



JOHANNES GUTENBERG
UNIVERSITÄT MAINZ

Regulation der Genexpression des RNA-bindenden Proteins KSRP und dessen Bedeutung für die Pathogenese von chronisch inflammatorischen Erkrankungen

Dissertation

zur Erlangung des Grades
„Doktor der Naturwissenschaften“

am Fachbereich Biologie
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

von

Katharina Schrick

geb. am 04.10.1988 in Bad Kreuznach

Mainz

2018

Dekan:

1. Gutachter:

2. Gutachter:

Tag der Prüfung: 03.12.2018

*„Es spielt keine Rolle, wie großartig deine Theorie ist,
es spielt auch keine Rolle wie klug du bist –
wenn es sich nicht durch Experimente belegen lässt,
dann ist es einfach falsch.“*

(Richard Phillips Feynman)

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis.....	ix
Tabellenverzeichnis	xiii
Abkürzungsverzeichnis.....	xv
Zusammenfassung.....	xix
Abstract.....	xxi
1 Einleitung	1
1.1 Regulation der Genexpression	1
1.1.1 Transkriptionelle Regulation	2
1.1.1.1 Verschiedene Promotortypen.....	4
1.1.2 Posttranskriptionelle Regulation.....	5
1.1.2.1 Regulation der mRNA-Stabilität	6
1.1.2.2 microRNAs als posttranskriptionelle Regulatoren der Genexpression	8
1.1.2.3 Die Rolle der 5'-UTR für die Translationseffizienz	9
1.2 Das KH-type splicing regulatory protein KSRP	9
1.2.1 KSRP als ARE-bindendes Protein	11
1.2.2 Regulation der KSRP-Expression und Aktivität.....	13
1.2.3 Die Rolle von KSRP in der Pathogenese verschiedener Erkrankungen	15
1.3 Rheumatoide Arthritis	16
1.3.1 Pathogenese der Rheumatoiden Arthritis	17
1.3.2 Regulation der pro-inflammatorischen Genexpression im Verlauf der RA	19
1.3.3 Therapie der rheumatoiden Arthritis	19
1.3.4 Der Naturstoff Resveratrol	20
1.3.5 Mausmodelle zur Untersuchung der Pathogenese der rheumatoiden Arthritis.....	21
2 Zielsetzung der Arbeit	25
3 Material	27
3.1 Laborgeräte.....	27
3.2 Verbrauchsmaterialien	29
3.2.1 Plastikwaren	29
3.2.2 Weitere Verbrauchsmaterialien.....	29

3.3	Software.....	30
3.4	Spezielle Chemikalien und Reagenzien	30
3.5	Lösungen und Puffer.....	32
3.5.1	Allgemeine Lösungen und Puffer	32
3.5.2	Lösungen für die Plasmid-DNA-Präparation	34
3.5.3	Lösungen und Puffer für Luciferase Reporter-Gen-Analysen	34
3.5.4	Lösungen und Puffer für Protein-Analysen	35
3.5.4.1	Isolation von Kernextrakten	35
3.5.4.2	Western Blot	36
3.5.4.3	Pulldown-Analysen.....	37
3.5.4.4	RNA-Immunpräzipitation (RIP).....	38
3.5.5	Puffer für die Virusproduktion	38
3.5.6	Medien und Medienzusätze für die Zellkultur	38
3.5.7	Bakterienmedien	39
3.6	Kits	39
3.7	Marker.....	40
3.8	Antikörper.....	40
3.9	Enzyme.....	41
3.10	Plasmide	41
3.11	Oligonukleotide.....	47
3.12	Bakterien.....	51
3.13	Zelllinien.....	51
3.14	Zytokine und Substanzen zur Behandlung von Zellen	52
3.15	Versuchstiere	52
4	Methoden.....	53
4.1	Zellbiologische Arbeitsmethoden	53
4.1.1	Kultivierung eukaryotischer Zellen	53
4.1.2	Kryokonservierung und Reaktivierung eukaryotischer Zellen.....	54
4.1.3	Bestimmung der Lebendzellzahl und Aussaat der Zellen	54
4.1.4	Stimulation und Behandlung von eukaryotischen Zellen	55

4.1.5	Analyse der mRNA-Stabilität mit Hilfe von 5,6-Dichlorobenzimidazole 1- β -D-ribofuranoside	56
4.1.6	Transfektion von Zellen	56
4.1.6.1	Transiente Transfektion	56
4.1.6.2	Stabile Transfektion.....	57
4.1.7	Herstellung von Zellen ohne KSRP und KSRP-Überexpression	58
4.1.7.1	Lentivirale Transduktion.....	58
4.1.7.2	Gen-Knockout durch CRISPR/Cas9.....	60
4.2	Molekularbiologische Methoden	62
4.2.1	Isolation von DNA aus Gewebe und Zellen	62
4.2.2	Isolation von Gesamt- und miRNA aus Zellen und Gewebe	62
4.2.3	Quantifizierung von Nukleinsäuren	63
4.2.4	Reverse Transkription (RT)	64
4.2.5	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	65
4.2.5.1	Slowdown-PCR.....	66
4.2.5.2	Quickchange-PCR (QC-PCR).....	67
4.2.6	Agarose-Gelelektrophorese.....	68
4.2.7	Quantitative Realtime-PCR.....	69
4.2.8	Klonierung	71
4.2.8.1	Hybridisierung von Oligonukleotiden	72
4.2.8.2	Restriktion von DNA	72
4.2.8.3	Dephosphorylierung	72
4.2.8.4	Kinasierung.....	73
4.2.8.5	Phenol-Chloroform-Extraktion	73
4.2.8.6	Klenow-Reaktion	73
4.2.8.7	Elektroelution von DNA aus Agarose	74
4.2.8.8	Ligation.....	74
4.2.8.9	Transformation von DNA in Bakterien	74
4.2.8.10	Plasmid-DNA-Präparation.....	75
4.3	Proteinbiochemische Methoden.....	76

4.3.1	Isolation von Gesamtproteinextrakten aus Zellen und Geweben	76
4.3.2	Isolation von Kernextrakten nach Dignam und Osborne.....	76
4.3.3	Quantifizierung von Proteinen – Bradford-Assay	77
4.3.4	Fällung von Proteinen	79
4.3.5	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	79
4.3.6	Immundetektion mittels Western Blot-Analyse.....	80
4.3.7	Luciferase Reportergen-Assay	81
4.3.8	Pulldown.....	82
4.3.8.1	DNA-Pulldown	83
4.3.8.2	RNA-Pulldown	84
4.3.9	RNA-Immunpräzipitation (RIP)	85
4.4	Arbeitsmethoden mit Versuchstieren	87
4.4.1	Genotypisierung von Mäusen	87
4.4.2	Die Kollagen-Antikörper-induzierte Arthritis (CAIA) als Modell einer chronischen Entzündung.....	89
4.4.3	Bestimmung des Arthritisindex	89
4.4.4	Isolation von Peritonealmakrophagen	90
4.4.5	Histochemische Färbungen von Gelenkschnitten	90
4.5	Statistik.....	91
5	Ergebnisse.....	93
5.1	Regulation der KSRP-Expression	93
5.1.1	Charakterisierung und Eingrenzung der KSRP Promotorregion mit Hilfe von Datenbankanalysen.....	93
5.1.2	Das KSRP Gen weist eine definierte Transkriptionsstartstelle (TSS) auf.....	95
5.1.3	Ein kurzes Promotorfragment von 245 bp stromaufwärts des Exon 1 von KSRP ist wichtig für die Expression der Luciferase.....	97
5.1.4	Die KSRP 5'-UTR spielt für die KSRP-Expression eine Rolle	101
5.1.4.1	Die Kombination aus der kurzen Promotorsequenz und der 5'UTR führt zu einer 10-fach erhöhten Luciferaseaktivität	101
5.1.4.2	Die Erhöhung der Luciferaseaktivität durch die KSRP 5'-UTR ist nicht KSRP promotorspezifisch.....	104

5.1.4.3	Deletionen der KSRP 5'-UTR am 5'- und 3'-Ende führen zu einer verringerten Aktivität der Luciferase	105
5.1.4.4	Die erhöhte Luciferaseaktivität bei den 5'-UTR Konstrukten ist hauptsächlich durch translationale Regulationsmechanismen bedingt.....	107
5.1.5	Potentielle Promotorelemente in Exon 1 und Intron 1 von KSRP sind nicht von essentieller Bedeutung für die Expression der Luciferase.....	110
5.1.6	Identifizierung von Transkriptionsfaktoren	111
5.1.6.1	Pulldown-Analysen zur Verifizierung potentieller Transkriptionsfaktoren – Etablierung der Methode	112
5.1.6.2	SP1 bindet an den 3 kb KSRP Promotor	115
5.1.7	Die KSRP-Expression wird posttranskriptionell über AU-reiche Elemente in der 3'-UTR reguliert	116
5.1.8	KSRP bindet an seine eigene 3'-UTR	118
5.1.9	Analyse einer möglichen Autoregulation von KSRP	120
5.1.9.1	Generierung von Zellen mit KSRP-Überexpression oder ohne KSRP	120
5.1.9.2	Der negative Effekt der KSRP 3'-UTR auf die Luciferaseaktivität wird nicht verändert durch den Knockout oder die Überexpression von KSRP	122
5.1.9.3	Neben KSRP interagieren weitere RNA-Bindeproteine mit der KSRP 3'-UTR	125
5.1.9.4	Analyse der Autoregulation über die KSRP 5'-UTR – Klonierung eines Minigens	127
5.1.9.5	Die transiente Transfektion des Minigens in Zellen mit ausgeschalteter KSRP-Expression führt zu einer veränderten Luciferaseexpression	128
5.1.10	Das KSRP Protein weist eine hohe Stabilität auf	131
5.2	Die Rolle von KSRP in chronischen Entzündungskrankheiten.....	133
5.2.1	Typisierung der KSRP ^{-/-} Mäuse.....	133
5.2.2	Die Schwellung der Gelenke ist in KSRP-ko Mäusen nach der Induktion einer CAIA deutlich verringert	134
5.2.3	Untersuchung potentieller Ursachen für die differente CAIA-Induktion in KSRP ^{+/+} und KSRP ^{-/-} Mäusen	137
5.2.3.1	Die mRNA-Expression pro-inflammatorischer Mediatoren und Biomarker der Rheumatoiden Arthritis ist in Gelenken von KSRP ^{-/-} Mäusen reduziert.....	137

5.2.3.2	Der Knockout von KSRP führt zu einer reduzierten Infiltration von Immunzellen in die Gelenke.....	141
5.2.3.3	Die mRNA-Expression von Immunzellmarkern und Adhäsionsmolekülen ist in Pfoten von CAIA-behandelten KSRP-ko Mäusen vermindert	144
5.2.3.4	Der Knockout von KSRP hat keinen Einfluss auf die Expression des neonatalen Fc-Rezeptors in Pfoten nach der CAIA-Induktion	148
5.2.3.5	Der C1-Esterase-Inhibitor und der Komplementfaktor H spielen für die Entwicklung der CAIA keine Rolle	148
5.2.3.6	Die miR-155-Expression ist in Antikörper-behandelten KSRP-ko Mäusen tendenziell erhöht.....	150
5.2.4	Die Expression von KSRP ist in CAIA-behandelten KSRP-wt Mäusen gewebespezifisch erhöht.....	151
5.3	Anti-inflammatorische Effekte des Naturstoffes Resveratrol durch die Regulation der KSRP Aktivität	153
5.3.1	Die Verringerung der KSRP-Expression inhibiert den destabilisierenden Effekt von Resveratrol auf die mRNAs pro-inflammatorischer Gene	153
5.3.2	Die Mutation des KSRP-Threonin 692 zu Alanin verhindert den Resveratrol-vermittelten negativen Effekt auf die pro-inflammatorische Genexpression.....	156
5.3.3	Resveratrol verstärkt die intrazelluläre Interaktion zwischen KSRP und den Transkripten von IL-8, iNOS und TNF- α	158
6	Diskussion	161
6.1	Untersuchung der Expressionsregulation von KSRP	161
6.1.1	Bioinformatische Analysen geben erste Hinweise auf die Lage des KSRP Promotors sowie eine definierte TSS.....	161
6.1.2	Die Transkription von KSRP wird potentiell über einen Promotorabschnitt zwischen -245 und +16 bp relativ zur TSS initiiert	163
6.1.3	Die KSRP 5'-UTR spielt für die posttranskriptionelle Regulation der KSRP-Expression eine Rolle	167
6.1.4	SP1 bindet an den 3 kb KSRP Promotor	170
6.1.5	Die KSRP 3'-UTR ist für die posttranskriptionelle Regulation der KSRP-Expression von Bedeutung	172
6.1.6	Verschiedene RNA-Bindeproteine interagieren mit der KSRP 3'-UTR	175
6.1.7	Untersuchung der potentiellen Autoregulation von KSRP.....	179

6.1.7.1	Die potentielle Autoregulation von KSRP wird nicht über die 3'-UTR vermittelt	179
6.1.7.2	Die KSRP-Eigenregulation erfolgt posttranskriptionell über die 5'-UTR..	180
6.1.8	Das KSRP Protein weist eine hohe Proteinstabilität auf	182
6.2	Analyse der Rolle von KSRP in chronisch entzündlichen Erkrankungen	184
6.2.1	Die Induktion einer CAIA in KSRP-ko Mäusen führt zu einer abgeschwächten Symptomatik der Arthritis	184
6.2.2	Der <i>Knockout</i> von KSRP führt zu einer reduzierten Infiltration von Immunzellen in die Gelenke	186
6.2.3	Der Transport der Antikörper gegen CII ist in KSRP-defizienten Mäusen nicht beeinträchtigt.....	189
6.2.4	Die Regulation der Expression relevanter Modulatoren des Komplementsystems spielt keine Rolle für die differente CAIA-Entwicklung in KSRP ko-Mäusen	190
6.2.5	Der <i>Knockout</i> von KSRP hat keinen Einfluss auf die miR-155-Expression	191
6.2.6	Die KSRP-Expression ist als Folge der Arthritisinduktion in wt-Mäusen gewebespezifisch erhöht.....	192
6.3	Die Rolle des Naturstoffes Resveratrol auf die KSRP-vermittelte Regulation der pro-inflammatorischen Genexpression	194
6.3.1	Der destabilisierende Effekt von Resveratrol auf pro-inflammatorische Transkripte ist in Zellen mit ausgeschalteter KSRP-Expression aufgehoben	194
6.3.2	Die Behandlung mit Resveratrol verhindert die p38-MAPK-vermittelte Phosphorylierung von KSRP und verstärkt die Interaktion mit Ziel-mRNAs	195
7	Anhang	199
8	Literaturverzeichnis.....	201
	Erklärung.....	221
	Publikationen	223
	Lebenslauf.....	225
	Danksagung	227

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1: Schematische Darstellung eines eukaryotischen Promotors.	4
Abbildung 1.2: Schematische Darstellung der Domänenverteilung in der Aminosäuresequenz von KSRP.	10
Abbildung 1.3: Veranschaulichung der Phosphorylierungsstellen innerhalb der KSRP Proteinsequenz.	15
Abbildung 1.4: Schematische Darstellung der Pathogenese der Rheumatoiden Arthritis.	18
Abbildung 4.1: Vereinfachte Darstellung der CRISPR/Cas9-Methode.	61
Abbildung 4.2: Schematische Darstellung des KSRP Gens in wt- und ko-Mäusen mit den jeweiligen Oligonukleotiden zur Genotypisierung.	88
Abbildung 5.1: Schematische Darstellung des KSRP Genlokus und der potentiellen Promotorregion.	95
Abbildung 5.2: GRO-cap-Analyse der putativen KSRP Promotorregion zur Identifizierung der TSS.	96
Abbildung 5.3: Analyse der Effekte verschiedener Promotordeletionen des KSRP Promotors auf die Luciferaseaktivität.	98
Abbildung 5.4: Deletion des 3'-Endes verschiedener Promotorfragmente in pGI4luc-Plasmiden und Untersuchung der Effekte auf die Luciferaseaktivität.	99
Abbildung 5.5: Analyse der Effekte der TSS-Deletion auf die Aktivität der Luciferase.	100
Abbildung 5.6: Schematische Darstellung der KSRP Promotorplasmide mit der 5'-UTR-Sequenz.	102
Abbildung 5.7: Luciferase Aktivitätsmessung unter der Kontrolle verschiedener KSRPprom 5'-UTR Abschnitte.	103
Abbildung 5.8: Analyse des Einflusses der KSRP 5'-UTR auf die Luciferaseaktivität.	104
Abbildung 5.9: Schematische Darstellung der verwendeten KSRP 5'-UTR-Deletionen.	105
Abbildung 5.10: Analyse der Bedeutung verschiedener 5'-UTR-Fragmente für die Luciferaseexpression.	106
Abbildung 5.11: Analyse der Luciferase mRNA-Expression nach transienter Transfektion verschiedener Reporterplasmide in DLD-1-Zellen.	108
Abbildung 5.12: mRNA-Expressionsanalyse nach transienter Transfektion der SV40prom und SV40prom KSRP 5'-UTR-Plasmide.	110
Abbildung 5.13: Messung der Luciferaseaktivität unter der Kontrolle des KSRPprom 245 bp_Ex1_In1_Ex2.	111
Abbildung 5.14: Überprüfung der Aufreinigung und Trennung von Kern- und Zytoplasmaextrakten aus DLD-1-Zellen.	113
Abbildung 5.15: Western Blot zur Überprüfung der Formaldehyd-Vernetzung.	115
Abbildung 5.16: Nachweis der SP1-Bindung an den KSRP Promotor.	116

Abbildung 5.17: Schematische Darstellung der AU-reichen Elemente innerhalb der KSRP 3'-UTR.....	117
Abbildung 5.18: Analyse der regulatorischen Effekte der KSRP 3'-UTR auf die Luciferaseaktivität in DLD-1-Zellen.....	118
Abbildung 5.19: Nachweis der KSRP-Interaktion mit verschiedenen Fragmenten der KSRP 3'-UTR.....	119
Abbildung 5.20: Überprüfung der KSRP-Expression in lentiviral transduzierten Zellen.....	121
Abbildung 5.21: Überprüfung des KSRP- <i>Knockouts</i> in CRISPR/Cas9-Zellen.....	122
Abbildung 5.22: Analyse der Luciferaseaktivität unter dem Einfluss der KSRP 3'-UTR in Zellen mit verminderter KSRP-Expression.....	123
Abbildung 5.23: Analyse der Luciferaseaktivität unter dem Einfluss der KSRP 3'-UTR in KSRP-überexprimierenden Zellen.....	125
Abbildung 5.24: Messung der Luciferaseaktivität des KSRP-Minigens nach transienter Transfektion von DLD-1-Zellen.....	128
Abbildung 5.25: Analyse der Luciferaseaktivität nach transienter Transfektion von KSRP- <i>Knockout</i> -Zellen mit den KSRP Minigen-Plasmiden.....	129
Abbildung 5.26: Analyse der Luciferaseaktivität in mit pGI4lucKSRPprom 245 bp transfizierten CRISPR-Zellen.....	130
Abbildung 5.27: Untersuchung der Rolle der 5'-UTR für die Autoregulation von KSRP auf transkriptioneller und translationaler Ebene.....	131
Abbildung 5.28: Untersuchung der KSRP Proteinstabilität nach der Behandlung von DLD-1-Zellen mit Cycloheximid.....	132
Abbildung 5.29: Genotypisierung von C57BL/6 KSRP-defizienten Mäusen.....	134
Abbildung 5.30: Schematische Darstellung der CAIA-Induktion.....	135
Abbildung 5.31: Dokumentation klinischer Symptome der Arthritisentwicklung und Bestimmung des Arthritisindex nach der Behandlung mit dem anti-CII-Antikörpermix.....	136
Abbildung 5.32: Analyse der CXCL-1, iNOS und TNF- α mRNA-Expression in Pfoten von CAIA-behandelten Mäusen und Kontrollmäusen.....	138
Abbildung 5.33: Expressionsanalyse der MCP-1 und MIP-1 α mRNA in den Gelenken von Antikörper-behandelten KSRP ^{+/+} und KSRP ^{-/-} Mäusen.....	139
Abbildung 5.34: mRNA-Expressionsanalyse von S100A8 in CAIA-behandelten KSRP-wt und KSRP-ko Mäusen.....	139
Abbildung 5.35: mRNA-Expressionsanalyse von pro-inflammatorischen Genen in Gewebeproben und Peritonealzellen von KSRP-wt und KSRP-ko Mäusen nach CAIA-Behandlung.....	141
Abbildung 5.36: Histochemische Übersichtsfärbungen zur Visualisierung der Immuneinfiltration in die Gelenke.....	143

Abbildung 5.37: Analyse der mRNA-Expression der Immunzellmarker CD68 und Ly6G in Gelenken von CAIA-behandelten Mäusen und Kontrollmäusen.	145
Abbildung 5.38: mRNA-Expressionsanalyse von Integrinen in Gelenken von CAIA-behandelten Mäusen.	146
Abbildung 5.39: mRNA-Expressionsanalyse der Adhäsionsmoleküle ICAM und VCAM in Gelenken von CAIA-behandelten Mäusen.	147
Abbildung 5.40: Analyse der FcRn-Expression in Pfoten CAIA-behandelter Mäuse sowie in Kontrollmäusen.	148
Abbildung 5.41: Analyse der mRNA-Expression der Komplementinhibitoren C1-Inhibitor und CfH.	149
Abbildung 5.42: Analyse der miR-155-Expression in Leberproben von CAIA-behandelten KSRP-wt und KSRP-ko Mäusen.	150
Abbildung 5.43: Messung der KSRP mRNA-Expression in Organen und Primärzellen nach CAIA-Induktion.	152
Abbildung 5.44: Regulation der mRNA-Stabilität pro-inflammatorischer Mediatoren in DLD-1-Zellen durch Resveratrol.	154
Abbildung 5.45: Analyse der mRNA-Stabilität pro-inflammatorischer Mediatoren in siKSRP-Zellen nach der Behandlung mit Resveratrol.	155
Abbildung 5.46: Überprüfung der KSRP-Expression in lentiviral transduzierten DLD-1-EGFP-KSRP(T692A-Zellen).	157
Abbildung 5.47: Analyse des Resveratrol-Effektes auf die mRNA-Expression pro-inflammatorischer Mediatoren in DLD-1-EGFP-KSRP(T692A)-Zellen.	158
Abbildung 5.48: Messung der mRNA-Menge pro-inflammatorischer Gene nach RIP-Analysen mit einem KSRP-Antikörper.	159
Abbildung 6.1: Schematische Darstellung der analysierten KSRP 3'-UTR-Abschnitte mit der Lokalisation der AREs.	173
Abbildung 7.1: ChIP-Seq-Analyse der putativen KSRP Promotorregion zur Identifizierung von Transkriptionsfaktoren.	199

Tabellenverzeichnis

Tabelle 3.1: Laborgeräte mit Angabe der Hersteller	27
Tabelle 3.2: Übersicht über die verwendeten Plastikmaterialien mit Angabe der Hersteller ..	29
Tabelle 3.3: Übersicht über Verbrauchsmaterialien mit Angabe der Hersteller	29
Tabelle 3.4: Verwendete Software.....	30
Tabelle 3.5: Eingesetzte Chemikalien und Reagenzien	30
Tabelle 3.6: Verwendete Medien und Zusätze für Zellkulturexperimente	38
Tabelle 3.7: Verwendete Größenmarker	40
Tabelle 3.8: Verwendete Primärantikörper für Western Blot-Analysen	40
Tabelle 3.9: Verwendete Sekundärantikörper für Western Blot-Analysen	40
Tabelle 3.10: Verwendete Antikörper in Immunpräzipitationsanalysen (IP-Analysen).....	41
Tabelle 3.11: Für Klonierungsexperimente verwendete Enzyme.....	41
Tabelle 3.12: Für Klonierungen verwendete Plasmide.....	41
Tabelle 3.13: Plasmide für Reporter-Gen-Analysen	42
Tabelle 3.14: Plasmide für die <i>in vitro</i> Transkription zur Herstellung Biotin-markierter RNA-Sonden	45
Tabelle 3.15: Verwendete Plasmide für die Lentivirale Transduktion und die stabile Transfektion	46
Tabelle 3.16: Plasmide zur Generierung von Zellen ohne KSRP mit Hilfe der CRISPR/Cas9-Methode	46
Tabelle 3.17: Sequenzen der für Klonierungen verwendeten Oligonukleotide	47
Tabelle 3.18: Biotinylierte Oligonukleotide für Pulldown-Analysen	48
Tabelle 3.19: Sequenzen der verwendeten Oligonukleotide und Sonden für qRT-PCR-Analysen.....	48
Tabelle 3.20: Oligonukleotide für die KSRP-Typisierung	50
Tabelle 3.21: Verwendete Zelllinien.....	51
Tabelle 4.1: Reaktionsansatz der transienten Transfektion	57
Tabelle 4.2: Reaktionsansatz der stabilen Transfektion	58
Tabelle 4.3: Herstellung der Kalzium-Phosphat-Präzipitate	59
Tabelle 4.4: Reaktionsansätze für die Reverse Transkription	64
Tabelle 4.5: Standard-Programm der Reversen Transkription	64
Tabelle 4.6: Reaktionsansatz für die cDNA-Synthese mit dem <i>TaqMan® MicroRNA Reverse Transcription Kit</i>	65
Tabelle 4.7: Programm der reversen Transkription von miRNAs mit dem <i>TaqMan® MicroRNA Reverse Transcription Kit</i>	65
Tabelle 4.8: Standard-PCR-Programm	66
Tabelle 4.9: PCR-Programm der Slowdown-PCR	67

Tabelle 4.10: Quickchange PCR-Programm für Deletionen	67
Tabelle 4.11: Quickchange PCR-Programm für Insertionen.....	68
Tabelle 4.12: Pipettierschema für die qRT-PCR.....	70
Tabelle 4.13: TaqMan qRT-PCR-Programm	70
Tabelle 4.14: SYBR Green PCR-Programm	71
Tabelle 4.15: Pipettierschema der BSA-Standardreihe.....	78
Tabelle 4.16: Pipettierschema der BSA-Standardreihe mit RIPA	78
Tabelle 4.17: Zusammensetzung für zwei Trenn- und Sammelgele für die SDS-PAGE	80
Tabelle 4.18: Reaktionsansatz für die KSRP-Typisierung.....	88
Tabelle 4.19: Reaktionsbedingungen für die KSRP-Typisierung	88
Tabelle 4.20: Merkmale zur Bestimmung des Arthritisindex.....	89
Tabelle 5.1: Strategien zur Klonierung der KSRPprom 5'-UTR-Plasmide	102
Tabelle 5.2: Durch massenspektrometrische Analysen identifizierte RNA-Bindeproteine der KSRP 3'-UTR.....	126

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
+/+	homozygot Wildtyp
-/-	homozygot defizient
APC	<i>antigene presenting cell</i>
ARE	Adenin-Uracil-reiche Elemente
ATP	Adenosintriphosphat
AUF1	ARE/poly(U)-bindender Degradationsfaktor
BAC	<i>Bacterial Artificial Chromosome</i>
bp	Basenpaare
BRCA1	<i>breast cancer susceptibility gene 1</i>
BSA	Bovines Serum Albumin
bzw.	Beziehungsweise
CII	Kollagenfasern des Typ II
CAIA	Kollagen-Antikörper-induzierte Arthritis
Cas	CRISPR-assoziiert
CD	<i>Cluster of Differentiation</i>
cDNA	komplementäre DNA (<i>complementary DNA</i>)
CfH	Komplementfaktor H
ChIP-Seq	<i>Chromatin Immunoprecipitation Sequencing</i>
CIA	Kollagen Typ II-induzierten Arthritis
CRISPR	<i>Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats</i>
CSF	<i>colony stimulating factor</i>
C _T -Wert	Schwellenwert der qRT-PCR
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DLD-1	humane Kolon-Adenokarzinomzellen
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTPs	Desoxyribonukleotid
DRB	5,6-Dichlorobenzimidazole 1-β-D-ribofuranoside
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGFP	<i>enhanced GFP</i>
EZM	extrazelluläre Matrix
FAM	6-Carboxyfluorescein

FBP	FUSE-Bindeprotein
FCS	<i>fetal calf serum</i> ; fötales Kälberserum
FUSE	<i>far upstream sequence element</i>
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GFP	grünfluoreszierendes Protein
GIT	Guanidiniumisothiocyanat
GRO-seq	<i>Global Nuclear Run-On sequencing</i>
HE	Hämotoxylin-Eosin
HEK-293	humane embryonale Nierenzellen (<i>human embryonic kidney cells</i>)
HLA	humanes Leukozytenantigen
HuR	humanes Antigen R
ICAM	<i>intercellular adhesion molecule</i>
IFN	Interferon
IL	Interleukin
iNOS	induzierte Stickstoffmonoxid-Synthase
INR	Initiator-Element
IP	Immunpräzipitation
i.p.	intraperitoneal
i.v.	intravenös
kDa	Kilodalton
KH	<i>K homology</i>
ko	<i>Knockout</i>
KSRP	<i>KH-type regulatory splicing protein</i>
LPS	Lipopolysaccharid
MCP-1	<i>monocyte chemotactic protein 1</i>
MCS	<i>multiple cloning site</i>
MHCII	<i>major histocompatibility complex</i> ; Haupthistokompatibilitätskomplex
min	Minute
MIP-1 α	<i>macrophage inflammatory protein 1α</i>
miRNA	microRNA
MP	Magermilchpulver
mRNA	<i>messenger RNA</i> ; Vorläufer-Boten-RNA
MS	Massenspektrometrie
NF- κ B	<i>nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells</i>

QC	Quickchange
qRT-PCR	quantitative Realtime-PCR
p38-MAPK	p-38 mitogenaktivierte Proteinkinase
PARN	<i>Poly-A-specific ribonuclease</i>
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PBS	<i>phosphate buffered saline</i> ; phosphatgepufferte Salzlösung
Pol2a	DNA-Polymerase II
RA	Rheumatoide Arthritis
RACE	<i>rapid amplification of cDNA ends</i>
Res	Resveratrol
RNA	Ribonukleinsäure
RNA-BP	RNA-Bindeprotein
rRNA	ribosomale RNA
RT	reverse Transkription
SDS	Sodiumdodecylsulfat
sek	Sekunden
SEM	Standardfehler (<i>standard error of the mean</i>)
siRNA	<i>small interfering RNA</i>
SP1	<i>specific protein 1</i>
SRA	<i>sequence read archive</i>
SV40	Simian-Virus 40
TAF	TBP-assozierte Faktoren
TAMRA	Carboxytetramethylrhodamin
Taq-Polymerase	Polymerase isoliert aus <i>Thermus aquaticus</i>
TBP	TATA-Bindeprotein
TF	Transkriptionsfaktor
TGF- β	<i>Transforming Growth Factor</i>
Th1	T _h -Zellen des Typ I
T _h -Zellen	T-Helferzellen
TNF α	Tumornekrosefaktor α
TSS	Transkriptionsstartstelle
TTP	Tristetraprolin
U	Einheit (<i>unit</i>)
Upm	Umdrehungen pro Minute
UTR	untranslatierte Region

VCAM	<i>vascular cell adhesion molecule</i>
Vol	Volumen
V	Volt
wt	Wildtyp

Zusammenfassung

Der Entstehung chronisch entzündlicher Erkrankungen liegt häufig eine Dysregulation der pro-inflammatorischen Genexpression zugrunde. Hierbei spielen posttranskriptionelle Mechanismen, wie die durch RNA-Bindeproteine-vermittelte Modulation der mRNA-Stabilität, eine wichtige Rolle. Das *KH-type splicing regulatory protein* (KSRP) ist aufgrund seiner Struktur in der Lage, sowohl RNA als auch DNA zu binden und auf mehreren Ebenen in die Genexpression einzugreifen. Dadurch wird für KSRP eine Rolle in der Pathogenese von chronischen Autoimmunerkrankungen, wie z.B. der Rheumatoiden Arthritis (RA), vermutet.

Ziel dieser Arbeit war es, die Regulation der KSRP-Expression sowohl auf transkriptioneller als auch auf posttranskriptioneller Ebene aufzuklären, um mögliche Ansatzpunkte für die Entwicklung neuer therapeutischer Strategien zu identifizieren. Die Charakterisierung der 3 kb langen Sequenz stromaufwärts des Exon 1 hinsichtlich potentieller Promotoraktivität hat gezeigt, dass die Transkription von KSRP scheinbar über mehrere, eng beieinander liegende Promotorabschnitte gestartet werden kann. Dabei spielt vermutlich der Transkriptionsfaktor SP1 eine Rolle, für den eine Interaktion mit dem putativen KSRP Promotor nachgewiesen wurde. Zudem konnte gezeigt werden, dass auf posttranskriptioneller Ebene die annotierte 108 bp lange KSRP 5'-UTR die Expression über vermutlich translationale Mechanismen begünstigt. Ebenso ist die 3'-UTR von Bedeutung, die mehrere AU-reiche Elemente enthält und einen negativen regulatorischen Effekt auf die Expression ausübt. Pulldown-Analysen identifizierten unter anderem KSRP selbst als Interaktionspartner der 3'-UTR, was allerdings keinen Einfluss auf die Expression eines Reportergenkonstruktes hatte. Stattdessen wird eine mögliche Autoregulation auf translationaler Ebene über die 5'-UTR gesteuert.

Weiterhin wurde die Rolle von KSRP für die Pathogenese der RA als Beispiel einer chronisch entzündlichen Erkrankung untersucht, wofür das Modell der Kollagen-Antikörper-induzierten Arthritis (CAIA) in KSRP-defizienten (KSRP-ko) Mäusen angewendet wurde. Entgegen den Erwartungen war die Arthritis-Entwicklung in KSRP-ko Tieren schwächer ausgeprägt als in den Kontrollmäusen, was anhand der Pfotenschwellung und mittels mRNA-Analysen nachgewiesen wurde. Histologische Untersuchungen zeigten, dass der *Knockout* von KSRP eine verringerte Frequenz an eingewanderten Immunzellen, darunter Monozyten, Makrophagen und Neutrophile, in die Gelenke zur Folge hatte. Das kann durch eine erhöhte Apoptoserate der Zellen myeloiden Ursprungs erklärt werden.

Letztendlich konnte bestätigt werden, dass die anti-inflammatorischen Effekte des Naturstoffs Resveratrol zumindest zum Teil KSRP-abhängig sind. Dabei wird die Phosphorylierung von KSRP durch die p-38 mitogenaktivierte Proteinkinase verhindert, wodurch die Interaktion zwischen KSRP und mRNAs pro-inflammatorischer Mediatoren, wie TNF- α , IL-8 and iNOS, verstärkt wird. Das resultiert wiederum im beschleunigten Abbau der Transkripte.

Abstract

Chronic inflammatory diseases are often characterized by dysregulation of pro-inflammatory gene expression, which is predominantly controlled at the posttranscriptional level by RNA binding proteins (RNA-BP) via regulation of mRNA stability. The KH-type splicing regulatory protein (KSRP) is a multi-functional protein that influences gene expression at various levels due to its property to bind both, RNA and DNA. Therefore, a role of KSRP is assumed for the development of chronic inflammatory disorders like Rheumatoid Arthritis (RA).

The aim of this study was to elucidate the regulation of KSRP expression at transcriptional and post-transcriptional level, as this may be able to develop new anti-inflammatory therapeutic strategies. Characterization and analysis of a 3 kb sequence upstream of KSRP exon 1 concerning potential promoter activity showed, that transcription of KSRP gene seems to be initiated by promoter parts that are located near to each other. The interaction observed between SP1 and the putative KSRP promoter reveals a potential role of SP1 in transcription initiation. Furthermore, the annotated 108 bp 5'-UTR of KSRP promotes expression due to predominantly translational mechanisms. In addition, the 3'-UTR sequence is also important for posttranscriptional regulation. It contains several AU-rich elements as putative binding sites for RNA-BPs and has a negative regulatory effect on KSRP expression. Pulldown analysis identified KSRP itself as an interaction partner of its own 3'-UTR, but there was no effect on expression of a reporter gene construct measured in KSRP-deficient cells. A potential autoregulation is rather accomplished by the 5'-UTR via posttranscriptional processes. These data demonstrate that complex mechanisms control KSRP expression.

Furthermore, the role of KSRP in RA, as an example for a chronic inflammatory disorder, was investigated. Therefore, collagen antibody-induced arthritis (CAIA) as an appropriate autoimmune disease mouse model was used. Induction of arthritis in KSRP-deficient mice (KSRP-ko) unexpectedly leads to a less severe arthritis induction compared to control mice. This was manifested in a reduced swelling of the paws and reduced mRNA expression of pro-inflammatory mediators (TNF- α , CXCL-1 and iNOS) in joints. Histological hematoxylin and eosin staining identified a lower frequency of immune cells in joints of KSRP-ko mice, including monocytes, macrophages, and neutrophils. This could be explained by an enhanced apoptosis of myeloid cells.

Finally, experiments confirmed that the anti-inflammatory effects of resveratrol are at least partially KSRP-dependent. Binding of resveratrol to KSRP prevents KSRP phosphorylation by p38 mitogen-activated protein kinase, which enhances intracellular binding of KSRP to target mRNAs of pro-inflammatory mediators like TNF- α , IL-8 and iNOS. This leads to an accelerated decay of these transcripts.

1 Einleitung

1.1 Regulation der Genexpression

Die kontrollierte Expression von eukaryotischen Genen bildet eine wichtige Grundlage für korrekt ablaufende Prozesse der Zelldifferenzierung und für Reaktionen der Zelle auf chemische Reize sowie auf sich ändernde Umweltbedingungen. Diese gezielte Regulation der Genexpression führt dazu, dass zu bestimmten Zeitpunkten und in verschiedenen Geweben nur ausgewählte Gene in Proteine umgeschrieben werden. Auch die Menge der gebildeten Proteine variiert hierbei. Eine fehlgesteuerte Genexpression kann beim Menschen zu schwerwiegenden Krankheiten führen, darunter z.B. chronisch-inflammatorische Erkrankungen oder Tumorerkrankungen.

Der Prozess der Genexpression läuft in mehreren Schritten ab, wobei regulatorische Mechanismen auf vielfältigen Ebenen und zu verschiedenen Zeitpunkten eingreifen können. Als erster wichtiger Schritt lässt sich die Transkription nennen, die im Zellkern stattfindet und bei der die Desoxyribonukleinsäure (DNA) durch eine DNA-abhängige Polymerase in Ribonukleinsäure (RNA) umgeschrieben wird. Die Transkription kann auf verschiedene Arten reguliert werden (O'Malley, Towle et al. 1977). Für die Initiation spielt zum einen die Zugänglichkeit der DNA für Proteinkomplexe eine große Rolle. Dazu zählen Transkriptionsfaktoren, welche spezifisch an die DNA in der Promotorregion binden und dadurch weiterhin den Prozess der RNA-Bildung initiieren, verstärken oder inhibieren können (Mitchell and Tjian 1989). Eine weitere wichtige Bedeutung kommt der posttranskriptionellen Regulation der Genexpression zu. Neben der Prozessierung der Vorläufer-Boten-RNA (hnRNA, heteronukleäre RNA) zur reifen Boten-RNA (mRNA, *messenger RNA*) und dem Transport aus dem Zellkern ins Zytoplasma, kann die Stabilität der Transkripte über RNA-Bindeproteine (RNA-BP) oder microRNAs (miRNAs) reguliert werden (Burd and Dreyfuss 1994; Filipowicz, Bhattacharyya et al. 2008). Den letzten wichtigen Schritt der Genexpression stellt die Translation dar, das Umschreiben der mRNA in Proteine. Auch hier können diverse Mechanismen eingreifen, welche die Translation verstärken oder inhibieren (Sonnenberg and Hinnebusch 2009). Schließlich wird auf posttranslationaler Ebene durch verschiedene Modifikationen der Aminosäuren die Aktivität sowie die Lebensdauer der gebildeten Proteine bestimmt (Khoury, Baliban et al. 2011). Einige der genannten Regulationsmechanismen werden im Folgenden genauer beschrieben.

1.1.1 Transkriptionelle Regulation

Einen wichtigen Angriffspunkt der Regulation eukaryotischer Gene stellt die Transkription dar, deren Ablauf durch das Zusammenspiel von Transkriptionsfaktoren, *cis*-Elementen und einer RNA-Polymerase kontrolliert wird. Insgesamt sind drei Polymerasen für die Transkription zuständig, wobei die Polymerase II hauptsächlich proteinkodierende Gene und miRNAs in RNA umschreibt. Die Polymerase I bildet ribosomale RNA (rRNA), die etwa 80 % der Gesamt-RNA ausmacht, und die Polymerase III katalysiert die Bildung der Transfer-RNA (tRNA) sowie weiterer kleiner RNAs (unter anderem die 5S rRNA) (Paule and White 2000).

Ob die Polymerase zur Transkriptionsinitiation an die DNA binden kann, ist von der Zugänglichkeit der DNA abhängig. DNA ist im Zellkern in Form von Nukleosomen, einem Komplex aus DNA und Histonen, organisiert. Dabei windet sich die negativ geladene DNA um positiv geladene Histonoktamere, woraus eine Aufspiralisierung resultiert. Je stärker die DNA aufspiralisiert ist, desto weniger gut ist sie zugänglich für Proteine. Durch Modifikationen von einzelnen Aminosäuren der Histone wird die Chromatin-Struktur so verändert, dass die DNA in bestimmten Regionen entspiralisiert vorliegt (Li, Carey et al. 2007). Beispielsweise finden sich Methylierungen oder Acetylierungen in der Nähe von Promotorregionen oder aktiven regulatorischen Elementen wie *Enhancer*. Dabei werden ausschließlich Lysine acetyliert, während sowohl Lysine als auch Arginine methyliert werden können (Strahl and Allis 2000). Unter Einbeziehung der Nummer des Histons, das modifiziert vorliegt, ergibt sich eine spezifische Nomenklatur, welche die Modifikation beschreibt (z.B. H3K4me3: dreifache Methylierung des vierten Lysins) (Sadakierska-Chudy and Filip 2015). Weiterhin kann auch die DNA selbst methyliert vorliegen, was eine geringere Zugänglichkeit für Transkriptionsfaktoren zur Folge hat und somit die Transkription negativ reguliert (Jin, Li et al. 2011).

Im Allgemeinen bindet zur Initiation der Transkription proteinkodierender Gene ein Komplex aus RNA-Polymerase II und den verschiedenen Transkriptionsfaktoren an den Promotor eines Gens. Dieser ist für die Initiation der Transkription von essentieller Bedeutung. Es handelt sich dabei um einen DNA-Abschnitt, der als Erkennungssequenz zur Bindung der genannten Faktoren dient und die regulierte Expression des zugehörigen Gens ermöglicht (Campbell, Reece et al. 2015). Meist befindet sich die Promotorsequenz stromaufwärts des jeweiligen Gens, wodurch der Startpunkt sowie die Richtung der RNA-Synthese vorgegeben werden. Der Promotor kennzeichnet sich durch verschiedene Elemente, die sowohl basale als auch regulative Funktionen erfüllen können. Dabei lässt sich die Sequenz in verschiedene Abschnitte unterteilen, den Kernpromotor sowie den proximalen und distalen Promotor mit *cis*-regulatorischen Elementen. Als Kernpromotor wird die minimalste Sequenz bezeichnet, die zur Transkriptionsinitiation ausgehend von der Transkriptionsstartstelle (TSS) benötigt wird.

Dieser befindet sich in direktem Umfeld der TSS (meist nur 40 Nukleotide) und steuert die basale Transkription (Gross and Oelgeschläger 2006). Sequenzmotive des Kernpromotors sind beispielsweise die TATA-Box, das Initiator-Element (INR), das durch den Transkriptionsfaktor IIB (TFIIB) erkannte Element (BRE, *TFIIB recognition element*), das stromabwärts liegende Element (DPE, *downstream promoter element*) und das *motif ten element* (Abbildung 1.1). Es ist allerdings zu beachten, dass nicht alle Elemente in jedem Promotor vorkommen müssen. Ursprünglich wurde angenommen, dass die TATA-Box die Grundlage für die Bildung des Präinitiationskomplexes bildet (Lifton, Goldberg et al. 1978). Demnach bindet der generelle TFIID, bestehend aus dem TATA-Bindeprotein (TBP) und mehreren TBP-assoziierten Faktoren, an die TATA-Box im Promotor, was zur Rekrutierung weiterer Transkriptionsfaktoren (IIA, IIB, IIE, IIF und IIH) sowie der RNA-Polymerase II führt (Orphanides, Lagrange et al. 1996; Hampsey 1998). Durch die sequenzspezifische Bindung des TFIIB an das BRE, welches sich stromaufwärts oder -abwärts der TATA-Box befindet (Lagrange, Kapanidis et al. 1998; Deng and Roberts 2005), kann die Formation der basalen Transkriptionsmaschinerie vereinfacht und die Transkription letztendlich initiiert werden. Da die Struktur des Kernpromotors jedoch variiert und es auch Promotoren ohne TATA-Box gibt, läuft die Transkriptionsinitiation nicht immer nach demselben Schema ab (Müller, Demény et al. 2007). Das INR-Element beispielsweise, das sich in direkter Nähe zur TSS befindet, ist ebenfalls in der Lage mit dem TFIID und der Polymerase II zu interagieren und die Transkription dadurch zu starten (Smale and Baltimore 1989; Kaufmann and Smale 1994; Smale 1997). Charakteristisch für einen Promotor ohne TATA-Box ist außerdem das stromabwärts liegende Promotorelement (DPE), das in Zusammenspiel mit dem INR ebenfalls die Bindung des TFIID vermitteln kann (Burke and Kadonaga 1996). Es interagiert dabei mit den TBP-assoziierten Faktoren 6 und 9 (Müller, Demény et al. 2007). Auch das *motif ten element*, das sich weiter stromaufwärts befindet, kann den TFIID unabhängig binden (Lim, Santoso et al. 2004).

Zur Regulation der Transkription, als z.B. Antwort auf äußere Einflüsse, werden weitere Sequenzelemente benötigt, die weiter entfernt von der TSS lokalisiert sind. Diese Elemente weisen Erkennungssequenzen für spezifische Transkriptionsfaktoren auf, welche durch die Bindung die basale Transkription beeinflussen. Bestandteile des proximalen Promotors, der sich im Bereich -200 bis -50 Basenpaare (bp) ausgehend von der TSS (+1) befindet, sind beispielsweise cAMP responsive Elemente (Montminy, Sevarino et al. 1986) oder die CAAT-Box, an die ebenfalls spezifische Transkriptionsfaktoren binden können (Abbildung 1.1). Weiterhin zählen GC-reiche Sequenzen zu den Promotorelementen, welche die Transkription regulieren oder sogar initiieren können. Solche CpG-Inseln sind punktuell zwar im gesamten Genom zu finden, aber nur in Promotorregionen liegen sie unmethyliert vor (Bird, Taggart et al. 1985; Suzuki, Kerr et al. 2007). Im Durchschnitt sind sie 1000 bp lang (beschrieben in

(Deaton and Bird 2011)). Der Transkriptionsfaktor SP1 (*specific protein 1*) bindet z.B. an solche Bereiche und ist auch ohne TATA-Box in der Lage das TBP zu rekrutieren und dadurch die Transkription zu starten (Smale, Schmidt et al. 1990). Weitere Proteine, die an GC-reiche Motive binden, sind die Transkriptionsfaktoren Nrf-1 (*nuclear respiratory factor 1*), E2F und ETS (*erythroblast transformation-specific*) (Landolin, Johnson et al. 2010). CpG-Inseln kommen in mehr als 70 % der annotierten Promotoren von Vertebratengen vor und kontrollieren die Expression von Haushaltsgenen, einigen gewebespezifischen Genen und Genen, welche die Entwicklung regulieren (Larsen, Gundersen et al. 1992; Saxonov, Berg et al. 2006; Zhu, He et al. 2008). Des Weiteren erfolgt die Feinregulation der Transkription eines Gens durch *cis*-Elemente, die bis zu mehreren Tausend Basen stromaufwärts oder -abwärts vom Promotor liegen können. Diese *Enhancer*- oder *Silencer*-Sequenzen binden zum einen direkt *trans*-agierende Proteine wie Transkriptionsfaktoren. Zum anderen sind sie in der Lage die Bindung von Transkriptionsfaktoren an den Promotor zu verstärken oder zu inhibieren, was wiederum Einfluss auf die Transkriptionsaktivität hat (Munk 2010) (Abbildung 1.1).

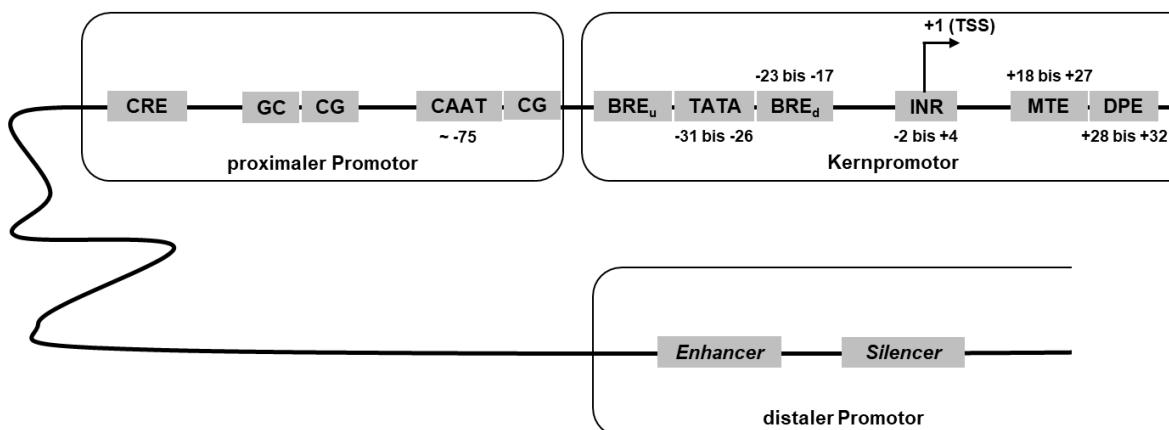


Abbildung 1.1: Schematische Darstellung eines eukaryotischen Promotors.

Der eukaryotische Promotor untergliedert sich in den für die basale Transkription wichtigen Kernpromotor sowie in proximale und distale Promotorabschnitte mit *cis*-Elementen, die regulatorische Funktionen erfüllen. CRE: cAMP responsives Element; GC: GC-reiche Sequenz oder CpG-Inseln; CAAT: CAAT-Box; BRE_{u/d}: upstream/downstream liegendes durch den Transkriptionsfaktor IIB erkanntes Element; TATA: TATA-Box; INR: Initiator-Element; MTE: motif ten element; TSS: Transkriptionsstartstelle; DPE: stromabwärts liegendes Promotorelement.

1.1.1.1 Verschiedene Promotortypen

Durch die vielen verschiedenen Sequenzelemente, die in der Promotorregion lokalisiert sind, wird die Promotorstruktur eines Gens sehr komplex. Somit lässt sich der Aufbau nicht für alle Gene verallgemeinern. Gerade der klassische TATA-Box-Promotor kommt nur in wenigen der annotierten humanen und murinen Genen vor (Carninci, Sandelin et al. 2006). Die Initiation der Transkription hängt dementsprechend von der Struktur und den Komponenten des

Promotors ab. Es werden drei verschiedene Promotortypen unterschieden: der fokussierte, der verteilte und der gemischte Promotor ((Ni, Corcoran et al. 2010); zusammengefasst in (Juven-Gershon and Kadonaga 2010)), wobei sich die jeweilige Bezeichnung von der Lage der TSS ableitet. Der fokussierte Promotor umfasst circa 80 bp und es gibt meist eine dominante TSS beziehungsweise mehrere schwache in einem stark begrenzten Bereich von wenigen Nukleotiden. Häufig haben diese Promotoren die genannten regulatorischen Elemente wie TATA-Box, INR, *motif ten element* und das stromabwärts liegende Promotorelement. Sie kontrollieren meist die Expression von gewebespezifischen Genen, die einer strikten Regulation unterliegen (Carninci, Sandelin et al. 2006). Im Gegensatz dazu weisen verteilte Promotoren mehrere schwache TSS auf, die über eine Länge von 50-100 bp verteilt vorliegen. Diese Promotortypen zeichnen sich durch eine hohe Dichte an CpG-Inseln aus und werden durch die Bindung von sequenzspezifischen Transkriptionsfaktoren wie SP1 aktiviert (Kim, Barrera et al. 2005; Bajic, Tan et al. 2006). Oft gibt es keine TATA-Box oder andere typische Kernpromotorelemente (Kim, Barrera et al. 2005). Beispiele für Gene, deren Expression der Kontrolle verteilter Promotoren unterliegen, sind konstitutiv exprimierte Gene und Haushaltsgene. Die Expression dieser Gene ist durch die schwachen TSS konstanter als bei fokussierten Promotoren, was dementsprechend eine Regulation schwieriger macht. Insgesamt haben mehr als 70 % der Vertebratengene verteilte Promotoren (Juven-Gershon and Kadonaga 2010). Schließlich gibt es den gemischten Promotor (Bajic, Tan et al. 2006). Dieser hat sowohl eine starke als auch mehrere schwache TSS, die über eine Länge von 80-100 bp verteilt sind (Danino, Even et al. 2015).

Unabhängig von der Verteilung der TSS wurden von verschiedenen Arbeitsgruppen weitere Promotorklassen beschrieben, die Kriterien wie etwa Histonmodifikationen oder vorhandene Sequenzelementen berücksichtigen (Danino, Even et al. 2015). Somit wird deutlich, dass die Komplexität der vielfältigen Promotorstrukturen eine allgemein gültige Klassifizierung erschwert.

1.1.2 Posttranskriptionelle Regulation

Auf posttranskriptioneller Ebene wird die Stabilität der gebildeten prä-mRNA reguliert und deren intrazelluläre Lokalisation sowie die Effizienz der Translation beeinflusst. Bevor die RNA jedoch vom Zellkern ins Zytoplasma transportiert wird, durchläuft sie mehrere Schritte der Prozessierung. Zum einen wird noch während der Elongation der Transkription eine 7-Methyl-Guanosin-Kappe ans 5'-Ende (*5'-cap*) angefügt, welche die RNA vor dem Abbau durch Exonukleasen und Phosphatasen schützt und als Erkennungssignal für die spätere Translation dient (Hocine, Singer et al. 2010). Zum anderen erfolgt nach der Termination der

Transkription eine Polyadenylierung. Dabei wird an das 3'-Ende nach Entfernen des Polyadenylierungssignals (5'-...AAUAAA...-3') durch Endonukleasen ein Poly-A-Schwanz von bis zu 250 Adenin-Nukleotiden angehängt. Dies dient ebenfalls der Stabilisierung und dem Transport der RNA aus dem Zellkern (Drummond, Armstrong et al. 1985). Zudem werden in der prä-mRNA vorhandene Intronsequenzen durch Spleißen entfernt. Dabei bildet sich eine Lariatstruktur aus, wodurch die Exons näher zueinander gebracht und letztendlich verbunden werden können (Hocine, Singer et al. 2010).

Die reife mRNA besteht schließlich aus der 5'-*cap*-Struktur, der 5'-untranslatierten Region (5'-UTR), dem proteinkodierenden Bereich und der 3'-UTR mit dem Poly-A-Schwanz. Die UTRs spielen eine große Rolle für die posttranskriptionelle Regulation. Sie kontrollieren den aktiven Transport der mRNA aus dem Zellkern, die mRNA-Stabilität und deren subzelluläre Lokalisation sowie die Effizienz der Translation (van der Velden and Thomas 1999; Bashirullah, Cooperstock et al. 2001; Jansen 2001). Dementsprechend können Mutationen in den 5'- und 3'-UTRs eine fehlgesteuerte Proteinexpression zur Folge haben und somit Auslöser für pathophysiologische Veränderungen sein.

1.1.2.1 Regulation der mRNA-Stabilität

Den weitaus wichtigsten Regulationsmechanismus auf posttranskriptioneller Ebene stellt die Regulation der mRNA-Stabilität dar, so dass die Abbaurate der mRNA zu einem Großteil die Menge an gebildetem Protein beeinflusst. Meist wird der Abbau von mRNAs über vollständige Deadenylierung bzw. durch Verkürzen des Poly-A-Schwanzes initiiert. Dieser Schritt erfolgt durch die Deadenylasen Pan2-Pan3, den Ccr4-Not-Komplex oder PARN (*Poly-A-specific ribonuclease*) (Yamashita, Chang et al. 2005). Die ungeschützte RNA kann anschließend sowohl in 3'-5'- als auch in 5'-3'-Richtung abgebaut werden. Durch die Rekrutierung des Exosoms, einem Proteinkomplex aus 3'-5'-Exonukleasen erfolgt die Degradation in 3'-5'-Richtung. Für den Abbau in 5'-3'-Richtung wird zunächst die *cap*-Struktur am 5'-Ende durch die Enzyme Dcp1-Dcp2 abgespalten und die mRNA schließlich durch die Exoribonuklease 1 (XRN1) abgebaut (Fenger-Grøn, Fillman et al. 2005; Nagarajan, Jones et al. 2013). Nur in seltenen Fällen erfolgt die Destabilisierung von mRNAs ohne vorausgehende Deadenylierung (Yang, Peng et al. 2004).

Häufig wird die Degradation der mRNAs (oder auch deren Stabilisierung) über das Vorhandensein von *cis*-agierenden Adenin-Uracil-reichen Elementen (AREs) in der 3'-UTR reguliert. AREs sind hauptsächlich in kurzlebigen RNAs zu finden. Beispiele hierfür sind Zytokine, Protoonkogene, Transkriptionsfaktoren und Wachstumsfaktoren (Chen and Shyu 1995; Vlasova-St. Louis and Bohjanen 2014). Somit ist die Regulation der Genexpression auf

Ebene der mRNA-Stabilität wichtig für inflammatorische und immunologische Prozesse, die Transkription sowie für die Zelldifferenzierung und Proliferation (Khabar 2005).

AREs werden aufgrund ihrer Sequenz und unterschiedlicher funktioneller Eigenschaften in drei Klassen eingeteilt. Klasse I und II AREs zeichnen sich durch das Vorhandensein mehrerer Kopien des Pentanukleotids AUUUA aus (Peng, Chen et al. 1996). Bei AREs der Klasse I finden sich wenige dieser Motive meist in der Nähe von U-reichen Sequenzabschnitten, während sich Klasse II AREs durch viele zusammenhängende und überlappende Pentanukleotidsequenzen auszeichnen. Klasse I AREs fördern die gleichmäßige Verkürzung der Poly-A-Schwänze und tragen dadurch zum Abbau der mRNAs bei. Sie sind hauptsächlich in mRNAs zu finden, die für Transkriptionsfaktoren wie c-Fos und c-Myc kodieren sowie in mRNAs einiger Zytokine, wie Interleukin 4 und 6 (IL-4 und IL-6). Die AREs der Klasse II begünstigen eine ungleichmäßige Deadenylierung, so dass Transkripte mit unterschiedlich langen Poly-A-Anhängen entstehen. Beispiele für mRNAs mit solchen AREs sind die Zytokine GM-CSF (*granulocyte macrophage colony-stimulating factor*), IL-2, Tumornekrosefaktor- α (TNF- α) und Interferon- α (IFN- α) (Caput, Beutler et al. 1986; Peng, Chen et al. 1996). AREs der Klasse III unterscheiden sich durch das Fehlen der AUUUA-Elemente von den anderen AREs. Sie zeichnen sich durch U-reiche Sequenzabschnitte aus und sind z.B. in der mRNA des Jun-Protoonkogens (c-Jun) zu finden (Peng, Chen et al. 1996).

Durch die Bindung von *trans*-agierenden RNA-BPs an diese *cis*-agierenden Sequenzmotive, kann die mRNA-Stabilität sowohl negativ als auch positiv beeinflusst werden. Hierzu zählen unter anderem die als destabilisierend beschriebenen Proteine Tristetraprolin (TTP), der ARE/poly(U)-bindende Degradationsfaktor (AUF1) oder das KH-Typ regulatorische Spleißingprotein (*KH-type splicing regulatory protein*, KSRP) (DeMaria and Brewer 1996; Lai, Carballo et al. 1999; Gherzi, Lee et al. 2004). Es konnte gezeigt werden, dass diese RNA-BPs für die Rekrutierung des Exosoms verantwortlich sind und somit den mRNA-Abbau begünstigen (Chen, Gherzi et al. 2001; Gherzi, Lee et al. 2004). Überwiegend stabilisierende Funktionen übernimmt hingegen das humane Antigen R (HuR) (Peng, Chen et al. 1998). Der Stellenwert, den diese RNA-BPs als Regulatoren der mRNA-Stabilität zur Kontrolle der Genexpression einnehmen, zeigt sich in der Pathogenese inflammatorischer Krankheiten. So konnte beispielsweise in TTP-defizienten Mäusen gezeigt werden, dass diese spontan einen chronisch-entzündlichen Phänotyp entwickeln, was auf die erhöhte mRNA-Stabilität der pro-inflammatorischen Zytokine TNF- α , GM-CSF1 und IL-6 zurückzuführen ist (Taylor, Carballo et al. 1996; Carballo and Blackshear 2001). Auch in AUF1-defizienten Mäusen konnte eine erhöhte pro-inflammatorische Genexpression beobachtet werden (Lu, Sadri et al. 2006). Des Weiteren wird die gesteigerte Expression verschiedener Gene in inflammatorischen Erkrankungen ebenfalls auf eine Dysregulation der mRNA-Stabilität zurückgeführt (Khabar 2005).

1.1.2.2 *microRNAs als posttranskriptionelle Regulatoren der Genexpression*

Bei miRNAs handelt es sich um endogene, stark konservierte RNA-Moleküle, die im reifen Zustand lediglich 21-23 bp lang sind und nicht für Proteine kodieren. Erstmals wurden miRNAs im Fadenwurm *Caenorhabditis elegans* beschrieben, wo sie für die Steuerung der Expression verschiedener Gene verantwortlich sind (Wightman, Ha et al. 1993). Seither hat deren Bedeutung für die posttranskriptionelle Genregulation erheblich zugenommen. Es wird angenommen, dass sie die Expression von bis zu 30 % der proteinkodierenden Gene regulieren (MacFarlane and Murphy 2010).

Die Regulation der Expression durch miRNAs erfolgt auf posttranskriptioneller Ebene, wobei der native miRNA-Strang an die 3'-UTR der Ziel-mRNAs bindet. Abhängig vom Grad der Komplementarität zwischen den RNA-Sequenzen wird daraufhin entweder die Translation gehemmt (bei geringer Basenpaarung) oder die mRNA abgebaut (bei vollständiger Homologie) (Pillai, Bhattacharyya et al. 2007). Aufgrund der Möglichkeit einer Interaktion auch bei geringer Komplementarität, kann eine miRNA potentiell mehrere hundert mRNAs binden und deren Expression regulieren. Umgekehrt kann ein Zielgen durch viele verschiedene miRNAs reguliert werden, was die Komplexität dieses Regulationsmechanismus verdeutlicht. Hinzu kommt, dass miRNAs auch mit RNA-BPs bei der posttranskriptionellen Regulation pro-inflammatorischer Gene konkurrieren oder kooperieren können. Beispielsweise wird die TNF- α mRNA durch ein Zusammenspiel aus TTP und der miR-16 negativ reguliert (Jing, Huang et al. 2005), während die *c-myc* Translation durch HuR und let-7 inhibiert wird (Kim, Kuwano et al. 2009). Eine Konkurrenz zwischen HuR und der miR-122 wurde im Falle des kationischen Aminosäuretransporters CAT-1 (*cationic amino acid transporter*) beschrieben (Kundu, Fabian et al. 2012).

Durch die Funktion von miRNAs als posttranskriptionelle Regulatoren der Genexpression, kommt ihnen eine wichtige Funktion in vielfältigen biologischen Prozessen zu. Gerade das Immunsystem betreffend beeinflussen miRNAs beispielsweise die Differenzierung von Immunzellen und sind an der Aktivierung der sowohl innaten als auch adaptiven Immunantwort beteiligt (Davidson-Moncada, Papavasiliou et al. 2010). Um einen reibungslosen Ablauf aller biologischen Vorgänge zu gewährleisten, ist das Expressionsprofil vieler miRNAs spezifisch für verschiedene Gewebe und Entwicklungsstadien. Demnach konnte in der Pathogenese einiger humaner Erkrankungen, darunter auch Autoimmunerkrankungen, eine dysregulierte miRNA-Expression nachgewiesen werden (Stanczyk, Pedrioli et al. 2008; Davidson-Moncada, Papavasiliou et al. 2010; Furer, Greenberg et al. 2010).

1.1.2.3 Die Rolle der 5'-UTR für die Translationseffizienz

Die Menge an translatiertem Protein korreliert meist nicht exakt mit der vorhandenen mRNA-Menge. Das hängt damit zusammen, dass nicht die gesamte mRNA in gleichem Maße in Protein umgeschrieben wird, sondern die Translationseffizienz ebenfalls einer starken Regulation unterliegt und von Gen zu Gen variieren kann (Anderson and Seilhamer 1997). Im Allgemeinen bindet zur Translation ein Komplex aus mehreren Initiationsfaktoren an die 5'-Kappe der mRNA, wodurch gebildete Sekundärstrukturen aufgelöst und die Interaktion der 40S-Untereinheit des Ribosoms mit der mRNA ermöglicht wird. Dieser Initiationskomplex bewegt sich entlang der 5'-UTR bis hin zum Startkodon (AUG), wo sich die Faktoren abspalten und die 60S-Untereinheit des Ribosoms bindet, bevor schließlich die Proteinsynthese beginnt. Der Erfolg der Translationsinitiation ist dabei größtenteils von den umgebenden Nukleotiden des Startkodons abhängig. Es konnte gezeigt werden, dass eine Konsensussequenz, die sogenannte Kozak-Sequenz (GCC RCC A⁽⁺¹⁾UG G in höheren Eukaryoten) die Translation optimiert und begünstigt. Die am stärksten konservierten Positionen sind dabei die Purinbase an Position -3 und das Guanin an Position +4. Mutationen dieser Basen führen zu einer stark veränderten Effektivität der Translation (Kozak 1987).

Die Regulation der Translationseffizienz wird von Strukturen, die sich in der mRNA befinden, beeinflusst, wobei die durchschnittlich 20-100 bp lange 5'-UTR eine maßgebliche Rolle einnimmt. Es konnte gezeigt werden, dass die Länge der 5'-UTR Auswirkungen auf die Translation einer mRNA hat (Ong, Leong et al. 2006). Gene beispielsweise, die für Proteine wie Transkriptionsfaktoren oder Wachstumsfaktoren kodieren und deren Expression stark kontrolliert werden muss, weisen häufig eine durchschnittlich längere 5'-UTR-Sequenz auf (Kozak 1987). Somit können sich Sekundärstrukturen ausbilden, welche die Translation je nach Lage begünstigen oder inhibieren können. Dabei gilt, je stärker diese Strukturen sind, desto geringer ist die Translationseffizienz (Pelletier and Sonenberg 1985).

1.2 Das KH-type splicing regulatory protein KSRP

Bei KSRP (*KH-type splicing regulatory protein*) handelt es sich um ein 75 kDa schweres Protein, das für seine Fähigkeit Nukleinsäuren zu binden bekannt ist. Das Gen, welches für KSRP kodiert, befindet sich auf dem humanen Chromosom 19p13.3 und dem Mausechromosom 17. Die humane Gensequenz besteht aus 19 Exons und 18 Introns. Sequenzvergleiche zwischen den Spezies Maus und Mensch haben gezeigt, dass KSRP hochgradig konserviert ist (Ring, Vameghi-Meyers et al. 1999). KSRP wird in nahezu allen Zelltypen exprimiert und kann sowohl im Nukleus als auch im Zytoplasma vorkommen, wobei die Lokalisation im Zellkern vorrangig ist (Hall, Huang et al. 2004). Insgesamt ist diese

Verteilung jedoch dynamisch und von verschiedenen Stimuli sowie dem Zelltyp abhängig (Gherzi, Chen et al. 2010). KSRP gehört der Familie der FUSE-Bindeproteine (*far upstream sequence element*; FBP1-3) an, weshalb es auch unter dem Namen FBP2 bekannt ist. Charakteristisch für das Protein sind die vier KH-Domänen (*K homology*), die zentral in der Proteinsequenz zu finden und für die Interaktion mit einzelsträngigen Nukleinsäuren sowie Proteinen verantwortlich sind (Abbildung 1.2). Dabei kann KSRP sowohl RNA als auch DNA binden. Die weniger komplexen N- und C-Termini der Sequenz enthalten dagegen zum einen das Kernlokalisierungssignal sowie verschiedene Sequenzelemente, die für Proteininteraktionen wichtig sind oder Angriffspunkte für posttranslationale Modifikationen darstellen (Gherzi, Chen et al. 2010).

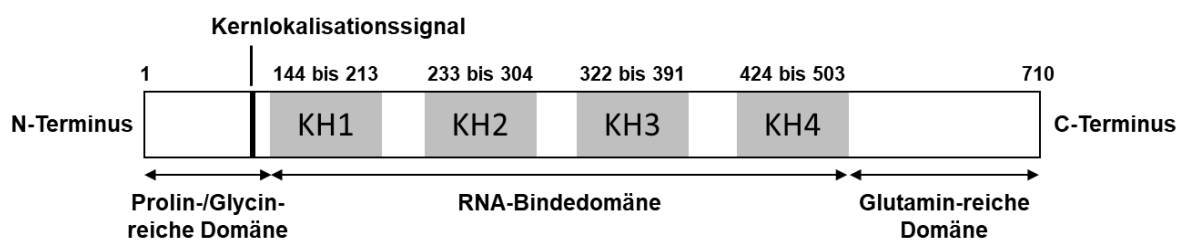


Abbildung 1.2: Schematische Darstellung der Domänenverteilung in der Aminosäuresequenz von KSRP.

Die Aminosäuresequenz von KSRP zeichnet sich durch vier zentrale KH-Domänen (*K homology*) aus, die untereinander stark konserviert sind. Über diese etwa 70-80 Aminosäuren langen Sequenzen erfolgt die RNA-Bindung. Das Kernlokalisierungssignal findet sich in der N-terminalen Domäne (García-Mayoral, Hollingworth et al. 2007).

Aufgrund seiner Struktur hat KSRP vielfältige Funktionen, die auf verschiedenen Ebenen der Genexpression und -regulation eine Rolle spielen. Die ursprünglichste Funktion von KSRP, die im Jahre 1996 durch Davis-Smyth et al. unter dem Namen FBP2 beschrieben wurde, ist die Transkriptionsregulation des *c-myc* Gens. Dabei bindet KSRP an die FUSE-Sequenz im Promotor des Gens, was eine verstärkte Transkription zur Folge hat (Davis-Smyth, Duncan et al. 1996; He, Weber et al. 2000). Durch *in vitro* Studien konnte dementsprechend gezeigt werden, dass sich der *Knockdown* der FBP-Proteine in einer verringerten *c-myc* mRNA-Menge bemerkbar macht und dadurch die Zellproliferation verhindert (He, Liu et al. 2000). Neuere Studien zeigen, dass auch die Promotoraktivität von TNF- α positiv durch KSRP reguliert wird (Li, Lin et al. 2012). Später wurde KSRP als Komponente eines Multiproteinkomplexes beschrieben, der an das *intronic splicing enhancer element* des Protoonkogens *c-src* bindet und dadurch das alternative Spleißen der *c-src* prä-mRNA reguliert (Min, Turck et al. 1997). Weiterhin ist KSRP Bestandteil des APOBEC-Komplexes (*apolipoprotein B editing complex*) und somit maßgeblich am Editieren der apoB-mRNA beteiligt (Lellek, Kirsten et al. 2000). Die mit am besten untersuchte Funktion von KSRP ist die Modulation der Stabilität von kurzlebigen Transkripten wie etwa pro-inflammatorischen Mediatoren, auf die in einem gesonderten Kapitel noch einmal genauer eingegangen wird (1.2.1). Darüber hinaus wurde gezeigt, dass

KSRP die Reifung von verschiedenen miRNAs beeinflusst, indem es über die KH-Domänen 3 und 4 an die terminalen Schleifen von Vorläufer-miRNAs bindet und als Komponente der Drosha- und Dicer-Enzymkomplexe die Entwicklung in reife miRNAs fördert (Trabucchi, Briata et al. 2009). Ein Beispiel für eine miRNA, an deren Reifung KSRP mitwirkt, ist die miR-155, eine multifunktionelle miRNA, die eine entscheidende Rolle in verschiedenen physiologischen und pathologischen Prozessen spielt (Faraoni, Antonetti et al. 2009; Ruggiero, Trabucchi et al. 2009; Bhattacharyya, Kumar et al. 2013). Reife miRNAs können wiederum die Stabilität von mRNAs negativ beeinflussen. Somit nimmt KSRP hier einen indirekten Einfluss auf die mRNA-Degradation. In Bezug hierzu zeigen aktuelle Daten, dass KSRP die Biogenese der miR-129 fördert. Diese wiederum verhindert die RUNX1-Expression (*runt related transcription factor 1*), wodurch die myeloide Differenzierung in entweder Granulozyten oder Monozyten festgelegt wird (Zhao, Wang et al. 2017). Auf translationaler Ebene konnte zudem nachgewiesen werden, dass KSRP als Repressor fungiert, indem es mit der internen ribosomalen Eintrittsstelle (IRES) des Enterovirus 71 in der 5'-UTR des Virus interagiert und auf diese Weise die virale Translation negativ reguliert (Lin, Li et al. 2009). Außerdem gibt es Hinweise darauf, dass KSRP die Translation von IL-6 und IL-1 α durch die Wechselwirkung mit einem ARE in der 3'-UTR verhindert (Dhamija, Kuehne et al. 2011). Eine weitere Funktion von KSRP stellt die Regulation der Prothrombinexpression dar. Als Antwort auf Stress oder Inflammation wird dabei sowohl KSRP als auch FBP3 phosphoryliert, woraufhin die Proteine an ein Sequenzelement in der 3'-UTR (*upstream sequence element* USE) der Prothrombin mRNA binden und schließlich die Prozessierung des 3'-Endes hemmen (Danckwardt, Gantzer et al. 2011).

Dementsprechend greift KSRP über multifunktionelle Mechanismen auf verschiedenen Ebenen in die Regulation der Genexpression ein. Dabei kontrolliert es die Expression proteinkodierender Gene ebenso auf direktem wie auch auf indirektem Wege.

1.2.1 KSRP als ARE-bindendes Protein

Die wahrscheinlich am besten untersuchte Funktion von KSRP ist die Regulation der mRNA-Stabilität von kurzlebigen Transkripten, wie Zytokinen, Chemokinen, Regulatoren des Zellzyklus sowie Protoonkogenen. *In vivo* und *in vitro* Experimente konnten zeigen, dass KSRP als RNA-BP mit AREs in der 3'-UTR interagiert und dadurch den ARE-abhängigen mRNA-Abbau (AMD, *ARE-mediated decay*) induziert (Gherzi, Lee et al. 2004). Wichtig für die Bindung an die mRNA sind die KH-Domänen 3 und 4, wobei die beiden Domänen unabhängig voneinander agieren können, was das Spektrum an Ziel-mRNAs vergrößert (García-Mayoral, Hollingworth et al. 2007). Es konnte außerdem gezeigt werden, dass die Domäne KH3 die

mRNA-Bindung der KH4-Domäne stabilisieren kann und gleichzeitig für eine Komplexbildung mit Enzymen verantwortlich ist, die den mRNA-Abbau fördern (Gherzi, Lee et al. 2004). Darunter finden sich z.B. die Poly-A-RNase PARN, das Enzym DCP2 (*mRNA decapping enzyme*), das die Entfernung der 5'-Kappe katalysiert, sowie Komponenten des Exosoms (Chen, Gherzi et al. 2001; Gherzi, Lee et al. 2004; Chou, Mulky et al. 2006). Somit begünstigt KSRP unter anderem die Rekrutierung des Exosoms, was zu einem Abbau der mRNA in 3'-5'-Richtung führt.

Winzen et al. konnten mit Hilfe von Pulldown- und Microarray-Analysen 100 Ziel-mRNAs von KSRP identifizieren (Winzen, Thakur et al. 2007). Darunter befinden sich zu ungefähr 50 % instabile Transkripte wie z.B. von IL-6, IL-8 CSF2 und Cox-2 (Cyclooxygenase-2), deren Expression in KSRP-defizienten Zellen erhöht ist. Allerdings konnte nur für 10 % der untersuchten mRNAs eine verlangsamte Degradation in Zellen ohne KSRP-Expression nachgewiesen werden. Das zeigt erneut, dass KSRP die Genexpression auf posttranskriptioneller Ebene nicht nur über die Modulation der mRNA-Stabilität reguliert, sondern auch translationale Prozesse steuert (Winzen, Thakur et al. 2007). In derselben Studie wurde die KSRP mRNA selbst sowie die mRNAs von FBP1 und 3 als Interaktionspartner von KSRP beschrieben. Weitere Publikationen zeigen zusätzlich einen destabilisierenden Effekt des RNA-BP auf die mRNAs der iNOS (induzierte Stickstoffmonoxid-Synthase), Pitx2 (*pituitary homebox 2*), TNF- α und β -Catenin (Briata, Ilengo et al. 2003; Linker, Pautz et al. 2005; Gherzi, Trabucchi et al. 2006; Nguyen-Chi and Morello 2008). Der negativ-regulierende Effekt von KSRP auf die mRNA-Stabilität konnte auch für die Typ I Interferone α und β bestätigt werden. Die IFN-Expression ist in Geweben sowie embryonalen Fibroblasten aus KSRP-defizienten Mäusen nach viraler Infektion im Vergleich zu Wildtyp-Zellen erhöht (Lin, Zheng et al. 2011). Weiterhin wurde in Lipopolysaccharid- (LPS) stimulierten Astrozyten, isoliert aus KSRP-defizienten Mäusen, 2-4-fach verstärkte mRNA-Quantitäten von TNF- α und IL-1 β nachgewiesen. Diese Unterschiede konnten zum Teil auf einen weniger starken Abbau der mRNAs zurückgeführt werden. Da die jeweiligen Proteinmengen jedoch deutlich stärker erhöht waren als die Menge der mRNA (15-fach zu 4-fach) weist dies auf einen translationalen Regulationsmechanismus durch KSRP hin (Li, Lin et al. 2012).

Durch die Wirkung von KSRP als Mediator des AMD von pro-inflammatorischen Mediatoren, erhält das Protein weitreichende Bedeutung in Immunreaktionen und somit für die Pathogenese von inflammatorischen Erkrankungen.

1.2.2 Regulation der KSRP-Expression und Aktivität

Trotz der vielseitigen zellulären Funktionen von KSRP bezüglich der Expressionsregulation einer großen Anzahl an Zielgenen, ist die Regulation der KSRP-Expression bisher wenig erforscht. Gerade auf Ebene der Promotorregulation gibt es kaum Hinweise, durch welche Faktoren oder Mechanismen die Transkription beeinflusst wird. Dennoch konnte gezeigt werden, dass die Transkription durch das Brustkrebsgen BRCA1 (*breast cancer susceptibility gene 1*) negativ moduliert wird (Santarosa, Del Col et al. 2010). In BRCA1-defizienten Zellen ist die KSRP mRNA-Menge erhöht, was durch quantitative Realtime-PCR nachgewiesen wurde. Durch Reexpression von BRCA1 wurde dieser Effekt wieder aufgehoben. Im Gegensatz dazu zeigten Proteom-Analysen allerdings, dass die KSRP-Proteinexpression ebenfalls in den BRCA1-defizienten Zellen leicht verringert ist, während sie in kaum differenziertem hepatozellulärem Karzinomgewebe erhöht vorliegt (Zubaidah, Tan et al. 2008; Santarosa, Del Col et al. 2010). Des Weiteren scheint die KSRP-Expression durch das SMN-Protein (*survival of motor neuron protein*) beeinflusst zu werden. Dies konnte in einer SMN-Knockdown-Zelllinie nachgewiesen werden, in der die KSRP-Proteinmenge verringert vorliegt (Tadesse, Deschênes-Furry et al. 2008). Eine posttranskriptionelle Regulation der KSRP-Expression selbst erfolgt durch RNA-BPs und miRNAs. So wurde etwa eine Interaktion von HuR und AUF1 mit AREs in der KSRP 3'-UTR beschrieben, wobei die Bindung von HuR zu einer Stabilisierung der KSRP mRNA führt. Demzufolge verursacht die Depletion dieses RNA-BP eine Reduktion der KSRP mRNA-Menge (Pullmann, Kim et al. 2007). Die Bindung von AUF1, HuR sowie von Poly-A-Bindeproteinen (PABP) konnte durch Julia Art (AG Kleinert) mittels UV-Crosslink-Analysen bestätigt werden (Art 2012). Weiterhin hat die Wechselwirkung der miR-206 mit der KSRP 3'-UTR die Inhibition der KSRP-Expression zur Folge (Amirouche, Tadesse et al. 2014). Einen ähnlichen Effekt vermitteln auch die TGF- β -induzierten (*Transforming Growth Factor*) miRNAs miR-181a und miR-27b-3p (Puppo, Bucci et al. 2016).

Während über die transkriptionelle und posttranskriptionelle Regulation der KSRP-Expression noch relativ wenig bekannt ist, sind posttranslationale Modifikationen und deren Einfluss auf die biologische Funktion von KSRP vergleichsweise gut beschrieben. Unter diesen Modifikationen finden sich hauptsächlich Phosphorylierungen bzw. Dephosphorylierungen verschiedener Aminosäuren (Abbildung 1.3). Beispielsweise phosphoryliert die p-38 mitogenaktivierte Proteinkinase (p38-MAPK) KSRP am Threonin 692 (C-terminales Ende), was die Bindung von KSRP an AREs hemmt und somit zu einer erhöhten Stabilität myogener Transkripte und den von ihnen kodierten Proteinen führt. Dies ist vor allem während der Differenzierung von Myoblasten zu Muskelzellen von Bedeutung (Briata, Forcales et al. 2005). Zusätzlich wurde von Winzen et al. eine erhöhte IL-8-Expression beschrieben, was auf eine verstärkte p38-MAPK-Aktivierung und die daraus resultierende Phosphorylierung von KSRP

zurückgeführt werden konnte (Winzen, Thakur et al. 2007). Die Proteinkinase B (AKT) phosphoryliert KSRP innerhalb der instabilen KH1-Domäne am Serin 193. Dadurch kommt es zu deren Entfaltung, was die Freilegung einer 14-3-3ζ-Bindestelle nach sich zieht. Die Interaktion zwischen KSRP und dem 14-3-3ζ-Protein führt zur vermehrten Akkumulation von KSRP im Zellkern, wodurch die KSRP-vermittelte Destabilisierung von Ziel-mRNAs im Zytoplasma verhindert wird (Díaz-Moreno, Hollingworth et al. 2009). Zusätzlich verringert die Phosphorylierung durch die AKT die Interaktion von KSRP mit dem Exosom und erhöht auf diese Weise die Stabilität der β -Catenin-mRNA (Gherzi, Trabucchi et al. 2006). Auch die Biogenese von miRNAs wird indirekt durch die posttranslationale Phosphorylierung von KSRP beeinflusst. Beispielsweise bindet die Proteinkinase ATM (*Ataxia telangectasia mutated*) im Falle von DNA-Schädigung an KSRP, woraus eine Phosphorylierung verschiedener Serine (S132, S274 und S670) resultiert. Hierdurch wird die Interaktion zwischen KSRP und prä-miRNAs erhöht und deren Maturation verstärkt, was für DNA-Reparaturmechanismen von Bedeutung ist. Somit nimmt KSRP eine Schlüsselrolle in der Reaktion der Zelle auf DNA-Schädigung ein (Zhang, Wan et al. 2011). Weiterhin bewirkt die Dephosphorylierung von KSRP am Serin 181 durch die Peptidyl-Isomerase Pin1 die Aktivierung des KSRP-abhängigen Abbaus der Parathyroidhormon mRNA (Nechama, Uchida et al. 2009). Außerdem wurde durch Pasero et al. beschrieben, dass SMAD-Proteine die durch KSRP induzierte Reifung myogener miRNAs (myomiRNAs) umkehren. Die SMAD-Proteine als Mediatoren der BMP-Signaltransduktion (*bone morphogenetic proteins*) interagieren mit KSRP und verhindern auf diese Weise die Interaktion mit prä-myomiRNAs. Dies führt dazu, dass multipotente mesenchymalen C2C12-Zellen in Osteoblasten und nicht in Myofibrillen differenzieren (Pasero, Giovarelli et al. 2012). Zuletzt ist die Ubiquitinierung von KSRP an den Lysin 109, 121 und 122 durch das *Kelch like*-Protein notwendig, um die bereits beschriebene IRES-abhängige Translation des Enterovirus 71 zu inhibieren (Lin, Li et al. 2009; Kung, Hung et al. 2017).

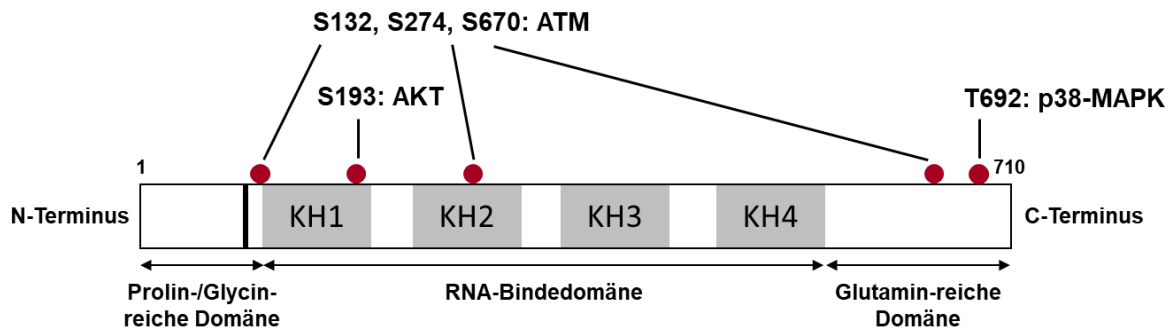


Abbildung 1.3: Veranschaulichung der Phosphorylierungsstellen innerhalb der KSRP Proteinsequenz.

Schematisch dargestellt ist die Aminosäuresequenz von KSRP mit den vier KH-Domänen (K homology). Rote Punkte indizieren die Positionen der Aminosäuren, die durch verschiedene Proteinkinasen phosphoryliert werden können. S: Serin, T: Threonin, AKT: Proteinkinase B, ATM: Ataxia telangectasia mutated Proteinkinase, p38-MAPK: p-38 mitogenaktivierte Proteinkinase (Briata, Chen et al. 2013).

1.2.3 Die Rolle von KSRP in der Pathogenese verschiedener Erkrankungen

Aufgrund seiner Eigenschaft sowohl RNA als auch DNA zu binden und dadurch die Expression einer Vielfalt an Zielgenen zu kontrollieren, spielt KSRP eine Rolle in einer Reihe an zellulären Prozessen sowie der Pathogenese verschiedener Erkrankungen. Beispielsweise nimmt KSRP Einfluss auf den Verlauf viraler Infektionen, da es die mRNA-Stabilität von Interferonen negativ reguliert. Diese werden produziert, um antivirale Signalwege auszulösen. Dementsprechend konnte gezeigt werden, dass Zellen, die aus KSRP-defizienten Mäusen isoliert wurden, resistent gegen das Herpes simplex und das vesikuläre Stomatitis Virus sind, was auf die erhöhten IFN- α - und - β -Mengen zurückgeführt wurde (Lin, Zheng et al. 2011). Weiterhin wurde beschrieben, dass KSRP als RNA-BP eine Rolle in der Myogenese spielt und für eine normale Muskelfunktionalität von Bedeutung ist. Z.B. wird durch die p38-MAPK vermittelte Thr692-Phosphorylierung die Interaktion zwischen KSRP und Transkripten verhindert, die für Myogenin und CDKN1A (*Cyclin Dependent Kinase Inhibitor 1A*) als wichtige Regulatoren der Myogenese kodieren, was zu einer Stabilisierung dieser mRNAs führt (Briata, Forcales et al. 2005). Amirouche et al. konnten außerdem zeigen, dass die p38-MAPK-vermittelte KSRP-Phosphorylierung die Expression von Utrophin fördert und somit die Entwicklung von Muskeldystrophien begünstigt (Amirouche, Tadesse et al. 2013). Das konnte sowohl *in vitro* als auch *in vivo* in einem Mausmodell zur Untersuchung der Muskeldystrophie des Typs Duchenne bestätigt werden. Sowohl der *Knockdown* von KSRP als auch die Aktivierung der p38-MAPK hatten eine erhöhte Utrophin-Expression zur Folge (Amirouche, Tadesse et al. 2013). Wie bereits in Kapitel 1.2.2 beschrieben, ist die KSRP-abhängige Reifung von myomiRNAs, wie z.B. der miR-206, ebenfalls wichtig für die Funktionalität sowie die Regeneration des Muskels (Williams, Valdez et al. 2009; Mitchelson and Qin 2015). Des Weiteren konnte eine Verbindung zwischen veränderten KSRP-Expressionen und der

Entstehung von Tumoren aufgezeigt werden. So etwa konnten Yang et al. zeigen, dass die Verminderung der KSRP-Expression in einem Mausmodell die Entstehung eines multifokalen Glioblastoms begünstigt und die Migrationsfähigkeit der Tumorzellen erhöht (Yang, Fan et al. 2013). Unterstützt wird diese Beobachtung dadurch, dass Glioblastom-Patienten mit erhöhten KSRP Transkriptmengen eine höhere Überlebensrate zeigen (Boucas, Fritz et al. 2015). Im Gegensatz dazu nimmt KSRP in Leberzellkarzinomen eine pro-tumorale Rolle ein. Demnach konnte mittels Western Blot-Analysen eine verstärkte Expression von KSRP in humanen Leberkarzinomproben detektiert werden, während das Ausschalten der Expression von KSRP *in vitro* zu einer verminderten Zellmigration führte (Zubaidah, Tan et al. 2008; Malz, Weber et al. 2009). Somit ist eine zellspezifische Funktion von KSRP für die Tumorentwicklung denkbar (Briata, Bordo et al. 2016). Erste Studien lassen zudem vermuten, dass KSRP in Prozesse des alternativen Spleißens involviert ist, welche für die Karzinogenese von Nierenkrebs eine Rolle spielen (Malouf, Su et al. 2014).

Als Regulator der mRNA-Stabilität von überwiegend Zytokinen und Chemokinen (Kapitel 1.2.1), deren Expression in Immunreaktionen einer strengen Kontrolle unterliegen muss, könnte KSRP eine Rolle in der Immunantwort einnehmen. Die Fehlregulation dieser pro-inflammatorischen Mediatoren kann pathologische Folgen haben und inflammatorische Erkrankungen, wie z.B. Autoimmunerkrankungen auslösen oder verschlimmern. Auf die Rheumatoide Arthritis als Beispiel für Autoimmunerkrankungen wird in den folgenden Kapiteln genauer eingegangen.

1.3 Rheumatoide Arthritis

Die Rheumatoide Arthritis (RA) ist eine systemische chronisch-entzündliche Autoimmunerkrankung, die weltweit mit einer Prävalenz von 0,5-1 % in der Bevölkerung auftritt (Silman and Pearson 2002). Dabei erkranken Frauen häufiger und schwerer als Männer (Cáliz, Canet et al. 2013). Die RA äußert sich in einer Entzündung der Synovialmembran der peripheren kleinen Gelenke, die mit einer massiven Zerstörung des Knochen- und Knorpelgewebes einhergeht. Durch frühzeitige antientzündliche Therapien können die Symptome zwar vermindert werden, im weiteren Verlauf der RA treten allerdings vermehrt Sekundärerkrankungen auf. Darunter finden sich kardiovaskuläre Erkrankungen, Osteoporose oder Infektionen. Gerade die kardiovaskulären Ereignisse als Folge der Entwicklung einer Arteriosklerose bzw. -thrombose erhöhen die Mortalität der RA-Patienten im Vergleich zu gesunden Menschen um etwa 50-60 % (Sherer and Shoenfeld 2006; Aviña-Zubieta, Choi et al. 2008; Kitas and Gabriel 2010).

1.3.1 Pathogenese der Rheumatoiden Arthritis

Die genaue Ursache der Entwicklung einer RA ist bisher noch nicht abschließend geklärt. Es wird jedoch eine multifaktorielle Genese vermutet; das Zusammenspiel genetischer Faktoren mit Umweltfaktoren. Die genetische Disposition der Erkrankung lässt sich beispielsweise mit bestimmten HLA-Merkmalen (humanes Leukozytenantigen) des Haupthistokompatibilitätskomplexes Klasse II (*major histocompatibility complex*, MHCII) assoziieren. Die Anfälligkeit für die RA ist durch das Vorhandensein bestimmter Allele der HLA-DRB1-Region gekennzeichnet, die für die HLA-DR4 und -DR1-Moleküle kodieren (Stastny 1978; Fugger and Svejgaard 2000). Die Pathogenese der RA beinhaltet eine Reihe an komplexen, zum Teil parallel ablaufenden Prozessen, die sich gegenseitig beeinflussen und verstärken. Eine vereinfachte Darstellung der Abläufe ist in Abbildung 1.4 gezeigt.

Es wird angenommen, dass ein bisher nicht eindeutig identifiziertes Autoantigen die Erkrankung bedingt (Voulgari and Drosos 2008). Das Antigen wird von Antigen-präsentierenden Zellen (*antigene presenting cell*, APC), wie dendritischen Zellen, Makrophagen oder aktivierten B-Zellen, über das MHCII-Molekül präsentiert, so dass autoreaktive CD4⁺-T-Zellen (T-Helferzellen, T_H-Zellen; CD: *Cluster of Differentiation*) aktiviert werden und proliferieren. Durch die Sekretion von IL-2, IL-12, TNF- α und IFN- γ entwickeln sich T_H-Zellen des Typ I (Th1). Dies hat eine unkontrolliert hohe Infiltration von Immunzellen in den Synovialspace zur Folge. Weiterhin werden B-Zellen aktiviert, die in Antikörper-produzierende Plasmazellen differenzieren und Autoantikörper gegen IgG (Rheumafaktor, RF) oder citrullierte Proteine (Anti-CP) produzieren (Schellekens, de Jong et al. 1998). Diese Autoantikörper bilden Immunkomplexe aus, die das Komplementsystem stimulieren, was die weitere Einwanderung von Immunzellen von der Peripherie in den Knorpel fördert (Mathsson, Lampa et al. 2006). Die Immunzellen produzieren wiederum selbst Zytokine, Chemokine, Adhäsionsmoleküle und inflammatorische Enzyme (Choy 2012). Infolgedessen kommt es zur Aktivierung von Makrophagen, Osteoklasten, Fibroblasten und Chondrozyten, die destruktive Proteine, wie Matrixmetalloproteasen (MMP3 und MMP9) sekretieren. Diese lösen letztendlich die Zerstörung der extrazellulären Matrix (EZM) aus (Cawston and Wilson 2006). Gleichzeitig wird die Neusynthese der EZM verhindert, indem durch die aktivierten Chondrozyten die Proteoglykan- und Kollagensynthese gehemmt wird. Die Ausschüttung von TNF- α , IL-1, IL-6 und RANKL (*receptor activator of NF- κ B ligand*) unterstützt die Differenzierung und Aktivierung der Osteoklasten sowie deren Einwanderung in den Knochen (Raisz 1999; Schett and Teitelbaum 2009). Dadurch entsteht ein Ungleichgewicht zwischen Osteoblasten und Osteoklasten zugunsten der Osteoklasten, was den vermehrten Knochenabbau zur Folge hat (Boyce and Xing 2008). Schlussendlich kommt es durch Mechanismen der Angiogenese zur

Ausbildung eines Pannus, der sich durch einen aggressiven und autonomen Zellverband auszeichnet und sich in den Knorpel einlagert.

