κ B. Ein destabilisierender Effekt von KSRP auf den Transkriptionsfaktor Pitx-2 wurde bereits beschrieben (Briata *et al.*, 2003). Eine veränderte mRNA-Stabilität und somit eine verringerte Expression von Transkriptionsfaktoren würde letztendlich auch zu einer erniedrigten Expression der iNOS durch eine Verminderung der Promotoraktivität führen. Dieser indirekte Vorgang würde allerdings mehr Zeit beanspruchen als eine direkte Wirkung von KSRP auf den iNOS-Promotor. In stabil transfizierten KSRP-überexprimierenden Zellen würde eine andauernde Herunterregulation der Expression von Transkriptionsfaktoren nach transienter Transfektion von pXP2-16kb demnach einen sichtbaren Effekt verursachen, während nach transienter Transfektion eines Konstruktes mit einer KSRP-cDNA die Zeit bis zur Lyse der Zellen nicht ausreichend wäre, um denselben Effekt hervorzurufen. Demzufolge findet die KSRP-vermittelte Beeinflussung der iNOS-Promotoraktivität wahrscheinlich auf indirektem Weg statt.

Im Gegensatz dazu scheint die Destabilisierung der iNOS-mRNA durch KSRP direkt vermittelt zu werden. Da die Induktion der iNOS-Expression in DLD-1-Zellen die Behandlung mit einem komplexen Zytokingemisch erfordert, wurde die Auswirkung der Zytokin-Stimulation auf die Expression von KSRP analysiert. Weder auf mRNA- (Daten nicht gezeigt) noch auf Proteinebene konnte eine Veränderung der KSRP-Expression beobachtet werden (Abbildung 27). Western-Blot-Analysen ergaben weiterhin keine Hinweise auf eine mögliche Veränderung der Lokalisation von KSRP in der Zelle. Briata *et al.* konnten kürzlich eine p38-vermittelte Phosphorylierung von KSRP nach Differenzierung von Muskelzellen zeigen, die in der Folge zu einer verringerten Bindung von KSRP an ARE-haltige Transkripte und so zu deren Stabilisierung führte (Briata *et al.*, 2005). Co-Immunpräzipitations-Experimente in DLD-1-Zellen gaben jedoch keinen Hinweis auf eine veränderte Phosphorylierung von KSRP nach Induktion der iNOS-Expression mit Zytokinen (Daten nicht gezeigt). Demnach scheint die gesteigerte iNOS-mRNA-Stabilität nach Zytokin-Stimulation in DLD-1-Zellen nicht mit einer veränderten Expression, Lokalisation oder Phosphorylierung von KSRP einherzugehen. Die bisherigen Beobachtungen lassen infolgedessen darauf schließen, dass ein komplexes Zusammenspiel verschiedener Faktoren für die Induktion der iNOS-Expression notwendig ist.

Es wurde bereits beschrieben, dass KSRP imstande ist, das Exosom an ARE-haltige mRNAs heranzuführen und auf diese Weise den exosomal vermittelten Abbau dieser mRNAs zu ermöglichen (Chen *et al.*, 2001; Gherzi *et al.*, 2004). Aus diesem Grund wurde in Co-Immunpräzipitations-Analysen untersucht, ob KSRP in DLD-1-Zellen mit dem Exosom interagiert. Um auszuschließen, dass die Bindung verschiedener RNA-bindender Proteine an dieselbe RNA zu einer RNA-abhängigen Präzipitation führt, wurden die eingesetzten Extrakte zuvor mit RNase behandelt. Diese Analysen zeigten eine Interaktion von KSRP mit der exosomalen Komponente PM-Scl 100 (Abbildung 28). Diese Wechselwirkung wurde jedoch durch Zytokin-Stimulation nicht verändert. Somit scheint KSRP die iNOS-mRNA Zytokin-unabhängig durch Interaktion mit dem Exosom zu destabilisieren.

Auch für TTP wurde eine Beteiligung am exosomalen Abbau von mRNAs mit AU-reichen Elementen beschrieben (Chen *et al.*, 2001). In humanen DLD-1-Zellen erwies sich TTP jedoch als stabilisierender Faktor für die iNOS-mRNA. In weiteren Co-Immunpräzipitations-Analysen wurde daher untersucht, ob KSRP und TTP miteinander in Wechselwirkung treten. Wie Abbildung 29 zeigt, wurde eine Interaktion von KSRP und TTP in DLD-1-Zellen beobachtet. Diese Wechselwirkung war nach Zytokin-Stimulation deutlich verstärkt, was wahrscheinlich auf die gesteigerte TTP-Expression unter diesen Bedingungen zurückzuführen ist. Daher wurde im nächsten Schritt untersucht, ob Hemmung der p38-MAP-Kinase einen Einfluss auf diese Interaktion hat. Tatsächlich führte Vorinkubation der DLD-1-Zellen mit SB 203580 zu einer Verminderung der Interaktion von KSRP und TTP nach Zytokin-Stimulation (Abbildung 30). Dies ist demnach als Folge der verringerten Zytokin-induzierten TTP-Expression nach Inhibition der p38-MAPK aufzufassen. Bisher kann somit zusammengefasst werden, dass das Wechselspiel

von p38-MAPK, TTP und KSRP eine wichtige Rolle bei der Stabilisierung der iNOS-mRNA nach Zytokin-Stimulation spielt.

Da TTP seinen Effekt auf die iNOS vermittelt, ohne mit der iNOS-mRNA in Interaktion zu treten, wurde untersucht, ob die Bindung von KSRP an die iNOS-3'-UTR für die destabilisierende Wirkung erforderlich ist. Dazu wurde die iNOS-Expression in DLD-1-Zellen, die eine nicht-bindende KSRP-Mutante überexprimieren, analysiert. UV-Crosslink-Experimente zeigten, dass die KSRP-Mutante, der die vierte RNA-Bindedomäne fehlt (Gherzi *et al.*, 2004), tatsächlich nicht mehr in der Lage ist, mit der iNOS-3'-UTR zu interagieren (Daten nicht gezeigt). Die erhöhte iNOS-mRNA-Expression und iNOS-vermittelte NO-Produktion in den DLD-1-pcDNA-KSRPdel-Zellen verglichen mit Kontrollzellen (Abbildung 32) bestätigt die Notwendigkeit der Bindung von KSRP für die Vermittlung des destabilisierenden Effekts.

Die Lokalisierung der genauen Bindungssequenz von KSRP in der iNOS-3'-UTR ergab, dass KSRP an das am 3'-Ende der 3'-UTR gelegene AU-reiche Element bindet (Abbildung 35). Frühere Experimente hatten gezeigt, dass auch das die iNOS stabilisierende Protein HuR mit diesem ARE der iNOS-mRNA interagiert (Rodriguez-Pascual *et al.*, 2000). In UV-Crosslink-Experimenten konnte nun gezeigt werden, dass KSRP und HuR *in vitro* um diese Bindungsstelle konkurrieren (Abbildung 36). Das ließ vermuten, dass nach Zytokin-Stimulation die Bindungsaffinität von KSRP an die iNOS-3'-UTR vermindert sein könnte und gleichzeitig eine verstärkte Bindungsaffinität des stabilisierenden HuR zu einer Steigerung der iNOS-Expression führen könnte. Um diese Hypothese zu überprüfen, wurde die Bindungsaffinität von KSRP unter Verwendung von Extrakten aus unbehandelten oder Zytokin-stimulierten Zellen und einer *in vitro*-transkribierten iNOS-3'-UTR-Sonde untersucht (Abbildung 37). Unter diesen Bedingungen war jedoch keine Veränderung der Bindungsaffinität von KSRP nach Induktion der iNOS-Expression festzustellen. Im Gegensatz zu diesem *in vitro*-Ansatz zeigten Immunpräzipitations-qRT-PCR-Analysen ein deutlich erhöhtes Verhältnis der endogenen HuR-Bindung zur KSRP-Bindung an die iNOS-3'-UTR nach Zytokin-Stimulation (Abbildung 38). Das bedeutet, dass die endogene Bindung von KSRP an die iNOS-mRNA nach Zytokin-Stimulation vermindert ist, während gleichzeitig die endogene Bindung von HuR zunimmt. Demzufolge kann eine gesteigerte iNOS-mRNA-Expression nach Zytokin-Induktion durch eine HuR-vermittelte Stabilisierung der iNOS-mRNA aufgrund einer vermehrten Bindung von HuR an die 3'-UTR erklärt werden. Ein ähnliches Prinzip wurde auch für die Regulation der IL-1 β -mRNA-Expression beschrieben (Suswam *et al.*, 2005).

Da diese Beobachtungen in Experimenten mit *in vitro*-transkribierter und damit in großem Überschuss vorliegender iNOS-3'-UTR-RNA nicht gemacht werden konnten, ist davon auszugehen, dass kleinste Veränderungen oder Verschiebungen innerhalb dieses Systems letztendlich für die markante Induktion der iNOS-Expression nach Zytokin-Stimulation verantwortlich sind. Dabei scheint ein Zusammenspiel der p38-MAPK und der RNA-bindenden Proteine TTP, KSRP und HuR mit der iNOS-mRNA von großer Bedeutung zu sein.

IX.4 Regulation der iNOS-Expression durch PTB

Da es bereits Hinweise für eine Beteiligung von PTB an der Regulation der murinen iNOS-Expression gibt (Soderberg *et al.*, 2002) und PTB mit KSRP in neuronalen Zellen colokalisiert (Hall *et al.*, 2004), wurde auch der Einfluss dieses RNA-bindenden Proteins auf die Regulation der humanen iNOS-Expression untersucht.

Zunächst wurde mit Hilfe von Immunfluoreszenz-Analysen die Lokalisation von PTB und KSRP in DLD-1-Zellen unter Kontrollbedingungen und nach Zytokin-Stimulation dargestellt (Abbildung 39). Hierbei konnte beobachtet werden, dass sich sowohl KSRP als auch PTB vorwiegend im Zellkern befinden, was dem Verteilungsmuster in neuronalen Zellen entspricht. Allerdings wies PTB eine Anreicherung in spezifischen Foci in der Nähe des Nukleolus auf, während KSRP diffuser verteilt war. Stimulation der Zellen mit Zytokinen ergab keine Veränderung der Lokalisation beider Proteine und somit auch keinen Hinweis auf eine Translokation von KSRP oder PTB vom Zellkern ins Zytoplasma.

