

**Die Bedeutung von KSRP für die  
pro-inflammatorische Genexpression in  
Autoimmunerkrankungen**

**Einfluss des Naturstoffes Resveratrol auf  
KSRP-vermittelte Regulationsmechanismen**

Dissertation

Zur Erlangung des Grades  
„Doktor der Naturwissenschaften“

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

Julia Art  
geb. in Worms  
Mainz, 2012

**1. Berichterstatter:**



**2. Berichterstatter:**



**Tag der mündlichen Prüfung:**

13. August 2012

„Ein Wissenschaftler benötigt vier Dinge:  
erstens einen Kopf zum Denken  
zweitens Augen zum Sehen  
drittens Geräte zum Messen  
und viertens - Geld.“

Albert Szent-Györgyi (\*1893), amerik. Biochemiker ungar. Herk., 1937 Nobelp.

# 1 Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>INHALTSVERZEICHNIS</b>	<b>4</b>
<b>2</b>	<b>ABBILDUNGSVERZEICHNIS</b>	<b>10</b>
<b>3</b>	<b>TABELLENVERZEICHNIS</b>	<b>13</b>
<b>4</b>	<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS</b>	<b>15</b>
<b>5</b>	<b>EINLEITUNG</b>	<b>19</b>
5.1	Chronische Autoimmunerkrankungen	19
5.1.1	Die rheumatoide Arthritis	19
5.1.1.1	Die Pathogenese der rheumatoiden Arthritis	19
5.1.1.2	Die Bedeutung pro-angiogenetischer Mechanismen in der rheumatoiden Arthritis	20
5.1.1.3	Die Expression des Ca <sup>2+</sup> -bindenden Proteins S100A8 in der rheumatoiden Arthritis	21
5.1.1.4	Die Regulation der pro-inflammatorischen Genexpression im Verlauf der rheumatoiden Arthritis	21
5.1.1.5	Modelle zur Untersuchung der Pathogenese der rheumatoiden Arthritis	22
5.1.2	Die Atherosklerose	23
5.1.2.1	Die Pathogenese der Atherosklerose	23
5.1.2.2	Das Modell der ApoE <sup>-/-</sup> -Mäuse zur Untersuchung cardiovascularer Erkrankungen	23
5.1.2.3	Der Naturstoff Resveratrol	24
5.2	Die Regulation der Genexpression	24
5.2.1	Post-transkriptionelle Regulation pro-inflammatorischer Gene	25
5.2.2	Die Regulation der mRNA-Stabilität über mRNA-bindende Proteine	25
5.2.3	Die Regulation der mRNA-Stabilität und -Translatierbarkeit über die Interaktion mit miRNAs	27
5.3	Das KH type splicing regulatory protein KSRP	27
5.3.1	KSRP als ARE-bindendes Protein	28
5.3.2	Die Bedeutung von KSRP für die miRNA-Prozessierung	29
5.3.3	Die Regulation der KSRP-Expression und -Aktivität	29
<b>6</b>	<b>ZIELSETZUNG</b>	<b>31</b>
<b>7</b>	<b>MATERIALIEN</b>	<b>32</b>

1	Inhaltsverzeichnis	
<hr/>		
7.1	Chemikalien	32
7.1.1	Spezielle Chemikalien	32
7.1.2	Radioaktive Chemikalien	33
7.1.3	Reagenzien zur Analyse der Expression pro-inflammatorischer Gene und zur Behandlung von Zellen	33
7.1.4	Reagenzien und Kits	33
7.2	Marker	34
7.3	Lösungen und Puffer	34
7.3.1	Allgemeine Lösungen und Puffer	34
7.3.2	Medien und Medienzusätze für die Zellkultur	35
7.3.3	Bakterienmedien	36
7.3.4	Lösungen und Puffer für die Plasmid-DNA-Präparation	36
7.3.5	Lösungen und Puffer für Protein-Analysen	37
7.3.6	Lösungen und Puffer für Microarray-Analysen	38
7.3.7	Lösungen und Puffer für UV-Crosslink-Analysen	38
7.4	Antikörper	38
7.5	Enzyme	40
7.6	Rekombinante Fusionsproteine	41
7.7	Plasmide	41
7.7.1	Expressionsplasmide für die stabile und transiente Transfektion	41
7.7.2	Plasmide für Reporteranalysen	42
7.7.3	Plasmide für die <i>in vitro</i> -Transkription	43
7.8	Oligonukleotide	43
7.8.1	Sequenzen der Oligonukleotide für die Amplifizierung verschiedener KSRP-Promotor-Fragmente und der KSRP-3'UTR	43
7.8.2	Sequenzen der Oligonukleotide und Sonden für die quantitative Real-Time RT-PCR-Analysen	44
7.9	Zelllinien	46
7.10	Bakterien	47
7.11	Versuchstiere	48
7.12	Laborgeräte	48
7.12.1	Zentrifugen	48

7.12.2	Geräte zur Elektrophorese	48
7.12.3	Messgeräte	48
7.12.4	Sonstige Laborgeräte	48
7.13	sonstige Materialien	49
7.13.1	Plastikwaren	49
7.13.2	Weitere Verbrauchsmaterialien	50
<b>8</b>	<b>METHODEN</b>	<b>51</b>
8.1	Zellbiologische Arbeitsmethoden	51
8.1.1	Kultivierung eukaryoter Zellen	51
8.1.2	Kryokonservierung und Auftauen eukaryoter Zellen	51
8.1.3	Bestimmung der Zellzahl eukaryoter Zellen	52
8.1.4	Stimulation und Behandlung eukaryoter Zellen	52
8.1.5	Analyse der mRNA-Stabilität durch Behandlung der Zellen mit 5,6-Dichlor-1-D-ribofuranosyl-benzimidazol (DRB)	52
8.1.6	Transiente und stabile Transfektion eukaryoter Zellen	53
8.1.7	Anwendung der Durchflusszytometrie zur Analyse von transfizierten Zellen	54
8.2	Proteinbiochemische Arbeitsmethoden	55
8.2.1	Gewinnung von Proteinextrakten aus Zellen und Geweben	55
8.2.2	Photometrische Quantifizierung von Proteinen – Bradford	55
8.2.3	Proteinfällung nach Wessel und Flügge	55
8.2.4	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	56
8.2.5	Immunodetektion mittels Western Blot Analyse	57
8.2.6	Die Immunpräzipitation	58
8.2.7	Die Aufreinigung rekombinanter His-Tag-Fusionsproteine	58
8.3	Molekularbiologische Arbeitsmethoden	59
8.3.1	Isolierung von RNA aus Zellen	59
8.3.2	Isolierung von RNA aus Geweben	60
8.3.3	Quantitative RNA-Analyse	60
8.3.4	Qualitative RNA-Analyse - Kontrolle der RNA-Integrität	60
8.3.5	Reverse Transkription	61
8.3.6	Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)	63
8.3.7	Quantitative Real-Time PCR	64
8.3.8	Die DNA-Microarray-Analyse	65
8.3.9	<i>In vitro</i> -Transkription zur Herstellung radioaktiv markierter RNA	71
8.3.10	UV-Crosslink zur <i>in vitro</i> -Analyse von Protein-RNA-Wechselwirkungen	72
8.3.11	Klonierung von DNA-Fragmenten	73
8.3.11.1	Restriktion von DNA	74

8.3.11.2	Phenol-Chloroform Extraktion von Nucleinsäuren	74
8.3.11.3	Auffüllen überhängender 5'-Enden mit DNA-Polymerase	74
8.3.11.4	5'- Dephosphorylierung	75
8.3.11.5	Agarose-Gelelektrophorese	75
8.3.11.6	Elektroelution von DNA aus Agarose	75
8.3.11.7	Ligation von DNA	75
8.3.11.8	Transformation von DNA in Bakterien	76
8.3.11.9	Plasmid-DNA-Präparation	76
8.3.12	Luciferase Reportergen Assay	77
8.4	Arbeitsmethoden mit Versuchstieren	77
8.4.1	Die Collagen-induzierte Arthritis (CIA) als Modell einer chronischen Entzündung	77
8.4.2	Resveratrol-Behandlung von ApoE <sup>-/-</sup> -Mäusen	78
8.5	Statistik	79
<b>9</b>	<b>ERGEBNISSE</b>	<b>80</b>
9.1	Die Analyse der KSRP-Expression in Modellen der rheumatoiden Arthritis (RA)	80
9.1.1	Die mRNA-Expression des Biomarkers der rheumatoiden Arthritis S100A8 ist in verschiedenen Geweben Collagen Typ II-immunisierten Mäusen erhöht	81
9.1.2	Die KSRP-Expression ist im Verlauf der Collagen-induzierten Arthritis (CIA) reguliert	85
9.1.3	Das humane Arthritis-Modell der C28/I2-Chondrozyten zeigt bei einer Überexpression von KSRP eine Reduktion bekannter KSRP-Zielgene	90
9.1.4	Der Vergleich der durchgeführten DNA-Microarray-Analysen im Modell der CIA und der KSRP-überexprimierenden Chondrozyten zeigt eine signifikante Regulation von 61 Genen in beiden Modellen	94
9.2	Die Analyse der transkriptionellen und post-transkriptionellen Regulation der KSRP Expression	98
9.2.1	C28/I2-KSRP-Chondrozyten zeigen eine erhöhte endogene KSRP-Expression	98
9.2.2	Eine KSRP-Überexpression hat keinen direkten Einfluss auf die KSRP-3'-UTR	99
9.2.3	Die Überexpression von KSRP führt zu einer Stimulation des KSRP-Promotors (3kb)	100
9.2.4	Die FUSE-analoge Sequenz ist für die Regulation des KSRP-Promotors von Bedeutung	101
9.2.5	PABP, HuR und AUF-1 interagieren mit der KSRP-3'-UTR	105
9.2.6	PABP hat einen positiven Effekt auf die KSRP-mRNA-Stabilität	106
9.2.7	Die AUF-1-Isoform p42 reduziert die KSRP-mRNA-Expression	108
9.3	Analyse der Regulation von KSRP durch die spezifische Bindung des Naturstoffs Resveratrol	109
9.3.1	Resveratrol bindet mit hoher Spezifität und Selektivität an KSRP	109

9.3.2	Die Behandlung mit Resveratrol führt zu einer reduzierten mRNA-Expression der KSRP-regulierten Gene TNF- $\alpha$ , IL-8 und iNOS	110
9.3.3	Die Resveratrol-abhängige Reduktion der iNOS-mRNA-Expression ist Sirtuin-1 unabhängig	112
9.3.4	Die Behandlung mit Resveratrol erhöht die Aktivität eines 16kb-iNOS-Promotor-Fragments	113
9.3.5	Resveratrol hat in siKSRP-Zellen keinen Einfluss auf die iNOS-mRNA-Stabilität	115
9.3.6	Resveratrol hat einen negativen Effekt auf die iNOS-3'UTR	119
9.3.7	Die miR-155-Expression und die miR-155-Aktivität sind in Resveratrol-behandelten DLD-1-Zellen erhöht	121
9.3.8	Die KSRP-Expression ist in Resveratrol-behandelten Zellen nicht verändert	124
9.3.9	Die Threonin-Phosphorylierung von KSRP ist in Resveratrol behandelten DLD-1-Zellen bei gleichbleibender KSRP-Expression reduziert	125
9.3.10	Die p38-MAPK-Aktivierung und die p38-MAPK-Aktivität werden durch Resveratrol in DLD-1-Zellen nicht reguliert	126
9.3.11	Die verringerte Threonin-Phosphorylierung von KSRP durch Resveratrol lässt sich im <i>in vivo</i> -Modell der ApoE <sup>-/-</sup> -Mäuse bestätigen	127
9.3.12	In Resveratrol behandelten ApoE-defizienten Tieren ist die mRNA-Expression von KSRP-regulierten Genen reduziert	128
<b>10</b>	<b>DISKUSSION</b>	<b>132</b>
10.1	Die Analyse der KSRP-Expression und die Identifizierung neuer Zielgene in Modellen der rheumatoiden Arthritis	132
10.1.1	Die mRNA-Expression des Biomarkers der rheumatoiden Arthritis S100A8 ist in verschiedenen Geweben Collagen Typ II-immunisierten Mäusen erhöht	132
10.1.2	Die KSRP-Expression ist im Verlauf der Collagen-induzierten Arthritis reguliert	133
10.1.3	Das humane Arthritis-Modell der C28/I2-Chondrozyten zeigt bei einer Überexpression von KSRP eine Reduktion bekannter KSRP-Zielgene	135
10.1.4	Der Vergleich der im Modell der CIA und der KSRP-überexprimierenden Chondrozyten regulierten Gene zeigt eine signifikante Regulation pro-inflammatorischer und pro-angiogenetischer Gene	136
10.2	Die Analyse der transkriptionellen und post-transkriptionellen Regulation der KSRP-Expression	141
10.2.1	Die endogene KSRP-Expression ist in KSRP-überexprimierenden Chondrozyten erhöht	141
10.2.2	Die Überexpression von KSRP hat keinen direkten Einfluss auf die KSRP 3'-UTR	141
10.2.3	Die Autoregulation von KSRP wird über die Modulation des eigenen Promotors realisiert	142
10.2.4	Die KSRP-mRNA-Expression wird post-transkriptionell über die Interaktion der RNA-Bindeproteine PABP, AUF-1 und HuR mit der KSRP-3'-UTR reguliert	143



10.3	Die Analyse der Regulation von KSRP durch die spezifische Bindung des Naturstoffs Resveratrol	147
10.3.1	Die Behandlung mit Resveratrol führt zu einer reduzierten mRNA-Expression der KSRP-regulierten Gene TNF- $\alpha$ , IL-8 und iNOS – dieser Effekt ist wahrscheinlich SIRT-1-unabhängig	147
10.3.2	Resveratrol reguliert die Aktivität eines 16kb-iNOS-Promotorfragments – Dieser Effekt scheint NF- $\kappa$ B- und STAT-1 $\alpha$ -abhängig zu sein	148
10.3.3	Die Regulation der iNOS-mRNA-Stabilität ist KSRP-abhängig	149
10.3.4	Die Expression und Aktivität der miR-155 ist durch Resveratrol erhöht	150
10.3.5	Die KSRP-deaktivierende Thr-Phosphorylierung ist bei unveränderter KSRP-Protein-Expression <i>in situ</i> und <i>in vivo</i> nach Resveratrol-Behandlung reduziert	151
10.3.6	Resveratrol führt zu einer Reduktion von KSRP-Zielgenen im murinen Atherosklerose-Modell der ApoE <sup>-/-</sup> -Maus	152
<b>11</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>156</b>
<b>12</b>	<b>ANHANG</b>	<b>158</b>
<b>13</b>	<b>PUBLIKATIONEN</b>	<b>161</b>
<b>14</b>	<b>LITERATUR</b>	<b>163</b>

## 2 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 8.1:	Übersicht über die Durchführung eines Microarray-Experiments .....	66
Abbildung 8.2:	Schema zur Auswertung eines Microarrays .....	70
Abbildung 9.1:	Immunisierungsschema der Collagen-induzierten Arthritis (CIA) .....	81
Abbildung 9.2:	Verschiedene Stadien der Schwellung der Pfoten bei CII- immunisierten Mäusen mit Angabe des entsprechenden Arthritisindex..	82
Abbildung 9.3:	Verlauf des Arthritisindex nach der ersten CII-Immunisierung.....	83
Abbildung 9.4:	Analyse der mRNA-Expression des Biomarkers S100A8 in Geweben ..... CII-immunisierte Mäuse.....	85
Abbildung 9.5:	Analyse der KSRP-mRNA-Expression in Geweben CII-Immunisierter Mäuse.....	87
Abbildung 9.6:	Analyse der KSRP-Proteinexpression in der Milz CII-immunisierte Mäuse.....	88
Abbildung 9.7:	Analyse der KSRP-mRNA-Expression in verschiedenen Immunzellen ..	89
Abbildung 9.8:	Analyse der Effekte der CM-Inkubation auf die KSRP-Expression .....	90
Abbildung 9.9:	Beispiel für eine Analyse der C28/I2-KSRP-Zellen durch ..... die Durchflusszytometrie (FACS).....	91
Abbildung 9.10:	Analyse der KSRP-Proteinexpression in stabil mit pcDNA5EGFP oder pcDNA5KSRP transfizierten C28-I/2 -Zellen.....	92
Abbildung 9.11:	Analyse der TNF- $\alpha$ , IL-8 und iNOS-Expression in ..... KSRP-überexprimierenden C28-I/2-KSRP-Zellen.....	93
Abbildung 9.12:	Schematische Darstellung der Anzahl signifikant regulierter Gene ..... in verschiedenen Modellen der rheumatoiden Arthritis.....	95
Abbildung 9.13:	Analyse der endogenen KSRP-mRNA-Expression in stabil ..... transfizierten C28/I2-Zellen.....	99
Abbildung 9.14:	Analyse der Effekte von KSRP auf die Luciferase-Expression in ..... pGL3-KSRP-3'-UTR transfizierten DLD-1-Zellen.....	100
Abbildung 9.15:	Analyse der Effekte von KSRP auf die Luciferaseaktivität in mit ..... pGL4-KSRP-prom transfizierten DLD-1-Zellen.....	101
Abbildung 9.16:	Analyse der Effekte einer Cytokin-Behandlung auf die Aktivität des ..... 3kb-KSRP-Promotorfragments .....	102
Abbildung 9.17:	Analyse der Effekte von Deletionen auf die Aktivität des KSRP-Promotors .....	103
Abbildung 9.18:	Schema der zur KSRP-Promotor-Analyse verwendeten Konstrukte ..... mit oder ohne FUSE-Element .....	103

---

Abbildung 9.19:	Analyse der Effekte der Deletion des FUSE-analogen Elements im KSRP-Promotor .....	104
Abbildung 9.20:	Schematische Darstellung der KSRP 3'-UTR .....	105
Abbildung 9.21:	Analyse der Bindung verschiedener RNA-BP an die 3'-UTR der KSRP-mRNA .....	106
Abbildung 9.22:	Analyse der Effekte der siRNA-vermittelten Reduktion der PABP-Expression auf die KSRP-mRNA-Expression .....	107
Abbildung 9.23:	Analyse der KSRP-mRNA-Stabilität in siPABP-Zellen .....	107
Abbildung 9.24:	Analyse der Effekte der Überexpression verschiedener AUF-1-Isoformen auf die KSRP-mRNA-Expression .....	108
Abbildung 9.25:	Aufreinigung von KSRP mit Hilfe einer Resveratrol-Matrix .....	110
Abbildung 9.26:	Analyse der Effekte von Resveratrol auf die CM-induzierte TNF- $\alpha$ -, IL-8- und iNOS-Expression .....	111
Abbildung 9.27:	Analyse des Effekts der SIRT-1-Hemmung durch Sirtinol auf die Modulation der iNOS-Expression durch Resveratrol .....	113
Abbildung 9.28:	Analyse der Effekte von Resveratrol auf die Aktivität des humanen iNOS-Promotors sowie artifizierender NF- $\kappa$ B- und STAT-1 $\alpha$ -abhängiger Promotoren .....	114
Abbildung 9.29:	Analyse der Effekte von Resveratrol auf die iNOS-mRNA-Stabilität .....	116
Abbildung 9.30:	Analyse der KSRP-Expression in DLD-1-siKSRP-Zellen .....	117
Abbildung 9.31:	Effekte von Resveratrol auf die CM-induzierte iNOS-mRNA-Expression in siKSRP-Zellen .....	118
Abbildung 9.32:	Effekte von Resveratrol auf die iNOS-mRNA-Stabilität in siKSRP-Zellen .....	119
Abbildung 9.33:	Analyse der Effekte von Resveratrol auf die Luciferaseaktivität in mit pGI3-iNOS-3'-UTR transfizierten DLD-1-Zellen .....	120
Abbildung 9.34:	Analyse der miR-155-Expression in DLD-1-Zellen nach Resveratrol-Behandlung .....	121
Abbildung 9.35:	Analyse der Effekte von Resveratrol auf die Luciferaseaktivität in mit pMIR-report-SHIP-1 transfizierten DLD-1-Zellen .....	122
Abbildung 9.36:	Analyse der Effekte von Resveratrol auf die Luciferaseaktivität in mit pMIR-report-SHIP-1 transfizierten siKSRP-Zellen .....	123
Abbildung 9.37:	Analyse der Effekte von Resveratrol auf die KSRP-Protein-Expression in DLD-1-Zellen .....	124
Abbildung 9.38:	Analyse der Threonin-Phosphorylierung von KSRP in Resveratrol-behandelten DLD-1-Zellen .....	125

Abbildung 9.39:	Analyse der p38-MAPK-Aktivierung und -Aktivität in mit Resveratrol behandelten DLD-1-Zellen.....	127
Abbildung 9.40:	Analyse der Threonin-Phosphorylierung von KSRP in der Milz von mit Resveratrol behandelten ApoE <sup>-/-</sup> -Mäusen .....	128
Abbildung 9.41:	Analyse der Effekte von Resveratrol auf die ..... pro-inflammatorische Genexpression in verschiedenen Organen von ApoE-defizienten Mäusen.....	130
Abbildung 10.1:	Zusammenfassung möglicher Mechanismen in der Pathogenese der RA, die durch KSRP beeinflusst werden.....	140
Abbildung 10.2:	Schema zur transkriptionellen und post-transkriptionellen Regulation ..... der KSRP-Expression .....	146
Abbildung 10.3:	Mechanismus der Resveratrol-abhängigen KSRP-Aktivierung.....	155

### 3 Tabellenverzeichnis

Tabelle 7.1:	Cytokine und Substanzen zur Induktion pro-inflammatorischer Gene und zur Behandlung der Zellen .....	33
Tabelle 7.2:	Verwendete Primärantikörper in Western Blot Analysen.....	39
Tabelle 7.3:	Verwendete Sekundärantikörper in Western Blot Analysen .....	40
Tabelle 7.4:	Verwendete Antikörper in Immunopräzipitationsanalysen.....	40
Tabelle 7.5:	Verwendete Enzyme in Klonierungsexperimenten.....	40
Tabelle 7.6:	Rekombinante Fusionsproteine .....	41
Tabelle 7.7:	Plasmide für die stabile und transiente Transfektion.....	42
Tabelle 7.8:	Verwendete Plasmide für die transiente Transfektion von DLD-1 Zellen ..... zur Durchführung von Luciferasereporteranalysen .....	43
Tabelle 7.9:	Plasmide für die <i>in vitro</i> -Transkription.....	43
Tabelle 7.10:	Sequenzen der Oligonukleotide für die Amplifizierung verschiedener ..... KSRP-Promotor-Fragmente und der KSRP-3'UTR.....	43
Tabelle 7.11:	Sequenzen der Oligonukleotide für <i>in situ</i> -Analysen humaner mRNA .....	45
Tabelle 7.12:	Sequenzen der Oligonukleotide für <i>in vivo</i> -Analysen muriner mRNA.....	45
Tabelle 7.13:	Verwendete Zelllinien .....	47
Tabelle 7.14:	Verwendete Mausstämme.....	48
Tabelle 8.1:	Zusammensetzung der Gele für die SDS-PAGE .....	56
Tabelle 8.2:	Reaktionsansatz für die reverse Transkription.....	62
Tabelle 8.3:	Programm für die reverse Transkription .....	62
Tabelle 8.4:	Ansatz für die reverse Transkription zur Bestimmung der ..... miR-155-Expression.....	62
Tabelle 8.5:	Programm für die reverse Transkription zur Bestimmung der miR-155-Expression .....	63
Tabelle 8.6:	Reaktionsansatz und Programm zur Amplifizierung des KSRP-Promotor Fragments.....	63
Tabelle 8.7:	Reaktionsansatz und Programm für die Amplifizierung des KSRP-3'UTRs	64
Tabelle 8.8:	Reaktionsansatz und Programm für die quantitative Real-Time PCR .....	65
Tabelle 8.9:	Reaktionsansatz für die Quantifizierung der miR-155.....	65
Tabelle 8.10:	Reaktionsansatz A für die Markierung der cDNA.....	67
Tabelle 8.11:	Zusätzliche Komponenten zur Markierung der cDNA .....	67
Tabelle 8.12:	Komponenten des Hybridisierungsansatzes.....	68
Tabelle 8.13:	Zusammenfassung der Hybridisierung .....	69
Tabelle 8.14:	Pipettierschema für die <i>in vitro</i> -Transkription.....	72

Tabelle 8.15:	Ansatz für die RNA-Protein-Bindungsreaktion für den UV-Crosslink.....	73
Tabelle 8.16:	Zusammensetzung der RNase-Verdau-Mischung für die nicht durch die Protein-Interaktion-geschützte RNA .....	73
Tabelle 8.17:	Bestimmung des Arthritisindex .....	78
Tabelle 9.1:	Auswahl aus 61 Genen, die sowohl im humanen Modell als auch im murinen Modell der rheumatoiden Arthritis signifikant reguliert waren.....	97

## 4 Abkürzungsverzeichnis

AKT	Proteinkinase B
AMD	<i>ARE mediated decay</i>
AMPK	AMP-aktivierte Proteinkinase
AP-1	<i>Aktivator Protein-1</i>
APC	<i>antigen-presenting cell</i>
ApoE	Apolipoprotein E
APOBEC	<i>apolipoprotein B mRNA editing enzyme</i>
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ARE	AU-reiches Element
ATF-2	<i>activating transcription factor 2</i>
ATM	<i>ataxia telangiectasia mutated protein kinase</i>
ATP	Adenosintriphosphat
AUF-1	<i>ARE/poly-(U)-binding factor</i>
bp	Basenpaare
BRCA1	<i>breast cancer type 1 susceptibility protein</i>
BSA	<i>bovine serum albumin</i>
bzw.	beziehungsweise
CII	Collagen Typ II
cAMP	<i>cyclic adenosine monophosphate</i>
CAT	<i>cationic amino acid transporter</i>
CBBG	Coomassie Brilliant Blau G-250
CCL	<i>chemokine (C-C motif) ligand</i>
CD	<i>cluster of differentiation</i>
cDNA	(zur mRNA) komplementäre DNA
cds	<i>coding sequence</i>
CFA	Komplettes Freund'sches Adjuvans
ChM-I	Chondromodulin-I
CIA	Collagen-induzierte Arthritis ( <i>collagen-induced arthritis</i> )
CM	Cytokingemisch ( <i>cytokine mixture</i> )
CO	unbehandelte (nicht mit Cytokinen behandelte) Zellen
COX	Cyclooxygenase
CSF	<i>colony-stimulating factor</i>
Dcp1	<i>decapping enzyme homolog A</i>
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DLD-1	humane Kolon-Adenokarzinomzellen

DMEM	Dulbecco's modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNase	Desoxyribonuklease
DNA	Desoxyribonukleinsäure ( <i>deoxyribonucleic acid</i> )
dNTP	Desoxynucleotidtriphosphat
DTT	1,4-Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGFP	<i>enhanced green fluorescent protein</i>
ELAV	<i>embryonic lethal abnormal vision</i>
EOE-S	<i>end over end</i> Schüttler
EZM	Extrazelluläre Matrix
FACS	<i>fluorescence activated cell sorting</i>
FCS	Fötale Kälberserum
FGF	<i>fibroblast growth factor</i>
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
FLS	<i>fibroblast like synovial</i>
FUSE	<i>far upstream element</i>
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GIT	Guanidiniumisothiocyanat-haltiger Puffer
GM-CSF	<i>granulocyte/monocyte colony stimulating factor</i>
GST	Glutathion S-Transferase
GZMA	Granzym A
h	Stunde
hnRNP	heterogenes nukleäres Ribonukleoprotein
HPSE	Heparanase
HuR	ELAV-( <i>embryonic lethal abnormal vision</i> )-Protein
ICAM	<i>intercellular adhesion molecule</i>
IFN	Interferon
IL	Interleukin
iNOS	induzierbare Isoform der NOS (NOS II)
JAK	Januskinase
kb	Kilo-Basen
kDa	Kilo-Dalton
KH	<i>K homology</i>
KSRP	<i>KH-type splicing regulatory protein</i>
LDL	<i>low density lipoprotein</i>
LPS	Lipopolysaccharid



Luc	Luciferase
MAPK	<i>mitogen activated protein kinase</i>
MCP-1	<i>monocyte chemotactic protein-1</i>
min	Minute
miR	microRNA
MKK-2	<i>mitogen-activated protein kinase kinase 2</i>
MMP	Metalloproteinase
MP	Milchpulver
mRNA	<i>messenger-RNA</i>
NADH	Nicotinamidadenindinucleotid
NF-AT	<i>nuclear factor of activated t-cells</i>
NF-κB	Nukleärer Faktor-κB
NO	Stickstoffmonoxid ( <i>nitric oxide</i> )
OD	optische Dichte
PABP	Poly-(A)-bindendes Protein
PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung ( <i>phosphate buffered saline</i> )
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PLB	<i>passive lysis buffer</i>
PKC/B	Proteinkinase C/B
PBMC	periphere Blutmonozyten ( <i>periphere blood mononuclear cell</i> )
PDE	Phosphodiesterase
PDGF	<i>platelet-derived growth factor</i>
PGC-1α	<i>peroxisome proliferator-activated receptor γ coactivator 1-α</i>
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase
Pin1	<i>peptidylprolyl cis/trans isomerase</i>
PLA2G2D	Phospholipase A2 Gruppe IID
PTB	<i>polypyrimidine-tract binding protein</i>
qRT-PCR	quantitative realtime PCR
RANKL	<i>receptor activator of NF-κB ligand</i>
Res	Resveratrol
RISC	<i>RNA induced silencing complex</i>
RNA	Ribonukleinsäure ( <i>ribonucleic acid</i> )
RNAPol2A	RNA-Polymerase 2A
RNA-BP	RNA-Bindeprotein
RA	rheumatoide Arthritis
RT	Reverse Transkription

S100A8	S100-Calciumbindeprotein A8
SDS	Natriumdodecylsulfat ( <i>sodium dodecyl sulfate</i> )
sec	Sekunde
SEM	<i>standard error of mean</i>
SHIP-1	<i>Src homology-2 domain-containing inositol 5-phosphatase 1</i>
siRNA	<i>small interfering RNA</i>
SIRT-1	Sirtuin 1
SNO	S-Nitrosyliert
SPARC	<i>secreted protein acidic and rich cysteine</i> – Osteonectin
STAT-1 $\alpha$	<i>signal transducer and activator of transcription-1<math>\alpha</math></i>
TCR	<i>T cell receptor</i>
TBE	Tris-HCl-, Borsäure- und EDTA-haltiger Puffer
TBS	Tris-gepufferte Kochsalzlösung ( <i>tris buffered saline</i> )
TEMED	N, N, N',N'-Tetramethylethyldiamin
TF	<i>tissue factor</i>
TG	Transgen
TGF- $\beta$	<i>transforming growth factor-<math>\beta</math></i>
Thr	Threonin
TNF- $\alpha$	Tumornekrosefaktor $\alpha$
TNMD	Tenomodulin
TTP	Tristetraprolin
Upm	Umdrehungen pro Minute
UTR	untranslatierte Region einer mRNA
VCAM	<i>vascular cell adhesion molecule</i>
VEGF	<i>vascular endothelial growth factor</i>
vs	versus
z.B.	zum Beispiel

## 5 Einleitung

### 5.1 Chronische Autoimmunerkrankungen

#### 5.1.1 Die rheumatoide Arthritis

Die rheumatoide Arthritis (RA) ist eine chronisch-entzündliche Erkrankung, welche vorwiegend die peripheren Gelenke befällt und zur Zerstörung des Knorpelgewebes sowie der Knochen führt. Die RA gilt als Paradigma einer systemischen Autoimmunerkrankung und zählt zu den häufigsten Indikationen von Arzneimittelverordnungen in der westlichen Welt. Eine Vielzahl genetischer und nicht-genetischer Faktoren spielt in der Auslösung, aber auch der Chronifizierung der RA eine Rolle. Man geht davon aus, dass ein unbekanntes Autoantigen die Krankheit auslöst (Voulgari 2008). Verschiedene Prozesse von sowohl unspezifischer als auch spezifischer Immunantwort führen schließlich zum klinischen Bild der rheumatoiden Arthritis, das mit starken Schmerzen und der Zerstörung der Gelenke einhergeht. Meist verläuft die Krankheit schubweise, ein Schub dauert typischerweise zwischen einigen Wochen bis Monaten an. Zwischen den einzelnen Schüben lassen die beschriebenen Beschwerden nach.

RA-Patienten zeigen erhöhte Raten an kardiovaskulären Ereignissen, was ihre Lebenserwartung reduziert. Die erhöhten Konzentrationen an pro-inflammatorischen Mediatoren führen zu einer verstärkten Atherosklerose bei diesen Patienten, was letztlich in kardiovaskulären Folgeerkrankungen resultiert (Sherer and Shoenfeld 2006; Kitas and Gabriel 2011).

##### 5.1.1.1 Die Pathogenese der rheumatoiden Arthritis

Es wird angenommen, dass ein unbekanntes Autoantigen über APC autoreaktiven CD4<sup>+</sup>-T-Zellen präsentiert wird. Diese autoreaktiven T-Zellen müssen kontrolliert bzw. das erkannte Selbstantigen muss immunologisch toleriert werden. Dies geschieht unter anderem durch T-regulatorische CD4(+) CD25(+) Zellen (T<sub>reg</sub>), die über direkten T<sub>H</sub>-Zell-Kontakt oder über die Sekretion verschiedener Mediatoren (TGF-β, IL-10) Immunantworten autoreaktiver T-Zellen inhibieren (Wahl 1994; Buer, Lanoue et al. 1998). In der RA versagen die körpereigenen Toleranzmechanismen (Kobayashi 1997) und es kommt zu einem Ungleichgewicht autoreaktiver T<sub>H</sub>-Zellen und T<sub>reg</sub>-Zellen. Das körpereigene Antigen wird nicht toleriert, sondern als fremd angesehen, wodurch die Entzündung induziert wird. Es folgt die Aktivierung von Monozyten, Makrophagen und synovialen Fibroblasten, welches zu einer ungewöhnlich hohen Akkumulation inflammatorischer Immunzellen in der Synovia von

Gelenken führt. Diese Immunzellen synthetisieren Cytokine (TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-6, IL-18), welche synoviale Fibroblasten, Chondrozyten (Knorpelzellen) und Osteoklasten aktivieren. Fibroblasten und Chondrozyten bilden daraufhin Matrix-Metalloproteasen (MMP3, MMP9) und Kollagenasen, die zum Abbau der extrazellulären Matrix (EZM) führen. Gleichzeitig folgt die Aktivierung der Chondrozyten in der Hemmung der Proteoglykan- und Kollagensynthese, welche die Bestandteile der EZM bilden. Chondrozyten und synoviale Fibroblasten sind außerdem in der Lage, Cytokine (IL-1, TNF- $\alpha$ ) und Chemokine (IL-8, MCP-1) zu synthetisieren (Koike 2006). Dies führt zu einer gegenseitigen Aktivierung und somit zu einer Verstärkung der Knorpeldestruktion. Die erhöhte Expression von Cytokinen aktiviert RANKL, was wiederum zu einer Aktivierung der Osteoklastendifferenzierung und schließlich zum Knochenabbau führt (McInnes and Schett 2007). Die beschriebenen Prozesse resultieren in einer Entzündung der Synovialis und es kommt zur Ausbildung eines sogenannten Pannus, dessen Entstehung durch eine pathologische Angiogenese charakterisiert ist (Brenchley 2001).

Der Pannus zeichnet sich durch einen aggressiven und autonomen Zellverband (Pannozyten) aus, der sich durch invasiv-destruktives Wachstum in den Knorpel einlagert und schließlich Knochenerosionen hervorruft. Die Summe aller dieser Wechselwirkungen führt schließlich zu den chronischen immun-inflammatorischen Prozessen (Otero and Goldring 2007; Voulgari and Drosos 2008).

#### **5.1.1.2 Die Bedeutung pro-angiogenetischer Mechanismen in der rheumatoiden Arthritis**

Die Angiogenese (Gefäßneubildung) ist ein physiologischer Prozess, der auf die Embryogenese sowie die Wundheilung beschränkt ist und das Wachstum von kleinen Blutgefäßen aus dem vorgebildeten Kapillarsystem beschreibt. Ein Angiogenese-Zyklus umfasst die Teilung von Endothelzellen, den selektiven Abbau von der vaskulären Basalmembran und der extrazellulären Matrix (EZM) sowie die Migration der Endothelzellen. In pathologischen Prozessen spielt die Angiogenese eine entscheidende Rolle in der Tumorprogression, aber auch in der rheumatoiden Arthritis. Die Ausbildung des Pannus ist durch eine endotheliale Proliferation und Apoptose gekennzeichnet, welche durch die Mechanismen der Angiogenese vermittelt werden. Bei RA-Patienten wurde in der Synovia und in der Synovialis eine erhöhte Expression angiogenetischer Wachstumsfaktoren (VEGF, FGF-1, FGF-2) nachgewiesen (Brenchley 2001; Malemud 2007). IL-18 ist dabei ein wichtiger Mediator, der indirekt und direkt die Angiogenese in der Pathogenese der rheumatoiden Arthritis induziert (Volin and Koch 2011).

### **5.1.1.3 Die Expression des Ca<sup>2+</sup>-bindenden Proteins S100A8 in der rheumatoiden Arthritis**

S100A8 (Calgranulin A) ist ein Ca<sup>2+</sup>-bindendes Protein, das konstitutiv in Neutrophilen und in aktivierten Makrophagen, abhängig von IL-10, exprimiert wird (Perera, McNeil et al. 2010). In der Pathogenese der RA fördert es die Proteolyse der extrazellulären Matrix (EZM), die Autoimmunität und die Entwicklung des pseudotumorellen Phänotyps der Synovialozyten (Baillet 2010). Zusammen mit S100A9 bildet es einen Komplex (Calprotectin), der vermehrt in der Synovia von RA-Patienten gefunden wird und mit der Knorpel-Destruktion korreliert (Hammer, Odegard et al. 2007). Dagegen wurde anti-inflammatorisches Potential einer post-translationalen Modifikation des S100A8 beschrieben (Perera, McNeil et al. 2010). Das S-nitrosylierte S100A8 (S100A8-SNO) soll die Mastzellen-Aktivierung und die Inflammation in der Mikrozirkulation hemmen, außerdem könnte S100A8-SNO als NO-Transporter den Gefäßtonus im entzündeten Gewebe regulieren (Goyette and Geczy 2011). Zusätzlich wurde S100A8 anti-oxidatives Potential zugesprochen (Perera, McNeil et al. 2010). Diese diskutierten kontroversen Funktionen beruhen möglicherweise auf der sekretierenden Immunzellart, auf extra- und intrazellulären Funktionen des S100A8, auf translationalen Modifikationen und auf der Komplexbildung zu Calprotectin. Jedoch wird stets eine Induktion von S100A8 in der entzündeten Synovialis und in der Synovia beschrieben, so dass dieses Protein als Biomarker für die RA postuliert wird (Baillet, Trocme et al. 2010).

### **5.1.1.4 Die Regulation der pro-inflammatorischen Genexpression im Verlauf der rheumatoiden Arthritis**

Bei der Induktion bzw. Aufrechterhaltung der RA sind pro-inflammatorische Mediatoren wie Cytokine (IL-1 $\beta$ , IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-18), Chemokine (IL-8, MCP-1), Adhäsionsmoleküle (ICAMs), inflammatorische Enzyme (iNOS, COX-2, lösliche Phospholipase A<sub>2</sub>, Matrix Metalloproteasen) und angiogenetische Wachstumsfaktoren (VEGF, FGF-1, FGF-2) von zentraler Bedeutung (Arend and Dayer 1990; Matsui, Tsutsui et al. 2003; Burrage, Mix et al. 2006; Malemud 2007; Voulgari 2008). Die Genexpression dieser Gene bedarf eines engmaschigen Regulationsmechanismus, da sie für die Immunabwehr zwar kurzfristig wichtig sind, jedoch in hohen, unkontrolliert exprimierten Mengen körpereigenes Gewebe angreifen. Eine fehlgesteuerte Expression der Faktoren beruht auf einer Dysregulation der Genexpression, die durch pathologische Veränderungen der Aktivität von verschiedenen Transkriptionsfaktoren (NF- $\kappa$ B, STATs, AP-1, NF-AT) (Hammaker, Sweeney et al. 2003; Lu, Stump et al. 2010) und RNA-Bindeproteinen (TTP, HuR) (Tang, Breen et al. 2002; Suzuki, Tsutsumi et al. 2006) bedingt wird. Diese regulierenden Proteinfaktoren werden selbst durch komplexe Signaltransduktionswege in ihrer Aktivität moduliert (Kracht and Saklatvala 2002;

Brooks, Connolly et al. 2004). Neuere Daten zeigen, dass es in der Pathogenese chronisch-inflammatorischer Erkrankungen auch zu einer fehlerhaften Regulation der Expression und Aktivität von microRNAs (miRNAs) kommt, die als wichtige Modulatoren der Genexpression angesehen werden (Furer, Greenberg et al. 2010). Bei RA-Patienten konnten bereits erhöhte Expressionsraten der miR-155 (Kurowska-Stolarska, Alivernini et al. 2011) und der miR-146 (Pauley, Satoh et al. 2008; Feng, Li et al. 2011) nachgewiesen werden, die zu einer fehlgesteuerten Regulation RA-modulierender Mediatoren (TNF- $\alpha$ , SHIP-1) führen. Aus den beschriebenen Dysregulationen der pro-inflammatorischen Genexpression erklärt sich das Krankheitsbild der RA.

#### **5.1.1.5 Modelle zur Untersuchung der Pathogenese der rheumatoiden Arthritis**

Verschiedene *in vivo*- und *in vitro*-Modelle eröffnen experimentelle Möglichkeiten, um die zugrunde liegenden Mechanismen der RA im Detail aufzuklären und therapeutische Aspekte zu analysieren. Wie bereits erwähnt, ist das Autoantigen bei der RA unbekannt, allerdings kann als potentieller Auslöser Collagen-Typ-II (CII), das Hauptprotein des Knorpels, genannt werden (Snir, Backlund et al. 2012). CII wird von Chondrozyten synthetisiert und kommt nur in der extrazellulären Matrix der Knochen und des Knorpels vor. Von Trentham wurde im Jahre 1977 erstmals die Induktion einer destruktiven Arthritis in bestimmten Ratteninzuchtstämmen nach einer intradermalen Immunisierung mit homologem (Ratte) oder heterologem (Huhn, Mensch) nativem CII in Adjuvans beschrieben (Trentham, Townes et al. 1977). Später konnte das Modell der Collagen-Typ-II-induzierten Arthritis (CIA) auf Mäuse (Courtenay, Dallman et al. 1980) übertragen werden und gilt als anerkanntes murines *in vivo*-Modell für die RA (Myers, Rosloniec et al. 1997; Moore 2003). Als besonders geeignet hat sich dabei die Verwendung von TCR $\beta$ -transgenen (TG) DBA/1 Mäusen erwiesen. Diese exprimieren die  $\beta$ -Kette eines T-Zell-Rezeptors, der aus einem Collagen-arthritogenen T-Zell-Klon isoliert wurde. TCR $\beta$ -TG Mäuse zeigen daher eine erhöhte Anfälligkeit für eine CII-induzierte Arthritis.

Als entsprechendes humanes *in situ*-Modell zur Untersuchung der RA wurden menschliche immortalisierte C28-I/2-Chondrozyten (Finger, Schorle et al. 2003; Goldring and Berenbaum 2004) beschrieben, deren Expressionsprofil weitestgehend dem von normalen differenzierten Chondrozyten entspricht (Finger, Schorle et al. 2003; Nieminen, Leinonen et al. 2005). Inkubation von C28-I/2-Chondrozyten mit pro-inflammatorischen Mediatoren führt zu einer erhöhten Expression von am destruktiven Prozess beteiligten Faktoren wie Cytokinen, COX-2, iNOS und Matrixmetalloproteasen (Varoga, Pufe et al. 2004; Nieminen, Leinonen et al. 2005; Schmidt, Pautz et al. 2010)

## 5.1.2 Die Atherosklerose

### 5.1.2.1 Die Pathogenese der Atherosklerose

Die Atherosklerose ist eine Autoimmunerkrankung, deren Pathogenese zu kardiovaskulären Folgeerkrankungen führt. Die Akkumulation von modifiziertem LDL (*low density lipoprotein*) und Immunzellen innerhalb des Endothels tragen zu einer Verkleinerung des Lumens der Arterien bei. In der frühen Phase der Atherosklerose wird LDL oxidiert, was zu einer Dysfunktion der Endothelzellen und zur Expression von Adhäsionsmolekülen (ICAM1, VCAM1, P-Selektin) und Chemokinen (IL-8) führt (Sherer and Shoenfeld 2006). Dadurch werden Monozyten rekrutiert, die zu Makrophagen differenzieren. Diese nehmen oxidiertes LDL auf und entwickeln sich zu Schaumzellen, die Wachstumsfaktoren (PDGF) und Cytokine (IL-1, IL-6, IL-12) produzieren. Zusätzlich werden T-Helfer-Zellen (T<sub>H</sub>1) rekrutiert, die aufgrund der Produktion von Cytokinen (TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ ) eine systemische Immunantwort vermitteln (Romagnani 1999). Die beschriebenen Mechanismen führen zur Proliferation der glatten Muskelzellen, die sich mit Komponenten der extrazellulären Matrix (Collagen, Proteoglykanen) als fibröse Kappe um abgestorbene Schaumzellen legen und die sogenannte atherosklerotische Plaque bilden. Die Sezernierung von Matrix Metalloproteasen (MMPs) (Ketelhuth and Back 2011) führt zur Destabilisierung der fibrösen Kappe und damit zur Freisetzung des nekrotischen Kerns (kristallisiertes Cholesterin) der fortgeschrittenen Plaque. Dadurch kann die Bildung eines Thrombus bei Anwesenheit des *Tissue Factor* TF initiiert werden (Badimon, Lettino et al. 1999), was wiederum zu einem akuten Gefäßverschluss (Herzinfarkt, Schlaganfall) führen kann.

### 5.1.2.2 Das Modell der ApoE<sup>-/-</sup>-Mäuse zur Untersuchung kardiovaskulärer Erkrankungen

Die Atherosklerose ist aufgrund von kardiovaskulären Folgeerkrankungen die häufigste Todesursache der westlichen Welt. Aus diesem Grund sind experimentelle Modelle für die Aufklärung pathologischer Mechanismen und die Entwicklung neuer Therapeutika äußerst bedeutend. 1992 gelang die Etablierung der Apolipoprotein E-defizienten Maus (ApoE<sup>-/-</sup>) (Zhang, Reddick et al. 1992). ApoE fungiert als Ligand des LDL-Rezeptors und ist für den Stoffwechsel von LDL verantwortlich. Ein Fehlen führt zu einer Erhöhung von LDL und wirkt somit pro-atherogen (Plump, Smith et al. 1992). Die ApoE<sup>-/-</sup>-Maus entwickelt spontan atherosklerotische Läsionen in Arterien, die den Läsionen vom Menschen morphologisch entsprechen (Plump, Smith et al. 1992). Dieses Modell ist bis heute das herausragende Tiermodell für das Studium der humanen Atherosklerose.

### 5.1.2.3 Der Naturstoff Resveratrol

Resveratrol ist ein Stilbenderivat, das in der Natur in unterschiedlichen Pflanzen wie Trauben und Beeren als Phytoalexin produziert wird, um diese vor Bakterien und Pilzinfektionen zu schützen. In murinen Modellen wurden bereits anti-oxidative, cardioprotektive, anti-inflammatorische, anti-diabetische, neuroprotektive und anti-tumorelle Eigenschaften von Resveratrol nachgewiesen, wodurch dieser Naturstoff ein großes pharmakologisches Potential aufweist (Brisdelli, D'Andrea et al. 2009; Rodrigo, Miranda et al. 2011). Viele dieser Effekte werden auf eine indirekte Aktivierung der Histon Deacetylase Sirtuin 1 (SIRT-1) zurückgeführt, die NAD<sup>+</sup>-abhängige Deacetylierungsreaktionen katalysiert. Dies führt unter anderem zu der Reduktion der NF-κB induzierten Transkription (Yeung, Hoberg et al. 2004; Nam 2006) und zur Aktivierung des cardioprotektiv wirkenden Transkriptionsfaktors PGC-1α (Lagouge, Argmann et al. 2006). Diese indirekte Aktivierung von SIRT-1 wird durch die Resveratrol-induzierte AMP-aktivierte Proteinkinase (AMPK) vermittelt, was zu einem erhöhten NAD<sup>+</sup>-Spiegel führt, der als limiterender Faktor der SIRT-1-Aktivität angenommen wird (Canto, Jiang et al. 2010; Um, Park et al. 2010). Bis 2012 wurden nur indirekte Effekte von Resveratrol beschrieben. Park *et al.* konnte nun *in vivo* Phosphodiesterasen (PDE) als direkte Zielproteine identifizieren. Resveratrol soll dabei direkt die PDE hemmen, was zu einer Erhöhung des cAMP-Spiegels und damit über einen Anstieg der Ca<sup>2+</sup>-Konzentration zu einer Aktivierung der AMPK führt (Park, Ahmad et al. 2012). Zusätzlich bewirkt Resveratrol die Reduktion pro-inflammatorischer Gene (TNF-α, iNOS, COX-2), pro-angiogenetischer Faktoren (MMP3, VEGF, ICAM-1) und Proteinkinasen (PI3K, AKT) (Bi, Yang et al. 2005; Harikumar and Aggarwal 2008), die in der Pathogenese chronisch inflammatorischer Erkrankungen, wie der rheumatoiden Arthritis und Atherosklerose, eine entscheidende Rolle einnehmen. Somit könnte sich eine Behandlung mit Resveratrol positiv auf die Symptomatik chronischer Autoimmunerkrankungen auswirken (Harikumar and Aggarwal 2008).

## 5.2 Die Regulation der Genexpression

Eine regulierte Expression von Genen stellt die Grundlage für die Zelldifferenzierung dar und ist für eine angepasste Genexpression der Zelle als Reaktion auf chemische Signale und wechselnde Umweltbedingungen entscheidend. Der Verlust der kontrollierten Expression kann zu der Entwicklung verschiedener Krankheiten, wie den beschriebenen Autoimmunerkrankungen, führen.

Im Genom des Menschen kodiert nur ein geringer Teil des genetischen Materials für Proteine. Der weitaus größere Teil ist an der Regulation der Genexpression beteiligt. Der Prozess der Genregulation verläuft in mehreren Schritten. An jedem dieser Schritte können regulatorische Faktoren einwirken und den Prozess steuern.



Die Übertragung von DNA-Information auf die mRNA (Transkription) im Zellkern ist hierbei als Startelement für die Genregulation von besonderer Bedeutung. Die Transkription eukaryotischer Gene wird durch regulatorische Transkriptionsfaktoren (NF- $\kappa$ B, STATs, AP-1) kontrolliert, die an spezifische DNA-Elemente in Promotoren binden. Die Aktivität eines basalen Promotors kann durch weitere Bindungssequenzen, die stromaufwärts gelegen sein können, gesteigert werden, wie die CCAAT-Box (McKnight and Tjian 1986) und die Sp1-Box („specificity protein 1“), eine GC-reiche Sequenz, die in vielen Genen mit oder ohne TATA-Box gefunden wird (Dyana, Saffer et al. 1985). Alle diese Elemente sind essentiell für eine effiziente Transkription und werden als UPEs (*upstream promoter elements*) bezeichnet.

Die entstandene prä-messenger RNA unterliegt nun einer Reihe von Reifungsschritten, bis sie schließlich als reife mRNA in das Cytoplasma transportiert und dort zu einem Protein translatiert wird.

Diese Reifungsschritte beinhalten das Entfernen von Introns (Spleißen), das Anfügen einer 7-Methyl-Guanylat-Kopfgruppe am 5'-Ende des ersten Exons (*Capping*) sowie eines Poly-A-Schwanzes aus 100 bis 250 Adenyl-Resten am 3'-Ende des letzten Exons.

Die entstandene reife mRNA besitzt eine dreigeteilte Struktur: eine 5'-untranslatierte Region (5'-UTR), die kodierende Sequenz (cds) und eine 3'-untranslatierte Region (3'-UTR). Die untranslatierten Regionen spielen eine wichtige Rolle für die post-transkriptionelle Regulation der Genexpression. Sie sind am Transport der mRNA aus dem Zellkern, an der Effektivität der Translation sowie der Stabilität der mRNA (Yaniv and Yisraeli 2001; Newbury, Muhlemann et al. 2006) beteiligt. Die Bedeutung von untranslatierten Regionen wird dadurch unterstrichen, dass Mutationen in diesen Regionen ernsthafte pathophysiologische Vorgänge zur Folge haben können (Levin and Mercola 2000).

### **5.2.1 Post-transkriptionelle Regulation pro-inflammatorischer Gene**

Die Modulation der mRNA-Stabilität ist ein entscheidender Faktor für die post-transkriptionelle Regulation der Genexpression. An der post-transkriptionellen Regulation der Stabilität pro-inflammatorischer mRNAs sind unterschiedliche RNA-BP und miRNAs beteiligt (Anderson 2010). Veränderungen in diesen post-transkriptionellen Regulationsmechanismen scheinen bei vielen inflammatorischen und angiogenetischen Mechanismen eine Rolle zu spielen (Khabar 2010; Chang and Hla 2011).

### **5.2.2 Die Regulation der mRNA-Stabilität über mRNA-bindende Proteine**

Die Halbwertszeit instabiler RNAs von Transkriptionsfaktoren, Wachstumsfaktoren, Onkogenen und pro-inflammatorischen Genen werden durch *cis*-Elemente in der 3'-UTR,

wie Adenylat- und Uridylat-reiche (AU-reiche) Elemente (ARE), kontrolliert. Über diese ARE wird die Stabilität von mRNAs als Reaktion auf eine Vielzahl von spezifischen extra- und intrazellulären Signalen moduliert. Dabei sind sie die am weitesten verbreiteten und effizientesten Sequenzen zur Regulation der mRNA-Stabilität in Mammalierzellen (Bevilacqua, Ceriani et al. 2003). ARE können in drei Klassen unterteilt werden: Klasse I und II zeichnen sich durch das Vorhandensein multipler Kopien des Pentanukleotids AUUUA aus. Klasse I-ARE kontrollieren die Cytoplasmatische Deadenylierung von mRNAs durch eine gleichmäßige Degradation des Poly-A-Schwanzes. Sie finden sich häufig in mRNAs, die für nukleäre Transkriptionsfaktoren wie z.B. c-myc oder c-fos kodieren. Das AUUUA-Element befindet sich hier zusätzlich in einer U-reichen Umgebung. Klasse II-ARE vermitteln eine unterschiedlich schnelle Deadenylierung von verschiedenen Transkripten. Sie sind durch das Vorhandensein vieler zusammenhängender oder überlappender AUUUA-Pentamere charakterisiert. Klasse II-ARE sind unter anderem in der mRNA von Cytokinen wie GM-CSF, IL-2 oder TNF- $\alpha$  vorhanden. Klasse III-ARE, die sich zum Beispiel in der c-jun-mRNA finden, besitzen nur U-reiche Segmente.

An diese *cis*-Elemente der 3'-UTR der RNA können *trans*-agierende Faktoren, die ARE-bindenden Proteine (ARE-BPs), binden. Diese sind Bestandteil vieler regulatorischer Mechanismen, sowohl im Zellkern als auch im Cytoplasma. Sie sind an der mRNA-Reifung im Zellkern, dem Transport der reifen mRNAs ins Cytoplasma, deren subzellulärer Lokalisation sowie der Regulation ihrer Stabilität und Translation beteiligt. Es konnte gezeigt werden, dass ARE-BP für die Rekrutierung des Exosoms an ARE-haltige mRNAs verantwortlich sind (Chen, Gherzi et al. 2001). Das Exosom umfasst einen Komplex aus sechs phosphorolytischen 3'-5'-Exonukleasen und einigen assoziierten hydrolytischen 3'-5'-Exonukleasen und Helicasen, was den Abbau der mRNAs in 3'→5'-Richtung induziert. Zusätzlich konnte der Abbau der mRNA in 5'→3'-Richtung durch eine Interaktion mit ARE-BPs nachgewiesen werden. Dieser Prozess startet mit *decapping* des 5'-Caps durch Dcp1 gefolgt vom Abbau der mRNA durch die 5'-3'-Exonuclease Xrn1 (Lejeune, Li et al. 2003; Stoecklin, Mayo et al. 2006).

Zu den ARE-BPs zählen unter anderem AUF-1, HuR, TTP, PABP und KSRP (Bollig, Winzen et al. 2003; Linker, Pautz et al. 2005; Khabar 2010; Chang and Hla 2011). Während AUF-1, TTP und KSRP zumeist als destabilisierende Faktoren beschrieben werden, scheint HuR überwiegend stabilisierende Funktionen einzunehmen. Die Relevanz von ARE-BPs konnte in der Pathogenese entzündlicher Erkrankungen in verschiedenen Tiermodellen gezeigt werden. TTP-defiziente Mäuse zeichnen sich durch eine massive Überexpression von TNF- $\alpha$  und GM-CSF aus und entwickeln spontan einen chronisch-entzündlichen Phänotyp (Carballo and Blackshear 2001). Eine erhöhte pro-inflammatorische Genexpression wurde auch in AUF-1-defizienten Mäusen beobachtet (Lu, Sadri et al. 2006). Zusätzlich wird die erhöhte

Expression verschiedener Gene (c-myc, c-fos, TNF- $\alpha$ , IL-2, GM-CSF) in Tumorellen und inflammatorischen Erkrankungen auf eine erhöhte mRNA-Stabilität zurückgeführt, was wiederum durch eine Fehlregulation von mRNA-BPs begründet wird (Nguyen-Chi and Morello 2008; Khabar 2010).

### **5.2.3 Die Regulation der mRNA-Stabilität und -Translatierbarkeit über die Interaktion mit miRNAs**

miRNAs wurden erstmals im Fadenwurm *C.elegans* beschrieben und sind kleine nicht Protein-kodierende einzelsträngige RNA-Moleküle (~ 22 Nucleotide lang), die mit Argonaut-Proteinen einen miRNA-Protein-Komplex bilden, der als RISC (*RNA-induced Silencing Complex*) die Translatierbarkeit und Stabilität von mRNAs beeinflussen kann. Der RISC bindet über die miRNA an Regionen meist unvollständiger Komplementarität in der 3'-UTR der Ziel-mRNA und hemmt in Vertebraten vorzugsweise die Translation (Fabian, Sonenberg et al. 2010). Bei vollständiger Homologie kann aber auch die mRNA-Stabilität moduliert werden (Pillai, Bhattacharyya et al. 2007). Man schätzt, dass jede miRNA potentiell mit Hunderten von Ziel-mRNAs interagieren kann. Darüber hinaus werden viele miRNA-Zielgene von verschiedenen miRNAs reguliert, was die Komplexität dieser Genregulations-Mechanismen verdeutlicht. Zusätzlich können ARE-BP mit miRNAs bei der post-transkriptionellen Regulation pro-inflammatorischer Gene interagieren oder konkurrieren. So wurde eine Koregulation der TNF- $\alpha$ -Expression durch TTP und der miR-16 über eine Wechselwirkung von TTP mit Argonaut-Proteinen des RISC gezeigt (Jing, Huang et al. 2005). Weiterhin wurde eine Kooperation von HuR und let-7 bei der Destabilisierung der c-myc-mRNA beschrieben. HuR bindet an die 3'UTR der c-myc-mRNA und rekrutiert den let-7 assoziierten RISC. Im Falle von CAT-1 (*cationic amino acid transporter*) konkurrieren HuR und die miR-122 um die gleiche Bindungsstelle auf der mRNA (Chang and Hla 2011). Diese beschriebenen Auswirkungen einer miR-abhängigen Regulation spielen in die Pathogenese verschiedener Autoimmunerkrankungen und Mechanismen der Angiogenese eine bedeutende Rolle (Szymanski and Barciszewski 2003; Furer, Greenberg et al. 2010; Chang and Hla 2011).

## **5.3 Das KH type splicing regulatory protein KSRP**

Das für das *KH-type splicing regulatory protein* (KSRP) kodierende Gen befindet sich auf dem humanen Chromosom 19p13.3 und dem Maus-Chromosom 17. Vergleichende Analysen des menschlichen und murinen Gens zeigen, dass KSRP zwischen den Spezies hochgradig konserviert ist (Ring, Vameghi-Meyers et al. 1999). KSRP zeichnet sich durch

vier *K homology* (KH) Motive aus, die für die Interaktion von KSRP mit Nukleinsäuren und anderen Proteinen eine zentrale Rolle spielen. Es wird in fast allen Zellarten exprimiert und zeigt eine vorrangig nukleäre Lokalisation (Hall, Huang et al. 2004).

KSRP ist ein multifunktionelles, an einzelsträngige Nukleinsäuren bindendes Protein mit verschiedenen Aufgaben in der Regulation der Biogenese und der Funktion von mRNAs und miRNAs (Briata, Chen et al. 2011). Es bindet an das *far upstream sequence element* (FUSE) im Promotor des *c-myc* Gens und erhöht die *c-myc* Transkription (He, Weber et al. 2000). Weiterhin interagiert KSRP mit dem *intronic splicing enhancer* des *c-src* Gens und reguliert somit das alternative Splicing der *c-src* hnRNA (Min, Turck et al. 1997). Als eine wichtige Komponente des APOBEC-1-Komplexes ist KSRP zentral am *editing* der apoB-mRNA beteiligt (Lellek, Kirsten et al. 2000). KSRP wurde eine zentrale Rolle in der Regulation der Stabilität und Translatierbarkeit von mRNAs pro-inflammatorischer Proteine zugeschrieben und ist somit ein zentraler Modulator des ARE-abhängigen mRNA-Abbaus (AMD) (Gherzi, Lee et al. 2004). Schließlich wurde gezeigt, dass KSRP die Biogenese einiger miRNAs moduliert (Trabucchi, Briata et al. 2009). Neuere Daten weisen auf zwei weitere Funktionen von KSRP hin. Durch Bindung an die *internal ribosomal entry site* des Enterovirus 71 reguliert KSRP negativ die virale Translation (Lin, Li et al. 2009). Durch Bindung an eine sogenannte USE-Sequenz hemmt KSRP die Prozessierung des 3'-Endes der Prothrombin-RNA und die Prothrombin-Expression (Danckwardt, Gantzer et al. 2011). Somit reguliert KSRP die Expression wichtiger Protein-kodierender Gene direkt (Splicing, Translation, mRNA-Stabilität) sowie indirekt (Reifung von miRNAs) durch multifunktionelle Mechanismen.

### 5.3.1 KSRP als ARE-bindendes Protein

Für verschiedene Gene wurde eine wichtige Funktion von KSRP bei der Regulation der mRNA-Stabilität nachgewiesen. Dabei bindet KSRP bevorzugt an die AU-reichen Elemente dieser mRNAs. Winzen *et al.* zeigte die Rolle von KSRP als RNA-destabilisierendes Faktor für die IL-8-, IL-6-, COX-2- und CSF-2-mRNA (Winzen, Thakur et al. 2007). Weiterhin wurde für die Pitx2-mRNA (Briata, Ilengo et al. 2003), die iNOS-mRNA (Linker, Pautz et al. 2005), die TNF- $\alpha$ -mRNA (Nguyen-Chi and Morello 2008) und die  $\beta$ -Catenin-mRNA (Gherzi, Trabucchi et al. 2006) eine Destabilisierung durch KSRP beschrieben. In embryonalen Fibroblasten, die aus KSRP-defizienten Mäusen isoliert wurden, konnte eine erhöhte IFN- $\alpha$ - und IFN- $\beta$ -Expression nach viraler Infektion nachgewiesen werden, was auf einen reduzierten mRNA-Abbau zurückgeführt wurde (Lin, Zheng et al. 2011).

*In-situ*- und *in-vivo*-Experimente von Gherzi *et al.* unterstreichen die Rolle von KSRP als RNA-bindendes Protein, das den Abbau von ARE-haltigen mRNAs durch Rekrutierung des Degradationsapparates veranlasst. Dabei sind die KH3- und KH4-Domänen essentiell für die

Bindung von KSRP an die mRNA, wobei das KH3 für die Interaktion von KSRP mit dem Exosom verantwortlich zu sein scheint (Gherzi, Lee et al. 2004). Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass KH3 und KH4 unabhängig voneinander agieren. Dadurch könnte eine Bindung von KSRP an unterschiedliche Gruppen von Ziel-mRNAs vermittelt werden (Garcia-Mayoral, Hollingworth et al. 2007).