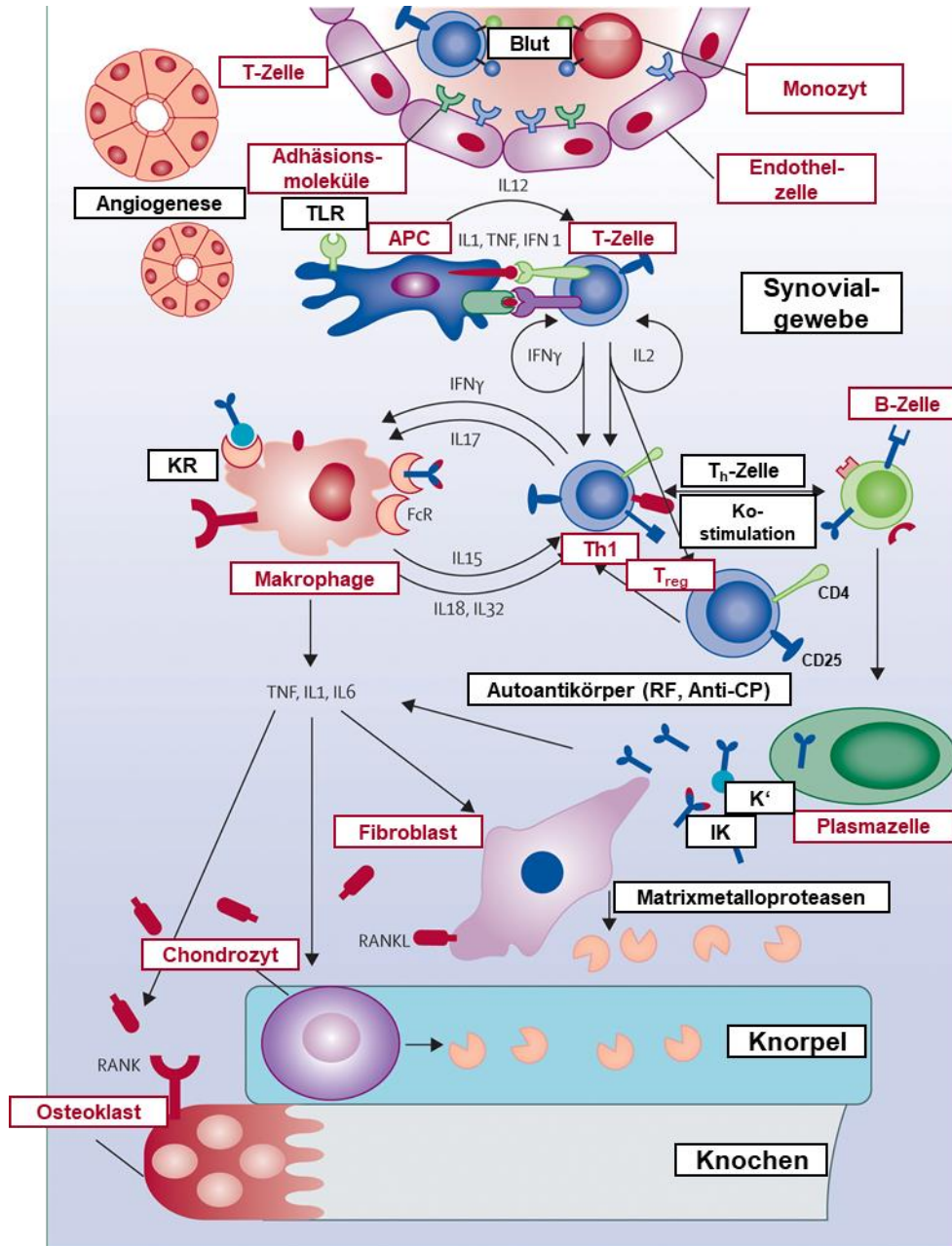


Abbildung 1.4: Schematische Darstellung der Pathogenese der Rheumatoiden Arthritis.

Die Darstellung bezieht sich auf die ablaufenden Prozesse während der Pathogenese der RA in Synovium, Knorpel und Knochen. Pfeile zeigen Interaktionen zwischen den einzelnen Parametern an. APC: Antigen-präsentierende Zelle, IL: Interleukin, IFN: Interferon, TLR: Toll-like Rezeptor, FcR: Rezeptor für den Fc-Anteil von Antikörpern, KR: Komplement-Rezeptor, T_H -Zelle: T-Helferzelle, $Th1$: T_H -Zellen des Typ 1, T_{reg} : regulatorische T-Zelle, CD: Cluster of Differentiation, IK: Immunkomplex, K' : Komplement, RF: Rheumafaktor, CP: citrulliierte Proteine, RANK: Rezeptoraktivator von NF- κ B ligand, RANKL: RANK-Ligand; verändert nach (Smolen, Aletaha et al. 2007).

1.3.2 Regulation der pro-inflammatorischen Genexpression im Verlauf der RA

Pro-inflammatorische Mediatoren, wie Zytokine (TNF- α , IL-1, IL-6, IL-18), Chemokine (*monocyte chemotactic protein 1*: MCP-1, IL-8), Adhäsionsmoleküle (*vascular cell adhesion molecule 1*: VCAM-1 und *intercellular adhesion molecule 1*: ICAM-1), inflammatorische Enzyme (iNOS, COX-2) und angiogenetische Wachstumsfaktoren (*vascular endothelial-* und *fibroblast growth factors*: VEGF und FGF) sind allgemein für Immunreaktionen von besonderer Bedeutung, spielen aber auch in der RA eine wichtige Rolle (Arend and Dayer 1990; Firestein 2003; Malemud 2007). Die Expression der Mediatoren muss einer strengen Regulation unterstehen. Sie müssen zwar im Falle einer erforderlichen Immunantwort kurzzeitig hochreguliert werden, greifen in anhaltend hohen Mengen jedoch körpereigenes Gewebe an, was in der RA der Fall ist. Wie in Kapitel 1.3.1 beschrieben, führen hier verschiedene, sich gegenseitig beeinflussende Prozesse zu einer unkontrollierten Expression dieser pro-inflammatorischen Proteine. Diese fehlgesteuerte Genregulation ist auf Aktivitätsänderungen von Transkriptionsfaktoren wie NF- κ B (*nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*), STATs (*Signal Transducer and Activator of Transcription*), AP-1 (*activator protein 1*) und NF-AT (*nuclear factor of activated T-cells*) zurückzuführen (Han, Boyle et al. 1998; Hammaker, Sweeney et al. 2003; Lu, Stump et al. 2010). Die Aktivität zur DNA Bindung ist für NF- κ B und AP-1 erhöht, was sich im Falle von NF- κ B durch die Degradation des Inhibitors I κ B erklären lässt (Han, Boyle et al. 1998). Darüber hinaus wirkt sich eine veränderte Aktivität von RNA-BPs als wichtige Regulatoren der posttranskriptionellen Genexpression auf die Expression pro-inflammatorischer Mediatoren während der Pathogenese der RA aus. Außerdem tragen dysregulierte miRNAs zur Entwicklung der RA bei (Furer, Greenberg et al. 2010). Beispielsweise konnte gezeigt werden, dass die miR-155 in Makrophagen der Synovialmembran aus RA-Patienten hochreguliert vorliegt (Stanczyk, Pedrioli et al. 2008). Das geht einher mit der verringerten Expression von SHIP-1 (*Src homology 2-containing inositol phosphatase-1*), einem Entzündungs-Inhibitor (Kurowska-Stolarska, Alivernini et al. 2011). In mononukleären Zellen des peripheren Bluts aus RA-Patienten ist die Expression der miR-146a, miR-155, miR-132 und miR-16 um das 1,8-2,6-Fache erhöht (Pauley, Satoh et al. 2008).

1.3.3 Therapie der rheumatoiden Arthritis

RA-Patienten sind während dem Verlauf der Erkrankung aufgrund der fortschreitenden Knorpel- und Knochendegradation physisch sehr stark eingeschränkt und einem um 50 % erhöhten Risiko ausgesetzt an Herz-Kreislauf-erkrankungen zu versterben (Aviña-Zubieta, Choi et al. 2008). Aus diesem Grund muss die Krankheit mit entsprechenden Therapiemaßnahmen frühzeitig behandelt werden, da die Zerstörung der Gelenke zu Beginn am stärksten

fortschreitet. Dabei werden vier Medikamentenklassen eingesetzt: nicht-steroidale anti-inflammatorische Medikamente (NSAIDs), Glukokortikoide, nicht-biologische und biologische krankheitsmodifizierende Antirheumatika (*disease-modifying antirheumatic drugs*, DMARDs) (Kumar and Banik 2013). Als Basistherapie wird gemäß den Leitlinien der Deutschen Gesellschaft für Rheumatologie mit Methotrexat behandelt, einem nicht-biologischen DMARD, das als Folsäureantagonist die T-Zellaktivierung hemmt. Durch diese immunsuppressive Wirkung wird das Fortschreiten der Erkrankung verlangsamt. Dabei wird eine Kombinationstherapie mit Glukokortikoiden (z.B. Prednisolon) in geringer Konzentration empfohlen, da hohe Konzentrationen Stoffwechselstörungen zur Folge haben können (Krüger, Wollenhaupt et al. 2012). Als Nebenwirkung der Behandlung ist die verringerte Reaktion des Körpers auf Viren oder Bakterien, bedingt durch die immunsuppressive Wirkung, zu nennen, was ein erhöhtes Infektionsrisiko darstellt.

Durch die zunehmend genaueren Erkenntnisse über die molekularen Mechanismen der Pathogenese der RA konnten Therapieansätze entwickelt werden, die spezifisch in verschiedene Signaltransduktionswege eingreifen und somit den Verlauf der Krankheit beeinflussen. Diese biologischen DMARDs, auch Biologika genannt, richten sich in Form von löslichen Rezeptoren oder als Antagonisten gegen inflammatorische Zytokine. Beispielsweise werden TNF- α -Inhibitoren, wie anti-TNF- α -Antikörper (Adalimumab) oder rekombinante TNF- α -Rezeptoren (Etanercept) in Anwendung gebracht. Des Weiteren gibt es eine Therapie gegen IL-1 (Anakinra) und IL-6 (Tocilizumab), eine Anti-B-Zell-Therapie (Rituximab) sowie T-Zell-Kostimulationsblocker (Abatacept) oder Proteinkinaseinhibitoren (Tofacitinib) (Kumar and Banik 2013). Nachteile der Therapie mit biologischen DMARDs sind zum einen die hohen Kosten und zum anderen die Nebenwirkungen, wie die Antikörperbildung gegen die verwendeten Biologika sowie ein erhöhtes Infektionsrisiko.

Die Therapiemöglichkeiten der RA haben zwar in den letzten Jahren erheblich zugenommen, allerdings führt der Einsatz der Medikamente häufig nicht zu vollständiger Remission. Die genannten Nebenwirkungen machen eine erfolgreiche Langzeittherapie oftmals schwierig, weshalb weiterhin der Bedarf besteht, neue wirksame sowie nebenwirkungsarme Substanzen zu erforschen und entwickeln.

1.3.4 Der Naturstoff Resveratrol

Bei Resveratrol handelt es sich um einen natürlich vorkommenden Stoff aus der Gruppe der Polyphenole, welcher von verschiedenen Pflanzen, wie beispielsweise Trauben und Beeren als Folge von Verletzungen oder Pilzinfektionen produziert wird (Langcake and Pryce 1976). Aus pharmakologischer Sicht weist Resveratrol aufgrund seiner anti-oxidativen, anti-

diabetischen, kardioprotektiven, neuroprotektiven, anti-tumorellen und anti-inflammatorischen Eigenschaften ein großes Potential auf (Brisdelli, D'Andrea et al. 2009; Rodrigo, Miranda et al. 2011). Viele dieser Effekte, die besondere Bedeutung für den Verlauf verschiedener inflammatorischer Erkrankungen haben, werden auf die Fähigkeit zurückgeführt die Histon Deacetylase Sirtuin 1 (SIRT-1) zu aktivieren. SIRT-1 wiederum vermindert die transkriptionelle Aktivität von NF- κ B, was zur Reduktion der NF- κ B-regulierten pro-inflammatorischen Genexpression führt (Yeung, Hoberg et al. 2004). Auch für STAT-1 α , einem weiteren pro-inflammatorischen TF, wurde eine Regulation durch Resveratrol beschrieben (Chung, Kim et al. 2011). Weiterhin moduliert der Naturstoff Signaltransduktionswege wie den p38-MAPK-Weg (Malemud 2007) oder den Signalweg der AMP-aktivierten Proteinkinase (AMPK) (Park, Ahmad et al. 2012). Überdies scheint Resveratrol auch auf posttranskriptioneller Ebene in die Regulation der Genexpression einzugreifen. Beispielsweise wurde ein negativer Einfluss auf die mRNA-Menge des pro-inflammatorischen Mediators TNF- α in aktivierten Jurkat T-Zellen beschrieben, der durch das RNA-BP HuR aufgehoben wurde. (Mukherjee, Lager et al. 2009). Auch für die iNOS mRNA konnte ein solcher Effekt beobachtet werden, wobei Resveratrol die mRNA-Halbwertszeit signifikant vermindert (Art 2012). Da zusätzlich eine Interaktion zwischen Resveratrol und KSRP nachgewiesen werden konnte, ist es naheliegend, dass die Resveratrol-vermittelte Destabilisierung pro-inflammatorischer Transkripte indirekt über KSRP verläuft. Das konnte für die Regulation der iNOS mRNA-Stabilität bereits bestätigt werden (Art 2012).

Der beschriebene negative Einfluss von Resveratrol auf die pro-inflammatorische Genexpression, deren Regulation für den Verlauf chronisch inflammatorischer Erkrankungen von Bedeutung ist, äußert sich somit auf verschiedenen Ebenen. Demnach könnte die Behandlung mit dem Naturstoff zu einer Verbesserung der Symptome chronischer Autoimmunerkrankungen führen (Harikumar and Aggarwal 2008; Yu, Fu et al. 2012).

1.3.5 Mausmodelle zur Untersuchung der Pathogenese der rheumatoiden Arthritis

Tiermodelle sind besonders hilfreich, um Mechanismen der Pathogenese von chronischen Entzündungskrankheiten zu untersuchen und potentielle therapeutische Substanzen zu testen. Die Verwendung von Inzuchtstämmen, meist kleinerer Säuger, gewährleistet, dass genetische Einflüsse verringert werden können und ermöglicht eine standardisierte Untersuchung.

Obwohl der eigentliche Auslöser der RA bisher noch unbekannt ist, wird angenommen, dass die Erkrankung durch Kollagenfasern des Typ II (CII) als potentielles Autoantigen ausgelöst wird und eine T- und B-Zell-abhängige Immunantwort induziert (Kim, Kim et al. 1999). CII wird

von Chondrozyten synthetisiert und kommt natürlicherweise in der EZM von Knorpel und Knochen vor und somit direkt am Ort des Entzündungsgeschehens im Verlauf der Erkrankung. Demnach liegt der Kollagen Typ II-induzierten Arthritis (CIA), einem anerkannten Mausmodell zur Untersuchung der RA, die Immunisierung mit heterologem CII in Freund's Adjuvans zugrunde (Courtenay, J. Dallman et al. 1980; Trentham 1982). Die vielen Gemeinsamkeiten zur humanen RA machen das Modell zum Goldstandard unter den RA-Tiermodellen. Beispielsweise sind Mausstämme deutlich anfälliger für die Entwicklung einer Arthritis, welche die bestimmten MHCII Haplotypen H-2q und H-2r besitzen, wie z.B. DBA\1-Mäuse (Wooley, Luthra et al. 1981; Holmdahl, Bockermann et al. 2002). Durch die Immunisierung mit CII wird eine B- und T-Zell-vermittelte Immunantwort ausgelöst, welche die Sekretion von Zytokinen sowie die Synthese von anti-CII-Antikörpern beinhaltet. Versuche mit T- und B-Zell-defizienten Mäusen konnten dies bestätigen (Svensson, Jirholt et al. 1998). 21-25 Tage nach der Immunisierung zeigen sich erste Anzeichen der Erkrankung ähnlich der humanen RA, wie die Einwanderung von Immunzellen in die Synovia, synoviale Hyperplasien und Erosionen von Knorpel und Knochen (Asquith, Miller et al. 2009).

Zur Untersuchung von Effekten genetischer Modifikationen oder gezielter Gendelektionen auf die Pathogenese der RA ist das CIA-Modell allerdings nicht geeignet, da transgene Mäuse meistens einen C57BL/6-Hintergrund haben. C57BL/6-Mäuse exprimieren den MHCII-Haplotyp H-2b, der die Mäuse weitestgehend resistent gegen die CIA-Induktion macht. Mit veränderten Protokollen ist eine CIA-Entstehung zwar dennoch möglich, allerdings ist die finale Ausprägung der Symptome deutlich schwächer als in DBA\1-Mäusen und sehr variabel (Inglis, Criado et al. 2007). Daher hat mittlerweile ein weiteres Mausmodell an Bedeutung gewonnen, bei welchem die Arthritis-Entwicklung unabhängig vom MHCII-Haplotyp verläuft: die Kollagen-Antikörper-induzierte Arthritis (CAIA) (Stuart and Dixon 1983; Nandakumar, Svensson et al. 2003). Bei diesem Modell erreicht die Inflammation bereits nach wenigen Tagen ihren Höhepunkt. Zur Induktion einer CAIA wird den Mäusen ein Gemisch aus monoklonalen Antikörpern injiziert, die gegen verschiedene Regionen des CII gerichtet sind. Durch die zusätzliche Injektion von Lipopolysaccharid (LPS) wird die Immunreaktion verstärkt (Terato, Harper et al. 1995; Khachigian 2006). Die ablaufenden Prozesse gehen wie bei der humanen RA oder dem CIA-Modell mit der Sekretion von pro-inflammatorischen Zytokinen, wie TNF- α und IL-1 β einher. Weiterhin scheinen die Chemokine MCP-1 und MIP-1 α (*macrophage inflammatory protein 1 α*) von Bedeutung zu sein, was durch entsprechende Depletionen gezeigt werden konnte (Kagari, Doi et al. 2002). Es wurde außerdem beschrieben, dass die Entwicklung der CAIA im Gegensatz zur CIA-Induktion T- und B-Zell-unabhängig verläuft und stattdessen von der Makrophagen-Infiltration abhängig ist. Dennoch konnte eine stärkere Ausprägung der Arthritis in T- oder B-Zell-defizienten Mäusen beobachtet werden, was letztlich eine regulatorische Rolle dieser Zellen für die Pathogenese denkbar

macht (Nandakumar, Bäcklund et al. 2004). Die pathogenen Auswirkungen der CAIA ähneln stark der humanen RA. Es kommt zur Pannus-Entwicklung und Synovitis, zum Knorpelabbau und Knochenerosionen sowie zur Einwanderung von Immunzellen, darunter Neutrophilen (Nandakumar, Svensson et al. 2003). Die mögliche Relevanz der Neutrophile für die CAIA-Entwicklung zeigt sich darin, dass der Krankheitsverlauf durch die Depletion von Neutrophilen abgeschwächt wird (Nandakumar, Svensson et al. 2003). Zusätzlich führt eine Antileukoproteinase-Behandlung, einem Serinprotease-Inhibitor, der einen negativen Einfluss auf die Leukozyten-Funktionen ausübt, zur vollständigen Inhibition der CAIA-Entstehung mit protektiver Wirkung gegen Knochenerosionen (Sehnert, Cavcic et al. 2004). Ähnlich zur humanen RA ist das Komplementsystem in die CAIA-Induktion involviert, wobei die Deletion bzw. Mutation verschiedener Faktoren oder Inhibitoren der Kaskade (z.B. der Komplementfaktor H, CfH) den Verlauf der Erkrankung abschwächt bzw. verschlimmert (Banda, Takahashi et al. 2007; Banda, Mehta et al. 2013).

2 Zielsetzung der Arbeit

Das *KH-type splicing regulatory protein* (KSRP) gilt als wichtiger negativer Modulator der mRNA-Stabilität pro-inflammatorischer Mediatoren, weshalb das RNA-Bindeprotein wahrscheinlich in die Pathogenese von chronisch entzündlichen Erkrankungen involviert ist. Kenntnisse über die Regulation der KSRP-Expression und -Aktivität könnten daher Aufschluss darüber geben, ob KSRP eine potentielle Zielstruktur für die Entwicklung von neuen therapeutischen Prinzipien zur Behandlung von chronischen Inflammationskrankheiten darstellt.

Ziel dieser Arbeit war es transkriptionelle sowie posttranskriptionelle Regulationsmechanismen der KSRP-Expression aufzuklären. Hierfür sollten durch bioinformatische Analysen und Luciferase Reporter-Gen-Assays putative Promotorabschnitte charakterisiert und der Bereich des Kernpromotors mit Hilfe von Deletionskonstrukten eingegrenzt werden. Eine weitere Aufgabe stellte die Identifikation von Transkriptionsfaktoren dar, welche die Transkription von KSRP initiieren. Da frühere Analysen bereits die Bindung von RNA-BPs an die KSRP 3'-UTR zeigten, ist eine Regulation der KSRP-Expression auch auf posttranskriptioneller Ebene möglich. Deshalb sollte im weiteren Verlauf die Rolle der KSRP 3'-UTR für die posttranskriptionelle Regulation betrachtet werden. Mittels Pulldown-Experimenten und massenspektrometrischen Untersuchungen sollten RNA-BPs identifiziert werden, die mit der KSRP 3'-UTR interagieren. Die bereits nachgewiesene Bindung von KSRP mit der eigenen 3'-UTR wurde weiterhin verifiziert und die Funktion von KSRP für die eigene Regulation in Zellen mit veränderter KSRP-Expression untersucht.

Im zweiten Teil dieser Arbeit wurde die Rolle von KSRP in chronisch inflammatorischen Erkrankungen analysiert. Zu diesem Zweck sollte in KSRP-defizienten Mäusen eine Arthritis durch die Injektion von Antikörpern gegen Kollagen II (CII) ausgelöst werden. Dieses Modell der Kollagen-Antikörper-induzierten Arthritis (CAIA) gilt als anerkanntes Mausmodell der humanen RA. Zur Charakterisierung der Mäuse nach der Arthritis-Induktion sollten mRNA-Analysen in verschiedenen Organen und den Pfoten durchgeführt werden, um die Expression Arthritis-relevanter Gene zu analysieren. Außerdem sollte die Ursache für die Schwellung der Pfoten CAIA-behandelter Mäuse mit histochemischen Methoden näher untersucht werden.

Der letzte Teil der Arbeit beschäftigte sich mit dem Naturstoff Resveratrol, welchem anti-inflammatorische Eigenschaften zugeschrieben werden. Durch die nachgewiesene direkte Bindung von KSRP an Resveratrol ist es denkbar, dass die positiven durch Resveratrol vermittelten Effekte KSRP-abhängig verlaufen. Daher sollten die molekularen Mechanismen, welche der Resveratrolwirkung zugrunde liegen, *in vitro* aufgeklärt und analysiert werden.

3 Material

3.1 Laborgeräte

Tabelle 3.1: Laborgeräte mit Angabe der Hersteller

Funktion	Gerät	Bezeichnung	Hersteller
Elektrophorese	Gleichstromquelle für Agarosegelelektrophorese	GPS 200/400	Pharmacia
	Gleichstromquelle für SDS-PAGE/Semi-Dry-Blotter	Power Pac Basic	BioRad
		Power Pac HC	
	Horizontal-Gelelektrophoresekammer		BioRad
Vertikal-Gelelektrophoresekammer	Mini-Protean 3 Cell	BioRad	
Kühlung	+4 °C Kühlschrank	Profi line	Liebherr
			Bosch
	-20 °C Gefrierschrank	Protan	Liebherr
		Comfort	
	-80 °C Gefrierschrank	Herafreeze	Heraeus
Kühlbox für Kryokonservierung	Mr. Frosty Freezing Container	Thermo Scientific	
Zellkulturtank	Cryo 200	Thermo Scientific	
Messung	Chemidoc™ XRS		BioRad
	Luminometer	Centro LB 960	Berthold
	qRT-PCR-Gerät	CFX Connect	BioRad
	pH-Meter	Wtw	inoLab
	Photometer	Sunrise	Tecan
	Spektrophotometer	NanoDrop-2000©-	Peqlab
	Waagen	Analytic AC120 S (0,1 mg-121 g)	Sartorius
Ew (0,02 g-120 g)		Kern	
440-35 N (0,01 g-400 g)			
	PCB (0,1 g-4000 g)		
Pipetten	Einkanalpipetten	0,5-10 µl 10-100 µl 100-1000 µl	Brand
		10-100 µl 200-1000 µl	Eppendorf
	Mehrkanalpipetten	Research plus (0,5-10 µl)	Eppendorf
		Proline Plus (0,5-10 µl)	Sartorius

	Pipetboy	Acu und confort	IBS
Schüttler	Kreisschüttler	KS 250 Basic	IKA Labortechnik
	Vortex-Schüttler		IKA Labortechnik
			VWR
	Überkopfschüttler	Intelli-Mixer	neoLab
	Wippschüttler	DRS-12	neoLab
	Schüttelinkubator	Innova® 40	New Brunswick Scientific
Zentrifugen	Kühlzentrifuge	Micro Star 17R	VWR
		Biofuge fresco	Heraeus
		Rotina 35R	Hettich
		Megafuge 1.0R	Heraeus
		Avanti™ J-30 I	Beckmann
	Tischzentrifuge	Biofuge 12	Heraeus
		Galaxy Mini	Merck
		Perfect Spin P	Peqlab
Sonstige Geräte	Autoklav	Laboklav	VWR
	Brutschrank	HeraCell 150	Thermo Fisher Scientific
		HeraCell 150i	
	Bunsenbrenner	Fireboy eco	IBS integra Bioscience
	Eismaschine		Ziegra
	Hämozytometer	Neubauer-Zählkammer	Marienfeld-Superior
	Heizblock		Peqlab
	Homogenisierstab	RT	Miccra
	Inkubationsschrank	B28	Binder
	Magnetrührer	Ikamag RCT	IKA Labortechnik
		Combimag RCT	IKA Labortechnik
		Big-Squid Ikamag	IKA Labortechnik
	Mikroskop	Leica DMIL	Leica
	Mikrowelle		Severin
	PCR-Gerät	MyCycler	BioRad
	Semi-Dry Blotter	Trans-Blot SD	BioRad
	Sonifikator	Bioruptor plus	Diagenode
	Sterilbank	Herasafe	Heraeus
	TissueLyser	TissueLyser LT	Qiagen
	UV-Transilluminator		Intas
Wasserbad	Julabo TW20	Julabo	
	1092	GFL	

3.2 Verbrauchsmaterialien

3.2.1 Plastikwaren

Tabelle 3.2: Übersicht über die verwendeten Plastikmaterialien mit Angabe der Hersteller

Produkt	Beschreibung	Hersteller
Einweg-Auslaufpipetten	5 ml, 10 ml, 25 ml	Greiner
Kunststoffpipettenspitzen	0,5-10 µl	Sarstedt
	10-100 µl	Starlab
	100-1000 µl	Starlab
Mikroplatte für Bradford-Assay	96-Lochplatte	Greiner
Mikroplatte für Luciferase-Assay	Lumitrac 200	Greiner
Zentrifugenröhrchen	15 ml und 50 ml	Greiner
PCR-Gefäße	0,2 ml 8-Lochstreifen mit Deckel	Nippon Genetics
	0,2 ml 96-Lochplatte für cDNA-Synthese	Biozym
	0,2 ml 96-Lochplatte für qRT-PCR	Greiner
Verschlussstreifen der PCR-Gefäße	8-Verschlussstreifen	Biozym
	Folie	Greiner
Reaktionsgefäße	0,2 ml, 1,5 ml, 2 ml, 5 ml	Peqlab, Sarstedt
Spritzen	Injekt-F, 1 ml	B.Braun
Kryokonservierungsröhrchen	1 ml	Thermo Fisher Scientific
Zellkulturflaschen Filter Top	Kulturflasche/Volumen (cm ² /ml): 25/50 und 75/250	Greiner
Zellkulturplatten, 6-Loch	Kulturfläche je Vertiefung: 9,6 cm ²	Greiner
Zellkulturplatten, 12-Loch	Kulturfläche je Vertiefung: 3,8 cm ²	
Zellkulturplatten, 24-Loch	Kulturfläche je Vertiefung: 1,75 cm ²	
Zellkulturschale	Durchmesser/Wachstumsfläche (cm/cm ²): 10/100 und 14,5/145	Cellstar
Zellschaber	25 cm, steril	Sarstedt

3.2.2 Weitere Verbrauchsmaterialien

Tabelle 3.3: Übersicht über Verbrauchsmaterialien mit Angabe der Hersteller

Produkt	Beschreibung	Hersteller
Kanülen	Microlance™ 3 24xG, 25xG, 27xG	BD
Nitrozellulosemembran	Protran BA 83 (0,2 µm)	Whatman
Whatman-Papier	3 mm Chr	Whatman

Material

Parafilm		Parafilm
Pasteurpipetten	150 mm, Glas, ohne Wattestopfen	Roth
Photomaterialien	Chemilumineszenz-Film	GE Healthcare
Steril-Filter	0,2 µm, 0,45 µm	VWR

3.3 Software

Tabelle 3.4: Verwendete Software

Name	Verwendung	Hersteller
GraphPad PRISM 5.02	Erstellung der Graphen und statistische Auswertung	Graphpad Software Inc.
Image Lab™	Auswertung der Western Blot-Analysen	BioRad
Magellan 6	Bradford-Messung	Tecan
Mikrowin 2000	Luciferase-Assay	Mikrotek Laborsysteme
CFX™ Manager Software Version 3.1	Auswertung der qRT-PCRs	BioRad
Quantity One	Western Blot	BioRad
NDP.view2	Bearbeitung der histochemischen Färbungen	Hamamatsu Photonics

3.4 Spezielle Chemikalien und Reagenzien

Tabelle 3.5: Eingesetzte Chemikalien und Reagenzien

Produkt	Hersteller
1,4-Dithiothreitol (DTT)	AppliChem
5,6-Dichlorobenzimidazol-1-β-ribofuranosid (DRB)	Sigma-Aldrich
β-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich
Acrylamid	Roth
Adenosintriphosphat (ATP)	AppliChem
Agar-Agar	Roth
Agarose	AppliChem
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Sigma
Ammoniumsulfat	AppliChem
Ampicilin	AppliChem
Bovines Serum Albumin (BSA)	AppliChem
Bradford-Reagenz	BioRad
Bromphenolblau	Applichem
Calciumchlorid (CaCl ₂)	Merck

Chloroform	AppliChem
Chloroquinphosphat	Sigma-Aldrich
Coelenterazin	PJK
Coenzym A	AppliChem
Diethylpyrocarbonat (DEPC)	Roth
Dimethylsulfoxid (DMSO)	AppliChem
D-Luciferin	PJK
7-Deaza-2'-Deoxyguanosin (dc ⁷ GTPs) 10 mM	Sigma-Aldrich
dNTPs (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) 100 mM	VWR
Entwicklerflüssigkeit	Agfa
Essigsäure	AppliChem
Ethanol	AppliChem
Ethanol, vergällt	Roth
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	AppliChem
Fixierflüssigkeit	Agfa
16 % Formaldehydlösung, Methanol-frei	Thermo Scientific
GeneJuice [®] Transfektionsreagenz	Novagen
Glucose	AppliChem
Glycerin	Roth
Glycin	AppliChem
Guanidiniumisothiocyanat (GIT)	Roth
Hefextrakt	Roth
Heparin	Sigma-Aldrich
Hepes	AppliChem
IGEPAL [®] CA-630 (NP-40)	Sigma-Aldrich
Isoamylalkohol	AppliChem
Isopropanol	AppliChem
Kaliumacetat (KAc)	Roth
Kaliumchlorid (KCl)	AppliChem
Lachssperma DNA	Sigma Aldrich
Lipopolysaccharid (LPS)	Sigma-Aldrich
Magermilchpulver (MP)	AppliChem
Magnesiumchlorid (MgCl ₂)	AppliChem
Magnesiumsulfat (MgSO ₄)	Roth
Methanol	AppliChem
N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin (TEMED)	AppliChem
Natriumacetat (NaAc)	Roth
Natriumchlorid (NaCl)	Roth
Natriumcitrat	AppliChem
Natriumhydrogenphosphat (NaH ₂ PO ₄)	Roth

Natriumhydroxid (NaOH)	Roth
N-Laurylsarcosin	AppliChem
5x <i>Passive Lysis Buffer</i> (PLB)	Promega
Pepton aus Casein	Roth
Phenol, Tris-gesättigt	AppliChem
Phenol, wassergesättigt	AppliChem
Phosphatase Inhibitor Cocktail 2 und 3	Sigma-Aldrich
Polyinosinpolycytidylsäure (Poly I:C)	Sigma-Aldrich
Polyethylenimin (PEI)	Sigma-Aldrich
Ponceau S	Roth
Protaminsulfat	Sigma-Aldrich
Protease Inhibitor SIGMAFAST™	Sigma-Aldrich
Protein-A/G PLUS-Agarose	Santa Cruz Biotechnology
Ribolock RNase Inhibitor (RNasin)	Thermo Scientific
Roti®-GelStain	Roth
Roti®-Histofix	Roth
Salzsäure (HCl)	Roth
SDS ultra pure	Roth
Streptavidin-Agarose	Sigma-Aldrich
Tricin	Sigma-Aldrich
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris)	Roth
tRNA	Roche
Tween® 20	Sigma
<i>Vanadyl Ribonucleosid Complex</i> (VRC)	BioChemica
Xylencyanol	Applichem

3.5 Lösungen und Puffer

Alle Lösungen und Puffer wurden, wenn nicht anders angegeben, mit Aqua bidest. (Millipore) angesetzt. Für Puffer und Lösungen, die für Versuche mit RNA benötigt wurden, wurde DEPC-H₂O verwendet.

3.5.1 Allgemeine Lösungen und Puffer

DEPC-Wasser

200 µl Diethylpyrocarbonat (DEPC) wurden in 1 l Aqua bidest. gegeben, für 16 Stunden geschüttelt und zweimal für 60 Minuten (min) autoklaviert.

10x TAE-Puffer (Tris-Acetat-EDTA-Puffer)

400 mM	Tris
1,142 %	Essigsäure
20 mM	Na ₂ EDTAxH ₂ O, pH 8,0

0,8x TAE-Puffer mit Roti®-GelStain

0,8x	TAE-Puffer (10x)
30 µl/l	Roti®-GelStain

10x Ladepuffer

0,1 %	Bromphenolblau
0,1 %	Xylencyanol
50 %	Glycerin

GIT-Puffer

4 M	GIT
2 mM	Natriumcitrat, pH 7
0,5 %	Laurylsarcosin
0,1 M	β-Mercaptoethanol, frisch zugegeben

2x Taq-Puffer

40 mM	Tris-HCl, pH 8,7
20 mM	Ammoniumsulfat
8 mM	MgCl ₂
20 mM	KCl

Hybridisierungs-Puffer

10 mM	Tris-HCl, pH 7,5
50 mM	NaCl
1 mM	EDTA

TE-Puffer

10 mM	Tris-HCl, pH 7,5
1 mM	EDTA

50x Basischer Puffer

5 M	NaOH
0,5 mM	EDTA

50x Neutralisationspuffer

2 M	Tris-HCl, pH 5
-----	----------------

3.5.2 Lösungen für die Plasmid-DNA-Präparation

Maniatis I

50 mM	Glucose
25 mM	Tris-HCl, pH 8,8
10 mM	EDTA

Maniatis II

0,2 M	NaOH
1 %	SDS

Maniatis III

3 M	KAc, pH 4,8
-----	-------------

3.5.3 Lösungen und Puffer für Luciferase Reportergen-Analysen

2x Luciferase-Puffer

60 mM	Tricin
0,2 mM	EDTA
30 mM	MgSO ₄
20 mM	DTT

Luciferase-Substrat

1x	Luciferase-Puffer
12,5 mM	D-Luciferin
27 µM	Coenzym A
100 mM	ATP

Renilla-Puffer

0,1 M	NaCl ₂
1 mM	CaCl ₂
25 mM	Tris-HCl, pH 7,5

Renilla-Substrat

0,9 µM	Coelentereazin in Renilla-Puffer
--------	----------------------------------

3.5.4 Lösungen und Puffer für Protein-Analysen

3.5.4.1 Isolation von Kernextrakten

10x Puffer A

10 mM	Hepes-KOH, pH 7,9
1,5 mM	MgCl ₂
10 mM	KCl

Mix I (immer frisch angesetzt)

1x	Puffer A (10x)
0,5 mM	DTT
0,1 %	NP-40
1x	Protease-/Phosphataseinhibitoren

10x Puffer C

20 mM	Hepes-KOH, pH 7,9
1,5 mM	MgCl ₂
0,2 mM	EDTA

Mix II (immer frisch angesetzt)

1x	Puffer C (10x)
25 %	Glycerin
420 mM	NaCl
0,5 mM	DTT
1x	Protease-/Phosphataseinhibitoren

Puffer D

20 mM	Hepes-KOH, pH 7,9
20 %	Glycerin
2 mM	MgCl ₂
100 mM	KCl
0,5 mM	DTT
0,2 mM	EDTA

3.5.4.2 Western Blot

RIPA-Puffer

50 mM	Tris-HCl, pH 7,4
150 mM	NaCl
1 %	NP-40
2 mM	EDTA
10 %	Glycerin

Proteinase- und Phosphataseinhibitoren wurden nach Herstellerangaben frisch dazugegeben.

5x Lämmli-Puffer

312,5 mM	Tris-HCl, pH 6,8
5 mM	EDTA
15 %	SDS
0,015 %	Bromphenolblau
50 %	Glycerin
40 mM	DTT (immer frisch hinzugegeben)

5x Laufpuffer

124 mM	Tris-HCl, pH 8,0
960 mM	Glycin
17,3 mM	SDS

pH auf 8,0 eingestellt

Transferpuffer

25 mM	Tris-HCl, pH 8,3
960 mM	Glycin
20 %	Methanol

Ponceau S Färbelösung

0,5 %	Ponceau S
1 %	Eisessig

10x TBS

100 mM	Tris-HCl, pH 7,8
150 mM	NaCl

1x TBST

1x	TBS (10x)
0,1 %	Tween® 20

3.5.4.3 Pulldown-Analysen

Alle Puffer für die Pulldown-Analysen mit RNA wurden mit DEPC-H₂O angesetzt.

10x Bindesalz

100 mM	Hepes-KOH, pH 7,9
30 mM	MgCl ₂
50 mM	EDTA

Bindepuffer-DNA, 40 mM KCl

1x	Bindesalz (10x)
40 mM	KCl
2 mM	DTT
5 %	Glycerin
0,5 %	NP-40
3 mg/ml	Heparin
0,5 mg/ml	Lachssperma DNA
1 mg/ml	Poly I:C

Bindepuffer-DNA, 100 mM KCl

1x	Bindesalz (10x)
100 mM	KCl
2 mM	DTT
0,2 %	Glycerin

Bindepuffer-RNA, 40 mM KCl

1x	Bindesalz (10x)
2 mM	DTT
5 %	Glycerin
0,5 %	NP-40
3 mg/ml	Heparin
0,5 mg/ml	tRNA
40 mM	KCl

Elutionspuffer, 2 M KCl

1x	Bindesalz (10x)
2 M	KCl
2 mM	DTT
0,2 %	Glycerin

3.5.4.4 RNA-Immunpräzipitation (RIP)

Alle verwendeten Puffer wurden mit DEPC-H₂O angesetzt.

10x Puffer A

100 mM Hepes-KOH, pH 7,9

15 mM MgCl₂

100 mM KCl

1x Lysepuffer

1x Puffer A

0,5 mM DTT

0,1 % NP-40

0,2 % VCR

100 U/ml RNasin

1x Proteinase- und Phosphataseinhibitor (immer frisch hinzugegeben)

NT2-Puffer

50 mM Tris, pH 7,4

150 mM NaCl

1 mM MgCl₂

0,05 % NP-40

3.5.5 Puffer für die Virusproduktion

2x HBS (HEPES-buffered saline)

281 mM NaCl

100 mM HEPES

1,5 mM NaH₂PO₄

pH 7,12

3.5.6 Medien und Medienzusätze für die Zellkultur

Tabelle 3.6: Verwendete Medien und Zusätze für Zellkulturexperimente

	Produkt	Hersteller
Lösungen	PBS (<i>Phosphate Buffered Saline</i>)	Sigma
	Trypsin/EDTA-Lösung (10x konzentriert)	Sigma
	Trypanblau-Lösung (0,4 % Trypanblau in PBS)	Serva

Medien	DMEM (<i>Dulbecco's modified Eagle Medium</i>) mit 1 g/l Glukose ohne L-Glutamin	Sigma
	DMEM mit 1 g/µl Glukose ohne L-Glutamin mit Phenolrot	
Medienzusätze	Fötale Kälberserum (<i>fetal calf serum, FCS</i>), hitzeinaktiviert	Sigma
	L-Glutamin (100x konzentriert, 200 mM)	Sigma
	Natrium-Pyruvat (100x konzentriert, 100 mM)	Sigma
	Penicillin/Streptomycin (100x konzentriert, 1000 Einheiten (U, <i>units</i>)) Penicillin, 10 mg Streptomycin/ml)	Sigma- Aldrich
	Puromycin (10 mg/ml)	InVivoGen

3.5.7 Bakterienmedien

Die Bakterienmedien wurden mit Millipore-H₂O angesetzt.

LB-Medium, pH 7,0

1 % Pepton Casein

1 % NaCl

0,5 % Hefextrakt

autoklaviert

LB-Amp-Medium

LB-Medium mit 100 µg/ml Ampicillin

LB-Amp-Agarplatten

LB-Amp-Medium mit 15 mg/ml Agar-Agar

3.6 Kits

Produkt	Hersteller
Arthrogen-CIA 5-clone cocktail Kit	Amsbio
Biotin Labeling Mix, 10x	Epicentre
High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit	Applied Biosystems
miRNeasy Mini Kit	Qiagen
Monarch® DNA Gel Extraction Kit	NEB
Monarch® Miniprep Kit	NEB
M-MuLV Reverse Transcriptase Kit	NEB
OneTaq® 2x Master Mix	NEB
PureLink™ Genomic DNA Mini Kit	Invitrogen

Material

PureLink™ HiPure Plasmid Midiprep Kit	Invitrogen
PrecisionPLUS Master Mix SYBRGreen	Primerdesign Ltd
Q5® High-Fidelity DNA Polymerase	NEB
REDTaq® ReadyMix™ PCR Reaction Mix	Sigma-Aldrich
RNeasy MinElute Cleanup-Kit	Qiagen
TaqMan® MicroRNA Assay mmu-miR-155	Applied Biosystems
TaqMan® MicroRNA Reverse Transcription Kit	Applied Biosystems
Pierce™ ECL Western Blotting Substrate	Thermo Scientific

3.7 Marker

Tabelle 3.7: Verwendete Größenmarker

Verwendung	Name	Hersteller
DNA-Marker	2-Log DNA Ladder (0,1-10 kb)	NEB
Protein-Marker	Precision Plus Protein Dual Color Standards (10-250 kDa)	BioRad

3.8 Antikörper

Tabelle 3.8: Verwendete Primärantikörper für Western Blot-Analysen

Primärer Antikörper	Klasse / Herkunft	Größe (kDa)	Verdünnung	Blockier- / Verdünnungspuffer	Hersteller
EGFP	Monoklonal / Maus	27	1:1000	5 % MP / 5 % MP	Roche
GAPDH	Monoklonal / Maus	37	1:1000	5 % MP / 5 % MP	SC Biotech
KSRP	Monoklonal / Maus	75	1:50	5 % MP / 5 % MP	AG Chen (University of Alabama at Birminham)
SP1	Monoklonal / Hase	90	1:1000	5 % MP / 5 % MP	Cell Signaling
RNA-Pol II	Polyklonal / Hase	240	1:1000	5 % BSA / 5 % BSA	Abcam
H3K4me3	Monoklonal / Hase	17	1:1000	5 % BSA / 5 % BSA	Merck

MP=Milchpulver

BSA=Bovines Serum Albumin

Tabelle 3.9: Verwendete Sekundärantikörper für Western Blot-Analysen

Sekundärer Antikörper	Verdünnung	Verdünnungspuffer	Hersteller
Anti-Maus, Peroxidase-gekoppelt	1:10000	5 % MP	Sigma-Aldrich
Anti-Hase, Peroxidase-gekoppelt	1:10000	5 % MP	Sigma-Aldrich

MP=Milchpulver

Tabelle 3.10: Verwendete Antikörper in Immunpräzipitationsanalysen (IP-Analysen)

Antikörper	Klasse / Herkunft	Menge pro IP	Hersteller
normal Hase IgG: sc-2027	Hase	5 µl	SC Biotech
KHSRP	Polyklonal / Hase	5 µl	Novus biologicals
SP1	Monoklonal / Hase	5 µl	Cell Signaling

3.9 Enzyme

Tabelle 3.11: Für Klonierungsexperimente verwendete Enzyme

Enzym	Hersteller
Alkalische Phosphatase	Roche
DNase I, RNase-frei, 10 U/µl	Roche
DNA-Taq-Polymerase	AG-Kleinert
Klenow-Fragment der DNA-Polymerase I von <i>E. coli</i>	NEB
Proteinase K	Roche
Restriktionsendonukleasen	NEB
RNAse A	Sigma
T3 und T7 RNA-Polymerase	Roche
T4 DNA-Ligase	NEB
T4-Polynukleotid-Kinase (T4-PNK)	NEB

3.10 Plasmide

Tabelle 3.12: Für Klonierungen verwendete Plasmide

Name	Beschreibung	Hersteller
KSRP BAC-Klon	<i>Bacterial Artificial Chromosome</i> von KSRP (RPCI-11)	RZPD (Deutsches Ressourcenzentrum für Genomforschung)
pRHCglo	Plasmid mit einer Sequenz des humanen β -Globin Gens (Exon 1-3 inklusive Introns)	AG Kleinert
pCRScript	Plasmid mit T3- und T7 Promotor	Addgene
pGl3basic	Plasmid mit einer Luciferasesequenz ohne Promotor	Promega
pcDNA4/TOLucKSRP3'UTR A	Plasmid mit der KSRP 3'-UTR 1 kb hinter einer Luciferasesequenz	AG Kleinert

Tabelle 3.13: Plasmide für Reporter-Gen-Analysen

Name	Beschreibung	Hersteller
1. pRLEF1 α (Renilla)	Plasmid zur Expression der Renilla-Luciferase unter der Kontrolle des pRLEF1 α -Promotors	AG Bros
2. pGI4luc	Plasmid mit einem Ampicillin-Resistenzgen und einem Luciferasegen	Promega
3. pGI4luc KSRPprom 3 kb	Plasmid mit einem Luciferasegen unter der Kontrolle einer 3 kb KSRP Promotorsequenz	AG Kleinert
4. pGI4luc KSRPprom 2 kb	Plasmid mit einem Luciferasegen unter der Kontrolle einer 2 kb KSRP Promotorsequenz	
5. pGI4luc KSRPprom 1 kb	Plasmid mit einem Luciferasegen unter der Kontrolle einer 1 kb KSRP Promotorsequenz	
6. pGI4luc KSRPprom 800 bp	Plasmid mit einem Luciferasegen unter der Kontrolle einer 800 bp KSRP Promotorsequenz	
7. pGI4luc KSRPprom 450 bp	Plasmid mit einem Luciferasegen unter der Kontrolle einer 450 bp KSRP Promotorsequenz	
8. pGI4luc KSRPprom 245 bp	Plasmid mit einem Luciferasegen unter der Kontrolle einer 245 bp KSRP Promotorsequenz	
9. pGI4luc KSRPprom 50 bp	Plasmid mit einem Luciferasegen unter der Kontrolle einer 50 bp KSRP Promotorsequenz; durch Quickchange-PCR (QC) auf 8. mit den Oligos QC_KSRPprom 50 bp_5P1/3P1	K. Schrick
10. pGI4luc KSRPprom 3 kb Del245	KSRP Promotorplasmid mit einer 245 bp langen Deletion am 3'-Ende; durch QC-PCR auf 3. mit den Oligos hKSRPprom_del245_up2/down2	
11. pGI4luc KSRPprom 2 kb Del245	KSRP Promotorplasmid mit einer 245 bp langen Deletion am 3'-Ende; durch QC-PCR auf 4. mit den Oligos hKSRPprom_del245_up2/down2	
12. pGI4luc KSRPprom 1 kb Del245	KSRP Promotorplasmid mit einer 245 bp langen Deletion am 3'-Ende; durch QC-PCR auf 5. mit den Oligos hKSRPprom_del245_up2/down2	
13. pGI4luc KSRPprom 800 bp Del245	KSRP Promotorplasmid mit einer 245 bp langen Deletion am 3'-Ende; durch QC-PCR auf 6. mit den Oligos hKSRPprom_del245_up2/down2	
14. pGI4luc KSRPprom 450 bp Del245	KSRP Promotorplasmid mit einer 245 bp langen Deletion am 3'-Ende; durch QC-PCR auf 7. mit den Oligos hKSRPprom_del245_up2/down2	
15. pGI4luc KSRPprom 3 kb delTSS	KSRP Promotorplasmid mit deletierter TSS; durch QC-PCR auf 3. mit den Oligos QC_KSRPprom_delTSS_5P1/3P1	

16. pGI4luc KSRPprom 450 bp delTSS	KSRP Promotorplasmid mit deletierter TSS; durch QC-PCR auf 7. mit den Oligos QC_KSRPprom_delTSS_5P1/3P1	K. Schrick
17. pGI4luc KSRPprom 245 bp delTSS	KSRP Promotorplasmid mit deletierter TSS; durch QC-PCR auf 8. mit den Oligos QC_KSRPprom_delTSS_5P1/3P1	
18. pGI4luc KSRPprom 3 kb del245 delTSS	KSRP Promotorplasmid mit einer 245 bp langen Deletion am 3'-Ende sowie der Deletion der TSS; durch QC-PCR auf 10. mit den Oligos QC_KSRPprom_del245_delTSS_5P1/3P1	
19. pGI4luc KSRPprom 450 bp del245 delTSS	KSRP Promotorplasmid mit einer 245 bp langen Deletion am 3'-Ende sowie der Deletion der TSS; durch QC-PCR auf 14. mit den Oligos QC_KSRPprom_del245_delTSS_5P1/3P1	
20. pGI4luc KSRP 5'-UTR	Plasmid mit einem Luciferasegen unter der Kontrolle der KSRP 5'-UTR	
21. pGI4luc KSRPprom 3 kb 5'-UTR	Plasmid mit einem Luciferasegen unter der Kontrolle des 3 kb KSRP Promotors und der KSRP 5'-UTR	
22. pGI4luc KSRPprom 245 bp 5'-UTR	Plasmid mit einem Luciferasegen unter der Kontrolle des 245 bp KSRP Promotors und der KSRP 5'-UTR	
23. pGI4luc KSRPprom 120 bp 5'-UTR	Plasmid mit einem Luciferasegen unter der Kontrolle des 120 bp KSRP Promotors und der KSRP5'-UTR	
24. pGI4luc KSRPprom 50 bp 5'-UTR	Plasmid mit einem Luciferasegen unter der Kontrolle des 50 bp KSRP Promotors und der KSRP 5'-UTR	
25. pGI4luc SV40prom Inglo	Plasmid mit einem Luciferasegen unter der Kontrolle des SV40 Promotors und einer Intronsequenz des humanen β -Globins hinter der Luciferase	
26. pGI4luc SV40prom KSRP 5'-UTR Inglo	Plasmid mit einem Luciferasegen unter der Kontrolle des SV40 Promotors und der KSRP 5'-UTR und einer Intronsequenz des humanen β -Globins hinter der Luciferase	
27. pGI4luc KSRPprom 3 kb 5'-UTR Del261	Plasmid mit einem Luciferasegen unter der Kontrolle des 3 kb KSRP Promotors und der am 5'-Ende deletierten KSRP 5'-UTR	

Material

28. pGI4luc KSRPprom 245 bp 5'-UTR Del1	Plasmid mit einem Luciferasegen unter der Kontrolle des 245 bp KSRP Promotors und der am 3'-Ende deletierten KSRP 5'-UTR 1	K. Schrick
29. pGI4luc KSRPprom 245 bp 5'-UTR Del2	Plasmid mit einem Luciferasegen unter der Kontrolle des 245 bp KSRP Promotors und der am 3'-Ende deletierten KSRP 5'-UTR 2	
30. pGI4luc Inglo	pGI4luc-Plasmid mit einer Intronsequenz des humanen β -Globins hinter der Luciferase	
31. pGI4luc KSRPprom 3 kb Inglo	Plasmid 3 mit einer Intronsequenz des humanen β -Globins hinter der Luciferase	
32. pGI4luc KSRPprom 245 bp Inglo	Plasmid 8 mit einer Intronsequenz des humanen β -Globins hinter der Luciferase	
33. pGI4luc KSRPprom 50 bp Inglo	Plasmid 9 mit einer Intronsequenz des humanen β -Globins hinter der Luciferase	
34. pGI4luc KSRP 5'-UTR Inglo	Plasmid 20 mit einer Intronsequenz des humanen β -Globins hinter der Luciferase	
35. pGI4luc KSRPprom 245 bp 5'-UTR Inglo	Plasmid 22 mit einer Intronsequenz des humanen β -Globins hinter der Luciferase	
36. pGI4luc KSRPprom 120 bp 5'-UTR Inglo	Plasmid 23 mit einer Intronsequenz des humanen β -Globins hinter der Luciferase	
37. pGI4luc KSRPprom 50 bp 5'-UTR Inglo	Plasmid 24 mit einer Intronsequenz des humanen β -Globins hinter der Luciferase	
38. pGI4luc KSRPprom 245 bp 5'-UTR Del1 Inglo	Plasmid 28 mit einer Intronsequenz des humanen β -Globins hinter der Luciferase	
39. pGI4luc KSRPprom 245 bp 5'-UTR Del2 Inglo	Plasmid 29 mit einer Intronsequenz des humanen β -Globins hinter der Luciferase	
40. pGI4luc KSRPprom 245 bp_Ex1_In1_Ex2	Plasmid mit einer Fusionssequenz bestehend aus KSRPprom 245 bp, KSRP Exon 1 inklusive 5'-UTR, KSRP Intron 1, einem Teil von Exon 2 sowie einem Luciferasegen	
41. pGI3control	Plasmid mit einem <i>Firefly</i> -Luciferasegen unter der Kontrolle eines SV40-Promotors	Promega
42. pGI3KSRP 3'-UTR 1 kb	Plasmid mit einem Luciferasegen unter der Kontrolle des SV40-Promotors und der KSRP 3'-UTR 1 kb	AG Kleinert
43. pGI3KSRP 3'-UTR 700 bp	Plasmid mit einem Luciferasegen unter der Kontrolle des SV40-Promotors und der KSRP 3'-UTR 700 bp	

44. pGI3KSRP 3'-UTR 600 bp	Plasmid mit einem Luciferasegen unter der Kontrolle des SV40-Promotors und der KSRP 3'-UTR 600 bp	K. Schrick
45. pGI3KSRP 3'-UTR 400 bp	Plasmid mit einem Luciferasegen unter der Kontrolle des SV40-Promotors und der KSRP 3'-UTR 400 bp	
46. pGI3KSRP 3'-UTR 200 bp	Plasmid mit einem Luciferasegen unter der Kontrolle des SV40-Promotors und der KSRP 3'-UTR 200 bp	
47. pGI3KSRP 3'-UTR 1 kb del200 bp	Plasmid mit einem Luciferasegen unter der Kontrolle des SV40-Promotors und der KSRP 3'-UTR 1 kb mit einer Deletion von 200 bp am 5'-Ende	S. Hamelmann
48. pGI3KSRPprom 245 bp 5'-UTR	Plasmid mit einem Luciferasegen unter der Kontrolle des 245 bp KSRP Promotors und der KSRP 5'-UTR	K. Schrick
49. Minigen 1 kb 3'-UTR	Plasmid mit einem Luciferasegen unter der Kontrolle des 245 bp KSRP Promotors inklusive der KSRP 5'-UTR sowie der 1 kb KSRP 3'-UTR	
50. Minigen 700 bp 3'-UTR	Plasmid mit einem Luciferasegen unter der Kontrolle des 245 bp KSRP Promotors inklusive der KSRP 5'-UTR sowie der 700 bp KSRP 3'-UTR	

Tabelle 3.14: Plasmide für die *in vitro* Transkription zur Herstellung Biotin-markierter RNA-Sonden

Plasmid	Beschreibung	Enzym zur Linearisierung	Verwendete Polymerase	Hersteller
pCR-TNF α 3UTR	pCRScript mit der humanen TNF- α 3'-UTR	BamHI	T7	AG Kleinert
pCR-TNF α 3UTRdelARE	pCRScript mit der humanen TNF- α 3'-UTR mit deletierten AREs	BamHI	T7	
pGI3T7Basic	pGI3-Luciferaseplasmid und T7 Promotor	XbaI	T7	
pCR-KSRP 3'-UTR 1 kb	pCRScript mit der humanen KSRP 3'-UTR 1 kb	EcoRI	T7	
pCR-KSRP 3'-UTR 700 bp	pCRScript mit der humanen KSRP 3'-UTR 700 bp	HindIII	T3	
pCR-KSRP 3'-UTR 600 bp	pCRScript mit der humanen KSRP 3'-UTR 600 bp	EcoRI	T7	S. Hamelmann

pCR-KSRP 3'-UTR 400 bp	pCRScript mit der humanen KSRP 3'-UTR 400 bp	HindIII	T3	S. Hamelmann
pCR-KSRP 3'-UTR 1 kb del200 bp	pCRScript mit der humanen KSRP 3'-UTR del200 bp	HindIII	T3	

Tabelle 3.15: Verwendete Plasmide für die Lentivirale Transduktion und die stabile Transfektion

Name	Beschreibung	Hersteller
pCMVΔ8.91	Verpackungsplasmid für die Virusproduktion	AG Bros
VSV-G	Plasmid exprimiert die Hüllproteine für die Virusproduktion	
pGIPZ-CO	Plasmid zur Herstellung von Kontrollzellen	AG Kleinert
pGIPZshRNAhmrKSRP	Plasmid enthält eine Sequenz, die eine siRNA gegen KSRP exprimiert zur Generierung von Zellen ohne KSRP	
pCDH-CMV-EF1-Cop-GFP	Expressionsvektor, der ein grünfluoreszierendes Protein aus dem Ruderfußkrebs <i>Pontellina plumata</i> (copGFP) exprimiert	
pCDHpuroEGFP-KSRP	Plasmid, welches das Fusionsprotein EGFP-KSRP exprimiert zur Herstellung von Zellen mit KSRP-Überexpression	
pCDHpuroEGFP-KSRP(T692A)	Plasmid, welches das Fusionsprotein EGFP-KSRP mit der Mutation T692A exprimiert zur Herstellung von Zellen mit KSRP-Überexpression	
pCDH-EF1-copGFP-siLuc	Plasmid, welches eine siRNA gegen eine Luciferase exprimiert	
pCDH-EF1-copGFP-siKSRP	Plasmid, welches eine siRNA gegen KSRP exprimiert	

Tabelle 3.16: Plasmide zur Generierung von Zellen ohne KSRP mit Hilfe der CRISPR/Cas9-Methode

Name	Beschreibung	Hersteller
CRISPR/Cas-LV (pSpCas9(BB)-2A-Pro)	Ausgangsplasmid für die Klonierung der Leitsequenz bzw. Kontrollplasmid für die stabile Transfektion	Addgene
CRISPR/Cas9	CRISPR-Plasmid, welches eine KSRP-spezifische Leitsequenz (identisch zu einem Abschnitt im kodierenden Bereich des KSRP Exon 1) enthält, zur Generierung von Zellen ohne KSRP	K. Schrick

3.11 Oligonukleotide

Alle verwendeten Oligonukleotide wurden von der Firma Sigma-Aldrich bezogen. Die jeweiligen Sequenzen sind den nachfolgenden Tabellen zu entnehmen. Die angegebenen Nummern in der Spalte **Verwendung** beziehen sich auf die in Tabelle 3.13 durchnummerierten Plasmide.

Tabelle 3.17: Sequenzen der für Klonierungen verwendeten Oligonukleotide

Name	Sequenz (5'-3')	Verwendung
KSRP CAS 6 BBS up	AAA CCT CAG CCA CCC GGC GGA GGC	Herstellung des CRISPR/Cas9-Plasmids
KSRP CAS 6 BBS down	CAC CGT GAG GAG GCC GAG GGC CTG	
QC_KSRPprom 50 bp_5P1	GCT AGC CTC GAG GAT TCT CTC CCC CCT C	Herstellung der Plasmide 9 und 24
QC_KSRPprom 50 bp_3P1	GAG GGG GGA GAG AAT CCT CGA GGC TAG C	
hKSRPprom_del245_up2	TGG GCC TCC TGC CTT CTC AGC AGA GTG CTC CGC GGC CATC	Herstellung der Plasmide 10-14
hKSRPprom_del245_down2	GAT GGC CGC GGA GCA CTC TGC TGA GAA GGC AGG AGG CCC A	
QC_KSRPprom_delTSS_5P1	CTC GTC GTC CTC CCA GCG GCT GGA TCC TCG AGG CTA GCG AGC TCA G	Herstellung der Plasmide 15-17
QC_KSRPprom_delTSS_3P1	CTG AGC TCG CTA GCC TCG AGG ATC CAG CCG CTG GGA GGA CGA CGA G	
QC_KSRPprom_del245_delTSS_5P1	CAT TGG GCC TCC TGC CTT CTC AGA TCC TCG AGG CTA GCG AGC TCA G	Herstellung der Plasmide 18 und 19
QC_KSRPprom_del245_delTSS_3P1	CTG AGC TCG CTA GCC TCG AGG ATC TGA GAA GGC AGG AGG CCC AAT G	
hKSRP 5'-UTR_5P1	CCA AGC TTA GAG TGC TCC GCG GCC GTG	Herstellung der Plasmide 20 und 22
hKSRPprom 5'-UTR_5P2	CCG GTC CAT AGG AGT C	
hKSRP 5'-UTR_3P1	GGC CAT GGC GCG GCG GGG CCG	
QC_KSRPprom 120 bp_5P1	TCG CTA GCC TCG AGG ATC CGG GGT GC	Herstellung des Plasmids 23
QC_KSRPprom 120 bp_3P1	GCA CCC CGG ATC CTC GAG GCT AGC GA	
QC_KSRPprom 3 kb 5UTR_Del270_5P4	TCA TTG GGC CTC CTG CCT TCT CAG CGT GTG GAG CGA GGC CTT GTT CCC	Herstellung des Plasmids 27
QC_KSRPprom 3 kb 5UTR_Del270_3P4	GGG AAC AAG GCC TCG CTC CAC ACG CTG AGA AGG CAG GAG GCC CAA TGA	
KSRP_5'-UTR_QCDeI_5P1	TCC ATG GCG CGG AGG CGG CGG C	Herstellung des Plasmids 28
KSRP_5'-UTR_QCDeI_3P1	GCC GCC GCC TCC GCG CCA TGG A	

KSRP_5'-UTR_QCDeI_5P2	CTT CCA TGG CGC GCA AGG CCT CGC TC	Herstellung des Plasmids 29
KSRP_5'-UTR_QCDeI_3P2	GAG CGA GGC CTT GCG CGC CAT GGA AG	
Inglo_5P1_EcoRV	CCG ATA TCG CCA TTT GAC CAT TCA CCA C	Herstellung der Plasmide 30-39
Inglo_3P1_NotI	CCG CGG CCG CCT CGA GCC ATG CCA ATC G	
QC_Prom_In_Adap_5P1	CAT TTC TCT GGC CTA ACT GGC CGG CCT CCT GCC TTC TCA GAT C	Herstellung des Plasmids 40
QC_Prom_In_Adap_3P1	GAC AGA AAT GGG ACT GGG TTG	
hKSRP_3UTR_5P1	CCT CTA GAT CGA ATG AAT GTG AAC TTC TTC ATC TG	Herstellung der Plasmide 44-46
hKSRP_3UTR_3P6 (592 bp)	CCT CTA GAC CAG GGC GGG AGG GAG AG	
hKSRP_3UTR_3P2 (421 bp)	CCT CTA GAG AAA ATG AAT TGC TTT ATC CTC AG	
hKSRP_3UTR_3P5 (208 bp)	CCT CTA GAG CAT GTG AGA CAC AGA ACA GG	
hKSRP_3UTR_5P2_del200 bp	CCT CTA GAC TCG CCT GTT CTG TGT CTC A	Herstellung des Plasmids 47
hKSRP_3UTR_3P5	CCT CTA GAG CAT GTG AGA CAC AGA ACA GG	

Für Pulldown-Analysen kamen Oligonukleotide zum Einsatz, die am 5'-Ende mit einem Biotin-Molekül markiert waren (Tabelle 3.18). Um Effekte durch sterische Hinderung zu vermeiden, wurde der Abstand zwischen den Basen und dem Biotin durch einen Triethylenglykol-Spacer (Biotin-TEG) erhöht.

Tabelle 3.18: Biotinylierte Oligonukleotide für Pulldown-Analysen

Name	Sequenz (5'-3')
GI3_Biotin_for	CTA GCA AAA TAG GCT GTC CC
GL4_Biotin_rev	GCT TCA TGG CTT TGT GCA G
Ctrl_TFbinding_kb_Biotin_for	GAG ACA GAG TAG AAA TGG GAC
Ctrl_TFbinding_3kb_Biotin_rev	CAA GGT GGT AGG TGT GAC TG
Ctrl_TFbinding_1,5kb_Biotin_for	GGA ACC TGG CTC AGA CAG AG
Ctrl_TFbinding_1,5kb_Biotin_rev	CTT TAG GCG GCT ATC TTC ATT G

TF=Transkriptionsfaktor

Die für quantitative Realtime-PCR-Messungen (qRT-PCR) eingesetzten Sonden sind am 5'-Ende mit 6-Carboxyfluorescein (FAM) als Reporterfluorophor und am 3'-Ende mit Carboxytetramethylrhodamin (TAMRA) als Quencher markiert.

Tabelle 3.19: Sequenzen der verwendeten Oligonukleotide und Sonden für qRT-PCR-Analysen

Name	Sequenz (5'-3')
RHCglo 5P	CAT TCA CCA CAT TGG TGT GC
SV40polyA prim 3P	CTA GTT GTG GTT TGT CCA AAC TC
RHCglo Sonde	AGC TCC GGA CTC GGG ATC CAT CTA C

Ren 5P	TTC GCA ACG GGT TTG CG
Ren 3P	TGT TTA CAT CTG GCC CAC CAC
Ren Sonde	AGC CAC CAT GAT CCA G
huPol2a 5P	GCA CCA CGT CCA ATG ACA T
huPol2a 3P	GTG CGG CTG CTT CCA TAA
huPol2a Sonde	TAC CAC GTC ATC TCC TTT GAT GGC TCC TAT
huGAPDH 5P	CCC ATG TTC GTC ATG GGT GT
huGAPDH 3P	TGG TCA TGA GTC CTT CCA CGA TA
huGAPDH Sonde	CTG CAC CAC CAA CTG CTT AGC ACC C
huIL-8 5P	GCC GTG GCT CTC TTG GC
huIL-8 3P	TAA CAC TCC TTG GCA AAA CTG C
huIL-8 Sonde	CTT CCT GAT TTC TGC AGC TCT GTG TGA AGG
huiNOS 5P	TGC AGA CAC GTG CGT TAC TCC
huiNOS 3P	GGT AGC CAG CAT AGC GGA TG
huiNOS Sonde	TGG CAA GCA CGA CTT CCG GGT G
huTNF- α 5P	CAA GCC TGT AGC CCA TGT TG
huTNF- α 3P	GGT TGA CCT TGG TCT GGT AGG
huTNF- α Sonde	CAA GGC TGC CCC TCC ACC CA
huKSRP 5P	TGC AGC AAG CCT GTG AGA TG
huKSRP 3P	CTG AGG CTC TGG AGG AGG TC
huKSRP Sonde	TGG ACA TCC TCC GGG AAC GTG ACC
<i>Firefly</i> -Luciferase 5P	AAA AAG TTG CGC GGA GGA G
<i>Firefly</i> -Luciferase 3P	TTT TTC TTG CGT CGA GTT TTC C
<i>Firefly</i> -Luciferase Sonde	TGT GTT TGT GGA CGA AGT ACC GAA AGG TCT TAC
muPol2a 5P	ACC ACG TCC AAT GAT ATT GTG GAG
muPol2a 3P	ATG TCA TAG TGT CAC ACA GGA GCG
muPol2a Sonde	CTG GGC ATT GAG GCT GTG CGG AA
muCXCL-1 5P	CTT GAA GGT GTT GCC CTC AG
muCXCL-1 3P	GTC AGA AGC CAG CGT TCA C
muCXCL-1 Sonde	AAG ACA GAC TGC TCT GA
muiNOS 5P	CAG CTG GGC TGT ACA AAC CTT
muiNOS 3P	CAT TGG AAG TGA AGC GTT TCG
muiNOS Sonde	CGG GCA GCC TGT GAG ACC TTT GA
muTNF- α 5P	CAT CTT CTC AAA ATT CGA GTG ACA
muTNF- α 3P	TGG GAG TAG ACA AGG TAC AAC CC
muTNF- α Sonde	CAC GTC GTA GCA AAC CAC CAA GTG G
muS100A8 5P	CTC CGT CTT CAA GAC ATC GTT TG
muS100A8 3P	TCA TTC TTG TAG AGG GCA TGG TG
muS100A8 Sonde	CAA TGC CGT CTG AAC TGG AGA AGG CC

Material

muMCP-1 5P muMCP-1 3P	AGG TCC CTG TCA TGC TTC TG TCA TTG GGA TCA TCT TGCT G
muMIP-1α 5P muMIP-1α 3P	CTG CAA CCA AGT CTT CTC AGC CTG CCT CCA AGA CTC TCA GG
muCD68 5P muCD68 3P muCD68 Sonde	GGC AGC ACA GTG GAC ATT C CAA TGA TGA GAG GCA GCA AG TCA GCT GCC TGA CAA GGG ACA CTT C
muLy6G 5P muLy6G 3P	TTG CAA AGT CCT GTG TGC TC AGA GCA ACG CAA AAT CCA TC
muITGAL 5P muITGAL 3P	CCC TCC TAA GCG CAG ATG AG TGA TCG CAT GTC CGA GAC AG
muITGAM 5P muITGAM 3P	AAG CTC TTC TGG TCA CAG CC GTC ACA CTG GTA GAG GGC AC
muITGB2 5P muITGB2 3P	TGT CTG ACG ACT CCA GCA AC TAT CCG TGA AAC CCA GTG CC
muICAM 5P muICAM 3P	GAC TCC ATG GCC CTC ACT TG CGC GTT TAG TGG GCT GTC TAT C
muVCAM 5P muVCAM 3P	ACC CCG CAG GTC CAA TTC CCA GAG CGG CAG AGC AAA
muFcRN 5P muFcRN 3P	TCT GTG GAT GAA GCA GCC TG AGG AGA AAG CAG CAC AGG TC
muC1-Inh 5P muC1-Inh 3P	GTT CTT CTT GGG GCT GGA G GAG ATG CAT TCA CAT AGG TGT CC
muCfh 5P muCfh 3P	TCT TTC CCT GCT GTG ACC AC TCC AAC TGC CAG CCT AAA GG
muKSRP 5P muKSRP 3P muKSRP Sonde	CCT GGG ATC CGC AAG GAC TCA GGA GTG TTG TTA TTC ACG GTG CTT CGC CGA CGC CGT GCA G

hu=human, mu=murin

Tabelle 3.20: Oligonukleotide für die KSRP-Typisierung

Name	Sequenz (5'-3')
muKSRP Typ P11 (wt-for)	CTCCGCCTCCTCAGCTTG
muKSRP Typ P7 (ko-for)	GAGGCCCTGGTTGAAGG
muKSRP Typ P9 (wt/ko-rev)	GCGGGGAGAATGTGAAGG

3.12 Bakterien

Für Klonierungen wurden DH5 α und TOP 10 (beide *E. coli*) der Firma BioLabs verwendet.

3.13 Zelllinien

Alle Zelllinien wurden, wenn nicht anders angegeben, in DMEM-Medium mit 10 % FCS, 1 % Penicillin/Streptomycin und 1 % Na-Pyruvat kultiviert.

Tabelle 3.21: Verwendete Zelllinien

Zelllinie	Beschreibung	Resistenz	Hersteller
DLD-1	humane Kolon-Adenokarzinomzellen		ATCC (CCL-221)
DLD-1-pGIPZ-CO	DLD-1, lentiviral mit dem Plasmid pGIPZ-CO transfiziert	2 μ g/ml Puromycin	K.Schrick
DLD-1-pGIPZshRNAhmrKSRP	DLD-1, lentiviral mit dem Plasmid pGIPZshRNAhmrKSRP transfiziert	2 μ g/ml Puromycin	
DLD-1-pCDH-CMV-EF1-Cop-GFP	DLD-1, lentiviral mit dem Plasmid pCDH-CMV-EF1-Cop-GFP transfiziert		
DLD-1-puro-EGFP-KSRP	DLD-1, lentiviral mit dem Plasmid pCDHpuroEGFP-KSRP transfiziert	2 μ g/ml Puromycin	
DLD-1-puro-EGFP-KSRP(T692A)	DLD-1, lentiviral mit dem Plasmid pCDHpuroEGFP-KSRP(T692A) transfiziert	2 μ g/ml Puromycin	
DLD-1-pCDH-EF1-copGFP-siLuc	DLD-1, stabil mit dem Plasmid pCDH-EF1-copGFP-siLuc transfiziert	2 μ g/ml Puromycin	
DLD-1-pCDH-EF1-copGFP-siKSRP	DLD-1, stabil mit dem Plasmid pCDH-EF1-copGFP-siKSRP transfiziert	2 μ g/ml Puromycin	
DLD-1-CRISPR/Cas-LV	DLD-1, stabil mit dem Plasmid transfiziert, CRISPR-Kontrollzellen	2 μ g/ml Puromycin	K.Schrick
DLD-1-CRISPR/Cas9	DLD-1, stabil mit dem Plasmid transfiziert, KSRP- <i>Knockout</i> durch CRISPR/Cas9	2 μ g/ml Puromycin	
HEK-293	humane embryonale Nierenzellen		ATCC (CRL-2278)

3.14 Zytokine und Substanzen zur Behandlung von Zellen

Name	Konzentration der Stammlösung	Hersteller
humanes rekombinantes TNF- α	50 μ g/ml	Miltenyi Biotec
humanes rekombinantes IFN- γ	100 μ g/ml	Miltenyi Biotec
humanes rekombinantes IL-1 β	10 μ g/ml	Miltenyi Biotec
murines rekombinantes IFN- γ	100 μ g/ml	Miltenyi Biotec
Cycloheximid (CHX)	10 mg/ml in H ₂ O	Sigma-Aldrich
Resveratrol	30 mM in DMSO	Sigma-Aldrich

3.15 Versuchstiere

Es wurden KSRP^{+/-}-Mäuse verwendet, die einen C57BL/6-Hintergrund hatten (Lin, Zheng et al. 2011). Die für die Tierexperimente benötigten Wildtyp- (KSRP-wt; KSRP^{+/+}) und *Knockout*-Mäuse (KSRP-ko; KSRP^{-/-}) wurden durch die Verpaarung von heterozygoten Tieren gewonnen, da die Nachkommen von KSRP^{+/+}- bzw. KSRP^{-/-}-Mäusen infertil sind. Bei den KSRP-defizienten Mäusen fehlen die Exons 1-13 des KSRP Gens. Die Deletion wurde durch Rekombination mit Hilfe des *Cre-Lox*-Systems generiert (Lin, Zheng et al. 2011). Für die Experimente wurden Pfoten, Leber, Milz und Lymphknoten entnommen.

4 Methoden

4.1 Zellbiologische Arbeitsmethoden

Sämtliche Zellkulturarbeiten mit lebenden Zellen wurden unter einer sterilen Werkbank durchgeführt. Um Kontaminationen zu vermeiden, wurde diese vor und nach jeder Arbeit mit Ethanol gereinigt. Verwendete Materialien wie Pipetten oder Zellkulturflaschen sowie eingesetzte Substanzen wurden steril verpackt erworben und eingesetzte Lösungen wurden vor der Benutzung sterilfiltriert oder autoklaviert. Vor der Verwendung wurden alle Kulturmedien auf Raumtemperatur (bzw. 37 °C) gebracht, um somit den Stress für die Zellen möglichst gering zu halten.

4.1.1 Kultivierung eukaryotischer Zellen

Die Kultivierung der für die Experimente benötigten Zellen erfolgte in Zellkulturflaschen mit Filter-Schraubverschluss bei 37 °C, 5 % CO₂-Begasung und 100 % Luftfeuchtigkeit in Brutschränken. Je nach Zelllinie wurden die Nährmedien mit Antibiotika zur Selektion versetzt. Eine Übersicht über die einzelnen Zelllinien sowie Informationen bezüglich der Medienzusammensetzung sind der Tabelle 3.21 zu entnehmen.

Alle drei bis vier Tage wurden die Zellen passagiert um zu vermeiden, dass sich aufgrund von Kontakthemmung die weitere Zellteilung einstellt. Dabei wurden die Zellen vor jedem Passagieren auf Konfluenz und Stresssymptome hin untersucht. Bei adhärenenten Zellen wurde zunächst das Kulturmedium abgenommen und durch 4 ml Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS, *phosphate buffered saline*) ersetzt. Anschließend wurden die Zellen durch die Inkubation mit einem Gemisch aus EDTA (Ethylendiamintetraacetat) und Trypsin (5-fach Verdünnung in PBS; Kapitel 3.5.6) für 10 min vom Boden der Zellkulturflasche abgelöst. Dieser enzymatische Verdau, der die extrazellulären Proteine abbaut und dadurch den Zellverband auflöst, wird durch die Zugabe von 4 ml Kulturmedium abgestoppt. Bei HEK-Zellen ist die Trypsin-Behandlung nicht notwendig, da die Zellen nur leicht am Boden anhaften und sich bereits durch einfaches Spülen mit dem Medium ablösen lassen. Zur Aufrechterhaltung der Stammkultur wurde je nach Konfluenz der Zellen ein Teil der Suspension in der Kulturflasche belassen und mit frischem Medium auf ein Gesamtvolumen von 20 ml aufgefüllt, so dass die Zellen meist 1:10 bzw. 1:20 verdünnt vorlagen. Die restlichen Zellen wurden entweder für folgende Versuche gezählt und ausgesät, eingefroren oder verworfen.

4.1.2 Kryokonservierung und Rekultivierung eukaryotischer Zellen

Für den langfristigen Erhalt der verschiedenen Zelllinien wurden diese in flüssigem N₂ (-196 °C) eingefroren und gelagert. Hierfür wurde die jeweilige Zellsuspension (bei adhärennten Zellen nach der Behandlung mit Trypsin/EDTA) bei 1200 x g abzentrifugiert und der Überstand abgenommen. Das Pellet wurde in FCS mit 10 % DMSO (Dimethylsulfoxid) resuspendiert und die Suspension in entsprechend beschrifteten 1,5 ml Kryokonservierungsröhrchen aliquotiert. Um die Zellen kontrolliert herunterzukühlen, wurden die Kryo-Röhrchen zunächst für 24 Stunden in einer mit Isopropanol gefüllten Box bei -80 °C gelagert. Durch DMSO und das langsame Abkühlen (-1 °C pro min) wird die Bildung von Eiskristallen verhindert, welche für die Zellen schädlich sind. Nach 24 Stunden wurden die Röhrchen für die dauerhafte Lagerung schließlich in flüssigen Stickstoff überführt.

Zur Rekultivierung wurden die eingefrorenen Zellen zügig bei 37 °C aufgetaut, in eine Zellkulturflasche überführt und mit 20 ml Medium versetzt. Nach 24 Stunden erfolgte ein Mediumswechsel, um die Zellen von den DMSO-Rückständen zu befreien. Je nach Zelllinie und Stresszustand der Zellen wurde bei diesem Schritt zusätzlich das entsprechende Antibiotikum zur Selektion zugegeben.

4.1.3 Bestimmung der Lebendzellzahl und Aussaat der Zellen

Zur besseren Reproduzierbarkeit der Zellkulturexperimente ist es wichtig für jedes Experiment einer Versuchsreihe die gleiche Anzahl an Zellen auszusäen. Dabei ist die jeweilige Anzahl der ausgesäten Zellen abhängig von der Größe der Schale bzw. der Lochplatte und der durchschnittlichen Teilungszeit einer Zelllinie. Um die Lebendzellzahl zu bestimmen, wurden 50 µl der Zellsuspension mit 100 µl einer 0,4 %igen Trypanblau-Lösung verdünnt (Tabelle 3.6). Bei Trypanblau handelt es sich um einen Farbstoff, der die Zellmembranen intakter Zellen nicht passieren kann, weshalb diese unter einem Lichtmikroskop hell erscheinen, während tote Zellen blau gefärbt sind. Das Zählen der Zellen erfolgte mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer, die aus 3x3 Großquadraten mit jeweils einer Fläche von 1 mm² besteht. Durch Auflegen eines Deckglases unter der Bildung Newtonscher Ringe entstand ein definierter Raum mit einer Tiefe von 0,1 mm und somit einem Volumen von 0,1 mm³ je Quadrat, wodurch die Zelldichte möglichst präzise bestimmt werden konnte. Es wurden die lebenden Zellen dreier Großquadranten gezählt und der Mittelwert gebildet. Durch Multiplikation des Mittelwertes mit dem Kammerfaktor 10⁴ und dem Verdünnungsfaktor konnte somit die Lebendzellzahl pro Milliliter Zellsuspension bestimmt werden.

Je nach Experiment wurde die gewünschte Anzahl an Zellen in 6-Lochplatten (2 ml Zellsuspension/Loch), 12-Lochplatten (1 ml Zellsuspension/Loch) oder in 24-Lochplatten (500 µl Zellsuspension/Loch) ausgesät.

4.1.4 Stimulation und Behandlung von eukaryotischen Zellen

Um die Expression pro-inflammatorischer Gene untersuchen zu können, musste diese zunächst durch einen Mix aus Zytokinen induziert werden. Hierfür wurde das Kulturmedium adhärenter Zellen 16 Stunden vor der Stimulation bzw. Behandlung durch FCS-freies Medium (DMEM mit 1 g/l Glukose ohne L-Glutamin, versetzt mit 1 % Penicillin/Streptomycin und 1 % L-Glutamin) ersetzt, um die Zellen für die Stimulation in der G0-Phase des Zellzyklus zu halten. Humane Zellen wie DLD-1 wurden für die Induktion der Zytokinexpression mit einem Mix aus 37,5 ng/ml TNF- α , 30 ng/ml IFN- γ (human) und 3 ng/ml IL-1 β behandelt, während murine Zellen (Peritonealzellen) mit 1 µg/ml LPS und 30 ng/µl IFN- γ (murin) inkubiert wurden. Die Dauer der Stimulation war jeweils abhängig von den Genen, deren Expression untersucht werden sollte und ist für die einzelnen Experimente angegeben. Je nach weiterführenden Analysen wurde das Medium abgenommen und die Stimulation mit 1xPLB (für Luciferase-Assays, Tabelle 3.5), GIT (für mRNA-Analysen, Kapitel 3.5.1) oder RIPA (für Proteinanalysen, Kapitel 3.5.4.2) gestoppt und bei -20 °C aufbewahrt. Die in RIPA aufgenommenen Zellen wurden zunächst durch Sonifikation aufgebrochen (8 Zyklen: jeweils 30 Sekunden (sek) Ultraschall und 30 sek Pause), die Zellreste bei 900 x g herunter zentrifugiert und der Proteinüberstand bei -20 °C bis zur weiteren Verwendung eingefroren.

Zur Untersuchung der Proteinstabilität wurden die Zellen für vier Stunden stimuliert und anschließend für 0, 3, 6, 12, 18, 24, 48 und 72 Stunden mit 50 µg/ml Cycloheximid (CHX) behandelt. Bei CHX handelt es sich um ein Antibiotikum, welches in Eukaryoten während der Elongationsphase der Translation die Translokation des Ribosoms hemmt, so dass kein neues Protein mehr gebildet werden kann (Obrig, Culp et al. 1971). Auf diese Weise kann die Stabilität von vorhandenen Proteinen mittels Western Blot (4.3.5 und 4.3.6) analysiert werden.

Zellen, die mit Resveratrol behandelt wurden, wurden ebenfalls 16 Stunden vor der Behandlung mit FCS-freiem Medium versetzt und anschließend für eine Stunde mit 30 µM Resveratrol bzw. dem Lösungsmittel DMSO vorinkubiert. Erst danach wurde die Zytokinexpression für 2 bzw. 6 Stunden induziert. Für Experimente mit 5,6-Dichlorobenzimidazole 1- β -D-ribofuranoside (DRB, Kapitel 4.1.5) zur Analyse der mRNA-Stabilität erfolgte die 30-minütige Resveratrol-Behandlung für 2 bzw. 4 Stunden nach der Stimulation mit den Zytokinen.

4.1.5 Analyse der mRNA-Stabilität mit Hilfe von 5,6-Dichlorobenzimidazole 1- β -D-ribofuranoside

DRB ist ein Adenosin Analog, welches die Elongation der RNA-Polymerase II-vermittelten Transkription hemmt (Sehgal, Darnell et al. 1976). Durch die Behandlung der Zellen mit DRB kann somit keine neue mRNA mehr gebildet werden, was ausschließlich die Messung von schon vorhandener mRNA ermöglicht. Analysen der mRNA-Menge nach unterschiedlich langer DRB-Inkubation lassen somit Rückschlüsse auf die Halbwertszeiten verschiedener mRNAs zu.

Für die Stabilitätsmessungen wurden DLD-1-Zellen in 24-Lochplatten ausgesät und wie in Kapitel 4.1.4 beschrieben stimuliert und behandelt. Schließlich erfolgte die Zugabe von DRB in einer Endkonzentration von 25 $\mu\text{g/ml}$ bevor die Reaktion nach 0, 10, 20, 30, 45 und 60 min (für IL-8 und TNF- α) bzw. nach 0, 2, 4 und 6 Stunden (für iNOS) in GIT-Puffer (3.5.1) abgestoppt wurde. Für die weiteren Analysen wurde RNA aus den Zellen isoliert (4.2.2), diese in komplementäre DNA (cDNA, *complementary DNA*) umgeschrieben (4.2.4) und die mRNA-Expression verschiedener pro-inflammatorischer Gene mittels qRT-PCR (4.2.7) analysiert.

4.1.6 Transfektion von Zellen

Die Transfektion beschreibt das Einbringen von Fremd-DNA in eine Zelle, so dass genetisch modifizierte Zellen entstehen. Dabei wird zwischen der zeitweiligen (transient) und der langfristigen (stabil) Aufnahme von DNA unterschieden (Recillas-Targa 2006).

4.1.6.1 Transiente Transfektion

Mit Hilfe der transienten Transfektion ist es möglich kurzzeitig Fremd-DNA in Form von Plasmiden in Zellen einzubringen und auf diese Weise die Regulation spezifischer Genexpressionen unter verschiedenen Bedingungen auf RNA- oder Proteinebene zu analysieren. Hierfür wurden Reporterplasmide verwendet, die ein Luciferasegen tragen, dessen Expression von verschiedenen zu untersuchenden regulatorischen Elementen, wie z.B. Promotor- oder 3'-UTR-Fragmenten, kontrolliert wurde.

Für die transiente Transfektion wurden die Zellen in 24-Lochplatten ausgesät (6×10^4 Zellen pro Loch) und über Nacht bei 37 °C und 5 % CO₂-Begasung inkubiert. Die Transfektion erfolgte mit dem Transfektionsreagenz Genejuice, das im Verhältnis 3:1 zur DNA eingesetzt wurde. Die transfizierten Plasmide, welche die zu analysierenden Promotor- und 5'-UTR-

Sequenzen enthielten, exprimierten die Luciferase des Leuchtkäfers (*Firefly*-Luciferase). Zusätzlich dazu wurde ein pRLEF1 α -Plasmid kotransfiziert, welches für eine Luciferase der Seefeder (Renilla) kodierte, deren Expression durch den Promotor des Translationelongationsfaktor 1 α (EF1 α) reguliert wurde. Dies diente der Kontrolle der Transfektionseffizienz sowie der späteren Normierung. Der Transfektionsansatz ist der Tabelle 4.1 zu entnehmen. Dabei wurde zunächst das Medium ohne FCS mit Genejuice für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert, bevor die DNA zugegeben wurde. Zur Ausbildung der lipophilen Komplexe, die das Eindringen der DNA in die Zelle erleichtern, erfolgte eine weitere Inkubation für 25 min unter der Sterilbank. In der Zwischenzeit wurden die Zellen mit frischem Medium (mit FCS) und schließlich mit 25 μ l Transfektionsansatz versetzt, der langsam zugetropft wurde. Nach der Transfektion wurden die Zellen für weitere 24 Stunden im Inkubator kultiviert. Die Reaktion wurde dann mit 200 μ l 1x PLB (*Passive Lysis Buffer*) abgestoppt und die Platten für mindestens 24 Stunden bei -20 °C gelagert oder für eine Stunde bei -80 °C, bevor die Zellen im Luciferase Reportergen-Assay analysiert werden konnten (Kapitel 4.3.7).

Tabelle 4.1: Reaktionsansatz der transienten Transfektion

	Einfacher Transfektionsansatz
Renilla-Plasmid (pRLEF1 α)	0,1 μ g
Plasmid	0,3 μ g
Genejuice	1,2 μ l
mit FCS-freiem Medium auf	25 μ l Gesamtvolumen

4.1.6.2 Stabile Transfektion

Im Gegensatz zur transienten Transfektion wird bei der stabilen Transfektion längerfristig DNA in Zellen gebracht, wobei die DNA-Sequenz zufällig stabil ins Genom der Zielzelle integriert wird. Hierfür wurden DLD-1-Zellen in 6-Lochplatten ausgesät (2×10^5 Zellen pro Loch) und für 24 Stunden bei 37 °C und 5 % CO₂-Begasung inkubiert. Die Transfektion erfolgte mit dem Transfektionsreagenz Polyethylenimin (PEI), einem kationischen Polymer, das mit der DNA Komplexe bildet, die sich an die Zellmembran anlagern und darüber schließlich eingeschleust werden (Boussif, Lezoualc'h et al. 1995). Der Reaktionsansatz (Tabelle 4.2) wurde gründlich gemischt und für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert, währenddessen die Zellen mit 2 ml frischem Medium versetzt wurden. Pro Loch wurden schließlich 120 μ l des Reaktionsansatzes auf die Zellen getropft und diese erneut über Nacht bei 37 °C inkubiert. Am folgenden Tag erhielten die Zellen nochmals frisches Medium, bevor sie nach weiteren 24 Stunden mit 200 μ l 5x Trypsin/EDTA abgelöst und auf 10 cm-Schalen überführt wurden. Da die transfizierten Plasmide ein Gen enthielten, welches für eine Puromycin-Resistenz kodiert, wurde das

Kulturmedium mit 2 µg/ml Puromycin versetzt, sobald die Zellen gut angewachsen waren. Auf diese Weise konnten positiv transfizierte Zellen selektioniert werden. Der Erfolg der stabilen Transfektion wurde mittels Western Blot-Analysen überprüft (4.3.6).

Tabelle 4.2: Reaktionsansatz der stabilen Transfektion

	Einfacher Transfektionsansatz
FCS-freies Medium	120 µl
Polyethylenimin (0,1 M)	35 µl einer 1:20 Verdünnung
Plasmid	3 µg

4.1.7 Herstellung von Zellen ohne KSRP und KSRP-Überexpression

Um die Rolle von KSRP einerseits im Hinblick auf die eigene Promotoraktivität zu untersuchen und andererseits auf die mRNA-Stabilität von pro-inflammatorischen Genen, wurden im Rahmen dieser Arbeit stabile Zellen ohne KSRP bzw. mit KSRP-Überexpression generiert. Hierfür wurden zwei verschiedene Methoden angewendet; die Lentivirale Transduktion und die CRISPR/Cas-Methode (*Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*).

4.1.7.1 Lentivirale Transduktion

Die Transduktion beschreibt das Einbringen von DNA in Zellen mit Hilfe von Lentiviren. Die hier verwendeten Viren gehören der Familie der Retroviren an. Diese zeichnen sich dadurch aus, dass sie ihr RNA-Genom mit Hilfe einer eigenen reversen Transkriptase in DNA umschreiben und in das Wirtsgenom einbauen können. Bei der lentiviralen Transduktion wird diese Eigenschaft genutzt, um DNA in Zellen einzubringen, die dabei zufällig ins Genom der Wirtszelle integriert wird. Häufig werden Plasmide verwendet, die eine spezifische siRNA (*small interfering RNA*) oder ein EGFP-Fusionsprotein exprimieren, so dass die Expression bestimmter Gene gezielt stabil verändert werden kann. Bei der Lentiviralen Transduktion kommen Viren zum Einsatz, die so verändert sind, dass sie nicht replikationsfähig sind. Für die Virusproduktion müssen deshalb lentivirale Vektoren in Virus-produzierende Zellen transfiziert werden. Diese Vektoren tragen Gene, die für einzelne Viruspartikel wie z.B. Hüllproteine kodieren. Auf diese Weise können die Wirtszellen alle Bestandteile exprimieren, die für die Virusproduktion benötigt werden. Die entstehenden Viren tragen die genomische RNA, inklusive der einzubringenden Sequenz und können schließlich für die Transduktion von DLD-1-Zellen verwendet werden (Naldini, Blömer et al. 1996).

