

Aus dem Institut für Pharmakologie
der Universitätsmedizin der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

**Regulation der Genexpression von IL-17A und CXCL3 durch das
RNA-Bindeprotein KSRP**

Inauguraldissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der
Medizin
der Universitätsmedizin
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Vorgelegt von

Vera Mareike Plümer
aus Nürnberg

Mainz, 2024

Wissenschaftlicher Vorstand:	Univ.-Prof. Dr. Hansjörg Schild
1. Gutachter:	
2. Gutachter:	
Tag der Promotion:	23.04.2025

Inhaltsverzeichnis

I.	Abkürzungsverzeichnis	V
II.	Tabellenverzeichnis.....	IX
III.	Abbildungsverzeichnis.....	X
1	Einleitung und Zielsetzung der Arbeit.....	1
2	Literaturdiskussion.....	4
2.1	Regulation der Genexpression	4
2.1.1	Transkriptionelle Regulationsmechanismen der Genexpression	5
2.1.2	Posttranskriptionelle Regulationsmechanismen der Genexpression.....	6
2.1.2.1	Regulation der mRNA-Stabilität.....	7
2.1.2.1.1	Vorgang der mRNA-Degradation.....	7
2.1.2.1.2	Bedeutung von AU-reichen Elementen (ARE) für die mRNA-Stabilität	7
2.1.2.1.3	Regulation durch RNA-bindende Proteine (RNA-BP).....	8
2.1.2.1.4	Regulation durch MikroRNA (miRNA)	10
2.2	KH-type splicing regulatory protein (KSRP).....	11
2.2.1	Einordnung und Struktur von KSRP	11
2.2.2	Regulatorische Funktionen von KSRP in der Genexpression.....	13
2.2.3	Regulation der KSRP-Aktivität.....	17
2.2.4	Klinische Relevanz von KSRP	18
2.3	Interleukin-17 (IL-17).....	19
2.3.1	Einordnung und Funktionen von IL-17	19
2.3.2	IL-17-produzierende Zellen	20
2.3.3	Genregulation von IL-17	20
2.3.3.1	Transkriptionelle Genregulation von IL-17	20
2.3.3.2	Posttranskriptionelle Genregulation von IL-17	21
2.4	CXC-Motiv Chemokin Ligand 3 (CXCL3)	22
2.4.1	Einordnung und klinische Relevanz von CXCL3	22
2.4.2	Mausmodelle und Zellen zur Untersuchung KSRP-vermittelter Mechanismen der Genregulation von CXCL3	23
2.4.2.1	C57BL/6 KSRP ^{-/-} -Mäuse	23
2.4.2.2	MRL-Fas ^{lpr} KSRP ^{-/-} -Mäuse.....	23
2.4.2.3	Renale Tubulusepithelzellen.....	24
3	Material.....	25
3.1	Laborgeräte	25
3.2	Verbrauchsmaterialien	26

3.3	Puffer, Lösungen und Reagenzien.....	27
3.3.1	Reagenzien	27
3.3.2	Puffer und Lösungen	28
3.3.3	Kits	30
3.3.4	Stimulantien.....	30
3.3.5	Marker	30
3.3.6	Oligonukleotide	31
3.3.7	Antikörper für Western Blot-Analysen	31
3.3.7.1	Primärantikörper	31
3.3.7.2	Sekundärantikörper	32
3.4	Zellen	32
4	Methoden	33
4.1	Zellbiologische Arbeitsmethoden.....	33
4.1.1	Kultivierung eukaryotischer Zellen.....	33
4.1.2	Kryokonservierung und Rekultivierung eukaryotischer Zellen	34
4.1.3	Bestimmung der Lebendzellzahl	35
4.1.4	Aussaat der Zellen in Lochplatten.....	35
4.1.5	Stimulation und Behandlung eukaryotischer Zellen	36
4.1.6	Analyse der mRNA-Stabilität mittels 5,6-Dichlorbenzimidazol-1- β -D- ribofuranosid (DRB)-Behandlung.....	36
4.1.7	Analyse der Protein-Stabilität mittels Cycloheximid (CHX)-Behandlung	37
4.2	Molekularbiologische Methoden	38
4.2.1	Isolation von RNA aus Zellen und Geweben	38
4.2.2	Quantifizierung von Nukleinsäuren	39
4.2.3	cDNA-Synthese mittels Reverser Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR).....	39
4.2.4	Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	40
4.2.5	Agarose-Gelelektrophorese	41
4.2.6	Quantitative real-time PCR (qRT-PCR).....	42
4.3	Proteinbiochemische Methoden.....	43
4.3.1	Isolation von Proteinextrakt aus Zellen und Geweben.....	43
4.3.2	Quantifizierung von Proteinen mittels Bradford-Assay	43
4.3.3	Methanol/Chloroform-Fällung von Proteinen.....	44
4.3.4	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	45
4.3.5	Immundetektion mittels Western Blot	46
4.4	Tierexperimentelle Methoden.....	47
4.4.1	Isolation renaler Tubulusepithelzellen aus Mäusen	47

4.4.2	Isolation muriner Peritonealzellen.....	49
4.5	Statistik	49
5	Ergebnisse	50
5.1	Analysen der mRNA-Expression von IL-17A in murinen EL-4 siKSRP T-Zellen im Vergleich zu murinen EL-4 Kontroll T-Zellen.....	50
5.1.1	Eine verminderte KSRP-Expression in stimulierten EL-4 T-Zellen führt zu keiner verstärkten IL-17A-mRNA-Expression.....	50
5.1.2	Die verminderte KSRP-Expression in EL-4 T-Zellen hat keinen signifikanten Einfluss auf die mRNA-Stabilität von IL-17A.....	52
5.1.3	Eine verminderte KSRP-Expression in EL-4 T-Zellen geht mit einer reduzierten IL-17A-Proteinexpression nach Translationshemmung einher.....	55
5.1.4	Analysen der mRNA-Expression des IL-1-Rezeptorantagonisten in murinen EL-4 Co T-Zellen im Vergleich zu EL-4 siKSRP T-Zellen	59
5.2	Die Aktivierung der p38-MAPK verändert sich in EL-4 T-Zellen mit verminderter KSRP-Expression nicht.....	60
5.3	Analysen einer KSRP-abhängigen Expression von CXCL3 in Mausmodellen	62
5.3.1	Herstellung eines geeigneten Primersystems für qRT-PCR-Analysen zur Untersuchung der CXCL3-mRNA-Expressionen	62
5.3.2	Analysen einer KSRP-abhängigen Expression von CXCL3 in MRL-FAS ^{lpr} -Mäusen	63
5.3.2.1	Renale Tubulusepithelzellen von MRL-FAS ^{lpr} KSRP ^{-/-} -Mäusen weisen eine erhöhte Induzierbarkeit der CXCL3-mRNA-Expression auf.....	63
5.3.2.2	Analysen der Regulation der CXCL3-mRNA-Stabilität in renalen Tubulus-epithelzellen von MRL-Fas ^{lpr} KSRP ^{-/-} -Mäusen im Vergleich zu MRL-Fas ^{lpr} KSRP ^{+/+} -Mäusen.....	65
5.3.3	Analysen einer KSRP-abhängigen Expression von CXCL3 in C57BL/6-Mäusen	67
5.3.3.1	Renale Tubulusepithelzellen von C57BL/6 KSRP ^{-/-} -Mäusen weisen eine erhöhte Induzierbarkeit der CXCL3-mRNA-Expression auf	67
5.3.3.2	Analysen der Induktion der mRNA-Expression von CXCL3 in Peritoneal-zellen von C57BL/6 KSRP ^{-/-} im Vergleich zu C57BL/6 KSRP ^{+/+} -Mäusen.....	68
6	Diskussion	71
6.1	Analyse einer Regulation der IL-17A-Expression durch KSRP in murinen EL-4 T-Zellen	71
6.1.1	KSRP hat keinen negativ regulatorischen Einfluss auf die IL-17A-mRNA-Expression in stimulierten EL-4 T-Zellen.....	71
6.1.2	KSRP bewirkt keine Destabilisierung der IL-17A-mRNA in stimulierten EL-4 T-Zellen	74
6.1.3	KSRP wirkt stabilisierend auf das IL-17A-Protein.....	79

6.2	KSRP fördert die Expression des IL-1-Rezeptorantagonisten in EL-4 T-Zellen	81
6.3	KSRP hat keinen Einfluss auf die Aktivierung der p38-MAPK in EL-4 T-Zellen	82
6.4	Analysen einer KSRP-abhängigen CXCL3-Expression in Mausmodellen	83
6.4.1	KSRP induziert die CXCL3-mRNA-Expression in renalen Tubulusepithelzellen	83
6.4.2	KSRP könnte einen destabilisierenden Effekt auf die CXCL3-mRNA-Stabilität in renalen Tubulusepithelzellen haben	86
6.4.3	KSRP könnte die CXCL3-mRNA-Expression in Peritonealzellen geschlechtsspezifisch induzieren.....	87
7	Zusammenfassung.....	90
8	Literaturverzeichnis	92
9	Anhang	106
10	Danksagung	108
11	Tabellarischer Lebenslauf.....	109

I. Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
ALAE	<i>Axon-enriched lncRNA</i>
AMD	ARE-vermittelter mRNA-Abbau
ANOVA	<i>analysis of variance</i>
ApoB	Apolipoprotein B
APOBEC-1	<i>ApoB Editing Komplex-1</i>
ARE	AU-reiches Element
Arid5a	AT-reiche interaktive Domäne-enthaltendes Protein 5a
ATM	<i>Ataxia Teleangiectasia mutated</i>
AUF1	<i>AU-rich RNA-binding factor 1</i>
bp	Basenpaare (Einheit)
BSA	Bovines Serum Albumin
bzw.	beziehungsweise
C	Cytosin
ca.	circa
CAIA	Kollagen-Antikörper-induzierte Arthritis
cap	7-Methyl-Guanylat-Kopfgruppe am 5'-Ende einer mRNA
CBA	<i>Cytometric Bead Array</i>
CCR4-NOT	<i>Carbon Catabolite Repression-Negative On TATA-less</i>
CCR6	C-C-Chemokinrezeptor Typ 6
cDNA	komplementäre DNA (zur mRNA)
CHX	Cyclohexamid
CD	<i>cluster of differentiation</i>
CM	Cytokingemisch
COAD	Adenokarzinoms des Kolons
COX-2	Cyclooxygenase Typ II
CTLA-8	zytotoxisches T-Lymphozyten-assoziiertes Antigen-8
CXCL	CXC-Motiv Chemokin Ligand
DCP	mRNA-Decapping-Protein
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMEM	Dulbecco's modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure

DNMT	DNA-Methyl-Transferase
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DRB	5,6-Dichlorobenzimidazol-1- β -D-ribofuranosid
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
Epr	<i>Epithelial cell Program Regulator</i>
et al.	und andere
etc.	et cetera
FBP2	<i>fuse binding protein 2</i>
FDR	<i>false discovery rate</i>
FUSE	<i>far upstream sequence element</i>
G	Guanin
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GDF15	Wachstumsdifferenzierungsfaktor 15
GIT	Guanidiniumisothiocyanat
GM-CSF	Granulozyten/Monozyten-Kolonie-stimulierender Faktor
GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunden
hnRNA	heteronukleäre RNA
hnRNP	heterogenes nukleäres Ribonukleoprotein
HuR	humanes Antigen R
ICL3	<i>innate lymphoid cells 3</i>
IFN	Interferon
IL	Interleukin
IL-1-RA	IL-1-Rezeptorantagonisten
iNOS	induzierbare NO-Synthase
JAK/STAT	<i>Januskinase/signal transducers and activators of transcription</i>
kb	kilo-Basen
kD	keine Daten
kDa	kilo-Dalton
KH	K homolog
KO	<i>knockout</i>
KSRP	<i>KH-type splicing regulatory protein</i>

L	Ligand
lncRNA	<i>long non-coding</i> RNA
LPS	Lipopolysaccharide
min	Minute(n)
miRNA	Mikro-RNA
MP	Magermilchpulver
mRNA	<i>messenger</i> RNA
mTor	<i>mammalian target of rapamycin</i>
NaAc	Natriumacetat
ncRNA	<i>non-coding</i> RNA
NF-κB	Nuklearer Faktor κB
NGD	<i>No-Go-Decay</i>
NMD	<i>Nonsense-Mediated-Decay</i>
NOT	<i>Negative On TATA-less</i>
ns	nicht signifikant
NSCLC	nicht-kleinzelliges Bronchialkarzinom
NSD	<i>Non-Stop-Decay</i>
nt	Nukleotide (Einheit)
OD	optische Dichte
p38-MAPK	p38-mitogenaktivierte Proteinkinasen
p-p38-MAPK	Phospho-p38-mitogenaktivierte Proteinkinasen
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
Pan	Poly(A)-Nuklease
PARN	Poly(A)-spezifische Ribonuklease
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PE	Phycoerythrin
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase
PKB	Proteinkinase B
PMA	Phorbol-12-Myristat-13-Acetat
Pol II	Polymerase II
qRT-PCR	quantitative Real-Time PCR
RBD	RNA-bindende Domäne
RIPA	<i>Radio-Immunoprecipitation Assay</i>

RISC	<i>RNA-induced silencing complex</i>
RNA	Ribonukleinsäure
RNA-BP	RNA-bindendes Protein
RNase	Ribonuklease
ROR γ t	<i>RAR-related orphan receptor-γ</i>
rpm	Umdrehungen pro Minute
RRM	RNA-Erkennungsmotiv
RT-PCR	Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion
RTEC	Renale Tubulusepithelzellen
Runx1	<i>Runt-related</i> Transkriptionsfaktor 1
SDS	Natriumdodecylsulfat
SEM	Standardfehler des Mittelwerts
shRNA	<i>small hairpin</i> RNA
siRNA	<i>small interfering</i> RNA
SLE	systemischer Lupus erythematoses
STAT	<i>signal transducers and activators of transcription</i>
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TBS	<i>Tris-buffered saline</i>
TBST	<i>Tris-buffered saline</i> mit Tween20
TBP	TATA-Bindeprotein
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethan-1,2-diamin
TGF	<i>Transforming growth factor</i>
Th	T Helferzellen
TIA-1	<i>T cell intercellular antigen 1</i>
TNF- α	Tumornekrosefaktor α
tRNA	Transfer-RNA
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
TTP	Tristetraprolin
U	Uracil
UTR	untranslatierte Region
Vol	Volumen
WT	Wildtyp

II. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Auflistung der verwendeten Laborgeräte.....	25
Tabelle 2: Auflistung der verwendeten Verbrauchsmaterialien	26
Tabelle 3: Auflistung der verwendeten Chemikalien und Medien	27
Tabelle 4: Auflistung der verwendeten Puffer und Lösungen	28
Tabelle 5: Auflistung der verwendeten Puffer und Lösungen für Proteinanalysen mittels Western Blot	29
Tabelle 6: Auflistung der verwendeten Kits	30
Tabelle 7: Auflistung der verwendeten Stimulantien	30
Tabelle 8: Auflistung der verwendeten Marker	30
Tabelle 9: Auflistung der verwendeten qRT-PCR-Primer.....	31
Tabelle 10: Auflistung der verwendeten Primärantikörper	31
Tabelle 11: Auflistung der verwendeten Sekundärantikörper	32
Tabelle 12: Auflistung der verwendeten Zelllinien	32
Tabelle 13: Auflistung der verwendeten Kulturmedien für jede Zelllinie.....	33
Tabelle 14: Auflistung der verwendeten Kulturgefäße und Zellzahlen zur Versuchsdurchführung für jede Zelllinie.....	36
Tabelle 15: Ansatz für die Reverse Transkription mit dem High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit.....	39
Tabelle 16: Temperaturprogramm für die Reverse Transkription	39
Tabelle 17: Ansatz für eine PCR unter Verwendung des OneTaq® 2X Master Mixes	41
Tabelle 18: Temperaturprogramm für eine PCR unter Verwendung des OneTaq® 2X Master Mixes	41
Tabelle 19: Ansatz für eine qRT-PCR	42
Tabelle 20: Temperaturprogramm für eine qRT-PCR.....	43
Tabelle 21: Verdünnungsreihe für einen Bradford-Assay	44
Tabelle 22: Zusammensetzung der SDS-Polyacrylamid-Gele	46
Tabelle 23: Darstellung der Expressionswerte für die in der Arbeit untersuchten Gene in murinen oder humanen Zellen mit durch siRNA herabregulierter KSRP- Expression im Vergleich zu mit Kontroll-siRNA behandelten Zellen.....	106

III. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematische Darstellung der primären Proteinstruktur von KSRP	12
Abbildung 2: KSRP reguliert die Genexpression auf verschiedenen Ebenen	13
Abbildung 3: Die mRNA-Expression von IL-17A in murinen EL-4 siKSRP T-Zellen (EL-4 siKSRP) und EL-4 Kontroll T-Zellen (EL4 Co) nach Behandlung mit dem Lösungsmittel DMSO bzw. PMA und Ionomycin (P/I).....	51
Abbildung 4: Kontrolle der mRNA-Expression von IL-17A in murinen EL-4 siKSRP und EL-4 Co T-Zellen nach der Behandlung mit PMA und Ionomycin bzw. nach der Kontrollbehandlung mit DMSO über 4 h.....	52
Abbildung 5: mRNA-Stabilitätsanalysen von IL-17A (A) und TNF- α (B) in murinen EL-4 siKSRP und EL-4 Co T-Zellen mittels Behandlung mit DRB zum Zeitpunkt 0 h	54
Abbildung 6: mRNA-Expression von IL-17A (A) und TNF- α (B) in murinen EL-4 siKSRP und EL-4 Co T-Zellen nach der Behandlung mit DRB für 6 h bzw. 2 h	55
Abbildung 7: Die Proteinexpressionen von IL-17A und TNF- α in EL-4 siKSRP und EL-4 Co T-Zellen nach Behandlung mit CHX über 3 h	56
Abbildung 8: Die Proteinexpression von IL-17A (A) und TNF- α (B) in EL-4 siKSRP und EL-4 Co T-Zellen nach Behandlung mit CHX	57
Abbildung 9: Die mRNA-Expression von IL-17A und TNF- α in murinen EL-4 Co und EL-4 siKSRP T-Zellen nach Behandlung mit CHX	58
Abbildung 10: Die mRNA-Expression IL-1-RA in murinen EL-4 siKSRP T-Zellen und EL-4 Co T-Zellen nach Stimulation mit PMA und Ionomycin	60
Abbildung 11: Untersuchung einer KSRP-abhängigen Veränderung in der Aktivierung der p38-MAPK in EL-4 T-Zellen	61
Abbildung 12: Agarosegele der qRT-PCR mit Proben aus EL-4 T-Zellen (A) und renalen Tubulusepithelzellen (RTEC) von MRL-Fas ^{lpr} WT-Mäusen (B) unter Verwendung von CXCL3-Primervariante 2	63
Abbildung 13: Untersuchung KSRP-abhängiger Unterschiede in der Induktion der CXCL3-mRNA-Expression in RTEC von MRL Fas ^{lpr} KSRP ^{-/-} -Mäusen und MRL Fas ^{lpr} KSRP ^{+/+} -Mäusen nach 3-stündiger Kontroll- und LPS-Behandlung	64
Abbildung 14: Untersuchung eines KSRP-abhängigen Unterschieds in der Induktion der CXCL3-mRNA-Expression in RTEC von MRL Fas ^{lpr} KSRP ^{-/-} -Mäusen und MRL Fas ^{lpr} KSRP ^{+/+} -Mäusen nach 24-stündiger Kontroll- und LPS-Behandlung	65
Abbildung 15: mRNA-Stabilitätsanalysen von CXCL3 (A) und CXCL1 (B) in RTEC von MRL Fas ^{lpr} KSRP ^{+/+} - und MRL Fas ^{lpr} KSRP ^{-/-} -Mäusen mittels Behandlung mit DRB zum Zeitpunkt 0 h	66
Abbildung 16: Untersuchung eines KSRP-abhängigen Unterschieds in der Induktion der CXCL3-mRNA-Expression in RTEC von C57BL/6 KSRP ^{-/-} - im Vergleich zu C57BL/6 KSRP ^{-/-} -Mäusen.....	68

Abbildung 17: Untersuchungen der Induktion der mRNA-Expression von CXCL3 in Peritonealzellen von C57BL/6 KSRP ^{+/+} - im Vergleich zu C57BL/6 KSRP ^{-/-} -Mäusen	69
--	----

1 Einleitung und Zielsetzung der Arbeit

Cytokine sind aus der Literatur als wichtige Mediatoren von Immunprozessen bekannt. Sie sind Teil des angeborenen und des erworbenen Immunsystems und können sowohl proinflammatorische als auch antiinflammatorische Wirkung haben. Eine Dysregulation im Gleichgewicht zwischen den Entzündungsmediatoren kann zu schweren autoimmunen und chronisch-entzündlichen Erkrankungen führen (Borish & Steinke, 2003; Jarczak & Nierhaus, 2022). Angesichts der steigenden Prävalenz von Inflammationserkrankungen wird ein noch genaueres Verständnis der Expressionsregulation von Entzündungsmediatoren angestrebt. Aus der Literatur geht bereits hervor, dass die Cytokinexpression auf verschiedenen Ebenen der Genexpression kontrolliert wird: Es wurden zahlreiche komplexe Regulationsmechanismen u.a. auf epigenetischer Ebene, auf den Ebenen der Transkription und der Translation sowie auf Proteinebene nachgewiesen, die sich wiederum wechselseitig beeinflussen (Kovarik et al., 2017; C.-G. Lee et al., 2009; J. Liu et al., 2016; Rauscher & Ignatova, 2015).