Somit ist KSRP ein zentraler Modulator des ARE-abhängigen mRNA-Abbaus (AMD).

### **5.3.2 Die Bedeutung von KSRP für die miRNA-Prozessierung**

miRNAs werden aus den miRNA-Vorläufern pri- und prä-miRNA durch die Endoribonucleasen Drosha (pri) und Dicer (prä) prozessiert. 2009 beschrieben Trabucchi *et al.* KSRP als wichtige Komponente des Dicer- und Drosha-Komplexes und wiesen eine Bindung über die KH3- und KH4-Domäne an die terminale Schleife der prä-miRNA-Vorstufe von *let-7a* nach. In Microarray-Analysen konnten zusätzlich 14 miRNAs (z.B. miR-20a/b, miR-21, miR-335) identifiziert werden, deren Biogenese durch KSRP erhöht wird (Trabucchi, Briata et al. 2009). Für diese KSRP-abhängige Induktion der miRNA-Prozessierung kann ausschließlich die Interaktion mit der terminalen Schleife verantwortlich gemacht werden.

Kurz darauf wurden die miR-155-Vorstufen als weitere Zielstrukturen KSRPs identifiziert (Ruggiero, Trabucchi et al. 2009). Hier erhöhte eine KSRP-Depletion die LPS-induzierten miR-155-Ziel-Transkripte iNOS, IL-1 $\beta$  und IL-12p40 in RAW264.7 Makrophagen. Nach Substitution der miR-155 normalisierte sich die Expression dieser Gene. Somit kann der miR-155 bzw. KSRP eine bedeutende Funktion in entzündlichen Erkrankungen zugeschrieben werden. Die Relevanz der miR-155 für die Ausbildung einer Collagen-induzierten Arthritis in einem Maus-Modell mit Deletion der miR-155 Sequenz verdeutlicht die Bedeutung dieser Mechanismen (Kurowska-Stolarska, Alivernini et al. 2011).

### **5.3.3 Die Regulation der KSRP-Expression und -Aktivität**

Über die Regulation der Expression von KSRP und über die dabei agierenden molekularen Mechanismen ist bisher sehr wenig bekannt. So wurde in Zellen mit einer Deletion des BRCA1-Genes eine erhöhte mRNA- und Protein-Expression von KSRP beschrieben. Diese erhöhte KSRP Expression wurde durch Reexpression von BRCA1 wieder normalisiert (Santarosa, Del Col et al. 2010). Dagegen zeigten Proteom-Analysen in wenig oder kaum differenziertem hepatozellulären Karzinomgewebe eine erhöhte KSRP-Expression (Zubaidah, Tan et al. 2008). Zu der Regulation der KSRP-Expression auf post-transkriptioneller Ebene existiert bisher nur eine systematische Analyse der Regulation ARE-BPs untereinander. Hier wurde die Interaktion von HuR und AUF-1 mit der KSRP-3'-UTR

nachgewiesen. Weiterhin führte die Depletion von HuR zu einer Reduktion der KSRP-Expression (Pullmann, Kim et al. 2007).

Bisherige Untersuchungen zur Regulation der KSRP-Aktivität zeigen vorwiegend post-translationale Modifikationen, indem KSRP durch eine Phosphorylierung oder Dephosphorylierung aktiviert bzw. deaktiviert wird. Briata *et al.* konnten zeigen, dass KSRP durch die p38-MAPK am Threonin 692 phosphoryliert wird (Dean, Sully et al. 2004). Diese Phosphorylierung hemmt die Bindung von KSRP an ARE-Sequenzen und führt so zu einer Erhöhung der Stabilität von myogenen Transkripten und den von ihnen kodierten Proteinen, die für die Differenzierung von Myoblasten zu Muskelzellen eine zentrale Rolle spielen (Briata, Chen et al. 2011). Ebenso ist die Erhöhung der IL-8-Expression durch eine IL-1-induzierte Aktivierung der p38-MAPK, der Phosphorylierung von KSRP und der dadurch reduzierten Bindung von KSRP an die 3'-UTR der IL-8-mRNA zu erklären (Winzen, Thakur et al. 2007). Eine Phosphorylierung von KSRP durch PKB an Serin 193 stimuliert die Entfaltung der instabilen KH1-Domäne, wodurch eine Bindungsstelle für 14-3-3zeta freigelegt wird (Diaz-Moreno, Hollingworth et al. 2009). Die daraus resultierende erhöhte Interaktion von KSRP und 14-3-3zeta führt zur Akkumulation von KSRP im Zellkern und somit zu einer verringerten KSRP-vermittelten Destabilisierung von mRNAs im Cytoplasma. Die Phosphorylierung von KSRP durch die PKB führt zusätzlich zu einer Verringerung der Interaktion von KSRP mit dem Exosom und dadurch zur Stabilisierung der  $\beta$ -Catenin-mRNA (Gherzi, Trabucchi et al. 2006). Eine Dephosphorylierung von KSRP an Serin 181 durch die Peptidylprolyl-Isomerase Pin1 führt zu einer Aktivierung des KSRP-abhängigen Abbaus der Parathyroidhormon-mRNA (Nechama, Uchida et al. 2009). Zuletzt konnte die direkte Bindung der durch DNA-Schäden aktivierten ATM-Kinase an KSRP nachgewiesen werden. Die daraus resultierende Phosphorylierung erhöht die Interaktion von KSRP mit prä-miRNAs und führt so zu einer verstärkten Biogenese von reifen miRNAs (Zhang, Wan et al. 2011).

## 6 Zielsetzung

Daten aus humanen Zellkulturmodellen sowie aus Tiermodellen zeigen die zentrale Bedeutung der ARE-bindenden Proteinen (ARE-BP) TTP, HuR und AUF-1 für die Regulation der Genexpression innerhalb chronisch-entzündlicher Erkrankungen. Auch für das *KH type splicing regulatory protein* KSRP wurde eine zentrale Bedeutung bei der Regulation der pro-inflammatorischen Genexpression gezeigt.

Ziel dieser Arbeit war die Analyse der Bedeutung der KSRP-Expression für die Pathogenese chronisch-entzündlicher Erkrankungen wie der Rheumatoiden Arthritis (RA). Dazu sollten Analysen mit Hilfe des murinen RA-Modells der Collagen-induzierten Arthritis (CIA) durchgeführt werden. Es sollte die KSRP-Expression in verschiedenen Organen Collagen-immunisierter Tiere untersucht werden und mit der von pro-inflammatorischen Genen korreliert werden.

Humane etablierte C28/I2-Chondrozyten werden als ein zelluläres Modell der humanen RA angesehen. Daher sollten Analysen der Effekte einer Überexpression von KSRP in C28/I2-Chondrozyten erfolgen. Dazu sollten stabil KSRP-überexprimierende C28/I2-Chondrozyten generiert werden. Zur genomweiten Analyse der Effekte der KSRP-Überexpression sollten diese Untersuchungen mit Hilfe der DNA-Microarray-Technik erfolgen.

Die Daten aus den murinen CIA- und den humanen Chondrozyten-Analysen sollten schließlich miteinander verglichen werden, um Spezies-übergreifende Effekte von KSRP auf die pro-inflammatorische Genexpression zu untersuchen.

Im Modell der humanen epithelialen DLD-1-Kolonkarzinom-Zellen sollte eine Analyse der molekularen Mechanismen der KSRP-Expression erfolgen. Die Mechanismen der Regulation sollten auf transkriptioneller und post-transkriptioneller Ebene untersucht werden. Eine frühere systemische Analyse ARE-BPs untereinander spricht für eine post-transkriptionelle Regulation der KSRP-Expression. Daher sollte in UV-Crosslink-Experimenten die Bindung verschiedener ARE-BPs und der Einfluss dieser auf die KSRP-mRNA-Expression untersucht werden.

Die Arbeitsgruppe von Prof. Dr. [REDACTED] identifizierte KSRP als direkten Interaktionspartner von Resveratrol. Aufgrund der anti-inflammatorischen und cardioprotektiven Eigenschaften dieses Naturstoffes und der Bedeutung von KSRP innerhalb inflammatorischer Vorgänge sollte die Funktion dieser Bindung *in situ* und *in vivo* eingehend untersucht werden. Diese Analysen zeigten eine positive Stimulation der KSRP-Funktionen durch die Behandlung mit Resveratrol, so dass der Mechanismus dieser Aktivitätserhöhung näher analysiert werden sollte.

## 7 Materialien

### 7.1 Chemikalien

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

#### 7.1.1 Spezielle Chemikalien

Acrylamid 4K-Lösung (30 %) Mix 29:1	(Applichem)
Agarose	(Roth)
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	(Sigma)
Bovines Serum Albumin, Fraktion V	(Applichem)
Bradford-Reagenz	(Biorad)
Bromphenolblau	(Sigma)
Coenzym A-Trilithiumsalz-Dihydrat	(Applichem)
Coelenterazin	(PJK)
Diethylpyrocarbonat (DEPC)	(Sigma)
Dimethylsulfoxid (DMSO)	(Sigma)
D-Luciferin	(PJK)
DTT (1,4 Dithiothreitol)	(Biomol)
Glycin	(Sigma)
Glycerin	(Roth)
Guanidiniumisothiocyanat	(Roth)
Heparin	(Sigma)
Magermilchpulver	(Applichem)
Methanol	(Applichem)
Natriumnitrit ( $\text{NaNO}_2$ )	(Sigma)
NTP's und dNTP's	(PeqLab)
Nonidet P-40 (NP-40)	(Sigma)
5x PLB ( <i>Passive Lysis Buffer</i> )	(Promega)
Ponceau S	(Sigma)
Protein A/G Agarose	(Santa Cruz)
RNase-Inhibitor (RNasin) 40 U/ $\mu\text{l}$	(Fermentas)
SDS ultra pure	(Roth)
Szintillationsflüssigkeit Lumasafe plus	(Lumac)
t-RNA	(Sigma)



TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylethylethylendiamin) (Sigma)

Tween-20 (Sigma)

### 7.1.2 Radioaktive Chemikalien

RADIONUKLEOTID		SPEZIFISCHE AKTIVITÄT	HALBWERTSZEIT	HERSTELLER
<sup>32</sup> [α- P]-UTP	β-Strahler	29,6 Tbq/mmol	14,3 Tage	MP Biochemicals

### 7.1.3 Reagenzien zur Analyse der Expression pro-inflammatorischer Gene und zur Behandlung von Zellen

CYTOKINE (STRAHTMANN) UND SUBSTANZEN	EXPRIMIERT IN:	KONZ. DER STAMM-LÖSUNG	KONZ. IM INKUBATIONS-MEDIUM	GELÖST IN (STERIL)	ZELL-LINIE
Humanes rekombinantes TNF-α	<i>Escherichia coli</i>	10 <sup>6</sup> U (10 ng)/μl	10 ng/ml	PBS, 1% BSA	DLD-1, C28/I2
Humanes rekombinantes IL-1β	<i>Escherichia coli</i>	2.000 U/μl	50 U/ml	PBS, 1% BSA	DLD-1, C28/I2
Humanes rekombinantes IFN-γ	<i>Escherichia coli</i>	1.000 U/μl	100 U/ml	PBS, 1% BSA	DLD-1, C28/I2,
Resveratrol		30 mM	1 - 30 μM	DMSO	DLD-1
Sirtinol		30 mM	30 μM	DMSO	DLD-1

**Tabelle 7.1: Cytokine und Substanzen zur Induktion pro-inflammatorischer Gene und zur Behandlung der Zellen**

### 7.1.4 Reagenzien und Kits

Gene Juice (Calbiochem)

High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (ABI)

TaqMan MicroRNA Reverse Transcription Kit (ABI)

TaqMan MicroRNA Assay (miR-155) (ABI)

iProof High Fidelity DNA Polymerase Kit (BioRad)

Go Taq PCR Kit	(Promega)
Phusion High Fidelity Polymerase Kit	(NEB)
Super Script Plus Direct Labeling Kit	(Invitrogen)
Experion RNA StdSens Analysis Kit	(BioRad)
Whole Genome Human Microarray Slides (Phalanx Biotech)	(Eurogentec)
RNeasy Kit	(Qiagen)
Plasmid Midi Kit	(Invitrogen)
QIAquick PCR Purification Kit	(Qiagen)
Quick Spin Columns for radiolabeled RNA purification	(Roche)
Western Lightning, Chemilumineszenz-Reagenz	(PerkinElmer)

## 7.2 Marker

Für DNA:

Gene Ruler 50 bp DNA Ladder

pcDNA1 x *Hinf* I (22-1058 kb)

$\lambda$  DNA/*Eco* 91I (117-20995 kb)

(Fermentas)

Für Protein:

Page Ruler, Prestained Protein Ladder

(10-180 kDa)

(Thermo Scient.)

## 7.3 Lösungen und Puffer

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

### 7.3.1 Allgemeine Lösungen und Puffer

#### DEPC-Wasser

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

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

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

**DNA-Probenpuffer**

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

**GIT-Puffer**

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

**7.3.2 Medien und Medienzusätze für die Zellkultur**

**Lösungen:**

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

**Medium:**

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

**Medienzusätze:**

Fötales Kälberserum ( <i>fetal calf serum</i> , FCS), hitzeinaktiviert	(HyClone)
L-Glutamin (100x konzentriert, 200 mM)	(PAN Biotech)
Natrium-Pyruvat (100x konzentriert, 100 mM)	(Sigma)
Pyruvat (100x konzentriert, 100 mM)	(Roth)
Penicillin/Streptomycin (100x konzentriert, 10.000 U bzw. 10 mg/ml)	(Sigma)
Hygromycin	(PAA)
Zeocin	(InvivoGen)

### 7.3.3 Bakterienmedien

#### LB-Medium, pH 7,0

10 g Bactotrypton (Casein)

10 g NaCl

5 g Hefeextrakt

mit Aqua bidest. auf 1 l auffüllen, 20 Minuten autoklavieren

#### LB-Amp-Medium

LB-Medium + 100 µg/ml Ampicillin

#### LB-Amp-Platten

1 l LB-Amp-Medium + 15 g Bactoagar

### 7.3.4 Lösungen und Puffer für die Plasmid-DNA-Präparation

#### Maniatis I (500 ml)

9,9 g Glucose (50 mM)

12,5 ml 1M Tris/HCl (25 mM – pH 8,8)

10 ml 0,5M EDTA (10 mM – pH 8,8)

#### Maniatis II (10 ml)

200 µl 10N NaOH

1 ml SDS, 10%

9,3 ml Milipore

#### Maniatis III

3 M KAc, pH 4,8

### 7.3.5 Lösungen und Puffer für Protein-Analysen

#### RIPA-Puffer

50 mM Tris-HCl pH 7,4

150 mM NaCl

1 % NP-40

2 mM EDTA

10 % Glycerin

Proteaseinhibitoren / Phosphataseinhibitoren nach Herstellerangabe (Roche) frisch hinzugeben.

#### 2x Laemmli-Probenpuffer

125 mM Tris/HCl pH 6.8

2 mM EDTA

4 % SDS

20 % Glycerin

0.02 % Bromphenolblau

Vor Gebrauch wird DTT in einer 40 mM Endkonzentration zugesetzt.

#### 5x Laufpuffer

125 mM Tris-HCl, pH 8,8

960 mM Glycin

0,5 % SDS

#### Ponceau S-Färbelösung

0,5 % Ponceau S

1 % Eisessig

#### TBS

10 mM Tris-HCl, pH 7,8

150 mM NaCl

#### Transferpuffer

25 mM Tris-HCl, pH 8,3

960 mM Glycin

20 % Methanol

### 7.3.6 Lösungen und Puffer für Microarray-Analysen

#### 20x SSPE-Puffer

175,3 g	NaCl
27,6 g	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
9,4 g	EDTA

Mit H<sub>2</sub>O auf 1 l auffüllen; pH 7,4 (NaOH); vor Gebrauch autoklavieren

#### Prä-Hybridisierungslösung:

5x	SSPE
0,1 %	SDS
1 %	BSA

#### Waschlösungen

2x	SSPE (+/-0,1 % SDS Lösung)
0,1x	SSPE (+/- 0,1 % SDS Lösung)

### 7.3.7 Lösungen und Puffer für UV-Crosslink-Analysen

#### Cyt\_10 Puffer

80 µl	1 M HEPES, KOH pH 7,4
27 µl	1 M MgCl <sub>2</sub>
380 µl	1 M KCl
500 µl	1 M EDTA, pH 8

#### RNase A/T1Puffer

300 mM	NaCl
10 mM	Tris-HCl, pH 7,5
5 mM	EDTA

## 7.4 Antikörper

PRIMÄR ANTIKÖRPER	KLASSE HERKUNFT	FIRMA	GRÖÖE (kDa)	VERDÜNNUNG	BLOCKIER- UND VERDÜNNUNGSPUFFER
β-Tubulin	Monoklonal Maus	Sigma	55	1:10000	5 % Milchpulver (MP), 0,1 % Tween-20 in TBS

PRIMÄR ANTIKÖRPER	KLASSE HERKUNFT	FIRMA	GRÖÖE (kDa)	VERDÜNNUNG	BLOCKIER- UND VERDÜNNUNGS-PUFFER
p38-MAPK	Polyklonal Hase	Cell Signaling	43	1:1000	5 % BSA, 0,1 % Tween-20 in TBS
Phospho-p38-MAPK	Polyklonal Hase	Cell Signaling	43	1:1000	5 % BSA, 0,1 % Tween-20 in TBS
ATF-2	Polyklonal Hase	Santa Cruz	70	1:200	5 % Milchpulver (MP), 0,1 % Tween-20 in TBS
Phospho-ATF-2	Polyklonal Hase	Cell Signaling	70	1:1000	5 % BSA, 0,1 % Tween-20 in TBS
KSRP	Monoklonal Maus	AG Chen	75	1:50	5 % Milchpulver (MP), 0,1 % Tween-20 in TBS
iNOS	Monoklonal Maus	R&D	125	1:2000	5 % Milchpulver (MP), 0,1 % Tween-20 in TBS
HuR	Monoklonal Maus	Santa Cruz	36	1:200-1:1000	5 % Milchpulver (MP), 0,1 % Tween-20 in TBS
AUF-1 (HNRPD)	Polyklonal Hase	Sigma HPA0049 11	37,40,42, 45	1:1000	5 % Milchpulver (MP), 0,1 % Tween-20 in TBS
eGFP	Monoklonal Maus	Roche	27	1:1000	5 % Milchpulver (MP), 0,1 % Tween-20 in TBS
GAPDH	Monoklonal Maus	Santa Cruz	37	1:200-1:1000	5 % Milchpulver (MP), 0,1 % Tween-20 in TBS

Tabelle 7.2: Verwendete Primärantikörper in Western Blot Analysen

SEKUNDÄR ANTIKÖRPER	FIRMA	VERDÜNNUNG	VERDÜNNUNGSPUFFER
Anti-Maus, Peroxidase-gekoppelt	Sigma	1:10000	5 % Milchpulver (MP), 0,1 % Tween-20 in TBS
Anti-Kaninchen, Peroxidase gekoppelt			

Tabelle 7.3: Verwendete Sekundärantikörper in Western Blot Analysen

ANTI-KÖRPER	KLASSE HERKUNFT	FIRMA	MENGE PRO IP
KSRP	Polyklonal Hase	Novus biologicals	10 µl

Tabelle 7.4: Verwendete Antikörper in Immunopräzipitationsanalysen

## 7.5 Enzyme

ENZYM	HERSTELLER	BESCHREIBUNG
<i>Restriktionsendonukleasen des Typ II: EcoRI, EcoRV, FspAI, HindIII, SrgAI, SmaI, XbaI, XhoI</i>	NEB	Schneiden DNA an palindromischen Sequenzen und können je nach Enzym glatte oder klebrige Enden hinterlassen
<i>Klenow-Fragment der DNA-Polymerase I von E.coli</i>	NEB	Zum Auffüllen nach Verdau mit 5'-überhängend schneidenden Enzymen
<i>CIAP (calf intestinal alkaline phosphatase)</i>	Roche	Alkalische Phosphatase; dephosphoryliert 5'-Enden von DNA → keine Religation des Vektors
<i>T4 DNA-Ligase</i>	NEB	Ermöglicht die Ligation von DNA
<i>T7 RNA Polymerase 10 U/µl</i>	Roche	DNA-abhängige RNA-Polymerase, spezifisch für den T7-RNA-Promotor
<i>DNase I, RNase frei, 10 U/µl</i>	Roche	Doppelstrangspezifische Endonuklease
<i>RNase A, 10 U/µl</i>	Sigma	Pyrimidin-spezifische Endonuklease, die einzelsträngige RNA abbaut
<i>RNase T1, 100 U/µl</i>	Roche	Endonuklease, die einzelsträngige RNA nach Guanidinresten abbaut
<i>Proteinase K</i>	Roche	Serinprotease, die als Exo- und Endopeptidase fungiert, aus dem Schlauchpilz <i>Tritirachium album</i>

Tabelle 7.5: Verwendete Enzyme in Klonierungsexperimenten



## 7.6 Rekombinante Fusionsproteine

PROTEIN	BESCHREIBUNG	HERKUNFT
GST	Wurde durch den Vektor pGEX-2T in DH5 $\alpha$ -Bakterien exprimiert und aufgereinigt	AG Kleinert
GST-PABP	Wurde durch den Vektor pGEX-2T-PABP in DH5 $\alpha$ -Bakterien exprimiert und aufgereinigt	S. Nowag
GST-HuR	Wurde durch den Vektor pGEX-2T-HuR in DH5 $\alpha$ -Bakterien exprimiert und aufgereinigt	AG Kleinert
GST-PTB	Wurde durch den Vektor pGEX-2T-PTB in DH5 $\alpha$ -Bakterien exprimiert und aufgereinigt	AG Kleinert
GST-TTP	Wurde durch den Vektor pGEX-2T-TTP in DH5 $\alpha$ -Bakterien exprimiert und aufgereinigt	AG Kleinert
GST-p37 – p45	Wurde durch den Vektor pGEX-2T-p37 – pGEX-2T-p45 in DH5 $\alpha$ -Bakterien exprimiert und aufgereinigt	AG Kleinert
His-KSRP	Wurde durch den Vektor pET15b-His-KSRP in BL21(DE3)LysS Bakterien exprimiert und aufgereinigt	J. Art

Tabelle 7.6: Rekombinante Fusionsproteine

## 7.7 Plasmide

### 7.7.1 Expressionsplasmide für die stabile und transiente Transfektion

PLASMID	BESCHREIBUNG	TRANSFIZIERTE ZELLE	HERSTELLER
pcDNA5GFP	Vektor mit Hygromycinresistenz und GFP-Gen unter der Kontrolle des CMV-Promotors	C28/I2, DLD-1	Invitrogen
pcDNA5KSRP	GFP-KSRP Fragment aus <i>BbsI</i> -Verdau von pcDNA4KSRP in pcDNA5 kloniert	C28/I2-KSRP, DLD-1	N.Schmidt
psiRNAsiluc	Expressionsplasmid für die Luciferase-spezifische siRNA	DLD-1	AG Kleinert
psiRNAsiKSRPchen	Expressionsplasmid für die etablierte KSRP spezifische siRNA (GAUCAACCGGAGAGCAAGA) (Gherzi, Lee et al. 2004)	DLD-1	AG Kleinert
pEGFP	Expressionsplasmid zur GFP-Expression unter der Kontrolle des CMV-Promotors	DLD-1	Invitrogen

PLASMID	BESCHREIBUNG	TRANSFIZIERTE ZELLE	HERSTELLER
pEGFP-HuR	Expressionsplasmid zur HuR-GFP-Expression unter der Kontrolle des CMV-Promotors	DLD-1	AG Kleinert

Tabelle 7.7: Plasmide für die stabile und transiente Transfektion

### 7.7.2 Plasmide für Reporteranalysen

PLASMID	BESCHREIBUNG	HERSTELLER
1. pGI4-luc	Plasmid mit Ampicillin-Resistenzgen und Luciferase Gen.	Promega
2. pGI4-KSRP-prom (3kb)	Das Reportergenkonstrukt pGI4-luc wurde mit <i>EcoRV</i> und <i>HindIII</i> geschnitten und mit einem 3kb KSRP-Promotorfragment, generiert mit den Oligonukleotiden KSRPprom-3P6 und -5P6, ligiert	J. Art
3. pGI4-KSRP-prom (2kb)	2. wurde mit <i>HindIII</i> und <i>FspAI</i> geschnitten und religiert um einen um 1kb verkürzten KSRP-Promotor zu erhalten	J. Art
4. pGI4-KSRP-prom (1kb)	2. wurde mit <i>SmaI</i> und <i>EcoRV</i> geschnitten und religiert um einen um 2kb verkürzten KSRP-Promotor zu erhalten	J. Art
5. pGI4-KSRP-prom-FUSE(+)	2. und das PCR-Fragment, generiert mit den Oligonukleotiden KSRPpromluc5P1 und -3P1HK, wurde mit <i>SrgAI</i> und <i>HindIII</i> geschnitten und ligiert; Das FUSE-analoge Bindemotiv ist gerade noch enthalten	J. Art
6. pGI4-KSRP-prom-FUSE(-)	2. und das PCR-Fragment, generiert mit den Oligonukleotiden KSRPpromluc5P1HK und -3P1HK, wurde mit <i>SrgAI</i> und <i>HindIII</i> geschnitten und ligiert; Das FUSE-analoge Bindemotiv ist gerade nicht enthalten	J. Art
7. pRLEF1a	Plasmid zur Expression der Renilla-Luciferase unter der Kontrolle des EF-1-alpha-Promotors	M. Bros
8. pMIR-report	9. wurde mit <i>HindIII</i> und <i>XhoI</i> geschnitten und religiert, um den Leervektor zu erhalten – Plasmid zur Expression der Luciferase unter der Kontrolle des CMV-Promotors	J. Art

PLASMID	BESCHREIBUNG	HERSTELLER
9. pMIR-SHIP1	Die 3'UTR der SHIP mRNA kloniert hinter einem Luciferasegen zur Analyse der miR-155-Aktivität	Addgene
10. pGI3-control	Enthält die Luciferase unter der Kontrolle des SV40-Promotors	Promega
11. pGI3-KSRP-3'UTR	10. wurde mit <i>Xba</i> I geschnitten und mit dem kinasierten PCR-Fragment (KSRP-UTR-5P1/3P4) ligiert. – Vektor zur Analyse der 3'UTR von KSRP	J. Art
12. pGI3-iNOS-3'UTR	Vektor zur Analyse der 3'UTR der iNOS	AG Kleinert

**Tabelle 7.8: Verwendete Plasmide für die transiente Transfektion von DLD-1 Zellen zur Durchführung von Luciferasereporteranalysen**

### 7.7.3 Plasmide für die *in vitro*-Transkription

PLASMID	BESCHREIBUNG	HERKUNFT
pCR-KSRP-3'UTR	pCRskript wurde mit <i>EcoRV</i> linearisiert und mit dem KSRP-3'UTR-Fragment (5P1/3P4) ligiert. Zur <i>in vitro</i> -Transkription wurde mit <i>EcoRI</i> linearisiert.	J. Art

**Tabelle 7.9: Plasmide für die *in vitro*-Transkription**

## 7.8 Oligonukleotide

### 7.8.1 Sequenzen der Oligonukleotide für die Amplifizierung verschiedener KSRP-Promotor-Fragmente und der KSRP-3'UTR

OLIGONUKLEOTID	SEQUENZ
5P6-KSRPprom	CCTAGGAAGGCCCTGTTTTTC
3P6-KSRPprom	GCGGAGGCTGAAGCTGAG
KSRPpromluc-5P1	CCAAGCTTGCATGACCCCCACGCTACTG
KSRPpromluc-5P2HK	CCAAGCTTGACAGGAGGACCTGATGACC
KSRPpromluc-3P1	GTACTCGGCGTAGGTAATGTCC
5P1-KSRP-UTR	CCTCTAGATCGAATGAATGTGAACCTTCTTCATCTG
3P4-KSRP-UTR	CAAAAAGCACTTTATTTAACAAAAAAA

**Tabelle 7.10: Sequenzen der Oligonukleotide für die Amplifizierung verschiedener KSRP-Promotor-Fragmente und der KSRP-3'UTR**

## 7.8.2 Sequenzen der Oligonukleotide und Sonden für die quantitative Real-Time RT-PCR-Analysen

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

OLIGONUKLEOTID	SEQUENZ
hiNOS sense	TGCAGACACGTGCGTTACTCC
hiNOS antisense	GGTAGCCAGCATAGCGGATG
hiNOS Sonde	TGGCAAGCACGACTTCCGGGTG
hKSRP sense	TGCAGCAAGCCTGTGAGATG
hKSRP antisense	TCCGTAATCATTCCGGTCCC
hKSRP Sonde	TGGACATCCTCCGGGAACGTGACC
hRNA-Pol 2A sense	GCACCACGTCCAATGACAT
hRNA-Pol 2A antisense	GTGCGGCTGCTTCCATAA
hRNA-Pol 2A Sonde	TACCACGTCATCTCCTTTGATGGCTCCTAT
hGAPDH sense	CCCATGTTTCGTCATGGGTGT
hGAPDH antisense	TTGTCATGAGTCCTTCCACGATA
hGAPDH Sonde	CTGCACCACCAACTGCTTAGCACC
hTNF- $\alpha$ sense	CAAGCCTGTAGCCCATGTTG
hTNF- $\alpha$ antisense	GGTTGACCTTGGTCTGGTAGG
hTNF- $\alpha$ Sonde	CAAGGCTGCCCTCCACCCA
hIL8 sense	GCCGTGGCTCTCTTGGC
hIL8 antisense	TAGCACTCCTTGCCAAAACCTG
hIL8 Sonde	CTTCCTGATTTCTGCAGCTCTGTGTGAAGG
hHuR sense	GTGAACTACGTGACCGCGAAG
hHuR antisense	GACTGGAGCCTCAAGCCG
hHuR Sonde	TGCAGAGAGAGCGATCAACACGCT
hPABP sense	GCTCAGGGTGCCAGACCTC
hPABP antisense	GGAGCAGCTGGGCGG
hPABP Sonde	TCCATTCCAAAATATGCCCGGTGCTA
hAUF-1pan sense	GCCTTTCTCCAGATACACCTGAAG
hAUF-1pan antisense	CTTATTGGTCTTGTGTCCATGGG
hAUF-1pan Sonde	TGGTGGTTTTGGTGAGGTGGAATCCATA
hKSRP-3'UTR sense	TTCTGAACCTGCCTCTCTG
hKSRP-3'UTR antisense	TCCAAGGAATGTTCCACCTC

OLIGONUKLEOTID	SEQUENZ
hKSRP-3'UTR Sonde	AGCAATTCATTTTCTCCCACCCTCG

Tabelle 7.11: Sequenzen der Oligonukleotide für *in situ*-Analysen humaner mRNA

OLIGONUKLEOTID	SEQUENZ
miNOS sense	CAGCTGGGCTGTACAAACCTT
miNOS antisense	CATTGGAAGTGAAGCGTTTTCG
miNOS Sonde	CGGGCAGCCTGTGAGACCTTTGA
mKSRP sense	CCTGGGATCCGCAAGGAC
mKSRP antisense	TCAGGAGTGTTGTTATTCACGGTG
mKSRP Sonde	CTTCGCCGACGCCGTGCAG
mTTP sense	CCATGGATCTCTCTGCCATC
mTTP antisense	CAGTCAGGCGAGAGGTGAC
mTTP Sonde	CGGAGGACTTTGGAACATAAACTCGGAC
mRNA-Pol 2A sense	ACCACGTCCAATGATATTGTGGAG
mRNA-Pol 2A antisense	ATGTCATAGTGTCACACAGGAGCG
mRNA-Pol 2A Sonde	CTGGGCATTGAGGCTGTGCGGAA
mGAPDH sense	TTCACCACCATGGAGAAGGC
mGAPDH antisense	GGCATGGACTGTGGTCATGA
mGAPDH Sonde	TGCTACCTG
mTNF- $\alpha$ sense	CATCTTCTCAAAATTTCGAGTGACAA
mTNF- $\alpha$ antisense	TGGGAGTAGACAAGGTACAACCC
mTNF- $\alpha$ Sonde	CACGTCGTAGAGTGGA
mIL6 sense	AAGTGCATCATCGTTGTTTCATACA
mIL6 antisense	GAGGATACCACTCCCAACAGACC
mIL6 Sonde	CAGAATTGCCATTGCACAACCTTTTTCTCA
mIFN- $\gamma$ sense	TGGCTCTGCAGGATTTTCATG
mIFN- $\gamma$ antisense	TCAAGTGGCATAGATGTGGAAGAA
mIFN- $\gamma$ Sonde	TCACCATCCTTTTGCCAGTTCCTCCAG
mIL-12p40 sense	GGAAGCACGGCAGCAGAATA
mIL-12p40 antisense	AACTTGAGGGAGAAGTAGGAATGG
mIL-12p40 Sonde	CATCATCAAACAGACCCGCCCAA
mS100A8 sense	CCATGCCGTCTACAGGGATG
mS100A8 antisense	TCATTCTGTAGAGGGCATGGTG
mS100A8 Sonde	CAATGCCGTCAAGGCC

Tabelle 7.12: Sequenzen der Oligonukleotide für *in vivo*-Analysen muriner mRNA

## 7.9 Zelllinien

ZELLEN	BESCHREIBUNG	RESISTENZ	HERSTELLER
C28-I/2	Humane Chondrozyten	Penicillin (100 U/ml), Streptomycin (100 µg/ml)	Goldring, M.B.
C28-I/2-GFP	C28-I/2 stabil transfiziert mit pcDNA5-GFP	Hygromycin (150 µg/ml)	J. Art
C28-I/2-KSRP	C28-I/2 stabil transfiziert mit pcDNA5-KSRP	Hygromycin (150µg/ml)	J. Art
DLD-1	Humane Kolon-Adenokarzinomzellen	Penicillin (100 U/ml), Streptomycin (100 µg/ml)	ATCC (CCL-221)
DLD-1-EF1-siluc	Humane Kolon-Adenokarzinomzellen, lentiviral transduziert mit pDHEF1GFPsiluc	Penicillin (100 U/ml), Streptomycin (100 µg/ml)	AG Reske Kunz
DLD-1-EF1-siKSRP	Humane Kolon-Adenokarzinomzellen, lentiviral transduziert mit pDHEF1GFPsiKSRPchen	Penicillin (100 U/ml), Streptomycin (100 µg/ml)	AG Reske Kunz(Besche, Wiechmann et al. 2010)
DLD-1-p40	Humane Kolon-Adenokarzinomzellen, stabil transfiziert mit pcDNA4TOGFPp40	0,2 mg/ml Zeocin	AG Kleinert
DLD-1-p42	Humane Kolon-Adenokarzinomzellen, stabil transfiziert mit pcDNA4TOGFPp42	0,2 mg/ml Zeocin	AG Kleinert
DLD-1-p45	Humane Kolon-Adenokarzinomzellen, stabil transfiziert mit pcDNA4TOGFPp45	0,2 mg/ml Zeocin	AG Kleinert
DLD-1-GFP	Humane Kolon-Adenokarzinomzellen, stabil transfiziert mit pcDNA4TOGFPC1	0,2 mg/ml Zeocin	AG Kleinert
DLD-1-pTER-siluc	Humane Kolon-Adenokarzinomzellen, stabil transfiziert mit pTER-eGFP-siluc	0,2 mg/ml Zeocin	S. Nowag

ZELLEN	BESCHREIBUNG	RESISTENZ	HERSTELLER
DLD-1-pTER-siPABP	Humane Kolon-Adenokarzinomzellen, stabil transfiziert mit pTER-eGFP-siPABP	0,2 mg/ml Zeocin	S. Nowag
DLD-1-iNOS-16kb	Humane Kolon-Adenokarzinomzellen, stabil transfiziert mit dem Reporter-genvektor pXP216kb (pNOSII16kb) zur Analyse des iNOS Promotors	0,2 mg/ml G418	AG Kleinert
DLD-1-NF- $\kappa$ B	Humane Kolon-Adenokarzinomzellen, stabil transfiziert mit dem Reporter-genvektor pNF- $\kappa$ Bluc zur Analyse der NF- $\kappa$ B-Aktivität	10 $\mu$ g/ml Blastizidin	M. Göllner
DLD-1-STAT-1 $\alpha$	Humane Kolon-Adenokarzinomzellen, stabil transfiziert mit dem Reporter-genvektor pGASluc zur Analyse der STAT-1 $\alpha$ Aktivität	10 $\mu$ g/ml Blastizidin	M. Göllner

Tabelle 7.13: Verwendete Zelllinien

## 7.10 Bakterien

TOP 10 (*E.coli* Stamm)

DH5 alpha (*E.coli* Stamm)

BL21(DE3)LysS (*E.coli* Stamm)

## 7.11 Versuchstiere

INZUCHT-MAUSSTAMM	BESCHREIBUNG	VERWENDETE ORGANE	HERKUNFT
TCR $\beta$ -TG	DBA/1-Transgenstamm, exprimiert spezifischen T-Zell-Rezeptor → Erhöhte Empfindlichkeit gegenüber Collagen Typ II (CII)	PBMC, Leber, Pfoten	Dr. L. Mori, Exp. Immunologie, Kantonsspital (Basel)
ApoE <sup>-/-</sup>	C57BL/6-Mäuse mit einem Knockout für das Apolipoprotein E → Erhöhte Atherosklerose	Milz, Leber, Darm, Aorta	Prof. Dr. Huige Li, (Mainz)

Tabelle 7.14: Verwendete Mausstämme

## 7.12 Laborgeräte

### 7.12.1 Zentrifugen

Tischzentrifugen:	Biofuge 13	(Heraeus)
Kühlzentrifugen:	Biofuge fresco	(Heraeus)

### 7.12.2 Geräte zur Elektrophorese

Gleichstromquellen:	Power Pac 300, Power Pac HC	(BioRad)
Vertikal-Gelelektrophoresekammer:	Mini Protean II	(BioRad)
Kapillarelektrophorese:	Experion	(BioRad)

### 7.12.3 Messgeräte

Photometer:	FluoStar Optima	(BMG)
	nanodrop ND-1000	(peqlab)
Luminometer:	Centro LB 960	(Berthold)
PCR-Gerät:	iCycler	(BioRad)
Szintillationszähler:	Tri-Carb 460 CD Liquid Scintillation System	(Packard)

### 7.12.4 Sonstige Laborgeräte

Brutschrank:	Hera Cell 150	(Heraeus)
Geltrockner:	Modell 583 / 543 Gel dryer mit Kühlfalle und Vakuumpumpe (Vapor Trap)	(BioRad)
Homogenisator:	Ultra Turrax T25	(Janke & Kunkel)



<b>Hybridisierungsgerät:</b>	Lucidea Slide Pro Hybridizer	(Amers. Bioscience)
<b>Microarray-Scanner:</b>	Scan Array Express	(Perk. Elmer)
<b>Mikroliterspritze:</b>	50 µl	(Hamilton)
<b>Mikroskop:</b>	Leitz DMIL	(Leica)
<b>Multipipette:</b>	Multipipette 1-20 µl	(Eppendorf)
<b>Pipetten:</b>	1-20 µl, 20-200 µl, 200-1000 µl	(Eppendorf)
<b>Präzisionswaagen:</b>	440 - 35 n, EW	(Kern)
<b>pH-Meter:</b>	φ32 pH-Meter	(Beckmann)
<b>Semi-Dry-Blot:</b>	Trans-Blot	(Biorad)
<b>Sterile Werkbank:</b>	Vacunsafe comfort	(IBS)
<b>Ultraschall-Homogenisator:</b>	Sonicator, ultrasonic processor XL	(Heat System)
<b>UV-Crosslinker:</b>	GS-Gene-Linker	(BioRad)
<b>Wasseraufbereitungsanlage:</b>	Milli-Q plus	(Millipore)
<b>Zählkammer für Zellen:</b>	Neubauer-Zählkammer	(Labotec)

## 7.13 sonstige Materialien

### 7.13.1 Plastikwaren

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

<b>Zellkulturflaschen, Filter Top:</b>	Kulturflasche/Volumen (cm <sup>2</sup> /ml): 75/250 und 25/50
<b>Gewebekultur-Petrischalen:</b>	Durchmesser/Wachstumsfläche (cm/cm <sup>2</sup> ): 14,5/145; 9,4/58 und 6,0/21
<b>Einweg-Auslaufpipetten:</b>	1 ml, 5 ml, 10 ml und 25 ml
<b>Zellkulturplatten, 6-Loch:</b>	Kulturfläche je Loch: 9,6 cm <sup>2</sup>
<b>Zellkulturplatten, 12-Loch:</b>	Kulturfläche je Loch: 3,8 cm <sup>2</sup>
<b>Zellkulturplatten, 24-Loch:</b>	Kulturfläche je Loch: 1,75 cm <sup>2</sup>
<b>Zentrifugenröhrchen:</b>	15 und 50 ml Spitzboden, 14 ml Rundboden
<b>Reaktionsgefäße :</b>	0,4 ml, 1,5 ml und 2,0 ml Safe-Lock, 1,5 ml mit Schraubverschluss und Kryo-Röhrchen
<b>PCR-Gefäße:</b>	96-Röhrchen-Platte, 8-Röhrchen-Streifen, Einzel- röhrchen, je 0,2 ml (peqlab)
<b>Plastikpipettenspitzen:</b>	0,5-10 µl, 10-100 µl und 100-1.000 µl

### 7.13.2 Weitere Verbrauchsmaterialien

**Whatman 3 MM Papier:** 3469 (Schleicher und Schuell)

**Nitrocellulose-Membran:** Whatman Protran BA 83 (0,2 µm) (Roth)

**Photomaterialien:** Entwickler- und Fixierer-Lösung (Kodak), Röntgenfilme (Agfa) Röntgenfilm-Fluoreszenzschirme (Agfa)

## 8 Methoden

### 8.1 Zellbiologische Arbeitsmethoden

#### 8.1.1 Kultivierung eukaryoter Zellen

Alle Arbeiten mit Zellen wurden mit sterilisierten Geräten, steril verpackten Pipetten und Zellkulturflaschen sowie steril filtrierten, autoklavierten oder steril gekauften Substanzen in einer Reinluftwerkbank durchgeführt. Die Kultivierung der Zellen erfolgte in einem Brutschrank bei 37°C mit 5 % CO<sub>2</sub>-Begasung und 100 % Luftfeuchtigkeit in Zellkulturflaschen mit Filter-Top. Benötigte Kulturmedien und Lösungen wurden vor dem Kontakt mit den Zellen eine Stunde bei Raumtemperatur gehalten oder 15 Minuten bei 37°C erwärmt.

Die Zellen wurden in phenolhaltigem DMEM mit 10 % FCS, das bereits zur Inaktivierung von Komplementfaktoren 40 Minuten auf 56°C erhitzt wurde, inkubiert. Das Medium wurde außerdem mit 2 mM L-Glutamin, 1 mM Pyruvat sowie Selektionsantibiotikum, dessen Klasse und Konzentration vom jeweiligen Zelltyp abhing, versetzt (siehe Tabelle 7.13).

Um die Zellen zu passagieren, wurden diese mit 5 ml PBS gewaschen und anschließend mit 1 ml 0,5 %iger Trypsin-Lösung versetzt. Nach drei bis sechs minütiger Inkubation bei 37°C im Brutschrank wurden die Zellen in PBS resuspendiert. Ein Aliquot der Zellsuspension blieb in der Flasche und wurde mit frischem Kulturmedium aufgenommen, um die Stammkultur zu erhalten. Die restlichen Zellen wurden verworfen, eingefroren oder für anstehende Versuche in Zellkulturschalen ausgesät.

#### 8.1.2 Kryokonservierung und Auftauen eukaryoter Zellen

Um Zellen dauerhaft zu erhalten, wurden diese in flüssigem Stickstoff eingefroren. Dazu wurden die trypsinisierten Zellen in 5 ml PBS aufgenommen und bei 1200 Upm für fünf Minuten bei 4 °C zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in FCS mit 10 % DMSO resuspendiert und in 1,5 ml Kryo-Röhrchen aliquotiert. Die Röhrchen wurden in eine mit Isopropanol gefüllte „Einfrierbox“ überführt, die bei -80°C eine kontrollierte und langsame Abkühlrate gewährleistet, um eine optimale Zellausbeute zu erhalten. Anschließend wurden die Zellen in flüssigen Stickstoff (-197°C) überführt.

Um die Zellen aufzutauen, wurde das Kryoröhrchen zunächst auf 37°C erwärmt, anschließend in 5 ml Medium aufgenommen und 10 min bei 1200 Upm zentrifugiert. Das Zellpellet wurde schließlich in 5 ml frischem Medium aufgenommen und in eine 50 ml Zellkulturflasche überführt.

### **8.1.3 Bestimmung der Zellzahl eukaryoter Zellen**

Zum Aussäen der Zellen wurde die Zellzahl der Zellsuspension bestimmt, um eine gleichmäßig verteilte Zellmenge auf den Zellkulturplatten zu erhalten. Hierfür wurde die Neubauer Zählkammer verwendet. Ein Liniennetz (Zählfeld) aus 9 Quadranten mit jeweils einer Fläche von 1 mm<sup>2</sup> bildet den Boden der Zählkammer. Durch Aufbringen eines Deckglases unter Bildung Newtonscher Ringe konnte ein definierter Raum von 0,1 mm Tiefe geschaffen werden, um das mikroskopisch genaue Auszählen der Zellen zu gewährleisten. Die Zellen wurden mit 0,4 % iger Trypanblau-Lösung im Verhältnis 1:2 versetzt, um tote, durch den sauren Farbstoff blau gefärbte Zellen von den lebenden, farblosen Zellen zu unterscheiden.

Nach Aufbringen der Zellsuspension auf ein Zählfeld wurden 3 Quadranten ausgezählt. Die ermittelte Zahl wurde mit 10.000 multipliziert, wodurch man die Zellzahl pro ml Zellsuspension erhielt.

### **8.1.4 Stimulation und Behandlung eukaryoter Zellen**

Zur Induktion der Expression der iNOS und anderer pro-inflammatorischer Gene in eukaryotischen Zellen wurde eine Cytokin-Mischung (CM) eingesetzt, die sich aus TNF- $\alpha$  (10 ng/ml), IL-1 $\beta$  (50 U/ml) und IFN- $\gamma$  (100 U/ml) zusammensetzte.

14 Stunden vor der Inkubation mit CM wurde ein Mediumwechsel auf serumfreies Medium durchgeführt, damit sich alle Zellen in der gleichen Phase des Zellzyklus befanden.

Die Zellen wurden für die jeweils angegebenen Zeiten mit CM stimuliert. Das Kulturmedium wurde anschließend abgesaugt und abhängig von den Folgeversuchen, mit GIT-Puffer (mRNA-Analysen) oder Passive Lysis Buffer (Protein-Analysen) bzw. RIPA-Puffer (Immunpräzipitation-Analysen) lysiert.

Bei Versuchen mit Resveratrol und Sirtinol wurden die Zellen eine Stunde vor CM-Stimulation in den angegebenen Konzentrationen behandelt.

### **8.1.5 Analyse der mRNA-Stabilität durch Behandlung der Zellen mit 5,6-Dichlor-1-D-ribofuranosyl-benzimidazol (DRB)**

5,6-Dichlor-1-D-ribofuranosyl-benzimidazol (DRB) führt zur Hemmung der RNA-Polymerase-II-vermittelten Transkription. Nach Zugabe von DRB kann keine neue mRNA synthetisiert werden, wodurch der Abbau der bereits hergestellten mRNA mittels qRT-PCR-Experimenten analysiert werden kann.

DLD-1-Zellen wurden zwei Tage vor der Behandlung mit DRB in einer 12 Loch-Platte mit  $2 \times 10^5$  Zellen pro Loch ausgesät. 16 Stunden vor dem Versuch wurde ein Mediumwechsel mit

serumfreien Medium durchgeführt. Die Zellen wurden für vier Stunden mit Cytokinen (8.1.4) behandelt. Anschließend wurde DRB in einer Konzentration von 25 µg/ml Medium hinzugegeben. Die Zellen wurden nach null, zwei, vier und sechs Stunden nach DRB-Behandlung zur mRNA-Analyse mit GIT Puffer abgestoppt.

Zur Analyse der Resveratrol vermittelten Effekte auf die iNOS-mRNA-Stabilität wurden die Zellen 15 Minuten vor der DRB-Behandlung mit 30 µM Resveratrol behandelt.

### **8.1.6 Transiente und stabile Transfektion eukaryoter Zellen**

Bei der transienten Transfektion wird ein zu untersuchendes Plasmid mittels eines Transfektionsreagenz vorübergehend in eine Zelle eingeschleust. In dieser Arbeit wurde diese Methode für verschiedene Reporteranalysen sowie für die Überexpression eines gewünschten Proteins angewendet.

DLD-1-Zellen wurden 24 h vor der Transfektion im 24 Loch Format mit  $5 \times 10^4$  Zellen pro Loch ausgesät. Anschließend wurde 0,8 µg DNA pro Ansatz in 50 µl serumfreien Medium vorgelegt und 1,2 µl des Transfektionsreagenz Genejuice (Roche) hinzugegeben. Dieses Gemisch wurde für 15-30 min inkubiert, damit sich lipophile Komplexe zwischen Genejuice und DNA ausbilden konnten. Das Gesamtvolumen von 50 µl wurde schließlich auf die Zellen gegeben.

24 h nach der Transfektion wurde ein Mediumwechsel auf serumfreies Medium durchgeführt, um nach weiteren 16 h mit der entsprechenden Behandlung bzw. Stimulation mit Cytokinen (8.1.4) zu beginnen.

Bei der stabilen Transfektion wird ein Expressionsplasmid oder ein Reportergenkonstrukt permanent in das zelleigene Genom aufgenommen. Somit wird eine dauerhafte Expression des gewünschten Gens gewährleistet. Die transfizierten Konstrukte kodieren zusätzlich für ein Resistenzgen, so dass durch die Verwendung Antibiotika-enthaltenden Medien selektioniert werden kann. Dabei sterben die Zellen, die das Plasmid nicht aufgenommen haben und somit keine Resistenz ausbilden konnten, ab. Eine zusätzliche Selektion über die Durchflusszytometrie (FACS) (8.1.7) ist möglich, wenn ein Plasmid transfiziert wurde, das für das fluoreszierende GFP kodiert.

Zellen wurden in 6 Loch-Platten mit  $2 \times 10^5$  Zellen pro Loch ausgesät. Am folgenden Tag wurde 1 µg DNA mit 1,5 µl Genejuice in 50 µl serumfreien Medium in ein Reaktionsgefäß pipettiert und nach 15-30 Minuten auf die Zellen gegeben. Nach 24 Stunden wurden die Zellen in 10 cm Schalen umgesetzt, um eine bessere Selektion zu ermöglichen. Nach weiteren 24 Stunden wurden die Zellen mit dem Antibiotikum-versetzten Kulturmedium (Tabelle 7.9) inkubiert. Die positiven Zellen wurden durch stetige Antibiotikumselektion und FACS konzentriert.

### 8.1.7 Anwendung der Durchflusszytometrie zur Analyse von transfizierten Zellen

Bei der Durchflusszytometrie oder FACS (*fluorescence activated cell sorting*) können verschiedene Eigenschaften der untersuchten Zellen wie Größe, Granularität und Fluoreszenzen analysiert werden. Zellen in einer Suspension werden dazu in einen dünnen Probenstrahl fokussiert und passieren einzeln einen Laserstrahl beleuchteten Messbereich, wo es zur Lichtstreuung und Fluoreszenz-Emission kommt. Dabei ist die Vorwärtsstreuung (*forward scatter* - FSC) ein Maß für die Größe, die Seitwärtsstreuung (*sideward scatter* - SSC) ein Maß für die Granularität der Zelle. Weiterhin können die Fluoreszenzen der durch den Laser angeregten Farbstoffe mit Hilfe verschiedener Kanäle (FI) erfasst werden, die über ein spezifisches Emissionsmaximum verfügen.

In dieser Arbeit wurde die Durchflusszytometrie zur Überprüfung und zur Sortierung der stabil transfizierten Zellen verwendet. Alle transfizierten Plasmide enthielten dafür ein *Green Fluorescent Protein* (GFP)-Gen, einem autofluoreszierenden Protein der Tiefseequalle *Aequorea victoria*. Dadurch konnten transfizierte Zellen von nicht transfizierten Zellen unterschieden werden.

Die Zellen wurden wie unter 8.1.1 beschrieben in 5 ml PBS resuspendiert und bei 1200 Upm für fünf Minuten zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in PBS/ 2 % FCS gewaschen und erneut zentrifugiert. Die Zellen wurden in 2 ml PBS/ 2 % FCS aufgenommen und in ein FACS-Röhrchen überführt. Um abgestorbene Zellen zu markieren und bei der Durchflusszytometrie zu erkennen, wurde 1/1000 Propidiumiodid (PI) hinzugegeben. Der Farbstoff PI besitzt die Fähigkeit, mit doppelsträngiger DNA zu interkalieren und bei Anregung durch UV-Licht zu fluoreszieren. Da PI keine intakten Zellmembranen passieren kann, wird nur die DNA toter Zellen gefärbt.

Zur Analyse der Zellen wurde das optische System des FACSCalibur (Argon Laser, Emission bei 488 nm; Dioden Laser, Emission bei 635 nm) verwendet. Weiterhin wurden für die Erfassung der Fluoreszenzen folgende Kanäle gewählt:

FI 1 (Emissionsmaximum 530 nm): GFP

FI 2 (Emissionsmaximum 585 nm): PI

Falls die Analyse der Zellen eine zu geringe Anzahl an positiven, GFP-gefärbten Zellen ergab, wurden die Zellen zusätzlich sortiert. Diese Aufgabe wurde von Frau Julia Altmaier mit Hilfe des FACSVantage SE durchgeführt.

Die nach der Durchflusszytometrie erhaltenden konzentrierten GFP-gefärbten Zellen wurden zentrifugiert und mit Medium gewaschen. Anschließend wurden sie je nach Zellmenge in eine Lochplatte oder Zellkulturflasche überführt.

## **8.2 Proteinbiochemische Arbeitsmethoden**

### **8.2.1 Gewinnung von Proteinextrakten aus Zellen und Geweben**

Analysen der Proteinexpression wurden in Gesamtzellextrakten durchgeführt. Dazu wurden die Zellen mit Passive Lysis Buffer (PLB) lysiert und mindestens eine Stunde bei  $-20^{\circ}\text{C}$  eingefroren. Zur Isolation von Proteinen aus Gewebe wurde ein Teil der in flüssigem Stickstoff eingefrorenen Organe entnommen und in RIPA-Puffer mit frisch zugesetzten Protease-Inhibitoren mit Hilfe eines Ultra Turrax homogenisiert. Anschließend wurde das Lysat zentrifugiert, um nicht homogenisiertes Material abzutrennen.

### **8.2.2 Photometrische Quantifizierung von Proteinen – Bradford**

Der Bio-Rad Protein Assay zur Bestimmung von Proteinen beruht auf der Methode von Bradford (Bradford 1976).

Der Triphenylmethanfarbstoff Coomassie-Brillant-Blau G-250 (CBBG) bildet in saurer Lösung mit Proteinen Komplexe. Das Absorptionsmaximum der ungebundenen, rotgefärbten Form hat ein Absorptionsmaximum bei 470 nm. Durch die Komplexbildung mit Proteinen verschiebt sich das Absorptionsmaximum auf 595 nm, der Farbstoff wird blau. Diese Änderung kann photometrisch gemessen werden und ist ein Maß für die Konzentration des Proteinextraktes.

Dazu wurde 1  $\mu\text{l}$  des Extraktes in  $\text{H}_2\text{O}$  bei einem Gesamtvolumen von 100  $\mu\text{l}$  verdünnt. Vor der Messung wurde 100  $\mu\text{l}$  40 %-ige Bio-Rad Protein Assay-Lösung hinzugegeben. Die photometrisch gemessenen Werte wurden durch Vergleich mit einer BSA-Standardreihe ermittelt.

### **8.2.3 Proteinfällung nach Wessel und Flügge**

Zur Anreicherung von Proteinen aus Zellysaten wurde das Protokoll der Proteinfällung nach Wessel und Flügge verwendet (Wessel and Flugge 1984). Die gewünschte Menge an Proteinlysate wurde in ein 1,5 ml Gefäß überführt und auf ein Gesamtvolumen von 100  $\mu\text{l}$  mit Wasser aufgefüllt. Dem Lysat wurde anschließend 400  $\mu\text{l}$  Methanol, 100  $\mu\text{l}$  Chloroform und anschließend 300  $\mu\text{l}$  Wasser hinzugegeben. Die trübe Mischung wurde gemischt und zur Phasentrennung bei 13000 Upm für 5 min zentrifugiert, wobei sich die Proteine in der Interphase ansammeln. Anschließend wurde die obere, wässrige Phase verworfen und die Proteine mit 300  $\mu\text{l}$  Methanol gefällt. Nach kurzem Mischen wurde die Suspension für weitere fünf min bei 13000 Upm zentrifugiert. Das Pellet wurde getrocknet und in 10  $\mu\text{l}$  1x

Laemmli-Puffer aufgenommen. Die Proben wurden für fünf min bei 95°C denaturiert und bis zur Auftrennung mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (8.2.4) bei -20°C gelagert.

### 8.2.4 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Zur Auftrennung von Proteinen wurde die eindimensionale SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) nach Laemmli (Laemmli 1970) verwendet.

Die Proben wurden mit Laemmli-Puffer, der SDS und DTT enthält, versetzt und anschließend zur vollständigen Denaturierung auf 95°C erhitzt. Das Detergenz SDS (Natriumdodecylsulfat) bindet an die Proteine, wodurch diese denaturiert werden. Die hohe negative Ladung von SDS maskiert die eigentliche Ladung der Proteine, so dass diese im Verhältnis zu ihrer Masse identische Ladungen besitzen. Durch DTT werden Disulfidbrücken gespalten, was zusätzliche Faltungen löst. Man erhält demnach lineare Proteine, die nur anhand ihres Molekulargewichtes aufgetrennt werden.

Für SDS-PAGE-Experimente wurde das Mini-Protean-System 3 (BioRad) eingesetzt. Die folgende Tabelle zeigt die Zusammensetzung der verwendeten Gele:

TRENNGEL	7,5 %	10 %	SAMMELGEL	4 %
H <sub>2</sub> O	5,6 ml	4,5 ml	H <sub>2</sub> O	3,05 ml
1,5 M Tris pH 8,8	2,8 ml	2,8 ml	0,5 M Tris pH 6,8	1,25 ml
10 % SDS	112 µl	112 µl	10 % SDS	50 µl
30 % Acrylamid	2,8 ml	3,75 ml	30 % Acrylamid	650 µl
TEMED	7,5 µl	7,5 µl	TEMED	6,5 µl
10 % APS	75 µl	75 µl	10 % APS	33 µl

**Tabelle 8.1: Zusammensetzung der Gele für die SDS-PAGE**

Ein Gel setzte sich aus Trenngel und Sammelgel zusammen. Der Gelkamm wurde sofort nach Gießen des Sammelgels eingesetzt. Die Konzentration des Trenngels wurde den aufzutrennenden Proteinen angepasst.

Zur Auftrennung wurde das Gel in eine Elektrophorese-Kammer gestellt, mit 1x Laufpuffer bedeckt und mit den denaturierten Protein-Proben beladen. Zusätzlich zu den Proben wurde ein Größenmarker für die spätere Abschätzung der Proteingrößen aufgetragen. Danach wurde eine elektrische Spannung von 80-100 Volt angelegt, die eine Migration der negativ geladenen Proben durch das Gel bewirkte. Die Proteine sammelten sich am Übergang zwischen Sammelgel und Trenngel, da das weitporige Sammelgel noch keine Größenauftrennung zuließ. Erst im engmaschigen Trenngel wurden die Proteine nach Größe



aufgetrennt. Der Lauf wurde in der Regel beendet, wenn die Lauffront gerade noch sichtbar war.

### **8.2.5 Immunodetektion mittels Western Blot Analyse**

Die Immunodetektion mittels Western Blot Analyse ist eine Methode zum Nachweis bestimmter Proteine aus einem Protein-Gemisch.

Es wird ein senkrecht zum Polyacrylamid-Gel gerichtetes elektrisches Feld angelegt. Somit wandern die Proteine aus dem Gel auf eine Nitrocellulose-Membran. An der Membranoberfläche bleiben sie aufgrund hydrophober Wechselwirkungen haften. Dabei bleibt das Muster der elektrophoretischen Auftrennung erhalten.

Durch Zugabe eines antigenspezifischen Primärantikörpers bindet dieser an das nachzuweisende Protein (Antigen). Der entstandene Antigen-Antikörper-Komplex wird mit Hilfe eines Peroxidase-gekoppelten Sekundärantikörpers markiert. Die Peroxidase katalysiert die Umsetzung eines zugegeben Substrates in dessen oxidierte Form. Mit der daraus resultierenden Lumineszenz Reaktion wird ein Positivfilm zur Visualisierung belichtet. Zum Transfer der Proteine auf die Nitrocellulosemembran wurden die SDS-Gele nach der Elektrophorese zunächst 15 Minuten in Transferpuffer äquilibriert. Die zugeschnittenen Whatmann-Papiere und Nitrocellulosemembran wurden ebenfalls in Transferpuffer geschwenkt. Es wurde in folgender Reihenfolge auf die Anodenplatte geschichtet und anschließend mit der Kathodenplatte abgedeckt: 3 Whatmann Papiere/Nitrocellulosemembran/SDS-Gel/3 Whatmann-Papiere. Transferiert wurde für etwa eine Minute pro kDa der Proteingröße bei 12 Volt. Anschließend wurde die Nitrocellulosemembran zur Überprüfung der Transfereffizienz in Ponceau-S-Lösung angefärbt und durch mehrmaliges Spülen mit Wasser wieder entfärbt. Um unspezifische Bindungsstellen abzusättigen und eine spezifische Antikörperbindung zu ermöglichen, wurde die Membran, wenn nicht anders angegeben, eine Stunde im Blockierpuffer inkubiert. Anschließend wurde die Membran über Nacht bei 4°C in einer Lösung des Primärantikörpers im entsprechenden Blockierpuffer (siehe Tabelle 7.4) geschüttelt. Am folgenden Tag wurde viermal mit Waschpuffer (1x TBS, 0,1 % Tween - TBST) gewaschen und anschließend die Membran in einer Lösung des Peroxidase-gekoppelten Sekundärantikörpers in Blockierpuffer für eine Stunde bei Raumtemperatur geschwenkt. Nach erneuten Waschschrritten mit TBST und 1x TBS wurde der Blot mit Hilfe des ECL-Systems (Western Lightning Chemiluminescence Reagent Plus, Perkin Elmer) detektiert. Durch die freigewordene Chemilumineszenz wurde ein aufgelegter Positivfilm belichtet.

### 8.2.6 Die Immunpräzipitation

Bei der Immunpräzipitation wird mit Hilfe eines Antikörpers das entsprechende Antigen aus einem Proteingemisch präzipitiert und schließlich durch spezifische Bindung des Antikörpers an die Protein-A/G-Agarose vom übrigen Lysat abgetrennt. Proteine, die an das Antigen binden, werden co-präzipitiert. So ist es in späteren Western Blot-Experimenten möglich, sowohl Interaktionspartner zu identifizieren als auch Änderungen im Phosphorylierungsstatus des präzipitierten Antigens zum Zeitpunkt der Lysatgewinnung nachzuweisen.

1 mg Proteinlysate wurde zuerst mit 40 µg RNase A und 500 U RNase T1 behandelt und 30 min bei 30°C inkubiert. Die Mischung wurde schließlich mit RIPA-Puffer auf 500 µl aufgefüllt und mit 15 µl Protein-A/G-Agarose eine Stunde bei 4°C im End-over-End-Schüttler (EOE-S) vorgeklärt. Die Mischung wurde für 5 min bei 3500 UpM zentrifugiert, der Überstand mit dem gewählten Antikörper nach Protokoll des Herstellers versetzt und bei 4°C im EOE-S inkubiert. Nach mindestens 12 h wurde die Mischung mit 50 µl Protein-A/G-Agarose, die vorher mit RIPA-Puffer gewaschen wurde, versetzt und für 6 h bei 4°C im EOE-S belassen. Anschließend wurde die A/G-Agarose mit der gebundenen Antikörper-Antigen-Verbindung bei 4°C und 3500 UpM pelletiert. Der Überstand wurde für spätere Western Blot Experimente aufbewahrt, um nicht gebundenes Antigen nachzuweisen und somit die Qualität des verwendeten Antikörpers zu ermitteln. Das Pellet wurde mehrmals mit RIPA-Puffer gewaschen und schließlich in 50 µl 2x Laemmli-Puffer aufgenommen.