Zur Generierung von Zellen mit verminderter KSRP-Expression erfolgte die lentivirale Transduktion mit dem Plasmid pGIPZshRNA_{hmrKSRP}, das eine siRNA gegen KSRP

exprimiert und somit die Bildung des KSRP-Proteins verhindert. Als Kontrolle diente das Plasmid pGIPZ-CO. Um Zellen mit einer vermehrten Expression von KSRP zu erhalten, wurde das Plasmid pCDHpuroEGFP-KSRP transfiziert, so dass die später transduzierten DLD-1-Zellen neben der endogenen KSRP-Expression zusätzlich das Fusionsprotein EGFP-KSRP exprimieren (EGFP-KSRP). Das Plasmid pCDH-CMV-MCS-EF1-Cop-GFP wurde zur Herstellung der Kontrollzellen verwendet. Alle benötigten Plasmide sind der Tabelle 3.15 zu entnehmen.

Für die Virusproduktion wurden HEK-Zellen (*human embryonic kidney cells*) verwendet. Diese eignen sich dafür, weil sie zum einen selbst Adenovirus-Proteine exprimieren und zum anderen in der Lage sind DNA von Plasmiden zu replizieren (Graham, Smiley et al. 1977).

Die HEK-Zellen wurden 24 Stunden vor der Transfektion in 10 cm-Kulturschalen ausgesät ($3,5 \times 10^6$ Zellen in 10 ml DMEM-Medium pro Schale) und 2 Stunden vor der Transfektion mit frischem Medium versetzt. Um zu verhindern, dass sich die Zellen vom Boden der Schale ablösen, wurde das neue Medium vorsichtig über die Zellen gegeben. Für die Transfektion wurden zunächst Kalzium-Phosphat-Präzipitate (Tabelle 4.3) hergestellt und für 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Während dieser Inkubationszeit bilden sich Komplexe aus, die der DNA eine positive Ladung geben und dadurch das Eindringen in die Zelle über die negativ geladene Zellmembran erleichtern. In der Zwischenzeit wurde dem Medium der HEK-Zellen 10 μ l Chloroquinphosphat (100 mM in 1x PBS) in einer Endkonzentration von 100 μ M zugegeben, um die Transfektionseffizienz zu erhöhen. Schließlich erfolgte die eigentliche Transfektion durch langsame Zugabe von jeweils 1 ml der Kalzium-Phosphat-Präzipitate zu den Zellen. Nach einer Inkubationszeit von 14-16 Stunden bei 37 °C wurde das alte Medium durch 5 ml frisches Medium ersetzt und nach weiteren 24 bzw. 48 Stunden, in denen die Virusproduktion erfolgte, konnte der virushaltige Überstand geerntet werden. Dieser wurde hierzu bei 1200 x g für 10 min zentrifugiert und anschließend mit sterilen Filteraufsätzen (0,45 μ m) filtriert, um alle Zellen und Zellreste zu entfernen. Der Virusüberstand wurde bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C aufbewahrt oder direkt für die Transduktion von Zielzellen weiterverwendet.

Tabelle 4.3: Herstellung der Kalzium-Phosphat-Präzipitate

	Einfacher Ansatz
Plasmid-DNA	13,2 μ g
pCMV Δ 8.91 (Verpackungsplasmid)	10 μ g
VSV-G (Hüllproteine)	4 μ g
mit 2:1 TE:H ₂ O auf	500 μ l Gesamtvolumen
50 μ l CaCl ₂ (2,5 M) unter ständigem Mischen zutropfen	
500 μ l 2x HBS (3.5.5) unter ständigem Mischen zutropfen	

Zur Transduktion der DLD-1-Zellen wurden 2×10^5 Zellen pro Loch in einer 6-Lochplatte ausgesät. Am Tag der Transduktion wurde das Medium durch 500 μ l frisches Medium ersetzt und mit jeweils 2 ml virushaltigem Medium versehen. Durch Zugabe von 4 μ g/ml Protaminsulfat, einem Polykation, wurde die Bindung zwischen Virus und Zielzelle erhöht und somit die Transduktionseffizienz gesteigert. Nach 5 stündiger Inkubation der Zellen bei 37 °C wurde zunächst 1 ml Medium durch frisches Medium ersetzt, während nach weiteren 24 Stunden das Medium komplett erneuert wurde. Zwei Tage nach der Transduktion wurden die Zellen mit 2x Trypsin/EDTA (Tabelle 3.6) abgelöst, zweimal mit 1x PBS gewaschen (Zentrifugation bei 1200 x g für 5 min), in frischem Medium aufgenommen und in eine Zellkulturflasche überführt. Die eingesetzten Plasmide exprimieren zusätzlich ein Gen, das für eine Puromycin-Resistenz kodiert, so dass die Zellen nach drei Tagen mit dem entsprechenden Selektionsmedium versehen wurden.

4.1.7.2 Gen-Knockout durch CRISPR/Cas9

Die CRISPR/Cas-Methode ermöglicht es das Genom gezielt zu verändern, wobei Gene sowohl eingefügt als auch deletiert oder ausgeschaltet werden können. In dieser Arbeit wurde die Methode verwendet um KSRP in DLD-1-Zellen auszuschalten. Das System ist ursprünglich als adaptives Immunsystem aus Bakterien bekannt, wo es als Abwehrmechanismus gegen Viren dient (Labrie, Samson et al. 2010). Der CRISPR-Lokus besteht aus repetitiven palindromischen Sequenzen, die durch nicht repetitive Abschnitte getrennt sind. Diese Abschnitte stellen homologe Sequenzen zur Ziel-DNA dar und dienen somit als Leitsequenz zur viralen DNA, die schließlich durch Endonukleasen abgebaut wird. Um diesen Mechanismus zum Editieren von Genen zu verwenden, wird lediglich ein Plasmid benötigt, welches für die Endonuklease Cas 9 (CRISPR-assoziiert) kodiert und eine Sequenz enthält, die identisch zur Ziel-Sequenz ist (Leit-RNA), sowie eine *tracrRNA* (*trans activating crRNA*). Die *tracrRNA* führt zur Ausbildung einer Haarnadel-Struktur, die für die Bindung an die DNA bzw. die spätere Restriktion notwendig ist. Um die Spezifität der Methode zu erhöhen wurde die Leitsequenz so gewählt, dass auf die identische Ziel-DNA eine NGG-Sequenz folgt, das sogenannte PAM-Motiv (*protospacer adjacent motif*). Nach der Transfektion des Plasmids bindet die Leitsequenz an die Ziel-DNA, woraufhin die Endonuklease Cas9 in diesem Bereich willkürlich einen Doppelstrangbruch erzeugt, was oftmals zu Fehlern während der Reparatur und somit zu Deletionen bzw. Leserasterverschiebungen führt (Richter, Chang et al. 2012). Der Ablauf der Methode ist in Abbildung 4.1 schematisch dargestellt.

Zur Herstellung der Zellen ohne KSRP mit Hilfe der CRISPR/Cas9-Methode wurde ein Plasmid von Addgene (pSpCas9(BB)-2A-Pro) verwendet, in das eine Leitsequenz über BbsI-

Schnittstellen hineinkloniert wurde (Tabelle 3.16). Die Leitsequenz wurde mittels Anlagerung zweier Oligos (4.2.8.1) generiert. Dabei wurden die Oligonukleotide so gewählt, dass die gebildete doppelsträngige DNA zum einen identisch zu einem Abschnitt im kodierenden Bereich von Exon 1 des KSRP Gens ist und zum anderen ein 5'-Überhang entsteht, der komplementär zu den BbsI-spezifischen Überhängen des Plasmids ist (Tabelle 3.17). Somit war eine gerichtete Ligation der Sequenz in das Ausgangsplasmid möglich (4.2.8.8). Nach erfolgreicher Klonierung wurde das Plasmid über stabile Transfektion (4.1.6.2) in DLD-1-Zellen gebracht, diese wurden vereinzelt und durch Puromycin selektioniert. Einzelkolonien wurden in Zellkulturflaschen bei 37 °C und 5 % CO₂-Begasung kultiviert. Mit Hilfe von Western Blot-Analysen (4.3.6) gegen KSRP wurde schließlich überprüft, ob das Ausschalten des KSRP Gens erfolgreich war.

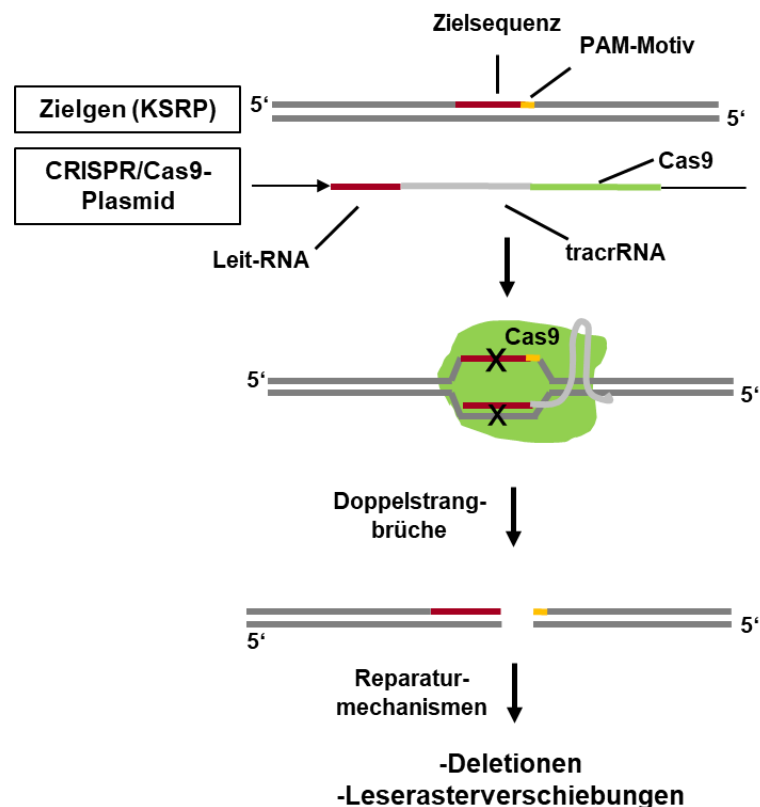


Abbildung 4.1: Vereinfachte Darstellung der CRISPR/Cas9-Methode.

Das CRISPR/Cas9-Plasmid zur Herstellung von (KSRP)-Knockout-Zellen kodiert für die Endonuklease Cas 9 (grün), eine Leit-RNA (rot), die identisch zur Zielsequenz (rot) im Genom ist, sowie für eine tracrRNA (hellgrau). Die tracrRNA bildet eine Haarnadelstruktur aus und gewährleistet dadurch die Bindung an die Zielsequenz und die spätere Restriktion. Stromabwärts der Zielsequenz befindet sich das PAM-Motiv (gelb), welches die Spezifität der Bindung erhöht. Nach der Transfektion der Zellen mit dem CRISPR/Cas9-Plasmid lagert sich die Leit-RNA an die Zielsequenz an, woraufhin die Endonuklease Cas 9 willkürlich Doppelstrangbrüche in diesem Bereich erzeugt. Dies führt zu Fehlern während der Reparatur und letztendlich zu Deletionen und Leserasterverschiebungen. PAM: protospacer adjacent motif, Cas: CRISPR-assoziiert, tracrRNA: trans activating crRNA.

4.2 Molekularbiologische Methoden

4.2.1 Isolation von DNA aus Gewebe und Zellen

Die Typisierung der KSRP-Mäuse (Kapitel 4.4.1) erfolgte mit DNA, die aus Ohrstanzen isoliert wurde (Truett, Heeger et al. 2000). Zur Entnahme der Ohrstanzen wurden die Mäuse im Klammergriff fixiert und mit einer Lochzange ein Stück Ohrgewebe entnommen. Die Gewebestücke wurden anschließend in ein 0,2 ml Reaktionsgefäß überführt, mit 50 µl 1x Basepuffer (3.5.1) versetzt und zur Lyse für 30 min bei 95 °C inkubiert. Nach dem Abkühlen auf 10 °C wurde den Proben jeweils 50 µl Neutralisationspuffer (1x, 3.5.1) zugefügt und zur Neutralisierung kräftig gemischt. Die isolierte DNA konnte direkt in die Typisierungs-PCR (Kapitel 4.2.5 und 4.4.1) eingesetzt werden.

Genomische DNA aus DLD-1-Zellen wurde mit Hilfe des *PureLink™ Genomic DNA Mini Kits* von Invitrogen nach Angaben des Herstellers isoliert.

4.2.2 Isolation von Gesamt- und miRNA aus Zellen und Gewebe

Die Isolation von Gesamt-RNA aus Zellen und Geweben erfolgte nach dem Protokoll von Chomczynski und Sacchi (Chomczynski and Sacchi 1987), dem die Extraktion durch Guanidiniumisothiocyanat (GIT) und Phenol-Chloroform zugrunde liegt. Für alle Schritte wurden RNase-freie Reaktionsgefäße und Pipettenspitzen verwendet und alle Lösungen wurden mit DEPC-H₂O angesetzt.

Für die RNA-Isolation aus Zellen wurde zunächst das Medium von den Platten abgesaugt, die Zellen in 200 µl GIT-Puffer (3.5.1) lysiert und die Suspension in 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt. Bei Geweben als Ausgangsmaterial wurde ein kleines Stück der bei -80 °C gelagerten Organe abgetrennt und in ein 2 ml Reaktionsgefäß mit 600 µl GIT-Puffer und drei kleinen Stahlkugeln zur Homogenisierung des Gewebes im TissueLyzer (Qiagen) überführt. Die Zerkleinerung erfolgte in dem dazugehörigen Einsatz des TissueLyzers, der bei -20 °C aufbewahrt wurde, für 4 min bei 50 Hertz. Anschließend wurden die Proben bei 900 x g und 4 °C für 5 min zentrifugiert und die Überstände schließlich in neue Reaktionsgefäße zur RNA-Isolation überführt. Für die Isolation von RNA aus Pfoten wurde ein Stück der Pfote abgetrennt, in ein 2 ml Reaktionsgefäß mit 600 µl GIT-Puffer überführt und mit Hilfe eines Homogenisierstabs (Micra) zerkleinert. Nach Zugabe von 600 µl DEPC-H₂O wurden die Proben mit Proteinase K (Endkonzentration: 0,1 mg/ml) versetzt und für 20 min bei 55 °C inkubiert, um die Proteine zu verdauen und die Nukleinsäuren freizusetzen.

Um letztlich die RNA zu isolieren, wurden die Proben zunächst mit 0,1 Volumen (Vol) einer 2 M Natriumacetat-Lösung (pH 4,0) angesäuert und mit 1 Vol wassergesättigtem Phenol sowie 0,5 Vol Chloroform:Isoamylalkohol (1:24) versetzt und gemischt. Dies führt dazu, dass zum einen die Proteine denaturieren und zum anderen die DNA weniger wasserlöslich ist und sich später in der organischen Phase anreichert. Nach einer 15-minütigen Inkubation auf Eis und der Phasentrennung durch Zentrifugation bei 16200 x g und 4 °C für 20 min konnte die in der wässrigen oberen Phase angereicherte RNA in neue Reaktionsgefäße überführt werden. Zur Präzipitation wurde die RNA nach Zugabe von 1,5 Vol Isopropanol für mindestens eine Stunde bei -20 °C gelagert. Die ausgefällte RNA wurde schließlich für 20 min bei 16200 x g und 4 °C zentrifugiert, mit 80 % Ethanol gewaschen und nach erneutem 10-minütigem Zentrifugationsschritt für 10 min über Kopf getrocknet. Je nach Ausgangsmaterial wurde das RNA-Pellet in 30 oder 50 µl DEPC-H₂O gelöst und bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

Zur Isolation von miRNA aus Leberproben wurden kleine Stücke der Organe in *QIAzol Lysis Reagent* (Qiagen) überführt und wie oben angegeben im TissueLyzer zerkleinert. Die weitere Präparation der RNA erfolgte mit dem *miRNeasy Mini Kit* von Qiagen nach Angaben des Herstellers. Die aufgereinigte RNA wurde mit 80 µl DEPC-H₂O von der Säule eluiert.

4.2.3 Quantifizierung von Nukleinsäuren

Die Bestimmung der Konzentration isolierter Nukleinsäuren erfolgte mit Hilfe des Spektralphotometers NanoDrop-2000© (Peqlab) und dem zugehörigen Programm *NanoDrop 2000*. Die Konzentration wurde anhand des Absorptionsmaximums von DNA und RNA bei 260 nm unter Zuhilfenahme des Lambert-Beerschen Gesetzes bestimmt, das eine direkte Korrelation zwischen Absorption und Konzentration herstellt. Zur Messung wurde 1 µl Probe eingesetzt. Eine Absorptionseinheit A_{260} entsprach dabei 40 µg einzelsträngiger RNA bzw. 50 µg doppelsträngiger DNA. Da das Absorptionsmaximum von Proteinen bei 280 nm liegt, wurde zusätzlich der Quotient aus E_{260} zu E_{280} errechnet, der eine Aussage über die Verunreinigung der DNA bzw. RNA durch Proteine möglich macht. Im Falle von RNA sollte dieser Wert ~2 und bei DNA ~1,8 sein. Verunreinigung durch Ethanol, Phenol oder andere organische Lösungsmittel, zeigen sich im Quotienten aus E_{260} / E_{230} , der bestenfalls zwischen 2 und 2,2 liegen sollte (*T042-Technical Bulletin NanoDrop Spectralphotometers*).

4.2.4 Reverse Transkription (RT)

Mit Hilfe einer reversen Transkriptase kann RNA in einzelsträngige cDNA umgeschrieben werden, was mit anschließender qRT-PCR (Kapitel 4.2.7) eine Analyse der mRNA-Expression zum Zeitpunkt der RNA-Isolation möglich macht. Die Erststrangsynthese erfolgt dabei ausgehend von Hexa-N-Oligonukleotiden, die willkürlich an die RNA binden. Je nach Ausgangsmaterial wurde das *High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit* von Applied Biosystems (für RNA aus primären Maus-Zellen wie z.B. Peritonealzellen) oder das *M-MuLV Reverse Transcriptase Kit* von NEB (für RNA aus sonstigen Zellen und Organen) verwendet. Die jeweiligen Reaktionsansätze sind der Tabelle 4.4 zu entnehmen.

Tabelle 4.4: Reaktionsansätze für die Reverse Transkription

High-Capacity		M-MuLV	
Komponente	V pro Ansatz	Komponente	V pro Ansatz
10x RT-Puffer	2 µl	10x M-MuLV Puffer	2 µl
25x dNTP Mix (100 mM)	0,8 µl	dNTP Mix (25 mM)	0,8 µl
10x RT Random Primers	2 µl	Hexa-N-Oligoprimmer (10 µM)	2 µl
MultiScribe® Reverse Transcriptase (50 U/µl)	0,5 µl	M-MuLV RT (200 U/µl)	0,125 µl
Nuklease-freies H ₂ O	4,7 µl	Nuklease-freies H ₂ O	5,075 µl
verdünnte RNA (50 ng/µl)	10 µl	verdünnte RNA (50 ng/µl)	10 µl
Gesamt	20 µl	Gesamt	20 µl

Die cDNA-Synthese erfolgte in 200 µl Reaktionsgefäßen im MyCycler (BioRad) nach folgendem Programm (Tabelle 4.5):

Tabelle 4.5: Standard-Programm der Reversen Transkription

Schritt	Temperatur	Zeit
Binden der Oligonukleotide an die RNA	25 °C	10 min
Reverse Transkription	37 °C	2 Std
Denaturierung der Reversen Transkriptase	85 °C	5 min
Kühlung	4 °C	∞

Im Rahmen dieser Arbeit sollte die miR-155-Expression in Leberproben untersucht werden. Hierfür wurde ein *TaqMan® MicroRNA Assay-System* von Applied Biosystems verwendet, das es ermöglicht spezifisch miRNAs in cDNA umzuschreiben und zu analysieren. Die cDNA-Synthese erfolgte demnach mit dem *TaqMan® MicroRNA Reverse Transcription Kit* mit den für die miR-155 spezifischen Oligonukleotiden. Der Reaktionsansatz ist der Tabelle 4.6 zu entnehmen. Dabei ist zu beachten, dass zunächst alle Komponenten gemischt und erst zuletzt

die RNA-Verdünnung und die Oligonukleotide zugegeben wurden. Die Ansätze wurden wie in Tabelle 4.7 angegeben im MyCycler (BioRad) inkubiert.

Tabelle 4.6: Reaktionsansatz für die cDNA-Synthese mit dem *TaqMan® MicroRNA Reverse Transcription Kit*

Komponente	V pro Ansatz
10x RT Puffer	1,5 µl
dNTP-Mix (100 mM)	0,15 µl
RNase Inhibitor (20 U/µl)	0,19 µl
Multiscribe™ RT-Enzym (50 U/µl)	1 µl
Wasser	7,16 µl
RNA-Verdünnung (5 ng/µl)	2 µl
5x mmu-miR-155 RT-Primer	3 µl
Gesamt	15 µl

Tabelle 4.7: Programm der reversen Transkription von miRNAs mit dem *TaqMan® MicroRNA Reverse Transcription Kit*

Schritt	Temperatur	Zeit
Binden der Oligonukleotide an die RNA	16 °C	30 min
Reverse Transkription	42 °C	30 min
Denaturierung der Reversen Transkriptase	85 °C	5 min
Kühlung	4 °C	∞

4.2.5 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion kann ein bestimmter DNA-Abschnitt *in vitro* exponentiell amplifiziert werden (Saiki, Gelfand et al. 1988). Die PCR bedient sich dabei dem natürlichen Mechanismus der DNA-Replikation in der Zelle. Das zu amplifizierende Fragment dient als Vorlage und wird von spezifischen Oligonukleotiden, die komplementär zu den jeweiligen Einzelsträngen sind und den Start der PCR vorgeben, flankiert. Die PCR erfolgt in 5'-3'-Richtung unter der Verwendung einer thermostabilen Polymerase, die aus dem Bakterium *Thermus aquaticus* (Taq) isoliert wurde, sowie freier dNTPs und den spezifischen Oligonukleotiden. Jeder Zyklus der PCR beginnt mit einer Denaturierung der DNA, bei der durch Erhitzen die Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den beiden Strängen aufgebrochen werden, so dass Einzelstränge entstehen. Durch das Absenken der Temperatur können die Oligonukleotide an die DNA binden (Oligo-Hybridisierung). Daraufhin erfolgt die Elongation, die Neusynthese eines komplementären Stranges ausgehend von den Oligonukleotiden. Die Temperatur ist dabei abhängig vom eingesetzten Enzym und die Dauer

der Elongation hängt von der Größe des zu amplifizierenden Fragments ab. Das verwendete Standardprogramm einer PCR ist der Tabelle 4.8 zu entnehmen; die Amplifikation erfolgte im MyCycler (BioRad).

Tabelle 4.8: Standard-PCR-Programm

Schritt	Temperatur	Zeit	Anzahl der Zyklen
Initiale Denaturierung	94 °C	3 min	1
Denaturierung	94 °C	0,5 min	
Oligo-Hybridisierung	T_m Oligos – 5	1 min	38
Elongation	72 °C	1 min pro kb Amplifikat	
Finale Elongation	72 °C	7 min	1
Kühlung	8 °C	∞	1

Für Klonierungen wurde zumeist eine Polymerase mit *Proofreading*-Funktion eingesetzt, um Fehler während der Amplifikation zu vermeiden. Hier fand die *Q5® High-Fidelity DNA Polymerase* von NEB nach Angaben des Herstellers Verwendung.

4.2.5.1 Slowdown-PCR

Die Amplifikation GC-reicher Sequenzen führt aufgrund hoher Schmelztemperaturen sowie der Ausbildung von Sekundärstrukturen häufig zu Problemen während der PCR, was auch bei der KSRP Sequenz (KSRPprom 245 bp_Ex1_In1_Ex2) der Fall war. Um den Genabschnitt dennoch vervielfältigen zu können, wurde die PCR mit 7-Deaza-2'-Deoxyguanosin (dc^7GTP) durchgeführt. Dabei handelt es sich um ein dGTP-Analog, das die Interaktion zwischen den einzelnen Basen abschwächt und somit die Sekundärstrukturen auflöst (Jung, Ruckert et al. 2002). Weiterhin erfolgte die PCR nach dem *Slowdown*-Protokoll, das von Frey et. al. im Jahre 2008 publiziert wurde (Frey, Bachmann et al. 2008). Dieses Protokoll vereint eine *Touchdown*-PCR mit einer Standard-PCR, wobei die Hybridisierungstemperatur immer für drei Zyklen konstant bleibt und dann verringert wird. Wichtig dabei ist, dass das Abkühlen (-1,5 °C pro sek) bzw. Erhitzen (+2,5 °C pro sek) zwischen den einzelnen Schritten der PCR-Reaktion langsam abläuft (*ramp rate*). Das hat den Vorteil, dass die Ausbildung von Sekundärstrukturen minimiert wird.

Die Amplifikation der KSRP-Sequenz erfolgte mit der *Q5® High-Fidelity DNA Polymerase* von NEB nach Herstellerangaben. Dabei wurden dc^7GTPs im Verhältnis 2:1 zu dGTPs eingesetzt. Das publizierte *Slowdown*-Programm wurde leicht abgewandelt, da die Annealing-Temperatur in jedem Zyklus um 0,5 °C verringert wurde (Tabelle 4.9). Die *ramp rates* waren wie oben angegeben.

Tabelle 4.9: PCR-Programm der Slowdown-PCR

Schritt	Temperatur	Zeit	Anzahl der Zyklen
Initiale Denaturierung	95 °C	5 min	1
Denaturierung	95 °C	30 sek	
Oligo-Hybridisierung	70→53 °C / 0,5 °C pro Zyklus	30 sek	36
Elongation	72 °C	40 sek	
Denaturierung	95 °C	30 sek	
Oligo-Hybridisierung	58 °C	30 sek	15
Elongation	72 °C	40 sek	
Finale Elongation	95 °C	10 min	1
Kühlung	8 °C	∞	1

4.2.5.2 Quickchange-PCR (QC-PCR)

Die *Quickchange*-PCR ist eine Methode, bei welcher mit nur einer PCR eine Deletion bzw Punktmutation in einem Plasmid erzeugt werden kann. Auch die Insertion einer Sequenz ist möglich, wobei hierfür eine weitere PCR notwendig ist. In dieser Arbeit wurde die *Quickchange*-PCR verwendet, um verschiedene Deletionen in die KSRP Promotorplasmide einzufügen. Hierfür wurden die Oligonukleotide so generiert, dass diese die gewünschte Deletion beinhalten und der Bereich des Plasmids, der verändert werden soll, überspannt wird. Ausgehend von diesen Oligonukleotiden erfolgte dann die Amplifikation des Plasmids. Für die PCR wurde die *Q5® High-Fidelity DNA Polymerase* von NEB verwendet, der Reaktionsansatz war wie vom Hersteller angegeben. Das PCR-Programm ist in Tabelle 4.10 dargestellt.

Tabelle 4.10: Quickchange PCR-Programm für Deletionen

Schritt	Temperatur	Zeit	Anzahl der Zyklen
Initiale Denaturierung	95 °C	0,5 min	1
Denaturierung	95 °C	0,5 min	
Oligo-Hybridisierung	55 °C	0,5 min	30
Elongation	68 °C	9 min	
Finale Elongation	72 °C	10 min	1
Kühlung	8 °C	∞	1

Da das PCR-Produkt im Gegensatz zur methylierten Ausgangs-DNA unmethyliert vorliegt, konnte in einem nächsten Schritt mit DpnI verdaut werden. DpnI schneidet ausschließlich methylierte DNA, so dass nach dem Verdau nur neu amplifizierte Plasmid-DNA mit den gewünschten Deletionen vorhanden war. Die Restriktion erfolgte bei 37 °C für eine Stunde

(4.2.8.2). Anschließend wurden die Plasmide in TOP10-Bakterien transformiert (4.2.8.9) und die Plasmide wie in Kapitel 4.2.8.10 beschrieben isoliert.

Des Weiteren wurde die QC-Methode verwendet, um die gesamte KSRP Promotorsequenz inklusive Exon 1 und 2 (KSRPprom 245 bp_Ex1_In1_Ex2) in das pGI4luc-Plasmid zu klonieren. Hierfür musste zunächst ein Megaprimer erstellt werden, welcher einerseits der Sequenz entspricht, die insertiert werden soll, und andererseits an den Enden homologe Sequenzen zum Plasmid aufweist. Die verwendeten Oligonukleotide sind in Tabelle 3.17 angegeben, die PCR erfolgte nach dem *Slowdown*-Protokoll (4.2.5.1) auf ein KSRP BAC-Plasmid (*Bacterial Artificial Chromosome*, Tabelle 3.12). Der Megaprimer konnte schließlich in die QC-PCR nach dem in Tabelle 4.11 angegebenen Protokoll eingesetzt werden.

Tabelle 4.11: Quickchange PCR-Programm für Insertionen

Schritt	Temperatur	Zeit	Anzahl der Zyklen
Initiale Denaturierung	95 °C	30 sek	1
Denaturierung	95 °C	30 sek	
Oligo-Hybridisierung	52 °C	30 sek	5
Elongation	68 °C	9 min	
Denaturierung	95 °C	30 sek	
Oligo-Hybridisierung	55 °C	30 sek	13
Elongation	68 °C	9 min	
Finale Elongation	68 °C	10 min	1
Kühlung	8 °C	∞	1

4.2.6 Agarose-Gelelektrophorese

Mit der Gelelektrophorese können DNA-Fragmente aus einem Gemisch ihrer Größe nach aufgetrennt werden. Bei Agarose handelt es sich um ein Polymer, das sich gelöst in einem geeigneten Puffer (TAE-Puffer, Tris-Acetat-EDTA-Puffer; 3.5.1) zu einem Gel vernetzt. Die Porengröße hängt dabei vom Agarosegehalt im Gel ab. Durch Anlegen einer Spannung, wandert die DNA aufgrund ihrer negativen Ladung durch das Gel zur Anode, wobei die Laufgeschwindigkeit durch die Größe der Fragmente und die Porengröße des Gels definiert wird; d. h. kleine Fragmente wandern schneller als große.

Die Methode wurde verwendet, um den Erfolg einer PCR oder Restriktion zu überprüfen. Je nach erwarteter Größe der zu analysierenden Fragmente wurden 0,8-2 %ige Agarose-Gele verwendet. Die jeweilige Menge an Agarose wurde in 0,8x TAE-Puffer (3.5.1) durch Erhitzen gelöst. Zum späteren Sichtbarmachen der DNA wurde dem Puffer *Roti®-GelStain* (3 µl/100 µl Puffer; Roth) zugegeben, ein Farbstoff, der in die DNA interkaliert und unter UV-Einstrahlung

eine grüne Fluoreszenz emittiert. Nach dem Gießen der Gele erfolgte die Elektrophorese in einer horizontalen Elektrophoresekammer (BioRad), die mit 0,8x TAE (3.5.1) gefüllt wurde, bei 80-100 Volt (V). Die Proben wurden vor dem Auftragen mit Ladebuffer (3.5.1) versetzt, der zum einen die Dichte der Proben erhöht und zum anderen eine sichtbare Lauffront darstellt. Zur Größenabschätzung der einzelnen Banden wurde zusätzlich ein Marker mit auf das Gel aufgetragen (Tabelle 3.7). Die Banden wurden schließlich unter einem UV-Transilluminator (Intas UV-Systeme) betrachtet und ausgewertet. Bei Bedarf wurden einzelne Banden mit einem Skalpell aus dem Gel ausgeschnitten und bis zur weiteren Verwendung bei 4 °C gelagert.

4.2.7 Quantitative Realtime-PCR

Die quantitative Realtime-PCR (qRT-PCR) beruht auf der herkömmlichen PCR-Methode und ermöglicht es mRNAs während der Amplifikation in Echtzeit spezifisch nachzuweisen und quantitativ zu bestimmen (Higuchi, Dollinger et al. 1992). Diese Anwendung ist somit wichtig für die Erstellung von mRNA-Expressionsprofilen unter verschiedenen Bedingungen. Die quantitative Messung erfolgt durch Fluoreszenzfarbstoffe, die während der PCR in die Amplifikate eingebaut werden. Dabei steigt die nach jedem Zyklus gemessene Fluoreszenz proportional zur DNA-Menge.

Im Rahmen dieser Arbeit kamen zwei verschiedene Fluoreszenzsysteme zum Einsatz. Einerseits wurde ein SYBRGreen Farbstoff (Primerdesign Ltd) verwendet, der sequenzunspezifisch in DNA interkaliert, und zum anderen das sondenbasierte TaqMan-System, was den Vorteil einer höheren Sequenzspezifität bietet. Hierbei wird eine Sonde eingesetzt, die zwischen den beiden Oligonukleotiden spezifisch an die DNA bindet und am 5'-Ende mit einem Fluorophor (z.B. 6-Carboxyfluorescein, FAM) markiert ist, während das 3'-Ende einen Quencher (z.B. Carboxytetramethylrhodamin, TAMRA) gebunden hat. Das Emissionsspektrum des Fluorophors entspricht dem Absorptionsspektrum des Quenchers, so dass der Quencher die Emission des Fluorophors absorbiert. Erst während der Elongation wird der Reporterfarbstoff durch die 5'-3'-Exonukleaseaktivität der Polymerase von der Sonde abgespalten, was eine räumliche Trennung zwischen Fluorophor und Quencher nach sich zieht. Diese Trennung führt zu einer messbaren Fluoreszenz, die proportional zur gebildeten DNA-Menge zunimmt. Im Gegensatz zum TaqMan-System ist die Messung mit SYBR Green® weniger sequenzspezifisch, da der Fluoreszenzfarbstoff generell in doppelsträngige DNA interkaliert. Die Emission, die durch die Bildung des Komplexes aus DNA und Farbstoff entsteht, wird auch bei dieser Methode am Ende jedes Zyklus gemessen und ist ebenfalls proportional zur DNA-Menge. Um die Spezifität der verwendeten Oligonukleotide zu

überprüfen, wird nach dem eigentlichen PCR-Programm zusätzlich eine Schmelzkurve erstellt. Hierbei wird die Temperatur kontinuierlich von 60 auf 95 °C erhöht. Das führt dazu, dass sich die Doppelstränge der gebildeten Amplifikate bei der jeweils spezifischen Schmelztemperatur trennen und das Fluoreszenzsignal dadurch abnimmt. Bei mehreren Produkten unterscheiden sich die Schmelztemperaturen, was somit eine Aussage über die Spezifität der Oligonukleotide möglich macht. Um außerdem zu gewährleisten, dass ausschließlich cDNA und nicht genomische DNA amplifiziert wird, wurden die Oligosysteme so generiert, dass mindestens ein Primer Exongrenzen-überspannend bindet.

In die PCR wurden 2 µl der zuvor synthetisierten cDNA (4.2.4) nach folgendem Pipettierschema eingesetzt (Tabelle 4.12):

Tabelle 4.12: Pipettierschema für die qRT-PCR

TaqMan		SYBR Green®	
Komponente	V pro Ansatz	Komponente	V pro Ansatz
2x Taq-Puffer	12,5 µl	PrecisionPLUS Master Mix	10 µl
dNTP-Mix (10 mM)	1 µl	SYBRGreen	
Vorwärts-Primer (10 pmol/µl)	2 µl	Vorwärts-Primer (10 pmol/µl)	0,6 µl
Rückwärts-Primer (10 pmol/µl)	2 µl	Rückwärts-Primer (10 pmol/µl)	0,6 µl
Sonde (10 pmol/µl)	1 µl	Wasser	6,8 µl
Taq (AG Kleinert)	0,5 µl	cDNA	2 µl
Wasser	4 µl		
cDNA	2 µl		
Gesamt	25 µl	Gesamt	20 µl

Die qRT-PCR erfolgte im iCycler von Biorad, die PCR-Programme für das sondenbasierte bzw. das sondenfreie System sind den nachfolgenden Tabellen (Tabelle 4.13 und Tabelle 4.14) zu entnehmen.

Tabelle 4.13: TaqMan qRT-PCR-Programm

Schritt	Temperatur	Zeit	Anzahl der Zyklen
Initiale Denaturierung	95 °C	15 min	1
Denaturierung	94 °C	15 sec	
Oligo-Hybridisierung	60 °C	30 sec	45
Elongation und Fluoreszenzmessung	60 °C	30 sec	
Kühlung	25 °C	∞	1

Tabelle 4.14: SYBR Green PCR-Programm

Schritt	Temperatur	Zeit	Anzahl der Zyklen
Initiale Denaturierung	95 °C	15 min	1
Denaturierung	94 °C	15 sec	
Oligo-Hybridisierung	60 °C	30 sec	45
Elongation und Fluoreszenzmessung	60 °C	30 sec	
Finale Elongation	95 °C	30 sec	1
Schmelzkurve	60 °C → 95 °C	10 sec	71
Kühlung	25 °C	∞	1

Die Quantifizierung der DNA wird durch einen Schwellenwert (C_T -Wert) beschrieben. Dieser definiert den PCR-Zyklus, bei dem die exponentielle Phase der Amplifikation beginnt. Die Auswertung der Expressionsanalysen erfolgte relativ, das heißt die Expression des zu untersuchenden Gens wurde auf die Expression eines konstitutiv exprimierten Gens (wie z.B. DNA-Polymerase II, Pol2a) normiert. Hierfür wurde die $2^{(-\Delta\Delta C(T))}$ -Methode nach Livak angewendet, bei der die C_T -Werte der einzelnen Proben auf die zugehörigen C_T -Werte des Referenzgens normiert und auf eine Kontrollgruppe bezogen werden (Livak and Schmittgen 2001).

4.2.8 Klonierung

Die Klonierung beschreibt das Einbringen eines DNA-Fragmentes in einen Vektor, mit dem Ziel die DNA identisch zu vervielfältigen und in weiteren Experimenten zu analysieren. Das Fragment kann dabei entweder über Restriktion (4.2.8.2), Hybridisierung von Oligonukleotiden (4.2.8.1) oder PCR (4.2.5) gewonnen werden. Sowohl Fragment als auch Vektor werden mit einem geeigneten Restriktionsenzym verdaut und mittels Phenol-Chloroform-Extraktion aufgereinigt (4.2.8.5). Die 5'-Enden des Vektors werden anschließend durch eine Alkalische Phosphatase dephosphoryliert (4.2.8.3), um eine Religation zu vermeiden. Das DNA-Fragment wird gegebenenfalls durch eine Kinase phosphoryliert (4.2.8.4) oder die überhängenden Enden der Restriktion aufgefüllt (4.2.8.6). Vor der Ligation werden Fragmente und Vektor über ein Agarosegel aufgetrennt (4.2.6), durch UV-Einstrahlung sichtbar gemacht und mit einem Skalpell ausgeschnitten. Die DNA wird aus dem Gel eluiert (4.2.8.7), Vektor und Fragment ligiert (4.2.8.8) und in Bakterien transformiert (4.2.8.9). Durch Bakterien vervielfältigte Plasmide werden isoliert (4.2.8.10) und über einen Restriktionsverdau oder Kolonie-PCR mit anschließender Sequenzierung überprüft.

4.2.8.1 Hybridisierung von Oligonukleotiden

Bei sehr kurzen DNA-Fragmenten, die in ein Plasmid eingebracht werden sollen, können 5'- und 3'-Oligonukleotide mit der entsprechenden Sequenz generiert und hybridisiert werden. Dabei müssen die beiden Oligonukleotide eine komplementäre Sequenz aufweisen. Jeweils 1 µl der Oligonukleotide (100 pmol/µl) wurden mit 5 µl Hybridisierungs-Puffer (3.5.1) sowie 43 µl H₂O versetzt und für 5 min auf 95 °C erhitzt. Durch das langsame Abkühlen der Reaktionsansätze auf Raumtemperatur konnten sich die Einzelstränge aneinander lagern.

4.2.8.2 Restriktion von DNA

Restriktionsendonukleasen sind Enzyme, die spezifische, meist palindromische Sequenzmuster erkennen und doppelsträngige DNA innerhalb oder in unmittelbarer Nähe ihrer Erkennungssequenz schneiden. Dabei erzeugen sie entweder glatte Enden oder 5'- bzw. 3'-Überhänge. Die Restriktion ist zum einen wichtig für die Charakterisierung von Plasmiden und zum anderen für die Vorbereitung von DNA-Fragmenten und Vektoren, die für die Klonierung eingesetzt werden.

Für einen analytischen Restriktionsansatz (z.B. zur Überprüfung eines isolierten Plasmids) wurde 1 µg Plasmid-DNA mit 2 µl des entsprechenden Restriktionspuffers (NEB) und 1-2 Einheiten des Enzyms (U, *units*) versetzt und mit DNA-H₂O auf 20 µl Gesamtvolumen aufgefüllt. Sollte eine größere Menge an Vektor- oder Fragment-DNA geschnitten werden, wurde ein präparativer Ansatz pipettiert. Es wurden dabei 30 µg DNA eingesetzt und dementsprechend die Puffermenge auf 10 µl und das Gesamtvolumen auf 100 µl erhöht. Pro µg DNA wurden 1-2 U Enzym zugegeben. Die Restriktion erfolgte für 2-3 Stunden bei dem jeweiligen Temperaturoptimum des verwendeten Enzyms. Mittels Agarose-Gelelektrophorese (4.2.6) wurde der Erfolg des Verdaus überprüft.

4.2.8.3 Dephosphorylierung

Um die Religation des Vektors nach der Restriktion zu verhindern, wurden die 5'-Phosphate durch Phosphatase-Behandlung entfernt. Hierfür wurde die aus Kälberdarm stammende Alkalische Phosphatase CIAP (*calf intestine alkaline phosphatase*, Roche) eingesetzt. Pro 100 µl Restriktionsansatz wurden 3 µl Phosphatase (5 U/µl) zugegeben und für eine Stunde bei 37 °C inkubiert. Der Restriktionspuffer konnte dabei im Reaktionsgefäß verbleiben.

4.2.8.4 Kinasierung

Wurden synthetisch hergestellte DNA-Fragmente (z.B. durch PCR oder Oligo-Hybridisierung) für die Klonierung verwendet, mussten diese zunächst am 5'-Ende phosphoryliert werden. Bei der Kinasierung handelt es sich dementsprechend um das Gegenteil der Dephosphorylierung. Hierfür wird eine T4-Polynukleotid-Kinase (T4-PNK) verwendet, die DNA-Fragmente unter Anwesenheit von ATP phosphoryliert. Die PCR-Produkte wurden mit 10 µl 10x PNK-Puffer, 2 µl 10 mM ATP und 2 µl T4-PNK versetzt und mit H₂O auf 100 µl aufgefüllt. Die Kinasierung erfolgte bei 37 °C für eine Stunde.

4.2.8.5 Phenol-Chloroform-Extraktion

Die Vektor- und Fragment-DNA wurde nach der Restriktion bzw. der PCR von Salzen und Enzymen befreit. Hierfür wurde eine Phenol-Chloroform-Extraktion durchgeführt. Die Probe wurde mit 0,1 V einer 3 M Natriumacetatlösung (pH 4,8) und 1 V einer Tris-gesättigten Phenol-Chloroform-Lösung (1:1) versetzt und auf dem Kreisschüttler gemischt. Zur Phasentrennung wurden die Proben bei 16200 x g für 5 min bei 4 °C zentrifugiert. Proteine sammelten sich dabei in der Interphase und organische Lösungsmittel in der unteren Phase. Die wässrige obere Phase, welche die DNA enthalten hat, wurde in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und zur Fällung der DNA mit 2 V Ethanol absolut gemischt. Die Fällung erfolgte bei -20 °C für mindestens eine Stunde. Um die gefällte DNA zu pelletieren, wurde die Probe für 20 min bei 4 °C und 16200 x g zentrifugiert, das Pellet mit 70 %igem Ethanol gewaschen (16200 x g, 4 °C, 10 min), für 10 min über Kopf getrocknet und in H₂O gelöst.

4.2.8.6 Klenow-Reaktion

Die Klenow-Reaktion wird verwendet, um bei der Restriktion entstandene Überhänge aufzufüllen. Dies ist notwendig, wenn z.B. Vektor und Integrat mit unterschiedlichen Enzymen geschnitten wurden, so dass die vorhandenen Überhänge nicht kompatibel sind. Bei dem Klenow-Enzym handelt es sich um die größere der beiden Untereinheiten der DNA-Polymerase I von *E. coli*. Es besitzt eine 5'-3'-Polymerase- sowie eine 3'-5'-Exonuklease-Aktivität und ist somit in der Lage sowohl 5'-Überhänge aufzufüllen als auch 3'-Überhänge zu entfernen. Die so erzeugten glatten Enden können weiterhin ligiert werden.

Für die Klenow-Reaktion wurde der zuvor aufgereinigten DNA (4.2.8.5) 4 µl 2,5 mM dNTPs, 10 µl Klenow-Puffer und 1 µl Enzym (NEB, entspricht 5 U) zugegeben und mit H₂O auf 100 µl Gesamtvolumen aufgefüllt. Die Inkubation erfolgte bei 37 °C für 30 min.

4.2.8.7 Elektroelution von DNA aus Agarose

Sowohl bei der Restriktion als auch bei der PCR können neben den gewünschten Fragmenten zusätzliche Fragmente entstehen, die für die Ligation nicht benötigt werden. Um diese unspezifischen Fragmente aus dem Gemisch zu entfernen, wurde die gesamte DNA auf einem präparativen Agarosegel (4.2.6) aufgetrennt, die entsprechenden Banden mit dem UV-Transilluminator (Intas UV-Systeme) identifiziert und mit einem Skalpell ausgeschnitten. Zur Elution der DNA wurde das Gelstück in einen Dialyseschlauch überführt, der 2 ml TAE-Puffer enthielt und anschließend luftdicht verschlossen wurde. Die Elution erfolgte in einer Gelelektrophoresekammer für eine Stunde bei 100 V. Um die DNA vom Dialyseschlauch zu lösen, wurde am Ende für 2 min die Laufrichtung geändert. Die eluierte DNA wurde schließlich in ein 2 ml Reaktionsgefäß überführt und mittels Phenol-Chloroform-Extraktion aufgereinigt (4.2.8.5).

Im Falle von kleineren Fragmenten (bis zu 1000 bp) erfolgte die Gelelution mit dem *Monarch® DNA Gel Extraction Kit* von NEB.

4.2.8.8 Ligation

Bei der Ligation werden zwei DNA-Fragmente (z.B. Vektor und PCR-Fragment) durch eine Enzymreaktion miteinander verbunden. Die hierfür verwendete T4 DNA-Ligase bildet dabei eine Phosphodiesterbindung zwischen der 3'-Hydroxygruppe und dem 5'-Phosphatende aus. Der Kofaktor der Ligase ist ATP.

Die Ligation erfolgte in einem Gesamtvolumen von 20 µl bei 16 °C über Nacht. Vektor und Fragment wurden im Verhältnis 1:3 unter Berücksichtigung der Fragmentlänge eingesetzt und mit 2 µl Ligase-Puffer und 1 µl T4 DNA-Ligase (400 U) versetzt. Als Kontrolle wurde das eingesetzte Volumen an Fragment-DNA durch H₂O ersetzt.

4.2.8.9 Transformation von DNA in Bakterien

Die Transformation beschreibt das Einbringen und die Vervielfältigung von Plasmid-DNA in kompetente Bakterienzellen. Hierfür wurden 50 µl Bakterien (DH5α oder TOP10) auf Eis aufgetaut, mit jeweils 10 µl Ligationsansatz bzw. der Kontrolle versetzt und für 30 min auf Eis inkubiert. Währenddessen lagert sich die Plasmid-DNA an die Zellwand an. Der nachfolgende Hitzeschock bei 42 °C für 30 sek führt zu einer erhöhten Permeabilität der Zellwand und somit einer gesteigerten Aufnahme der DNA in die Bakterienzelle. Nach einer fünfminütigen

Inkubation auf Eis wurde den Zellen 400 µl LB-Medium (3.5.7) hinzugegeben und die Ansätze für eine Stunde bei 37 °C auf dem Schüttelinkubator (Innova®40, New Brunswick Scientific) inkubiert. In dieser Zeit kann sich die entsprechende Antibiotikaresistenz ausbilden, die auf der Plasmid-DNA vorliegt, so dass im Nachfolgenden eine Selektion positiv transformierter Bakterien erfolgen konnte. Hierfür wurden jeweils die gesamten Ansätze steril auf antibiotikahaltige Agarplatten (3.5.7) ausplattiert und für 16 Stunden bei 37 °C im Brutschrank (B28, Binder) inkubiert, so dass nur Bakterien mit aufgenommenem Plasmid wachsen konnten.

4.2.8.10 Plasmid-DNA-Präparation

Der Erfolg der Klonierung wurde überprüft, indem die vervielfältigte rekombinante Plasmid-DNA aus den Bakterien isoliert und in einem Kontrollverdau (4.2.8.2) analysiert wurde. Hierfür wurden die über Nacht gewachsenen Bakterienkolonien mit einem sterilen Zahnstocher von der Agarplatte gepickt, in ein Glasröhrchen mit 3 ml LB-Selektionsmedium (LB-Amp-Medium, 3.5.7) überführt und über Nacht bei 37 °C auf dem Schüttelinkubator (Innova®40, New Brunswick Scientific) inkubiert, so dass die Bakterien wachsen konnten.

Die Präparation der Plasmid-DNA aus den Bakterienzellen erfolgte nach der Methode der Alkalischen Lyse (Birnboim and Doly 1979). Bei dieser Methode werden die Zellen zunächst durch das Detergenz Natriumdodecylsulfat (SDS) lysiert, während gleichzeitig die chromosomale DNA unter alkalischen Bedingungen durch NaOH denaturiert wird. Die Zugabe einer Kaliumacetat-Lösung zur Neutralisation führt dazu, dass die hochmolekulare chromosomale DNA sowie die Protein-SDS-Komplexe ausfallen und mittels Zentrifugation von der Plasmid-DNA in Lösung getrennt werden kann.

Zur Aufarbeitung der Plasmide wurden 1,5 ml der Bakteriensuspension in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und die Bakterien bei 16200 x g und 4 °C für 1 min pelletiert. Das LB-Medium wurde verworfen und das Pellet in 100 µl Maniatis I (3.5.2) resuspendiert. Zur Lyse der Zellen wurden 200 µl Maniatis II (3.5.2) zugegeben, vorsichtig invertiert und für 5 min auf Eis inkubiert. Durch die Zugabe von 150 µl Maniatis III (3.5.2) und erneutem Invertieren des Reaktionsgefäßes fielen chromosomale DNA und Proteine aus und wurden durch 15-minütige Zentrifugation (16200 x g, 4 °C) pelletiert. Der Überstand wurde in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und zur Fällung der Plasmid-DNA mit 400 µl Isopropanol versetzt, gemischt und für 2 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die DNA wurde anschließend für 5 min bei 21 °C und 16200 x g abzentrifugiert, das Pellet mit 70 % Ethanol gewaschen, für 15 min über Kopf getrocknet und schließlich in 50 µl Millipore-H₂O gelöst. Zur Analyse wurden 5 µl der Plasmidlösung mit geeigneten Restriktionsenzymen geschnitten (4.2.8.2) und der Verdau

auf einem Agarosegel überprüft (4.2.6). Entsprechen die detektierten Banden den Erwartungen, wurde eine Sequenzierung mit spezifischen Oligonukleotiden durchgeführt, um die Integrate zusätzlich auf Sequenzebene zu kontrollieren. Hierfür wurde die Plasmid-DNA aus der Bakteriensuspension mit dem Monarch® Miniprep Kit (NEB) nach Angaben des Herstellers isoliert und in 50 µl DNA-H₂O eluiert. Die Sequenzierung wurde von der Firma StarSEQ GmbH (Mainz) durchgeführt. Bei positiven Sequenzierungen wurde mit Hilfe von Midi-Präparationen eine größere Menge an Plasmid-DNA isoliert. Dafür wurden 100 ml LB-Amp-Medium (3.5.7) mit 100 µl der Bakteriensuspension versetzt und über Nacht bei 37 °C im Schüttelinkubator inkubiert (Innova®40, New Brunswick Scientific). Die Isolation der Plasmide erfolgte mit dem *HiPure Plasmid Filter Midiprep Kit* von Invitrogen nach Angaben des Herstellers.

4.3 Proteinbiochemische Methoden

4.3.1 Isolation von Gesamtproteinextrakten aus Zellen und Geweben

Analysen der Proteinexpression in Zellen wurden mit Gesamtzellextrakten durchgeführt. Die Zellsuspension wurde hierfür abzentrifugiert (1200 x g, bei 25 °C für 5 min) und das Pellet in RIPA-Puffer (3.5.4.2) zur Lyse der Zellen resuspendiert. Um die Proteine zu schützen, wurde der Puffer vor der Verwendung mit Protease- und Phosphataseinhibitoren nach Herstellerangaben versetzt. Anschließend erfolgte eine Ultraschall-Lyse über 8 Zyklen (jeweils 30 sek Pulsintervalle mit 30 sek Pause im Biorupter Plus, Diagenode). Durch die nachfolgende Zentrifugation der Proben für 5 min bei 900 x g und 4 °C wurden die isolierten Proteine von den Zelltrümmern getrennt. Der Überstand, der die Proteine enthält, wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

Um Proteine aus Geweben zu analysieren, wurde ein Teil der bei -80 °C aufbewahrten Organe abgetrennt und in ein 2 ml Reaktionsgefäß mit 600 µl RIPA (3.5.4.2) und sterilen Metallkugeln gegeben. Die Homogenisierung erfolgte anschließend im TissueLyser (Qiagen) bei 50 Hz für 5 min. Die Zelltrümmer wurden entfernt, indem die Proben für 1 min bei 900 x g und 4 °C zentrifugiert wurden. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und bei -80 °C aufbewahrt.

4.3.2 Isolation von Kernextrakten nach Dignam und Osborne

Für die Pulldown-Assays zur Analyse der Transkriptionsfaktoren, die an den KSRP Promotor binden, wurden Kernextrakte verwendet. Die Isolation der Kernextrakte aus DLD-1-Zellen

erfolgte nach einem modifizierten Protokoll der publizierten Methode von Dignam und Osborn (Dignam, Lebovitz et al. 1983; Osborn, Kunkel et al. 1989). Alle verwendeten Puffer wurden vor der Präparation frisch angesetzt und mit Protease- und Phosphataseinhibitoren in den entsprechenden Konzentrationen versetzt.

Die DLD-1-Zellen wurden auf 14 cm-Schalen ausgesät und für ca. vier Tage im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO₂-Zufuhr bis zu einer Konfluenz von 80 % inkubiert. Zur Isolation der Kernextrakte wurde zunächst das Medium abgenommen und durch 4 ml PBS pro Schale ersetzt. Die Zellen wurden mit Hilfe eines Zellschabers vom Schalenboden abgelöst und die Zellsuspension in ein 15 ml Zentrifugenröhrchen überführt. Dabei wurden jeweils die Zellen von zwei Schalen vereint und anschließend für 10 min bei 1000 x g und 4 °C pelletiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in einem definierten PBS-Volumen aufgenommen. Zur Bestimmung der Zellzahl (4.1.3) wurde ein Teil der Zellsuspension in eine Neubauer-Zählkammer überführt, die Zellen gezählt und anschließend erneut herunter zentrifugiert (10 min bei 1000 x g und 4 °C). Das Pellet wurde in 200 µl Mix I (3.5.4.1) pro 10⁷ Zellen aufgenommen und für 10 min auf Eis inkubiert. Danach erfolgte der mechanische Aufschluss der Zellen, indem die Proben kräftig auf dem Kreisschüttler gemischt wurden und die Zellsuspension anschließend mehrmals durch eine Kanüle aufgezogen (24xG) wurde. Die dadurch freigesetzten Zellkerne wurden bei 16200 x g und 4 °C für 10 min abzentrifugiert. Der Überstand, der dem Zytoplasmaextrakt entspricht, wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt, mit 20 % Glycerin versetzt und bei -80 °C weggefroren. Das Zellkernpellet wurde in 100 µl Mix II (3.5.4.1) pro 10⁷ Zellen resuspendiert und für 15 min bei 4 °C zur Lyse der Kerne inkubiert. Um die Zellreste von den Proteinen zu trennen, wurde erneut kräftig auf dem Kreisschüttler gemischt und für 10 min bei 16200 x g und 4 °C zentrifugiert. Der die Proteine enthaltende Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit 500 µl Puffer D (3.5.4.1) pro 10⁷ Zellen versetzt. Bis zur weiteren Verwendung wurden die Kernextrakte ebenfalls bei -80 °C gelagert.

4.3.3 Quantifizierung von Proteinen – Bradford-Assay

Die Bestimmung der Konzentration von Proteinen erfolgte nach der Methode von Bradford (Bradford 1976), einer photometrischen Proteinbestimmung. Hierfür wird der Triphenylmethanfarbstoff Coomassie-Brillant-Blau G-250 verwendet, der in sauren Lösungen Komplexe mit den kationischen und unpolaren Seitenketten von Aminosäuren bildet. Dabei wird ausgenutzt, dass der Farbstoff zwischen gebundener und ungebundener Form seine Farbe und somit das Absorptionsmaximum ändert. In der ungebundenen kationischen Form hat der rote Farbstoff ein Absorptionsmaximum bei 470 nm, während er in der gebundenen

anionischen Form eine blaue Färbung annimmt und bei 595 nm absorbiert. Je mehr Protein vorhanden ist und somit gebunden werden kann, desto mehr verschiebt sich das Absorptionsmaximum auf 595 nm. Diese Änderung kann photometrisch gemessen werden und stellt ein Maß für die Proteinkonzentration dar.

Für den Bradford-Assay wurden jeweils 1-2 µl Probe (je nach Ausgangsmaterial) zusammen mit 98-99 µl H₂O auf eine 96-Lochplatte pipettiert und mit 100 µl 40 %igem Bradford-Reagenz versetzt. Zur späteren Umrechnung der gemessenen Extinktionen wurde zusätzlich eine BSA-Verdünnungsreihe mit bekannter Konzentration pipettiert und gemessen. Das Pipettierschema der Standardreihe ist der Tabelle 4.1 zu entnehmen. Um die Konzentration möglichst genau messen zu können, wurde eine Doppelbestimmung durchgeführt. Die Absorptionsmessung bei 595 nm erfolgte mit einem Spektrometer (Sunrise, Tecan).

Tabelle 4.15: Pipettierschema der BSA-Standardreihe

Konzentration	0 µg/µl	0,25 µg/µl	0,5 µg/µl	1 µg/µl	1,5 µg/µl	2 µg/µl
BSA (1x)	0 µl	2,5 µl	5 µl	10 µl	15 µl	20 µl
Wasser	100 µl	97,5 µl	95 µl	90 µl	85 µl	80 µl
Konzentration	2,5 µg/µl	3 µg/µl	3,5 µg/µl	4 µg/µl	5 µg/µl	6 µg/µl
BSA (1x)	25 µl	30 µl	35 µl	40 µl	50 µl	60 µl
Wasser	75 µl	70 µl	65 µl	60 µl	50 µl	40 µl

Da RIPA-Puffer die Proteinmessung beeinflusst, musste der Standardreihe ebenfalls RIPA in gleichen Anteilen zugegeben werden, sofern die Proben in diesem Puffer aufgearbeitet wurden (Tabelle 4.16). Hierbei wurde 1 µl Probe mit 9 µl RIPA-Puffer (3.5.4.2), 790 µl Wasser und 200 µl unverdünntem Bradford-Reagenz versetzt. Der Ansatz wurde gemischt und davon 200 µl doppelt auf eine 96 Lochplatte überführt.

Tabelle 4.16: Pipettierschema der BSA-Standardreihe mit RIPA

Konzentration	0 µg/µl	1 µg/µl	2 µg/µl	4 µg/µl	6 µg/µl	8 µg/µl
BSA (10x)	0 µl	1 µl	2 µl	4 µl	6 µl	8 µl
RIPA	10 µl	10 µl	10 µl	10 µl	10 µl	10 µl
Wasser	790 µl	789 µl	788 µl	786 µl	784 µl	782 µl
Konzentration	10 µg/µl	12 µg/µl	14 µg/µl	16 µg/µl	18 µg/µl	20 µg/µl
BSA (1x)	10 µl	12 µl	14 µl	16 µl	18 µl	20 µl
RIPA	10 µl	10 µl	10 µl	10 µl	10 µl	10 µl
Wasser	780 µl	778 µl	776 µl	774 µl	772 µl	770 µl

4.3.4 Fällung von Proteinen

Um die Konzentration einer Proteinlösung für weitere Analysen anzureichern, wurden die Proteine nach dem Protokoll von Wessel und Flügge gefällt (Wessel and Flügge 1984). Die gewünschte Menge an Protein wurde mit sterilem Millipore-H₂O auf ein Gesamtvolumen von 100 bzw. 200 µl gebracht, mit 4 V Methanol, 1 V Chloroform und 3 V Millipore-H₂O versetzt und auf dem Kreisschüttler kräftig gemischt. Die Zugabe von Chloroform führt hierbei zur Ausfällung der Proteine und das Wasser verbessert die Phasentrennung während der nachfolgenden Zentrifugation (10 min bei 4 °C und 16200 x g). Proteine sammeln sich dabei in der Interphase an. Nach dem Verwerfen der wässrigen oberen Phase wurden die Proteine durch erneute Zugabe von Methanol (4 V des Ausgangsvolumens) vollständig gefällt und durch zehninütiges Zentrifugieren bei 4 °C und 16200 x g pelletiert. Der Überstand wurde abgenommen und das Pellet unter dem Abzug luftgetrocknet. Zur späteren Verwendung für die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese wurden die Pellets in 2x Lämmli-Puffer (mit 1,4-Dithiothreitol, DTT, 3.5.4.2) aufgenommen und bei -80 °C aufbewahrt.

4.3.5 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Mit Hilfe der eindimensionalen SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) ist es möglich, Proteine ihrem Molekulargewicht nach in einem elektrischen Feld aufzutrennen (Laemmli 1970). Die Proteine wurden für die SDS-PAGE in Lämmli-Puffer (3.5.4.2) aufgenommen, der zum einen DTT und zum anderen das Detergens SDS enthält. DTT spaltet die Disulfidbrücken und trägt somit zur Denaturierung der Tertiär- und Quartärstrukturen bei. Diese Linearisierung der Proteine wird durch Erhitzen der Proben auf 95 °C für 5 min unterstützt. Die hohe negative Ladung von SDS überdeckt die Eigenladung der Proteine, indem die lipophilen Kohlenwasserstoffketten des SDS die hydrophoben Seitenketten der Proteine binden. So entstehen negativ geladene SDS-Proteinkomplexe, wobei die negative Ladung im Verhältnis zur Masse der Proteine steht. Dadurch, und durch die Linearisierung, wird eine Auftrennung der Proteine rein nach der Größe möglich.

Die für die SDS-PAGE verwendeten Polyacrylamid-Gele bestehen aus einem kurzen, niedrigprozentigen Sammelgel (4 %) und einem hochprozentigen Trenngel, wobei die Konzentration des Trenngels von der Größe der zu analysierenden Proteine abhängt. Das Sammelgel dient zur Ansammlung aller Proteine an der Phasengrenze, so dass die Auftrennung im feinporigen Trenngel nach dem Molekulargewicht für alle Proben vom selben Ausgangspunkt starten kann. In dieser Arbeit wurde das *Mini-Protean-System 3* von BioRad verwendet. Dabei wurden ausschließlich 10 %ige Trenngele eingesetzt (Tabelle 4.17).

Tabelle 4.17: Zusammensetzung für zwei Trenn- und Sammelgele für die SDS-PAGE

Komponente	Trenngel 10 %	Sammelgel 4 %
Millipore Wasser	6,75 ml	4,6 ml
1,5 M Tris pH 8,8	4,2 ml	-
0,5 M Tris pH 6,8	-	1,875 ml
10 % SDS	168 μ l	75 μ l
30 % Acrylamid	5,625 ml	975 μ l
TEMED	11,25 μ l	9,75 μ l
10 % APS	112,5 μ l	49,5 μ l

Zum Gießen der Gele wurden zwei Glasplatten mit einem Abstandshalter (1,5 mm) zusammengesetzt und in die Halterung eingespannt. Zunächst wurde das Trenngel gegossen und mit 70 % Ethanol überschichtet, um eine glatte Oberfläche zu generieren. Nach der Polymerisierung wurde das Ethanol entfernt, durch das Sammelgel ersetzt und mit einem Kamm zum Formen der Taschen versehen. Das auspolymerisierte Gel wurde schließlich in eine Elektrophoresekammer gestellt, die mit 1x Laufpuffer (3.5.4.2) gefüllt wurde. Der Kamm wurde entfernt und das Gel mit den denaturierten Protein-Proben beladen. Zur späteren Abschätzung der Proteingrößen wurde zusätzlich ein Molekulargewicht-Standard (*Precision Plus Protein Dual Color Standard*, BioRad, Kapitel 3.7) mit aufgetragen. Schließlich wurde eine Spannung von 80-100 V angelegt, so dass die Auftrennung der Proteine erfolgte. Der Lauf wurde beendet, wenn die Lauffront gerade noch zu erkennen war.

4.3.6 Immundetektion mittels Western Blot-Analyse

Die Methode des Western Blots ermöglicht es ausgewählte Proteine aus einem Gemisch spezifisch nachzuweisen. Hierfür werden die Proteine mit Hilfe der SDS-PAGE (4.3.5) aufgetrennt und anschließend durch Anlegen eines elektrischen Feldes vertikal zum Gel auf eine Trägermembran übertragen (Towbin, Staehelin et al. 1979; Burnette 1981). Durch hydrophobe Wechselwirkungen mit der Membran, bleiben die Proteine an der Membran haften, wobei das Muster der elektrophoretischen Auftrennung sowie die Quantität erhalten bleiben. Anschließend können einzelne Proteine (Antigene) durch antigenspezifische Primäantikörper gebunden werden, die wiederum einen Peroxidase-gekoppelten Sekundäantikörper über die F_c-Region binden. Die häufig verwendete Meerrettich-Peroxidase katalysiert die Oxidation von Luminol, das in Form eines Zweikomponenten-Chemilumineszenz-Substrates zugegeben wird. Dabei entsteht eine Chemilumineszenz, die mit einem Positivfilm oder dem ChemiDocTM XRS sichtbar gemacht werden kann.

Um die Proteine auf die Membran zu übertragen, wurde ein Semidry-Blot-System verwendet. Zur Vorbereitung wurden sechs Filterpapiere (Whatman-Papiere) und eine Nitrozellulosemembran in der Größe des Gels zurechtgeschnitten und für 5-10 min in Transferpuffer (3.5.4.2) äquilibriert, wodurch die Oberfläche der Membran aktiviert wurde. Zur Entfernung von SDS-Rückständen wurde das Gel ebenfalls in diesem Puffer inkubiert. Zum Aufbau des Blots wurden zunächst drei Filterpapiere auf die Anodenplatte des Blotters gelegt, gefolgt von der Membran, dem Gel und drei weiteren Whatman-Papieren, bevor der Stapel durch die Kathodenplatte abgedeckt wurde. Dabei wurde darauf geachtet, dass sich keine Luftblasen zwischen den einzelnen Schichten befanden, um einen gleichmäßigen Transfer zu gewährleisten. Die Dauer des Transfers bei 12 V war von der Größe der zu analysierenden Proteine abhängig. Größere Proteine (hier: KSRP und SP1) wurden für 50 min transferiert. Zur Überprüfung der Transfereffizienz wurden die Proteine auf der Membran unspezifisch mit einer Ponceau S-Lösung (3.5.4.2) für ca. 2 min angefärbt und durch mehrmaliges Spülen mit Wasser wieder entfärbt. Unspezifische Bindungsstellen der Membran wurden anschließend mit einer 5 %igen Milchpulver-TBST-Lösung (MP-TBST 3.5.4.2) für 60 min bei Raumtemperatur abgesättigt, so dass eine spezifische Antikörperbindung möglich wurde. Der Blockierpuffer wurde entfernt und durch eine Lösung des Primärantikörpers, der im selben Puffer verdünnt wurde, ersetzt. Die Bildung der Antikörper-Antigen-Komplexe erfolgte über Nacht bei 4 °C auf dem Kreisschüttler. Um nicht gebundenen Antikörper zu entfernen, wurde die Lösung abgenommen und die Membran dreimal für 10 min mit 1 x TBST (3.5.4.2) gewaschen. Anschließend wurde die Membran für 90 min mit dem entsprechenden Sekundärantikörper (1:10 000 verdünnt in einer MP-TBST-Lösung) auf dem Wippschüttler bei Raumtemperatur inkubiert, erneut dreimal mit 1x TBST gewaschen und schließlich in 1x TBS gelagert (3.5.4.2). Die Detektion erfolgte mit Hilfe eines ECL-Systems (*enhanced-chemiluminescence*-System) von Thermo Scientific, dessen zwei Komponenten in gleichen Anteilen gemischt und für 1 min auf die Membran gegeben wurden. Das durch die Oxidation des Luminols entstehende Licht wurde durch Auflegen eines Positivfilms oder mit Hilfe des *ChemiDocTM XRS* detektiert, wobei die Belichtungszeit abhängig war von den Proteinen und der Stärke des Signals. Dabei korreliert die gemessene Emission mit der Lage und der Menge des Proteins auf der Membran. Die quantitative Auswertung erfolgte mit dem Programm *Image LabTM* (BioRad).

4.3.7 Luciferase Reportergen-Assay

Luciferase Reportergen-Assays ermöglichen die Analyse von Sequenzelementen, welche die Genexpression regulieren, wie beispielsweise 5'- und 3'-UTR sowie Promotoren. Hierbei wird die Eigenschaft von Luciferasen genutzt, in Anwesenheit von O₂ und den Kofaktoren

Adenosintriphosphat (ATP), Coenzym A und Mg^{2+} , das Substrat Luciferin in Oxyluciferin zu oxidieren (Kricka and Thorpe 1983). Die bei dieser Reaktion entstehende Biolumineszenz kann mit einem Luminometer quantifiziert werden. Dabei korreliert der gemessene Wert mit der Menge an exprimierter Luciferase. Da die Luciferase in humanen Zellen endogen nicht exprimiert wird und die Expression in diesem Assay unter der Kontrolle der zu analysierenden Promotor- oder 3'-UTR-Sequenz steht, können schließlich Rückschlüsse auf die Rolle dieser Elemente für die Genexpression gezogen werden.

In dieser Arbeit wurden mit Hilfe von Reportergen-Assays verschiedene KSRP Promotorfragmente in Kombination mit der 5'-UTR sowie die Rolle der 3'-UTR untersucht. Hierfür wurden die entsprechenden Fragmente vor (Promotor und 5'-UTR) bzw. hinter (3'-UTR) ein *Firefly*-Luciferasegen kloniert (4.2.8) und die Plasmide transient in DLD-1-Zellen transfiziert (4.1.6.1). Zur Normierung der gemessenen Aktivität wurde jeweils ein Plasmid kotransfiziert, welches die Renilla-Luciferase unter der Kontrolle des EF1 α -Promotors exprimiert. Das Substrat der Renilla-Luciferase ist Coelenterazin (Inouye and Shimomura 1997). Zur Messung der Luciferaseaktivitäten wurden je 10 μ l des Lysats auf eine 96-Lochplatte pipettiert und 3 sek nach Zugabe der jeweiligen Luciferasesubstrate (100 μ l) wurde die Biolumineszenz im Luminometer (Centro LB 960, Berthold) detektiert. Um die Hintergrundaktivität zu eliminieren wurde die Lumineszenz von 10 μ l PLB gemessen und von den Werten der Proben subtrahiert. Die normierten Messwerte der *Firefly*-Luciferase wurden schließlich auf die Werte der Renilla-Luciferase bezogen.

4.3.8 Pulldown

Mit der Pulldown-Methode können direkte Protein-DNA-, Protein-RNA- sowie Protein-Protein-Wechselwirkungen analysiert und nachgewiesen werden. Es handelt sich dabei um eine Affinitätschromatografie, bei der die zu untersuchenden Proben (hier: RNA und DNA) mit Biotin markiert und aufgrund der hohen Affinität zu Streptavidin-Agarose an diese gebunden werden. Durch die Inkubation mit einem Zelllysats werden alle Proteine, die mit der an die Agarose gebundenen DNA oder RNA interagieren, aus dem Gemisch herausgezogen und können schließlich mittels Western Blot (4.3.6) analysiert werden (Wu 2006; Panda, Martindale et al. 2016).

Im Rahmen dieser Arbeit wurden zum einen Pulldown-Analysen durchgeführt um Transkriptionsfaktoren zu analysieren, die an den KSRP Promotor binden, und zum anderen wurden Proteine identifiziert, die mit der KSRP 3'-UTR interagieren.

4.3.8.1 DNA-Pulldown

Für die Analyse der Transkriptionsfaktoren wurden verschiedene Promotorfragmente (3 kb und 245 bp prom 5'-UTR) mit Biotin-markierten Oligonukleotiden (Tabelle 3.18) mittels PCR (4.2.5) amplifiziert. Hierfür wurde der *OneTaq® 2x Master Mix* von NEB nach Angaben des Herstellers verwendet. Als Negativkontrollen dienten Sequenzen, die laut bioinformatischen Analysen kaum Promotoraktivität aufweisen (Yip, Cheng et al. 2012). Im Falle der Promotorsequenzen wurden Plasmide als Template verwendet (pGI4lucKSRPprom 3 kb, pGI4lucKSRPprom 245 bp 5'-UTR, Tabelle 3.13), während die PCRs der Negativkontrollen (3 kb und 1,5 kb) auf genomische DNA aus DLD-1-Zellen erfolgten. Die PCR-Produkte wurden über ein präparatives Agarosegel aufgereinigt (4.2.6) und aus dem Gel extrahiert (4.2.8.7).

Für die Bindung der biotinylierten Amplifikate an die Streptavidin-Agarose wurden zunächst 100 µl Agarose bei 16200 x g und 4 °C für 5 min zentrifugiert und mit 100 µl DNA-H₂O gewaschen. Anschließend wurden jeweils 10 µg biotinylierte PCR-Produkte in 20 µl H₂O mit 100 µl Bindepuffer-DNA (40 mM KCl; 3.5.4.3) versetzt und auf die Streptavidin-Agarose überführt. Die Bindung unter Niedrigsalz-Bedingungen erfolgte für 6 Stunden bei 4 °C auf dem Überkopfschüttler. Da die Transkription im Zellkern stattfindet, wurden für die Analyse der Transkriptionsfaktoren Kernextrakte verwendet. Diese wurden wie in Kapitel 4.3.2 beschrieben aus DLD 1-Zellen isoliert, die Konzentration mittels Bradford (4.3.3) bestimmt und schließlich für die Bindung an die Promotorfragmente eingesetzt. Um unspezifische Bindungen der Proteine an die Agarose zu eliminieren, wurden die Extrakte zunächst vorgeklärt. Hierfür wurde 1 mg Kernextrakt (in 600 µl) auf 50 µl gewaschene Streptavidin-Agarose (16200 x g und 4 °C für 5 min) gegeben und für zwei Stunden auf dem Überkopfschüttler bei 4 °C inkubiert. Nach den 2 bzw. 6 Stunden wurde die Agarose jeweils bei 16200 x g und 4 °C für 5 min herunter zentrifugiert. Der Überstand des DNA-Agarose-Gemischs wurde verworfen und der Proteinüberstand wurde auf die Streptavidin-Agarose überführt, an welche die DNA gebunden war. Die Bindung der Proteine an die DNA erfolgte über Nacht bei 4 °C auf dem Überkopfschüttler nach der Zugabe von 500 µl Bindepuffer-DNA (40 mM KCl). Um die Bindung zu verstärken, wurde am folgenden Tag ein Formaldehyd-Crosslink durchgeführt. Hierfür wurde 16 %iges Formaldehyd zu den Proben gegeben (Endkonzentration 1 %) und für 10 min bei Raumtemperatur auf dem Überkopfschüttler inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe einer sterilfiltrierten 2,5 M Glycinlösung (Endkonzentration 0,125 M) abgestoppt (10 min auf dem Überkopfschüttler). Schließlich wurden die Proben abzentrifugiert (16200 x g und 4 °C für 5 min) und der Überstand mit den ungebundenen Proteinen in ein neues Reaktionsgefäß überführt und bis auf Weiteres bei -80 °C gelagert. Die Agarose wurde daraufhin für 5 min bei 4 °C auf dem Überkopfschüttler mit 100 µl frischem Bindepuffer-DNA (40 mM KCl) inkubiert und anschließend erneut abzentrifugiert. Ein zweiter Waschschriff erfolgte mit höher

konzentriertem Bindepuffer-DNA (100 mM KCl; 3.5.4.3). Schließlich wurde die DNA zusammen mit den gebundenen Proteinen unter Hochsalz-Bedingungen mit 100 µl Elutionspuffer (2M KCl; 3.5.4.3) durch 30-minütige Inkubation von der Agarose eluiert und für die weitere Verwendung bei -80 °C weggefroren. Für die nachfolgende Western Blot-Analyse (4.3.5-4.3.6) erfolgte eine Methanolfällung der Eluate sowie von jeweils 100 µl der Überstände (0), um die für die Methode störenden Salze zu entfernen.

4.3.8.2 RNA-Pulldown

Der Pulldown von Proteinen, die an RNA-Fragmente binden, wird beispielsweise genutzt, um RNA-BPs zu analysieren, welche für die posttranskriptionelle Regulation der Genexpression von Bedeutung sind (vgl. Kapitel 1.1.2.1).

4.3.8.2.1 In vitro Transkription

Die *in vitro* Transkription ermöglicht es definierte RNA-Sequenzen außerhalb der Zelle herzustellen. Dabei kommen RNA-Polymerasen zum Einsatz, die aus den Bakteriophagen T3 und T7 isoliert wurden. Ausgehend von den entsprechenden Promotorsequenzen kann somit, durch den Einbau von freien biotinylierten dNTPs, DNA in eine Biotin-markierte RNA-Sonde umgeschrieben werden (Milligan, Groebe et al. 1987).

Alle Fragmente, die in Pulldown-Experimenten analysiert werden sollten, wurden zuvor in einen pCRScript-Vektor kloniert (Tabelle 3.12), so dass die entsprechenden 3'-UTR-Sequenzen von einem T3 und T7 Polymerasepromotor flankiert wurden. Für die *in vitro* Transkription wurden die pCR-3'-UTR-Plasmide zunächst durch einen dreistündigen Restriktionsverdau linearisiert (4.2.8.2). Dabei wurde ein Restriktionsenzym so gewählt, dass der Schnitt unmittelbar hinter der 3'-UTR-Sequenz stattfand, abhängig von der Orientierung der Sequenz im Plasmid. Nach der Überprüfung der Restriktion mittels Agarose-Gelelektrophorese (4.2.6) wurden die Proben durch Phenol-Chloroform-Extraktion (4.2.8.5) aufgereinigt, in 30 µl DEPC-H₂O gelöst und bei -20 °C aufbewahrt.

Für die *in vitro* Transkription wurde schließlich 1 µg der linearisierten Fragmente mit 2 µl 10x RNA Biotin Labeling Mix, 2 µl T3- oder T7-Transkriptionspuffer und 2 µl T3 oder T7 RNA-Polymerase versetzt und mit DEPC-H₂O auf 18 µl aufgefüllt. Welche Polymerase verwendet wurde hing vom Promotor ab, der sich am 5'-Ende des linearisierten Fragments befand. Nach einer zweistündigen Inkubation bei 37 °C wurden 2 µl RNase-freie DNase I zugegeben und für 20 min bei 37 °C verdaut. Die Reaktion wurde mit 1 µl EDTA (0,5 M) abgestoppt und die RNA über Nacht bei -20 °C durch Zugabe von 0,1 Vol 2 M Natriumacetat und 1 Vol Isopropanol

gefällt. Das Pellet wurde mit 80 % Ethanol gewaschen, für 10 min über Kopf getrocknet und schließlich in 20 µl DEPC-H₂O gelöst.

4.3.8.2.2 Streptavidin-Biotin-gekoppelte RNA-Affinitätschromatografie

Zur Bindung der RNA an die Streptavidin-Agarose wurde 100 µl Agarose mit 100 µl DEPC-H₂O gewaschen (16200 x g und 4°C für 5 min) und anschließend mit 4 µl Biotin-markierter RNA-Sonde (4.3.8.2.1) in 16 µl DEPC-H₂O und 100 µl Bindepuffer-RNA (40 mM KCl; 3.5.4.3) versetzt. Die Inkubation erfolgte für sechs Stunden bei 4 °C auf dem Überkopfschüttler.

Für den RNA-Pulldown wurden Gesamtzellextrakte von DLD-1-Zellen in RIPA-Puffer (3.5.4.2) verwendet. Insgesamt 5 mg Zellextrakt wurde, wie in Kapitel 4.3.8.1 beschrieben, vorgeklärt, um unspezifisch bindende Proteine zu eliminieren. Nach der Bindung bzw. dem Vorklären der Proteine wurden alle Proben bei 16200 x g und 4°C für 5 min pelletiert, der Überstand der Agarose-RNA-Komplexe verworfen und das Agarosepellet mit dem vorgeklärten Proteinüberstand versetzt. Nach der Zugabe von 400 µl Bindepuffer-RNA (40 mM KCl; 3.5.4.3) erfolgte die Bindung der Proteine an die RNA über Nacht bei 4 °C auf dem Überkopfschüttler. Am folgenden Tag wurde die Agarose herunter zentrifugiert (16200 x g und 4°C für 5 min) und der Überstand mit ungebundenen Proteinen bei -80 °C weggefroren. Anschließend folgten fünf Waschschriffe mit jeweils 100 µl Bindepuffer-RNA (40 mM KCl; 5 min Inkubation bei 4 °C auf dem Überkopfschüttler gefolgt von 5 min Zentrifugieren bei 16200 x g und 4 °C). Letztlich wurden die gebundenen Proteine für 30 min mit 100 µl Elutionspuffer (2M KCl; 3.5.4.3) eluiert. Die Proben wurden entweder gefällt (0), um mit Western Blots (4.3.5-4.3.6) einzelne Proteine zu untersuchen, oder für massenspektrometrische Analysen ins *Center for Mass Spectrometry-analytics* der Technischen Universität in Kaiserslautern geschickt. Mit Hilfe der Massenspektrometrie (MS) ist es möglich alle Proteine eines Gemischs zu identifizieren und zu quantifizieren.

4.3.9 RNA-Immunpräzipitation (RIP)

Die RNA-Immunpräzipitation (RIP) stellt eine weitere wichtige Methode dar, mit der die direkte Interaktion zwischen RNA und RNA-BPs detektiert werden kann (Gilbert and Svejstrup 2001). Im Gegensatz zum Pulldown-Assay wird bei der RIP mit einem spezifischen Antikörper das Protein von Interesse gebunden und durch die Interaktion des Antikörpers mit Protein-A/G-Agarose aus einem Gemisch herausgezogen. An das Protein gebundene RNA kann schließlich aufgereinigt und mittels qRT-PCR (4.2.7) quantitativ analysiert werden.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden RIP-Assays durchgeführt, um die KSRP-Interaktion mit Ziel-mRNAs unter dem Einfluss von Resveratrol zu untersuchen. Hierfür wurden DLD-Zellen auf 14 cm-Schalen ausgesät, bis zur 80 %igen Konfluenz bei 37 °C kultiviert und, wie in Kapitel 4.1.4. beschrieben, mit Resveratrol behandelt und stimuliert. Das Medium wurde nach der jeweils angegebenen Zeit abgenommen und durch 400 µl Lysepuffer (3.5.4.4) ersetzt. Nach dem Aufschluss der Zellen mittels Ultraschallbehandlung und der Konzentrationsbestimmung (4.3.3) konnten die Proteine für die Immunpräzipitation verwendet werden.

Zu Beginn wurde der entsprechende Antikörper an die Agarose gebunden. Hierfür wurde je 50 µl Protein-A/G PLUS-Agarose pro Probe zweimal mit 500 µl DEPC-H₂O und einmal mit NT2-Puffer (3.5.4.4) gewaschen (5 min Inkubation auf dem Überkopfschüttler, 5 min Zentrifugation bei 1200 x g und 4 °C). Der Überstand wurde jeweils verworfen. Anschließend wurde das Agarose-Pellet mit 475 µl NT2-Puffer, 200 µg tRNA, 0,5 mg/ml Heparin und 5 µl KSRP-Antikörper (Tabelle 3.10) versetzt. Die Zugabe von tRNA und Heparin diente dazu, die Spezifität der Bindungen zu erhöhen. Für jede Probe wurde zusätzlich eine Negativkontrolle angesetzt, bei der unspezifischer Hase-IgG-Antikörper verwendet wurde. Die Bindung erfolgte über Nacht im Überkopfschüttler bei 4 °C. Am darauffolgenden Tag wurde die Agarose fünfmal mit NT2-Puffer gewaschen (5 min Inkubation auf dem Überkopfschüttler, 5 min Zentrifugation bei 1200 x g und 4 °C), wobei der Überstand jeweils verworfen wurde. In der Zwischenzeit wurden die Zelllysate vorgeklärt, um unspezifisch bindende Proteine aus dem Gemisch zu entfernen. Dafür wurden jeweils 20 µl Protein-A/G PLUS-Agarose mit 500 µl NT2-Puffer gewaschen und mit 2 mg Proteinlysate in einem Gesamtvolumen von 500 µl NT2-Puffer versetzt. Dem Puffer wurden zuvor 0,2 % VRC (*Vanadyl Ribonucleosid Complex*) und 100 U/ml RNasin sowie Proteinase- und Phosphataseinhibitoren (nach Angaben des Herstellers) zugegeben. Anschließend wurden die Proben für 30 min auf dem Überkopfschüttler bei 4 °C vorgeklärt. Nachfolgend wurde die Agarose durch Zentrifugation pelletiert (5 min bei 1200 x g und 4 °C) und der Proteinüberstand wurde auf die gewaschene Agarose übertragen, die den Antikörper gebunden hatte. Nach der Zugabe von 1 mM DTT und 15 mM EDTA erfolgte die Bindung der Proteine an den Antikörper bei 4 °C auf dem Überkopfschüttler für mindestens drei Stunden.

Überschüssiges Proteinlysate wurde schließlich entfernt, indem die Agarose-Antikörper-Protein-Komplexe viermal mit NT2-Puffer und 0,2 % VRC gewaschen wurden (5 min Inkubation auf dem Überkopfschüttler, 5 min Zentrifugation bei 1200 x g und 4 °C). Die Überstände wurden jeweils verworfen. Um die RNA freizulegen, die an dem präzipitierten Protein gebunden vorlag, folgte ein enzymatischer Verdau. Hierfür wurde die Protein A/G PLUS-Agarose mit 0,1 SDS und 0,5 mg/ml Proteinase K behandelt und für 15 min bei 55 °C inkubiert. Vor der Aufreinigung der freigewordenen RNA wurde dem Gemisch 1 ng *in vitro*

transkribierte Luciferase-RNA aus dem pGI3T7basic (Tabelle 3.14) zugegeben, um die Normierung der Messwerte in den folgenden qRT-PCR-Analysen zu gewährleisten. Die RNA wurde mit dem *RNeasy MinElute Cleanup-Kit* nach Herstellerangaben aufgereinigt, in 14 µl DEPC-H₂O eluiert und unverdünnt in die cDNA-Synthese (4.2.4) eingesetzt. Die qRT-PCR-Analysen (4.2.7) erfolgten mit spezifischen Oligonukleotiden.

4.4 Arbeitsmethoden mit Versuchstieren

Für die verschiedenen Experimente wurden KSRP-Wildtyp-Mäuse (KSRP-wt; KSRP^{+/+}) und KSRP-*Knockout*-Mäuse (KSRP-ko; KSRP^{-/-}) auf C57BL/6-Hintergrund verwendet (Lin, Zheng et al. 2011), die als Inzuchtstämme in der zentralen Tierversuchsanlage (ZVTE/TARC) der Johannes Gutenberg-Universität gezüchtet wurden. Die Haltung der Tiere erfolgte in Typ 2 Käfigen unter kontrolliert pathogenfreien Bedingungen, mit einem Tag/Nacht-Zyklus von je 12 Stunden, bei einer Raumtemperatur von 20 bis 24 °C. Futter und Wasser stand *ad libitum* zur Verfügung.

4.4.1 Genotypisierung von Mäusen

Da die KSRP-defizienten Mäuse keinen spezifischen Phänotyp aufwiesen, mussten die Tiere nach dem Entwöhnen von den Eltern genotypisiert werden. Mehrere Mäuse pro Käfig wurden zur Unterscheidung mit einer unterschiedlichen Anzahl an Löchern in den Ohren markiert. Die hierfür entnommenen Ohrstanzen wurden als Ausgangsmaterial für die DNA-Isolation (4.2.1) und die Typisierung mittels PCR (4.2.5) verwendet.

Mit Hilfe einer Multiplex-PCR und anschließender Agarose-Gelelektrophorese (4.2.6) wurde letztendlich überprüft, welchen Genotyp die Mäuse besitzen. Dabei wurden die Primer so gewählt, dass ein *reverse*-Primer an beide Allele in Exon 14 binden kann, während zwei verschiedene *forward*-Primer eingesetzt wurden, um wt- und ko-Allele spezifisch zu amplifizieren (Abbildung 4.2). Das für das wt-Allel spezifische Oligonukleotid bindet in Exon 13, welches in den ko-Mäusen deletiert ist. Im Gegensatz dazu bindet der *forward*-Primer zur Amplifikation des ko-Gens in Exon 1 und somit vor dem deletierten Bereich, so dass er zwar auch an das wt-Gen binden kann, die Elongationszeit der PCR allerdings nicht ausreicht, um den großen Abschnitt zu vervielfältigen (Exon 1-14). Für die PCR wurde der *REDTaq® ReadyMix™ PCR Reaction Mix* von Sigma-Aldrich verwendet, der Reaktionsansatz sowie die Reaktionsbedingungen sind den nachfolgenden Tabellen zu entnehmen (Tabelle 4.18 und Tabelle 4.19).

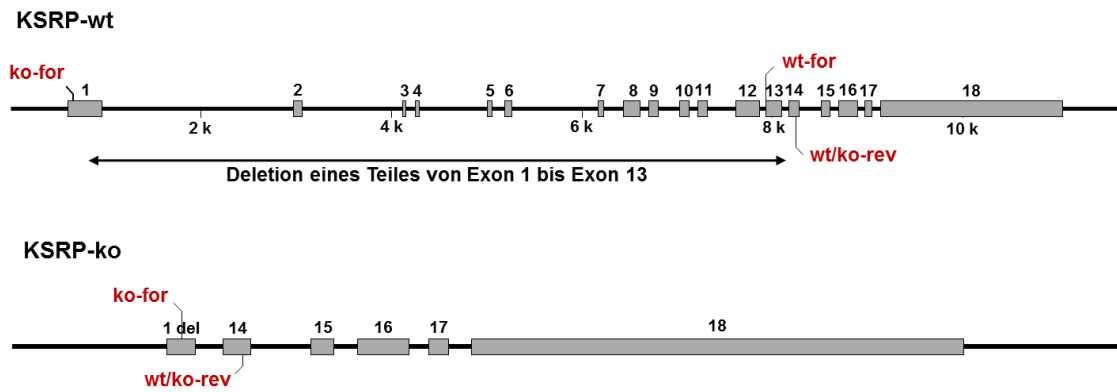


Abbildung 4.2: Schematische Darstellung des KSRP Gens in wt- und ko-Mäusen mit den jeweiligen Oligonukleotiden zur Genotypisierung.

Gezeigt ist jeweils die Genstruktur von KSRP in wt- (oben) und ko-Mäusen (unten). Graue Kästchen stellen Exons dar. In den KSRP-defizienten Tieren ist das 3'-Ende von Exon 1 sowie alle weiteren Exons bis Exon 13 deletiert. ko-for: Vorwärtsprimer für die ko-Typisierung, wt-for: Vorwärtsprimer für die wt-Typisierung, wt/ko-rev: Rückwärtsprimer, 1 del: Exon 1 mit der Deletion am 3'-Ende.

Tabelle 4.18: Reaktionsansatz für die KSRP-Typisierung

Komponente	V pro Ansatz
2 x REDTaq® ReadyMix™	12,5 µl
Vorwärts-Primer wt (10 pmol/µl)	1,5 µl
Vorwärts-Primer ko (10 pmol/µl)	1,5 µl
Rückwärts-Primer wt/ko (10 pmol/µl)	3 µl
DNA	3 µl
Wasser	3,5 µl
Gesamt	25 µl

Tabelle 4.19: Reaktionsbedingungen für die KSRP-Typisierung

Schritt	Temperatur	Zeit	Anzahl der Zyklen
Initiale Denaturierung	94 °C	3 min	1
Denaturierung	94 °C	0,5 min	
Annealing	60	1 min	35
Elongation	72 °C	1 min	
Finale Elongation	72 °C	7 min	1
Kühlung	8 °C	∞	1

Die PCR-Produkte wurden auf einem 2 %igen Agarosegel (4.2.6) aufgetrennt, wobei für wt-Mäuse eine Bande bei 300 bp detektiert wurde, während ko-Mäuse eine Bande bei 250 bp vorwiesen. Heterozygote Tiere zeigten dementsprechend zwei Banden, eine bei 300 bp und eine bei 250 bp.

4.4.2 Die Kollagen-Antikörper-induzierte Arthritis (CAIA) als Modell einer chronischen Entzündung

Als Mausmodell für die rheumatoide Arthritis wurde die Kollagen-Antikörper-induzierte Arthritis (*collagen-antibody-induced arthritis*, CAIA) verwendet (Kapitel 1.3.5). CII ist Bestandteil der extrazellulären Matrix der Knochen und des Knorpels und dient in diesem Tiermodell als Antigen zur Induktion der rheumatoiden Arthritis durch Auslösen einer adaptiven Immunantwort (Nandakumar, Svensson et al. 2003).

Den Mäusen wird hierbei ein Gemisch aus fünf monoklonalen Antikörpern (*Arthrogen-CIA 5 clone cocktail kit*, Amsbio) injiziert, die spezifisch an CII binden. Die Injektion von 100 µl Antikörper-Mix pro Maus in PBS (entspricht einer Konzentration von 2,54 mg) bzw. PBS als Kontrolle an Tag 0 erfolgte intravenös in die Schwanzvene, um eine möglichst gute Aufnahme zu gewährleisten. Zur Verstärkung der Immunreaktion erhielten die Antikörper-behandelten Tiere an Tag 3 nach der Immunisierung eine intraperitoneale LPS-Injektion von 50 µg pro Maus (*boost*). Die PBS-behandelten Tiere erhielten 0,9 % NaCl als Lösungsmittelkontrolle. Ab Tag 3 bis zum Versuchsende an Tag 9 wurden die Mäuse täglich auf sichtbare Veränderungen der Pfoten hin untersucht und anhand der Schwellungen der Arthritisindex (4.4.3) bestimmt.