Als wichtige Regulatoren der Cytokinexpression wurden Ribonukleinsäure-Bindeproteine (RNA-BP) erkannt. RNA-BP sind insbesondere an der posttranskriptionellen Genregulation beteiligt, indem sie z.B. das Splicing von *messenger* Ribonukleinsäure (mRNA), die mRNA-Stabilität, die mRNA-Degradation sowie das mRNA-Translationspotenzial einer Vielzahl von Entzündungsmediatoren steuern (Akira & Maeda, 2021; Gerstberger et al., 2014). Ein von der AG Pautz/Kleinert vielfältig untersuchtes RNA-BP ist das *KH-type splicing regulatory protein* (KSRP). In zellulären Modellen konnte die AG Pautz/Kleinert die in der Literatur beschriebene antiinflammatorische Rolle von KSRP überwiegend bestätigen (z.B. Regulation der NOS2, TNF- α Expression durch Destabilisierung der mRNA (Linker et al., 2005)). Jedoch waren nicht alle erhobenen Daten mit der Rolle von KSRP als negativer Regulator der proinflammatorischen Genexpression vereinbar: Die Inaktivierung von KSRP in Mäusen resultierte erstaunlicher Weise in einer deutlich verringerten inflammatorischen Antwort auf die Induktion einer rheumatoiden Arthritis durch spezifische Antikörper (CAIA) (Käfer et al., 2017).

Die AG Pautz/Kleinert führte kürzlich bisher unveröffentlichte RNA-Seq-Analysen an murinen T-Lymphozyten durch. Die T-Lymphozyten wurden aus KSRP-knockout (KSRP-KO) bzw. Wildtyp (WT)-Mäusen isoliert und für 24 h polyklonal (mit Antikörper gegen CD3 und CD28) stimuliert. Anschließend wurde die RNA isoliert und durch RNA-Seq die Genexpression der T-Lymphozyten bestimmt. Die Daten von Interleukin (IL)-17A ließen eine 2,3-fach hochregulierte mRNA-Expression des Cytokins in KSRP-KO Mäusen im Vergleich zu den WT-Mäusen erkennen. Aufgrund des „false discovery rate“ (FDR)-Werts von über 0,05 war der Unterschied

in der IL-17A-Expression nicht signifikant. Damit vereinbare Expressionsdaten wurden in Cytometric Bead Array (CBA)-Messungen in EL-4 CD4⁺ T-Zellen erhoben: Nach einer Stimulation wurde in EL-4 T-Zellen mit verminderter KSRP-Expression quantitativ mehr IL-17A nachgewiesen als in den Kontrollzellen. Dies deutet auf eine KSRP-vermittelte Regulation der IL-17A-Expression in murinen EL-4 CD4⁺ T-Zellen hin. Aus bioinformatischen Analysen aller z.Z. (Stand September 2022) in öffentlichen Datenbanken (Pubmed, SRA, Array-Express, Geo, Bioproject; siehe Anhang, Tabelle 23) zu findenden totalen Genexpressionsdaten von humanen oder murinen Zellen bzw. Geweben mit herabregulierter KSRP-Expression (siKSRP vs. Co) lässt sich hingegen ein eher heterogenes Bild erkennen. Ein Großteil der untersuchten Zellen exprimiert wie erwartet wenig oder gar kein IL-17A. Weiterhin sind die FDR-Werte zumeist größer 0,05, womit die Analysen statistisch nicht signifikant sind. Als ein proinflammatorisches Cytokin ist IL-17A an der Pathogenese zahlreicher Entzündungs- und Autoimmunerkrankungen (Psoriasis, rheumatoide Arthritis, allergisches Asthma etc.) beteiligt und hat damit eine bedeutende klinische Relevanz in verschiedenen medizinischen Fachdisziplinen (Blauvelt & Chiricozzi, 2018; Miossec & Kolls, 2012; Schinocca et al., 2021).

In den oben genannten RNA-Seq-Analysen wurde ein weiterer, scheinbar durch KSRP-regulierter Entzündungsmediator detektiert: Aus den Expressionsdaten von T-Zellen mit verminderter KSRP-Expression geht eine um Faktor 3,8 signifikant gesteigerte mRNA-Expression des *C-X-C motif chemokine ligand 3* (CXCL3) hervor. Während für CXCL1 als Mitglied derselben Chemokinfamilie bereits umfangreiche Daten vorliegen und eine Regulation durch KSRP bestätigt werden konnte (Bollmann et al., 2014), ist die Datenlage für CXCL3 bisher vergleichsweise gering. Bekannt ist, dass CXCL3 eine Aktivierung und Zellmigration von polymorphkernigen Leukozyten (PMN) vermittelt und es an der Pathogenese von Bronchialasthma beteiligt sein könnte (Sokulsky et al., 2020).

In dieser Arbeit sollte nun der Einfluss von KSRP auf die Expression des Cytokins IL-17A und des Chemokins CXCL3 weiter untersucht werden. Zur Positivkontrolle sollten jeweils die Expressionen des Tumornekrosefaktor- α (TNF- α) und CXCL1 bestimmt werden, da hier einige Literaturdaten zum Einfluss von KSRP auf die Expression vorhanden sind. Mit Hilfe von quantitativer *Real-Time* PCR (qRT-PCR), CBA und Western-Blotanalysen sollten die RNA- bzw. Protein-Expressionen der zu analysierenden Gene in verschiedenen etablierten oder primären Zellen bestimmt werden. Zum einen wurde dafür die murine T-Zell-Linie EL-4 verwendet. In der AG waren bereits EL-4-Zellen vorhanden, die durch retrovirale Expression einer *small hairpin* RNA (shRNA) gegen KSRP eine herabregulierte KSRP-Expression aufweisen (EL-4

siKSRP). Als Kontrolle wurden EL-4 T-Zellen eingesetzt, die nur mit dem retroviralen Vektor (ohne shRNA-Sequenz) stabil transduziert worden sind (EL-4 Co). Zum anderen sollten primär isolierte renale Tubulusepithelzellen (RTEC) und Peritonealzellen aus Mäusen verwendet werden. Diese RTEC bzw. Peritonealzellen wurden aus Mäusen (C57BL/6 oder MRL-FAS^{lpr}) isoliert, die durch Deletion von Teilen des KSRP-Gens keine KSRP-Expression mehr zeigen (knockout-Tiere). Zum Vergleich wurden die Expressionen in entsprechenden Wildtyptieren untersucht.

Angesichts der oben genannten steigenden Prävalenz chronisch-entzündlicher Erkrankungen ist eine genaue Kenntnis der Funktionsweise von KSRP von großem klinischen Interesse. Ein detailliertes Verständnis der Pathogenese KSRP-vermittelter Entzündungs- und Immunreaktionen könnte dazu beitragen, langfristig neue therapeutische Ansätze entwickeln zu können.

2 Literaturdiskussion

2.1 Regulation der Genexpression

Die eukaryotische Genexpression wird durch eine Vielzahl von Regulationsmechanismen streng kontrolliert, wodurch Gene gezielt in ihrer Aktivität gesteuert werden können. Dies ermöglicht eine Koordination wichtiger biologischer Prozesse, zu denen u.a. die embryonale und spätere Entwicklung des Organismus sowie dessen Anpassung auf Änderungen endogener und exogener Bedingungen gehören (Pope & Medzhitov, 2018; Jaenisch & Bird, 2003). Die Regulation der Genexpression stellt eine zeitlich präzise Differenzierung von Zellen des Organismus zu unterschiedlichen Zelltypen mit jeweils spezifischen Funktionen sicher (Jaenisch & Bird, 2003). Die Bedeutung der Genregulation zeigt sich im Verhältnis von proteinkodierenden zu nicht-proteinkodierenden Gensequenzen: Nur ca. 2 % des Genoms kodieren für Proteine, der Großteil der genetischen Information hat hingegen regulatorische Funktion (Akira & Maeda, 2021). Eine wichtige Rolle spielt die Genregulation im Rahmen von Immunreaktionen: Während eine zeitlich begrenzte, kontrollierte Expression von Immunmodulatoren eine protektive Funktion für den Organismus hat, kann es durch eine Dysregulation der Genexpression zur Entstehung von Tumor- und Autoimmunerkrankungen kommen (Medzhitov, 2008). Besonders eine Fehlregulation in der Expression proinflammatorischer Mediatoren, wie Cytokine und Chemokine, kann ursächlich für chronisch-entzündliche Erkrankungen sein (Charo & Ransohoff, 2006; Hirano, 2021).

Die Regulationsmechanismen finden sich auf allen Ebenen der Genexpression: Bereits prätranskriptionell erfolgt eine Regulation auf der Ebene der Epigenetik, indem das Transkriptionspotenzial einzelner DNA-Abschnitte durch Modifikationen, wie beispielsweise Methylierung und Demethylierung von DNA und Histonen, gesteuert wird (Hashimoto et al., 2010). Im Rahmen der Transkription finden weitere wichtige Steuerungsmechanismen der Genexpression statt. Dabei spielt das Zusammenwirken von Transkriptionsfaktoren eine zentrale Rolle. Transkriptionsfaktoren sind Proteine, die DNA sequenzspezifisch binden und die Transkription durch Rekrutierung von Kofaktoren sowohl fördern als auch hemmen können (Lambert et al., 2018). Auch posttranskriptionelle Regulationsmechanismen auf Ebene der RNA sind zu nennen. So unterliegt sowohl die Prozessierung der unreifen heteronukleären RNA (hnRNA) als auch der anschließende Transport der messenger RNA (mRNA) ins Zytoplasma unterschiedlichen Steuerungsprozessen (Akira & Maeda, 2021; Uehata & Takeuchi, 2020). Darüber hinaus wird die Genexpression über die mRNA-Stabilität kontrolliert, was eine besonders rasche Regulation von mRNA-Spiegeln ermöglicht (Boo & Kim, 2020). Modulierend auf die mRNA-Stabilität

wirken u.a. RNA-bindende Proteine (RNA-BP) sowie Mikro-RNAs (miRNAs) (Akira & Maeda, 2021). Im Anschluss an die Transkription findet während der Translation in hochgradig regulierten Prozessen die Proteinsynthese statt (Kaeberlein & Kennedy, 2008). Durch posttranslationale Proteinmodifikationen werden Proteineigenschaften und -funktionen angepasst. Proteine werden beispielsweise durch chemische Veränderungen, wie den Austausch von Aminosäuren, sowie durch Anfügen funktioneller Gruppen verändert (R. Wang & Wang, 2019). Im Folgenden soll auf ausgewählte Steuerungsprozesse der Genexpression näher eingegangen werden.

2.1.1 Transkriptionelle Regulationsmechanismen der Genexpression

Die eukaryotische Transkription dient der komplementären Synthese von hnRNA durch eine DNA-abhängige RNA-Polymerase (Haberle & Stark, 2018). Der Transkriptionsprozess lässt sich in eine Initiations-, Elongations- und Terminationsphase unterteilen. Für jede dieser Phasen wurden zahlreiche Regulationsmechanismen identifiziert (X. Liu et al., 2013; Porrua et al., 2016).

Im Rahmen der Transkriptionsinitiation ist die Zugänglichkeit der DNA für Bestandteile der Transkriptionsmaschinerie von großer Bedeutung. Die genomische DNA liegt im Zellkern überwiegend stark kondensiert als Heterochromatin vor und ist in dieser Form nicht für die Transkriptionsinitiation zugänglich (Allshire & Madhani, 2018). Organisiert als Nukleosom ist die DNA-Doppelhelix dicht um ein Oktamer aus Histonen gewunden (Teif & Bohinc, 2011). Die Zugänglichkeit der DNA wird entscheidend über die Methylierung der DNA reguliert. Diese erfolgt hauptsächlich an Cytosin von CpG-Dinukleotiden durch DNA-Methyltransferasen (DNMT) (Attwood et al., 2002). Darüber hinaus wird die Zugänglichkeit der DNA über posttranslationale Modifikationen der Histone, wie Methylierungen und Acetylierungen, gesteuert. Es konnte gezeigt werden, dass die Histonmethylierung sowohl eine Aktivierung als auch eine Deaktivierung der Transkription bewirken kann (Y. Zhang et al., 2021). Die Histonacetylierung hat hingegen ausschließlich einen aktivierenden Effekt auf die Transkription (Patra et al., 2008).

Der Prozess der Transkriptionsinitiation stellt durch die zahlreichen Regulationsvorgänge einen Schlüsselmechanismus der Genexpression dar (Sainsbury et al., 2015). Beteiligt daran sind Kernpromotoren, die RNA-Polymerase II, Transkriptionsfaktoren, Kofaktoren sowie weitere regulatorische DNA-Elemente (Haberle & Stark, 2018). Die mRNA-Synthese erfolgt durch die RNA-Polymerase II (Cramer, 2019), die im Bereich des Kernpromotors einen Komplex mit

verschiedenen Transkriptionsfaktoren und dem TATA-Bindeprotein (TBP) bildet (Greber & Nogales, 2019). Zusätzlich zur Promotorregion gibt es distale Kontrollelemente der DNA, sogenannte Enhancer, die abhängig von zellulären Umgebungssignalen spezifische Transkriptionsfaktoren binden (Cramer, 2019; Field & Adelman, 2020). Durch die Bindung werden wiederum Koaktivatorkomplexe rekrutiert, wodurch sich die Aktivität von Kernpromotoren dynamisch regulieren lässt (Slobodin & Dikstein, 2020).

2.1.2 Posttranskriptionelle Regulationsmechanismen der Genexpression

Die während der Transkription entstandene hnRNA wird zunächst innerhalb des Zellkerns zu mRNA prozessiert. Enzymatisch wird kotranskriptional am 5'-Ende der hnRNA eine Cap-Struktur aus N⁷-methyliertem Guanosin angefügt. Die Hauptfunktion der Cap-Struktur liegt in der Initiierung der Proteinsynthese. Zudem schützt sie die RNA vor einem Abbau durch Exonukleasen und ist wichtig für das korrekte Spleißen der hnRNA (Ghosh & Lima, 2010; Ramanathan et al., 2016). Weil eukaryotische Gene diskontinuierlich aus proteinkodierenden Exons und nichtkodierenden Introns aufgebaut sind, werden durch Spleißen Introns aus dem Primärtranskript entfernt. Der Prozess wird u.a. durch Wechselwirkungen regulatorischer RNA-Elemente mit Spleißfaktoren gesteuert (Y. Lee & Rio, 2015). Am 3'-Ende der hnRNA wird das Transkript durch Endonukleasekomplexe an bestimmten Sequenzmotiven, sogenannten Polyadenylierungsstellen, gespalten. Weil in der 3'-untranslatierten Region (3'-UTR) mehrere potenzielle Polyadenylierungsstellen vorhanden sein können, ist die Entstehung verschiedener Transkripte mit unterschiedlicher Stabilität und Translationsrate möglich (Gruber & Zavolan, 2019). Im Anschluss wird ein Poly(A)-Schwanz aus 250–300 Adenosinen an die 3'-UTR angefügt (Elkon et al., 2013). Der Poly-(A)-Schwanz hat auf die mRNA-Stabilität und die Translationsrate synergistische Wirkung mit der Cap-Struktur. Die Verkürzung des Poly(A)-Schwanzes durch Deadenylierung führt zu einer Translationsrepression und verminderter mRNA-Stabilität. Es konnte gezeigt werden, dass RNA-BP die Spaltung und Polyadenylierung der 3'-UTR regulieren und auf diese Weise die Stabilität und Halbwertszeit von mRNA verändern (Erson-Bensan, 2016; Passmore & Collier, 2022). Allgemein spielt die mRNA-Stabilität eine zentrale Rolle in der posttranskriptionellen Steuerung der Genexpression, weshalb in Kapitel 2.1.2 näher darauf eingegangen wird.

Nach den oben genannten Modifikationen liegt die RNA als reife mRNA vor. Die kodierende Sequenz wird beidseits von UTRs flankiert und enthält eine 5'-Cap-Struktur sowie einen 3'-Poly(A)-Schwanz (Darnell, 2013). Der Export der reifen mRNA aus dem Zellkern erfolgt durch

Bindung der mRNA an einen heterodimeren Exportrezeptor und eine anschließende Freisetzung ins Zytoplasma über einen Kernporenkomplex (Xie & Ren, 2019).

2.1.2.1 Regulation der mRNA-Stabilität

2.1.2.1.1 Vorgang der mRNA-Degradation

Die Anzahl der Proteinmoleküle, die bei der Translation von einem mRNA-Transkript hergestellt wird, wird besonders durch die Translationseffizienz und die mRNA-Halbwertszeit bestimmt. Die Translation und der mRNA-Abbau sind wiederum durch Wechselwirkungen aufeinander abgestimmt (Bicknell & Ricci, 2017).

Der mRNA-Abbau im Zytoplasma wird überwiegend durch Exonukleasen vermittelt. Der Prozess beginnt mit dem Abbau des 3'-Poly(A)-Schwanzes durch einen Deadenylasekomplex aus Poly(A)-Nuklease 2 (Pan2) und Poly(A)-Nuklease 3 (Pan3), Carbon Catabolite Repression-Negative On TATA-less (CCR4-NOT) und Poly(A)-spezifischer Ribonuklease (PARN) (Dave & Chao, 2020). Im Anschluss an die Deadenylierung werden zwei Abbauewege unterschieden: Zum einen kann zunächst die 5'-Cap-Struktur enzymatisch durch einen Decapping-Komplex aus mRNA-Decapping-Enzym (Dcp) 1A, Dcp1B und Dcp2 entfernt werden (Dave & Chao, 2020; Siwaszek et al., 2014). Nachfolgend wird die mRNA durch die 5'-3'-Exonuklease 1 (Xrn1) abgebaut. Zum anderen kann nach der Deadenylierung ein mRNA-Abbau in 3'-5'-Richtung durch einen zytoplasmatischen Exosomenkomplex mit Ribonukleaseaktivität erfolgen. Die verbleibende 5'-Cap-Struktur wird dann durch ein Scavenger-Decapping-Enzym hydrolysiert (Siwaszek et al., 2014).

Neben diesen Degradationsmechanismen wurden in Eukaryoten kotranslationale mRNA-Abbauewege identifiziert. Durch den kotranslationalen Abbau wird die Translation aberranter mRNA-Transkripte gehemmt (Dave & Chao, 2020; Siwaszek et al., 2014). Als kotranslationale Abbaumechanismen sind der Non-Sense-Mediated-Decay (NMD), der No-Go-Decay (NGD) sowie der Non-Stop-Decay (NSD) zu nennen (Bicknell & Ricci, 2017).