### 8.2.7 Die Aufreinigung rekombinanter His-Tag-Fusionsproteine

Zur bakteriellen Expression von His-Tag-KSRP wurde der pET15b-Expressionsvektor mit der Sequenz für KSRP (pET15b-His-KSRP) verwendet, der eine N-terminale His-Tag-Sequenz von sechs aufeinanderfolgenden Histidinen und eine Ampicillin-Resistenz enthält. Dieses Konstrukt wurde in BL21(DE3)LysS-Bakterien transformiert. BL21(DE3)LysS-Bakterien sind ein *E.coli* Stamm mit Chloramphenicolresistenz und enthalten im Genom ein Gen für die T7-RNA-Polymerase, den Bakteriophagen DE3, der ein IPTG (Isopropyl-(β)-(D)-thiogalactopyranosid)-induzierbaren *lacUV5*-Promotor für das T7-RNA-Polymerasegen besitzt und das Plasmid pLysS. Das Plasmid pLysS enthält das T7-Lysozymgen und ermöglicht durch Einfrieren/Auftauen eine Zelllyse. Sowohl der Phage DE3 als auch der Vektor pET15b kodieren für ein *lacI* Gen, das über den *lac* Repressor die Expression der T7-Polymerase inhibiert. Erst durch Induktion mit IPTG kommt es zur Aktivierung des *lacUV5*-Promotors, Expression der T7-RNA-Polymerase und zur Transkription des Zielgens (in diesem Fall das His-KSRP).

Zuerst wurden 5 ml LB-Medium mit dem in BL21(DE3)LysS transformierten pET15b-His-KSRP für 14 Stunden bei 37°C, 220 Upm inkubiert. Da nach wurden 100 µl der Vorkultur in 125 ml Medium gegeben und in einem 1 l Kolben geschüttelt. Nach zwei Stunden wurde in regelmäßigen Abständen die OD<sub>600</sub> überprüft. Sobald ein Wert von 0,6 erreicht war, wurde der Kultur 300 µl IPTG (200mg/ml) hinzugegeben und für fünf Stunden bei 37°C und 220 Upm geschüttelt. Die Suspension wurde schließlich bei 6000 Upm 20 min zentrifugiert, mit 15 ml PBS gewaschen und in ein 50 ml Gefäß überführt und eingefroren. Nach 16 Stunden wurde das Pellet auf Eis aufgetaut, in 3 ml gekühlten Lyse-Puffer (50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 300 mM NaCl; 10 mM Imidazol) aufgenommen und mit 1 mg/ml Lysozym behandelt. Nach 30-minütiger Inkubation auf Eis wurde für 5 x 5 Sekunden sonifiziert und mit RNase und DNase behandelt. Schließlich wurde für 30 min bei 12.000 Upm zentrifugiert und der Überstand, der His-Tag-KSRP enthielt, in ein neues Gefäß überführt. 25 % Ni-NTA-Agarose wurde hinzugegeben und zur Bindung des His-Tag-KSRP an die Ni-NTA-Agarose für eine Stunde bei 4°C geschüttelt. Anschließend wurde die Lysat-Ni-NTA-Mischung auf eine Säule (BioRad) gegeben. Nach Durchlaufen der Lösung wurde zweimal mit einem Waschpuffer gewaschen (20 mM Imidazol), bevor das His-Tag-Fusionsprotein mit einem Elutionspuffer (250 mM Imidazol) eluiert wurde. Die aufgereinigten Proteine wurde durch SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese mit anschließender Coomassie-Färbung und mittels Western Blot Analyse (8.2.5) überprüft.

## **8.3 Molekularbiologische Arbeitsmethoden**

### **8.3.1 Isolierung von RNA aus Zellen**

Zur Isolierung von Gesamt-RNA aus Zellen wurde die Methode von Chomczynski und Sacchi (Chomczynski and Sacchi 1987) angewendet. Es wurden RNase-freie Gefäße und Pipettenspitzen verwendet. Alle Lösungen wurden mit DEPC-Wasser angesetzt.

Nach Behandlung der Zellen wurden diese in GIT-Puffer lysiert. Mit einer Pipette wurde die Zellsuspension in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und mit 1/10 Volumen (V) 2 M Natriumacetat-Lösung (pH 4) versetzt. Anschließend wurde 1 V saures H<sub>2</sub>O-gesättigtes Phenol hinzugegeben und gemischt. Nach Zugabe von ½ V Chloroform/Isoamylalkohol-Mischung im Verhältnis 24:1 wurde gut gemischt und für 15 min auf Eis inkubiert. Schließlich wurde zur Phasentrennung für 20 min bei 13.000 Upm / 4°C zentrifugiert. Die abzutrennenden Proteine befanden sich in der organischen Phase. Durch Verminderung des pH-Wertes konnte auch die DNA im sauren Phenol gelöst werden. Im wässrigen Überstand lag somit nur die RNA vor. Zur Fällung bei -20°C wurden der abgetrennten wässrigen Phase 1,5 V Isopropanol zugefügt. Nach mindestens einer Stunde wurde für 20 min bei 13.000

Upm / 4°C die RNA pelletiert. Anschließend wurde mit 80 %igem Ethanol gewaschen und die RNA über Kopf getrocknet. Die RNA wurde je nach Menge in 20 – 50 µl DEPC-H<sub>2</sub>O aufgenommen und bei -20°C gelagert.

### 8.3.2 Isolierung von RNA aus Geweben

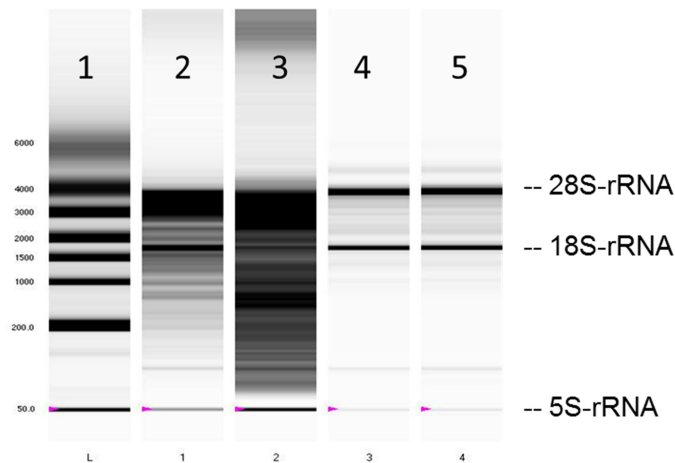
Zur Isolierung von RNA aus Geweben wurde ein Aliquot der in flüssigem Stickstoff gelagerten Organe entnommen und in GIT-Puffer überführt. Unter Eiskühlung wurde die Mischung mit Hilfe eines Ultra Turrax homogenisiert. Die folgenden Schritte waren wie unter 8.3.1 beschrieben.

### 8.3.3 Quantitative RNA-Analyse

Die Konzentrationsbestimmungen der isolierten RNA-Proben erfolgten mit dem NanoDrop<sup>®</sup> - ND-1000-Spektrophotometer. Für eine Messung wurde 1 µl der RNA-Probe verwendet. Die RNA-Konzentration wurde durch Absorptionsmessung bei der Wellenlänge 260 nm bestimmt. Eine Absorptionseinheit  $A_{260}$  entspricht 40 µg ssRNA/ml. Zusätzlich wurde eine graphische Darstellung des Absorptionsspektrums innerhalb der Wellenlängen von 220 nm bis 350 nm aufgezeichnet. In diesem Wellenlängenbereich konnten die Absorptionsmessung beeinflussenden Substanzen wie Phenol- und Proteinverunreinigungen der isolierten RNA detektiert werden. Der Absorptionsquotient  $A_{260}/A_{280}$  sollte für eine reine RNA etwa 1,9 - 2,1 sein.

### 8.3.4 Qualitative RNA-Analyse - Kontrolle der RNA-Integrität

Die Integrität der isolierten Gesamt-RNA für gesamtgenomische Microarray-Analysen wurde mit dem Experion (BioRad) ermittelt. Diese Technik ermöglicht, basierend auf dem Prinzip der Kapillarelektrophorese, eine automatisierte, parallele Bestimmung von zehn RNA-Proben hinsichtlich ihrer Qualität. Die einzelnen Fraktionen der rRNA (5S, 18S, 28S), die mRNA sowie fragmentierte RNAs werden der Größe nach aufgetrennt, visualisiert und in einem Elektropherogramm sowie als „virtuelles Gelbild“ dargestellt (Abb. 8.1). Zusätzlich zu dem 28S/18S rRNA-Verhältnis generiert die Experion Software den RNA Quality Index (RQI), einen Zahlenwert von 1 bis 10, der die Einstufung der RNA-Integrität vereinfachen soll. Ein Wert von 10 repräsentiert eine intakte, nicht degradierte und nicht fragmentierte RNA von sehr hoher Qualität, und 1 steht für komplett degradierte und fragmentierte RNA mit geringster Qualität.



**Abbildung 8.1: Virtuelles Gelbild einer RNA-Qualitätsmessung mittels des Experion-Gerätes**

1: Marker; 2: nicht vollständig degradierte RNA; 3: degradierte RNA; 4 & 5: intakte RNA

Bei intakter RNA sind im Gel zwei deutlich getrennte Banden, die 28S- und 18S-Bande ribosomaler RNA zu erkennen. Das 2:1-Verhältnis der Fluoreszenzintensitäten der 28S- und 18S-rRNA-Bande ist ein Zeichen dafür, dass die mRNA nicht abgebaut ist. Die 5S-Bande ist meist kaum oder gar nicht zu sehen.

Zur Qualitätsmessung der RNA-Proben, die für die Microarray-Analysen eingesetzt werden sollten, wurden die Experion RNA StdSens Chips und das dazugehörige RNA StdSens Kit (BioRad) verwendet. Zur Durchführung der Analyse wurde exakt nach Angabe des Herstellers verfahren.

### 8.3.5 Reverse Transkription

Mit der quantitativen Realtime-PCR (qRT-PCR) lässt sich die Genexpression der Zellen zum Zeitpunkt der RNA-Isolation nachweisen. Dazu musste die RNA zunächst mit Hilfe der Reversen Transkriptase in cDNA (complementary DNA) umgeschrieben werden. Die erhaltene cDNA wurde als Vorlage in anschließenden qRT-PCR-Analysen verwendet.

Es wurde für die cDNA-Synthese das High Capacity cDNA RT Kit von Applied Biosystems im folgenden Ansatz verwendet:

KOMPONENTE	V PRO ANSATZ (µL)
10x RT Puffer	2
25x dNTP Mix (100 mM)	0,8
10x RT Random Primer	2
Multiscribe RT	0,5
H <sub>2</sub> O	4,7
RNA-Verdünnung (50 ng/µl)	10

**Tabelle 8.2: Reaktionsansatz für die reverse Transkription**

Die Reaktionsansätze wurden im icycler (BioRad) nach folgendem Schema inkubiert:

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

**Tabelle 8.3: Programm für die reverse Transkription**

Für TaqMan MicroRNA Assays, um die Expression der miR-155 zu bestimmen, musste die isolierte RNA zusätzlich mit dem *TaqMan MicroRNA Reverse Transcription Kit* von Applied Biosystems in cDNA umgeschrieben werden. Folgender Ansatz wurde verwendet:

KOMPONENTE	V PRO ANSATZ (µL)
1. 10x RT Puffer	1,5
2. 25x dNTP Mix (100 mM)	0,15
3. RNase Inhibitor	0,2
4. Multiscribe RT	1
5. H <sub>2</sub> O	4,15
6. RNA-Verdünnung (10 ng/µl)	5
7. miR-155 RT-Primer 1: 5 V	3

**Tabelle 8.4: Ansatz für die reverse Transkription zur Bestimmung der miR-155-Expression**

Dabei wurden zuerst 1. – 5. pipettiert und 7 µl im PCR-Gefäß vorgelegt. Anschließend wurde 6. hinzugegeben und dann 7.. Die 15 µl Gesamtansatz wurden mit folgendem Programm inkubiert:

ZEIT	TEMPERATUR	VORGANG
30 min	16 °C	Oligonukleotide binden an RNA
30 min	42 °C	Reverse Transkription
5 sec	85 °C	Denaturierung der rev. Transkriptase
5 min	8 °C	Kühlung

**Tabelle 8.5: Programm für die reverse Transkription zur Bestimmung der miR-155-Expression**

### 8.3.6 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

Mit Hilfe der Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) ist es möglich ein spezifisches Gen oder ein Genabschnitt zu vervielfältigen. Verwendet werden passende Oligonukleotide, die das zu amplifizierende Gen eingrenzen, eine thermostabile DNA-Polymerase und Ausgangs-DNA (Template). Ein Zyklus beginnt mit dem Erhitzen der DNA, damit sich die beiden Stränge trennen (Denaturierung). Anschließend wird die Temperatur gesenkt, die Oligonukleotide hybridisieren an die DNA (Annealing). Die Temperatur wird dem Arbeitsoptimum der DNA-Polymerase angepasst, so dass die Zweitstrangsynthese ausgehend von den Oligonukleotiden in 5'→ 3' Richtung erfolgen kann (Elongation). Der beschriebene Zyklus kann beliebig oft wiederholt werden.

Zur Amplifizierung des KSRP-Promotor-Fragments (3kb) wurde das *Go Taq PCR Kit* (Promega) wie folgt verwendet:

KOMPONENTE	PRO ANSATZ (µL)	PROGRAMM			
		ZEIT	TEMPERATUR	VORGANG	
Go Taq PCR Puffer 5x	10	5 min	95 °C	Initiale Denaturierung	
dNTP Mix (10 mM)	1,5	1 min	94 °C	Denaturierung	→ 35x
Oligonukleotid 5P-6	2	1 min	55 °C	Annealing	
Oligonukleotid 3P-6	2	3 min	60 °C	Elongation	
Go Taq	0,4	7 min	60 °C	Abschließende Elongation	
Wasser	32,1	∞	4 °C	Kühlung	
Bac Klon (Template)	2				

**Tabelle 8.6: Reaktionsansatz und Programm zur Amplifizierung des KSRP-Promotor Fragments**

Zur Amplifizierung des KSRP-3'UTR-Fragments wurden die Lösungen und Puffer des *Phusion High Fidelity Polymerase Kit* (NEB) verwendet. Die folgende Tabelle 8.7 zeigt den Reaktionsansatz und das verwendete PCR-Programm:

KOMPONENTE	PRO ANSATZ (µL)	PROGRAMM		
HF Puffer 5x	10	30 sec	98 °C	Initiale Denaturierung
dNTP Mix (10 mM)	1	10 sec	98 °C	Denaturierung
Oligonukleotid 5P-1	2	30 sec	60 °C	Annealing
Oligonukleotid 3P-4	2	1 min	72 °C	Elongation
Phusion Taq	0,4	7 min	72 °C	Abschließende Elongation
Wasser	30,6	∞	4 °C	Kühlung
Bac Klon (Template)	2			

**Tabelle 8.7: Reaktionsansatz und Programm für die Amplifizierung des KSRP-3'UTRs**

Zur Amplifizierung der KSRP-promluc-Fragmente (5P1-3P1HK & 5P2HK-3P1HK) wurden die Lösungen und Puffer des *iProof High Fidelity PCR Kit* (BioRad) entsprechend des Herstellerprotokolls verwendet.

### 8.3.7 Quantitative Real-Time PCR

Die quantitative Real-Time PCR wird zur Quantifizierung einer spezifischen mRNA aus der Gesamtzell-RNA eingesetzt. Die quantitative Bestimmung der RNA-Menge wird durch den Zusatz von sequenzspezifischen TaqMan-Sonden ermöglicht. TaqMan-Sonden sind am 5'-Ende mit einem Reporter-Fluoreszenzfarbstoff (z.B. 6-Carboxyfluorescein (FAM)) markiert und am 3'-Ende mit einem Quencher (z.B. Carboxytetramethylrhodamin (TAMRA)). Solange sie an die komplementäre cDNA gebunden sind, sind sie intakt und durch die räumliche Nähe der beiden zueinander wird keine Fluoreszenz emittiert. Da Taq-Polymerasen zusätzlich zur Polymerase-Aktivität noch eine 5'-3'-Exonuklease-Aktivität besitzen, wird die Sonde während der Extensionsphase der PCR gespalten, wodurch sich Fluoreszenzfarbstoff und Quencher voneinander entfernen und ein Fluoreszenzsignal messbar wird. Dieses Signal ist direkt proportional zur Menge der amplifizierten cDNA. Die Quantifizierung erfolgt letztendlich durch den Vergleich der Menge der gewünschten mRNA mit der Menge einer mRNA eines in der Zelle konstitutiv exprimierten Referenzgens wie die RNA-Pol2A oder GAPDH.

Die folgende Tabelle zeigt den Reaktionsansatz und das verwendete Programm:



KOMPONENTE	PRO ANSATZ (µL)	PROGRAMM		
2x Taq-Puffer	12,5	15 min	95 °C	Initiale Denaturierung
dNTP Mix (10 mM)	1	15 sec	94 °C	Denaturierung
Oligo_for	2	1 min	60 °C	Annealing/
Oligo_rev	2			Elongation
TaqMan-Sonde	1	∞	4 °C	Kühlung
Taq-Polymerase	0,5			
Wasser	4			
cDNA	2			

**Tabelle 8.8: Reaktionsansatz und Programm für die quantitative Real-Time PCR**

Für die quantitative Bestimmung der miR-155 wurde das *TaqMan MicroRNA Assay Kit* von Applied Biosystems verwendet. Folgender Ansatz wurde mit dem in Tabelle 8.9 beschriebenden Programm pipettiert:

KOMPONENTE	V PRO ANSATZ (µL)
2x Taq-Puffer	10
dNTP Mix (10mM)	1
Real Time Mix AB miRNA	1
Eigene Taq	0,5
Wasser	5,5
cDNA (miRNA spezifisch – Tabelle 8.4)	2

**Tabelle 8.9: Reaktionsansatz für die Quantifizierung der miR-155**

Die Fluoreszenzmessung erfolgte in jedem Annealing/Extension-Schritt. Alle Oligonukleotid-TaqMan-Sonden-Kombinationen wiesen Effizienzen von 100 % ( $\pm$  10 %) auf. Zur Auswertung der relativen Expressionen wurde die  $2^{-\Delta\Delta C(T)}$ -Methode verwendet (Livak and Schmittgen 2001). Dabei wurden die Schwellenwerte (C(T)-Werte) jeder Probe auf den jeweiligen C(T)-Wert der Referenzgene RNA-Pol2A bzw. GAPDH normiert.

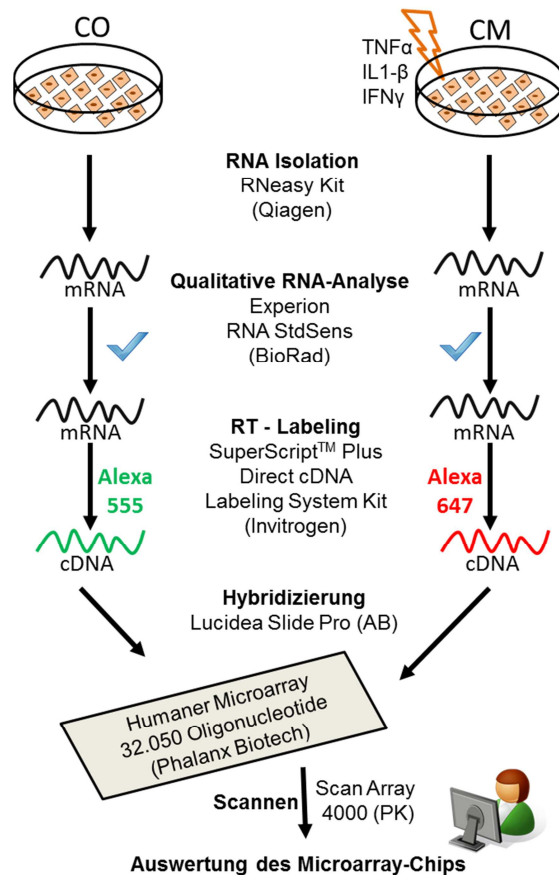
Die verwendeten Oligonukleotide und TaqMan Sonden sind in Tabelle 7.11 (human) und 7.12 (murin) aufgeführt. Als PCR-Gerät wurde der iCycler von BioRad verwendet.

### 8.3.8 Die DNA-Microarray-Analyse

Mit Hilfe von gesamt genomischen Microarray-Analysen ist es möglich, die Regulation einer Vielzahl von Genen parallel zu analysieren. Die in dieser Arbeit verwendeten Phalanx

Biotech Chips sind Glasträger (25mm x 75mm), die an definierten Stellen mit synthetischen Oligonukleotiden markiert sind. Diese genspezifischen Sonden ermöglichen die parallele Bestimmung von 30.968 Genen. Zusätzlich sind die Chips mit Kontroll-Oligonukleotiden (1082) markiert um eine korrekte Auswertung zu gewährleisten.

Ein gesamtes Microarray-Experiment von der RNA bis zum hybridisierten Microarray-Chip setzt sich aus verschiedenen Versuchen zusammen. Eine Übersicht ist in Abbildung 8.1 dargestellt.



**Abbildung 8.1: Übersicht über die Durchführung eines Microarray-Experiments**

Kontrolle (CO); Mit Cytokinen stimuliert (CM); Reverse Transkription (RT); Amersham Bioscience (AB); Perkin Elmer (PK)

Beispielsweise werden Zellen mit Cytokinen (CM) stimuliert, zur Kontrolle werden Zellen in serumfreiem Medium inkubiert (CO). Im Microarray-Experiment soll die Genexpression der CO-Gruppe mit der Genexpression der CM-Gruppe verglichen werden. Die RNA wird mit Hilfe des RNeasy Kits (Qiagen) nach Herstellerangaben isoliert und anschließend wird die Konzentration gemessen (8.3.3). Dann wird mit Hilfe des Experion (BioRad) die Qualität der RNA bestimmt, da das Experiment durch die Verwendung einer degradierten RNA misslingen würde (8.3.4). Die intakte RNA wird schließlich mit dem *SuperScript Plus Direct cDNA Labeling System Kit* (Invitrogen) während der reversen Transkription (RT) mit

Fluoreszenzfarbstoffen markiert. Dabei wurde für die CO-Gruppe immer ALEXA 555 (grün) und für die CM-Gruppe ALEXA 647 (rot) verwendet. Die Hybridisierung der markierten cDNA der CO- und CM-Gruppe mit dem prähybridisierten Genchip wird im Lucidea Slide Pro (Amersham Bioscience) ermöglicht. Die Fluoreszenzsignale des gewaschenen und getrockneten Microarrays werden schließlich im Scan Array 4000 (Perkin Elmer) unter Verwendung eines Lasers ausgelesen und mit unterschiedlichen Computerprogrammen ausgewertet.

Für die Markierung der RNA mit Fluoreszenzfarbstoffen unter Verwendung des *SuperScript Plus Direct cDNA Labeling System Kit* wurde 20 µg der intakten RNA eingesetzt. Zunächst wurde folgender Ansatz A pipettiert:

KOMPONENTE	V PRO ANSATZ (µL)
Gesamt RNA – 20 µg	X
Anchored Oligo(dT)20Primer (2,5 µg/µl)	2
DEPC-Wasser	ad 15

**Tabelle 8.10: Reaktionsansatz A für die Markierung der cDNA**

Dieser Reaktionsansatz A wurde für 10 min bei 70°C inkubiert und anschließend für eine Minute auf Eis gehalten. Dann wurden die in Tabelle 8.11 aufgeführten Komponenten zu Ansatz A gegeben:

KOMPONENTE	V PRO ANSATZ (µL)
5x First Strand Buffer	6
0,1 M DTT	3
10x Nucleotide Mix mit ALEXA Fluor555-aha-dUTP (für CO) oder ALEXA Fluor647-aha-dUTP (für CM)	3
RNaseOUTTM (40 U/µl)	1
SuperScriptTMIII Reverse Transcriptase (400 U/µl)	2

**Tabelle 8.11: Zusätzliche Komponenten zur Markierung der cDNA**

Nach der Zugabe der Fluoreszenzfarbstoffe ist es wichtig, die Ansätze im Dunkeln zu halten, um die Stabilität des Farbstoffes zu gewährleisten. Es folgte die cDNA-Synthese und cDNA-Markierung bei 46°C für 3 h. Nach der Synthese wurde durch Zugabe von 15 µl 0,1 M NaOH und einer Inkubation bei 70°C für 30 min die Original-RNA degradiert. Zur abschließenden Neutralisierung wurde 15 µl 0,1 M HCl zugegeben. Überschüssige Nukleotide und Reaktionspuffer wurden mit dem Purification-Modul nach Herstellerangaben entfernt. Um die

Effizienz der cDNA-Markierung zu ermitteln, wurde diese mit Hilfe des NanoDrop-1000 bestimmt. Die gereinigte, markierte cDNA wurde dann bis zur Hybridisierung bei -20°C gelagert.

Für die Genexpressionsanalysen wurden total-genomische humane Microarrays von Phalanx Biotech mit dem Hybridisierungspuffer und der im Handbuch angegebenen Präybridisierungslösung und Waschlösung verwendet (siehe 7.3.6). Zum Injizieren der markierten cDNA wurde der in Tabelle 8.12 beschriebene Hybridisierungsansatz pipettiert. Anschließend wurde die Probe bei 95°C für fünf min denaturiert und bei 60°C gehalten.

KOMPONENTE	V PRO ANSATZ (µL)
1,5x Hybridisierungspuffer ( + deionisiertes Formamid)	100
Salmon Sperm DNA Blocking Mix (Invitrogen)	2,5
cDNA-A555	X (abh. von Effizienz (E) der Markierung; Menge v. E(A555) = Menge v. E(A647)
cDNA-A647	
Wasser	ad 150

**Tabelle 8.12: Komponenten des Hybridisierungsansatzes**

Die einzelnen Schritte der Hybridisierung, die im Lucidea Slide Pro (Amersham Bioscience) automatisiert durchgeführt wurden, sind in Tabelle 8.13 zusammengefasst.

SCHRITT DER HYBRIDIZIERUNG	LOESUNG UND ZEIT
<b>Prä-Hybridisierung</b>	5x SSPE, 0,1% SDS; 1% BSA 60 min, 42°C
<b>Waschen</b>	dest. H <sub>2</sub> O
<b>Spülen</b>	EtOH absolut
<b>Trocknen</b>	37°C
<b>SSPE-Puffer</b>	2x SSPE
<b>Injizieren der markierten cDNA</b>	150 µl (Tab. 8.12)
<b>Hybridisierung</b>	42°C für 16 h
<b>Waschen</b>	2x SSPE, 0,1 % SDS
<b>Abkühlen auf Raumtemperatur</b>	
<b>Waschen</b>	0,1x SSPE, 0,1 % SDS
<b>Waschen</b>	0,1x SSPE
<b>Trocknen</b>	

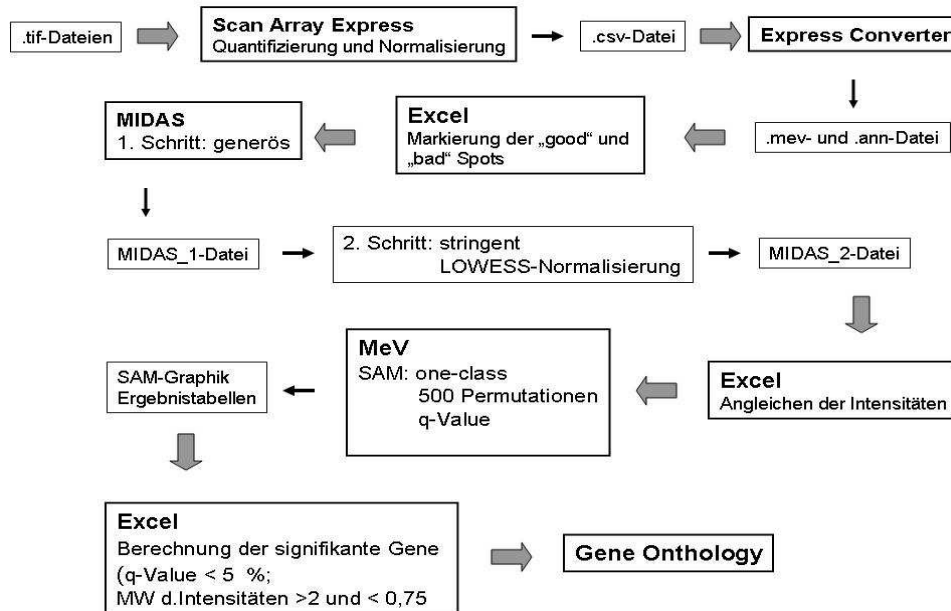
**Tabelle 8.13: Zusammenfassung der Hybridisierung**

Die Fluoreszenzsignale des gewaschenen und getrockneten Genchips wurden dann im Scan Array 4000 (Perkin Elmer) unter Verwendung eines Lasers ausgelesen. Dabei wurde je eine „tif“-Datei von ALEXA 555 (grün) und ALEXA 637 (rot) erhalten. Beide Dateien wurden im Programm Scan Array Express eingelesen, so dass eine Überlagerung der jeweiligen Intensitäten angezeigt wurde. Annäherungsweise zeigt ein roter Spot die Induktion des Gens und ein grüner Spot die Reduktion des entsprechenden Gens an. Ein gelbes Signal würde auf keine Regulation des Gens deuten.

Um die einzelnen Fluoreszenz-Signale der Spots den passenden Genen zuzuordnen, wurde im *Easy Quant Modus* eine Datei (B950718Block200.gal) verwendet, die Informationen zu jedem Oligonukleotid enthält und eine Zuordnung ermöglicht. Dazu wurde ein Gitter aus 200 Einzelblöcken mit je 120 Spots über die „tif“-Datei gelegt und die Gitter einzeln positioniert. Anschließend konnte der Genchip quantifiziert werden. Dazu wurde der *Fixed circle*-Modus als Auswertungsmethode und die Total-Methode als Normalisierungsmethode (Yang, Buckley et al. 2001) gewählt. Die so erhaltenen Ergebnisse wurden als „.csv“-Datei gespeichert, in der nun die Spotintensitäten des gesamten Microarrays gespeichert sind.

Die weitere Auswertung erfolgte mit Hilfe von Microarray-Daten-Verarbeitungsprogrammen, die am *Institute for Genomic Research* (TIGR) entwickelt wurden. Eine Gesamtübersicht ist in Abbildung 8.2 dargestellt. Zunächst wurde die „.csv“-Datei im *Express Converter* in „.mev“- und „.ann“ (*annotation*)-Dateien umgewandelt, die für die Verwendung aller weiteren Programme benötigt wurden. Um weitere Berechnungen durchführen zu können, mussten die gewünschten 30968 Gene (*good Spots*) von den unerwünschten 1082 Kontroll-

Oligonukleotiden (*bad Spots*) unterschieden werden. Dies wurde in *Excel* durch eine Markierung mit den Buchstaben A und C erfüllt, wobei alle *good Spots* mit einem C markiert wurden und diese für alle weiteren Berechnungen verwendet wurden.



**Abbildung 8.2: Schema zur Auswertung eines Microarrays**

Dieses Schema wurde von [REDACTED] im Rahmen ihrer Doktorarbeit erstellt<sup>1</sup>

Zur weiteren Normalisierung der Daten wurde das Programm *TIGR Microarray Data Analysis System (MIDAS)* verwendet. Hier wurden alle Geninformationen verworfen, die eine Intensität  $\leq 0$  aufwiesen. Um die Informationen der am stärksten regulierten Gene nicht zu verlieren, wurde eine Zwei-Stufen-Normalisierung durchgeführt. Im ersten Schritt wurde für die *One Bad Channel Tolerance Policy* die Einstellung *generös* gewählt. Falls die Spot-Intensität des einen Fluoreszenzkanals  $\leq 0$  ist, der andere Kanal jedoch eine Intensität  $> 0$  anzeigt, wird die Intensität  $\leq 0$  auf 10 % der kleinsten Intensität gesetzt. Somit werden diese Informationen nicht verworfen. Im zweiten Schritt wurde die Bedingung *stringent* gewählt, wodurch Spots, deren Intensitäten auch nach der 1. Normalisierung  $\leq 0$  sind, für weitere Berechnungen nicht mehr berücksichtigt werden. In diesem Schritt wurde die *LOWESS*-Normalisierung durchgeführt. Die so erhaltene Datei konnte für alle weiteren Berechnungen verwendet werden.

Um eine größere Anzahl an Einzelexperimenten zu erhalten, wurden die Einzelintensitäten aus der *MIDAS*-Normalisierung aller durchgeführten Genchips in *Excel* auf eine gemeinsame

<sup>1</sup> <http://ubm.opus.hbz-nrw.de/volltexte/2010/2195/pdf/doc.pdf>

Gesamtintensität angeglichen. So war es möglich, die Ergebnisse verschiedener Arrays untereinander zu vergleichen. Die korrigierten Daten wurden anschließend mit dem *Multi Experiment Viewer (MeV)* statistisch ausgewertet.

Für die statistische Analyse wurden die *mev*.Datei und die *ann*.Datei benötigt. Man erhielt zunächst eine *heat-map*, in der die Expressionsstärke eines Gens in den unterschiedlichen Experimenten nebeneinander gestellt wurde. Auf diesen Ergebnissen basierend wurde anschließend eine *one-class-significance analysis of Microarrays-SAM* Analyse durchgeführt. Dabei wurden signifikante Gene in Bezug auf Ihre Expression innerhalb verschiedener Experimente ermittelt. Für die Analyse wurden 500 Permutationen durchgeführt. Zusätzlich wurde der q-Value berechnet. Als Ergebnis erhielt man zunächst den SAM-Graph als graphische Darstellung der Analyse. Die aus der SAM-Analyse resultierenden Ergebnistabellen wurden als Grundlage für alle weiteren Berechnungen verwendet.

Abschließend wurde in *Excel* zuerst der Logarithmus der Intensitäten in Verhältnisse umgewandelt. Dann wurde der Mittelwert der Intensitäten eines Gens gebildet und die Standardabweichung berechnet. Zuletzt wurde für signifikante Gene der q-Value  $\leq 5\%$  und gleichzeitig ein Mittelwert der Verhältnisse  $CO/CM \geq 2$  oder  $\leq 0,5$  definiert.

Zur Darstellung der Ergebnisse wurden die Funktionen der *Ingenuity* Software ([www.ingenuity.com](http://www.ingenuity.com)) verwendet.

### **8.3.9 *In vitro*-Transkription zur Herstellung radioaktiv markierter RNA**

Bei der *in vitro*-Transkription wird ein zu untersuchendes RNA-Fragment hergestellt. Dies geschieht mit Hilfe eines geeigneten DNA-Templates und der T7- bzw. T3-RNA-Polymerase. Um die RNA später in UV-Crosslink-Experimenten verwenden zu können und schließlich das Ergebnis sichtbar zu machen, wird die RNA durch den Einbau von  $^{32}\text{P}$ -UTPs radioaktiv markiert.

Die *in vitro*-Transkription wird in einem Ansatz von 20  $\mu\text{l}$  wie in Tabelle 8.14 beschrieben für eine Stunde bei 37°C vollzogen.

KOMPONENTE	MENGE
Linearisierter pCRscript mit zu untersuchender Sequenz	1 µg
10x TP Puffer (Roche)	2 µl
3,3 mM CTP, ATP, GTP-Mix	3 µl
RNase-Inhibitor	1 µl
100 µM UTP	1 µl
<sup>32</sup> P-UTP	3 µl
T7 (sense) oder T3 (antisense) Polymerase	1 µl
H <sub>2</sub> O	ad 20 µl

**Tabelle 8.14: Pipettierschema für die *in vitro*-Transkription**

Nach einem DNase-Verdau von 45 min bei 37°C wurde die RNA mit Hilfe der Quick Spin Columns (Roche) nach Protokoll des Herstellers von nicht eingebautem <sup>32</sup>P-UTP befreit und aufgereinigt. Anschließend wurden die Zerfälle pro Minute (CPM) bestimmt.

### 8.3.10 UV-Crosslink zur *in vitro*-Analyse von Protein-RNA-Wechselwirkungen

Mit dieser Methode ist es möglich eine Interaktion zwischen RNA und Protein nachzuweisen. Hierzu wird die radioaktiv markierte, *in vitro* transkribierte RNA zuerst mit einem rekombinanten, aufgereinigten Fusionsprotein inkubiert um eine Bindung zu ermöglichen. Durch anschließende UV-Licht-Bestrahlung entsteht eine kovalente Bindung zwischen Protein und RNA. Zuletzt wird die nicht gebundene und nicht durch die Proteinbindung geschützte RNA durch einen RNase-Verdau abgebaut und die möglichen RNA-Protein-Verbindungen nach Größe mittels SDS-PAGE aufgetrennt. Das Gel wird anschließend getrocknet und für 2 Tage mit einem Positiv-Film in einer Fotokammer belassen. Da ein bekanntes Protein mit bekannter Größe eingesetzt wird, ist mit Hilfe eines Markers festzustellen, ob eine Interaktion zwischen RNA und Protein stattgefunden hat.

Folgender Ansatz (Tabelle 8.15) wurde für die RNA-Protein-Bindungsreaktion pipettiert und für 20 min bei 37°C inkubiert.



KOMPONENTE	MENGE
Cyt_10 Puffer	2 µl
40 mM DTT	1 µl
60 mg/ml Heparin	1 µl
10 mg/ml tRNA	1 µl
40 % NP40	1 µl
Radioaktiv markierte RNA	1000000- 1500000 CPM
Rekombinates, aufgereinigtes Protein	7 µl
Wasser	ad 20 µl

**Tabelle 8.15: Ansatz für die RNA-Protein-Bindungsreaktion für den UV-Crosslink**

Für das Ausbilden der kovalenten Bindung zwischen Protein und RNA wurde die Mischung schließlich auf Eis im UV-Crosslinker (BioRad) unter Verwendung des Programmes C-L bei 125 mJ 30 min mit UV-Licht bestrahlt. Später wurde dem Gemisch folgender RNase-Verdau (Tabelle 8.16) hinzugeführt und für 30 min bei 30°C inkubiert.

KOMPONENTE	MENGE
Rnase A/ T1 Puffer	1,8 µl
10 µg/µl RNase A	2 µl
100 U/µl RNase T1	0,2 µl

**Tabelle 8.16: Zusammensetzung der RNase-Verdau-Mischung für die nicht durch die Protein-Interaktion-geschützte RNA**

Jede Probe wurde mit Laemmli-Puffer versetzt und bei 95°C für fünf min denaturiert. Anschließend wurden die Proben nach Größe der Proteine mittels SDS-Page aufgetrennt. Das Gel wurde mit Hilfe eines Vakkumtrockners getrocknet und schließlich mit einem Positivfilm für zwei bis drei Tage inkubiert, bevor der Film zur Analyse entwickelt wurde.

### 8.3.11 Klonierung von DNA-Fragmenten

Unter Klonierung versteht man die Integration eines DNA-Fragments in einen Vektor. Ziel der Klonierung kann die Vermehrung, Analyse und Expression dieser integrierten DNA sein. Hierzu werden Vektor und Fragment mit geeigneten Restriktionsendonukleasen verdaut (8.3.11.1). Um die DNA zwischen den einzelnen Reaktionsschritten aufzureinigen, wird die Phenol-Chloroform-Extraktion verwendet (8.3.11.2). Der Vektor wird mit einer alkalischen

Phosphatase behandelt um später eine Religation zu vermeiden (8.3.11.4). Fragment und Vektor werden mittels Agarose-Gel-Elektrophorese (8.3.11.5) von Unreinheiten befreit und wieder eluiert (8.3.11.6). Die DNA wird schließlich ligiert (8.3.11.7) und in Bakterien transformiert (8.3.11.8). Die durch die Bakterien vermehrte Plasmid-DNA wird isoliert (8.3.11.9) und durch geeigneten Verdau und anschließender Sequenzierung überprüft.

#### **8.3.11.1 Restriktion von DNA**

Restriktionsendonukleasen werden für die Charakterisierung von Plasmid-DNA und bei der Präparation von DNA für Klonierungen verwendet. Sie erkennen palindromische Sequenzen und schneiden hier doppelsträngige DNA mit glatten oder 3'- bzw. 5'- überhängenden Enden. Bei der gerichteten Klonierung sind überhängende Enden von Vorteil.

Zum analytischen Verdau wurden 0,1-1 µg Plasmid-DNA mit BSA, entsprechendem Reaktionspuffer und 3 U Enzym in einem Gesamtvolumen von 20 µl angesetzt. Für präparative Zwecke wurden 20-40 µg DNA eingesetzt; das Gesamtvolumen wurde dementsprechend angepasst. Der Restriktionsansatz wurde, wenn nicht anders angegeben, bei 37 °C für drei bis 16 h inkubiert. Die Restriktion wurde mittels Agarosegel-Elektrophorese überprüft.

#### **8.3.11.2 Phenol-Chloroform Extraktion von Nucleinsäuren**

Zur Entfernung von Salzen und Proteinen wurde der Restriktionsansatz mit 1/10 V 3 M Natriumacetatlösung (pH 4,8) versetzt. Anschließend wurde ein V einer 1:1 Mischung Phenol/Chloroform hinzu pipettiert und gemischt. Es wurde für fünf min bei 13000 Upm und 4 °C zentrifugiert. Die obere wässrige Phase wurde in ein neues Gefäß überführt und 1 V Chloroform hinzugegeben. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt wurde die wässrige Phase erneut abgetrennt. Nach Zugabe von 2 V Ethanol 100 % wurde die DNA für mindestens eine Stunde bei -20°C gefällt. Danach wurde für 20 min bei 13000 Upm und 4 °C abzentrifugiert. Das Pellet wurde mit 70 %igem Ethanol gewaschen, getrocknet und in DNA-H<sub>2</sub>O gelöst.

#### **8.3.11.3 Auffüllen überhängender 5'-Enden mit DNA-Polymerase**

Durch Auffüllen überhängender 5'-Enden werden glatte Enden geschaffen, die mittels der T4-Ligase verbunden werden können. Das hierzu verwendete Enzym ist das *Klenow* Fragment, die größere der beiden Untereinheiten der DNA-Polymerase I v. *E. coli*. Es verfügt über eine 5'-3'-Polymerase-Funktion und eine 3'-5' Exonuclease Aktivität, wodurch die Generierung von glatten Enden ermöglicht wird.

Dazu wurde die gereinigte DNA in H<sub>2</sub>O aufgenommen und mit dem angegebenen Puffer, 1 mM dNTPs sowie 3 U Klenow in einem Gesamtvolumen von 100 µl für zwei Stunden bei 37°C inkubiert.

#### **8.3.11.4 5'- Dephosphorylierung**

Um bei der Ligation eine Religation der Vektor-DNA zu vermeiden, wurde diese mit der alkalischen Phosphatase CIAP (*calf intestine alkaline phosphatase*) am 5'-Ende dephosphoryliert. Dazu wurde die gereinigte und verdaute Vektor-DNA in H<sub>2</sub>O aufgenommen und mit 10x Puffer sowie 3 U CIAP versetzt. Es wurde bei 37 °C für ca. ein bis zwei Stunden inkubiert.

#### **8.3.11.5 Agarose-Gelelektrophorese**

Zur Überprüfung eines Restriktionsverdaus mit Fragmentlängen größer als 100 bp, wurden Agarosegele mit 0,8 %-2 % Agarose in TBE-Puffer verwendet. Bei kleinen Fragmenten wurde dementsprechend ein hochprozentiges Gel verwendet. Um die DNA auf dem Gel detektieren zu können, wurde dem Gel der Interkalationsfarbstoff Ethidiumbromid in einer Konzentration von 5 ng/ml zugesetzt. Für die Elektrophorese wurden ca. 12 µl der Proben mit 3 µl DNA-Probenpuffer versetzt, aufgetragen und eine Spannung von 4-5 V/cm angelegt. Schließlich wurden die einzelnen Fragmente durch Fluoreszenz unter dem UV-Transilluminator betrachtet und konnten mit einem geeigneten Standard zur Identifizierung verglichen werden.

#### **8.3.11.6 Elektroelution von DNA aus Agarose**

Bei der Verwendung von mehreren Restriktionsenzymen beim Verdaus von Vektor oder Fragment entstehen unspezifische DNA-Fragmente, die bei der späteren Ligation stören. Zur Aufreinigung wurde daher die gesamte verdaute DNA auf ein präparatives Gel aufgetragen (8.3.11.5). Die entsprechenden DNA-Stücke, identifiziert durch Fluoreszenz unter dem UV-Transilluminator, wurden ausgeschnitten. Sie wurden in einen Dialyseschlauch gefüllt und mit 600 bis 800 µl TBE bedeckt. Der Dialyseschlauch wurde gut verschlossen und es wurde für eine Stunde bei 100 Volt eluiert. Anschließend wurde für zwei Minuten in die entgegengesetzte Richtung eluiert um die DNA vom Dialyseschlauch zu lösen. Die eluierte DNA wurde in ein Reaktionsgefäß überführt und mittels Phenol-Chloroform-Extraktion und anschließender Ethanol-Fällung gereinigt (8.3.11.2).

#### **8.3.11.7 Ligation von DNA**

Bei der Ligation von DNA werden das 3'-Hydroxy- und das 5'-Phosphat-Ende einer Nukleinsäure unter Abspaltung von ATP durch ein Ligase-Enzym miteinander verknüpft. Hierzu wurden Vektor und Fragment im Verhältnis 1:3 mit Ligasepuffer und 1 U T4-DNA-Ligase in einem Gesamtvolumen von 20 µl über Nacht bei 18°C inkubiert. Zur Negativkontrolle wurde ein Ansatz ohne Zugabe von Insertionsfragment mitgeführt.

### 8.3.11.8 Transformation von DNA in Bakterien

Als Transformation wird die Aufnahme von DNA in kompetente Bakterienzellen bezeichnet. Diese wird zur Vervielfältigung von rekombinanter DNA nach einer Klonierung verwendet. Zum Einschleusen von Plasmid-DNA in Bakterien wurden 10 µl des Ligationansatzes und 10 µl der Negativkontrolle mit je 100 µl kompetenter Bakterien auf Eis für mindestens 30 min inkubiert. Anschließend wurde durch die Hitzeschockbehandlung bei 42 °C für 45 sec die Zellwand der Bakterien kurzzeitig permeabel, so dass die Plasmid-DNA aufgenommen werden konnte. Im Anschluss wurde für 2 min auf Eis inkubiert. Zur Ausprägung der eingebrachten Resistenz wurde dem Ansatz 400 µl LB-Medium hinzugegeben und bei 37 °C für eine Stunde auf dem Schüttler inkubiert. 100 µl dieses Ansatzes wurden auf Antibiotikahaltigen Agarplatten steril ausplattiert. Daher konnten nur solche Bakterien zu Kolonien wachsen, die das entsprechende Resistenzgen-enthaltende Plasmid aufgenommen hatten. Die Platten wurden für 16 h bei 37 °C zum Wachstum der Bakterien inkubiert.

### 8.3.11.9 Plasmid–DNA–Präparation

Mit Hilfe der Plasmid DNA Präparation wird die vermehrte DNA aus den Bakterien isoliert um das Ergebnis der Klonierung zu überprüfen.

Hierzu wurden über Nacht gewachsene Kolonien mit einem sterilen Zahnstocher gepickt. Mit diesem wurden schließlich 3 ml LB-Medium (Minipräparation) bzw. 50 ml LB-Medium (Midipräparation) angeimpft. Die Kultur wurde für 16 h bei 37 °C auf dem Schüttler angereichert. Für das Aufarbeiten der Midipräparation wurde das Plasmid Midi Kit (Qiagen) verwendet.

Für die Aufarbeitung der Minipräparationen wurde die Methode der Alkalischen Lyse (Birnboim and Doly 1979) verwendet. Das Prinzip dieser Methode beruht auf der Lyse der Zellen durch das Detergenz SDS bei gleichzeitiger Denaturierung der chromosomalen DNA bei alkalischem pH-Wert durch NaOH. Nach Neutralisierung durch Kaliumacetat-Lösung fällt die hochmolekulare chromosomale DNA zusammen mit Protein-SDS-Komplexen aus und kann durch Zentrifugation von der Plasmid-DNA abgetrennt werden, die in Lösung und damit im Überstand bleibt.

Dafür wurde 1 ml der Bakteriensuspension für eine min bei 13000 Upm und 4 °C zentrifugiert. Das LB-Medium wurde verworfen und das Bakterien Pellet in 100 µl Maniatis I aufgenommen. Nach fünf min Inkubation bei 25 °C gab man 200 µl Maniatis II zur Lyse der Bakterien hinzu, mischte vorsichtig und stellte die Suspension fünf min auf Eis. Schließlich wurde 150 µl Maniatis III kurz gemischt und für weitere fünf min auf Eis inkubiert. Es wurde für 15 min zur Entfernung der gefällten genomischen DNA und der Proteinkomplexe bei 13000 Upm und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Gefäß überführt und mit 600 µl Isopropanol gefällt. Nach zwei min bei 25 °C wurde 10 min bei 13000 Upm und 21

°C pelletiert. Anschließend wurde die DNA mit 70 %igem Ethanol gewaschen, getrocknet und in 50 µl 1x TE aufgenommen.

### **8.3.12 Luciferase Reportergen Assay**

Die Luciferase ist eine Oxygenase, die in Anwesenheit von O<sub>2</sub> sowie den Cofaktoren ATP, Coenzym A und Mg<sup>2+</sup> ihr Substrat Luciferin zu Oxyluciferin oxidiert. Das bei dieser Reaktion emittierte Licht kann mittels eines geeigneten Luminometers quantifiziert werden. Da die Luciferase in humanen Zellen nicht endogen exprimiert wird, ist es ein geeignetes Reporter gen für Promotor- oder 3'UTR-Analysen. Dazu wird ein Promotorfragment vor ein Luciferasegen kloniert, so dass die Expression der Luciferase unter dessen Kontrolle steht. Dementsprechend wird für eine Analyse der 3'UTR ein Fragment hinter das Luciferasegen kloniert.

Die Zellen wurden zunächst transient transfiziert (8.1.6). Zur Kontrolle der Transfektionseffizienz wurde jeweils das Renilla-Luciferase-Gen unter der Kontrolle des EF-1α-Promotors (pRL-EF1α) cotransfiziert. Je nach Experiment wurden die Zellen mit Resveratrol behandelt bzw. mit Cytokinen stimuliert (8.1.4). Je 20 µl des Lysats wurden zur Messung der Firefly-Luciferase- und Renilla-Luciferase-Aktivität in eine 96-Loch-Platte pipettiert, welche im Plattenluminometer vermessen wurde. Unmittelbar vor der Messung wurden je 100 µl Luciferase-Substrat-Lösung (25 mM D-Luciferin; 27 µM Coenzym A; 100 mM ATP; 30 mM Tricin, pH 7,8; 0,1 mM EDTA; 15 mM MgSO<sub>4</sub>; 10 mM DTT) bzw. Renilla-Substrat-Lösung (0,1 M NaCl; 25 mM Tris-HCl pH 7,5; 1 mM CaCl<sub>2</sub>; 0,9 µM Coelenterazin) pro Loch injiziert. Die Hintergrundaktivität wurde durch die Messung von 20 µl PLB bestimmt und von den Werten der Proben abgezogen. Die Messwerte der Luciferaseaktivität wurden auf die Werte der Renilla-Aktivität bezogen.

## **8.4 Arbeitsmethoden mit Versuchstieren**

### **8.4.1 Die Collagen-induzierte Arthritis (CIA) als Modell einer chronischen Entzündung**

Collagen-Typ-II (CII) wird von Chondrozyten synthetisiert und ist Bestandteil der extrazellulären Matrix der Knochen und des Knorpels. Im murinen Modell der Collagen-induzierten Arthritis (CIA) ist CII das potentielle Antigen zur Induktion einer rheumatoiden Arthritis (RA).

Dazu wurden Mäuse des TCRβ-TG-Stammes mit CII immunisiert. Jedem Tier wurden 200 µg CII in kompletten Freund'schen Adjuvanz (CFA) intradermal in die Haut beider

Ohrmuscheln und an einer Seite des Rückenfalls in der Nähe der Schwanzbasis injiziert. An Tag 11 und Tag 21 nach der ersten Immunisierung erhielten alle Tiere eine zusätzliche Injektion (boost) von 100 µg CII-Emulsion in die Schwanzbasis.

Die Mäuse wurden regelmäßig auf sichtbare Veränderungen an den Pfoten untersucht. Als Arthritis-positiv wurden Mäuse bewertet, bei denen entweder eine beginnende Schwellung im Bereich des Knöchels oder der Pfote erkennbar war oder mindestens ein peripheres Gelenk eine Schwellung zeigte. Schließlich wurde die Schwere der Arthritis anhand eines bestimmten Arthritisindex beschrieben (Tabelle 8.17).

INDEX	MERKMALE
0	Normale 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, eingeschränkte Beweglichkeit

**Tabelle 8.17: Bestimmung des Arthritisindex**

Entsprechend der dargestellten Klassifizierung wurde für alle Extremitäten aller Mäuse einer Experimentalgruppe ein Einzelindex pro Pfote vergeben. Aus der Summe der vier Einzelindizes ergab sich der Arthritisindex (maximal 16) für Einzeltiere. Der mittlere Arthritisindex errechnete sich durch Addition der Arthritisindizes aller Tiere einer Experimentalgruppe dividiert durch die Gesamtzahl der Tiere dieser Gruppe. Die Arthritis-Schwere kommt als mittlerer Arthritisindex zum Ausdruck.

Die Mäuse wurden nach unterschiedlichen Zeitpunkten nach der ersten Immunisierung zur Organ- und Gewebe-Entnahme getötet.

#### 8.4.2 Resveratrol-Behandlung von ApoE<sup>-/-</sup>-Mäusen

ApoE<sup>-/-</sup>-Mäuse sind C57BL/6-Mäuse mit einem Knockout für das Apolipoprotein E. Ca. 10 Monate nach der Geburt wurden die Tiere per Schlundsonde oral mit 30 mg/kg oder 100 mg/kg Resveratrol gefüttert. Zur Kontrolle wurden Mäuse mit PBS gefüttert. Nach sieben Tagen wurden die Mäuse zur Organentnahme getötet.

## 8.5 Statistik

Alle dargestellten Daten repräsentieren die Mittelwerte +/- der Standardabweichung (*Standard error of the mean SEM*). Alle statistischen Auswertungen wurden mit *Graphpad Prism 5.0d* durchgeführt. Dabei wurde die *ttest*-Analyse angewendet, wenn zwei Gruppen miteinander verglichen wurden. Beim Vergleich von mehr als 2 Gruppen wurde ein faktorieller ANOVA (*analysis of variance*) durchgeführt. Im speziellen wurde der *Dunnnett's multiple comparison test* („einer vs. alle“) oder der *Tukey's multiple comparison test* („jeder vs. jeden“) angewendet.

## 9 Ergebnisse

### 9.1 Die Analyse der KSRP-Expression in Modellen der rheumatoiden Arthritis (RA)

Chronisch entzündliche Erkrankungen wie die rheumatoide Arthritis (RA) zeigen eine pathologische Erhöhung pro-inflammatorischer Gene (TNF- $\alpha$ , iNOS, etc.) (Voulgari 2008). Bei der Regulation der Expression dieser Gene spielen post-transkriptionelle Mechanismen eine entscheidende Rolle. In früheren Studien konnte gezeigt werden, dass das mRNA-bindende *KH type splicing regulatory protein* (KSRP) die mRNA-Stabilität pro-inflammatorischer Gene (TNF- $\alpha$ , iNOS, etc) reguliert (Linker, Pautz et al. 2005). Daher ist es von großem Interesse die KSRP-Expression im Rahmen chronisch-inflammatorischer Prozesse zu analysieren.

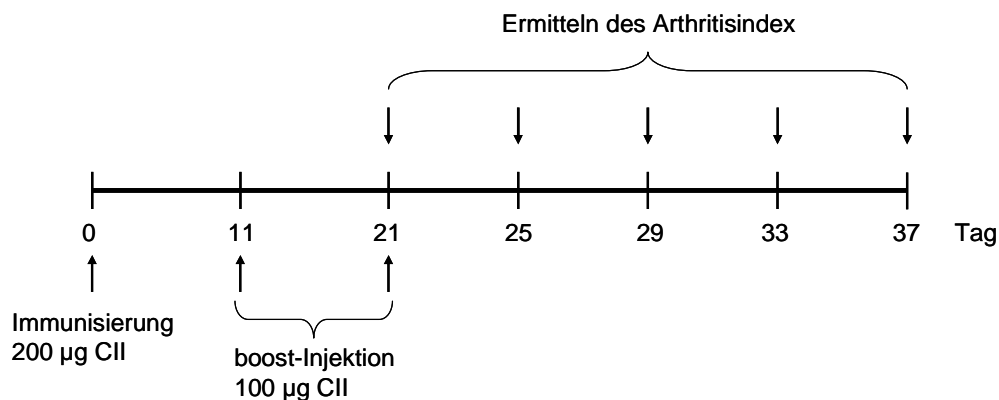
Ein etabliertes murines *in vivo*-Modell einer chronischen entzündlichen Erkrankung ist die Collagen-induzierte Arthritis (CIA). Hier werden DBA/1-Mäuse verwendet, die transgen für die T-Zellrezeptor- $\beta$ -Kette eines Collagen Typ II (CII)-spezifischen, arthritogenen T-Zellklon sind (TCR $\beta$ -TG) (Mori, Loetscher et al. 1992). Es konnte gezeigt werden, dass die Expression der TCR $\beta$ -TG-Kette zu einer höheren Empfindlichkeit der Mäuse gegenüber einer Immunisierung mit CII sorgt und somit die Wahrscheinlichkeit für die Ausbildung der CIA erhöht ist. Die CII-Immunisierung führt zu der Entwicklung einer Autoimmunreaktion, die zu einer Schwellung der Gelenke und zu einer erhöhten pro-inflammatorischen Genexpression führt.

Als *in situ*-Modell wurden die humanen C28/I2-Chondrozyten verwendet. Chondrozyten sind Knorpelzellen, die zum Erhalt der extrazellulären Matrix für die Proteoglycan- und Collagensynthese verantwortlich sind. Während der RA wird diese Chondrozyten-vermittelte Synthese gehemmt, was einen Abbau der extrazellulären Matrix zur Folge hat. Chondrozyten sind zusätzlich in der Lage, Cytokine zu bilden, was zu einer gegenseitigen Aktivierung und somit zu einer Verstärkung der Knorpeldestruktion führt (Otero and Goldring 2007). Aus diesem Grund ist es von großer Bedeutung, die pro-inflammatorische Genexpression in humanen Chondrozyten zu untersuchen. Um KSRP-vermittelte Effekte miteinzubeziehen, wurden C28/I2-Zellen mit einer Überexpression von KSRP generiert.



### 9.1.1 Die mRNA-Expression des Biomarkers der rheumatoiden Arthritis S100A8 ist in verschiedenen Geweben Collagen Typ II-immunisierter Mäuse erhöht

TCR $\beta$ -TG-Mäuse wurden an Tag 0 mit 200  $\mu$ g heterologem Collagen Typ II (CII) in kompletten Freund'schen Adjuvans (CFA) durch eine intradermale Injektion in die Schwanzbasis und Ohrmuschel zur Ausbildung einer Collagen-induzierten Arthritis (CIA) immunisiert (8.4.1). An Tag 11 und 21 erhielten die Mäuse eine Boost-Injektion in die Schwanzbasis von 100  $\mu$ g CII in CFA. Ein Schema der Versuchsdurchführung ist in Abbildung 9.1 dargestellt.

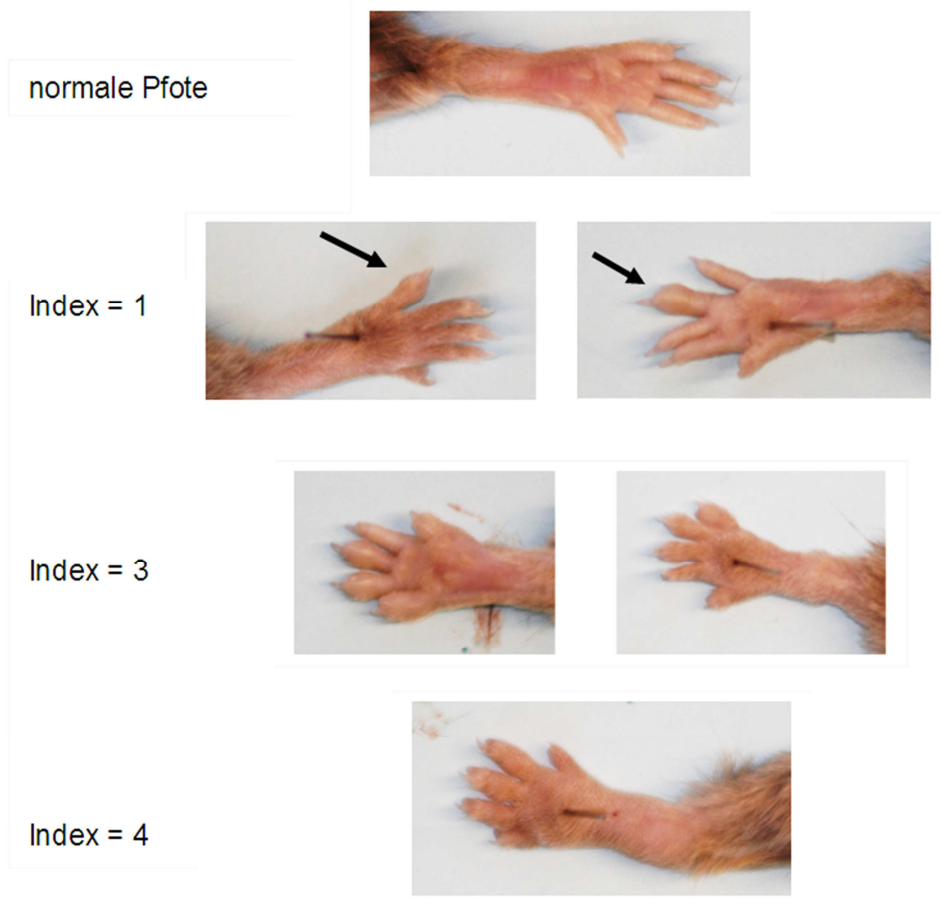


**Abbildung 9.1: Immunisierungsschema der Collagen-induzierten Arthritis (CIA)**

*TCR $\beta$ -TG-Mäuse wurden an Tag 0 mit 200  $\mu$ g heterologem Collagen Typ II (CII) in kompletten Freund'schen Adjuvans (CFA) durch eine intradermale Injektion in die Schwanzbasis und Ohrmuschel immunisiert. An Tag 11 und 21 erhielten die Mäuse eine Boost-Injektion in die Schwanzbasis von 100  $\mu$ g CII in CFA. An Tag 21, 25, 29, 33 und 37 wurde der Arthritisindex ermittelt.*

Ab Tag 21 wurden die Pfoten der Mäuse auf Schwellungen überprüft und der Arthritisindex bestimmt, um die Ausprägung der CIA einschätzen zu können (Abb. 9.2). Der geringste Index von eins wurde für eine Pfote mit einem geschwollenen Interphalangeal-Gelenk vergeben. Eine Pfote mit geschwollenem Gelenk und aller Interphalangeal-Gelenke ergab den höchsten Index von vier.

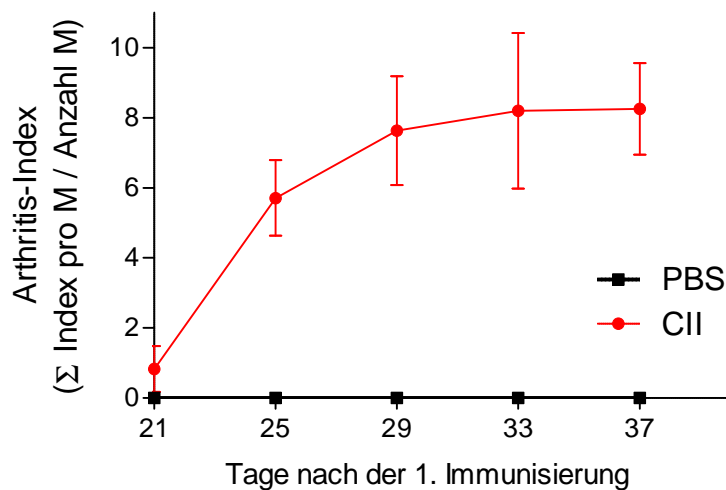
Zur Auswertung wurden die Indizes aller vier Pfoten pro Maus addiert. Anschließend wurden alle Indizes addiert und durch die Anzahl der Mäuse geteilt um den mittleren Index zu bestimmen.