4.4.3 Bestimmung des Arthritisindex

Um den Schweregrad der durch die Kollagen-Antikörper ausgelöste Arthritis zunächst optisch zu charakterisieren, wurden die Pfoten der CAIA-behandelten Mäuse täglich ab dem *Boost* an Tag 3 (4.4.2) auf sichtbare Schwellungen hin untersucht. Hierfür wurde vor allem auf Veränderungen im Bereich der Knöchel und Gelenke geachtet. Anhand der in Tabelle 4.20 aufgeführten Eigenschaften errechnete sich schließlich ein Index für jede Pfote, der für die vier Pfoten einer Maus aufaddiert wurde. Somit konnte eine Maus einen Arthritisindex von maximal 16 erreichen.

Tabelle 4.20: Merkmale zur Bestimmung des Arthritisindex

Index	Merkmale
0	keine Schwellung der Gelenke
1	Schwellung an einem Interphalangeal-Gelenk
2	Schwellung an 2-3 Interphalangeal-Gelenken
3	Schwellung des Knöchelbereichs und des Metatarsus/-carpus
4	extensive Schwellung der gesamten Pfote und eingeschränkte Beweglichkeit

4.4.4 Isolation von Peritonealmakrophagen

Zur Untersuchung der Genexpression verschiedener pro-inflammatorischer Mediatoren in Immunzellen wurden Zellen aus dem Bauchraum von Mäusen isoliert. Die Immunzellen, darunter Makrophagen, B- und T-Zellen, befinden sich sowohl in der Peritonealflüssigkeit als auch in der Membran des Peritonealraumes. Da die Zellen recht schnell zu isolieren sind und eine große Anzahl an naiven Makrophagen enthalten (Zhang, Goncalves et al. 2008; Ray and Dittel 2010), eignen sie sich besonders gut für mRNA-Expressionsanalysen auf der Ebene von Immunzellen.

Um die Peritonealzellen entnehmen zu können wurden die Mäuse zunächst durch zervikale Dislokation getötet und für die Präparation auf einem Präparationsblock fixiert. Der Bauch wurde mit 70 % EtOH gesäubert. Anschließend wurde die Außenhaut vom Bauch leicht angehoben und aufgeschnitten, wobei darauf geachtet wurde, dass die Innenhaut unbeschädigt blieb. Mit einer 27xG Nadel wurde 5 ml eiskaltes PBS mit 3 % FCS in den Bauchraum injiziert ohne dabei Gefäße oder Organe zu verletzen. Zum Ablösen der Zellen von der Membran und den Organen wurde der Bauch vorsichtig für 2-3 min massiert. Die Flüssigkeit mit den Zellen wurde nachfolgend mit einer 25xG Nadel wieder entnommen und in ein steriles 50 ml Reaktionsgefäß überführt. Der beschriebene Vorgang wurde mit 5 ml frischem PBS mit 3 % FCS wiederholt, um die Anzahl der isolierten Zellen zu erhöhen. Schließlich wurde die Innenhaut mit einem kleinen Schnitt geöffnet und die restliche Flüssigkeit mit einer Pipette entnommen. Die isolierten Zellen wurden für 8 min bei 1200 x g pelletiert, der Überstand verworfen und das Zellpellet in DMEM-Medium mit 3 % FCS resuspendiert. Nach dem Zählen der Zellen wurden diese für die weitere Behandlung auf 24-Lochplatten ausgesät (4.1.3). Die Zellen wurden zunächst für zwei Stunden bei 37 °C und 5 % CO₂-Zufuhr im Brutschrank kultiviert. Innerhalb dieser Zeit adhären die Monozyten und Makrophagen an den Boden der Kulturplatte, während T- und B-Zellen in der Suspension verbleiben. Die adhären Zellen wurden schließlich in GIT-Puffer (3.5.1) lysiert und bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

4.4.5 Histochemische Färbungen von Gelenkschnitten

Der allgemeine Nachweis von Immunzellen in den Pfoten CAIA-behandelter Mäuse erfolgte mittels histochemischer Färbungen von Gelenkschnitten. Alle histologischen Analysen dieser Arbeit wurden in Kooperation mit der Gewebe-Biobank (Pathologie der Universitätsmedizin Mainz) durchgeführt. Es wurde jeweils eine Hinterpfote pro Maus nach dem Versuchsende abgetrennt und in einer 4 %igen phosphatgepufferten Formaldehydlösung (pH 7, *Roti®-Histofix*, Roth) für mindestens 24 Stunden fixiert. Um ein Zusammenkrümmen der Zehen zu

verhindern und später saubere Schnitte zu gewährleisten, wurden die Pfoten dabei auf einem Styroporblock so befestigt, dass die einzelnen Zehen möglichst gestreckt waren. Anschließend wurden die Pfoten an die Pathologie übergeben. Dort erfolgte die Dekalzifizierung durch Inkubation in einer EDTA-Lösung für mehrere Tage, bevor die Proben schließlich entwässert wurden. Die Pfoten wurden in Paraffinblöcke eingebettet und mit einem Kryostaten wurden Schnitte von 5 µm Dicke angefertigt.

Zur Visualisierung der Immunzellen wurden Übersichtsfärbungen mit Hämatoxylin-Eosin (HE) durchgeführt. Dabei färbt der natürliche Farbstoff Hämatoxylin saure Strukturen wie DNA und RNA im Zellkern blau an, während der synthetische Farbstoff Eosin basische Plasmaproteine sowie Kollagen rot färbt. Somit entsteht im mikroskopischen Bild ein Kontrast zwischen Kern und Zytoplasma (Fischer, Jacobson et al. 2008). Die HE-Färbung lässt daher Aussagen über die Gewebestruktur und die Anzahl an Zellen in einem Gewebe zu.

4.5 Statistik

Alle dargestellten Daten repräsentieren den Mittelwert \pm den Standardfehler (*standard error of the mean*, SEM). Die statistischen Auswertungen wurden mit *GraphPad PRISM 5.02* durchgeführt. Dabei wurde für den Vergleich zweier Gruppen eine ttest-Analyse und beim Vergleich mehrerer Gruppen eine ANOVA (*analysis of variance*) durchgeführt. Weiterhin wurde der *Dunnett's multiple comparison test* („all columns vs. control column“) bzw. der *Bonferroni's multiple comparison test* („all columns vs. all columns“) verwendet.

5 Ergebnisse

5.1 Regulation der KSRP-Expression

Aufgrund der vielfältigen beschriebenen Funktionen ist KSRP ein wichtiger Modulator der Genexpression und scheint nachweislich in Erkrankungen eine Rolle zu spielen (Kapitel 1.2 und 1.2.3). Kenntnisse über die Regulation der KSRP-Expression und über mögliche Faktoren, die diese beeinflussen, können dabei helfen, Ansatzpunkte für Therapiemethoden verschiedener Krankheiten zu entwickeln, in deren Pathogenese KSRP involviert ist (Briata, Bordo et al. 2016). Bisher ist jedoch nur wenig über mögliche Mechanismen bekannt, welche die KSRP-Expression positiv oder negativ verändern können. Der erste Teil dieser Arbeit beschäftigt sich deshalb mit der Regulation der transkriptionellen sowie der posttranskriptionellen KSRP-Expression. Hierfür wurde die Promotorregion zunächst mit Hilfe von bioinformatischen Analysen eingegrenzt und potentielle Bereiche identifiziert, die für die Transkription essentiell zu sein scheinen. Diese Abschnitte wurden anschließend in einen pGI4-Luciferase-Expressionsvektor kloniert (4.2.8) und in Luciferase Reporter-Gen-Assays (4.3.7) analysiert. Durch das Einfügen verschiedener Deletionen in der Promotorsequenz, konnte der für die Transkriptionsinitiation wichtige Bereich festgelegt werden. Weiterhin wurden Pulldown-Analysen (4.3.8) durchgeführt, um Transkriptionsfaktoren zu identifizieren, die in diesem Bereich an den KSRP Promotor binden. Auf posttranskriptioneller Ebene wurde die Rolle der KSRP 3'-UTR für die Regulation analysiert. Dafür wurden unterschiedlich große 3'-UTR-Fragmente in einen pGI3-Expressionsvektor kloniert (4.2.8) und ebenfalls in Reporter-Gen-Assays (4.3.7) untersucht. RNA-BPs, die an die AU-reichen Elemente in der KSRP 3'-UTR binden, wurden mittels Pulldown (4.3.8) und nachfolgenden Western Blot-Analysen (4.3.6) identifiziert.

5.1.1 Charakterisierung und Eingrenzung der KSRP Promotorregion mit Hilfe von Datenbankanalysen

Die Regulation der KSRP Promotoraktivität ist bisher kaum erforscht. Es gibt lediglich Hinweise darauf, dass die Expression auf transkriptioneller Ebene durch BRCA1 negativ beeinflusst wird, wobei die Menge der gemessenen KSRP-Transkripte in BRCA1-defizienten Zellen erhöht ist (Santarosa, Del Col et al. 2010). Um weitere Hinweise darauf zu erhalten, wie die Expression von KSRP reguliert wird, wurde die Promotorregion zunächst identifiziert und auf einen Bereich eingegrenzt, der für die Transkription essentiell zu sein scheint. Für solche Analysen eignen sich besonders Datenbanken, die Zugriff auf Sequenzdaten bieten, welche mit verschiedenen Methoden generiert wurden. Diese Daten sind meist online verfügbar und

können mit Hilfe von bioinformatischen Werkzeugen analysiert und ausgewertet werden. Beispielsweise stellt der *UCSC Genome Browser (University of California, Santa Cruz)* (<https://genome.ucsc.edu/>) ein wichtiges Hilfsmittel dar, um potentielle Genstrukturen zu identifizieren oder Expressionsdaten zu analysieren. Dieser Browser gewährt Zugriff auf eine große Menge an assemblierten Sequenzdaten einer Vielfalt an Spezies (Vertebraten und Invertebraten) (Kent, Sugnet et al. 2002; Kuhn, Karolchik et al. 2009; Fujita, Rhead et al. 2011). Die Datenbank beinhaltet vorwiegend Daten des ENCODE-Projekts (*Encyclopedia of DNA Elements*), das es sich zum Ziel gemacht hat, alle funktionellen Elemente des menschlichen Genoms zu lokalisieren und zu charakterisieren (Consortium 2004; Rosenbloom, Dreszer et al. 2010). Die durch Methoden wie ChIP-Seq (*Chromatin Immunoprecipitation Sequencing*), FAIRE-Seq (*Formaldehyde-Assisted Isolation of Regulatory Elements*) und RNA-Seq gewonnenen Daten stehen im *Genome Browser* zur Verfügung, wobei die Analysen meistens in mehreren Zelllinien durchgeführt wurden. Weiterhin sind annotierte DNA-Sequenzen, Transkript- und Protein-Daten der *Reference Sequence (RefSeq)*-Kollektion hinterlegt. Die so zusammengefassten Daten ermöglichen es, regulatorische Elemente zu identifizieren, die auf verschiedenen Ebenen der Genexpression agieren.

Um die Promotorregion des KSRP Gens zu definieren, wurde der Genlokus mit Hilfe des *Genome Browsers*, hinsichtlich entsprechender Elemente untersucht, die einen potentiellen Promotor charakterisieren (Abbildung 5.1). Dazu zählen vor allem spezifische Histonmodifikationen und CpG-Inseln (vgl. Kapitel 1.1.1). Beispielsweise findet sich eine Methylierung des vierten Lysins des Histon 3 (H3K4Me1) bzw. eine Acetylierung des Lysin 27 (H3K27Ac) in der Nähe von aktiven regulatorischen Elementen, wie *Enhancer*, während die dreifache Methylierung des Lysin 4 (H3K4Me3) oftmals Promotor indiziert.

Das humane KSRP Gen ist auf dem reversen Strang des Chromosom 19 lokalisiert und besteht aus 20 Exons und 19 Introns. Abbildung 5.1 (oben) zeigt, dass das Gen in einer Region lokalisiert ist, die eine hohe Gendichte besitzt. Stromaufwärts befindet sich in unmittelbarer Umgebung das SLC25A41-Gen, während stromabwärts ein Gen mit der Bezeichnung BC171868 zu finden ist. Auffällig ist außerdem, dass innerhalb von Exon 14 und Intron 14 eine Sequenz liegt, die für eine miRNA kodiert (miR-3940). Der potentielle Promotorbereich, der in Abbildung 5.1 (unten) vergrößert dargestellt ist, kennzeichnet sich durch die zuvor genannten Histonmodifikationen. Anhand dieser lässt sich die Sequenz, die für die KSRP-Transkription von Bedeutung sein könnte, auf einen Bereich eingrenzen, der zum einen bis zu 3 kb stromaufwärts des Exon 1 lokalisiert ist, zum anderen aber auch in das erste Exon und Teile des ersten Introns hineinragt. Dies spricht für einen teilweise geninternen Promotor. Unterstützt wird diese Annahme durch das Vorhandensein von CpG-Inseln in derselben Region, die ebenfalls auf Promotoraktivität hindeuten. Für die 3 kb Sequenz stromaufwärts

des Exon 1 konnte Julia Art, im Rahmen ihrer Dissertation, mit Hilfe von Reporteranalysen bereits Promotoraktivität nachweisen (Art 2012).

Des Weiteren wird in Abbildung 5.1 deutlich, dass der mögliche KSRP Promotor mit der Sequenz des SLC25A41-Gens interferiert, was unter Umständen die Expression von KSRP beeinflussen könnte.

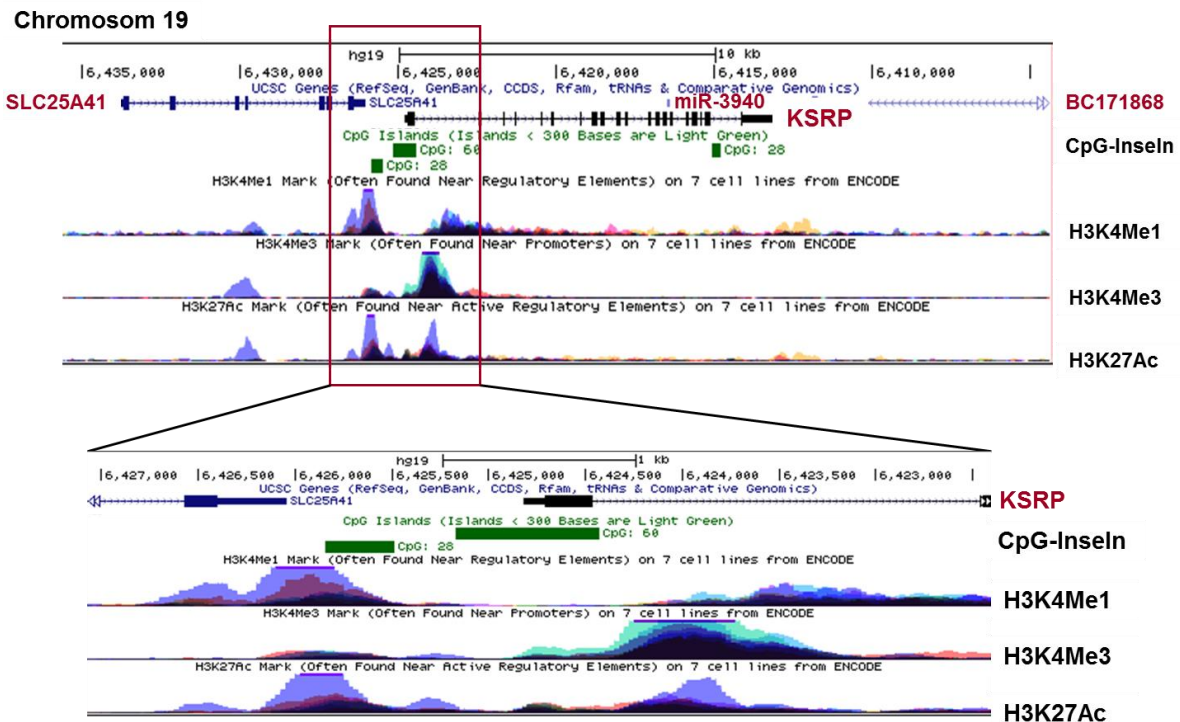


Abbildung 5.1: Schematische Darstellung des KSRP Genlokus und der potentiellen Promotorregion.

Gezeigt ist die Analyse des KSRP Genlokus auf Chromosom 19 mit Hilfe des UCSC Genome Browsers (oben) sowie in der Vergrößerung den putativen KSRP Promotor (unten). Zur Vereinfachung der Darstellung sind lediglich Histonmodifikationen, die einen aktiven Promotor oder regulatorische Elemente indizieren (H3K4Me1, H3K4Me3, H3K27Ac), sowie das Vorhandensein von CpG-Inseln angegeben.

5.1.2 Das KSRP Gen weist eine definierte Transkriptionsstartstelle (TSS) auf

Um Aussagen über die Regulation eines Gens machen zu können, ist es wichtig, neben der Lage des Promotors, auch die Transkriptionsstartstelle (TSS) zu kennen, da viele Elemente des Kernpromotors in direkter Umgebung der TSS lokalisiert sind (vgl. Abbildung 1.1, Kapitel 1.1.1). Für KSRP ist bisher keine eindeutige TSS publiziert, allerdings gibt es auch hierfür frei zugängliche Datenbanken, die z.B. Daten aus CAGE- (*cap analysis of gene expression*) oder GRO-seq-Analysen (*Global Nuclear Run-On sequencing*) beinhalten. Mit Hilfe der GRO-cap können TSS von stabilen und instabilen Transkripten, abhängig von der *cap*-Struktur identifiziert werden. Die Gruppe um Core et al. hat GRO-cap und GRO-seq Bibliotheken von humanen lymphoblastoiden B-Zellen (GM12878) und myelogenen Leukämiezellen (K562)

erstellt und die Daten im *Sequence Read Archive* (SRA) verfügbar gemacht (Core, Martins et al. 2014). Zur Identifizierung der KSRP TSS wurde die Nukleotidsequenz der putativen KSRP Promotorsequenz (bis etwa 3 kb stromaufwärts des Translationsstarts ATG) gegen die SRA-Datenbank geblastet (*Basic Local Alignment Search Tool*, BLASTn). Dabei wurde jeder Nukleotidposition die Anzahl an GRO-cap-Fragmenten zugeordnet, die identifiziert wurden. Dabei gilt, je größer die Anzahl an Fragmenten, desto wahrscheinlicher handelt es sich um eine TSS. Die Position mit den meisten Fragmenten wurde als Haupt-TSS definiert (+1) (Abbildung 5.2).

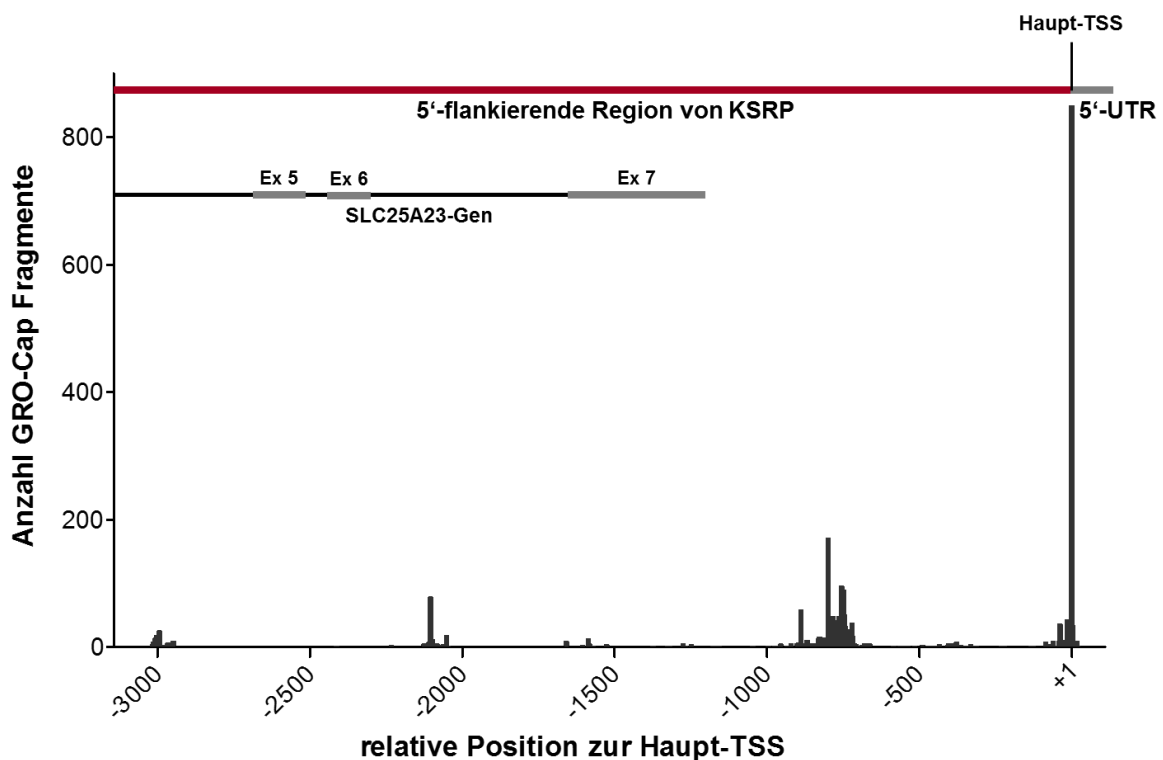


Abbildung 5.2: GRO-cap-Analyse der putativen KSRP Promotorregion zur Identifizierung der TSS.

Graphisch dargestellt ist das Ergebnis der BLASTn-Analyse gegen die SRA-Datenbank, welche Sequenzdaten aus GRO-cap und GRO-seq Bibliotheken von GM12878- und K562-Zellen beinhaltet. Untersucht wurde die KSRP-Sequenz etwa 3 kb stromaufwärts des Exon 1 bis zum Translationsstart (ATG). Die Position, welcher am meisten Cro-cap-Fragmente zugeordnet wurden, wurde als Haupt-TSS festgelegt und als Position +1 definiert. Hiervon ausgehend wurden alle weiteren Basen durchnummeriert (~-3100 bis +108).

In Abbildung 5.2 ist zu erkennen, dass es zwei Regionen gab, die eine große Unterstützung durch GRO-cap-Fragmente aufwiesen. Dabei war die Anzahl der Alignments für die +1-Position mit mehr als 800 Fragmenten mit Abstand am größten. Somit kann angenommen werden, dass die Transkription an dieser Stelle initiiert wird. Der Abschnitt zwischen den Positionen -500 und -1000 wies dennoch bis zu 200 zugehörige Fragmente auf.

Außerdem wird in Abbildung 5.2 erneut deutlich, dass sich in etwa die Hälfte der stromaufwärts des Exon 1 liegenden putativen KSRP Promotorsequenz mit der Gensequenz von SLC25A23 überlagert.

5.1.3 Ein kurzes Promotorfragment von 245 bp stromaufwärts des Exon 1 von KSRP ist wichtig für die Expression der Luciferase

Bisherige Analysen der AG Kleinert zeigten bereits, dass der 3 kb Promotor, kloniert in ein pGI4luc Plasmid, in Reporteragen-Assays (4.3.7) eine deutliche Luciferaseaktivität hervorruft (Art 2012). Diese änderte sich im Wesentlichen nicht, wenn das 3 kb-Fragment vom 5'-Ende her verkürzt wurde (2 kb, 1 kb, 800 bp, 450 bp und 245 bp). Die Transfektion des Plasmids mit der kürzesten Promotorsequenz von 245 bp führte zu einer erhöhten Aktivität, verglichen mit der Transfektion des 3 kb Promotors, wodurch dieser Bereich für die Transkription wichtig erscheint. Im Rahmen dieser Arbeit sollten die Daten reproduziert und die Promotorregion genauer untersucht werden. Hierfür wurde das 245 bp-Fragment zunächst noch weiter verkürzt, um ein 50 bp langes Fragment zu erhalten. Die Deletion erfolgte mit dem QC-Protokoll (4.2.5.2), ausgehend vom Plasmid pGI4luc KSRPprom 245 bp (Tabelle 3.13). Die Oligonukleotidsequenzen für die QC-PCR sind der Tabelle 3.17 zu entnehmen.

Für die Luciferase Reporteragen-Assays wurden DLD-1-Zellen mit den Plasmiden pGI4luc KSRPprom 3 kb, pGI4luc KSRPprom 2 kb, pGI4luc KSRPprom 1 kb, pGI4luc KSRPprom 800 bp, pGI4luc KSRPprom 450 bp, pGI4luc KSRPprom 245 bp, pGI4luc KSRPprom 50 bp transient transfiziert (4.1.6.1). Zur Kontrolle der Transfektionseffizienz und zur späteren Normierung wurde der Vektor pRLEF1 α kotransfiziert. Zur Auswertung der Luciferase-Assays (4.3.7) wurden die gemessenen Werte für die *Firefly*-Luciferase durch die Werte der Renilla-Luciferase geteilt und auf die Aktivitäten der mit dem pGI4luc KSRPprom 3 kb-Plasmid transfizierten Zellen bezogen.

Es ist zu beachten, dass sich alle untersuchten Fragmente am 3'-Ende und somit in der Umgebung des Translationsstarts der Luciferase nicht unterschieden haben. Die Promotorplasmide beinhalten jeweils 16 bp der zuvor definierten KSRP 5'-UTR (5.1.2) sowie 21 bp Plasmid-DNA vor dem Luciferasegen (schematisch dargestellt in Abbildung 5.3).

Die vorangegangenen Analysen der AG Kleinert konnten damit bestätigt werden. Alle analysierten Fragmente zwischen 3 kb und 245 bp induzierten eine deutliche Luciferaseaktivität, während die Transfektion der Negativkontrolle (pGI4luc, Luciferaseplasmid ohne Promotorsequenz) keine Aktivität hervorrief. Demnach konnte gezeigt werden, dass es sich bei den untersuchten Sequenzen um Promotorabschnitte handelte. Die gemessenen Aktivitäten für die Transfektion der 2 kb-, 450 bp- und 245 bp-Fragmente waren im Vergleich zum 3 kb Promotor signifikant erhöht (etwa 1,5-fach) (Abbildung 5.3). Unter der Kontrolle der 1 kb und 800 bp Promotorfragmente war die Luciferaseaktivität, verglichen mit dem 3 kb-Fragment, nicht signifikant verschieden. Die Daten zeigen somit, dass das 245 bp-Fragment als Promotorstruktur anscheinend ausreicht, um die Transkription des Luciferase

Reportergens zu initiieren. Dagegen war die Luciferaseaktivität unter der Kontrolle der kurzen Sequenz von 50 bp mit lediglich 25 % der Aktivität des 3 kb Promotors stark verringert und fast auf dem Niveau der Negativkontrolle pGI4luc (n.s.).

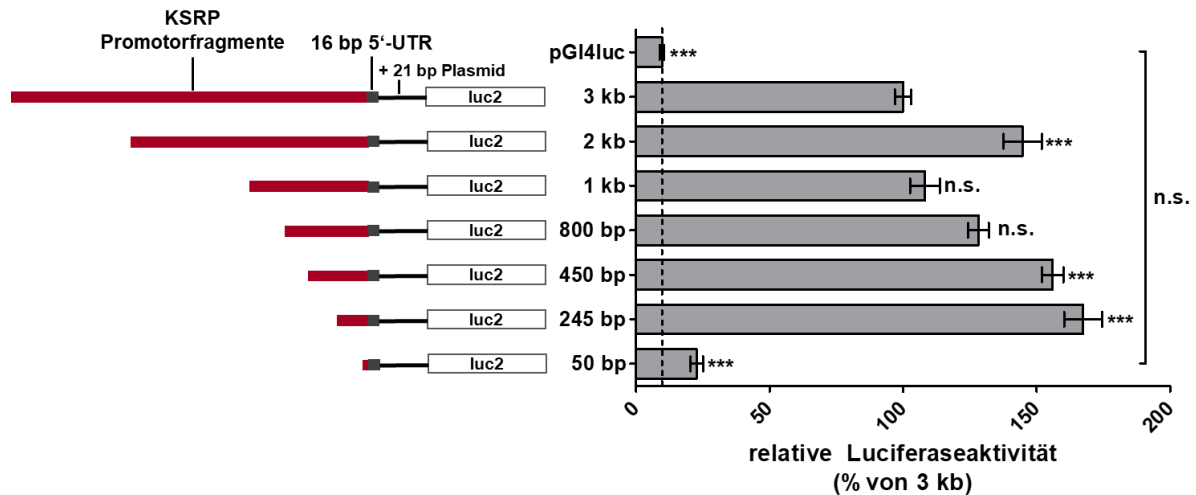


Abbildung 5.3: Analyse der Effekte verschiedener Promotordeletionen des KSRP Promotors auf die Luciferaseaktivität.

DLD-1-Zellen wurden transient mit den Plasmiden pGI4luc, pGI4luc KSRPprom 3 kb, pGI4luc KSRPprom 2 kb, pGI4luc KSRPprom 1 kb, pGI4luc KSRPprom 800 bp, pGI4luc KSRPprom 450 bp, pGI4luc KSRPprom 245 bp, pGI4luc KSRPprom 50 bp transfiziert. Zur Normierung der Daten wurde das pRLEF1 α -Plasmid mit der Renilla-Luciferase kotransfiziert. Die Zellen wurden nach 24 Stunden in 200 μ l PLB pro Loch lysiert und die Firefly- sowie die Renillaaktivität gemessen. Zur Auswertung wurden die Fireflywerte auf die entsprechenden Renillawerte normiert. Dargestellt ist die Zusammenfassung aus unabhängigen Messungen mit 3-6 Replikaten pro Plasmid. Die Säulen zeigen die relative Luciferaseaktivität (Mittelwert \pm SEM) bezogen auf die Aktivität von pGI4luc KSRPprom 3 kb transfizierten Zellen (***: $p < 0,001$; n.s.: nicht signifikant verschieden; One-way ANOVA).

Wichtige Elemente zur Expression der Luciferase scheinen somit in den ersten 245 bp stromaufwärts des ersten Exons zu liegen, was im Folgenden genauer analysiert werden sollte. Hierfür wurde das 3'-Ende der Promotorfragmente 3 kb, 2 kb, 1 kb, 800 bp und 450 bp in den pGI4luc-Plasmiden ausgehend von der TSS um 245 bp verkürzt, so dass die kurze Promotorsequenz entfernt wurde, während die 16 bp der 5'-UTR inklusive der TSS bestehen blieben. Die Umgebung des Translationsstarts der Luciferase blieb unverändert (Abbildung 5.4, A). Zur Generierung der Deletion wurde die QC-Methode mit den in Tabelle 3.17 genannten Oligonukleotiden und den jeweiligen Ausgangsplasmiden (Tabelle 3.13) verwendet. Die Plasmide wurden schließlich in Reporteranalysen eingesetzt (4.3.7).

In Abbildung 5.4 (B) sind die Luciferaseaktivitäten dargestellt, die aus der Transfektion von DLD-1-Zellen mit den Deletionsplasmiden sowie den zugehörigen Kontrollen resultierten. Dabei wurden jeweils die Kontrollplasmide auf 100 % gesetzt. Trotz der Deletion der 245 bp Sequenz konnte in allen Fällen noch Luciferaseaktivität gemessen werden, die in pGI4luc KSRPprom 3 kb Del 245 bp transfizierten Zellen sogar signifikant auf fast 150 % gesteigert war. Zwischen den Fragmenten 2 kb Del245 sowie 800 bp Del245 und den jeweiligen

Kontrollen gab es dagegen keinen Unterschied. Signifikant verringerte Luciferaseaktivitäten konnten für die pGI4luc KSRPprom 1 kb Del245 und pGI4luc KSRPprom 450 bp Del245 im Vergleich zu den Kontrollen nachgewiesen werden. Die Aktivität war in den pGI4luc KSRPprom 450 bp Del245 auf etwa die Hälfte reduziert.

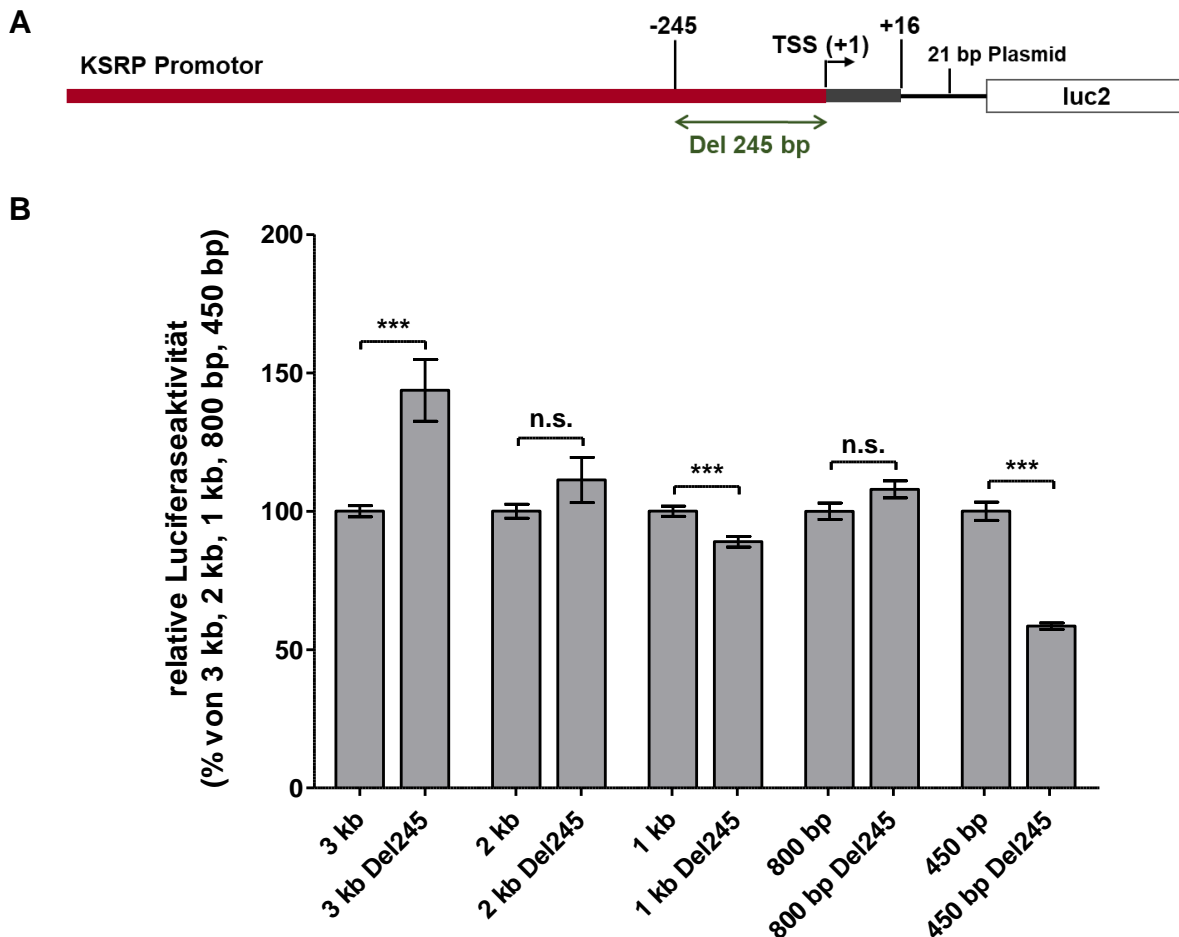


Abbildung 5.4: Deletion des 3'-Endes verschiedener Promotorfragmente in pGI4luc-Plasmiden und Untersuchung der Effekte auf die Luciferaseaktivität.

(A) Schematische Darstellung der Deletion von 245 bp am 3'-Ende der Promotorfragmente in den Plasmiden pGI4luc KSRPprom 3 kb, pGI4luc KSRPprom 2 kb, pGI4luc KSRPprom 1 kb, pGI4luc KSRPprom 800 bp und pGI4luc KSRPprom 450 bp. Die Deletion wurde mit Hilfe der QC-Methode hergestellt; TSS: Transkriptionsstartstelle.

(B) DLD-1-Zellen wurden mit den Kontrollplasmiden pGI4luc KSRPprom 3 kb, pGI4luc KSRPprom 2 kb, pGI4luc KSRPprom 1 kb, pGI4luc KSRPprom 800 bp, pGI4luc KSRPprom 450 bp sowie den jeweiligen Deletionsplasmiden (Del245) transient transfiziert. Zur Ermittlung der Transfektionseffizienz wurde das pRLEF1 α -Plasmid kotransfiziert. Nach 24 Stunden wurden die Zellen mit 200 μ l PLB lysiert und anschließend die Luciferaseaktivitäten gemessen. Die Fireflywerte wurden jeweils auf die dazugehörigen Renillawerte normiert. Dargestellt ist die Zusammenfassung aus 2-5 unabhängigen Experimenten mit jeweils 4-6 Messungen pro Gruppe. Die Säulen (Mittelwert \pm SEM) repräsentieren relative Luciferaseaktivitäten, wobei jeweils die Kontrollplasmide auf 100 % gesetzt wurden (***: $p < 0,001$; n.s.: nicht signifikant verschieden, ttest).

Die Daten lassen darauf schließen, dass die kurze Promotorsequenz von 245 bp nicht unbedingt notwendig ist für die Expression der Luciferase. Allerdings sollte hier beachtet werden, dass die 245 bp-Deletion nicht das 16 bp 5'-UTR-Fragment inklusive der TSS einschließt, so dass dieser Teil weiterhin in allen untersuchten Plasmiden vorhanden war und

somit Einfluss auf die Luciferaseaktivität haben könnte. Aus diesem Grund wurden im weiteren Verlauf Konstrukte generiert, bei welchen die TSS sowie die umgebenden 15 bp entfernt wurden (delTSS). Hierfür wurden QC-PCRs auf die Plasmide pGI4luc KSRPprom 3 kb, pGI4luc KSRPprom 450 bp und pGI4luc KSRPprom 245 bp (Tabelle 3.13) mit den Oligonukleotiden QC_KSRPprom_delTSS_5P1/3P1 (Tabelle 3.17) durchgeführt (4.2.5.2). Des Weiteren wurde in den Del245-Klonen ebenfalls die TSS mittels QC unter Verwendung der Plasmide pGI4luc KSRPprom 3 kb Del245 sowie pGI4luc KSRPprom 450 bp Del245 (Tabelle 3.13) und den Oligonukleotiden QC_KSRPprom_del245_delTSS_5P1/3P1 (Tabelle 3.17) deletiert.

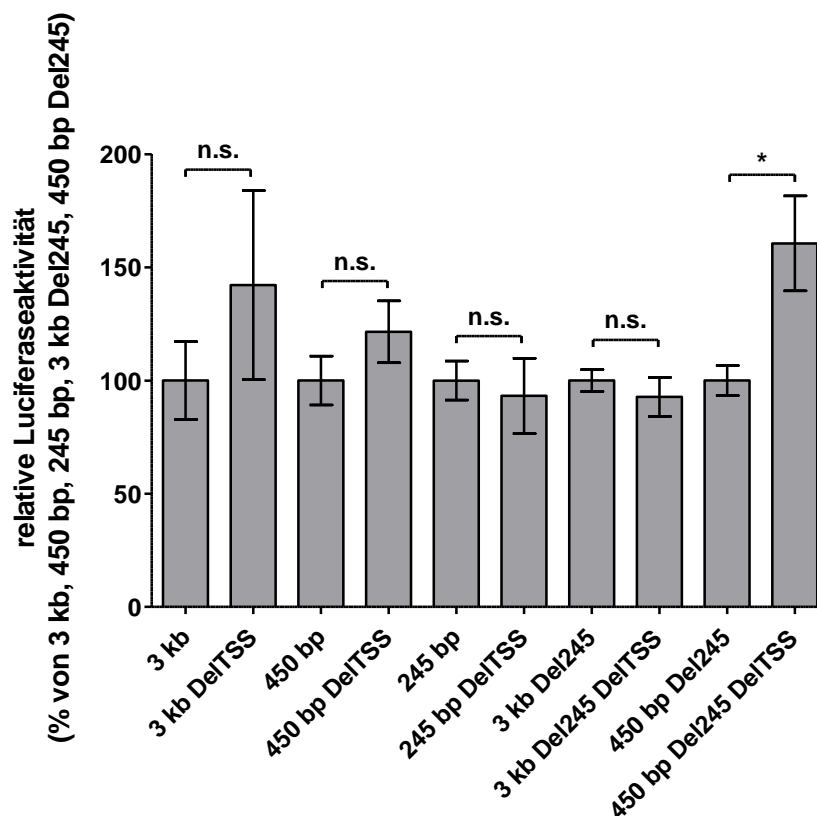


Abbildung 5.5: Analyse der Effekte der TSS-Deletion auf die Aktivität der Luciferase.

DLD-1-Zellen wurden mit den Plasmiden pGI4luc KSRPprom 3 kb, pGI4luc KSRPprom 3 kb delTSS, pGI4luc KSRPprom 450 bp, pGI4luc KSRPprom 450 bp delTSS, pGI4luc KSRPprom 245 bp, pGI4luc KSRPprom 245 bp delTSS, pGI4luc KSRPprom 3 kb Del245, pGI4luc KSRPprom 3 kb Del245 delTSS, pGI4luc KSRPprom 450 bp Del245 und pGI4luc KSRPprom 450 bp Del245 delTSS transient transfiziert. Zur Normierung der Daten wurde das pRLEF1 α -Plasmid mit der Renilla-Luciferase kotransfiziert. Die Zellen wurden nach 24 Stunden in 200 μ l PLB pro Loch lysiert und die Firefly- sowie die Renillaaktivitäten gemessen. Zur Auswertung wurden die Fireflywerte auf die entsprechenden Renillawerte normiert. Dargestellt ist die Zusammenfassung aus 2-5 unabhängigen Messungen mit 4 Replikaten pro Plasmid. Die Säulen (Mittelwert \pm SEM) repräsentieren relative Luciferaseaktivitäten, wobei jeweils die Kontrollplasmide ohne TSS-Deletion auf 100 % gesetzt wurden (*: $p < 0,05$; n.s.: nicht signifikant verschieden, ttest).

Abbildung 5.5 zeigt, dass die Deletion der TSS weitestgehend keinen Einfluss auf die Aktivität der Luciferase hatte, verglichen mit den entsprechenden Kontrollplasmiden, in welchen die TSS noch vorhanden war. Um einen direkten Vergleich zu ermöglichen, wurde die Aktivität

der Kontrollen auf 100 % gesetzt und die durch die Deletionskonstrukte hervorgerufene Luciferaseexpression jeweils auf die zugehörige Kontrolltransfektion bezogen. Entgegen der Erwartungen hatte die Deletion der TSS entweder keine oder eine tendenziell erhöhte Luciferaseaktivität zur Folge (3 kb und 3 kb DelTSS, bzw. 450 bp und 450 bp DelTSS). Die Entfernung der TSS vom 450 bp Del245-Fragment (450 bp Del245 DelTSS) führte sogar zu einer signifikanten Aktivitätserhöhung auf 161 % im Vergleich zu pGI4luc KSRPprom 450 bp Del245 transfizierten Zellen (100 %). Demnach scheint die Sequenz in direkter Umgebung der TSS sowie die TSS selbst nicht für die Transkription von KSRP essentiell zu sein. Vielmehr könnten in diesem Bereich regulatorische Elemente lokalisiert sein, welche die KSRP-Expression entweder auf transkriptioneller oder auf translationaler Ebene negativ beeinflussen.

5.1.4 Die KSRP 5'-UTR spielt für die KSRP-Expression eine Rolle

Die bisher beschriebenen funktionellen Analysen des KSRP Promotors beschränken sich auf den stromaufwärts des Exon 1 liegenden Sequenzabschnitt von etwa 3 kb. Die Untersuchung des KSRP Genlokus hinsichtlich Histonmodifikationen, die typisch für regulatorische Elemente sind, hat jedoch gezeigt, dass potentielle Promotorabschnitte auch innerhalb der Gensequenz zu finden sein könnten. Diese Vermutung wird durch das Vorhandensein von CpG-Inseln unterstützt, die bis in das erste KSRP Intron hineinragen (Kapitel 5.1.1, Abbildung 5.1). Weiterhin ist bekannt, dass verschiedene Elemente des Kernpromotors, die für die Initiation der Transkription von Bedeutung sind, meist in unmittelbarer Nähe zur TSS zu finden sind. Dadurch kann auch der 5'-UTR eines Gens eine Rolle in der Transkriptionsregulation zukommen (Kapitel 1.1.1). Aufgrund dessen sollte im Folgenden die Relevanz der KSRP 5'-UTR für die Regulation der Expression genauer untersucht werden.

5.1.4.1 Die Kombination aus der kurzen Promotorsequenz und der 5'UTR führt zu einer 10-fach erhöhten Luciferaseaktivität

Die Rolle der 5'-UTR für die KSRP-Expression wurde mittels Luciferase Aktivitätsmessungen analysiert (4.3.7). Hierfür wurden Plasmide generiert, die verschieden lange Promotor Abschnitte (3 kb, 245 bp, 120 bp, und 50 bp) in Kombination mit der 5'-UTR vor der Gensequenz einer Luciferase haben (Abbildung 5.6). Eine Zusammenfassung der jeweiligen Klonierungsstrategien ist in Tabelle 5.1 dargelegt. Die Sequenzen der verwendeten Oligonukleotide zur Klonierung sind der Tabelle 3.17 zu entnehmen.



Abbildung 5.6: Schematische Darstellung der KSRP Promotorplasmide mit der 5'-UTR-Sequenz.

Das Schema zeigt die Zusammensetzung der Luciferaseplasmide mit den unterschiedlichen KSRP Promotorsequenzen inklusive der 108 bp langen 5'-UTR stromaufwärts der Luciferase. +1 zeigt die Lage der Transkriptionsstartstelle an.

Tabelle 5.1: Strategien zur Klonierung der KSRPprom 5'-UTR-Plasmide

Plasmid	Art der Klonierung	Oligonukleotide / Enzyme	Ausgangsplasmid
pGI4luc KSRP 5'-UTR	PCR / Restriktion	hKSRP 5'-UTR_5P1, hKSRP 5'-UTR_3P1 / HindIII, NcoI	pGI4luc
pGI4luc KSRPprom 3 kb 5'-UTR	Restriktion	Sac I	pGI4luc KSRPprom 245 bp 5'-UTR, pGI4luc KSRPprom 3 kb
pGI4luc KSRPprom 245 bp 5'-UTR	PCR / Restriktion	hKSRPprom 5'-UTR_5P2, hKSRP 5'-UTR_3P1 / BglII, NcoI	pGI4luc
pGI4luc KSRPprom 120 bp 5'-UTR	QC-PCR	QC_KSRPprom 120 bp_5P1, QC_KSRPprom 120 bp_3P1	pGI4luc KSRPprom 245 bp 5'-UTR
pGI4luc KSRPprom 50 bp 5'-UTR	QC-PCR	QC_KSRPprom 50 bp_5P1, QC_KSRPprom 50 bp_3P1	pGI4luc KSRPprom 245 bp 5'-UTR

Die transiente Transfektion von DLD-1-Zellen mit den verschiedenen 5'-UTR-Plasmiden und die nachfolgenden Reportergerananalysen haben gezeigt, dass die KSRP 5'-UTR einen deutlichen Effekt auf die Luciferaseaktivität ausübt (Abbildung 5.7). Vor allem die Transfektion des pGI4luc Plasmids, mit der kurzen 245 bp Promotorsequenz in Kombination mit der 5'-UTR, hatte eine mehr als 10-fach erhöhte Aktivität auf 1200 % zur Folge, verglichen mit dem entsprechenden 245 bp-Fragment ohne 5'-UTR. Auch bei allen weiteren Plasmiden hatte das Vorhandensein der 5'-UTR einen positiven Effekt auf die Promotor-vermittelte Luciferaseaktivität, obwohl die gemessenen Werte deutlich niedriger waren als bei den mit pGI4luc KSRPprom 245 bp 5'-UTR transfizierten Zellen. Unter der Kontrolle des 3 kb Promotors, in Kombination mit der 5'-UTR, betrug die Aktivität 600 %. Für den 120 bp Promotor mit 5'-UTR wurde eine Luciferaseaktivität von etwa 750 % gemessen, jeweils bezogen auf die Aktivität von pGI4luc KSRPprom 3 kb transfizierte Zellen. Interessant ist, dass

sogar der 50 bp Promotor, welcher alleine die Expression der Luciferase kaum induzieren konnte (vgl. Abbildung 5.3), durch die Unterstützung der 5'-UTR eine deutliche Luciferaseaktivität von mehr als 200 % bezogen auf den 3 kb Promotor aufwies (Abbildung 5.7, KSRPprom 50 bp 5'-UTR). Die 5'-UTR alleine hatte nur einen geringen Effekt auf die Luciferaseaktivität. Mit durchschnittlich 40 % lagen die Werte nur gering über der Negativkontrolle pGI4luc.

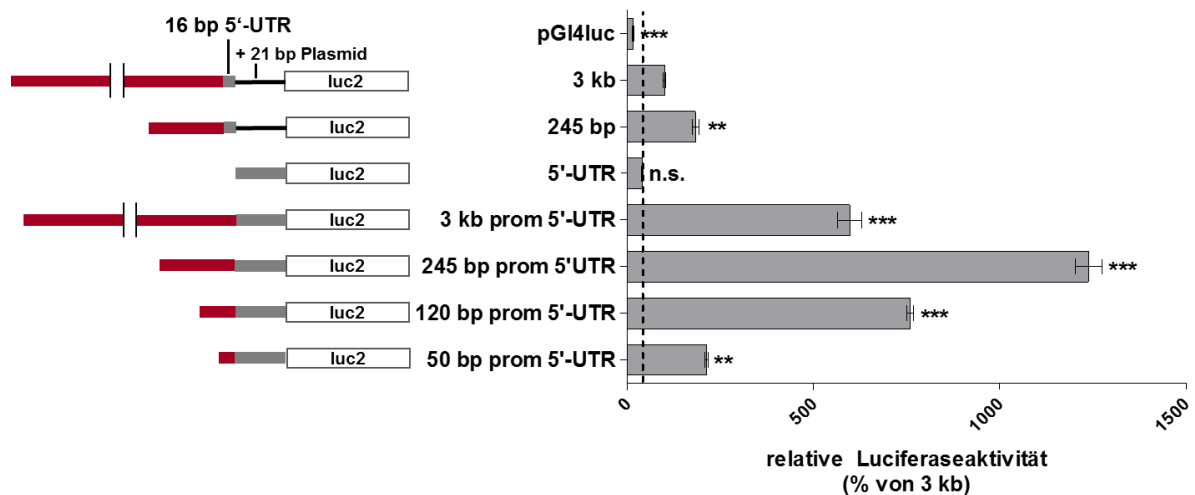


Abbildung 5.7: Luciferase Aktivitätsmessung unter der Kontrolle verschiedener KSRPprom 5'-UTR Abschnitte.

DLD-1-Zellen wurden transient mit den Plasmiden pGI4luc, pGI4luc KSRPprom 3 kb, pGI4luc KSRPprom 245 bp, pGI4luc KSRP 5'-UTR, pGI4luc KSRPprom 3 kb 5'-UTR, pGI4luc KSRPprom 245 bp 5'-UTR, pGI4luc KSRPprom 120 bp 5'-UTR und pGI4luc KSRPprom 50 bp 5'-UTR transient transfiziert. Zur Normierung der Werte wurde das pRLEF1 α -Plasmid mit der Renilla-Luciferase kotransfiziert. Die Zellen wurden nach 24 Stunden in 200 μ l PLB pro Ansatz lysiert und die Luciferaseaktivitäten gemessen. Zur Auswertung wurden die Fireflywerte auf die entsprechenden Renillawerte normiert. Dargestellt ist die Zusammenfassung aus 2-8 unabhängigen Messungen mit 4-6 Replikaten pro Plasmid. Die Säulen zeigen die relativen Luciferaseaktivitäten (Mittelwert \pm SEM) bezogen auf die Aktivität von pGI4luc KSRPprom 3 kb transfizierten Zellen (***: $p < 0,001$; **: $p < 0,01$; n.s.: nicht signifikant verschieden vs. pGI4luc KSRPprom 3 kb transfizierte Zellen; One-way ANOVA).

Die KSRP 5'-UTR zeigt somit einen positiven Effekt auf die Expression der Luciferase, unabhängig davon, welcher Abschnitt des Promotors in Kombination mit der 5'-UTR im transfizierten Plasmid vorhanden war. Welche Funktion die 5'-UTR genau erfüllt, lässt sich allerdings an dieser Stelle nicht festlegen. Zum einen ist es möglich, dass die Sequenz selbst Promotoreigenschaften besitzt oder als *Enhancer* die Promotoraktivität der vorangestellten Sequenzen erhöht. Zum anderen könnte die erhöhte Luciferaseaktivität unter dem Einfluss der KSRP 5'-UTR auf translationale Regulationsmechanismen zurückzuführen sein. Die potentielle Rolle der 5'-UTR für die KSRP-Expression sollte im Folgenden genauer analysiert werden.

5.1.4.2 Die Erhöhung der Luciferaseaktivität durch die KSRP 5'-UTR ist nicht KSRP promotorspezifisch

Um zu untersuchen, ob die 5'-UTR-Sequenz Bestandteil des KSRP Kernpromotors ist oder womöglich als *Enhancer* fungiert, wurde der Promotor des Simian-Virus 40 (SV40) vor die KSRP 5'-UTR kloniert (4.2.8). Hierfür wurde der SV40 Promotor aus dem Plasmid pGI3control mit den Restriktionsenzymen KpnI und HindIII herausgeschnitten (4.2.8.2) und in den mit denselben Enzymen linearisierten Vektor pGI4luc KSRP 5'-UTR Inglo ligiert (4.2.8.8) (**pGI4luc SV40prom KSRP 5'-UTR Inglo**). Als Kontrolle wurde die SV40-Sequenz in den Vektor pGI4luc Inglo kloniert (**pGI4luc SV40prom Inglo**, Tabelle 3.13) und in Luciferase Aktivitätsmessungen (4.3.7) analysiert.

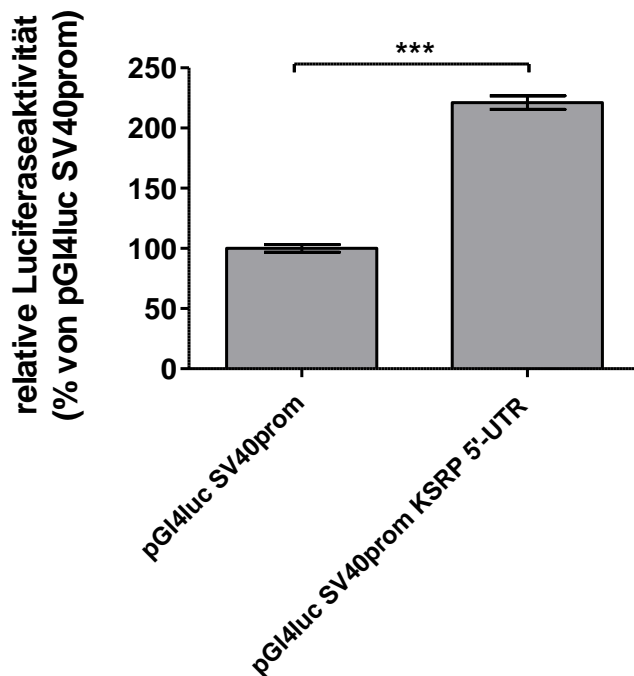


Abbildung 5.8: Analyse des Einflusses der KSRP 5'-UTR auf die Luciferaseaktivität.

DLD-1-Zellen wurden transient mit den Plasmiden pGI4luc SV40prom Inglo und pGI4luc SV40prom KSRP 5'-UTR Inglo sowie dem pRLEF1 α -Plasmid mit einer Renilla-Luciferase transient transfiziert. Die Zellen wurden nach 24 Stunden in 200 μ l PLB pro Ansatz lysiert und die Luciferaseaktivitäten gemessen. Zur Auswertung wurden die Fireflyaktivitäten auf die entsprechenden Renillawerte normiert. Dargestellt ist die Zusammenfassung aus 2 unabhängigen Messungen mit 4 Replikaten pro Plasmid. Die mittleren Luciferaseaktivitäten (\pm SEM) wurden auf die Aktivität von pGI4luc SV40prom Inglo transfizierten Zellen bezogen (***: $p < 0,001$; ttest).

Abbildung 5.8 zeigt, dass die KSRP 5'-UTR auch in Kombination mit einem genfremden Promotor einen positiven Effekt auf die gemessene Luciferaseaktivität hatte. Verglichen mit pGI4luc SV40prom Inglo transfizierten Zellen, deren Aktivität auf 100 % gesetzt wurde, erhöhte sich die Luciferaseaktivität in pGI4luc SV40prom KSRP 5'-UTR Inglo transfizierten Zellen auf etwa 220 %. Das Vorhandensein der KSRP 5'-UTR führte somit zur Verdopplung der Luciferaseexpression. Allerdings war der Unterschied deutlich schwächer, als in den vorhergehenden Experimenten, in denen die KSRP 5'-UTR mit dem geneigenen Promotor verbunden war (vgl. Abbildung 5.7). Das könnte sich jedoch durch die ohnehin schon höhere Aktivität des SV40 Promotors erklären lassen, so dass eine weitere Aktivitätssteigerung nur bedingt möglich ist. Die Daten deuten darauf hin, dass die 5'-UTR möglicherweise unabhängig

vom KSRP Promotor *Enhancer*-Funktionen erfüllen könnte. Allerdings lassen sich an dieser Stelle translationale Mechanismen noch nicht ausschließen.

5.1.4.3 Deletionen der KSRP 5'-UTR am 5'- und 3'-Ende führen zu einer verringerten Aktivität der Luciferase

In weiteren Experimenten sollte die KSRP 5'-UTR genauer charakterisiert werden. Um die Lokalisation putativer Sequenzelemente zu identifizieren, die für die erhöhten Luciferaseaktivitäten verantwortlich sein könnten, wurden mit Hilfe der QC-Methode (4.2.5.2) Plasmide generiert, bei denen verschiedene Bereiche der 5'-UTR deletiert wurden. Dabei wurde zum einen ausgehend vom Plasmid pGI4luc KSRPprom 3 kb 5'-UTR das 3'-Ende des Promotors (245 bp) sowie die ersten 15 bp der 5'-UTR inklusive der TSS entfernt (pGI4luc KSRPprom 3 kb 5'-UTR Del261, Abbildung 5.9, A). Zum anderen wurde ein Drittel (**Del1**) bzw. zwei Drittel (**Del2**) der 5'-UTR vom 3'-Ende her deletiert (Abbildung 5.9, B). Dabei wurden die für die QC-PCR verwendeten Oligonukleotide (Tabelle 3.17) so generiert, dass die Kozak-Sequenz der Luciferase trotz der Deletion unverändert blieb.

Die neu gewonnenen Plasmide wurden zusammen mit entsprechenden Kontrollen in Reporteranalysen eingesetzt (4.3.7).

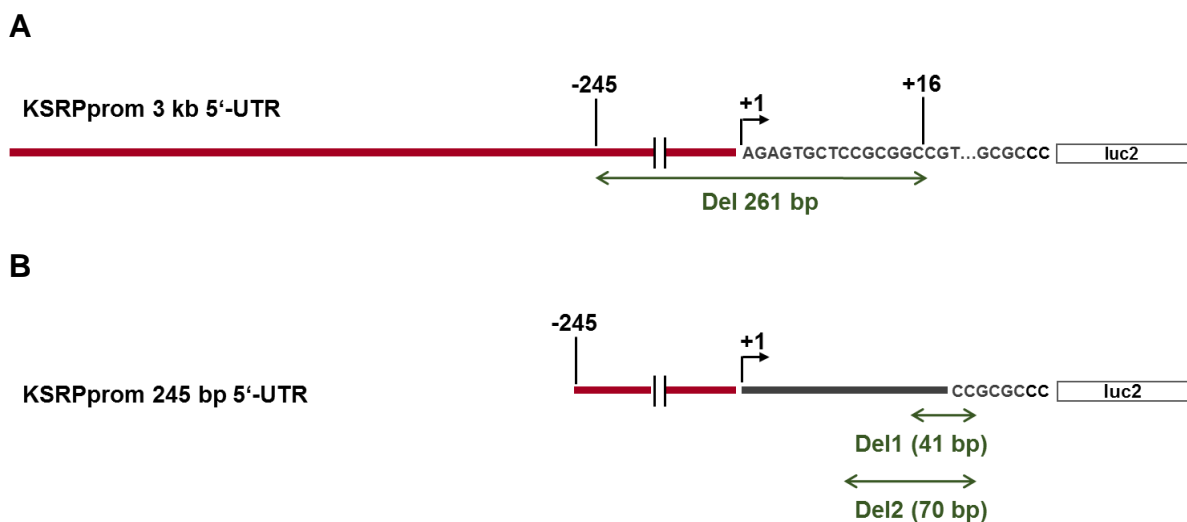


Abbildung 5.9: Schematische Darstellung der verwendeten KSRP 5'-UTR-Deletionen.

(A) Ausgehend vom pGI4luc KSRPprom 3 kb 5'-UTR-Plasmid wurden mit Hilfe der Quickchange-Methode die letzten 245 bp des KSRP Promotors sowie die ersten 15 bp der 5'-UTR deletiert (Del 261 bp). Die Position +1 indiziert die TSS.

(B) Das 3'-Ende der 5'-UTR wurde ausgehend vom Plasmid pGI4luc KSRPprom 245 bp 5'-UTR deletiert. Dabei wurden 41 bp (Del1) bzw. 70 bp (Del2) entfernt. Die Position +1 indiziert die TSS.

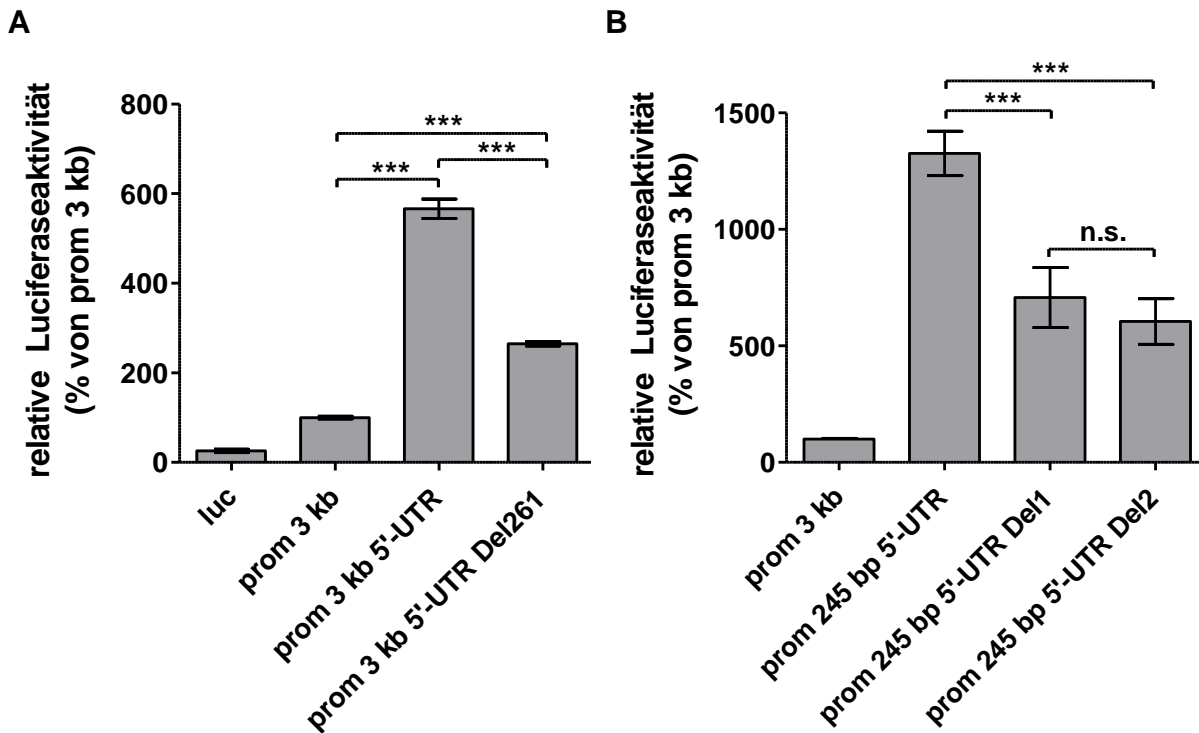


Abbildung 5.10: Analyse der Bedeutung verschiedener 5'-UTR-Fragmente für die Luciferaseexpression.

DLD-1-Zellen wurden transient mit Plasmiden transfiziert, deren Luciferaseexpression unter der Kontrolle verschiedener KSRP Promotorelemente und der 5'-UTR steht. Zur Normierung wurde jeweils das pRLEF1 α -Plasmid mit einer Renilla-Luciferase kotransfiziert. Die Zellen wurden nach 24 Stunden in 200 μ l PLB pro Ansatz lysiert und die Firefly- sowie die Renillaaktivität in Luciferase Reporteragen-Assays gemessen. Zur Auswertung wurden die Fireflywerte auf die entsprechenden Renillawerte normiert.

(A) Transfektion der Plasmide pGI4luc, pGI4lucKSRPprom 3 kb, pGI4lucKSRPprom 3 kb 5'-UTR und pGI4lucKSRPprom 3 kb 5'-UTR Del261. Dargestellt ist die Zusammenfassung aus 3-4 unabhängigen Messungen mit 4-6 Replikaten pro Plasmid. Die mittleren Luciferaseaktivitäten (\pm SEM) wurden auf die Aktivität von pGI4lucKSRPprom 3 kb transfizierten Zellen bezogen (***: $p < 0,001$; One-way ANOVA).

(B) Transfektion der Plasmide pGI4lucKSRPprom 3 kb, pGI4lucKSRPprom 245 bp 5'-UTR, pGI4lucKSRPprom 245 bp 5'-UTR Del1 und pGI4lucKSRPprom 245 bp 5'-UTR Del2. Dargestellt ist die Zusammenfassung aus 2-3 unabhängigen Messungen mit 4 Replikaten pro Plasmid. Die mittleren Luciferaseaktivitäten (\pm SEM) wurden auf die Aktivität von pGI4lucKSRPprom 3 kb transfizierten Zellen bezogen (***: $p < 0,001$; n.s.: nicht signifikant verschieden; One-way ANOVA).

Die Reporteragen-Assays haben gezeigt, dass die Transfektion von DLD-1-Zellen mit den Deletionsplasmiden zu einer Verringerung der Luciferaseaktivitäten führte im Vergleich zur Transfektion der jeweiligen Kontrollplasmide. Dabei spielte es keine Rolle, welcher Teil der KSRP 5'-UTR deletiert war. Abbildung 5.10 A zeigt, dass die Deletion des 3'-Endes des KSRP Promotors und des 5'-Endes der 5'-UTR eine signifikante Reduktion der Luciferaseaktivität von fast 600 % (**prom 3 kb 5'-UTR**) auf etwa 200 % (**prom 3 kb 5'-UTR Del261**) zur Folge hatte. Dennoch war die gemessene Aktivität noch signifikant höher als die, welche unter der Kontrolle des 3 kb Promotors ohne 5'-UTR zu verzeichnen war. Auch die Deletion der KSRP 5'-UTR vom 3'-Ende her (**prom 245 bp 5'-UTR Del1** und **Del2**) führte zu einer Halbierung der Luciferaseaktivitäten im Vergleich zur Transfektion des kurzen KSRP Promotorplasmids mit der gesamten 5'-UTR-Sequenz (**prom 245 bp 5'-UTR**, Abbildung 5.10, B). Trotz der

Reduktion wiesen auch diese Transfektionen der Deletionskonstrukte eine mehr als 5-fach höhere Luciferaseaktivität auf als Transfektionen des 3 kb Promotorplasmids ohne 5'-UTR (**prom 3 kb**). Zwischen den Deletionen 1 und 2 gibt es keinen Unterschied in der Luciferaseaktivität. Dabei wurde bei Del1 lediglich das letzte Drittel der 5'-UTR entfernt, während bei Del2 die letzten beiden Drittel deletiert wurden (vgl. Abbildung 5.9). Somit scheint das mittlere Drittel der 5'-UTR weniger relevant zu sein für die Expression der Luciferase. Insgesamt gesehen scheint die vollständige 5'-UTR-Sequenz benötigt zu werden, um die maximale Luciferaseaktivität zu erreichen.

5.1.4.4 Die erhöhte Luciferaseaktivität bei den 5'-UTR Konstrukten ist hauptsächlich durch translationale Regulationsmechanismen bedingt

Reportergenanalysen geben keinen Aufschluss darüber, ob die beobachteten Effekte auf die Regulation der Promotoraktivität zurückzuführen sind oder durch Mechanismen bedingt sind, welche die Translation steuern. Aus diesem Grund sollte im weiteren Verlauf die mRNA-Expression der Luciferase nach der Transfektion mit den entsprechenden Plasmiden gemessen werden. Auf diese Weise lässt sich feststellen, ob die positive Regulation der Luciferase durch die KSRP 5'-UTR auf transkriptioneller oder translationaler Ebene stattfindet.

Um in den qRT-PCR-Analysen ausschließlich die Luciferase mRNA und nicht die Plasmid DNA zu messen, wurde in die verschiedenen KSRP Promotor und 5'-UTR-Plasmide (pGI4luc KSRPprom 3 kb, pGI4luc KSRPprom 245 bp, pGI4luc KSRPprom 50 bp, pGI4luc KSRP 5'-UTR, pGI4luc KSRPprom 245 bp 5'-UTR, pGI4luc KSRPprom 120 bp 5'-UTR, pGI4luc KSRPprom 50 bp 5'-UTR, pGI4luc KSRPprom 245 bp 5'-UTR Del1 und pGI4luc KSRPprom 245 bp 5'-UTR Del2) sowie in pGI4luc als Negativkontrolle zunächst die Sequenz des humanen β -Globin-Intron 1 stromabwärts der Luciferasesequenz kloniert. Dadurch konnten Oligonukleotide für die PCR so generiert werden, dass einer der Primer Intron-überspannend bindet und somit spezifisch die Luciferase mRNA amplifiziert. Hierfür wurde das Globin-Intron 1 (weiterhin Inglo genannt) inklusive Donor- und Akzeptorstellen aus dem Plasmid pRHCglo (Tabelle 3.12) mit den Oligonukleotiden Inglo_5P1_EcoRV und Inglo_3P1_NotI (Tabelle 3.17) heraus amplifiziert (4.2.5), phosphoryliert (4.2.8.4) und in die oben genannten Vektoren ligiert (4.2.8.8), die zuvor mit XbaI geschnitten (4.2.8.2) wurden. Die so hergestellten Plasmide sind der Tabelle 3.13 (Nummer 30-39) zu entnehmen.

Die qRT-PCR-Messungen (4.2.7) erfolgten mit einem SONDENSYSTEM. Hierfür wurden die Oligonukleotide RHCglo_5P1 und SV40polyA prim sowie die RHCglo Sonde verwendet (Tabelle 3.19). Zur Normierung wurde die mRNA-Menge der Renilla-Luciferase gemessen.

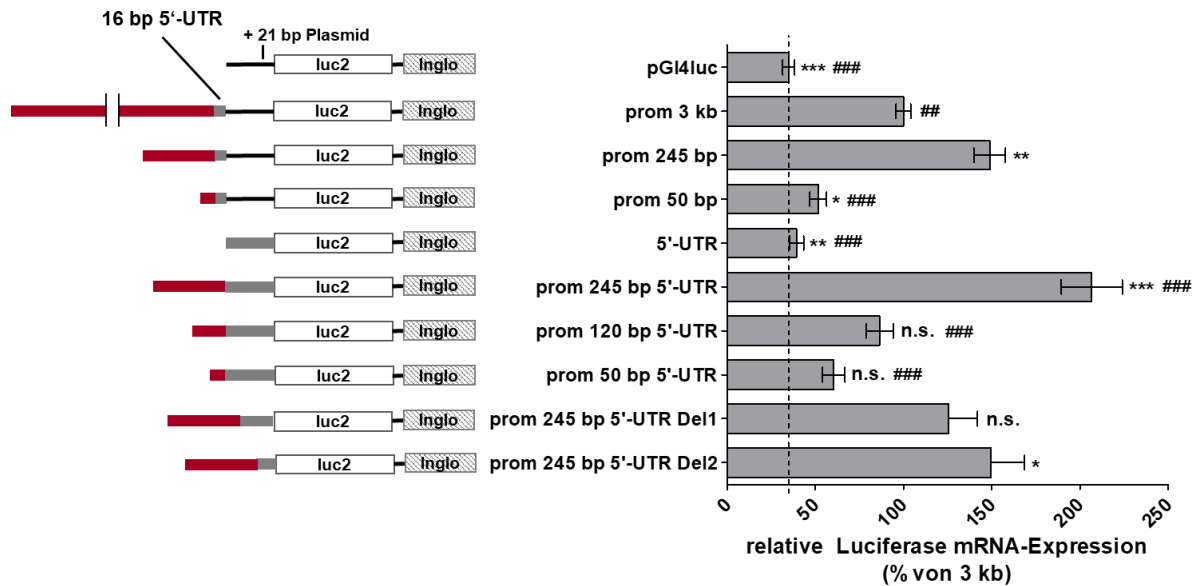


Abbildung 5.11: Analyse der Luciferase mRNA-Expression nach transienter Transfektion verschiedener Reporterplasmide in DLD-1-Zellen.

DLD-1-Zellen wurden transient mit den Plasmiden pGI4luc Inglo, pGI4luc KSRPprom 3 kb Inglo, pGI4luc KSRPprom 245 bp Inglo, pGI4luc KSRPprom 50 bp Inglo, pGI4luc KSRP 5'-UTR Inglo, pGI4luc KSRPprom 245 bp 5'-UTR Inglo, pGI4luc KSRPprom 120 bp 5'-UTR Inglo, pGI4luc KSRPprom 50 bp 5'-UTR Inglo, pGI4luc KSRPprom 245 bp 5'-UTR Del1 Inglo, pGI4luc KSRPprom 245 bp 5'-UTR Del2 Inglo transfiziert. Zur Normierung wurde jeweils das pRLEF1 α -Plasmid mit einer Renilla-Luciferase kotransfiziert. Die Zellen wurden nach 24 Stunden in 200 μ l GIT pro Ansatz lysiert, RNA wurde isoliert und in cDNA umgeschrieben. Die qRT-PCR erfolgte mit spezifischen Oligonukleotiden zur Amplifikation der Firefly mRNA sowie der Renilla mRNA zur Normierung. Dargestellt ist jeweils die relative mRNA-Expression bezogen auf die mit dem Plasmid pGI4lucKSRPprom 3 kb transfizierten Zellen. Die Säulen repräsentieren Mittelwerte (\pm SEM) von 3-5 unabhängigen Messungen mit 4 Replikaten pro Plasmid (* zeigen die signifikanten Unterschiede zur Kontrolle 3 kb prom an; # zeigen die Signifikanz zu prom 245 bp an; **/###: $p < 0,001$; */###: $p < 0,01$; n.s.: nicht signifikant verschieden vs. pGI4luc KSRPprom 3 kb transfizierte Zellen; One-way ANOVA).

Abbildung 5.11 zeigt die Ergebnisse der Luciferase mRNA-Expressionsanalysen nach transienter Transfektion verschiedener KSRPprom 5'-UTR-Plasmide. Wie in den Luciferase Aktivitätsmessungen auf Proteinebene (vgl. Abbildung 5.7), war auch auf mRNA-Ebene die Luciferaseexpression unter der Kontrolle des 245 bp Promotors signifikant erhöht im Vergleich zum 3 kb Promotor (etwa 1,5-fach). Die Transfektion der Plasmide pGI4luc KSRPprom 50 bp Inglo, pGI4luc KSRP 5'-UTR Inglo und pGI4luc KSRPprom 50 bp 5'-UTR Inglo hatten eine deutlich schwächere Expression der Luciferase mRNA zur Folge, so dass die gemessenen Werte in etwa auf dem Niveau der Negativkontrolle pGI4luc Inglo lagen. Das ist annähernd vergleichbar mit den Luciferaseaktivitäten, welche für die entsprechenden Konstrukte gemessen wurden (vgl. Abbildung 5.3 und Abbildung 5.7) Diese Daten zeigen beispielsweise, dass der Unterschied in der Expression der Luciferase zwischen dem kurzen 50 bp Promotorfragment und dem 245 bp-Fragment vermutlich durch unterschiedliche Promotoraktivitäten bedingt ist. Das analysierte kurze Fragment (50 bp) alleine erfüllt demnach keine Funktion für die Expression der Luciferase, weder auf Ebene der Promotoraktivität noch auf translationaler Ebene. Ein signifikanter Anstieg der mRNA-Menge konnte nach der

Transfektion mit dem pGI4luc KSRPprom 245 bp 5'-UTR-Plasmid beobachtet werden, sowohl im Vergleich mit dem 3 kb Promotor (***) als auch mit dem 245 bp Promotor (###). Allerdings lag hier eine Erhöhung auf nur 206 % und somit lediglich eine Verdopplung der mRNA-Menge vor, die durch die Transfektion mit dem pGI4luc KSRPprom 3 kb-Plasmid erreicht wurde. Dies steht im Gegensatz zu den Ergebnissen der Reporteragen-Assays, bei denen die Luciferaseaktivität unter der Kontrolle des 245 bp Promotors in Kombination mit der 5'-UTR im Vergleich zum 3 kb Promotorfragment mehr als 10-fach erhöht war (vgl. Abbildung 5.7). Weiterhin waren auf mRNA-Ebene die gemessenen Werte der Del1 und 2 Transfektionen mit 130 % (245 bp prom 5'-UTR Del1 Inglo) und 150 % (245 bp prom 5'-UTR Del2 Inglo) nicht signifikant verschieden zu pGI4luc KSRPprom 245 bp Inglo transfizierten Zellen bzw. nur tendenziell erhöht, verglichen mit pGI4luc KSRPprom 3 kb Inglo transfizierten Zellen. Das entspricht ebenfalls nicht den Daten der Reporteragenanalysen, in denen die Transfektion der 5'-UTR-Deletionsplasmide eine 5-fach höhere Luciferaseaktivität zur Folge hatte als die Transfektion des 3 kb Promotorplasmids (vgl. Abbildung 5.10, B und Abbildung 5.11). Diese Beobachtungen lassen darauf schließen, dass die starken positiven Effekte der KSRP 5'-UTR auf die Expression der Luciferase hauptsächlich auf translationale Regulationsmechanismen zurückzuführen sind und nur zu einem geringen Anteil die Transkription begünstigen.

Um diese Vermutung weiterhin zu überprüfen, wurden qRT-PCR-Messungen (4.2.7) zur Bestimmung der Luciferase mRNA-Menge nach transienter Transfektion der Plasmide pGI4luc SV40prom Inglo und pGI4luc SV40prom KSRP 5'-UTR Inglo durchgeführt. Dabei konnte ebenfalls gezeigt werden, dass der positive Effekt der KSRP 5'-UTR auf die Luciferaseaktivität, der in Reporteragenanalysen beobachtet werden konnte (Abbildung 5.8), auf transkriptioneller Ebene nicht vorhanden war (Abbildung 5.12). Dementsprechend wäre es denkbar, dass die KSRP 5'-UTR als translationaler *Enhancer* fungiert.

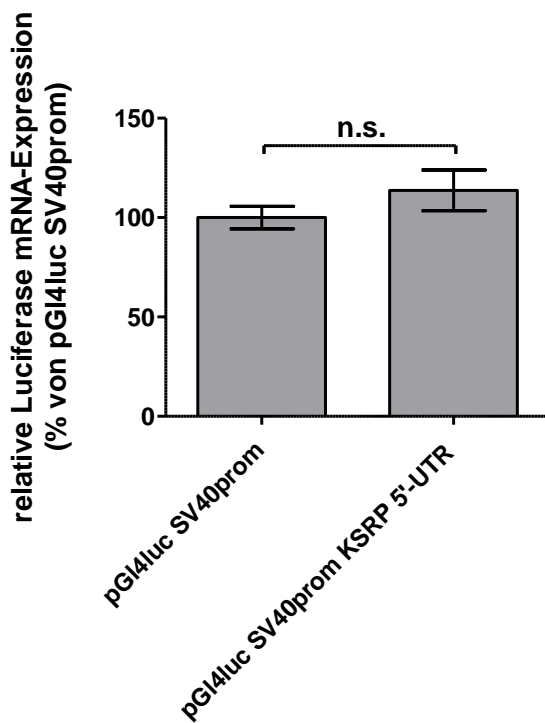


Abbildung 5.12: mRNA-Expressionsanalyse nach transienter Transfektion der SV40prom und SV40prom KSRP 5'-UTR-Plasmide.

DLD-1-Zellen wurden transient mit den Plasmiden pGI4luc SV40prom Inglo und pGI4luc SV40prom KSRP 5'-UTR Inglo transfiziert. Zur Normierung wurde das Plasmid pRL-EF1 α kotransfiziert. Die Transfektion wurde nach 24 Stunden mit 200 μ l GIT abgestoppt. RNA wurde isoliert, in cDNA umgeschrieben und in qRT-PCR-Analysen eingesetzt. Die Expression der Firefly-Luciferase wurde auf die jeweiligen Renilla-Werte normiert. Dargestellte Säulen repräsentieren Mittelwerte (\pm SEM) bezogen auf mit pGI4luc SV40prom Inglo transfizierte Zellen (n.s.: nicht signifikant verschieden; ttest).

5.1.5 Potentielle Promotorelemente in Exon 1 und Intron 1 von KSRP sind nicht von essentieller Bedeutung für die Expression der Luciferase

Neben der 3 kb Promotorsequenz und der 5'-UTR, die in den vorangegangenen Analysen hinsichtlich Promotoraktivität untersucht wurden, konnten promotorspezifische Histonmodifikationen ebenfalls innerhalb von Exon 1, Intron 1 und Exon 2 des KSRP Gens nachgewiesen werden (*UCSC Genome Browser*, Kapitel 5.1.1). Deshalb sollte weiterhin untersucht werden, ob diese Sequenzen für die KSRP-Expression von Bedeutung sind. Hierfür wurde ein Fusionskonstrukt, bestehend aus dem kurzen KSRP Promotor (245 bp), Exon 1, Intron 1, einem Teil von Exon 2 sowie einem Luciferasegen, kloniert (4.2.8). Die 5'-UTR ist dabei Bestandteil des Exon 1, da sich der Startpunkt der Translation an der Position +108 befindet. Nach transienter Transfektion (4.1.6.1) wurde die Luciferaseaktivität gemessen (4.3.7). Die Insertion der KSRP Sequenz in den pGI4luc-Expressionsvektor erfolgte nach dem QC-Protokoll (4.2.5.2) unter Verwendung eines Megaprimers. Zur Herstellung des Megaprimers wurde eine Slowdown-PCR (4.2.5.1) mit den in Tabelle 3.17 angegebenen Oligonukleotiden durchgeführt, als PCR-Vorlage diente der KSRP BAC-Klon (Tabelle 3.12). Bei der Klonierung wurde darauf geachtet, dass es durch die Insertion zu keiner Leserasterverschiebung der Luciferase kommt.

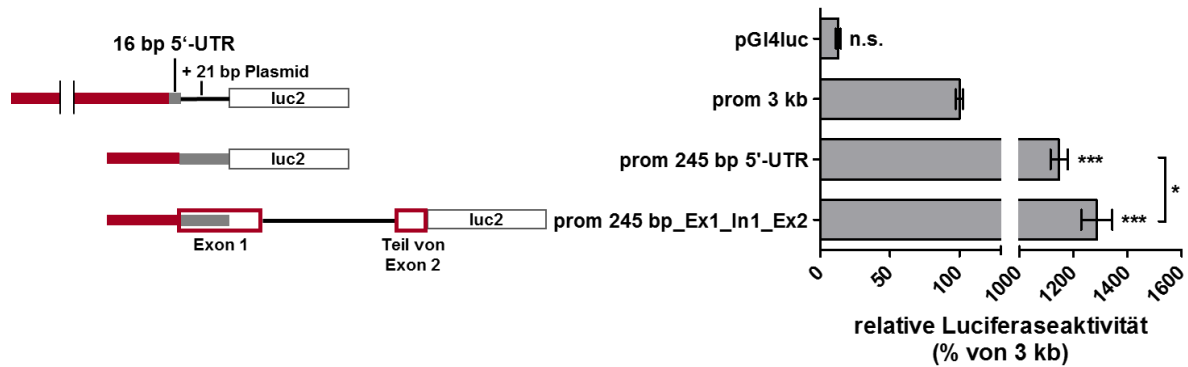


Abbildung 5.13: Messung der Luciferaseaktivität unter der Kontrolle des KSRPprom 245 bp_Ex1_In1_Ex2.

DLD-1-Zellen wurden transient mit den Plasmiden pGI4luc, pGI4luc KSRPprom 3 kb, pGI4luc KSRPprom 245 bp 5'-UTR und pGI4luc KSRPprom 245 bp_Ex1_In1_Ex2 sowie dem pRLEF1 α -Plasmid zur Normierung transfiziert. Die Zellen wurden nach 24 Stunden in 200 μ l PLB pro Loch lysiert und die Firefly- sowie die Renillaaktivität gemessen. Zur Auswertung wurden die Fireflywerte auf die entsprechenden Renillawerte normiert. Dargestellt ist die Zusammenfassung aus 2 unabhängigen Messungen mit 6 Replikaten pro Plasmid. Die Säulen zeigen die relative Luciferaseaktivität (Mittelwert \pm SEM) bezogen auf die Aktivität von pGI4luc KSRPprom 3 kb transfizierten Zellen (***: $p < 0,001$; *: $p < 0,05$; n.s.: nicht signifikant verschieden vs. pGI4luc KSRPprom 3 kb transfizierte Zellen; One-way ANOVA).

Die Transfektion des Fusionsplasmids pGI4luc KSRPprom 245 bp_Ex1_In1_Ex2 hatte eine mehr als 12-fach höhere Luciferaseaktivität zur Folge (1280 %), als die Transfektion des pGI4luc KSRPprom 3 kb Kontrollplasmids (100 %, Abbildung 5.13). Damit war die gemessene Aktivität nur wenig höher als die in pGI4luc KSRPprom 245 bp 5'-UTR transfizierten Zellen (1150 %). Die Daten zeigen somit, dass schon die kurze KSRP Promotorsequenz in Kombination mit der 5'-UTR ausreicht, um die maximale Luciferaseaktivität zu erreichen. Aus diesem Grund wurden keine weiteren Analysen bezüglich geninterner Regulationselemente angestellt.

5.1.6 Identifizierung von Transkriptionsfaktoren

Die Lokalisation des KSRP Promotors konnte durch die vorausgehenden Reporteranalysen weitestgehend definiert und eingegrenzt werden. Zur weiteren Untersuchung der transkriptionellen Regulation ist es notwendig Transkriptionsfaktoren zu identifizieren, die an verschiedene Sequenzmotive des Promotors binden und somit als Regulatoren der KSRP-Expression infrage kommen könnten. Um erste Anhaltspunkte zu erhalten, welche Transkriptionsfaktoren potentiell an einen Promotor binden, stehen verschiedene bioinformatische Online-Werkzeuge frei zur Verfügung. Mit diesen Hilfsmitteln können Sequenzanalysen durchgeführt werden, die mögliche Bindestellen innerhalb einer Sequenz identifizieren, welche meist spezifisch für gewisse DNA-Bindeproteine sind. Häufig werden die Sequenzdaten experimentell durch ChIP-Seq-Analysen unterstützt, eine Methode,

die es ermöglicht im Hochdurchsatzverfahren DNA-Protein-Interaktionen nachzuweisen. Somit können zum einen potentielle Bindepartner identifiziert und zum anderen der ungefähre Sequenzbereich definiert werden, in welchem die mögliche Bindung stattfindet.

Zur Identifizierung von Transkriptionsfaktoren, die mit dem KSRP Promotor interagieren, wurde die KSRP Sequenz mit Hilfe des *UCSC Genome Browsers* hinsichtlich Transkriptionsfaktorbindestellen analysiert (Anhang 7, Abbildung 7.1). Da es sich bei den vorhergesagten Bindestellen lediglich um Vermutungen handelte, die auf Sequenzanalysen beruhen und nur bedingt experimentell belegt sind, wurde im Folgenden die Bindung eines Transkriptionsfaktors experimentell verifiziert.

Ein Protein, das basierend auf den Sequenzanalysen als Interaktionspartner des KSRP Promotors in Betracht kam und das für die weiterführenden Analysen ausgewählt wurde, ist SP1. Es ist bekannt, dass SP1 an GC-reiche Sequenzen bindet und ausgehend von diesen CpG-Inseln in der Lage ist, die Transkription eines Gens zu initiieren (vgl. Kapitel 1.1.1). Da bereits gezeigt werden konnte, dass der KSRP Promotor viele solcher CpG-Inseln aufweist (Abbildung 5.1), liegt eine SP1-Bindung nahe. Diese Vermutung sollte im weiteren Verlauf überprüft werden.

5.1.6.1 Pulldown-Analysen zur Verifizierung potentieller Transkriptionsfaktoren – Etablierung der Methode

Zur Bestätigung der vermuteten SP1-Bindung an den KSRP Promotor wurden Pulldown-Analysen (4.3.8.1) mit anschließendem Western Blot (4.3.6) durchgeführt. Da die Methode zum Nachweis von DNA-Protein-Interaktionen in der Arbeitsgruppe nicht etabliert war, mussten zunächst einige Teile des Protokolls optimiert und getestet werden. Auf die einzelnen Schritte wird in den folgenden Kapiteln genauer eingegangen.

Isolation von Kernextrakten

Aufgrund der Tatsache, dass die Transkription im Zellkern stattfindet, wurden für die Pulldown-Methode ausschließlich Kernextrakte verwendet. Daher erfolgte bei der Isolation der Proteine aus DLD-1-Zellen eine Trennung von Kern- und Zytoplasmaextrakten. Die Extrakte wurden wie in Kapitel 4.3.2 beschrieben aufgereinigt und der Erfolg der Auftrennung bei jedem Durchgang vor der weiteren Verwendung mittels Western Blot überprüft (4.3.5-4.3.6). Hierbei wurden jeweils 100 µg der Proteinextrakte eingesetzt. Zur Proteindetektion wurden spezifische Antikörper gegen SP1 und die Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) verwendet. GAPDH ist überwiegend im Zytoplasma zu finden (Tristan, Shahani et al. 2011),

während SP1 hauptsächlich im Zellkern vorliegt. Ein repräsentativer Western Blot ist in Abbildung 5.14 dargestellt. Es ist zu erkennen, dass die Aufreinigung weitestgehend erfolgreich war. Eine SP1-Bande konnte lediglich in den Kernextrakten detektiert werden, wohingegen ein deutliches Signal für GAPDH vorwiegend in Zytoplasmaextrakten sichtbar war. Wie erwartet gab es lediglich ein schwaches GAPDH-Signal in den Kernextrakten.

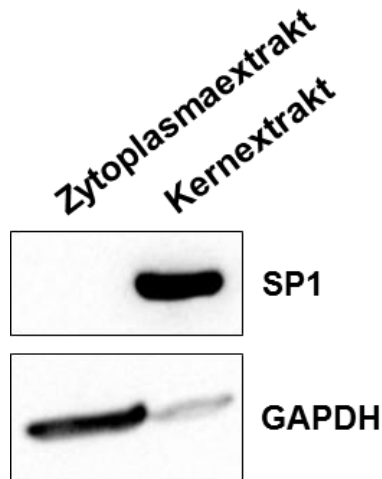


Abbildung 5.14: Überprüfung der Aufreinigung und Trennung von Kern- und Zytoplasmaextrakten aus DLD-1-Zellen.

Die Isolation von Kern- und Zytoplasmaextrakten erfolgte aus humanen DLD-1-Zellen nach dem Protokoll von Dignam und Osborne (4.3.2). Zur Überprüfung der Auftrennung wurde die Proteinkonzentration mittels Bradford-Assay bestimmt und jeweils 100 µg Kern- bzw. Zytoplasmaextrakt auf einem 10 % SDS-Polyacrylamid-Gel aufgetrennt. Nach Übertragung auf eine Nitrozellulosemembran erfolgte die Detektion von SP1 und GAPDH mit Hilfe spezifischer Antikörper (Antikörper-Verdünnung: jeweils 1:1000 in 5 % MP). Dargestellt ist ein repräsentativer Western Blot.

Generierung der biotinylierten PCR-Produkte und Finden geeigneter Negativkontrollen

In den Pulldown-Analysen sollte die SP1-Bindung an die KSRP Promotorfragmente 3 kb sowie 245 bp mit 5'-UTR untersucht werden. Hierfür wurden die Fragmente mit biotinylierten Oligonukleotiden vervielfältigt (4.2.5), um Biotin-markierte Amplifikate mit einer hohen Affinität zur Streptavidin-Agarose zu erhalten. Als PCR-Vorlage dienten die Plasmide pGI4luc KSRPprom 3 kb und pGI4luc KSRPprom 245 bp 5'-UTR (Tabelle 3.13). Die ausgewählten Oligonukleotide binden innerhalb der Plasmidsequenz und konnten daher für die Amplifikation beider Promotorabschnitte verwendet werden (Tabelle 3.18).

Als Negativkontrollen wurden mit Hilfe von Datenbankanalysen genomische Bereiche gesucht, die nur schwache bis keine Transkriptionsfaktorbindung aufwiesen. Um solche Regionen zu finden, wurde die Publikation von Yip et. al. herangezogen (Yip, Cheng et al. 2012), in der das Genom anhand von Sequenzmotiven und verschiedenen experimentellen Daten aus fünf Zelllinien in sechs Gruppen eingeteilt wurde. Darunter zählen beispielsweise *binding active regions* (BARs) und *binding inactive regions* (BIRs), welche für die zugrunde liegende Fragestellung von Bedeutung waren. Die Klassifizierung der Regionen erfolgte anhand von ChIP-Seq Datensätzen, wodurch Bereiche mit potentiell hoher bzw. niedriger Transkriptionsfaktorbindung definiert werden konnten. Zusätzlich wurde die Struktur des Chromatins sowie Histonmodifikationen mit einbezogen, die ebenfalls Aussagen über die Promotoreigenschaften von Genen zulassen (vgl. 1.1.1). Mit Hilfe der in der Publikation

angegebenen Position der BIRs im Genom, zusammen mit den zugehörigen, frei verfügbaren Sequenzen, wurden letztendlich Bereiche ausgewählt, die eine geringe transkriptionelle Aktivität vermuten ließen. Davon ausgehend wurden Oligonukleotide generiert, welche zur Amplifikation eines 3 kb- und eines 1,5 kb-Fragments verwendet werden konnten. Als PCR-Vorlage diente genomische DNA, isoliert aus DLD-1-Zellen. Die Sequenzen der biotinylierten Oligonukleotide sind in Tabelle 3.18 aufgelistet.