Aufgrund der ähnlichen räumlichen Verteilung lag die Untersuchung einer möglichen Interaktion von PTB und KSRP nahe. Co-Immunpräzipitations-Analysen bestätigten eine solche Wechselwirkung, allerdings wiederum ohne Veränderung nach Zytokin-vermittelter Induktion der iNOS-Expression (Abbildung 40).

Deshalb sollte untersucht werden, ob PTB überhaupt einen Einfluss auf die humane iNOS-Expression ausübt. Die Analyse der iNOS-mRNA-Expression und der iNOS-vermittelten NO-Produktion in PTB-überexprimierenden DLD-1-Zellen zeigte verglichen mit Kontrollzellen einen deutlichen positiv regulatorischen Effekt von PTB auf die iNOS-Expression (Abbildung 41). RNA-Interferenz-Experimente mit einer siRNA gegen die humane PTB-mRNA in DLD-1- und A549/8-Zellen (Daten nicht gezeigt) konnten dies bestätigen (Abbildung 43). Jedoch schien der in RNA-Interferenz-Analysen in DLD-1-Zellen beobachtete Effekt von PTB auf die iNOS nicht sehr stark ausgeprägt zu sein. Als mögliche Erklärung dafür könnte die Autoregulation der PTB-Expression durch alternatives Spleißen seiner Prä-mRNA dienen. Dabei entsteht eine Spleißvariante, die durch den Mechanismus des „nonsense mediated decay“ abgebaut wird. Auf diese Weise ist PTB in der Lage, seine Proteinexpression an die jeweiligen Erfordernisse der Zellen anzupassen (Wollerton *et al.*, 2004). Dieser Autoregulationsmechanismus könnte einer Verminderung der PTB-Expression durch transiente Transfektion entgegenwirken. Trotz dieses möglichen Effekts konnte deutlich gezeigt werden, dass PTB die Zytokin-stimulierte Expression der humanen iNOS steigert. Dabei änderte sich nach Stimulation von DLD-1-Zellen mit Zytokinen jedoch weder die mRNA- (Daten nicht gezeigt) noch die Proteinexpression von PTB (Abbildung 44).

UV-Crosslink-Experimente konnten zeigen, dass PTB nicht nur mit der 3'-UTR der iNOS-mRNA, sondern auch mit der 5'-untranslatierten Region interagiert. Während eine eindeutige Bindungsstelle in der 3'-UTR nicht klar definiert werden konnte, schien PTB in der 5'-UTR vor allem an das Exon 1 der iNOS-mRNA zu binden. Eine Analyse der genauen Nukleotidsequenz

zeigte das Vorhandensein der PTB-Konsensussequenz „UCUU“ (Perez *et al.*, 1997a), die sich in Exon 1 zudem in einem pyrimidinreichen Kontext befindet. Auch in der iNOS-3'-UTR existieren mehrere solcher „UCUU“-Sequenzen, allerdings liegen diese nicht in einem günstigen pyrimidinreichen Umfeld. Diese Beobachtung lässt darauf schließen, dass PTB an die sowohl in der iNOS-3'-UTR als auch in der iNOS-5'-UTR vorhandenen „UCUU“-Sequenzen bindet, wobei die Bindungsaffinität an die 5'-UTR dabei deutlich höher zu sein scheint.

Zusammenfassend spricht dies für eine PTB-vermittelte positive Regulation der humanen iNOS-Expression durch Bindung von PTB an die iNOS-3'-UTR und/oder 5'-UTR. Dabei scheint PTB Zytokin-unabhängig mit dem bereits vorgestellten Proteinkomplex um KSRP assoziiert zu sein. Bisher konnte jedoch noch kein Mechanismus für die Regulation der iNOS-Expression durch PTB aufgeklärt werden. Weiterführende Transfektionsexperimente unserer Arbeitsgruppe mit einem 16 kb-Fragment des humanen iNOS-Promotors vor einem Luciferase-Reportergen (pXP2-16kb) in den PTB-überexprimierenden DLD-1-Zellen zeigten keine Beteiligung von PTB an der Regulation der iNOS-Promotoraktivität, was auf einen post-transkriptionellen Einfluss von PTB auf die humane iNOS-Expression schließen lässt.

Die Bindung von PTB an die iNOS-5'-UTR impliziert zusätzlich einen Effekt auf die Translation der iNOS-mRNA. Für PTB wurde bereits ein Einfluss auf die Cap-unabhängige IRES-vermittelte Translation beschrieben (Borman *et al.*, 1993; Niepmann *et al.*, 1997). Dabei bindet PTB an das IRES-Element (Huez *et al.*, 1998). Es wurde sowohl über einen translationsfördernden Effekt von PTB (Cho *et al.*, 2005) als auch über einen negativ regulatorischen Effekt von PTB auf die Translation (Cornelis *et al.*, 2005) berichtet. In der Struktur der iNOS-mRNA konnte jedoch bisher kein IRES-Element ausfindig gemacht werden.

Auch eine Beteiligung von PTB an der Regulation der iNOS-Expression durch den Mechanismus des „nonsense mediated decay“ (NMD) wäre möglich. Dabei könnte PTB durch alternatives Spleißen der iNOS-Prä-mRNA das Auftreten eines vorzeitigen Stopcodons und damit die Markierung der iNOS-mRNA für den NMD beeinflussen. Es wurden bereits mehrere Spleißvarianten der iNOS-mRNA beschrieben, die jedoch alle translatiert werden (Eissa *et al.*, 1996). In der 5'-UTR der iNOS-mRNA befindet sich aber auch ein μ ORF, dessen Vorhandensein bereits ausreichend für einen Abbau der mRNA durch den NMD sein könnte. Des Weiteren ist eine indirekte Beteiligung des „nonsense mediated decay“ an der Regulation der iNOS-Expression durch einen Einfluss auf die Autoregulation der PTB-Expression (Wollerton *et al.*, 2004) nicht auszuschließen.

Die Aufklärung des genauen Mechanismus der PTB-vermittelten Regulation der iNOS-Expression geht jedoch über den Rahmen dieser Arbeit hinaus und wird Gegenstand weiterer Studien unserer Arbeitsgruppe sein.

IX.5 Ein komplexes Zusammenspiel von RNA-bindenden Proteinen reguliert die humane iNOS-Expression

In dieser Arbeit wurde der Einfluss von RNA-bindenden Proteinen und ihr Zusammenspiel bei der post-transkriptionellen Regulation der humanen iNOS-Expression dargestellt. Die folgende Tabelle soll zunächst nochmals die wichtigsten Eigenschaften der einzelnen Proteine zusammenfassen:

Protein	Effekt auf die iNOS-Expression	Bindung an die iNOS-mRNA	Expression nach Zytokin-Stimulation	Interaktion/Regulation
TTP	stabilisiert die iNOS-mRNA	keine	gesteigert	p38-MAPK, KSRP
KSRP	destabilisiert die iNOS-mRNA	ARE am 3'-Ende der 3'-UTR; Abnahme nach Zytokin-Stimulation	unverändert	PM-Scl 100, TTP, PTB
HuR ¹⁾	stabilisiert die iNOS-mRNA	ARE am 3'-Ende der 3'-UTR; Zunahme nach Zytokin-Stimulation	unverändert, Abnahme nach 8 Stunden	nicht untersucht
PTB	erhöht die iNOS-Expression	3'-UTR; 5'-UTR (Exon1)	unverändert	KSRP

¹⁾ (Rodriguez-Pascual *et al.*, 2000)

Tabelle 11: Effekte der untersuchten RNA-bindenden Proteine auf die Regulation der iNOS-Expression

Es ist sehr wahrscheinlich, dass die bisher untersuchten Proteine nicht die einzigen sind, die an der Regulation der iNOS-Expression beteiligt sind. Frühere Arbeiten konnten bereits einen Einfluss des Proteins AUF 1 darstellen, welches die iNOS-Expression vermindert (Kleinert *et al.*, 2002). Weitere Untersuchungen zeigten inzwischen auch eine Beteiligung von hnRNP A1, das wahrscheinlich durch Bindung an die 5'-UTR einen positiven Effekt auf die iNOS-Expression ausübt. Ebenso bewirken TIA-1 und TIAR entgegen ihren beschriebenen negativ regulatorischen Eigenschaften eine Erhöhung der iNOS-Expression (Fechir *et al.*, 2005b).

Des Weiteren wurden durch die RNA-Affinitätschromatographie-Aufreinigung mit der iNOS-3'-UTR-RNA zusätzlich die RNA-bindenden Proteine PABP und hnRNP E1 identifiziert, deren Effekt auf die iNOS-Expression noch untersucht werden muss. Demzufolge findet die post-transkriptionelle Regulation der iNOS-Expression durch ein komplexes Zusammenspiel von regulatorischen Proteinen wahrscheinlich auf mehreren Ebenen statt, wobei die Modulation der iNOS-mRNA-Stabilität von besonderer Bedeutung zu sein scheint.

Aufgrund der vorliegenden Erkenntnisse lässt sich die Stabilisierung der iNOS-mRNA nach Stimulation mit Zytokinen wie folgt erklären:

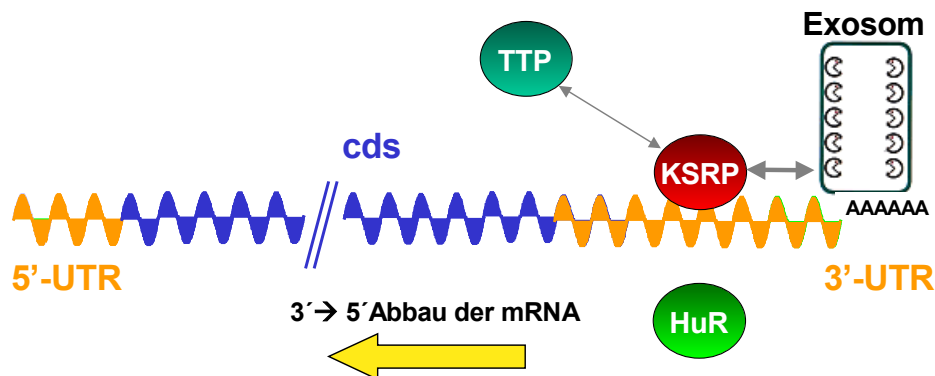
In unstimulierten DLD-1-Zellen bindet KSRP an die 3'-UTR der iNOS-mRNA und führt das Exosom an diese heran, wodurch der Abbau der iNOS-mRNA ermöglicht wird. Nach Stimulation mit Zytokinen ist sowohl die Expression von TTP als auch dessen Interaktion mit KSRP erhöht. Da TTP nicht mit der iNOS-mRNA interagiert, ist die Folge dieser verstärkten Wechselwirkung eine Verminderung der Bindung des KSRP-Exosom-Komplexes an die iNOS-3'-UTR. Aufgrund der Konkurrenz von KSRP und HuR um dieselbe Bindungsstelle an der iNOS-mRNA führt diese Verlagerung von KSRP zu einer Verstärkung der Bindung von HuR an die iNOS-3'-UTR. Diese gesteigerte Interaktion ermöglicht daraufhin eine Stabilisierung der iNOS-mRNA durch HuR, was letztendlich zu einer Erhöhung der iNOS-Expression führt (Abbildung 46).