2.1.2.1.2 Bedeutung von AU-reichen Elementen (ARE) für die mRNA-Stabilität

Die 3'-UTR der mRNA spielt eine bedeutende Rolle in der Regulation der mRNA-Stabilität (Mayr, 2019). Speziell cis-Elemente innerhalb der 3'-UTR, die mit trans-Faktoren in Wechselwirkung treten, haben einen entscheidenden Einfluss auf die Halbwertszeit eines Transkripts (Signor & Nuzhdin, 2018). Ein viel untersuchtes cis-Element ist das sogenannte „AU-reiche

Element (ARE)“. Namensgebend ist der hohe Anteil an Adenylat und Uridylat in der Nukleotidsequenz. ARE wurden erstmals in Genen beschrieben, die für Cytokine kodieren. Inzwischen wird angenommen, dass ca. 8 % aller mRNA-Transkripte ARE innerhalb ihrer 3'-UTR enthalten (Sidali et al., 2021). ARE setzen sich aus 50–150 nt (Nukleotide) zusammen und enthalten mehrere Kopien des Pentanukleotids AUUUA (C. Y. Chen & Shyu, 1995). In der Literatur werden drei Klassen von ARE unterschieden: ARE der Klasse I enthalten mehrere Kopien des Pentanukleotids AUUUA, die in eine U-reiche Region eingegliedert sind. Beispiele für Gene mit AREs der Klasse I sind die Protoonkogene c-fos und c-myc. Die ARE-Klasse II weist ebenfalls mehrere AUUUA-Motive auf, wobei sich die Motive gegenseitig überschneiden. Dieses Muster wurde für den Tumornekrosefaktor- α (TNF- α), den Granulozyten/Monozyten-Kolonie-stimulierender Faktor (GM-CSF) und die Cyclooxygenase Typ II (COX-2) beschrieben. Die dritte Klasse unterscheidet sich durch das Fehlen von AUUUA-Motiven. Stattdessen sind U-reiche Regionen sowie wiederholte GUUUG-Motive vorhanden (C. Y. Chen & Shyu, 1995; Espel, 2005; Khabar, 2017). ARE werden durch trans-Faktoren erkannt und gebunden. Wichtige mit ARE interagierende trans-Faktoren sind RNA-BP und nichtkodierende RNAs (Khabar, 2017). Ursprünglich wurde eine rein destabilisierende Wirkung von ARE auf die mRNA angenommen (Mayr, 2019). Es wurde gezeigt, dass ARE-vermittelt wichtige Schritte der mRNA-Degradation – das Decapping sowie die Deadenylierung des Poly(A)-Schwanzes – beschleunigt werden. Zudem wurde eine direkte Interaktion zwischen dem Exosomenkomplex und ARE festgestellt (Stumpo et al., 2010). Später konnte nachgewiesen werden, dass ARE abhängig von den gebundenen trans-agierenden Faktoren sowohl stabilisierende als auch destabilisierende Effekte auf die mRNA haben können (Mayr, 2019). Neben der posttranskriptionellen mRNA-Kontrolle sind sie außerdem an der Regulation der Translation beteiligt (Espel, 2005).

Analysen der 3'-UTR von unterschiedlichen mRNA-Transkripten konnten zeigen, dass kurzlebige Transkripte, die typischerweise für Cytokine, Chemokine, Onkogene und Wachstumsfaktoren kodieren, einen vergleichsweise hohen Anteil an ARE in ihrer 3'-UTR aufweisen (Mayr, 2019). Eine Dysregulation in der ARE-abhängigen Steuerung der mRNA-Stabilität kann wiederum mit chronischen Entzündungen, Autoimmunerkrankungen und Tumoren einhergehen (Barreau et al., 2005).

2.1.2.1.3 Regulation durch RNA-bindende Proteine (RNA-BP)

RNA-BP sind entscheidende Regulatoren der posttranskriptionellen Genexpression. Ihre regulatorische Funktion konnte bei der Reifung, Stabilisierung, Degradation und Translation der

RNA nachgewiesen werden (Sidali et al., 2021). In einer 2014 veröffentlichten Studie wurden in genomweiten Analysen 1542 humane RNA-BP festgestellt (Gerstberger et al., 2014). Daten neuerer Studien lassen inzwischen auf über 2000 humane RNA-BP schließen (Corley et al., 2020). Abhängig von ihrer Ziel-RNA werden RNA-BP in unterschiedliche Familien eingeteilt. Die meisten RNA-BP erkennen und regulieren mRNA, aber auch Transfer-RNA (tRNA) und ribosomale Proteine sind Zielstrukturen von RNA-BP (Gerstberger et al., 2014). Die Interaktion zwischen mRNA und RNA-BP wird durch RNA-bindende Domänen (RBD) innerhalb der RNA-BP vermittelt (Jin Zhang & Chen, 2008). Klassische RBD sind u.a. das RNA-Erkennungsmotiv (RNA recognition motif, RRM), das heterogene nukleäre Ribonukleoprotein (hnRNP) K homologe (KH) Motiv, das Doppelstrang-RNA-Bindungsmotiv (DSRM) und die Zink-Finger-Domäne. Die RBD wiederholen sich typischerweise mehrfach innerhalb eines RNA-BP (Corley et al., 2020; Gerstberger et al., 2014; Sidali et al., 2021). Zudem hat ein RNA-BP meist verschiedene RBD, wodurch eine Erkennung unterschiedlicher Zielstrukturen durch ein RNA-BP möglich ist (Sidali et al., 2021). Durch kombinatorische Bindung zahlreicher RNA-BP an eine mRNA-Zielstruktur wird ein sogenannter Ribonukleokomplex gebildet (Mohibi et al., 2019). Die Interaktion eines RNA-BP mit der Bindedomäne einer Ziel-RNA kann wiederum zu einer verstärkten oder verminderten Rekrutierung anderer RNA-BP an diese mRNA führen. Durch die Bindung verschiedener RNA-BP an eine Ziel-mRNA können stabilisierende und destabilisierende RNA-BP konkurrieren (Akira & Maeda, 2021).

Wie in Kapitel 2.1.2.1.2 beschrieben, sind RNA-BP durch ihre Wechselwirkungen mit ARE wichtige Regulatoren von Entzündungsmediatoren. Zu den ARE-bindenden RNA-BP gehören u.a. Tristetrapolin (TTP), das KH-type splicing regulatory protein (KSRP), das humane Antigen R (HuR), der AU-rich RNA-binding factor 1 (AUF1) und das T-cell-restricted intercellular antigen 1 (TIA-1). ARE-bindende Proteine können sowohl proinflammatorisch als auch antiinflammatorisch wirken (Akira & Maeda, 2021).

TTP wirkt überwiegend destabilisierend auf seine Ziel-mRNAs. Es konnte eine hohe Affinität zu ARE von TNF- α , Interleukin (IL)-2, IL-3, GM-CSF und c-fos nachgewiesen werden. In vivo-Studien an Mäusen mit deletiertem TTP-Gen wiesen erhöhte Spiegel von TNF- α auf, die sich klinisch in Arthritissymptomen zeigten. Erschwert wurde die Symptomatik bei gleichzeitiger TIA1-Depletion (Sanduja et al., 2012). Für die vier Isoformen von AUF1 konnte neben einem destabilisierenden Effekt auf einige mRNA-Ziele auch eine Stabilisierung der Transkripte von Transforming growth factor (TGF)-1 β und IL-6 über einen IL6/signal transducers and activators of transcription (STAT) 3/Nukleärer Faktor-kB (NF- κ B)-Signalweg dargelegt

werden (White et al., 2017). Das RNA-BP HuR wirkt proinflammatorisch, indem es die Stabilität und Translation von Entzündungsmediatoren fördert. Eine Stabilisierung durch HuR wurde für die proinflammatorischen Cytokine TNF- α , TGF- β , IL-6, IL-8, Interferon- γ (IFN- γ), C-C-Chemokinrezeptor Typ 6 (CCR6) und die proinflammatorischen Enzymen COX-2 und induzierbare NO-Synthase (iNOS) beschrieben (Schultz et al., 2020). Für KSRP lässt sich hingegen in der Literatur eine vorwiegend destabilisierende posttranskriptionelle Wirkung auf die mRNA proinflammatorischer Mediatoren finden (Gherzi et al., 2010). Seine Struktur, Funktion und Rolle in der Genexpression werden in Kapitel 2.2 ausführlicher dargestellt.

2.1.2.1.4 Regulation durch MikroRNA (miRNA)

Mikro-RNAs (miRNAs) sind nicht-kodierende, einzelsträngige RNAs, deren Sequenz über das gesamte Genom verteilt ist (B. Liu et al., 2014). Sie bestehen nur aus etwa 22 Nukleotiden, sind aber entscheidend an der posttranskriptionellen Genregulation beteiligt. Durch ihre komplementäre Bindung an die 3'-UTR von mRNAs wird abhängig von der Sequenzhomologie der mRNA-Zerfall begünstigt und die Translation inhibiert (Fabian et al., 2010; Romero-Cordoba et al., 2014; Trabucchi et al., 2011). Eine miRNA kann bis zu mehrere hundert Ziel-mRNAs haben (Krol et al., 2010). Die miRNAs durchlaufen einen mehrstufigen Reifungsprozess, der einer komplexen Regulation unterliegt. Über die Vorläufer pri-miRNA und pre-miRNA entsteht die reife miRNA. Zentral beteiligt an diesem Reifungsprozess sind die Ribonukleasen Drosha und Dicer. Die reife miRNA ist Teil des RNA-induced silencing complex (RISC), der die RNA-Stabilität sowie die Transkription negativ beeinflusst (Briata et al., 2011; Krol et al., 2010).

Sowohl miRNAs als auch RNA-BP sind wichtige Regulatoren der posttranskriptionellen Genexpression. Durch die gemeinsame regulatorische Funktion in Bezug auf die mRNA-Stabilität sind miRNAs und RNA-BP auf verschiedenen Ebenen der Genexpression wechselseitig miteinander verknüpft. Bei Betrachtung der miRNA-Prozessierung im Zellkern und Zytoplasma fällt die entscheidende Rolle von RNA-BP auf: RNA-BP sind in Komplexen mit Drosha und Dicer direkt an der miRNA-Verarbeitung beteiligt. Auch für zahlreiche andere RNA-BP konnte eine regulatorische Funktion in der miRNA-Biogenese und posttranskriptionelle Modulation von miRNAs gezeigt werden. RNA-BP können die miRNA-Biogenese über eine Regulierung von Drosha und Dicer fördern oder hemmen (Connerty et al., 2015; Michlewski & Cáceres, 2019). Zudem können miRNAs und RNA-BP durch Bindung an dieselbe Ziel-mRNA in ihrer Wirkung konkurrieren. Dadurch kann die miRNA-vermittelte Destabilisierung von mRNAs verstärkt

oder gehemmt werden. Beispielsweise kann durch RNA-BP die mRNA-Struktur so verändert werden, dass eine Interaktion mit RISC erleichtert wird. Umgekehrt können RNA-BP die RISC-Bindung an mRNAs erschweren oder seine Interaktion mit nachgeschalteten Effektoren der Translationsrepression und Deadenylierung negativ beeinflussen. Darüber hinaus konnte am Beispiel von miR-328 gezeigt werden, dass miRNAs durch Bindung an RNA-BP die RNA-BP-Aktivität unterdrücken können (Krol et al., 2010; Loffreda et al., 2015).

2.2 KH-type splicing regulatory protein (KSRP)

2.2.1 Einordnung und Struktur von KSRP

Das K-homology-type splicing regulatory protein (KSRP) ist ein multifunktionelles, Einzelstrangnukleinsäure-bindendes Protein, das an der Regulation der post-transkriptionellen Genexpression beteiligt ist (Briata et al., 2011). Es wird in verschiedenen Spezies (Mensch, Maus, Ratte, Huhn, *X. laevis*) und Zellarten exprimiert und konnte sowohl im Zellkern als auch im Zytoplasma nachgewiesen werden. Die Kern-Zytoplasma-Verteilung variiert abhängig von der Zellart und unterliegt einer dynamischen Anpassung auf zelluläre Stimuli (Briata et al., 2013). KSRP hat ein Molekulargewicht von 75 kilo-Dalton (kDa). Seine kodierende genetische Information ist im humanen Genom auf Chromosom 19p13.3 und im murinen Genom auf Chromosom 17 lokalisiert (Ring et al., 1999).

Ursprünglich wurde KSRP 1995 mit dem Nachweis seiner regulatorischen Funktion auf die Transkription des c-myc Protoonkogens der Familie der far upstream sequence element (FUSE)-Bindende Proteine zugeordnet und als „fuse binding protein 2“ (FBP2) bezeichnet. Bei der Analyse der Primärstruktur von KSRP wurden vier charakteristische KH-Domänen identifiziert, die die Bindung des Proteins an seine Nukleinsäureziele vermitteln. Im Folgejahr konnte die für KSRP kodierende komplementäre DNA (cDNA) kloniert werden. Außerdem konnte herausgefunden werden, dass KSRP mit fünf weiteren Proteinen einen Multiproteinkomplex bildet, der am Prozess des alternativen Spleißens des Neuron-spezifischen Protoonkogen c-src beteiligt ist. 1997 wurde deshalb die Bezeichnung „K-homology-type splicing regulatory protein“ festgelegt (Briata et al., 2011; Min et al., 1997).

In Abbildung 1 ist die Primärstruktur von KSRP schematisch dargestellt. Im zentralen Bereich der Primärstruktur von KSRP befindet sich eine Nukleinsäurebindungsdomäne. Darin enthalten sind vier K-homologe Domänen (KH-Domänen), die Nukleinsäureziele kombinatorisch erkennen (Gherzi et al., 2014). Jede KH-Domäne besteht aus ca. 70 Aminosäuren und bindet spezifisch eine kurze RNA- oder DNA-Sequenz von bis zu vier Nukleotiden (Briata et al., 2013).

Ein Nukleinsäureeinzelstrang kann potenziell von mehreren KH-Domänen erkannt werden (García-Mayoral et al., 2008). An den Positionen 2 und 3 innerhalb der KH-Domäne werden Nukleobasen mit einer höheren Spezifität erkannt. Auch die KH-Domänen untereinander weisen Unterschiede in ihrer Affinität und Sequenzspezifität auf: Es konnte gezeigt werden, dass KH3 im Vergleich zu den anderen KH-Domänen eine höhere Affinität zur Zielsequenz hat. Darüber hinaus wurden unterschiedliche Bindungspräferenzen der KH-Domänen beobachtet: Während KH2 besonders AU-reiche Sequenzen bindet, wurde für KH1 und KH3 eine bevorzugte Bindung G- und G/U-reicher Nukleinsäureziele festgestellt. Die Bindung ist niedrig affin in Form von hydrophoben Wechselwirkungen und Wasserstoffbrückenbindungen zwischen dem Phosphatrückgrat der Nukleotide und Loop-Strukturen von KSRP. Eine Kombinatorik in Bezug auf die Bindung verschiedener Zielmoleküle ergibt sich dadurch, dass die distal gelegenen Bindungsdomänen KH1 und KH4 frei um die zentral gelegenen Domänen KH2 und KH3 beweglich sind (Díaz-Moreno et al., 2010; García-Mayoral et al., 2007; Gherzi et al., 2014). In ihrer gefalteten Form zeigen die KH-Domänen drei alpha-Helices sowie ein dreisträngiges antiparalleles beta-Faltblatt. In dieser Konformation entsteht eine hydrophobe Furche, in der sich die Nukleinsäurebindungsstelle befindet. Zu beiden Seiten der zentralen RNA-Binderegion befinden sich weniger konservierte Regionen mit geringerer Sequenzkomplexität. Diese vermitteln die Wechselwirkung von KSRP mit Proteinen und ermöglichen die posttranslationale Modifikation durch KSRP (Briata et al., 2013).

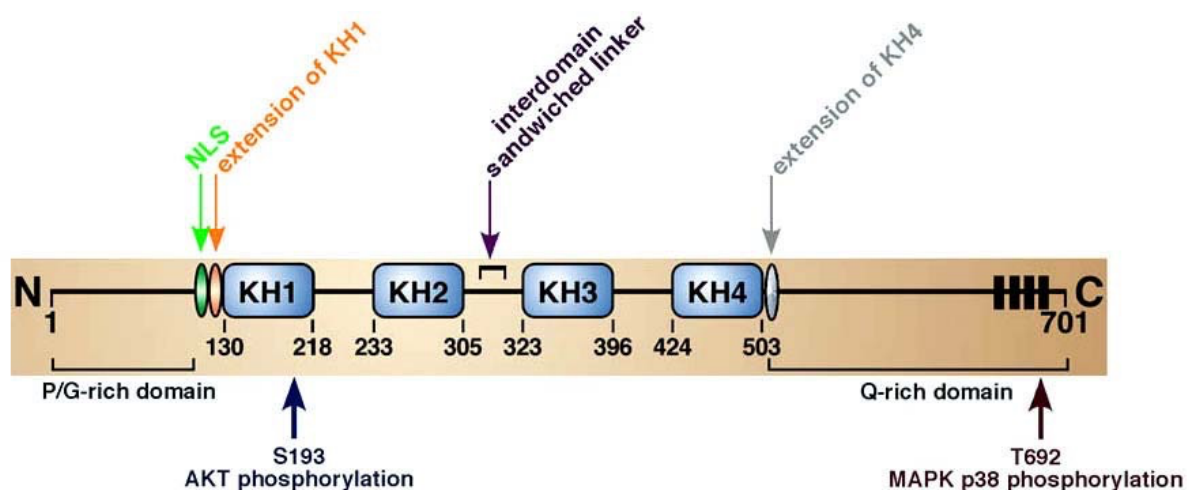


Abbildung 1: Schematische Darstellung der primären Proteinstruktur von KSRP. Gezeigt sind die Organisation in der zentralen Region, die an der RNA-Interaktion beteiligt ist, sowie die N- und C-terminal flankierenden Regionen, die für die Proteininteraktion notwendig sind. Phosphorylierungsstellen sind angegeben. Abbildung aus (Briata et al., 2011).

2.2.2 Regulatorische Funktionen von KSRP in der Genexpression

Die Funktionen von KSRP sind vielfältig und weiterhin Gegenstand aktueller Forschung. In Abbildung 2 sind wichtige bisher bekannte Funktionen von KSRP schematisch dargestellt. Hervorzuheben ist die Regulation der posttranskriptionellen Genexpression durch KSRP auf unterschiedlichen Ebenen: KSRP hat sowohl Einfluss auf das mRNA-Spleißen, die mRNA-Stabilität, das mRNA-Translationspotenzial als auch auf die Reifung von miRNAs (King & Chen, 2014).

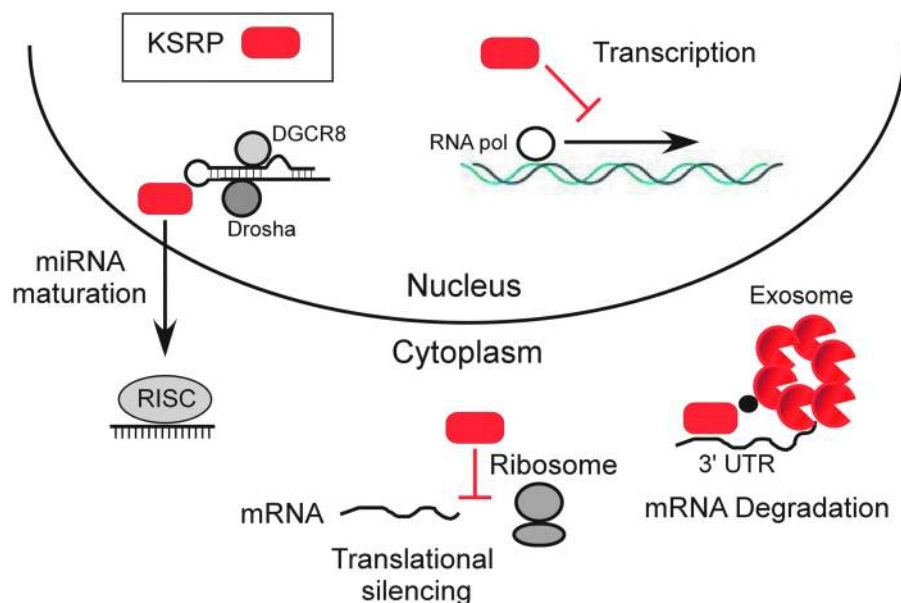


Abbildung 2: KSRP reguliert die Genexpression auf verschiedenen Ebenen Im Zellkern fungiert KSRP als Transkriptions- und Spleißfaktor und vermittelt im Zytoplasma den Abbau von ARE-haltigen mRNAs. Darüber hinaus kann KSRP auch die Translation von mRNAs inhibieren. Zudem fördert KSRP die miRNA-Reifung durch Interaktion mit den Ribonukleasen Drosha und Dicer. Abbildung aus (King & Chen, 2014).