**Abbildung 9.2: Verschiedene Stadien der Schwellung der Pfoten bei CII-immunisierten Mäusen mit Angabe des entsprechenden Arthritisindex**

Abgebildet sind Fotos der unterschiedlichen Stadien einer Pfortenschwellung während der Collagen-induzierten Arthritis (CIA) und die Bezeichnung des dafür definierten Arthritisindex. (Die Bilder wurden von Dr. [REDACTED] zur Verfügung gestellt)

Abbildung 9.3 zeigt die Auftragung des mittleren Arthritisindex CII-immunisierter Mäuse (M) im Vergleich zu PBS-behandelten Mäusen. Ab Tag 25 war der Arthritisindex signifikant auf sechs erhöht und stieg bis Tag 37 auf 8 an. Zwischen Tag 25 und 37 war keine signifikante Änderung im Index CII-immunisierter Mäuse zu sehen. Die Pfoten PBS-behandelter Tiere waren nicht geschwollen.



**Abbildung 9.3: Verlauf des Arthritisindex nach der ersten CII-Immunisierung**

Dargestellt ist die Zusammenfassung (MW  $\pm$  SEM) der Summe der Indizes CII-behandelter Mäuse (M) und PBS-behandelter Kontrollmäuse, geteilt durch die Anzahl der Mäuse. (Die Index-Bestimmung wurde von Dr. [REDACTED] durchgeführt)

Die Messung des Arthritisindex zeigte, dass CII-behandelte Mäuse nach 25 Tagen eine schwere äußerliche Arthritis-Symptomatik ausbilden. Nun sollte analysiert werden, ob die pro-inflammatorische mRNA-Expression auf eine Arthritis hinweist. Das Calcium-bindende Protein S100A8 wurde in früheren Studien als RA-Marker postuliert und wurde daher in diesem Versuch als Marker für die Schwere der Krankheit verwendet (Baillet 2010).

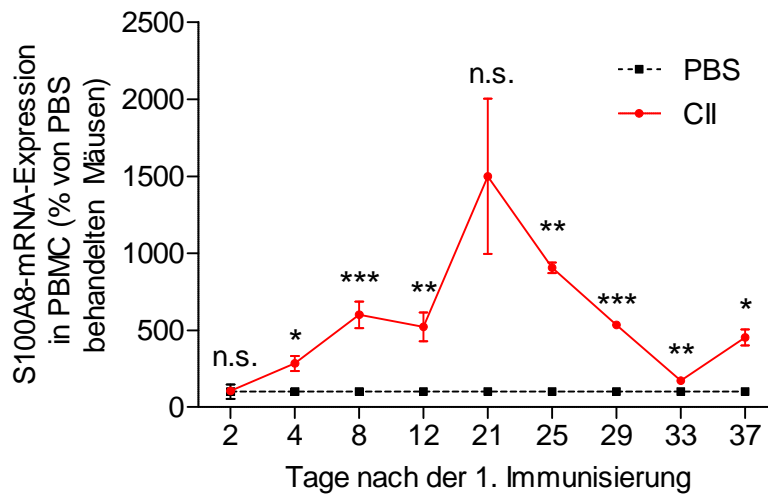
Die CII-immunisierten Mäuse und PBS-behandelten Mäuse wurden nach Tag 2, 4, 8, 12, 21, 25, 29, 33 und 37 zur Organ- und Gewebe-Entnahme getötet (8.4.1). Anschließend wurde die RNA aus PBMC, Milz und Pfoten isoliert (8.3.2) und die S100A8-mRNA-Expression mittels qRT-PCR-Analysen bestimmt (8.3.7). Zur Auswertung wurden die Werte der PBS-behandelten Kontrollmäuse auf 100 % gesetzt.

In PBMC (Abb. 9.4 A) war die S100A8-mRNA-Expression bereits 4 Tage nach der ersten Immunisierung im Vergleich zu Kontrollmäusen 2-fach signifikant erhöht. Bis Tag 21 stieg die S100A8-mRNA-Menge kontinuierlich auf das 15-fache an und fiel schließlich bis Tag 33. Danach schien die Expression wieder zu steigen.

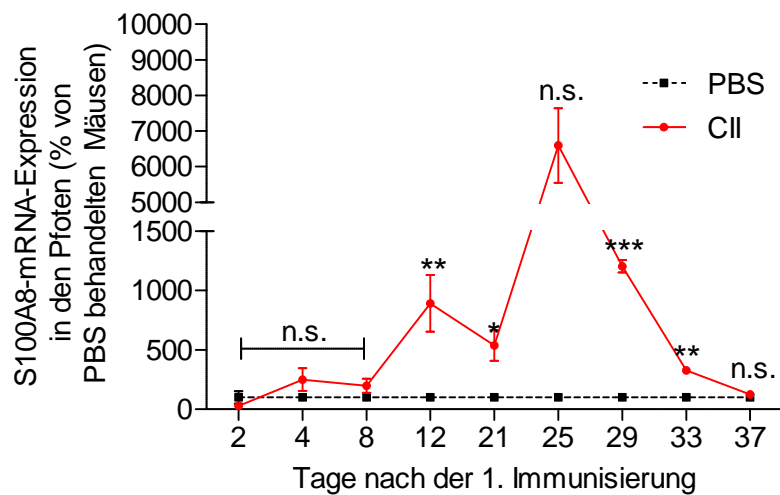
Die S100A8-mRNA-Menge in den Pfoten der Mäuse war erst 12 Tage nach der ersten Immunisierung erhöht (Abb. 9.4 B). Hier war tendentiell die höchste S100A8-Expression nach 25 Tagen im Vergleich zu Kontrollmäusen erreicht. Anschließend fiel die Expression in CII-immunisierten Mäusen signifikant auf das 10-Fache in Kontrast zu der S100A8-Expression in Kontrollmäusen. Bis Tag 37 war eine Reduktion der mRNA-Menge im Vergleich zu PBS-behandelten Mäusen festzustellen.

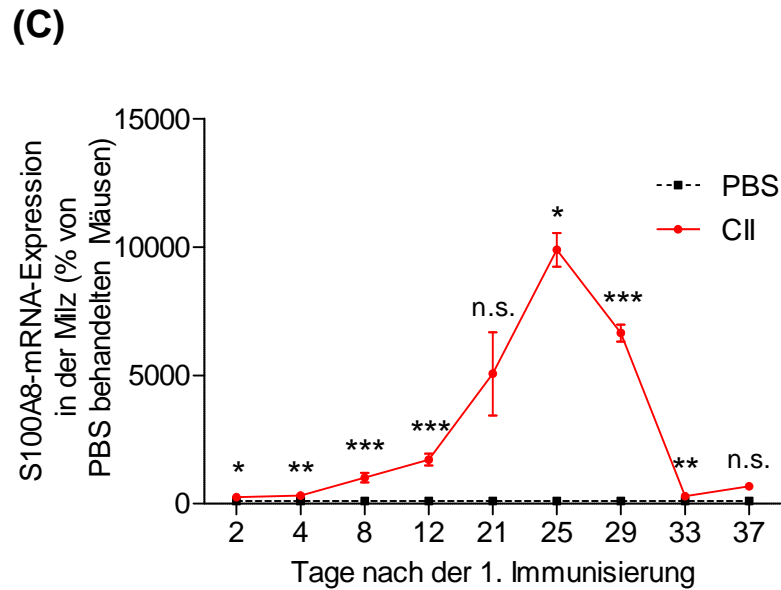
Abbildung 9.4 C zeigt, dass die S100A8-mRNA-Expression in der Milz bereits nach 2 Tagen signifikant im Vergleich zu Kontrollmäusen erhöht war. Auch hier stieg die Expression kontinuierlich bis Tag 25 sogar auf das 100-fache an und fiel danach bis Tag 33 auf das 3-fache im Vergleich zu der S100A8-mRNA-Expression in PBS behandelten Mäusen. Am Tag 37 war keine erhöhte Expression des Biomarkers in der Milz CII-immunisierter Mäuse zu sehen.

(A)



(B)





**Abbildung 9.4: Analyse der mRNA-Expression des Biomarkers S100A8 in Geweben CII-immunisierter Mäuse**

*TCR $\beta$ -TG-Mäuse wurden an Tag 0 mit 200  $\mu$ g Collagen Typ II (CII) in kompletten Freund'schen Adjuvanz (CFA) immunisiert. An Tag 11 und 21 wurde den Mäusen eine Boost-Injektion von je 100  $\mu$ g CII in die Schwanzbasis appliziert (CII). Zusätzlich wurde Mäusen PBS injiziert, die als Kontrollgruppe dienen (PBS). Nach zwei, vier, 8, 12, 21, 25, 29, 33 und 37 Tagen wurden jeweils Mäuse der CII- und PBS-Gruppe zur Organ- und Gewebeentnahme getötet und die RNA isoliert. Die S100A8-mRNA-Expression und die GAPDH- bzw. RNA-Pol2A-mRNA-Expression zur Normierung wurde mittels qRT-PCR bestimmt. Der Versuch wurde pro Zeitpunkt dreifach durchgeführt mit je  $n=3-5$ .*

*Dargestellt ist die Auswertung von 3 unabhängigen qRT-PCR-Analysen mit RNA aus PBMC (A), Pfoten (B) und Milz (C) von TCR $\beta$ -TG-Mäusen. Abgebildet sind die Mittelwerte (MW) und die SEM (+/-) der relativen S100A8-mRNA-Menge in CII-immunisierten Mäusen in Bezug auf die mRNA-Menge in PBS-behandelten Kontrolltieren. (\*\*\*:  $p<0,001$ ; \*\*:  $p<0,01$ ; \*:  $p<0,05$ ; ns: nicht signifikant verschieden von PBS-behandelten Tieren)*

CII-immunisierte-TCR $\beta$ -TG-Mäuse zeigten deutliche Arthritissymptome anhand von geschwollenen Pfoten und Gelenken. Der etablierte RA-Biomarker S100A8 war in allen untersuchten Geweben im Vergleich zu unbehandelten Mäusen deutlich erhöht, was die Ausprägung einer CIA bestätigt.

### 9.1.2 Die KSRP-Expression ist im Verlauf der Collagen-induzierten Arthritis (CIA) reguliert

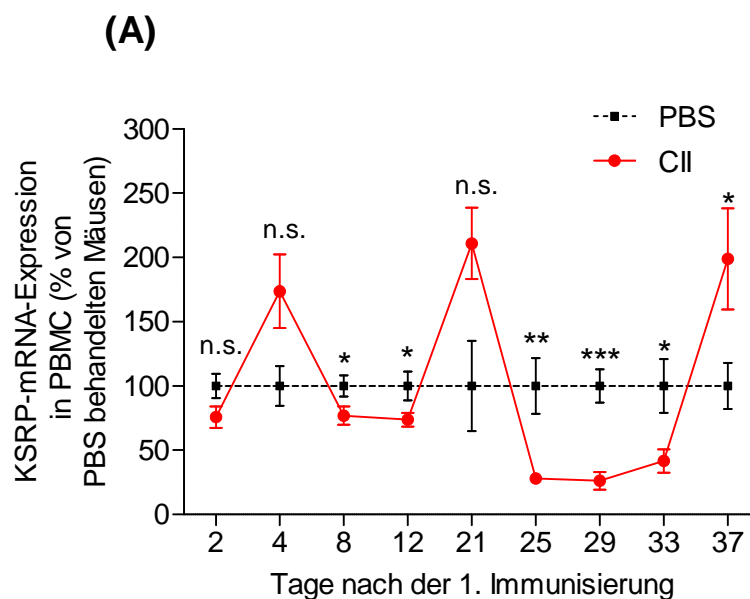
Nachdem eine CII-abhängige Erkrankung der TCR $\beta$ -TG-Mäuse bewiesen wurde, sollte in diesen Mäusen die KSRP-mRNA-Expression analysiert werden.

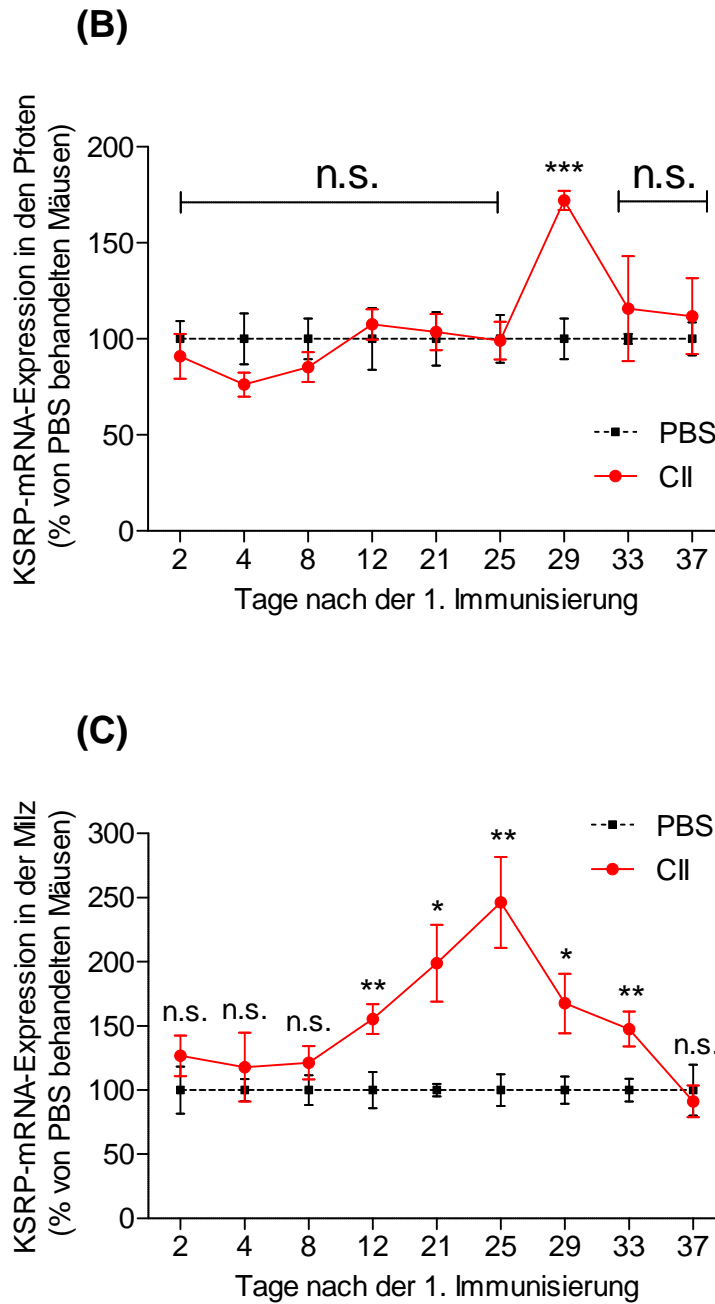
Dazu wurden TCR $\beta$ -TG-Mäuse an Tag 0 mit 200  $\mu$ g heterologem Collagen Typ II (CII) in kompletten Freund'schen Adjuvans (CFA) durch eine intradermale Injektion in die

Schwanzbasis und Ohrmuschel zur Ausbildung einer Collagen-induzierten Arthritis (CIA) immunisiert (8.4.1). An Tag 11 und 21 erhielten die Mäuse eine Boost-Injektion in die Schwanzbasis von 100 µg CII in CFA. Zur Kontrolle wurden Mäuse an allen Tagen mit PBS injiziert. Die Mäuse wurden nach Tag zwei, vier, 8, 12, 21, 25, 29, 33 und 37 zur Organ- und Gewebe-Entnahme getötet. Anschließend wurde die RNA aus PBMC, Milz und Pfoten isoliert (8.3.2), revers transkribiert (8.3.5) und die KSRP-mRNA-Expression mittels qRT-PCR-Analysen bestimmt (8.3.7). Zur Auswertung wurden die Werte der PBS-behandelten Kontrollmäuse auf 100 % gesetzt.

In PBMC war die KSRP-mRNA-Expression am vierten Tag nach der ersten Immunisierung im Vergleich zu PBS-behandelten Mäusen tendenziell erhöht (Abb. 9.5 A) Nach acht Tagen verringerte sich die KSRP-mRNA-Menge in CII-immunisierten Mäusen signifikant auf 75 % und blieb bis Tag 12 konstant. An Tag 21 konnte eine zweimal stärkere KSRP-Expression in CII-immunisierten Mäusen nachgewiesen werden, die an Tag 25 auf 25 % im Vergleich zu Kontrollmäusen sank. Diese verringerte KSRP-Expression war bis Tag 33 annähernd konstant und stieg erneut an Tag 37 signifikant auf das 2-Fache im Vergleich zu der KSRP-Expression in Kontrollmäusen an.

Abbildung 9.5 B zeigt die KSRP-mRNA-Expression in den Pfoten CII- und PBS-behandelter Tiere. Bis Tag 25 war kein signifikanter Unterschied zwischen CII-immunisierten und PBS-behandelten Kontrollmäusen festzustellen. An Tag 29 war eine signifikante Erhöhung der KSRP-mRNA-Menge in immunisierten Mäusen detektierbar. Tag 33 und 37 zeigten keine signifikante Änderung der KSRP-Expression in CII-immunisierten Mäusen im Vergleich zu Kontrolltieren.





**Abbildung 9.5: Analyse der KSRP-mRNA-Expression in Geweben CII-Immunisierter Mäuse**

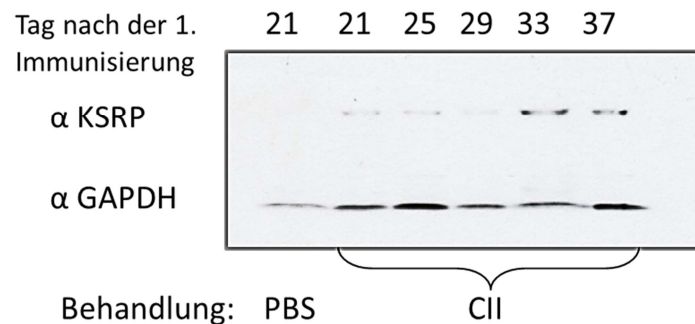
*TCRβ-TG-Mäuse wurden an Tag 0 mit 200 µg Collagen Typ II (CII) in kompletten Freund'schen Adjuvanz (CFA) immunisiert. An Tag 11 und 21 wurde den Mäusen eine Boost-Injektion von je 100 µg CII in die Schwanzbasis appliziert (CII). Zusätzlich wurde Mäusen PBS injiziert, die als Kontrollgruppe dienten (PBS). Nach 2, 4, 8, 12, 21, 25, 29, 33 und 37 Tagen wurden jeweils Mäuse der CII- und PBS-Gruppe zur Organ- und Gewebeentnahme getötet und die RNA isoliert. Die KSRP-mRNA-Expression und die GAPDH- bzw. RNA-Pol2A-mRNA-Expression zur Normierung wurde mittels qRT-PCR bestimmt. Der Versuch wurde pro Zeitpunkt dreimal durchgeführt mit je 3-5 Mäusen pro Gruppe.*

*Dargestellt ist die Auswertung von 3 unabhängigen qRT-PCR-Analysen mit RNA aus PBMC (A), Milz (B) und Pfoten (C) von TCRβ-TG-Mäusen. Abgebildet sind die Mittelwerte (MW) und die SEM der relativen KSRP-mRNA-Menge in CII-immunisierten Mäusen in Bezug auf die mRNA-Menge in PBS-behandelten Kontrolltieren. (\*\*\*:  $p < 0,001$ ; \*\*:  $p < 0,01$ ; \*:  $p < 0,05$ ; ns: nicht signifikant verschieden von PBS-behandelten Tieren)*

In der Milz CII-immunisierter Mäuse war die KSRP-Expression bereits nach 12 Tagen im Vergleich zu Kontrollmäusen signifikant erhöht (Abb. 9.5 C). Diese Erhöhung stieg bis Tag 25 auf das 2,5-Fache der KSRP-Expression in PBS-behandelten Mäusen an. Ab Tag 29 fiel diese gesteigerte KSRP-Expression in CII-behandelten Mäusen, war jedoch bis Tag 33 im Vergleich zu Kontrollmäusen signifikant erhöht. Tag 37 zeigte schließlich keine signifikante Änderung der KSRP-Expression in CII-immunisierten Mäusen im Vergleich zu Kontrollmäusen.

Diese detektierte Steigerung der KSRP-mRNA-Expression in der Milz sollte auf Proteinebene bestätigt werden. Dazu wurde ein Teil der Milzen CII-immunisierter Mäuse, die an Tag 21, 25, 29, 33 und 37 getötet wurden, zur Proteingewinnung in RIPA-Puffer lysiert (8.2.1). Zusätzlich wurde ein Teil der Milzen PBS-behandelter Mäuse von Tag 21 entsprechend aufgearbeitet. Anschließend wurden Western Blot Experimente mit 40 µg Protein und monoklonalen Antikörpern zur Detektion der KSRP-Expression und zur Ladungskontrolle GAPDH-Menge durchgeführt (8.2.5).

Abbildung 9.6 zeigt, dass die KSRP-Protein-Expression an den Tagen 33 und 37 in immunisierten Tieren im Vergleich zu Kontrolltieren deutlich erhöht war.



#### Abbildung 9.6: Analyse der KSRP-Proteinexpression in der Milz CII-immunisierter Mäuse

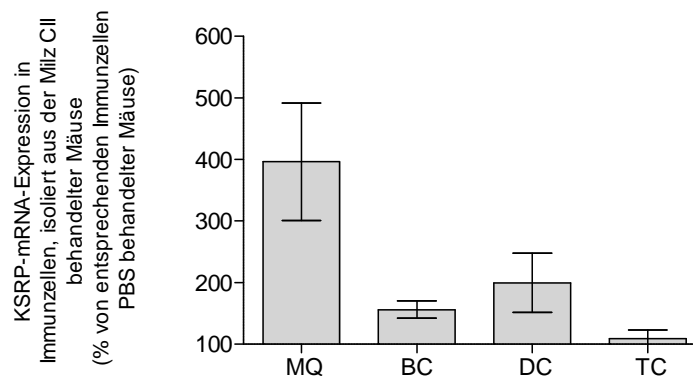
*TCRβ-TG-Mäuse wurden an Tag 0 mit 200 µg Collagen Typ II (CII) in kompletten Freund'schen Adjuvanz (CFA) immunisiert. An Tag 11 und 21 wurde den Mäusen eine Boost-Injektion von je 100 µg CII in die Schwanzbasis appliziert (CII). Zusätzlich wurde Mäusen PBS injiziert, die als Kontrollgruppe dienten (PBS). Nach 21, 25, 29, 33 und 37 Tagen wurden jeweils Mäuse der CII- und PBS-Gruppe zur Entnahme der Milz getötet. Aus der Milz wurden Proteinlysate gewonnen und die KSRP-Expression mittels Western Blot Analysen bestimmt.*

*Dargestellt ist ein Blot aus 3 unabhängigen Western Blot Analysen mit einem monoklonalen Antikörper zur KSRP-Detektion (α KSRP) und Proteinextrakten aus der Milz von CII- und PBS-behandelten Mäusen. Zur Ladungskontrolle wurde ein monoklonaler Antikörper zur Bestimmung des GAPDH-Gehaltes (α GAPDH) verwendet. (Die Western Blot Analyse wurde von ██████████ im Rahmen Ihrer Diplomarbeit in der AG Kleinert durchgeführt und für diese Arbeit zu Verfügung gestellt)*

In der Milz findet neben dem Makrophagen-abhängigen Abbau geschädigter Blutzellen die antigeninduzierte Differenzierung und Vermehrung von B- und T-Lymphozyten, während



einer Immunreaktion, statt. Daher sollte untersucht werden, ob eine bestimmte Immunzellart für die erhöhte KSRP-Expression in der Milz erkrankter Mäuse verantwortlich ist. Hierzu wurden Immunzellen anhand ihrer spezifischen Oberflächenproteine magnetisch separiert (Sudowe, Arps et al. 2000). Diese Auftrennung der Immunzellen wurde von der AG Reske-Kunz (Dermatologie, Klinische Forschungsgruppe Allergie, Universitätsmedizin Mainz) durchgeführt. Makrophagen (MQ), Dendritische Zellen (DC), B-Zellen (BC) und T-Zellen (TC) aus Milzgewebe CII- und PBS-behandelter Mäuse von Tag 29 wurden isoliert und in GIT-Puffer lysiert. Die RNA wurde isoliert (8.3.1) und qRT-PCR-Experimente (8.3.7) durchgeführt. Zur Auswertung wurden die jeweiligen Immunzellen der PBS-behandelten Maus als 100% gesetzt (nicht dargestellt). In MQ konnte eine um den Faktor vier erhöhte KSRP-mRNA-Expression in CII-immunisierten Mäusen im Vergleich zu Kontrollmäusen nachgewiesen werden (Abb. 9.7). Dagegen war in DC eine zweifach induzierte Expression nach einer CII-Immunsierung zu sehen. In BC war eine 1,5-fach vermehrte KSRP-mRNA-Menge im Vergleich zu PBS-Kontrollmäusen detektierbar. In TC war die KSRP-Expression in CII-immunisierten Mäusen im Vergleich zu Kontrolltieren nicht verändert.



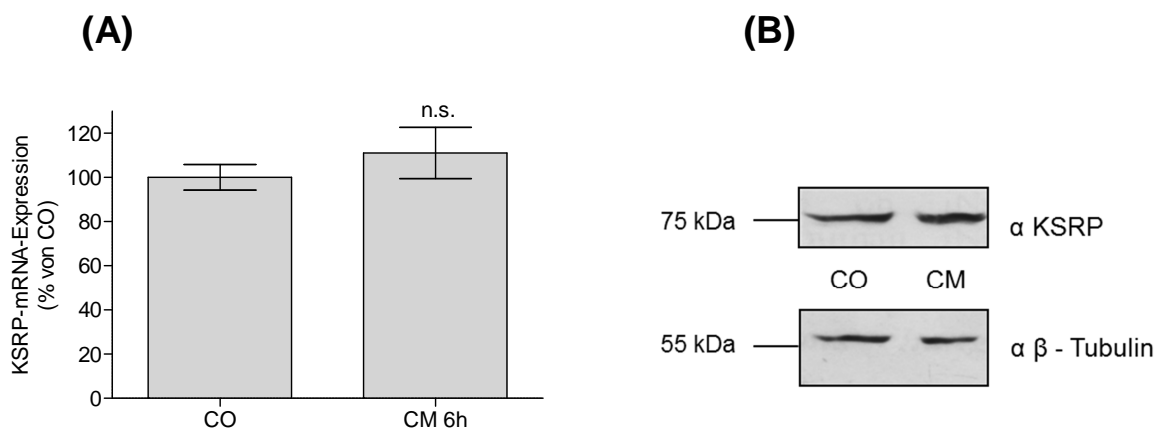
**Abbildung 9.7: Analyse der KSRP-mRNA-Expression in verschiedenen Immunzellen**

*TCR $\beta$ -TG-Mäuse wurden an Tag 0 mit 200  $\mu$ g Collagen Typ II (CII) in kompletten Freund'schen Adjuvanz (CFA) immunisiert. An Tag 11 und 21 wurde den Mäusen eine Boost-Injektion von je 100  $\mu$ g CII in die Schwanzbasis appliziert (CII). Zusätzlich wurde Mäusen PBS injiziert, die als Kontrollgruppe dienten (PBS). Nach 29 Tagen wurde jeweils eine Maus der CII- und PBS-Gruppe zur Milzentnahme getötet und Makrophagen (MQ), B-Zellen (BC), Dendritische Zellen (DC) und T-Zellen (TC) mittels magnetischer Separation isoliert. Die Immunzellen wurden in GIT aufgenommen, die RNA isoliert und die KSRP-mRNA-Expression sowie die GAPDH- bzw. RNA-Pol2A-mRNA-Expression (Normierung) mittels qRT-PCR bestimmt. Dargestellt ist die Zusammenfassung aus fünf unabhängigen qRT-PCR-Analysen. Die Säulen (MW  $\pm$  SEM) repräsentieren relative KSRP-mRNA-Mengen in Bezug auf die KSRP-mRNA-Menge in den jeweiligen Immunzellen PBS-behandelter Mäuse*

In den untersuchten Geweben der TCR $\beta$ -TG-Mäuse führte eine Immunisierung mit CII zu einer Modulation der KSRP-Expression. In der Milz konnte eine KSRP-Induktion im Gesamtgewebe und in den Immunzellen MQ, DC und BC nachgewiesen werden.

### 9.1.3 Das humane Arthritis-Modell der C28/I2-Chondrozyten zeigt bei einer Überexpression von KSRP eine Reduktion bekannter KSRP-Zielgene

Um die Bedeutung der regulierten KSRP-Expression im Verlauf einer Collagen-induzierten Arthritis *in situ* genauer untersuchen zu können, sollte das Modell der humanen C28/I2-Chondrozyten verwendet werden. Frühere Analysen unserer Arbeitsgruppe haben am Beispiel der iNOS gezeigt, dass die Cytokin-abhängige Induktion der pro-inflammatorischen Genexpression nur in superkonfluenten C28/I2-Zellen möglich ist (Schmidt, Pautz et al. 2010). Daher wurden alle Analysen mit C28/I2-Chondrozyten mit superkonfluenten Zellen durchgeführt. Zuerst sollte die KSRP-mRNA-Expression nach einer Cytokinbehandlung analysiert werden. Dazu wurden superkonfluente C28/I2-Zellen mit Cytokinen (CM) behandelt (8.1.4). Zur Kontrolle wurden Zellen in serumfreien Medium inkubiert (CO). Nach sechs Stunden wurden die Zellen zur RNA-Isolation in GIT-Puffer lysiert (8.3.1). Die RNA wurde revers transkribiert (8.3.5) und mit qRT-PCR-Analysen (8.3.7) quantifiziert. Zur Auswertung wurden CO-behandelte C28/I2-Zellen als 100% gesetzt.



**Abbildung 9.8: Analyse des Effekts der CM-Inkubation auf die KSRP-Expression**

Superkonfluente C28-I/2-Chondrozyten wurden für sechs Stunden mit Cytokinen (CM) stimuliert. Zusätzlich wurden Zellen in serumfreien Medium inkubiert (CO). Schließlich wurde die RNA isoliert und die KSRP-mRNA-Menge (A) mittels qRT-PCR-Analysen bestimmt. Zusätzlich wurden Zellen zur Proteinbestimmung (B) in PLB aufgenommen

(A) Auswertung von 3 unabhängigen qRT-PCR-Analysen mit RNA aus C28-I/2-Zellen. Die Säulen (MW +/- SEM) repräsentieren relative KSRP-mRNA-Mengen in Bezug auf die mRNA-Menge in CO-behandelten C28-I/2-Zellen. (n.s. von CO-behandelten C28-I/2-Zellen)

(D) Repräsentativer Blot für drei unabhängige Western Blot Analysen mit monoklonalen Antikörpern zur KSRP- und β-Tubulin-Detektion. Eingesetzt wurden 40 µg Extrakte aus C28/I2-Zellen.

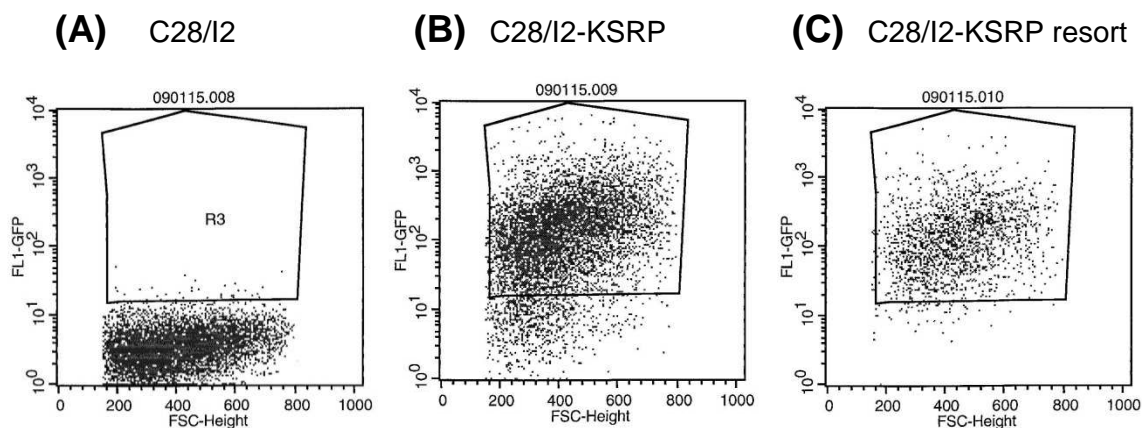
Die KSRP-mRNA-Expression war in CM-stimulierten C28/I2-Zellen im Vergleich zu Kontrollzellen nicht signifikant verändert (Abb.9.8 A).

Um dieses Ergebnis auf Proteinebene zu bestätigen, wurden C28/I2-Zellen wie oben beschrieben mit CM und CO behandelt und in PLB aufgenommen. Anschließend wurden Western Blot Experimente mit monoklonalen Antikörpern zur Darstellung der KSRP- und  $\beta$ -Tubulin-Expression durchgeführt (8.2.5).

Abbildung 9.8. B zeigt, dass keine Änderung der KSRP-Expression in CM-behandelten C28/I2-Zellen im Vergleich zu Kontrollzellen detektierbar war.

Die Induktion mit Cytokinen führte im Zellkulturmodell der RA zu keiner veränderten KSRP-Expression. Um KSRP-abhängige Effekte genauer untersuchen zu können, sollten daher C28/I2-Zellen mit einer Überexpression von KSRP hergestellt werden.

Dazu wurden C28/I2-Zellen stabil mit dem Vektor pcDNA5KSRP transfiziert (8.1.6), der die KSRP-cDNA unter der Kontrolle des CMV-Promotors enthielt (C28/I2-KSRP). Zur Kontrolle wurden C28/I2-Zellen generiert, die den Leervektor pcDNA5GFP exprimieren (C28/I2-GFP). Da die transfizierten Vektoren für ein GFP-Gen kodierten, konnten sie mit Hilfe der Durchflusszytometrie (FACS) konzentriert werden (siehe 8.1.7).



**Abbildung 9.9: Beispiel für eine Analyse der C28/I2-KSRP-Zellen durch die Durchflusszytometrie (FACS)**

(A) Dargestellt ist eine Aufnahme der C28/I2-Wildtyp-Zellen nach Einstellung der Größe und Oberflächenbeschaffenheit. Der Auswahlbereich R3 wurde so festgelegt, dass alle Zellen, die innerhalb dieses Bereichs detektiert werden, ein GFP-spezifisches Fluoreszenzsignal zeigen.

(B) Dargestellt ist eine Aufnahme der C28/I2-KSRP-Zellen vor der Sortierung mit Hilfe des FACS.

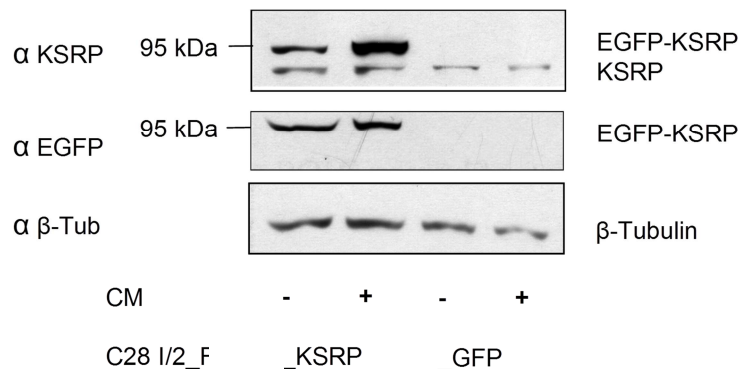
(C) Dargestellt ist eine Aufnahme der C28/I2-KSRP-Zellen nach der Sortierung mit Hilfe des FACS.

Abbildung 9.9 zeigt eine typische Aufnahme, die nach der FACS-Analyse erhalten wurde. Für die Einstellung der Zellgröße und Oberflächenbeschaffenheit wurden zuerst die Wildtyp-C28/I2-Zellen im FACS analysiert (9.9 A). Anschließend wurden die C28/I2-KSRP-Zellen untersucht, die ein deutliches Fluoreszenzsignal zeigten und somit verschoben im Auswahlbereich R3 angezeigt wurden (9.9 B). Die C28/I2-KSRP-Zellen waren zum Analysezeitpunkt nicht rein, da unterhalb von R3 ungefärbte Wildtyp-Zellen sichtbar waren. Nach dem Sortiervorgang, bei dem die Zellen innerhalb R3 in ein neues Gefäß sortiert

wurden, zeigte die erneute Analyse (resort) der C28/I2-KSRP-Zellen eine deutlich geringere Anzahl an Wildtyp-Zellen (9.9 C).

Zusätzlich wurde die KSRP-Überexpression durch Western Blot Analysen untersucht.

Dazu wurden superkonfluente C28/I2-KSRP-Zellen und C28/I2-GFP-Zellen wie oben beschrieben mit CO und CM behandelt. Die Zellen wurden in PLB lysiert und ein Western Blot mit monoklonalen Antikörpern zur KSRP-, GFP- und  $\beta$ -Tubulin-Detektion durchgeführt (8.2.5). Da es sich bei dem überexprimierten KSRP um ein GFP-Fusionsprotein handelte, wurden Signale durch den Einsatz des GFP- und KSRP-Antikörpers bei einer Masse von 99 kDa in C28/I2-KSRP-Zellen detektiert (Abb. 9.10). Dies entspricht der Masse von KSRP (73 kDa) und GFP (26 kDa) in der Summe. Die Expression des GFP-KSRP-Fusionproteins war in CM-induzierten im Vergleich zu CO-behandelten C28/I2-KSRP-Zellen deutlich erhöht. Zusätzlich konnte das endogen exprimierte KSRP bei 73 kDa nachgewiesen werden, das in C28/I2-KSRP-Zellen im Vergleich zu C28/I2-GFP-Zellen vermehrt exprimiert wurde.



#### Abbildung 9.10: Analyse der KSRP-Proteinexpression in stabil mit pcDNA5EGFP oder pcDNA5KSRP transfizierten C28-I/2 -Zellen

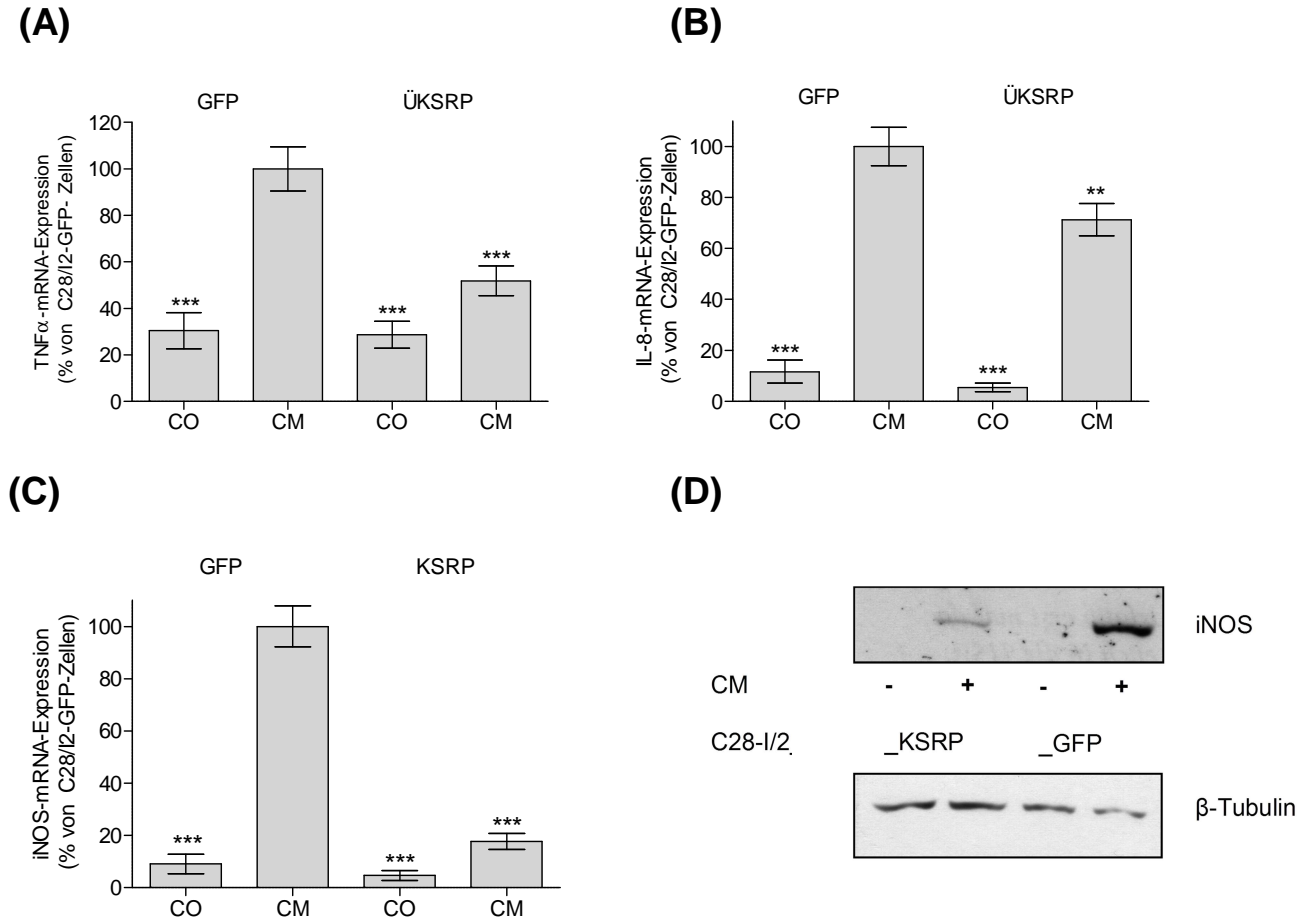
Superkonfluente C28-I/2-KSRP- und C28-I/2-GFP-Zellen wurden für sechs Stunden mit Cytokinen (CM) stimuliert. Zusätzlich wurden Zellen in serumfreiem Medium inkubiert (CO). Schließlich wurden Zellen zur Proteinanalyse mit PLB lysiert.

Dargestellt ist ein repräsentativer Blot für drei unabhängige Western Blot Experimente mit monoklonalen Antikörpern zur Untersuchung der KSRP-, GFP- und  $\beta$ -Tubulin-Expression. Eingesetzt wurden 40  $\mu$ g Extrakte aus C28-I/2-KSRP- und C28-I/2-GFP-Zellen.

Im nächsten Schritt sollten bekannte KSRP-abhängige Effekte auf die mRNA der iNOS, TNF- $\alpha$  und IL-8 im Modell der C28/I2-Chondrozyten mit einer KSRP-Überexpression analysiert werden.

Dazu wurden superkonfluente C28/I2-KSRP- (ÜKSRP) und C28/I2-GFP-Zellen (GFP) 16 Stunden vor der Behandlung mit Cytokinen (CM) mit serumfreiem Medium inkubiert. Schließlich wurden sie für zwei Stunden (TNF- $\alpha$ ) oder sechs Stunden (iNOS, IL-8) mit CM stimuliert (8.1.4). Zur Kontrolle der Induktion wurden Zellen in serumfreiem Medium inkubiert

(CO). Die Zellen wurden lysiert, die RNA isoliert (8.3.1) und qRT-PCR-Experimente (8.3.7) durchgeführt. Zur Auswertung wurden die CM-induzierten C28/I2-GFP-Zellen auf 100 % gesetzt.



**Abbildung 9.11: Analyse der TNF-α-, IL-8 und iNOS-Expression in KSRP-überexprimierenden C28-I/2-KSRP-Zellen**

Superkonfluente C28-I/2-KSRP- und C28-I/2-GFP-Zellen wurden für zwei (TNF-α), sechs (IL-8, iNOS) und 8 (iNOS-Protein) Stunden mit Cytokinen (CM) stimuliert. Zusätzlich wurden Zellen in serumfreien Medium inkubiert (CO). Schließlich wurde die RNA isoliert und die TNF-α-mRNA-Menge (A), die IL-8-mRNA-Menge (B) und die iNOS-mRNA-Menge (C) mittels qRT-PCR-Analysen bestimmt. Zusätzlich wurden Zellen zur iNOS-Proteinbestimmung (D) in PLB aufgenommen.

(A-C) Auswertung von 3 unabhängigen qRT-PCR-Analysen mit RNA aus C28-I/2-KSRP- und C28-I/2-GFP-Zellen. Die Säulen (MW +/- SEM) repräsentieren relative mRNA-Mengen in Bezug auf die mRNA-Menge in CM-stimulierten C28-I/2-GFP-Zellen. (\*\*\*:p<0,001; \*\*:p<0,01 vs. CM-behandelter C28-I/2-GFP-Zellen)

(D) Repräsentativer Blot für zwei unabhängige Western Blot Experimente mit monoklonalen Antikörpern zur iNOS- und β-Tubulin-Analyse. Eingesetzt wurden 40 µg Extrakte aus C28-I/2-KSRP- und C28-I/2-GFP-Zellen

Abb. 9.11 A zeigt eine vierfach erhöhte TNF-α-mRNA-Expression nach zweistündiger CM-Stimulation in C28/I2-GFP-Zellen. Dieser Effekt war in KSRPÜ-Zellen signifikant auf 50 %

reduziert. Die 10-fach CM-induzierte IL-8-mRNA-Expression in GFP-Zellen konnte durch eine Überexpression von KSRP auf 70 % reduziert werden (Abb. 9.11 B).

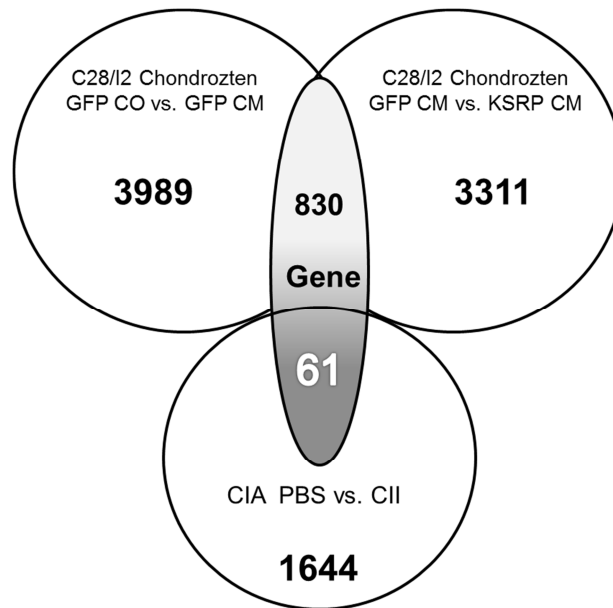
Die iNOS-mRNA-Menge war durch die Behandlung mit CM in C28/I2-GFP-Zellen 10-fach induziert. In C28/I2-KSRP-Zellen verringerte sich diese Expression signifikant auf 20 % (Abb. 9.11 C). Um den Effekt auf die iNOS durch eine Proteinanalyse zu bestätigen, wurden C28/I2-KSRP- und C28/I2-GFP-Zellen für 8 Stunden mit CM inkubiert. Proteinlysate wurden in Western Blot Experimenten mit monoklonalen Antikörpern zur Detektion der iNOS- und  $\beta$ -Tubulin-Expression analysiert (8.2.5). Abbildung 9.11 D zeigt eine CM-abhängige Induktion der iNOS-Expression in C28/I2-GFP-Zellen, die im Vergleich zu der iNOS-Menge in C28/I2-KSRP-Zellen deutlich erhöht war. In CO-behandelten Zellen war die iNOS nicht detektierbar. Die Überexpression von KSRP in humanen C28/I2-Chondrozyten führte somit zu einer deutlichen Reduktion der Expression von TNF- $\alpha$ , IL-8 und der iNOS. Es konnte somit ein *in situ*-Modell der rheumatoiden Arthritis etabliert werden, dass die molekulare Analyse KSRP-abhängiger Effekte in entzündlichen Erkrankungen ermöglicht.

#### **9.1.4 Der Vergleich der durchgeführten DNA-Microarray-Analysen im Modell der CIA und der KSRP-überexprimierenden Chondrozyten zeigt eine signifikante Regulation von 61 Genen in beiden Modellen**

Im nächsten Schritt sollten die Ergebnisse aus dem *in vivo*-Modell der Collagen-induzierten Arthritis mit den Ergebnissen des *in situ*-Modells der KSRP überexprimierenden C28/I2-Chondrozyten kombiniert werden. Ziel dieses Vergleichs war die Aufklärung möglicher KSRP-Zielgene, die in der Pathogenese der rheumatoiden Arthritis (RA) eine zentrale Rolle spielen und durch eine erhöhte Expression von KSRP im Verlauf der CIA (9.1.2) reguliert werden. Die komplexe Pathogenese der RA erfordert die Analyse der Expression einer Vielzahl von Genen, so dass die DNA-Microarray-Technik (8.3.8) für beide Modelle angewendet wurde.

C28/I2-GFP-Zellen und C28/I2-KSRP-Zellen wurden 16 Stunden vor einer Behandlung mit Cytokinen (CM) in serumfreien Medium inkubiert. Anschließend wurden sie für sechs Stunden mit CM induziert (8.1.4). Zur Kontrolle wurden Zellen mit serumfreiem Medium (CO) inkubiert. Die Zellen wurden lysiert und die RNA, wie unter 8.3.8 beschrieben, über Säulen isoliert. In der reversen Transkription wurde die generierte cDNA mit Fluoreszenzfarbstoffen markiert und mit humanen Genchips hybridisiert (8.3.8). Jeder Chip ist mit 32.050 Oligonukleotiden (ON) markiert, die sich aus 30.968 ON für die Detektion humaner Gene und 1082 ON zur Kontrolle zusammensetzen. Nach Einscannen der Microarray-Chips wurden die erhaltenen Daten ausgewertet.

█ hatte im Rahmen ihrer Doktorarbeit in der AG Kleinert mit Hilfe der Microarray-Technik die Expression von 25.000 Genen in Pfoten CII-immunisierter Mäuse im Vergleich zu PBS-behandelter Mäuse untersucht<sup>2</sup>. Die dabei erhaltenen Ergebnisse wurden für den Vergleich der beschriebenen RA-Modelle im Rahmen dieser Arbeit verwendet. In Abbildung 9.12 sind ein Schema der Auswertung der durchgeführten Microarrays und die Kombination der Ergebnisse dargestellt.



**Abbildung 9.12: Schematische Darstellung der Anzahl signifikant regulierter Gene in verschiedenen Modellen der rheumatoiden Arthritis**

C28/I2-GFP-Zellen und C28/I2-KSRP-Zellen wurden mit Cytokinen (CM) für sechs Stunden behandelt. Zur Kontrolle wurden Zellen nur in serumfreiem Medium inkubiert (CO). Die Zellen wurden schließlich mit GIT lysiert und die RNA isoliert.

TCR-β-TG-Mäuse wurden mit 200 µg Collagen Typ II (CII) in Freund'schem Adjuvanz (CFA) immunisiert. Nach 11 und 21 Tagen erhielten die Mäuse eine Boost-Injektion von 100 µg CII in CFA. 33 Tage nach der ersten Immunisierung wurden die Mäuse zur Gewebeentnahme getötet und die RNA aus den Pfoten isoliert.

Die RNA der C28/I2-Zellen und der Pfoten behandelter CIA-Mäuse wurden mit Hilfe der DNA-Microarray-Technik analysiert. Dargestellt ist die Anzahl signifikant regulierter Gene

- in CO-behandelten C28/I2-GFP-Zellen im Vergleich zu CM-behandelten C28/I2-GFP-Zellen (GFP CO vs. GFP CM)
- in CM-behandelten C28/I2-GFP-Zellen im Vergleich zu CM-behandelten C28/I2-KSRP-Zellen (GFP CM vs. KSRP CM)
- und in PBS-behandelten Mäusen im Vergleich zu CII-immunisierter Mäuse (PBS vs. CII)

Weiterhin zeigt die Überschneidung der einzeln durchgeführten Microarrays übereinstimmende signifikant regulierte Gene.

<sup>2</sup> <http://ubm.opus.hbz-nrw.de/volltexte/2010/2195/pdf/doc.pdf>

Es wurden drei unterschiedliche Analysen durchgeführt. Zuerst wurden die Auswirkungen einer Induktion durch Cytokine (CM) in Chondrozyten durch den Vergleich von CO-behandelten C28/I2-GFP-Zellen und CM-induzierten C28/I2-GFP-Zellen analysiert. Diese Untersuchung zeigte eine signifikante Regulation von 3989 Genen. In einem weiteren Microarray-Experiment wurde nun der Einfluss der KSRP-Überexpression in CM-behandelten Zellen durch die Gegenüberstellung von jeweils CM-stimulierten C28/I2-GFP-Zellen und C28/I2-KSRP-Zellen analysiert. Nach Auswertung der Daten konnte eine signifikante Modulation 3311 Gene nachgewiesen werden. Vergleicht man nun die Ergebnisse der beiden Analysen, so können 830 Gene identifiziert werden, die in C28/I2-GFP-Zellen durch eine CM-Stimulation reguliert und durch eine KSRP-Überexpression signifikant in ihrer Expression verändert wurden.

Unter Einbeziehung der Ergebnisse des Microarrays CII-immunisierter Mäuse gegenüber PBS-behandelter Mäuse, der die signifikante Regulation 1644 Gene zeigte, konnten 61 Gene identifiziert werden.

Diese 61 Gene wurden sowohl im KSRP-spezifischen humanen *in situ*-Modell der C28/I2-Chondrozyten (C28 KSRP) als auch im murinen *in vivo*-Modell der CIA signifikant reguliert. Dabei konnten 35 Gene, deren Expression im CIA-Modell induziert und im C28 KSRP Modell reduziert war, identifiziert werden. Eine positive Regulation durch beide Modelle war bei 15 Genen nachweisbar. 7 Gene wurden durch eine KSRP-Überexpression in Chondrozyten erhöht und durch CIA verringert. Vier Gene wurden durch beide Modelle in ihrer Expression signifikant reduziert (siehe Anhang, Kapitel 12).

Eine Auswahl dieser 61 Gene mit der Änderung der Expression des entsprechenden Gens im C28 KSRP- und CIA-Modell sowie dessen Symbol und Gen-Name ist in Tabelle 9.1 dargestellt. Eine Reduktion des Gens wurde in grüner Farbe und die Induktion des Gens in roter Farbe dargestellt. Zusätzlich wurde unter Verwendung der *ARE Database* und dem *ARE Organism Search Engine* die Präsenz von AU-reichen Elementen untersucht.

X-FACHE ÄNDERUNG C28 KSRP	X-FACHE ÄNDERUNG CIA	SYMBOL	GEN-NAME	ENTREZ-ID HUMAN	ID MURIN	ARE <sup>3</sup>
-13,152	3,383	SPARC	secreted protein, acidic, cysteine- rich (osteonectin)	6678	ENSMUSG 00000018593	AAAUAUUU AUGAU
-6,674	4,029	PLA2G2D	phospholipase A2, group IID	26279	ENSMUSG 00000041202	-

<sup>3</sup> <http://brp.kfshrc.edu.sa/ARED/>



X-FACHE ÄNDERUNG C28 KSRP	X-FACHE ÄNDERUNG CIA	SYMBOL	GEN-NAME	ENTREZ-ID HUMAN	ID MURIN	ARE <sup>3</sup>
-4,197	10,645	MMP3	matrix metallo- peptidase 3 (stromelysin 1, progelatinase)	4314	ENSMUSG 00000043613	UUUUUUUU AAUAA
-4,139	3,661	MMP2	matrix metallo- peptidase 2 (gelatinase A, 72kDa gelatinase, 72kDa type IV collagenase)	4313	ENSMUSG 00000031740	-
-3,389	2,636	IL18R1	Interleukin 18 receptor accessory protein	8809	ENSMUSG 00000026070	-
-2,694	18,694	GZMA	granzyme A (granzyme 1, cytotoxic T- lymphocyte- associated serine esterase 3)	3001	ENSMUSG 00000023132	-
-2,288	5,868	TNMD	tenomodulin	64102	ENSMUSG 00000031250	-
-2,25	3,49	HPSE	heparanase	10855	ENSMUSG 00000035273	UUUUUUUU UUUUUUUU UUUUU

**Tabelle 9.1: Auswahl aus 61 Genen, die sowohl im humanen Modell als auch im murinen Modell der rheumatoiden Arthritis signifikant reguliert waren**

*Es wurden Microarray-Analysen mit RNA von CO- und CM-behandelten C28/I2-GFP Zellen durchgeführt und ausgewertet. Die Analyse wurde mit dem Ergebnis der Microarray-Analyse CM-behandelter C28/I2-GFP-Zellen und CM-behandelter C28/I2-KSRP-Zellen verglichen. Die Gene, die in beiden Microarray-Analysen signifikant reguliert waren (C28 KSRP), wurden schließlich der Auswertung der Microarray-Analyse von PBS-behandelten Mäusen und CII-immunisierten Mäusen gegenübergestellt (CIA). Dargestellt ist eine Auswahl aus 60 signifikant regulierter Gene, die Regulation (Reduktion oder Induktion) im Modell C28 KSRP und CIA (grün: Reduktion des Gens im untersuchten Modell; rot: Induktion des Gens im untersuchten Modell) sowie die Präsenz von AU-reichen Elementen*

In den durchgeführten Analysen konnten 61 mögliche Zielgene von KSRP in der Pathogenese der rheumatoiden Arthritis identifiziert werden. Dies unterstreicht die zentrale

Bedeutung des mRNA-bindenden Proteins KSRP und damit die Relevanz post-transkriptioneller Regulationsmechanismen bei der Modulation pro-inflammatorischer Gene.

## **9.2 Die Analyse der transkriptionellen und post-transkriptionellen Regulation der KSRP Expression**

Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine Regulation von KSRP in Collagen-induzierten Mäusen, die Arthritis-Symptomatik zeigten, nachgewiesen. Frühere Studien haben eine meist post-translationale Regulation von KSRP beschrieben (Briata, Forcales et al. 2005). Über die transkriptionelle und post-transkriptionelle Regulation der KSRP-Expression ist bisher noch wenig bekannt. Mögliche Mechanismen dieser Regulation von KSRP sollten nun weiter untersucht werden.

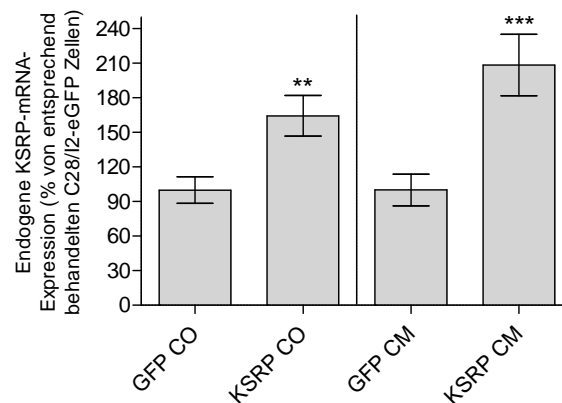
### **9.2.1 C28/I2-KSRP-Chondrozyten zeigen eine erhöhte endogene KSRP-Expression**

Während der Generierung der C28/I2-KSRP-Zellen (siehe 9.1.3) wurden zur Überprüfung der Expression des GFP-KSRP-Fusionsproteins Western Blot Experimente durchgeführt. Abbildung 9.10 zeigte eine deutlich erhöhte endogene KSRP-Expression in C28/I2-KSRP-Zellen im Vergleich zu C28/I2-GFP-Zellen.

Um diese KSRP-abhängige Erhöhung der endogenen KSRP-Expression auf mRNA-Ebene zu bestätigen, wurden C28/I2-KSRP-Zellen und die Kontrollzellen C28/I2-GFP mit Cytokinen (CM) behandelt (8.1.4). Zur Kontrolle wurden Zellen in serumfreiem Medium (CO) inkubiert. Die Zellen wurden in GIT zur RNA-Isolation lysiert (8.3.2). Anschließend wurden qRT-PCR-Analysen mit Oligonukleotiden und einer Sonde, die spezifisch die KSRP-3'UTR detektieren (8.3.6), durchgeführt. Das transfizierte GFP-KSRP-Transkript hat keine 3'UTR, so dass nur die endogen exprimierte KSRP-mRNA nachgewiesen werden konnte. Zur Auswertung wurden die entsprechend behandelten C28/I2-GFP-Zellen auf 100 % gesetzt.

Abbildung 9.13 zeigt eine erhöhte KSRP-3'-UTR-Expression in CO-behandelten C28/I2-KSRP-Zellen im Vergleich zu C28/I2-GFP-Zellen. Dieser Effekt konnte auch in CM-behandelten Zellen nachgewiesen werden.

Die Ergebnisse zeigen, dass eine Überexpression von KSRP zu einer erhöhten endogenen KSRP-Expression auf Protein- und mRNA-Ebene führte.



**Abbildung 9.13: Analyse der endogenen KSRP-mRNA-Expression in stabil transfizierten C28/I2-Zellen**

C28/I2-GFP-KSRP- und C28/I2-GFP-Zellen wurden ausgesät und mit Cytokinen (CM) induziert. Zusätzlich wurden Zellen in serumfreien Medium inkubiert (CO). Nach sechs Stunden wurden die Zellen mit GIT-Puffer zur RNA-Isolation lysiert.

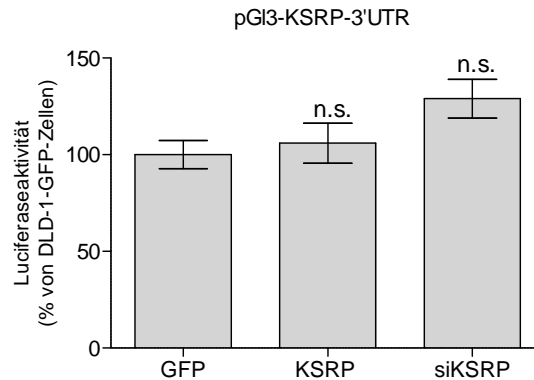
Auswertung von 3 unabhängigen qRT-PCR-Analysen mit spezifischen Oligonukleotiden und Sonde zur Analyse der KSRP-3'-UTR-Expression. Die Säulen (MW +/- SEM) repräsentieren relative KSRP-3'-UTR-mRNA-Mengen in Bezug auf die 3'-UTR-mRNA-Menge in entsprechend behandelten C28/I2-GFP-Zellen (\*\*\*:  $p < 0,001$ ; \*\*:  $p < 0,01$  vs C28/I2-GFP-Zellen)

## 9.2.2 Eine KSRP-Überexpression hat keinen direkten Einfluss auf die KSRP-3'-UTR

Um zu untersuchen, ob KSRP seine eigene Expression über die Interaktion mit der KSRP-3'-UTR moduliert, wurden Reporteragen-Analysen mit pGI3-KSRP-3'-UTR durchgeführt. Superkonfluente C28/I2-Zellen sind für Transfektionsexperimente ungeeignet, daher wurden im Folgenden humane DLD-1-Zellen verwendet.

DLD-1-Zellen wurden ausgesät und 24 Stunden später mit pGI3-KSRP-3'-UTR und den entsprechenden Expressionsvektoren pcDNA5KSRP (KSRP), psiRNAsiKSRPchen (siKSRP) und zur Kontrolle pcDNA5GFP (GFP) transfiziert (8.1.6). Zur Ermittlung der Transfektionseffizienz wurde der pRLEF1 $\alpha$  cotransfiziert. 30 Stunden nach der Transfektion wurden die Zellen in serumfreien Medium inkubiert und schließlich zur Messung der Luciferase- und Renilla-Aktivität in PLB lysiert (8.3.12). Zur Auswertung wurden die normierten Luciferaseaktivitäten der pcDNA5GFP-transfizierten Zellen auf 100 % gesetzt.

Weder eine KSRP-Überexpression (KSRP) noch eine KSRP-Depletion durch die Verwendung einer KSRP-spezifischen siRNA (siKSRP) zeigten einen signifikanten Unterschied im Vergleich zu DLD-1-GFP-Zellen (GFP) (Abb.9.14).