Zusammenfassend zeigt dieser Mechanismus, dass komplexe Interaktionen in einem Netzwerk von RNA-bindenden Proteinen notwendig sind, um die fein abgestimmte post-transkriptionelle Regulation der iNOS-Expression zu bewerkstelligen. Innerhalb dieses Netzwerks scheint KSRP eine Art Schlüsselmolekül zu sein, das durch verschiedene Interaktionen die Effekte anderer RNA-bindender Proteine wie TTP oder HuR verbindet, die ihrerseits dann zur Stabilisierung der iNOS-mRNA beitragen. Geringfügige Veränderungen innerhalb dieses Systems scheinen somit für die markante Induktion der iNOS-Expression nach Zytokin-Stimulation verantwortlich zu sein.

Darüber hinaus sind sehr wahrscheinlich weitere RNA-bindende Proteine, wie beispielsweise PTB, mit diesem Netzwerk assoziiert. Die zusätzliche Bindung von PTB an die 5'-UTR der iNOS-mRNA impliziert eine mögliche weitere Regulation der iNOS-Expression auf Ebene der Translation. Darüber hinaus könnte PTB die iNOS-Expression über Mechanismen wie den „nonsense mediated decay“ (NMD) modulieren.

Der Einfluss von PTB und weiteren Proteinen auf die Regulation der iNOS-Expression und ihre Verbindung mit dem bisher bekannten, an die iNOS-3'-UTR gekoppelten Regulationssystem kann hier jedoch nicht abschließend geklärt werden und wird Gegenstand weiterer Untersuchungen sein.

A)



B)

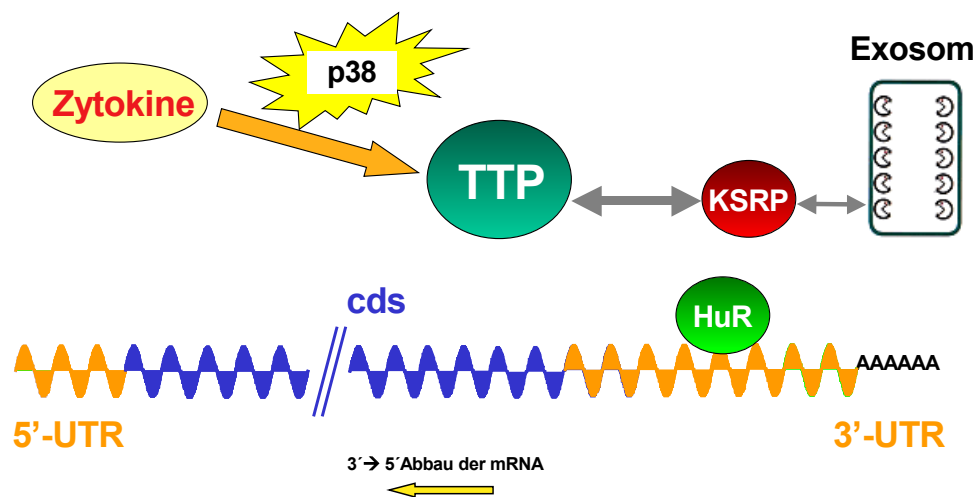


Abbildung 46: Stabilisierung der iNOS-mRNA nach Stimulation mit Zytokinen

A) In unstimulierten Zellen bindet KSRP an die 3'-UTR der iNOS-mRNA und führt das Exosom an diese heran. Somit wird der Abbau der iNOS-mRNA durch den Exonukleasekomplex ermöglicht.

B) Nach Stimulation mit Zytokinen ist die Expression von TTP in Abhängigkeit von der p38-MAPK gesteigert. Gleichzeitig ist auch die Interaktion zwischen TTP und KSRP verstärkt. Da TTP nicht an die iNOS-mRNA bindet, führt dies wahrscheinlich zu einer Verminderung der Bindung des KSRP-Exosom-Komplexes an die iNOS-mRNA-3'-UTR. Da KSRP und HuR um die gleiche Bindungsstelle an der iNOS-mRNA konkurrieren, ermöglicht dies in der Folge eine verstärkte Interaktion des stabilisierenden Proteins HuR mit der iNOS-3'-UTR. Auf diese Weise ist HuR in der Lage, die iNOS-mRNA vermehrt zu stabilisieren. Dies führt letztendlich zu einer Erhöhung der iNOS-Expression.

X Zusammenfassung

Die Expression der humanen induzierbaren NO-Synthase (iNOS) wird sowohl über transkriptionelle als auch über post-transkriptionelle Mechanismen reguliert. Dabei spielt die Modulation der iNOS-mRNA-Stabilität durch RNA-bindende Proteine eine bedeutende Rolle.

In dieser Arbeit konnte eine Beteiligung des p38-MAPK-Signaltransduktionsweges sowie der RNA-bindenden Proteine TTP, KSRP, HuR und PTB an der Regulation der iNOS-Expression dargestellt werden.

Hemmung der p38-MAPK führte zu einer Reduktion der iNOS-mRNA-Expression, hatte aber keinen Effekt auf die iNOS-Promotoraktivität. Das RNA-bindende Protein Tristetraprolin (TTP) erhöhte die Stabilität der iNOS-mRNA nach Zytokin-Stimulation, ohne jedoch mit ihr zu interagieren. Die Proteinexpression von TTP war unter dem Einfluss von Zytokinen erhöht; Inhibition der p38-MAPK verursachte eine Verminderung der Zytokin-stimulierten TTP-Expression.

Das „KH-type splicing regulatory protein“ (KSRP) übte einen destabilisierenden Effekt auf die iNOS-mRNA aus. Der Abbau der mRNA wird dabei wahrscheinlich durch eine Zytokin-unabhängige Interaktion von KSRP mit dem Exosom vermittelt. Ebenso konnte zwischen KSRP und TTP eine Wechselwirkung beobachtet werden, die nach Induktion der iNOS-Expression mit Zytokinen verstärkt und durch p38-MAPK-Inhibitoren hemmbar war. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass die Bindung von KSRP an die iNOS-mRNA-3'-UTR für die Vermittlung des destabilisierenden Effekts essentiell ist. Eine genaue Lokalisierung der KSRP-Bindungsstelle ergab, dass KSRP ebenso wie HuR mit dem AU-reichen Element am 3'-Ende der 3'-UTR interagiert. KSRP und HuR sind in der Lage, um diese Bindungsstelle zu konkurrieren. Nach Zytokin-Stimulation war dementsprechend die endogene Bindung von KSRP an die iNOS-mRNA vermindert, während die endogene Bindung von HuR an die iNOS-mRNA verstärkt war. Die Stabilisierung der iNOS-mRNA nach Zytokin-Stimulation ergibt sich demnach aus einer Verminderung der Bindung des KSRP-Exosom-Komplexes an die iNOS-mRNA als Folge der verstärkten Interaktion von TTP und KSRP. Dies ermöglicht parallel eine vermehrte Bindung von HuR an die iNOS-3'-UTR und führt damit zu einer Stabilisierung der iNOS-mRNA und so letztendlich auch zu einer Erhöhung der iNOS-Expression.

Außerdem konnte eine Beteiligung des Polypyrimidin-Trakt-bindenden Proteins (PTB) an der Regulation der humanen iNOS-Expression gezeigt werden. PTB erhöhte die Expression der iNOS und interagierte Zytokin-unabhängig mit KSRP.

Zusammenfassend lässt sich schließen, dass ein Zusammenspiel verschiedener Proteine in einem komplexen Netzwerk für die fein abgestimmte Regulation der humanen iNOS-Expression auf post-transkriptioneller Ebene verantwortlich ist.

Summary

The expression of the human inducible nitric oxide synthase (iNOS) is regulated both by transcriptional and post-transcriptional mechanisms. For post-transcriptional regulation of iNOS expression modulation of mRNA stability plays an important role.

It could be demonstrated that the p38-MAPK signal transduction pathway and the RNA binding proteins TTP, KSRP, HuR and PTB are involved in the post-transcriptional regulation of iNOS expression.

Inhibition of the p38-MAPK resulted in a reduction of iNOS mRNA expression but not iNOS promoter activity. The RNA binding protein tristetraprolin (TTP) stabilized iNOS mRNA after cytokine stimulation without binding to it. TTP expression was enhanced after cytokine treatment. Inhibition of the p38-MAPK resulted in a reduction of the cytokine-stimulated TTP expression.

The „KH-type splicing regulatory protein” (KSRP) showed a destabilizing effect on the iNOS mRNA. The degradation of the iNOS mRNA is most likely mediated by cytokine-independent interaction of KSRP with the exosome. KSRP and TTP also displayed an interaction which was increased by cytokine stimulation and could be reduced by p38-MAPK inhibition. In addition it could be demonstrated that binding of KSRP to the iNOS mRNA is essential for its destabilizing effect. Mapping of the exact binding site revealed an interaction of KSRP with the most 3'-located ARE in the iNOS-3'-UTR. This is also the binding site for HuR, an iNOS stabilizing protein. It could be shown that KSRP and HuR compete for this binding site. After cytokine treatment intracellular binding to the iNOS mRNA was reduced for KSRP and enhanced for HuR.