Eine der ersten untersuchten Funktionen von KSRP ist seine regulatorische Funktion in der Transkription des c-myc-Gens: Als FBP bindet es das sogenannte FUSE, eine Sequenz 1,5 kilobasen (kb) stromaufwärts des c-myc-Promotors. Humanes c-myc reguliert die Zellhomöostase sowie das Zellwachstum und kann bei Dysregulation onkogen wirken. Über die Bindung von Aktivatoren und Repressoren an das einzelsträngige FUSE ist eine präzise Steuerung der Genexpression von c-myc möglich. Durch Rekrutierung von KSRP an FUSE wird die Transkription von c-myc gefördert (Hsiao et al., 2010; J Zhang & Chen, 2013). KSRP wird in undifferenzierten Zellen verstärkt exprimiert und mit fortschreitender Zelldifferenzierung herunterreguliert (Davis-Smyth et al., 1996). He et al. (2000) konnten darlegen, dass die Abwesenheit von KSRP zu einem Transkriptionsstopp von c-myc führt und die Zellproliferation ausbleibt (He et al.,

2000). Darüber hinaus konnte eine Beteiligung von KSRP an der RNA-Editierung von Apolipoprotein B (ApoB) nachgewiesen werden. Durch den ApoB Editing Komplex-1 (APOBEC-1) erfolgt die Desaminierung von Cytosin der ApoB-mRNA zu Uracil. Lellek et al. (2000) stellten fest, dass KSRP ein Hilfsprotein des Enzymkomplexes ist, ihn stabilisiert und die Enzymaktivität steigert (Blanc & Davidson, 2010; Lellek et al., 2000). Eine weitere Funktion von KSRP wurde im Zusammenhang mit dem alternativen Spleißen der prä-mRNA des Protoonkogens c-src beschrieben: KSRP bindet mit weiteren Proteinen den intronischen c-src-Enhancer und fördert das alternative Spleißen des stromabwärtsgelegenen c-src N1-Exons (Min et al., 1997).

Viel untersucht ist die Rolle von KSRP als RNA-bindendes Protein. Es konnte eine Beteiligung von KSRP an der posttranskriptionellen Regulation der mRNA-Stabilität kurzlebiger Transkripte nachgewiesen werden. Kurzlebige Transkripte kodieren besonders für Cytokine, Chemokine, Zellzyklusregulatoren und Protoonkogene (Briata et al., 2013). Sie zeichnen sich durch einen erhöhten Anteil an ARE in der 3'-UTR aus. Durch die Bindung von KSRP an ARE-haltige Transkripte wird ein mRNA-Degradationsprozess initiiert: Über eine Interaktion mit den KH-Domänen 3 und 4 werden Exonukleasen, mRNA-Zerfallsenzyme, wie die Poly(A)-RNase PARN, sowie das mRNA-Decapping-Protein 2 (DCP2) rekrutiert (Briata et al., 2013). Es wurde nachgewiesen, dass die KH-Domänen 3 und 4 für den KSRP-vermittelten mRNA-Abbau unerlässlich sind, sie sich aber in ihrer Funktion unterscheiden: KH4 vermittelt überwiegend die ARE-Erkennung, während KH3 bedeutend für die mRNA-Degradation ist. Nur ein gleichzeitiges Vorhandensein von KH3 und KH4 erlaubt den sogenannten ARE-vermittelten mRNA-Abbau (AMD). Der AMD ist ein essenzielles Instrument der Genregulation, da wichtige Prozesse, wie die Zellproliferation und Immunreaktionen, rasch gesteuert werden können. Mit einer Dysregulation des AMD gehen wiederum Inflammations- und Tumorerkrankungen einher (García-Mayoral et al., 2007; Gherzi et al., 2004).

Ein ARE-vermittelter mRNA-Abbau durch KSRP wurde bereits für eine Reihe von Entzündungsmediatoren untersucht. Winzen et al. (2007) wiesen in KSRP-depletierten HeLa-Zellen eine erhöhte Stabilität von IL-8-mRNA nach, was durch die ausbleibende KSRP-vermittelte Rekrutierung von PARN erklärt wurde. Neben der Analyse des AMD von IL-8 wurden in derselben Studie weitere Transkripte durch Microarray-Analysen auf eine posttranskriptionelle Regulation durch KSRP untersucht. Hierfür wurden HeLa-Zellen über 2 h mit IL-1 stimuliert und anschließend die mRNA in Pulldown-Analysen auf eine Interaktion mit KSRP und Veränderungen der mRNA-Expression durch KSRP-Depletion analysiert. Insgesamt einhundert

mRNAs zeigten eine Assoziation mit KSRP sowie eine mindestens um den Faktor 1,33 gesteigerte Expression bei KSRP-Defizienz. Bei den KSRP-defizienten Zellen konnte für 10 dieser mRNAs zusätzlich ein verlangsamter mRNA-Abbau beobachtet werden. Neben IL-8, IL-6, Wachstumsdifferenzierungsfaktor 15 (GDF15) und GM-CSF2 gehört auch der im Rahmen dieser Arbeit untersuchte CXC-Motiv Chemokin Ligand 3 (CXCL3) zu den Genen, deren mRNA-Stabilität durch KSRP moduliert wird (Winzen et al., 2007).

Li et al. (2012) untersuchten die mRNA-Expression verschiedener Cytokine in Astrozyten und konnten für TNF- α und IL-1 β einen ARE-abhängigen mRNA-Abbau durch KSRP feststellen (Xuelin Li et al., 2012). Darüber hinaus wurde auch für mehrere ARE-haltige Interferone (IFN) eine Beeinflussung der mRNA-Stabilität durch KSRP beschrieben: Lin et al. (2011) wiesen in KSRP-depletierten murinen Fibroblasten einen verminderten mRNA-Abbau von INF- α und INF- β nach (W.-J. Lin et al., 2011). Eine posttranskriptionelle Kontrolle der Typ III-Interferon-Expression durch KSRP legten Schmitke et al. (2019) dar und stellten mit Interferon λ 3 ein weiteres ARE-haltiges Transkript vor, das durch KSRP negativ in seiner Stabilität reguliert wird (Schmidtke et al., 2019). Auch für iNOS konnte in in-vitro Degradationsassays eine erhöhte mRNA-Stabilität in KSRP-depletierten, humanen DLD1-Zellen präsentiert werden. Zudem konnte ein Einfluss von TTP auf die KSRP-abhängige mRNA-Degradation von iNOS nachgewiesen werden. Da TTP selbst nicht an die mRNA bindet, wird eine Verdrängung des u.a. durch KSRP rekrutierten Exosomenkomplexes von der iNOS-mRNA angenommen. Darüber hinaus wurde dargelegt, dass KSRP und HuR in DLD1-Zellen dieselbe mRNA-Bindestelle an iNOS erkennen und um diese Bindestelle konkurrieren. Durch Cytokinbehandlung wurde die Bindung von HuR gefördert, wodurch die iNOS-mRNA-Stabilität zunahm. Insgesamt wurde durch diese Studie deutlich, dass RNA-BP in ihrer Funktion weniger als Einzelproteine zu betrachten sind, sondern RNA-BP viel mehr als ein komplexes Netzwerk an der posttranskriptionellen Genregulation beteiligt sind (Linker et al., 2005).

KSRP wird in den meisten Studien als ein negativer Regulator der proinflammatorischen Genexpression präsentiert. Jedoch gibt es auch veröffentlichte Daten, die dazu im Widerspruch stehen: Käfer et al. (2019) beobachteten im C57BL/6-Mausmodell mit Kollagen-Antikörper-induzierter Arthritis (CAIA) eine verminderte mRNA-Expression der Entzündungsmediatoren CXCL1 und TNF- α bei KSRP-Defizienz. Diese Ergebnisse suggerieren eine protektive Funktion von KSRP für die Entstehung einer rheumatoiden Arthritis. Dies deutet auf mögliche Unterschiede in der Wirkung von KSRP auf isolierte Zellen in-vitro gegenüber in einen Organismus integrierte Zellen in-vivo hin (Käfer et al., 2019).

In polyklonal stimulierten KSRP-defizienten CD4⁺ T-Zellen konnten Käfer et al. (2019) eine erhöhte Proliferationsrate sowie eine gesteigerte Expression von IL-5, IL-9, IL-10 und IL-13 auf mRNA- und Proteinebene im Vergleich zu Kontrollzellen nachweisen. Der zugrundeliegende Mechanismus dieser Effekte ist noch nicht eindeutig geklärt. Erste Daten weisen darauf hin, dass in KSRP-defizienten CD4⁺ T-Zellen die Stabilität der IL-4-mRNA erhöht ist. Dies könnte zu einer Polarisierung der CD4⁺ T-Zellen in Richtung T-Helferzellen 2 (Th 2) führen, die typischerweise im Rahmen ihrer Entwicklung vermehrt IL-5, IL-9, IL-10 und IL-13 bilden (Käfer et al., 2019).

In vorausgegangenen Studien wurde außerdem dargelegt, dass KSRP die Prozessierung einer Reihe von miRNAs fördert und auf diese Weise auch indirekt eine mRNA-Destabilisierung vermittelt. Für mehrere miRNAs konnte eine Bindung von KSRP im Bereich des Terminal Loops gezeigt werden. Außerdem wurde eine Interaktion von KSRP mit den Multiproteinkomplexen Drosha und Dicer nachgewiesen, wodurch deren enzymatische Aktivität und damit die miRNA-Reifung gefördert wird (Trabucchi et al., 2011). In neueren Studien wurde beschrieben, dass KSRP verstärkt an der Prozessierung von miRNAs mit hohem GC-Anteil in der Stem-loop-Struktur ihres Vorläufer-Transkripts beteiligt ist. Zu diesen miRNAs gehören u.a. miR-129 und miR-155 (Palzer et al., 2022). Beide fungieren als wichtige Immunmodulatoren. miR-129 vermindert die Expression vom Runt-related Transkriptionsfaktor 1 (Runx1) und verändert damit die Differenzierung myeloischer Progenitorzellen zu Monozyten und Granulozyten (H. Zhao et al., 2017). Untersuchungen der miR-155 konnten zahlreiche Funktionen feststellen, darunter u.a. die Reifung, Differenzierung und Aktivierung von B- und T-Zellen. Zudem konnte eine Beteiligung der miR-155 an verschiedenen pathophysiologischen Prozessen nachgewiesen werden (Elton et al., 2013; Seddiki et al., 2014). Bhattacharyya et al. (2013) stellten eine antagonistische Wirkung von KSRP und TTP auf die Biogenese von miR-155 fest, was wiederum die vernetzte Regulation durch RNA-BP unterstreicht (Bhattacharyya et al., 2013).

In Analysen von Polysomenprofilen konnte eine Beteiligung von KSRP an der Regulation der Translation gezeigt werden. Für mehrere ARE-haltige Transkripte wurde in KSRP-depletierten HeLa-Zellen eine erhöhte Polysomenassoziation festgestellt, was eine Translationshemmung durch KSRP nahelegt. Untersucht wurde in diesem Zusammenhang die Regulation von IL-6: In KSRP-depletierten HeLa-Zellen konnte eine erhöhte IL-6-Proteinexpression bedingt durch eine KSRP-vermittelte Polysomenassoziation der IL-6-mRNA nachgewiesen werden. Die Hemmung der Translation von IL-6 durch KSRP ließ sich durch das Cytokin IL-1 aufheben (Dhamija et al., 2011).

2.2.3 Regulation der KSRP-Aktivität

Nukleinsäure-bindende Proteine werden häufig durch intra- und extrazelluläre Signale in einem Netzwerk an Signaltransduktionswegen modifiziert und dadurch in ihrer Aktivität reguliert (Briata et al., 2005). Dies ermöglicht eine präzise Steuerung der mRNA-Stabilität als Reaktion auf Veränderungen des externen Milieus (Cuadrado & Nebreda, 2010).

Die KSRP-Aktivität wird verstärkt posttranskriptional und posttranslational reguliert. An der posttranskriptionalen Regulation von KSRP sind insbesondere nicht-kodierende RNAs (ncRNAs), wie miRNAs und Long Non-Coding RNAs (lncRNAs), beteiligt (Giovarelli et al., 2014; Puppò et al., 2016). Amirouche et al. (2014) wiesen in Skelettmuskelzellen eine durch miR-206 vermittelte Verringerung der KSRP-Aktivität nach (Amirouche et al., 2014). lncRNAs bestehen definitionsgemäß aus mindestens 200 Nukleotiden und konnten in Enhancer- und Promotorregionen sowie innerhalb und zwischen proteinkodierenden Genen nachgewiesen werden (Akira & Maeda, 2021). Durch lncRNAs wird die KSRP-vermittelte Destabilisierung von Transkripten beeinflusst: Während für lncRNA H19 eine Förderung der mRNA-Destabilisierung gezeigt wurde (Giovarelli et al., 2014), wird der KSRP-vermittelte mRNA-Abbau durch die Axon-enriched lncRNA (ALAE) und den Epithelial cell Program Regulator (Epr) vermindert (Rossi et al., 2019; Wei et al., 2021).

Als wichtige posttranslationale KSRP-regulierende Signalwege wurden die p38-mitogen-aktivierte-Proteinkinase (p38-MAPK), die Ataxia Teleangiectasia mutated (ATM)-Kinase sowie die Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3-K)-Akt/Proteinkinase B (PKB) identifiziert (Palzer et al., 2022). Die p38-MAPK-Familie wird den Serin/Threonin-Proteinkinasen zugeordnet. Sie vermittelt eine zelluläre Differenzierung und Proliferation als Reaktion auf Stressoren. Auch für KSRP konnte eine funktionelle Regulation durch eine p38-MAPK-vermittelte Phosphorylierung an Threonin 692 nachgewiesen werden. Durch die Phosphorylierung von KSRP wird seine Interaktion mit ARE-haltigen Transkripten beeinträchtigt, was den destabilisierenden Effekt von KSRP auf die Transkripte vermindert. So konnte durch Aktivierung der p38-MAPK während der Differenzierung von C2C12-Myoblasten die Stabilisierung myogener, KSRP-regulierter Transkripte gezeigt werden (Briata et al., 2005; Dean et al., 2004). Dieser Effekt wurde auch in Studien zur Entwicklung weiterer Therapieansätze für die Muskeldystrophie Typ Duchenne beschrieben: Eine Aktivierung der p38-MAPK in C2C12-Skelettmuskelzellen durch Heparin führte hierbei zu einer 70–250 % gesteigerten Menge an Utrophin A-mRNA, was auf einen beeinträchtigten KSRP-vermittelten mRNA-Abbau zurückgeführt werden konnte (Amirouche et al., 2013). In einer weiteren Studie wurde die antiinflammatorische Wirkung

von Resveratrol analysiert. Darin konnte nachgewiesen werden, dass Resveratrol spezifisch an KSRP bindet und dies die Threoninphosphorylierung durch die p38-MAPK verhindert. Darüber hinaus scheint die Interaktion zwischen KSRP und dem Exosomenkomplex sowie die Bindungsaktivität zwischen KSRP und seinen Nukleinsäurezielen durch Resveratrol verstärkt zu werden. Dadurch wird der destabilisierenden Effekt von KSRP auf proinflammatorische Transkripte zusätzlich begünstigt (Bollmann et al., 2014).

2.2.4 Klinische Relevanz von KSRP

Mit der Multifunktionalität von KSRP geht seine Beteiligung an einer Vielzahl von Erkrankungen in unterschiedlichen medizinischen Fachbereichen einher. In neueren Publikationen wird eine Modulation von KSRP in der Tumorgenese sowie der Tumorphiliferation beschrieben. Es konnte gezeigt werden, dass KSRP die Proliferation von Melanomzellen sowie deren Resistenz gegen Vemurafenib fördert (W. Liu et al., 2019). Eine Tumor-protective sowie prognostische Funktion von KSRP durch die Hemmung der Migrations- und Invasionsfähigkeit von Tumorzellen konnte hingegen beim nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinom (non-small cell lung cancer, NSCLC) nachgewiesen werden (Chien et al., 2017). Weiterhin konnte ein Effekt von KSRP auf die Immunantwort gegen bakterielle Infektionserreger gezeigt werden: In Mausmodellen mit KSRP-Überexpression wurde eine verstärkte Kolonisierung und Proliferation von *Helicobacter pylori* mit verstärkter Magenschleimhautschädigung festgestellt (N. Li et al., 2018). Durch Untersuchungen von Herpes Simplex Typ 1 und dem Vesikulären Stomatitis-Virus wurde gezeigt, dass KSRP über posttranskriptionelle Mechanismen die viral induzierte Interferonproduktion herunterreguliert (W.-J. Lin et al., 2011). Eine zentrale Rolle spielt KSRP in der Regulation entzündlicher Prozesse. So konnte in polyklonal stimulierten KSRP-defizienten CD4⁺ T-Zellen eine erhöhte Expression verschiedener proinflammatorischer Cytokine nachgewiesen werden (Käfer et al., 2019). Darüber hinaus wurde in einem KSRP-defizienten Lupus-Mausmodell eine Verschlechterung der Nierenmorphologie im Sinne einer verstärkten Glomerulonephritis beobachtet (Schmidtke et al., 2021). Eine strenge Kontrolle der Expression von Entzündungsmediatoren ist entscheidend, um einer überschießenden Immunantwort mit möglicher Gewebedestruktion sowie der Entstehung von Autoimmunität vorzubeugen.

2.3 Interleukin-17 (IL-17)

2.3.1 Einordnung und Funktionen von IL-17

IL-17 ist ein proinflammatorisches Cytokin, das an der akuten und chronischen Immunantwort beteiligt ist. Erstmals wurde es 1993 aus muriner cDNA eines T-Zell-Hybridoms kloniert und als „zytotoxisches T-Lymphozyten-assoziiertes Antigen-8 (CTLA-8)“ bezeichnet (Gu et al., 2013). Aktuell sind sechs verwandte Isoformen der IL-17-Cytokinfamilie bekannt: IL-17A bis IL-17F. Zum IL-17-Signalweg gehören zudem fünf IL-17-Rezeptoren mit fünf Rezeptoruntereinheiten IL-17-RA bis -RE. Ein Rezeptor setzt sich aus einem Heterodimer von IL-17-RA und einer weiteren Rezeptoruntereinheit zusammen. Mittlerweile konnte für verschiedene Zellen eine Expression des IL-17-Rezeptors nachgewiesen werden, darunter Fibroblasten, Keratinozyten, Leukozyten und epitheliale Zellen (Ge et al., 2020; Gu et al., 2013).

IL-17A gilt als Prototyp der IL-17-Cytokinfamilie und wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit untersucht. Die Isoformen IL-17A und IL-17F werden koexprimiert und weisen untereinander eine Sequenzhomologie von 50 % auf. Sie können als Homodimer oder Heterodimer IL-17A/F vorkommen, wobei das Homodimer IL-17A die stärkste Signalwirkung aufweist (Khan & Ansar Ahmed, 2015; Xiaoxia Li et al., 2019). Das für IL-17A kodierende humane Gen ist auf Chromosom 6p12 lokalisiert. Als Disulfid-verknüpftes Homodimer besteht humanes IL-17A aus 155 Aminosäuren und weist ein Molekulargewicht von 35 kDa auf (Kolls & Lindén, 2004). Murines IL-17A zeigt eine Sequenzhomologie von 63 % zum humanen IL-17A und hat mit 147 Aminosäuren ein Molekulargewicht von 21 kDa (Iwakura et al., 2008).

Die physiologische Funktion von IL-17 liegt in der Induktion des angeborenen Immunsystems zur Wirtsabwehr gegen intra- und extrazelluläre Bakterien, Pilze und kommensale Mikrobiota. Für den proinflammatorischen Effekt fördert IL-17 die Produktion von Cytokinen (GM-CSF, IL-6, IL-1), Chemokinen (CCL2, CCL7, CXCL1, CXCL5, IL-8), Matrixmetalloproteinasen (MMP1, MMP3, MMP13), antimikrobiellen Peptiden (β -Defensine, Lipocalin, S100 Proteine) und Gewebeumbauproteinen (Akute Phase Proteine). Während eine kontrollierte IL-17-Expression eine protektive Funktion für den Organismus hat, kann eine Fehlexpression zu pathologischen Prozessen wie Autoimmunität und Tumorerkrankungen führen (Ge et al., 2020; Iwakura et al., 2008; Xiaoxia Li et al., 2019). Es wurde eine Beteiligung von IL-17 an der Pathogenese zahlreicher entzündlicher Hauterkrankungen und Rheuma beschrieben (T. Liu et al., 2020; Lubberts, 2015). Darüber hinaus wurden allergische Erkrankungen mit IL-17 in Ver-

bindung gebracht. Insbesondere soll IL-17 über seine Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten eine Schlüsselrolle in der Pathogenese von neutrophilem Asthma, einer schweren Form des Asthma bronchiale, einnehmen (Chesné et al., 2014).

2.3.2 IL-17-produzierende Zellen

Eine Expression von IL-17 konnte in verschiedenen Zellen des angeborenen und erworbenen Immunsystems nachgewiesen werden. Sowohl in CD (cluster of differentiation) 4^+ T-Zellen, wie Th 1 und Th 22, als auch in zytotoxischen $CD8^+$ T-Zellen und $\gamma\delta$ T-Zellen wurde eine Produktion von IL-17 nachgewiesen. Darüber hinaus produzieren Zellen des angeborenen Immunsystems, z.B. Mastzellen, neutrophile Granulozyten und myeloische Zellen, das Cytokin. Im Jahr 2013 wurde zudem eine neue Gruppe von angeborenen, lymphatischen, IL-17A-produzierenden Zellen (innate lymphoid cells 3, ICL3) identifiziert (Lubberts, 2015). Den weitaus größten Anteil an der Gesamtproduktion von IL-17 hat eine im Jahr 2005 erstmals beschriebene Population $CD4^+$ T-Helferzellen. Diese steht in Verwandtschaft zu regulatorischen T-Zellen, aber zeichnet sich durch eine verstärkte Expression von IL-17A, IL-17F und IL-22 aus. Entsprechend wurden diese Zellen als „Th 17-Zellen“ bezeichnet (Butcher & Zhu, 2021; Ge et al., 2020).