**Abbildung 9.14: Analyse der Effekte von KSRP auf die Luciferase-Expression in pGI3-KSRP-3'-UTR transfizierten DLD-1-Zellen**

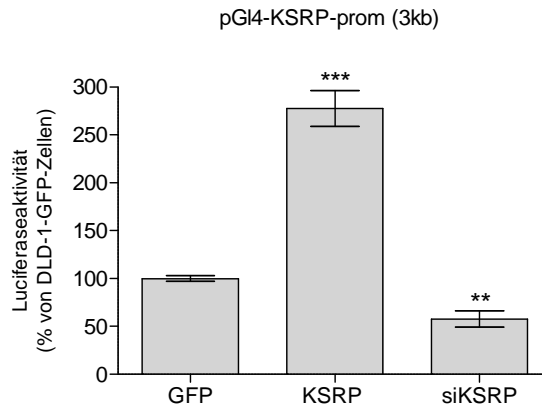
DLD-1-Zellen wurden mit pGI3-KSRP-3'-UTR und den jeweiligen Expressionskonstrukten pcDNA5-GFP (GFP), pcDNA5-KSRP (KSRP) und psiRNAsiKSRPchen (siKSRP) cotransfiziert. Zur Ermittlung der Transfektionseffizienz wurden die Zellen zusätzlich mit pRLEF1 $\alpha$  transfiziert. Nach 24 Stunden wurde ein Mediumwechsel auf serumfreies Medium durchgeführt und nach weiteren 24 Stunden mit PLB lysiert. Anschließend wurden die Luciferase- und Renillaaktivitäten gemessen. Die Luciferase-Aktivität wurde auf die jeweilige Renilla-Aktivität normiert.

Dargestellt ist die Zusammenfassung aus 3 unabhängigen Luciferase-Aktivitätsmessungen. Die Säulen (MW  $\pm$  SEM) repräsentieren die relativen Luciferaseaktivitäten bezogen auf die Luciferaseaktivität in DLD-1-GFP-Zellen (n.s. von DLD-1-GFP-Zellen)

Die Ergebnisse weisen darauf hin, dass KSRP nicht über die Interaktion mit der KSRP-3'-UTR seine eigene Expression positiv reguliert.

### 9.2.3 Die Überexpression von KSRP führt zu einer Stimulation des KSRP-Promotors (3kb)

Im Folgenden sollte eine mögliche KSRP-abhängige Modulation des KSRP-Promotors in DLD-1-Zellen untersucht werden. Dazu wurden DLD-1-Zellen ausgesät und 24 Stunden später mit pGI4-KSRP-prom (3kb) und den entsprechenden Expressionsvektoren pcDNA5KSRP (KSRP), psiRNAsiKSRPchen (siKSRP) und zur Kontrolle pcDNA5GFP (GFP) transfiziert (8.1.6). Zur Ermittlung der Transfektionseffizienz wurde der pRLEF1 $\alpha$  cotransfiziert. 30 Stunden nach der Transfektion wurden die Zellen in serumfreiem Medium inkubiert und schließlich zur Messung der Luciferase- und Renilla-Aktivität in PLB lysiert (8.3.12). Zur Auswertung wurden die normierten Luciferaseaktivitäten der pcDNA5GFP-transfizierten Zellen auf 100 % gesetzt. Abbildung 9.15 zeigt eine deutliche 2,7-fache Erhöhung der Luciferaseaktivität unter dem Einfluss des KSRP-Promotors in KSRP-überexprimierenden Zellen im Vergleich zu GFP-Zellen. Die Behandlung der DLD-1-Zellen mit der KSRP-spezifischen siRNA führte dagegen zu einer Verringerung der Luciferaseaktivität.



**Abbildung 9.15: Analyse der Effekte von KSRP auf die Luciferaseaktivität in mit pGI4-KSRP-prom transfizierten DLD-1-Zellen**

DLD-1-Zellen wurden mit pGI4-KSRP-prom (3kb) und den jeweiligen Expressionskonstrukten pcDNA5-GFP (GFP), pcDNA5-KSRP (KSRP) und psiRNAsiKSRPchen (siKSRP) cotransfiziert. Zur Ermittlung der Transfektionseffizienz wurden die Zellen zusätzlich mit pRLEF1 $\alpha$  transfiziert. Nach 24 Stunden wurde ein Mediumwechsel auf serumfreies Medium durchgeführt und nach weiteren 24 Stunden mit PLB lysiert. Anschließend wurden die Luciferase- und Renillaaktivitäten bestimmt. Die Luciferase-Aktivität wurde auf die jeweilige Renilla-Aktivität normiert.

Dargestellt ist die Zusammenfassung aus 3 unabhängigen Luciferase-Aktivitätsmessungen. Die Säulen (MW  $\pm$  SEM) repräsentieren die relativen Luciferaseaktivitäten bezogen auf die Luciferaseaktivität in DLD-1-GFP-Zellen (\*\*\*:  $p < 0,001$ ; \*\*:  $p < 0,01$  vs DLD-1-GFP-Zellen)

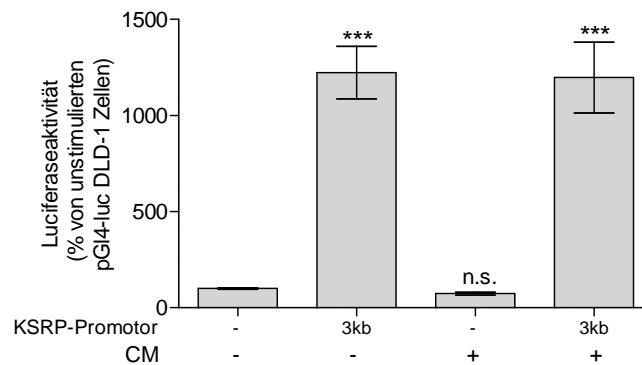
Dieses Ergebnis zeigt eine KSRP-abhängige Induktion der Luciferase unter der Kontrolle des KSRP-Promotors (3kb).

#### 9.2.4 Die FUSE-analoge Sequenz ist für die Regulation des KSRP-Promotors von Bedeutung

Für die Regulation der KSRP-Expression scheint die Modulation des Promotors von entscheidender Bedeutung zu sein. Daher sollte dieser genauer untersucht werden. Zuerst wurde der Einfluss einer Cytokinstimulation auf den KSRP-Promotor analysiert.

Dazu wurden DLD-1-Zellen mit pGI4-KSRP-prom (3kb) und dem Leervektor pGI4-luc transfiziert. Zur Normierung der Transfektion wurde der pRLEF1 $\alpha$  cotransfiziert (8.1.6). Nach 30 Stunden wurde ein Mediumwechsel auf serumfreies Medium durchgeführt und 16 Stunden später wurden die Zellen mit Cytokinen (CM) stimuliert (8.1.4). Zusätzlich wurden die Zellen in serumfreiem Medium inkubiert (CO). Nach sechs Stunden wurden die Zellen in PLB lysiert und Luciferase- und Renilla-Aktivitätsmessungen durchgeführt. Zur Auswertung wurden CO-behandelte pGI4-luc-Zellen als 100% gesetzt. Abbildung 9.16 zeigt eine 12-fache Erhöhung der Luciferaseaktivität unter der Kontrolle eines KSRP-Promotors (3kb) im Vergleich zu DLD-1-Zellen, die mit dem Leervektor transfiziert wurden. Nach Behandlung mit

CM war diese Erhöhung der Aktivität unverändert. Somit wurde das verwendete KSRP-Promotor-Fragment (3kb) durch die verwendeten Cytokine nicht moduliert.



**Abbildung 9.16: Analyse der Effekte einer Cytokin-Behandlung auf die Aktivität des 3kb-KSRP-Promotorfragments**

DLD-1-Zellen wurden transient mit den Konstrukten pGI4-KSRP-prom (3kb) und zur Kontrolle pGI4-luc transfiziert. Zusätzlich wurde pRL-EF1 $\alpha$  (Renilla-Luciferase) zur Normierung der Ergebnisse cotransfiziert. 30 Stunden nach der Transfektion der Zellen erfolgte ein Wechsel auf serumfreies Medium und nach weiteren 16 Stunden wurden die Zellen mit Cytokinen (CM) stimuliert oder in serumfreiem Medium inkubiert. Anschließend wurden die Zellen in PLB lysiert und die Luciferase- und die Renilla-Aktivität bestimmt. Die Luciferase-Aktivität wurde auf die jeweilige Renilla-Aktivität normiert.

Dargestellt ist die Zusammenfassung aus 5 unabhängigen Luciferase-Aktivitätsmessungen mit jeweils 3-6 Replikaten pro Gruppe. Die Säulen (MW  $\pm$  SEM) repräsentieren die relative Luciferaseaktivität in Bezug auf die Luciferaseaktivität von unstimulierten, pGI4-luc-transfizierten DLD-1-Zellen. (\*\*\*:  $p < 0,001$ ; n.s.: nicht signifikant verschieden vs unstimulierten, pGI4-luc-transfizierten DLD-1-Zellen)

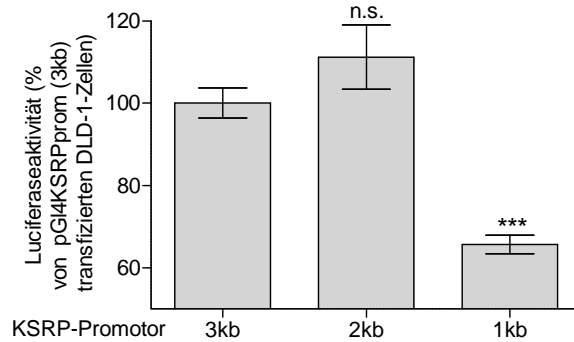
Da der KSRP-Promotor mit einer Größe von 3kb nicht CM-abhängig reguliert wurde, wurden die folgenden Analysen in unbehandelten DLD-1-Zellen durchgeführt.

Um zu untersuchen, in welchem Abschnitt des KSRP-Promotors bedeutende regulatorische Sequenzen liegen, wurde ein 2kb- und 1kb-KSRP-Promotorfragment hergestellt (8.3.11) und durch Luciferaseaktivitätsmessungen analysiert.

DLD-1-Zellen wurden mit pGI4-KSRP-prom (3kb), pGI4-KSRP-prom (2kb) und pGI4-KSRP-prom (1kb) transient transfiziert (8.1.6). Nach 30 Stunden erfolgte ein Mediumwechsel auf serumfreies Medium. Nach weiteren 18 Stunden wurden die DLD-1-Zellen mit PLB lysiert und Luciferase- und Renilla-Aktivitäten gemessen (8.3.12). Zur Auswertung wurden pGI4-KSRP-prom transfizierte DLD-1-Zellen als 100% gesetzt.

In DLD-1-Zellen, die mit dem 2kb-KSRP-Promotor-Konstrukt transfiziert wurden, war kein signifikanter Unterschied der Luciferaseaktivität im Vergleich zu 3kb-Zellen festzustellen (Abb. 9.17). Dagegen führte die Expression der Luciferase unter der Kontrolle eines 1kb-KSRP-Promotors zu einer 60 % reduzierten Aktivität im Vergleich zu 3kb-Zellen.

Dieser Versuch zeigt, dass zwischen dem 2kb- und 1kb-KSRP-Promotor mögliche regulatorische Sequenzen liegen, die die Modulation des KSRP-Promotors beeinflussen.

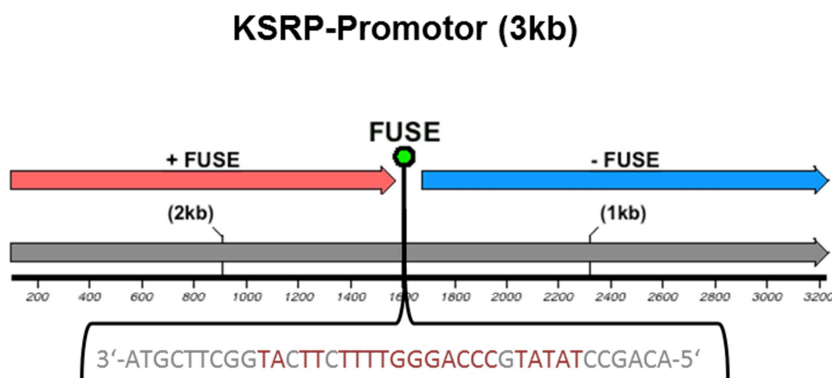


**Abbildung 9.17: Analyse der Effekte von Deletionen auf die Aktivität des KSRP-Promotors**

DLD-1-Zellen wurden transient mit den Konstrukten pGI4-KSRP-prom (3kb), pGI4-KSRP-prom (2kb) und pGI4-KSRP-prom (1kb) transfiziert. Zusätzlich wurde pRL-EF1α (Renilla-Luciferase) zur Normierung der Ergebnisse cotransfiziert. 30 Stunden nach der Transfektion der Zellen erfolgte ein Wechsel auf serumfreies Medium. Nach weiteren 24 Stunden wurden die Zellen in PLB lysiert und die Luciferase- und die Renilla-Aktivität bestimmt. Die Luciferase-Aktivität wurde auf die jeweilige Renilla-Aktivität normiert.

Dargestellt ist die Zusammenfassung aus 4 unabhängigen Luciferase-Aktivitätsmessungen mit jeweils 3-6 Replikaten pro Gruppe. Die Säulen (MW +/- SEM) repräsentieren die relative Luciferaseaktivität in Bezug auf die Luciferaseaktivität von pGI4-KSRP-prom (3kb) transfizierten DLD-1-Zellen. (\*\*\*:p<0,001; n.s.: nicht signifikant verschieden vs pGI4-KSRP-prom (3kb) transfizierten DLD-1-Zellen)

Levens beschrieb die Bindung von KSRP (hier als FBP-2 bezeichnet) an das positive cis-Element des c-myc-Promotors FUSE (*far upstream element*) (Davis-Smyth, Duncan et al. 1996). Da in 9.2.3 eine positive Regulation des KSRP-Promotors durch KSRP nachgewiesen wurde, sollte der KSRP-Promotor auf mögliche FUSE-Analogien untersucht werden.

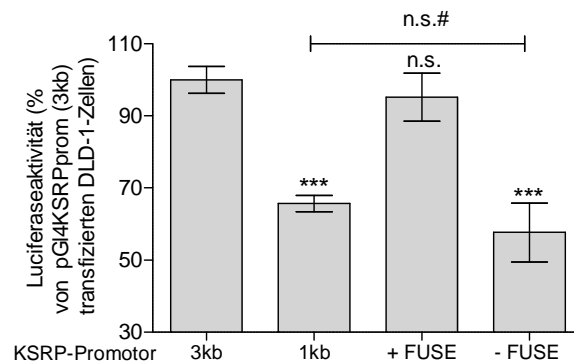


**Abbildung 9.18: Schema der zur KSRP-Promotor-Analyse verwendeten Konstrukte mit oder ohne FUSE-Element**

Dargestellt ist das pGI4-KSRP-prom (3kb) Konstrukt (grau) mit dem FUSE-analogen Element (grün). Die Konstrukte pGI4-KSRP-prom (+FUSE) (rosa) und pGI4-KSRP-prom (-FUSE) (blau) sind abgebildet. Weiterhin ist die Größe des pGI4-KSRP-prom (2kb) und – (1kb) eingezeichnet.

Es konnte ein FUSE-analoges Bindeelement identifiziert werden (Abb. 9.18), das im Bereich von 1,5 kb vor dem Transkriptionsstart des KSRP-Gens liegt. Um den Effekt dieses Motifs auf die Promotor-Regulation zu analysieren, wurde sowohl ein KSRP-Promotor-Fragment generiert, das das FUSE Element gerade noch beinhaltet (+FUSE) und ein Fragment, für das es gerade nicht mehr kodiert (-FUSE) (8.3.11). Diese KSRP-Promotor-Fragmente sollten schließlich in Reporteranalysen untersucht werden.

Es wurden DLD-1-Zellen mit den Konstrukten pGI4-KSRP-prom (3kb), pGI4-KSRP-prom (1kb), pGI4-KSRP-prom (+FUSE) und pGI4-KSRP-prom (-FUSE) transfiziert (8.1.6). Zur Kontrolle der Transfektionseffizienz wurde der pRLEF1 $\alpha$  cotransfiziert. Nach 30 Stunden wurde ein Mediumwechsel auf serumfreies Medium durchgeführt und schließlich mit PLB lysiert, um die Luciferase- und Renilla-Aktivitäten zu messen (8.3.12). Zur Auswertung wurden die Aktivitäten des pGI4-KSRP-prom (3kb) auf 100 % gesetzt.



**Abbildung 9.19: Analyse der Effekte der Deletion des FUSE-analogen Elements im KSRP-Promotor**

DLD-1-Zellen wurden transient mit den Konstrukten pGI4-KSRP-prom (3kb), pGI4-KSRP-prom (1kb), pGI4-KSRP-prom(+FUSE) und pGI4-KSRP-prom(-FUSE) transfiziert. Zusätzlich wurde pRL-EF1 $\alpha$  (Renilla-Luciferase) zur Normierung der Ergebnisse cotransfiziert. 30 Stunden nach der Transfektion der Zellen erfolgte ein Wechsel auf serumfreies Medium. Nach weiteren 24 Stunden wurden die Zellen in PLB lysiert und die Luciferase- und die Renilla-Aktivität bestimmt. Die Luciferase-Aktivität wurde auf die jeweilige Renilla-Aktivität normiert.

Dargestellt ist die Zusammenfassung aus 4 unabhängigen Luciferase-Aktivitätsmessungen mit jeweils 3-6 Replikaten pro Gruppe. Die Säulen (MW +/- SEM) repräsentieren die relative Luciferaseaktivität in Bezug auf die Luciferaseaktivität von pGI4-KSRP-prom (3kb) transfizierten DLD-1-Zellen. (\*\*\*) $p < 0,001$ ; n.s.: nicht signifikant verschieden vs pGI4-KSRP-prom (3kb) transfizierten DLD-1-Zellen; n.s.#: nicht signifikant verschieden von pGI4-KSRP-prom (1kb) DLD-1-Zellen)

Die Luciferaseaktivität unter der Kontrolle des 1kb-Fragments war signifikant im Vergleich zu dem 3-kb Fragment reduziert (Abb. 9.19). Das Ergebnis aus Abbildung 9.17 konnte damit bestätigt werden. Die Luciferaseaktivität unter der Kontrolle des +FUSE-Fragment war im Kontrast zu 3kb nicht verändert. Dagegen führte das Fehlen des FUSE-Elements im -FUSE-

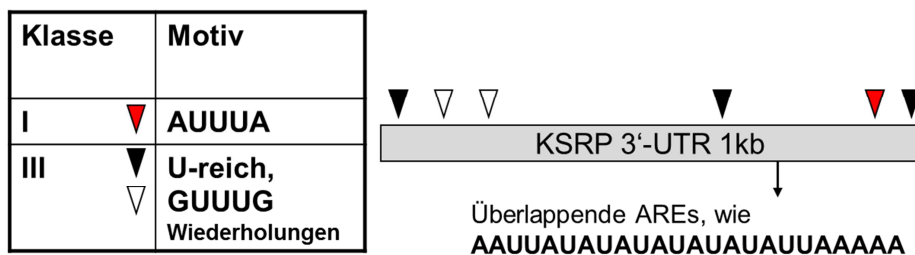


Fragment zu einer deutlichen Abnahme der Luciferaseaktivität auf 75 %. Diese Reduktion war nicht signifikant verschieden im Vergleich zu 1kb.

Somit konnte die FUSE-analoge Sequenz innerhalb des KSRP-Promotors als ein für die Regulation entscheidendes Motif identifiziert werden.

### 9.2.5 PABP, HuR und AUF-1 interagieren mit der KSRP-3'-UTR

Neben der Regulation des KSRP-Promotors sollte die Bedeutung der 3'-untranslatierten Region (3'-UTR) der KSRP-mRNA genauer untersucht werden. In früheren Studien konnte gezeigt werden, dass sich mRNA-bindende Proteine (mRNA-BP) gegenseitig durch die Interaktion mit AU-reichen Elementen (ARE) innerhalb der 3'-UTR regulieren (Pullmann, Kim et al. 2007). Die Sequenz der KSRP-3'-UTR zeigt ein ARE der Klasse I (AUUUA) und 5 ARE der Klasse III (Schematische Darstellung, Abb. 9.20). Aufgrund der Identifizierung dieser Sequenzen ist die Regulation der KSRP-Expression über post-transkriptionelle Mechanismen denkbar.



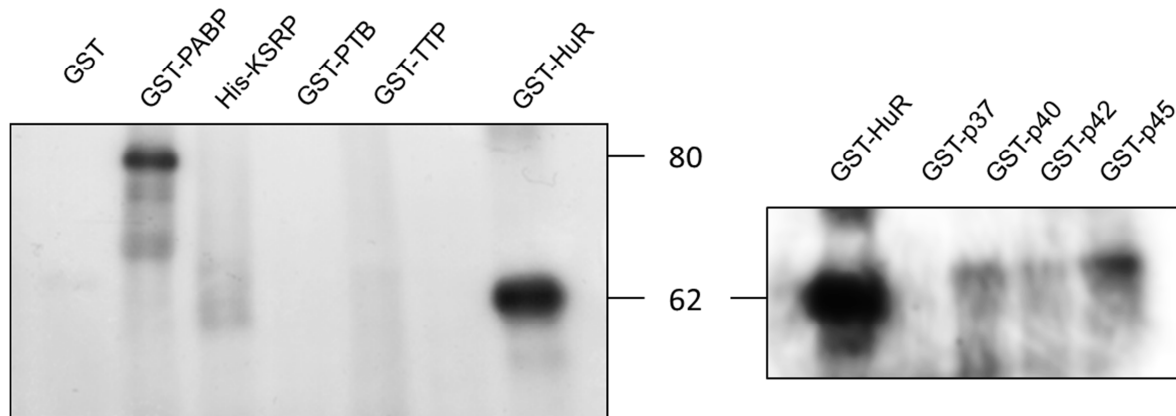
**Abbildung 9.20: Schematische Darstellung der KSRP 3'-UTR**

Abgebildet ist die KSRP 3'-UTR mit den darin enthaltenen AU-reichen Elementen (ARE). Die Tabelle zeigt eine Erklärung der ARE-Klassen I und III.

Zur Aufklärung dieser Fragestellung wurden UV-Crosslink-Experimente durchgeführt, um mögliche Interaktionspartner der KSRP-3'-UTR zu identifizieren. Der Vektor pCR-KSRP-3'-UTR wurde mit *EcoRI* linearisiert und unter Verwendung radioaktiv markierter <sup>32</sup>P-UTP und der T7-RNA-Polymerase wie unter 8.3.9 beschrieben *in vitro* transkribiert. Anschließend wurden UV-Crosslink-Experimente mit den rekombinanten Fusionsproteinen GST-PABP, His-KSRP (8.2.7), GST-PTB, GST-TTP, GST-HuR und den AUF-1-Isoformen GST-p37, GST-p40, GST-p42, GST-p45 und der *in vitro* transkribierten, radioaktiv markierten KSRP-3'-UTR durchgeführt (8.3.10). Zur Kontrolle wurde der UV-Crosslink mit GST durchgeführt.

Abbildung 9.21 zeigt eine deutliche Interaktion der rekombinanten Fusionsproteine GST-PABP, GST-HuR und GST-p45. GST-p42 und GST-p40 zeigten eine geringe Interaktion mit

der *in vitro* transkribierten KSRP-3'-UTR. Bei den übrigen analysierten Fusionsproteinen konnte keine Interaktion mit der KSRP-3'-UTR-RNA detektiert werden.



<sup>32</sup>P-markierte, *in-vitro* transkribierte KSRP-3'UTR

#### Abbildung 9.21: Analyse der Bindung verschiedener RNA-BP an die 3'-UTR der KSRP-mRNA

Der linearisierte Vektor *pCR-KSRP-3'-UTR* wurde unter Verwendung <sup>32</sup>P-markierter UTPs und der T7-RNA-Polymerase *in vitro* transkribiert. Anschließend wurden UV-Crosslink-Analysen mit den rekombinaten Fusionsproteinen GST-PABP, His-KSRP, GST-PTB, GST-TTP, GST-HuR, GST-p37, GST-p40, GST-p42, GST-p45 und zur Kontrolle GST durchgeführt.

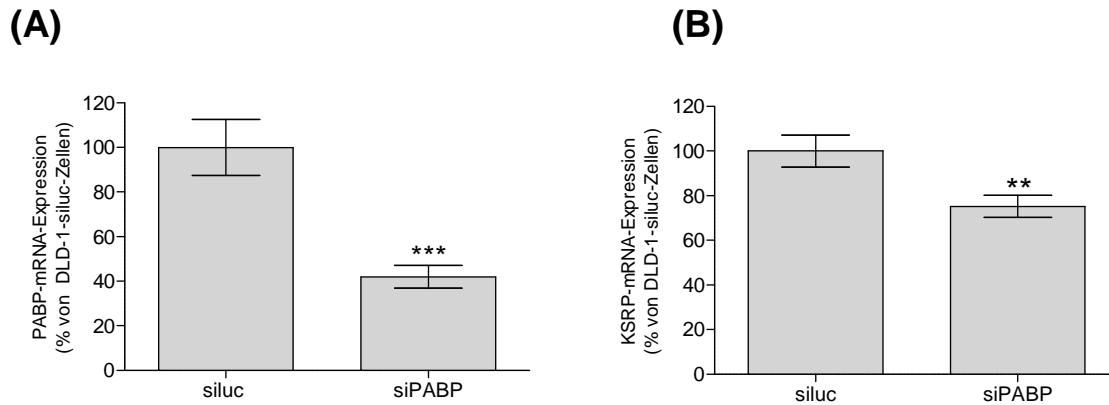
Dargestellt ist ein repräsentativer UV-Crosslink aus drei unabhängigen UV-Crosslink-Analysen.

### 9.2.6 PABP hat einen positiven Effekt auf die KSRP-mRNA-Stabilität

Das Poly-A-bindende Protein PABP nimmt eine multifunktionelle Rolle in der post-transkriptionellen Genregulation ein (Mangus, Evans et al. 2003). Weiterhin wurde bereits eine Interaktion mit AU-reichen Elementen nachgewiesen (Bollig, Winzen et al. 2003). Da eine Bindung von PABP an die KSRP-3'-UTR nachgewiesen wurde (9.2.5), sollte nun analysiert werden, ob diese Interaktion die KSRP-Expression beeinflusst.

Dazu wurden DLD-1-pTER-siluc- (siluc) und DLD-1-pTER-siPABP-Zellen (siPABP), die in unserer Arbeitsgruppe etabliert wurden (8.1.6), ausgesät und 24 Stunden später mit serumfreiem Medium versetzt. Weitere 18 Stunden später wurden die Zellen in GIT-Puffer zur RNA-Isolation (8.3.1) lysiert. Nach der reversen Transkription (8.3.5) wurden qRT-PCR-Experimente (8.3.7) durchgeführt. Zur Auswertung wurden DLD-1-pTER-siluc-Zellen auf 100 % gesetzt.

Abbildung 9.22 A zeigt eine auf 40 % verringerte PABP-mRNA-Menge in siPABP-Zellen im Vergleich zu siluc-Zellen. Somit wurde durch die verwendete PABP-spezifische siRNA eine reduzierte PABP-Expression erhalten. Die KSRP-mRNA-Expression war in siPABP-Zellen im Vergleich zu siluc-Zellen auf 70 % reduziert (Abb. 9.22 B)

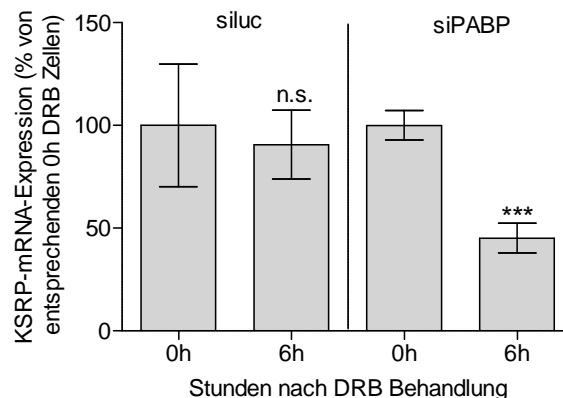


### Abbildung 9.22: Analyse der Effekte der siRNA-vermittelten Reduktion der PABP-Expression auf die KSRP-mRNA-Expression

*DLD1-pTER-siPABP-(siPABP) und DLD-1-pTER-siluc-Zellen (siluc) wurden ausgesät und nach 48 Stunden mit GIT-Puffer zur RNA-Isolation lysiert. Anschließend wurde die PABP-mRNA-Expression (A) und KSRP-mRNA-Expression (B) mittels qRT-PCR-Analyse bestimmt.*

*Auswertung von 3 unabhängigen qRT-PCR-Untersuchungen. Die Säulen (MW +/- SEM) repräsentieren relative mRNA-Mengen in Bezug auf die mRNA-Menge in DLD-1-siluc-Zellen (\*\*\*:  $p < 0,001$ ; \*\*:  $p < 0,01$  vs DLD-1-siluc-Zellen)*

Um zu untersuchen, ob PABP die KSRP-mRNA-Stabilität in DLD-1-Zellen reguliert, wurden 5, 6-Dichlor-1- $\beta$ -D-Ribofuranosylbenzimidazol (DRB)-Experimente, wie unter 8.1.5 beschrieben, durchgeführt.



### Abbildung 9.23: Analyse der KSRP-mRNA-Stabilität in siPABP-Zellen

*DLD-1-pTER-siPABP-(siPABP) und DLD-1-pTER-siluc-Zellen (siluc) wurden mit 25  $\mu$ g/ml DRB behandelt. Nach null (0h) und sechs (6h) Stunden wurde der Versuch zur RNA-Isolation beendet.*

*Gezeigt ist die Auswertung von 3 unabhängigen qRT-PCR-Analysen. Die Säulen (MW +/- SEM) repräsentieren relative KSRP-mRNA-Mengen in Bezug auf die KSRP-mRNA-Menge in entsprechenden DLD-1-Zellen nach 0h DRB-Behandlung (n.s. von DLD-1-siluc-Zellen (0h); \*\*\*:  $p < 0,001$  vs DLD-1-siPABP-Zellen (0h))*

Hierzu wurden DLD-1-pTER-siluc- (siluc) und DLD-1-pTER-siPABP-Zellen (siPABP) mit DRB zum Stoppen der Transkription in einer Menge von 25  $\mu$ g/ml Inkubationsmedium

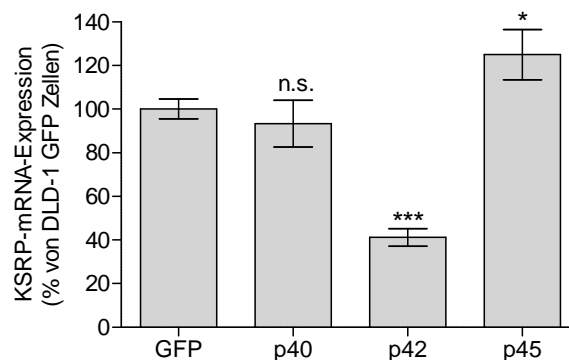
behandelt. Die Zellen wurden nach null und sechs Stunden nach DRB-Behandlung zur RNA-Isolation mit GIT-Puffer lysiert (8.3.1). Die KSRP-mRNA-Expression wurde mittels qRT-PCR-Analysen (8.3.7) bestimmt und zur Auswertung wurden die entsprechenden DLD-1-Zellen nach null Stunden DRB-Behandlung als 100 % gesetzt.

In siluc-Zellen war keine Verringerung der KSRP-mRNA nach sechs Stunden DRB-Behandlung nachweisbar (Abb. 9.23). Dagegen war die KSRP-mRNA-Expression in siPABP-Zellen nach sechs Stunden DRB-Inkubation signifikant reduziert.

Die Ergebnisse zeigen, dass die Bindung von PABP an die KSRP-3'-UTR die KSRP-mRNA-Stabilität erhöht und somit zu einer vermehrten Expression führt.

### 9.2.7 Die AUF-1-Isoform p42 reduziert die KSRP-mRNA-Expression

Der *ARE/poly-(U) binding factor 1* AUF-1 kommt in 4 Isoformen p37, p40, p42 und p45 vor. In der AG Kleinert wurde nachgewiesen, dass alle 4 Isoformen durch die Interaktion mit der gleichen ARE die iNOS-mRNA destabilisieren (Pautz, Linker et al. 2009). Weil die Isoformen p40, p42 und p45 im Gegensatz zu p37 eine Interaktion mit der KSRP 3'-UTR (Abb. 9.21) zeigten, wurde die KSRP-Expression in isoformspezifischen AUF-1-überexprimierenden Zellen untersucht.



#### Abbildung 9.24: Analyse der Effekte der Überexpression verschiedener AUF-1-Isoformen auf die KSRP-mRNA-Expression

DLD-1-GFP-, DLD-1-p40-, DLD-1-p42- und DLD-1-p45-Zellen wurden ausgesät und nach 48 Stunden mit GIT-Puffer zur RNA-Isolation lysiert. Anschließend wurden qRT-PCR-Experimente mit spezifischen Oligonukleotiden und Sonde für KSRP durchgeführt.

Auswertung von 3 unabhängigen qRT-PCR-Analysen. Die Säulen (MW +/- SEM) repräsentieren relative mRNA-Mengen in Bezug auf die mRNA-Menge in DLD-1-GFP-Zellen (\*\*\*.p<0,001; \*\*.p< 0,01; \*.p<0,05; n.s. vs DLD-1-GFP-Zellen)

Dazu wurden DLD-1-GFP-, -p40-, -p42- und -p45-Zellen, die bereits in unserer Arbeitsgruppe etabliert wurden (Pautz, Linker et al. 2009), ausgesät und 24 Stunden später mit serumfreien Medium versetzt. Weitere 18 Stunden später wurden die Zellen in GIT-Puffer zur RNA-Isolation (8.3.1) lysiert. Anschließend wurden qRT-PCR-Experimente (8.3.4) durchgeführt. Zur Auswertung wurden DLD-1-GFP-Zellen auf 100 % gesetzt.

Abbildung 9.24 zeigt, dass die KSRP-mRNA-Expression in p40-Zellen im Vergleich zu GFP-Zellen nicht reguliert war. Dagegen war in p42-Zellen eine signifikante Reduktion der KSRP-mRNA auf 40 % festzustellen. Die p45-Überexpression führte zu einer schwachen Erhöhung der KSRP-mRNA-Expression im Vergleich zu GFP-Zellen.

Diese Ergebnisse zeigen, dass p42-AUF-1 die KSRP-mRNA-Expression reduziert, dagegen hat p45-AUF-1 einen positiven Einfluss auf KSRP. Demnach regulieren verschiedene AUF-1-Isoformen die KSRP-mRNA-Expression unterschiedlich.

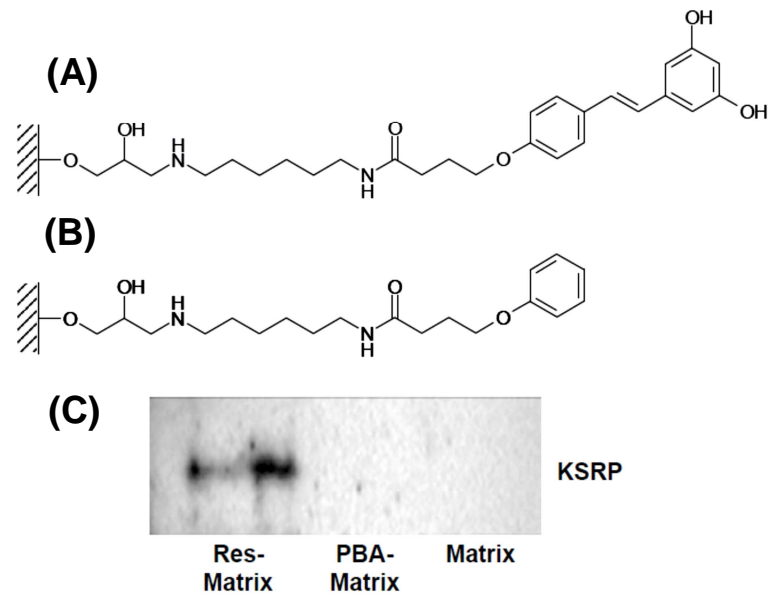
## **9.3 Die Analyse der Regulation von KSRP durch die spezifische Bindung des Naturstoffs Resveratrol**

### **9.3.1 Resveratrol bindet mit hoher Spezifität und Selektivität an KSRP**

Dem in Weintrauben vorkommenden Stilbenderivat Resveratrol wurden in der Vergangenheit anti-oxidative, anti-entzündliche und cardioprotektive Eigenschaften zugeschrieben (Rodrigo, Miranda et al. 2011).

Die Arbeitsgruppe von Prof. [REDACTED] aus Jena untersuchte die direkte Bindung von Resveratrol an bisher unbekannte Interaktionsmoleküle.

Dazu wurde Resveratrol an der C4'-OH Position mit einem  $\gamma$ -Carboxy-funktionalisierten N-Butyl-Linker-Molekül chemisch modifiziert (Abb. 9.25 A), was nachweislich keinen Einfluss auf die Bioaktivität von Resveratrol hat (Schreiner, Kumerz et al. 2011). Als Negativkontrolle für spätere Analysen wurde 4-Phenoxybutansäure (PBA-Abb. 9.25 B) verwendet. Die Liganden wurden an Agarose-Beads gekoppelt und mit humanen PBMC-Lysaten inkubiert. Mit den Eluaten wurden zweidimensionale Chromatographie-Experimente durchgeführt und die Proteine, die selektiv an Resveratrol im Vergleich zu PBA gebunden hatten, massenspektrometrisch analysiert. Alle Proteine oder Proteinfragmente konnten dabei als KSRP identifiziert werden. In Western Blot Experimenten wurde diese selektive Bindung von Resveratrol an KSRP im Gegensatz zu PBA bestätigt (Abb. 9.25 C).



**Abbildung 9.25: Aufreinigung von KSRP mit Hilfe einer Resveratrol-Matrix**

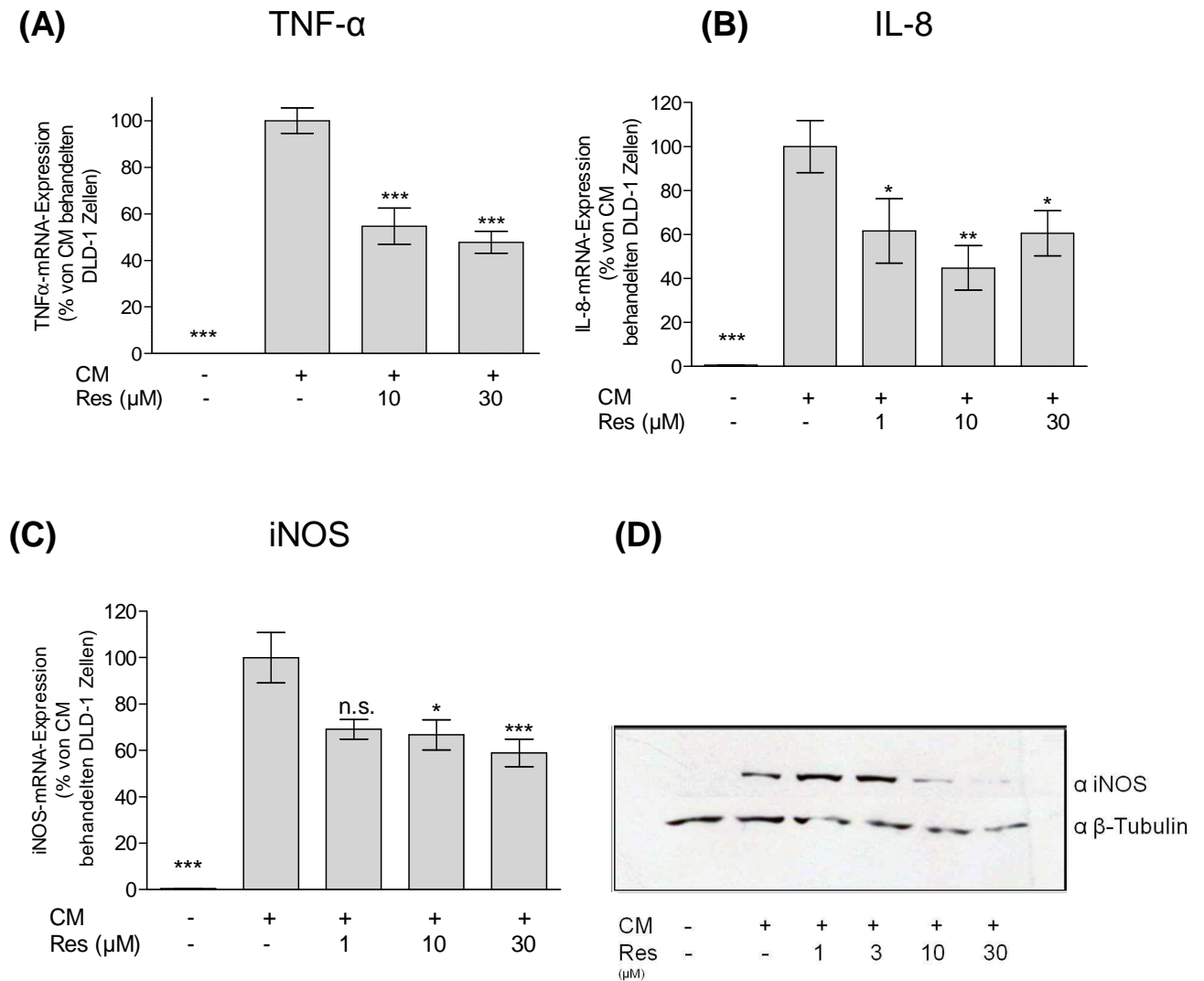
$\gamma$ -Carboxy-Resveratrol, gekoppelt an ein Linker-Molekül (Res-Matrix - A) und 4-Phenoxybutansäure, gekoppelt an ein Linker-Molekül (PBA-Matrix - B) wurden mit Lysaten von humanen PBMCs inkubiert. Spezifisch gebundene Proteine wurden eluiert und durch Western Blot Experimente auf eine KSRP-Bindung mit einem monoklonalen Antikörper zur KSRP-Detektion überprüft (C).

### 9.3.2 Die Behandlung mit Resveratrol führt zu einer reduzierten mRNA-Expression der KSRP-regulierten Gene TNF- $\alpha$ , IL-8 und iNOS

Die Analysen der Arbeitsgruppe von Herrn [REDACTED] hatten gezeigt, dass Resveratrol mit hoher Affinität und Selektivität an KSRP bindet.

Frühere Studien haben gezeigt, dass KSRP die mRNA-Stabilität der Gene TNF- $\alpha$  (Briata, Chen et al. 2011), IL-8 (Winzen, Thakur et al. 2007) und iNOS (Linker, Pautz et al. 2005) durch die Bindung an deren 3'-UTR reduziert. Inwieweit KSRP-abhängige Funktionen durch die Bindung von Resveratrol moduliert werden, sollte durch die Analyse der TNF- $\alpha$ , IL-8 und iNOS-mRNA-Expression in Resveratrol-behandelten Zellen untersucht werden.

DLD-1-Zellen wurden in 12-Loch-Platten ausgesät und 16 Stunden vor Versuchsbeginn mit serumfreiem Medium versetzt. Die Zellen wurden mit den angegebenen Konzentrationen von Resveratrol (Res) oder dem Lösungsmittel DMSO behandelt. Eine Stunde nach der Zugabe von Resveratrol wurden die Zellen für zwei (TNF- $\alpha$ ) oder sechs (iNOS, IL-8) Stunden mit Cytokinen (CM), wie unter 8.1.4 beschrieben, stimuliert. Zur Kontrolle der Induktion der pro-inflammatorischen Genexpression wurden Zellen nur in serumfreiem Medium inkubiert. Schließlich wurden die Zellen für RNA-Analysen mit GIT-Puffer lysiert (8.3.1), die RNA revers transkribiert (8.3.5) und qRT-PCR-Analysen (8.3.7) durchgeführt. Für die Auswertungen der RNA-Analysen wurden CM-stimulierte DLD-1-Zellen als 100% gesetzt.



**Abbildung 9.26: Analyse der Effekte von Resveratrol auf die CM-induzierte TNF- $\alpha$ -, IL-8- und iNOS-Expression**

Humane DLD-1-Zellen wurden mit Resveratrol (Res) in den angegebenen Konzentrationen oder DMSO in entsprechenden Mengen präinkubiert. Nach einer Stunde wurden die Zellen mit Cytokinen (CM) stimuliert. Zusätzlich wurden Zellen in serumfreien Medium zur Kontrolle inkubiert. Nach weiteren zwei bzw. sechs Stunden wurde die RNA isoliert oder Zellen zur Proteinanalyse mit PLB lysiert.

(A) Auswertung von 3 unabhängigen qRT-PCR-Analysen. Die Säulen (MW +/- SEM) repräsentieren relative TNF- $\alpha$ -mRNA-Mengen in Bezug auf die TNF- $\alpha$ -mRNA-Menge in CM-behandelten DLD-1-Zellen. (\*\*\*:  $p < 0,001$ ; n.s.: nicht signifikant verschieden vs CM-behandelten DLD-1-Zellen)

(B) Auswertung von 3 unabhängigen qRT-PCR-Analysen. Die Säulen (MW +/- SEM) repräsentieren relative IL-8-mRNA-Mengen in Bezug auf die IL-8-mRNA-Menge in CM-behandelten DLD-1-Zellen. (\*\*\*:  $p < 0,001$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \* $p < 0,05$ ; vs CM-behandelten DLD-1-Zellen)

(C) Auswertung von 4 unabhängigen qRT-PCR-Analysen. Die Säulen (MW + SEM) repräsentieren relative iNOS-mRNA-Mengen in Bezug auf die iNOS-mRNA-Menge in CM-behandelten DLD-1-Zellen. (\*\*\*:  $p < 0,001$ ; \* $p < 0,05$ ; n.s.: nicht signifikant verschieden vs CM-behandelten DLD-1-Zellen)

(D) Repräsentativer Blot aus 3 weiteren Western Blot Experimenten mit monoklonalen Antikörpern zur Analyse der iNOS- und  $\beta$ -Tubulin-Expression. Eingesetzt wurden 40  $\mu$ g Extrakte aus humanen DLD-1-Zellen.

Abbildung 9.26 A zeigt, dass die CM-induzierte TNF- $\alpha$ -mRNA-Expression nach Res-Behandlung signifikant auf annähernd 50 % reduziert war. Der Effekt war jedoch in 10  $\mu$ M und 30  $\mu$ M Res-behandelten Zellen gleich.

Auch die CM-induzierte IL-8-mRNA-Expression war in Res-behandelten Zellen signifikant verringert, eine Konzentrationsabhängigkeit ließ sich auch hier nicht feststellen (Abb. 9.26 B). Die CM-Induktion der iNOS-mRNA-Expression (9.26 C) war in Res-inkubierten Zellen im Vergleich zu unbehandelten Zellen verringert.

Dieses Ergebnis sollte auf Proteinebene mittels Western Blot Analyse (8.2.5) bestätigt werden. Dazu wurden die Res-behandelten DLD-1-Zellen für acht Stunden mit CM induziert und schließlich in PLB lysiert. Zur Kontrolle der Gel-Beladung wurde die  $\beta$ -Tubulin-Menge bestimmt. Abbildung 9.26 D zeigt eine CM-induzierte iNOS-Expression im Vergleich zu unstimulierten DLD-1-Zellen. Diese CM-Induktion der iNOS war nach Res-Behandlung konzentrationsabhängig reduziert.

Die Ergebnisse zeigen, dass die Behandlung mit Resveratrol zu einer reduzierten mRNA-Expression der KSRP-regulierten Gene TNF- $\alpha$ , IL-8 und iNOS in DLD-1-Zellen führt.

### **9.3.3 Die Resveratrol-abhängige Reduktion der iNOS-mRNA-Expression ist Sirtuin-1 unabhängig**

Viele der anti-inflammatorischen und cardioprotektiven Effekte Resveratrols lassen sich auf die indirekte Aktivierung der Histon-Deacetylase Sirtuin-1 (SIRT-1) zurückführen (Kubota, Kurihara et al. 2009; Sulaiman, Matta et al. 2010). Daher sollte am Beispiel der iNOS-mRNA-Expression untersucht werden, ob die verringerte pro-inflammatorische Expression in Resveratrol-behandelten Zellen auf eine SIRT-1-Aktivierung zurückzuführen ist.

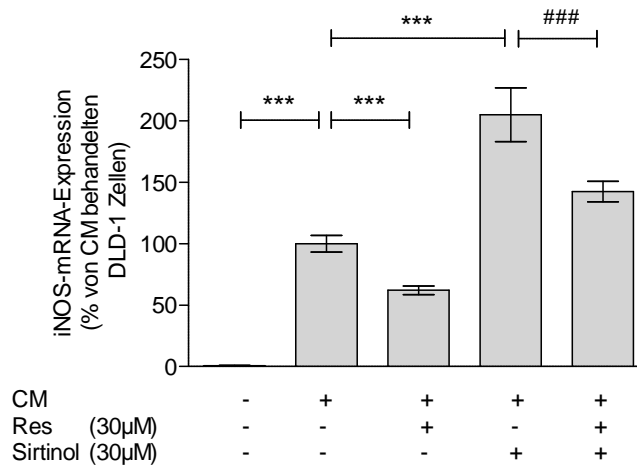
Dazu wurden DLD-1-Zellen zuerst für eine Stunde mit dem SIRT-1-Inhibitor Sirtinol (30  $\mu$ M) ((Orecchia, Scarponi et al. 2011) inkubiert und anschließend mit Resveratrol (Res) behandelt (8.1.4). Zellen, die nicht mit einer Substanz behandelt wurden, wurden mit dem Lösungsmittel DMSO inkubiert. Nach einer weiteren Stunde wurde die iNOS-Expression mit einem Cytokingemisch (CM) induziert. Zur Kontrolle der Induktion wurden Zellen mit serumfreien Medium inkubiert. Nach insgesamt acht Stunden wurden die DLD-1-Zellen mit GIT-Puffer lysiert und die RNA isoliert (8.3.1). Anschließend wurde die RNA revers transkribiert und die iNOS-mRNA-Expression mittels qRT-PCR quantifiziert (8.3.7). Zur Auswertung wurden die Zellen, die ausschließlich mit CM und DMSO behandelt wurden, als 100 % gesetzt.

Die Reduktion der CM-induzierten iNOS-mRNA-Expression in Res-behandelten DLD-1-Zellen im Vergleich zu ausschließlich CM-behandelten Zellen konnte in diesem Versuch bestätigt werden (Abb. 9.27). Eine Behandlung mit Sirtinol führte im Vergleich zu Kontrollzellen zu einem zweifachen Anstieg der CM-induzierten iNOS-mRNA-Menge.



Allerdings konnte auch in Sirtinol-behandelten Zellen weiterhin die Res-vermittelte Reduktion der iNOS-Expression detektiert werden.

Diese Ergebnisse zeigen, dass die Resveratrol-abhängige Reduktion der iNOS-mRNA-Expression SIRT-1 unabhängig ist.



**Abbildung 9.27: Analyse des Effekts der SIRT-1-Hemmung durch Sirtinol auf die Modulation der iNOS-Expression durch Resveratrol**

DLD-1-Zellen wurden mit Sirtinol (30µM) und Resveratrol (30µM) oder mit DMSO in entsprechenden Mengen präinkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit Cytokinen (CM) stimuliert. Zusätzlich wurden Zellen in serumfreien Medium inkubiert. Nach insgesamt 8 Stunden wurden die Zellen lysiert und die RNA für weitere Analysen isoliert.

Gezeigt ist die Auswertung von 5 unabhängigen qRT-PCR-Analysen. Die Säulen (MW +/- SEM) repräsentieren relative iNOS-mRNA-Mengen in Bezug auf die iNOS-mRNA-Menge in CM-behandelten DLD-1-Zellen. (\*\*\*) :  $p < 0,001$  vs CM-behandelten DLD-1-Zellen; (###):  $p < 0,001$  vs CM/Sirtinol-behandelten DLD-1-Zellen)

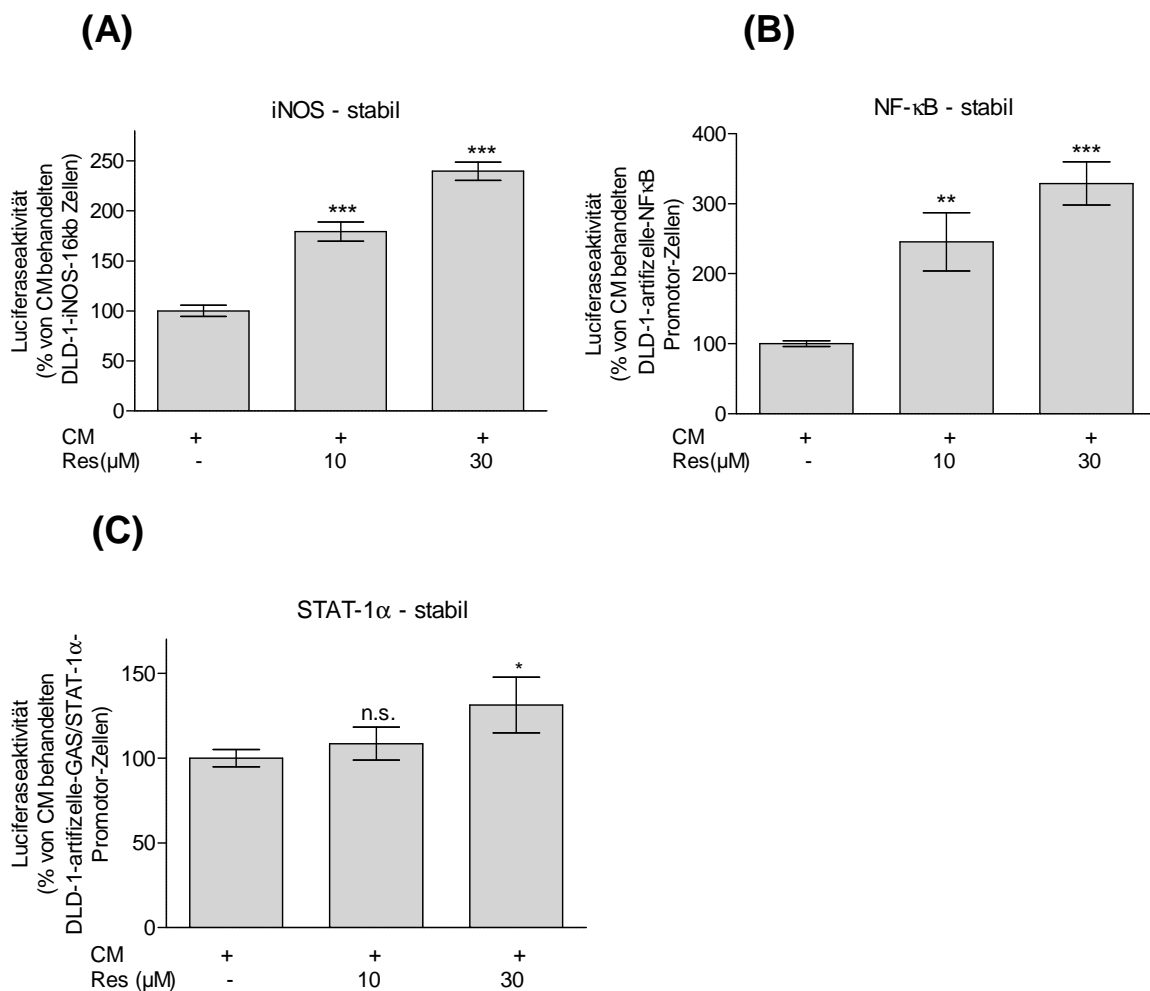
### 9.3.4 Die Behandlung mit Resveratrol erhöht die Aktivität eines 16kb-iNOS-Promotor-Fragments

Die iNOS-Expression wird auf transkriptioneller Ebene durch verschiedene Transkriptionsfaktoren (TF) beeinflusst. Dabei wurde eine positive Regulation des iNOS-Promotors durch STAT-1 $\alpha$  und NF- $\kappa$ B nachgewiesen (Pautz, Art et al. 2010).

Eine Resveratrol-abhängige SIRT-1-Aktivierung führt laut Literatur zu einer Reduktion der NF- $\kappa$ B-vermittelten Effekte (Yeung, Hoberg et al. 2004). Ebenso wurde eine negative Regulation des JAK/STAT-Signalwegs durch Resveratrol gezeigt (Capiralla, Vingtdoux et al. 2012). Ob diese Mechanismen in DLD-1-Zellen bestätigt werden können, sollte in Reporteragen-Analysen untersucht werden.

Zur Analyse der Resveratrol-abhängigen Effekte auf den iNOS-Promotor wurden DLD-1-Zellen verwendet, die stabil mit einem Reporteragenkonstrukt transfiziert worden waren, dass ein 16kb-iNOS-Promotor-Fragment vor einem Luciferasereporteragen enthält (DLD-1-16kb-

Zellen). DLD-1-16kb-Zellen wurden mit Resveratrol (Res) in den angegebenen Konzentrationen behandelt (8.1.4). Zur Kontrolle wurden Zellen mit dem Lösungsmittel DMSO inkubiert. Nach einer Stunde wurde mit Cytokinen (CM) oder serumfreiem Medium für weitere sechs Stunden stimuliert. Schließlich wurden die Zellen mit PLB lysiert und die Luciferaseaktivität gemessen (8.3.12). Zur Normierung der Ergebnisse wurde die Proteinkonzentration mittels Bradford bestimmt (8.2.2). Die Daten der ausschließlich CM-behandelten DLD-1-Zellen wurden auf 100 % gesetzt.



**Abbildung 9.28: Analyse der Effekte von Resveratrol auf die Aktivität des humanen iNOS-Promotors sowie artifizierender NF-κB- und STAT-1α-abhängiger Promotoren**

Stabil transfizierte DLD-1-Zellen mit den Konstrukten *pXP216kb* (A), *pNF-κBluc* (B) und *pGASluc* (C) wurden mit Resveratrol (Res) in den angegebenen Konzentrationen eine Stunde präinkubiert. Nach einer sechs-stündigen Cytokin-Stimulation (CM) wurden die Zellen mit PLB lysiert und die Luciferaseaktivität bestimmt. Zur Normierung wurde die Proteinkonzentration mittels Bradford gemessen.

Dargestellt ist die Zusammenfassung aus 3 unabhängigen Luciferase-Aktivitätsmessungen mit jeweils 3-6 Replikaten pro Gruppe. Die Säulen (MW +/-SEM) repräsentieren die relative Luciferaseaktivität in Bezug auf die Luciferaseaktivität von ausschließlich CM-behandelten Zellen. (\*\*\*:  $p < 0,001$ ; \*\*:  $p < 0,01$ ; \*:  $p < 0,05$ ; n.s.: nicht signifikant verschieden vs Res-unbehandelten, CM-behandelten DLD-1-Zellen)

Abbildung 9.28 A zeigt, dass Res die Luciferaseaktivität unter dem Einfluss eines 16kb iNOS-Promotorfragments in stabil transfizierten DLD-1-Zellen erhöhte. Die Luciferaseaktivität stieg in 30  $\mu$ M Res-behandelten Zellen auf das 2,5-Fache im Vergleich zu ausschließlich CM-behandelten Zellen. Zur Betrachtung der Res-abhängigen Modulation der TF NF- $\kappa$ B und wurden stabile DLD-1-Zellen verwendet, die ein Luciferasereporter gen unter der Kontrolle eines artifiziellen Promotors exprimieren. Dieser enthält fünfmal eine Konsensusbindungssequenz von NF- $\kappa$ B und ermöglicht die Expression der Luciferase abhängig von der NF- $\kappa$ B-Aktivität. Die DLD-1-artifiziellen-NF- $\kappa$ B-Promotor-Zellen (NF- $\kappa$ B) wurden ausgesät und, wie oben beschrieben, mit Res bzw. CM behandelt und entsprechend ausgewertet.

Die Luciferaseaktivität war in Res-behandelten NF- $\kappa$ B-Zellen im Vergleich zu ausschließlich CM-induzierten Zellen signifikant erhöht (Abb. 9.28 B). Eine Inkubation mit 30  $\mu$ M Res führte zu einer 3-fachen Induktion der Luciferase-Expression durch den NF- $\kappa$ B-abhängigen Promotor.

Die Regulation des TF STAT-1 $\alpha$  durch Resveratrol wurde in stabilen DLD-1-artifiziellen-GAS/STAT-1 $\alpha$ -Promotor-Zellen (STAT-1 $\alpha$ ) analysiert. STAT-1 $\alpha$  bindet spezifisch an den GAS (*Interferon-Gamma Activated Sequence*) -Promotor und reguliert die Luciferase-Expression abhängig von der STAT-1 $\alpha$ -Aktivität. Diese DLD-1-STAT-1 $\alpha$ -Zellen wurden, wie oben dargestellt, mit Res bzw. CM behandelt und entsprechend ausgewertet.

Abbildung 9.28 C zeigt eine unveränderte Luciferaseaktivität in 10  $\mu$ M Res-behandelten STAT-1 $\alpha$ -Zellen im Vergleich zu ausschließlich CM-induzierten Zellen. Die Inkubation mit 30  $\mu$ M Res führte dagegen zu einer geringen, aber signifikanten Erhöhung der Luciferaseaktivität.

Die Ergebnisse zeigen, dass Resveratrol sowohl die NF- $\kappa$ B-Aktivität als auch die STAT-1 $\alpha$ -Aktivität erhöht, wodurch die durch Resveratrol-Behandlung erhöhte Luciferaseaktivität in DLD-1-16kb-Zellen erklärt werden kann. Die Resveratrol-abhängige Reduktion der iNOS-Expression kann somit nicht durch eine Modulation des iNOS-Promotors begründet werden.

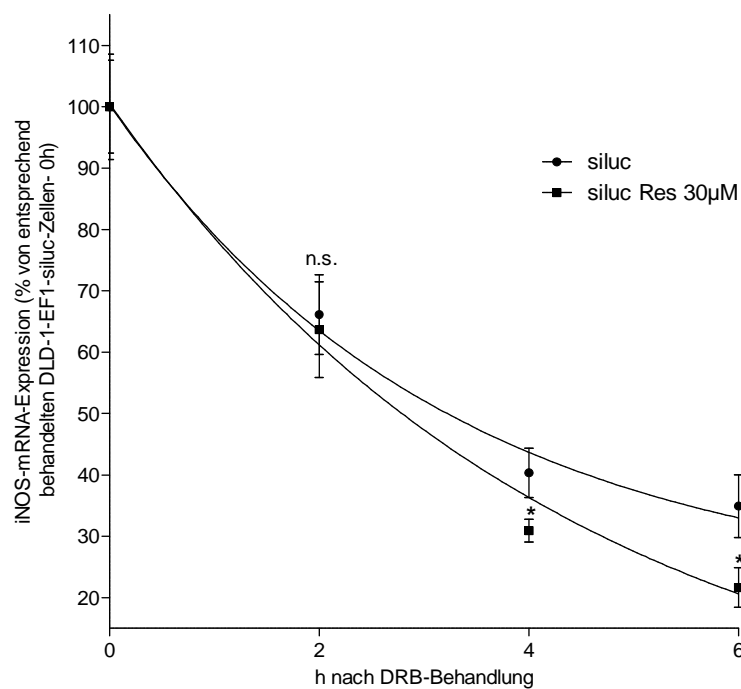
### **9.3.5 Resveratrol hat in siKSRP-Zellen keinen Einfluss auf die iNOS-mRNA-Stabilität**

Es wurde beschrieben, dass KSRP die iNOS-mRNA über eine Interaktion mit AU-reichen Elementen innerhalb der iNOS-3'-UTR destabilisiert (Linker, Pautz et al. 2005).

Um zu untersuchen, ob Resveratrol auf post-transkriptioneller Ebene die iNOS-mRNA-Expression in DLD-1-Zellen reguliert, wurde die iNOS-mRNA-Stabilität durch 5, 6-Dichlor-1- $\beta$ -D-Ribofuranosylbenzimidazol (DRB)-Behandlung, wie unter 8.1.5 beschrieben, analysiert.

Hierzu wurden DLD-1-EF1-siluc-Zellen verwendet, die stabil eine siRNA gegen die Luciferase exprimieren. Diese Zellen wurden zur Induktion der iNOS-mRNA-Expression mit Cytokinen behandelt (8.1.4). Nach vier Stunden wurde Resveratrol (Res) in einer Konzentration von 30  $\mu\text{M}$  und 15 Minuten danach 25  $\mu\text{g/ml}$  DRB zum Stoppen der Transkription hinzugegeben. Die Zellen wurden nach null, zwei, vier und sechs Stunden nach DRB-Behandlung zur RNA-Isolation mit GIT-Puffer lysiert (8.3.1). Die iNOS-mRNA-Expression wurde mittels qRT-PCR-Analysen bestimmt (8.3.7) und zur Auswertung wurden die Zellen der entsprechenden Behandlung nach null Stunden DRB-Behandlung als 100 % gesetzt.