Testen der Notwendigkeit eines Formaldehyd-Crosslinks

Zur Optimierung der Pulldown-Methode wurde des Weiteren überprüft, ob die einfache Bindung zwischen Proteinen und DNA ausreicht, um auch während der Waschschriffe weiterhin zu bestehen, oder ob die Vernetzung durch die Inkubation mit Formaldehyd verstärkt werden muss. Hierfür erfolgte die Bindung des biotinylierten KSRPprom 3 kb-PCR-Produkts an die Streptavidin-Agarose und die Inkubation mit Kernextrakten über Nacht bei 4 °C, so dass die Proteine spezifisch mit der DNA interagieren konnten. Ein Teil der Proben wurde für 10 min mit einer 16 %igen Formaldehydlösung inkubiert (Endkonzentration 1 %), während die andere Hälfte unbehandelt blieb. Die Crosslink-Reaktion wurde durch die Zugabe von 0,125 M Glycin gestoppt. Anschließend erfolgten fünf Waschschriffe mit geringer Salzkonzentration (Bindepuffer-DNA 40 mM KCl, 3.5.4.3), wodurch nicht-gebundene oder unspezifisch gebundene Proteine entfernt wurden, so dass letztendlich die gebundenen Proteine unter Hochsalzbedingungen von der Agarose eluiert werden konnten (Elutionspuffer 2 M KCl, 3.5.4.3). Die Proben wurden gefällt (Überstand nach der Bindung, Waschschriff 5 und Eluat, 0) und in Western Blot-Analysen eingesetzt (4.3.6). Für die Detektion wurden spezifische Antikörper gegen die RNA-Polymerase II sowie gegen die promotortypische Histonmodifikation H3K4me3 verwendet.

In Abbildung 5.15 sind die Ergebnisse des Crosslink-Tests dargestellt. Sowohl für die RNA-Polymerase II (A) als auch für H3K4me3 (B) konnte gezeigt werden, dass die zusätzliche Stärkung der Protein-DNA-Interaktion mit Formaldehyd notwendig ist, um gebundene Proteine durch die Waschschriffe nicht zu verlieren. In den Proben, die nicht mit Formaldehyd behandelt wurden (- FA, oben), konnte lediglich ein Signal im Überstand detektiert werden, während in den Spuren WS 5 und Eluat keine bzw. nur sehr schwache Banden (H3K4me3) sichtbar wurden. Im Gegensatz dazu gab es bei den Formaldehyd-behandelten Proben (+ FA, unten) auch in den Waschüberständen und den Eluaten deutliche RNA-Polymerase II- und H3K4me3-Signale. Aus diesem Grund wurden in allen folgenden Pulldown-Experimenten Formaldehyd-Vernetzungen durchgeführt.

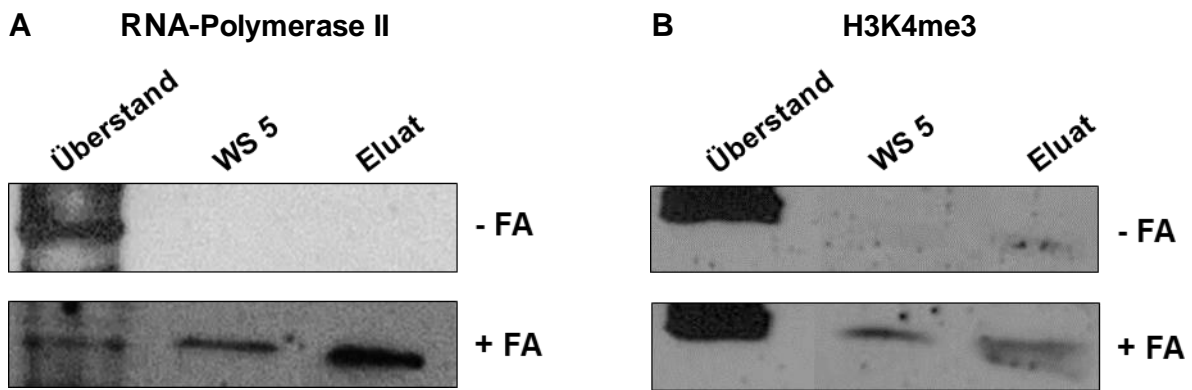


Abbildung 5.15: Western Blot zur Überprüfung der Formaldehyd-Vernetzung.

Das KSRP Promotorfragment 3 kb wurde mit biotinylierten Oligonukleotiden amplifiziert und in Pulldown-Analysen eingesetzt. Nach der Bindung an Streptavidin-Agarose erfolgte die Inkubation mit DLD-1 Kernextrakten. Vor dem Waschen der Proben wurde eine Hälfte mit 1 % Formaldehyd behandelt (+ FA), während die andere Hälfte unbehandelt blieb (- FA). Die Proteine wurden in 100 μ l 2 M KCl Elutionspuffer eluiert, mit Methanol und Chloroform gefällt (0) und über ein 10 %iges SDS-Polyacrylamid-Gel aufgetrennt (Überstand nach der Bindung, Überstand nach Waschschrift 5: WS 5, und Eluat). Nach Übertragung auf eine Nitrozellulosemembran erfolgte die Detektion der RNA-Polymerase II (A) sowie H3K4me3 (B) mit Hilfe spezifischer Antikörper (Verdünnung: 1:1000 in 5 % BSA). Dargestellt ist jeweils ein repräsentativer Western Blot für 2-3 unabhängige Experimente.

5.1.6.2 SP1 bindet an den 3 kb KSRP Promotor

Nachdem das Pulldown-Protokoll so optimiert wurde, dass möglichst viel Protein gebunden und eluiert werden konnte, wurde schließlich die SP1-Bindung an den KSRP Promotor untersucht. Die 3 kb prom und die 245 bp prom 5'-UTR-Sequenz sowie die Negativkontrollen wurden mit biotinylierten Oligonukleotiden ausgehend von Plasmid-DNA bzw. genomischer DNA amplifiziert (4.2.5). Die PCR-Produkte wurden auf ein präparatives Agarosegel (4.2.6) aufgetragen und nach der Auftrennung mittels Elektroelution (4.2.8.7) und anschließender Phenol-Chloroform-Extraktion (4.2.8.5) aufgereinigt. Der Pulldown wurde wie in Kapitel 4.3.7 beschrieben durchgeführt. Die Waschschriffe wurde im Vergleich zu den Vorversuchen (vgl. Testen der Notwendigkeit eines Formaldehyd-Crosslinks) auf zwei reduziert, da für SP1 bereits nach dem zweiten Durchgang kein Protein mehr von den Beads gewaschen wurde. Stattdessen wurde die Stringenz erhöht, indem der zweite Waschschrift mit 100 mM KCl Bindepuffer (3.5.4.3) erfolgte. Nach der Elution wurden die Proteine im Überstand (vor dem ersten Waschen) sowie im Eluat gefällt (0) und das Vorhandensein von SP1 mit Hilfe von Western Blot-Analysen nachgewiesen (Abbildung 5.16).

Für alle untersuchten Proben konnte ein SP1-Signal in den Überständen (Abbildung 5.16, oben) detektiert werden. Das zeigt, dass SP1 in den Kernextrakten im Überschuss vorhanden war und nicht vollständig an die DNA gebunden hat. Eine Interaktion zwischen SP1 und dem KSRP Promotor wurde lediglich für das 3 kb lange Fragment nachgewiesen, was an der

schwachen Bande im Eluat zu erkennen ist. Dagegen hat an das 245 bp-Fragment mit der KSRP 5'-UTR trotz der GC-reichen Sequenz keine Bindung stattgefunden. Somit lässt sich sagen, dass SP1 im Bereich zwischen -3000 und -245 (relativ zur TSS, +1) mit dem KSRP Promotor interagiert. Wie zu erwarten war, zeigten die Negativkontrollen keine SP1-Bindung.

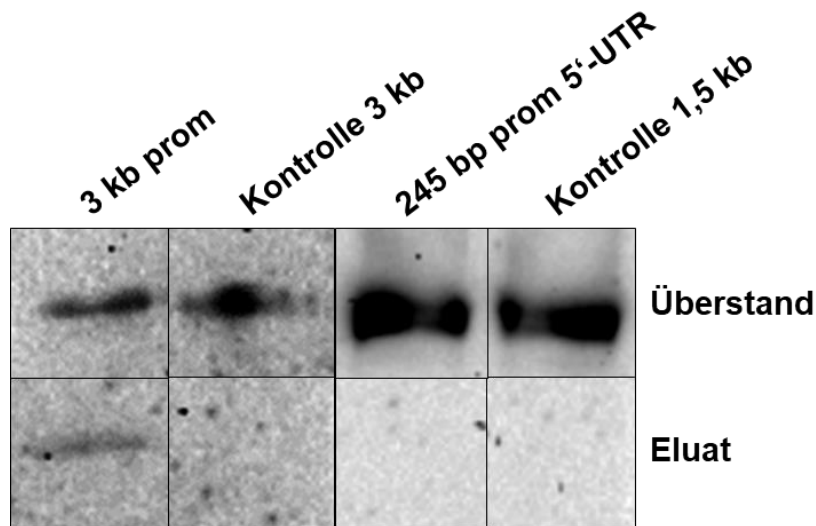


Abbildung 5.16: Nachweis der SP1-Bindung an den KSRP Promotor.

Die KSRP Promotorfragmente sowie genomische Sequenzen mit geringer Transkriptionsaktivität als Negativkontrollen wurden mit biotinylierten Oligonukleotiden amplifiziert und an Streptavidin-Agarose gebunden. Anhand von Pulldown-Experimenten mit DLD-1-Kernextrakten und anschließenden Western Blot-Analysen mit einem SP1-Antikörper (1:1000 verdünnt in 5 % Milchpulver) wurde die Bindung von SP1 an die verschiedenen Promotorabschnitte untersucht. Als Ladekontrolle wurde der Proteinüberstand nach der Protein-DNA-Bindung (oben) aufgetragen, die zugehörigen Eluate nach den Waschschriffen sind im unteren Bereich gezeigt. Die Größenbestimmung erfolgte unter Zuhilfenahme des Proteinmarkers Precision Plus Protein Dual Color Standard von BioRad (hier nicht gezeigt). Der dargestellte Western Blot ist repräsentativ für 2 unabhängige Experimente.

5.1.7 Die KSRP-Expression wird posttranskriptionell über AU-reiche Elemente in der 3'-UTR reguliert

Neben der Regulation der Promotoraktivität sollte die Bedeutung der KSRP 3'-UTR für die Regulation der KSRP-Expression genauer untersucht werden. Die 3'-UTR weist AREs verschiedener Klassen sowie GU-reiche Elemente auf, die eine posttranskriptionelle Regulation durch RNA-BPs denkbar machen (Abbildung 5.17, vgl. Kapitel 1.1.2.1). Diese Annahme wird durch frühere Studien unterstützt, die beschreiben, dass sich RNA-BPs über AREs in der 3'-UTR gegenseitig regulieren (Pullmann, Kim et al. 2007). Außerdem konnten in Arbeiten der AG Kleinert bereits Interaktionen zwischen RNA-BPs wie HuR, AUF1 oder PABP mit der KSRP 3'-UTR nachgewiesen werden (Art 2012).

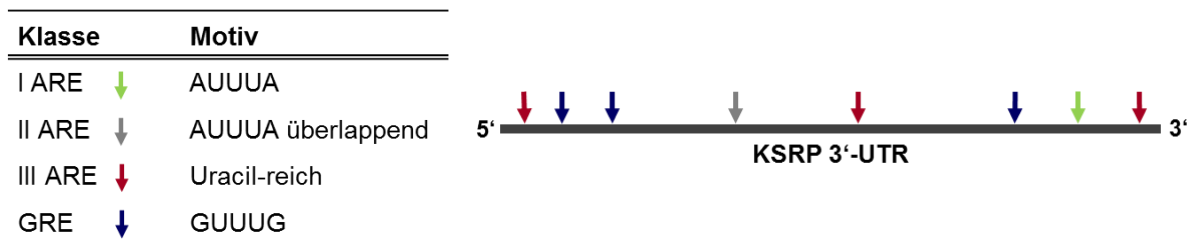


Abbildung 5.17: Schematische Darstellung der AU-reichen Elemente innerhalb der KSRP 3'-UTR.

Vereinfacht dargestellt ist die KSRP 3'-UTR mit den darin enthaltenen AREs. Die Lokalisation der AREs ist durch Pfeile indiziert. Die entsprechenden ARE-Klassen sind der Tabelle (links) zu entnehmen. ARE: AU-reiche Elemente, GRE: GU-reiche Elemente.

Um die Rolle der 3'-UTR und deren Funktion für die KSRP-Regulation aufzuklären, wurde der Effekt verschiedener 3'-UTR-Fragmente auf die Expression der *Firefly*-Luciferase in Reporter-Gen-Assays analysiert. Hierfür wurde die gesamte KSRP 3'-UTR in ein pGI3control-Plasmid hinter die Luciferasesequenz kloniert, deren Expression unter der Kontrolle eines SV40-Promotors steht. Ausgehend davon wurden verschiedene Deletionskonstrukte mittels PCR (4.2.5) und Restriktion durch XbaI (4.2.8.2) erstellt, welche die 3'-UTR vom 3'-Ende her verkürzen (Tabelle 3.13 und Tabelle 3.17). Somit konnte die Bedeutung einzelner AU-reicher Elemente für die posttranskriptionelle Modulation der KSRP-Expression charakterisiert werden. Die Experimente wurden in Zusammenarbeit mit Stefan Hamelmann durchgeführt (Hamelmann 2016). Es wurden DLD-1-Zellen mit dem 3'-UTR-Plasmid pGI3KSRP 3'-UTR 1 kb sowie den verschiedenen Deletionskonstrukten KSRP 3'-UTR 700 bp, 600 bp, 400 bp und 200 bp transient transfiziert (4.1.6.1). Zusätzlich wurde ein Plasmid transfiziert, welches eine vom 5'-Ende her verkürzte 3'-UTR aufwies (KSRP 3'-UTR 1 kb del200 bp, kloniert durch Stefan Hamelmann im Rahmen einer Masterarbeit (Hamelmann 2016)). Als Kontrolle wurde der Vektor pGI3control verwendet und zur Normierung der Transfektionseffizienz wurde das pRLEF1 α Plasmid kotransfiziert (Tabelle 3.13). Zur Auswertung der Reporter-Genanalysen wurden mit pGI3control transfizierte Zellen auf 100 % gesetzt und die gemessenen Luciferaseaktivitäten darauf bezogen.

Abbildung 5.18 zeigt die Ergebnisse der Luciferase Aktivitätsmessungen von transient transfizierten DLD-1-Zellen. Verglichen mit der Kontrolle (pGI3control) ging die Luciferaseaktivität unter dem Einfluss der KSRP 3'-UTR signifikant zurück. Lediglich das Deletionskonstrukt mit der 200 bp 3'-UTR hatte keinen negativen Effekt auf die Aktivität der Luciferase. Die größte Aktivitätsminderung von ca. 50 % konnte unter der Kontrolle der 400 bp 3'-UTR beobachtet werden, während die Transfektion des Plasmids mit der gesamten 3'-UTR (1 kb) lediglich eine auf 75 % verringerte Luciferaseaktivität zur Folge hatte. Werte von 60-66 % waren für die Transfektion der KSRP 3'-UTR-Deletionsplasmide 700 bp, 600 bp und 1 kb del200 bp zu verzeichnen, jeweils verglichen mit der Kontrolle. Das Vorhandensein bestimmter

Abschnitte der KSRP 3'-UTR scheint somit einen negativen regulatorischen Effekt auf die Expression der Luciferase zu haben.

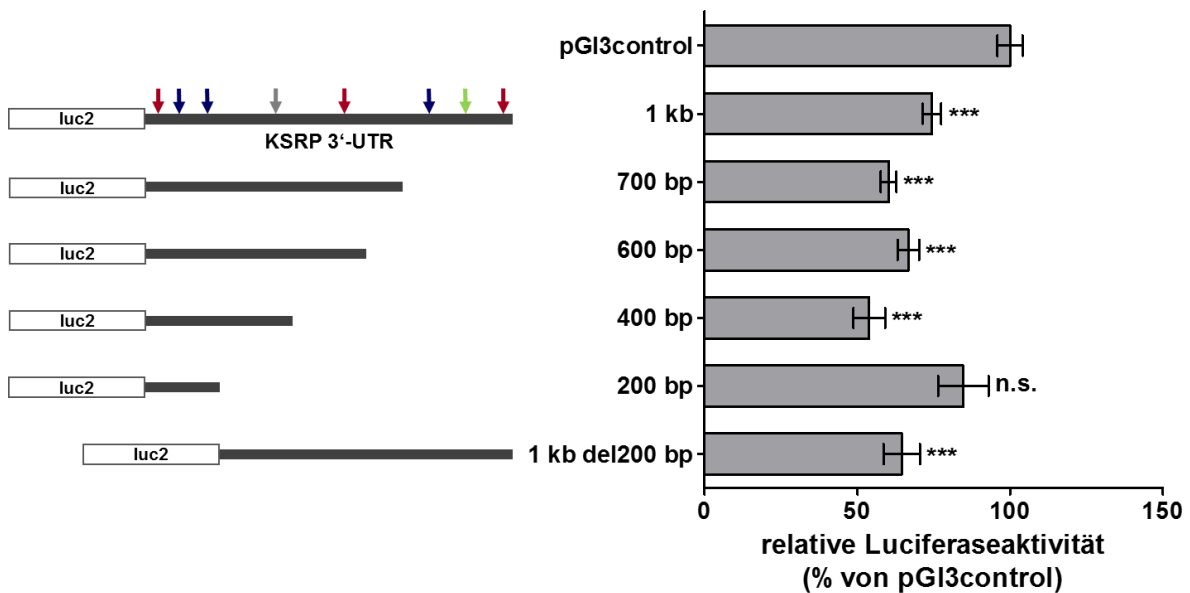


Abbildung 5.18: Analyse der regulatorischen Effekte der KSRP 3'-UTR auf die Luciferaseaktivität in DLD-1-Zellen.

DLD-1-Zellen wurden mit den pGI3KSRP 3'-UTR-Plasmiden 1 kb, 700 bp, 600 bp, 400 bp, 200 bp und 1 kb del200 bp (links schematisch dargestellt) sowie dem pGI3control Plasmid als Kontrolle transient transfiziert. Zur Ermittlung der Transfektionseffizienz wurden die Zellen mit dem pRLEF1 α -Plasmid kotransfiziert. Nach 24 Stunden wurden die Zellen in 200 μ l PLB lysiert und anschließend die Luciferase- und Renillaaktivitäten gemessen. Die Luciferaseaktivitäten wurden jeweils auf die dazugehörigen Renillaaktivitäten normiert. Dargestellt ist die Zusammenfassung aus 2-7 unabhängigen Experimenten mit jeweils 4 Messungen pro Gruppe. Die Säulen (Mittelwert \pm SEM) repräsentieren relative Luciferaseaktivitäten bezogen auf die Luciferaseaktivität der pGI3control transfizierten Zellen (***: $p < 0,001$; n.s.: nicht signifikant verschieden vs. pGI3control transfizierte Zellen, One-way ANOVA). Pfeile zeigen schematisch die AU-reichen Elemente in der 3'-UTR an.

5.1.8 KSRP bindet an seine eigene 3'-UTR

Durch die Reporter-Gen-Assays (Kapitel 5.1.7) konnte eine mögliche Relevanz der KSRP 3'-UTR für die posttranskriptionelle Regulation bestätigt werden. Da KSRP selbst als RNA-BP die mRNA-Stabilität verschiedener Gene durch die Bindung an AREs in der 3'-UTR reguliert, ist eine Autoregulation über die eigene 3'-UTR denkbar. Um diese Annahme zu verifizieren, wurden Pulldown-Experimente in Zusammenarbeit mit Stefan Hamelmann durchgeführt (Hamelmann 2016). Hierfür wurden die verschiedenen 3'-UTR-Fragmente 1 kb, 700 bp, 600 bp, 400 bp, 200 bp und 1 kb del200 bp in die *multiple cloning site* (MCS) des pCRScript-Vektors umklontiert (Tabelle 3.12). Die Plasmide wurden vor der *in vitro* Transkription (4.3.8.2.1) unmittelbar hinter dem 3'-Ende der 3'-UTR mit geeigneten Endonukleasen linearisiert (4.2.8.2). Eine Übersicht über die verwendeten Restriktionsenzyme und der jeweiligen Polymerase ist in Tabelle 3.14 dargestellt. Die *in vitro* transkribierte RNA wurde

schließlich in Pulldown-Assays (4.3.8.2.2) eingesetzt und die Bindung von KSRP an die jeweiligen 3'-UTR Abschnitte mit Hilfe von Western Blot-Analysen (4.3.5 und 4.3.6) überprüft. Als Positivkontrolle wurde die TNF- α 3'-UTR mitgeführt, da bekannt ist, dass KSRP die mRNA-Stabilität von TNF- α über die Bindung an ein ARE in der 3'-UTR reguliert (Linker, Pautz et al. 2005). Dementsprechend diente die TNF- α 3'-UTR mit deletiertem ARE als Negativkontrolle. Auf das SDS-Polyacrylamid-Gel wurden zusätzlich 100 μ g DLD-1-Lysat als Positivkontrolle für den Western Blot aufgetragen (Abbildung 5.19).

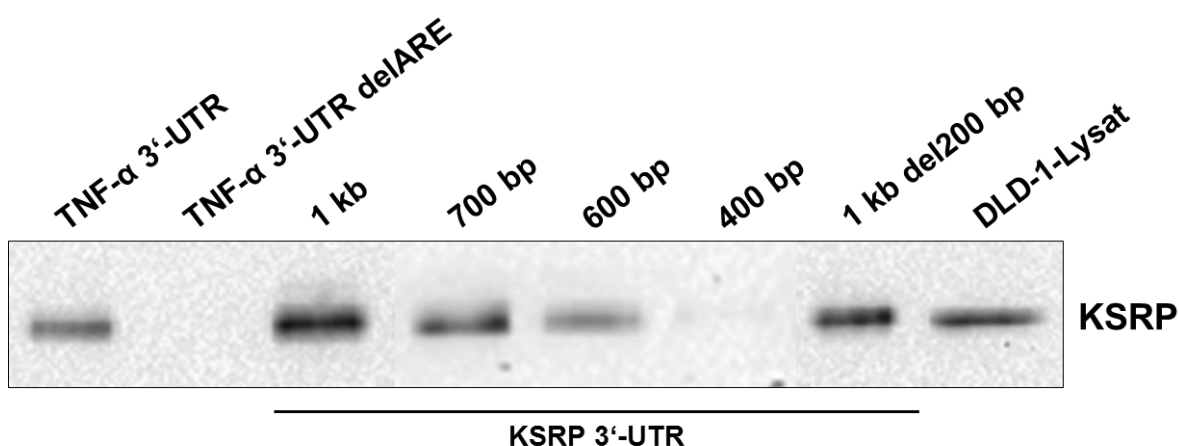


Abbildung 5.19: Nachweis der KSRP-Interaktion mit verschiedenen Fragmenten der KSRP 3'-UTR.

Die pCRScript Plasmide mit den KSRP 3'-UTR-Sequenzen 1 kb, 700 bp, 600 bp, 400 bp und 1 kb del200 bp sowie die Kontrollplasmide pCR-TNF α 3UTR und pCR-TNF α 3UTRdelARE wurden linearisiert und mit der T3 oder T7 Polymerase in vitro transkribiert. Mit Pulldown-Experimenten und anschließenden Western Blot-Analysen mit einem spezifischen KSRP-Antikörper (1:50 verdünnt in 5 % Milchpulver) wurde die Bindung von KSRP an die verschiedenen 3'-UTR-Fragmente überprüft. Zur Kontrolle wurden 100 μ g DLD-1-Lysat sowie der Proteinmarker Precision Plus Protein Dual Color Standard von BioRad zur Größenbestimmung (hier nicht gezeigt) aufgetragen. Der gezeigte Western Blot ist repräsentativ für 3 unabhängige Experimente.

Der in Abbildung 5.19 dargestellte Western Blot zeigt wie erwartet ein deutliches Signal für KSRP bei der Positivkontrolle TNF- α 3'-UTR, während bei der Negativkontrolle TNF- α 3'-UTR delARE kein KSRP detektiert werden konnte. Dies spricht dafür, dass die Methode funktioniert hat und bestätigt die Interaktion von KSRP mit der 3'-UTR von TNF- α . Weiterhin konnte ein Signal für die Proben KSRP 3'-UTR 700 bp, 600 bp und 1 kb del200 bp nachgewiesen werden, was eine Bindung von KSRP an diese Abschnitte der 3'-UTR indiziert. Für das 400 bp-Fragment konnte keine Interaktion mit KSRP festgestellt werden. Somit scheint KSRP im Bereich der Basen 400-600 der eigenen 3'-UTR zu binden.

5.1.9 Analyse einer möglichen Autoregulation von KSRP

Durch den Pulldown und den darauffolgenden Western Blot-Analysen konnte gezeigt werden, dass KSRP an die eigene 3'-UTR bindet und sich somit womöglich selbst auf posttranskriptioneller Ebene reguliert. Um dies zu überprüfen, wurden Zellen generiert, in denen KSRP entweder überexprimiert oder herunterreguliert vorliegt (4.1.7). Durch transiente Transfektionen (4.1.6.1) mit den entsprechenden 3'-UTR-Plasmiden und anschließenden Luciferase Aktivitätsmessungen (4.3.7) sollte untersucht werden, ob der in DLD-1-Zellen beobachtete negative regulatorische Effekt der 3'-UTR durch die veränderte KSRP-Expression beeinflusst wird.

5.1.9.1 Generierung von Zellen mit KSRP-Überexpression oder ohne KSRP

Die Zellen, die eine erhöhte Expression von KSRP aufwiesen, sowie Zellen ohne KSRP, wurden zum einen mittels lentiviraler Transduktion von DLD-1-Zellen (4.1.7.1) oder mit Hilfe der CRISPR/Cas9-Methode (4.1.7.2) hergestellt.

Um sicherzugehen, dass die Zellen für weitere Analysen geeignet waren, wurde die veränderte KSRP-Expression sowohl auf mRNA-Ebene mit Hilfe der qRT-PCR als auch auf Proteinebene mittels Western Blot überprüft (Abbildung 5.20). Für die RNA-Analysen wurden die Zellen in GIT-Puffer (3.5.1) lysiert, RNA isoliert (4.2.2), in cDNA umgeschrieben (4.2.4) und die KSRP-Expression schließlich mit spezifischen Oligonukleotiden gemessen (4.2.7; Tabelle 3.19). Zur Western Blot-Analyse wurden die Zellen in RIPA-Puffer (mit Proteinase- und Phosphataseinhibitoren, 3.5.4.2) aufgenommen, jeweils 200 µg Protein auf einem SDS-Polyacrylamid-Gel aufgetrennt (4.3.5) und KSRP sowie GAPDH als Ladekontrolle mit Hilfe spezifischer Antikörper (Tabelle 3.8) detektiert (4.3.6). Bei den EGFP-KSRP-Zellen wurde zusätzlich das EGFP-KSRP-Fusionsprotein mit einem spezifischen Antikörper gegen EGFP (Tabelle 3.8) visualisiert.

Durch die Western Blot-Analysen konnte auf Proteinebene gezeigt werden, dass KSRP in den lentiviral transduzierten Zellen herunterreguliert wurde (Abbildung 5.20, A). Die detektierte KSRP-Bande ist in den pGIPZ-siKSRP-Zellen zwar noch leicht zu erkennen, allerdings ist diese deutlich schwächer als in den Kontrollzellen. Auch die mRNA-Expression ist signifikant auf etwa 45 % verringert in den pGIPZ-siKSRP-Zellen gegenüber den pGIPZ-CO-Zellen (B). Die Überexpression von KSRP ist ebenfalls gelungen (Abbildung 5.20, C und D). Wenn auch nur schwach, konnte dennoch eine Bande detektiert werden, die spezifisch für das EGFP-KSRP-Fusionsprotein ist. Dabei spielt es keine Rolle, ob der KSRP- (C) oder GFP-Antikörper (D) verwendet wurde.

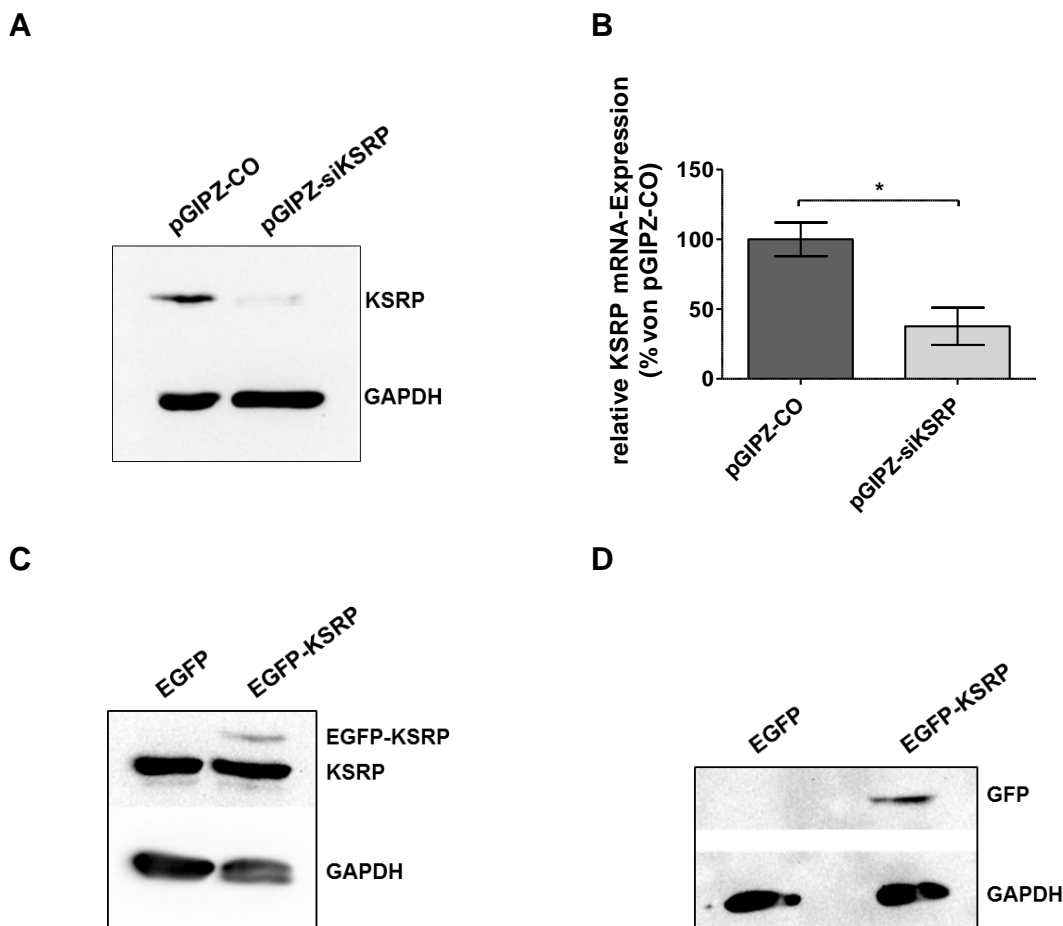


Abbildung 5.20: Überprüfung der KSRP-Expression in lentiviral transduzierten Zellen.

DLD-1-Zellen wurden zur Herstellung von Zellen ohne KSRP und Zellen mit KSRP-Überexpression mit den Plasmiden pGIPZshRNA_{mrKSRP} (pGIPZ-siKSRP) und pGIPZ-CO bzw. pCDH_{puro}EGFP-KSRP (EGFP-KSRP) und pCDH-CMV-MCS-EF1-Cop-GFP (EGFP) lentiviral transfiziert. Zur Überprüfung der KSRP-Expression auf Proteinebene wurden die Zellen in RIPA-Puffer lysiert, die Proteinkonzentration mittels Bradford (4.3.3) bestimmt und 200 µg Gesamtprotein in Western Blot-Analysen zur Detektion von KSRP und GFP sowie GAPDH als Ladekontrolle eingesetzt (GAPDH-Verdünnung: 1:1000 in 5 % MP).

(A) Repräsentativer Western Blot zum Nachweis der herunterregulierten KSRP-Expression in pGIPZ-siKSRP-Zellen, verglichen mit pGIPZ-CO-Kontrollzellen, unter Verwendung eines spezifischen KSRP-Antikörpers (1:50 verdünnt in 5 % MP).

(B) RNA wurde aus den Zellen isoliert (4.2.2), in cDNA umgeschrieben (4.2.4) und in qRT-PCR-Analysen eingesetzt (4.2.7). Dargestellt ist die relative mRNA-Expression (Mittelwert ± SEM) von KSRP in pGIPZ-siKSRP-Zellen, bezogen auf die Expression in Kontrollzellen (pGIPZ-siKSRP). Zur Normierung wurde die Pol2a-Expression gemessen (*: $p < 0,05$, ttest).

(C) Repräsentativer Western Blot zum Nachweis der Expression des EGFP-KSRP-Fusionsproteins in KSRP-überexprimierenden Zellen (EGFP-KSRP) im Vergleich zu Kontrollzellen (EGFP) unter Verwendung eines spezifischen KSRP-Antikörpers (1:50 verdünnt in 5 % MP).

(D) Repräsentativer Western Blot zum Nachweis der Expression des EGFP-KSRP-Fusionsproteins in KSRP-überexprimierenden Zellen (EGFP-KSRP) im Vergleich zu Kontrollzellen (EGFP) unter Verwendung eines spezifischen GFP-Antikörpers (1:1000 verdünnt in 5 % MP). Die GFP-Bande in den Kontrollzellen ist aufgrund der geringen Größe des Proteins nicht gezeigt.

Weiterhin wurden KSRP-defiziente Zellen mit der CRISPR/Cas9-Methode generiert. Regelmäßige Western Blot-Analysen haben gezeigt, dass der KSRP-Knockout stärker wurde, je länger sich die Zellen in Kultur befanden (Daten nicht gezeigt). Diese Beobachtung lässt sich darauf zurückführen, dass das CRISPR/Cas9-System während der ganzen Zeit, in der

die Zellen kultiviert wurden, weiterhin aktiv blieb. Abbildung 5.21, A zeigt einen repräsentativen Blot zur Kontrolle der KSRP-Expression in den Zellen. Es ist zu erkennen, dass in CRISPR/Cas9-Zellen kein KSRP-Signal mehr detektiert werden konnte, während in den Kontrollzellen eine deutliche Bande für KSRP sichtbar war. Des Weiteren konnte ebenfalls eine verminderte mRNA-Menge von KSRP in den CRISPR/Cas9-Zellen detektiert werden (Abbildung 5.21, B).

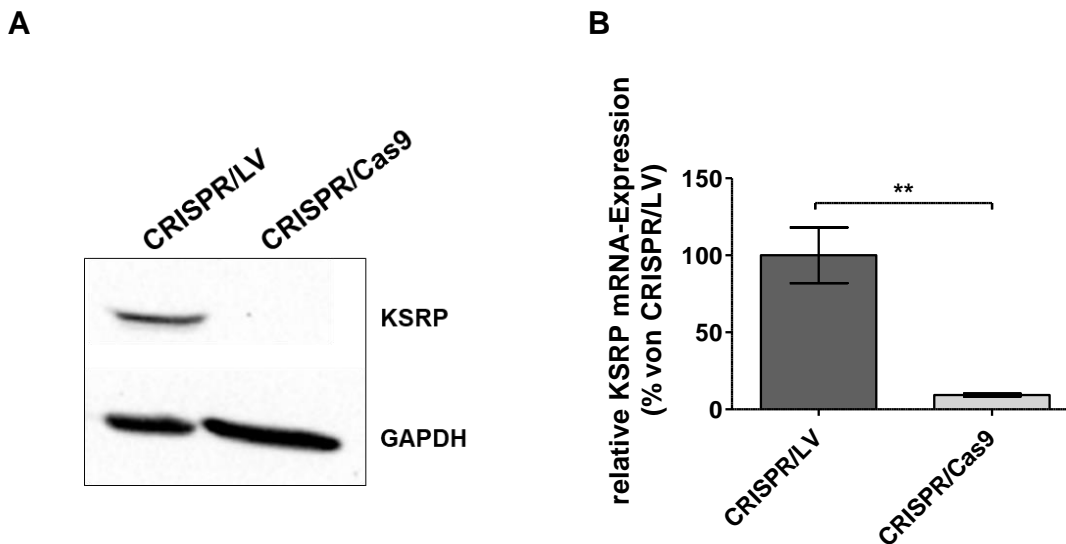


Abbildung 5.21: Überprüfung des KSRP-Knockouts in CRISPR/Cas9-Zellen.

Das KSRP Gen wurde mit Hilfe der CRISPR/Cas9-Methode funktionsunfähig gemacht. Zur Überprüfung der KSRP-Expression wurden qRT-PCR- (4.2.7) und Western Blot-Analysen (4.3.6) durchgeführt.

(A) Die Zellen wurden in RIPA-Puffer lysiert, die Proteinkonzentration mittels Bradford-Assay (4.3.3) bestimmt und 200 µg Gesamtprotein auf einem 10 % SDS-Polyacrylamid-Gel aufgetrennt. Nach Übertragung auf eine Nitrozellulosemembran erfolgte die Detektion unter Verwendung spezifischer anti-KSRP- (1:50 verdünnt in 5 % MP) und anti-GAPDH- (1:1000 verdünnt in 5 % MP) Antikörper. Dargestellt ist ein repräsentativer Western Blot.

(B) Die Zellen wurden in GIT-Puffer lysiert, RNA isoliert, in cDNA umgeschrieben und die mRNA-Menge in qRT-PCR-Analysen gemessen. Dargestellt ist die relative mRNA-Expression (Mittelwert ± SEM) von KSRP in CRISPR/Cas9-Zellen, bezogen auf die Expression in Kontrollzellen (CRISPR/LV). Zur Normierung wurde die Pol2a-Expression gemessen (**: $p < 0,01$, ttest).

Die beschriebenen Zellen stellen somit insgesamt geeignete Systeme zur Untersuchung einer potentiellen Autoregulation von KSRP dar.

5.1.9.2 Der negative Effekt der KSRP 3'-UTR auf die Luciferaseaktivität wird nicht verändert durch den Knockout oder die Überexpression von KSRP

Die Rolle verschiedener KSRP 3'-UTR-Fragmente für die Regulation der Genexpression wurde in Reporterexperimenten in Abhängigkeit der KSRP-Expression analysiert. Hierfür wurden Zellen, in denen die Expression von KSRP entweder ausgeschaltet oder erhöht ist, (5.1.9.1) transient mit dem 3'-UTR-Plasmid pGI3KSRP 3'-UTR 1 kb sowie den

Deletionskonstrukten mit verkürzter 3'-UTR (700 bp, 600 bp, 400 bp, 200 bp und 1 kb del200 bp) transfiziert (4.1.6.1) und die Luciferaseaktivitäten gemessen (4.3.7). Als Kontrollplasmid diente pGI3control und zur späteren Normierung wurde das Plasmid pRLEF1 α kotransfiziert. Für die Auswertung wurden jeweils die mit dem pGI3control-Plasmid transfizierten Kontrollzellen (pGIPZ-CO, CRISPR/LV und EGFP) auf 100 % gesetzt.

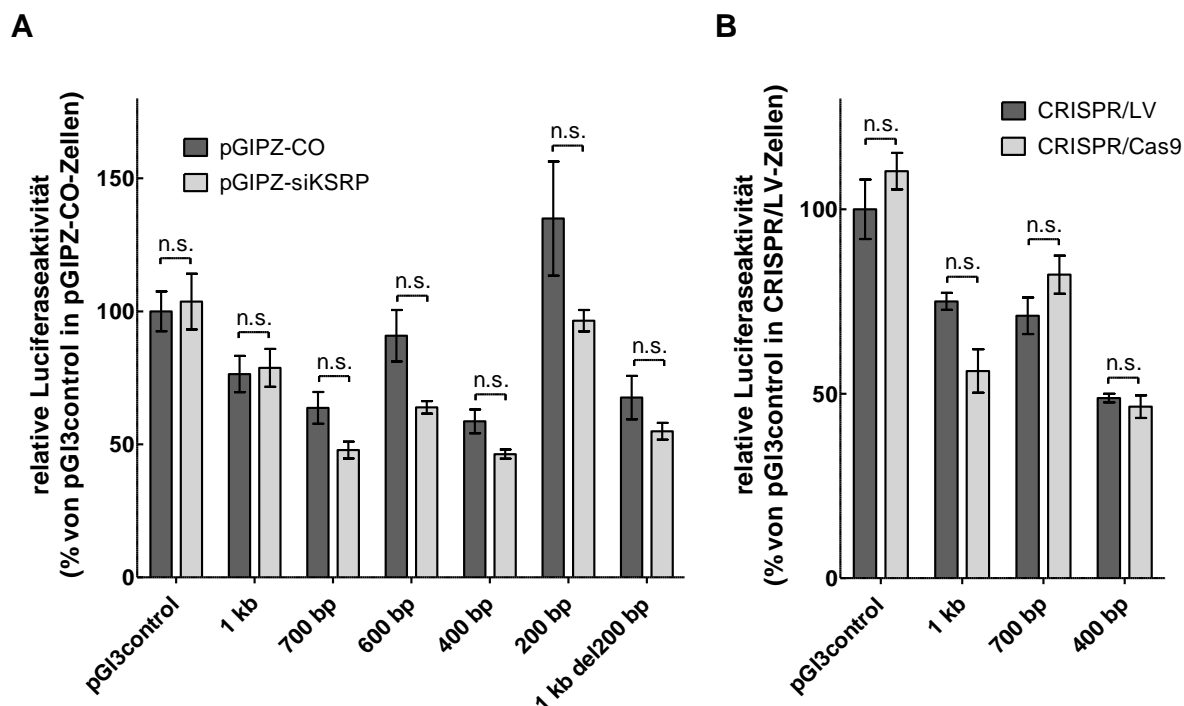


Abbildung 5.22: Analyse der Luciferaseaktivität unter dem Einfluss der KSRP 3'-UTR in Zellen mit verminderter KSRP-Expression.

DLD-1-Zellen mit verminderter KSRP-Expression und die jeweiligen Kontrollzellen wurden mit KSRP 3'-UTR-Plasmiden sowie pGI3control transient transfiziert. Zur Ermittlung der Transfektionseffizienz wurde das pRLEF1 α Plasmid kotransfiziert. Nach 24 Stunden wurden die Zellen in 200 μ l PLB lysiert und anschließend die Firefly- und Renillaaktivitäten gemessen. Die Fireflyaktivitäten wurden jeweils auf die dazugehörigen Renillaaktivitäten normiert. Dargestellt ist die Zusammenfassung aus 4 unabhängigen Experimenten mit jeweils 4-6 Messungen pro Gruppe. Die Säulen (Mittelwert \pm SEM) repräsentieren relative Luciferaseaktivitäten bezogen auf die Luciferaseaktivität der pGI3control transfizierten Kontrollzellen (n.s.: nicht signifikant verschieden, Two-way ANOVA).

(A) Lentiviral hergestellte DLD-1-Zellen, in welchen die KSRP-Expression herunterreguliert wurde (pGIPZ-siKSRP) und Kontrollzellen (pGIPZ-CO) wurden mit den pGI3KSRP 3'-UTR-Plasmiden 1 kb, 700 bp, 600 bp, 400 bp, 200 bp und 1 kb del200 bp transient transfiziert.

(B) Mit der CRISPR/Cas9-Methode generierte DLD-1-Zellen mit ausgeschalteter KSRP-Expression (CRISPR/Cas9) und Kontrollzellen (CRISPR/LV) wurden mit den pGI3KSRP 3'-UTR-Plasmiden 1 kb, 700 bp und 400 bp transient transfiziert.

Sowohl in den pGIPZ-Zellen als auch in den CRISPR-Zellen konnte der negative Effekt, den das Vorhandensein der KSRP 3'-UTR in transfizierten DLD-1-Zellen auf die Luciferaseaktivität ausgeübt hat, bestätigt werden (vgl. Abbildung 5.18 und Abbildung 5.22). Die transiente Transfektion der 3'-UTR-Plasmide pGI3KSRP 3'-UTR 1 kb, 700 bp, 600 bp, 400 bp und 1 kb del200 bp mit nachfolgender Aktivitätsmessung der Luciferase führte zu einer verringerten relativen Aktivität, verglichen mit pGI3control transfizierten Zellen. Dabei spielte es keine Rolle,

ob die Zellen eine normale (pGIPZ-CO, CRISPR/LV) oder eine verringerte KSRP-Expression (pGIPZ-siKSRP, CRISPR/Cas9) aufwiesen. Die 200 bp 3'-UTR hatte keinen negativen regulatorischen Einfluss auf die Luciferaseexpression, wohingegen die Transfektion des KSRP 3'-UTR 400 bp Plasmids in allen Zelllinien die geringste Luciferaseaktivität von ca. 50 % zur Folge hatte. Wird die Transfektion einzelner Plasmide betrachtet und die gemessenen Aktivitäten jeweils in den pGIPZ-CO- und den pGIPZ-siKSRP-Zellen miteinander verglichen, war für alle Plasmide kein signifikanter Unterschied zu verzeichnen (Abbildung 5.22, A). Die Transfektion der Deletionsplasmide führte sogar in pGIPZ-siKSRP-Zellen zu einer tendenziell stärkeren Aktivitätsminderung als in den Kontrollzellen, bezogen auf pGI3control transfizierte Zellen. Auch zwischen den CRISPR/Cas9- und den Kontrollzellen konnte kein signifikanter Unterschied für die einzelnen Plasmid-Transfektionen beobachtet werden (Abbildung 5.22, B).

Unterstützt wurden diese Daten durch Reporteranalysen mit KSRP-überexprimierenden Zellen (5.1.9.1). Die transiente Transfektion mit dem pGI3KSRP 3'-UTR 1 kb sowie den 3'-UTR-Deletionsplasmiden 700 bp, 600 bp, 400 bp, 200 bp und 1 kb del200 bp hatten jeweils keine signifikant verschiedenen Luciferaseaktivitäten zwischen EGFP- und EGFP-KSRP-Zellen zur Folge (Abbildung 5.23). Dennoch wurde auch hier der negative regulatorische Einfluss der 3'-UTR auf die Luciferase-Expression deutlich. Die gemessene Aktivität war in den Zellen, die mit den 700 bp, 600 bp, 400 bp und 1 kb del200 bp 3'-UTR-Plasmiden transfiziert wurden, auf mindestens 85 % reduziert im Vergleich zur Transfektion mit dem pGI3control-Plasmid. Die 400 bp 3'-UTR zog mit einer Verringerung der Luciferaseaktivität auf 43 % in Kontrollzellen (EGFP) den größten negativen Effekt nach sich. Im Gegensatz dazu hatte die 1 kb 3'-UTR keinen regulatorischen Einfluss auf die Luciferaseaktivität.

Da die veränderte KSRP-Expression die Luciferaseaktivitäten unter der Kontrolle der verschiedenen KSRP 3'-UTR-Fragmente nicht beeinflusst, wird eine Autoregulation von KSRP auf posttranskriptioneller Ebene unwahrscheinlich.

Aufgrund der Vergleichbarkeit der Ergebnisse in den lentiviral hergestellten Zellen und den CRISPR/Cas9-Zellen, fanden für die weiterführenden Analysen nur noch die CRISPR/Cas9-Zellen Anwendung.

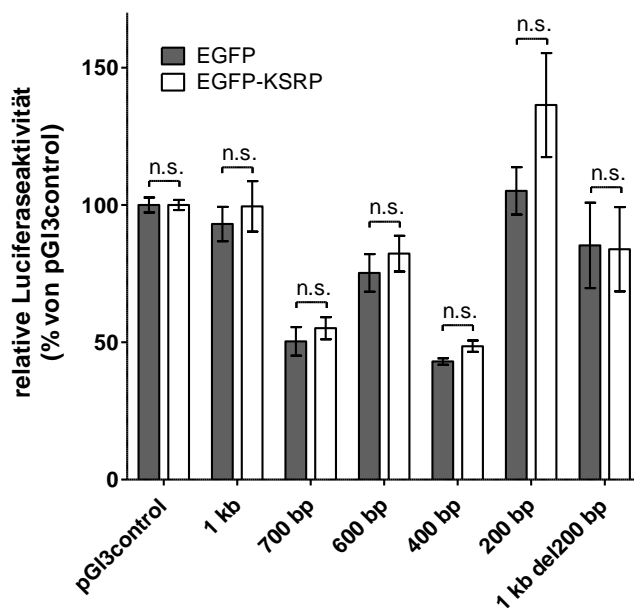


Abbildung 5.23: Analyse der Luciferaseaktivität unter dem Einfluss der KSRP 3'-UTR in KSRP-überexprimierenden Zellen.

Lentiviral transfizierte DLD-1-Zellen mit einer KSRP-Überexpression (EGFP-KSRP) und den Kontrollzellen (EGFP) wurden mit den pGI3KSRP 3'-UTR-Plasmiden 1 kb, 700 bp, 600 bp, 400 bp, 200 bp und 1 kb del200 bp sowie pGI3control als Kontrolle transient transfiziert. Zur Ermittlung der Transfektionseffizienz wurde das pRLEF1 α Plasmid kotransfiziert. Nach 24 Stunden wurden die Zellen in 200 μ l PLB lysiert und anschließend die Luciferaseaktivitäten gemessen. Die Aktivitäten der Firefly-Luciferase wurden jeweils auf die zugehörigen Renillaaktivitäten normiert. Dargestellt ist die Zusammenfassung aus 3 unabhängigen Experimenten mit jeweils 4-6 Messungen pro Gruppe. Die Säulen (Mittelwert \pm SEM) repräsentieren relative Luciferaseaktivitäten bezogen auf die Aktivität der pGI3control transfizierten Zellen (n.s.: nicht signifikant verschieden, Two-way ANOVA).

5.1.9.3 Neben KSRP interagieren weitere RNA-Bindeproteine mit der KSRP 3'-UTR

Die Ergebnisse der Pulldown-Analysen zeigen zusammen mit den Reporter-gen-Daten in Zellen mit veränderter KSRP-Expression, dass KSRP zwar an AU-reiche Elemente in der eigenen 3'-UTR bindet, die Expression auf posttranskriptioneller Ebene allerdings nicht über die 3'-UTR reguliert. Denkbar wäre, dass die Regulation durch ein Zusammenspiel mehrerer RNA-BPs vermittelt wird. Aus diesem Grund sollte das Spektrum an RNA-BPs, die mit der KSRP 3'-UTR interagieren, mit Hilfe von massenspektrometrischen Analysen erweitert werden. Die Massenspektrometrie (MS) ist eine Methode zur quantitativen und qualitativen Molekülbestimmung. Dabei können alle Proteine eines Gemischs identifiziert werden.

Hierfür wurde das Plasmid pGI3KSRP 3'-UTR 1 kb in Pulldown-Experimente (4.3.7) eingesetzt, an die 3'-UTR gebundene Proteine eluiert und das Eluat zur weiteren Aufarbeitung und Identifizierung der RNA-BPs an die Technische Universität in Kaiserslautern (*Center for MS-analytics*) geschickt. Als Negativkontrolle wurde das Plasmid pGI3T7basic (Tabelle 3.14) verwendet, welches eine Luciferasesequenz unter der Kontrolle des T7 Promotors exprimiert, die weitestgehend keinen Angriffspunkt für RNA-BPs bilden sollte. Präliminäre MS-Analysen identifizierten eine Reihe von möglichen Interaktionspartnern der KSRP 3'-UTR (Tabelle 5.2). Zur Auswertung der Daten und um erste Aussagen über die potentiellen Bindeproteine machen zu können, wurde für jedes Protein der Quotient gebildet aus der Anzahl der Peptide,

die an die KSRP 3'-UTR und an die Negativkontrolle gebunden hatten. Dabei wurde mindestens durch den Wert 1 geteilt. Es gilt, je höher der Quotient, desto größer ist die Wahrscheinlichkeit einer Bindung. Tabelle 5.2 zeigt eine Zusammenfassung der Proteine, für die eine Interaktion mit der KSRP 3'-UTR nachgewiesen werden konnte. Dabei sind Proteine aufgelistet, die mindestens einen Quotienten von 1,5 aufwiesen.

Tabelle 5.2: Durch massenspektrometrische Analysen identifizierte RNA-Bindeproteine der KSRP 3'-UTR

Protein	Quotient aus Anzahl Peptide 3'-UTR / Anzahl Peptide Negativkontrolle
PABP C1 und C3	27
SYNCRIP (<i>Synaptotagmin-binding cytoplasmic RNA-interacting protein</i>)	17
IGF2BP2 (<i>Insulin-like growth factor 2 mRNA-binding protein 2</i>)	17
hnRNP C, CL4, CL1, CL3 und CL2 (<i>Heterogenous nuclear ribonucleoprotein</i>)	15
Vigilin	12,5
hnRNPK	11
FBP3	10
PABP N1 und C1	9
FBP1	8,3
KHDRBS1 (<i>KH domain-containing, RNA-binding, signal transduction-associated protein 1</i>)	8
PTBP1 (<i>Polypyrimidine tract-binding protein 1</i>)	8
IGF2BP3 (<i>Insulin-like growth factor 2 mRNA-binding protein 3</i>)	8
RALY	7
hnRNP A1 und A1L2	5,5
PCBP2 (<i>Poly(rC) binding protein 2</i>)	5
YBX 1-3 (Y-Box-Bindeproteine)	5
KSRP	4,83
PCBP1	4,5
RBM X (<i>RNA-binding motif protein, X chromosome</i>) und XL1 (<i>X-linked-like 1</i>)	4
hnRNP A2B1	3,3
hnRNP AB	3
HuR	1,5

Dass die bekannten RNA-BPs wie HuR oder verschiedene Poly-A-Bindeproteine (PABP) mit der KSRP 3'-UTR interagieren, konnte bereits in früheren Arbeiten der AG Kleinert durch UV-

Crosslink-Analysen nachgewiesen werden (Art 2012). Interessant ist, dass neben KSRP selbst auch die anderen FUSE-Bindeproteine FBP1 und FBP3 an dessen 3'-UTR binden (Tabelle 5.2). Das ist vermutlich dadurch bedingt, dass die Proteinsequenzen der FBPs weitestgehend konserviert sind (Davis-Smyth, Duncan et al. 1996). Weiterhin deuten die MS-Daten auf eine Interaktion zwischen verschiedenen Mitgliedern der hnRNP-Familie (*Heterogenous nuclear ribonucleoprotein*) und der KSRP 3'-UTR hin. Es handelt sich dabei um multifunktionelle RNA-BPs, welche die Genexpression auf verschiedenen Ebenen regulieren (Chaudhury, Chander et al. 2010). Demnach konnten einige Proteine identifiziert werden, die eine posttranskriptionelle Regulation der KSRP-Expression über die 3'-UTR denkbar machen.

5.1.9.4 Analyse der Autoregulation über die KSRP 5'-UTR – Klonierung eines Minigens

In den vorhergehenden Kapiteln konnte gezeigt werden, dass KSRP zwar an die eigene 3'-UTR bindet, jedoch nicht direkt und vor allem nicht alleine an der posttranskriptionellen Regulation über die 3'-UTR beteiligt zu sein scheint. Wie bereits beschrieben, kann neben der 3'-UTR auch die 5'-UTR regulatorische Funktionen auf posttranskriptioneller Ebene bzw. auf der Ebene der Translationseffizienz erfüllen (vgl. Kapitel 1.1.2.3). Dass die KSRP 5'-UTR als translationaler *Enhancer* fungiert, konnte schon in Kapitel 5.1.4.4 gezeigt werden. In den folgenden Kapiteln sollte nun überprüft werden, ob die KSRP 5'-UTR möglicherweise für eine Autoregulation von KSRP von Bedeutung ist, wofür Reporter- sowie mRNA-Analysen in CRISPR/Cas9-Zellen durchgeführt wurden. In diesem Zusammenhang wurde außerdem eine Regulation in Betracht gezogen, welche die 5'-UTR und die 3'-UTR in Kombination beinhaltet.

Um dies zu untersuchen, wurde ein Plasmid generiert, welches für ein KSRP-Minigen kodiert, bestehend aus dem 245 bp Promotor, der KSRP 5'-UTR, der kodierenden Sequenz für die Luciferase sowie der KSRP 3'-UTR. Hierfür wurde die 245 bp prom 5'-UTR-Sequenz mit den Oligonukleotiden hKSRPprom 5'-UTR_5P2 und hKSRP 5'-UTR_3P1 (Tabelle 3.17) sowie genomischer DNA aus DLD-1-Zellen als PCR-Vorlage amplifiziert (4.2.5), mit BglII und NcoI restringiert (4.2.8.2) und in den pGI3basic-Vektor ligiert (4.2.8.8). In das so entstandene Plasmid **pGI3KSRPprom 245 bp 5'-UTR** wurden schließlich die zu untersuchenden 3'-UTR-Sequenzen (1 kb bzw. 700 bp) hinter die Luciferasesequenz kloniert. Für die 1 kb lange 3'-UTR wurde eine PCR mit den Oligonukleotiden huKSRP_3UTR_5P1 und huKSRP_3UTR_3P5 (Tabelle 3.17) und dem Plasmid pcDNA4/TOLucKSRP3'UTR A (Tabelle 3.12) als PCR-Vorlage durchgeführt (**Minigen 1 kb 3'-UTR**). Die 700 bp Sequenz wurde durch Restriktion desselben Plasmids mit XbaI gewonnen (**Minigen 700 bp 3'-UTR**).

Zunächst wurde die Funktionalität der Minigen-Plasmide überprüft, indem DLD-1-Zellen mit den Plasmiden transient transfiziert (4.1.6.1) wurden und die Luciferaseaktivität in Reporteranalysen (4.3.7) gemessen wurde.

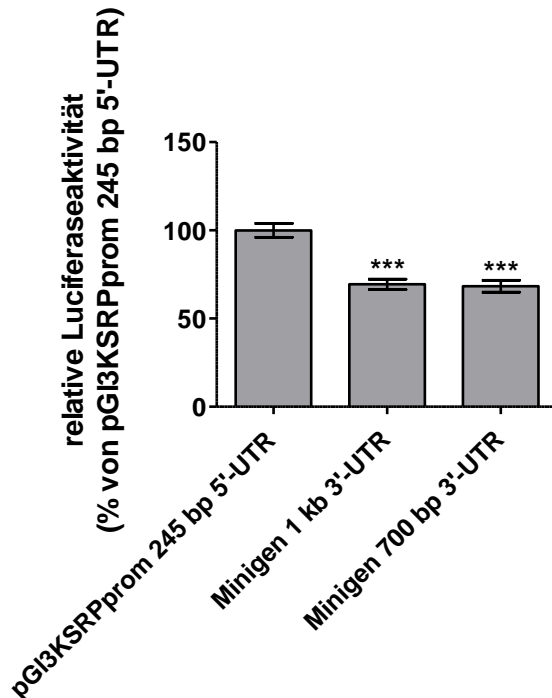


Abbildung 5.24: Messung der Luciferaseaktivität des KSRP-Minigens nach transienter Transfektion von DLD-1-Zellen.

DLD-1-Zellen wurden transient mit den Plasmiden pGI3KSRPprom 245 bp 5'-UTR, Minigen 1 kb 3'-UTR und Minigen 700 bp 3'-UTR sowie dem pRLEF1 α -Plasmid mit einer Renilla-Luciferase transient transfiziert. Die Zellen wurden nach 24 Stunden in 200 μ l PLB pro Ansatz lysiert und die Firefly- sowie die Renillaaktivitäten gemessen. Zur Auswertung wurden die Werte der Firefly-Luciferase auf die entsprechenden Renillawerte normiert. Die Säulen repräsentieren Mittelwerte (\pm SEM) von 1-3 unabhängigen Messungen mit 4 Replikaten pro Plasmid, wobei die normierten Luciferaseaktivitäten jeweils auf die Aktivität von pGI3KSRPprom 245 bp 5'-UTR transfizierten Zellen bezogen wurde (***: $p < 0,001$; One-way ANOVA).

In diesem Experiment konnte der bereits beobachtete negative Effekt der KSRP 3'-UTR auf die Luciferaseaktivität bestätigt werden (Abbildung 5.24). Die mit den Minigen-Plasmiden transfizierten DLD-1-Zellen zeigten eine auf 70 % reduzierte Aktivität im Vergleich zur Transfektion mit dem Plasmid ohne 3'-UTR (pGI3KSRPprom 245 bp 5'-UTR). Daher lässt sich sagen, dass die neu generierten Plasmide die Luciferase funktionsfähig exprimieren und die Expression durch das Vorhandensein der KSRP 3'-UTR reguliert wird.

5.1.9.5 Die transiente Transfektion des Minigens in Zellen mit ausgeschalteter KSRP-Expression führt zu einer veränderten Luciferaseexpression

Im Folgenden wurde die Luciferaseexpression in CRISPR/Cas9-Zellen nach transienter Transfektion der KSRP-Minigen-Plasmide untersucht. Die Ergebnisse der Messungen sind in Abbildung 5.25 dargestellt. Der negative Effekt der KSRP 3'-UTR auf die Luciferaseaktivität konnte auch in den CRISPR-Zellen bestätigt werden. Zudem zeigte sich im Vergleich der Aktivitäten in den CRISPR/Cas9- und den Kontrollzellen, dass die gemessenen Luciferasewerte in den Zellen ohne KSRP nach Transfektion mit den verschiedenen Plasmiden deutlich erhöht vorlagen. Dabei führte die transiente Transfektion des pGI3KSRPprom 245 bp 5'-UTR-Plasmids sogar zu einer signifikanten Aktivitätssteigerung auf

mehr als das Doppelte in den CRISPR/Cas9-Zellen. Damit wurde die zunächst angenommene kombinatorische Regulation aus 5'-UTR und 3'-UTR widerlegt. Allerdings lassen die Daten eine negative Autoregulation von KSRP über den Promotor und die 5'-UTR vermuten. Da KSRP neben RNA auch DNA bindet, könnte KSRP einerseits als Transkriptionsfaktor mit der 245 bp Promotorsequenz interagieren und somit die Transkription steuern. Andererseits könnte die Regulation durch translationale Mechanismen über die 5'-UTR erfolgen.

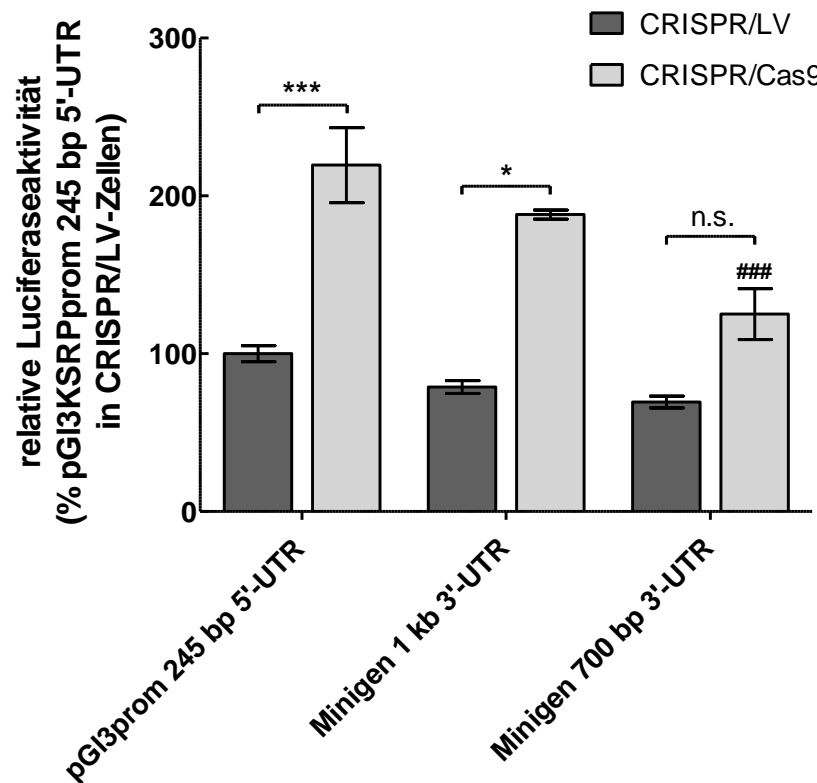


Abbildung 5.25: Analyse der Luciferaseaktivität nach transienter Transfektion von KSRP-Knockout-Zellen mit den KSRP Minigen-Plasmiden.

CRISPR/LV-Kontrollzellen und CRISPR/Cas9-Zellen ohne KSRP Proteinexpression wurden mit den Plasmiden pGI3KSRPprom 245 bp 5'-UTR, Minigen 1 kb 3'-UTR sowie Minigen 700 bp 3'-UTR transient transfiziert. Zur Ermittlung der Transfektionseffizienz wurde das pRLEF1 α -Plasmid, welches eine Renilla-Luciferase exprimiert, kotransfiziert. Nach 24 Stunden wurden die Zellen mit 200 μ l PLB lysiert und anschließend die Firefly- und Renillaaktivitäten gemessen. Die Fireflyaktivitäten wurden jeweils auf die dazugehörigen Renillaaktivitäten normiert. Dargestellt ist die Zusammenfassung aus 1-3 unabhängigen Experimenten mit jeweils 3-4 Wiederholungen pro Plasmid und Zelllinie. Die Säulen (Mittelwert \pm SEM) repräsentieren relative Luciferaseaktivitäten bezogen auf die Luciferaseaktivität der mit pGI3KSRPprom 245 bp 5'-UTR transfizierten CRISPR/LV-Zellen (***: $p < 0,001$ CRISPR/LV vs. CRISPR/Cas9; *: $p < 0,05$ CRISPR/LV vs. CRISPR/Cas9; n.s.: nicht signifikant verschieden; ###: $p < 0,001$ Minigen 700 bp 3'-UTR vs. pGI3KSRPprom 245 bp 5'-UTR in CRISPR/Cas9-Zellen, One-way ANOVA).

Um zu überprüfen, auf welcher Ebene die Selbstregulation stattfindet, wurde das KSRP Promotorplasmid pGI4lucKSRPprom 245 bp, welches keine 5'-UTR-Sequenz enthält, transient in CRISPR/LV- sowie in CRISPR/Cas9-Zellen transfiziert und die Luciferaseaktivitäten gemessen.

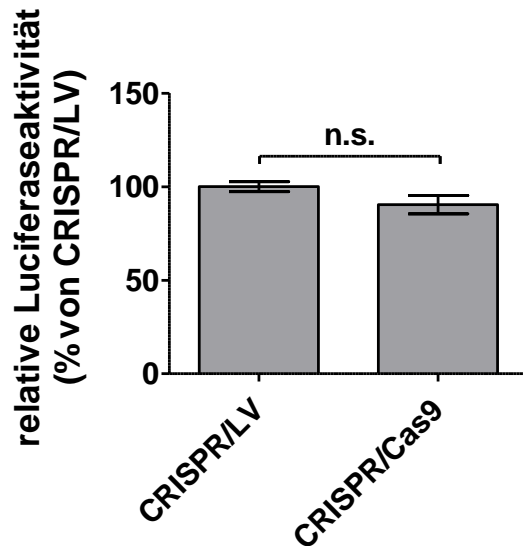


Abbildung 5.26: Analyse der Luciferaseaktivität in mit pGI4lucKSRPprom 245 bp transfizierten CRISPR-Zellen.

DLD-1-CRISPR/LV- und DLD-1-CRISPR/Cas9-Zellen wurden transient mit dem Plasmid pGI4lucKSRPprom 245 bp sowie dem pRLEF1 α -Plasmid transfiziert. Die Zellen wurden nach 24 Stunden in 200 μ l PLB pro Ansatz lysiert und die Firefly- sowie die Renillaaktivitäten gemessen. Zur Auswertung wurden die Fireflywerte auf die entsprechenden Renillawerte normiert. Dargestellt ist die Zusammenfassung aus 2 unabhängigen Messungen mit 4 Replikaten pro Zelllinie. Die mittleren Luciferaseaktivitäten (\pm SEM) wurden auf transfizierte CRISPR/LV-Zellen bezogen (n.s.: nicht signifikant verschieden; ttest).

In Abbildung 5.26 wird deutlich, dass die Luciferaseexpression unter der Kontrolle des 245 bp Promotors in den CRISPR/Cas9-Zellen verglichen mit den Kontrollzellen unverändert blieb, was eine Selbstregulation der KSRP-Expression über den Promotor unwahrscheinlich macht. Somit scheint die KSRP 5'-UTR für die Eigenregulation eine Rolle zu spielen.

Im Folgenden wurde daher untersucht, in welchen Prozess KSRP eingreift, um die eigene Expression über die 5'-UTR zu regulieren. Hierfür wurden CRISPR/LV und CRISPR/Cas9-Zellen mit dem Plasmid pGI4lucKSRPprom 245 bp 5'-UTR Inglo transient transfiziert, um anschließend die Expression der Luciferase sowohl auf RNA- als auch auf Proteinebene bestimmen zu können.

In Luciferase Reporteranalysen löste die transiente Transfektion des Plasmids pGI4lucKSRPprom 245 bp 5'-UTR in Zellen ohne KSRP (CRISPR/Cas9) eine signifikante Aktivitätssteigerung der Luciferase aus, verglichen mit den Kontrollzellen (Abbildung 5.27, A). Im Gegensatz dazu gab es keinen signifikanten Unterschied in der mRNA-Menge zwischen den beiden Zelllinien. Tendenziell ging die mRNA-Expression der Luciferase in transfizierten CRISPR/Cas9-Zellen im Vergleich zu den CRISPR/LV-Zellen sogar zurück (Abbildung 5.27, B). Daraus lässt sich schließen, dass der *Knockout* von KSRP die Translation der Luciferase positiv beeinflusst, wobei dieser Effekt möglicherweise durch das Vorhandensein der KSRP 5'-UTR gesteuert wird.

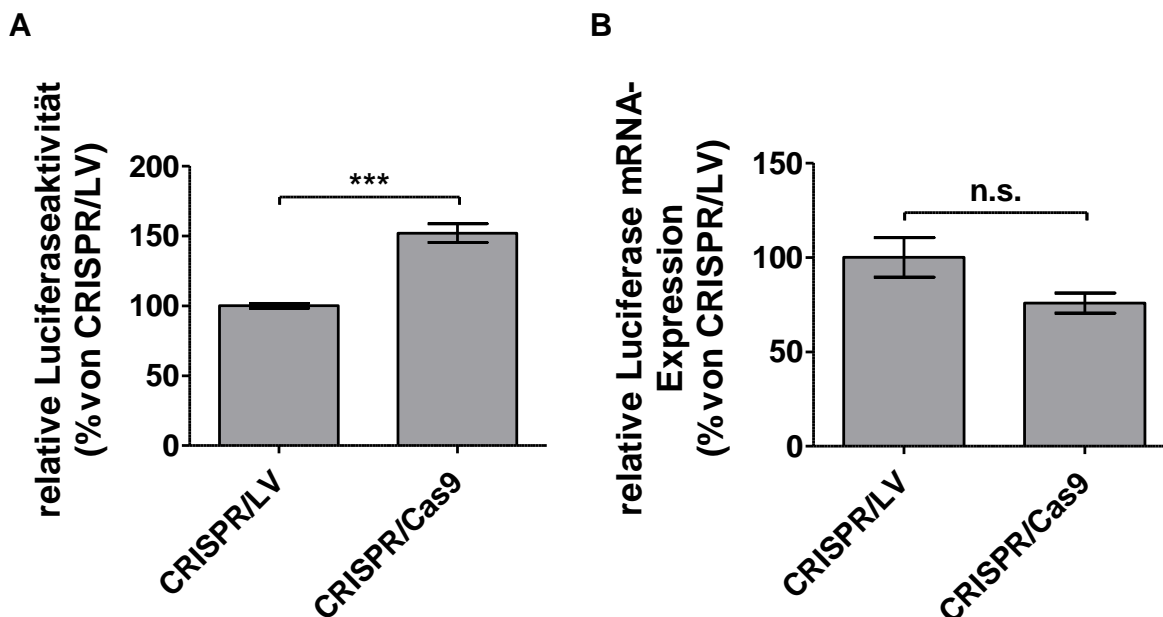


Abbildung 5.27: Untersuchung der Rolle der 5'-UTR für die Autoregulation von KSRP auf transkriptioneller und translationaler Ebene.

Zellen, in denen die KSRP-Expression ausgeschaltet ist (CRISPR/Cas9) und Kontrollzellen (CRISPR/LV) wurden transient mit dem Plasmid pGI4lucKSRPprom 245 bp 5'-UTR Inglo sowie pRLEF1 α zur Normierung transfiziert. Die Lyse der Zellen erfolgte nach 24 Stunden in 200 μ l PLB für Luciferase Aktivitätsmessungen bzw. 200 μ l GIT für RNA-Analysen.

(A) Die Firefly- und Renillaaktivitäten wurden gemessen. Zur Auswertung wurden die Werte der Fireflyaktivität auf die entsprechenden Renillawerte normiert. Dargestellt ist die Zusammenfassung aus 4 unabhängigen Messungen mit 4-6 Replikaten pro Zelllinie. Die mittleren Luciferaseaktivitäten (\pm SEM) wurden auf transfizierte CRISPR/LV-Zellen bezogen (***: $p < 0,001$; ttest).

(B) RNA wurde isoliert (4.2.2), in cDNA umgeschrieben (4.2.4) und in qRT-PCR-Analysen zur Quantifizierung der Firefly-Luciferase mRNA-Expression mit spezifischen Oligonukleotiden eingesetzt (4.2.7). Zur Normierung wurde die Expression der Renilla-Luciferase gemessen. Gezeigt ist die relative mRNA-Expression bezogen auf transfizierte CRISPR/LV-Zellen. Die Säulen repräsentieren Mittelwerte (\pm SEM) von 2 Analysen mit 6 Wiederholungen pro Zelllinie (n.s.: nicht signifikant verschieden; ttest).

5.1.10 Das KSRP Protein weist eine hohe Stabilität auf

Analysen bezüglich der Regulation von Genexpressionen gehen häufig mit Stabilitätsmessungen der mRNA oder von Proteinen einher. Lisa Schmitdtke (AG Pautz) konnte im Rahmen ihrer Masterarbeit bereits zeigen, dass die KSRP mRNA sehr stabil ist (Daten unveröffentlicht). 24 Stunden nach der Zugabe von DRB konnte keinerlei Abnahme der mRNA-Menge verzeichnet werden.

Im Rahmen dieser Arbeit sollte nun die Proteinstabilität von KSRP untersucht werden. Hierfür wurden DLD-1-Zellversuche mit Cycloheximid (CHX, Translationsinhibitor) wie in Kapitel 4.1.4 beschrieben durchgeführt. Die Zellen wurden zu den angegebenen Zeitpunkten in 300 μ l 2x Lämmli (3.5.4.2) aufgenommen und 40 μ l in Western Blot Analysen (4.3.5-4.3.6) zur Detektion des KSRP Proteins eingesetzt.

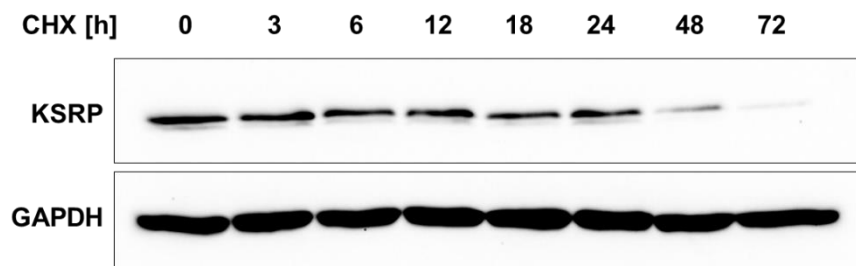
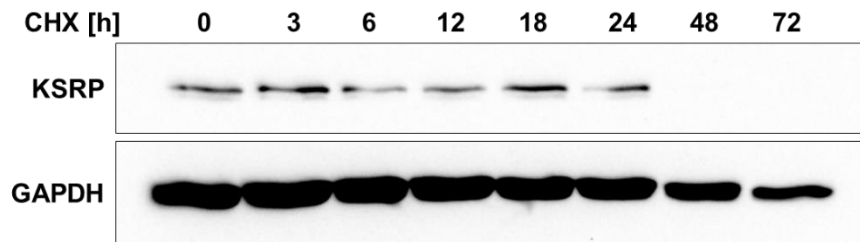
A CO**B CM**

Abbildung 5.28: Untersuchung der KSRP Proteinstabilität nach der Behandlung von DLD-1-Zellen mit Cycloheximid.

DLD-1-Zellen wurden auf 6-Lochplatten ausgesät und 16 Stunden vor der Behandlung mit FCS-freiem Medium versetzt. Die Behandlung mit einem Zytokinmix (CM) bzw. FCS-freiem Medium ohne Zytokine (CO) erfolgte für vier Stunden, bevor die Zellen mit 50 µg/ml CHX für 0, 3, 6, 12, 18, 24, 48 und 72 Stunden inkubiert wurden. Nach den genannten Zeiten wurden die Zellen in 300 µl heißem Lämmli (2x) lysiert und 40 µl auf ein SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen. Die Detektion von KSRP und GAPDH als Ladekontrolle erfolgte nach der Übertragung auf die Nitrozellulosemembran mit spezifischen Antikörpern (KSRP 1:50 in 5 % MP, GAPDH 1:1000 in 5 % MP). Die Signale wurden mit Hilfe des ECL-System auf dem Chemidoc™ XRS sichtbar gemacht.

In Abbildung 5.28 ist zu erkennen, dass die Degradation des KSRP Proteins nach Inhibition der Translation durch CHX erst nach 24 Stunden nachzuweisen war. In Zellen, die zuvor nicht mit dem Zytokinmix stimuliert wurden, war nach 48 Stunden noch ein Signal für KSRP vorhanden und auch nach 72 Stunden konnte eine sehr schwache Bande detektiert werden (A). Dahingegen zeigten stimulierte Zellen bereits für die früheren Zeitpunkte schwächere Signale (B). Bereits nach 48 Stunden war kein KSRP Protein mehr vorhanden. Allerdings ist hier zu beachten, dass auch die GAPDH Intensität nach 48 und 72 Stunden deutlich schwächer wurde. Es ist somit anzunehmen, dass die Zellen durch die Zytokinbehandlung bereits gestresst waren, wodurch der Abbau der Proteine schneller von statten ging. Insgesamt lässt sich sagen, dass das KSRP Protein sehr stabil zu sein scheint, unabhängig davon, ob die Zellen unbehandelt blieben oder einer Zytokinstimulation ausgesetzt wurden.

5.2 Die Rolle von KSRP in chronischen Entzündungskrankheiten

Pro-inflammatorische Gene wie Zytokine, Chemokine oder inflammatorische Enzyme sind für den Ablauf der Immunantwort von zentraler Bedeutung, weshalb die Genexpression dieser Mediatoren einer strikten Kontrolle unterstehen muss. Fehlgesteuerte Expressionen führen zur Entwicklung verschiedener Erkrankungen, wie beispielsweise der RA (vgl. Kapitel 1.3.1). Es ist bekannt, dass KSRP die mRNA-Stabilität von pro-inflammatorischen Mediatoren (z.B. TNF- α , IL-8 oder iNOS) negativ reguliert (Linker, Pautz et al. 2005), wodurch das RNA-BP zur Pathogenese der RA beitragen könnte. Daher ist es von Interesse die Rolle von KSRP für die Entwicklung chronischer Inflammationskrankheiten zu untersuchen, um mögliche Therapieansätze zur Behandlung der Erkrankung entwickeln zu können.

Da Zellsysteme lediglich Modelle für eine akute Inflammation darstellen und dabei jeweils nur ein Zelltyp untersucht werden kann, wurde stattdessen die Folge eines KSRP-*Knockouts in vivo* analysiert. Um eine chronische Entzündung auszulösen, wurde die Methode der Kollagen-Antikörper-induzierten Arthritis (CAIA, Kapitel 4.4.2) verwendet, einem anerkannten Mausmodell der RA (Khachigian 2006).

5.2.1 Typisierung der KSRP^{-/-} Mäuse

Da die Nachkommen einer homozygoten Kreuzung von KSRP-ko Mäusen infertil sind, mussten die Mäuse heterozygot verpaart werden. Deshalb wurde der Genotyp der Nachkommen mittels Typisierungs-PCR bestimmt (4.4.1). Die Primer wurden so gewählt (Tabelle 3.1), dass nach der Auftrennung der PCR-Produkte auf einem Agarosegel (4.2.6) bei ko-Mäusen eine Bande bei 250 bp, bei wt-Mäusen eine Bande bei 300 bp und bei heterozygoten Mäusen jeweils eine Bande bei 300 und bei 250 bp zu erkennen war (Abbildung 5.29, A). Zusätzlich wurde stichprobenartig auf Proteinebene gezeigt, dass bei den KSRP-ko Mäusen kein KSRP-Signal detektiert werden konnte (Abbildung 5.29,B).

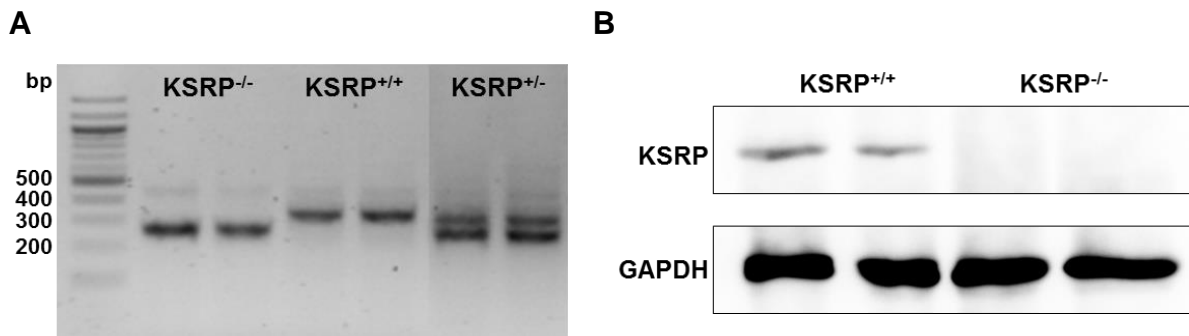


Abbildung 5.29: Genotypisierung von C57BL/6 KSRP-defizienten Mäusen.

Exemplarisch dargestellt ist die Typisierung von KSRP-ko Mäusen auf DNA- (A) und Proteinebene (B). (A) DNA wurde aus Ohrstanzen isoliert und eine Typisierungs-PCR durchgeführt. Die Proben wurden mit 3 μ Ladebuffer versehen und über ein 2 %iges Agarosegel bei 80 V aufgetrennt. Die Bande bei 250 bp ist spezifisch für ko-Mäuse, bei 300 bp für wt-Mäuse und zwei Banden sind charakteristisch für heterozygote Mäuse. (B) Western Blot aus Milzextrakten, isoliert aus wt- und ko-Mäusen, zur Analyse der KSRP-Expression mit monoklonalen Antikörpern gegen KSRP- und GAPDH. 200 μ g des Proteinextrakts wurde auf das Gel aufgetragen.

5.2.2 Die Schwellung der Gelenke ist in KSRP-ko Mäusen nach der Induktion einer CAIA deutlich verringert

Um die Rolle von KSRP in Prozessen chronischer Entzündung zu untersuchen, wurde in KSRP-wt und -ko Mäusen eine inflammatorische Arthritis ausgelöst. Da die Mäuse einen C57BL/6 Hintergrund haben, wurde hierfür das CAIA-Modell ausgewählt. Dieses Modell bietet gegenüber der CIA den Vorteil, dass die Induktion der Arthritis unabhängig vom MHCII-Molekül vonstatten geht und somit auch CIA-resistente C57BL/6-Mäuse empfänglich dafür sind (vgl. Kapitel 1.3.5) (Wooley, Luthra et al. 1981; Nandakumar, Svensson et al. 2003).

Zur Induktion der CAIA wurde den Mäusen an Tag 0 ein Mix aus fünf CII-spezifischen Antikörpern (2,54 μ g pro Maus) bzw. PBS als Lösungsmittelkontrolle intravenös (i.v.) in die Schwanzvene injiziert (4.4.2). Durch den Boost mit 50 μ g LPS pro Maus an Tag 3 wurde die CAIA-Entwicklung gefördert. An Tag 9 wurde der Versuch beendet und es wurden Organe entnommen und Peritonealzellen isoliert (4.4.4), um weiterführende Analysen durchführen zu können. Außerdem wurden die Hinterpfoten abgetrennt und für RNA-Analysen bzw. histopathologische Untersuchungen aufbewahrt. Abbildung 5.30 zeigt eine schematische Darstellung der Versuchsdurchführung.

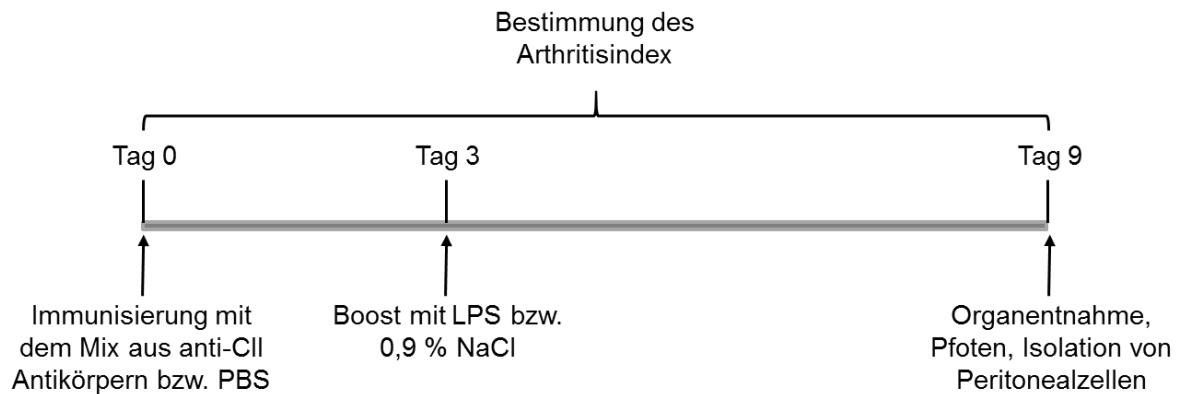


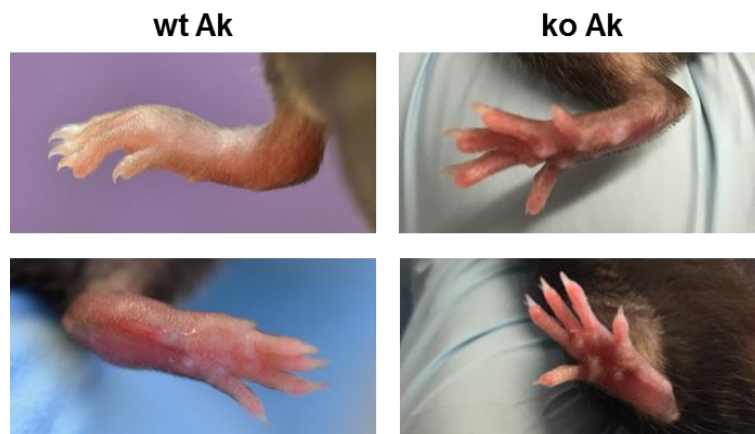
Abbildung 5.30: Schematische Darstellung der CAIA-Induktion.

KSRP-wt und -ko Mäuse wurden an Tag 0 mit einem Mix aus fünf Antikörpern gegen CII (2,54 µg) bzw. PBS als Lösungsmittelkontrolle durch i.v.-Injektion in die Schwanzvene immunisiert. An Tag 3 erhielten die Mäuse eine intraperitoneale Boost-Injektion von 50 µg LPS bzw. 0,9 % NaCl als Kontrolle. Der Arthritisindex wurde täglich durch visuelle Beobachtung ermittelt.

Die Mäuse wurden täglich beobachtet, um die Entwicklung klinischer Symptome einer Arthritis festzustellen. Hierfür wurde der Arthritisindex nach den in Kapitel 4.4.3 beschriebenen Kriterien bestimmt (Abbildung 5.31, B). Bei der Beobachtung der Mäuse war auffällig, dass sich die Anzeichen der Arthritisentwicklung nicht im Anschwellen einzelner Interphalangealgelenke gezeigt haben, sondern sich die Schwellung meist direkt in der ganzen Pfote ausgebreitet und die Mäuse in ihrer Beweglichkeit eingeschränkt hat (Abbildung 5.31, A). Außerdem konnten Schwellungen fast ausschließlich in den Hinterpfoten festgestellt werden, während die Vorderpfoten keine Anzeichen einer Schwellung zeigten.

Die ersten Arthritis-Symptome haben sich bei den mit Antikörpern behandelten KSRP^{+/+}-Mäusen nach fünf Tagen bemerkbar gemacht, während bei den KSRP^{-/-}-Mäusen geschwollene Pfoten erst einen Tag später beobachtet werden konnten (ab Tag 6; Abbildung 5.31, B). Es ist zu erkennen, dass die Schwellungen der Pfoten bei den KSRP-wt Mäusen im Verlauf der Erkrankung deutlich stärker ausfallen als bei den ko-Mäusen. Dies bestätigte sich im durchschnittlichen Arthritisindex zum Zeitpunkt des Versuchsendes (Tag 9) von 7 bei den wt-Mäusen und 2 bei den ko-Mäusen. Die Kontrollmäuse beider Genotypen haben keine Arthritis entwickelt.

A



B

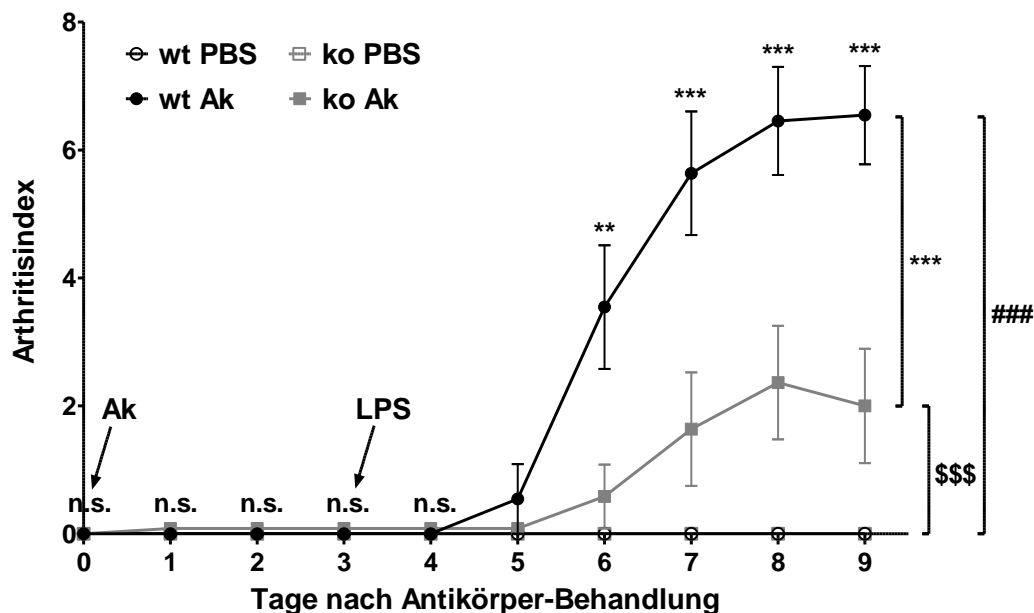


Abbildung 5.31: Dokumentation klinischer Symptome der Arthritisentwicklung und Bestimmung des Arthritisindex nach der Behandlung mit dem anti-CII-Antikörpermix.

KSRP^{+/+} (wt) und KSRP^{-/-} (ko) Mäuse wurden an Tag 0 mit einem Mix aus fünf CII-spezifischen Antikörpern oder PBS als Lösungsmittelkontrolle behandelt. An Tag 3 erhielten die Mäuse eine LPS-Injektion bzw. 0,9 % NaCl als Lösungsmittelkontrolle. Zwischen den Tagen 0 und 9 wurden täglich klinische Symptome der Arthritisentwicklung in Form von Gelenkschwellungen beobachtet (A) und deren Schweregrad durch Bestimmung des Arthritisindex dokumentiert (B). Zum Versuchsende an Tag 9 wurden die Mäuse getötet und Organe oder Zellen für nachfolgende Analysen entnommen.

(A) Dokumentation der Gelenkschwellungen an Tag 9. Gezeigt sind repräsentativ jeweils zwei Pfoten von Antikörper-behandelten (Ak) wt- und ko-Tieren.