In conclusion, stabilization of the iNOS mRNA after cytokine treatment results from an enhanced interaction of TTP and KSRP that leads to a dislodgement of the KSRP-exosome-complex from the iNOS mRNA. In parallel, binding of HuR to the iNOS-3'-UTR is increased. This facilitates stabilization of the iNOS mRNA and as a consequence increases iNOS expression.

Moreover an involvement of the polypyrimidine tract binding protein (PTB) in the regulation of iNOS expression was shown. PTB was able to enhance iNOS expression and displayed a cytokine-independent interaction with KSRP.

According to these findings, an interplay of different RNA binding proteins in a complex network seems to be essential for the fine-tuned post-transcriptional regulation of human iNOS expression.

XI Literaturverzeichnis

- Akashi M., Shaw G., Hachiya M., Elstner E., Suzuki G. und Koeffler P. (1994) *Blood* **83**:3182-3187.
- Ambs S., Hussain S. P. und Harris C. C. (1997) *Faseb Journal* **11**:443-448.
- Ambs S., Merriam W. G., Bennett W. P., Felley-Bosco E., Ogunfusika M. O., Oser S. M., Klein S., Shields P. G., Billiar T. R. und Harris C. C. (1998) *Cancer Res* **58**:334-341.
- Ashiya M. und Grabowski P. J. (1997) *Rna* **3**:996-1015.
- Bagasra O., Michaels F. H., Zheng Y. M., Bobroski L. E., Spitsin S. V., Fu Z. F., Tawadros R. und Koprowski H. (1995) *Proc Natl Acad Sci USA* **92**:12041-12045.
- Bakheet T., Frevel M., Williams B. R., Greer W. und Khabar K. S. (2001) *Nucleic Acids Res* **29**:246-254.
- Bandaletova T., Brouet I., Bartsch H., Sugimura T., Esumi H. und Ohshima H. (1993) *APMIS* **101**:330-336.
- Barnes P. J. (1996) *Thorax* **51**:218-220.
- Bashirullah A., Cooperstock R. und Lipshitz H. (2001) *Proc Natl Acad Sci USA* **98**:7025-7028.
- Bevilacqua A., Ceriani M. C., Capaccioli S. und Nicolini A. (2003) *J Cell Physiol* **195**:356-372.
- Bhat N. R., Feinstein D. L., Shen Q. und Bhat A. N. (2002) *J Biol Chem* **277**:29584-29592.
- Blackshear P. J. (2002) *Biochem Soc Trans* **30**:945-952.
- Bogdan C. (2001) *Nat Immunol* **2**:907-916.
- Bogdan C., Vodovotz Y., Paik J., Xie Q. W. und Nathan C. (1994) *J Leukocyte Biol* **55**:227-233.
- Bohlinger I., Leist M., Barsig J., Uhlig S., Tiegs G. und Wendel A. (1995) *Hepatology* **22**:1829-1837.
- Boissel J. P., Zelenka M., Gödtel-Armbrust U., Feuerstein T. J. und Förstermann U. (2003) *Biol Chem* **384**:351-362.
- Bollig F., Winzen R., Gaestel M., Kostka S., Resch K. und Holtmann H. (2003) *Biochem Biophys Res Commun* **301**:665-670.
- Borman A., Howell M. T., Patton J. G. und Jackson R. J. (1993) *J Gen Virol* **74**:1775-1788.
- Borovkov A. Y. und Rivkin M. I. (1997) *Biotechniques* **22**:812-814.
- Bradford M. M. (1976) *Anal Biochem* **72**:248-254.
- Brennan C. M. und Steitz J. A. (2001) *Cell Mol Life Sci* **58**:266-277.
- Briata P., Ilengo C., Corte G., Moroni C., Rosenfeld M. G., Chen C. Y. und Gherzi R. (2003) *Mol Cell* **12**:1201-1211.
- Briata P., Forcales S. V., Ponassi M., Corte G., Chen C. Y., Karin M., Puri P. L. und Gherzi R. (2005) *Mol Cell* (persönliche Information)
- Broholm H., Braendstrup O. und Lauritzen M. (2001) *Clin Neuropathol* **20**:233-238.
- Broholm H., Rubin I., Kruse A., Braendstrup O., Schmidt K., Skriver E. B. und Lauritzen M. (2003) *Clin Neuropathol* **22**:273-281.
- Brooks S. A., Connolly J. E., Diegel R. J., Fava R. A. und Rigby W. F. (2002) *Arthritis Rheum* **46**:1362-1370.
- Brouwer R., Pruijn G. J. und van Venrooij W. J. (2001) *Arthritis Res* **3**:102-106.
- Bruch-Gerharz D., Schnorr O., Suschek C., Beck K. F., Pfeilschifter J., Ruzicka T. und Kolb-Bachofen V. (2003) *Am J Pathol* **162**:203-211.
- Bulut A. S., Erden E., Sak S. D., Doruk H., Kursun N. und Dincol D. (2005) *Virchows Arch* **447**:24-30.

- Burnette W. N. (1981) *Anal Biochem* **112**:195-203.
- Busse R. und Mülsch A. (1990) *FEBS Lett* **275**:87-90.
- Caivano M. (1998) *FEBS Lett* **429**:249-253.
- Cao H., Dzineku F. und Blackshear P. J. (2003) *Arch Biochem Biophys* **412**:106-120.
- Caput D., Beutler B., Hartog K., Thayer R., Brown-Shimer S. und Cerami A. (1986) *Proc Natl Acad Sci USA* **83**:1670-1674.
- Carballo E., Cao H., Lai W. S., Kennington E. A., Campbell D. und Blackshear P. J. (2001) *J Biol Chem* **276**:42580-42587.
- Carballo E., Lai W. S. und Blackshear P. J. (1998) *Science* **281**:1001-1005.
- Carballo E., Lai W. S. und Blackshear P. J. (2000) *Blood* **95**:1891-1899.
- Carstens R. P., Wagner E. J. und Garcia-Blanco M. A. (2000) *Mol Cell Biol* **20**:7388-7400.
- Castelo-Branco P., Furger A., Wollerton M., Smith C., Moreira A. und Proudfoot N. (2004) *Mol Cell Biol* **24**:4174-4183.
- Chan R. C. und Black D. L. (1997) *Mol Cell Biol* **17**:4667-4676.
- Charles I. G., Palmer R. M. J., Hickery M. S., Bayliss M. T., Chubb A. P., Hall V. S., Moss D. W. und Moncada S. (1993) *Proc Natl Acad Sci USA* **90**:11419-11423.
- Chen C. Y., Gherzi R., Andersen J. S., Gaietta G., Jurchott K., Royer H. D., Mann M. und Karin M. (2000) *Genes Dev* **14**:1236-1248.
- Chen C. Y., Gherzi R., Ong S. E., Chan E. L., Rajmakers R., Pruijn G. J., Stoecklin G., Moroni C., Mann M. und Karin M. (2001) *Cell* **107**:451-464.
- Chen C. Y. und Shyu A. B. (1994) *Mol Cell Biol* **14**:8471-8482.
- Chen C. Y. und Shyu A. B. (1995) *Trends Biochem Sci* **20**:465-470.
- Chesler D. A., McCutcheon J. A. und Reiss C. S. (2004) *J Interferon Cytokine Res* **24**:141-149.
- Chinje E. C. und Stratford I. J. (1997) *Essays Biochem* **32**:61-72.
- Cho S., Kim J. H., Back S. H. und Jang S. K. (2005) *Mol Cell Biol* **25**:1283-1297.
- Choi S. K., Choi H. K., Kadonookuda K., Taniai K., Kato Y., Yamamoto M., Chowdhury S., Xu J. H., Miyanoshita A., Debnath N. C., Asaoka A. und Yamakawa M. (1995) *Biochem Biophys Res Commun* **207**:452-459.
- Chomczynski P. und Sacchi N. (1987) *Anal Biochem* **162**:156-159.
- Chu S. C., Marks Konczalik J., Wu H. P., Banks T. C. und Moss J. (1998) *Biochem Biophys Res Commun* **248**:871-878.
- Coles L. S., Bartley M. A., Bert A., Hunter J., Polyak S., Diamond P., Vadas M. A. und Goodall G. J. (2004) *Eur J Biochem* **271**:648-660.
- Conne B., Stutz A. und Vassalli J. (2000) *Nat Med* **6**:637-641.
- Corbett J. A. und McDaniel M. L. (1992) *Diabetes* **41**:897-903.
- Cornelis S., Tinton S. A., Schepens B., Bruynooghe Y. und Beyaert R. (2005) *Nucleic Acids Res* **33**:3095-3108.
- Cote C. A., Gautreau D., Denegre J. M., Kress T. L., Terry N. A. und Mowry K. L. (1999) *Mol Cell* **4**:431-437.
- Cuenda A., Cohen P., Buee-Scherrer V. und Goedert M. (1997) *Embo J* **16**:295-305.
- Cunha F. Q., Moncada S. und Liew F. Y. (1992) *Biochem Biophys Res Commun* **182**:1155-1159.