Abbildung 9.29 zeigt, dass die Menge der CM-induzierten iNOS-mRNA nach DRB-Inkubation kontinuierlich abnahm. Nach sechs Stunden verringerte sie sich auf 40 % des Ausgangsniveaus. Die iNOS-mRNA-Menge nahm in Res-behandelten DLD-1-siluc-Zellen nach vier und sechs Stunden im Vergleich zu unbehandelten Zellen deutlicher ab. Hier war die iNOS-mRNA nach sechs Stunden auf etwa 25 % reduziert.

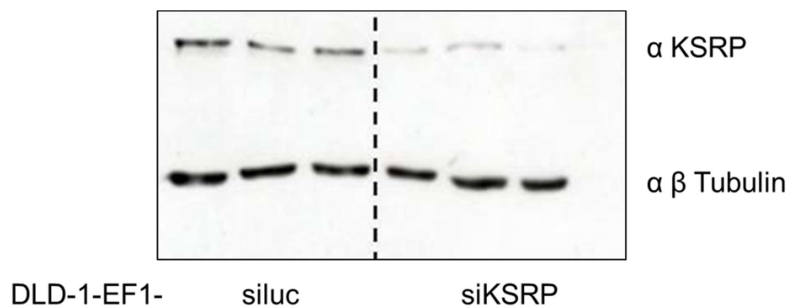


**Abbildung 9.29: Analyse der Effekte von Resveratrol auf die iNOS-mRNA-Stabilität**

DLD-1-EF1-siluc-Zellen wurden mit Cytokinen für vier Stunden stimuliert. Anschließend wurden die Zellen mit 30  $\mu\text{M}$  Resveratrol (Res) und 15 Minuten später mit 25  $\mu\text{g/ml}$  DRB behandelt. Nach null, zwei, vier und sechs Stunden nach DRB-Zugabe wurde der Versuch zur RNA-Isolation beendet.

Gezeigt ist die Auswertung von 2 unabhängigen qRT-PCR-Analysen mit jeweils 4-6 Replikaten pro Gruppe. Die Säulen (MW  $\pm$  SEM) repräsentieren relative iNOS-mRNA-Mengen in Bezug auf die iNOS-mRNA-Menge in entsprechend behandelten DLD-1-EF1-siluc-Zellen (\*:  $p < 0,05$ ; n.s.: nicht signifikant verschieden vs Res-unbehandelten DLD-1-EF1-siluc-Zellen)

Dieses Ergebnis zeigt, dass die Behandlung mit Resveratrol die iNOS-mRNA destabilisiert. Die Vermutung, dass Resveratrol über die direkte Bindung an KSRP dessen Funktion erhöht, sollte mit DLD-1-EF1-siKSRP-Zellen aufgeklärt werden, die stabil eine KSRP-spezifische siRNA exprimieren. Zuerst wurde durch ein Western Blot Experiment, unter Verwendung eines monoklonalen Antikörpers zur Detektion der KSRP-Expression, die Funktionalität der siRNA überprüft. Zur Ladungskontrolle wurde ein monoklonaler  $\beta$ -Tubulin-Antikörper eingesetzt. Abbildung 9.30 zeigt eine reduzierte KSRP-Expression in DLD-1-EF1-siKSRP-Zellen im Vergleich zu DLD-1-EF1-siluc-Zellen.



**Abbildung 9.30: Analyse der KSRP-Expression in DLD-1-siKSRP-Zellen**

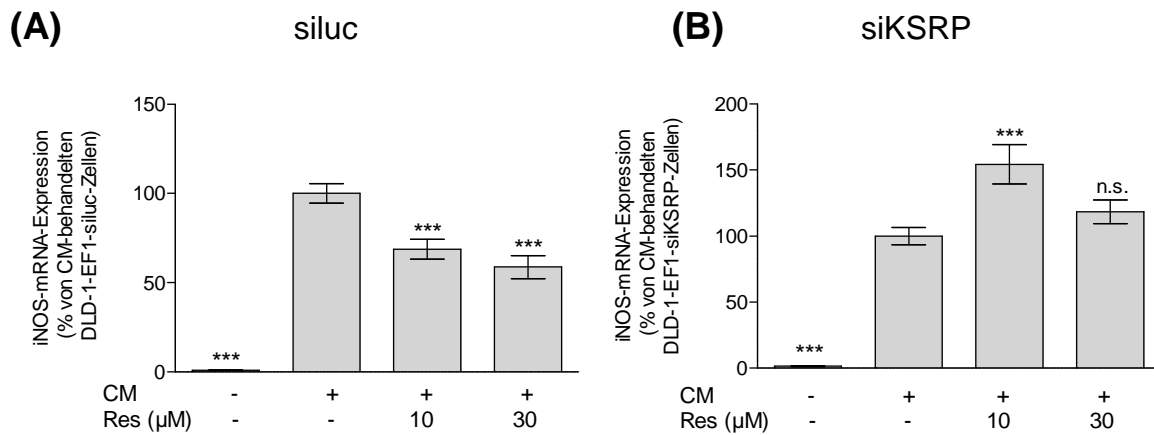
*DLD-1-EF1-siluc- und DLD-1-EF1-siKSRP-Zellen wurden ausgesät und nach 24 Stunden mit PLB lysiert. Für den Western Blot wurden 30  $\mu$ g Proteinextrakt verwendet.*

*Dargestellt ist ein repräsentativer Blot aus 2 unabhängigen Western Blot Analysen mit monoklonalen Antikörpern zur KSRP- und  $\beta$ -Tubulin-Detektion.*

Um die KSRP-Abhängigkeit der Resveratrol-Wirkung zu untersuchen, wurde zuerst die iNOS-mRNA-Expression in DLD-1-EF1-siluc- im Vergleich zu DLD-1-EF1-siKSRP-Zellen untersucht. Dazu wurden DLD-1-EF1-siluc- (siluc) und DLD-1-EF1-siKSRP-Zellen (siKSRP) mit Resveratrol (Res) für eine Stunde in den angegebenen Konzentrationen inkubiert. Zur Kontrolle wurden Zellen mit dem Lösungsmittel DMSO behandelt. Es folgte eine Stimulation mit Cytokinen (CM) für sechs Stunden (8.1.4). Zur Kontrolle der Induktion wurden Zellen in serumfreien Medium inkubiert. Die Zellen wurden mit GIT-Puffer lysiert und die RNA isoliert (8.3.1). Diese wurde mit einer reversen Transkriptase in cDNA umgeschrieben (8.3.5) und in qRT-PCR-Analysen (8.3.7) quantifiziert. Zur Auswertung wurden die Werte der jeweils CM-behandelten DLD-1-Zellen als 100 % gesetzt und die übrigen Behandlungsgruppen in Relation gesetzt.

Abbildung 9.31 A zeigt, dass die CM-induzierte iNOS-mRNA-Menge in 30  $\mu$ M Res-behandelten siluc-Zellen im Vergleich zu CM-behandelten siluc-Zellen auf 50 % signifikant reduziert war. Somit konnte das Ergebnis aus 9.3.2 in DLD-1-siluc-Zellen bestätigt werden. In DLD-1-siKSRP-Zellen war kein signifikanter Unterschied der CM-induzierten iNOS-mRNA-Expression zwischen 30  $\mu$ M Res-behandelten und unbehandelten Zellen festzustellen (Abb.

9.31 B). Eine Behandlung von 10  $\mu\text{M}$  Res führte sogar zu einer leicht erhöhten iNOS-mRNA-Expression.



**Abbildung 9.31: Effekte von Resveratrol auf die CM-induzierte iNOS-mRNA-Expression in siKSRP-Zellen**

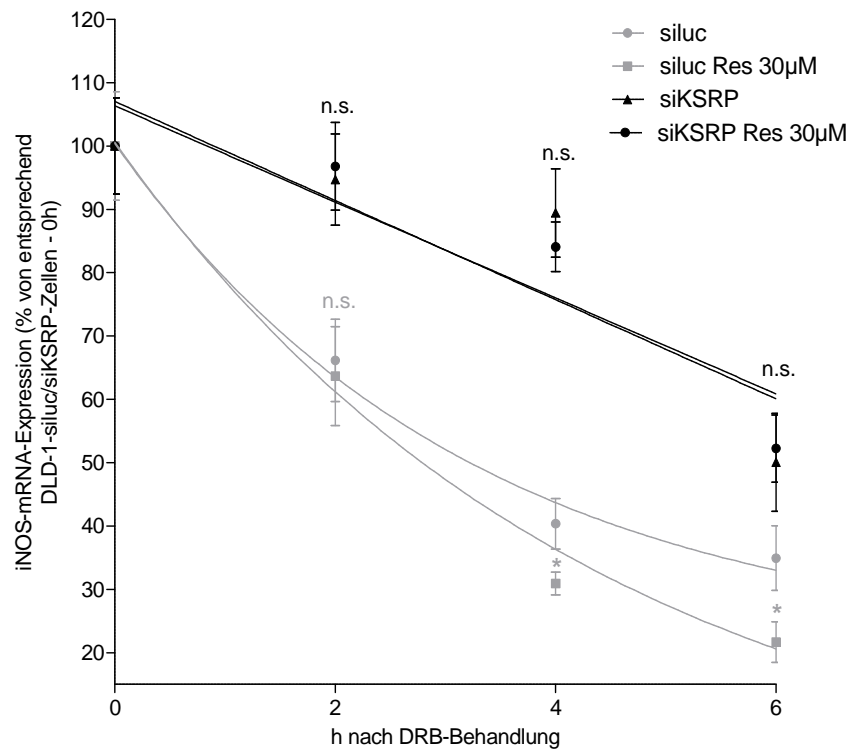
DLD-1-EF1-siKSRP und -siluc-Zellen wurden mit Resveratrol (Res) in den angegebenen Konzentrationen eine Stunde inkubiert. Es folgte eine Cytokin-Stimulation (CM) für sechs Stunden. Anschließend wurden die Zellen lysiert und RNA für qRT-PCR-Analysen isoliert.

(A) Gezeigt ist die Auswertung von 3 unabhängigen qRT-PCR-Analysen. Die Säulen (MW  $\pm$  SEM) repräsentieren relative iNOS-mRNA-Mengen in Bezug auf die iNOS-mRNA-Menge in CM-stimulierten DLD-1-siluc-Zellen (\*\*\*:  $p < 0,001$  vs CM-behandelter DLD-1-siluc-Zellen)

(B) Gezeigt ist die Auswertung von 3 unabhängigen qRT-PCR-Analysen. Die Säulen (MW  $\pm$  SEM) repräsentieren relative iNOS-mRNA-Mengen in Bezug auf die iNOS-mRNA-Menge in CM-stimulierten DLD-1-siKSRP-Zellen (\*\*\*:  $p < 0,001$ ; n.s.: nicht signifikant verschieden vs CM-stimulierter DLD-1-siKSRP-Zellen)

Um diese KSRP-abhängige Regulation der iNOS-mRNA-Stabilität durch Res zu bestätigen, wurde der DRB-mRNA-Stabilitätsversuch in DLD-1-siKSRP-Zellen, wie oben beschrieben, wiederholt.

Wie erwartet, war die iNOS-mRNA-Stabilität in DLD-1-siKSRP-Zellen im Vergleich zu siluc-Zellen erhöht (Linker, Pautz et al. 2005) (Abb. 9.32). Hier konnte nach sechs Stunden eine Abnahme der iNOS-mRNA auf 55 % detektiert werden. Eine Behandlung mit Resveratrol führte in DLD-1-siKSRP-Zellen im Vergleich zu Res-unbehandelten DLD-1-siKSRP-Zellen zu keiner signifikanten Veränderung der iNOS-mRNA-Stabilität.



**Abbildung 9.32: Effekte von Resveratrol auf die iNOS-mRNA-Stabilität in siKSRP-Zellen**

DLD-1-EF1-siKSRP- und -siluc-Zellen wurden mit Cytokinen für vier Stunden stimuliert. Anschließend wurden die Zellen mit 30 µM Resveratrol (Res) und 15 Minuten später mit 25 µg/ml DRB behandelt. Nach null, zwei, vier und sechs Stunden nach DRB-Zugabe wurde der Versuch zur RNA-Isolation beendet.

Gezeigt ist die Auswertung von 2 unabhängigen qRT-PCR-Analysen. Die Säulen (MW +/- SEM) repräsentieren relative iNOS-mRNA-Mengen in Bezug auf die iNOS-mRNA-Menge in entsprechend behandelten DLD-1-siKSRP- bzw. -siluc-Zellen (\*:  $p < 0,05$ ; n.s.: nicht signifikant verschieden vs entsprechenden Res-unbehandelten DLD-1-Zellen)

Die durchgeführten Untersuchungen zeigen, dass die Resveratrol-vermittelte Reduktion der iNOS-mRNA-Expression und -Stabilität in Bezug zu KSRP steht. Die Depletion von KSRP hebt die beschriebene Resveratrol-Wirkung in den durchgeführten Analysen auf.

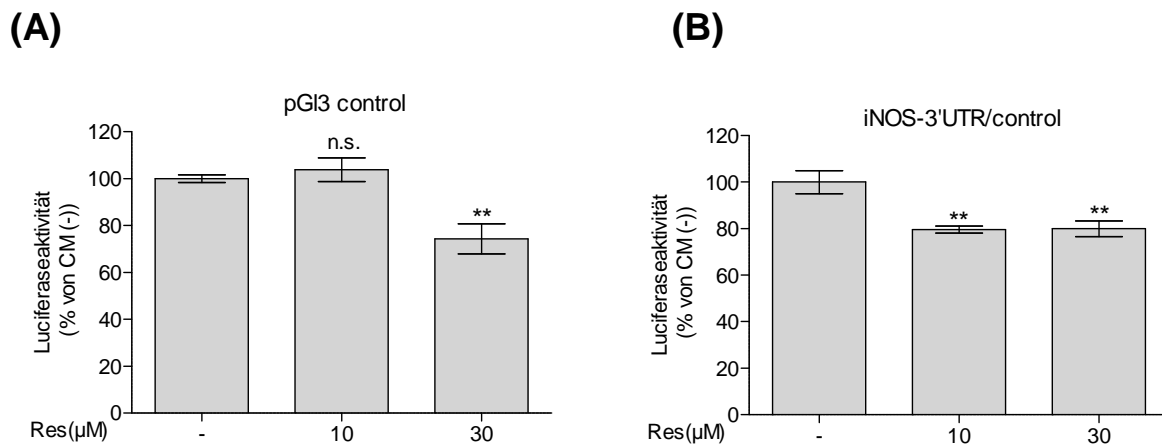
### 9.3.6 Resveratrol hat einen negativen Effekt auf die iNOS-3'UTR

Um zu untersuchen, ob dieser Effekt von Resveratrol post-transkriptionell über die 3'-UTR der iNOS vermittelt wird, wurden Luciferase-Assay-Analysen durchgeführt.

Dazu wurden DLD-1-Zellen mit dem iNOS-3'-UTR-Reportergenkonstrukt und dem Kontrollvektor pGI3-control transfiziert. Zur Kontrolle der Transfektionseffizienz wurde der Renilla-Luciferase-Vektor pRLEF1α cotransfiziert (8.1.6). Nach 30 Stunden erfolgte ein Wechsel auf serumfreies Medium, um 16 Stunden später die Zellen mit Resveratrol (Res) in den angegebenen Konzentrationen für eine Stunde vorzubehandeln. Anschließend erfolgte eine Stimulation mit Cytokinen (CM) für sechs Stunden (8.1.4). Danach wurden die Zellen in

PLB lysiert und nach mindestens zwei Stunden bei  $-20^{\circ}\text{C}$  wurden die Luciferaseaktivitätsmessung durchgeführt (8.3.12). Zur Auswertung wurden jeweils ausschließlich CM-behandelte Zellen als 100 % gesetzt.

Eine Konzentration von  $30\ \mu\text{M}$  Res hatte bereits einen negativen Effekt auf den Kontrollvektor pGI3-control im Vergleich zu unbehandelten DLD-1-Zellen (Abb. 9.33 A). Um den Effekt der Res-Behandlung auf die iNOS-3'-UTR abzüglich des beschriebenen Effektes auf den Leervektor zu erhalten, wurden die Luciferaseaktivitäten der pGI3-iNOS-3'-UTR transfizierten DLD-1-Zellen durch die Werte der pGI3-control-transfizierten Zellen dividiert (iNOS-3'-UTR/control). Nach der Durchführung dieser Normierung zeigte die  $30\ \mu\text{M}$  Resveratrol-Behandlung eine signifikant verringerte Luciferaseaktivität in iNOS-3'-UTR-Zellen (Abb. 9.33 B). Dieser Effekt war in  $10\ \mu\text{M}$  Res-behandelten Zellen vergleichbar.



**Abbildung 9.33: Analyse der Effekte von Resveratrol auf die Luciferaseaktivität in mit pGI3-iNOS-3'-UTR transfizierten DLD-1-Zellen**

DLD-1-Zellen wurden je mit den Konstrukten pGI3-control und pGI3-iNOS-3'-UTR transfiziert. Zusätzlich wurde pRL-EF1 $\alpha$  (Renilla-Luciferase) zur Normierung der Ergebnisse cotransfiziert. 30 Stunden nach der Transfektion erfolgte ein Wechsel auf serumfreies Medium und nach weiteren 16 Stunden wurden die Zellen mit Resveratrol (Res) in den angegebenen Konzentrationen eine Stunde präinkubiert. Nach einer sechs-stündigen Cytokin-Stimulation (CM) wurden die Zellen mit PLB lysiert und die Luciferase- und Renilla-Aktivität bestimmt. Die Luciferase-Aktivität wurde auf die jeweilige Renilla-Aktivität normiert.

(A) Dargestellt ist die Zusammenfassung aus 3 unabhängigen Luciferase-Aktivitätsmessungen der transfizierten DLD-1-Zellen. Die Säulen (MW  $\pm$  SEM) repräsentieren die relative Luciferaseaktivität in Bezug auf die Luciferaseaktivität von Res-unbehandelten (-), CM-stimulierten Zellen. (\*\*:  $p < 0,01$ ; n.s.: nicht signifikant verschieden vs Res-unbehandelten, CM-stimulierten DLD-1-Zellen)

(B) Dargestellt ist die Zusammenfassung des Quotienten pGI3-iNOS-3'-UTR/pGI3-control (iNOS-3'-UTR/control) von 3 unabhängigen Luciferase-Aktivitätsmessungen der transfizierten DLD-1-Zellen. Die Säulen (MW  $\pm$  SEM) repräsentieren die relative Luciferaseaktivität in Bezug auf die Luciferaseaktivität von Res-unbehandelten (-), CM-stimulierten Zellen. (\*\*:  $p < 0,01$  vs Res-unbehandelten, CM-stimulierten DLD-1-Zellen)



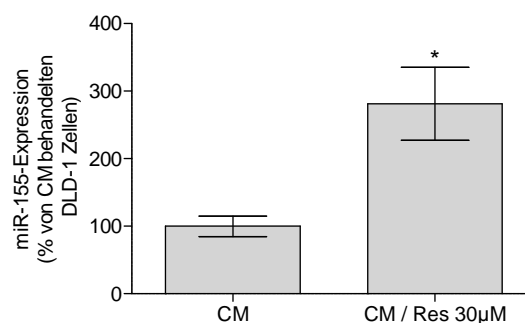
### 9.3.7 Die miR-155-Expression und die miR-155-Aktivität sind in Resveratrol-behandelten DLD-1-Zellen erhöht

Die bisher durchgeführten Analysen zeigen, dass die Interaktion von Resveratrol mit KSRP die KSRP-vermittelte Destabilisierung der iNOS-mRNA verstärkt. Trabucchi schrieb KSRP neben der Regulation der mRNA-Stabilität eine entscheidende Rolle in der Prozessierung von miRNAs zu (Trabucchi, Briata et al. 2009). Die miR-155 wurde dabei als von KSRP positiv regulierte Ziel-miRNA identifiziert (Ruggiero, Trabucchi et al. 2009).

Daher sollte nun am Beispiel der miR-155 untersucht werden, ob Resveratrol die miRNA-Prozessierung durch die Interaktion mit KSRP beeinflusst.

Dazu wurden DLD-1-Zellen mit Resveratrol (Res 30µM) oder DMSO in entsprechenden Mengen vorbehandelt. Nach einer Stunde wurden die Zellen mit Cytokinen (CM) für weitere vier Stunden stimuliert (8.1.4) und schließlich zur RNA-Isolation mit GIT-Puffer lysiert (8.3.1). Die Reverse Transkription (8.3.5) und Quantifizierung mittels qRT-PCR (8.3.7) wurden mit miR-155-spezifischen Assay-Systemen von Applied Biosystems durchgeführt.

Abbildung 9.34 zeigt eine signifikant erhöhte miR-155-Expression in Res-behandelten Zellen im Vergleich zu CM-behandelten DLD-1-Zellen.



**Abbildung 9.34: Analyse der miR-155-Expression in DLD-1-Zellen nach Resveratrol-Behandlung**

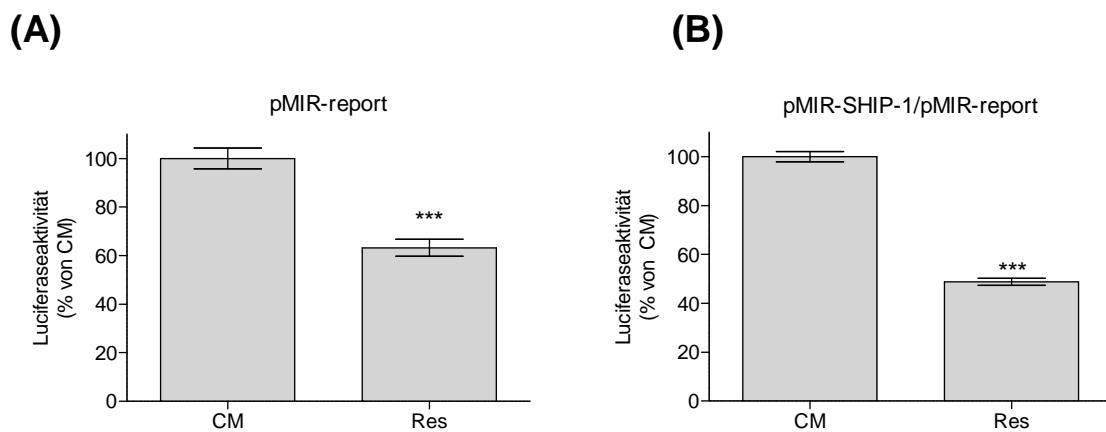
Humane DLD-1-Zellen wurden mit 30 µM Resveratrol (Res) oder DMSO in der entsprechenden Menge präinkubiert. Nach einer Stunde wurden die Zellen mit Cytokinen (CM) stimuliert. Nach weiteren 4 Stunden wurde die RNA isoliert und die miR-155 Expression mittels qRT-PCR analysiert.

Dargestellt ist die Zusammenfassung von 6 unabhängigen qRT-PCR-Analysen. Die Säulen (MW +/- SEM) repräsentieren relative miRNA-155-Mengen in Bezug auf die miRNA-155-Menge in CM-behandelten DLD-1-Zellen. (\*:  $p < 0,05$  vs CM-behandelte DLD-1-Zellen)

Frühere Studien zeigen, dass die miR-155 einen negativen Effekt auf die Expression der *Src homology-2 domain-containing inositol 5-phosphatase 1* (SHIP-1) durch die Interaktion mit deren 3'-UTR ausübt (O'Connell, Chaudhuri et al. 2009; Lee, Futami et al. 2012). Um zu untersuchen, ob die erhöhte miR-155-Expression in Resveratrol-behandelten Zellen zu einer verstärkten miR-155-Aktivität führt, wurden Luciferase-Reportergen-Assays mit einem 3'-

UTR-Konstrukt der SHIP-1 durchgeführt. Dazu wurden DLD-1-Zellen mit den Konstrukten pMIR-SHIP-1 und dem Leervektor pMIR-report transfiziert (8.1.6). Zur Kontrolle der Transfektionseffizienz wurde der Vektor pRLEF1 $\alpha$  cotransfiziert. Nach 30 Stunden wurde ein Mediumwechsel auf serumfreies Medium durchgeführt und 16 Stunden später wurde mit 30  $\mu$ M Resveratrol (Res) für eine Stunde vorinkubiert (8.1.4). Anschließend wurden die Zellen mit Cytokinen (CM) stimuliert, nach sechs Stunden mit PLB lysiert und Luciferase-Assays durchgeführt (8.3.12). Zur Auswertung wurden CM-stimulierte DLD-1-Zellen auf 100 % gesetzt.

Abbildung 9.35 A zeigt die Auswertung der DLD-1-Zellen, die mit dem Leervektor pMIR-report transfiziert wurden. Hier hatte Res einen deutlich signifikanten negativen Effekt im Vergleich zu CM-behandelten Zellen.



**Abbildung 9.35: Analyse der Effekte von Resveratrol auf die Luciferaseaktivität in mit pMIR-report-SHIP-1 transfizierten DLD-1-Zellen**

DLD-1-Zellen wurden mit pMIR-report-SHIP-1 oder dem entsprechenden Kontrollvektor pMIR-report transfiziert. Zur Kontrolle der Transfektionseffizienz wurde der Renilla-Luciferase-Klon pRL-EF1 $\alpha$  cotransfiziert. Nach 30 Stunden erfolgte ein Mediumwechsel auf serumfreies Medium und 16 Stunden später wurden die transfizierten DLD-1-Zellen mit 30  $\mu$ M Resveratrol (Res) oder DMSO in entsprechender Menge behandelt. Nach einer Stunde wurden die Zellen für sechs Stunden mit Cytokinen (CM) stimuliert. Die Zellen wurden mit PLB lysiert und die Luciferase- und Renilla-Aktivität bestimmt. Die Luciferase-Aktivität wurde auf die jeweilige Renilla-Aktivität normiert.

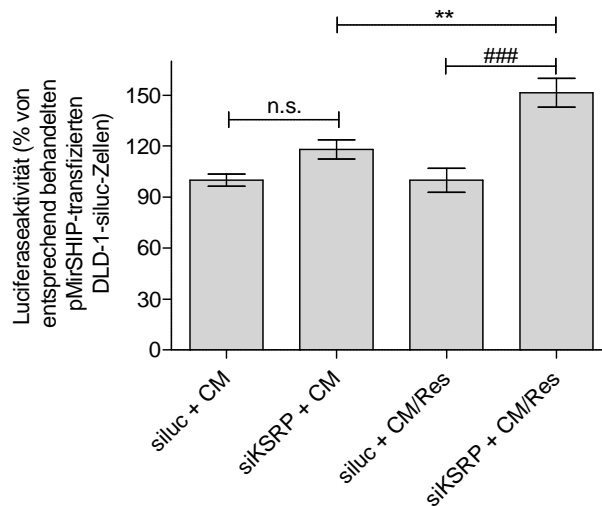
(A) Dargestellt ist die Zusammenfassung aus drei unabhängigen Luciferaseaktivitätsmessungen der pMIR-report-transfizierten DLD-1-Zellen. Die Säulen (MW  $\pm$  SEM) repräsentieren die relative Luciferaseaktivität in Bezug auf die Luciferaseaktivität von CM-stimulierten DLD-1-Zellen (\*\*\*:  $p < 0,001$  vs CM-stimulierten DLD-1-Zellen)

(B) Dargestellt ist die Zusammenfassung des Quotienten pMIR-SHIP-1-3'-UTR/pMIR-report (pMIR-SHIP-1/pMIR-report) von 3 unabhängigen Luciferase-Aktivitätsmessungen der transfizierten DLD-1-Zellen. Die Säulen (MW &  $\pm$  SEM) repräsentieren die relative Luciferaseaktivität in Bezug auf die Luciferaseaktivität von CM-behandelten Zellen. (\*\*\*:  $p < 0,001$  vs CM-stimulierten DLD-1-Zellen)

Um die ausschließliche SHIP-1-3'-UTR-Modulation durch Res darzustellen, wurden die Luciferaseaktivitäten der pMIR-SHIP-1-transfizierten Zellen durch die Luciferaseaktivitäten

der pMIR-report-transfizierten Zellen dividiert. Die ermittelten Quotienten wurden schließlich in Relation zu CM-behandelten DLD-1-Zellen gesetzt. Nach dieser durchgeführten Normierung ließ sich eine 50 % verringerte Luciferaseaktivität in Res-behandelten Zellen im Vergleich zu CM-behandelten Zellen feststellen (Abb. 9.35 B). Die Resveratrol-vermittelte Induktion der miR-155 Expression scheint negativ auf die 3'-UTR der SHIP-1 zu wirken. Um zu analysieren, ob diese Wirkung auf einer gesteigerten KSRP-Aktivität beruht, wurden Luciferase-Assay-Analysen mit dem 3'-UTR-SHIP-1-Konstrukt nach Depletion von KSRP durchgeführt.

Dazu wurden DLD-1-EF1-siluc- (siluc) und DLD-1-EF1-siKSRP-Zellen (siKSRP) mit pMIR-report-SHIP-1 transient transfiziert und, wie oben beschrieben, mit Res behandelt und mit CM stimuliert.



**Abbildung 9.36: Analyse der Effekte von Resveratrol auf die Luciferaseaktivität in mit pMIR-report-SHIP-1 transfizierten siKSRP-Zellen**

DLD-1-siluc-Zellen und DLD-1-siKSRP-Zellen wurden mit pmiR-report-SHIP-1 transfiziert. Zur Kontrolle der Transfektionseffizienz wurde der Renilla-Luciferase-Klon pRL-EF1 $\alpha$  cotransfiziert. Nach 30 Stunden erfolgte ein Mediumwechsel auf serumfreies Medium und 16 Stunden später wurden die transfizierten DLD-1-siluc- bzw. -siKSRP-Zellen mit 30  $\mu$ M Resveratrol (Res) oder DMSO in entsprechender Menge behandelt. Nach einer Stunde wurden die Zellen für sechs Stunden mit Cytokinen (CM) stimuliert. Die Zellen wurden mit PLB lysiert und die Luciferase- und Renilla-Aktivität bestimmt. Die Luciferase-Aktivität wurde auf die jeweilige Renilla-Aktivität normiert.

Dargestellt ist die Zusammenfassung aus drei unabhängigen Luciferaseaktivitätsmessungen. Die Säulen (MW  $\pm$  SEM) repräsentieren die relative Luciferaseaktivität in Bezug auf die Luciferaseaktivität von entsprechend behandelten DLD-1-siluc-Zellen (\*\*:  $p < 0,01$ ; n.s.: nicht signifikant vs CM-behandelten DLD-1-siKSRP-Zellen; ###:  $p < 0,001$  vs Res behandelten DLD-1-siluc-Zellen)

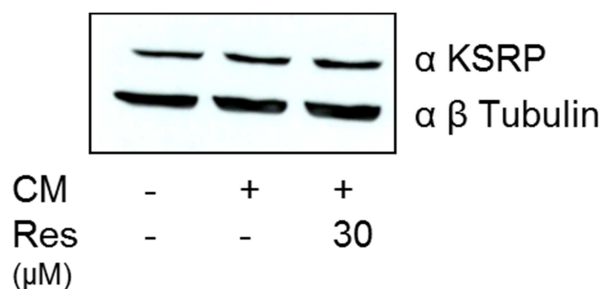
Abbildung 9.36 zeigt, dass kein signifikanter Unterschied der Luciferaseaktivität zwischen DLD-1-siluc und DLD-1-siKSRP-Zellen nach CM-Behandlung bestand. In Res-behandelten siKSRP-Zellen war die Luciferaseaktivität im Vergleich zu siluc-Zellen dagegen signifikant

erhöht. Zusätzlich führte Res in siKSRP-Zellen zu einer um 30 % erhöhten Aktivität der Luciferase unter Kontrolle der SHIP-1-3'-UTR im Vergleich zu einer CM-Behandlung.

Die durchgeführten Analysen zeigen, dass die Behandlung mit Resveratrol die miR-155-Expression erhöht. Dies führt zu einer erhöhten miR-155-Aktivität, was am Beispiel der SHIP-1-3'-UTR nachgewiesen wurde. Diese Wirkung konnte in siKSRP-Zellen aufgehoben werden.

### 9.3.8 Die KSRP-Expression ist in Resveratrol-behandelten Zellen nicht verändert

Bisherige Daten zeigen, dass Resveratrol mit hoher Affinität an KSRP bindet und dass diese Bindung eine Erhöhung der KSRP-vermittelten Effekte verursacht. Man könnte vermuten, dass Resveratrol (Res) einen positiven Einfluss auf die KSRP-Expression ausübt. Um dies zu untersuchen, wurden Zellen mit 30  $\mu$ M Resveratrol (Res) oder DMSO für eine Stunde vorbehandelt. Anschließend wurden die Zellen mit Cytokinen (CM) stimuliert (8.1.4). Zusätzlich wurden Zellen in serumfreien Medium inkubiert. Nach sechs Stunden wurden die DLD-1-Zellen in PLB lysiert. Für die Western Blot Experimente (8.2.5) wurden monoklonale Antikörper zur Analyse von KSRP ( $\alpha$ -KSRP) und zur Ladungskontrolle  $\beta$ -Tubulin eingesetzt. Abbildung 9.37 zeigt, dass die Resveratrol-Behandlung keine Auswirkung auf die KSRP-Expression hatte.



#### Abbildung 9.37: Analyse der Effekte von Resveratrol auf die KSRP-Protein-Expression in DLD-1-Zellen

DLD-1-Zellen wurden mit 30  $\mu$ M Resveratrol (Res) oder DMSO in entsprechender Menge vorbehandelt. Anschließend wurden die Zellen mit Cytokinen (CM) stimuliert und nach sechs Stunden mit PLB lysiert. Für den Western Blot wurden 30  $\mu$ g Proteinextrakt verwendet.

Dargestellt ist ein repräsentativer Blot aus 3 unabhängigen Western Blot Analysen mit einem monoklonalen Antikörper gegen KSRP und  $\beta$ -Tubulin zur Ladungskontrolle.

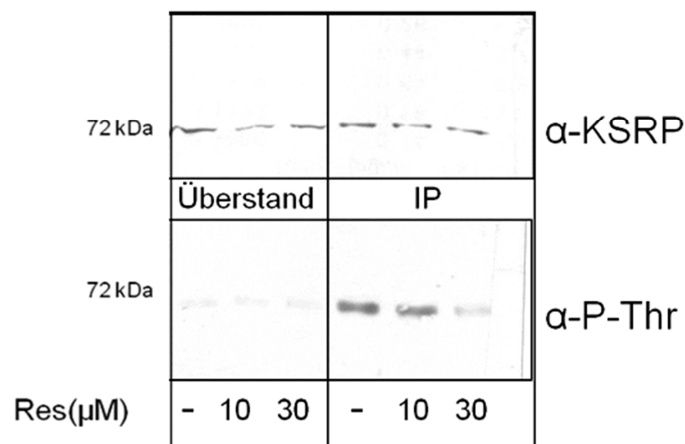
Die KSRP-abhängigen Effekte der Resveratrol-Behandlung können nicht auf eine erhöhte KSRP-Expression zurückgeführt werden.

### 9.3.9 Die Threonin-Phosphorylierung von KSRP ist in Resveratrol behandelten DLD-1-Zellen bei gleichbleibender KSRP-Expression reduziert

Laut bisherigen Literaturdaten wird die Aktivität von KSRP hauptsächlich auf post-translationaler Ebene reguliert. Beispielsweise führt eine p38-MAPK-abhängige Threonin-Phosphorylierung (P-Thr) KSRPs zu einer verminderten Bindung an die ARE der Myogenin- und p21-mRNA und somit zu einer Stabilisierung dieser (Briata, Forcales et al. 2005).

Daher sollte nun untersucht werden, ob eine Resveratrol-Behandlung die P-Thr von KSRP beeinflusst.

Dazu wurden, wie in 8.2.6 beschrieben, Immunpräzipitationsanalysen (IP) mit einem polyklonalen KSRP-Antikörper und Proteinextrakten aus Cytokin-behandelten und Resveratrol-behandelten (Res) Zellen durchgeführt (8.1.4). Anschließend wurde die IP mit einem monoklonalen Antikörper zur Detektion des immunpräzipitierten KSRP ( $\alpha$ -KSRP) kontrolliert und die Phosphorylierung von KSRP an Threonin mit einem monoklonalen Antikörper zur Darstellung von Phospho-Threonin ( $\alpha$ -P-Thr) mittels Western Blot (8.2.5) bestimmt. Zur Kontrolle wurden zusätzlich die Überstände der IP analysiert.



**Abbildung 9.38: Analyse der Threonin-Phosphorylierung von KSRP in Resveratrol-behandelten DLD-1-Zellen**

DLD-1-Zellen wurden mit Resveratrol (Res) in den angegebenen Konzentrationen eine Stunde vorinkubiert. Es folgte eine Cytokinstimulation (CM) für sechs Stunden. Dann wurden die Zellen lysiert, die Extrakte zur Vermeidung von RNA-Protein-Interaktionen mit RNase behandelt und Immunpräzipitationen mit einem polyklonalen Antikörper gegen KSRP durchgeführt.

Dargestellt ist ein repräsentativer Blot für zwei Western-Blot-Analysen mit monoklonalen Antikörpern gegen KSRP und P-Thr (Threonin-Phosphorylierung). Eingesetzt wurden zum Vergleich 20  $\mu$ l des Überstandes der Immunpräzipitation (Überstand) sowie präzipitierte Proteine aus der Immunpräzipitation (IP).

Die KSRP-Proteinmenge war in immunpräzipitierten Extrakten nach Res-Behandlung nicht verändert. Dies zeigt, dass in allen Ansätzen vergleichbare Mengen präzipitiert wurden (Abb.

9.38). Der Blot mit dem P-Thr-Antikörper (Abb. 9.38) zeigt deutlich, dass in immunpräzipitierten Extrakten von Res/CM-behandelten Zellen im Vergleich zu nur CM-stimulierten Zellen ein verringertes Phospho-Threonin-Signal detektiert wurde.

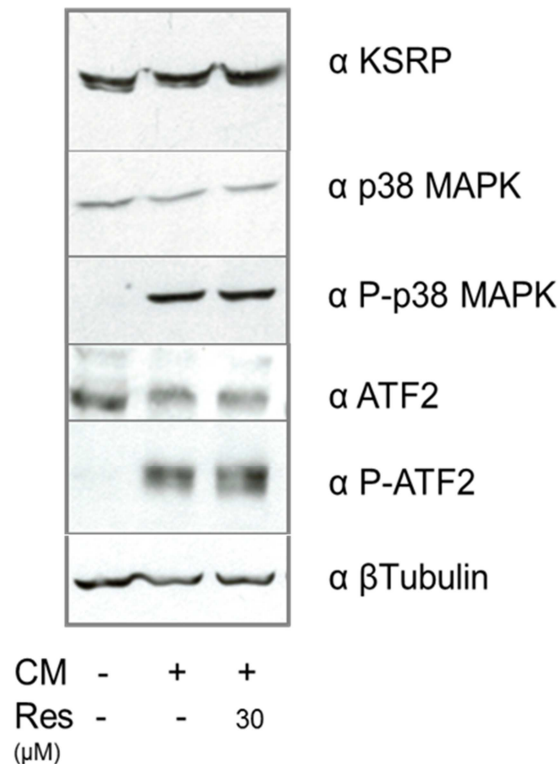
Resveratrol hat demnach eine negative Wirkung auf die p38-MAPK-abhängige Thr-Phosphorylierung von KSRP.

### **9.3.10 Die p38-MAPK-Aktivierung und die p38-MAPK-Aktivität werden durch Resveratrol in DLD-1-Zellen nicht reguliert**

Frühere Studien haben gezeigt, dass Resveratrol über eine SIRT-1-Aktivierung zu einer p38-MAPK-Deaktivierung führt (Seo, Moon et al. 2010). Andere Analysen konnten einen positiven Effekt Resveratrols auf die p38-MAPK nachweisen (Shimizu, Nakazato et al. 2006). Um zu untersuchen, welche Wirkung Resveratrol im verwendeten Zellsystem der DLD-1-Zellen auf die p38-MAPK vermittelt, wurde die Aktivierung und Aktivität dieser analysiert.

Dazu wurden DLD-1-Zellen mit Resveratrol (Res) behandelt und nach einer Stunde mit Cytokinen (CM) stimuliert (8.1.4). Nach 10 Minuten wurde der Versuch mit heißem Lämmli-Puffer beendet. Zur Bestimmung des Res-Effektes auf die p38-MAPK-Aktivierung wurden Western Blot-Experimente (8.2.5) mit Antikörpern zur Detektion der p38-MAPK-Expression ( $\alpha$  p38-MAPK) und zur Ermittlung der aktivierenden Phosphorylierung der p38-MAPK ( $\alpha$  P-p38-MAPK) durchgeführt. Um die Aktivität der p38-MAPK unter Res-Behandlung zu analysieren, wurde ein weiteres Zielprotein der p38-MAPK, der *activating transcription factor 2* (ATF2), untersucht (Lee, Bahn et al. 2010). Hierzu wurde ein Antikörper zur Darstellung der ATF2- ( $\alpha$  ATF2) und Phospho-ATF2-Menge ( $\alpha$  P-ATF2) eingesetzt. Zur Ladungskontrolle wurden Antikörper zur Analyse der  $\beta$ -Tubulin- ( $\alpha$   $\beta$ Tubulin) und KSRP-Expression ( $\alpha$  KSRP) verwendet. Für die beschriebenen Analysen wurden ausschließlich monoklonale Antikörper eingesetzt.

Die Phosphorylierung der p38-MAPK war nach CM-Stimulation im Vergleich zu unbehandelten Zellen induziert (Abb. 9.39). Eine zusätzliche Behandlung mit Res hatte keinen Einfluss auf den Phosphorylierungsstatus der p38-MAPK. Auch die Phosphorylierung des ATF2 war nach CM-Behandlung induziert und ein Effekt von Res war nicht nachweisbar. Demnach werden die Aktivierung und die Aktivität der p38-MAPK durch Resveratrol in DLD-1-Zellen nicht beeinflusst.



**Abbildung 9.39: Analyse der p38-MAPK-Aktivierung und -Aktivität in mit Resveratrol behandelten DLD-1-Zellen**

DLD-1-Zellen wurden mit 30  $\mu\text{M}$  Resveratrol (DMSO) oder DMSO in entsprechender Menge vorbehandelt. Anschließend wurden die Zellen mit Cytokinen (CM) stimuliert, wobei zusätzlich Zellen zur Kontrolle in serumfreien Medium inkubiert wurden. Nach 10 Minuten wurde der Versuch mit heißem Lämmli-Puffer abgestoppt. Für die Western Blot Analysen wurden 20  $\mu\text{l}$  Probe aufgetragen.

Dargestellt ist ein repräsentativer Blot aus 3 unabhängigen Western Blot Analysen mit monoklonalen Antikörpern zur Detektion von KSRP, ATF2, P-ATF2, p38-MAPK, P-p38-MAPK und  $\beta$ -Tubulin zur Ladungskontrolle.

### 9.3.11 Die verringerte Threonin-Phosphorylierung von KSRP durch Resveratrol lässt sich im *in vivo*-Modell der ApoE<sup>-/-</sup>-Mäuse bestätigen

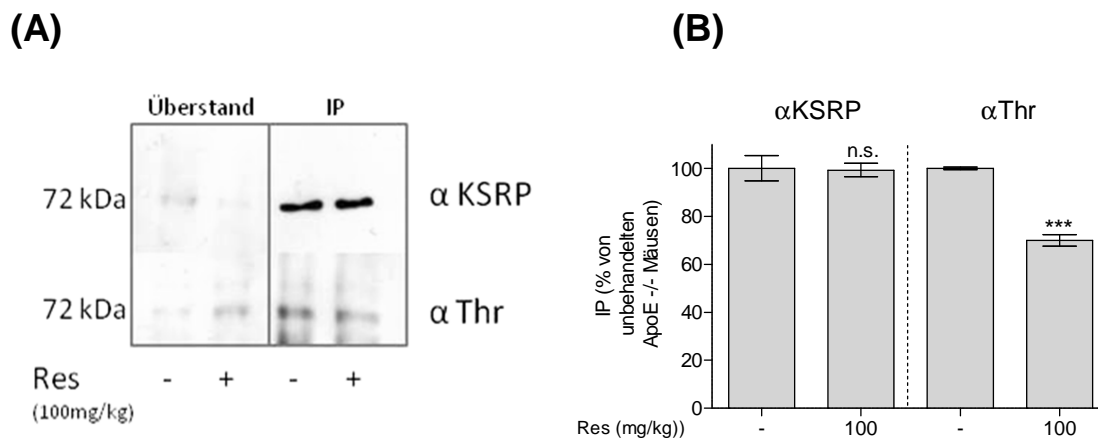
Viele der positiven Effekte Resveratrols sind als cardioprotektiv (Penumathsa and Maulik 2009) und anti-inflammatorisch (Harikumar and Aggarwal 2008) beschrieben worden. Mäuse mit deletiertem ApoE zeigen eine erhöhte Ausprägung atherosklerotischer Symptome, wodurch kardiovaskuläre Erkrankungen vermehrt auftreten (van Ree, van den Broek et al. 1994). Daher wurde das murine ApoE<sup>-/-</sup>-Modell gewählt um die *in situ* gefundenen Ergebnisse *in vivo* zu bestätigen. Zuerst sollte analysiert werden, ob die deaktivierende Threonin-Phosphorylierung von KSRP durch Resveratrol in der Maus moduliert wird.

Dazu wurden ApoE<sup>-/-</sup>-Mäuse mit Resveratrol (Res) in den angegebenen Konzentrationen für sieben Tage oral per Schlundsonde behandelt (8.4.2). Anschließend wurden die Mäuse zur

Organentnahme getötet. Die Milz der Mäuse wurde in RIPA-Puffer lysiert und somit Proteinextrakte hergestellt (8.2.1).

Anschließend wurden Immunpräzipitationsanalysen (IP) mit Proteinextrakten der Milzen unbehandelter und Resveratrol-behandelter ApoE<sup>-/-</sup>-Tiere und einem polyklonalen KSRP-Antikörper durchgeführt (8.2.6). Anschließend wurde ein Western Blot mit einem monoklonalen Antikörper zur Analyse der präzipitierten KSRP-Menge ( $\alpha$  KSRP) durchgeführt und die Threonin-Phosphorylierung unter Verwendung eines monoklonalen P-Threonin-Antikörpers ( $\alpha$  Thr) untersucht (8.2.5). Zusätzlich wurde der Überstand der IP analysiert.

Die Menge an immunpräzipitierten KSRP war in 100 mg/kg Resveratrol-behandelten Mäusen im Vergleich zu unbehandelten ApoE<sup>-/-</sup>-Tieren nicht verändert (Abb. 9.40 A) Die Threonin-Phosphorylierung von KSRP war in Res-behandelten Mäusen reduziert. Diese Beobachtungen lassen sich nach densitometrischer Auswertung bestätigen (Abb. 9.40 B).



**Abbildung 9.40: Analyse der Threonin-Phosphorylierung von KSRP in der Milz von mit Resveratrol behandelten ApoE<sup>-/-</sup>-Mäusen**

ApoE<sup>-/-</sup>-Mäusen wurde pro Tag 100 mg/kg Resveratrol (Res) per Schlundsonde verabreicht. Nach 7 Tagen wurden die Mäuse zur Organentnahme getötet. Aus der Milz wurden Proteinlysate gewonnen, die zur Vermeidung von RNA-Protein-Interaktionen mit RNase behandelt wurden. Schließlich wurden Immunpräzipitationen mit einem polyklonalen KSRP-Antikörper durchgeführt.

(A) Dargestellt ist ein repräsentativer Blot mit monoklonalen Antikörpern zur Analyse von KSRP und P-Thr (Threonin-Phosphorylierung). Eingesetzt wurden 20  $\mu$ l des Überstandes der Immunpräzipitation (Überstand) sowie präzipitierte Proteine aus der Immunpräzipitation (IP).

(B) Dargestellt ist die densitometrische Auswertung der beschriebenen Immunpräzipitation. Die Intensitäten der unbehandelten Mäuse wurden zur Auswertung als 100 % gesetzt.

### 9.3.12 In Resveratrol behandelten ApoE-defizienten Tieren ist die mRNA-Expression von KSRP-regulierten Genen reduziert

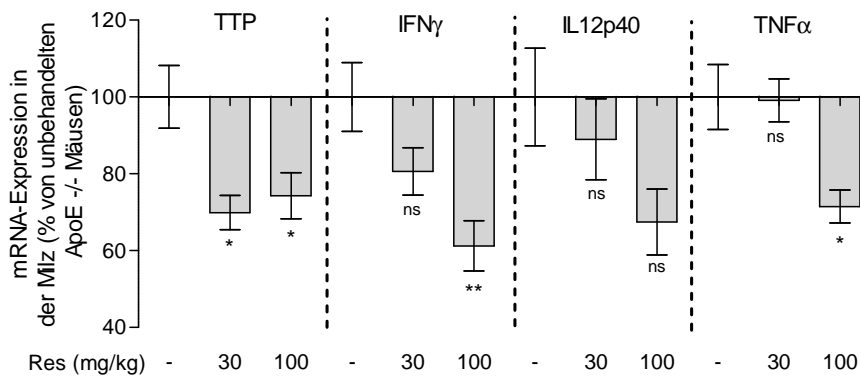
Ob Resveratrol einen Einfluss auf die mRNA-Expression bestimmter KSRP-Zielgene in Resveratrol-behandelten ApoE<sup>-/-</sup>-Tieren ausübt und ob damit die Reduktion der Thr-



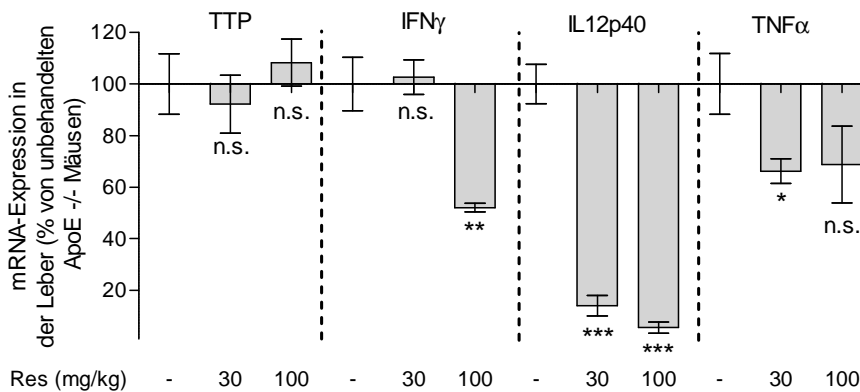
Phosphorylierung von KSRP nach Res-Gabe in Verbindung gebracht werden kann, sollte in qRT-PCR-Experimenten analysiert werden. Dazu wurden die Mäuse mit Resveratrol in den angegebenen Konzentrationen oral per Schlundsondierung behandelt (8.4.2). Nach sieben Tagen wurden die Mäuse zur Organentnahme getötet, die Organe bzw. Gewebe Milz, Leber, Darm und Aorta in GIT-Puffer lysiert und die RNA isoliert (8.3.1). Anschließend wurde die RNA revers transkribiert (8.3.5) und mittels qRT-PCR-Analysen quantifiziert (8.3.7). Dargestellt sind die relativen mRNA-Mengen bezogen auf die mRNA-Menge in unbehandelten ApoE<sup>-/-</sup>-Mäusen.

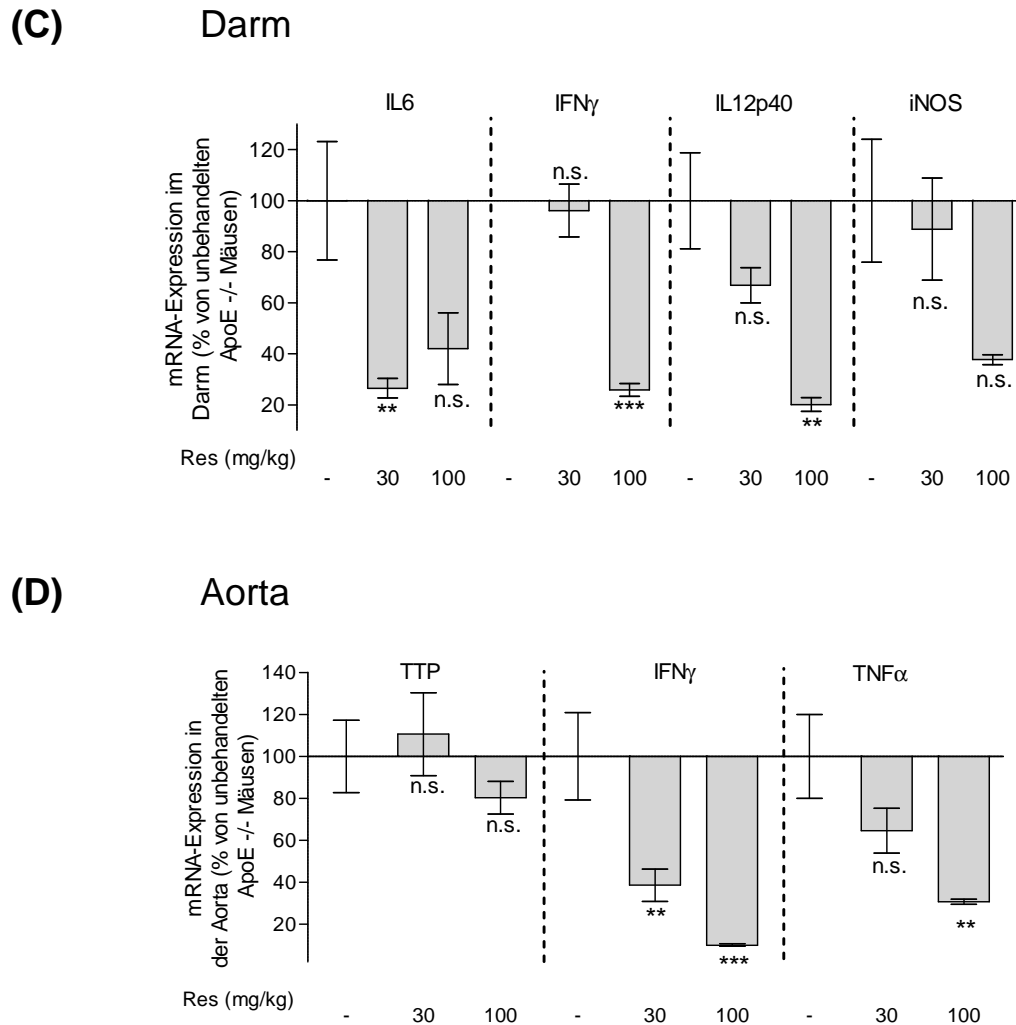
In der Milz (Abb. 9.41 A) und der Leber (Abb. 9.41 B) wurde die mRNA-Menge der Gene TTP, IFN- $\gamma$ , IL-12p40 und TNF- $\alpha$  bestimmt. Im Milzgewebe zeigten alle untersuchten mRNAs eine verringerte Expression durch eine Behandlung mit Resveratrol. Dabei war TTP auf 70 %, IFN- $\gamma$  auf 60 %, IL-12p40 tendentiell auf 70 % und TNF- $\alpha$  signifikant auf 75 % reduziert. In der Leber war keine TTP-Modulation durch Resveratrol nachzuweisen (Abb. 9.41 B).

**(A) Milz**



**(B) Leber**





**Abbildung 9.41: Analyse der Effekte von Resveratrol auf die pro-inflammatorische Genexpression in verschiedenen Organen von ApoE-defizienten Mäusen**

*ApoE<sup>-/-</sup>-Mäusen wurde pro Tag Resveratrol (Res) in den angegebenen Konzentrationen per Schlundsonde verabreicht. Nach 7 Tagen wurden die Mäuse zur Organentnahme getötet. Aus der Milz (A), Leber (B), Darm (C) und der Aorta (D) wurde die RNA isoliert und die mRNA-Expression von TTP, IL6, IFN $\gamma$ , IL-12p40, iNOS, TNF- $\alpha$  bestimmt.*

*Gezeigt ist die Auswertung von zwei unabhängigen qRT-PCR-Analysen. Die Säulen (MW  $\pm$  SEM) repräsentieren relative mRNA-Mengen in Bezug auf die mRNA-Menge in unbehandelten ApoE<sup>-/-</sup>-Mäusen (-) (\*\*\*:  $p < 0,001$ ; \*\*:  $p < 0,01$ ; \*:  $p < 0,05$ ; n.s.: nicht signifikant verschieden vs un behandelter ApoE<sup>-/-</sup>-Mäusen)*

Dagegen war auch hier die IFN- $\gamma$ -mRNA-Expression signifikant auf 50 % und die TNF- $\alpha$ -mRNA-Expression auf 60 % in Resveratrol-behandelten Mäusen im Vergleich zu Kontrollmäusen verringert. Die IL-12p40-mRNA war nach Resveratrol-Gabe sogar auf 10 % reduziert.

Im Darm wurden neben IFN- $\gamma$  und IL-12p40 die im Darm konstitutiv exprimierte iNOS-mRNA-Menge und die IL6-Menge analysiert (Abb. 9.41 C). Die Expression der IL-6-, IFN- $\gamma$ - und IL-12p40-mRNA waren in 100 mg/kg Res-behandelten Mäusen signifikant auf 30 %

reduziert. Weiterhin war die iNOS-mRNA-Expression nach Res-Behandlung tendentiell verringert.

In der Aorta konnte IL-12p40 nicht detektiert werden, daher ist nur die TTP, IFN- $\gamma$  und TNF- $\alpha$  Expression dargestellt. Abbildung 9.41 D zeigt keine Regulation der TTP-mRNA durch Resveratrol. Die IFN $\gamma$ -mRNA-Menge war dagegen auf 20 % und die TNF- $\alpha$ -Expression auf 40 % in Res-behandelten Mäusen im Vergleich zu Kontrollmäusen reduziert.

Diese Ergebnisse zeigen, dass eine Behandlung mit Resveratrol die mRNA-Expression verschiedener pro-inflammatorischer Gene in ApoE<sup>-/-</sup>-Mäusen reduziert, die in früheren Studien als KSRP-Zielgene beschrieben wurden.

## 10 Diskussion

### 10.1 Die Analyse der KSRP-Expression und die Identifizierung neuer Zielgene in Modellen der rheumatoiden Arthritis

#### 10.1.1 Die mRNA-Expression des Biomarkers der rheumatoiden Arthritis S100A8 ist in verschiedenen Geweben Collagen Typ II-immunisierter Mäuse erhöht

Die Pathogenese chronisch-inflammatorischer Erkrankungen, wie der rheumatoiden Arthritis (RA), ist durch eine fehlerhafte Regulation pro-inflammatorischer Mediatoren wie Cytokine (IL-1 $\beta$ , IFN- $\gamma$ , S100A8, TNF- $\alpha$ ), Chemokine (IL-8, MCP-1), Adhäsionsmoleküle (ICAMs), inflammatorische Enzyme (iNOS, COX-2, lösliche Phospholipase A<sub>2</sub>, Matrixmetalloproteasen) aber auch angiogenetischer Wachstumsfaktoren (VEGF, FGF-1, FGF-2) gekennzeichnet (Malemud 2007; Voulgari 2008). Bei der Regulation dieser Gene spielen post-transkriptionelle Mechanismen wie die Modulation der mRNA-Stabilität und -Translatierbarkeit über die Bindung mRNA-bindender Proteine sowie über microRNAs eine entscheidende Rolle. Im Rahmen dieser Arbeit sollten die Effekte des mRNA-bindenden *KH-type splicing regulatory protein* KSRP auf die pro-inflammatorische Genexpression in der rheumatoiden Arthritis untersucht werden. TCR $\beta$ -TG-Mäuse wurden mit Collagen Typ II (CII) immunisiert, um eine Arthritis zu induzieren, welche die Symptomatik der rheumatoiden Arthritis imitiert. Nach 25 Tagen wurde eine deutliche Schwellung der Pfoten CII-immunisierter Mäuse nachgewiesen (Abb. 9.3). Eine frühere Studie mit Harlan DBA/1-Mäusen zeigte durch eine direkte *ex vivo*-Messung der Genregulation in Pfoten eine STAT3-Aktivierung, die mit dem Grad der Schwellung korrelierte und eine erhöhte Expression der Cytokine IL-12, IL-1 $\beta$  und IL-6 zur Folge hatte (Lu, Stump et al. 2010). Koenders wies auf die durch die Überexpression von IL-17 und TNF- $\alpha$  hervorgerufene irreversible Knorpelschädigung und eine erhöhte Expression von S100A8, IL-1 $\beta$  und MMP3 hin (Koenders, Marijnissen et al. 2011). Zusätzlich wurde in der entzündeten Synovialis von RA-Patienten eine induzierte S100A8-, S100A9- und S100A12-Expression nachgewiesen, so dass diese Proteine als Biomarker postuliert werden (Baillet, Trocme et al. 2010). Wie in Abbildung 9.4 gezeigt, konnte eine signifikant erhöhte S100A8-mRNA-Expression in den Pfoten CII-immunisierter Mäuse bestätigt werden. Aber auch in der Milz und in PBMC wurde eine erhöhte S100A8-Menge nachgewiesen.

Diese Induktion des Biomarkers S100A8 in allen analysierten Geweben unterstreicht die Ausbildung der CII-induzierten Arthritis in den hier verwendeten TCR $\beta$ -TG-Mäusen (9.1.1).

### 10.1.2 Die KSRP-Expression ist im Verlauf der Collagen-induzierten Arthritis reguliert

Eine Dysregulation der pro-inflammatorischen Genexpression ist eine der Ursachen für die chronische Entzündung der Gelenke. Neben der transkriptionellen Modulation der Expression spielen post-transkriptionelle Mechanismen eine entscheidende Rolle. Die Modulation der Stabilität, Lokalisation und Translatierbarkeit der mRNAs geschieht über die Interaktion mRNA-bindender Proteine mit spezifischen Zielstrukturen, wie AU-reicher Elemente (ARE), die in der 3'-UTR pro-inflammatorischer Gene gelegen sind. Den ARE-bindenden Proteinen Tristetraprolin (TTP) (Tsutsumi, Suzuki et al. 2004) und HuR (Suzuki, Tsutsumi et al. 2006) wird eine wichtige Bedeutung in der Regulation der TNF- $\alpha$ -Expression in der Synovialis von RA-Patienten zugeschrieben. Koga wies in *fibroblast like synovial* (FLS)-Zellen von RA-Patienten eine negative IL-6-Regulation durch das mRNA-Bindeprotein Zc3h12a nach (Koga, Yamasaki et al. 2011).

Ein weiterer post-transkriptioneller Mechanismus ist die Modulation der mRNA-Stabilität und/oder -Translatierbarkeit durch die Bindung von miRNAs über den *RNA-induced Silencing Complex* (RISC). Dieser bindet über die miRNA an die 3'-UTR und führt bei vollständiger Homologie zum Abbau der mRNA. Die Regulation pro-inflammatorischer Gene in der RA über miRNAs gewinnt zunehmend an Bedeutung (Ceribelli, Nahid et al. 2011; Mizoguchi and Kohsaka 2012). So wurde eine erhöhte miR-146a- (Pauley, Satoh et al. 2008) und miR-155-Expression (Leah 2011) nachgewiesen. Das mRNA-bindende Protein KSRP, das im Rahmen dieser Arbeit untersucht wurde, reguliert auf post-transkriptioneller Ebene die Stabilität pro-inflammatorischer Gene direkt über ARE-Bindung (Gherzi, Lee et al. 2004) und indirekt über die Beteiligung an der miRNA-Prozessierung (Trabucchi, Briata et al. 2009). Sowohl TNF- $\alpha$  (Nguyen-Chi and Morello 2008) als auch die miR-155 (Ruggiero, Trabucchi et al. 2009), die in der Pathogenese der RA als wichtige Mediatoren beschrieben wurden, werden als KSRP-Zielgene postuliert. Daher ist eine Beteiligung KSRP-vermittelter Mechanismen in der RA wahrscheinlich. Eine Regulation der KSRP-Expression im Verlauf der RA könnte die Modulation pro-inflammatorischer Zielgene beeinflussen. In PBMC CII-immunisierter TCR $\beta$ -TG-Mäuse wurde eine regulierte KSRP-mRNA-Expression detektiert (Abb. 9.5). Vorwiegend war hier eine reduzierte KSRP-Expression erkennbar. Frühere Studien zeigten eine erhöhte IFN- $\gamma$ -Expression in T-Zellen, die aus der Synovia von RA-Patienten isoliert wurden, im Gegensatz zu T-Zellen, die aus dem Blut isoliert wurden (Snir, Backlund et al. 2012). Dies ist ein Hinweis auf eine reduzierte pro-inflammatorische Genexpression in PBMC. Dadurch könnte die verringerte KSRP-Expression erklärt werden. Die Pfoten sind der Ort der Invasion von entzündlichen Immunzellen, die zu der Entzündung der Synovialis und zur Pannusausbildung führen. In dieser Arbeit wurden die Synovialis und Synovia nicht isoliert, sondern die gesamte Pfote für Genexpressionsanalysen verwendet.