2.3.3 Genregulation von IL-17

2.3.3.1 Transkriptionelle Genregulation von IL-17

Für die proinflammatorischen Cytokine TGF- β , IL-1 β , IL-6 und IL-23 konnte eine Förderung der Th 17-Polarisation über die Transkriptionsfaktoren RAR-related orphan receptor γ (ROR γ t) und phosphorylierter STAT3 (pSTAT3) dargelegt werden. ROR γ t ist nicht nur entscheidend an der Differenzierung von Th 17-Zellen beteiligt, sondern wird auch als wichtiger Transkriptionsfaktor von IL-17 beschrieben (Kumar et al., 2021). Es wurde eine enge funktionelle Verknüpfung zwischen den Cytokinen IL-17 und IL-23 gezeigt und die sogenannte „IL-23/IL-17-Achse“ präsentiert. In einem CIA-Mausmodell mit einer IL-23p19-Defizienz konnte ein Fehlen von IL-17-produzierenden $CD4^+$ T-Zellen festgestellt werden, was mit einem vollständigen Schutz gegen rheumatoide Arthritis einherging (Lubberts, 2015). Liu et al. (2020) und Lubberts et al. (2015) zeigten die klinische Relevanz der IL-23/IL-17-Achse für zahlreiche chronisch-inflammatorische Erkrankungen auf und diskutierten sie als möglichen Angriffspunkt für Kombinationstherapien (T. Liu et al., 2020; Lubberts, 2015). IL-23 ist zudem ein wichtiger Regulator der IL-22-Expression (Lindahl & Olsson, 2021).

2.3.3.2 Posttranskriptionelle Genregulation von IL-17

Auch auf posttranskriptioneller Ebene wurden Regulationsmechanismen der IL-17-Expression untersucht. Als wichtige Kontrollelemente der IL-17-Expression wurden RNA-BP und miRNAs beschrieben. Die posttranskriptionelle Regulation durch miRNAs kann entweder durch einen direkten Effekt der miRNA auf die IL-17-Expression erfolgen oder aber über die posttranskriptionelle Regulation von zwischengeschalteten Proteinen indirekt vermittelt werden (Salvi et al., 2019). Salvi et al. (2019) haben in ihrer Veröffentlichung 14 miRNAs präsentiert, für die eine Regulation von IL-17 im Zusammenhang mit Autoimmunerkrankungen beschrieben worden sind: miRNA-340, miRNA-20b, miRNA-30a, miRNA-210, miRNA-451a, miRNA-326, miRNA-26a, let-7e, miRNA-21, miRNA-448, miRNA-155, miRNA-132, miRNA-200a und miRNA-146a. Die genauen Regulationsmechanismen sind für den überwiegenden Anteil dieser miRNAs bisher nicht bekannt (Salvi et al., 2019). Darüber hinaus sind miRNAs maßgeblich an der positiven und negativen Regulation der Th 17-Differenzierung beteiligt. Als entscheidende Signalwege dieser Regulation werden NF- κ B, PI3K (Phosphoinositid-3-Kinase)-AKT-mTOR (*mammalian target of rapamycin*), *Januskinase/signal transducers and activators of transcription* (JAK-STAT) 3 und TGF- β genannt (Huang et al., 2021).

Aus der Literatur gehen Regulationen der IL-17A-Expression durch mehrere RNA-BP, wie z.B. TTP, HuR und AT-reiche interaktive Domäne-enthaltendes Protein 5a (Arid5a), hervor (Amatya et al., 2018; Guo et al., 2020; H. H. Lee et al., 2012; Peng et al., 2020). Zum Einfluss des RNA-BP KSRP auf die Expression von IL-17A liegen bisher wenige publizierte Daten vor. Frau Nina Kuhlmann (AG Pautz) untersuchte im Rahmen ihres Projekts in Cytometric Bead Array (CBA)-Messungen vergleichend Cytokinexpressionen in murinen CD4⁺ EL-4 T-Zellen mit verminderter KSRP-Expression (EL-4 siKSRP) gegenüber CD4⁺ EL-4 T-Zellen mit unveränderter KSRP-Expression (EL-4 Co). Aus den bisher unveröffentlichten Daten von Frau Kuhlmann lässt sich ein deutlicher Unterschied in der Proteinexpression von IL-17A zwischen den beiden T-Zell-Subtypen erkennen: Nach Aktivierung der Zellen über 24 Stunden mit PMA (Phorbol-12-Myristat-13-Acetat) und Ionomycin konnte Frau Kuhlmann eine um Faktor 6,7 gesteigerte Proteinmenge von IL-17A in den EL-4 siKSRP T-Zellen im Vergleich zu den EL-4 Co T-Zellen messen. Dies deutet auf eine KSRP-vermittelte Regulation der IL-17A-Expression in murinen CD4⁺ T-Zellen hin.

2.4 CXC-Motiv Chemokin Ligand 3 (CXCL3)

2.4.1 Einordnung und klinische Relevanz von CXCL3

Der CXC-Motiv Chemokin Ligand 3 (CXCL3) wird der CXC-Chemokinfamilie zugeordnet, die insgesamt 17 Mitglieder umfasst. Namensgebend sind zwei N-terminale Cysteine in der Primärstruktur dieser Chemokine, die eine weitere mit „X“ bezeichnete Aminosäure flankieren. Ihre Hauptfunktion liegt in der Steuerung der Migration von Immunzellen (Miller & Mayo, 2017; Palomino & Marti, 2015). Eine Untergruppe der CXC-Chemokine stellt die GRO-Familie dar. Diese setzt sich aus den Chemokinen GRO α (CXCL-1), GRO β (CXCL2) und GRO γ (CXCL3) zusammen. Die GRO-Chemokine sind hoch konserviert, was auf ihre Entstehung durch Genduplikation zurückzuführen ist. Jedoch konnten auf Proteinebene Unterschiede in ihrer Funktion nachgewiesen werden (Gulati et al., 2018). GRO-Chemokine wirken proinflammatorisch, indem sie die Rekrutierung und Aktivierung von neutrophilen Granulozyten steuern (Rajaratnam et al., 2019).

CXCL3 ist an der Pathogenese zahlreicher maligner Erkrankungen beteiligt. In neueren Untersuchungen wurde eine Überexpression von CXCL3 in Prostata- und Zervix-Karzinomzellen beschrieben. Zudem wurde CXCL3 als ein Schlüsselgen für die Prognose und Diagnostik des Adenokarzinoms des Kolons (COAD) identifiziert. Die Datenlage zu den zugrunde liegenden Signalwegen zwischen CXCL3 und den Tumorzellen ist bisher begrenzt (Qi et al., 2020; Reyes et al., 2021; Xin et al., 2018; Q.-Q. Zhao et al., 2020). Weitere Daten legen eine Förderung von Typ 2-Entzündungen und speziell von Rhinovirus-induzierten Asthmaexazerbationen durch CXCL3 nahe. So konnten bei CXCL3-depletierten Mausmodellen in der Lunge eine verminderte Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten sowie eine reduzierte Produktion von Typ 2-typischen Entzündungsmediatoren festgestellt werden. Die Unterdrückung der Entzündungsreaktion zeigte sich in einer verringerten Schleimhypersekretion sowie einer verminderten Hyperreaktivität der Atemwege (Sokulsky et al., 2020). In einer weiteren Studie wurde die CXCL3-Expression in humanen Lungenepithel- und Lungenarterienendothelzellen untersucht: In Lipopolysacchariden (LPS)-behandelten Zellen ging der Knockdown von CXCL3 mit entzündungshemmenden und antiapoptotischen Effekten einher (Y. Wang & Pan, 2022).

Als Reaktion auf proinflammatorische Stimuli werden die GRO-Chemokine von unterschiedlichen Zelltypen, darunter Epithel-, Stroma-, Endothel- und myeloische Zellen, freigesetzt und bewirken eine Infiltration und Degranulation von neutrophilen Granulozyten. Zur Verhinderung von unkontrollierter Gewebedestruktion unterliegt die Chemokinexpression strengen Kontrollmechanismen auf den Ebenen der Transkription sowie der mRNA-Stabilität (Hamilton

et al., 2010; Verbeke et al., 2012). Winzen et al (2007) konnten ARE in der 3'-UTR der CXCL3-mRNA von HeLa-Zellen nachweisen und eine destabilisierende Funktion von KSRP auf das Transkript feststellen. In Pulldown-Analysen von HeLa-Zellen wurde nach einer dreistündigen Behandlung mit Actinomycin D in KSRP-defizienten Zellen eine mindestens 1,3-fach erhöhte CXCL3-mRNA-Expression im Vergleich zu den Kontrollzellen gemessen (Winzen et al., 2007). In Übereinstimmung dazu konnten Herjan et al (2007) an HeLa-Zellen eine Regulation der mRNA-Stabilität für CXCL2 und CXCL3 durch KSRP nachweisen (Herjan et al., 2013). In Immunzellen hingegen fehlt dieser Nachweis bisher.

2.4.2 Mausmodelle und Zellen zur Untersuchung KSRP-vermittelter Mechanismen der Genregulation von CXCL3

2.4.2.1 C57BL/6 KSRP^{-/-}-Mäuse

Zur Untersuchung von KSRP-abhängigen Genregulationsmechanismen eignen sich C57BL/6-Mäuse mit einem KSRP-knockout (KSRP^{-/-}). Generiert wurden die C57BL/6 KSRP^{-/-}-Mäuse von der Arbeitsgruppe Chen: Durch eine Selektionskassette, die ein Hygromycin-Resistenzgen enthält, wurden Exon 1 bis 13 des KSRP-Gens ersetzt. Im Anschluss wurde die Selektionskassette durch die Cre-Rekombinase, die loxP-Signalsequenzen beidseits der Selektionskassette bindet, entfernt. Nachfolgend konnte in Northern-Blot-Analysen das Fehlen von KSRP-Transkripten in C57BL/6 KSRP^{-/-}-Mäusen nachgewiesen werden (W.-J. Lin et al., 2011).

2.4.2.2 MRL-Fas^{lpr} KSRP^{-/-}-Mäuse

Bei MRL-Fas^{lpr}-Mäusen handelt es sich um ein Lupus-Mausmodell, das viele klinische Merkmale eines systemischen Lupus erythematoses (SLE) aufweist. Durch eine loss-of-function-Mutation im Fas/CD95-Gen bleibt die Fas-vermittelte Apoptose autoreaktiver Lymphozyten aus. Die Akkumulation dieser Zellen führt u.a. zu einer verstärkten Produktion von Autoantikörpern sowie zur Bildung von Immunkomplexen, was mit verschiedenen Autoimmunsymptomen einhergeht (Nagasu et al., 2019). Ähnlich zur humanen Form des SLE kommt es zur Manifestation des Lupus in unterschiedlichen Organsystemen. Typische Erscheinungen des SLE sind eine Splenomegalie, Lymphadenopathie, Hautläsionen und Arthritis (Andrews et al., 1978; Furukawa et al., 1984; Kelley & Roths, 1985; Koopman & Gay, 1988). Eine der häufigsten und schwersten Folgen des SLE ist die Lupusnephritis. Diese geht neben glomerulären Entzündungen und Schädigungen auch mit tubulointerstitiellen Läsionen einher (Hong et al., 2020). Um einen Einfluss von KSRP auf die autoreaktiven und inflammatorischen Prozesse im Rahmen

des SLE untersuchen zu können, generierte die AG Pautz ein MRL-Fas^{lpr}-Mausmodell, das durch einen knockout von KSRP charakteristisch ist (MRL-Fas^{lpr} KSRP^{-/-}-Mäuse). In vergleichenden Untersuchungen mit MRL-Fas^{lpr} KSRP Wildtyp-Mäusen (MRL-Fas^{lpr} KSRP^{+/+}) konnte nachgewiesen werden, dass der KSRP-knockout mit einem höheren Schweregrad einer Glomerulonephritis einhergeht (Schmidtke et al., 2021). Weiterhin wurde für verschiedene Cytokine (u.a. IL-2, IL-12, INF- γ , IL-4, IL-5, IL-10, IL-13) eine wichtige Rolle in der Entstehung und Aufrechterhaltung des SLE nachgewiesen werden (Nozaki, 2020).

2.4.2.3 Renale Tubulusepithelzellen

Renale Tubulusepithelzellen (renal tubular epithel cells, RTEC) sind an der Pathogenese der Lupusnephritis im Rahmen des SLE sowie anderer akuter und chronischer Nierenerkrankungen beteiligt (Hong et al., 2020). Im Frühstadium vieler Nierenerkrankungen kommt es zu tubulointerstitiellen Entzündungen. Weil frühe tubulointerstitielle Läsionen nachfolgend oft mit schwereren Formen der glomerulären Schädigung einhergehen, werden sie als wichtige prognostische und diagnostische Marker der Glomerulonephritis diskutiert (Londoño Jimenez et al., 2018). Als ursächlich für tubulointerstitielle Entzündungen wurde u.a. eine Sekretion proinflammatorischer Mediatoren aus geschädigten RTEC erkannt. In der Literatur werden beispielsweise IL-1 β , IL-6, IL-34 und TNF- α als proinflammatorische Cytokine aufgeführt, die von geschädigten RTEC verstärkt produziert werden. Zudem wurde eine Freisetzung von Chemokinen – darunter auch Chemokine der CXC-Chemokinfamilie – durch aktivierte RTEC dargelegt (B.-C. Liu et al., 2018): Disteldorf et al. (2015) wiesen eine Th17/IL-17-induzierte Freisetzung von CXCL5 durch murine RTEC nach, die eine Rekrutierung neutrophiler Granulozyten bewirkte (Disteldorf et al., 2015). Auch für CXCL8 und CXCL12 wurde eine verstärkte Expression in geschädigten RTEC festgestellt (B.-C. Liu et al., 2018). Ein genaues Verständnis der Rolle von RTEC an der Pathogenese inflammatorischer Prozesse könnte zukünftig für neue Therapieansätze zur Behandlung der Lupusnephritis und anderer Nierenerkrankungen genutzt werden (Fu et al., 2022; Hong et al., 2020).

3 Material

3.1 Laborgeräte

Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit verwendeten Geräte sind in Tabelle 1 dargestellt.

Tabelle 1: Auflistung der verwendeten Laborgeräte

Funktion	Gerät	Bezeichnung	Hersteller
Elektrophorese	Gleichstromquelle für die Agarose-Gel-elektrophorese	Power Pac Basic	Biorad
	Gleichstromquelle für die SDS-PAGE und für die Semi-Dry-Blotter	Power Pac HC	Biorad
	Horizontal Gelelektrophorese-Kammer	Wide mini-sub cell GT Owl Easycast B1A	Biorad Thermo
	Vertikal-Gelelektrophorese-Kammer	Mini-Protean 3 Cell	Biorad
	Semi-Dry-Blotter	Trans-Blot® Turbo™	Biorad
Kühlung	+4 °C-Kühlschrank	Profi line Liebherr Comfort	Liebherr
	-20 °C-Gefrierschrank	Comfort	Liebherr
	-70 °C-Gefrierschrank	Herafreeze	Heraeus
Messung	Chemilumineszenz-Detektor	ChemiDoc™ XRS	Biorad
	PCR-Gerät	MyCycler T100 Thermal Cycler MyiQ Cycler CFX Connect™	BioRad
	pH-Meter	Wtw	InoLab
	Spektrometer	NanoDrop2000 FLUOstar OPTIMA	Thermo BMG
	Präzisionswaagen	Analytic AC120 S (0,1 mg – 121 g)	Satorius
Pipetten	Einkanalpipetten	0,5 – 10 µl 10 – 100 µl 100 – 1000 µl	Brand Eppendorf
	Mehrkanalpipette	Multipette Plus (0,5-10 µl)	Eppendorf Greiner
	Pipettierhilfe	Pipetboy	Integra
Zellkultur	Brutschrank	Hera Cell 150 Hera cell 150i	Thermo
	Mikroskop	Leica DMIL	Leica
	Sterile Werkbank	Herasafe	Thermo
	Zählkammer	Neubauer-Zählkammer	Labotec

Funktion	Gerät	Bezeichnung	Hersteller
Zentrifugen	Kühlzentrifuge	MicroStar 17R Biofuge fresco GT 1R Centrifuge	VWR Heraeus Fisher brand
	Tischzentrifuge	Galaxy Mini Perfect Spin P	Merck Peqlab
Sonstige Geräte	Autoklav	Laboklav	VWR
	Absaughilfe	Vacuboy	Integra
	Eismaschine		Ziegra
	Heizblock	Techne Dri Block DB 2A	Peqlab
	Magnetrührer	Ikamag RCT	IKA Labortechnik
	Mikrowelle		Severin
	Schüttler	DRS-12 DRS-12	NeoLab ELMI
	Waage		Sartorius
	Ultraschallbad	Bioruptor plus Bioruptor Water Cooler	Diagenode
	UV-Transilluminator	Intas GelDoc	Intas
	Vakuumpumpe	Vacusaft	Integra
	Vibrationsmischer	Mixomat	Vwr Boskampp GmbH
	Wasseraufbereitung	Milli-Q plus	Millipore
	Wasserbad	Julabo TW20	Julabo

3.2 Verbrauchsmaterialien

Die verwendeten Verbrauchsmaterialien sind in Tabelle 2 aufgelistet.

Tabelle 2: Auflistung der verwendeten Verbrauchsmaterialien

Artikel	Beschreibung	Hersteller
Beschichtete Gewebekultur-Petrischalen	Durchmesser: 9,4 cm; Wachstumsfläche: 58 cm ²	Sarstedt Greiner
Einweg-Auslaufpipetten	5 ml 10 ml 25 ml	Greiner
Kunststoff-Pipettenspitzen	0,5 – 10 µl 10 – 100 µl 100 – 1000 µl	Starlab Greiner Biozym
Reaktionsgefäße	0,2 ml 1,5 ml 2 ml 5 ml	Biozym Sarstedt

Artikel	Beschreibung	Hersteller
Zellkulturflaschen Filter Top	25 cm ² (50 ml) 75 cm ² (250 ml)	Greiner
6-Loch-Zellkulturplatten	Kulturfläche je Vertiefung: 9,6 cm ²	Greiner
24-Loch-Zellkulturplatten	Kulturfläche je Vertiefung: 1,75 cm ²	Greiner
Zellschaber	steril, 24 cm	Sarstedt
PCR-Gefäße	96-Loch-Platte für cDNA-Synthese	Biozym
	96-Loch-Platte für qRT-PCR	Greiner
	8-Loch-Streifen mit Deckel	Peqlab
Zentrifugenröhrchen	15 ml und 50 ml	Greiner
Nitrocellulose-Blotting-Membran	Protran 0,2 µm NC	Amersham
Blotting-Papier	MN 827 B	Macherey-Nagel

3.3 Puffer, Lösungen und Reagenzien

3.3.1 Reagenzien

In Tabelle 3 sind verwendete Chemikalien und vorgefertigte Medien dargestellt.

Tabelle 3: Auflistung der verwendeten Chemikalien und Medien

Substanz	Hersteller
Agarose	Roth
APS (Ammoniumperoxidsulfat)	Sigma Aldrich
Bradford-Reagenz	BioRad
BSA (Bovines Serum Albumin, Fraktion V)	AppliChem
CHX (Cycloheximid)	Sigma-Aldrich
DEPC (Diethylpyrocarbonat)	Sigma-Aldrich
DRB (5,6-Dichlor-benzimidazol-1-β-D-ribofuranosid)	Sigma-Aldrich
DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium)	Sigma-Aldrich
DMSO (Dimethylsulfoxid)	Sigma-Aldrich
dNTPs (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)	Peqlab
EDTA (Ethylendiamintetraacetat)	AppliChem
Ethanol	AppliChem
FCS (<i>fetal calf serum</i>)	PAA
GIT (Guanidiniumisothiocyanat)	Roth
Isopropanol	AppliChem
Magermilchpulver (MP)	AppliChem
Methanol	AppliChem
Natriumacetat (NaAc)	Roth
PBS	GIBCO

Substanz	Hersteller
Penicillin/Streptomycin (PenStrep), 100x	GIBCO
Puromycin	Invivo Gen
Pyruvat	Roth
Roti-safe	Roth
Salzsäure	Roth
SDS ultra-pure	Roth
TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylethan-1,2-diamin)	Sigma-Aldrich
TRIS (Tris(hydroxymethyl)-aminomethan)	AppliChem
Trypanblau, 4 %	Serva
Trypsin/EDTA-Lösung, 10x	PAA
Tween-20	Sigma-Aldrich
β-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich

3.3.2 Puffer und Lösungen

Die verwendeten Puffer und Lösungen und deren Zusammensetzung sind in Tabelle 4 aufgeführt. In Tabelle 5 sind die Puffer und Lösungen dargestellt, die für Western Blot-Analysen eingesetzt wurden.