- Da Silva J., Pierrat B., Mary J. L. und Lesslauer W. (1997) *J Biol Chem* **272**:28373-28380.
- Daniliuc S., Bitterman H., Rahat M. A., Kinarty A., Rosenzweig D., Lahat N. und Nitza L. (2003) *J Immunol* **171**:3225-3232.
- Dashti S. R., Efimova T. und Eckert R. L. (2001) *J Biol Chem* **276**:27214-27220.
- De Groot C. J., Ruuls S. R., Theeuwes J. W., Dijkstra C. D. und Van der Valk P. (1997) *J Neuropathol Exp Neurol* **56**:10-20.
- de Vera M. E., Shapiro R. A., Nüssler A. K., Mudgett J. S., Simmons R. L., Morris S. M., Jr., Billiar T. R. und Geller D. A. (1996) *Proc Natl Acad Sci USA* **93**:1054-1059.
- de Vera M. E., Taylor B. S., Wang Q., Shapiro R. A., Billiar T. R. und Geller D. A. (1997) *Am J Physiol* **273**:1290-1296.
- Dean J. L., Sully G., Clark A. R. und Saklatvala J. (2004) *Cell Signal* **16**:1113-1121.
- Dean J. L., Wait R., Mahtani K. R., Sully G., Clark A. R. und Saklatvala J. (2001) *Mol Cell Biol* **21**:721-730.
- Dignam J. D., Lebovitz R. M. und Roeder R. G. (1983) *Nucleic Acids Res* **11**:1475-489.
- Ding A., Nathan C. F., Graycar J., Derynck R., Stuehr D. J. und Srimal S. (1990) *J Immunol* **145**:940-944.
- Ding M., St. Pierre B. A., Parkinson J. F., Medberry P., Wong J. L., Rogers N. E., Ignarro L. J. und Merrill J. E. (1997) *J Biol Chem* **272**:11327-11335.
- Dodson R. E. und Shapiro D. J. (2002) *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* **72**:129-164.
- Doi M., Shichiri M., Katsuyama K., Ishimaru S. und Hirata Y. (2002) *Atherosclerosis* **160**:123-132.
- Donev R. M., Doneva T. A., Bowen W. R. und Sheer D. (2002) *Mol Cell Biochem* **233**:181-185.
- Dong Z. Y., Qi X. O., Xie K. P. und Fidler I. J. (1993) *J Immunol* **151**:2717-2724.
- Dorssers L., Burger H., Bot F., Delwel R., Geurts van Kessel A. H., Lowenberg B. und Wagemaker G. (1987) *Gene* **55**:115-124.
- Drummond G. R., Cai H., Davis M. E., Ramasamy S. und Harrison D. G. (2000) *Circ Res* **86**:347-354.
- DuBois R. N., McLane M. W., Ryder K., Lau L. F. und Nathans D. (1990) *J Biol Chem* **265**:19185-19191.
- Duenas-Gonzalez A., Isales C. M., del Mar Abad-Hernandez M., Gonzalez-Sarmiento R., Sanguenza O. und Rodriguez-Commes J. (1997) *Mod Pathol* **10**:645-649.
- Eberhardt W., Pluss C., Hummel R. und Pfeilschifter J. (1998) *J Immunol* **160**:4961-4969.
- Eissa N. T., Strauss A. J., Haggerty C. M., Choo E. K., Chu S. C. und Moss J. (1996) *J Biol Chem* **271**:27184-27187.
- Elbashir S. M., Harborth J., Weber K. und Tuschl T. (2002) *Methods* **26**:199-213.
- Elbashir S. M., Lendeckel W. und Tuschl T. (2001) *Genes Dev* **15**:188-200.
- Enslin H., Raingeaud J. und Davis R. J. (1998) *J Biol Chem* **273**:1741-1748.
- Fechir M., Linker K., Pautz A., Hubrich T., Förstermann U., Rodriguez-Pascual F. und Kleinert H. (2005a) *Mol Pharmacol* **67**:2148-2161.
- Fechir M., Linker K., Pautz A., Hubrich T. und Kleinert H. (2005b) *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)* **51**:299-305.
- Felley-Bosco E., Bender F. C., Courjault-Gautier F., Bron C. und Quest A. F. (2000) *Proc Natl Acad Sci USA* **97**:14334-14339.
- Fiset S. und Chabot B. (2001) *Nucleic Acids Res* **29**:2268-2275.

- Förstermann U., Boissel J. P. und Kleinert H. (1998) *FASEB J* **12**:773-790.
- Förstermann U., Closs E. I., Pollock J. S., Nakane M., Schwarz P., Gath I. und Kleinert H. (1994) *Hypertension* **23**:1121-1131.
- Förstermann U., Gath I., Schwarz P., Closs E. I. und Kleinert H. (1995a) *Biochem Pharmacol* **50**:1321-1332.
- Förstermann U., Kleinert H., Gath I., Schwarz P., Closs E. I. und Dun N. J. (1995b) in *Nitric oxide: Biochemistry, molecular biology, and therapeutic implications* (Ignarro L. und Murad F. eds) pp. 171-186, Academic Press, Inc., San Diego.
- Förstermann U., Li H., Schwarz P. M. und Kleinert H. (2003) in *Signal transduction by reactive oxygen and nitrogen species* (Forman H. J., Fukuto J. und Torres M. eds) pp. 119-154, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.
- Förstermann U., Pollock J. S. und Nakane M. (1993) *Trends Cardiovasc Med* **3**:104-110.
- Förstermann U., Schmidt H. H. H. W., Kohlhaas K. L. und Murad F. (1992) *Eur J Pharmacol Mol Pharmacol* **225**:161-165.
- Frank S., Madlener M., Pfeilschifter J. und Werner S. (1998) *J Invest Dermatol* **111**:1058-1064.
- Fuentes-Panana E. M., Peng R., Brewer G., Tan J. und Ling P. D. (2000) *J Virol* **74**:8166-8175.
- Galea E., Reis D. J. und Feinstein D. L. (1994) *J Neurosci Res* **37**:406-414.
- Ganster R. W., Taylor B. S., Shao L. und Geller D. A. (2001) *Proc Natl Acad Sci USA* **98**:8638-8643.
- Gao M., Wilusz C. J., Peltz S. W. und Wilusz J. (2001) *Embo J* **20**:1134-1143.
- Gath I., Closs E. I., Gödtel-Armbrust U., Schmitt S., Nakane M., Wessler I. und Förstermann U. (1996) *FASEB J* **10**:1614-1620.
- Geller D. A. und Billiar T. R. (1998) *Cancer Metastasis Rev* **17**:7-23.
- Geller D. A., Lowenstein C. J., Shapiro R. A., Nussler A. K., Di Silvio M., Wang S. C., Nakayama D. K., Simmons R. L., Snyder S. H. und Billiar T. R. (1993) *Proc Natl Acad Sci USA* **90**:3491-3495.
- Gherzi R., Lee K. Y., Briata P., Wegmuller D., Moroni C., Karin M. und Chen C. Y. (2004) *Mol Cell* **14**:571-583.
- Ghetti A., Pinol-Roma S., Michael W. M., Morandi C. und Dreyfuss G. (1992) *Nucleic Acids Res* **20**:3671-3678.
- Ghosh S., May M. J. und Kopp E. B. (1998) *Annu Rev Immunol* **16**:225-260.
- Gilbert R. S. und Herschman H. R. (1993) *Biochem Biophys Res Commun* **195**:380-384.
- Gooding C., Roberts G. C. und Smith C. W. (1998) *Rna* **4**:85-100.
- Gouble A., Grazide S., Meggetto F., Mercier P., Delsol G. und Morello D. (2002) *Cancer Res* **62**:1489-1495.
- Grabowski P. und Black D. (2001) *Prog Neurobiol* **65**:289-308.
- Green S. J., Mellouk S., Hoffman S. L., Meltzer M. S. und Nacy C. A. (1990) *Immunol Lett* **25**:15-19.
- Grosset C., Chen C. Y., Xu N., Sonenberg N., Jacquemin-Sablon H. und Shyu A. B. (2000) *Cell* **103**:29-40.
- Guan Z., Baier L. D. und Morrison A.R. (1997) *J Biol Chem* **272**:8083-8089.
- Guo F. H., De Raeve H. R., Rice T. W., Stuehr D. J., Thunnissen F. B. und Erzurum S. C. (1995) *Proc Natl Acad Sci USA* **92**:7809-7813.
- Hahm B., Cho O. H., Kim J. E., Kim Y. K., Kim J. H., Oh Y. L. und Jang S. K. (1998a) *FEBS Lett* **425**:401-406.
- Hahm K. B., Lee K. J., Kim Y. S., Kim J. H., Cho S. W., Yim H. und Joo H. J. (1998b) *Dig Dis Sci* **43**:235-240.
- Hall M. P., Huang S. und Black D. L. (2004) *Mol Biol Cell* **15**:774-786.

- Hamid Q., Springall D. R., Riveros Moreno V., Chanez P., Howarth P., Redington A., Bousquet J., Godard P., Holgate S. und Polak J. M. (1993) *Lancet* **342**:1510-1513.
- Hamilton B. J., Nagy E., Malter J. S., Arrick B. A. und Rigby W. F. (1993) *J Biol Chem* **268**:8881-8887.
- Hangai M., Yoshimura N., Hiroi K., Mandai M. und Honda Y. (1996) *Exp Eye Res* **63**:501-509.
- Harbrecht B. G., Wu B., Watkins S. C., Billiar T. R. und Peitzman A. B. (1997) *Shock* **8**:415-421.
- Harmey J. H., Bucana C. D., Lu W., Byrne A. M., McDonnell S., Lynch C., Bouchier-Hayes D. und Dong Z. (2002) *Int J Cancer* **101**:415-422.
- Hausladen A. und Stamler J. S. (1998) *Proc Natl Acad Sci USA* **95**:10345-10347.
- He L., Weber A. und Levens D. (2000) *Nucleic Acids Res* **28**:4558-4565.
- He W. und Parker R. (2001) *Genetics* **158**:1445-1455.
- Hevel J. M., White K. A. und Marletta M. A. (1991) *J Biol Chem* **266**:22789-22791.
- Heximer S. P. und Forsdyke D. R. (1993) *DNA Cell Biol* **12**:73-88.
- Hoffman R. A., Zhang G., Nussler N. C., Gleixner S. L., Ford H. R., Simmons R. L. und Watkins S. C. (1997) *Am J Physiol* **272**:383-392.
- Hollams E. M., Giles K. M., Thomson A. M. und Leedman P. J. (2002) *Neurochem Res* **27**:957-980.
- Hortelano S., Genaro A. M. und Bosca L. (1993) *FEBS Lett* **320**:135-139.
- Huang P. L., Huang Z. H., Mashimo H., Bloch K. D., Moskowitz M. A., Bevan J. A. und Fishman M. C. (1995) *Nature* **377**:239-242.
- Huez I., Creancier L., Audigier S., Gensac M. C., Prats A. C. und Prats H. (1998) *Mol Cell Biol* **18**:6178-6190.
- Hughes M. und Andrews D. (1997) *FEBS Lett* **414**:19-22.
- Iacono M., Mignone F. und Pesole G. (2005) *Gene* **349**:97-105.
- Inouye S. und Shimomura O. (1997) *Biochem Biophys Res Commun* **233**:349-353.
- Jansen R. (2001) *Nat Rev Mol Cell Biol* **2**:247-256.
- Jing Q., Huang S., Guth S., Zarubin T., Motoyama A., Chen J., Di Padova F., Lin S. C., Gram H. und Han J. (2005) *Cell* **120**:623-634.
- Johnson B. A., Stehn J. R., Yaffe M. B. und Blackwell T. K. (2002) *J Biol Chem* **277**:18029-18036.
- Karupiah G. und Harris N. (1995) *J Exp Med* **181**:2171-2179.
- Katahira M., Miyanoiri Y., Enokizono Y., Matsuda G., Nagata T., Ishikawa F. und Uesugi S. (2001) *J Mol Biol* **311**:973-988.
- Kilbourn R. G. und Belloni P. (1990) *J Natl Cancer Inst* **82**:772-776.
- Kilbourn R. G., Jubran A., Gross S. S., Griffith O. W., Levi R., Adams J. und Lodato R. F. (1990) *Biochem Biophys Res Commun* **172**:1132-1138.
- Kim Y. M., de Vera M. E., Watkins S. C. und Billiar T. R. (1997) *J Biol Chem* **272**:1402-1411.
- Kimura H., Hokari R., Miura S., Shigematsu T., Hirokawa M., Akiba Y., Kurose I., Higuchi H., Fujimori H., Tsuzuki Y., Serizawa H. und Ishii H. (1998) *Gut* **42**:180-187.
- Kitamura Y., Takahashi H., Nomura Y. und Taniguchi T. (1996) *Eur J Pharmacol* **306**:297-306.
- Kleinert H., Boissel J. P., Schwarz P. M. und Förstermann U. (2000) in *Nitric Oxide: Biology and Pathobiology* (Ignarro L. J. ed) pp. 105-128, Academic Press, New York.