Dadurch können die Effekte auf die KSRP-Expression durch nicht entzündetes Gewebe verändert werden.

Es wurde trotzdem eine erhöhte KSRP-Expression in Pfoten CII-immunisierter Mäuse an Tag 29 nachgewiesen (Abb. 9.5). Analysen aus der Literatur befassten sich vorwiegend mit der Untersuchung der Genexpression in der Synovia und in der Synovialis von RA-Patienten. Hier ist eine erhöhte Expression der KSRP-Zielgene TNF- $\alpha$  (Suzuki, Tsutsumi et al. 2006), IL-8 (Onodera, Nishihira et al. 2004), der iNOS (Grabowski, Wright et al. 1997) und miR-155 (Murata, Yoshitomi et al. 2010) beschrieben. Die erhöhte KSRP-Expression könnte negativ auf die Regulation dieser Gene wirken und zur Abwehr der autoimmunologischen Mechanismen führen.

In der Milz wurde an Tag 12 eine erhöhte KSRP-Expression in CII-immunisierten Mäusen nachgewiesen. Diese war an Tag 25 sogar 2,5-fach induziert (Abb. 9.5). Die erhöhte KSRP-mRNA-Expression in der Milz an Tag 25 konnte auf Proteinebene nicht bestätigt werden. Hier ist eine erhöhte KSRP-Expression CII-immunisierter Mäuse verzögert an Tag 33 zu detektieren (Abb. 9.6). In der Literatur fanden sich andere Hinweise auf eine nicht übereinstimmende RNA- und Proteinsynthese. Es wurde eine erhöhte S100A8- und IL-8-mRNA-Expression in isoliertem Gewebe von Ischämie-Patienten beschrieben, die auf Proteinebene nicht nachgewiesen werden konnte (Dragu, Schnurer et al. 2011). Dies ist vermutlich auch auf eine verzögerte Proteinexpression der aufgezeigten Gene zurückzuführen. Andere Studien zeigten eine verzögerte Protein-Expression im Vergleich zur mRNA-Expression in *in situ*-Analysen (Fournier, Paulson et al. 2010).

Die Milz dient als Blutspeicher, ermöglicht den Abbau überalterter Erythrozyten und führt neben den Lymphknoten zur Aktivierung von Lymphozyten. In der Milz vorkommende Makrophagen beseitigen opsonisierte Pathogene. Die Milz ist im Gegensatz zu den Lymphknoten an den offenen Blutkreislauf angeschlossen, so dass Antigene sie ausschließlich über den Blutkreislauf erreichen. Bei einer Verschleppung von Bakterien in das Blut kommt es zu einer erhöhten Aktivierung und Ansammlung von Lymphozyten und zu einem Anschwellen der Milz. CII-immunisierte Mäuse zeigten eine deutliche Vergrößerung der Milz im Vergleich zu Kontrollmäusen (Abbildung nicht gezeigt). Somit ist hier eine Ansammlung von aktivierten Lymphozyten sehr wahrscheinlich. Diese hohe Dichte an Immunzellen ermöglichte die Analyse verschiedener aus der Milz isolierter Immunzelltypen.

Dabei wurde vor allem in Makrophagen CII-immunisierter Mäuse eine deutlich erhöhte KSRP-mRNA-Expression detektiert (Abb. 9.7). Makrophagen sind Immunzellen des unspezifischen Abwehrsystems, die durch die Sekretion verschiedener pro-inflammatorischer Mediatoren (IL-6, TNF- $\alpha$ , IL-8) und die Aktivierung synovialer Fibroblasten eine entscheidende Bedeutung in der Pathogenese der RA einnehmen (Drexler, Kong et al. 2008; Voulgari 2008). Diese genannten Effektoren wurden bereits als KSRP-Zielgene

beschrieben (Winzen, Thakur et al. 2007; Nguyen-Chi and Morello 2008). Zusätzlich wird eine erhöhte NO-Produktion durch die in Makrophagen exprimierte iNOS im Verlauf der RA nachgewiesen, was zur Zerstörung des Knorpels beiträgt (Miyasaka and Hirata 1997). Die mRNA der iNOS wird durch KSRP negativ reguliert (Linker, Pautz et al. 2005), so dass eine erhöhte KSRP-Expression in Makrophagen die iNOS-Expression reduzieren könnte. Eine erhöhte KSRP-abhängige miR-155-Expression in Makrophagen nach LPS-Stimulation wurde bereits nachgewiesen (Ruggiero, Trabucchi et al. 2009). Hier wurde KSRP über die Prozessierung der miR-155 anti-inflammatorisches Potential aufgrund der Destabilisierung pro-inflammatorischer Gene zugesprochen. Andere Analysen in der Synovia CII-immunisierter Mäuse deuteten auf eine pro-inflammatorische Wirkung der miR-155 hin, da diese miRNA die Expression des anti-inflammatorischen SHIP-1 hemmt. In Mäusen, die keine miR-155 exprimieren, konnte entsprechend keine Arthritis ausgelöst werden (Kurowska-Stolarska, Alivernini et al. 2011). Somit kann KSRP, abhängig vom Ort und Mechanismus, möglicherweise pro- oder anti-inflammatorisch wirken. Die KSRP-Expression in T-Zellen der Milz CII-immunisierter Tiere war nicht reguliert (Abb. 9.7). Eine erhöhte IFN- $\gamma$ -Expression in synovialen T-Zellen von RA-Patienten wurde nachgewiesen. In T-Zellen, die aus dem Blut isoliert wurden, konnte eine solche Erhöhung nicht festgestellt werden (Snir, Backlund et al. 2012). Somit könnte möglicherweise im entzündeten Gewebe der Synovialis eine regulierte KSRP-Expression in T-Zellen bestehen, die in der Milz nicht nachzuweisen war. Dies müsste in weiteren Analysen untersucht werden.

Die nicht einheitliche KSRP-Expression in PBMC, Pfoten und Milz kann darauf zurückgeführt werden, dass das Blut als Transportmedium für die Immunzellen fungiert. Die Dichte an Immunzellen ist hier nicht hoch und nicht konstant. Die Immunzellen werden nach Induktion der Entzündung in der Milz aktiviert und gelangen über das Blut in die entzündete Synovia. Während die höchste KSRP-Expression in den Pfoten gemessen wurde, wurde gleichzeitig die geringste KSRP-Expression im Blut nachgewiesen (Abb. 9.5). Zusammenfassend ist zu sagen, dass die KSRP-Expression im Verlauf der Collagen-induzierten Arthritis deutlich reguliert wird. Die Analyse der Funktion dieser Regulation ist von entscheidender Bedeutung, da KSRP auf unterschiedliche Art und Weise die Genexpression moduliert.

### **10.1.3 Das humane Arthritis-Modell der C28/I2-Chondrozyten zeigt bei einer Überexpression von KSRP eine Reduktion bekannter KSRP-Zielgene**

Zur weiteren molekularen Analyse wurde ein *in situ*-Modell von humanen immortalisierten C28/I2-Chondrozyten verwendet (Robbins and Goldring 1999). Chondrozyten werden in der Pathogenese der RA durch Cytokine wie IL-1, IL-18 und TNF- $\alpha$  induziert, können diese

Cytokine aber auch selbst generieren. Dadurch sind sie am Abbau der EZM beteiligt und verhindern anabolische Reparaturmechanismen, wodurch der Abbau des Knorpels während der RA unterstützt wird (Otero and Goldring 2007). Die verwendeten C28/I2-Chondrozyten wiesen keine erhöhte KSRP-Expression nach Induktion mit Cytokinen (Abb. 9.8) auf. Analysen in humanen epithelialen DLD-1-Kolonkarzinom-Zellen zur Regulation der iNOS hatten schon gezeigt, dass eine Inkubation mit Cytokinen die KSRP-Expression in diesen Zellen nicht beeinflusst (Linker, Pautz et al. 2005). Somit wurden C28/I2-Zellen mit einer Überexpression von KSRP generiert (Abb. 9.9-9.10). Die erhöhte KSRP-Expression reduzierte eine durch Cytokin-Behandlung induzierte Expression der Ziel-mRNAs der iNOS (Linker, Pautz et al. 2005), TNF- $\alpha$  (Nguyen-Chi and Morello 2008) und IL-8 (Winzen, Thakur et al. 2007) (Abb. 9.11). Eine bedeutende Funktion dieser Proteine im Verlauf der RA wurde bereits beschrieben (van't Hof, Hocking et al. 2000; Voulgari 2008). Somit wurde ein Modell generiert, das die Funktionen von KSRP innerhalb entzündlicher Vorgänge nachweisen kann. Unter Verwendung der Chondrozyten gelang eine direkte Verbindung zur rheumatoiden Arthritis.

#### **10.1.4 Der Vergleich der im Modell der CIA und der KSRP-überexprimierenden Chondrozyten regulierten Gene zeigt eine signifikante Regulation pro-inflammatorischer und pro-angiogenetischer Gene**

Schließlich wurden die Ergebnisse der beschriebenen Modelle der RA unter Verwendung der DNA-Microarray-Technik miteinander kombiniert. Hier wurden 61 Gene identifiziert, die nach Cytokin-Induktion in KSRP-überexprimierenden Chondrozyten im Vergleich zu Kontrollzellen reguliert werden und gleichzeitig im Modell der CIA in Pfoten CII-immunisierten Mäuse moduliert werden (Abb. 9.12). Eine Auswahl wurde in Tabelle 9.1 dargestellt. Dabei zeigt sich, dass die Expression von SPARC, MMP2, MMP3, PLA2G2D, GZMA, HPSE, TNMD und IL-18-R1 durch eine KSRP-Überexpression in Chondrozyten reduziert wurde. Die mRNA-Menge aller aufgezählten Gene war in CII-immunisierten Mäusen im Vergleich zu PBS-behandelten Mäusen induziert. Im folgenden Abschnitt soll die Bedeutung der Regulation dieser Gene durch KSRP für die Pathogenese der RA diskutiert werden.

SPARC (*Secreted protein acidic and rich in cysteine* - Osteonectin) ist ein Glykoprotein, das in der EZM während Umbau- und Entwicklungsvorgängen sowie Entzündungen exprimiert und sezerniert wird. Es ist in der Lage, mehrere Calcium-Ionen aufzunehmen, bindet an Matrixproteine wie Collagen und reguliert Matrix-Zell-Interaktionen. Regulatorische Funktionen während der Knochenbildung und -mineralisation, der Angiogenese und Fibrose wurden beschrieben (Rivera, Bradshaw et al. 2011). In der Synovia und im Knorpel von RA-



Patienten wurde eine erhöhte SPARC-Expression nachgewiesen (Nakamura, Kamihagi et al. 1996). Weiterhin ist SPARC in der Lage, die Expression der Matrix-Metalloproteasen MMP2 und MMP3 zu induzieren (McClung, Thomas et al. 2007; McCurdy, Dai et al. 2011). Eine erhöhte Expression von SPARC in CII-immunisierten Mäusen führt demnach wahrscheinlich zu einem erhöhten Abbau von dem im Knorpel vorhandenen Collagen und Proteoglykanen. Weiterhin wird möglicherweise die Angiogenese induziert, wodurch die Ausbildung des hyperplastischen Pannus unterstützt wird. Es konnten ARE innerhalb der SPARC-mRNA identifiziert werden (Tabelle 9.1), so dass eine direkte Modulation durch mRNA-BPs wie KSRP anzunehmen ist. Die verringerte SPARC-Expression, die in KSRP-überexprimierenden Chondrozyten nachgewiesen wurde, könnte zu einer Reduktion der oben beschriebenen pathogenen Mechanismen führen.

Proteine der Matrix-Metalloproteinase-Familie sind in physiologischen und pathophysiologischen Prozessen am Abbau der extrazellulären Matrix beteiligt (Sternlicht and Werb 2001). MMP2 und -3 werden durch TNF- $\alpha$  und IL-1 $\beta$  induziert und führen zum Abbau von Collagen Typ IV. MMP3 degradiert zusätzlich Fibronectin, Laminin, Collagen III, IX, und X sowie im Knorpel vorhandene Proteoglykane. MMP3 wurde bereits als möglicher Biomarker zur Prognose der Gelenkschädigung postuliert, was die Bedeutsamkeit der MMPs im Krankheitsverlauf der RA unterstreicht (Mamehara, Sugimoto et al. 2010). In immortalisierten Chondrozyten wurde eine Induktion der MMPs durch den Angiogenese-Faktor VEGF (*vascular endothelial growth factor*) beschrieben (Pufe, Harde et al. 2004). Die MMP3-mRNA weist im Gegensatz zu der MMP2-mRNA ARE auf, so dass die nachgewiesene Reduktion der Expression dieser Gene in KSRP-überexprimierenden Chondrozyten unterschiedlich realisiert werden könnte. MMP3 könnte direkt durch eine Bindung von KSRP moduliert werden, dagegen ist die Regulation von MMP2 wahrscheinlich ein indirekter Effekt. Umfassend könnte die Reduktion der MMPs durch KSRP der Knorpeldestruktion entgegenwirken und somit die Symptome der RA verringern.

Interleukin-18 (IL-18) ist ein pro-inflammatorisches Cytokin, das in der Synovialis und Synovia von RA-Patienten vermehrt nachgewiesen wurde. Es wird vorwiegend in synovialen Makrophagen, aber auch in synovialen Fibroblasten, Endothelzellen, dendritischen Zellen, Chondrozyten und Osteoblasten exprimiert (Volin and Koch 2011). Es induziert die Expression von Adhäsionsmolekülen (ICAM-1, VCAM-1) und die Freisetzung von Chemokinen (IL-8, CXCL8), was zum Fortschreiten der Inflammation führt (Morel, Park et al. 2001; Morel, Park et al. 2001). Zusätzlich exprimieren IL-18-regulierte Fibroblasten angiogenetische Chemokine und VEGF, so dass IL-18 indirekt die Angiogenese induziert. Als direkter angiogenetischer Mechanismus bindet IL-18 an Endothelzellen und vermittelt die Zell-Migration (Volin and Koch 2011). Diese beschriebenen inflammatorischen und angiogenetischen Prozesse führen zu einer fortschreitenden Ausbildung der Pannus-

Hyperplasie und zum Untergang des Knorpelgewebes. Vermittelt werden die IL-18-Wirkungen über den IL-18 Rezeptor (IL-18-R), der in CII-immunisierten Mäusen erhöht exprimiert wurde (Tabelle 9.1). Die Reduktion des IL-18-R durch eine KSRP-Überexpression, wie in dieser Arbeit in humanen immortalisierten Chondrozyten beschrieben, könnte die beschriebenen IL-18-vermittelten Mechanismen verringern, womit KSRP anti-inflammatorisch und anti-angiogenetisch wirken würde.

Die Phospholipase-A2 (PLA2)-Superfamilie umfasst 15 Gruppen, die intrazellulär oder sekretiert vorliegen und Phospholipide von Zellmembranen hydrolysieren. Damit entstehen Lysophospholipide und freie Arachidonsäure, die intrazellulär als *second messenger* wirken können. Die Arachidonsäure ist zusätzlich die Vorstufe von Eicosanoiden (Prostaglandine, Leukotriene), deren Bildung durch die COX und Lipoxygenase katalysiert werden. Diese pro-inflammatorischen Mediatoren werden im Verlauf der Inflammation, Proliferation, Apoptose und Atherosklerose verstärkt gebildet (Berezat 1996; Menschikowski, Hagelgans et al. 2006). PLA2G2D (Phospholipase A2 Gruppe IID) gehört zur Gruppe 2 der Phospholipasen A2, die untereinander hohe Homologien aufweisen. Am besten charakterisiert ist die PLA2G2A, die zum ersten Mal als Protein in der Synovia von RA-Patienten beschrieben wurde (Seilhamer, Pruzanski et al. 1989). PLA2s werden von Endothelzellen, Mastzellen, Neutrophilen, Makrophagen, Chondrozyten und Synoviozyten synthetisiert und nach Aktivierung durch Cytokine (IL-6, TNF- $\alpha$ ) oder Chemokine (IL-8) sekretiert. In der RA wurde die Expression der Phospholipasen der Gruppe 2 inklusive der PLA2G2D nachgewiesen und eine erhöhte Prostaglandin-Produktion in immortalisierten Synoviozyten detektiert (Masuda, Murakami et al. 2005). In KSRP-überexprimierenden Chondrozyten war die PLA2G2D-mRNA-Expression reduziert, wodurch weniger Arachidonsäure und schließlich Eicosanoide gebildet werden können. Die Folge könnte die Reduktion der Eicosanoid-abhängigen Modulation von Enzymen (PKC) sowie die Reduktion der Expression pro-inflammatorischer Gene (TNF- $\alpha$ ) sein (Berezat 1996).

Granzym A (GZMA) ist eine in der Granula von zytotoxischen T-Lymphozyten vorkommende spezifische Serinprotease, die für die Apoptose körpereigener und -fremder Zellen verantwortlich ist. Eine erhöhte Expression von Granzym B wurde in humanen Chondrozyten (Horiuchi, Saito et al. 2003) und Makrophagen (Kim, Kim et al. 2007) im Verlauf der RA nachgewiesen, so dass die Expression anderer Granzyme wie GZMA in diesen Zellen wahrscheinlich ist. In der Synovia und in Geweben von RA-Patienten wurde eine induzierte Expression von löslichem GZMA nachgewiesen. Weiterhin wurden Granzym-positiven Zellen eine entscheidende Rolle in der Apoptose, für die extrazelluläre Proteolyse und der Cytokin-Induktion zugeschrieben und als möglicher Marker für RA in Betracht gezogen (Tak, Spaeny-Dekking et al. 1999). Eine erhöhte Expression von KSRP könnte eine induzierte GZMA-

Expression reduzieren und die beschriebenen Mechanismen während einer Autoimmunreaktion abschwächen.

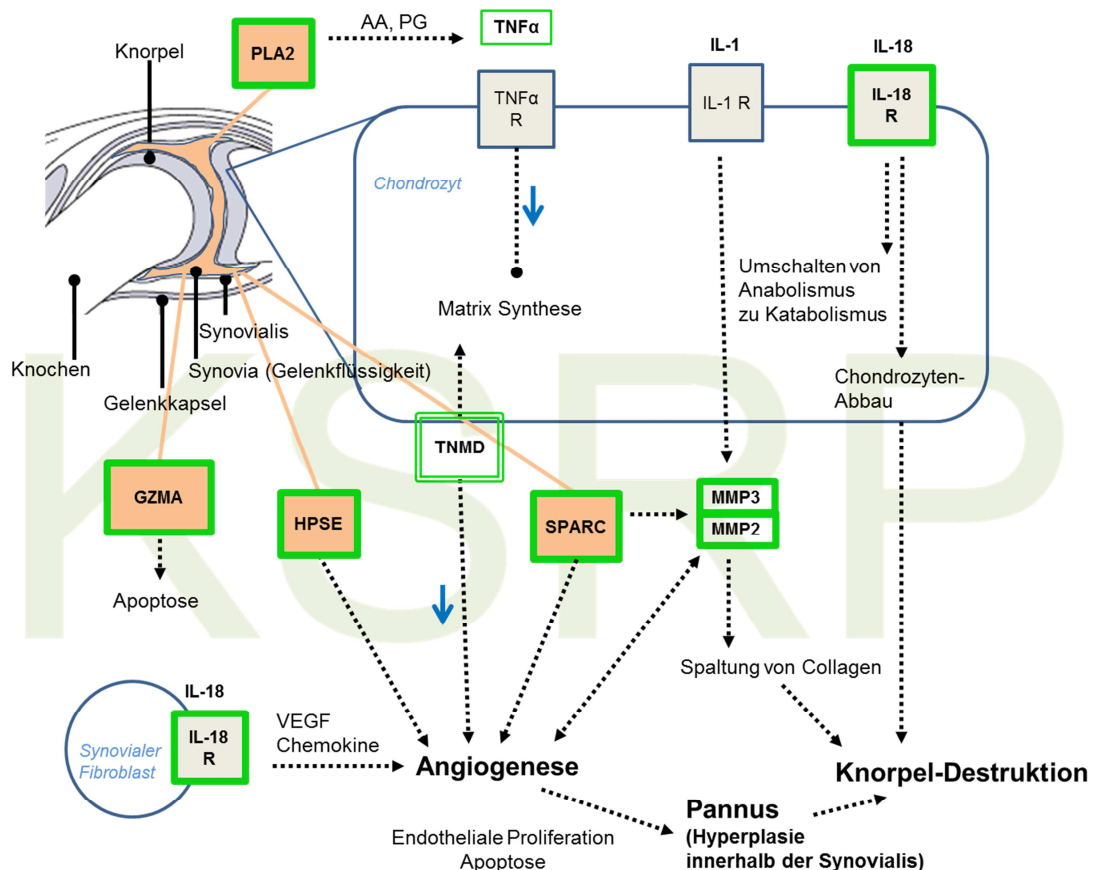
Heparansulfat (HS) ist ein anionisches Glykosaminoglykan, Bestandteil von HS-Proteoglykanen und somit der EZM. Es spielt eine entscheidende Rolle in physiologischen und pathologischen Umbaumechanismen der EZM durch die Abstimmung der Aktivität von angiogenetischen Wachstumsfaktoren und Chemokinen (Sanderson, Yang et al. 2004). Die Endoglucoronidase Heparanase (HPSE) ist ein Proenzym und fördert die Angiogenese durch die Spaltung von EZM-HS, was zur Abgabe EZM-gebundener Wachstumsfaktoren (FGF), Enzymen (MMPs) und Cytokinen (TNF- $\alpha$ ) führt (Li, Freeman et al. 2008). Neben der Auslösung der beschriebenen pro-angiogenetischen und pro-inflammatorischen Mediatoren führt es direkt zum Abbau der EZM durch Spaltung der HS-Proteoglykane. In der Synovia und in synovialem Gewebe von RA-Patienten wurde eine deutliche Erhöhung der HPSE-Expression nachgewiesen (Li, Freeman et al. 2008). Auch in dieser Arbeit wurde in CII-immunisierten Mäusen eine induzierte HPSE-Expression detektiert. Eine Reduktion der Heparanase-Expression durch KSRP, wie in dieser Arbeit in Chondrozyten beschrieben, könnte die durch HPSE-vermittelten Mechanismen verringern und somit dem Abbau der EZM sowie der Induktion der Angiogenese entgegenwirken. Es konnten ARE innerhalb der HPSE-mRNA identifiziert werden (Tab. 9.1), so dass eine Bindung von KSRP an dieses Element und eine direkte Modulation der mRNA-Stabilität wahrscheinlich ist.

Tenomodulin (TNMD) ist ein mit Chondromodulin-I (ChM-I) verwandtes Knorpel-Matrix-Glykoprotein, das in Chondrozyten exprimiert wird und in die EZM sekretiert wird. Dort führt es zur Synthese von Proteoglykanen und wirkt anti-angiogenetisch (Shukunami, Oshima et al. 2005). Rekombinantes ChM-I inhibierte die Synovialzell-Proliferation bei RA-Patienten und T-Zell-Antworten im Verlauf der RA (Setoguchi, Misaki et al. 2004). Eine erhöhte Expression von TNMD in CII-immunisierten Mäusen könnte eine Folge von Abwehrmechanismen sein, die dem Pannuswachstum entgegen wirken. Eine KSRP-Überexpression in Chondrozyten verringert dagegen diese Expression, wodurch es zu einer Hemmung der anti-angiogenetischen Wirkung von TNMD kommen könnte.

Eine zusammenfassende Übersicht der diskutierten KSRP-vermittelten Mechanismen im Verlauf der RA ist in Abbildung 10.1 dargestellt. KSRP verringert wahrscheinlich die Expression von HPSE, SPARC und der MMP2 und -3, wodurch es angiogenetische Mechanismen unterdrücken und somit der hyperplastischen Pannusausbildung entgegenwirken könnte. Eine KSRP-medierte Reduktion von TNMD würde dagegen pro-angiogenetische Folgen haben. Eine Abnahme der Expression des IL-18-Rezeptors führt zu einer Hemmung der Angiogenese und des Chondrozyten-Abbaus. Die KSRP-abhängige

Verringerung von GZMA könnte die Apoptose körpereigener Zellen verhindern, die durch zytotoxische T-Zellen oder aktivierte Chondrozyten ausgelöst wird.

Somit könnte die Identifizierung eines Therapeutikums, das die KSRP-Expression oder die KSRP-Aktivität erhöht, für die Behandlung verschiedener Autoimmunerkrankungen von großer Bedeutung sein.



**Abbildung 10.1: Zusammenfassung möglicher Mechanismen in der Pathogenese der RA, die durch KSRP beeinflusst werden**

PLA2 (Phospholipase 2), TNF- $\alpha$  (Tumor necrosis factor  $\alpha$ ), IL-1 & -18 (Interleukin-1 & -18), GZMA (Granzym A), HPSE (Heparanase), TNMD (Tenomodulin), SPARC (Osteonectin - Secreted protein acidic and rich in cysteine) MMP2 & 3 (Matrix Metalloproteasen 2 & 3), R (Rezeptor), AA (Arachidonsäure), PG (Prostaglandin), VEGF (vascular endothelial growth factor).

Erklärung zur Farben- und Rahmenwahl der Abbildung:

- Grün: Reduzierte Gene in KSRP-überexprimierenden Chondrozyten im Vergleich zu Kontrollzellen. Diese Gene waren in CII-immunisierten Mäusen im Vergleich zu Kontrollmäusen induziert.
- Einfacher Rahmen: KSRP-vermittelte Regulation, die sich negativ auf die Pathogenese der RA auswirkt (anti-inflammatorische und anti-angiogenetische Mechanismen)
- Doppelter Rahmen: KSRP-vermittelte Regulation, die sich positiv auf die Pathogenese der RA auswirkt (pro-inflammatorische und pro-angiogenetische Mechanismen)

## **10.2 Die Analyse der transkriptionellen und post-transkriptionellen Regulation der KSRP-Expression**

### **10.2.1 Die endogene KSRP-Expression ist in KSRP-überexprimierenden Chondrozyten erhöht**

In 10.1 wurde eine entscheidende Bedeutung der Regulation der KSRP-Expression für die Pathogenese der rheumatoiden Arthritis diskutiert. Bislang sind zur Regulation der KSRP-Expression fast nur post-translationale Mechanismen beschrieben worden. Beispielsweise wird die Aktivität von KSRP durch Phosphorylierungen der p38-MAPK (Briata, Forcales et al. 2005), der PI3K-AKT (Gherzi, Trabucchi et al. 2006), der ATM (Zhang, Wan et al. 2011) oder Dephosphorylierung durch Pin1 (Nechama, Uchida et al. 2009) moduliert.

Bei der Etablierung der KSRP-überexprimierenden C28/I2-Chondrozyten wurde eine erhöhte endogene KSRP-Expression detektiert (Abb. 9.10). Frühere Analysen zeigten bereits erste Hinweise auf eine mögliche Autoregulation von KSRP aufgrund der Kreuzregulation verschiedener FUSE-Bindeproteine (Winzen, Thakur et al. 2007). Generell scheint eine Autoregulation bei mRNA-bindenden Proteinen ein möglicher Mechanismus zur Modulation von deren Expression zu sein. Es wurde bereits gezeigt, dass TTP an die 3'-UTR seiner eigenen mRNA bindet und damit zu einer Destabilisierung derselben führt (Tchen, Brook et al. 2004). Auch PABP reguliert seine eigene Expression durch die Bindung an die 5'-UTR (Hornstein, Harel et al. 1999). Um zu überprüfen, ob KSRP auch zu einer Erhöhung der KSRP-mRNA-Menge führt, wurden qRT-PCR-Experimente durchgeführt. Eine KSRP-Überexpression führte zu einer endogenen Erhöhung der KSRP-mRNA im Vergleich zu Kontrollzellen (Abb. 9.13).

### **10.2.2 Die Überexpression von KSRP hat keinen direkten Einfluss auf die KSRP 3'-UTR**

KSRP reguliert die Stabilität pro-inflammatorischer mRNAs direkt über die Bindung an AU-reiche Elemente (ARE), die innerhalb der 3'-UTR der Ziel-mRNAs liegen (Linker, Pautz et al. 2005). Auch die Sequenz der KSRP-3'-UTR weist ARE auf (Abb. 9.20), die als mögliche KSRP-Bindesequenzen identifiziert wurden. Man könnte daher vermuten, dass KSRP über die Bindung an die eigene 3'-UTR die eigene mRNA-Stabilität moduliert. Analysen mit einem KSRP-3'-UTR-Reportergenkonstrukt zeigten keinen Unterschied der Luciferaseaktivität in Zellen mit einer KSRP-Überexpression im Vergleich zu Kontrollzellen (Abb. 9.14). Um eine Interaktion von KSRP mit seiner eigenen 3'-UTR zu überprüfen, wurden UV-Crosslink-Experimente mit einer radioaktiv-markierten KSRP-3'-UTR-Sonde und rekombinantem His-

KSRP durchgeführt. Dabei konnte keine Bindung von KSRP an seine eigene 3'-UTR nachgewiesen werden (Abb. 9.21). Somit ist die Autoregulation von KSRP nicht durch die Regulation der mRNA-Stabilität zu erklären.

### **10.2.3 Die Autoregulation von KSRP wird über die Modulation des eigenen Promotors realisiert**

KSRP reguliert die Expression pro-inflammatorischer Gene entweder direkt über die Bindung an AREs in deren mRNAs oder durch die Erhöhung der Prozessierung von miRNAs (Trabucchi, Briata et al. 2009). Beide Mechanismen führen entweder über die Reduktion der mRNA-Stabilität und/oder -Translatierbarkeit zur Reduktion der pro-inflammatorischen Genexpression. Im Falle der Modulation seiner eigenen Expression übt KSRP dagegen einen positiven Effekt aus. Als positiver Regulator wurde KSRP (hier als FUSE-BP2 bezeichnet) bereits als Transkriptionsfaktor beschrieben, indem er die c-myc-Transkription über die Bindung an das FUSE-Element induziert (He, Weber et al. 2000). Man könnte vermuten, dass KSRP über die Modulation der mRNA-Stabilität negativ auf seine Zielgene wirkt und über die Regulation der Transkription positive Effekte vermittelt. Daher könnte die Erhöhung der KSRP-Expression über die Bindung des eigenen Promotors verwirklicht werden. Dies wurde mit einem Reportergenkonstrukt, das die Luciferase unter der Kontrolle eines 3kb-KSRP-Promotorfragment enthält, untersucht. Die hierdurch induzierte Luciferaseaktivität war in KSRP-überexprimierenden DLD-1-Zellen im Vergleich zu Kontrollzellen deutlich erhöht. In siKSRP-Zellen wurde dagegen eine verringerte Luciferaseaktivität im Vergleich zu Kontrollzellen detektiert (Abb.9.15). KSRP scheint tatsächlich positiv auf seinen eigenen Promotor zu wirken. Die Stimulation mit Cytokinen hatte keinen Effekt auf die Luciferaseexpression unter der Kontrolle des KSRP-Promotors (Abb. 9.16). Die KSRP-Expression wurde weder in C28/I2-Chondrozyten (Abb. 9.8) noch in DLD-1-Zellen (Linker, Pautz et al. 2005) durch Cytokine moduliert, was dieses Ergebnis des Cytokin-unabhängigen KSRP-Promotors bestätigt.

Um zu untersuchen, welcher Bereich des KSRP-Promotors regulatorische Sequenzen enthält, wurden Deletionen von 2kb und 1kb durchgeführt. Die Luciferaseaktivität in transfizierten DLD-1-Zellen war erst nach einer Deletion von 2kb verringert, so dass eine regulierende Sequenz zwischen dem 1kb- und 2kb-Promotor-Fragment vermutet werden kann (Abb. 9.17). Innerhalb dieses Sequenz-Bereichs konnte ein Element, das Homologien zu dem FUSE-Element des c-myc-Gens aufweist, identifiziert werden (Abb. 9.18) (Davis-Smyth, Duncan et al. 1996). Um die Bedeutung dieses FUSE-analogen Elements für die Aktivität des KSRP-Promotors zu untersuchen, wurden Deletionen generiert, die diese beschriebene Sequenz gerade noch (+FUSE) oder nicht mehr (-FUSE) beinhalten. Durch die

Deletion der FUSE-analogen Sequenz wurde eine signifikant reduzierte Luciferaseaktivität im Vergleich zu dem +FUSE-Element detektiert, die mit der Aktivität in Zellen, die mit dem 1kb-Promotorfragment transfiziert wurden, vergleichbar war (Abb. 9.19). Somit scheint das FUSE-analoge Element von großer Bedeutung für die Regulation der KSRP-Transkription zu sein. Die Bindung von KSRP an dieses Element ist nach den vorliegenden Daten aber nur zu vermuten und muss in weiteren Analysen bestätigt werden. Ein positiver Rückkopplungsmechanismus könnte durch die post-translationale Modifikation von KSRP durch PI3K/AKT ermöglicht werden. Durch diese Phosphorylierung kommt es aufgrund einer erhöhten Interaktion mit 14-3-3zeta zur Akkumulation von KSRP im Zellkern, wodurch KSRP die Mechanismen der mRNA-Destabilisierung im Cytoplasma nicht mehr aufrechterhalten kann (Diaz-Moreno, Hollingworth et al. 2009). Dadurch könnte eine lokale Überexpression von KSRP im Zellkern hervorgerufen werden, so dass die eigene Transkription induziert werden könnte.

#### **10.2.4 Die KSRP-mRNA-Expression wird post-transkriptionell über die Interaktion der RNA-Bindeproteine PABP, AUF-1 und HuR mit der KSRP-3'-UTR reguliert**

Die Regulation der mRNA-Stabilität ist ein wichtiger Mechanismus der post-transkriptionellen Modulation der Genexpression. Durch eine strikte Kontrolle der mRNA-Menge kann die Proteinexpression den Bedürfnissen der Zelle angepasst werden. Eine systematische Analyse zur Regulation der mRNA-Bindeproteine untereinander zeigte eine Bindung der mRNA-BPs HuR und AUF-1 an die KSRP-3'-UTR. Die Depletion von HuR führte zu einer verringerten KSRP-Expression (Pullmann, Kim et al. 2007). In dieser Arbeit sollte die Modulation der KSRP-Expression durch die 3'-UTR der KSRP-mRNA genauer untersucht werden. Es konnten AU-reiche Elemente der Klasse I und III identifiziert werden (Abb. 9.20), daher ist eine Bindung der mRNA-BPs wahrscheinlich. In UV-Crosslink-Experimenten mit einer radioaktiv markierten KSRP-3'-UTR-Sonde und rekombinanten Fusionsproteinen wurde die Interaktion zwischen den mRNA-BPs und der *in vitro* transkribierten RNA analysiert. Dabei konnte eine Bindung von HuR, PABP und den AUF-1-Isoformen p40, p42 und p45 an die KSRP-3'-UTR detektiert werden (Abb. 9.21).

Das cytoplasmatische Poly-(A)-Bindeprotein (PABP) bindet an den 3'-Poly (A)-Schwanz eukaryotischer mRNAs und moduliert deren Translation und Stabilität. Fast alle bekannten PABP-Funktionen werden auf die Bindung an den Poly-(A)-Schwanz oder A-reiche Sequenzen innerhalb der 3'-UTR zurückgeführt (Mangus, Evans et al. 2003). Weiterhin wurde PABP als AU-Bindeprotein beschrieben (Burd, Matunis et al. 1991). In dieser Arbeit

wurde eine *in vitro*-Bindung von PABP an die KSRP-3'-UTR detektiert (Abb. 9.21). Die KSRP-3'-UTR beinhaltet sowohl AU-reiche Elemente als auch A-reiche Sequenzen, die bis zu 15 Adenosin-Monophosphate in Folge aufweisen. In früheren Studien wurden bisher destabilisierende und stabilisierende Effekte von PABP beschrieben. Es wird vermutet, dass PABP die mRNA durch die Bindung an den 3' Poly(A)-Schwanz stabilisiert, wodurch der mRNA-Abbau in 3'-5'-Richtung verhindert wird (Bag and Bhattacharjee 2010). Zusätzlich werden destabilisierende Effekte beschrieben, indem PABP an AU-reiche Elemente bindet (Bernstein, Peltz et al. 1989; Mangus, Evans et al. 2003). In diesem Zusammenhang konnten MKK-2 und PABP selbst als Ziel-mRNAs von PABP identifiziert werden (Bag and Bhattacharjee 2010)

In DLD-1-Zellen mit einer Depletion von PABP wurde eine reduzierte KSRP-mRNA-Expression nachgewiesen (Abb. 9.22). Zusätzlich konnte eine verringerte KSRP-mRNA-Stabilität in siPABP-Zellen im Vergleich zu siluc-Zellen detektiert werden (Abb. 9.23). Somit scheint PABP die KSRP-mRNA-Expression positiv zu beeinflussen. Bei der Autoregulation von PABP scheint die folgende Sequenz der PABP-5'-UTR entscheidend zu sein: CCCCAGAAAAUUUACAAAAA (Bag and Bhattacharjee 2010). Eine Sequenz-Homologie innerhalb der 3'-UTR von KSRP konnte identifiziert werden: AAAUUUACAAA. Beide Sequenzen enthalten ein klassisches AU-reiches Element, so dass die mögliche Bindung des PABP an AU-reiche Sequenzen verdeutlicht wird. Es wurde bisher noch nicht geklärt, ob diese Sequenz oder die A-reichen Sequenzen innerhalb der KSRP-3'-UTR entscheidend für die PABP-abhängige KSRP-Modulation sind. Dies muss in späteren Studien analysiert werden.

*In vitro*-Experimente zeigten eine kompetitive Bindung von AUF-1 und PABP an den Poly (A)-Schwanz der GM-CSF-mRNA (Sagliocco, Laloo et al. 2006). Auch in der vorliegenden Arbeit wurde die Bindung von AUF-1 an die KSRP-3'-UTR nachgewiesen (Abb. 9.21). Der *ARE/poly(U) binding/degradation factor* AUF-1 gehört zu der Familie der *ubiquitously expressed heterogeneous nuclear ribonucleoproteins* (hnRNPs). AUF-1 ist ein mRNA-BP, welchem sowohl stabilisierende als auch destabilisierende Funktionen zugesprochen wurden. Alternatives Spleißen des hnRNP-Gens der Exone 2 und 7 führt zu 4 Isoformen, die nach ihrer Masse p37, p40, p42 und p45 genannt werden. p45 beinhaltet alle Exone, p42 exprimiert Exon 7, p40 exprimiert Exon 2 und p37 fehlen Exon 2 sowie Exon 7 (Wagner, DeMaria et al. 1998).

Es wurde schon gezeigt, dass AUF-1 an die KSRP 3'-UTR bindet. Pullmann *et al.* differenzierte jedoch nicht zwischen den unterschiedlichen Isoformen von AUF-1 und zeigte nicht den Effekt einer AUF-1-Bindung auf die KSRP-Expression (Pullmann, Kim et al. 2007). In dieser Arbeit wurde die Bindung der AUF-1-Isoformen p40, p42 und p45 nachgewiesen (Abb. 9.21). Somit scheint Exon 2 und Exon 7 für die Bindung an KSRP-AREs entscheidend



zu sein. Neuere Daten von Zucconi zeigten eine Dimer-Bildung der AUF-1-Isoformen. Die Anwesenheit des Exons 2 führte zu einer verringerten Bindungsaffinität und damit zu einer reduzierten Oligomerbildung. Exon 7 vermittelte den gegenteiligen Effekt (Zucconi, Ballin et al. 2010). Durch diese Untersuchungen könnte die nicht detektierte Bindung von p37 erklärt werden.

Unterschiedliche Wirkungen der AUF-1-Isoformen auf die mRNA-Stabilität wurden beschrieben. Um die Effekte einer selektiven Überexpression der AUF-1-Isoformen auf die KSRP-mRNA-Expression nachzuweisen, wurden etablierte, stabil transfizierte DLD-1-Zellen mit selektiven AUF-1-Isoform-Expressionskonstrukten verwendet (Pautz, Linker et al. 2009) und qRT-PCR-Experimente durchgeführt. DLD-1-Zellen mit einer p40-Überexpression zeigten keinen Unterschied der KSRP-mRNA-Expression im Vergleich zu Kontrollzellen (Abb. 9.24).

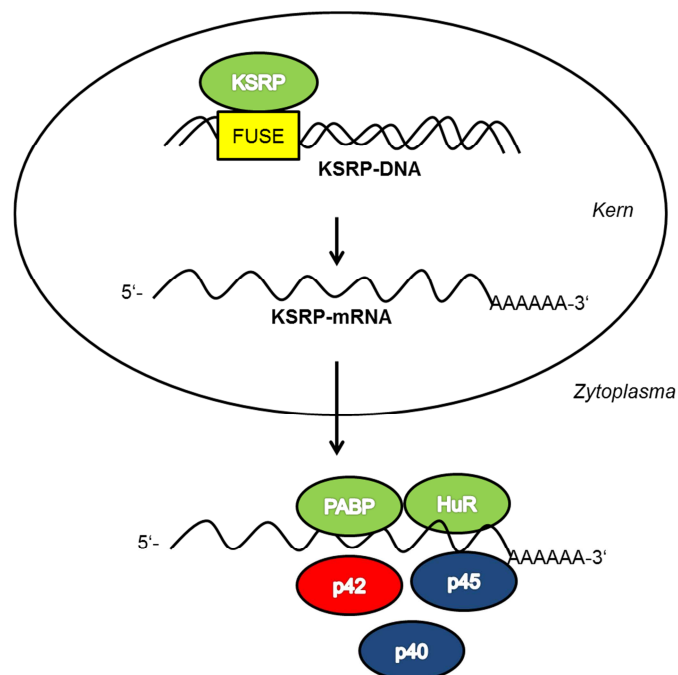
Frühere Analysen zeigten, dass die selektive Reduktion der AUF-1-Isoformen p40/p45 zu einer Erhöhung der GM-CSF-Expression führte, eine unspezifische Reduktion von AUF-1 hatte dagegen keinen Effekt (Raineri, Wegmueller et al. 2004). Weiterhin wurde ein positiver Effekt der p40-Isoform auf die IL-10 Expression nach LPS-Induktion beschrieben (Sarkar, Sinsimer et al. 2008). Somit scheint p40, abhängig von der modulierten mRNA, stabilisierend oder destabilisierend zu wirken. Die nicht vorhandene Regulation der KSRP-mRNA trotz Bindung kann vielleicht darauf zurückgeführt werden, dass p40 aufgrund des Fehlens von Exon 7 bzw. der Präsenz von Exon 2 eine geringe Bindungsaffinität zu der KSRP-mRNA aufweist. Möglicherweise ist eine *in vitro*-Bindung *in situ* nicht nachzuweisen.

Eine Überexpression von p42 reduzierte die KSRP-mRNA-Expression deutlich im Vergleich zu Kontrollzellen (Abb. 9.24). Eine selektive Destabilisierung durch die p42-Isoform der Prostaglandin-induzierten FGF9-mRNA wurde nachgewiesen (Chen, Hsu et al. 2010). Ebenso führte p42 zu einem Abbau der IL-6-mRNA (Paschoud, Dogar et al. 2006). Somit wurden für p42 vorwiegend destabilisierende Effekte beschrieben, welche die in dieser Arbeit detektierten Daten bestätigen. Zusätzlich festigt sich die Vermutung, dass die Präsenz des Exon 7 zu einer höheren Bindungsaffinität und somit zu der Destabilisierung von Ziel-mRNAs führt. Der negative Effekt einer Überexpression von p42 unterstützt die Annahme, dass PABP und AUF-1 um die gleiche Bindungsstelle innerhalb der KSRP-3'-UTR konkurrieren und somit gegenteilige Effekte hervorrufen (Sagliocco, Laloo et al. 2006).

In p45-überexprimierenden DLD-1-Zellen war die KSRP-mRNA-Expression im Vergleich zu Kontrollzellen leicht erhöht (Abb. 9.24). Es wurde bereits eine Östradiol-abhängige Induktion von p45 beschrieben, die zur Stabilisierung der Östrogenrezeptor- $\alpha$ -mRNA führte (Ing, Massuto et al. 2008). Im Fall von GM-CSF wurde p45 in Kombination mit p40 negatives Regulationspotential zugesprochen (Raineri, Wegmueller et al. 2004). Dagegen wurde bei der Destabilisierung der iNOS-mRNA durch AUF-1 kein Unterschied zwischen den

Isoformen festgestellt (Pautz, Linker et al. 2009). So kann p45 sowohl stabilisierend als auch destabilisierend abhängig von der Ziel-mRNA wirken. In Bezug auf KSRP kann der leicht positive Effekt durch p45 vernachlässigt werden. Aus den hier diskutierten Ergebnissen zu AUF-1 ist zu schließen, dass für eine negative Regulation der KSRP-Expression die Abwesenheit von Exon 2 entscheidend ist. Die zusätzliche Präsenz von Exon 7 führt zur Reduktion der KSRP-mRNA-Expression.

HuR ist ein Mitglied der ELAV Protein Familie. Es besitzt 3 RNA-Bindedomänen und bindet an cis-Elemente, vorwiegend AU-reiche Elemente, innerhalb der Ziel-mRNAs. Die bereits beschriebene Bindung von HuR an die KSRP 3'-UTR (Pullmann, Kim et al. 2007) konnte in diesem Experiment bestätigt werden (Abb. 9.21). HuR wurde bisher fast ausschließlich als ARE-BP beschrieben, das Ziel-mRNAs stabilisiert. So wurde gezeigt, dass eine erhöhte HuR-Expression verschiedene mRNAs pro-inflammatorischer Gene (iNOS, TNF- $\alpha$ , IL-8) stabilisiert (Fan and Steitz 1998; Linker, Pautz et al. 2005). Auch in Bezug auf die KSRP-Expression wurde ein stabilisierender Effekt detektiert (Pullmann, Kim et al. 2007). In dieser Arbeit konnte der Effekt einer Überexpression von HuR in DLD-1-Zellen nicht untersucht werden, da die Generierung dieser Zellen nicht möglich war.



**Abbildung 10.2: Schema zur transkriptionellen und post-transkriptionellen Regulation der KSRP-Expression**

*FUSE (far upstream element), KSRP (KH type splicing regulatory protein), HuR (Hu Antigen R), p40-p45 (AUF 1-Isoformen), PABP (Poly (A) binding protein)*

*Erklärung der Farben:*

*Grün: positive Regulation der KSRP-Expression*

*Rot: negative Regulation der KSRP-Expression*

Eine zusammenfassende Übersicht der KSRP-regulierenden Mechanismen ist in Abbildung 10.2 dargestellt. KSRP scheint seinen eigenen Promotor positiv zu stimulieren, was zu einer erhöhten Expression des endogenen KSRPs führt. Die mRNA-BPs HuR, PABP und die AUF-1-Isoformen p40, p42 und p45 binden *in vitro* an die KSRP-3'-UTR. Dabei scheinen HuR (Pullmann, Kim et al. 2007) und PABP die KSRP-mRNA-Expression positiv zu modulieren. Die AUF-1-Isoformen modulieren die KSRP-Expression unterschiedlich, was vermutlich auf die Abwesenheit des Exon 2 zurückzuführen ist.

### **10.3 Die Analyse der Regulation von KSRP durch die spezifische Bindung des Naturstoffs Resveratrol**

Die Arbeitsgruppe von Prof. Dr. [REDACTED] analysierte die spezifische Bindung des anti-inflammatorischen und cardioprotektiven Naturstoffs Resveratrol an Proteine humaner PBMC-Extrakte. Dabei konnte KSRP als direkter, selektiver Interaktionspartner von Resveratrol identifiziert werden (Abb. 9.25).

KSRP ist ein multifunktionelles Protein, welchem eine Rolle in der Regulation der mRNA-Stabilität durch die Bindung an AU-reiche Elemente und durch die Prozessierung von miRNAs zugesprochen wurde (Briata, Chen et al. 2011). Aufgrund der Bedeutung von KSRP für die Regulation der Genexpression wurde im Rahmen dieser Arbeit die Funktion der spezifischen Interaktion von Resveratrol und KSRP untersucht.

#### **10.3.1 Die Behandlung mit Resveratrol führt zu einer reduzierten mRNA-Expression der KSRP-regulierten Gene TNF- $\alpha$ , IL-8 und iNOS – dieser Effekt ist wahrscheinlich SIRT-1-unabhängig**

Dazu wurde zunächst die mRNA-Expression der bekannten KSRP-Zielgene TNF- $\alpha$  (Nguyen-Chi and Morello 2008), IL-8 (Winzen, Thakur et al. 2007) und der iNOS (Linker, Pautz et al. 2005), deren mRNA AU-reiche Elemente enthalten, nach Inkubation mit Resveratrol analysiert. Die Expression dieser Gene konnte durch die Behandlung mit Resveratrol verringert werden (Abb. 9.26). Eine reduzierte Expression dieser Gene durch Resveratrol wurde bereits beschrieben. So konnte in immortalisierten, murinen Gliazellen eine LPS-induzierte iNOS und TNF- $\alpha$  Expression durch die Behandlung mit Resveratrol verringert werden (Bi, Yang et al. 2005). In A549-Zellen konnte die IL-8-Sekretion durch Resveratrol inhibiert werden (Donnelly, Newton et al. 2004). Hier wurde die Resveratrol-abhängige Reduktion auf eine Hemmung von NF- $\kappa$ B zurückgeführt.

Viele Effekte von Resveratrol werden auf die indirekte Aktivierung der Histon Deacetylase Sirtuin 1 (SIRT-1) zurückgeführt (Yeung, Hoberg et al. 2004). In dieser Arbeit wurde nach

Behandlung mit Sirtinol, welches ein Inhibitor von SIRT-1 ist, eine erhöhte iNOS-Expression nachgewiesen (Abb. 9.27). Somit scheint SIRT-1, wie erwartet, negativ auf die iNOS-mRNA-Expression zu wirken. Es wurde bereits beschrieben, dass SIRT-1 zu einer Inhibition des NF- $\kappa$ B-Signalweges führt (Yeung, Hoberg et al. 2004). Somit führt eine Reduktion von SIRT-1 durch Sirtinol zu einer verstärkten Induktion von NF- $\kappa$ B und zu einer Erhöhung der iNOS-Expression.

Eine zusätzliche Behandlung mit Resveratrol nach Inkubation mit Sirtinol führte zu einer verringerten iNOS-mRNA-Expression (Abb. 9.27). Somit ist die Resveratrol-abhängige Reduktion der iNOS mRNA-Menge aus Abbildung 9.26 SIRT-1-unabhängig.

### **10.3.2 Resveratrol reguliert die Aktivität eines 16kb-iNOS-Promotorfragments – Dieser Effekt scheint NF- $\kappa$ B- und STAT-1 $\alpha$ -abhängig zu sein**

Die iNOS-Expression wird auf transkriptioneller Ebene durch verschiedene Transkriptionsfaktoren beeinflusst. Dabei wurde eine positive Regulation des iNOS-Promotors durch STAT-1 $\alpha$  und NF- $\kappa$ B nachgewiesen (Pautz, Art et al. 2010). In früheren Studien konnte eine SIRT-1-abhängige NF- $\kappa$ B-Inhibition durch Resveratrol gezeigt werden (Yeung, Hoberg et al. 2004). Ebenso wurde eine negative Regulation des JAK/STAT-Signalwegs durch Resveratrol nachgewiesen (Capiralla, Vingtdeux et al. 2012). Die Resveratrol-abhängige Reduktion der iNOS-Expression könnte daher auf einer Hemmung der regulierenden Signalwege beruhen, die den iNOS-Promotor positiv beeinflussen. Reporter-Gen-Analysen mit stabil transfizierten DLD-1-Zellen, die ein Luciferasegen unter der Kontrolle eines 16kb-Fragments des humanen iNOS-Promotors aufweisen, zeigten eine positive Modulation des iNOS-Promotors durch Resveratrol (Abb. 9.28). Anschließende Analysen mit stabilen DLD-1-Zellen, welche die Luciferase unter der Kontrolle von artifiziellen Promotoren mit multimeren Bindungsstellen für STAT-1 $\alpha$  und NF- $\kappa$ B exprimieren, zeigten ebenfalls eine erhöhte Luciferaseaktivität nach Resveratrol-Behandlung (Abb. 9.28). Daher kann der Resveratrol-vermittelte Anstieg der Luciferase-Aktivität unter Kontrolle des iNOS-Promotors durch die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B erklärt werden. Messungen einer reduzierten iNOS-mRNA-Expression trotz erhöhter NF- $\kappa$ B-Aktivität nach Resveratrol-Inkubation in murinen mesangialen Zellen bestätigten diese Beobachtung (Uchida, Yamazaki et al. 2005). In RAW264.7 Makrophagen konnte dagegen eine reduzierte iNOS-Promotor-Aktivität und Expression durch Resveratrol gezeigt werden (Chung, Kim et al. 2011). Diese gegensätzlichen Daten könnten auf Unterschiede in der Behandlung, der Zellart und des Speziestyps zurückgeführt werden. Eine unterschiedliche Regulation des

iNOS-Promotors in Maus, Mensch und Ratte wurde bereits dargestellt (Pautz, Art et al. 2010).

Somit kann die in dieser Arbeit beschriebene reduzierte iNOS-mRNA-Expression in DLD-1-Zellen nach Behandlung mit Resveratrol nicht auf die Reduktion der Promotoraktivität zurückgeführt werden.

### **10.3.3 Die Regulation der iNOS-mRNA-Stabilität ist KSRP-abhängig**

Ein weiterer Mechanismus zur Regulation der Genexpression ist die Modulation der mRNA-Stabilität. Um zu analysieren, ob die Behandlung mit Resveratrol die iNOS-mRNA destabilisiert, wurden DRB-Experimente mit DLD-1-Zellen durchgeführt. Abbildung 9.29 zeigt, dass die iNOS-mRNA-Expression vier Stunden nach DRB-Inkubation in Resveratrol-behandelten Zellen im Vergleich zu unbehandelten Zellen reduziert war. Diese Reduktion kann als destabilisierender Effekt der Resveratrol-Behandlung interpretiert werden. Die negative Regulation der iNOS-mRNA-Stabilität durch das mRNA-Bindeprotein KSRP wurde bereits nachgewiesen (Linker, Pautz et al. 2005). Aufgrund der selektiven Bindung von Resveratrol an KSRP könnte man vermuten, dass die Destabilisierung der iNOS-mRNA durch Resveratrol auf die Interaktion mit KSRP zurückzuführen ist. Die Analyse der iNOS-mRNA-Expression nach Depletion von KSRP durch eine spezifische siRNA (Abb. 9.30) (Trabucchi, Briata et al. 2009) zeigte, dass die Resveratrol-vermittelte Reduktion der iNOS-mRNA aufgehoben war (Abb. 9.31). Es wurde sogar eine leichte Erhöhung der iNOS-mRNA-Menge in siKSRP-Zellen nach Resveratrol-Behandlung festgestellt. mRNA-Stabilitätsanalysen zeigten eine höhere Stabilität der iNOS-mRNA in siKSRP-Zellen im Vergleich zu Kontrollzellen (Abb. 9.32). Dieses Ergebnis wurde in früheren Analysen bereits beobachtet (Linker, Pautz et al. 2005). Die iNOS-mRNA-Destabilisierung in Resveratrol-behandelten Kontrollzellen konnte in siKSRP-Zellen nicht nachgewiesen werden (Abb. 9.32). Somit kann die reduzierte iNOS-mRNA-Stabilität nach Resveratrol-Behandlung auf eine Interaktion mit KSRP zurückgeführt werden.

In früheren Studien konnte gezeigt werden, dass eine Modulation der mRNA-Stabilität über Bindung verschiedener mRNA-BPs an die iNOS-3'-UTR für die Expression der iNOS entscheidend ist (Linker, Pautz et al. 2005). Die Behandlung mit Resveratrol führte in Zellen, die mit einem Reportergenkonstrukt der iNOS-3'-UTR transfiziert wurden, im Vergleich zu Kontrollzellen zu einer reduzierten Luciferaseaktivität (Abb. 9.33).

Mukherjee zeigte in immortalisierten Jurkat T-Zellen, dass Resveratrol die TNF- $\alpha$ -Expression über die TNF- $\alpha$ -3'-UTR negativ reguliert. Eine Überexpression des ARE-BP HuR konnte diesen Effekt aufheben (Mukherjee, Lager et al. 2009). Es wurde bereits nachgewiesen, dass bei der Regulation der iNOS-Expression über die iNOS-3'-UTR HuR und KSRP um die

gleiche Bindungsstelle in dieser Sequenz konkurrieren. Die Behandlung mit den Cytokinen IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  und IFN- $\gamma$  führte zu einer verringerten Bindungsaffinität des Destabilisators KSRP und gleichzeitig zu einer erhöhten Bindungsaffinität des Stabilisators HuR (Linker, Pautz et al. 2005). Eine Behandlung mit IL-1 $\beta$  führte bei der Regulation der IL-8-mRNA zu dem gleichen Ergebnis (Suswam, Nabors et al. 2005). Somit kann auch im Fall von TNF- $\alpha$  eine Konkurrenz um die gleiche ARE-Bindungsstelle angenommen werden. Die Destabilisierung der TNF- $\alpha$ -mRNA durch Resveratrol (Mukherjee, Lager et al. 2009) kann möglicherweise durch eine Resveratrol-abhängige Aktivierung von KSRP zu erklären sein. Die ermittelten Daten festigen die Vermutung, dass Resveratrol post-transkriptionell die iNOS-mRNA-Expression reguliert.

#### **10.3.4 Die Expression und Aktivität der miR-155 ist durch Resveratrol erhöht**

miRNAs spielen eine wichtige Rolle in der post-transkriptionellen Regulation der Genexpression. Eine Fehlregulation dieser Expression bei kardiovaskulären oder inflammatorischen Erkrankungen wurde bereits nachgewiesen (Furer, Greenberg et al. 2010; Elton, Khan et al. 2011). 2009 wurde erstmals beschrieben, dass KSRP eine bedeutende Funktion in der miRNA-Biogenese einnimmt. Dabei wurde KSRP als Teil des Dicer-Komplexes identifiziert und die Bindung an die terminale Schleife der miRNA-Vorläufer nachgewiesen. Durch diese Bindung konnte eine verstärkte miRNA-Prozessierung gezeigt werden (Trabucchi, Briata et al. 2009). Die Biogenese der miR-155, der sowohl pro- (Leah 2011) als auch anti-inflammatorisches (Ruggiero, Trabucchi et al. 2009) Potential zugesprochen wurde, wird durch KSRP reguliert. In Resveratrol-behandelten DLD-1-Zellen konnte eine erhöhte miR-155-Expression im Vergleich zu nicht behandelten Zellen nachgewiesen werden (Abb. 9.34).

Die SHIP-Expression wird über die Interaktion der miR-155 mit der SHIP-3'-UTR negativ reguliert (O'Connell, Chaudhuri et al. 2009). DLD-1-Zellen, die mit einem Reportergenkonstrukt, in dem die SHIP-3'-UTR hinter die kodierende Region der Luciferase kloniert worden war, transfiziert wurden, zeigten nach der Behandlung mit Resveratrol eine negative Modulation der Luciferaseaktivität (Abb. 9.35). Somit scheint Resveratrol die miR-155 Expression zu erhöhen und die Aktivität zu verstärken. Um zu analysieren, ob dieser Effekt KSRP-abhängig ist, wurde das SHIP1-Reportergenkonstrukt in siKSRP-Zellen transfiziert. Eine Behandlung mit Cytokinen zeigte keinen Unterschied zwischen siKSRP-Zellen und Kontrollzellen (Abb. 9.36). Bei der Zugabe von Resveratrol konnte eine Erhöhung der Luciferaseaktivität in siKSRP-Zellen im Vergleich zu Kontrollzellen nachgewiesen werden. Somit ist es wahrscheinlich, dass die erhöhte miR-155-Expression durch

Resveratrol auf einer Interaktion mit KSRP beruht. Eine Modulation von miRNAs durch Resveratrol wurde bereits beschrieben. Entgegen der Beobachtungen in dieser Arbeit wurde eine reduzierte miR-155-Expression nach Resveratrol-Behandlung in immortalisierten THP-1-Monozyten nachgewiesen (Tili, Michaille et al. 2010). Der unterschiedliche Zelltyp und die miR-155-Induktion mit LPS könnten mögliche Ursachen für die gegenteiligen Ergebnisse sein. Eine Resveratrol-vermittelte Modulation der miR-20a/b, miR-21 (Mukhopadhyay, Pacher et al. 2011), miR-335 und miR-361 (Bae, Lee et al. 2011), deren Prozessierung durch KSRP reguliert wird (Trabucchi, Briata et al. 2009), wurde beschrieben. Die Interaktion zwischen KSRP und Resveratrol könnte möglicherweise die Modulation der Expression dieser miRNAs erklären.

### **10.3.5 Die KSRP-deaktivierende Thr-Phosphorylierung ist bei unveränderter KSRP-Protein-Expression *in situ* und *in vivo* nach Resveratrol-Behandlung reduziert**

Die oben dargestellten Daten legen nahe, dass Resveratrol die KSRP-Aktivität positiv reguliert. Der nächste Schritt sollte die Aufklärung des Mechanismus der Aktivitätserhöhung sein. Weder eine Cytokin-Stimulation noch die zusätzliche Behandlung mit Resveratrol modulierten die KSRP-Protein-Expression (Abb. 9.37). Zur Regulation der KSRP-Aktivität sind verschiedene post-translationale Mechanismen beschrieben worden. Aufgrund der nicht regulierten KSRP-Expression ist auch hier ein post-translationaler Mechanismus wahrscheinlich. Frühere Arbeiten beschrieben die p38-MAPK-abhängige Phosphorylierung als eine der bedeutendsten Modulationen der KSRP-Aktivität (Briata, Chen et al. 2011). Die p38-MAPK phosphoryliert KSRP an Threonin (Thr) 692, was zu einer verringerten Bindungsaffinität von KSRP an Ziel-mRNAs und somit zu einer erhöhten Stabilität letzterer führt (Dean, Sully et al. 2004). Immunpräzipitationsexperimente mit einem polyklonalen KSRP-Antikörper und Protein-Extrakten aus Resveratrol-behandelten und -unbehandelten DLD-1-Zellen zeigten in Western Blot Experimenten eine gleiche Menge an immunpräzipitierten KSRP (Abb. 9.38). Dagegen war die Thr-Phosphorylierung in Extrakten aus Resveratrol-behandelten Zellen reduziert. Somit könnte man vermuten, dass die selektive Resveratrol-Bindung die p38-MAPK-vermittelte Phosphorylierung von KSRP verhindert. Andere Studien beschrieben bereits eine Inhibition der p38-MAPK-vermittelten Phosphorylierung nach Resveratrol-Behandlung in THP-1-Zellen, was zu einer reduzierten LPS-induzierten IL-8-Expression führte (Oh, Kang et al. 2009). Jedoch wurden auch eine negative (Sebai, Ristorcelli et al. 2010) und keine Regulation (Haider, Sorescu et al. 2002) der p38-MAPK durch Resveratrol beschrieben. Diese unterschiedliche Regulation könnte durch die unterschiedlichen Zelltypen erklärt werden. Daher wäre eine direkte Modulation der

p38-MAPK-Aktivierung bzw. Aktivität durch Resveratrol in DLD-1-Zellen möglich. In Western Blot Experimenten wurde eine Induktion der aktivierenden Phosphorylierung der p38-MAPK durch Cytokin-Stimulation detektiert, die durch die Behandlung mit Resveratrol nicht verändert war (Abb. 9.39). Die Aktivität der p38-MAPK wurde anhand der Phosphorylierung des p38-MAPK-Zielgens ATF-2 (*activating transcription factor 2*) analysiert (Zhang, Liu et al. 2006). Auch hier war kein Resveratrol-Effekt der Cytokin-induzierten ATF-2-Phosphorylierung zu detektieren (Abb. 9.39). Diese Daten machen deutlich, dass die verringerte Threonin-Phosphorylierung von KSRP nicht durch eine Resveratrol-abhängige Hemmung der p38-MAPK vermittelt wird.