Tabelle 4: Auflistung der verwendeten Puffer und Lösungen

Name	Zusammensetzung
ACK-Lysepuffer	150 mM NH ₄ Cl 1 mM KHCO ₃ 0,1 mM EDTA In milipore H ₂ O
Chloroform/Isoamylalkohol	5 Vol% Isoamylalkohol in Chloroform
Collagenase Solution	30 mg Collagenase Typ 4 200 µl 1M HEPES 20 ml HBSS
DEPC-Wasser	DNA-H ₂ O mit 0,1 Vol% DEPC, autoklaviert
DNA-Ladepuffer (10x)	50 % Glycerin 0,1 % Bromphenolblau 0,1 % Xylencyanolblau in DNA-H ₂ O
dNTPs, 10 mM	10 mM dATP 10 mM dCTP 10 mM dGTP 10 mM dTTP in H ₂ O

Name	Zusammensetzung
Ethanol, 70 %	70 % Ethanol in DNA-H ₂ O
Ethanol, 80 %	80 % Ethanol in DEPC-H ₂ O
GIT-Puffer	4 M GIT 2 mM Natriumcitrat 0,5 % Sarcosyl 0,1 M β -Mercaptoethanol (frisch hinzugegeben) in DEPC-H ₂ O
NaAc, 2 M	2 M NaAc in DEPC-H ₂ O
Phenol/Chloroform	1:1 Gemisch von Phenol und Chloroform
TAE-Puffer, 10x	400 mM TRIS 20 mM Na ₂ EDTA 1,142 % Essigsäure in H ₂ O pH 8,0

Tabelle 5: Auflistung der verwendeten Puffer und Lösungen für Proteinanalysen mittels Western Blot

Name	Zusammensetzung
BSA-Lösung	5 % Albumin Fraktion V in TBST
Laemmli-Puffer, 5x	312,5 mM TRIS-HCl 5 mM EDTA 15 % SDS 0,015 % Bromphenolblau 50 % Glycerin 40 mM DTT in H ₂ O pH 6,8
Laufpuffer, 5x	124 mM TRIS-HCl 959 mM Glycin 17 mM SDS in H ₂ O pH 8,3
MP-Lösung	5 % MP in TBST
Ponceau-S-Färbelösung	0,5 % Ponceau S 1 % Eisessig
RIPA-Puffer	50 mM Tris-HCl, pH 7,4 150 mM NaCl 1 % NP-40 2 mM EDTA 10 % Glycerin Proteinase- und Phosphataseinhibitoren wurden nach Herstellerangaben frisch hinzugegeben.
TBS, 10x	100 mM TRIS 150 mM NaCl in H ₂ O pH 7,8

Name	Zusammensetzung
TBST, 1x	1x TBS (10x) 0,1 % Tween 20
Transferpuffer	25 mM TRIS-HCl 192 mM Glycin 20 % Methanol in H ₂ O pH 8,3
Waschpuffer (TBST)	0,1 % Tween in 1xTBS

3.3.3 Kits

Tabelle 6: Auflistung der verwendeten Kits

Name	Verwendung	Hersteller
AmplifyMe SG Universal Mix	qRT-PCR	blirt
High Capacity cDNA Reverse Transcription	RT-PCR	Applied Biosystems
OneTaq® 2X Master Mix	Polymerase für PCR	New England Biolabs
Monarch® PCR & DNA Cleanup Kit	DNA-Aufreinigung	New England Biolabs

3.3.4 Stimulantien

Tabelle 7: Auflistung der verwendeten Stimulantien

Name	Konzentration der Stammlösung	Hersteller
PMA	1 mg/ml, gelöst in DMSO	Sigma Aldrich
Ionomycin	0,4 µmol/ml, gelöst in DMSO	Sigma Aldrich
LPS	1 mg/ml	Sigma-Aldrich
INF-γ	0,1 mg/ml	Miltenyi Biotec

3.3.5 Marker

Tabelle 8: Auflistung der verwendeten Marker

Name	Verwendung	Hersteller
PAGE Ruler, Prestained Protein Ladder	SDS-PAGE	Thermo Scientific
1kb Gene Ruler DNA Ladder	Agarose-GE	Thermo Scientific

3.3.6 Oligonukleotide

In Tabelle 9 sind die für qRT-PCRs verwendeten murinen Oligonukleotide und ihre Sequenzen aufgeführt. Alle aufgelisteten Oligonukleotide wurden von der Firma Sigma-Aldrich bezogen.

Tabelle 9: Auflistung der verwendeten qRT-PCR-Primer

Name	5'-Primer	3'-Primer
18 S	CGG CTA CCA CAT CCA AGG AA	GCT GGA ATT ACC GCG GCT
CXCL1	CTT GAA GGT GTT GCC CTC AG	GTC AGA AGC CAG CGT TCA C
CXCL3	CAG CCA CAC TCC AGC CTA	CAC AAC AGC CCC TGT AGC
IL-1-RA	GGA AAA GAC CCT GCA AGA TGC	TGG TCC TTG TAA GTA CCC AGC
IL-17A	TGA GTC CAG GGA GAG CTT CA	ATG TGG TGG TCC AGC TTT CC
TBP	CTA CCG TGA ATC TTG GCT GT	CTC TTG GCT CCT GTG CAC A
TNF- α	CAT CTT CTC AAA ATT CGA GTG ACA	TGG GAG TAG ACA AGG TAC AAC CC

3.3.7 Antikörper für Western Blot-Analysen

3.3.7.1 Primärantikörper

Tabelle 10: Auflistung der verwendeten Primärantikörper

Name	Verdünnungs- faktor	Lösung zum Ver- dünnen/Blockieren	Sekundär- antikörper	Hersteller
anti- β -Tubulin	1:20.000	5 % BSA in TBST	anti-mouse	Sigma Aldrich
anti-p38	1:1.000	5 % BSA in TBST	anti-rabbit	Cell Signaling
anti-p p38	1:1.000	5 % BSA in TBST	anti-rabbit	Cell Signaling
anti-GAPDH	1:10.000	3 % MP in TBST	anti-mouse	Cell Signaling
anti-KSRP	1:1.000	3 % MP in TBST	anti-rabbit	Novus Biolo- gicals

3.3.7.2 Sekundärantikörper

Tabelle 11: Auflistung der verwendeten Sekundärantikörper

Name	Verdünnung	Konjugiert an	Hersteller
anti-mouse	1:10.000	Meerrettichperoxidase	Sigma Aldrich
anti-rabbit	1:10.000	Meerrettichperoxidase	Sigma Aldrich

3.4 Zellen

Innerhalb der vorliegenden Arbeit wurden die nachfolgenden Zellsysteme verwendet.

Tabelle 12: Auflistung der verwendeten Zelllinien

Zelllinie	Beschreibung und Herkunft
EL-4 T-Zellen	Murine T-Lymphozyten aus C57BL/6N, die durch Behandlung mit 9,10-dimethyl-1,2-benzanthracen Lymphom-erkrankt sind Hersteller: ATCC (American Type Culture Collection); Kennziffer: TIB-39
EL-4 siKSRP T-Zellen	Murine EL-4 T-Lymphozyten, die durch retrovirale Transduktion des pBullet-pGIPZ-shRNA-hmrKSRP Vektors mit siRNA gegen KSRP eine verminderte KSRP-Expression aufweisen
EL-4 Co T-Zellen	Murine EL-4 T-Lymphozyten, die durch retrovirale Transduktion des pBullet-pGIPZ-Co Vektors eine unveränderte KSRP-Expression aufweisen
Primäre renale Tubulusepithelzellen (RTEC)	Aus C57BL/6 und MRL-Fas ^{lpr}
Primäre Peritonealzellen	Aus C57BL/6

4 Methoden

4.1 Zellbiologische Arbeitsmethoden

Sämtliche zellbiologische Arbeiten an eukaryotischen Zellen wurden zur Vermeidung von Kontaminationen unter einer sterilen Reinluftwerkbank durchgeführt. Zudem wurden ausschließlich steril verpackte oder autoklavierte Arbeitsmaterialien eingesetzt. Die verwendeten Lösungen und Medien wurden entweder bereits steril verpackt erworben oder wurden vor ihrem Gebrauch steril filtriert. Alle Geräte, Instrumente und Arbeitsoberflächen wurden mit 70 %igem Ethanol wischdesinfiziert.

4.1.1 Kultivierung eukaryotischer Zellen

Die Kultivierung der verwendeten Zelllinien erfolgte in Brutschränken mit einer Temperatur von 37 °C, 5 % CO₂-Begasung, gesättigter Wasserdampfathmosphäre und in zellspezifischem Kulturmedium. Die eingesetzten Kulturmedien gehen aus Tabelle 13 hervor. Zur Selektion wurde das Kulturmedium mit Antibiotikum versetzt. Die Kulturmedien wurden bei 6 °C gelagert und vor Verwendung auf Raumtemperatur erwärmt, um Zellstress zu vermeiden. Für die Kultivierung der Zellen wurden Zellkulturflaschen mit einer Wachstumsfläche von 75 cm² und Filterschraubverschluss eingesetzt, was einen Gasaustausch während der Zellkultivierung ermöglicht.

Tabelle 13: Auflistung der verwendeten Kulturmedien für jede Zelllinie

Zelllinie	Zusammensetzung des Kulturmediums
EL-4 Co T-Zellen	DMEM, 10 % FCS, 1 % Penicillin/Streptomycin, 4 µg/ml Puromycin
EL-4 siKSRP T-Zellen	DMEM, 10 % FCS, 1 % Penicillin/Streptomycin, 4 µg/ml Puromycin
Primäre renale Tubulusepithelzellen (RTEC)	DMEM/F-12, 10 % FCS, 1 % Hepes (1 M), 1 % Penicillin/Streptomycin, 1 % Hormonmix, 1 % Glutamin, 0,1 % humanes EGF
Primäre Peritonealzellen	DMEM low-glucose, 3 % FCS

Um ideale Wachstumsbedingungen zu gewährleisten, wurden die Zellen regelmäßig auf die Zelldichte bzw. -konfluenz hin beurteilt. Bei einer Zelldichte von 80 % wurden die Zellen subkultiviert. Bei den EL-4 Suspensionszelllinien wurde hierzu ein Teil der Zellsuspension in der Zellkulturflasche belassen und dieser mit frischem Kulturmedium auf ein Endvolumen von 20

ml aufgefüllt. Zur Subkultivierung der adhärenenten RTEC und Peritonealzellen wurden das Kulturmedium vollständig abgenommen und die Zellen mit Phosphatgepufferter Salzlösung (PBS, phosphate buffered saline, siehe Tabelle 3) gewaschen. Im Anschluss wurden 3 ml einer Lösung aus Ethylendiamintetraacetat (EDTA) und der Endopeptidase Trypsin (1-fach Verdünnung in PBS, Tabelle 3) auf die Zellen aufgetragen und für drei Minuten inkubiert. Durch die enzymatische Reaktion wurden die Zellen vom Boden der Zellkulturflasche bzw. der Petrischale abgelöst. Zum Beenden der Reaktion wurde 1 x PBS oder das jeweilige Kulturmedium zugefügt. Um die Zellkultur zu erhalten, wurden die Zellen in frischem Kulturmedium aufgenommen und in Kulturgefäßen inkubiert. Der nicht für den Erhalt der Zellkultur benötigte Anteil der Zellsuspension stand zum Aussäen für Zellkulturexperimente oder zur Kryokonservierung (siehe Kapitel 4.1.2) zur Verfügung.

4.1.2 Kryokonservierung und Rekultivierung eukaryotischer Zellen

Zur Sicherstellung eines dauerhaften Erhalts der Zelllinien wurden die Zellen kryokonserviert und langzeitgelagert. Dazu wurde die Zellsuspension zunächst für fünf Minuten in einem 15 ml-Reaktionsgefäß bei 1200 Umdrehungen pro Minute (rpm) (Fisher brand, GT 1R) und 4 °C zentrifugiert. Das entstandene Zellpellet wurde in FCS mit 10 % Dimethylsulfoxid (DMSO) resuspendiert und in ein 1,5 ml-Kryokonservierungsröhrchen transferiert. DMSO hat eine kryoprotektive Wirkung, indem es nach der Zellpenetration eine osmotische Dehydrierung sowie die Bildung von Eiskristallen verhindert. Das Einfrieren erfolgte schrittweise: Zunächst wurden die Kryokonservierungsröhrchen in einer mit Isopropanol befüllten Einfrierbox bei -70 °C für 24 Stunden gelagert. Dies stellt ein langsames Einfrieren mit einem Temperaturabsinken von 1 °C pro Minute sicher, wodurch Gefrierschäden verhindert werden sollten. Im Anschluss erfolgte eine Langzeitlagerung in einem Stickstofftank bei -196 °C. Bei dieser Lagerung kommt der Stoffwechsel der Zellen vollständig zum Erliegen, ohne dass die Ausgangseigenschaften der Zellen verloren gehen.

Zum Rekultivieren wurden die Zellen unmittelbar nach Entnahme aus dem Stickstofftank in einem 37 °C temperierten Wasserbad aufgetaut und in 5 ml Kulturmedium aufgenommen. Um das bei Raumtemperatur zelltoxisch wirkende DMSO aus der Suspension zu entfernen, wurde die Suspension für fünf Minuten bei 1200 rpm (Fisher brand, GT 1R) und 22 °C zentrifugiert und das entstandene Zellpellet in 10 ml Kulturmedium resuspendiert. Zum Anwachsen der Zel-

len folgte eine 24-stündige Kultivierung in einer 50 ml-Zellkulturflasche mit Filterschraubverschluss. Anschließend wurden die Zellen in eine 250 ml-Zellkulturflasche mit 20 ml Kulturmedium überführt.

4.1.3 Bestimmung der Lebendzellzahl

Im Rahmen von Zellkulturexperimenten wurde eine festgelegte Anzahl an Zellen in Kulturgefäßen ausplattiert. Dafür wurde zunächst die Lebendzellzahl der verwendeten Zelllinien lichtmikroskopisch und unter Verwendung einer Neubauer Zählkammer bestimmt. Der Kammerboden der Neubauer Zählkammer wird von höher liegenden Trägerstegen flankiert, auf die ein Deckglas unter Bildung Newtonscher Ringe positioniert wird. Oberhalb des Kammerbodens entsteht so ein Raum mit einer Kammertiefe von 0,1 mm. Auf dem Kammerboden befindet sich ein Zählfeld aus 3×3 Großquadraten von je 1 mm^2 . Jedes Großquadrat ist wiederum in 16 Einzelquadrate unterteilt.

Die auszuzählende Zellsuspension wurde im Verhältnis 1:2 mit einer 0,4 %igen Trypanblau-Lösung in PBS (siehe Tabelle 3) versetzt. Trypanblau wird aufgrund der Permeabilität der Zellmembran nur von abgestorbenen und perforierten Zellen aufgenommen. Diese Zellen werden dadurch blau gefärbt. Die Suspension wurde auf die Neubauer Zählkammer aufgetragen und gelangte durch Kapillarkräfte in die Zählkammer. Unter einem Lichtmikroskop wurden die vitalen, farblosen Zellen von drei Großquadraten gezählt. Die abgestorbenen, gefärbten Zellen wurden bei der Zellzählung nicht berücksichtigt. Durch Multiplizieren der ermittelten Zellzahl in drei Großquadraten mit dem Kammerfaktor 10^4 sowie dem Verdünnungsfaktor wurde die Lebendzellzahl bestimmt.

4.1.4 Aussaat der Zellen in Lochplatten

Für Zellversuche wurden die Zellen 16 Stunden vor Stimulation in Lochgefäßen ausplattiert. Um ein synchrones Vorliegen aller Zellen in der G0-Phase zu erreichen, wurden die Zellen in einem Kulturmedium mit reduziertem Serumgehalt ausgesät. Abhängig vom durchzuführenden Versuch wurden 6-, 24- oder 96-Lochplatten verwendet und eine definierte Zellzahl pro Loch ausgesät (siehe Tabelle 14).

Tabelle 14: Auflistung der verwendeten Kulturgefäße und Zellzahlen zur Versuchsdurchführung für jede Zelllinie

Zelllinie	Kulturgefäß	Zellzahl
EL-4 Co und EL-4 siKSRP T-Zellen	6-Lochplatte	2×10^6
	24-Lochplatte	3×10^5 bzw. $1,5 \times 10^5$
	96-Lochplatte	2×10^5
Primäre renale Tubulusepithelzellen (RTEC)	24-Lochplatte	75×10^3
Primäre Peritonealzellen	24-Lochplatte	maximal mögliche Zellzahl

4.1.5 Stimulation und Behandlung eukaryotischer Zellen

Um die proinflammatorische Genexpression in Zelllinien untersuchen zu können, erfolgte eine Induktion der ausgesäten Zellen. Diese Induktion bewirkte eine vermehrte Cytokinexpression in den behandelten Zellen.

In Versuchsreihen an murinen EL-4 T-Lymphozyten wurden die am Vortag ausplattierten Zellen für unterschiedliche Zeitperioden mit in DMSO gelöstem PMA und Ionomycin (siehe Tabelle 7) induziert. Beide Reagenzien wurden in einer Endkonzentration von jeweils $1 \mu\text{g/ml}$ eingesetzt. Während PMA über eine Aktivierung der Proteinkinase C wirkt, führt Ionomycin als Kalziumionophor zu einer veränderten intrazellulären Kalziumkonzentration. Durch die Behandlung der T-Zellen mit diesen Reagenzien werden intrazelluläre Signalwege aktiviert, die eine Produktion von Cytokinen fördern. Als Lösungsmittelkontrolle wurde ein Teil der ausgesäten Zellen mit der entsprechenden Menge an DMSO behandelt.

Die adhärenenten Zellen wurden mit einer LPS-Lösung (siehe Tabelle 7) in einer Endkonzentration von $1 \mu\text{g/ml}$ stimuliert. LPS als Bestandteil der äußeren Zellmembran gram-negativer Bakterien induziert in RTEC bzw. Peritonealzellen die Freisetzung von Entzündungsmediatoren sowie deren Proliferation. Gleichzeitig wurden Zellen zur Kontrolle mit Kulturmedium ohne Zusatz von LPS behandelt.

4.1.6 Analyse der mRNA-Stabilität mittels 5,6-Dichlorbenzimidazol-1- β -D-ribofuranosid (DRB)-Behandlung

Die Behandlung mit 5,6-Dichlorbenzimidazol-1- β -D-ribofuranosid (DRB, Tabelle 3) ermöglicht eine Bestimmung der mRNA-Stabilität. DRB ist ein Adenosinanalogs, das durch Hemmung der Elongation durch die Polymerase II einen Abbruch der Transkription bewirkt. Nach der DRB-Behandlung findet keine Neusynthese von mRNA mehr statt. Mittels quantitativer real-

time PCR (qRT-PCR, siehe Kapitel 4.2.6) kann die Halbwertszeit der vor der DRB-Behandlung bereits vorhandenen mRNA analysiert werden (Sehgal et al., 1976).

Zur Untersuchung der mRNA-Stabilität wurden die EL-4 Zellen und RTEC in 24-Lochplatten ausgesät (siehe Kapitel 4.1.4) und am Folgetag mit LPS stimuliert (siehe Kapitel 4.1.5). Nach Inkubation der EL-4 Zellen für 4 bzw. der RTEC für 3 Stunden wurde DRB in einer Endkonzentration von 25 µg/ml zugefügt und die Zellen wurden zu unterschiedlichen Zeitpunkten mit Guanidiniumisothiocyanat (GIT)-Puffer (Tabelle 4) lysiert (siehe Kapitel 4.2.1). Im Anschluss wurde die mRNA der Zellen isoliert und mittels reverser Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR) in komplementäre DNA umgeschrieben (siehe Kapitel 4.2.3). Anschließend wurden durch qRT-PCR mRNA-Abbauanalysen vorgenommen (siehe Kapitel 4.2.6).