- Kleinert H., Euchenhofer C., Fritz G., Ihrig-Biedert I. und Förstermann U. (1998a) *Br J Pharmacol* **123**:1716-1722.
- Kleinert H., Euchenhofer C., Ihrig Biedert I. und Förstermann U. (1996a) *Mol Pharmacol* **49**:15-21.
- Kleinert H., Euchenhofer C., Ihrig-Biedert I. und Förstermann U. (1996b) *J Biol Chem* **271**:6039-6044
- Kleinert H., Geller D. A. und Förstermann U. (1999) *Naunyn-Schmiedeb Arch Pharmacol* **359**:R37.
- Kleinert H., Mangasser-Stephan K., Yao Y., Fechir M., Bouazzaoui A., Rodriguez-Pascual F. und Förstermann U. (2002) *Nitric Oxide* **6**:412.
- Kleinert H., Pautz A., Linker K. und Schwarz P. M. (2004) *Eur J Pharmacol* **500**:255-266.
- Kleinert H., Schwarz P. M. und Förstermann U. (2003) *Biol Chem* **384**:1343-1364.
- Kleinert H., Wallerath T., Fritz G., Ihrig-Biedert I., Rodriguez-Pascual F., Geller D. A. und Förstermann U. (1998b) *Br J Pharmacol* **125**:193-201.
- Kobzik L., Bredt D. S., Lowenstein C. J., Drazen J., Gaston B., Sugarbaker D. und Stamler J. S. (1993) *Am J Respir Cell Mol Biol* **9**:371-377.
- Koide M., Kawahara Y., Nakayama I., Tsuda T. und Yokoyama M. (1993) *J Biol Chem* **268**:24959-24966.
- Kolb H. und Kolb-Bachofen V. (1992) *Immunol Today* **13**:157-160.
- Kolb-Bachofen V. (1996) *Biochem Soc Trans* **24**:233-234.
- Kolyada A. Y., Savikovskiy N. und Madias N. E. (1996) *Biochem Biophys Res Commun* **220**:600-605.
- Kontoyiannis D., Pasparakis M., Pizarro T. T., Cominelli F. und Kollias G. (1999) *Immunity* **10**:387-398.
- Kozak M. (1987) *Nucleic Acids Res* **15**:8125-8148.
- Kracht M. und Saklatvala J. (2002) *Cytokine* **20**:91-106.
- Krecic A. M. und Swanson M. S. (1999) *Curr Opin Cell Biol* **11**:363-371.
- Kristof A. S., Marks-Konczalik J. und Moss J. (2001) *J Biol Chem* **276**:8445-8452.
- Kröncke K. D., Fehsel K. und Kolb-Bachofen V. (1995) *Biol Chem Hoppe Seyler* **376**:327-343.
- Kröncke K. D., Fehsel K. und Kolb-Bachofen V. (1998) *Clin Exp Immunol* **113**:147-156.
- Kröncke K. D., Fehsel K., Schmidt T., Zenke F. T., Dasting I., Wesener J. R., Bettermann H., Breunig K. D. und Kolb-Bachofen V. (1994) *Biochem Biophys Res Commun* **200**:1105-1110.
- Kunz D., Walker G., Eberhardt W. und Pfeilschifter J. (1996) *Proc Natl Acad Sci USA* **93**:255-259.
- Kunz D., Walker G. und Pfeilschifter J. (1997) *Inflamm Res* **46**:327-331.
- Laemmli U. K. (1970) *Nature* **227**:680-685.
- Lahti A., Jalonen U., Kankaanranta H. und Moilanen E. (2003) *Mol Pharmacol* **64**:308-315.
- Lai W. S. und Blackshear P. J. (2001) *J Biol Chem* **276**:23144-23154.
- Lai W. S., Carballo E., Strum J. R., Kennington E. A., Phillips R. S. und Blackshear P. J. (1999) *Mol Cell Biol* **19**:4311-4323.
- Lai W. S., Kennington E. A. und Blackshear P. J. (2002) *J Biol Chem* **277**:9606-9613.
- Lai W. S., Kennington E. A. und Blackshear P. J. (2003) *Mol Cell Biol* **23**:3798-3812.
- Lai W. S., Stumpo D. J. und Blackshear P. J. (1990) *J Biol Chem* **265**:16556-16563.
- Lala P. K. und Chakraborty C. (2001) *Lancet Oncol* **2**:149-156.
- Lander E., Linton L., Birren B., Nusbaum C., Zody M., Baldwin J., Devon K., Dewar K., Doyle M. und FitzHugh W. (2001) *Nature* **409**:860-921.

- Langrehr J. M., Hoffman R. A., Billiar T. R., Lee K. K., Schraut W. H. und Simmons R. L. (1991) *Surgery* **110**:335-342.
- Lee J. J. und Costlow N. A. (1987) *Methods Enzymol* **152**:633-648.
- Lejeune F., Li X. und Maquat L. E. (2003) *Mol Cell* **12**:675-687.
- Lellek H., Kirsten R., Diehl I., Apostel F., Buck F. und Greeve J. (2000) *J Biol Chem* **275**:19848-19856.
- Li H., Wallerath T. und Förstermann U. (2002) *Nitric Oxide Biol Chem* **7**:103-118.
- Linker K., Pautz A., Fehir M., Hubrich T., Greeve J. und Kleinert H. (2005) *Nucleic Acids Res* **33**:4813-4827.
- Linn S. C., Morelli P. J., Edry I., Cottongim S. E., Szabo C. und Salzman A. L. (1997) *Am J Physiol* **272**:1499-1508.
- Linscheid P., Schaffner A. und Schoedon G. (1998) *Biochem Biophys Res Commun* **243**:137-141.
- Livak K. J. und Schmittgen T. D. (2001) *Methods* **25**:402-408.
- Lowenstein C. J., Alley E. W., Raval P., Snowman A. M., Snyder S. H., Russell S. W. und Murphy W. J. (1993) *Proc Natl Acad Sci USA* **90**:9730-9734.
- Lowenstein C. J., Glatt C. S., Bredt D. S. und Snyder S. H. (1992) *Proc Natl Acad Sci USA* **89**:6711-6715.
- Lui P., Zeng C., Acton S., Cok S., Sexton A. und Morrison A. R. (2004) *Am J Physiol Cell Physiol* **286**:145-152.
- Luss H., Li R. K., Shapiro R. A., Tzeng E., McGowan F. X., Yoneyama T., Hatakeyama K., Geller D. A., Mickle D. A., Simmons R. L. und Billiar T. R. (1997) *J Mol Cell Cardiol* **29**:1153-1165.
- Lyons C. R., Orloff G. J. und Cunningham J. M. (1992) *J Biol Chem* **267**:6370-6374.
- Ma Q. und Herschman H. R. (1991) *Oncogene* **6**:1277-1278.
- MacKendrick W., Caplan M. und Hsueh W. (1993) *Pediatr Res* **34**:222-228.
- MacMicking J., Xie Q. W. und Nathan C. (1997) *Annu Rev Immunol* **15**:323-350.
- MacMicking J. D., Nathan C., Hom G., Chartrain N., Fletcher D. S., Trumbauer M., Stevens K., Xie Q. W., Sokol K., Hutchinson N., Chen H. und Mudgett J. S. (1995) *Cell* **81**:641-650.
- Mahtani K. R., Brook M., Dean J. L., Sully G., Saklatvala J. und Clark A. R. (2001) *Mol Cell Biol* **21**:6461-6469.
- Mangus D. A., Evans M. C. und Jacobson A. (2003) *Genome Biol* **4**:223.
- Markewitz B. A., Michael J. R. und Kohan D. E. (1993) *J Clin Invest* **91**:2138-2143.
- Markovtsov V., Nikolic J. M., Goldman J. A., Turck C. W., Chou M. Y. und Black D. L. (2000) *Mol Cell Biol* **20**:7463-7479.
- Martel-Pelletier J., Mineau F., Jovanovic D., Di Battista J. A. und Pelletier J. P. (1999) *Arthritis Rheum* **42**:2399-2409.
- Matsumi H., Yano T., Koji T., Ogura T., Tsutsumi O., Taketani Y. und Esumi H. (1998) *Biochem Biophys Res Commun* **243**:67-72.
- Meraz M. A., White J. M., Sheehan K. C. F., Bach E. A., Rodig S. J., Dighe A. S., Kaplan D. H., Riley J. K., Greenlund A. C., Campbell D., Carver-Moore K., DuBois R. N., Clark R., Aguet M. und Schreiber R. D. (1996) *Cell* **84**:431-442.
- Mian I. S. (1997) *Nucleic Acids Res* **25**:3187-3195.
- Mignone F., Gissi C., Liuni S. und Pesole G. (2002) *Genome Biology* **3**:4001-4010
- Min H., Turck C. W., Nikolic J. M. und Black D. L. (1997) *Genes Dev* **11**:1023-1036.
- Misquitta C. M., Iyer V. R., Werstiuk E. S. und Grover A. K. (2001) *Mol Cell Biochem* **224**:53-67.