Es konnte gezeigt werden, dass eine Behandlung mit Resveratrol die Expression pro-inflammatorischer Gene (TNF- $\alpha$ , iNOS, COX-2), pro-angiogenetischer Faktoren (MMP3, VEGF, ICAM-1) und Proteinkinasen (PI3K, PKB) (Bi, Yang et al. 2005; Harikumar and Aggarwal 2008) reduziert. Diese Faktoren spielen bei inflammatorischen Erkrankungen wie der Atherosklerose eine entscheidende Rolle. Weiterhin wurde Resveratrol cardioprotektives Potential zugesprochen (Dolinsky and Dyck 2011). Aufgrund der beschriebenen Resveratrol-Wirkungen wurde das murine ApoE<sup>-/-</sup>-Atherosklerose-Modell verwendet, um die reduzierte Thr-Phosphorylierung von KSRP nach Resveratrol-Behandlung *in vivo* zu bestätigen. ApoE<sup>-/-</sup>-Mäuse, die eine Woche mit 100 mg/kg Resveratrol behandelt wurden, zeigten eine verringerte Thr-Phosphorylierung von KSRP im Vergleich zu unbehandelten Mäusen (Abb. 9.40).

Somit hemmt die Behandlung mit Resveratrol die p38-MAPK-vermittelte Phosphorylierung und erhöht die KSRP-Aktivität *in situ* und *in vivo*.

### **10.3.6 Resveratrol führt zu einer Reduktion von KSRP-Zielgenen im murinen Atherosklerose-Modell der ApoE<sup>-/-</sup>-Maus**

Mögliche Auswirkungen dieser beschriebenen verringerten Phosphorylierung von KSRP sollten nun anhand von KSRP-Ziel-mRNAs in unterschiedlichen Geweben von Resveratrol-behandelten ApoE<sup>-/-</sup>-Mäusen im Vergleich zu Kontrollmäusen analysiert werden.

Die TNF- $\alpha$ -mRNA-Expression war in allen untersuchten Geweben (Milz, Leber, Darm, Aorta) in Resveratrol-behandelten Mäusen im Vergleich zu unbehandelten Mäusen reduziert (Abb.9.41). TNF- $\alpha$  ist ein multifunktionelles, pro-inflammatorisches Cytokin, welches vorwiegend von Makrophagen sekretiert wird. Eine Destabilisierung der TNF- $\alpha$ -mRNA durch KSRP wurde beschrieben (Nguyen-Chi and Morello 2008). Ebenso wurde die LPS-induzierte TNF- $\alpha$ -Expression in murinen Gliazellen durch Resveratrol reduziert (Bi, Yang et al. 2005). In dieser Arbeit konnte in DLD-1-Zellen eine reduzierte TNF- $\alpha$ -Expression nach Resveratrol-Behandlung nachgewiesen werden (Abb. 9.26). Somit kann die detektierte, reduzierte TNF-



$\alpha$ -Expression in ApoE<sup>-/-</sup>-Mäusen möglicherweise durch die Interaktion von Resveratrol mit KSRP begründet werden.

Zusätzlich wurde die TTP-mRNA-Expression bestimmt. Eine Verringerung der TTP-mRNA-Menge durch Resveratrol konnte nur in der Milz detektiert werden. In Leber und Aorta wurde TTP nicht reguliert (Abb. 9.41). TTP (Tristetraprolin) ist ein mRNA-bindendes Protein, das eine entscheidende Rolle in der Regulation der TNF- $\alpha$ -mRNA-Expression einnimmt. Es wurde eine erhöhte TTP-Expression in atherosklerotischen Makrophagen beschrieben. Die Depletion der TTP-Expression führte zu einer erhöhten TNF- $\alpha$ -Sekretion (Patino, Kang et al. 2006). Microarray-Analysen mit Extrakten aus siKSRP-HeLa-Zellen zeigten bereits eine Regulation der TTP-Expression durch KSRP (Winzen, Thakur et al. 2007). Somit könnte die Reduktion der TTP-mRNA-Expression in der Milz von Resveratrol-behandelten ApoE<sup>-/-</sup>-Mäusen auf eine Interaktion mit KSRP zurückzuführen sein.

Eine verringerte IL-12p40-Expression wurde in der vorliegenden Arbeit in der Milz, Leber und Aorta Resveratrol-behandelter Tiere nachgewiesen (Abb. 9.41). Im Darm konnte IL-12p40 nicht detektiert werden. IL-12p40, eine Untereinheit von Interleukin-12, wird von aktivierten Makrophagen exprimiert und sekretiert, was zur Induktion der T<sub>H</sub>1-Zell-Differenzierung führt. IL-12p40 wird negativ durch die miR-155 reguliert, deren Prozessierung durch KSRP reguliert wird. In RAW264.7 Makrophagen mit einer Depletion von KSRP wurde IL-12p40 verstärkt induziert (Ruggiero, Trabucchi et al. 2009). Im EAE-Modell (*experimental autoimmune encephalomyelitis*), welches ein murines Modell der multiplen Sklerose darstellt, konnte die IL-12p40-Expression durch die Behandlung mit Resveratrol in Makrophagen reduziert werden (Imler and Petro 2009). Die LPS-induzierte IL-12p40-Sekretion konnte auch in Resveratrol-behandelten BM-DCs (*bone marrow-derived dendritic cells*) verringert werden (Kim, Cho et al. 2004). Aufgrund der beschriebenen Studien ist die Regulation von IL-12p40 durch die Interaktion von KSRP und Resveratrol im hier verwendeten Atherosklerose-Modell wahrscheinlich.

In allen untersuchten Geweben von ApoE<sup>-/-</sup>-Mäusen, die mit Resveratrol behandelt wurden, konnte eine reduzierte IFN- $\gamma$ -mRNA-Expression nachgewiesen werden (Abb. 9.41). Interferon- $\gamma$  ist ein Cytokin mit anti-viralen, immunregulatorischen und anti-tumorellen Eigenschaften und wurde als Aktivator von Makrophagen beschrieben. In T-Zellen konnte bereits eine reduzierte IFN- $\gamma$  Expression nach Resveratrol-Behandlung detektiert werden (Yu, Zeng et al. 2005). Weiterhin wurden AU-reiche Elemente innerhalb der IFN- $\gamma$ -mRNA nachgewiesen (Caput, Beutler et al. 1986) und eine post-transkriptionelle Modulation durch mRNA-BPs angenommen (Seko, Cole et al. 2006). Die IFN- $\gamma$ -homologen Cytokine IFN- $\alpha$  und IFN- $\beta$  werden nach Virus-Behandlung in KSRP<sup>-/-</sup>-Mäusen im Vergleich zu Kontrollmäusen vermehrt exprimiert, was auf einen reduzierten, KSRP-abhängigen mRNA-Abbau zurückgeführt wurde (Lin, Zheng et al. 2011). Somit könnte IFN- $\gamma$  ein putatives

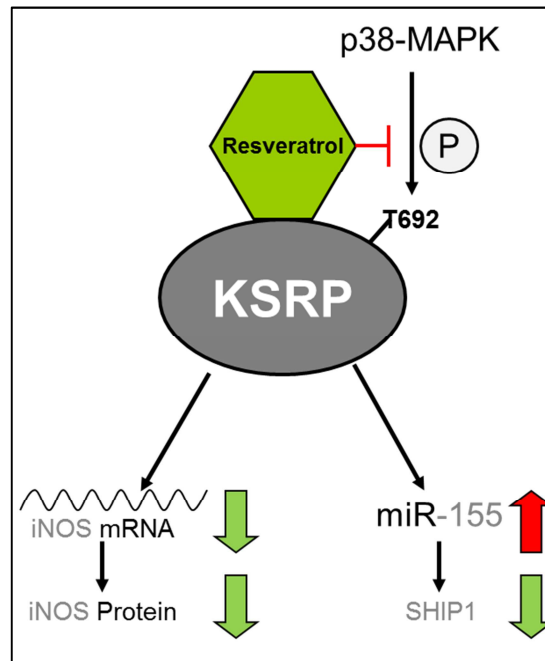
Zielgen für KSRP darstellen. Weiterhin wurde eine Regulation von IFN- $\gamma$  durch die miR-21 gezeigt (Lu, Hartner et al. 2011), die als Ziel-miRNA von KSRP nachgewiesen wurde (Trabucchi, Briata et al. 2009). Somit könnte KSRP bzw. Resveratrol über eine Modulation der miR-21 die IFN- $\gamma$ -Expression reduzieren.

Im Darm wurden zusätzlich IL-6 und die konstitutiv exprimierte iNOS nachgewiesen. Die Expression beider Gene war in Resveratrol-behandelten Mäusen im Vergleich zu Kontrollmäusen reduziert (Abb. 9.41).

Interleukin-6 (IL-6) ist ein Cytokin, das die Reifung von B-Zellen moduliert. Es wird in akuten oder chronischen inflammatorischen Erkrankungen produziert und sekretiert. Eine erhöhte IL-6-Sekretion wurde bei der rheumatoiden Arthritis (Wong, Campbell et al. 2003), bei der Atherosklerose (Jaber, Murin et al. 2002) und bei inflammatorischen Darmerkrankungen (Morbus Crohn) (Rogler and Andus 1998) nachgewiesen. Eine Reduktion dieser erhöhten IL-6-Expression durch Resveratrol in einem murinen Modell für Morbus Chron konnte detektiert werden (Rahal, Schmiedlin-Ren et al. 2012). Ebenso konnte Winzen *et al.* die IL-6-mRNA als KSRP-Ziel identifizieren (Winzen, Thakur et al. 2007).

Die induzierbare NO-Synthase (iNOS) wird durch verschiedene Cytokine (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IFN- $\gamma$ ) in Kombination mit LPS induziert. Im Darm ist sie konstitutiv exprimiert, so dass hier eine iNOS-mRNA-Expression detektiert werden konnte. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die iNOS als Beispiel für eine KSRP Ziel-mRNA verwendet und eine reduzierte iNOS-mRNA-Expression (Abb. 9.26) und iNOS-mRNA-Stabilität (Abb. 9.29) nach Resveratrol-Behandlung detektiert. Die iNOS wurde auch als Ziel-Transkript der miR-155, die durch KSRP prozessiert wird, beschrieben (Ruggiero, Trabucchi et al. 2009). In immortalisierten murinen Gliazellen konnte eine LPS-induzierte iNOS-Expression durch die Behandlung mit Resveratrol reduziert werden (Bi, Yang et al. 2005). Somit ist anzunehmen, dass die nachgewiesene reduzierte iNOS-mRNA-Expression in Resveratrol-behandelten DLD-1-Zellen im murinen Modell der Atherosklerose bestätigt werden kann.

Eine Zusammenfassung des in dieser Arbeit beschriebenen Mechanismus‘ der Resveratrol-vermittelten KSRP-Aktivierung ist in Abbildung 10.3 dargestellt. KSRP wurde als direkter, selektiver Interaktionspartner von Resveratrol identifiziert. Durch eine Bindung von Resveratrol an KSRP wird die p38-MAPK-abhängige Phosphorylierung, die zu einer Inaktivierung von KSRP führt, reduziert. Somit kann KSRP vermehrt an Ziel-mRNAs binden und zu deren Abbau führen. Weiterhin erhöht die Behandlung mit Resveratrol die Expression der KSRP-regulierten miRNAs.



**Abbildung 10.3: Mechanismus der Resveratrol-abhängigen KSRP-Aktivierung**

*p38MAPK (p38 mitogen activated protein kinase), T692 (Threonin 692), KSRP (KH type splicing regulatory protein), miR-155 (microRNA 155), iNOS (induzierbare NO-Synthase), SHIP1 (Src homology-2 domain-containing inositol 5-phosphatase 1)*

## 11 Zusammenfassung

Die Pathogenese chronisch inflammatorischer Erkrankungen ist von einer Dysregulation der pro-inflammatorischen Genexpression geprägt. Dieser liegen wahrscheinlich pathologische Veränderungen der Aktivität von verschiedenen Transkriptionsfaktoren und RNA-bindenden Proteinen zugrunde. In dieser Arbeit konnte die Regulation der KSRP-Expression in einem murinen Modell der rheumatoiden Arthritis (RA) nachgewiesen werden. In humanen Chondrozyten führte eine erhöhte KSRP-Expression zu einer Reduktion der Expression von bekannten KSRP-Zielgenen. Der Vergleich von verschiedenen Microarray-Analysen aus den verwendeten humanen und murinen Modellen der RA führte zur Identifikation von pro-inflammatorischen und pro-angiogenetischen Faktoren (SPARC, MMP2, MMP3, PLA2G2D, GZMA, HPSE, TNMD und IL-18-R), die in der RA eine Rolle spielen und höchstwahrscheinlich durch eine erhöhte KSRP-Expression reguliert werden. Daher könnte eine Modulation der KSRP-Expression bei der Therapie von Autoimmunerkrankungen von Bedeutung sein. In diesem Zusammenhang ist die Detektion der Bindung des cardioprotektiven und anti-inflammatorisch wirkenden Naturstoffs Resveratrol an KSRP zu nennen. Diese spezifische Interaktion führte zu einer Reduktion der p38-MAPK-vermittelten Thr-Phosphorylierung des KSRP-Proteins (*in situ* und *in vivo*), was eine Aktivierung der KSRP-vermittelten Mechanismen zur Folge hatte. Somit konnte *in situ* die mRNA-Stabilität der iNOS reduziert und die miR-155-Expression erhöht werden. Im murinen Atherosklerosemodell führte die Behandlung mit Resveratrol zu einer verringerten Expression bekannter KSRP-Ziel-mRNAs.

Neben diesem post-translationalen Regulationsmechanismus von KSRP durch Resveratrol konnte die Modulation der KSRP-Expression auf transkriptioneller Ebene durch KSRP selbst gezeigt werden. Dies geschieht möglicherweise über die Bindung von KSRP an das FUSE-analoge Element innerhalb des KSRP-Promotors, welches eine positive Autoregulation der KSRP-Expression bewirkt. Bei der Analyse der post-transkriptionellen Regulation der KSRP-Expression interagierten die mRNA-bindenden Proteine HuR, PABP und die AUF-1-Isoformen p40, p42 und p45 *in vitro* mit der KSRP-3'UTR. Dabei konnte in Expressionsanalysen nachgewiesen werden, dass die KSRP-mRNA durch PABP positiv und durch p42 negativ reguliert wird.

Zusammenfassend ist zu sagen, dass die KSRP-Expression neben post-translationalen Mechanismen auch auf transkriptioneller und post-transkriptioneller Ebene moduliert wird. Zusätzlich wurde eine Regulation der KSRP-Expression innerhalb entzündlicher Erkrankungen nachgewiesen, die Bedeutung dieser Modulation für die pro-inflammatorischen Genexpression diskutiert und ein möglicher therapeutischer Angriffspunkt durch Resveratrol identifiziert.

## Abstract

The pathogenesis of chronic inflammatory diseases is characterized by a dysregulated pro-inflammatory gene expression, which implies a pathologic modified activity of different transcription factors and RNA-binding proteins.

In this study regulation of KSRP-expression was detected in a murine model of rheumatoid arthritis (RA). An increased expression of KSRP in human chondrocytes led to a reduction of typical KSRP target genes. The results of microarray analyses of human and murine RA models were compared. Thereby pro-inflammatory and pro-angiogenic factors (SPARC, MMP2, MMP3, PLA2G2D, GZMA, HPSE, TNMD und IL-18-R) could be identified, which are essential for the pathogenesis of RA and might be regulated by modulation of KSRP expression. So alteration of KSRP activity could be a possible therapeutic mechanism in autoimmune diseases like rheumatoid arthritis. In this context selective and specific binding of the anti-inflammatory and cardioprotective natural compound resveratrol to KSRP was demonstrated. This interaction resulted in a reduced p38-MAPK mediated phosphorylation of KSRP at threonine residues (*in situ* and *in vivo*), which lead to an enhanced activity of KSRP. In accordance a decreased iNOS-mRNA stability and increased miR-155 expression could be measured. In a murine atherosclerosis model resveratrol treatment reduced the expression of KSRP target mRNAs.

Beside this post-translational regulation of KSRP by resveratrol, modulation of KSRP expression by a transcriptional autoregulatory mechanism was determined. Therefore binding of KSRP to the FUSE analog element within the KSRP promoter might be relevant for the positive autoregulation of KSRP. Post-transcriptional analyses showed the interaction of the mRNA-binding proteins HuR, PABP and the AUF-1 isoforms p40, p42 and p45 with the KSRP 3'UTR *in vitro*. Thereby PABP might be a stabilizing factor of KSRP, whereas overexpression of p42 led to a reduced KSRP-expression.

In summary KSRP is modulated by transcriptional and post-transcriptional mechanisms. In inflammatory diseases regulation of KSRP-expression could be detected, the importance of this modulation for the pro-inflammatory gene expression was discussed and a possible new therapeutic mechanism via resveratrol was identified.

## 12 Anhang

X-FACHE ÄNDERUNG C28 KSRP	X-FACHE ÄNDERUNG CIA	SYMBOL	GEN-NAME	ENTREZ- ID HUMAN	ID MURIN
-14,676	8,708	YJEFN3	YjeF N-terminal domain containing 3	374887	ENSMUSG00000048967
-13,152	3,383	SPARC	secreted protein, acidic, cysteine-rich (osteonectin)	6678	ENSMUSG00000018593
-11,402	12,547	SLC17A4	solute carrier family 17 (sodium phosphate), member 4	10050	ENSMUSG00000021336
-6,674	4,029	PLA2G2D	phospholipase A2, group IID	26279	ENSMUSG00000041202
-6,341	8,204	FPR1	formyl peptide receptor 1	2357	ENSMUSG00000045551
-6,178	6,008	RPLP2	ribosomal protein, large, P2	6181	ENSMUSG00000025508
-5,962	3,625	SV2A	synaptic vesicle glycoprotein 2A	9900	ENSMUSG00000038486
-5,17	2,695	ITGB1	integrin, beta 1 (fibronectin receptor, beta polypeptide, antigen CD29 includes MDF2, MSK12)	3688	ENSMUSG00000025809
-4,395	2,835	CCDC88B	coiled-coil domain containing 88B	283234	ENSMUSG00000047810
-4,197	10,645	MMP3	matrix metalloproteinase 3 (stromelysin 1, progelatinase)	4314	ENSMUSG00000043613
-4,181	5,499	CHRM1	cholinergic receptor, muscarinic 1	1128	ENSMUSG00000032773
-4,139	3,661	MMP2	matrix metalloproteinase 2 (gelatinase A, 72kDa gelatinase, 72kDa type IV collagenase)	4313	ENSMUSG00000031740
-3,81	10,974	EIF1AY	eukaryotic translation initiation factor 1A, Y-linked	9086	ENSMUSG00000057561
-3,756	4,289	TFB1M	transcription factor B1, mitochondrial	51106	ENSMUSG00000036983
-3,727	-2,629	HMGCL	3-hydroxymethyl-3- methylglutaryl-CoA lyase	3155	ENSMUSG00000028672
-3,709	-2,811	ZNF238	zinc finger protein 238	10472	ENSMUSG00000063659
-3,679	7,144	SH2D1A	SH2 domain containing 1A	4068	ENSMUSG00000005696
-3,564	2,612	AASDH	aminoadipate-semialdehyde dehydrogenase	132949	ENSMUSG00000055923
-3,485	-2,202	CNOT6L	CCR4-NOT transcription	246175	ENSMUSG00000034724

X-FACHE ÄNDERUNG C28 KSRP	X-FACHE ÄNDERUNG CIA	SYMBOL	GEN-NAME	ENTREZ- ID HUMAN	ID MURIN
			complex, subunit 6-like		
-3,43	4,631	SH2B2	SH2B adaptor protein 2	10603	ENSMUSG00000005057
-3,423	2,881	C16orf42	chromosome 16 open reading frame 42	115939	ENSMUSG00000015126
-3,389	2,636	IL18R1	Interleukin 18 receptor accessory protein	8809	ENSMUSG00000026070
-3,194	17,925	JMJD4	jumonji domain containing 4	65094	ENSMUSG00000036819
-3,094	4,659	ALKBH2	alkB, alkylation repair homolog 2 (E. coli)	121642	ENSMUSG00000044339
-3,083	2,534	TLX3	T-cell leukemia homeobox 3	30012	ENSMUSG00000040610
-3,081	6,486	TPPP	tubulin polymerization promoting protein	11076	ENSMUSG00000021573
-2,885	2,377	TUBB2B	tubulin, beta 2B	347733	ENSMUSG00000045136
-2,749	7,789	DNAH10	dynein, axonemal, heavy chain 10	196385	ENSMUSG00000038011
-2,696	2,631	ACCN1	amiloride-sensitive cation channel 1, neuronal	40	ENSMUSG00000020704
-2,694	18,694	GZMA	granzyme A (granzyme 1, cytotoxic T-lymphocyte- associated serine esterase 3)	3001	ENSMUSG00000023132
-2,512	2,044	LYG2	lysozyme G-like 2	254773	ENSMUSG00000061584
-2,46	5,497	MFAP4	microfibrillar-associated protein 4	4239	ENSMUSG00000042436
-2,3	9,495	SLC16A10	solute carrier family 16, member 10 (aromatic amino acid transporter)	117247	ENSMUSG00000019838
-2,288	5,868	TNMD	tenomodulin	64102	ENSMUSG00000031250
-2,25	3,49	HPSE	heparanase	10855	ENSMUSG00000035273
-2,129	6,192	ATXN7	ataxin 7	6314	ENSMUSG00000021738
-2,107	80,898	IGFBP7	insulin-like growth factor binding protein 7	3490	ENSMUSG00000036256
-2,099	-2,005	SLC7A6	solute carrier family 7 (amino acid transporter light chain, y+L system), member 6	9057	ENSMUSG00000031904
-2,012	3,786	NSMCE2	non-SMC element 2, MMS21 homolog (S. cerevisiae)	286053	ENSMUSG00000059586
2,992	5,394	HOXA13	homeobox A13	3209	ENSMUSG00000038203

X-FACHE ÄNDERUNG C28 KSRP	X-FACHE ÄNDERUNG CIA	SYMBOL	GEN-NAME	ENTREZ- ID HUMAN	ID MURIN
4,075	5,753	REM1	RAS (RAD and GEM)-like GTP-binding 1	28954	ENSMUSG00000000359
4,166	2,375	JAK1	Janus kinase 1	3716	ENSMUSG00000028530
5,146	4,101	PUS1	pseudouridylate synthase 1	80324	ENSMUSG00000029507
5,334	17,195	CD4	CD4 molecule	920	ENSMUSG00000023274
5,8	16,378	ETV6	ets variant 6	2120	ENSMUSG00000030199
6,077	-2,206	DHRS1	dehydrogenase/reductase (SDR family) member 1	115817	ENSMUSG00000002332
6,763	13,963	RHOBTB1	Rho-related BTB domain containing 1	9886	ENSMUSG00000019944
7,168	-2,27	SPRR3	small proline-rich protein 3	6707	ENSMUSG00000048455
7,187	2,216	MRPS18A	mitochondrial ribosomal protein S18A	55168	ENSMUSG00000023967
7,629	-2,102	C1orf158	chromosome 1 open reading frame 158	93190	ENSMUSG00000028589
8,251	5,838	MAGEA10	melanoma antigen family A, 10	4109	ENSMUSG00000043453
8,271	7,438	TRAK2	trafficking protein, kinesin binding 2	66008	ENSMUSG00000026028
9,509	7,626	HEATR5B	HEAT repeat containing 5B	54497	ENSMUSG00000039414
9,945	-2,538	SBF2	SET binding factor 2	81846	ENSMUSG00000038371
10,778	-2,566	KDM5A	lysine (K)-specific demethylase 5A	5927	ENSMUSG00000030180
10,862	14,387	TWIST2	twist homolog 2 (Drosophila)	117581	ENSMUSG00000007805
11,27	6,819	MIDN	midnolin	90007	ENSMUSG00000035621
11,548	6,938	FASTKD3	FAST kinase domains 3	79072	ENSMUSG00000021532
11,954	-3,067	TBX6	T-box 6	6911	ENSMUSG00000030699
16,081	-2,574	C2orf54	chromosome 2 open reading frame 54	79919	ENSMUSG00000034159
46,193	7,33	EFCAB4A	EF-hand calcium binding domain 4A	283229	ENSMUSG00000048200



## 13 Publikationen

- 2012 Resveratrol post-transcriptionally regulates pro-inflammatory gene expression via activation of the KH type splicing regulatory protein (KSRP)  
Art J, Pautz A, Besche V, Bros M, Li H, Handler N, Bauer F, Erker T, Behnke F, Mönch B, Förstermann U, Dirsch V, Werz O, Kleinert H In Vorbereitung
- 2012 The anti-inflammatory fungal compound (S)-Curvularin reduces pro-inflammatory gene expression in an in-vivo model of rheumatoid arthritis  
Schmidt N, Art J, Forsch I, Werner A, Erkel G, Jung M, Horke S, Kleinert H, Pautz, A zur Publikation eingereicht
- 2011 Regulation of human mitochondrial aldehyde dehydrogenase (ALDH-2) activity by electrophiles in vitro  
Oelze M, Knorr M, Schell R, Kamuf J, Pautz A, Art J, Wenzel P, Münzel T, Kleinert H, Daiber A  
J Biol Chem. 2011 Mar 18; 286(11):8893-900. Epub 2011 Jan 20.
- 2010 Regulation of the expression of inducible nitric oxide synthase  
Pautz A, Art J, Hahn S, Nowag S, Voss C, Kleinert H  
Nitric Oxide. 2010 Sep 15;23(2):75-93. Epub 2010 May 8. Review
- 2010 Transcriptional and post-transcriptional regulation of iNOS expression in human chondrocytes  
Schmidt N, Pautz A, Art J, Rauschkolb P, Jung M, Erkel G, Goldring MB, Kleinert H  
Biochem Pharmacol. 2010 Mar 1;79(5):722-32. Epub 2009 Oct 23.
- 2010 The RNA binding protein tristetraprolin influences the activation state of murine dendritic cells  
Bros M, Wiechmann N, Besche V, Art J, Pautz A, Grabbe S, Kleinert H, Reske-Kunz AB  
Mol Immunol. 2010 Feb;47(5):1161-70. Epub 2009 Nov 28.

- 2009 Effects of nitroglycerin or pentaerythryl tetranitrate treatment on the gene expression in rat hearts: evidence for cardiotoxic and cardioprotective effects  
Pautz A, Rauschkolb P, Schmidt N, Art J, Oelze M, Wenzel P, Förstermann U, Daiber A, Kleinert H  
Physiol Genomics. 2009 Jul 9;38(2):176-85. Epub 2009 May 5.
- 2009 Similar regulation of human inducible nitric-oxide synthase expression by different isoforms of the RNA-binding protein AUF-1  
Pautz A, Linker K, Altenhöfer S, Heil S, Schmidt N, Art J, Knauer S, Stauber R, Sadri N, Pont A, Schneider RJ, Kleinert H  
J Biol Chem. 2009 Jan 30;284(5):2755-66. Epub 2008 Dec 12.

## 14 Literatur

- Anderson, P. (2010). "Post-transcriptional regulons coordinate the initiation and resolution of inflammation." *Nat Rev Immunol* **10**(1): 24-35.
- Arend, W. P. and J. M. Dayer (1990). "Cytokines and cytokine inhibitors or antagonists in rheumatoid arthritis." *Arthritis Rheum* **33**(3): 305-315.
- Badimon, J. J., M. Lettino, et al. (1999). "Local inhibition of tissue factor reduces the thrombogenicity of disrupted human atherosclerotic plaques: effects of tissue factor pathway inhibitor on plaque thrombogenicity under flow conditions." *Circulation* **99**(14): 1780-1787.
- Bae, S., E. M. Lee, et al. (2011). "Resveratrol alters microRNA expression profiles in A549 human non-small cell lung cancer cells." *Mol Cells* **32**(3): 243-249.
- Bag, J. and R. B. Bhattacharjee (2010). "Multiple levels of post-transcriptional control of expression of the poly (A)-binding protein." *RNA Biol* **7**(1): 5-12.
- Baillet, A. (2010). "[S100A8, S100A9 and S100A12 proteins in rheumatoid arthritis]." *Rev Med Interne* **31**(6): 458-461.
- Baillet, A., C. Trocme, et al. (2010). "Synovial fluid proteomic fingerprint: S100A8, S100A9 and S100A12 proteins discriminate rheumatoid arthritis from other inflammatory joint diseases." *Rheumatology (Oxford)* **49**(4): 671-682.
- Berezziat, G. (1996). "[Diversity of phospholipases A2 and their functions]." *C R Seances Soc Biol Fil* **190**(4): 409-416.
- Bernstein, P., S. W. Peltz, et al. (1989). "The poly(A)-poly(A)-binding protein complex is a major determinant of mRNA stability in vitro." *Mol Cell Biol* **9**(2): 659-670.
- Besche, V., N. Wiechmann, et al. (2010). "Dendritic cells lentivirally engineered to overexpress interleukin-10 inhibit contact hypersensitivity responses, despite their partial activation induced by transduction-associated physical stress." *J Gene Med* **12**(3): 231-243.
- Bevilacqua, A., M. C. Ceriani, et al. (2003). "Post-transcriptional regulation of gene expression by degradation of messenger RNAs." *J Cell Physiol* **195**(3): 356-372.
- Bi, X. L., J. Y. Yang, et al. (2005). "Resveratrol inhibits nitric oxide and TNF-alpha production by lipopolysaccharide-activated microglia." *Int Immunopharmacol* **5**(1): 185-193.
- Birnboim, H. C. and J. Doly (1979). "A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA." *Nucleic Acids Res* **7**(6): 1513-1523.
- Bollig, F., R. Winzen, et al. (2003). "Affinity purification of ARE-binding proteins identifies polyA-binding protein 1 as a potential substrate in MK2-induced mRNA stabilization." *Biochem Biophys Res Commun* **301**(3): 665-670.
- Bradford, M. M. (1976). "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding." *Anal Biochem* **72**: 248-254.
- Brenchley, P. E. (2001). "Antagonising angiogenesis in rheumatoid arthritis." *Ann Rheum Dis* **60 Suppl 3**: iii71-74.
- Briata, P., C. Y. Chen, et al. (2011). "KSRP, many functions for a single protein." *Front Biosci* **16**: 1787-1796.
- 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." *Mol Cell* **20**(6): 891-903.
- Briata, P., C. Ilengo, et al. (2003). "The Wnt/beta-catenin-->Pitx2 pathway controls the turnover of Pitx2 and other unstable mRNAs." *Mol Cell* **12**(5): 1201-1211.
- Brisdelli, F., G. D'Andrea, et al. (2009). "Resveratrol: a natural polyphenol with multiple chemopreventive properties." *Curr Drug Metab* **10**(6): 530-546.
- Brooks, S. A., J. E. Connolly, et al. (2004). "The role of mRNA turnover in the regulation of tristetraprolin expression: evidence for an extracellular signal-regulated kinase-specific, AU-rich element-dependent, autoregulatory pathway." *J Immunol* **172**(12): 7263-7271.
- Buer, J., A. Lanoue, et al. (1998). "Interleukin 10 secretion and impaired effector function of major histocompatibility complex class II-restricted T cells anergized in vivo." *J Exp Med* **187**(2): 177-183.
- Burd, C. G., E. L. Matunis, et al. (1991). "The multiple RNA-binding domains of the mRNA poly(A)-binding protein have different RNA-binding activities." *Mol Cell Biol* **11**(7): 3419-3424.
- Burrage, P. S., K. S. Mix, et al. (2006). "Matrix metalloproteinases: role in arthritis." *Front Biosci* **11**: 529-543.
- Canto, C., L. Q. Jiang, et al. (2010). "Interdependence of AMPK and SIRT1 for metabolic adaptation to fasting and exercise in skeletal muscle." *Cell Metab* **11**(3): 213-219.

- Capiralla, H., V. Vingtdeux, et al. (2012). "Resveratrol mitigates lipopolysaccharide- and Abeta-mediated microglial inflammation by inhibiting the TLR4/NF-kappaB/STAT signaling cascade." *J Neurochem* **120**(3): 461-472.
- Caput, D., B. Beutler, et al. (1986). "Identification of a common nucleotide sequence in the 3'-untranslated region of mRNA molecules specifying inflammatory mediators." *Proc Natl Acad Sci USA* **83**: 1670-1674.
- Carballo, E. and P. J. Blakeshear (2001). "Roles of tumor necrosis factor-alpha receptor subtypes in the pathogenesis of the tristetraprolin-deficiency syndrome." *Blood* **98**(8): 2389-2395.
- Ceribelli, A., M. A. Nahid, et al. (2011). "MicroRNAs in rheumatoid arthritis." *FEBS Lett* **585**(23): 3667-3674.
- Chang, S. H. and T. Hla (2011). "Gene regulation by RNA binding proteins and microRNAs in angiogenesis." *Trends Mol Med* **17**(11): 650-658.
- 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, T. M., C. H. Hsu, et al. (2010). "AUF-1 p42 isoform selectively controls both steady-state and PGE2-induced FGF9 mRNA decay." *Nucleic Acids Res* **38**(22): 8061-8071.
- Chomczynski, P. and N. Sacchi (1987). "Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction." *Anal Biochem* **162**(1): 156-159.
- Chung, E. Y., B. H. Kim, et al. (2011). "Resveratrol down-regulates interferon-gamma-inducible inflammatory genes in macrophages: molecular mechanism via decreased STAT-1 activation." *J Nutr Biochem* **22**(10): 902-909.
- Courtenay, J. S., M. J. Dallman, et al. (1980). "Immunisation against heterologous type II collagen induces arthritis in mice." *Nature* **283**(5748): 666-668.
- Danckwardt, S., A. S. Gantzer, et al. (2011). "p38-MAPK controls prothrombin expression by regulated RNA 3' end processing." *Mol Cell* **41**(3): 298-310.
- 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." *J Biol Chem* **271**(49): 31679-31687.
- Dean, J. L., G. Sully, et al. (2004). "The involvement of AU-rich element-binding proteins in p38 mitogen-activated protein kinase pathway-mediated mRNA stabilisation." *Cell Signal* **16**(10): 1113-1121.
- Diaz-Moreno, I., D. Hollingworth, et al. (2009). "Phosphorylation-mediated unfolding of a KH domain regulates KSRP localization via 14-3-3 binding." *Nat Struct Mol Biol* **16**(3): 238-246.
- Dolinsky, V. W. and J. R. Dyck (2011). "Calorie restriction and resveratrol in cardiovascular health and disease." *Biochim Biophys Acta* **1812**(11): 1477-1489.
- Donnelly, L. E., R. Newton, et al. (2004). "Anti-inflammatory effects of resveratrol in lung epithelial cells: molecular mechanisms." *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **287**(4): L774-783.
- Dragu, A., S. Schnurer, et al. (2011). "Gene expression analysis of ischaemia and reperfusion in human microsurgical free muscle tissue transfer." *J Cell Mol Med* **15**(4): 983-993.
- Drexler, S. K., P. L. Kong, et al. (2008). "Cell signalling in macrophages, the principal innate immune effector cells of rheumatoid arthritis." *Arthritis Res Ther* **10**(5): 216.
- Dynan, W. S., J. D. Saffer, et al. (1985). "Transcription factor Sp1 recognizes promoter sequences from the monkey genome that are simian virus 40 promoter." *Proc Natl Acad Sci U S A* **82**(15): 4915-4919.
- Elton, T. S., M. Khan, et al. (2011). "MicroRNAs in cardiovascular disease." *F1000 Med Rep* **3**: 10.
- Fabian, M. R., N. Sonenberg, et al. (2010). "Regulation of mRNA translation and stability by microRNAs." *Annu Rev Biochem* **79**: 351-379.
- Fan, X. C. and J. A. Steitz (1998). "Overexpression of HuR, a nuclear-cytoplasmic shuttling protein, increases the in vivo stability of ARE-containing mRNAs." *Embo J* **17**(12): 3448-3460.
- Feng, Z. T., J. Li, et al. (2011). "[Expression of miR-146a and miR-16 in peripheral blood mononuclear cells of patients with rheumatoid arthritis and their correlation to the disease activity]." *Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao* **31**(2): 320-323.
- Finger, F., C. Schorle, et al. (2003). "Molecular phenotyping of human chondrocyte cell lines T/C-28a2, T/C-28a4, and C-28/I2." *Arthritis Rheum* **48**(12): 3395-3403.
- Fournier, M. L., A. Paulson, et al. (2010). "Delayed correlation of mRNA and protein expression in rapamycin-treated cells and a role for Ggc1 in cellular sensitivity to rapamycin." *Mol Cell Proteomics* **9**(2): 271-284.
- Furer, V., J. D. Greenberg, et al. (2010). "The role of microRNA in rheumatoid arthritis and other autoimmune diseases." *Clin Immunol* **136**(1): 1-15.
- Garcia-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., K. Y. Lee, et al. (2004). "A KH domain RNA binding protein, KSRP, promotes ARE-directed mRNA turnover by recruiting the degradation machinery." *Mol Cell* **14**(5): 571-583.
- Gherzi, R., M. Trabucchi, et al. (2006). "The RNA-binding protein KSRP promotes decay of beta-catenin mRNA and is inactivated by PI3K-AKT signaling." *PLoS Biol* **5**(1): e5.
- Goldring, M. B. and F. Berenbaum (2004). "The regulation of chondrocyte function by proinflammatory mediators: prostaglandins and nitric oxide." *Clin Orthop Relat Res*(427 Suppl): S37-46.
- Goyette, J. and C. L. Geczy (2011). "Inflammation-associated S100 proteins: new mechanisms that regulate function." *Amino Acids* **41**(4): 821-842.
- Grabowski, P. S., P. K. Wright, et al. (1997). "Immunolocalization of inducible nitric oxide synthase in synovium and cartilage in rheumatoid arthritis and osteoarthritis." *Br J Rheumatol* **36**(6): 651-655.
- Haider, U. G., D. Sorescu, et al. (2002). "Resveratrol suppresses angiotensin II-induced Akt/protein kinase B and p70 S6 kinase phosphorylation and subsequent hypertrophy in rat aortic smooth muscle cells." *Mol Pharmacol* **62**(4): 772-777.
- 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." *Mol Biol Cell* **15**(2): 774-786.
- Hammaker, D., S. Sweeney, et al. (2003). "Signal transduction networks in rheumatoid arthritis." *Ann Rheum Dis* **62 Suppl 2**: ii86-89.
- Hammer, H. B., S. Odegard, et al. (2007). "Calprotectin (a major leucocyte protein) is strongly and independently correlated with joint inflammation and damage in rheumatoid arthritis." *Ann Rheum Dis* **66**(8): 1093-1097.
- Harikumar, K. B. and B. B. Aggarwal. (2008, Apr 15). "Resveratrol: a multitargeted agent for age-associated chronic diseases." *Cell Cycle* Retrieved 8, 7
- He, L., A. Weber, et al. (2000). "Nuclear targeting determinants of the far upstream element binding protein, a c-myc transcription factor." *Nucleic Acids Res* **28**(22): 4558-4565.
- Horiuchi, K., S. Saito, et al. (2003). "Expression of granzyme B in human articular chondrocytes." *J Rheumatol* **30**(8): 1799-1810.
- 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 Lett* **457**(2): 209-213.
- Imler, T. J., Jr. and T. M. Petro (2009). "Decreased severity of experimental autoimmune encephalomyelitis during resveratrol administration is associated with increased IL-17+IL-10+ T cells, CD4(-) IFN-gamma+ cells, and decreased macrophage IL-6 expression." *Int Immunopharmacol* **9**(1): 134-143.
- Ing, N. H., D. A. Massuto, et al. (2008). "Estradiol up-regulates AUF-1p45 binding to stabilizing regions within the 3'-untranslated region of estrogen receptor alpha mRNA." *J Biol Chem* **283**(3): 1764-1772.
- Jaber, J., J. Murin, et al. (2002). "[The role of infection and inflammation in the pathogenesis of atherosclerosis]." *Vnitr Lek* **48**(7): 657-666.
- Jing, Q., S. Huang, et al. (2005). "Involvement of microRNA in AU-rich element-mediated mRNA instability." *Cell* **120**(5): 623-634.
- Ketelhuth, D. F. and M. Back (2011). "The role of matrix metalloproteinases in atherothrombosis." *Curr Atheroscler Rep* **13**(2): 162-169.
- Khabar, K. S. (2010). "Post-transcriptional control during chronic inflammation and cancer: a focus on AU-rich elements." *Cell Mol Life Sci* **67**(17): 2937-2955.
- Kim, G. Y., H. Cho, et al. (2004). "Resveratrol inhibits phenotypic and functional maturation of murine bone marrow-derived dendritic cells." *Int Immunopharmacol* **4**(2): 245-253.
- Kim, W. J., H. Kim, et al. (2007). "Macrophages express granzyme B in the lesion areas of atherosclerosis and rheumatoid arthritis." *Immunol Lett* **111**(1): 57-65.
- Kitas, G. D. and S. E. Gabriel (2011). "Cardiovascular disease in rheumatoid arthritis: state of the art and future perspectives." *Ann Rheum Dis* **70**(1): 8-14.
- Kobayashi, S. (1997). "[T cell tolerance and autoimmune disease]." *Nihon Rinsho* **55**(6): 1345-1350.
- Koenders, M. I., R. J. Marijnissen, et al. (2011). "Tumor necrosis factor-interleukin-17 interplay induces S100A8, interleukin-1beta, and matrix metalloproteinases, and drives irreversible cartilage destruction in murine arthritis: rationale for combination treatment during arthritis." *Arthritis Rheum* **63**(8): 2329-2339.
- Koga, T., S. Yamasaki, et al. (2011). "Post-transcriptional regulation of IL-6 production by Zc3h12a in fibroblast-like synovial cells." *Clin Exp Rheumatol* **29**(6): 906-912.
- Koike, T. (2006). "[Destruction of articular cartilage]." *Clin Calcium* **16**(9): 1543-1547.
- Kracht, M. and J. Saklatvala (2002). "Transcriptional and post-transcriptional control of gene expression in inflammation." *Cytokine* **20**(3): 91-106.

- Kubota, S., T. Kurihara, et al. (2009). "Prevention of ocular inflammation in endotoxin-induced uveitis with resveratrol by inhibiting oxidative damage and nuclear factor-kappaB activation." *Invest Ophthalmol Vis Sci* **50**(7): 3512-3519.
- Kurowska-Stolarska, M., S. Alivernini, et al. (2011). "MicroRNA-155 as a proinflammatory regulator in clinical and experimental arthritis." *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**(27): 11193-11198.
- Laemmli, U. K. (1970). "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4." *Nature* **227**: 680-685.
- Lagouge, M., C. Argmann, et al. (2006). "Resveratrol improves mitochondrial function and protects against metabolic disease by activating SIRT1 and PGC-1alpha." *Cell* **127**(6): 1109-1122.
- Leah, E. (2011). "Rheumatoid arthritis: miR-155 mediates inflammation." *Nat Rev Rheumatol* **7**(8): 437.
- Lee, D. W., M. Futami, et al. (2012). "Loss of SHIP-1 protein expression in high-risk myelodysplastic syndromes is associated with miR-210 and miR-155." *Oncogene*.
- Lee, S. H., J. H. Bahn, et al. (2010). "Activating transcription factor 2 (ATF2) controls tolfenamic acid-induced ATF3 expression via MAP kinase pathways." *Oncogene* **29**(37): 5182-5192.
- Lejeune, F., X. Li, et al. (2003). "Nonsense-mediated mRNA decay in mammalian cells involves decapping, deadenylation, and exonucleolytic activities." *Mol Cell* **12**(3): 675-687.
- Lellek, H., R. Kirsten, et al. (2000). "Purification and molecular cloning of a novel essential component of the apolipoprotein B mRNA editing enzyme-complex." *J Biol Chem* **275**(26): 19848-19856.
- Levin, M. and M. Mercola (2000). "Expression of connexin 30 in *Xenopus* embryos and its involvement in hatching gland function." *Dev Dyn* **219**(1): 96-101.
- Li, R. W., C. Freeman, et al. (2008). "Dramatic regulation of heparanase activity and angiogenesis gene expression in synovium from patients with rheumatoid arthritis." *Arthritis Rheum* **58**(6): 1590-1600.
- 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 Res* **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." *Mol Cell Biol* **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 Res* **33**(15): 4813-4827.
- Livak, K. J. and T. D. Schmittgen (2001). "Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method." *Methods* **25**(4): 402-408.
- Lu, J. Y., N. Sadri, et al. (2006). "Endotoxic shock in AUF-1 knockout mice mediated by failure to degrade proinflammatory cytokine mRNAs." *Genes Dev* **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 Immunol* **11**: 55.
- Lu, T. X., J. Hartner, et al. (2011). "MicroRNA-21 limits in vivo immune response-mediated activation of the IL-12/IFN-gamma pathway, Th1 polarization, and the severity of delayed-type hypersensitivity." *J Immunol* **187**(6): 3362-3373.
- Malemud, C. J. (2007). "Growth hormone, VEGF and FGF: involvement in rheumatoid arthritis." *Clin Chim Acta* **375**(1-2): 10-19.
- Mamehara, A., T. Sugimoto, et al. (2010). "Serum matrix metalloproteinase-3 as predictor of joint destruction in rheumatoid arthritis, treated with non-biological disease modifying anti-rheumatic drugs." *Kobe J Med Sci* **56**(3): E98-107.
- Mangus, D. A., M. C. Evans, et al. (2003). "Poly(A)-binding proteins: multifunctional scaffolds for the post-transcriptional control of gene expression." *Genome Biol* **4**(7): 223.
- Masuda, S., M. Murakami, et al. (2005). "Various secretory phospholipase A2 enzymes are expressed in rheumatoid arthritis and augment prostaglandin production in cultured synovial cells." *Febs J* **272**(3): 655-672.
- Matsui, K., H. Tsutsui, et al. (2003). "Pathophysiological roles for IL-18 in inflammatory arthritis." *Expert Opin Ther Targets* **7**(6): 701-724.
- McClung, H. M., S. L. Thomas, et al. (2007). "SPARC upregulates MT1-MMP expression, MMP-2 activation, and the secretion and cleavage of galectin-3 in U87MG glioma cells." *Neurosci Lett* **419**(2): 172-177.
- McCurdy, S. M., Q. Dai, et al. (2011). "SPARC mediates early extracellular matrix remodeling following myocardial infarction." *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **301**(2): H497-505.
- McInnes, I. B. and G. Schett (2007). "Cytokines in the pathogenesis of rheumatoid arthritis." *Nat Rev Immunol* **7**(6): 429-442.

- McKnight, S. and R. Tjian (1986). "Transcriptional selectivity of viral genes in mammalian cells." *Cell* **46**(6): 795-805.
- Menschikowski, M., A. Hagelgans, et al. (2006). "Secretory phospholipase A2 of group IIA: is it an offensive or a defensive player during atherosclerosis and other inflammatory diseases?" *Prostaglandins Other Lipid Mediat* **79**(1-2): 1-33.
- Min, H., C. W. Turck, et al. (1997). "A new regulatory protein, KSRP, mediates exon inclusion through an intronic splicing enhancer." *Genes Dev* **11**(8): 1023-1036.
- Miyasaka, N. and Y. Hirata (1997). "Nitric oxide and inflammatory arthritides." *Life Sci* **61**(21): 2073-2081.
- Mizoguchi, F. and H. Kohsaka (2012). "Role of microRNA in rheumatoid arthritis." *Nihon Rinsho Meneki Gakkai Kaishi* **35**(1): 69-74.
- Moore, A. R. (2003). "Collagen-induced arthritis." *Methods Mol Biol* **225**: 175-179.
- Morel, J. C., C. C. Park, et al. (2001). "Interleukin-18 induces rheumatoid arthritis synovial fibroblast CXC chemokine production through NF $\kappa$ B activation." *Lab Invest* **81**(10): 1371-1383.
- Morel, J. C., C. C. Park, et al. (2001). "A novel role for interleukin-18 in adhesion molecule induction through NF  $\kappa$  B and phosphatidylinositol (PI) 3-kinase-dependent signal transduction pathways." *J Biol Chem* **276**(40): 37069-37075.
- Mori, L., H. Loetscher, et al. (1992). "Expression of a transgenic T cell receptor beta chain enhances collagen-induced arthritis." *J Exp Med* **176**(2): 381-388.
- Mukherjee, N., P. J. Lager, et al. (2009). "Coordinated posttranscriptional mRNA population dynamics during T-cell activation." *Mol Syst Biol* **5**: 288.
- Mukhopadhyay, P., P. Pacher, et al. (2011). "MicroRNA signatures of resveratrol in the ischemic heart." *Ann N Y Acad Sci* **1215**: 109-116.
- Murata, K., H. Yoshitomi, et al. (2010). "Plasma and synovial fluid microRNAs as potential biomarkers of rheumatoid arthritis and osteoarthritis." *Arthritis Res Ther* **12**(3): R86.
- Myers, L. K., E. F. Rosloniec, et al. (1997). "Collagen-induced arthritis, an animal model of autoimmunity." *Life Sci* **61**(19): 1861-1878.
- Nakamura, S., K. Kamihagi, et al. (1996). "Enhancement of SPARC (osteonectin) synthesis in arthritic cartilage. Increased levels in synovial fluids from patients with rheumatoid arthritis and regulation by growth factors and cytokines in chondrocyte cultures." *Arthritis Rheum* **39**(4): 539-551.
- Nam, N. H. (2006). "Naturally occurring NF-kappaB inhibitors." *Mini Rev Med Chem* **6**(8): 945-951.
- 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." *J Clin Invest* **119**(10): 3102-3114.
- Newbury, S. F., O. Muhlemann, et al. (2006). "Turnover in the Alps: an mRNA perspective. Workshops on mechanisms and regulation of mRNA turnover." *EMBO Rep* **7**(2): 143-148.
- Nguyen-Chi, M. and D. Morello (2008). "[Aberrant regulation of mRNA 3' untranslated region in cancers and inflammation]." *Med Sci (Paris)* **24**(3): 290-296.
- Nieminen, R., S. Leinonen, et al. (2005). "Inhibitors of mitogen-activated protein kinases downregulate COX-2 expression in human chondrocytes." *Mediators Inflamm* **2005**(5): 249-255.
- O'Connell, R. M., A. A. Chaudhuri, et al. (2009). "Inositol phosphatase SHIP1 is a primary target of miR-155." *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**(17): 7113-7118.
- 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." *Am J Chin Med* **37**(6): 1203-1214.
- Onodera, S., J. Nishihira, et al. (2004). "Macrophage migration inhibitory factor up-regulates the expression of interleukin-8 messenger RNA in synovial fibroblasts of rheumatoid arthritis patients: common transcriptional regulatory mechanism between interleukin-8 and interleukin-1beta." *Arthritis Rheum* **50**(5): 1437-1447.
- Orecchia, A., C. Scarponi, et al. (2011). "Sirtinol treatment reduces inflammation in human dermal microvascular endothelial cells." *PLoS One* **6**(9): e24307.
- Otero, M. and M. B. Goldring (2007). "Cells of the synovium in rheumatoid arthritis. Chondrocytes." *Arthritis Res Ther* **9**(5): 220.
- Park, S. J., F. Ahmad, et al. (2012). "Resveratrol ameliorates aging-related metabolic phenotypes by inhibiting cAMP phosphodiesterases." *Cell* **148**(3): 421-433.
- Paschoud, S., A. M. Dogar, et al. (2006). "Destabilization of interleukin-6 mRNA requires a putative RNA stem-loop structure, an AU-rich element, and the RNA-binding protein AUF-1." *Mol Cell Biol* **26**(22): 8228-8241.
- Patino, W. D., J. G. Kang, et al. (2006). "Atherosclerotic plaque macrophage transcriptional regulators are expressed in blood and modulated by tristetraprolin." *Circ Res* **98**(10): 1282-1289.
- Pauley, K. M., M. Satoh, et al. (2008). "Upregulated miR-146a expression in peripheral blood mononuclear cells from rheumatoid arthritis patients." *Arthritis Res Ther* **10**(4): R101.

- Pautz, A., J. Art, et al. (2010). "Regulation of the expression of inducible nitric oxide synthase." *Nitric Oxide* **23**(2): 75-93.
- Pautz, A., K. Linker, et al. (2009). "Similar regulation of human inducible nitric-oxide synthase expression by different isoforms of the RNA-binding protein AUF-1." *J Biol Chem* **284**(5): 2755-2766.
- Penumathsa, S. V. and N. Maulik (2009). "Resveratrol: a promising agent in promoting cardioprotection against coronary heart disease." *Can J Physiol Pharmacol* **87**(4): 275-286.
- Perera, C., H. P. McNeil, et al. (2010). "S100 Calgranulins in inflammatory arthritis." *Immunol Cell Biol* **88**(1): 41-49.
- Pillai, R. S., S. N. Bhattacharyya, et al. (2007). "Repression of protein synthesis by miRNAs: how many mechanisms?" *Trends Cell Biol* **17**(3): 118-126.
- Plump, A. S., J. D. Smith, et al. (1992). "Severe hypercholesterolemia and atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice created by homologous recombination in ES cells." *Cell* **71**(2): 343-353.
- Pufe, T., V. Harde, et al. (2004). "Vascular endothelial growth factor (VEGF) induces matrix metalloproteinase expression in immortalized chondrocytes." *J Pathol* **202**(3): 367-374.
- Pullmann, R., Jr., H. H. Kim, et al. (2007). "Analysis of turnover and translation regulatory RNA-binding protein expression through binding to cognate mRNAs." *Mol Cell Biol* **27**(18): 6265-6278.
- Rahal, K., P. Schmiedlin-Ren, et al. (2012). "Resveratrol has antiinflammatory and antifibrotic effects in the peptidoglycan-polysaccharide rat model of Crohn's disease." *Inflamm Bowel Dis* **18**(4): 613-623.
- Raineri, I., D. Wegmueller, et al. (2004). "Roles of AUF-1 isoforms, HuR and BRF1 in ARE-dependent mRNA turnover studied by RNA interference." *Nucleic Acids Res* **32**(4): 1279-1288.
- 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.
- Rivera, L. B., A. D. Bradshaw, et al. (2011). "The regulatory function of SPARC in vascular biology." *Cell Mol Life Sci* **68**(19): 3165-3173.
- Robbins, J. R. and M. B. Goldring (1999). "Preparation of immortalized human chondrocyte cell lines." *Methods Mol Med* **18**: 173-192.
- Rodrigo, R., A. Miranda, et al. (2011). "Modulation of endogenous antioxidant system by wine polyphenols in human disease." *Clin Chim Acta* **412**(5-6): 410-424.
- Rogler, G. and T. Andus (1998). "Cytokines in inflammatory bowel disease." *World J Surg* **22**(4): 382-389.
- Romagnani, S. (1999). "Th1/Th2 cells." *Inflamm Bowel Dis* **5**(4): 285-294.
- Ruggiero, T., M. Trabucchi, et al. (2009). "LPS induces KH-type splicing regulatory protein-dependent processing of microRNA-155 precursors in macrophages." *FASEB J* **23**(9): 2898-2908.
- Sagliocco, F., B. Laloo, et al. (2006). "The ARE-associated factor AUF-1 binds poly(A) in vitro in competition with PABP." *Biochem J* **400**(2): 337-347.
- Sanderson, R. D., Y. Yang, et al. (2004). "Heparan sulfate proteoglycans and heparanase--partners in osteolytic tumor growth and metastasis." *Matrix Biol* **23**(6): 341-352.
- Santarosa, M., L. Del Col, et al. (2010). "BRCA1 modulates the expression of hnRNPA2B1 and KHSRP." *Cell Cycle* **9**(23): 4666-4673.
- Sarkar, S., K. S. Sinsimer, et al. (2008). "AUF-1 isoform-specific regulation of anti-inflammatory IL10 expression in monocytes." *J Interferon Cytokine Res* **28**(11): 679-691.
- Schmidt, N., A. Pautz, et al. (2010). "Transcriptional and post-transcriptional regulation of iNOS expression in human chondrocytes." *Biochem Pharmacol* **79**(5): 722-732.
- Schreiner, C. E., M. Kumerz, et al. (2011). "Resveratrol blocks Akt activation in angiotensin II- or EGF-stimulated vascular smooth muscle cells in a redox-independent manner." *Cardiovasc Res* **90**(1): 140-147.
- 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." *Arch Biochem Biophys* **495**(1): 56-61.
- Seilhamer, J. J., W. Pruzanski, et al. (1989). "Cloning and recombinant expression of phospholipase A2 present in rheumatoid arthritic synovial fluid." *J Biol Chem* **264**(10): 5335-5338.
- Seko, Y., S. Cole, et al. (2006). "The role of cytokine mRNA stability in the pathogenesis of autoimmune disease." *Autoimmun Rev* **5**(5): 299-305.
- Seo, J. S., M. H. Moon, et al. (2010). "SIRT1, a histone deacetylase, regulates prion protein-induced neuronal cell death." *Neurobiol Aging*.
- Setoguchi, K., Y. Misaki, et al. (2004). "Suppression of T cell responses by chondromodulin I, a cartilage-derived angiogenesis inhibitory factor: therapeutic potential in rheumatoid arthritis." *Arthritis Rheum* **50**(3): 828-839.



- Sherer, Y. and Y. Shoenfeld (2006). "Mechanisms of disease: atherosclerosis in autoimmune diseases." *Nat Clin Pract Rheumatol* **2**(2): 99-106.
- Shimizu, T., T. Nakazato, et al. (2006). "Resveratrol induces apoptosis of human malignant B cells by activation of caspase-3 and p38 MAP kinase pathways." *Biochem Pharmacol* **71**(6): 742-750.
- Shukunami, C., Y. Oshima, et al. (2005). "Chondromodulin-I and tenomodulin: a new class of tissue-specific angiogenesis inhibitors found in hypovascular connective tissues." *Biochem Biophys Res Commun* **333**(2): 299-307.
- Snir, O., J. Backlund, et al. (2012). "Multifunctional T cell reactivity to native and glycosylated type-II collagen in rheumatoid arthritis." *Arthritis Rheum*.
- Sternlicht, M. D. and Z. Werb (2001). "How matrix metalloproteinases regulate cell behavior." *Annu Rev Cell Dev Biol* **17**: 463-516.
- Stoecklin, G., T. Mayo, et al. (2006). "ARE-mRNA degradation requires the 5'-3' decay pathway." *EMBO Rep* **7**(1): 72-77.
- Sudowe, S., V. Arps, et al. (2000). "The role of interleukin-4 in the regulation of sequential isotype switch from immunoglobulin G1 to immunoglobulin E antibody production." *Scand J Immunol* **51**(5): 461-471.
- Sulaiman, M., M. J. Matta, et al. (2010). "Resveratrol, an activator of SIRT1, upregulates sarcoplasmic calcium ATPase and improves cardiac function in diabetic cardiomyopathy." *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **298**(3): H833-843.
- Suswam, E. A., L. B. Nabors, et al. (2005). "IL-1beta induces stabilization of IL-8 mRNA in malignant breast cancer cells via the 3' untranslated region: Involvement of divergent RNA-binding factors HuR, KSRP and TIAR." *Int J Cancer* **113**(6): 911-919.
- Suzuki, E., A. Tsutsumi, et al. (2006). "Expression of TNF-alpha, tristetraprolin, T-cell intracellular antigen-1 and Hu antigen R genes in synovium of patients with rheumatoid arthritis." *Int J Mol Med* **18**(2): 273-278.
- Szymanski, M. and J. Barciszewski (2003). "Regulation by RNA." *Int Rev Cytol* **231**: 197-258.
- Tak, P. P., L. Spaeny-Dekking, et al. (1999). "The levels of soluble granzyme A and B are elevated in plasma and synovial fluid of patients with rheumatoid arthritis (RA)." *Clin Exp Immunol* **116**(2): 366-370.
- Tang, K., E. C. Breen, et al. (2002). "Hu protein R-mediated posttranscriptional regulation of VEGF expression in rat gastrocnemius muscle." *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **283**(4): H1497-1504.
- 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." *J Biol Chem* **279**(31): 32393-32400.
- Tili, E., J. J. Michaille, et al. (2010). "Resveratrol decreases the levels of miR-155 by upregulating miR-663, a microRNA targeting JunB and JunD." *Carcinogenesis* **31**(9): 1561-1566.
- Trabucchi, M., P. Briata, et al. (2009). "The RNA-binding protein KSRP promotes the biogenesis of a subset of microRNAs." *Nature* **459**(7249): 1010-1014.
- Trentham, D. E., A. S. Townes, et al. (1977). "Autoimmunity to type II collagen an experimental model of arthritis." *J Exp Med* **146**(3): 857-868.
- Tsutsumi, A., E. Suzuki, et al. (2004). "Expression of tristetraprolin (G0S24) mRNA, a regulator of tumor necrosis factor-alpha production, in synovial tissues of patients with rheumatoid arthritis." *J Rheumatol* **31**(6): 1044-1049.
- Uchida, Y., H. Yamazaki, et al. (2005). "Enhancement of NF-kappaB activity by resveratrol in cytokine-exposed mesangial cells." *Clin Exp Immunol* **142**(1): 76-83.
- Um, J. H., S. J. Park, et al. (2010). "AMP-activated protein kinase-deficient mice are resistant to the metabolic effects of resveratrol." *Diabetes* **59**(3): 554-563.
- van't Hof, R. J., L. Hocking, et al. (2000). "Nitric oxide is a mediator of apoptosis in the rheumatoid joint." *Rheumatology (Oxford)* **39**(9): 1004-1008.
- van Ree, J. H., W. J. van den Broek, et al. (1994). "Diet-induced hypercholesterolemia and atherosclerosis in heterozygous apolipoprotein E-deficient mice." *Atherosclerosis* **111**(1): 25-37.
- Varoga, D., T. Pufe, et al. (2004). "Production of endogenous antibiotics in articular cartilage." *Arthritis Rheum* **50**(11): 3526-3534.
- Volin, M. V. and A. E. Koch (2011). "Interleukin-18: a mediator of inflammation and angiogenesis in rheumatoid arthritis." *J Interferon Cytokine Res* **31**(10): 745-751.
- Voulgari, P. V. (2008). "Emerging drugs for rheumatoid arthritis." *Expert Opin Emerg Drugs* **13**(1): 175-196.
- Voulgari, P. V. and A. A. Drosos (2008). "Catastrophic rheumatoid arthritis." *J Rheumatol* **35**(10): 2062-2063.

- Wagner, B. J., C. T. DeMaria, et al. (1998). "Structure and genomic organization of the human AUF-1 gene: alternative pre-mRNA splicing generates four protein isoforms." *Genomics* **48**(2): 195-202.
- Wahl, S. M. (1994). "Transforming growth factor beta: the good, the bad, and the ugly." *J Exp Med* **180**(5): 1587-1590.
- Wessel, D. and U. I. Flugge (1984). "A method for the quantitative recovery of protein in dilute solution in the presence of detergents and lipids." *Anal Biochem* **138**(1): 141-143.
- 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." *Mol Cell Biol* **27**(23): 8388-8400.
- Wong, P. K., I. K. Campbell, et al. (2003). "The role of the interleukin-6 family of cytokines in inflammatory arthritis and bone turnover." *Arthritis Rheum* **48**(5): 1177-1189.
- Yang, Y. H., M. J. Buckley, et al. (2001). "Analysis of cDNA microarray images." *Brief Bioinform* **2**(4): 341-349.
- Yaniv, K. and J. K. Yisraeli (2001). "Defining cis-acting elements and trans-acting factors in RNA localization." *Int Rev Cytol* **203**: 521-539.
- Yeung, F., J. E. Hoberg, et al. (2004). "Modulation of NF-kappaB-dependent transcription and cell survival by the SIRT1 deacetylase." *EMBO J* **23**(12): 2369-2380.
- Yu, Y., Y. Y. Zeng, et al. (2005). "[The effects of resveratrol on the activation, proliferation and cytokine expression of murine T lymphocytes]." *Xi Bao Yu Fen Zi Mian Yi Xue Za Zhi* **21**(6): 697-699, 703.
- Zhang, S., H. Liu, et al. (2006). "Activation of activating transcription factor 2 by p38 MAP kinase during apoptosis induced by human amylin in cultured pancreatic beta-cells." *Febs J* **273**(16): 3779-3791.
- Zhang, S. H., R. L. Reddick, et al. (1992). "Spontaneous hypercholesterolemia and arterial lesions in mice lacking apolipoprotein E." *Science* **258**(5081): 468-471.
- Zhang, X., G. Wan, et al. (2011). "The ATM kinase induces microRNA biogenesis in the DNA damage response." *Mol Cell* **41**(4): 371-383.
- 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.
- Zucconi, B. E., J. D. Ballin, et al. (2010). "Alternatively expressed domains of AU-rich element RNA-binding protein 1 (AUF-1) regulate RNA-binding affinity, RNA-induced protein oligomerization, and the local conformation of bound RNA ligands." *J Biol Chem* **285**(50): 39127-39139.