4.1.7 Analyse der Protein-Stabilität mittels Cycloheximid (CHX)-Behandlung

Cycloheximid (CHX, siehe Tabelle 3) ist ein von *Streptomyces griseus* produziertes Antibiotikum, das in eukaryotischen Zellen eine Hemmung der Translation bewirkt. Durch die inhibierte Elongation während der Proteinbiosynthese kommt es zur Wachstumshemmung und schließlich zum Zelltod (Schneider-Poetsch et al., 2010).

Zur Analyse der RNA- und Proteinexpressionen wurden die EL-4 Zellen zunächst in 96-Lochplatten ausgesät (siehe Kapitel 4.1.4). Nach 16-stündiger Inkubation der Zellen erfolgte eine Stimulation mit PMA und Ionomycin für drei Stunden (siehe Kapitel 4.1.5). Im Anschluss wurde CHX in einer Endkonzentration von 50 µg/ml zugefügt. 3, 6, 12, 18 und 24 Stunden nach der CHX-Zugabe wurde die Zellsuspension in ein 1,5 ml-Reagiergefäß überführt und für fünf Minuten bei 1500 rpm (Fisher brand, GT 1R) und 4°C zentrifugiert. Aus dem entstandenen Zellpellet wurde die RNA isoliert (Kapitel 4.2.1) und nach reverser Transkription (siehe Kapitel 4.2.3) wurde die cDNA für qRT-PCRs (siehe Kapitel 4.2.6) verwendet. Zudem wurde der proteinhaltige Überstand auf die Proteinmengen von IL-17, TNF- α und weiteren Cytokinen mittels Cytometric Bead Array (CBA) von BDTM untersucht. Die CBA-Assays wurden freundlicherweise im Rahmen eines Kooperationsprojekts von der AG Bros durchgeführt. CBA-Assays beruhen auf dem Prinzip der Durchflusszytometrie und erlauben die simultane Quantifizierung mehrerer Cytokine. Hierzu wurden dem proteinhaltigen Überstand ausgewählte Partikel (Beads) zugefügt, die durch Antikörper auf ihrer Oberfläche jeweils spezifisch ein Cytokin erkennen. Zusätzlich wurden Detektor-Antikörper verwendet, die ebenfalls an das Cytokin binden und mit dem Fluoreszenzfarbstoff Phycoerythrin (PE) markiert sind. Nach Laseranregung konnte die Proteinmenge der ausgewählten Cytokine über die emittierte Fluoreszenzintensität

bestimmt werden. Die Fluoreszenzintensität steigt proportional zur enthaltenen Proteinmenge. Zur Bestimmung der absoluten Proteinkonzentration wurden eine Kalibrierungskurve erstellt und eine spezielle CBA-Analysesoftware verwendet (Medeiros & Gomes, 2019).

4.2 Molekularbiologische Methoden

4.2.1 Isolation von RNA aus Zellen und Geweben

Zur Untersuchung der mRNA-Expression wurde RNA mittels der Guanidiniumthiocyanat-Phenol-Chloroform-Extraktion nach Chomczynski und Sacchi (1987) aus Zellen isoliert (Chomczynski & Sacchi, 1987).

Bei Zellkulturexperimenten mit Suspensionszellen wurde die Zellsuspension aus den Lochplatten in 1,5 ml-Reagiergefäße überführt und durch Zentrifugation bei 1500 rpm (VWR, Microstar 17R) und 4 °C für 5 Minuten pelletiert. Das entstandene Zellpellet wurde mit PBS aufgereinigt. Anschließend wurden die Zellen mit GIT-Puffer (siehe Tabelle 5) lysiert. Zur Extraktion von RNA aus adhärenenten Zellen wurde das Kulturmedium aus den Lochplatten abgenommen und GIT-Puffer zur Zelllyse hinzugegeben. Die Zellen wurden durch Schaben von der Lochplatte gelöst und in 1,5 ml-Reagiergefäße überführt.

Nach dem Zellaufschluss der Suspensions- oder adhärenenten Zellen wurde 0,1 Volumen (Vol) 2 M Natrium-acetat (pH 4,0) zugefügt. Anschließend wurden die Proben mit wassergesättigtem Phenol versetzt und 15 Minuten lang auf Eis inkubiert. Zur Phasentrennung wurden die Proben 20 Minuten lang bei 13.000 rpm (VWR, Microstar 17R) und 4 °C zentrifugiert. Die untere, organische Chloroformphase sowie die DNA-haltige Interphase wurden verworfen. Die obere, wässrige, RNA-haltige Phase wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit 1,5 Vol Isopropanol versetzt. Zur RNA-Präzipitation wurden die Proben für mindestens zwei Stunden bei -20 °C gelagert.

Im Anschluss an die Fällung wurden die Proben erneut bei 13.000 rpm (VWR, Microstar 17R) und 4 °C für 20 Minuten zentrifugiert. Das entstandene Pellet wurde in 1 Vol 80 %igem Ethanol in DEPC-H₂O aufgenommen und wiederum für 10 Minuten zentrifugiert. Nach 10-minütigem Trocknen des Pellets wurde es in 30 µl RNase-freiem H₂O resuspendiert. Im Anschluss wurde die RNA-Konzentration photometrisch bestimmt.

4.2.2 Quantifizierung von Nukleinsäuren

Zur Konzentrations- und Reinheitsbestimmung der RNA wurde das Spektrophotometer Nano-Drop2000 verwendet. Nach dem Lambert-Beer'schen Gesetz kann aus der Höhe der Absorption die Konzentration der absorbierenden Substanz bestimmt werden. Zur Untersuchung der RNA-Konzentration wurde die Extinktion bei einer optischen Dichte (OD) von 260 nm bestimmt. Dies entspricht dem Absorptionsmaximum von Nukleinsäuren. Das Absorptionsmaximum von Proteinen liegt hingegen bei 280 nm. Aus dem Absorptionsverhältnis von Nukleinsäuren zu Proteinen können Verunreinigungen der RNA durch Proteine festgestellt werden. Die RNA gilt als rein, sofern der Quotient A_{260}/A_{280} zwischen 1,8 und 2,0 liegt. Neben einer Proteinverunreinigung können auch Lösungsmittel, wie Phenol oder Ethanol, den Reinheitsgrad der RNA beeinträchtigen. Eine solche Lösungsmittelverunreinigung lässt sich aus dem Quotienten der Absorptionen A_{260}/A_{230} bestimmen. Bei reiner RNA beträgt dieser Quotient 2.

4.2.3 cDNA-Synthese mittels Reverser Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR)

Tabelle 15: Ansatz für die Reverse Transkription mit dem High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit

Komponente	Volumen pro Ansatz
10 x RT Puffer	2 µl
25 x dNTP Mix (100 mM)	0,8 µl
10 x RT Random Primer	2 µl
MultiScribe® Reverse Transcriptase (50 U/µl)	0,5 µl
Nuklease-freies H ₂ O	4,7 µl
RNA (50 ng/µl)	10 µl
Gesamt	20 µl

Tabelle 16: Temperaturprogramm für die Reverse Transkription

Dauer	Temperatur	Schritt
10 min	25 °C	Bindung der Oligonukleotide an die RNA
120 min	37 °C	Reverse Transkription
5 sec	85 °C	Denaturierung der reversen Transkriptase
∞	8 °C	Kühlung

Um die mRNA-Expressionslevel in Zellen quantitativ durch qRT-PCR untersuchen zu können, wurde die mRNA zunächst mittels reverser Transkription in komplementäre DNA umgeschrieben.

Für die reverse Transkription wurde das High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit von Applied Biosystems (siehe Tabelle 6) verwendet. Die isolierte RNA wurde auf 50 ng/µl verdünnt und wie in Tabelle 15 angegeben mit den Kit-Bestandteilen versetzt. Die im Kit enthaltenen Oligonukleotide mit Zufallssequenz binden während der Inkubationsphase an die mRNA. Durch die RNA-abhängige DNA-Polymerase wird komplementäre, einsträngige cDNA synthetisiert. Die reverse Transkription erfolgte im MyCycler von Bio-Rad mit dem in Tabelle 16 aufgelisteten Temperaturprogramm.

4.2.4 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) wird verwendet, um ein spezifisches Gen in-vitro exponentiell zu vervielfältigen. Die Funktionsweise der PCR ist an die physiologische Replikation in der Zelle angelehnt (Saiki et al., 1988).

Das zu amplifizierende Fragment dient als Vorlage und wird von spezifischen Oligonukleotiden, die komplementär zu den jeweiligen Einzelsträngen sind, flankiert. Die PCR erfolgt in 5'-3'-Richtung durch eine thermostabile Polymerase aus dem Bakterium *Thermus aquaticus* (Taq) sowie freien Desoxyribonukleosidtriphosphaten (dNTPs) und den spezifischen Oligonukleotiden. Die PCR beginnt mit der Denaturierung der doppelsträngigen DNA durch Erhitzen auf 95 °C. Dabei kommt es zum Aufbrechen der Wasserstoffbrückenbindung, sodass DNA-Einzelstränge entstehen. Mit dem anschließenden Absenken der Temperatur auf 60 °C hybridisieren die komplementären Oligonukleotide an die Einzelstränge. Daraufhin erfolgt in der Elongationsphase die Neusynthese des komplementären Stranges durch die DNA-Polymerase. Durch Repetition der genannten PCR-Schritte wird das DNA-Fragment exponentiell amplifiziert. Das verwendete PCR-Programm ist detailliert aus Tabelle 18 zu entnehmen. Die Amplifikation erfolgte im MyCycler (BioRad).

Mittels anschließender elektrophoretischer Auftrennung der PCR-Produkte wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit die Spezifität verschiedener Primer getestet. Die PCR wurde unter Verwendung des OneTaq® 2X Master Mixes (siehe Tabelle 6) durchgeführt. Das Pipettierschema ist in Tabelle 17 aufgeführt.

Tabelle 17: Ansatz für eine PCR unter Verwendung des OneTaq® 2X Master Mixes

Komponente	Volumen pro Ansatz [µl]
OneTaq® 2X Master Mix	12,5
forward-Primer	1
reverse-Primer	1
H ₂ O	8,5
cDNA-Lösung	2

Tabelle 18: Temperaturprogramm für eine PCR unter Verwendung des OneTaq® 2X Master Mixes

Dauer	Temperatur [°C]	Zyklusanzahl	Schritt
5 min	95	1	Initiale Denaturierung
12 sec	95	44	Denaturierung
1 min	60		Annealing/Elongation
10 min	20	1	Kühlung

4.2.5 Agarose-Gelelektrophorese

Die Agarose-Gelelektrophorese wurde zur Identifizierung und Trennung von DNA-Fragmenten nach ihrer Größe durchgeführt. Durch die Größenbestimmung der PCR-Produkte konnte die Spezifität der verwendeten Primer untersucht werden.

Zur Herstellung eines Gels wurde das Polysaccharid Agarose (siehe Tabelle 3) in einem Elektrophorese-Puffer gelöst. Die eingesetzte Menge an Agarose wurde abhängig von der zu erwartenden Fragmentgröße festgelegt, da der Agarosegehalt die Porengröße des Gels bestimmt. Zur Analyse der PCR-Produkte wurde ein 1,5–2 %iger Agarosegehalt gewählt. Die Agarose wurde in 100 ml 0,8 x TRIS-Acetat-EDTA (TAE)-Puffer (siehe Tabelle 4) aufgekocht. Zur späteren Sichtbarmachung der DNA wurden pro 100 ml Pufferlösung 5 µl Roti-safe (siehe Tabelle 3) zugefügt. Der Farbstoff interkaliert in die DNA und emittiert unter UV-Licht eine grüne Fluoreszenz. Die erhitzte Agaroselösung wurde in eine Gelkammer gegossen und ein Kamm zur Bildung von Taschen eingesetzt. Das auspolymerisierte Agarosegel wurde in eine horizontale Elektrophoresekammer (Bio-Rad) überführt und die Kammer mit 0,8 x TAE-Puffer (Tabelle 4) befüllt. Die zu untersuchenden Proben wurden mit einem DNA-Ladepuffer (siehe Tabelle 4) versetzt und in die Geltaschen aufgetragen. Zusätzlich wurde eine Geltasche zur Abschätzung der Fragmentgröße mit einem 1 kb Ladder von Thermo Scientific (siehe Tabelle 8) beladen. Durch Anlegen einer Spannung von 80–100 V wurden die DNA-Fragmente abhängig von ihrer

Ladung bzw. Größe im elektrischen Feld aufgetrennt. Unter Verwendung eines UV-Transilluminators (Intas UV-Systeme) wurden die Banden sichtbar gemacht und ausgewertet.

4.2.6 Quantitative real-time PCR (qRT-PCR)

Mit Hilfe der quantitativen real-time PCR (qRT-PCR) wird die bei der reversen Transkription hergestellte cDNA vervielfältigt und im Vergleich zur herkömmlichen PCR zusätzlich quantifiziert. Die Expression des zu untersuchenden Gens wird dabei relativ zu einem Haushaltsgen bestimmt.

Für die cDNA-Quantifizierung wurden die cDNA und Primer mit dem AmplifyMe SG Universal Mix (siehe Tabelle 6) versetzt. Der Universal Mix enthält den DNA-bindenden Fluoreszenzfarbstoff SYBR Green I. SYBR Green I interkaliert während der Elongationsphase als Minor Groove Binder in die amplifizierte, doppelsträngige DNA. Durch den hierbei entstehenden Komplex aus cDNA und SYBR Green I wird ein Fluoreszenzsignal freigesetzt, das in Echtzeit zu jedem Amplifikationszeitpunkt detektiert und erfasst wird. Das Fluoreszenzsignal steigt dabei proportional zur Menge der cDNA, sodass die Zunahme an PCR-Produkt in Echtzeit verfolgt werden kann.

Nachteilig an dieser Methode ist die unspezifische Bindung von SYBR Green I an mögliche andere PCR-Produkte oder Primer-Dimere. Zur Überprüfung der Primerspezifität für die Zielsequenz werden die Schmelzkurve und der Schmelzpunkt analysiert. Beide sind durch die Länge und den GC-Gehalt des DNA-Fragments charakteristisch für eine Zielsequenz.

Für die qRT-PCR wurde der Reaktionsansatz wie in Tabelle 19 aufgeführt angesetzt und mit je 2 µl cDNA versetzt. Im Cycler CFX Connect von BioRad wurde das in Tabelle 20 aufgeführte Temperaturprogramm gewählt.

Tabelle 19: Ansatz für eine qRT-PCR

Komponente	Volumen [µl]
SYBR Green MasterMix (PrimerDesign)	10
forward-Primer	0,6
reverse-Primer	0,6
H ₂ O	6,8
cDNA-Lösung	2

Tabelle 20: Temperaturprogramm für eine qRT-PCR

Temperatur [°C]	Zeit	Zyklusanzahl	Schritt
95	15 min	1	initiale Denaturierung
94	15 sec	45	Denaturierung
60	60 sec		Annealing/Elongation
95	30 sec	1	terminale Denaturierung
60–95	10 sec		Schmelzkurve

4.3 Proteinbiochemische Methoden

4.3.1 Isolation von Proteinextrakt aus Zellen und Geweben

Zur Untersuchung der Proteinexpression von Suspensionszellen erfolgte zunächst eine Extraktion des Proteins aus den Zellen. Hierfür wurde jeweils ein Teil der zu untersuchenden Zellsuspensionen entnommen und diese für 5 Minuten bei 1200 rpm (VWR, Microstar 17R) und 4 °C zentrifugiert. Das entstandene Zellpellet wurde mit PBS gewaschen und nach erneutem Zentrifugieren in RIPA-Puffer (siehe Tabelle 5) resuspendiert. Um einen Verdau des Zielproteins nach Zelllyse durch zelleigene Proteasen und Phosphatasen zu verhindern, wurde der RIPA-Puffer in einer Konzentration von 1:10 mit einem Protease- und 1:100 mit einem Phosphatase-Inhibitor versetzt. Nach Überführen der in RIPA-Puffer aufgenommenen Zellen in ein 1,5 ml-Reagiergefäß wurden die Zellen zur Lyse bei -70 °C eingefroren. Das aufgetaute Lysat wurde anschließend mittels eines Bioruptors homogenisiert. Hierbei erfolgte durch insgesamt zehn Zyklen von 30-sekündigen Ultraschallimpulsen ein mechanischer Zellaufschluss, wodurch das zu untersuchende Protein und andere Biomoleküle aus den Zellen freigesetzt wurden. Zur Entfernung von Zelltrümmern wurde das Lysat für 30 Minuten bei 13.000 rpm (VWR, Microstar 17R) und 4 °C zentrifugiert und nur der Überstand zur Proteinanalyse weiterverwendet.

4.3.2 Quantifizierung von Proteinen mittels Bradford-Assay

Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte photometrisch nach der Methode von Bradford (Bradford, 1976). Beim Bradford-Test wird der Triphenylmethanfarbstoff Coomassie-Brilliant-Blau G-250 verwendet. Coomassie-Brilliant-Blau eignet sich aufgrund seiner spektralen Eigenschaften zur quantitativen Proteinbestimmung: In seiner kationischen, unkomplexierten Form hat der Farbstoff ein Absorptionsmaximum bei einer Wellenlänge von 465 nm. Dies erzeugt einen roten Farbeindruck. In der anionischen Form kommt es zur Komplexbildung

des Farbstoffs mit basischen Seitenketten von Proteinen. Das Absorptionsmaximum verschiebt sich bei Proteinbindung zu einer Wellenlänge von 595 nm. Um die im Lysat enthaltene Menge an Protein photometrisch zu bestimmen, wird die Extinktion bei einer Wellenlänge von 595 nm gemessen. Die Extinktion steigt proportional zur Menge an Protein. Zur Bestimmung der absoluten Proteinkonzentration des Lysats erfolgte eine Kalibrierung mit einem Proteinstandard. Hierzu wurde eine Verdünnungsreihe des bovinen Serumalbumins (BSA) wie in Tabelle 21 aufgeführt in Reagiergefäße pipettiert.

Die zu messenden Proben wurden zunächst 1:10 mit RIPA-Puffer (siehe Tabelle 5) verdünnt und anschließend im Verhältnis 1:80 in Milliporwasser aufgenommen. Im Anschluss wurden den Proben- sowie den BSA-Ansätzen jeweils 200 µl Bradford-Stammlösung zugefügt. Jeder Ansatz wurde jeweils zweifach in eine 96-Lochplatte pipettiert und die Absorption am Spektrometer Fluostar Optima bei 595 nm gemessen.

Tabelle 21: Verdünnungsreihe für einen Bradford-Assay

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

4.3.3 Methanol/Chloroform-Fällung von Proteinen

Sofern zu geringe Mengen an Protein beim Bradford-Test gemessen wurden, wurde das Protein mittels einer Methanol/Chloroform-Fällung aufkonzentriert (Wessel & Flügge, 1984). Es wurde eine Proteinendkonzentration festgelegt und das entsprechende Probenvolumen mit RIPA auf jeweils 100 µl aufgefüllt. Zur Fällung wurden die Proteinlösungen mit 4 Vol Methanol, einem Vol Chloroform und 3 Vol H₂O versetzt und für 10 Minuten bei 13.000 rpm (VWR, Microstar 17R) und 4 °C zur Phasentrennung zentrifugiert. Das Protein befindet sich nach der Zentrifugation in der Interphase. Die obere Phase wurde verworfen und weitere 3 Vol Methanol zugefügt. Nach erneuter Zentrifugation für 10 Minuten bei 13.000 rpm (VWR, Microstar 17R) und 4 °C wurde das entstandene Pellet vollständig getrocknet und in 40 µl 2 x Laemmli-Puffer mit Dithiothreitol (DTT) (siehe Tabelle 5) resuspendiert. Zur Proteindenaturierung wurden die Proben bei 95 °C erhitzt und anschließend auf ein Natriumdodecylsulfat (SDS)-Polyacrylamidgel aufgetragen (siehe Kapitel 4.3.4).