- Mitchell P., Petfalski E., Shevchenko A., Mann M. und Tollervey D. (1997) *Cell* **91**:457-466.
- Mitchell P. und Tollervey D. (2000) *Curr Opin Genet Dev* **10**:193-198.
- Moraes K. C., Quaresma A. J., Maehns K. und Kobarg J. (2003) *Biol Chem* **384**:25-37.
- Mori M. und Gotoh T. (2000) *Biochem Biophys Res Commun* **275**:715-719.
- Morris B. J., Adams D. J., Beveridge D. J., van der Weyden L., Mangs H. und Leedman P. J. (2004) *Acta Physiol Scand* **181**:369-373.
- Muhl H. und Pfeilschifter J. (1994) *Kidney Int* **46**:1302-1306.
- Mulligan G. J., Guo W., Wormsley S. und Helfman D. M. (1992) *J Biol Chem* **267**:25480-25487.
- Mulligan M. S., Hevel J. M., Marletta M. A. und Ward P. A. (1991) *Proc Natl Acad Sci USA* **88**:6338-6342.
- Mülsch A., Schray-Utz B., Mordvintcev P. I., Hauschildt S. und Busse R. (1993) *FEBS Lett* **321**:215-218.
- Musial A. und Eissa N. T. (2001) *J Biol Chem* **276**:24268-24273.
- Nathan C. F. und Hibbs J. B. (1991) *Curr Opin Immunol* **3**:65-70.
- Niepmann M., Petersen A., Meyer K. und Beck E. (1997) *J Virol* **71**:8330-8339.
- Nishiya T., Uehara T., Edamatsu H., Kaziro Y., Itoh H. und Nomura Y. (1997) *FEBS Lett* **408**:33-38.
- Oh Y. L., Hahm B., Kim Y. K., Lee H. K., Lee J. W., Song O., Tsukiyama-Kohara K., Kohara M., Nomoto A. und Jang S. K. (1998) *Biochem J* **331**:169-175.
- Oliveira C. C., Gonzales F. A. und Zanchin N. I. (2002) *Nucleic Acids Res* **30**:4186-4198.
- Ostareck-Lederer A., Ostareck D. H., Cans C., Neubauer G., Bomsztyk K., Superti-Furga G. und Hentze M. W. (2002) *Mol Cell Biol* **22**:4535-4543.
- Park C. S., Pardhasaradhi K., Gianotti C., Villegas E. und Krishna G. (1994) *Biochem Biophys Res Commun* **205**:85-91.
- Patton J. G., Mayer S. A., Tempst P. und Nadal-Ginard B. (1991) *Genes Dev* **5**:1237-1251.
- Pelletier J., Kaplan G., Racaniello V. R. und Sonenberg N. (1988) *Mol Cell Biol* **8**:1103-1112.
- Peng S. S., Chen C. Y. und Shyu A. B. (1996) *Mol Cell Biol* **16**:1490-1499.
- Perez I., Lin C. H., McAfee J. G. und Patton J. G. (1997a) *Rna* **3**:764-778.
- Perez I., McAfee J. G. und Patton J. G. (1997b) *Biochemistry* **36**:11881-11890.
- Pesole G., Liuni S., Grillo G. und Saccone C. (1997) *Gene* **205**:95-102.
- Pesole G., Mignone F., Gissi C., Grillo G., Licciulli F. und Liuni S. (2001) *Gene* **276**:73-81.
- Phillips K., Kedersha N., Shen L., Blackshear P. J. und Anderson P. (2004) *Proc Natl Acad Sci USA* **101**:2011-2016.
- Piecyk M., Wax S., Beck A. R., Kedersha N., Gupta M., Maritim B., Chen S., Gueydan C., Krays V., Streuli M. und Anderson P. (2000) *Embo J* **19**:4154-4163.
- Poljakovic M., Nygren J. M. und Persson K. (2003) *Eur J Pharmacol* **469**:21-28.
- Pukkila M. J., Kellokoski J. K., Virtaniemi J. A., Kumpulainen E. J., Johansson R. T., Halonen P. M., Kosunen A. S., Nuutinen J. und Kosma V. M. (2002) *Laryngoscope* **112**:1084-1088.
- Raghavan A., Robison R. L., McNabb J., Miller C. R., Williams D. A. und Bohjanen P. R. (2001) *J Biol Chem* **276**:47958-47965.
- Rao C. V. (2004) *Mutat Res* **555**:107-119.

- Ratovitski E. A., Alam M. R., Quick R. A., McMillan A., Bao C., Kozlovsky C., Hand T. A., Johnson R. C., Mains R. E., Eipper B. A. und Lowenstein C. J. (1999a) *J Biol Chem* **274**:993-999.
- Ratovitski E. A., Bao C., Quick R. A., McMillan A., Kozlovsky C. und Lowenstein C. J. (1999b) *J Biol Chem* **274**:30250-20257.
- Redinbaugh M. G. und Campbell W. H. (1985) *Anal Biochem* **147**:144-147.
- Reichlin M. und Arnett F. C., Jr. (1984) *Arthritis Rheum* **27**:1150-1156.
- Ridley S. H., Dean J. L., Sarsfield S. J., Brook M., Clark A. R. und Saklatvala J. (1998) *FEBS Lett* **439**:75-80.
- Rife T. K., Xie J., Redman C. und Young A. P. (2000) *Brain Res Mol Brain Res* **75**:225-236.
- Ring H. Z., Vameghi-Meyers V., Nikolic J. M., Min H., Black D. L. und Francke U. (1999) *Genomics* **56**:350-352.
- Rodriguez-Pascual F., Hausding M., Ihrig-Biedert I., Furneaux H., Levy A. P., Förstermann U. und Kleinert H. (2000) *J Biol Chem* **275**:26040-26049.
- Sambrook J., Fritsch E. F. und Maniatis T. (1989) *Cold Spring Harbor Laboratory Press*.
- Sands W. A., Bulut V., Severn A., Xu D. M. und Liew F. Y. (1994) *Eur J Immunol* **24**:2345-2350.
- Saura M., Martinezdalmau R., Minty A., Perezsala D. und Lamas S. (1996) *Biochem J* **313**:641-646.
- Schini V. B., Durante W., Elizondo E., Scott B. T., Junquero D. C., Schafer A. I. und Vanhoutte P. M. (1992) *Eur J Pharmacol* **216**:379-383.
- Schmidlin M., Lu M., Leuenberger S. A., Stoecklin G., Mallaun M., Gross B., Gherzi R., Hess D., Hemmings B. A. und Moroni C. (2004) *Embo J* **23**:4760-4769.
- Searles C. D., Miwa Y., Harrison D. G. und Ramasamy S. (1999) *Circ Res* **85**:588-595.
- Sedmak J. J. und Grossberg S. E. (1977) *Anal Biochem* **79**:544-552.
- Sennequier N., Wolan D. und Stuehr D. J. (1999) *J Biol Chem* **274**:930-938.
- Shen X. und Masters P. S. (2001) *Proc Natl Acad Sci USA* **98**:2717-2722.
- Sherman M. P., Aeberhard E. E., Wong V. Z., Griscavage J. M. und Ignarro L. J. (1993a) *Biochem Biophys Res Commun* **191**:1301-1308.
- Sherman P. A., Laubach V. E., Reep B. R. und Wood E. R. (1993b) *Biochemistry* **32**:11600-11605.
- Sherman T. S., Chen Z., Yuhanna I. S., Lau K. S., Margraf L. R. und Shaul P. W. (1999) *Am J Physiol* **276**:383-390.
- Shyu A. B., Belasco J. G. und Greenberg M. E. (1991) *Genes Dev* **5**:221-231.
- Siddhanta U., Wu C., Abu-Soud H. M., Zhang J., Ghosh D. K. und Stuehr D. J. (1996) *J Biol Chem* **271**:7309-7312.
- Singer I., Kawka D. W., Scott S., Weidner J. R., Mumford R. A., Riehl T. E. und Stenson W. F. (1996) *Gastroenterology* **111**:871-885.
- Singh A., Sventek P., Lariviere R., Thibault G. und Schiffrin E. L. (1996a) *Am J Hypertens* **9**:867-877.
- Singh K., Balligand J. L., Fischer T. A., Smith T. W. und Kelly R. A. (1996b) *J Biol Chem* **271**:1111-1117.
- Sioud M. (2004) *Trends Pharmacol Sci* **25**:22-28.
- Sladic R. T., Lagnado C. A., Bagley C. J. und Goodall G. J. (2004) *Eur J Biochem* **271**:450-457.
- Smith P. K., Krohn R. I., Hermanson G. T., Mallia A. K., Gartner F. H., Provenzano M. D., Fujimoto E. K., Goeke N. M., Olson B. J. und Klenk D. C. (1985) *Anal Biochem* **150**:76-85.
- Soderberg M., Raffalli-Mathieu F. und Lang M. A. (2002) *Mol Pharmacol* **62**:423-431.
- Southby J., Gooding C. und Smith C. W. (1999) *Mol Cell Biol* **19**:2699-2711.