*(B) Verlauf des Arthritisindex von Tag 0-9. Dargestellt ist der durchschnittliche Arthritisindex (MW ± SEM) für Antikörper-behandelte (Ak) wt- und ko-Mäuse (wt Ak, ko Ak) bzw. PBS-behandelte Kontrolltiere (wt PBS, ko PBS) (n.s.: nicht signifikant verschieden; ***: p<0,001 vs. Ak-behandelte KSRP^{-/-}-Mäuse; ###: p<0,001 vs. PBS-behandelte KSRP^{+/+}-Mäuse; \$\$\$: p<0,001 vs. PBS-behandelte KSRP^{-/-}-Mäuse), (Käfer, Schrick et al. 2017).*

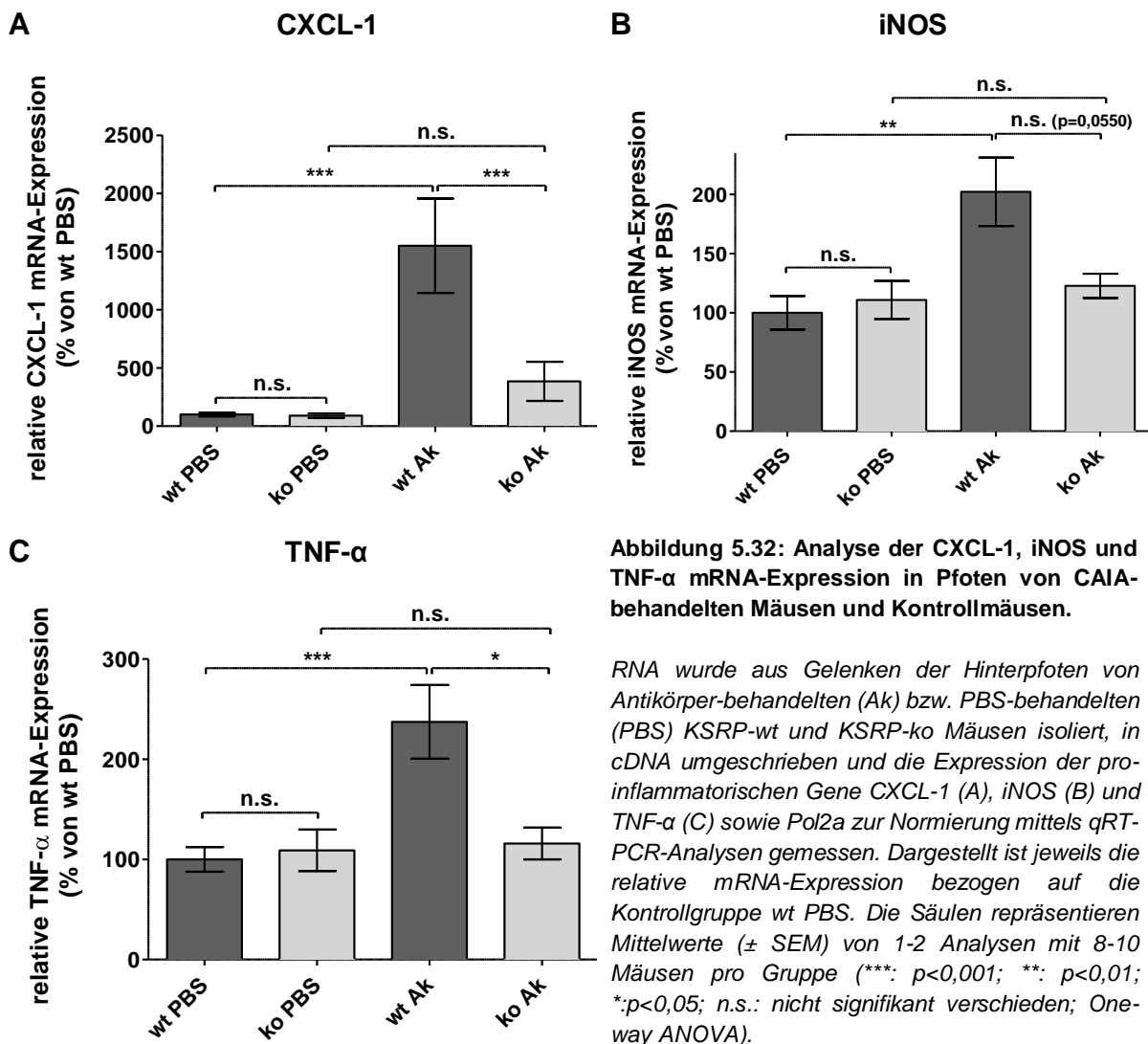
5.2.3 Untersuchung potentieller Ursachen für die differente CAIA-Induktion in KSRP^{+/-} und KSRP^{-/-} Mäusen

Die bisher beschriebenen Beobachtungen und Daten stehen im Kontrast zur publizierten anti-inflammatorischen Wirkung von KSRP, die durch die Destabilisierung der mRNA von pro-inflammatorischen Mediatoren bedingt ist (Winzen, Thakur et al. 2007; Bollmann, Art et al. 2014). Im CAIA-Modell scheint das Vorhandensein von KSRP stattdessen die Entzündungsreaktionen zu begünstigen, wohingegen der KSRP-*Knockout* eine schützende Rolle einzunehmen scheint. Somit löst der *Knockout* von KSRP offensichtlich unterschiedliche Effekte *ex vivo* in isolierten Zellen und *in vivo* im Gesamtorganismus aus. Mögliche Ursachen hierfür werden in den folgenden Kapiteln intensiver betrachtet, wobei sowohl Kontrollmäuse als auch CAIA-behandelte Mäuse auf verschiedenen Ebenen charakterisiert und verglichen wurden.

5.2.3.1 Die mRNA-Expression pro-inflammatorischer Mediatoren und Biomarker der Rheumatoiden Arthritis ist in Gelenken von KSRP^{-/-} Mäusen reduziert

Um zu untersuchen, ob der erhöhte Arthritisindex in den C57BL/6 KSRP-wt Mäusen infolge der CAIA-Induktion auf eine gesteigerte Expression pro-inflammatorischer Gene zurückzuführen ist, wurde die Expression der KSRP-Zielgene CXCL-1 (*Chemokine (C-X-C motif) ligand*, murines Analog zum humanen IL-8), iNOS und TNF- α auf mRNA-Ebene analysiert. Hierfür wurde RNA aus den Pfoten (entnommen an Tag 9) wie in Kapitel 4.2.2 beschrieben isoliert, in cDNA umgeschrieben (4.2.4) und qRT-PCR-Analysen durchgeführt (4.2.7). Die gemessenen C_T-Werte der zu untersuchenden Gene wurden auf die Expression des Referenzgens Pol2a normiert. Die verwendeten Oligonukleotide zur Amplifikation sind der Tabelle 3.19 zu entnehmen.

Abbildung 5.32 zeigt, dass die Behandlung der wt-Mäuse mit dem Antikörper-Mix eine signifikant erhöhte mRNA-Expression von CXCL-1 (A), iNOS (B) und TNF- α (C) in den Pfoten zur Folge hatte. Die CXCL-1 mRNA-Menge war dabei in CAIA-behandelten wt-Tieren um den Faktor 15 höher als in Kontrollmäusen, während die TNF- α - und iNOS-mRNA verdoppelt vorlag. Im Gegensatz dazu zeigte sich in den ko-Mäusen nach Antikörper-Behandlung keine Veränderung der Genexpression, sowohl verglichen mit den ko-Kontrolltieren als auch verglichen mit den PBS-behandelten KSRP^{+/-}-Mäusen.



Weiterhin wurde die Expression der Chemokine MCP-1 und MIP-1 α in den Pfoten mittels qRT-PCR analysiert, da diese Moleküle nicht nur eine Rolle in der humanen Arthritis-Entwicklung spielen, sondern auch im murinen Modell von Bedeutung sind (Kagari, Doi et al. 2002).

Die CAIA-Behandlung zog in KSRP-wt Mäusen eine signifikant erhöhte mRNA-Expression von MCP-1 auf etwa 500 % in den Pfoten nach sich, verglichen mit PBS-behandelten wt-Kontrolltieren (Abbildung 5.33, A). Im Gegensatz dazu war die MCP-1-Expression in KSRP-ko Mäusen nach der Antikörper-Behandlung nur leicht erhöht (200 %), wobei der Unterschied zur PBS-Kontrollgruppe (ko PBS) nicht signifikant war. Die Quantität der MCP-1-mRNA war in CAIA-behandelten wt-Tieren signifikant höher als in gleich behandelten ko-Mäusen. Für MIP-1 α konnten ähnliche Tendenzen gemessen werden (Abbildung 5.33; B). Die Antikörper-Behandlung führte in Wildtypen zu einer signifikanten Erhöhung der mRNA-Expression. Der Unterschied zwischen den KSRP^{+/+} und KSRP^{-/-} Mäusen, in denen eine Arthritis induziert wurde, war allerdings nicht signifikant. Die MIP-1 α mRNA-Menge war in wt-Tieren (wt Ak) nur tendenziell höher als in den KSRP-defizienten Mäusen (ko Ak).

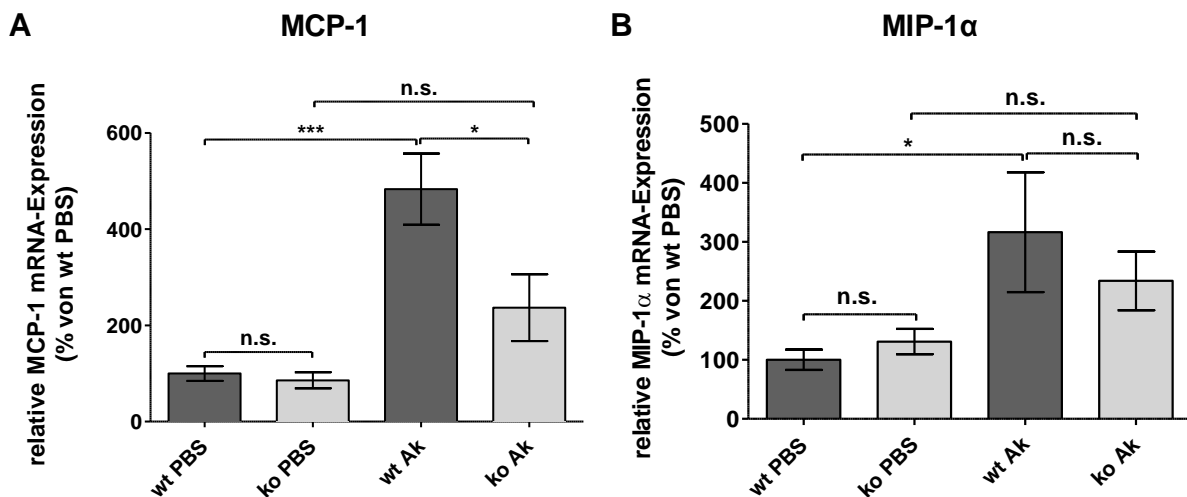


Abbildung 5.33: Expressionsanalyse der MCP-1 und MIP-1α mRNA in den Gelenken von Antikörper-behandelten KSRP^{+/+} und KSRP^{-/-} Mäusen.

Die untersuchten Gelenke der Hinterpfoten entstammten Antikörper-behandelten (Ak) und PBS-behandelten (PBS) KSRP^{+/+} (wt) und KSRP^{-/-} (ko) Mäusen. RNA wurde isoliert, in cDNA umgeschrieben und die mRNA-Expression von MCP-1 (A) und MIP-1α (B) sowie Pol2a zur Normierung mittels qRT-PCR gemessen. Die MCP-1 und MIP-1α-Expression wurde jeweils auf die Pol2a mRNA-Expression normiert. Dargestellt sind relative Expressionen (Mittelwert ± SEM) bezogen auf die Kontrollgruppe wt PBS mit 8-10 Tieren pro Gruppe (***: $p < 0,001$; *: $p < 0,05$; n.s.: nicht signifikant verschieden; One-way ANOVA).

Ein wichtiger Biomarker für die RA stellt das Ca²⁺-bindende Protein S100A8 (Calgranulin A) dar. Die zytoplasmatischen S100 Proteine S100A8, 9 und 12 werden während der Aktivierung des innate Immunsystems von Monozyten und Granulozyten sekretiert (Kessel, Holzinger et al. 2013). Dabei korreliert die Konzentration der Proteine mit dem Ausmaß der Entzündung, unabhängig davon, ob es sich um eine lokale oder systemische Inflammation handelt. Außerdem führt beispielsweise die Immunisierung von DBA/1-Mäusen mit CII zur Akkumulation von S100A8 in den Gelenken (Schmidt, Art et al. 2012), weshalb die S100A8 mRNA-Expression auch im CAIA-Modell gemessen werden sollte.

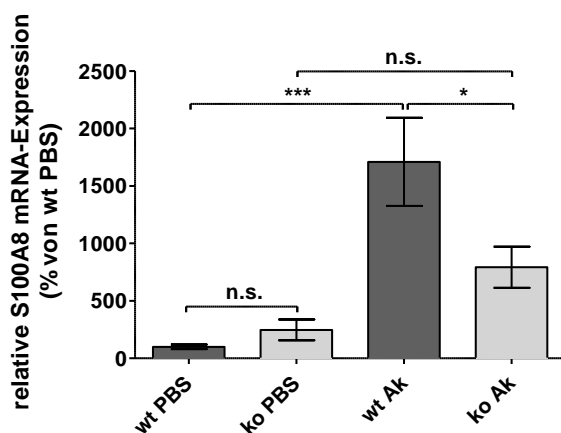


Abbildung 5.34: mRNA-Expressionsanalyse von S100A8 in CAIA-behandelten KSRP-wt und KSRP-ko Mäusen.

RNA wurde aus Hinterpfoten CAIA-behandelter (Ak) KSRP-wt und KSRP-ko Mäuse sowie den Kontrollmäusen (PBS) isoliert, cDNA synthetisiert und die mRNA-Expression des RA Biomarkers S100A8 sowie Pol2a zur Normierung gemessen. Die Säulen repräsentieren die Mittelwerte (± SEM) relativer mRNA-Expressionen, jeweils bezogen auf die Kontrollgruppe wt PBS mit 4-10 Mäusen pro Gruppe (One-way ANOVA).

Die gemessene S100A8 mRNA-Expression war ebenfalls in den Antikörper-behandelten wt-Mäusen (1700 %) deutlich höher als in den wt-Kontrollmäusen (100 %). In den KSRP-defizienten Tieren führte die Antikörper-Behandlung lediglich zu einem leichten, nicht

signifikanten Anstieg der S100A8 mRNA-Menge (ko PBS vs. ko Ak). Der Vergleich beider Genotypen CAIA-behandelter Tiere zeigte eine signifikant höhere mRNA-Expression in wt-Tieren als in ko-Tieren (etwa 2-fach).

Im Folgenden wurde weiterhin überprüft, ob die durch die CAIA ausgelösten Entzündungsreaktionen lokal auf die Pfoten beschränkt waren oder ob es sich um eine systemische Inflammation handelte. Hierfür wurde die mRNA-Expression von CXCL-1, TNF- α und S100A8 mittels qRT-PCR (4.2.7) in Leberproben, Lymphknoten und Peritonealmakrophagen gemessen, isoliert aus Antikörper-behandelten KSRP^{+/+} und KSRP^{-/-} Mäusen sowie den zugehörigen Kontrolltieren (Abbildung 5.35). Peritonealzellen wurden wie in Kapitel 4.4.4 beschrieben isoliert, 500 μ l der Zellsuspension bei 1200 x g zentrifugiert und in 200 μ l GIT-Puffer (3.5.1) lysiert. Die RNA-Isolation erfolgte wie in Kapitel 4.2.2 beschrieben.

Die Immunisierung der KSRP-wt und KSRP-ko Mäuse mit dem Antikörpermix gegen CII zur Induktion einer Arthritis führte weitestgehend zu keiner Änderung der mRNA-Expression der pro-inflammatorischen Gene CXCL-1 und TNF- α in Leberproben, Lymphknoten und Peritonealzellen, verglichen mit den PBS-behandelten Kontrollgruppen (Abbildung 5.35, A-F). Lediglich für CXCL-1 waren in Peritonealzellen tendenziell erhöhte mRNA-Quantitäten in CAIA-behandelten Tieren zu verzeichnen (Abbildung 5.35, C). Die TNF- α -Expression war in Antikörper-behandelten KSRP^{-/-} Tieren sogar signifikant niedriger als in den entsprechenden Kontrollmäusen (Abbildung 5.35, E). Dagegen war die Expression von S100A8 in den untersuchten Organen der CAIA-behandelten Tiere unabhängig vom Genotyp erhöht, wobei die Unterschiede jedoch nicht signifikant waren. In den Peritonealzellen löste die Behandlung mit dem Antikörpermix einen signifikanten Anstieg der S100A8 mRNA-Menge in KSRP^{+/+} Mäusen verglichen mit den Kontrollen aus, während die Expression in ko-Tieren trotz der Behandlung unverändert blieb (n.s.).

Somit lässt sich festhalten, dass die Behandlung der KSRP-wt und KSRP-ko Mäuse mit dem Antikörpermix eine Entzündung in den wt-Tieren ausgelöst hat, die lokal auf die Pfoten beschränkt war. In den untersuchten Organen (Leber und Lymphknoten) und Zellen konnte dagegen keine Erhöhung relevanter Zytokine gemessen werden. Lediglich S100A8 als allgemeiner Biomarker für Inflammationserkrankungen war trotz der lokal vorliegenden Entzündung auch in den anderen Organen erhöht.

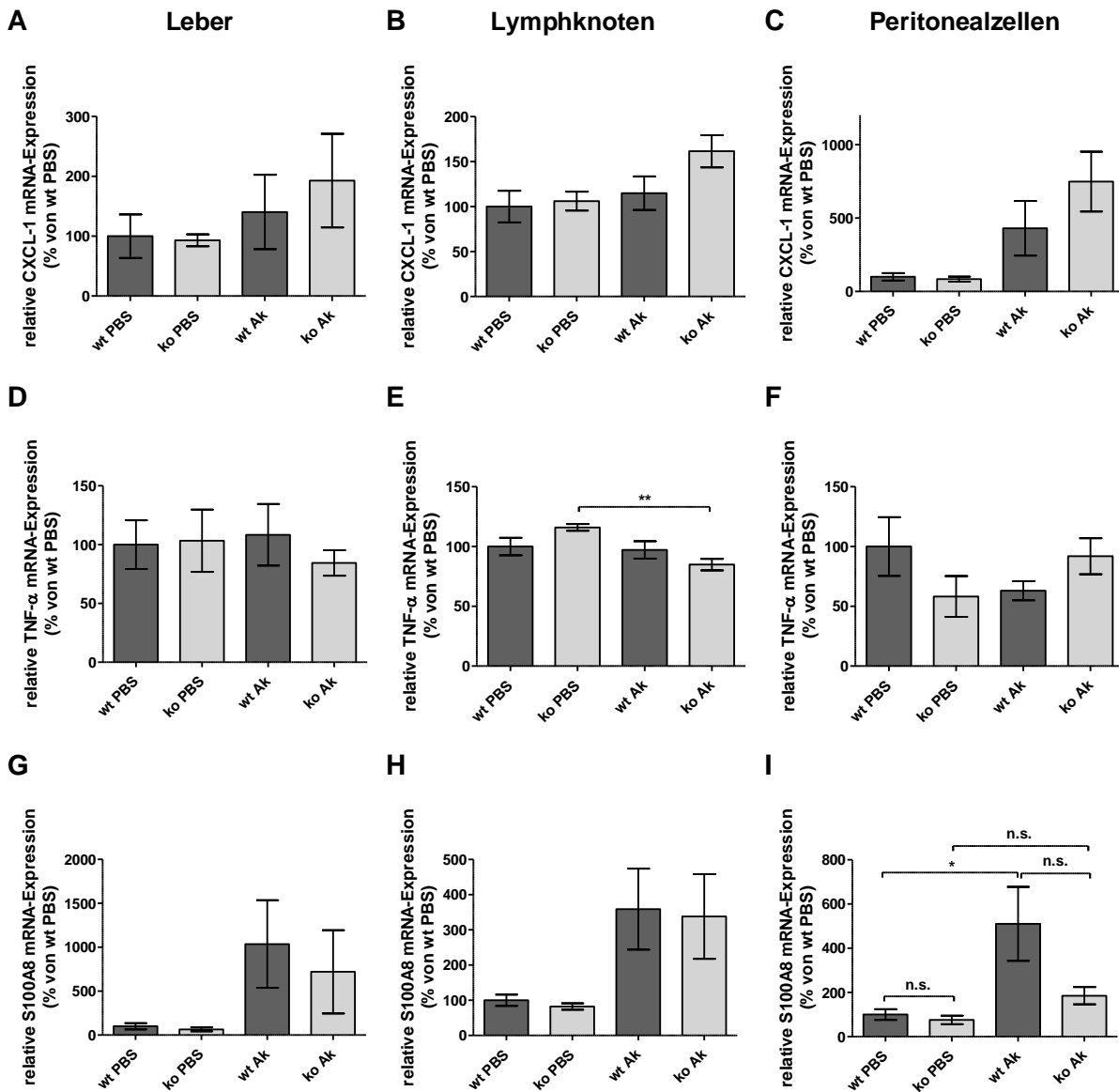


Abbildung 5.35: mRNA-Expressionsanalyse von pro-inflammatorischen Genen in Gewebeproben und Peritonealzellen von KSRP-wt und KSRP-ko Mäusen nach CAIA-Behandlung.

Leber (jeweils links, A, D, G), Lymphknoten (Mitte, B, E, H) und Peritonealzellen (rechts, C, F, I) wurden CAIA-behandelten (Ak) sowie PBS-behandelten (PBS) KSRP-wt und KSRP-ko Mäusen entnommen. RNA wurde isoliert, in cDNA umgeschrieben und die mRNA-Expression von CXCL-1 (A-C), TNF- α (D-F) und S100A8 (G-H) sowie Pol2a zur Normierung gemessen. Dargestellt ist jeweils die relative mRNA-Expression bezogen auf die Kontrollgruppe wt PBS. Die Säulen repräsentieren Mittelwerte (\pm SEM) von Analysen mit 5 Mäusen pro Gruppe (**: $p < 0,01$; n.s.: nicht signifikant verschieden; One-way ANOVA).

5.2.3.2 Der Knockout von KSRP führt zu einer reduzierten Infiltration von Immunzellen in die Gelenke

Es ist bekannt, dass die Pathogenese der RA sowohl im humanen System als auch im murinen Modellsystem (CIA oder CAIA) mit der Infiltration von Immunzellen in den Synovialspalt einhergeht. Durch die Sekretion von Zytokinen werden weitere Immunzellen rekrutiert. Diese

unkontrollierte Ansammlung von Zellen fördert die Aufrechterhaltung der Inflammation und trägt zur Pannusentwicklung und Schwellung der Gelenke bei (Kapitel 1.3.1 und 1.3.5).

Aufgrund der beobachteten Schwellung der Hinterpfoten nach der CAIA-Induktion in den KSRP-wt Mäusen, wurde ebenfalls eine Einwanderung von Immunzellen vermutet, was mit histochemischen Färbungen bestätigt werden sollte. Hierfür wurde jeweils eine Hinterpfote pro Maus nach dem Versuchsende abgetrennt, in einer Paraformaldehydlösung fixiert, dekalzifiziert, entwässert und in Paraffin eingebettet. Anschließend wurden Schnitte von 5 µm Dicke angefertigt und zur Visualisierung der Immunzellen wurden HE-Färbungen durchgeführt (Kapitel 4.4.5).

Die HE-Übersichtsfärbungen der Gelenkschnitte PBS-behandelter Kontrollmäuse (Abbildung 5.36, A und B) sowie der CAIA-behandelten Mäuse (Abbildung 5.36, C und D) machen deutlich, dass die Behandlung von KSRP-wt Mäusen mit dem anti-CII-Antikörpermix zu einer enormen Infiltration von Immunzellen geführt hat (Abbildung 5.36, C). Die Akkumulation in der Synovia (durch Pfeile gekennzeichnet) hatte eine großflächige Zerstörung der normalen Gelenkstruktur zur Folge, die bei den Kontrollmäusen dagegen noch zu erkennen ist (A und B). Der dargestellte Gelenkschnitt der wt-Pfote ist repräsentativ und entstammt einer Maus mit einem Arthritisindex von 8. Im Gegensatz dazu war die Einwanderung von Immunzellen in die Gelenkspalte bei Antikörper-behandelten KSRP-ko Mäusen deutlich geringer. Die Abbildung 5.36, D lässt zwar vereinzelt Bereiche erkennen, in denen sich Zellen angesammelt hatten, dennoch ist das Ausmaß der daraus resultierenden Veränderungen der Gelenkstruktur minimal. Bei der beispielhaft ausgewählten KSRP-defizienten Maus wurde ein Arthritisindex von 4 bestimmt.

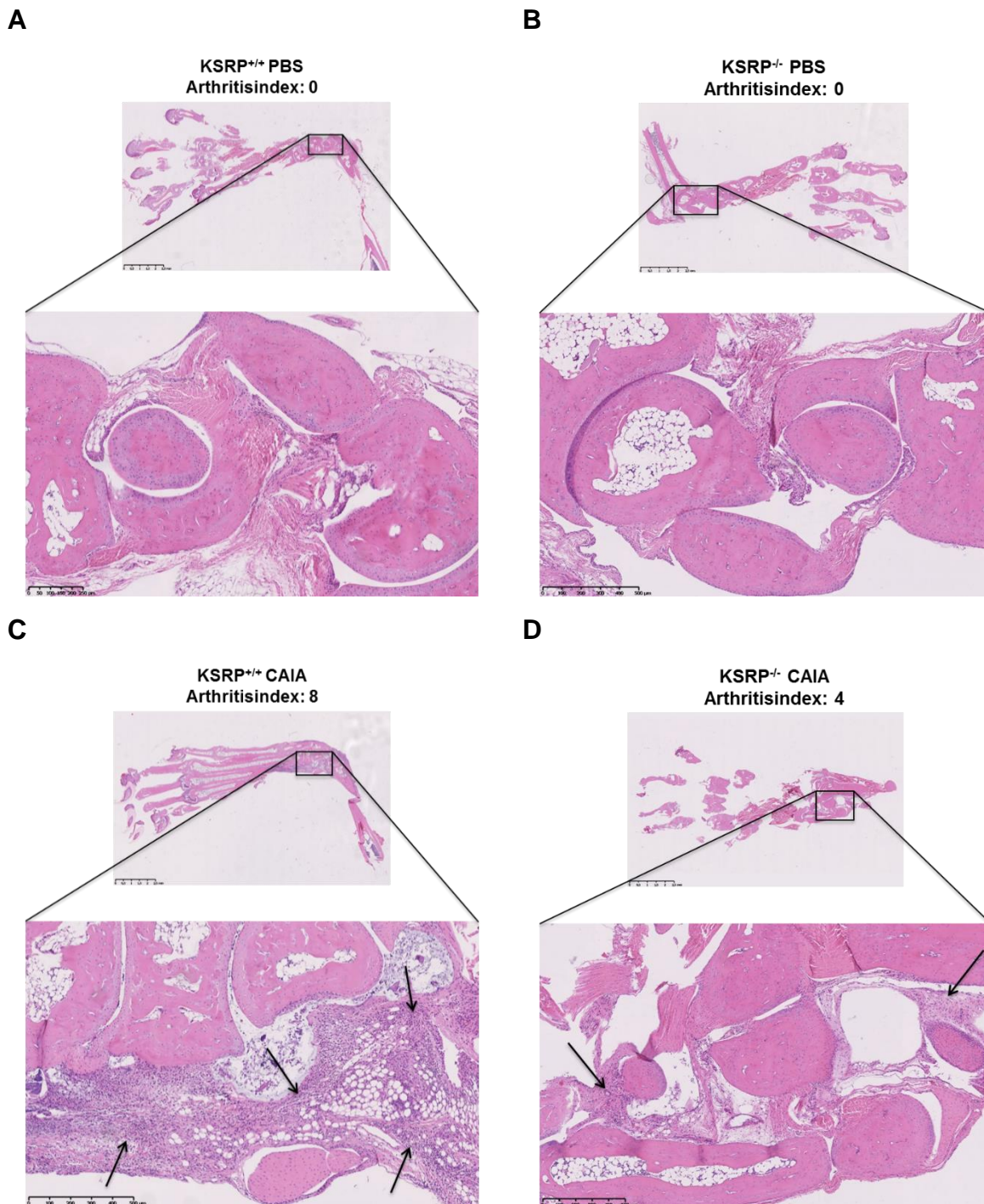


Abbildung 5.36: Histochemische Übersichtsfärbungen zur Visualisierung der Immunzellinfiltration in die Gelenke.

Neun Tage nach der Immunisierung mit anti-CII-Antikörpern wurden Hinterpfoten der CAIA-behandelten Mäuse und der PBS-behandelten Kontrollmäuse in 4 % Paraformaldehyd fixiert, für mehrere Tage dekalzifiziert und in Paraffin eingebettet. Die angefertigten Schnittpräparate mit einer Dicke von 5 μ m wurden mit Hämatoxylin-Eosin angefärbt, um eingewanderte Immunzellen sichtbar zu machen. Dargestellt ist jeweils eine repräsentative Abbildung der Gelenkschnitte für PBS-behandelte KSRP^{+/+} (A) und KSRP^{-/-} Kontrollmäuse (B) sowie CAIA-behandelte KSRP^{+/+} (C) und KSRP^{-/-} Mäuse (D). Der obere Abschnitt zeigt jeweils eine Übersicht der Gesamtpfote. Ausgewählte Bereiche des Gelenks sind markiert und im unteren Abschnitt vergrößert dargestellt. Pfeile weisen auf eine Ansammlung von Immunzellen hin. Die Abbildungen wurden in der Pathologie der Universitätsmedizin Mainz erstellt und mit dem Programm NDP.view2 bearbeitet.

5.2.3.3 Die mRNA-Expression von Immunzellmarkern und Adhäsionsmolekülen ist in Pfoten von CAIA-behandelten KSRP-ko Mäusen vermindert

Unterstützend zu den histopathologischen Untersuchungen wurde weiterhin die Expression von Genen analysiert, die für Marker von verschiedenen Immunzellen kodieren, welche für die Entwicklung der RA von Bedeutung sind. Auf diese Weise sollten die eingewanderten Immunzellen genauer charakterisiert werden. In diesem Zuge wurde die Expression folgender Marker mittels qRT-PCR gemessen: CD68, Ly6G (*Lymphocyte antigen 6 complex locus G6D*) sowie die Integrine α L (ITGAL, CD11a), α M (ITGAM, CD11b) und β 2 (ITGB2, CD18). CD68 wird von Monozyten und Makrophagen exprimiert und gilt allgemein als selektiver Marker für diese Zelltypen, obwohl das Oberflächenmolekül auch in anderen Zellen detektiert werden konnte (Gottfried, Kunz-Schughart et al. 2008). Ly6G wird vorwiegend von Neutrophilen exprimiert (Lee, Wang et al. 2013), die neben Makrophagen für die CAIA-Entwicklung von Bedeutung sein könnten (Nandakumar, Svensson et al. 2003). Integrine sind Adhäsionsmoleküle, die unter anderem für die Rekrutierung von Leukozyten zuständig sind und eine Rolle in inflammatorischen Erkrankungen spielen. Die β -Untereinheit der β 2-Integrine interagiert mit den α -Untereinheiten ITGAL zu LFA-1 (*lymphocyte function associated antigen 1*) oder ITGAM zu Mac-1 (*macrophage-1 antigen*, auch Komplementrezeptor CR3 genannt). LFA-1 wird von Neutrophilen, Monozyten und Lymphozyten exprimiert, während Mac-1 hauptsächlich auf Monozyten und Neutrophilen gefunden wird (Mitroulis, Alexaki et al. 2015).

Für die mRNA-Analysen wurde RNA aus Hinterpfoten isoliert (4.2.2), revers transkribiert (4.2.4) und mittels qRT-PCR gemessen (4.2.7). Die verwendeten Oligonukleotide sind der Tabelle 3.19 zu entnehmen.

In Abbildung 5.37 ist zu sehen, dass die Behandlung der KSRP-wt Mäuse mit dem anti-CII-Antikörpermix eine signifikant erhöhte mRNA-Expression von CD68 (A) und Ly6G (B) zur Folge hatte, verglichen mit den PBS-behandelten Kontrollmäusen. In ko-Mäusen, in denen eine CAIA ausgelöst wurde, konnte zwar für CD68 auch eine leichte Erhöhung der mRNA-Expression verzeichnet werden, allerdings war der gemessene Unterschied zu den ko-Kontrolltieren deutlich schwächer (Abbildung 5.37, A). Demnach lieferte der Vergleich der beiden Genotypen nach Antikörper-Behandlung für CD68 einen signifikanten Unterschied, bei dem die mRNA-Menge in KSRP^{+/+} Mäusen etwa doppelt so hoch war wie in KSRP^{-/-} Tieren. Im Falle von Ly6G war dieser Unterschied zwischen wt Ak und ko Ak gerade nicht mehr signifikant ($p=0,0548$).

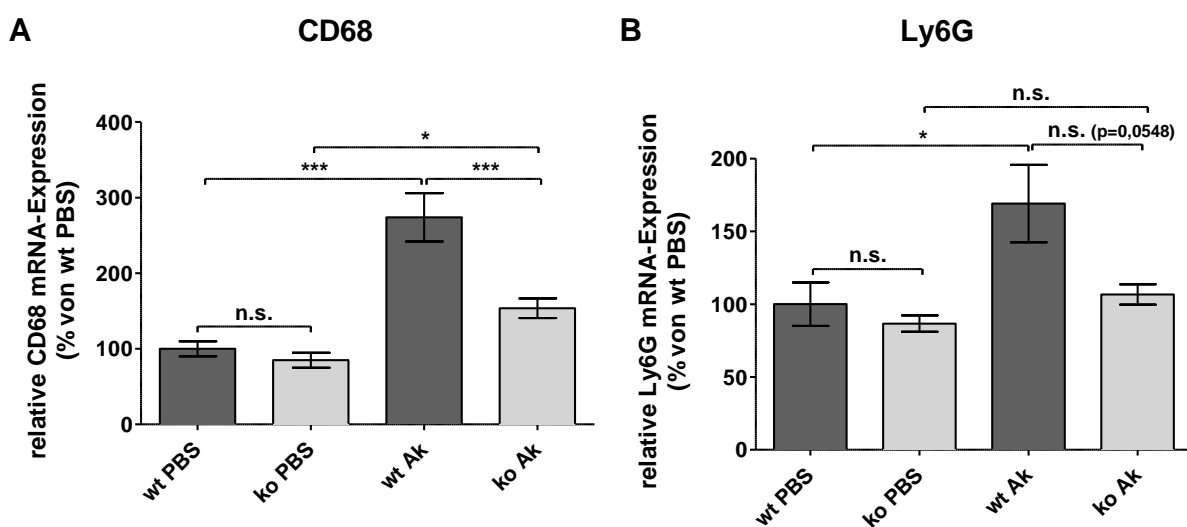


Abbildung 5.37: Analyse der mRNA-Expression der Immunzellmarker CD68 und Ly6G in Gelenken von CAIA-behandelten Mäusen und Kontrollmäusen.

RNA wurde aus Hinterpfoten von KSRP-wt und KSRP-ko Mäusen isoliert, die mit CAIA-Antikörper (Ak) bzw. PBS als Kontrolle behandelt wurden. Die mRNA-Expression von CD68 (A) und Ly6G (B) sowie Pol2a zur Normalisierung wurde gemessen. Dargestellt ist jeweils die relative mRNA-Expression bezogen auf die Kontrollgruppe wt PBS. Die Säulen repräsentieren Mittelwerte (\pm SEM) von 2 Analysen mit 4-10 Mäusen pro Gruppe (***: $p<0,001$; *: $p<0,05$; n.s.: nicht signifikant verschieden; One-way ANOVA).

Auch die Expression der Integrine ITGAL (A), ITGAM (B) und ITGB2 (C) war in KSRP^{+/+} Mäusen nach CAIA-Induktion in den Gelenken der Hinterpfoten signifikant erhöht (ITGAL auf fast 400 %, ITGAM auf 300 %, ITGB2 auf etwa 350 %), während die Antikörper-Behandlung in KSRP^{-/-} Tieren lediglich zu einem leichten Anstieg der mRNA-Menge führte (Abbildung 5.38). Die gemessenen mRNA-Mengen in den wt Ak Tieren war jeweils signifikant höher als in ko Ak Mäusen. Diese Daten unterstützen die histologischen Untersuchungen (Abbildung 5.36) dahingehend, dass in KSRP^{-/-}-Mäusen quantitativ weniger CAIA-relevante Immunzellen in die Gelenke eingewandert sind. Das deutet darauf hin, dass der *Knockout* von KSRP weitestgehend vor der CAIA-Induktion zu schützen scheint.

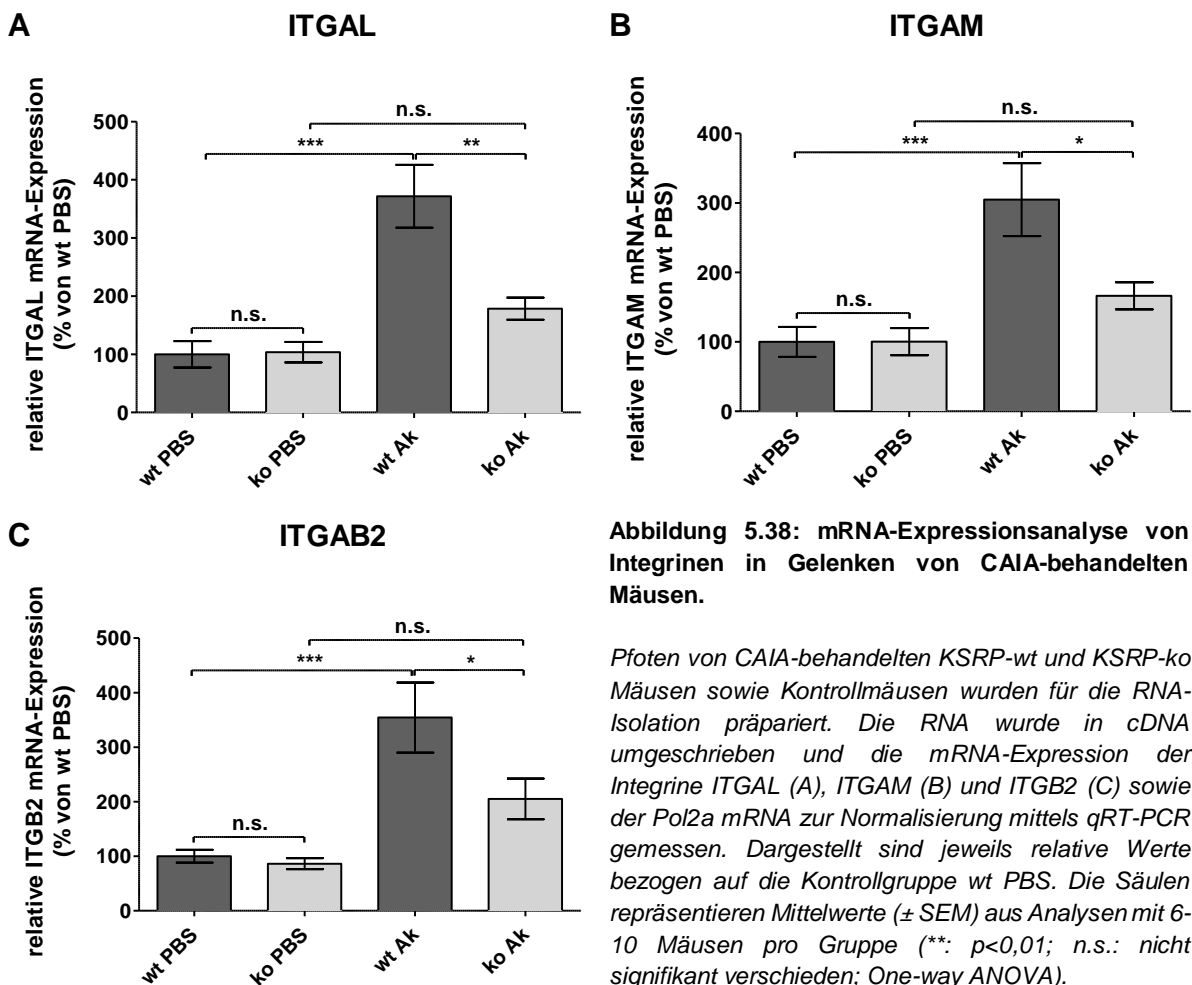


Abbildung 5.38: mRNA-Expressionsanalyse von Integrinen in Gelenken von CAIA-behandelten Mäusen.

Pfoten von CAIA-behandelten KSRP-wt und KSRP-ko Mäusen sowie Kontrollmäusen wurden für die RNA-Isolation präpariert. Die RNA wurde in cDNA umgeschrieben und die mRNA-Expression der Integrine ITGAL (A), ITGAM (B) und ITGB2 (C) sowie der Pol2a mRNA zur Normalisierung mittels qRT-PCR gemessen. Dargestellt sind jeweils relative Werte bezogen auf die Kontrollgruppe wt PBS. Die Säulen repräsentieren Mittelwerte (\pm SEM) aus Analysen mit 6-10 Mäusen pro Gruppe (**: $p < 0,01$; n.s.: nicht signifikant verschieden; One-way ANOVA).

ICAM und VCAM sind weitere Zelladhäsionsmoleküle, die für die Interaktionen von Zellen untereinander wichtig und somit von Relevanz für den Ablauf von Immunantworten sind. Es handelt sich um Oberflächenproteine, die beispielsweise mit LFA-1 oder Mac-1 interagieren (Springer 1990). Auch deren Expression ist in der RA fehlreguliert, weshalb sie für die Entwicklung der CAIA ebenfalls von Bedeutung sind (Davies, Sharma et al. 1992). Allerdings zeigten mRNA-Analysen von ICAM und VCAM in Pfoten von CAIA-behandelten Mäusen keine bzw. nur geringfügige Änderungen in der Expression (Abbildung 5.39). Die VCAM-Expression war in KSRP^{+/+} Tieren nach Antikörper-Behandlung signifikant erhöht im Vergleich zu PBS-Kontrolltieren desselben Genotyps, während in KSRP^{-/-} Mäusen kein solcher Unterschied detektiert werden konnte (Abbildung 5.39, B). Für die ICAM mRNA waren keine Unterschiede zwischen den Behandlungen und Genotypen zu verzeichnen.

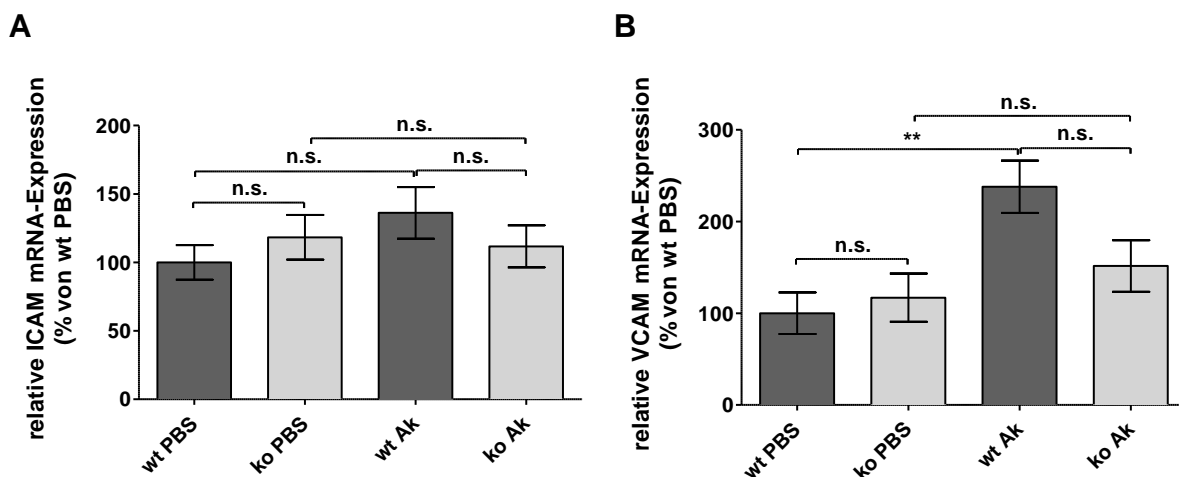


Abbildung 5.39: mRNA-Expressionsanalyse der Adhäsionsmoleküle ICAM und VCAM in Gelenken von CAIA-behandelten Mäusen.

*Pfoten von CAIA-behandelten KSRP-wt und KSRP-ko Mäusen sowie Kontrollmäusen wurden für die RNA-Isolation präpariert. Nach der reversen Transkription wurde die mRNA-Expression der Zelladhäsionsmoleküle ICAM (A) und VCAM (B) sowie der Pol2a mRNA zur Normalisierung mittels qRT-PCR gemessen. Dargestellt sind jeweils relative Werte bezogen auf die Kontrollgruppe wt PBS. Die Säulen repräsentieren Mittelwerte \pm SEM aus Analysen mit 6-10 Mäusen pro Gruppe (**: $p < 0,01$; n.s.: nicht signifikant verschieden; One-way ANOVA).*

Zusammenfassend zeigen die vorliegenden Daten der mRNA-Expressionsanalysen, dass es sich bei der in CAIA-behandelten KSRP-wt Mäusen verzeichneten Einwanderung von Immunzellen in die Gelenke um überwiegend myeloide Zellen, wie Monozyten und Makrophagen sowie um Neutrophile handelte (Abbildung 5.37 und Abbildung 5.38). In Mäusen mit KSRP-Knockout war die Infiltration dieser Zellen nach CAIA-Induktion deutlich verringert.

Neben den Immunzellen, die für die CAIA-Entwicklung eine Rolle spielen und den Unterschied zwischen KSRP^{+/+} und KSRP^{-/-} bedingen können, wurden weitere Faktoren betrachtet und analysiert. Auf diese wird in den folgenden Kapiteln genauer eingegangen.

5.2.3.4 Der Knockout von KSRP hat keinen Einfluss auf die Expression des neonatalen Fc-Rezeptors in Pfoten nach der CAIA-Induktion

Der neonatale Fc-Rezeptor (FcRn) spielt verschiedene Rollen in der adaptiven Immunantwort. Durch die Interaktion mit IgG erleichtert der Rezeptor die Translokation von Antigen-spezifischen Antikörpern zum Ort des Geschehens (Ravetch and Clynes 1998). Bezüglich der CIA-Induktion wurde eine Rolle von Fc-Rezeptoren beschrieben, die von den gebildeten Immunkomplexen in Form von Antikörpern gebunden werden. Polymorphismen in der Fc- γ -Kette sind dabei verantwortlich für die unterschiedlich starke Ausprägung der CIA (Andr n, Johanneson et al. 2005). Um die potentielle Bedeutsamkeit des FcRn für die CAIA-Entwicklung zu untersuchen und zu überprüfen, ob womöglich die Translokalisierung des Rezeptors in die Pfoten bei KSRP^{-/-}-Mäusen beeinträchtigt ist, wurden mRNA-Analysen in Pfoten durchgeführt.

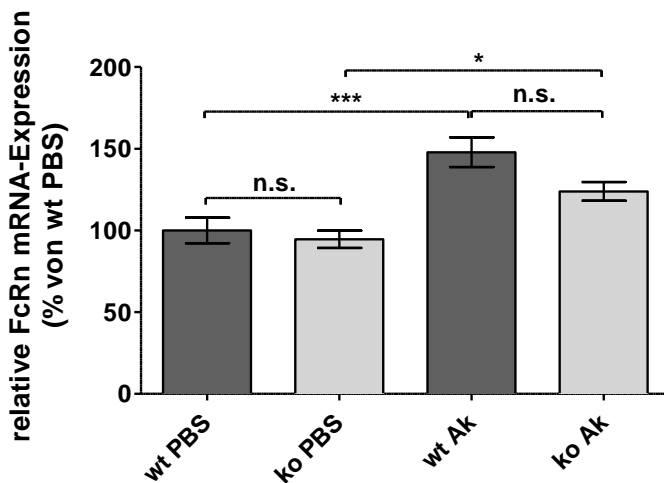


Abbildung 5.40: Analyse der FcRn-Expression in Pfoten CAIA-behandelter Mäuse sowie in Kontrollmäusen.

RNA wurde aus Pfoten von CAIA-behandelten (Ak) und PBS-behandelten (PBS) KSRP^{+/+} sowie KSRP^{-/-} Mäusen isoliert, in cDNA umgeschrieben und die FcRn mRNA-Expression mittels qRT-PCR analysiert. Zur Normalisierung wurde die Pol2a mRNA-Expression gemessen. Dargestellt sind relative Expressionen (Mittelwert \pm SEM) bezogen auf die Kontrollgruppe wt PBS mit 8-10 Tieren pro Gruppe (***: $p < 0,001$; *: $p < 0,05$; n.s.: nicht signifikant verschieden; One-way ANOVA).

Abbildung 5.40 zeigt die Ergebnisse der FcRn-Expressionsanalysen in den Pfoten. Es ist zu erkennen, dass sowohl in den wt- als auch in den ko-Tieren die Expression des FcRn in den Gelenken im Zuge der CAIA-Behandlung zwar leicht, aber dennoch signifikant angestiegen ist. Allerdings gab es dabei keinen signifikanten Unterschied zwischen den beiden Genotypen.

5.2.3.5 Der C1-Esterase-Inhibitor und der Komplementfaktor H spielen für die Entwicklung der CAIA keine Rolle

Das Komplementsystem ist Bestandteil der körpereigenen Immunabwehr. Bei einer Infektion wird eine Komplementkaskade in Gang gesetzt, welche die Immunantwort auslöst. In Autoimmunerkrankungen wie der RA liegt eine Fehlregulation des Systems vor, was eine überhöhte Aktivierung und letztendlich die Schädigung von Geweben zur Folge hat (vgl. Kapitel 1.3.1). Weiterhin wurde auch für die Mausmodelle der RA die Involvierung des

Komplementsystems für die Entwicklung der Arthritis beschrieben (Banda, Mehta et al. 2013). Um zu untersuchen, ob es Unterschiede in der Expression ausgewählter Faktoren des Komplementsystems zwischen den beiden Genotypen gibt, welche die Genotyp-abhängige CAIA-Induktion erklären könnten, wurden RNA-Analysen durchgeführt. Es wurden Leberproben verwendet, da die Komplementfaktoren in der Leber gebildet werden. Hierfür wurde zum einen der C1-Esterase-Inhibitor (C1-Inhibitor) ausgewählt, eine Serin-Protease, die für die Kontrolle der Aktivierung des Komplementfaktors C1 zuständig ist. Dadurch sollen überschießende Immunreaktionen verhindert werden. Es besteht die Möglichkeit, dass der C1-Inhibitor durch KSRP reguliert sein könnte, da in den Analysen von Winzen et al. eine Serinpeptidase als KSRP-Zielgen identifiziert werden konnte (Winzen, Thakur et al. 2007). Weiterhin wurde der Komplementfaktor H näher untersucht, der ebenfalls als Regulator des Systems zählt (Kapitel 1.3.5).

Um die Expression der beschriebenen Inhibitoren zu untersuchen, wurde RNA aus Leberproben isoliert (4.2.2), in cDNA umgeschrieben (4.2.4) und qRT-PCR-Analysen (4.2.7) durchgeführt.

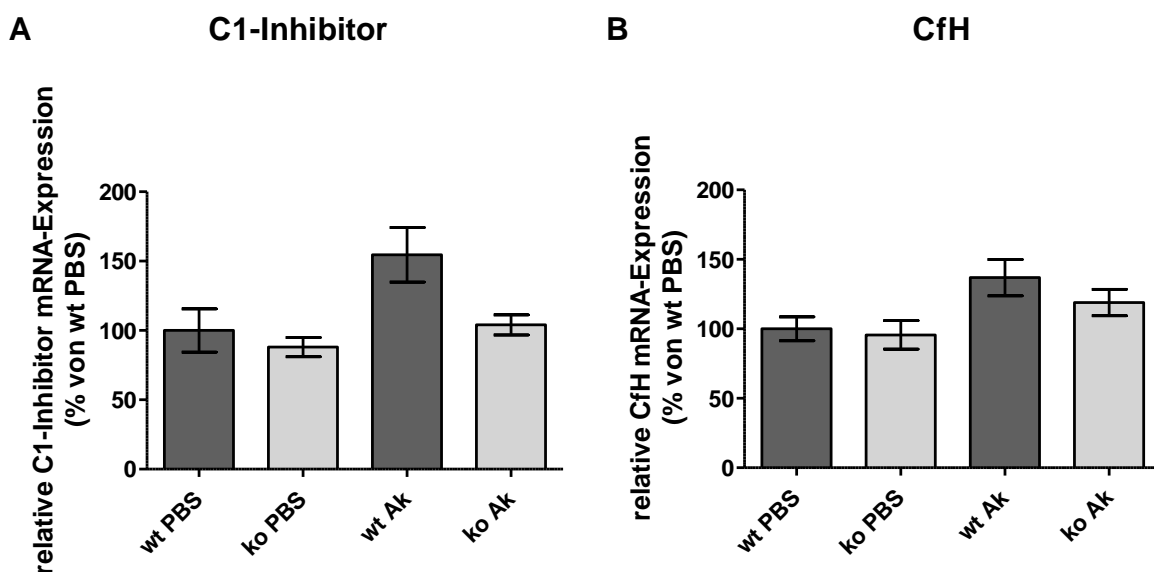


Abbildung 5.41: Analyse der mRNA-Expression der Komplementinhibitoren C1-Inhibitor und Cfh.

Leberproben wurden den CAIA-behandelten (Ak) KSRP-wt und KSRP-ko Mäusen sowie den Kontrollmäusen (PBS) entnommen, RNA isoliert, in cDNA umgeschrieben und die mRNA-Expression des C1-Inhibitor (A), Cfh (B) und Pol2a zur Normierung gemessen. Dargestellt sind Mittelwerte (\pm SEM), jeweils bezogen auf die Kontrollgruppe wt PBS, aus 5 Mäusen pro Gruppe (One-way ANOVA).

Die analysierten Inhibitoren zeigten keinen Unterschied in der mRNA-Expression in Leberproben von CAIA-behandelten KSRP-wt und KSRP-ko Mäusen sowie den Kontrollen (Abbildung 5.41). Es sind sowohl für den C1-Inhibitor als auch für Cfh lediglich leicht erhöhte mRNA-Mengen in Wildtyp-Tieren nach Antikörper-Behandlung zu erkennen, die Tendenzen sind allerdings nicht signifikant.

5.2.3.6 Die miR-155-Expression ist in Antikörper-behandelten KSRP-ko Mäusen tendenziell erhöht

Eine mögliche Ursache für die abgeschwächte CAIA-Induktion in KSRP^{-/-} Mäusen könnte eine durch den *Knockout* von KSRP bedingte Expressionsänderung der miR-155 sein. Es ist allgemein bekannt, dass KSRP die Reifung der prä-miR-155 fördert und zum anderen wird eine negative Rolle für die miR-155 in der Pathogenese der RA vermutet (vgl. Kapitel 1.2 und 1.3.2). Um zu untersuchen, ob die Expression der miRNA in den KSRP-ko Mäusen gegenüber den KSRP-wt Mäusen vermindert ist, wurden Leberproben von Antikörper-behandelten KSRP-wt und KSRP-ko Mäusen sowie PBS-behandelten KSRP-wt Tieren in *QIAzol Lysis Reagent* (Qiagen) zerkleinert und die RNA isoliert (4.2.2). Die reverse Transkription (4.2.4) und Quantifizierung mittels qRT-PCR (4.2.7) wurden mit miR-155-spezifischen Assay-Systemen von Applied Biosystems durchgeführt. Zur Normierung wurde die Expression der miRNA U6 mit entsprechenden Systemen gemessen.

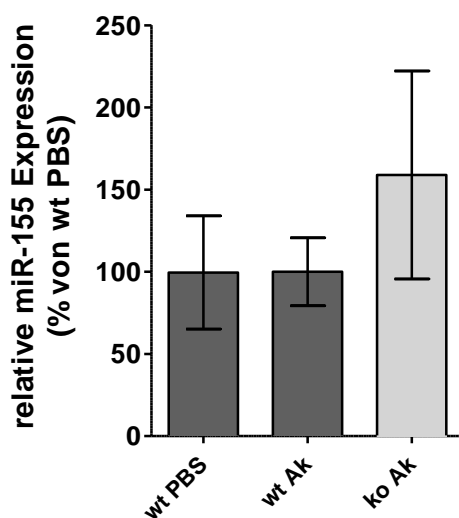


Abbildung 5.42: Analyse der miR-155-Expression in Leberproben von CAIA-behandelten KSRP-wt und KSRP-ko Mäusen.

Nach der Beendigung des CAIA-Experiments an Tag 9 wurden den KSRP-wt und KSRP-ko Mäusen Leberproben entnommen, RNA isoliert und die miR-155-Expression mittels qRT-PCR analysiert. Dargestellt sind relative Expression bezogen auf die Kontrollgruppe wt PBS. Die Säulen repräsentieren Mittelwerte (\pm SEM) der Analysen mit 7-10 Mäusen pro Gruppe (One-way ANOVA).

Abbildung 5.42 zeigt eine tendenzielle Erhöhung der miR-155-Expression in Antikörper-behandelten KSRP-ko Mäusen. Allerdings war der Unterschied aufgrund der starken Schwankungen nicht signifikant.

5.2.4 Die Expression von KSRP ist in CAIA-behandelten KSRP-wt Mäusen gewebespezifisch erhöht

Julia Art konnte im Rahmen ihrer Doktorarbeit nachweisen, dass die KSRP mRNA-Expression in TCR β -TG-Mäusen infolge der Immunisierung mit CII über den Verlauf der CIA-Entwicklung reguliert war (Art 2012). Sowohl in Pfoten und Milzen als auch in Peritonealzellen konnten erhöhte mRNA-Mengen gemessen werden, was in Milzproben auf Proteinebene mittels Western Blots bestätigt werden konnte. Um zu untersuchen, ob die Behandlung mit dem anti-CII-Antikörpermix zur Induktion der CAIA ebenfalls Änderungen der KSRP-Expression in wt-Mäusen hervorruft, die verantwortlich sein könnten für die beobachteten Schwellungen der Gelenke, wurden qRT-PCR-Analysen durchgeführt (4.2.7). Hierzu wurde RNA sowohl aus Geweben (Pfoten und Milz) als auch aus isolierten Zellen wie Peritonealzellen (hauptsächlich Monocyten und Makrophagen, Kapitel 4.4.4) und T-Zellen wie in Kapitel 4.2.2 beschrieben isoliert, in cDNA umgeschrieben (4.2.4) und unter Verwendung der in Tabelle 3.19 genannten Oligonukleotide amplifiziert (4.2.7). Die T-Zellen wurden von Rudolf Käfer isoliert und für die mRNA-Expressionsanalysen zur Verfügung gestellt.

Die Messungen der mRNA-Expressionen zeigten keinen Unterschied in der KSRP-Expression im Vergleich der Kontrolltiere (PBS) mit den CAIA-behandelten Tieren (Ak) in Pfoten (B) sowie in isolierten Zellen (Abbildung 5.43, C und D). In Milzproben war eine leichte, aber dennoch signifikante Erhöhung der KSRP-Expression auf etwa 150 % im Zuge der Antikörper-Behandlung zu verzeichnen (A). Somit scheint das Auslösen der Arthritis die KSRP-Expression zell- bzw. gewebespezifisch zu beeinflussen.

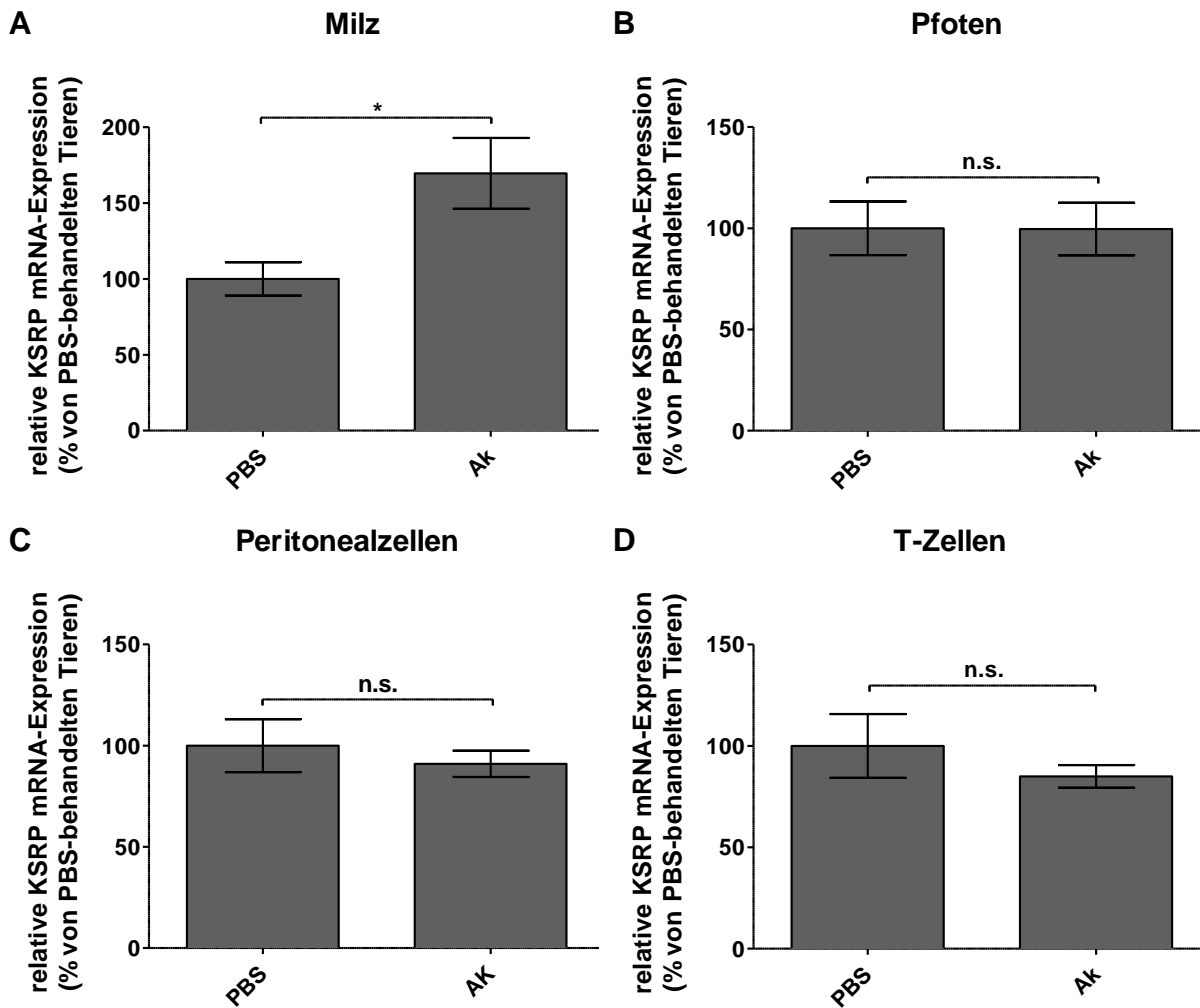


Abbildung 5.43: Messung der KSRP mRNA-Expression in Organen und Primärzellen nach CAIA-Induktion.

Milzproben (A), Pforten (B), Peritonealmakrophagen (C) und T-Zellen (D) von CAIA-behandelten (Ak) KSRP-wt Mäusen und Kontrollmäusen (PBS) wurden in GIT-Puffer lysiert, RNA wurde isoliert, in cDNA umgeschrieben und in qRT-PCR-Analysen eingesetzt. Die Expression der KSRP mRNA wurde gemessen und auf die Pol2a mRNA normiert. Dargestellt ist jeweils die relative mRNA-Expression bezogen auf die Kontrollgruppe PBS (100 %). Die Säulen repräsentieren Mittelwerte (\pm SEM) von 1-3 Analysen mit 4-10 Mäusen pro Gruppe (*: $p < 0,05$; n.s.: nicht signifikant verschieden; ttest).

5.3 Anti-inflammatorische Effekte des Naturstoffes Resveratrol durch die Regulation der KSRP Aktivität

Dem Naturstoff Resveratrol kommt aufgrund seiner vielfältigen nachgewiesenen Eigenschaften ein großes pharmakologisches Potential zu (Kapitel 1.3.4). Gerade die anti-inflammatorischen Effekte können für die Behandlung chronisch entzündlicher Erkrankungen, wie beispielsweise der RA, von Bedeutung sein. Deshalb ist es von Interesse, den genauen Wirkmechanismus von Resveratrol im Hinblick auf die Hemmung der Genexpression pro-inflammatorischer Gene wie TNF- α , IL-8 oder iNOS zu ergründen, um darüber mögliche Ansatzpunkte für Therapiemöglichkeiten der RA zu entwickeln.

Da eine direkte Bindung von Resveratrol an KSRP nachgewiesen werden konnte, besteht die Möglichkeit, dass die beschriebenen Effekte auf indirektem Wege über KSRP vermittelt werden (Bollmann, Art et al. 2014). Im Rahmen dieser Arbeit sollten nun die Prozesse, welche der Wirkung von Resveratrol zugrunde liegen, genauer untersucht werden, um schließlich die Rolle von KSRP in diesem Zusammenhang besser verstehen zu können.

5.3.1 Die Verringerung der KSRP-Expression inhibiert den destabilisierenden Effekt von Resveratrol auf die mRNAs pro-inflammatorischer Gene

Julia Art konnte im Rahmen ihrer Doktorarbeit bereits zeigen, dass Resveratrol die Stabilität der iNOS mRNA über die 3'-UTR vermindert (Art 2012). Diese Beobachtung konnte in der AG Kleinert weiterhin für die Gene IL-8 und TNF- α in DLD-1-Zellen bestätigt werden (vgl. Abbildung 5.44, publiziert in (Bollmann, Art et al. 2014)). Die Resveratrol-Behandlung der Zellen führte in etwa zu einer Halbierung der Halbwertszeit aller analysierten mRNAs.

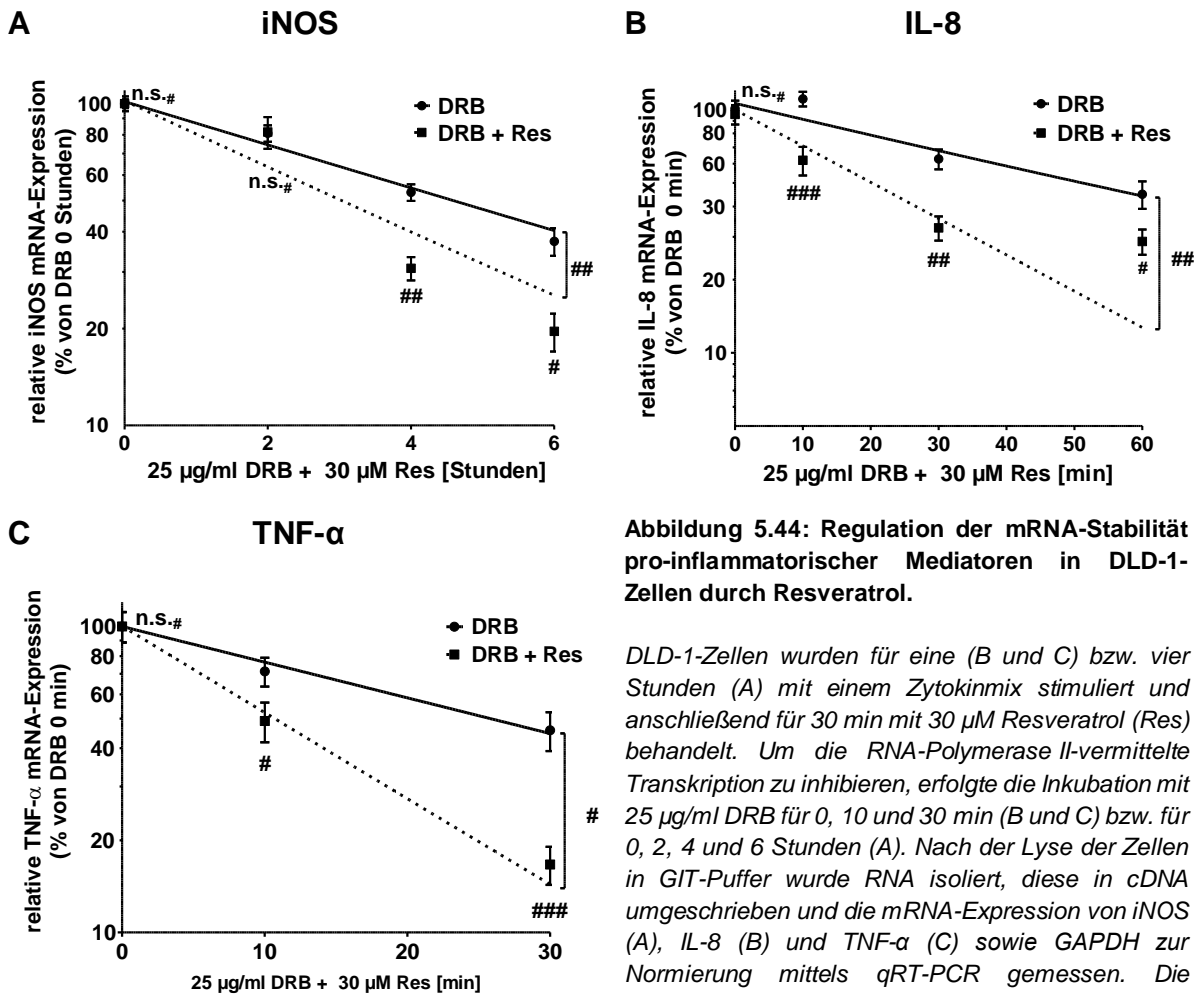


Abbildung 5.44: Regulation der mRNA-Stabilität pro-inflammatorischer Mediatoren in DLD-1-Zellen durch Resveratrol.

DLD-1-Zellen wurden für eine (B und C) bzw. vier Stunden (A) mit einem Zytokinmix stimuliert und anschließend für 30 min mit 30 µM Resveratrol (Res) behandelt. Um die RNA-Polymerase II-vermittelte Transkription zu inhibieren, erfolgte die Inkubation mit 25 µg/ml DRB für 0, 10 und 30 min (B und C) bzw. für 0, 2, 4 und 6 Stunden (A). Nach der Lyse der Zellen in GIT-Puffer wurde RNA isoliert, diese in cDNA umgeschrieben und die mRNA-Expression von iNOS (A), IL-8 (B) und TNF-α (C) sowie GAPDH zur Normierung mittels qRT-PCR gemessen. Die relativen Expressionen nach 0 h DRB wurden jeweils auf 100 % gesetzt und die Werte der anderen Zeitpunkte darauf bezogen. Gezeigt sind die Mittelwerte ±SEM von 10-12 unabhängigen Analysen (###: p<0,001; ##: p<0,01; #: p<0,05; ns#: nicht signifikant verschieden vs. Res-unbehandelte Zellen; Two-way ANOVA). Publiziert in (Bollmann, Art et al. 2014).

KSRP gilt als wichtiger Modulator der mRNA-Stabilität verschiedener pro-inflammatorischer Gene (Kapitel 1.2). Die nachweisliche Bindung von Resveratrol an KSRP (Bollmann, Art et al. 2014) lässt daher vermuten, dass letztendlich KSRP für die Resveratrol-vermittelte Verringerung der mRNA-Halbwertszeit von KSRP-Zielgenen verantwortlich ist, was Julia Art für die iNOS mRNA bereits bestätigen konnte (Art 2012). Dabei könnte Resveratrol demnach eine indirekte Rolle einnehmen. Um dies weiterhin zu verifizieren und für IL-8 und TNF-α zu überprüfen, wurden mRNA-Stabilitätsmessungen in Resveratrol-behandelten Zellen mit herunterregulierter KSRP-Expression durchgeführt. Hierfür wurden DLD-1-Zellen stabil mit dem Plasmid pCDH-EF1-copGFP-siKSRP transfiziert, welches eine siRNA gegen KSRP exprimiert (4.1.6.2, siKSRP). Als Kontrollen wurde ein Plasmid mit einer siRNA gegen die Luciferase (pCDH-EF1-copGFP-siLuc) verwendet (siLuc) (Tabelle 3.21). Die Zellen wurden in der AG Kleinert hergestellt und die KSRP-Expression wurde vor der Verwendung der weiteren

Verwendung auf Proteinebene überprüft (nicht gezeigt). Weiterhin wurde die mRNA-Expression von TNF- α , IL-8 und iNOS in stimulierten Zellen gemessen, wodurch bestätigt werden konnte, dass die mRNA-Mengen der pro-inflammatorischen Mediatoren in KSRP-defizienten Zellen erhöht vorlagen (AG Kleinert). Die Behandlung der Zellen mit Resveratrol führte wie erwartet zu verminderten mRNA-Quantitäten der pro-inflammatorischen Mediatoren (Bollmann, Art et al. 2014). Demnach konnten die Zellen für DRB-Versuche verwendet werden.

Die Stimulation der Zellen erfolgte wie in Kapitel 4.1.4 beschrieben. DRB wurde 30 min nach der Resveratrol-Behandlung für 0, 10, 20, 30, 40 und 60 min zugegeben (4.1.5). Mittels qRT-PCR (4.2.7) wurde die mRNA von IL-8, iNOS und TNF- α quantifiziert (Abbildung 5.45).

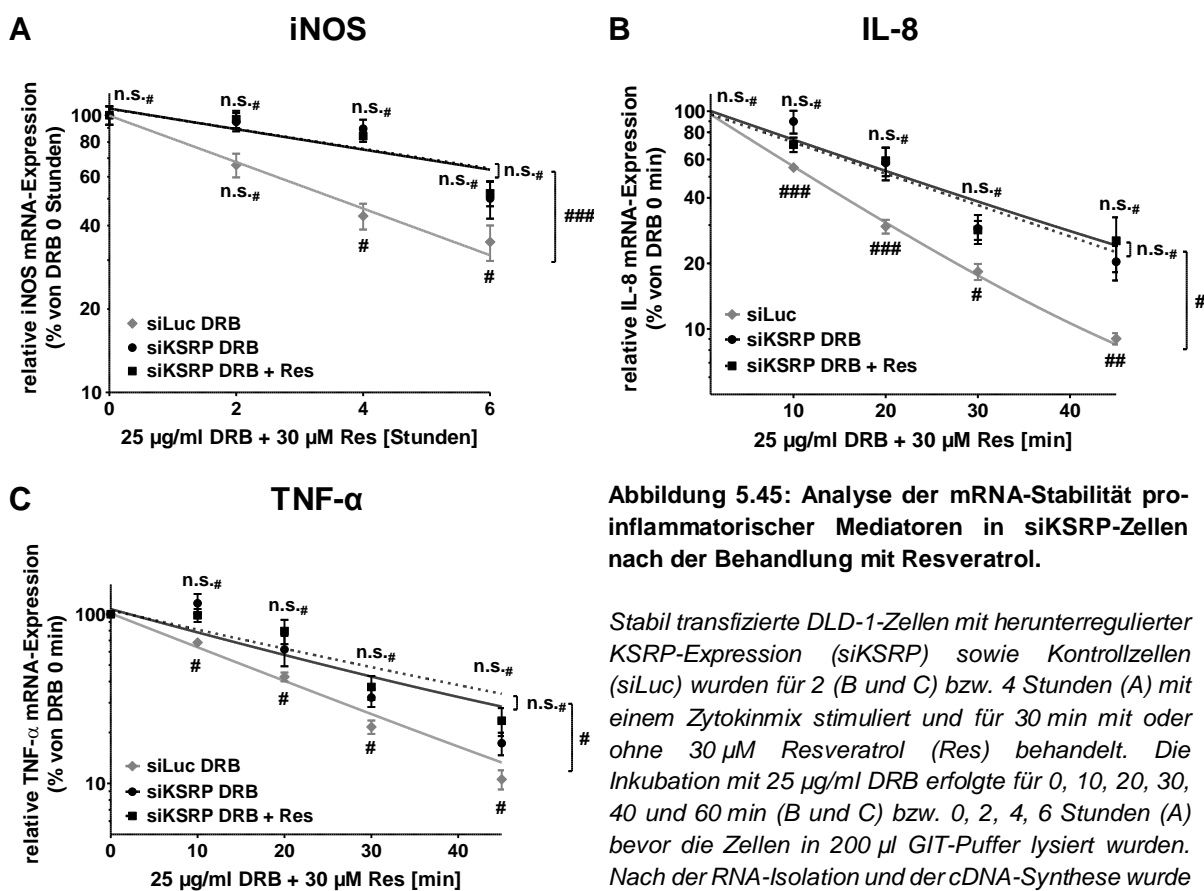


Abbildung 5.45: Analyse der mRNA-Stabilität pro-inflammatorischer Mediatoren in siKSRP-Zellen nach der Behandlung mit Resveratrol.

Stabil transfizierte DLD-1-Zellen mit herunterregulierter KSRP-Expression (siKSRP) sowie Kontrollzellen (siLuc) wurden für 2 (B und C) bzw. 4 Stunden (A) mit einem Zytokinmix stimuliert und für 30 min mit oder ohne 30 µM Resveratrol (Res) behandelt. Die Inkubation mit 25 µg/ml DRB erfolgte für 0, 10, 20, 30, 40 und 60 min (B und C) bzw. 0, 2, 4, 6 Stunden (A) bevor die Zellen in 200 µl GIT-Puffer lysiert wurden. Nach der RNA-Isolation und der cDNA-Synthese wurde die mRNA-Expression von iNOS (A), IL-8 (B) und TNF- α (C) sowie GAPDH zur Normierung mittels qRT-PCR gemessen. Gezeigt sind Mittelwerte \pm SEM von 8-14 Analysen. Die relativen mRNA-Expressionen zum Zeitpunkt 0 wurden jeweils auf 100 % gesetzt (###: $p < 0,001$; ##: $p < 0,01$; #: $p < 0,05$; n.s.# vs. Resveratrol-unbehandelten siLuc-Zellen, Two-way ANOVA). Publiziert in (Bollmann, Art et al. 2014).

Die DRB-Analysen konnten zeigen, dass die mRNA-Stabilität der untersuchten pro-inflammatorischen Mediatoren in Zellen mit herunterregulierter KSRP-Expression (siKSRP DRB) signifikant gestiegen war, im Vergleich zu den Kontrollzellen (siLuc DRB) (Abbildung 5.45). Die Halbwertszeit hatte sich für IL-8 von $10,09 \pm 0,70$ min in siLuc-Zellen auf $19,76 \pm$

4.18 min in siKSRP-Zellen erhöht. Für iNOS betrug die Halbwertszeit in siLuc-Zellen 4.31 ± 0.75 Stunden und in siKSRP-Zellen 7.60 ± 2.88 Stunden, während für TNF- α Halbwertszeiten von 14.85 ± 0.94 min (siLuc) und 20.17 ± 4.29 min (siKSRP) errechnet wurden. Die Behandlung der siKSRP-Zellen mit Resveratrol hatte keinen weiteren Einfluss auf die mRNA-Stabilitäten (Halbwertszeit IL-8: 20.88 ± 3.29 min, iNOS: 7.83 ± 2.36 Stunden, TNF- α : 24.81 ± 4.37 min). Demnach wurde bestätigt, dass der Effekt von Resveratrol auf die mRNA-Stabilität von pro-inflammatorischen Genen KSRP-abhängig ist.

5.3.2 Die Mutation des KSRP-Threonin 692 zu Alanin verhindert den Resveratrol-vermittelten negativen Effekt auf die pro-inflammatorische Genexpression

Die KSRP-Aktivität wird durch Phosphorylierungen auf posttranslationaler Ebene reguliert (vgl. Kapitel 1.2.2). Beispielsweise hemmt die Phosphorylierung des Threonin 692 die Bindung von KSRP an Ziel-mRNAs, was sich in der erhöhten Stabilität der Transkripte äußert (Briata, Forcales et al. 2005). Es konnte bereits gezeigt werden, dass die Behandlung von DLD-1-Zellen mit Resveratrol zur Reduzierung dieser p38-MAPK-vermittelten Phosphorylierung von KSRP führt. Dabei bleibt sowohl die p38-MAPK-Aktivität als auch die Aktivierung unverändert (Bollmann, Art et al. 2014). Aufgrund dessen wurde im folgenden Experiment untersucht, ob die verminderte Threonin-Phosphorylierung durch Resveratrol dadurch bedingt ist, dass die Interaktion der p38-MAPK mit KSRP verhindert wird. Hierfür wurden lentiviral transduzierte DLD-1-Zellen etabliert (4.1.7.1), die ein EGFP-KSRP-Fusionsprotein im Überschuss exprimierten, bei dem das Threonin 692 zu Alanin mutiert wurde (EGFP-KSRP(T692A)). Diese Mutation hemmt den inhibitorischen Effekt der p38-MAPK-Phosphorylierung auf die KSRP-Aktivität (Briata, Forcales et al. 2005). Als Kontrollen wurden die EGFP-Zellen verwendet, die in Kapitel 5.1.9.1 beschrieben wurden. Die Expression des EGFP-KSRP(T692A)-Fusionsproteins wurde mittels Western Blot-Analysen (4.3.5-4.3.6) überprüft. Abbildung 5.46 zeigt, dass in EGFP-KSRP(T692A)-Zellen das Fusionsprotein überexprimiert wurde. Neben dem Signal für endogenes KSRP konnte ein höher liegendes Signal detektiert werden, welches dem Fusionsprotein entsprach. Diese zweite Bande war in den Kontrollzellen nicht vorhanden.

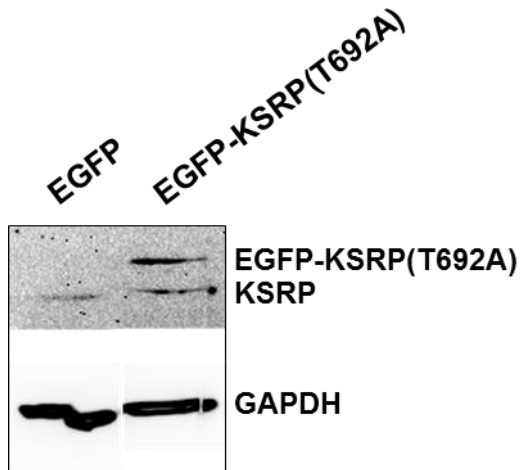


Abbildung 5.46: Überprüfung der KSRP-Expression in lentiviral transduzierten DLD-1-EGFP-KSRP(T692A-Zellen).

DLD-1-Zellen wurden mit den Plasmiden pCDH-CMV-MCS-EF1-Cop-GFP (EGFP, Kontrollen) und pCDHPuroEGFP-KSRP(T692A) lentiviral transfiziert. Zur Überprüfung der KSRP-Expression auf Proteinebene wurden die Zellen in RIPA-Puffer lysiert, die Proteinkonzentration mittels Bradford bestimmt und 200 µg Gesamtprotein in Western Blot-Analysen zur Detektion von KSRP und GAPDH als Ladekontrolle eingesetzt (GAPDH-Verdünnung: 1:1000 in 5 % MP, KSRP-Verdünnung: 1:50 in 5 % MP). Dargestellt ist ein repräsentativer Western Blot zum Nachweis der Expression des EGFP-KSRP(T692)-Fusionsproteins in KSRP-überexprimierenden Zellen im Vergleich zu Kontrollzellen (EGFP).

Die so generierten Zellen wurden schließlich analysiert im Hinblick auf den Einfluss von Resveratrol. Dafür wurden die Zellen wie in Kapitel 4.1.4 beschrieben mit Resveratrol vorinkubiert und anschließend für 2 bzw. 6 Stunden mit einem Zytokinmix stimuliert. qRT-PCR-Analysen (4.2.7) wurden für die Gene IL-8, iNOS und TNF- α durchgeführt (Abbildung 5.47).

In den EGFP-Kontrollzellen war die Expression aller gemessenen mRNAs nach CM-Behandlung signifikant erhöht, verglichen mit den unstimulierten Kontrollen. Die Behandlung mit Resveratrol der stimulierten Zellen führte zu einer hoch signifikanten Verminderung der mRNA-Mengen. Dieser Effekt war in den DLD-1-EGFP-KSRP(T692A)-Zellen (TA) nicht mehr vorhanden. Somit konnte die Vermutung bestätigt werden, dass Resveratrol die Phosphorylierung von KSRP durch die p38-MAPK am Threonin 692 blockiert.

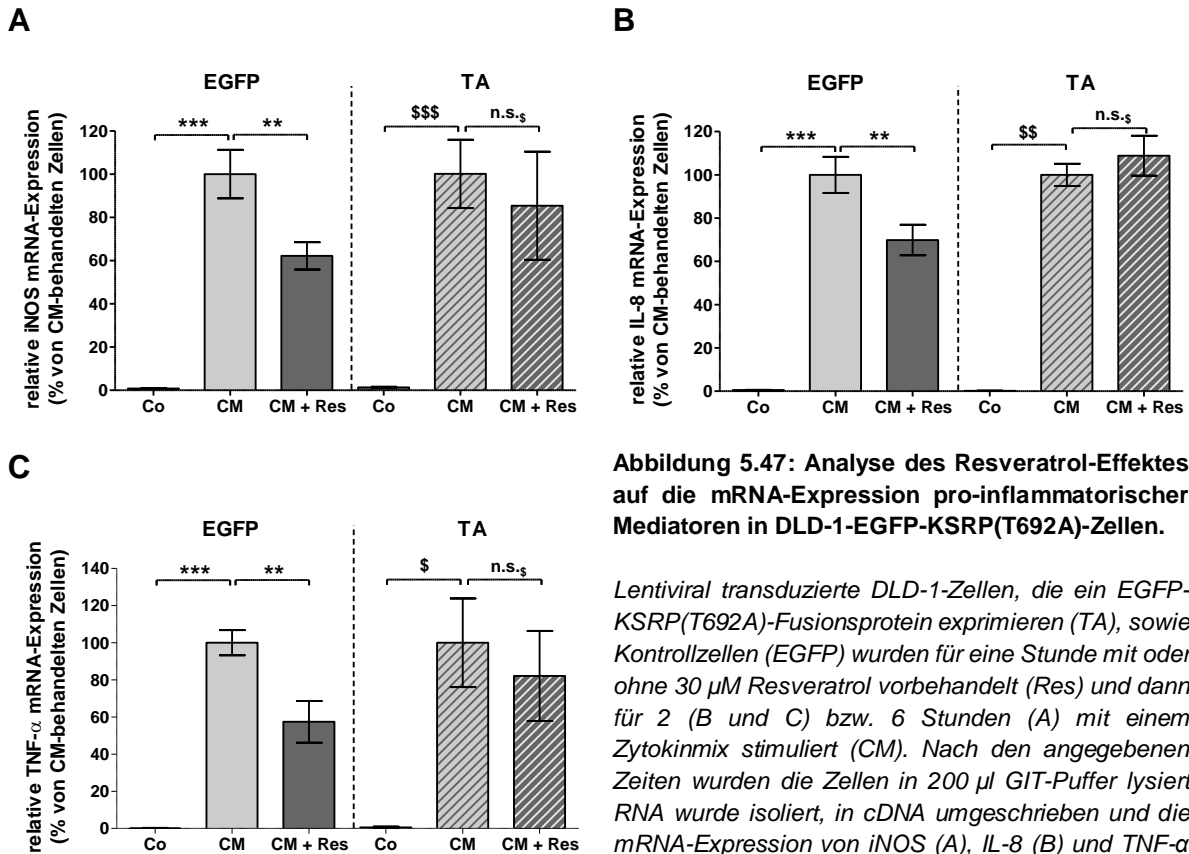


Abbildung 5.47: Analyse des Resveratrol-Effektes auf die mRNA-Expression pro-inflammatorischer Mediatoren in DLD-1-EGFP-KSRP(T692A)-Zellen.

Lentiviral transduzierte DLD-1-Zellen, die ein EGFP-KSRP(T692A)-Fusionsprotein exprimieren (TA), sowie Kontrollzellen (EGFP) wurden für eine Stunde mit oder ohne 30 μ M Resveratrol vorbehandelt (Res) und dann für 2 (B und C) bzw. 6 Stunden (A) mit einem Zytokinmix stimuliert (CM). Nach den angegebenen Zeiten wurden die Zellen in 200 μ l GIT-Puffer lysiert, RNA wurde isoliert, in cDNA umgeschrieben und die mRNA-Expression von iNOS (A), IL-8 (B) und TNF- α (C) sowie GAPDH zur Normalisierung gemessen. Dargestellt sind relative mRNA-Expressionen, jeweils bezogen auf die Expression in CM-behandelten EGFP- oder TA-Zellen. Die Säulen repräsentieren Mittelwerte (\pm SEM) von 4-6 Analysen (***: $p < 0,001$; **: $p < 0,05$ vs. CM-behandelte EGFP-Zellen; \$\$\$: $p < 0,001$; \$\$: $p < 0,01$; \$: $p < 0,05$; n.s.s: nicht signifikant vs. CM-behandelte TA-Zellen; One-way ANOVA).

5.3.3 Resveratrol verstärkt die intrazelluläre Interaktion zwischen KSRP und den Transkripten von IL-8, iNOS und TNF- α

Die vorhergehenden Daten zeigen, dass Resveratrol die Aktivität von KSRP erhöht, so dass KSRP Ziel-mRNAs stärker abgebaut werden. Über welchen Mechanismus diese Aktivitätserhöhung erreicht wird, ist allerdings noch nicht klar. Aus diesem Grund wurde mit Hilfe von Immunpräzipitationsanalysen mit anschließender qRT-PCR untersucht, ob durch Resveratrol womöglich die intrazelluläre Bindung von KSRP an die Transkripte erhöht wird. Für diesen Zweck wurden DLD-1-Zellen wie in Kapitel 4.1.4 für eine Stunde mit Resveratrol vorinkubiert und anschließend für 2 bzw. 6 Stunden mit einem Zytokinmix stimuliert. Als Kontrollen wurden stimulierte Zellen verwendet, die nicht mit Resveratrol behandelt wurden. Die Proteinlysate wurden schließlich für RNA-Immunpräzipitationsanalysen (RIP) verwendet, wobei KSRP, zusammen mit den gebundenen mRNAs, spezifisch aus dem Gemisch

immunpräzipitiert wurde. Der Ablauf war wie in Kapitel 4.3.9 beschrieben. Die RNAs wurden aufgereinigt, in cDNA (4.2.4) umgeschrieben und in qRT-PCR-Messungen (4.2.7) eingesetzt.

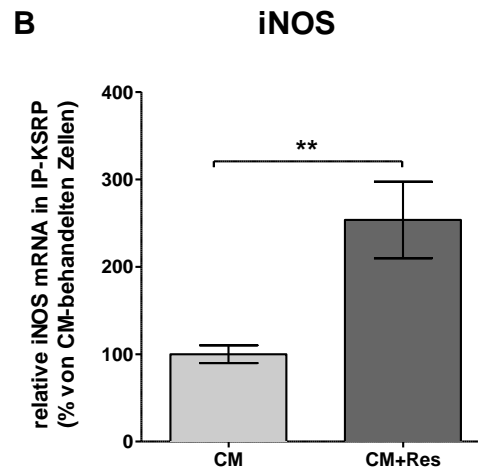
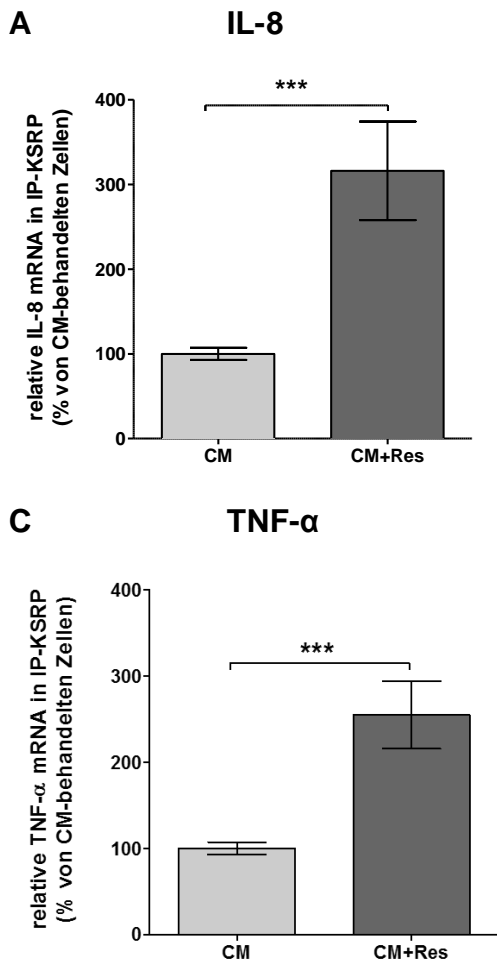


Abbildung 5.48: Messung der mRNA-Menge pro-inflammatorischer Gene nach RIP-Analysen mit einem KSRP-Antikörper.

DLD-1-Zellen wurden für eine Stunde mit oder ohne Resveratrol (30 μ M, Res) behandelt und anschließend 2 (A und C) bzw. 6 (B) Stunden mit einem Zytokinmix stimuliert (CM). Nach der Lyse der Zellen wurden RNAs, die an KSRP gebunden waren, mit einem spezifischen Antikörper immunpräzipitiert. Zur Normierung der RNAs für die nachfolgenden Analysen wurde jeder Probe 1 ng in vitro transkribierte Luciferase-RNA zugegeben. Die RNA wurde aufgereinigt, in cDNA umgeschrieben und mittels qRT-PCR die mRNA-Menge von IL-8 (A) iNOS (B) und TNF- α (C) sowie der Luciferase als Kontrolle zur Normalisierung gemessen. Gezeigt ist die Zusammenfassung aus 12-16 RIP-Analysen. Die Säulen repräsentieren Mittelwerte (\pm SEM) der relativen mRNA-Mengen, die an KSRP gebunden vorlagen, bezogen auf CM-behandelte Zellen (***: $p < 0,001$; **: $p < 0,01$; ttest).

Die Ergebnisse zeigen, dass die Behandlung von Resveratrol die Interaktion zwischen KSRP und den mRNAs von IL-8, iNOS und TNF- α signifikant verstärkt hatte, was wiederum vermutlich für deren schnelleren Abbau verantwortlich ist.

6 Diskussion

6.1 Untersuchung der Expressionsregulation von KSRP

Das *KH-type Splicing Regulatory Protein* KSRP ist aufgrund seiner Fähigkeit sowohl DNA als auch RNA zu binden in der Lage, auf mehreren Ebenen in die Regulation der Expression verschiedener Gene einzugreifen. Das Protein erfüllt dadurch eine Vielzahl an Funktionen, wie beispielsweise die Aktivierung des *c-myc*-Promotors, die Prozessierung von prä-mRNAs, die Modulation der Reifung von miRNAs sowie die Kontrolle der mRNA-Stabilität (Briata, Bordo et al. 2016). Da dysregulierte Genexpressionen häufig der Auslöser für Erkrankungen sind, spielt KSRP als wichtiger Modulator der Genexpression vermutlich in der Pathogenese verschiedener Krankheiten eine Rolle (Kapitel 1.2 und 1.2.3). Somit könnte KSRP einen potentiellen Angriffspunkt für die Entwicklung neuer therapeutischer Strategien darstellen. Bisher ist jedoch nur wenig über Mechanismen bekannt, welche die KSRP-Expression positiv oder negativ verändern können. Viele Arbeitsgruppen haben sich stattdessen auf die Einflüsse konzentriert, welche die KSRP-Aktivität posttranslational regulieren, wohingegen gerade die Regulation der Promotoraktivität weitestgehend unerforscht blieb. Der erste Teil dieser Arbeit beschäftigt sich daher mit der Regulation der KSRP-Expression, wobei der Fokus auf die transkriptionelle sowie die posttranskriptionelle Regulation gelegt wurde.

6.1.1 Bioinformatische Analysen geben erste Hinweise auf die Lage des KSRP Promotors sowie eine definierte TSS

Der korrekte Ablauf von Prozessen der Zelldifferenzierung wird durch die akkurate Regulation der Genexpression in der Zelle gewährleistet. Die Kontrolle auf transkriptioneller Ebene wird durch eine Kombination aus Transkriptionsfaktoren, der RNA-Polymerase II und *cis*-regulatorischen Elementen, wie Promotoren, *Enhancer* oder *Silencer* bewerkstelligt (Mignone, Gissi et al. 2002). Das Wissen über die Lokalisation des Promotors sowie dazugehöriger Elemente ist daher essentiell für die Analyse der transkriptionellen Expressionsregulation. Aus diesem Grund sollte im Rahmen dieser Arbeit der KSRP Promotor eingegrenzt und charakterisiert werden. Bioinformatische Analysen zeigten, dass sich die potentielle Promotorregion von KSRP innerhalb der 3 kb langen Sequenz stromaufwärts des Exon 1 befindet (Abbildung 5.1). Dieser Bereich kennzeichnet sich durch die spezifischen aktivierenden Histonmodifikationen H3K4Me1, H3K4me3 sowie H3K27Ac, die in der Nähe von Promotoren und aktiven regulatorischen Elementen zu finden sind (Zhou, Goren et al. 2010; Danino, Even et al. 2015). Solche Histonmodifikationen reichen zusätzlich in das erste Intron hinein, was darauf schließen lässt, dass sich womöglich für die KSRP-Transkription wichtige

Bereiche genintern befinden. Auch das Vorkommen von CpG-Inseln innerhalb des Exon 1, über welche die Transkription initiiert werden kann (Deaton and Bird 2011), unterstützt die Vermutung eines geninternen Promotorelements (Abbildung 5.1). Generell handelt es sich häufig bei stromabwärts des Exon 1 liegenden Elementen um *Enhancer*-Sequenzen. Dagegen kommt es vergleichsweise selten vor, dass Abschnitte des Kernpromotors genintern liegen. Solche Promotoren finden sich im Allgemeinen überwiegend in Genen, welche durch die Polymerase III transkribiert werden, wie z.B. tRNA-Gene (Paule and White 2000). Dennoch sind wenige Vertreter bekannt, die geninterne Polymerase II-Promotoren besitzen. Ein Beispiel hierfür ist das Herzprotein Titin, ein wichtiges Strukturprotein des Sarkomers (Zou, Tran et al. 2015). Somit ist ein KSRP Promotor innerhalb der kodierenden Sequenz nicht auszuschließen.

Der Kernpromotor spielt eine zentrale Rolle für die Regulation der Transkriptionsinitiation. Dieser befindet sich zumeist im Bereich zwischen -35 bp und +35 bp relativ zur Transkriptionsstartstelle (TSS) (Smale and Kadonaga 2003), weshalb das Wissen über die Lage der TSS dazu beitragen kann, den Kernpromotor eines Gens inklusive der zugehörigen Sequenzelemente zu identifizieren. Die Auswertung der SRA-Datensätze von GRO-cap-Analysen (Core, Martins et al. 2014) konnte zeigen, dass der KSRP Promotor eine dominante TSS aufweist, die als +1 Position definiert wurde (Abbildung 5.2). Neben dieser Haupt-TSS gibt es einen weiteren Bereich, zwischen -600 und -1000 bp, dem ebenfalls GRO-cap-Fragmente zugeordnet wurden und in welchem demnach ebenfalls potentielle Transkriptionsstartpunkte liegen könnten. Da bereits nachgewiesen werden konnte, dass auch *Enhancer* transkribiert werden (*enhancer* RNA, eRNA), könnten die zugewiesenen Fragmente auch auf *Enhancer*-Sequenzen in diesem Bereich hindeuten (Léveillé, Melo et al. 2015; Xu, Ling et al. 2017). Insgesamt war die Anzahl der zugeordneten Fragmente hier jedoch deutlich geringer, verglichen mit der +1-Position (200 gegen 800 Fragmente), was schließlich einen definierten Startpunkt der KSRP-Transkription vermuten lässt.

Weiterhin ist auffällig, dass das KSRP Gen in einem Bereich lokalisiert ist, der eine relativ hohe Gendichte aufweist, wobei der putative KSRP Promotor mit der Gensequenz von SLC25A41 überlappt, einem Mitglied der *solute carrier family 25* (humane Transportproteine). Dabei überschneiden sich die letzten drei Exons von SLC25A41 mit der Promotorsequenz von KSRP. Es ist bekannt, dass auf dem Chromosom 19 im Gegensatz zu allen anderen humanen Chromosomen allgemein die höchste Anzahl an Genen lokalisiert ist (Grimwood, Gordon et al. 2004). Diese hohe Gendichte korreliert mit dem GC-Gehalt der DNA, der auf dem Chromosom 19 48 % beträgt, verglichen mit 41 % im gesamten Genom) (International Human Genome Sequencing 2001). Solche GC-reichen Sequenzen, wurden als Charakteristikum für Domänen beschrieben, in welchen stark exprimierte Gene lokalisiert sind (Versteeg, van

Schaik et al. 2003). Der hohe GC-Gehalt des putativen KSRP Promotors (vgl. CpG-Inseln Abbildung 5.1) lässt demnach vermuten, dass KSRP diesen hoch exprimierten Genen anghört.

Durch diese ersten bioinformatischen Analysen konnten Hinweise bezüglich der Lage und einigen Eigenschaften des KSRP Promotors gewonnen werden, die im Folgenden mit Hilfe von Reporteranalysen weiter untersucht wurden.

6.1.2 Die Transkription von KSRP wird potentiell über einen Promotorabschnitt zwischen -245 und +16 bp relativ zur TSS initiiert

Der zuvor identifizierte 3 kb Promotorabschnitt stromaufwärts des KSRP Exon 1 wurde mittels Luciferase Reporteranalysen in DLD-1-Zellen hinsichtlich der Promotoraktivität überprüft. Deletionen vom 5'-Ende her konnten zeigen, dass eine kurze Sequenz von 245 bp ausreicht, um ein Luciferasesignal zu erzeugen. Die gemessene Aktivität war dabei unter der Kontrolle des 245 bp Promotors signifikant höher als unter der Kontrolle des 3 kb Promotors (Abbildung 5.3). Dagegen zeigte die Transfektion des 50 bp Promotorplasmids kaum Luciferaseaktivität. Somit konnten vorhergehende Analysen der AG Kleinert bestätigt werden, welche darauf hindeuten, dass sich für die Transkription von KSRP wichtige regulatorische Elemente innerhalb der ersten 245 bp stromaufwärts des Exon 1 befinden (unveröffentlicht). Der Anstieg der Luciferaseaktivität zwischen pGI4luc KSRPprom 3 kb zu pGI4lucKSRPprom 2 kb transfizierten Zellen deutet auf mögliche negativ regulierende Elemente im Bereich zwischen -3 kb und -2 kb hin (Abbildung 5.3). Gleichzeitig lassen die Daten jedoch auch vermuten, dass zwischen -2 kb und -1 kb womöglich *Enhancer*-Sequenzen liegen, welche für die höhere Expression der Luciferase unter der Kontrolle des 2 kb Promoters im Vergleich zu den Promotorfragmenten 1 kb und 800 bp verantwortlich sind. Dieser potentielle *Enhancer* steht möglicherweise in Wechselwirkung mit der negativ regulatorischen Sequenz zwischen -3 und -2 kb, so dass sich bei der Transfektion des 3 kb Promotorplasmids positive und negative Regulationsmechanismen ausgleichen. Die generell erhöhten Luciferasesignale, die unter der Kontrolle der kurzen Promotorfragmente 450 und 245 bp detektiert werden konnten, deuten auf wichtige positive Kontrollelemente in diesem Bereich hin. Diese scheinen jedoch erst zum Tragen zu kommen, wenn die stromaufwärts liegende Sequenz deletiert wurde. Somit ist die kurze Sequenz von 245 bp in der Lage die Transkription von KSRP zu starten, sie ist allerdings nicht essentiell für den Prozess der Transkriptionsinitiation. Das konnte durch entsprechende 3'-Deletionen der 245 bp Sequenz mit Hilfe von Luciferase Reporter- Assays in DLD-1-Zellen gezeigt werden (Abbildung 5.4). Lediglich für das 450 bp-Fragment führte die 245 bp-Deletion am 3'-Ende zu einer deutlichen Reduktion der Luciferaseaktivität, was zeigt, dass der Bereich zwischen -450 bp und -245 bp alleine nicht für die Transkription von KSRP ausreicht.

Für alle anderen Konstrukte hatte die Deletion keinen oder nur einen geringfügigen negativen Effekt zur Folge. Im Gegenteil dazu wurde eine signifikante Aktivitätserhöhung durch die Transfektion des Plasmids pGI4luc KSRPprom 3 kb del245 beobachtet, verglichen mit pGI4luc KSRPprom 3 kb transfizierten Zellen. Daraus resultiert die Vermutung, dass die 245 bp Promotersequenz abhängig von der vorangestellten Sequenz positive oder negative regulatorische Funktionen erfüllen kann. Dies könnte sich dadurch erklären lassen, dass der KSRP Promotor potentiell verschiedene regulatorische Elemente beinhaltet, die womöglich Bindestellen für Transkriptionsfaktoren darstellen und die sich in ihrer Funktion gegenseitig beeinflussen. Je nachdem welcher Promotorabschnitt vorhanden ist, überwiegen schließlich positiv oder negativ regulierende Faktoren. Ähnliches konnte unter anderem für die Rezeptor-Tyrosinkinase EPHB2 gezeigt werden, deren putative Promotersequenz etwa 1 kb lang ist und sowohl positive als auch negative Kontrollsequenzen aufweist (Fu, Li et al. 2009). Das resultiert in unterschiedlichen Luciferaseaktivitäten, abhängig davon, welcher Promotorabschnitt in Luciferase-Assays analysiert wurde. Des Weiteren wird die Transkription des humanen Komplementrezeptor 2 durch verschiedene Transkriptionsfaktoren reguliert, wobei die Mutation einzelner Bindestellen in Reporteranalysen verminderte aber auch erhöhte Luciferaseaktivitäten zur Folge hat (Ulgiati, Pham et al. 2002).

Durch die zusätzliche Deletion der putativen TSS (+1) von KSRP konnte nachgewiesen werden, dass diese ebenfalls nicht zwingend notwendig ist für die Initiation der Transkription (Abbildung 5.5). In den DLD-1-Zellen, die mit den delTSS Konstrukten transfiziert wurden, blieb die Luciferaseaktivität unverändert gegenüber den jeweiligen Kontrolltransfektionen. Tendenziell konnte vielmehr ein Anstieg der Luciferaseaktivitäten als Folge der TSS-Deletionen beobachtet werden, der im Falle von pGI4luc KSRPprom 450 bp del245 delTSS transfizierten Zellen gegenüber der Kontrolle sogar signifikant war. Demnach scheint die TSS hier womöglich eine negative regulatorische Funktion auf die Expression der Luciferase auszuüben, deren Ausprägung jedoch abhängig ist vom vorangestellten Promotor. Die beschriebenen Daten stehen damit im Einklang mit dem Ergebnis der Transfektion des KSRPprom 50 bp-Plasmids in DLD-1-Zellen, welches neben der TSS lediglich eine kurze Promotersequenz enthält und kaum die Expression der Luciferase induzierte (Abbildung 5.3). Demnach konnte gezeigt werden, dass die TSS und die umliegenden Basen nicht ausreichen, um die Transkription vollständig zu initiieren. Diese Beobachtungen sprechen somit gegen die Transkriptionsinitiation über eine definierte TSS, wie sie aufgrund der GRO-cap-Analysen angenommen wurde (Abbildung 5.2). Allerdings scheint auch der zweite Bereich zwischen -600 und -1000 bp, welcher laut GRO-cap-Daten mehrere putative TSS enthält, die Deletion der Haupt-TSS nicht ausgleichen zu müssen. Die Transfektion der Plasmide pGI4luc KSRPprom 450 bp delTSS und pGI4luc KSRPprom 450 bp del245 delTSS, welche beide potentiellen TSS-Bereiche nicht mehr enthalten, führte ebenfalls nicht zu einer Verminderung

der Luciferaseaktivität. Somit deuten die Ergebnisse der Luciferase Reportergen-Assays zunächst darauf hin, dass die Transkription von KSRP über mehrere verteilte TSS initiiert wird. Allerdings muss bezüglich der TSS-Deletionskonstrukte berücksichtigt werden, dass die Sequenz in der Umgebung der als +1 definierten KSRP-TSS sowie die stromaufwärts liegende Sequenz sehr GC-reich ist. Durch die Deletion der putativen TSS inklusive der umliegenden Basen ist die Wahrscheinlichkeit sehr hoch, dass eine Sequenz herangezogen wird, die das Startsignal ersetzen und dadurch die Expression der Luciferase beeinflussen kann. Eine Möglichkeit dies zu umgehen könnte die gezielte Mutation der TSS darstellen, was in zukünftigen Experimenten umgesetzt werden könnte. Weiterhin könnte mittels 5'-RACE (*rapid amplification of cDNA ends*) das exakte 5'-Ende der KSRP-Transkripte identifiziert und die exakte Lokalisation der TSS bzw. mehrerer TSS definiert werden. Demnach geben die zum jetzigen Zeitpunkt vorliegenden Daten keinen Aufschluss über das Vorhandensein und die Lage putativer TSS. Auch in der Literatur ist diesbezüglich nichts publiziert, was Hinweise auf mögliche Mechanismen der Transkriptionsinitiation von KSRP liefert. Neben den beschriebenen methodischen Schwierigkeiten bei der TSS-Deletion, durch welche die unterschiedlichen Ergebnisse der Luciferase Reportergen-Assays verglichen mit den GRO-cap-Daten erklärt werden können, könnten auch die verschiedenen verwendeten Zellsysteme eine Rolle spielen. Die GRO-cap-Analysen wurden in lymphoblastoiden B-Zellen und myelogenen Leukämiezellen durchgeführt, während für die Reportergenanalysen DLD-1-Zellen verwendet wurden, was unter Umständen zu zellspezifischen Effekten führen könnte.

Die bioinformatischen und molekularbiologischen Analysen bezüglich der Charakterisierung des KSRP Promotors deuten auf sehr komplexe und vielfältige regulatorische Mechanismen hin. Bei der Untersuchung verschiedener KSRP Promotorfragmente konnte festgestellt werden, dass mehrere kurze Sequenzabschnitte innerhalb des putativen 3 kb Promotors unabhängig voneinander in der Lage sind die Transkription zu initiieren. Ein definierter Kernpromotor, über den die KSRP-Expression auf transkriptioneller Ebene reguliert wird, konnte nicht identifiziert werden. Das lässt sich vermutlich durch die CpG-Inseln im beschriebenen Bereich erklären, über welche die Transkription unabhängig von den klassischen Elementen wie z.B. der TATA-Box gestartet werden kann (Smale, Schmidt et al. 1990). Weiterhin kommt eine alternative Regulation infrage, welche die Transkription ausgehend von verschiedenen, getrennt voneinander liegenden Promotoren bewirken kann. Beispielsweise könnten solche Promotoren nach den Ergebnissen der Luciferase Reportergenanalysen (Abbildung 5.3) im Bereich zwischen -2000 bp und -1000 bp oder zwischen -450 bp und -50 bp stromaufwärts des KSRP Exon 1 liegen, da die Transfektion dieser Abschnitte eine erhöhte Luciferaseaktivität zur Folge hatte. Die Transkriptionskontrolle über alternative Promotoren wurde bereits für einige Gene beschrieben (Ayoubi and Van De Ven 1996). Dadurch entsteht eine Diversität des Transkriptomts sowie eine verbesserte

Flexibilität in der Regulation der Genexpression als Antwort auf äußere Reize. Häufig lässt sich die gewebespezifische mRNA-Expression verschiedener Gene auf alternative Promotoren zurückführen. So wird die Expression des Aromatase Cytochrom P450 Gens (Cyp19) in Hoden und dem Gehirn von Mäusen über drei differente Promotoren kontrolliert (Golovine, Schwerin et al. 2003). Diese befinden sich alle in Exon 1, so dass sich die Transkripte in ihrer 5'-UTR-Sequenz unterscheiden, die kodierende Region jedoch in allen Transkripten gleichbleibt. Meist finden sich multiple Promotoren allerdings nicht in unmittelbarer Umgebung zueinander wie das für KSRP vermutet werden könnte, sondern sind in unterschiedlichen Exons lokalisiert. Das konnte beispielsweise für die Serin-Threonin-Kinase WNK1 gezeigt werden (Delaloy, Lu et al. 2003). Im Falle des MAPT Gens, welches für das Protein Tau kodiert, wird ebenfalls die gewebespezifische Expression sowie eine differente Funktion durch alternative Promotoren erklärt (Huin, Buée et al. 2017). Dabei ist ein zweiter Promotor in Exon 1 lokalisiert. Dem daraus resultierenden verkürzten Protein wird eine veränderte Funktion sowie eine differente Lokalisation im Gehirn zugeschrieben, wodurch eine in Verbindung mit Alzheimer stehende neurodegenerative Wirkung vermutet wird. Auch für KSRP kann eine Regulation der Expression über einen genintern liegenden Promotor nicht vollständig ausgeschlossen werden. Die bioinformatischen Analysen der KSRP Gensequenz zeigten promotorspezifische Histonmodifikationen in Exon 1, Intron 1 und Exon 2 (Abbildung 5.1), wodurch dieser Bereich einen putativen alternativen Promotor aufweisen könnte. Reporter-Gen-Assays konnten dies allerdings nicht bestätigen. Die Transfektion des Fusionsplasmids in DLD-1-Zellen zeigte nur eine geringfügig höhere Luciferaseaktivität als die Transfektion des 245 bp prom 5'-UTR-Plasmids (Abbildung 5.13). Auch die unabhängige Transfektion des geninternen Bereichs (Exon 1 bis Exon 2) war nicht in der Lage die Expression der Luciferase zu induzieren (Daten nicht gezeigt).

Die beschriebenen Daten lassen demnach keine abschließende Aussage über potentielle alternative Promotoren zur Regulation der KSRP-Expression zu. Eine solche Art der Expressionsregulation könnte jedoch die Vielfältigkeit der KSRP-Expression sowie die potentielle Beteiligung an der Pathogenese von Erkrankungen erklären (vgl. Kapitel 1.2.2 und 1.2.3) (Briata, Bordo et al. 2016). Bezüglich Tumorerkrankungen wurde bereits eine zellspezifische Funktion von KSRP beschrieben (Briata, Bordo et al. 2016). In Glioblastom-Patienten haben beispielsweise erhöhte KSRP Transkriptmengen eine höhere Überlebensrate zur Folge (Boucas, Fritz et al. 2015). Im Gegensatz dazu findet sich in Leberzellkarzinomen eine verstärkte Expression von KSRP, was eine pro-tumorale Rolle vermuten lässt (Zubaidah, Tan et al. 2008). Das Vorkommen multipler Promotoren für ein Gen hat die Entstehung verschiedener Transkript-Isoformen zur Folge, die sich am 5'-Ende in der Sequenz unterscheiden. Somit müssen unterschiedliche Transkripte nicht immer auf alternatives Spleißen zurückzuführen sein. Die Analyse des KSRP Gens mit Hilfe des UCSC Genome

Browsers zeigt zwar verschiedene KSRP mRNAs an, allerdings kann nicht eindeutig festgelegt werden, wodurch die Transkripte entstehen und wo potentielle Promotoren lokalisiert sind. Zur Aufklärung der KSRP Promoterstruktur sind aufgrund der aktuellen Datenlage weitere molekularbiologische Analysen notwendig. So kann etwa die Identifizierung von Transkripten in unterschiedlichen Geweben und unter verschiedenen Bedingungen mittels 5'-RACE die Lage putativer Promotorelemente weiter charakterisieren. Im Wesentlichen muss jedoch beachtet werden, dass die Analyse der Expressionsregulation von KSRP durch die hohe Gendichte auf Chromosom 19 sowie den GC-Gehalt erheblich erschwert wird (vgl. Kapitel 6.1.1), da sich womöglich regulatorische Elemente verschiedener Gene in ihrer Sequenz überschneiden.

6.1.3 Die KSRP 5'-UTR spielt für die posttranskriptionelle Regulation der KSRP-Expression eine Rolle

Durch die vorhergehenden Untersuchungen konnte die Komplexität aufgezeigt werden, die der Regulation der KSRP-Expression auf transkriptioneller Ebene zugrunde liegt. Da bekannt ist, dass die UTR-Sequenzen häufig in die Kontrolle der Genexpression involviert sind (Mignone, Gissi et al. 2002), wurde weiterhin die Rolle der 5'-UTR genauer analysiert. Als 5'-UTR wurde für die folgenden Untersuchungen die Sequenz definiert, die ausgehend von der durch Sequenzanalysen vorhergesagten TSS (+1) bis hin zum Startkodon von KSRP (+108) reicht. Luciferase Reportergen-Assays mit verschiedenen KSRPprom 5'-UTR-Plasmiden konnten zeigen, dass das Vorhandensein der 5'-UTR zu einer 10-fach höheren Expression der Luciferase führt, verglichen mit den entsprechenden Promotorfragmenten ohne 5'-UTR (Abbildung 5.7). Dabei war die gemessene Aktivitätserhöhung unter der Kontrolle des 245 bp Promotors mit der 5'-UTR am höchsten. Aber auch der 50 bp Promotor, der alleine lediglich eine Luciferaseaktivität von 25 % aufwies, erreicht in Kombination mit der 5'-UTR eine Aktivität von etwa 200 % bezogen auf pGI4luc KSRPprom 3 kb transfizierte Zellen (Abbildung 5.3 und Abbildung 5.7). Die 5'-UTR alleine ist dagegen nicht in der Lage die Expression der Luciferase zu induzieren. Demnach scheint die UTR-Sequenz einen positiven regulatorischen Effekt auszuüben, der jedoch nur in Kombination mit entsprechenden Promotorelementen zum Tragen kommt. Dabei spielt es keine Rolle welcher Promotor vorangestellt ist. Auch die Aktivität des genfremden SV40-Promotors wird durch die KSRP 5'-UTR unterstützt (Abbildung 5.8). Allerdings ist die hier verzeichnete Aktivitätserhöhung der Luciferase lediglich verdoppelt. Das könnte sich dadurch erklären lassen, dass der SV40-Promotor konstitutiv exprimiert wird und an sich schon eine sehr hohe Aktivität aufweist (Qin, Zhang et al. 2010), wodurch eine weitere Aktivitätssteigerung vermutlich nur bedingt möglich ist.

Einflüsse der 5'-UTR auf die Kontrolle der Genexpression sind in der Literatur hauptsächlich auf posttranskriptioneller Ebene beschrieben (van der Velden and Thomas 1999; Mignone, Gissi et al. 2002; Pickering and Willis 2005). Das konnte auch für die 5'-UTR von KSRP bestätigt werden. Messungen der Luciferase mRNA nach der Transfektion verschiedener KSRPprom 5'-UTR-Konstrukte konnten zeigen, dass die Anwesenheit der 5'-UTR nahezu keinen positiven Effekt auf die mRNA-Expression der Luciferase hatte (Abbildung 5.11). Lediglich in Kombination mit dem 245 bp Promotor konnte eine Verdopplung der mRNA-Menge verzeichnet werden. Das spricht womöglich für eine kombinatorische Regulation aus transkriptionellen und posttranskriptionellen Mechanismen, wobei die posttranskriptionelle Kontrolle einen höheren Stellenwert zu haben scheint (vgl. Abbildung 5.7 und Abbildung 5.11). Auch die Verbindung mit dem SV40-Promotor hatte keine Erhöhung der Luciferase mRNA-Expression zur Folge, verglichen mit dem SV40-Promotor alleine (Abbildung 5.12). Demnach kann angenommen werden, dass die KSRP 5'-UTR überwiegend translationale Prozesse begünstigt. Um definitiv aufzuklären, wie groß der Einfluss der 5'-UTR auf die translatierte mRNA-Menge ist, könnten beispielsweise RNA-Transfektionen durchgeführt werden. Gebildete Mengen der zu untersuchenden Proteine korrelieren hier direkt mit der Translationseffizienz. Eine weitere Möglichkeit die Translationrate quantitativ und qualitativ zu bestimmen stellen Ribosomen-*Profiling*-Experimente dar. Dabei wird mRNA inklusive gebundener Ribosomen isoliert. Mit Hilfe von Ribonukleasen wird anschließend die gesamte mRNA abgebaut, die nicht durch Ribosomen geschützt ist. Im nächsten Schritt werden die Proteine degradiert und die frei gewordene RNA kann nach entsprechender Aufbereitung in Sequenzierungsreaktionen eingesetzt werden. Somit wird schließlich nur die mRNA analysiert, die an Ribosomen assoziiert ist und damit tatsächlich translatiert wird (Ingolia 2016). Generell wird die Genexpression posttranskriptionell über die mRNA-Stabilität oder die Translationseffizienz reguliert. Dies wird häufig über Strukturen in den UTR-Sequenzen gesteuert, über welche die Expression sowohl positiv als auch negativ moduliert werden kann. Zu diesen Elementen in der 5'-UTR gehören Sekundärstrukturen wie IRES-Sequenzen, stromaufwärts liegende Startkodons sowie interne offene Leserahmen (vgl. Kapitel 1.1.2.3) (Barrett, Fletcher et al. 2012). Auch in der 5'-UTR können sich AREs befinden, die als Erkennungssequenzen für die Interaktion mit RNA-BPs dienen. So ist beispielsweise ein U-reiches Element in der 5'-UTR der p27 mRNA notwendig für die p27 Translation (Millard, Vidal et al. 2000). Dagegen konnten durch Sequenzanalysen keine AREs innerhalb der KSRP 5'-UTR detektiert werden (nicht gezeigt), was die Regulation durch klassische AREs unwahrscheinlich macht (Chen and Shyu 1995). Weitere Eigenschaften der 5'-UTR-Sequenz, welche nachweislich Einfluss auf die Translationseffizienz haben, ist zum einen die Länge der 5'-UTR und zum anderen der GC-Gehalt (vgl. Kapitel 1.1.2.3). Beispielsweise zeigen die drei TGF- β -Isoformen Unterschiede in der Translationsrate, was auf verschieden lange 5'-UTRs

zurückzuführen ist (Allison, Mummy et al. 1998). Lange 5'-UTRs begünstigen die Ausbildung von Sekundärstrukturen, welche wiederum die Translation begünstigen oder inhibieren können. Meist wirken sich dabei stabile Sekundärstrukturen negativ auf die Translationseffizienz aus (Pelletier and Sonenberg 1985). Für die Stärke der Sekundärstrukturen spielt beispielsweise der GC-Gehalt eine maßgebliche Rolle. Ein hoher GC-Gehalt führt zur Ausbildung komplexerer Strukturen und korreliert somit mit einer niedrigeren Translationsrate (Leppek, Das et al. 2017). So wird die verminderte Translation der Ornithin-Decarboxylase auf eine GC-reiche Region in der 5'-UTR zurückgeführt, die eine stabile *stem-loop*-Struktur ausbildet (Manzella and Blackshear 1990). Zusätzlich erschwert ein hoher GC-Gehalt die Fortbewegung des Ribosoms entlang der 5'-UTR bis hin zum Startkodon (Pelletier and Sonenberg 1985). Damit würde der hohe GC-Gehalt der KSRP 5'-UTR (vgl. Abbildung 5.1) allerdings in Kontrast zur erhöhten gemessenen Luciferaseaktivität stehen, die vermutlich auf eine verbesserte Translation zurückzuführen ist (Abbildung 5.7 und Abbildung 5.11). Das könnte sich zum einen durch die Länge der 5'-UTR erklären lassen, die mit 108 bp unter dem Durchschnitt von 210,2 bp liegt (Pesole, Mignone et al. 2001). Somit könnte die eher kurze 5'-UTR-Sequenz die Ausbildung von starken Sekundärstrukturen erschweren. Zum anderen hat die Lage der Haarnadelstrukturen unterschiedliche Auswirkungen auf die Translation. Dabei haben Strukturen, die näher am 5'-Ende der 5'-UTR liegen einen größeren Einfluss auf die Translationseffizienz als Strukturen, die sich weiter stromabwärts und somit näher am Startkodon ausbilden (Zydowicz-Machtel, Swiatkowska et al. 2018). Demnach muss ein hoher GC-Gehalt nicht zwangsläufig mit einer verminderten Translationseffizienz einhergehen. Das ist beispielsweise für das humane α -Synuklein (SNCA) der Fall, einem Protein, welches die Dopaminausschüttung kontrolliert und mit der Pathogenese von Parkinson in Verbindung gebracht wird (Koukouraki and Doxakis 2016). Die Translation von SNCA wird durch die 264 bp lange, GC-reiche (66 %) 5'-UTR begünstigt, statt wie erwartet inhibiert.

Insgesamt gesehen liegt für KSRP die Vermutung nahe, dass Strukturen innerhalb der 5'-UTR lokalisiert sind, über die positiv regulierende Faktoren mit der Sequenz interagieren und die Translation begünstigen. Die Bindung von regulatorischen Proteinen an die 5'-UTR könnte beispielsweise mittels Pulldown und anschließenden MS-Analysen nachgewiesen werden. 5'- und 3'-Deletionen der KSRP 5'-UTR zeigten in Kombination mit dem kurzen 245 bp Promotor eine verringerte Luciferaseaktivität im Vergleich zur gesamten 5'-UTR. Dabei spielte es keine Rolle, welches Ende der Sequenz entfernt wurde (Abbildung 5.10). Diese Unterschiede in der Luciferaseaktivität auf Proteinebene spiegeln sich für die 3'-Deletionen auch auf der Ebene der mRNA-Expression wider (Abbildung 5.11). Allerdings ist die mRNA-Menge nur schwach reduziert (pGI4luc KSRPprom 245 bp 5'-UTR Del1/Del2 vs. pGI4luc KSRPprom 245 bp 5'-UTR), was sich vermutlich auf die ohnehin schon geringeren mRNA-

Expressionsunterschiede zurückführen lässt. Aufgrund dieser Daten kann angenommen werden, dass sowohl am 5'- als auch am 3'-Ende innerhalb der deletierten Abschnitte Elemente lokalisiert sind, welche die Translation begünstigen. Somit wird die KSRP 5'-UTR als Ganzes benötigt, um sich positiv auf die Translation auszuwirken, wie dies z.B. auch für α -Synuklein nachgewiesen wurde (Koukouraki and Doxakis 2016).

6.1.4 SP1 bindet an den 3 kb KSRP Promotor

Der Transkriptionsfaktor SP1 reguliert die Expression einer Vielzahl an Genen und spielt daher eine wichtige Rolle in zellulären Prozessen, wie z.B. der Zelldifferenzierung und der Apoptose (Deniaud, Baguet et al. 2009). Es wurde beschrieben, dass SP1 aufgrund seiner Erkennungssequenz vermehrt an GC-reiche Promotoren bindet und in der Lage ist das TBP zu rekrutieren. Darüber kann die Transkription unabhängig von klassischen Promotorelementen initiiert werden (Smale, Schmidt et al. 1990; Deaton and Bird 2011). Da der KSRP Promotor sehr GC-reich ist und keine klassische TATA-Box aufweist, liegt die transkriptionelle Regulation von KSRP durch SP1 nahe. Eine SP1-Bindung an den 3 kb Promotor konnte mittels Pulldown-Analysen bestätigt werden (Abbildung 5.16). Dagegen zeigt der kurze 245 bp Promotor in Kombination mit der 5'-UTR keine Interaktion mit SP1. Dies lässt vermuten, dass SP1 möglicherweise in die Kontrolle der KSRP-Expression involviert ist, allerdings scheint der TF nicht alleine für die Regulation verantwortlich zu sein. Derzeit gibt es jedoch keine Informationen in der Literatur, die eine SP1-Bindung oder die Bindung anderer Faktoren an den KSRP Promotor beschreiben. Dennoch ist im Allgemeinen bekannt, dass TFs wie Nrf1 und E2F aufgrund ähnlicher Erkennungssequenzen neben SP1 mit CpG-Inseln interagieren (Landolin, Johnson et al. 2010). So wurde beispielsweise eine kooperative Aktivierung der *c-myc*-Expression durch SP1 und E2F beschrieben (Majello, De Luca et al. 1995). Außerdem konnte die direkte Interaktion zwischen den beiden TFs nachgewiesen werden, die essentiell für die Aktivierung verschiedener Promotoren ist (Karlseder, Rotheneder et al. 1996). Somit ist eine Bindung von Nrf1 und E2F an den KSRP Promotor nicht auszuschließen.

An dieser Stelle stehen daher weitere Analysen aus. Um z.B. genauere Aussagen über die Rolle von SP1 für die KSRP Promotoraktivität machen zu können, müsste die exakte Bindestelle definiert und durch Klonierung mutiert werden. Veränderte Luciferaseaktivitäten in Reporter-gen-Assays könnten schließlich Aufschluss darüber geben, inwiefern SP1 die KSRP-Expression reguliert. Des Weiteren könnte SP1 in Zellversuchen herunterreguliert und die potentiell resultierende Änderung der KSRP-Expression analysiert werden. Zusätzlich müssen verschiedene Experimente zur Identifizierung weiterer TFs, die mit dem KSRP Promotor

interagieren, durchgeführt werden. Das wäre beispielsweise für spezifische Faktoren mit Pulldown-Experimenten möglich. Die Analyse aller TFs könnte mittels Massenspektrometrie oder ChIP-Seq erfolgen. Erste Hinweise auf potentiell bindende Proteine gibt die Auswertung bioinformatischer Datensätze, denen häufig ebenfalls ChIP-Seq-Analysen zugrunde liegen. Die Untersuchung der Gensequenz von KSRP im *UCSC Genome Browser* zeigte diesbezüglich eine Reihe an Transkriptionsfaktoren, die der KSRP Promotorsequenz zugeordnet wurden (Anhang, Kapitel 7, Abbildung 7.1). Darunter sind beispielsweise die genannten Proteine SP1, Nrf1 und E2F zu finden. Allerdings ist hierbei zu beachten, dass die Daten überwiegend auf Sequenzanalysen hinsichtlich DNA-Bindemotiven beruhen. Diese werden zwar durch ChIP-Seq-Experimente unterstützt, eine molekularbiologische Untersuchung zur Verifizierung ist dennoch unerlässlich. Die Literatur liefert zum jetzigen Zeitpunkt nur sehr wenige Informationen bezüglich Faktoren, welche die Transkription von KSRP steuern. Lediglich eine negative Regulation auf transkriptioneller Ebene durch BRCA1 konnte nachgewiesen werden (Santarosa, Del Col et al. 2010). In dieser Publikation wurde jedoch ausschließlich eine veränderte KSRP Transkript- und Proteinmenge in BRCA1-defizienten Zellen beschrieben, während eine potentielle direkte Bindung von BRCA1 an den KSRP Promotor nicht untersucht wurde. Weiterhin hat eine herunterregulierte Expression von SMN (*survival of motor neuron protein*) eine verminderte KSRP-Proteinmenge zur Folge. Doch auch diese Studie zeigt keine direkte Interaktion zwischen SMN und dem KSRP Promotor, wodurch eine indirekte Regulation der KSRP-Expression durch SMN nicht auszuschließen ist (Tadesse, Deschênes-Furry et al. 2008). Das wird dadurch unterstützt, dass sich BRCA1 und SMN nicht unter den TFs befinden, die nach den Analysen des *UCSC Genome Browsers* als potentielle Bindeproteine des KSRP Promotors infrage kommen (Anhang, Kapitel 7, Abbildung 7.1). Hier könnte es sich beispielsweise um eine indirekte Regulation handeln, die durch miRNAs vermittelt wird. So hat auch TGF- β einen negativen Einfluss auf die KSRP-Expression, der durch die miRNAs miR-27b-3p und miR-181 umgesetzt wird (Puppo, Bucci et al. 2016). Insgesamt wurden Einflüsse von miRNAs auf die KSRP-Expression jedoch überwiegend auf posttranskriptioneller Ebene beschrieben (vgl. Kapitel 6.1.6).

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass die vorliegenden Untersuchungen bezüglich der transkriptionellen Regulation von KSRP keine definitive Zuordnung des KSRP Promotors in eine der klassischen Gruppen (fokussiert, verteilt und gemischt) zulassen (1.1.1.1). Die Auswertung der GRO-cap-Daten indiziert auf der einen Seite eine eindeutig definierte TSS (Abbildung 5.2). Daher kann vermutet werden, dass es sich bei dem KSRP Promotor um einen fokussierten Promotor handelt (vgl. Kapitel 1.1.1.1), der häufig in niederen Organismen sowie in gewebespezifisch exprimierten Genen vorkommt (Carninci, Sandelin et al. 2006; Juven-Gershon and Kadonaga 2010). Allerdings steht dies in Kontrast zur Expression von KSRP, die nicht auf bestimmte Zelltypen beschränkt ist (Hall, Huang et al. 2004). Aufgrund dessen könnte

der KSRP Promotor der Gruppe der verteilten Promotoren zugeordnet werden, welche die Transkription über mehrere eng beieinander liegende TSS initiieren. Diese treten in 70 % der Vertebratengene auf und exprimieren überwiegend konstitutive Gene, deren Expression weitestgehend konstant ist (Juven-Gershon and Kadonaga 2010). Auch das Vorkommen von CpG-Inseln sowie die Regulation durch SP1 ist charakteristisch für verteilte Promotoren (Kim, Barrera et al. 2005). Eine mögliche Initiation der KSRP-Transkription über mehrere TSS wird durch die Luciferase Aktivitätsmessungen unterstützt, die zeigen, dass mehrere Abschnitte des putativen KSRP Promotors unabhängig voneinander die Expression der Luciferase induzieren (Abbildung 5.3 und Abbildung 5.4). Gerade die Experimente mit den delTSS-Konstrukten sprechen für diese Annahme (Abbildung 5.5). Dennoch könnte der KSRP Promotor letztlich als gemischter Promotor definiert werden, der die Charakteristika beider Typen vereint (Bajic, Tan et al. 2006). Es muss jedoch beachtet werden, dass eine Eingruppierung aufgrund der allgemeinen Komplexität von Promotorstrukturen nicht immer einfach ist und auch anhand von anderen Kriterien erfolgen kann (vgl. Kapitel 1.1.1.1), so dass eine Zuordnung des KSRP Promotors nicht abschließend geklärt werden kann.

6.1.5 Die KSRP 3'-UTR ist für die posttranskriptionelle Regulation der KSRP-Expression von Bedeutung

Für die Regulation der Genexpression spielen posttranskriptionelle Mechanismen eine wichtige Rolle. Dabei kann die mRNA-Stabilität durch die Interaktion von RNA-BPs mit AU-reichen Elementen in der 3'-UTR sowohl positiv als auch negativ beeinflusst werden (Glisovic, Bachorik et al. 2008). KSRP gilt als wichtiger Modulator der Genexpression, der die mRNA-Stabilität verschiedener Zielgene über die Interaktion mit AREs posttranskriptionell reguliert (Briata, Chen et al. 2013). Durch das Vorhandensein von AREs, sowie die nachweisliche Bindung anderer RNA-BPs wie HuR oder TTP an die KSRP 3'-UTR, kann angenommen werden, dass die Kontrolle der mRNA-Expression von KSRP ebenfalls über posttranskriptionelle Mechanismen gesteuert wird (Pullmann, Kim et al. 2007). Im Rahmen dieser Arbeit sollte nun in Zusammenarbeit mit Stefan Hamelmann (Hamelmann 2016) die Bedeutung der KSRP 3'-UTR für die posttranskriptionelle Genexpression mit Hilfe von Luciferase Reporteranalysen genauer untersucht werden.

Durch Sequenzanalysen konnten AU-reiche Elemente aller Klassen in der 3'-UTR identifiziert werden, über welche RNA-BPs mit der KSRP mRNA interagieren können (vgl. Kapitel 1.1.2.1 sowie Abbildung 6.1). Dabei finden sich überwiegend GREs sowie AREs der Klasse III in der KSRP 3'-UTR, wohingegen lediglich ein Klasse I bzw. Klasse II ARE vorhanden ist. Es wurde bereits beschrieben, dass AREs der Klasse II hauptsächlich in der 3'-UTR von Zytokinen zu

finden sind, während Klasse I und III AREs häufig in der Sequenz von Transkriptionsfaktoren sowie zellzyklusregulierenden Proteinen vorkommen (Barreau, Paillard et al. 2005). Das könnte beispielsweise mit der Funktion von KSRP als Transkriptionsfaktor zur Regulation der *c-myc*-Expression sowie der Promotoraktivität von TNF- α in Zusammenhang stehen (vgl. Kapitel 1.2) (Davis-Smyth, Duncan et al. 1996; Li, Lin et al. 2012). Zudem gibt es in der Literatur einige Hinweise darauf, dass KSRP an der Zellproliferation beteiligt ist, weshalb dem Protein eine Rolle in der Entstehung von Lungenkrebs oder Leberkarzinomen zugeschrieben wird (Zubaidah, Tan et al. 2008; Malz, Weber et al. 2009; Bikkavilli, Zerayesus et al. 2017). Um zu definieren, welche AREs der KSRP mRNA potentiell für regulatorische Funktionen verantwortlich sind, wurde die 3'-UTR sowohl vom 5'- als auch vom 3'-Ende her deletiert. Auf diese Weise wurden verschieden lange 3'-UTR-Fragmente generiert, die unterschiedliche regulatorische Elemente enthielten (Abbildung 6.1).

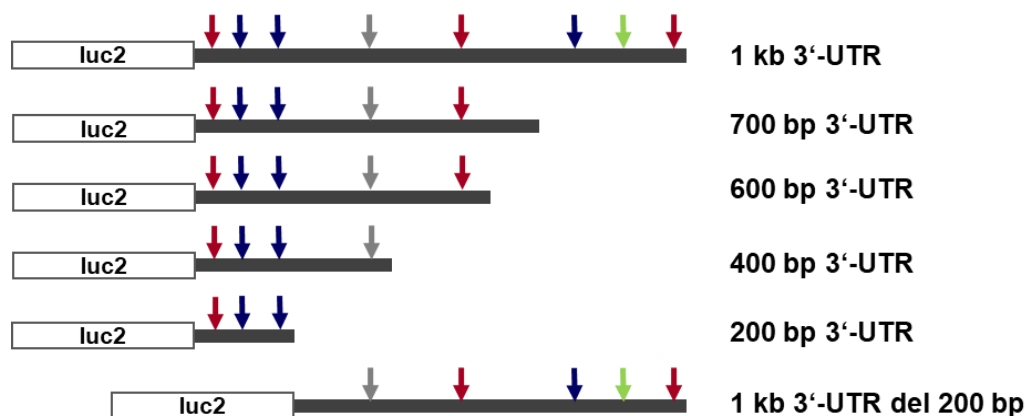


Abbildung 6.1: Schematische Darstellung der analysierten KSRP 3'-UTR-Abschnitte mit der Lokalisation der AREs.

Gezeigt sind die verschiedenen Deletionskonstrukte der KSRP 3'-UTR, die in Luciferase Reporter-Gen-Assays analysiert wurden. Pfeile zeigen die Lokalisation von AREs an. Die verschiedenen Farben symbolisieren unterschiedliche ARE-Klassen: grün: Klasse I ARE, grau: Klasse II ARE, rot: Klasse III ARE, blau: GRE.

Transiente Transfektionen der KSRP 3'-UTR-Plasmide in DLD-1-Zellen zeigten in nachfolgenden Luciferase Reporter-Genanalysen eine reduzierte Luciferaseaktivität, verglichen mit pGI3control transfizierten Zellen. Die niedrigste Expression war dabei unter der Kontrolle des 400 bp 3'-UTR-Fragments zu verzeichnen (Abbildung 5.18). Das lässt einen generellen negativen Einfluss der KSRP 3'-UTR für die posttranskriptionelle Expressionskontrolle vermuten. Der negative Effekt war dagegen nicht vorhanden, wenn nur die kurze 200 bp lange 3'-UTR transfiziert wurde. Dieser Abschnitt beinhaltet drei regulatorische Elemente; ein ARE der Klasse III sowie zwei GREs, die demnach nicht für den negativen Einfluss der 3'-UTR auf die Luciferaseexpression verantwortlich zu sein scheinen. Diese Annahme wird dadurch unterstützt, dass die Deletion der 3'-UTR vom 5'-Ende her (1 kb 3'-UTR del 200 bp) den für die anderen Fragmente beobachteten negativen Effekt auf die Luciferaseaktivität hervorruft. Das lässt zum einen vermuten, dass diese durch Sequenzanalysen identifizierten Elemente

keine funktionelle Bedeutung für die Kontrolle der mRNA-Stabilität haben, zum anderen könnten jedoch auch Faktoren an diese Bereiche binden, die eine stabilisierende Funktion erfüllen. Für GREs sind im Allgemeinen vielfältige Aufgaben bekannt. Über die Interaktion von Proteinen der CELF-Familie mit GREs wird neben der mRNA-Degradation die mRNA-Prozessierung sowie die Translationsinitiation reguliert (Vlasova and Bohjanen 2008). Des Weiteren wird der regulatorische Effekt der KSRP 3'-UTR auf die Luciferaseaktivität vermutlich nicht durch die drei Elemente vermittelt, welche sich in den letzten 300 bp am 3'-Ende der 3'-UTR befinden (ARE Klasse I und III, GRE). Das zeigt sich dadurch, dass die Aktivität auch in den Zellen verringert war, die mit den Deletionskonstrukten 400 bp, 600 bp und 700 bp transfiziert wurden und die somit den Bereich zwischen 700 bp und 1 kb nicht enthielten (Abbildung 5.18). Folglich scheint das ARE der Klasse I in diesem Abschnitt keine regulatorische Bedeutung zu haben, obwohl AREs dieser Klasse bisher als destabilisierende Elemente der mRNA von Zytokinen sowie von *c-myc* beschrieben wurden (Mignone, Gissi et al. 2002). Da die genannten Deletionskonstrukte (400 bp, 600 bp und 700 bp) die Luciferaseaktivität sogar stärker reduzieren als die 1 kb 3'-UTR, besteht hier vielmehr die Möglichkeit, dass über die Elemente, welche sich in diesem Abschnitt der 3'-UTR befinden, stabilisierende RNA-BPs binden können. Dazu zählen z.B. PABP, HuR oder das Polypyrimidin-Trakt Bindeprotein PTB (Wang, Day et al. 1999; Brennan and Steitz* 2001; Pautz, Linker et al. 2006). Systematische Analysen von Pullmann et al. konnten bereits eine Interaktion von HuR und PABP mit der KSRP 3'-UTR zeigen, wobei sich die Depletion von HuR negativ auf die KSRP mRNA-Menge auswirkt (Pullmann, Kim et al. 2007). Dadurch wird die stabilisierende Funktion von HuR unterstützt und es wird vermutet, dass HuR die Translation von KSRP begünstigt (Pullmann, Kim et al. 2007). Weiterhin konnte Julia Art mit Hilfe von UV-Crosslink-Analysen die Bindung von HuR an die KSRP 3'-UTR bestätigen und zusätzlich die Interaktion mit PABP nachweisen (Art 2012). Solche Proteine, die stabilisierende Funktionen einnehmen, könnten ebenfalls an das AU-reiche Element in der Mitte der KSRP 3'-UTR im Bereich zwischen 400 und 600 bp binden (Abbildung 6.1, rot, Klasse III ARE). Die beobachtete Luciferaseaktivität unter der Kontrolle der Fragmente 600 bp und 700 bp, welche dieses ARE beinhalten, war erhöht gegenüber dem 400 bp-Fragment. Klasse III AREs in der *c-Jun* 3'-UTR wurden bereits als Sequenzelemente beschrieben, welche die Proteinexpression erhöhen (Barreau, Watrin et al. 2006). Dagegen bewirkt das Vorhandensein eines AREs der Klasse II, das häufig in Zytokinen für die Destabilisierung der mRNA verantwortlich ist, eine Reduktion der Expression (Xu, Chen et al. 1997; Barreau, Watrin et al. 2006). Das stimmt mit den hier beobachteten Daten überein, nach denen das Klasse II ARE (Abbildung 6.1, grau) für die Reduktion der Luciferaseaktivität verantwortlich zu sein scheint. Das Element ist in allen untersuchten Konstrukten vorhanden, außer im 200 bp 3'-UTR-Konstrukt, in welchem der negative regulatorische Effekt aufgehoben wurde (Abbildung 5.18).

Dieses ARE könnte demnach eine Zielsequenz für RNA-BPs darstellen, welche die mRNA destabilisieren. Dazu zählen beispielsweise AUF1 oder KSRP selbst. Die Bindung von KSRP an die eigene 3'-UTR wurde bereits in der Studie von Pullmann et al. nachgewiesen (Pullmann, Kim et al. 2007). Auch die Interaktion von AUF1 mit der KSRP 3'-UTR konnte bereits in früheren Analysen der AG Kleinert bestätigt werden (Art 2012). Stefan Hamelmann konnte im Rahmen einer Masterarbeit diesbezüglich spezifizieren, dass es sich um die Isoformen p40 und p42 handelt, welche an die 3'-UTR binden (Hamelmann 2016). Allerdings wurde dabei gezeigt, dass nur die Isoform p42 mit allen untersuchten 3'-UTR-Fragmenten interagiert, während die Isoform p40 an die 600 bp, 700 bp und 1 kb 3'-UTR-Fragmente bindet. Demnach scheint die Isoform p40 nicht an das ARE der Klasse II im Bereich zwischen 200 und 400 bp zu binden und für den starken negativen Effekt auf die Luciferaseaktivität verantwortlich zu sein. RNA-BPs, die mit der KSRP 3'-UTR interagieren werden im folgenden Kapitel genauer untersucht.

6.1.6 Verschiedene RNA-Bindeproteine interagieren mit der KSRP 3'-UTR

Die zuvor diskutierten Daten zeigen, dass die KSRP 3'-UTR eine destabilisierende Wirkung auf die mRNA hat. Ein solcher Abbau der Transkripte wird zumeist durch RNA-BPs oder miRNAs bewerkstelligt, die mit AREs in der 3'-UTR interagieren. Neben der bereits nachgewiesenen Bindung von HuR und TTP an die KSRP 3'-UTR (Pullmann, Kim et al. 2007) interagiert auch KSRP selbst mit der eigenen 3'-UTR, was durch Pulldown-Analysen mit den in Kapitel 6.1.5 beschriebenen 3'-UTR-Fragmenten gezeigt wurde (Abbildung 5.19). Dabei konnte eine Bindung an die Fragmente 600 bp, 700 bp und 1 kb sowie 1 kb del 200 bp nachgewiesen werden, während das Protein im Bereich der ersten 400 bp nicht bindet. Demnach liegt die vermutete Bindesequenz im mittleren Abschnitt der 3'-UTR zwischen 400 und 600 bp, wodurch eine Interaktion mit dem ARE der Klasse III möglich ist. Aufgrund der vergleichsweise geringen Sequenzspezifität von KSRP gegenüber Ziel-mRNAs, die aus der Flexibilität in der RNA-Affinität der vier KH-Domänen resultiert (vgl. Kapitel 1.2.1), ist das Vorhandensein eines AREs für die Bindung jedoch nicht zwingend erforderlich. Die KH-Domäne 3 bindet allgemein mit hoher Affinität an G-reiche mRNAs, während die anderen Domänen verschiedene Sequenzen präferieren (García-Mayoral, Díaz-Moreno et al. 2008). Hollingworth et al. konnten nachweisen, dass dagegen keine der KH-Domänen eine hohe Spezifität gegenüber AU-reichen Elementen zeigt (Hollingworth, Candel et al. 2012). Beispielsweise interagiert KSRP mit der 3'-UTR des Typ III Interferon IFN- λ 3 unabhängig von den zuvor identifizierten AREs, was durch Analysen von Lisa Schmidtke (AG Pautz) bestätigt werden konnte. Daher muss die genaue Zielsequenz von KSRP in der eigenen mRNA nicht zwingend ein ARE sein und bleibt weiterhin zu identifizieren. Hierfür müssen weitere

Deletionskonstrukte generiert und in Pulldown-Analysen hinsichtlich der KSRP-Bindung untersucht werden. Des Weiteren kann überprüft werden, ob die KSRP-Bindung durch die Mutation des AREs in diesem Bereich inhibiert wird.

Durch die generelle Interaktion von KSRP mit der eigenen 3'-UTR, ist eine Autoregulation der KSRP-Expression auf posttranskriptioneller Ebene denkbar, welche die mRNA-Menge negativ beeinflusst. Diese Annahme wird durch die Studie von Winzen et al. unterstützt, in der die KSRP mRNA bereits als Zielsequenz von KSRP selbst identifiziert werden konnte (Winzen, Thakur et al. 2007). Eine solche RNA-vermittelte Autoregulation konnte schon für weitere Proteine gezeigt werden, die in den RNA-Metabolismus involviert sind. So reguliert etwa TTP die eigene Expression über die mRNA-Stabilität (Tchen, Brook et al. 2004). Dennoch scheint KSRP nicht alleine für den negativen regulatorischen Effekt verantwortlich zu sein, da in Reporteranalysen die stärkste Reduktion der Luciferaseaktivität unter der Kontrolle der 400 bp 3'-UTR detektiert werden konnte, an die KSRP nicht bindet (Abbildung 5.18 und Abbildung 5.19). Das spricht dafür, dass die Regulation der KSRP-Expression durch das Zusammenwirken verschiedener RNA-BPs vermittelt wird. Ein solches Zusammenspiel mehrerer RNA-BPs wurde bereits beschrieben, wobei die Proteine sich einerseits in ihrer Funktion unterstützen, andererseits jedoch auch um eine Bindestelle konkurrieren können. Beispielsweise binden HuR und AUF1 sowohl an unterschiedliche als auch an die selben AREs innerhalb einer 3'-UTR-Sequenz (Lal, Mazan-Mamczarz et al. 2004). Auch für HuR und KSRP selbst wurde eine Konkurrenz um eine Bindestelle in der iNOS 3'-UTR nachgewiesen sowie eine Interaktion zwischen KSRP und TTP bestätigt (Linker, Pautz et al. 2005). Somit liegt die Vermutung nahe, dass HuR auch hier an die selbe Sequenz in der KSRP 3'-UTR bindet wie KSRP (zwischen 400 und 600 bp). Durch die stabilisierenden Effekte von HuR auf Ziel-mRNAs könnte womöglich die durch das 600 bp 3'-UTR-Plasmid verursachte erhöhte Luciferaseaktivität gegenüber dem 400 bp 3'-UTR-Plasmid erklärt werden (Abbildung 5.18). Die tatsächliche Bindung von HuR im genannten Abschnitt bleibt jedoch zu bestätigen.

Anhand von Pulldown-Experimenten und anschließenden massenspektrometrische Analysen konnten weitere RNA-BPs identifiziert werden, die mit der 1 kb langen KSRP 3'-UTR interagieren (Tabelle 5.2). Dabei bestätigte sich die Bindung von bereits genannten Proteinen, wie PABP, HuR und KSRP. PABP bindet mit einer hohen Affinität an die KSRP 3'-UTR, wobei sowohl nukleäre (PABP N1) als auch zytoplasmatische Formen (PABP C1 und C3) detektiert wurden. Das unterstützt frühere Daten von Julia Art, die eine Interaktion zwischen PABP und der KSRP 3'-UTR mittels UV-Crosslink nachweisen konnte (Art 2012). Ähnlich KSRP erfüllt PABP vielfältige Funktionen bezüglich der Expressionskontrolle, was durch die vergleichsweise unspezifische Bindung an den Poly-A-Schwanz von mRNAs bewerkstelligt wird. Unter anderem reguliert das Protein die Translatierbarkeit sowie die mRNA-Stabilität,

wobei es durch die Interaktion mit mRNA-Stabilitätskomplexen vorwiegend stabilisierend wirkt (Wang, Day et al. 1999). Da das für die Pulldown-Analysen verwendete 3'-UTR-Fragment keinen Poly-A-Schwanz enthält, ist anzunehmen, dass PABP unspezifisch an die KSRP 3'-UTR-Sequenz bindet; möglicherweise auch unabhängig eines AREs an Adenin-reiche Sequenzabschnitte. Ähnliches wurde beispielsweise für die Interaktion von PABP mit der iNOS 3'-UTR beschrieben (Casper, Nowag et al. 2013). Weiterhin wurde die Bindung von Proteinen der hnRNP-Familie detektiert, welcher auch AUF1 angehört (hnRNPD). Dass AUF1 selbst nicht identifiziert wurde, steht in Kontrast zu Analysen von Julia Art und Stefan Hamelmann, die UV-Crosslink- bzw. Pulldown-Analysen mit anschließendem Western Blot durchführten und eine Bindung der AUF1-Isoformen p40 und p42 nachweisen konnten (Art 2012; Hamelmann 2016). Dabei interagiert die Isoform p42 mit allen untersuchten 3'-UTR-Fragmenten, während p40 an die 600 bp, 700 bp und 1 kb 3'-UTR bindet (Hamelmann 2016). Hier muss jedoch beachtet werden, dass es sich bei den Ergebnissen der Massenspektrometrie um präliminäre Daten handelt, die durch weitere Analysen verifiziert werden müssen. Das könnte die Unterschiede zwischen den Pulldown-Analysen und den hier vorliegenden MS-Daten erklären.

Interessant ist, dass neben KSRP selbst auch die weiteren FUSE-Bindeproteine FBP1 und 3 als Interaktionspartner der KSRP 3'-UTR identifiziert wurden (Tabelle 5.2). Umgekehrt wurde die FBP3 mRNA als Zielsequenz von KSRP beschrieben (Winzen, Thakur et al. 2007), was vermuten lässt, dass sich die Mitglieder der FBP-Familie in ihrer Expression gegenseitig regulieren. Sequenzanalysen zeigten, dass die FBPs innerhalb ihrer DNA/RNA-Bindedomänen hochgradig konserviert sind (Davis-Smyth, Duncan et al. 1996). Ähnlich wie KSRP stellen auch FBP1 und 3 multifunktionelle Proteine dar, die eine Vielzahl an Genen regulieren. Dabei überschneiden sich sowohl die Funktionen als auch die Zielgene, deren Expression beeinflusst wird (Chung, Liu et al. 2006). In KSRP-defizienten Zellen sowie in KSRP-ko Mäusen konnte eine erhöhte mRNA-Expression von FBP1 gemessen werden, was auf eine FBP1-Regulation durch KSRP hindeutet (Daten nicht gezeigt). Eine solche Abhängigkeit der FBP1-Expression von KSRP wurde bereits durch Malz et al. beschrieben (Malz, Weber et al. 2009). Das unterstützt die Annahme, dass KSRP umgekehrt auch von FBP1 reguliert wird. Die FBP3-Expression bleibt dagegen unbeeinflusst durch den *Knockout* von KSRP (Daten nicht gezeigt) (Malz, Weber et al. 2009).

Eine Gemeinsamkeit vieler der in den MS-Analysen identifizierten Proteine stellt das Vorkommen von KH-Domänen dar. So weist das durch Östrogen induzierbare RNA-BP Vigilin 14 KH-Domänen auf, über welche die Bindung an Erkennungssequenzen in der RNA erfolgt (Kanamori, Dodson et al. 1998). KHDRBS1 (SAM68) sowie die Poly(rC)-Bindeproteine binden ebenfalls über KH-Domänen an Ziel-mRNAs und erfüllen auf diese Weise verschiedene

Funktionen in der Expressionsregulation (Sánchez-Jiménez and Sánchez-Margalet 2013; Hwang, Wagley et al. 2017). Die Sequenz des Poly(rC)-Bindepotein 1 enthält drei KH-Domänen des Typ I, worüber das Protein überwiegend stabilisierende Funktionen erfüllt (Hwang, Wagley et al. 2017).

Die massenspektrometrischen Analysen zeigen, dass eine Vielzahl an regulatorischen Proteinen mit der KSRP 3'-UTR interagieren und womöglich in die posttranskriptionelle Regulation der KSRP-Expression eingreifen. Unter den Interaktionspartnern der KSRP 3'-UTR finden sich sowohl stabilisierende (z.B. HuR, PABP, Poly(rC)-Bindepotein) als auch destabilisierende Proteine (FBP1 – 3). Somit besteht die Möglichkeit, dass sich diese verschiedenen RNA-BPs in ihrer Funktion beeinflussen oder unterstützen, wodurch sich die unterschiedlichen Effekte der KSRP 3'-UTR-Fragmente auf die Luciferaseaktivität erklären lassen. Um dies zu verifizieren und eine tatsächliche Regulation zu überprüfen, müssen allerdings noch weiterführende Experimente folgen. Die Analyse der mRNA-Expression von KSRP in entsprechenden *Knockout*-Zellen sowie die Mutation verschiedener AREs in der 3'-UTR, gefolgt von weiteren Pulldown- und massenspektrometrischen Untersuchungen, könnten die Regulation von KSRP genauer charakterisieren. Dabei können zudem die Sequenzen identifiziert werden, an denen die jeweiligen Proteine binden, um Aufschluss über mögliche in Konkurrenz stehende Proteine zu erhalten. Außerdem müssten die hier gezeigten MS-Analysen wiederholt werden, um eine statistische Auswertung der Daten gewährleisten zu können.

Anhand der vorliegenden Daten konnte bestätigt werden, dass KSRP posttranskriptionell über die 3'-UTR reguliert wird. Allerdings wurde in den Experimenten der Fokus auf die Regulation durch RNA-BPs gelegt, wobei die Expressionskontrolle durch miRNAs außer Acht gelassen wurde. In der Literatur liegen diesbezüglich einige Untersuchungen vor. Beispielsweise hat die miR-206 einen negativen Effekt auf die KSRP-Expression (Amirouche, Tadesse et al. 2014), was über die direkte Bindung der miRNA an konservierte Elemente in der KSRP 3'-UTR umgesetzt wird. Auch TGF- β hat einen negativen Einfluss auf die KSRP-Expression, welcher indirekt über die Aktivierung der miRNAs miR-27b-3p und miR-181 vermittelt wird (Puppo, Bucci et al. 2016). Diese negative Regulation von KSRP hat wiederum die verminderte Reifung der miR-192-5p zur Folge und führt zu zellulären Genexpressionsänderungen, die mit der Umwandlung von Epithelzellen zu Mesenchymzellen einhergehen (*epithelial-mesenchymal transition*, EMT). Des Weiteren wird die KSRP-Expression durch die miR-27 vermindert, was zu Veränderungen der iNOS mRNA-Stabilität führt (Zhou, Gong et al. 2012). Außerdem wurde durch Jiang et al. beschrieben, dass die KSRP mRNA ein direktes Zielgen der miR-185 darstellt (Jiang, Zhang et al. 2015). Dabei interagiert die miRNA mit der 3'-UTR von KSRP und bewirkt eine Reduktion der KSRP mRNA-Menge. Somit wird deutlich, dass sich die Bindung

von miRNAs an die KSRP 3'-UTR überwiegend negativ auf die Transkriptmenge auswirkt, während RNA-BPs die KSRP-Expression sowohl positiv als auch negativ modulieren können. Das Zusammenspiel aus RNA-BPs und miRNAs bildet letztendlich ein weitläufiges Netzwerk an regulatorischen Faktoren, die gegenseitigen Einfluss nehmen und deren Funktion durch verschiedene Stimuli verändert werden kann. Dadurch zeigt sich die Komplexität posttranskriptioneller Regulationsmechanismen.

6.1.7 Untersuchung der potentiellen Autoregulation von KSRP

Die Autoregulation stellt einen mehrfach beschriebenen Mechanismus dar, über den die Expression von RNA-BPs moduliert wird. Dabei kann die Regulation sowohl durch die Interaktion mit der 5'-UTR als auch mit der 3'-UTR erfolgen. So kann beispielsweise die Bindung von PABP an die eigene 5'-UTR eine verminderte Translation oder den Abbau der PABP mRNA hervorrufen (Hornstein, Harel et al. 1999). Auch TTP hat einen negativen Einfluss auf die eigene mRNA-Stabilität (Tchen, Brook et al. 2004). Hinweise dafür, dass KSRP die eigene Expression moduliert, liefern Analysen von Lisa Schmidtke (AG Pautz, unveröffentlicht), nach denen die endogene KSRP mRNA in KSRP-überexprimierenden Zellen verstärkt abgebaut wird. Gegenläufige Daten von Julia Art zeigen eine erhöhte endogene KSRP mRNA-Menge in überexprimierenden Chondrozyten (Art 2012). Daher wird in den folgenden Kapiteln die Rolle von KSRP für die eigene Expression genauer untersucht.

6.1.7.1 Die potentielle Autoregulation von KSRP wird nicht über die 3'-UTR vermittelt

Durch den Nachweis der Bindung von KSRP an die eigene 3'-UTR scheint eine Autoregulation auf posttranskriptioneller Ebene denkbar (Abbildung 5.19). Reporteranalysen mit verschiedenen KSRP 3'-UTR-Konstrukten in Zellen mit veränderter KSRP-Expression zeigten allerdings keinen Unterschied in der Luciferaseaktivität, verglichen mit den Kontrollzellen. Dabei zog weder die Depletion von KSRP (Abbildung 5.22) noch dessen Überexpression (Abbildung 5.23) einen regulatorischen Effekt auf die Luciferaseexpression nach sich. Das lässt darauf schließen, dass die potentielle Autoregulation nicht ausschließlich durch die Bindung an die 3'-UTR vermittelt wird. Möglicherweise werden weitere Strukturen, wie z.B. die 5'-UTR benötigt, um einen regulatorischen Effekt auf die Luciferaseaktivität zu erzielen. Ähnliches wurde etwa für das RNA-BP PABP beschrieben, das sowohl mit der 3'-UTR als auch mit der 5'-UTR der iNOS mRNA interagiert, wobei ausschließlich die Bindung an die 5'-UTR eine Stabilisierung der iNOS mRNA zur Folge hat (Casper, Nowag et al. 2013). Weiterhin ist es sehr wahrscheinlich, dass KSRP nicht alleine für die eigene

posttranskriptionelle Regulation verantwortlich ist, was durch die vorherigen Analysen unterstützt wird (Kapitel 6.1.5 und 6.1.6). Durch die Interaktion weiterer RNA-BPs mit der KSRP 3'-UTR ist es denkbar, dass mehrere der regulatorischen Proteine in einem Netzwerk zusammenwirken und sich in ihrer Funktion gegenseitig beeinflussen oder unterstützen. Der *Knockout* eines RNA-BPs könnte demnach Effekte nach sich ziehen, welche die Expression der anderen Proteine des Netzwerks verändern, wodurch die Funktionen eines einzelnen Proteins schwer zu erfassen sind. So führt etwa die Depletion von HuR zur Reduktion der KSRP mRNA (Pullmann, Kim et al. 2007). Dementsprechend könnte beispielsweise die Expressionserhöhung von FBP1 als Folge der KSRP-Depletion eine Ursache für die ausbleibenden Effekte auf die Luciferaseaktivität darstellen (Abbildung 5.22 und Abbildung 5.23, FBP1-Daten nicht gezeigt). Um zu verifizieren, ob FBP1 womöglich Funktionen von KSRP hinsichtlich der KSRP-Autoregulation übernimmt, müssen entsprechende Doppel-*Knockout*-Zellen generiert werden, die weder KSRP noch FBP1 exprimieren. Durch Luciferase Reporteranalysen mit den KSRP 3'-UTR-Plasmiden könnten schließlich weitere Einblicke in die Eigenregulation der KSRP-Expression erhalten werden.

6.1.7.2 Die KSRP-Eigenregulation erfolgt posttranskriptionell über die 5'-UTR

Neben der 3'-UTR spielt auch die 5'-UTR für posttranskriptionelle Regulationsmechanismen eine maßgebliche Rolle. Dabei ist die Kontrolle der Translationseffizienz von besonderer Bedeutung (Mignone, Gissi et al. 2002). Die Funktion der KSRP 5'-UTR für die Regulation der KSRP-Expression wurde mit Hilfe eines Reportergenkonstruktes untersucht, welches den kurzen 245 bp KSRP Promoter und die 5'-UTR vor der Luciferasesequenz enthält sowie die 3'-UTR stromabwärts der Luciferase (Minigen). Transiente Transfektionen dieses Minigens in DLD-1-Zellen zeigten den erwarteten negativen regulatorischen Effekt der KSRP 3'-UTR, im Vergleich zu Zellen, die lediglich mit einem Promotorplasmid transfiziert wurden (Abbildung 5.24). In Experimenten mit CRISPR/Cas9-Zellen mit ausgeschalteter KSRP-Expression führte die Transfektion der Minigen-Plasmide zu einem KSRP-abhängigen Effekt auf die Luciferaseaktivität (Abbildung 5.25). Dabei war in KSRP-defizienten Zellen die Aktivität signifikant erhöht gegenüber gleich behandelten Kontrollzellen, was vermuten lässt, dass KSRP die eigene Expression negativ reguliert. Diese Annahme steht in Einklang mit unveröffentlichten Daten von Lisa Schmidtke (AG Pautz), nach welchen die Überexpression von KSRP die Halbwertszeit der KSRP mRNA reduziert. Da die Transfektion eines KSRP Promotorplasmids ohne 5'-UTR keine Unterschiede in der Luciferaseaktivität zwischen *Knockout*-Zellen und Kontrollzellen hervorgerufen hat (Abbildung 5.26), lässt sich an dieser Stelle postulieren, dass der Effekt vermutlich nicht durch transkriptionelle Mechanismen bedingt ist und dass die KSRP 5'-UTR für die posttranskriptionelle Regulation eine

entscheidende Rolle spielt. Diese Annahme konnte durch Analysen der Luciferase mRNA-Menge nach transienter Transfektion des pGI4lucKSRPprom 245 bp 5'-UTR in CRISPR/Cas9-Zellen bestätigt werden. Die Luciferaseaktivität war in KSRP-defizienten Zellen signifikant erhöht gegenüber den Kontrollzellen (Abbildung 5.27, A), während dieser Unterschied auf Ebene der mRNA-Expression aufgehoben war (Abbildung 5.27, B). Somit scheint die KSRP 5'-UTR, für die eine Funktion als translationaler *Enhancer* vermutet wird (Kapitel 5.1.4.4 und 6.1.3), der Angriffspunkt für die negative Autoregulation von KSRP zu sein. Pulldown-Experimente zeigten allerdings keine Bindung von KSRP an die *in vitro* transkribierte 5'-UTR-Sequenz (Daten nicht gezeigt), weshalb eine direkte Autoregulation der KSRP-Expression über die 5'-UTR ausgeschlossen werden kann. Allerdings wäre hier eine Regulation über indirekte Mechanismen denkbar. Um Hinweise darüber zu erhalten, welche Proteine für die nachgewiesenen Effekte verantwortlich sind und durch KSRP reguliert werden, könnten beispielsweise Pulldown-Assays mit anschließenden massenspektrometrischen Analysen durchgeführt werden. Die Expression identifizierter Proteine könnte schließlich in Abhängigkeit von KSRP gemessen werden. Außerdem könnten für ausgewählte Proteine entsprechende *Knockout*-Zellen generiert und die Einflüsse auf die Expression eines Reportergens unter der Kontrolle der KSRP 5'-UTR in Luciferase-Assays untersucht werden.

Da der Effekt auf die Luciferaseexpression somit völlig unabhängig von der KSRP 3'-UTR beobachtet werden konnte (Abbildung 5.27, A), bleibt die Interaktion von KSRP mit der eigenen 3'-UTR letztlich ohne Effekt für die posttranskriptionelle Expressionsregulation. Ähnliches konnte für die Bindung von PABP an die iNOS mRNA beobachtet werden (Casper, Nowag et al. 2013). HuR bewirkt ebenfalls nicht nur die Stabilisierung von Ziel-mRNAs über die Bindung an AREs in der 3'-UTR, vielmehr kann das Protein auch die Translationseffizienz erhöhen. Es wurde beschrieben, dass HuR mit der 5'-UTR von HIF-1 α (*hypoxia inducible factor 1 α*) interagiert und dadurch translationale Prozesse verstärkt (Galbán, Kuwano et al. 2008). Das zeigt, dass RNA-BPs vielfältige Funktionen erfüllen können, die nicht ausschließlich die Regulation der mRNA-Stabilität über AREs in der 3'-UTR betreffen.

Damit lässt sich zusammenfassen, dass KSRP auf posttranskriptioneller Ebene in die eigene Regulation eingreift, wobei die UTR-Sequenzen, insbesondere die 5'-UTR, eine Rolle zu spielen scheinen. Die nachweisliche Bindung von KSRP an die 3'-UTR bleibt dabei ohne Effekt für die Expression (Abbildung 5.22 und Abbildung 5.23). Dagegen scheint die 5'-UTR einen positiven Faktor für die Autoregulation von KSRP darzustellen (Abbildung 5.27), obwohl keine direkte Bindung von KSRP an die eigene 5'-UTR nachgewiesen werden konnte (Daten nicht gezeigt). Mögliche indirekte Regulationsmechanismen, die dabei von Bedeutung sind, bleiben weiterhin zu untersuchen.

6.1.8 Das KSRP Protein weist eine hohe Proteinstabilität auf

KSRP reguliert die mRNA-Stabilität von überwiegend kurzlebigen Transkripten, wie proinflammatorischen Mediatoren, deren Expression einer strengen Kontrolle unterstehen muss (Linker, Pautz et al. 2005). Dagegen ist die KSRP mRNA selbst vergleichsweise stabil. Lisa Schmidtke konnte im Rahmen ihrer Masterarbeit mit Hilfe von DRB-Experimenten in DLD-1-Zellen zeigen, dass nach 24 Stunden keinerlei Unterschiede in der mRNA-Menge zu verzeichnen waren, während beispielsweise die iNOS mRNA bereits nach vier Stunden zur Hälfte abgebaut war (Schmidtke 2014). Auch das KSRP Protein weist eine hohe Stabilität auf, was durch die Behandlung mit Cycloheximid nachgewiesen werden konnte (Abbildung 5.28). Erst nach 48 Stunden war eine verringerte Proteinmenge in unbehandelten DLD-1-Zellen zu verzeichnen, wobei zu diesem Zeitpunkt in Zellen, die mit einem Zytokinmix (TNF- α , IL-1 β und IFN- γ , siehe Kapitel 4.1.4) stimuliert wurden, kein Protein mehr detektiert werden konnte. Somit beginnt der Abbau des KSRP Proteins zwischen 24 und 48 Stunden. Die schwächeren KSRP-Signale in stimulierten Zellen, im Vergleich zu unstimulierten Zellen, lassen sich womöglich durch die erhöhten Stressfaktoren, ausgelöst durch die induzierte Expression proinflammatorischer Mediatoren erklären, denen die Zellen durch die Stimulation ausgesetzt sind.

Die Proteinstabilität wird in der Zelle durch mehrere Faktoren beeinflusst. Dabei spielen pH- oder Temperaturänderungen sowie Wechselwirkungen der Aminosäuren untereinander eine große Rolle. Das Vorkommen von Disulfidbrücken zwischen Cysteinresten trägt beispielsweise erheblich zur Stabilisierung bei (Trivedi, Laurence et al. 2009). Aber auch durch posttranslationale Modifikationen sowie die Interaktion von Proteinen untereinander kann die Stabilität von Proteinen verändert werden. So wird das TTP-Protein durch eine p38-MAPK-vermittelte Phosphorylierung vor der Degradation durch das 20S/26S-Proteasom geschützt (Brook, Tchen et al. 2006). Die Stabilität von SP1 wird durch die Interaktion mit dem Hitzeschockprotein 90 (Hsp90) erhöht (Wang, Chuang et al. 2009). Die hohe Stabilität des KSRP Proteins lässt sich anhand verschiedener Eigenschaften erklären, die in einer Studie von Patrick et al. beschrieben wurden und die bezeichnend für stabile bzw. instabile Proteine sind (Yen, Xu et al. 2008; Patrick, Cao et al. 2012). Dazu zählen posttranslationale Modifikationen, charakteristische Proteindomänen, spezifische N-terminale Aminosäuren sowie die Aminosäuresequenz im Allgemeinen. Von den analysierten stabilen Proteinen lagen 72 % phosphoryliert und 36 % acetyliert vor, während diese Modifikationen bei instabilen Proteinen weitaus seltener detektiert wurden (30 % und 4 %). Dagegen zeigen instabile Proteine häufiger Glykosylierungen. Da es sich bei den posttranslationalen Modifikationen, welche die KSRP-Aktivität beeinflussen, hauptsächlich um Phosphorylierungen handelt (vgl. Kapitel 1.2.2), kann KSRP anhand dieses Kriteriums in die Gruppe der stabilen Proteine

eingeorndet werden. Auch das Vorkommen von RNA-Bindedomänen wurde als charakteristisch für stabile Proteine beschrieben (Patrick, Cao et al. 2012). Außerdem gibt es eine Reihe von N-terminalen Aminosäuren, die sich in den meisten Fällen destabilisierend auf Proteine auswirken (Varshavsky 1997). Die letzte Aminosäure des KSRP Proteins ist die Asparaginsäure (*Accession Number*: AAH85004.1, NCBI), welche nicht den beschriebenen destabilisierenden Aminosäuren angehört (Patrick, Cao et al. 2012).

Durch die hohe Stabilität der KSRP mRNA und des Proteins wird die Untersuchung der Expressionsregulation deutlich erschwert. Da die KSRP-Expression relativ konstant bleibt, sind leichte Unterschiede in der Expression, die durch z.B. die Zugabe von Substanzen erzeugt werden, nur schwer zu detektieren. Gerade Experimente in Zellen, die KSRP normal exprimieren, müssen unter Umständen über einen längeren Zeitraum erfolgen, bis Unterschiede in der Expression zu erkennen sind. Das muss vor allem für die Regulation von KSRP zur potentiellen Therapie von Erkrankungen berücksichtigt werden.

6.2 Analyse der Rolle von KSRP in chronisch entzündlichen Erkrankungen

Für den korrekten Ablauf der Immunantwort spielt die kontrollierte Expression von pro-inflammatorischen Genen wie Zytokinen, Chemokinen oder inflammatorischen Enzymen eine Schlüsselrolle. Im Falle einer erforderlichen Immunreaktion wird die Expression dieser Gene kurzzeitig hochreguliert, muss allerdings nach gegebener Zeit wieder unterdrückt werden. In der Entwicklung chronisch entzündlicher Erkrankungen wie der Rheumatoiden Arthritis (RA) ist diese Regulation fehlgesteuert, was mit einer pathologischen Expressionserhöhung der Gene einhergeht (Voulgari and Drosos 2008). Für die Kontrolle der pro-inflammatorischen Genexpression sind überwiegend posttranskriptionelle Mechanismen, wie z.B. die Regulation der mRNA-Stabilität von Bedeutung, die meist über die Bindung von RNA-BPs oder miRNAs an AU-reiche Elemente in der 3'-UTR erfolgt. Daher sind einige dieser Proteine, wie z.B. TTP (Taylor, Carballo et al. 1996) oder AUF1 (Lu, Sadri et al. 2006) in die Pathogenese von chronischen Inflammationskrankheiten involviert. Auch KSRP gilt als wichtiger negativer Modulator der mRNA-Stabilität von pro-inflammatorischen Zytokinen (King and Chen 2014). Sowohl in humanen KSRP-defizienten Zellen als auch in *ex vivo* mit $\text{mLFN-}\gamma$ und LPS stimulierten Peritonealzellen, isoliert aus KSRP-*Knockout* (KSRP-ko) Mäusen ist dementsprechend die Expression von TNF- α , IL-8/CXCL-1 und iNOS erhöht, verglichen mit den jeweiligen Kontrollen (Linker, Pautz et al. 2005; Bollmann, Art et al. 2014). Diese *in vitro* Daten, die einem Modell für eine akute Inflammation entsprechen, lassen vermuten, dass auch KSRP in chronischen Inflammationserkrankungen für die Regulation der pro-inflammatorischen Genexpression von Bedeutung ist.

Im Rahmen dieser Arbeit sollte daher die Relevanz von KSRP für die Pathogenese der RA untersucht und mögliche Prozesse identifiziert werden, in denen KSRP regulatorische Funktionen einnimmt. Hierfür wurde in KSRP-defizienten Mäusen eine Arthritis ausgelöst, und die Effekte des KSRP-*Knockouts* sowohl auf molekularer als auch auf immunologischer Ebene analysiert.

6.2.1 Die Induktion einer CAIA in KSRP-ko Mäusen führt zu einer abgeschwächten Symptomatik der Arthritis

Die für die Experimente verwendeten KSRP-ko Mäuse haben einen C57BL/6-Hintergrund (Lin, Zheng et al. 2011). Da C57BL/6-Mäuse weitestgehend resistent gegen die Induktion einer Kollagen Typ II-induzierten Arthritis (CIA) sind (Pan, Kang et al. 2004; Inglis, Criado et al. 2007), dem am besten charakterisierten Mausmodell zur Untersuchung der RA, wurde das Modell der Kollagen-Antikörper-induzierten Arthritis verwendet (CAIA) (siehe Kapitel 1.3.5).

Der Vorteil der CAIA ist, dass die Entwicklung der Arthritis unabhängig vom genetischen Hintergrund verläuft (Kapitel 1.3.5) (Nandakumar, Svensson et al. 2003). So kann in Mäusen eine Arthritis ausgelöst werden, die in der Symptomatik der humanen RA ähnelt (Nandakumar, Svensson et al. 2003). Zur Beurteilung des Schweregrades der Erkrankung wurde nach der CAIA-Induktion in KSRP-Mäusen der Arthritisindex dokumentiert. Entgegen den Erwartungen war dieser in den Antikörper-behandelten KSRP-ko Tieren deutlich geringer als in den Kontrollmäusen (Abbildung 5.31). Dabei war zum einen die Ausprägung der Symptome abgeschwächt und zum anderen der Zeitpunkt verzögert, an welchem die ersten Schwellungen visuell erfasst werden konnten. Diese Beobachtung wurde auf molekularer Ebene unterstützt durch die verminderte pro-inflammatorische Genexpression von CXCL-1, iNOS und TNF- α in Gelenken CAIA-behandelter KSRP-ko Mäuse im Vergleich zu den Wildtyp-Tieren (KSRP-wt) (Abbildung 5.32). In den KSRP-wt Mäusen führte die Behandlung mit dem Antikörpermix zu einem signifikanten Anstieg der Transkriptmenge dieser Inflammationsmediatoren, während die Antikörperbehandlung der KSRP-defizienten Tiere kaum einen Anstieg der mRNA-Mengen nach sich zog. Demnach stehen die Daten nicht im Einklang mit den beschriebenen *ex vivo*-Analysen, bei denen die mRNA-Menge der KSRP-Zielgene CXCL-1, iNOS und TNF- α in mit murinem IFN- γ und LPS stimulierten Peritonealmakrophagen aufgrund des *Knockouts* von KSRP erhöht vorliegen (Bollmann, Art et al. 2014; Briata, Bordo et al. 2016). Die Ergebnisse deuten somit auf einen relevanten Unterschied in der Zytokinexpression hin, der zwischen isolierten Zellen und dem ganzen Organismus besteht. Dabei stellen die isolierten Zellen ein System dar, welches einer akuten Inflammation entspricht und dem nur ein Zelltyp zugrunde liegt. Dagegen sind bei den *in vivo*-Analysen verschiedene Zellpopulationen involviert und das Modell spiegelt die Bedingungen einer chronischen Inflammation wider. Auch die S100A8 mRNA-Expression war in den Gelenken von KSRP-defizienten Mäusen nach der Arthritis-Induktion wesentlich geringer als in den ebenso behandelten Wildtypen (Abbildung 5.34). S100A8 wird als anerkannter Biomarker für die humane RA postuliert, da in der entzündeten Synovia von RA-Patienten drastisch erhöhte Transkriptmengen gemessen werden konnten (Baillet 2010). Die S100 Proteine A8, A9 und A12 werden während der Aktivierung des innate Immunsystems von Monozyten und Granulozyten produziert, wobei die Ausprägung der Entzündung in Korrelation mit der Menge der sekretierten Proteine steht (Kessel, Holzinger et al. 2013). Somit unterstützt die geringe S100A8-Expression in den KSRP-ko Mäusen die visuell beobachtete schwächere Ausprägung der Arthritis-Symptome, verglichen mit den wt-Mäusen.

Im Kontrast zur humanen RA scheint die Behandlung der C57BL/6-Mäuse mit dem Antikörpermix gegen CII eine lokale Inflammation hervorzurufen. mRNA-Analysen der Arthritis-relevanten Gene CXCL-1 und TNF- α in Leberproben, Lymphknoten und isolierten Peritonealzellen zeigten keinen Unterschied zwischen CAIA-behandelten und unbehandelten

Tieren (Abbildung 5.35, A-F). Lediglich die leichte Erhöhung der S100A8-Expression in den untersuchten Geweben und Zellen nach der Immunisierung deutet auf eine systemische Entzündung hin (Abbildung 5.35, G-I). Dabei waren in Leberproben und Lymphknoten keine Unterschiede zwischen den Genotypen zu verzeichnen. In Peritonealzellen war dagegen die S100A8 Transkriptmenge nach der CAIA-Behandlung genotypspezifisch verändert. Wt-Tiere zeigten eine signifikant erhöhte S100A8-Menge gegenüber CAIA-behandelten ko-Tieren. Das zeigt, dass die Expression des Biomarkers S100A8 während der CAIA-Entwicklung organ- und zellspezifisch reguliert wird, wobei die stärkste Expression lokal in den Pfoten gemessen werden konnte. Dagegen konnte in Kollagen-immunisierten TCR β -transgenen DBA/1 Mäusen eine Erhöhung der S100A8-Expression in allen untersuchten Organen nachgewiesen werden (Art 2012). Dieser transgene Mausstamm exprimiert die β -Kette eines T-Zell-Rezeptors (TCR), der aus einem Kollagen-arthritogenen T-Zell-Klon isoliert wurde, und ist daher anfälliger gegenüber der CII-induzierten Arthritis (Art 2012). Somit zeigt sich ein Unterschied zwischen der CAIA, für die bisher keine systemische Entzündung beschrieben wurde, und der CIA bzw. der humanen RA, die sich durch systemische Inflammationen kennzeichnen (Luross and Williams 2001; Lazzerini, Capecchi et al. 2017).

Zusammenfassend zeigen die Daten, dass die Arthritis-Induktion mit Hilfe der CAIA-Methode durch den *Knockout* von KSRP weitestgehend inhibiert wurde, was mit einer verminderten Zytokin- und Chemokinexpression sowie einem reduzierten Arthritisindex einhergeht. Um die potentiellen Ursachen für die stärkere Arthritisentwicklung in KSRP-wt Mäusen zu begreifen, wurden die KSRP-wt und -ko Mäuse im weiteren Verlauf genauer charakterisiert. Auf diese Weise sollten Prozesse identifiziert werden, welche die Arthritisentwicklung begünstigen, und in welche KSRP eingreifen könnte. Die dazu erhobenen Daten werden in den folgenden Kapiteln dargelegt und diskutiert.

6.2.2 Der *Knockout* von KSRP führt zu einer reduzierten Infiltration von Immunzellen in die Gelenke

Die histochemischen Übersichtsfärbungen (HE-Färbung) der Gelenkschnitte von CAIA-behandelten Mäusen sowie Kontrollmäusen haben gezeigt, dass das Auslösen der Arthritis in den KSRP-wt Mäusen eine drastische Infiltration von Immunzellen in die Gelenke zur Folge hatte (Abbildung 5.36). Im Gegensatz dazu war die Frequenz eingewanderter Immunzellen in den KSRP-defizienten Mäusen deutlich geringer, was wiederum für eine schwächer ausgeprägte Arthritis spricht und möglicherweise für die verringerte Expression der pro-inflammatorischen Mediatoren verantwortlich ist. Durch die Messung der mRNA-Expression verschiedener Immunzellmarker, wie CD68 und Ly6G, wurden die eingewanderten Zellen

weiterhin genauer charakterisiert (Abbildung 5.37). CD68 wird spezifisch von Monozyten und Makrophagen produziert, (Gottfried, Kunz-Schughart et al. 2008), deren Infiltration in die Gelenke als charakteristisch für die CAIA beschrieben wurde (Asquith, Miller et al. 2009). Sowohl im Mausmodell als auch in der humanen RA gilt die Menge an CD68-positiven Makrophagen in der Synovia als Merkmal zur Bestimmung des Schweregrades der Erkrankung (Bender, Spyvee et al. 2013). Ly6G-Proteine sind charakteristische Oberflächenmarker von Neutrophilen (Lee, Wang et al. 2013), denen ebenfalls eine wichtige Rolle in der CAIA-Entwicklung zukommt. Die Depletion von Neutrophilen führte zu einer reduzierten Häufigkeit und einem geringeren Schweregrad der Arthritis (Nandakumar, Svensson et al. 2003). Zudem wurde die Expression der Integrinuntereinheiten α L, α M und β 2 mittels qRT-PCR analysiert (Abbildung 5.38), die als generelle Markergene für Immunzellen betrachtet werden und somit ebenfalls von Monozyten und Lymphozyten exprimiert werden (Mitroulis, Alexaki et al. 2015). Die Expression dieser genannten Immunzellmarker konnte in Pfoten CAIA-behandelter KSRP-wt Mäuse verstärkt gemessen werden (Abbildung 5.37 und Abbildung 5.38). Demnach zeigen die Daten, dass sich im Immunzellinfiltrat Monozyten, Makrophagen und Neutrophile befinden. Da für die CAIA-Entwicklung nachweislich Makrophagen und Neutrophile von Bedeutung sind (Nandakumar, Svensson et al. 2003; Nandakumar, Bäcklund et al. 2004), könnte die geringere Frequenz dieser Zellpopulationen in den Gelenken der Antikörper-behandelten KSRP-ko Mäuse im Vergleich zu den wt-Mäusen die abgeschwächten Arthritissymptome erklären.

Weiterhin wurde die Expression der Chemokine MCP-1 und MIP-1 α in den Pfoten von Antikörper- bzw. PBS-behandelten Mäusen gemessen (Abbildung 5.33). Diese Proteine, die der CC-Subfamilie der Chemokine angehören, stellen chemische Lockstoffe dar und sind dadurch in immunregulatorische Prozesse der humanen RA sowie der CAIA und CIA involviert. Dabei wirken die Proteine chemotaktisch auf Monozyten sowie T- und B-Zellen und sind daher für die Rekrutierung dieser Zellen in das Synovialgewebe zum Ort der Entzündung verantwortlich (Szekanecz, Kim et al. 2003; Szekanecz, Vegvari et al. 2010). Dementsprechend konnten im Synovialgewebe und der Gelenkflüssigkeit von Patienten mit RA erhöhte Quantitäten von MCP-1 detektiert werden (Koch, Kunkel et al. 1992; Akahoshi, Wada et al. 1993; Pavkova Goldbergova, Lipkova et al. 2012). Es wurde beschrieben, dass die mRNA-Mengen von MCP-1 und MIP-1 α in Gelenken der Hinterpfoten im CAIA-Modell mit der Ausprägung der Arthritis korrelieren (Kagari, Doi et al. 2002). Im Einklang mit den zuvor beschriebenen Daten konnte in den Gelenken CAIA-behandelter KSRP-ko Mäuse signifikant weniger MCP-1 mRNA detektiert werden, als in den ebenso behandelten KSRP^{+/+} Tieren (Abbildung 5.33, A). Dieser Unterschied in der MCP-1-Expression könnte eine Ursache für die reduzierte Frequenz an Immunzellen in den Gelenken der KSRP-defizienten Mäuse nach Antikörper-Behandlung sein. Im Gegensatz zu MCP-1 konnte für MIP-1 α lediglich eine leichte

Erhöhung der Transkriptmenge in Pfoten der Antikörper-behandelten KSRP-wt Mäuse beobachtet werden, verglichen mit KSRP-ko Mäusen (Abbildung 5.33). Zelladhäsionsmoleküle wie ICAM oder VCAM ermöglichen den Kontakt zwischen Zellen und wurden in der humanen RA als fundamental für den Ablauf der Entzündungsreaktionen beschrieben (Pitzalis, Kingsley et al. 1994; Veale and Maple 1996). Im CAIA-Modell konnten diese Oberflächenmoleküle allerdings weitestgehend als Ursache für die erhöhte Immunezellinfiltration ausgeschlossen werden, da keine signifikanten Unterschiede in der mRNA-Expression in Pfoten verzeichnet werden konnten (Abbildung 5.39).

Die mRNA-Daten lassen einen generellen negativen Einfluss des KSRP-*Knockouts* auf Zellpopulationen myeloiden Ursprungs vermuten, wie Monozyten, Makrophagen und Granulozyten, was durch Rudolf Käfer auf immunologischer Ebene weiter analysiert wurde. Dabei wurde in mononukleären Zellen des peripheren Blutes (PBMCs) aus unbehandelten KSRP-ko gegenüber KSRP-wt Mäusen eine signifikant reduzierte Zellzahl von myeloiden Zellen und Neutrophilen nachgewiesen, wodurch die zuvor gezeigten mRNA-Daten unterstützt werden (Käfer, Schrick et al. 2017). Diese verringerte Zellzahl lässt sich vermutlich durch eine deutlich erhöhte Apoptoserate der myeloiden Zellen in KSRP-ko Mäusen erklären (Käfer, Schrick et al. 2017), womit KSRP eine anti-apoptotische Rolle einzunehmen scheint. Das steht allerdings in Kontrast zu Daten, die durch Shi et al. publiziert wurden, nach welchen KSRP die neuronale Apoptose fördert (Shi, Zhao et al. 2015). Weiterhin wurde gezeigt, dass KSRP die Apoptose in einem Leukämiemodell begünstigt, was über die Regulation der miR-16-1- Biogenese vermittelt wird (Trabucchi, Briata et al. 2009). Aufgrund dieser gegensätzlichen Daten ist es denkbar, dass die Rolle von KSRP für die Regulation der Apoptose abhängig ist vom Gewebe. Vermutlich werden je nach Zelltyp verschiedene Zielgene reguliert, was unterschiedliche Signalwege in Gang setzt.

Weiterhin konnte Rudolf Käfer auch im CAIA-Modell bestätigen, dass KSRP einen regulatorischen Effekt speziell auf myeloide Zellpopulationen ausübt. Dabei wurde gezeigt, dass die Zellfrequenz durch die Behandlung mit den CII-spezifischen Antikörpern in beiden Genotypen signifikant angestiegen war, wobei der Effekt in Zellen aus KSRP-ko Mäusen deutlich geringer war (Käfer, Schrick et al. 2017). Insgesamt gesehen bekräftigen diese immunologischen Daten die Annahme, dass der *Knockout* von KSRP die negative Regulation myeloider Zellpopulationen bedingt. Das steht im Einklang mit den publizierten Daten von Zhao et al., die beschreiben, dass KSRP für die Differenzierung von Neutrophilen verantwortlich ist. Dabei begünstigt eine erhöhte KSRP-Expression die Granulozyten-Differenzierung, wohingegen die verminderte Expression mit der Monozytopoese einhergeht (Zhao, Wang et al. 2017). Aufgrund der Tatsache, dass Makrophagen und Neutrophile eine wichtige Rolle für die Induktion der CAIA spielen (Nandakumar, Svensson et al. 2003), ist es

sehr wahrscheinlich, dass die reduzierte Anzahl an myeloiden Zellen in KSRP-ko Mäusen für die abgeschwächte Arthritis-Induktion verantwortlich ist.