- Stichtenoth D. O. und Frölich J. C. (1998) *Br J Rheumatol* **37**:246-257.
- Stoecklin G., Hahn S. und Moroni C. (1994) *J Biol Chem* **269**:28591-28597.
- Stoecklin G., Stubbs T., Kedersha N., Wax S., Rigby W. F., Blackwell T. K. und Anderson P. (2004) *Embo J* **23**:1313-1324.
- Stuehr D. J., Cho H. J., Kwon N. S., Weise M. F. und Nathan C. F. (1991) *Proc Natl Acad Sci USA* **88**:7773-7777.
- Sully G., Dean J. L., Wait R., Rawlinson L., Santalucia T., Saklatvala J. und Clark A. R. (2004) *Biochem J* **377**:629-639.
- Suswam E. A., Nabors L. B., Huang Y., Yang X. und King P. H. (2005) *Int J Cancer* **113**:911-919.
- Taylor G. A., Carballo E., Lee D. M., Lai W. S., Thompson M. J., Patel D. D., Schenkman D. I., Gilkeson G. S., Broxmeyer H. E., Haynes B. F. und Blackshear P. J. (1996a) *Immunity* **4**:445-454.
- Taylor G. A., Lai W. S., Oakey R. J., Seldin M. F., Shows T. B., Eddy R. L., Jr. und Blackshear P. J. (1991) *Nucleic Acids Res* **19**:3454.
- Taylor G. A., Thompson M. J., Lai W. S. und Blackshear P. J. (1996b) *Mol Endocrinol* **10**:140-146.
- Tchen C. R., Brook M., Saklatvala J. und Clark A. R. (2004) *J Biol Chem* **279**:32393-32400.
- Tenenbaum S. A., Lager P. J., Carson C. C. und Keene J. D. (2002) *Methods* **26**:191-198.
- Thiele B. J., Doller A., Kahne T., Pregla R., Hetzer R. und Regitz-Zagrosek V. (2004) *Circ Res* **95**:1058-1066.
- Thomson A. M., Rogers J. T., Walker C. E., Staton J. M. und Leedman P. J. (1999) *Biotechniques* **27**:1032-1039, 1042.
- Thornton F. J., Schaffer M. R., Witte M. B., Moldawer L. L., MacKay S. L., Abouhamze A., Tannahill C. L. und Barbul A. (1998) *Biochem Biophys Res Commun* **246**:654-659.
- Tillmar L. und Welsh N. (2002) *Mol Med* **8**:263-272.
- Timchenko L. (1999) *Am J Hum Genet* **64**:360-364.
- Tojo A., Gross S. S., Zhang L., Tisher C. C., Schmidt H. H., Wilcox C. S. und Madsen K. M. (1994) *J Am Soc Nephrol* **4**:1438-1447.
- Towbin H., Staehelin T. und Gordon J. (1992) *Biotechnology* **24**:145-149.
- Treadwell E. L., Alspaugh M. A., Wolfe J. F. und Sharp G. C. (1984) *J Rheumatol* **11**:658-662.
- Valcarcel J. und Gebauer F. (1997) *Curr Biol* **7**:705-708.
- van der Velden A. und Thomas A. (1999) *Int J Biochem Cell Biol* **31**:87-106.
- van Hoof A. und Parker R. (1999) *Cell* **99**:347-350.
- Varnum B. C., Ma Q. F., Chi T. H., Fletcher B. und Herschman H. R. (1991) *Mol Cell Biol* **11**:1754-1758.
- Venter J., Adams M., Myers E., Li P., Mural R., Sutton G., Smith H., Yandell M., Evans C. und Holt R. (2001) *Science* **291**:1304-1351.
- Vodovotz Y., Bogdan C., Paik J., Xie Q. W. und Nathan C. (1993) *J Exp Med* **178**:605-613.
- Wagner E. J. und Garcia-Blanco M. A. (2001) *Mol Cell Biol* **21**:3281-3288.
- Wagner E. J. und Garcia-Blanco M. A. (2002) *Mol Cell* **10**:943-949.
- Wiechelmann K. J., Braun R. D. und Fitzpatrick J. D. (1988) *Anal Biochem* **175**:231-237.
- Wilkinson M. F. und Shyu A. B. (2001) *Bioessays* **23**:775-787.
- Wilson G. M. und Brewer G. (1999) *Methods* **17**:74-83.

- Wilusz C. J., Wormington M. und Peltz S. W. (2001) *Nat Rev Mol Cell Biol* **2**:237-246.
- Wolfe J. F., Adelstein E. und Sharp G. C. (1977) *J Clin Invest* **59**:176-178.
- Wollerton M. C., Gooding C., Wagner E. J., Garcia-Blanco M. A. und Smith C. W. (2004) *Mol Cell* **13**:91-100.
- Wood E. R., Berger H. J., Sherman P. A. und Lapetina E. G. (1993) *Biochem Biophys Res Commun* **191**:767-774.
- Worthington M. T., Amann B. T., Nathans D. und Berg J. M. (1996) *Proc Natl Acad Sci USA* **93**:13754-13759.
- Worthington M. T., Pelo J. W., Sachedina M. A., Applegate J. L., Arseneau K. O. und Pizarro T. T. (2002) *J Biol Chem* **277**:48558-48564.
- Wright K., Ward S. G., Kolios G. und Westwick J. (1997) *J Biol Chem* **272**:12626-12633.
- Xie J., Lee J. A., Kress T. L., Mowry K. L. und Black D. L. (2003) *Proc Natl Acad Sci USA* **100**:8776-8781.
- Xie Q. W., Cho H. J., Calaycay J., Mumford R. A., Swiderek K. M., Lee T. D., Ding A., Troso T. und Nathan C. (1992) *Science* **256**:225-228.
- Xie Q. W., Whisnant R. und Nathan C. (1993) *J Exp Med* **177**:1779-1784.
- Xie X., Lu J., Kulbokas E. J., Golub T. R., Mootha V., Lindblad-Toh K., Lander E. S. und Kellis M. (2005) *Nature* **434**:338-345.
- Xu N., Chen C. Y. und Shyu A. B. (1997) *Mol Cell Biol* **17**:4611-4621.
- Yamasaki K., Edington H. D., McClosky C., Tzeng E., Lizonova A., Kovesdi I., Steed D. L. und Billiar T. R. (1998) *J Clin Invest* **101**:967-971.
- Yui Y., Hattori R., Kosuga K., Eizawa H., Hiki K. und Kawai C. (1991) *J Biol Chem* **266**:12544-12547.
- Zhang L., Liu W. und Grabowski P. J. (1999) *Rna* **5**:117-130.
- Zhang W., Wagner B. J., Ehrenman K., Schaefer A. W., DeMaria C. T., Crater D., DeHaven K., Long L. und Brewer G. (1993) *Mol Cell Biol* **13**:7652-7665.
- Zhang X. J., Thompson J. H., Mannick E. E., Correa P. und Miller M. J. (1998) *Nitric Oxide* **2**:187-192.
- Zhu W., Brauchle M. A., Di Padova F., Gram H., New L., Ono K., Downey J. S. und Han J. (2001) *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **281**:499-508.
- Zinn K., Di Maio D. und Maniatis T. (1983) *Cell* **34**:865-879

XII Publikationen

Im Rahmen dieser Arbeit entstanden folgende Veröffentlichungen:

Originalarbeiten:

Linker, K., Pautz, A., Fechir, M., Hubrich, T., Greeve, J., Kleinert, H. (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**:4813-4827.

Fechir, M., Linker, K., Pautz, A., Hubrich, T., Förstermann, U., Rodriguez-Pascual, F., Kleinert, H. (2005) Tristetraprolin regulates the expression of the human inducible nitric oxide synthase gene. *Mol Pharmacol* **267**:2148-2161.

Fechir, M., Linker, K., Pautz, A., Hubrich, T., Kleinert, H. (2005) The RNA binding protein TIAR is involved in the regulation of human iNOS expression. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)* **51**:299-305.

Übersichtsarbeiten:

Kleinert, H., Pautz, A., Linker, K., Schwarz, P.M. (2004) Regulation of the expression of inducible nitric oxide synthase. *Eur J Pharmacol* **500**:255-266.

Abstracts:

Fechir, M., Schneid, C., Linker, K., Förstermann, U., Kleinert, H. (2003) Complex regulation of human iNOS expression by RNA binding proteins. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology [Suppl 1]* **367**:R41.

Kleinert, H., Fechir, M., Schneid, C., Linker, K., Förstermann, U. (2003) Regulation of human iNOS expression by RNA binding proteins. 1st Joint French-German NO-Meeting, Strasbourg.

Linker, K., Fechir, M., Schneid, C., Förstermann, U., Kleinert, H. (2004) The RNA binding protein KSRP negatively regulates human iNOS expression. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology [Suppl 1]* **369**:R40.

Linker, K., Pautz, A., Fechir, M., Förstermann, U., Kleinert, H. (2004) The RNA binding protein KSRP regulates human iNOS expression by destabilizing the iNOS mRNA. 9. NO-Forum der Gesellschaft für NO-Forschung, Mainz.

Pautz, A., Fechir, M., Linker, K., Hubrich, T., Förstermann, U., Rigby, W. F. C., Rodriguez-Pascual, F., Kleinert, H. (2004) Tristetraprolin regulates the expression of the human inducible nitric oxide synthase gene. 9. NO-Forum der Gesellschaft für NO-Forschung, Mainz.

Pautz, A., Fechir, M., Linker, K., Hubrich, T., Förstermann, U., Kleinert, H. (2005) Tristetraprolin regulates the expression of the human inducible nitric oxide synthase gene. Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology [Suppl 1] **371**:R36.

Linker, K., Pautz, A., Förstermann, U., Kleinert, H. (2005) Regulation of human iNOS expression by the polypyrimidine tract binding protein. Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology [Suppl 1] **371**:R37.

Pautz, A., Linker, K., Hubrich, T., Förstermann, U., Kleinert, H. (2005) Analysis of the post-transcriptional regulation of human iNOS expression using siRNAs. Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology [Suppl 1] **371**:R40.

Kleinert, H., Linker, K., Pautz, A., Fechir, M., Hubrich, T. (2005) Post-transcriptional regulation of human iNOS expression by a complex interaction of KSRP, TTP and HuR. EMBO-Workshop: Mechanisms and Regulation of mRNA Turnover, Arolla, Schweiz.

Pautz, A., Fechir, M., Linker, K., Hubrich, T., Förstermann, U., Rodriguez-Pascual, F., Kleinert, H. (2005) Tristetraprolin regulates the expression of the human inducible nitric oxide synthase gene. EMBO-Workshop: Mechanisms and Regulation of mRNA Turnover, Arolla, Schweiz.

Pautz, A., Linker, K., Förstermann, U., Kleinert, H. (2005) The RNA binding protein PTB regulates human iNOS expression. 10. NO-Forum der Gesellschaft für NO-Forschung, Köln.

Linker, K., Pautz, A., Fechir, M., Kleinert, H. (2005) Complex interactions of the RNA binding proteins KSRP, TTP and HuR post-transcriptionally regulate human iNOS expression. 10. NO-Forum der Gesellschaft für NO-Forschung, Köln.