Weitere Analysen von Rudolf Käfer zeigen, dass der KSRP-*Knockout* unter Kontrollbedingungen (PBS- und NaCl-Injektion) eine signifikant höhere Produktion von IFN- γ in *ex vivo* mit LPS stimulierten Milzzellen zur Folge hat, verglichen mit wt-Zellen. Dieser Unterschied ist in CAIA-behandelten Mäusen dagegen deutlich schwächer ausgeprägt (Käfer, Schrick et al. 2017). Für IFN- γ wurden sowohl immunsuppressive als auch immunstimulatorische Eigenschaften in Autoimmunerkrankungen beschrieben (Kelchtermans, Billiau et al. 2008). Im CIA-Modell sind z.B. protektive Eigenschaften für IFN- γ bekannt, da CIA-resistente B57BL/6-Mäuse durch den *Knockout* von IFN- γ eine Anfälligkeit gegenüber der CIA-Induktion zeigen (Chu, Song et al. 2003). Somit könnte die erhöhte IFN- γ -Produktion im hier analysierten CAIA-Modell ebenfalls einen Anhaltspunkt darstellen, um die verminderte Arthritisinduktion zu erklären. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass der *Knockout* von KSRP die Zytokinproduktion in T-Zellen moduliert und eine Verlagerung der Th1-Immunantwort in Richtung Th2 induziert (AG Pautz, unveröffentlicht). Das stellt ebenfalls einen potentiellen Erklärungsansatz für die abgeschwächte Arthritsentwicklung in KSRP-defizienten Mäusen dar, da in der Pathogenese der RA nachweislich Th1-Zellen eine Rolle spielen (Schulze-Koops and R. Kalden 2002). Auch im CIA-Modell wird die Th2-spezifische Zytokinproduktion weitestgehend supprimiert (Schulze-Koops and R. Kalden 2002).

Die hier dargelegten Ergebnisse liefern erste Anhaltspunkte auf Faktoren, welche für die differente Arthritisinduktion zwischen KSRP-wt und -ko Mäusen verantwortlich sein können. Dennoch bedarf es weiterhin der Aufklärung genauer Mechanismen. Weitere potentielle Ursachen werden in den folgenden Kapiteln diskutiert.

6.2.3 Der Transport der Antikörper gegen CII ist in KSRP-defizienten Mäusen nicht beeinträchtigt

Die weniger stark ausgeprägten Arthritissymptome und die verminderte Expression pro-inflammatorischer Mediatoren in der Synovia von KSRP-ko Mäusen, verglichen mit wt-Mäusen sprechen dafür, dass das Ausschalten der KSRP-Expression vor einer Arthritisinduktion schützt. Neben dem zuvor beschriebenen anti-apoptotischen Einfluss von KSRP auf Zellen myeloiden Ursprungs (Kapitel 6.2.2) (Zhao, Wang et al. 2017), durch welchen sich die Unterschiede in der Arthritisinduktion erklären lassen, könnte die Translokation der Antikörper zum Ort des Geschehens in KSRP ko-Mäusen beeinträchtigt sein. Dieser Schritt ist für das Auslösen einer Immunreaktion essentiell, da sich zunächst Immunkomplexe zwischen den intravenös injizierten spezifischen Antikörpern und CII ausbilden müssen. CII-Epitope befinden

sich gut zugänglich an der Oberfläche des Gelenkknorpels (Mo, Scheynius et al. 1994), wo durch die Bildung der Antigen-Antikörper-Komplexe die weiteren immunologischen Prozesse initiiert werden. Der Transport der Antikörper zu den Gelenken wird durch den FcRn-Rezeptor über die Interaktion mit IgG erleichtert (Ravetch and Clynes 1998), weshalb eine verminderte FcRn-Expression auf einen beeinträchtigten Transport hindeuten könnte. In den hierzu durchgeführten Analysen konnten allerdings keine Unterschiede der FcRn-Expression in den Gelenken CAIA-behandelter Mäuse zwischen den beiden Genotypen detektiert werden (Abbildung 5.40). Die Behandlung mit dem Antikörpermix führt sowohl in wt- als auch in ko-Tieren zu einem signifikanten Anstieg der FcRn mRNA. In Antikörper-behandelten wt-Mäusen ist dieser Anstieg zwar tendenziell stärker als in KSRP ko-Mäusen, der gemessene Unterschied zwischen den Genotypen ist jedoch nicht signifikant. Das lässt vermuten, dass der Transport der Antikörper auch in den KSRP^{-/-}-Tieren ordnungsgemäß verläuft.

6.2.4 Die Regulation der Expression relevanter Modulatoren des Komplementsystems spielt keine Rolle für die differente CAIA-Entwicklung in KSRP ko-Mäusen

Die unkontrollierte Komplementaktivierung spielt eine entscheidende Rolle für die Pathogenese einer Vielzahl an humanen Inflammationserkrankungen, darunter auch die RA (Linton and Morgan 1999). In CIA- bzw. CAIA-Mausmodellen zur Untersuchung der RA-Entwicklung wurde ebenfalls eine Involvierung des Komplementsystems beschrieben, da der *Knockout* verschiedener Komplementfaktoren (C5, CfH) eine Resistenz gegen die Arthritisinduktion zur Folge hat (Wang, Kristan et al. 2000; Banda, Mehta et al. 2013). Die Komplementaktivierung erfolgt durch Immunkomplexe, die sich im Falle der RA-Mausmodelle zwischen CII und den CII-spezifischen Antikörpern am Gelenkknorpel ausbilden (vgl. Kapitel 6.2.3).

Aufgrund der Rolle des Komplementsystems für die Arthritisentwicklung erscheint es möglich, dass der *Knockout* von KSRP eine veränderte Expression von Komplementfaktoren nach sich zieht, was wiederum die Tiere vor der CAIA-Induktion schützt. Es wurde beschrieben, dass für das Auslösen der CAIA der alternative Weg der Komplementaktivierung von besonderer Bedeutung ist (Banda, Levitt et al. 2010). Der Komplementfaktor H gilt beispielsweise als negativer endogener Regulator des alternativen Weges der Komplementaktivierung. Demnach sind die klinischen Symptome der CAIA durch die Inhibierung des CfH deutlich verschlimmert (Banda, Mehta et al. 2013). CfH mRNA-Analysen in Leberproben von CAIA-induzierten KSRP-defizienten Mäusen sowie von KSRP wt-Mäusen zeigten allerdings keinen Unterschied in der CfH-Expression zwischen den beiden Genotypen. Auch die Antikörper-Behandlung hatte keinen Effekt auf die mRNA-Menge (Abbildung 5.41, B), so dass eine

veränderte Cfh mRNA-Menge als Ursache für die Unterschiede in der Arthritisentwicklung ausgeschlossen werden kann. Weiterhin wurde die Expression des C1-Inhibitors im CIAA-Modell untersucht. Der C1-Inhibitor, eine Serinpeptidase, ist für die negative Regulation des Komplementfaktor C1 zuständig, dem ersten Protein in der Komplementkaskade. Obwohl in Studien von Winzen et al. gezeigt werden konnte, dass KSRP mit der 3'-UTR einer Serinpeptidase interagiert, konnte keine durch den *Knockout* von KSRP bedingte Regulation der C1-Inhibitor-Expression nachgewiesen werden (Abbildung 5.41, A). Vielmehr scheint in Antikörper-behandelten wt-Mäusen die Expression des Inhibitors leicht angestiegen zu sein, allerdings könnte diese Tendenz durch Schwankungen der Messung bedingt sein. Die Unterschiede waren nicht signifikant.

Somit ist die unterschiedlich starke Arthritisentwicklung in den KSRP wt- und ko- Mäusen als Folge der Behandlung mit CII-spezifischen Antikörpern nicht auf veränderte Expressionen wichtiger Regulatoren der Komplementaktivierung zurückzuführen.

6.2.5 Der *Knockout* von KSRP hat keinen Einfluss auf die miR-155-Expression

Die Rolle von miRNAs hat in den letzten Jahren für die Pathogenese der RA zunehmend an Bedeutung erlangt (Ceribelli, Nahid et al. 2011). Neben der Regulation der Genexpression auf translationaler Ebene gelten miRNAs als wichtige Mediatoren der mRNA-Stabilität pro-inflammatorischer Zytokine, deren Expression einer strengen Kontrolle unterstehen muss. Beispielsweise wurde nachgewiesen, dass die miRNA-146 sowie die miR-155 in verschiedenen Geweben und Zelltypen von RA-Patienten hochreguliert vorliegen, weshalb diese miRNAs als potentielle Biomarker der RA gelten (Ceribelli, Nahid et al. 2011; Kurowska-Stolarska, Alivernini et al. 2011). Die Bedeutung der miR-155 für die RA-Entwicklung konnte weiterhin im CIA-Modell bestätigt werden. Dabei sind miR-155-defiziente Mäuse resistent gegen die CIA-Induktion, was auf eine verminderte pro-inflammatorische Genexpression sowie die beeinträchtigte Produktion der Autoantikörper zurückgeführt wurde (Kurowska-Stolarska, Alivernini et al. 2011). Die miR-155, für die in früheren Studien die Kontrolle der Expression von sowohl pro- als auch anti-inflammatorischen Molekülen beschrieben wurde, zählt zu den miRNAs, deren Biogenese durch KSRP beschleunigt wird (Ruggiero, Trabucchi et al. 2009). Demnach wäre durch den *Knockout* von KSRP eine Reduktion der miR-155-Expression denkbar. Die Expressionsanalysen mittels qRT-PCR zeigten jedoch einen tendentiell gegenläufigen Effekt, da stattdessen eine erhöhte miR-155-Menge in Leberproben KSRP-defizienter Tiere nach der Antikörper-Behandlung gemessen werden konnte (Abbildung 5.42).

Somit kann angenommen werden, dass veränderte miR-155-Expressionen nicht für die differente CAIA-Induktion zwischen KSRP-ko Mäusen und KSRP-wt Mäusen verantwortlich sind. Das Fehlen von KSRP scheint in diesem Modell keinen Nachteil auf die Biogenese der miR-155 zu haben. Möglicherweise liegt hier eine multifaktorielle Regulation vor. In Lungenepithelzellen der zystischen Fibrose konnte beispielsweise eine antagonistische Regulation der miR-155-Prozessierung durch KSRP und TTP gezeigt werden. Während KSRP die Reifung der miRNA fördert, wird diese durch die Überexpression von TTP supprimiert (Bhattacharyya, Kumar et al. 2013). Daher besteht hier die Möglichkeit, dass der *Knockout* von KSRP bezüglich der miR-155-Expression durch einen anderen Faktor kompensiert wird.

6.2.6 Die KSRP-Expression ist als Folge der Arthritisinduktion in wt-Mäusen gewebespezifisch erhöht

Frühere Analysen der AG Kleinert konnten bereits zeigen, dass die KSRP-Expression im Verlauf der CIA-Entwicklung reguliert wird (Art 2012). Im Allgemeinen konnte dabei eine Erhöhung der mRNA-Menge als Folge der Immunisierung mit CII in PBMCs, Pfoten und Milz verzeichnet werden, die Expression war jedoch flexibel und abhängig vom untersuchten Gewebe sowie dem Zeitpunkt der Analyse (Art 2012). Gerade in isolierten Immunzellen der Milz wurde eine deutliche Erhöhung der KSRP-Expression gemessen. Demnach scheint die KSRP-Expression *in vivo* im CIA-Modell, einem Mausmodell für chronische Inflammation, hochreguliert zu werden. Ähnliche Ergebnisse konnten im Rahmen dieser Arbeit im akuten Entzündungsmodell in Milzproben aus LPS-behandelten Mäusen gemessen werden, wo die KSRP-Expression um den Faktor 1,5 erhöht vorlag gegenüber unbehandelten Tieren (Daten nicht gezeigt). Eine zweifach erhöhte KSRP-Expression wurde in Milzzellen nachgewiesen, die aus KSRP-wt Mäusen isoliert und *ex vivo* mit 0,1 µg/ml LPS stimuliert wurden, verglichen mit unbehandelten isolierten Zellen (Daten nicht gezeigt). Gegensätzlich dazu wird die KSRP-Expression *in vitro* sowohl in humanen als auch in murinen Zellsystemen, wie DLD-1, MM6 (Mono Mac 6, Monozyten) und RAW-Makrophagen, durch die Stimulation mit einem pro-inflammatorischen Zytokinmix nicht verändert, was in früheren Studien der AG Kleinert gezeigt werden konnte. Die Daten machen deutlich, dass KSRP in verschiedenen Modellen und Geweben unterschiedlich reguliert zu werden scheint. Diese variable Regulation lässt vermuten, dass die Kontrolle der Genexpression durch KSRP ebenfalls variabel und abhängig vom untersuchten Gewebe ist. Dies steht in Einklang mit den bereits beschriebenen Unterschieden im Hinblick auf die Expression pro-inflammatorischer Mediatoren *ex vivo*, *in vitro* und *in vivo*, welche durch den *Knockout* von KSRP ausgelöst wurden. Dabei hatte der *Knockout* von KSRP in isolierten Peritonealmakrophagen, in welchen mit murinem IFN-γ und LPS eine akute Entzündung ausgelöst wurde, eine erhöhte Expression der untersuchten

Mediatoren TNF- α , CXCL-1 und iNOS zur Folge, verglichen mit Zellen aus wt-Mäusen (*ex vivo*) (Bollmann, Art et al. 2014). Auch in lentiviral generierten Zellen mit herunterregulierter KSRP-Expression wurde durch die Behandlung mit einem pro-inflammatorischen Zytokinmix eine erhöhte pro-inflammatorische Genexpression nachgewiesen (*in vitro*) (Bollmann, Art et al. 2014). Im Gegensatz dazu führt die Induktion einer Arthritis mittels CAIA in KSRP-ko Mäusen zu einer verminderten Expression der genannten Gene in verschiedenen Organen, im Vergleich zu wt-Tieren (*in vivo*, Abbildung 5.32 und Abbildung 5.35). Somit können womöglich unterschiedliche Rollen von KSRP für die Entwicklung von sowohl chronischen (z.B. CIA / CAIA) als auch akuten Entzündungen vermutet werden. Um die Expressionsdaten von KSRP zu vervollständigen, sollte ebenfalls die KSRP mRNA-Expression in verschiedenen Zellen und Geweben CAIA-behandelter KSRP^{+/+} Mäuse sowie PBS-behandelter Kontrolltiere gemessen werden (Abbildung 5.43). Dabei wurde gezeigt, dass die Antikörper-Behandlung der Mäuse keine Auswirkung auf die KSRP mRNA-Expression in Pfoten, isolierten Peritonealzellen sowie isolierten T-Zellen hatte. Dagegen konnte in Milzproben ein signifikanter Anstieg der Expression auf 170 % gemessen werden. Die erhöhte Expression in der Milz nach dem Auslösen der Arthritis steht damit im Einklang mit den erhobenen Daten zur KSRP-Expression in der Milz, die nach der CIA-Induktion beobachtet werden konnte (Art 2012).

Insgesamt gesehen lässt sich damit festhalten, dass die KSRP-Expression in Entzündungsreaktionen unterschiedlich reguliert wird. Die Expression steigt in Milzproben *in vivo* (in isolierten Zellen sowie im Gesamtorgan) aus CII-immunisierten DBA/1 Mäusen (Art 2012) sowie *ex vivo* in mit LPS stimulierten Milzzellen, isoliert aus C57BL/6-Mäusen, tendentiell an. Auch die CAIA-Behandlung hat eine Expressionserhöhung von KSRP in Milzproben zur Folge. In anderen Organen lassen sich die Änderungen der Expression nicht verallgemeinern, während *in vitro* bisher keine Einflüsse auf die KSRP-Expression durch die Stimulation mit pro-inflammatorischen Zytokinen nachgewiesen werden konnte.

6.3 Die Rolle des Naturstoffes Resveratrol auf die KSRP-vermittelte Regulation der pro-inflammatorischen Genexpression

Für Resveratrol konnte ein vielfältiges Spektrum an pharmakologischen Effekten nachgewiesen werden. Der Naturstoff wirkt anti-oxidativ, anti-diabetisch, kardioprotektiv, anti-karzinogen und anti-inflammatorisch, was eine positive Rolle in Tumorerkrankungen sowie kardiovaskulären und inflammatorischen Erkrankungen zur Folge hat (Brisdelli, D'Andrea et al. 2009; Rodrigo, Miranda et al. 2011; Yu, Fu et al. 2012). Dabei scheinen die anti-entzündlichen Effekte von Resveratrol von besonderer Bedeutung zu sein, welche neben der negativen Kontrolle von pro-inflammatorischen Transkriptionsfaktoren durch die posttranskriptionelle Regulation von pro-inflammatorischen Mediatoren vermittelt werden (vgl. Kapitel 1.3.4) (Bollmann, Art et al. 2014). Da KSRP als direkter selektiver Interaktionspartner von Resveratrol identifiziert wurde (Art 2012; Bollmann, Art et al. 2014), besteht die Möglichkeit, dass die Resveratrol vermittelten Effekte indirekt über KSRP erfolgen. Die möglichen zugrunde liegenden Mechanismen werden in den folgenden Kapiteln diskutiert.

6.3.1 Der destabilisierende Effekt von Resveratrol auf pro-inflammatorische Transkripte ist in Zellen mit ausgeschalteter KSRP-Expression aufgehoben

Die Expression der KSRP-Zielgene iNOS (Linker, Pautz et al. 2005), TNF- α (Nguyen-Chi and Morello 2008) und IL-8 (Winzen, Thakur et al. 2007) wird durch Resveratrol negativ reguliert (Donnelly, Newton et al. 2004; Bi, Yang et al. 2005; Mukherjee, Lager et al. 2009). Diese verringerten Transkriptmengen konnten auf die Inhibierung der NF- κ B-Aktivierung zurückgeführt werden (Meng, Ma et al. 2005). Neben der negativen Kontrolle von pro-inflammatorischen Transkriptionsfaktoren gibt es allerdings auch Hinweise darauf, dass Resveratrol die Expression der genannten Mediatoren mittels posttranskriptionellen Mechanismen über die 3'-UTR reguliert. Beispielsweise hat die Resveratrol-Behandlung von DLD-1-Zellen, die mit einem iNOS 3'-UTR-Plasmid transfiziert wurden, eine verringerte Luciferaseaktivität zur Folge (Bollmann, Art et al. 2014). Dieser negative Effekt von Resveratrol auf die Luciferaseaktivität ist bedingt durch den verstärkten mRNA-Abbau, was in DLD-1-Zellen gezeigt werden konnte. Dabei führte die Behandlung mit Resveratrol zu einer verstärkten Destabilisierung der Transkripte von iNOS, IL-8 und TNF- α im Vergleich zu unbehandelten Zellen (Art 2012; Bollmann, Art et al. 2014) (vgl. Abbildung 5.44). Dagegen konnte in Zellen, in welchen die KSRP-Expression mittels einer spezifischen siRNA inhibiert wurde, kein Resveratrol-vermittelter Effekt auf die mRNA-Stabilitäten der pro-inflammatorischen Mediatoren nachgewiesen werden (Abbildung 5.45). Es gab keinen Unterschied zwischen Resveratrol-behandelten und unbehandelten siKSRP-Zellen, wodurch

vorhergehende Analysen von Julia Art bezüglich der iNOS-Stabilität bestätigt werden konnten (Art 2012). Somit wird die Annahme unterstützt, dass die posttranskriptionellen Resveratrol-Effekte auf pro-inflammatorische Mediatoren über die Beeinflussung der Aktivität von RNA-BPs vermittelt werden. Dabei liegt es nahe, dass die KSRP-Aktivität durch Resveratrol verstärkt wird. Diese Annahme wird dadurch bekräftigt, dass beispielsweise der negativ regulatorische Effekt von Resveratrol auf die TNF- α mRNA durch die Überexpression von HuR aufgehoben wird, was in immortalisierten Jurkat T-Zellen gezeigt werden konnte (Mukherjee, Lager et al. 2009). Frühere Studien postulierten eine Konkurrenz zwischen dem destabilisierend wirkenden RNA-BP KSRP und dem Stabilisator HuR um dieselbe Bindungsstelle in der iNOS-3'-UTR (Linker, Pautz et al. 2005). Demnach kann angenommen werden, dass dies auch für die TNF- α 3'-UTR der Fall ist und dass die Resveratrol-vermittelte Aktivitätserhöhung von KSRP durch die Bindung von HuR an die KSRP-Zielsequenz somit ohne Wirkung bleibt.

6.3.2 Die Behandlung mit Resveratrol verhindert die p38-MAPK-vermittelte Phosphorylierung von KSRP und verstärkt die Interaktion mit Ziel-mRNAs

Da in vorhergehenden Analysen der AG Kleinert bereits gezeigt werden konnte, dass die Behandlung mit Resveratrol keinen Einfluss auf die KSRP Proteinexpression hat (Art 2012), sollte im Folgenden analysiert werden, inwiefern posttranslationale Mechanismen für den Resveratrol-vermittelten Effekt auf KSRP verantwortlich sind. Die KSRP-Aktivität wird über verschiedene Aminosäure-Phosphorylierungen durch Proteinkinasen gesteuert, wie die p38-MAPK, die Kinase ATM sowie die AKT (Kapitel 1.2.2) (Briata, Chen et al. 2013). Dabei konnte gezeigt werden, dass die Phosphorylierung des Threonin 692 durch die p38-MAPK die wichtigste Modulation für die KSRP-abhängige Regulation der pro-inflammatorischen Genexpression ist (Bollmann, Art et al. 2014). Dadurch wird die KSRP-Affinität zu AREs vermindert, was wiederum eine erhöhte Transkriptstabilität von KSRP-Zielgenen zur Folge hat (Briata, Forcales et al. 2005). Im Rahmen dieser Arbeit sollte nun überprüft werden, ob die KSRP-Phosphorylierung des Threonin 692 durch die Behandlung mit Resveratrol beeinflusst wird. Hierfür wurden Zellen generiert, die ein EGFP-KSRP-Fusionsprotein überexprimierten, bei dem die Phosphorylierungsstelle mutiert wurde (T692A). Die Überexpression wurde mittels Western Blot überprüft (Abbildung 5.46). Wie in den vorherigen Analysen der mRNA-Destabilisierung wurde auch in diesen Zellen die mRNA-Menge der KSRP-Zielgene iNOS, IL-8 und TNF- α gemessen. Während in den Kontrollzellen (EGFP) eine signifikant geringere Transkriptmenge als Folge der Resveratrol-Behandlung detektiert werden konnte, gab es in den TA-Zellen keinen Unterschied zwischen Resveratrol-behandelten und unbehandelten Zellen (Abbildung 5.47). Das bestätigt die Vermutung, dass die Phosphorylierung von KSRP

am Threonin 692 eine Rolle für die Resveratrol-vermittelten Effekte spielt. Unterstützend dazu konnte aus Resveratrol-behandelten DLD-1-Zellen eine geringere Menge an Threonin-phosphoryliertem KSRP immunpräzipitiert werden, während die Gesamtmenge von KSRP nicht verändert war (Art 2012). Es wurde allerdings gezeigt, dass durch die Behandlung mit Resveratrol sowohl die Aktivität als auch die Aktivierung der p38-MAPK in DLD-1-Zellen unverändert bleibt (Bollmann, Art et al. 2014). Im Gegensatz dazu wurde in früheren Studien eine erhöhte p38-MAPK-Phosphorylierung beobachtet, die durch die Behandlung mit LPS ausgelöst und durch Resveratrol weiter verstärkt wurde (Sebai, Ristorcelli et al. 2010). Eine andere Studie beschreibt eine durch Resveratrol vermittelte, verminderte Phosphorylierung und damit Aktivität der p38-MAPK in THP-1-Zellen, was die Inhibierung der IL-8-Produktion zur Folge hatte (Oh, Kang et al. 2009). Ähnliches wurde in murinen RAW-Makrophagen beschrieben (Zong, Sun et al. 2012). Das lässt vermuten, dass die Effekte von Resveratrol auf die Kinase zellspezifisch sind. Da in den hier verwendeten DLD-1-Zellen allerdings keine Resveratrol-abhängige Veränderung der p38-MAPK-Aktivierung und Aktivität nachgewiesen werden konnte, aber dennoch eine verminderte KSRP-Phosphorylierung vorliegt (Art 2012), ist es wahrscheinlich, dass die selektive Resveratrol-Bindung an KSRP die Phosphorylierung durch sterische Hinderung inhibiert.

Die bisherigen Daten suggerieren damit die Inhibierung der p38-MAPK-vermittelten Phosphorylierung von KSRP durch Resveratrol, was eine erhöhte Aktivität des RNA-BP zur Folge hat. Da die Phosphorylierung des Threonin 692 eine verminderte Affinität zwischen KSRP und den Zielgenen bewirkt, kann angenommen werden, dass im Umkehrschluss durch die verhinderte Phosphorylierung die intrazelluläre Bindung von KSRP an die mRNAs zunimmt. Um diese Vermutung zu überprüfen, wurden Immunpräzipitationsanalysen mit einem polyklonalen KSRP-Antikörper sowie Protein-Extrakten aus Resveratrol-behandelten und unbehandelten DLD-1-Zellen durchgeführt. Durch nachfolgende qRT-PCR-Messungen konnte gezeigt werden, dass die mRNA-Menge der untersuchten pro-inflammatorischen Mediatoren IL-8, iNOS und TNF- α , die an KSRP gebunden vorliegt, in Resveratrol-behandelten Zellen signifikant erhöht war (Abbildung 5.48).

Damit lässt sich zusammenfassen, dass Resveratrol die mRNA-Stabilität der untersuchten Gene IL-8, iNOS und TNF- α negativ reguliert, indem die Aktivität von KSRP gesteigert wird. Dies erfolgt durch die Hemmung der KSRP-Phosphorylierung aufgrund von sterischer Hinderung und der daraus resultierenden stärkeren Bindung von KSRP an die Ziel-Transkripte. Das hat wiederum deren schnelleren Abbau zur Folge. Da KSRP bekanntermaßen in verschiedene regulatorische Mechanismen sowohl auf transkriptioneller (Davis-Smyth, Duncan et al. 1996) als auch auf posttranskriptioneller Ebene involviert ist (Gherzi, Lee et al. 2004; Linker, Pautz et al. 2005; Winzen, Thakur et al. 2007) und zu den

wenigen identifizierten direkten Interaktionspartnern von Resveratrol zählt, könnte das RNA-BP eine Schlüsselrolle für die vielfältigen beschriebenen Effekte von Resveratrol darstellen.

7 Anhang

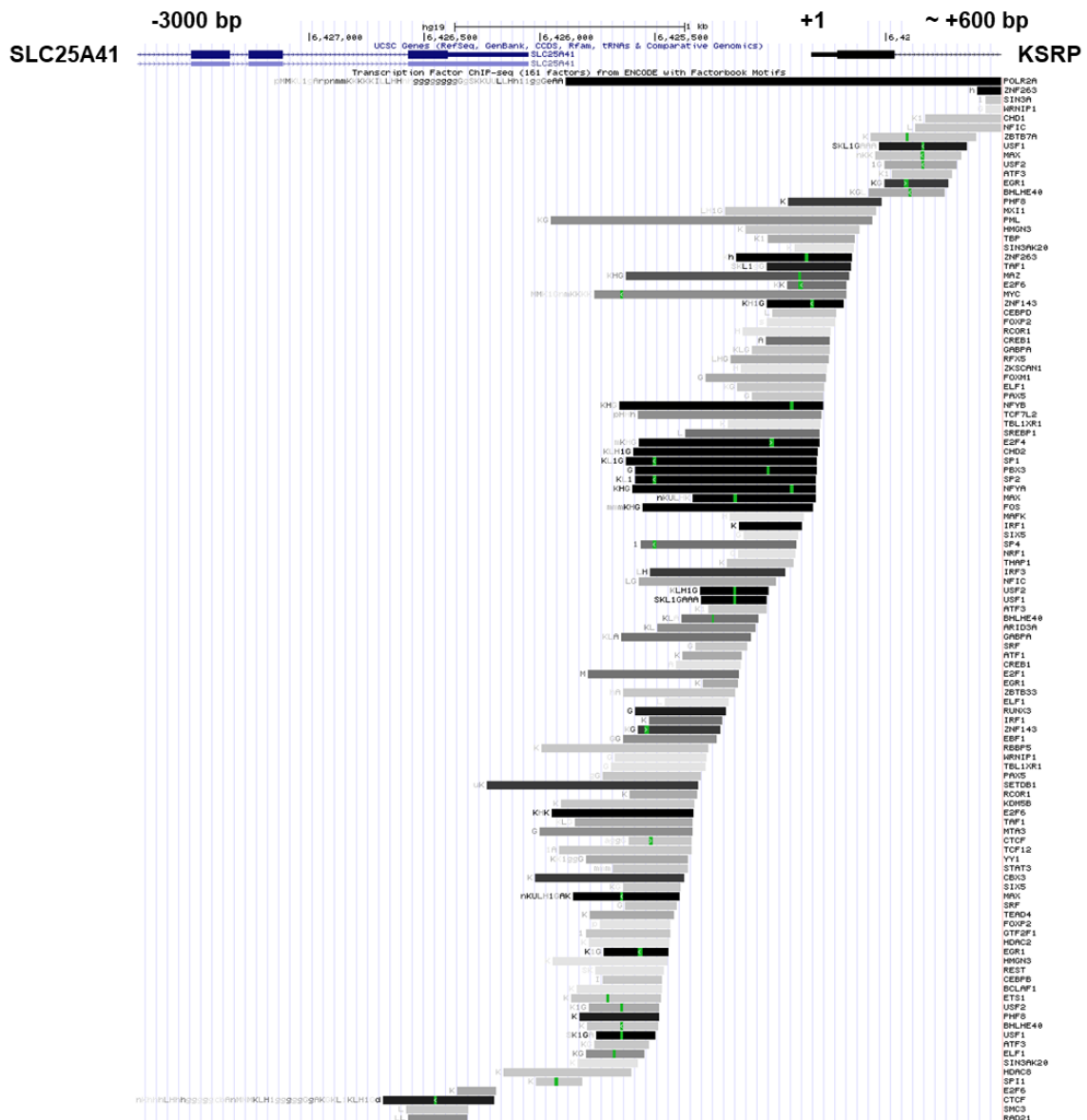


Abbildung 7.1: ChIP-Seq-Analyse der putativen KSRP Promotorregion zur Identifizierung von Transkriptionsfaktoren.

Gezeigt ist die bioinformatische Untersuchung der 3 kb langen Sequenz stromaufwärts des Exon 1 von KSRP mit Hilfe des UCSC Genome Browsers hinsichtlich potentieller Transkriptionsfaktorbindestellen. Dem zugrunde liegen Sequenzanalysen, die durch ChIP-Seq-Datensätze unterstützt werden. Dargestellt ist der Bereich zwischen -3000 bp und etwa +600 bp ausgehend von der annotierten KSRP-TSS.

8 Literaturverzeichnis

- Akahoshi, T., C. Wada, et al. (1993). "Expression of monocyte chemotactic and activating factor in rheumatoid arthritis. regulation of its production in synovial cells by interleukin-1 and tumor necrosis factor." Arthritis & Rheumatism **36**(6): 762-771.
- Allison, R. S. H., M. L. Mummy, et al. (1998). "Translational Control Elements in the Major Human Transforming Growth Factor- β 1 mRNA." Growth Factors **16**(2): 89-100.
- Amirouche, A., H. Tadesse, et al. (2013). "Activation of p38 signaling increases utrophin A expression in skeletal muscle via the RNA-binding protein KSRP and inhibition of AU-rich element-mediated mRNA decay: implications for novel DMD therapeutics." Human Molecular Genetics **22**(15): 3093-3111.
- Amirouche, A., H. Tadesse, et al. (2014). "Converging pathways involving microRNA-206 and the RNA-binding protein KSRP control post-transcriptionally utrophin A expression in skeletal muscle." Nucleic Acids Research **42**(6): 3982-3997.
- Anderson, L. and J. Seilhamer (1997). "A comparison of selected mRNA and protein abundances in human liver." Electrophoresis **18**.
- Andr n, M., B. Johanneson, et al. (2005). "IgG Fc receptor polymorphisms and association with autoimmune disease." European Journal of Immunology **35**(10): 3020-3029.
- Arend, W. P. and J.-M. Dayer (1990). "Cytokines and cytokine inhibitors or antagonists in rheumatoid arthritis." Arthritis & Rheumatism **33**(3): 305-315.
- Art, J. (2012). Die Bedeutung von KSRP für die pro-inflammatorische Genexpression in Autoimmunerkrankungen - Einfluss des Naturstoffes Resveratrol auf KSRP-vermittelte Regulationsmechanismen.
- Asquith, D. L., A. M. Miller, et al. (2009). "Animal models of rheumatoid arthritis." European Journal of Immunology **39**(8): 2040-2044.
- Avi na-Zubieta, J. A., H. K. Choi, et al. (2008). "Risk of cardiovascular mortality in patients with rheumatoid arthritis: A meta-analysis of observational studies." Arthritis Care & Research **59**(12): 1690-1697.
- Ayoubi, T. A. and W. J. Van De Ven (1996). "Regulation of gene expression by alternative promoters." The FASEB Journal **10**(4): 453-460.
- Baillet, A. (2010). "Prot ines S100A8, S100A9 et S100A12 : marqueurs inflammatoires ou acteurs physiopathologiques de la polyarthrite rhumato de." La Revue de M decine Interne **31**(6): 458-461.
- Bajic, V. B., S. L. Tan, et al. (2006). "Mice and Men: Their Promoter Properties." PLOS Genetics **2**(4): e54.
- Banda, N. K., B. Levitt, et al. (2010). "Complement activation pathways in murine immune complex-induced arthritis and in C3a and C5a generation in vitro." Clinical and Experimental Immunology **159**(1): 100-108.
- Banda, N. K., G. Mehta, et al. (2013). "Essential Role of Surface-Bound Complement Factor H in Controlling Immune Complex-Induced Arthritis." The Journal of Immunology **190**(7): 3560.

- Banda, N. K., K. Takahashi, et al. (2007). "Pathogenic Complement Activation in Collagen Antibody- Induced Arthritis in Mice Requires Amplification by the Alternative Pathway." The Journal of Immunology **179**(6): 4101.
- Barreau, C., L. Paillard, et al. (2005). "AU-rich elements and associated factors: are there unifying principles?" Nucleic Acids Research **33**(22): 7138-7150.
- Barreau, C., T. Watrin, et al. (2006). "Protein expression is increased by a class III AU-rich element and tethered CUG-BP1." Biochemical and Biophysical Research Communications **347**(3): 723-730.
- Barrett, L. W., S. Fletcher, et al. (2012). "Regulation of eukaryotic gene expression by the untranslated gene regions and other non-coding elements." Cellular and Molecular Life Sciences **69**(21): 3613-3634.
- Bashirullah, A., R. L. Cooperstock, et al. (2001). "Spatial and temporal control of RNA stability." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **98**(13): 7025-7028.
- Bender, A. T., M. Spyvee, et al. (2013). "Evaluation of a candidate anti-arthritis drug using the mouse collagen antibody induced arthritis model and clinically relevant biomarkers." American Journal of Translational Research **5**(1): 92-102.
- Bhattacharyya, S., P. Kumar, et al. (2013). "Regulation of miR-155 biogenesis in cystic fibrosis lung epithelial cells: Antagonistic role of two mRNA-destabilizing proteins, KSRP and TTP." Biochemical and Biophysical Research Communications **433**(4): 484-488.
- Bi, X. L., J. Y. Yang, et al. (2005). "Resveratrol inhibits nitric oxide and TNF- α production by lipopolysaccharide-activated microglia." International Immunopharmacology **5**(1): 185-193.
- Bikkavilli, R. K., S. A. Zerayesus, et al. (2017). "K-homology splicing regulatory protein (KSRP) promotes post-transcriptional destabilization of Spry4 transcripts in non-small cell lung cancer." The Journal of Biological Chemistry **292**(18): 7423-7434.
- Bird, A., M. Taggart, et al. (1985). "A fraction of the mouse genome that is derived from islands of nonmethylated, CpG-rich DNA." Cell **40**(1): 91-99.
- Birnboim, H. C. and J. Doly (1979). "A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA." Nucleic Acids Research **7**(6): 1513-1523.
- Bollmann, F., J. Art, et al. (2014). "Resveratrol post-transcriptionally regulates pro-inflammatory gene expression via regulation of KSRP RNA binding activity." Nucleic Acids Research **42**(20): 12555-12569.
- Boucas, J., C. Fritz, et al. (2015). "Label-Free Protein-RNA Interactome Analysis Identifies Khsp1 Signaling Downstream of the p38/Mk2 Kinase Complex as a Critical Modulator of Cell Cycle Progression." PLOS ONE **10**(5): e0125745.
- Boussif, O., F. Lezoualc'h, et al. (1995). "A versatile vector for gene and oligonucleotide transfer into cells in culture and in vivo: polyethylenimine." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **92**(16): 7297-7301.
- Boyce, B. F. and L. Xing (2008). "Functions of RANKL/RANK/OPG in bone modeling and remodeling." Archives of biochemistry and biophysics **473**(2): 139-146.
- Bradford, M. M. (1976). "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding." Analytical Biochemistry **72**(1): 248-254.

- Brennan, C. M. and J. A. Steitz* (2001). "HuR and mRNA stability." Cellular and Molecular Life Sciences CMLS **58**(2): 266-277.
- Briata, P., D. Bordo, et al. (2016). "Diverse roles of the nucleic acid-binding protein KHSRP in cell differentiation and disease." Wiley Interdisciplinary Reviews: RNA **7**(2): 227-240.
- Briata, P., C.-Y. Chen, et al. (2013). "Functional and molecular insights into KSRP function in mRNA decay." Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Regulatory Mechanisms **1829**(6): 689-694.
- Briata, P., S. V. Forcales, et al. (2005). "p38-Dependent Phosphorylation of the mRNA Decay-Promoting Factor KSRP Controls the Stability of Select Myogenic Transcripts." Molecular Cell **20**(6): 891-903.
- Briata, P., C. Ilengo, et al. (2003). "The Wnt/ β -Catenin \rightarrow Pitx2 Pathway Controls the Turnover of Pitx2 and Other Unstable mRNAs." Molecular Cell **12**(5): 1201-1211.
- Brisdelli, F., G. D'Andrea, et al. (2009). Resveratrol: a natural polyphenol with multiple chemopreventive properties (Review).
- Brook, M., C. R. Tchen, et al. (2006). "Posttranslational Regulation of Tristetraprolin Subcellular Localization and Protein Stability by p38 Mitogen-Activated Protein Kinase and Extracellular Signal-Regulated Kinase Pathways." Molecular and Cellular Biology **26**(6): 2408-2418.
- Burd, C. G. and G. Dreyfuss (1994). "Conserved structures and diversity of functions of RNA-binding proteins." Science **265**(5172): 615.
- Burke, T. W. and J. T. Kadonaga (1996). "Drosophila TFIID binds to a conserved downstream basal promoter element that is present in many TATA-box-deficient promoters." Genes & Development **10**(6): 711-724.
- Burnette, W. N. (1981). "'Western Blotting': Electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A." Analytical Biochemistry **112**(2): 195-203.
- Cáliz, R., L. M. Canet, et al. (2013). "Gender-Specific Effects of Genetic Variants within Th1 and Th17 Cell-Mediated Immune Response Genes on the Risk of Developing Rheumatoid Arthritis." PLoS ONE **8**(8): e72732.
- Campbell, N. A., J. B. Reece, et al. (2015). Biologie, Pearson Deutschland.
- Caput, D., B. Beutler, et al. (1986). "Identification of a common nucleotide sequence in the 3'-untranslated region of mRNA molecules specifying inflammatory mediators." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **83**(6): 1670-1674.
- Carballo, E. and P. J. Blackshear (2001). "Roles of tumor necrosis factor- α receptor subtypes in the pathogenesis of the tristetraprolin-deficiency syndrome." Blood **98**(8): 2389.
- Carninci, P., A. Sandelin, et al. (2006). "Genome-wide analysis of mammalian promoter architecture and evolution." Nat Genet **38**(6): 626-635.
- Casper, I., S. Nowag, et al. (2013). "Post-transcriptional regulation of the human inducible nitric oxide synthase (iNOS) expression by the cytosolic poly(A)-binding protein (PABP)." Nitric Oxide **33**: 6-17.

- Cawston, T. E. and A. J. Wilson (2006). "Understanding the role of tissue degrading enzymes and their inhibitors in development and disease." Best Practice & Research Clinical Rheumatology **20**(5): 983-1002.
- Ceribelli, A., M. A. Nahid, et al. (2011). "MicroRNAs in Rheumatoid Arthritis." FEBS letters **585**(23): 3667-3674.
- Chaudhury, A., P. Chander, et al. (2010). "Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins (hnRNPs) in cellular processes: Focus on hnRNP E1's multifunctional regulatory roles." RNA **16**(8): 1449-1462.
- Chen, C.-Y., R. Gherzi, et al. (2001). "AU Binding Proteins Recruit the Exosome to Degrade ARE-Containing mRNAs." Cell **107**(4): 451-464.
- Chen, C.-Y. A. and A.-B. Shyu (1995). "AU-rich elements: characterization and importance in mRNA degradation." Trends in Biochemical Sciences **20**(11): 465-470.
- Chomczynski, P. and N. Sacchi (1987). "Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction." Analytical Biochemistry **162**(1): 156-159.
- Chou, C.-F., A. Mulky, et al. (2006). "Tethering KSRP, a Decay-Promoting AU-Rich Element-Binding Protein, to mRNAs Elicits mRNA Decay." Molecular and Cellular Biology **26**(10): 3695-3706.
- Choy, E. (2012). "Understanding the dynamics: pathways involved in the pathogenesis of rheumatoid arthritis." Rheumatology **51**(suppl_5): v3-v11.
- Chu, C., Z. Song, et al. (2003). "IFN γ deficient C57BL/6 (H-2(b)) mice develop collagen induced arthritis with predominant usage of T cell receptor V β 6 and V β 8 in arthritic joints." Annals of the Rheumatic Diseases **62**(10): 983-990.
- Chung, E. Y., B. H. Kim, et al. (2011). "Resveratrol down-regulates interferon- γ -inducible inflammatory genes in macrophages: molecular mechanism via decreased STAT-1 activation." The Journal of Nutritional Biochemistry **22**(10): 902-909.
- Chung, H.-J., J. Liu, et al. (2006). "FBPs Are Calibrated Molecular Tools To Adjust Gene Expression." Molecular and Cellular Biology **26**(17): 6584-6597.
- Consortium, T. E. P. (2004). "The ENCODE (ENCyclopedia Of DNA Elements) Project." Science **306**(5696): 636.
- Core, L. J., A. L. Martins, et al. (2014). "Analysis of nascent RNA identifies a unified architecture of initiation regions at mammalian promoters and enhancers." Nature Genetics **46**: 1311.
- Courtenay, J. S., M. J. Dallman, et al. (1980). Immunisation Against Heterologous Type II Collagen Induces Arthritis in Mice.
- Danckwardt, S., A.-S. Gantzer, et al. (2011). "p38 MAPK Controls Prothrombin Expression by Regulated RNA 3' End Processing." Molecular Cell **41**(3): 298-310.
- Danino, Y. M., D. Even, et al. (2015). "The core promoter: At the heart of gene expression." Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Regulatory Mechanisms **1849**(8): 1116-1131.
- Davidson-Moncada, J., F. N. Papavasiliou, et al. (2010). "MiRNAs of the Immune System: Roles in Inflammation and Cancer." Annals of the New York Academy of Sciences **1183**: 183-194.

- Davies, M. E., H. Sharma, et al. (1992). "ICAM-1 expression on chondrocytes in rheumatoid arthritis: induction by synovial cytokines." Mediators of Inflammation **1**(1): 71-74.
- Davis-Smyth, T., R. C. Duncan, et al. (1996). "The Far Upstream Element-binding Proteins Comprise an Ancient Family of Single-strand DNA-binding Transactivators." Journal of Biological Chemistry **271**(49): 31679-31687.
- Deaton, A. M. and A. Bird (2011). "CpG islands and the regulation of transcription." Genes & Development **25**(10): 1010-1022.
- Delaloy, C., J. Lu, et al. (2003). "Multiple Promoters in the WNK1 Gene: One Controls Expression of a Kidney-Specific Kinase-Defective Isoform." Molecular and Cellular Biology **23**(24): 9208-9221.
- DeMaria, C. T. and G. Brewer (1996). "AUF1 Binding Affinity to A+U-rich Elements Correlates with Rapid mRNA Degradation." Journal of Biological Chemistry **271**(21): 12179-12184.
- Deng, W. and S. G. E. Roberts (2005). "A core promoter element downstream of the TATA box that is recognized by TFIIB." Genes & Development **19**(20): 2418-2423.
- Deniaud, E., J. Baguet, et al. (2009). "Overexpression of Transcription Factor Sp1 Leads to Gene Expression Perturbations and Cell Cycle Inhibition." PLOS ONE **4**(9): e7035.
- Dhamija, S., N. Kuehne, et al. (2011). "Interleukin-1 Activates Synthesis of Interleukin-6 by Interfering with a KH-type Splicing Regulatory Protein (KSRP)-dependent Translational Silencing Mechanism." The Journal of biological chemistry **286**(38): 33279-33288.
- Díaz-Moreno, I., D. Hollingworth, et al. (2009). "PHOSPHORYLATION-MEDIATED UNFOLDING OF A KH DOMAIN REGULATES KSRP LOCALISATION VIA 14-3-3 BINDING." Nature structural & molecular biology **16**(3): 238-246.
- Dignam, J. D., R. M. Lebovitz, et al. (1983). "Accurate transcription initiation by RNA polymerase II in a soluble extract from isolated mammalian nuclei." Nucleic Acids Research **11**(5): 1475-1489.
- Donnelly, L. E., R. Newton, et al. (2004). "Anti-inflammatory effects of resveratrol in lung epithelial cells: molecular mechanisms." American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology **287**(4): L774-L783.
- Drummond, D. R., J. Armstrong, et al. (1985). "The effect of capping and polyadenylation on the stability, movement and translation of synthetic messenger RNAs in *Xenopus* oocytes." Nucleic Acids Research **13**(20): 7375-7394.
- Faraoni, I., F. R. Antonetti, et al. (2009). "miR-155 gene: A typical multifunctional microRNA." Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease **1792**(6): 497-505.
- Fenger-Grøn, M., C. Fillman, et al. (2005). "Multiple Processing Body Factors and the ARE Binding Protein TTP Activate mRNA Decapping." Molecular Cell **20**(6): 905-915.
- Filipowicz, W., S. N. Bhattacharyya, et al. (2008). "Mechanisms of post-transcriptional regulation by microRNAs: are the answers in sight?" Nature Reviews Genetics **9**: 102.
- Firestein, G. S. (2003). "Evolving concepts of rheumatoid arthritis." Nature **423**(6937): 356-361.
- Fischer, A. H., K. A. Jacobson, et al. (2008). "Hematoxylin and Eosin Staining of Tissue and Cell Sections." Cold Spring Harbor Protocols **2008**(5): pdb.prot4986.

- Frey, U. H., H. S. Bachmann, et al. (2008). "PCR-amplification of GC-rich regions: 'slowdown PCR'." Nature Protocols **3**: 1312.
- Fu, T., P. Li, et al. (2009). "c-Rel is a transcriptional repressor of EPHB2 in colorectal cancer." The Journal of Pathology **219**(1): 103-113.
- Fugger, L. and A. Svejgaard (2000). "Association of MHC and rheumatoid arthritis: HLA-DR4 and rheumatoid arthritis - studies in mice and men." Arthritis Research **2**(3): 208-211.
- Fujita, P. A., B. Rhead, et al. (2011). "The UCSC Genome Browser database: update 2011." Nucleic Acids Research **39**(Database issue): D876-D882.
- Furer, V., J. D. Greenberg, et al. (2010). "The role of microRNA in rheumatoid arthritis and other autoimmune diseases." Clinical Immunology **136**(1): 1-15.
- Galbán, S., Y. Kuwano, et al. (2008). "RNA-Binding Proteins HuR and PTB Promote the Translation of Hypoxia-Inducible Factor 1 α ." Molecular and Cellular Biology **28**(1): 93-107.
- García-Mayoral, M. F., I. Díaz-Moreno, et al. (2008). "The sequence selectivity of KSRP explains its flexibility in the recognition of the RNA targets." Nucleic Acids Research **36**(16): 5290-5296.
- García-Mayoral, M. F., D. Hollingworth, et al. (2007). "The Structure of the C-Terminal KH Domains of KSRP Reveals a Noncanonical Motif Important for mRNA Degradation." Structure **15**(4): 485-498.
- Gherzi, R., C.-Y. Chen, et al. (2010). "The role of KSRP in mRNA decay and microRNA precursor maturation." Wiley Interdisciplinary Reviews - RNA **1**(2): 230-239.
- Gherzi, R., K.-Y. Lee, et al. (2004). "A KH Domain RNA Binding Protein, KSRP, Promotes ARE-Directed mRNA Turnover by Recruiting the Degradation Machinery." Molecular Cell **14**(5): 571-583.
- Gherzi, R., M. Trabucchi, et al. (2006). "The RNA-Binding Protein KSRP Promotes Decay of β -Catenin mRNA and Is Inactivated by PI3K-AKT Signaling." PLOS Biology **5**(1): e5.
- Gilbert, C. and J. Q. Svejstrup (2001). RNA Immunoprecipitation for Determining RNA-Protein Associations In Vivo. Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, Inc.
- Glisovic, T., J. L. Bachorik, et al. (2008). "RNA-binding proteins and post-transcriptional gene regulation." FEBS letters **582**(14): 1977-1986.
- Golovine, K., M. Schwerin, et al. (2003). "Three Different Promoters Control Expression of the Aromatase Cytochrome P450 Gene (Cyp19) in Mouse Gonads and Brain1." Biology of Reproduction **68**(3): 978-984.
- Gottfried, E., L. A. Kunz-Schughart, et al. (2008). "Expression of CD68 in Non-Myeloid Cell Types." Scandinavian Journal of Immunology **67**(5): 453-463.
- Graham, F. L., J. Smiley, et al. (1977). "Characteristics of a Human Cell Line Transformed by DNA from Human Adenovirus Type 5." Journal of General Virology **36**(1): 59-72.
- Grimwood, J., L. A. Gordon, et al. (2004). "The DNA sequence and biology of human chromosome 19." Nature **428**: 529.
- Gross, P. and T. Oelgeschläger (2006). Core promoter-selective RNA polymerase II transcription.

- Hall, M. P., S. Huang, et al. (2004). "Differentiation-induced Colocalization of the KH-type Splicing Regulatory Protein with Polypyrimidine Tract Binding Protein and the c-src Pre-mRNA." Molecular Biology of the Cell **15**(2): 774-786.
- Hamelmann, S. (2016). Regulation der Expression von KSRP. **Master of Science**.
- Hammaker, D., S. Sweeney, et al. (2003). "Signal transduction networks in rheumatoid arthritis." Annals of the Rheumatic Diseases **62**(suppl 2): ii86.
- Hampsey, M. (1998). "Molecular Genetics of the RNA Polymerase II General Transcriptional Machinery." Microbiology and Molecular Biology Reviews **62**(2): 465-503.
- Han, Z., D. L. Boyle, et al. (1998). "AP-1 and NF- κ B Regulation in Rheumatoid Arthritis and Murine Collagen-Induced Arthritis." Autoimmunity **28**(4): 197-208.
- Harikumar, K. B. and B. B. Aggarwal (2008). "Resveratrol: A multitargeted agent for age-associated chronic diseases." Cell Cycle **7**(8): 1020-1035.
- He, L., J. Liu, et al. (2000). "Loss of FBP function arrests cellular proliferation and extinguishes c-myc expression." The EMBO Journal **19**(5): 1034-1044.
- He, L., A. Weber, et al. (2000). "Nuclear targeting determinants of the far upstream element binding protein, a c-myc transcription factor." Nucleic Acids Research **28**(22): 4558-4565.
- Higuchi, R., G. Dollinger, et al. (1992). "Simultaneous Amplification and Detection of Specific DNA Sequences." Bio/Technology **10**: 413.
- Hocine, S., R. H. Singer, et al. (2010). "RNA Processing and Export." Cold Spring Harbor perspectives in biology **2**(12): a000752-a000752.
- Hollingworth, D., A. M. Candel, et al. (2012). "KH domains with impaired nucleic acid binding as a tool for functional analysis." Nucleic Acids Research **40**(14): 6873-6886.
- Holmdahl, R., R. Bockermann, et al. (2002). "The molecular pathogenesis of collagen-induced arthritis in mice—a model for rheumatoid arthritis." Ageing Research Reviews **1**(1): 135-147.
- Hornstein, E., H. Harel, et al. (1999). "Overexpression of poly(A)-binding protein down-regulates the translation or the abundance of its own mRNA." FEBS letters **457**(2): 209-213.
- Huin, V., L. Buée, et al. (2017). "Alternative promoter usage generates novel shorter MAPT mRNA transcripts in Alzheimer's disease and progressive supranuclear palsy brains." Scientific Reports **7**(1): 12589.
- Hwang, C. K., Y. Wagley, et al. (2017). "Phosphorylation of poly(rC) binding protein 1 (PCBP1) contributes to stabilization of mu opioid receptor (MOR) mRNA via interaction with AU-rich element RNA-binding protein 1 (AUF1) and poly A binding protein (PABP)." Gene **598**: 113-130.
- Inglis, J. J., G. Criado, et al. (2007). "Collagen-induced arthritis in C57BL/6 mice is associated with a robust and sustained T-cell response to type II collagen." Arthritis Research & Therapy **9**(5): R113-R113.
- Ingolia, N. T. (2016). "Ribosome Footprint Profiling of Translation throughout the Genome." Cell **165**(1): 22-33.
- Inouye, S. and O. Shimomura (1997). "The Use of Renilla Luciferase, Oplophorus Luciferase, and Apoaequorin as Bioluminescent Reporter Protein in the Presence of

- Coelenterazine Analogues as Substrate." Biochemical and Biophysical Research Communications **233**(2): 349-353.
- International Human Genome Sequencing, C. (2001). "Initial sequencing and analysis of the human genome." Nature **409**: 860.
- Jansen, R.-P. (2001). "mRNA localization: message on the move." Nat Rev Mol Cell Biol **2**(4): 247-256.
- Jiang, H., J. Zhang, et al. (2015). "microRNA-185 modulates low density lipoprotein receptor expression as a key posttranscriptional regulator." Atherosclerosis **243**(2): 523-532.
- Jin, B., Y. Li, et al. (2011). "DNA Methylation: Superior or Subordinate in the Epigenetic Hierarchy?" Genes & Cancer **2**(6): 607-617.
- Jing, Q., S. Huang, et al. (2005). Involvement of microRNA in AU-Rich element-mediated mRNA stability.
- Jung, A., S. Ruckert, et al. (2002). "7-Deaza-2'-deoxyguanosine allows PCR and sequencing reactions from CpG islands." Molecular Pathology **55**(1): 55-57.
- Juven-Gershon, T. and J. T. Kadonaga (2010). "Regulation of Gene Expression via the Core Promoter and the Basal Transcriptional Machinery." Developmental biology **339**(2): 225-229.
- Käfer, R., K. Schrick, et al. (2017). "Inactivation of the KSRP gene modifies collagen antibody induced arthritis." Molecular Immunology **87**(Supplement C): 207-216.
- Kagari, T., H. Doi, et al. (2002). "The Importance of IL-1 β and TNF- α , and the Noninvolvement of IL-6, in the Development of Monoclonal Antibody-Induced Arthritis." The Journal of Immunology **169**(3): 1459.
- Kanamori, H., R. E. Dodson, et al. (1998). "In Vitro Genetic Analysis of the RNA Binding Site of Vigilin, a Multi-KH-Domain Protein." Molecular and Cellular Biology **18**(7): 3991-4003.
- Karlseder, J., H. Rotheneder, et al. (1996). "Interaction of Sp1 with the growth- and cell cycle-regulated transcription factor E2F." Molecular and Cellular Biology **16**(4): 1659-1667.
- Kaufmann, J. and S. T. Smale (1994). "Direct recognition of initiator elements by a component of the transcription factor IID complex." Genes & Development **8**(7): 821-829.
- Kelchtermans, H., A. Billiau, et al. (2008). "How interferon- γ keeps autoimmune diseases in check." Trends in Immunology **29**(10): 479-486.
- Kent, W. J., C. W. Sugnet, et al. (2002). "The Human Genome Browser at UCSC." Genome Research **12**(6): 996-1006.
- Kessel, C., D. Holzinger, et al. (2013). "Phagocyte-derived S100 proteins in autoinflammation: Putative role in pathogenesis and usefulness as biomarkers." Clinical Immunology **147**(3): 229-241.
- Khabar, K. S. A. (2005). "The AU-Rich Transcriptome: More Than Interferons and Cytokines, and Its Role in Disease." Journal of Interferon & Cytokine Research **25**(1): 1-10.
- Khachigian, L. M. (2006). "Collagen antibody-induced arthritis." Nat. Protocols **1**(5): 2512-2516.

- Khoury, G. A., R. C. Baliban, et al. (2011). "Proteome-wide post-translational modification statistics: frequency analysis and curation of the swiss-prot database." Scientific Reports **1**: 90.
- Kim, H.-Y., W.-U. Kim, et al. (1999). "Enhanced T cell proliferative response to type II collagen and synthetic peptide CII (255–274) in patients with rheumatoid arthritis." Arthritis & Rheumatism **42**(10): 2085-2093.
- Kim, H. H., Y. Kuwano, et al. (2009). "HuR recruits let-7/RISC to repress c-Myc expression." Genes & Development **23**(15): 1743-1748.
- Kim, T. H., L. O. Barrera, et al. (2005). "A high-resolution map of active promoters in the human genome." Nature **436**(7052): 876-880.
- King, P. H. and C.-Y. Chen (2014). "Role of KSRP in Control of Type I Interferon and Cytokine Expression." Journal of Interferon & Cytokine Research **34**(4): 267-274.
- Kitas, G. D. and S. E. Gabriel (2010). "Cardiovascular disease in rheumatoid arthritis: state of the art and future perspectives." Annals of the Rheumatic Diseases **70**(1): 8.
- Koch, A. E., S. L. Kunkel, et al. (1992). "Enhanced production of monocyte chemoattractant protein-1 in rheumatoid arthritis." Journal of Clinical Investigation **90**(3): 772-779.
- Koukouraki, P. and E. Doxakis (2016). "Constitutive translation of human α -synuclein is mediated by the 5'-untranslated region." Open Biology **6**(4): 160022.
- Kozak, M. (1987). "An analysis of 5'-noncoding sequences from 699 vertebrate messenger RNAs." Nucleic Acids Research **15**(20): 8125-8148.
- Kricka, L. J. and G. H. G. Thorpe (1983). "Chemiluminescent and bioluminescent methods in Analytical Chemistry. A review." Analyst **108**(1292): 1274-1296.
- Krüger, K., J. Wollenhaupt, et al. (2012). "S1-Leitlinie der DGRh zur sequenziellen medikamentösen Therapie der rheumatoiden Arthritis 2012." Zeitschrift für Rheumatologie **71**(7): 592-603.
- Kuhn, R. M., D. Karolchik, et al. (2009). "The UCSC Genome Browser Database: update 2009." Nucleic Acids Research **37**(Database issue): D755-D761.
- Kumar, P. and S. Banik (2013). "Pharmacotherapy Options in Rheumatoid Arthritis." Clinical Medicine Insights. Arthritis and Musculoskeletal Disorders **6**: 35-43.
- Kundu, P., M. R. Fabian, et al. (2012). "HuR protein attenuates miRNA-mediated repression by promoting miRISC dissociation from the target RNA." Nucleic Acids Research **40**(11): 5088-5100.
- Kung, Y.-A., C.-T. Hung, et al. (2017). "Control of the negative IRES trans-acting factor KHSRP by ubiquitination." Nucleic Acids Research **45**(1): 271-287.
- Kurowska-Stolarska, M., S. Alivernini, et al. (2011). "MicroRNA-155 as a proinflammatory regulator in clinical and experimental arthritis." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **108**(27): 11193-11198.
- Labrie, S. J., J. E. Samson, et al. (2010). "Bacteriophage resistance mechanisms." Nature Reviews Microbiology **8**: 317.
- Laemmli, U. K. (1970). "Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4." Nature **227**(5259): 680-685.

- Lagrange, T., A. N. Kapanidis, et al. (1998). "New core promoter element in RNA polymerase II-dependent transcription: sequence-specific DNA binding by transcription factor IIB." Genes & Development **12**(1): 34-44.
- Lai, W. S., E. Carballo, et al. (1999). "Evidence that Tristetraprolin Binds to AU-Rich Elements and Promotes the Deadenylation and Destabilization of Tumor Necrosis Factor Alpha mRNA." Molecular and Cellular Biology **19**(6): 4311-4323.
- Lal, A., K. Mazan-Mamczarz, et al. (2004). "Concurrent versus individual binding of HuR and AUF1 to common labile target mRNAs." The EMBO Journal **23**(15): 3092-3102.
- Landolin, J. M., D. S. Johnson, et al. (2010). "Sequence features that drive human promoter function and tissue specificity." Genome Research **20**(7): 890-898.
- Langcake, P. and R. J. Pryce (1976). "The production of resveratrol by *Vitis vinifera* and other members of the Vitaceae as a response to infection or injury." Physiological Plant Pathology **9**(1): 77-86.
- Larsen, F., G. Gundersen, et al. (1992). "CpG islands as gene markers in the human genome." Genomics **13**(4): 1095-1107.
- Lazzerini, P. E., P. L. Capecchi, et al. (2017). "Systemic inflammation and arrhythmic risk: lessons from rheumatoid arthritis." European Heart Journal **38**(22): 1717-1727.
- Lee, P. Y., J.-X. Wang, et al. (2013). "Ly6 family proteins in neutrophil biology." Journal of Leukocyte Biology **94**(4): 585-594.
- Lellek, H., R. Kirsten, et al. (2000). "Purification and Molecular Cloning of a Novel Essential Component of the Apolipoprotein B mRNA Editing Enzyme-Complex." Journal of Biological Chemistry **275**(26): 19848-19856.
- Leppek, K., R. Das, et al. (2017). "Functional 5' UTR mRNA structures in eukaryotic translation regulation and how to find them." Nature Reviews Molecular Cell Biology.
- Léveillé, N., C. A. Melo, et al. (2015). "Enhancer-associated RNAs as therapeutic targets." Expert Opinion on Biological Therapy **15**(5): 723-734.
- Li, B., M. Carey, et al. (2007). "The Role of Chromatin during Transcription." Cell **128**(4): 707-719.
- Li, X., W.-J. Lin, et al. (2012). "KSRP: A Checkpoint for Inflammatory Cytokine Production in Astrocytes." Glia **60**(11): 1773-1784.
- Lifton, R. P., M. L. Goldberg, et al. (1978). "The Organization of the Histone Genes in *Drosophila melanogaster*: Functional and Evolutionary Implications." Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology **42**: 1047-1051.
- Lim, C. Y., B. Santoso, et al. (2004). "The MTE, a new core promoter element for transcription by RNA polymerase II." Genes & Development **18**(13): 1606-1617.
- Lin, J.-Y., M.-L. Li, et al. (2009). "Far upstream element binding protein 2 interacts with enterovirus 71 internal ribosomal entry site and negatively regulates viral translation." Nucleic Acids Research **37**(1): 47-59.
- Lin, W.-J., X. Zheng, et al. (2011). "Posttranscriptional Control of Type I Interferon Genes by KSRP in the Innate Immune Response against Viral Infection." Molecular and Cellular Biology **31**(16): 3196-3207.

- Linker, K., A. Pautz, et al. (2005). "Involvement of KSRP in the post-transcriptional regulation of human iNOS expression—complex interplay of KSRP with TTP and HuR." Nucleic Acids Research **33**(15): 4813-4827.
- Linton, S. M. and B. P. Morgan (1999). "Complement activation and inhibition in experimental models of arthritis." Molecular Immunology **36**(13): 905-914.
- Livak, K. J. and T. D. Schmittgen (2001). "Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT Method." Methods **25**(4): 402-408.
- Lu, J.-Y., N. Sadri, et al. (2006). "Endotoxic shock in AUF1 knockout mice mediated by failure to degrade proinflammatory cytokine mRNAs." Genes & Development **20**(22): 3174-3184.
- Lu, L. D., K. L. Stump, et al. (2010). "Novel Method of Monitoring Trace Cytokines and Activated STAT Molecules in the Paws of Arthritic Mice using Multiplex Bead Technology." BMC Immunology **11**(1): 55.
- Luross, J. A. and N. A. Williams (2001). "The genetic and immunopathological processes underlying collagen-induced arthritis." Immunology **103**(4): 407-416.
- MacFarlane, L.-A. and P. R. Murphy (2010). "MicroRNA: Biogenesis, Function and Role in Cancer." Current Genomics **11**(7): 537-561.
- Majello, B., P. De Luca, et al. (1995). "Differential transcriptional regulation of c-myc promoter through the same DNA binding sites targeted by Sp1-like proteins." Oncogene **10**(9): 1841-1848.
- Malemud, C. J. (2007). "Growth hormone, VEGF and FGF: Involvement in rheumatoid arthritis." Clinica Chimica Acta **375**(1): 10-19.
- Malemud, C. J. (2007). "Inhibitors of stress-activated protein/mitogen-activated protein kinase pathways." Current Opinion in Pharmacology **7**(3): 339-343.
- Malouf, G. G., X. Su, et al. (2014). "Next-generation sequencing of translocation renal cell carcinoma reveals novel RNA splicing partners and frequent mutations of chromatin remodeling genes." Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research **20**(15): 4129-4140.
- Malz, M., A. Weber, et al. (2009). "Overexpression of far upstream element binding proteins: A mechanism regulating proliferation and migration in liver cancer cells." Hepatology **50**(4): 1130-1139.
- Manzella, J. M. and P. J. Blackshear (1990). "Regulation of rat ornithine decarboxylase mRNA translation by its 5'-untranslated region." Journal of Biological Chemistry **265**(20): 11817-11822.
- Mathsson, L., J. Lampa, et al. (2006). "Immune complexes from rheumatoid arthritis synovial fluid induce Fc γ RIIa dependent and rheumatoid factor correlated production of tumour necrosis factor- α by peripheral blood mononuclear cells." Arthritis Research & Therapy **8**(3): R64-R64.
- Meng, Y., Q.-Y. Ma, et al. (2005). "Effect of resveratrol on activation of nuclear factor kappa-B and inflammatory factors in rat model of acute pancreatitis." World Journal of Gastroenterology : WJG **11**(4): 525-528.
- Mignone, F., C. Gissi, et al. (2002). "Untranslated regions of mRNAs." Genome Biology **3**(3): reviews0004.0001.

- Millard, S. S., A. Vidal, et al. (2000). "A U-Rich Element in the 5' Untranslated Region Is Necessary for the Translation of p27 mRNA." Molecular and Cellular Biology **20**(16): 5947-5959.
- Milligan, J. F., D. R. Groebe, et al. (1987). "Oligoribonucleotide synthesis using T7 RNA polymerase and synthetic DNA templates." Nucleic Acids Research **15**(21): 8783-8798.
- Min, H., C. W. Turck, et al. (1997). "A new regulatory protein, KSRP, mediates exon inclusion through an intronic splicing enhancer." Genes & Development **11**(8): 1023-1036.
- Mitchell, P. J. and R. Tjian (1989). "Transcriptional regulation in mammalian cells by sequence-specific DNA binding proteins." Science **245**(4916): 371.
- Mitchelson, K. R. and W.-Y. Qin (2015). "Roles of the canonical myomiRs miR-1, -133 and -206 in cell development and disease." World Journal of Biological Chemistry **6**(3): 162-208.
- Mitroulis, I., V. I. Alexaki, et al. (2015). "Leukocyte integrins: Role in leukocyte recruitment and as therapeutic targets in inflammatory disease." Pharmacology & therapeutics **0**: 123-135.
- Mo, J. A., A. Scheynius, et al. (1994). "Germline-Encoded IgG Antibodies Bind Mouse Cartilage In Vivo: Epitope- and Idiotype-Specific Binding and Inhibition." Scandinavian Journal of Immunology **39**(2): 122-130.
- Montminy, M. R., K. A. Sevarino, et al. (1986). "Identification of a cyclic-AMP-responsive element within the rat somatostatin gene." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **83**(18): 6682-6686.
- Mukherjee, N., P. J. Lager, et al. (2009). "Coordinated posttranscriptional mRNA population dynamics during T-cell activation." Molecular Systems Biology **5**: 288-288.
- Müller, F., M. A. Demény, et al. (2007). "New Problems in RNA Polymerase II Transcription Initiation: Matching the Diversity of Core Promoters with a Variety of Promoter Recognition Factors." Journal of Biological Chemistry **282**(20): 14685-14689.
- Munk, K. (2010). Taschenlehrbuch Biologie, Genetik, Thieme.
- Nagarajan, V. K., C. I. Jones, et al. (2013). "XRN 5'→3' exoribonucleases: Structure, mechanisms and functions." Biochimica et biophysica acta **1829**(0): 590-603.
- Naldini, L., U. Blömer, et al. (1996). "In Vivo Gene Delivery and Stable Transduction of Nondividing Cells by a Lentiviral Vector." Science **272**(5259): 263.
- Nandakumar, K. S., J. Bäcklund, et al. (2004). "Collagen type II (CII)-specific antibodies induce arthritis in the absence of T or B cells but the arthritis progression is enhanced by CII-reactive T cells." Arthritis Research & Therapy **6**(6): R544-R550.
- Nandakumar, K. S., L. Svensson, et al. (2003). "Collagen Type II-Specific Monoclonal Antibody-Induced Arthritis in Mice : Description of the Disease and the Influence of Age, Sex, and Genes." The American Journal of Pathology **163**(5): 1827-1837.
- Nechama, M., T. Uchida, et al. (2009). "The peptidyl-prolyl isomerase Pin1 determines parathyroid hormone mRNA levels and stability in rat models of secondary hyperparathyroidism." The Journal of Clinical Investigation **119**(10): 3102-3114.

- Nguyen-Chi, M. and D. Morello (2008). "Contribution de la régulation post-transcriptionnelle à l'émergence de maladies: l'enfance de l'ARE." Medecine sciences : M/S **24**(3): 290-296.
- Ni, T., D. L. Corcoran, et al. (2010). "A paired-end sequencing strategy to map the complex landscape of transcription initiation." Nature methods **7**(7): 521-527.
- O'Malley, B. W., H. C. Towle, et al. (1977). "Regulation of Gene Expression in Eucaryotes." Annual Review of Genetics **11**(1): 239-275.
- Obrig, T. G., W. J. Culp, et al. (1971). "The Mechanism by which Cycloheximide and Related Glutarimide Antibiotics Inhibit Peptide Synthesis on Reticulocyte Ribosomes." Journal of Biological Chemistry **246**(1): 174-181.
- Oh, Y.-C., O.-H. Kang, et al. (2009). "Anti-Inflammatory Effect of Resveratrol by Inhibition of IL-8 Production in LPS-Induced THP-1 Cells." The American Journal of Chinese Medicine **37**(06): 1203-1214.
- Ong, C. K., C. Leong, et al. (2006). "The role of 5[prime] untranslated region in translational suppression of OKL38 mRNA in hepatocellular carcinoma." Oncogene **26**(8): 1155-1165.
- Orphanides, G., T. Lagrange, et al. (1996). "The general transcription factors of RNA polymerase II." Genes & Development **10**(21): 2657-2683.
- Osborn, L., S. Kunkel, et al. (1989). "Tumor necrosis factor alpha and interleukin 1 stimulate the human immunodeficiency virus enhancer by activation of the nuclear factor kappa B." Proceedings of the National Academy of Sciences **86**(7): 2336-2340.
- Pan, M., I. Kang, et al. (2004). "Resistance to Development of Collagen-Induced Arthritis in C57BL/6 Mice Is Due to a Defect in Secondary, but Not in Primary, Immune Response." Journal of Clinical Immunology **24**(5): 481-491.
- Panda, A. C., J. L. Martindale, et al. (2016). "Affinity Pulldown of Biotinylated RNA for Detection of Protein-RNA Complexes." Bio-protocol **6**(24): e2062.
- Park, S.-J., F. Ahmad, et al. (2012). "Resveratrol Ameliorates Aging-Related Metabolic Phenotypes by Inhibiting cAMP Phosphodiesterases." Cell **148**(3): 421-433.
- Pasero, M., M. Giovarelli, et al. (2012). "Bone Morphogenetic Protein/SMAD Signaling Orients Cell Fate Decision by Impairing KSRP-Dependent MicroRNA Maturation." Cell Reports **2**(5): 1159-1168.
- Patrick, R., K.-A. L. Cao, et al. (2012). "Mapping the stabilome: a novel computational method for classifying metabolic protein stability." BMC Systems Biology **6**: 60-60.
- Paule, M. R. and R. J. White (2000). "Transcription by RNA polymerases I and III." Nucleic Acids Research **28**(6): 1283-1298.
- Pauley, K. M., M. Satoh, et al. (2008). "Upregulated miR-146a expression in peripheral blood mononuclear cells from rheumatoid arthritis patients." Arthritis Research & Therapy **10**(4): R101-R101.
- Pautz, A., K. Linker, et al. (2006). "The Polypyrimidine Tract-binding Protein (PTB) Is Involved in the Post-transcriptional Regulation of Human Inducible Nitric Oxide Synthase Expression." Journal of Biological Chemistry **281**(43): 32294-32302.
- Pavkova Goldbergova, M., J. Lipkova, et al. (2012). "RANTES, MCP-1 chemokines and factors describing rheumatoid arthritis." Molecular Immunology **52**(3): 273-278.

- Pelletier, J. and N. Sonenberg (1985). "Insertion mutagenesis to increase secondary structure within the 5' noncoding region of a eukaryotic mRNA reduces translational efficiency." Cell **40**(3): 515-526.
- Peng, S. S., C. Y. Chen, et al. (1996). "Functional characterization of a non-AUUUA AU-rich element from the c-jun proto-oncogene mRNA: evidence for a novel class of AU-rich elements." Molecular and cellular biology **16**(4): 1490-1499.
- Peng, S. S., C. Y. Chen, et al. (1998). "RNA stabilization by the AU-rich element binding protein, HuR, an ELAV protein." The EMBO Journal **17**(12): 3461-3470.
- Pesole, G., F. Mignone, et al. (2001). "Structural and functional features of eukaryotic mRNA untranslated regions." Gene **276**(1): 73-81.
- Pickering, B. M. and A. E. Willis (2005). "The implications of structured 5' untranslated regions on translation and disease." Seminars in Cell & Developmental Biology **16**(1): 39-47.
- Pillai, R. S., S. N. Bhattacharyya, et al. (2007). "Repression of protein synthesis by miRNAs: how many mechanisms?" Trends in Cell Biology **17**(3): 118-126.
- Pitzalis, C., G. Kingsley, et al. (1994). "Adhesion molecules in rheumatoid arthritis: role in the pathogenesis and prospects for therapy." Annals of the Rheumatic Diseases **53**(5): 287-288.
- Pullmann, R., H. H. Kim, et al. (2007). "Analysis of Turnover and Translation Regulatory RNA-Binding Protein Expression through Binding to Cognate mRNAs." Molecular and Cellular Biology **27**(18): 6265-6278.
- Puppo, M., G. Bucci, et al. (2016). "miRNA-Mediated KHSRP Silencing Rewires Distinct Post-transcriptional Programs during TGF- β -Induced Epithelial-to-Mesenchymal Transition." Cell Reports **16**(4): 967-978.
- Qin, J. Y., L. Zhang, et al. (2010). "Systematic Comparison of Constitutive Promoters and the Doxycycline-Inducible Promoter." PLOS ONE **5**(5): e10611.
- Raisz, L. G. (1999). "Physiology and Pathophysiology of Bone Remodeling." Clinical Chemistry **45**(8): 1353.
- Ravetch, J. V. and R. A. Clynes (1998). "DIVERGENT ROLES FOR Fc RECEPTORS AND COMPLEMENT IN VIVO." Annual Review of Immunology **16**(1): 421-432.
- Ray, A. and B. N. Dittel (2010). "Isolation of Mouse Peritoneal Cavity Cells." Journal of Visualized Experiments : JoVE(35): 1488.
- Recillas-Targa, F. (2006). "Multiple strategies for gene transfer, expression, knockdown, and chromatin influence in mammalian cell lines and transgenic animals." Molecular Biotechnology **34**(3): 337-354.
- Richter, C., J. T. Chang, et al. (2012). "Function and Regulation of Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats (CRISPR) / CRISPR Associated (Cas) Systems." Viruses **4**(10): 2291-2311.
- Ring, H. Z., V. Vameghi-Meyers, et al. (1999). "Mapping of the KHSRP Gene to a Region of Conserved Synteny on Human Chromosome 19p13.3 and Mouse Chromosome 17." Genomics **56**(3): 350-352.
- Rodrigo, R., A. Miranda, et al. (2011). "Modulation of endogenous antioxidant system by wine polyphenols in human disease." Clinica Chimica Acta **412**(5): 410-424.

- Rosenbloom, K. R., T. R. Dreszer, et al. (2010). "ENCODE whole-genome data in the UCSC Genome Browser." Nucleic Acids Research **38**(Database issue): D620-D625.
- Ruggiero, T., M. Trabucchi, et al. (2009). "LPS induces KH-type splicing regulatory protein-dependent processing of microRNA-155 precursors in macrophages." The FASEB Journal **23**(9): 2898-2908.
- Sadakerska-Chudy, A. and M. Filip (2015). "A Comprehensive View of the Epigenetic Landscape. Part II: Histone Post-translational Modification, Nucleosome Level, and Chromatin Regulation by ncRNAs." Neurotoxicity Research **27**: 172-197.
- Saiki, R. K., D. H. Gelfand, et al. (1988). "Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase." Science **239**(4839): 487.
- Sánchez-Jiménez, F. and V. Sánchez-Margalet (2013). "Role of Sam68 in Post-Transcriptional Gene Regulation." International Journal of Molecular Sciences **14**(12): 23402-23419.
- Santarosa, M., L. Del Col, et al. (2010). "BRCA1 modulates the expression of hnRNPA2B1 and KHSRP." Cell Cycle **9**(23): 4666-4673.
- Saxonov, S., P. Berg, et al. (2006). "A genome-wide analysis of CpG dinucleotides in the human genome distinguishes two distinct classes of promoters." Proceedings of the National Academy of Sciences **103**(5): 1412-1417.
- Schellekens, G. A., B. A. de Jong, et al. (1998). "Citruiline is an essential constituent of antigenic determinants recognized by rheumatoid arthritis-specific autoantibodies." Journal of Clinical Investigation **101**(1): 273-281.
- Schett, G. and S. L. Teitelbaum (2009). "Osteoclasts and Arthritis." Journal of Bone and Mineral Research **24**(7): 1142-1146.
- Schmidt, N., J. Art, et al. (2012). "The Anti-Inflammatory Fungal Compound (S)-Curvularin Reduces Proinflammatory Gene Expression in an In Vivo Model of Rheumatoid Arthritis." Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics **343**(1): 106.
- Schmidtke, L. (2014). Systemischer Lupus Erythematodes- Die Bedeutung von KSRP für die Expression krankheitsrelevanter Zytokine und neue pharmakologische Therapieansätze. **Master of Science**.
- Schulze-Koops, H. and J. R. Kalden (2002). The balance of Th1/Th2 cytokines in rheumatoid arthritis.
- Sebai, H., E. Ristorcelli, et al. (2010). "Protective effect of resveratrol against LPS-induced extracellular lipoperoxidation in AR42J cells partly via a Myd88-dependent signaling pathway." Archives of Biochemistry and Biophysics **495**(1): 56-61.
- Sehgal, P. B., J. E. Darnell, et al. (1976). "The inhibition of DRB (5,6-dichloro-1-β-d-ribofuranosylbenzimidazole) of hnRNA and mRNA production in HeLa cells." Cell **9**(3): 473-480.
- Sehnert, B., A. Cavcic, et al. (2004). "Antileukoproteinase: Modulation of neutrophil function and therapeutic effects on anti-type II collagen antibody-induced arthritis." Arthritis & Rheumatism **50**(7): 2347-2359.
- Sherer, Y. and Y. Shoenfeld (2006). "Mechanisms of Disease: atherosclerosis in autoimmune diseases." Nat Clin Pract Rheum **2**(2): 99-106.

- Shi, S., J. Zhao, et al. (2015). "KHSRP Participates in Manganese-Induced Neurotoxicity in Rat Striatum and PC12 Cells." Journal of Molecular Neuroscience **55**(2): 454-465.
- Silman, A. J. and J. E. Pearson (2002). "Epidemiology and genetics of rheumatoid arthritis." Arthritis Research & Therapy **4**(3): S265.
- Smale, S. T. (1997). "Transcription initiation from TATA-less promoters within eukaryotic protein-coding genes." Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Structure and Expression **1351**(1): 73-88.
- Smale, S. T. and D. Baltimore (1989). "The "initiator" as a transcription control element." Cell **57**(1): 103-113.
- Smale, S. T. and J. T. Kadonaga (2003). "The RNA Polymerase II Core Promoter." Annual Review of Biochemistry **72**(1): 449-479.
- Smale, S. T., M. C. Schmidt, et al. (1990). "Transcriptional activation by Sp1 as directed through TATA or initiator: specific requirement for mammalian transcription factor IID." Proceedings of the National Academy of Sciences **87**(12): 4509-4513.
- Smolen, J. S., D. Aletaha, et al. (2007). "New therapies for treatment of rheumatoid arthritis." The Lancet **370**(9602): 1861-1874.
- Sonenberg, N. and A. G. Hinnebusch (2009). "Regulation of Translation Initiation in Eukaryotes: Mechanisms and Biological Targets." Cell **136**(4): 731-745.
- Springer, T. A. (1990). "Adhesion receptors of the immune system." Nature **346**: 425.
- Stanczyk, J., D. M. L. Pedrioli, et al. (2008). "Altered expression of MicroRNA in synovial fibroblasts and synovial tissue in rheumatoid arthritis." Arthritis & Rheumatism **58**(4): 1001-1009.
- Stastny, P. (1978). "Association of the B-Cell Alloantigen DRw4 with Rheumatoid Arthritis." New England Journal of Medicine **298**(16): 869-871.
- Strahl, B. D. and C. D. Allis (2000). "The language of covalent histone modifications." Nature **403**: 41.
- Stuart, J. M. and F. J. Dixon (1983). "Serum transfer of collagen-induced arthritis in mice." The Journal of Experimental Medicine **158**(2): 378.
- Suzuki, M. M., A. R. W. Kerr, et al. (2007). "CpG methylation is targeted to transcription units in an invertebrate genome." Genome Research **17**(5): 625-631.
- Svensson, L., J. Jirholt, et al. (1998). "B cell-deficient mice do not develop type II collagen-induced arthritis (CIA)." Clinical and Experimental Immunology **111**(3): 521-526.
- Szekanecz, Z., J. Kim, et al. (2003). "Chemokines and chemokine receptors in rheumatoid arthritis." Seminars in Immunology **15**(1): 15-21.
- Szekanecz, Z., A. Vegvari, et al. (2010). "Chemokines and chemokine receptors in arthritis." Frontiers in bioscience (Scholar edition) **2**: 153-167.
- Tadesse, H., J. Deschênes-Furry, et al. (2008). "KH-type splicing regulatory protein interacts with survival motor neuron protein and is misregulated in spinal muscular atrophy." Human Molecular Genetics **17**(4): 506-524.
- Taylor, G. A., E. Carballo, et al. (1996). "A Pathogenetic Role for TNF α in the Syndrome of Cachexia, Arthritis, and Autoimmunity Resulting from Tristetraprolin (TTP) Deficiency." Immunity **4**(5): 445-454.

- Tchen, C. R., M. Brook, et al. (2004). "The Stability of Tristetraprolin mRNA Is Regulated by Mitogen-activated Protein Kinase p38 and by Tristetraprolin Itself." Journal of Biological Chemistry **279**(31): 32393-32400.
- Terato, K., D. S. Harper, et al. (1995). "Collagen-Induced Arthritis in Mice: Synergistic Effect of E. Coli Lipopolysaccharide Bypasses Epitope Specificity in the Induction of Arthritis with Monoclonal Antibodies to Type II Collagen." Autoimmunity **22**(3): 137-147.
- Towbin, H., T. Staehelin, et al. (1979). "Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **76**(9): 4350-4354.
- Trabucchi, M., P. Briata, et al. (2009). "The RNA-binding Protein KSRP Promotes the Biogenesis of a Subset of miRNAs." Nature **459**(7249): 1010-1014.
- Trentham, D. E. (1982). "Collagen arthritis as a relevant model for rheumatoid arthritis. evidence pro and con." Arthritis & Rheumatism **25**(8): 911-916.
- Tristan, C., N. Shahani, et al. (2011). "The diverse functions of GAPDH: views from different subcellular compartments." Cellular signalling **23**(2): 317-323.
- Trivedi, M. V., J. S. Laurence, et al. (2009). "The role of thiols and disulfides in protein chemical and physical stability." Current protein & peptide science **10**(6): 614-625.
- Truett, G. E., P. Heeger, et al. (2000). Preparation of PCR quality mouse genomic DNA with hot sodium hydroxide and Tris (HotSHOT).
- Ulgianti, D., C. Pham, et al. (2002). "Functional Analysis of the Human Complement Receptor 2 (CR2/CD21) Promoter: Characterization of Basal Transcriptional Mechanisms." The Journal of Immunology **168**(12): 6279.
- van der Velden, A. W. and A. A. M. Thomas (1999). "The role of the 5' untranslated region of an mRNA in translation regulation during development." The International Journal of Biochemistry & Cell Biology **31**(1): 87-106.
- Varshavsky, A. (1997). "The N-end rule pathway of protein degradation." Genes to Cells **2**(1): 13-28.
- Veale, D. J. and C. Maple (1996). "Cell Adhesion Molecules in Rheumatoid Arthritis." Drugs & Aging **9**(2): 87-92.
- Versteeg, R., B. D. C. van Schaik, et al. (2003). "The Human Transcriptome Map Reveals Extremes in Gene Density, Intron Length, GC Content, and Repeat Pattern for Domains of Highly and Weakly Expressed Genes." Genome Research **13**(9): 1998-2004.
- Vlasova-St. Louis, I. and P. R. Bohjanen (2014). "Post-Transcriptional Regulation of Cytokine Signaling by AU-Rich and GU-Rich Elements." Journal of Interferon & Cytokine Research **34**(4): 233-241.
- Vlasova, I. A. and P. R. Bohjanen (2008). "Posttranscriptional regulation of gene networks by GU-rich elements and CELF proteins." RNA biology **5**(4): 201-207.
- Voulgari, P. V. and A. A. Drosos (2008). "Catastrophic Rheumatoid Arthritis." The Journal of Rheumatology **35**(10): 2062.
- Wang, S.-A., J.-Y. Chuang, et al. (2009). "Heat Shock Protein 90 Is Important for Sp1 Stability during Mitosis." Journal of Molecular Biology **387**(5): 1106-1119.

- Wang, Y., J. Kristan, et al. (2000). "A Role for Complement in Antibody-Mediated Inflammation: C5-Deficient DBA/1 Mice Are Resistant to Collagen-Induced Arthritis." The Journal of Immunology **164**(8): 4340.
- Wang, Z., N. Day, et al. (1999). "An mRNA Stability Complex Functions with Poly(A)-Binding Protein To Stabilize mRNA In Vitro." Molecular and Cellular Biology **19**(7): 4552-4560.
- Wessel, D. and U. I. Flügge (1984). "A method for the quantitative recovery of protein in dilute solution in the presence of detergents and lipids." Analytical Biochemistry **138**(1): 141-143.
- Wightman, B., I. Ha, et al. (1993). "Posttranscriptional regulation of the heterochronic gene lin-14 by lin-4 mediates temporal pattern formation in *C. elegans*." Cell **75**(5): 855-862.
- Williams, A. H., G. Valdez, et al. (2009). "MicroRNA-206 Delays ALS Progression and Promotes Regeneration of Neuromuscular Synapses in Mice." Science (New York, N.Y.) **326**(5959): 1549-1554.
- Winzen, R., B. K. Thakur, et al. (2007). "Functional Analysis of KSRP Interaction with the AU-Rich Element of Interleukin-8 and Identification of Inflammatory mRNA Targets." Molecular and Cellular Biology **27**(23): 8388-8400.
- Wooley, P., H. Luthra, et al. (1981). Type II collagen-induced arthritis in mice. I. Major histocompatibility complex (I region) linkage and antibody correlates.
- Wu, K. K. (2006). Analysis of Protein-DNA Binding by Streptavidin-Agarose Pulldown. Gene Mapping, Discovery, and Expression: Methods and Protocols. M. Bina. Totowa, NJ, Humana Press: 281-290.
- Xu, J.-W., S. Ling, et al. (2017). "Higher-Order Chromatin Regulation of Inflammatory Gene Expression." Mediators of Inflammation **2017**: 7848591.
- Xu, N., C. Y. Chen, et al. (1997). "Modulation of the fate of cytoplasmic mRNA by AU-rich elements: key sequence features controlling mRNA deadenylation and decay." Molecular and Cellular Biology **17**(8): 4611-4621.
- Yamashita, A., T.-C. Chang, et al. (2005). "Concerted action of poly(A) nucleases and decapping enzyme in mammalian mRNA turnover." Nat Struct Mol Biol **12**(12): 1054-1063.
- Yang, F., Y. Peng, et al. (2004). "Endonuclease-mediated mRNA Decay Requires Tyrosine Phosphorylation of Polysomal Ribonuclease 1 (PMR1) for the Targeting and Degradation of Polyribosome-bound Substrate mRNA." The Journal of biological chemistry **279**(47): 48993-49002.
- Yang, J., J. Fan, et al. (2013). "Genome-Wide RNAi Screening Identifies Genes Inhibiting the Migration of Glioblastoma Cells." PLOS ONE **8**(4): e61915.
- Yen, H.-C. S., Q. Xu, et al. (2008). "Global Protein Stability Profiling in Mammalian Cells." Science **322**(5903): 918.
- Yeung, F., J. E. Hoberg, et al. (2004). "Modulation of NF- κ B-dependent transcription and cell survival by the SIRT1 deacetylase." The EMBO Journal **23**(12): 2369-2380.
- Yip, K. Y., C. Cheng, et al. (2012). "Classification of human genomic regions based on experimentally determined binding sites of more than 100 transcription-related factors." Genome Biology **13**(9): R48-R48.

- Yu, W., Y.-C. Fu, et al. (2012). "Cellular and molecular effects of resveratrol in health and disease." Journal of Cellular Biochemistry **113**(3): 752-759.
- Zhang, X., R. Goncalves, et al. (2008). "The Isolation and Characterization of Murine Macrophages." Current protocols in immunology / edited by John E. Coligan ... [et al.] **CHAPTER**: Unit-14.11.
- Zhang, X., G. Wan, et al. (2011). "The ATM Kinase Induces MicroRNA Biogenesis in the DNA Damage Response." Molecular Cell **41**(4): 371-383.
- Zhao, H., X. Wang, et al. (2017). "KSRP specifies monocytic and granulocytic differentiation through regulating miR-129 biogenesis and RUNX1 expression." Nature Communications **8**(1): 1428.
- Zhou, R., A.-Y. Gong, et al. (2012). "miR-27b Targets KSRP to Coordinate TLR4-Mediated Epithelial Defense against *Cryptosporidium parvum* Infection." PLOS Pathogens **8**(5): e1002702.
- Zhou, V. W., A. Goren, et al. (2010). "Charting histone modifications and the functional organization of mammalian genomes." Nature Reviews Genetics **12**: 7.
- Zhu, J., F. He, et al. (2008). "On the nature of human housekeeping genes." Trends in Genetics **24**(10): 481-484.
- Zong, Y., L. Sun, et al. (2012). "Resveratrol Inhibits LPS-Induced MAPKs Activation via Activation of the Phosphatidylinositol 3-Kinase Pathway in Murine RAW 264.7 Macrophage Cells." PLOS ONE **7**(8): e44107.
- Zou, J., D. Tran, et al. (2015). "An internal promoter underlies the difference in disease severity between N- and C-terminal truncation mutations of Titin in zebrafish." eLife **4**: e09406.
- Zubaidah, R. M., G. S. Tan, et al. (2008). "2-D DIGE profiling of hepatocellular carcinoma tissues identified isoforms of far upstream binding protein (FUBP) as novel candidates in liver carcinogenesis." Proteomics **8**(23-24): 5086-5096.
- Zydowicz-Machtel, P., A. Swiatkowska, et al. (2018). "Variants of the 5'-terminal region of p53 mRNA influence the ribosomal scanning and translation efficiency." Scientific Reports **8**: 1533.

Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig angefertigt und nur die in der Arbeit ausdrücklich benannten Quellen und Hilfsmittel benutzt habe. Wörtlich oder sinngemäß übernommenes Gedankengut, einschließlich zugänglicher Daten aus dem Internet, ist als solches kenntlich gemacht.

(Datum, Ort)

(Unterschrift)

Publikationen

Im Rahmen dieser Arbeit entstanden folgende Veröffentlichungen:

Originalarbeiten

- 2017 Käfer R, Schmidtke L, **Schrick K**, Montermann E, Bros M, Kleinert H, Pautz A; The RNA binding protein KSRP affects T cell functions; in Vorbereitung
- 2017 Käfer R and **Schrick K** (contributed equally), Schmidtke L, Montermann E, Hobernik D, Bros M, Chen C-Y, Kleinert H, Pautz A; Inactivation of the KSRP gene modifies collagen antibody induced arthritis; *Molecular Immunology*; 87: 207-216
- 2015 Bollmann F, Jäckel S, Schmidtke L, **Schrick K**, Reinhardt C, Jurk K, Wu Z, Xia N, Li H, Erkel G, Walter U, Kleinert H, Pautz A; Anti-inflammatory and anti-thrombotic effects of the fungal metabolite Galiellalactone in Apolipoprotein E-deficient mice; *PLoS ONE* 10(6): e0130401
- 2014 Bollmann F and Art J, Henke J, **Schrick K**, Besche V, Bros M, Li H, Siuda D, Handler N, Bauer F, Erker T, Behnke F, Mönch B, Härdle L, Hoffmann M, Chen C-Y, Förstermann U, Dirsch V, Werz O, Kleinert H, Pautz A; Resveratrol post-transcriptionally regulates pro-inflammatory gene expression via regulation of KSRP RNA binding activity; *Nucleic Acids Research*; 42(10): 12555-12569

Abstracts / Vorträge

- 2017 **Schrick K**, Hamelmann Stefan, Schmidtke L, Art J, Kleinert H, Pautz A; The KSRP expression is affected by transcriptional and post-transcriptional mechanisms; 83. Jahrestagung der German Society for Experimental and Clinical Pharmacology and Toxicology
- 2015 **Schrick K**, Bollmann F and Art J, Henke J, Besche V, Bros M, Li H, Siuda D, Handler N, Bauer F, Erker T, Behnke F, Mönch B, Härdle L, Hoffmann M, Chen C-Y, Förstermann U, Dirsch V, Werz O, Kleinert H, Pautz A; Resveratrol regulates gene expression of pro-inflammatory mediators by enhancing the activity of the RNA-binding protein KSRP; 81. Jahrestagung der German Society for Experimental and Clinical Pharmacology and Toxicology

Lebenslauf

Persönliche Daten

Berufserfahrung

Akademische Ausbildung

Schulbildung

Danksagung