4.3.4 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) dient der Auftrennung von Proteingemischen nach ihrem Molekulargewicht. Polyacrylamidgele lassen sich abhängig von der zu erwartenden Proteingröße in unterschiedlichen Polyacrylamid-Konzentrationen herstellen. Bei sämtlichen hier durchgeführten Gelelektrophoresen wurde für das Trenngel eine Konzentration von 10 % und für das Sammelgel eine Konzentration von 4 % gewählt. Die genaue Zusammensetzung der Gele ist in Tabelle 22 dargestellt. Sammelgel und Trenngel wurden übereinander in einer Dicke von 1,5 mm zwischen zwei in eine Gießapparatur eingespannte Glasplatten gegossen. Das Polyacrylamidgel wurde diskontinuierlich hergestellt: Zunächst wurde das Trenngel wie in Tabelle 22 angegeben angesetzt und zwischen die Glasplatten pipettiert. Das Trenngel wurde mit Isopropanol überschichtet, um eine gerade verlaufende Oberfläche des Gels sicherzustellen. Nachdem das Trenngel auspolymerisiert war, wurde das Isopropanol abgegossen. Anschließend wurde das Sammelgel entsprechend den Angaben in Tabelle 22 angesetzt und zwischen die Glasplatten auf das Trenngel pipettiert. In das Sammelgel wurde im noch nicht auspolymerisierten Zustand ein Kamm eingebracht, der die zur Probenbeladung notwendigen Geltaschen erzeugte. Nach vollständiger Auspolymerisation wurde das Gel entweder zur späteren Verwendung bei 4 °C gelagert oder direkt für einen Western Blot verwendet. Zur Durchführung eines Western Blots wurde das Gel in eine Elektrophorese-Apparatur eingebracht und diese mit 1x Laufpuffer (siehe Tabelle 5) befüllt.

Vor der Auftragung der Proteingemische in die Geltaschen wurden die Proben folgendermaßen vorbereitet: Es wurde das für eine definierte Proteinkonzentration benötigte Probenvolumen berechnet und dieses Volumen mit Milliporwasser in einem Reagiergefäß auf 32 µl aufgefüllt. Zur Denaturierung der Proteine wurden den Proben jeweils 8 µl 2x Laemmli-Puffer mit DTT (siehe Tabelle 5) hinzugefügt. Im Laemmli-Puffer ist das anionische Tensid SDS enthalten, das durch Proteinbindung die Eigenladung der Proteine überdeckt und die Proteine proportional zu ihrer Molekülgröße negativ lädt. DTT führt zu einer Spaltung der Disulfidbrücken durch Reduktion, was zu einer zusätzlichen Entfaltung der Proteine führt. Zur vollständigen Denaturierung wurden die Proben anschließend für 5 Minuten in einem Heizblock bei 95 °C denaturiert. Die Taschen des Gels wurden mit den denaturierten Proteinproben beladen. Um die Proteingröße bestimmen zu können, wurde zusätzlich ein Molekulargewicht-Standard aufgetragen. Zum Einlaufen im 1x Laufpuffer (siehe Tabelle 5) und zur Aufkonzentrierung der Proben im Sammelgel wurde zunächst eine Spannung von 80 V angelegt. Sobald die Laufront das Trenngel erreicht hatte, wurde die angelegte Spannung auf 100 V erhöht.

Tabelle 22: Zusammensetzung der SDS-Polyacrylamid-Gele

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

4.3.5 Immundetektion mittels Western Blot

Die im SDS-Gel nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennten Proteine sollten im Folgenden auf eine Nitrozellulosemembran übertragen werden, um sie mittels Immundetektion zu visualisieren (Burnette, 1981; Towbin et al., 1979).

Zunächst wurde das SDS-Gel aus der Elektrophorese-Apparatur gelöst. Das Sammelgel wurde abgetrennt und verworfen. Das Trenngel, vier zugeschnittene Whatman-Papiere und eine Nitrozellulosemembran wurden für 15 Minuten in einem Transferpuffer (siehe Tabelle 5) inkubiert. Der Proteintransfer erfolgte in einem Semi-Dry-Blotter. Auf dessen Anodenplatte wurden zwei der puffergesättigten Whatman-Papiere, die Nitrozellulosemembran, das Trenngel und zwei weitere Whatman-Papiere gestapelt und mit der Kathodenplatte abgedeckt. Es wurde für 45 Minuten eine konstante Spannung von 12 V angelegt. Weil die Proteine durch das SDS negativ geladen waren, wanderten sie im elektrischen Feld senkrecht zum SDS-Gel in Richtung der Anode und wurden so auf die Nitrozellulosemembran übertragen.

Nach dem abgeschlossenen Protein-Blotting erfolgte ein Transfertest mittels Ponceau-S-Färbelösung (siehe Tabelle 5). Hierfür wurde die Nitrozellulosemembran eine Minute lang in der Färbelösung inkubiert und bei einem erfolgreichen Proteintransfer wurden die Proteinbanden sichtbar. Die Proteinfärbung war reversibel und wurde nach dem Transfertest mit H₂O abgewaschen.

Um ein unspezifisches Binden von Antikörpern an ungesättigte Bindungsstellen auf der Nitrozellulosemembran zu verhindern, wurde die Membran zunächst für eine Stunde in einer Blockierlösung auf einem Kippschüttler bei Raumtemperatur inkubiert. Als Blockierlösung wurden in 1x *Tris-buffered saline* mit 0,1 % Tween (TBST, Tabelle 5) gelöstes Rinderserumalbumin (BSA, 1%ig, Tabelle 3) oder entfettetes Magermilchpulver (MP, 3 %ig, Tabelle 3) verwendet. Im Anschluss erfolgte die Inkubation der Membran über Nacht bei 4 °C mit einem in

der entsprechenden Blockierlösung gelösten primären Antikörper. Die verwendeten primären Antikörper sind in Tabelle 10 aufgeführt. Der primäre Antikörper band spezifisch an das zu detektierende Protein auf der Nitrozellulosemembran. Nicht gebundener Primärantikörper wurde durch dreimaliges Auftragen von 1 x TBST (Tabelle 5) für jeweils 10 Minuten entfernt. Anschließend erfolgte die Inkubation mit einem konjugierten Sekundärantikörper (Tabelle 11) für 1 Stunde bei Raumtemperatur. Der Sekundärantikörper war gegen den Fc-Bereich des Primärantikörpers gerichtet, wobei durch Mehrfachbindung von Sekundärantikörpern an einen Primärantikörper eine Signalverstärkung erzielt wurde. Die Nitrozellulosemembran wurde zur Entfernung von schwach oder nicht gebundenem Sekundärantikörper erneut dreimalig mit TBST (siehe Tabelle 5) gewaschen. Mittels des ECL-Systems von Thermo Scientific wurde der Blot detektiert, was durch die Peroxidase-Kopplung des sekundären Antikörpers möglich war. Die freigesetzte Chemilumineszenz wurde zur Belichtung eines aufgelegten Positivfilms verwendet.

4.4 Tierexperimentelle Methoden

4.4.1 Isolation renaler Tubulusepithelzellen aus Mäusen

Die Versuchstiere – MRL Fas^{lpr}- und C57BL/6-Mäuse – wurden aus der zentralen Versuchstiereinrichtung der Universität Mainz (TARC) bezogen, wo sie gemäß den Anforderungen aus der Tierschutz-Versuchstierordnung gehalten werden. Die Tiere wurden im Alter zwischen 12 und 14 Wochen durch zervikale Dislokation getötet und das Fell mit 70 %igem Ethanol desinfiziert. Unter Verwendung von sterilem Präparierbesteck wurden durch einen transversalen Schnitt die Bauchdecke eröffnet und der Retroperitonealraum dargestellt. Mit einer sterilen Organschere wurden die Nieren beidseits freipräpariert und die Nierenstielgefäße im Bereich des Nierenhilus abgesetzt. Grobe Fettanteile wurden entfernt und die Nieren wurden in eine mit PBS gefüllte Petrischale überführt.

Alle nachfolgenden Arbeitsschritte fanden unter einer sterilen Reinluftwerkbank und unter Verwendung von sterilisierten Instrumenten und Materialien statt. Zunächst wurde die Nierenkapsel unter Beibehaltung der Integrität des Nierenparenchyms entfernt und verworfen. Anschließend wurden die Nieren zerteilt, bis sie in breiartiger Konsistenz vorlagen. Das zerkleinerte Zellmaterial wurde mit Collagenase Solution (Tabelle 4) versetzt und für 45 Minuten bei 37 °C, 100 % Luftfeuchtigkeit und 5 % CO₂ inkubiert. Nach der Inkubation wurde das Zellmaterial nacheinander durch drei Zellsiebe mit abnehmender Maschenweite (100 µm, 70 µm, 40 µm) und unter Spülen mit PBS filtriert. Das Filtrat wurde bei 1500 rpm (Fisher brand, GT 1R) für

10 Minuten bei Raumtemperatur zentrifugiert. Das entstandene Zellpellet wurde in steril filtertem ACK-Lysepuffer (siehe Tabelle 4) resuspendiert und darin für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Durch den Lysepuffer wurden die roten Blutzellen lysiert. Die Lyse wurde durch Zugabe von PBS beendet. Die gesamte Suspension wurde erneut für 10 Minuten bei 1500 rpm (Fisher brand, GT 1R) und Raumtemperatur zentrifugiert. Anschließend wurde das Zellpellet in DMEM Medium (Tabelle 13) aufgenommen und in oberflächenunbehandelte Petrischalen mit Gentamycin überführt. Während der nachfolgenden einstündigen Inkubation bei 37 °C, 100 % Luftfeuchtigkeit und 5 % CO₂ kam es zur Anhaftung von Makrophagen an die Petrischalen, während die RTEC in Suspension blieben. Die Zellsuspension mit den darin enthaltenen RTEC wurde abgenommen und in oberflächenbehandelte Petrischalen überführt. Diese wurden für 3–4 Tage bei 37 °C, 5 % CO₂ und 100 % Luftfeuchtigkeit zum Anwachsen der RTEC inkubiert. Nach dieser Inkubation erfolgte ein Mediumwechsel, durch den bewegliche Zellfragmente entfernt wurden. Es erfolgte eine erneute Inkubation der Zellen mit regelmäßigen Kontrollen der Zellkonfluenz unter dem Lichtmikroskop.

Zum Passagieren der Zellen wurde eine Konfluenz von 80 bis 90 % abgewartet. Beim Erreichen der notwendigen Konfluenz wurde das Medium aus den Petrischalen entnommen und bewegliche Zellfragmente durch das Waschen mit PBS entfernt. Es folgte eine dreiminütige Inkubation der Petrischalen in einer 1x Trypsinlösung (siehe Tabelle 3), wodurch die adhärenenten RTEC enzymatisch in Lösung gebracht wurden. Durch Zugabe von 1x PBS wurde die Reaktion durch darin enthaltene trypsininhibitorische Faktoren gestoppt. Die Zellsuspension wurde in ein 50 ml-Reagiergefäß überführt. Um die noch auf den Petrischalen verbliebenen RTEC zu lösen, wurde erneut PBS zugefügt und die Zellen wurden mittels eines Zellschabers gelöst. Die Suspension wurde ebenfalls in das 50 ml-Reagiergefäß überführt. Nach einer Zentrifugation für 5 Minuten bei 1500 rpm (Fisher brand, GT 1R) und Raumtemperatur wurden die Zellen in Kulturmedium (siehe Tabelle 13) resuspendiert und abhängig von ihrer Konfluenz zum Zeitpunkt des Passagierens auf 2–3 Petrischalen ausplattiert. Es folgt eine weitere Inkubation für 3–4 Tage mit zwischenzeitlichem Mediumwechsel. Sämtliche Versuche an den RTEC wurden in Zellpassage 1 durchgeführt. Zum Aussäen wurden die RTEC von den Petrischalen gelöst und in Kulturmedium aufgenommen. Es folgte das Ausplattieren in 24-Loch-Platten mit einer Zellzahl von 75×10^3 Zellen pro Loch (siehe Tabelle 14).

4.4.2 Isolation muriner Peritonealzellen

Die Versuchstiere wurden durch zervikale Dislokation getötet und das Fell mit 70 %igem Ethanol desinfiziert. Im unteren Drittel des Abdomens wurden medial Dermis und Bauchfaszien unter Erhalt des Peritoneums in einem Bereich von 1,5 x 1,5 cm² entfernt. Darin wurde eine Kanüle mit einem Außendurchmesser von 0,4 mm durch das Peritoneum in den Bauchraum geführt, ohne die Integrität viszeraler Organe zu verletzen. Durch die Kanüle wurde PBS mit 3 % FCS in den Bauchraum injiziert. Durch vorsichtiges Massieren des Abdomens wurden die Bauchorgane mit der Lösung umspült, wodurch im Peritoneum befindliche Immunzellen gelöst wurden. Mit einer Kanüle mit einem Außendurchmesser von 0,9 mm wurde die Suspension aus dem Bauchraum abgenommen und in ein 15 ml-Reagiergefäß überführt. Erneut wurde PBS mit 3 % FCS in den Bauchraum injiziert und weitere Immunzellen aus dem Bauchraum gesammelt. Durch einen transversalen Schnitt wurde der Bauchraum anschließend komplett eröffnet und die verbliebene Suspension wurde abgenommen. Die Suspension wurde für 8 Minuten bei 1500 rpm (Fisher brand, GT 1R) und Raumtemperatur zentrifugiert und das entstandene Pellet wurde in DMEM mit 3 % FCS resuspendiert. Unter Verwendung einer Neubauer Zählkammer wurde die Zellzahl bestimmt und die Zellen wurden in 24-Loch-Platten ausgesät. Vor Beginn der Versuchsdurchführung wurden die 24-Lochplatten für zwei Stunden bei 37 °C, 5 % CO₂ und 100 % Luftfeuchtigkeit inkubiert.

4.5 Statistik

Zur statistischen Auswertung wurden die Programme Microsoft Excel 2019 und GraphPad Prism (Version 9.02) verwendet. Die Daten repräsentieren den Mittelwert ± SEM (Standardfehler der Mittelwerte). Die Signifikanz wird mit einem Stern (*) dargestellt. Dabei entspricht ein Stern einem p-Wert unter 0,05, zwei Sterne einem p-Wert von unter 0,01, drei Sterne einem p-Wert unter 0,001 und vier Sterne einem p-Wert unter 0,0001. Zur vergleichenden Analyse zweier Gruppen wurden zweiseitige t-Tests durchgeführt. Für den Vergleich mehrerer Gruppen mit zwei Variablen wurde eine two-way ANOVA (analysis of variance) vorgenommen.

5 Ergebnisse

5.1 Analysen der mRNA-Expression von IL-17A in murinen EL-4 siKSRP T-Zellen im Vergleich zu murinen EL-4 Kontroll T-Zellen

5.1.1 Eine verminderte KSRP-Expression in stimulierten EL-4 T-Zellen führt zu keiner verstärkten IL-17A-mRNA-Expression

IL-17A ist als proinflammatorisches Cytokin u.a. an der Pathogenese verschiedener entzündlicher Haut- und Gelenkerkrankungen beteiligt. Ein Verständnis der Genexpression des Entzündungsmediators ist deshalb von großem klinischem Interesse. Es konnte bereits eine Regulation der Expression von IL-17A durch die RNA-BP Arid5a und TTP dargelegt werden (Amatya et al., 2018; H. H. Lee et al., 2012; Nyati et al., 2019). Ein Einfluss von KSRP auf die IL-17-Expression wurde in der Literatur hingegen bisher nicht beschrieben. Jedoch wurde für andere Entzündungsmediatoren, wie IL-1, IL-6, IL-8 und TNF- α , in verschiedenen humanen und murinen Zellmodellen eine posttranskriptionelle Regulation durch KSRP nachgewiesen. Aus den unveröffentlichten Daten von CBA-Analysen der AG Pautz (siehe Kapitel 2.3.3.2) konnte in EL-4 T-Zellen mit *small interfering* RNA (siRNA)-vermittelter Reduktion der KSRP-Expression (EL-4 siKSRP T-Zellen) nach 24-stündiger Aktivierung mit PMA und Ionomycin eine signifikant höhere IL-17A-Proteinexpression festgestellt werden als in EL-4 Kontroll T-Zellen (EL-4 Co T-Zellen). Dieses Ergebnis lässt vermuten, dass KSRP die Genexpression von IL-17A negativ beeinflusst. Dies würde mit der bisher bekannten Rolle von KSRP als überwiegend negativer Regulator der proinflammatorischen Genexpression übereinstimmen.

Um mögliche posttranskriptionelle Regulationsmechanismen von KSRP auf die IL-17A-Expression zu analysieren, wurden zwei verschiedene Subzelllinien der murinen CD4⁺ T-Zelllinie EL-4 verwendet. Mittels retroviraler Transduktion mit einem Vektorkonstrukt, das die Expression einer *short hairpin* RNA (shRNA) gegen KSRP zur Folge hat, wurde eine EL-4 T-Zelllinie etabliert, die durch eine verminderte Expression von KSRP charakterisiert ist (EL-4 siKSRP T-Zellen). Als Kontrolle wurde eine EL4 T-Zelllinie erzeugt, die mit dem gleichen retroviralen Vektor ohne shRNA-Expression stabil transduziert wurde (EL-4 Co T-Zellen) (siehe Tabelle 12). Vergleichend wurde die IL-17A-Expression in den EL-4 Co und den EL-4 siKSRP T-Zellen untersucht. Die verminderte Expression von KSRP in den EL-4 siKSRP T-Zellen wurde vor Versuchsbeginn mittels Western Blot Analyse bestätigt (Daten nicht gezeigt). Dazu wurden beide T-Zelllinien zunächst über einen Zeitraum von 16 Stunden in serumarmem Medium mit 0,5 % FCS inkubiert. Danach erfolgte eine Aktivierung der T-Zellen mit PMA (1 μ g/ml, gelöst in DMSO) und Ionomycin (1 μ g/ml) über verschiedene Zeiträume (2, 4, 6, 8 und 24 h). Zur

Kontrolle wurde ein Teil der Zellen über dieselben Zeiträume mit dem Lösungsmittel DMSO behandelt. Die anschließende Lyse der Zellen erfolgte mit GIT-Puffer (siehe Tabelle 5). Zur Analyse der mRNA-Expression wurden qRT-PCRs (siehe 4.2.6) durchgeführt und bei der Analyse der IL-17A-mRNA-Expression auf die mRNA-Expression von TATA-Bindeprotein (TBP) normiert.

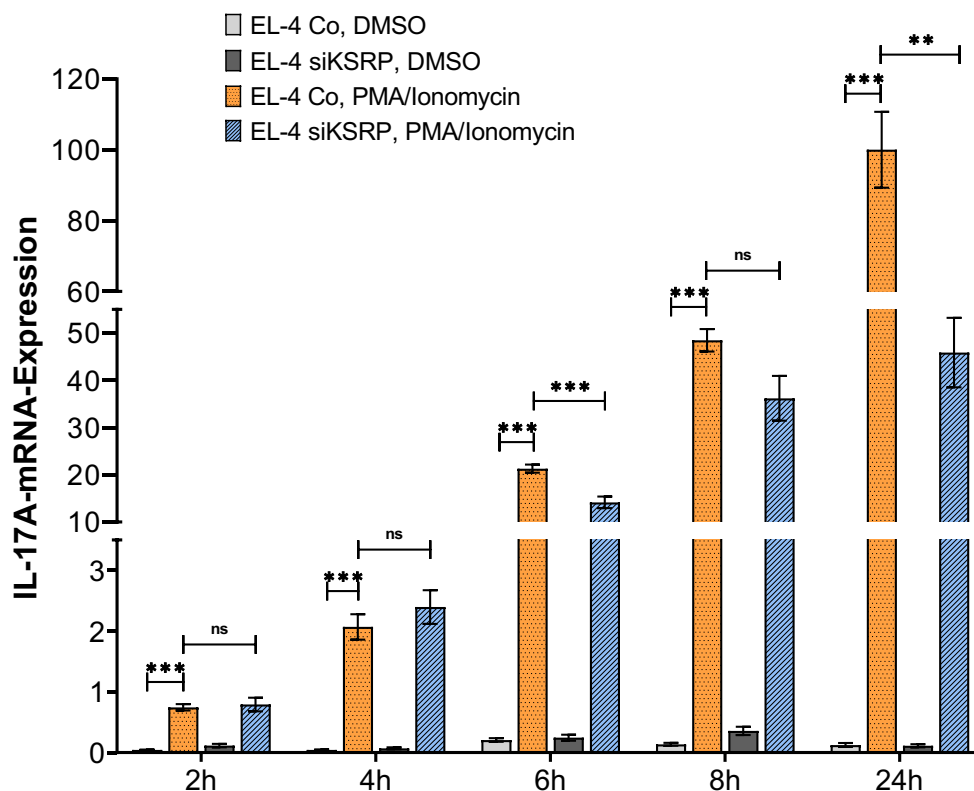


Abbildung 3: Die mRNA-Expression von IL-17A in murinen EL-4 siKSRP T-Zellen (EL-4 siKSRP) und EL-4 Kontroll T-Zellen (EL4 Co) nach Behandlung mit dem Lösungsmittel DMSO bzw. PMA und Ionomycin (P/I). Die EL-4 T-Zellen wurden für jeweils 2, 4, 6, 8 und 24 h mit dem Lösungsmittel DMSO bzw. PMA (1 µg/ml) und Ionomycin (1 µg/ml) behandelt. Abgebildet ist die Auswertung der qRT-PCR-Analysen von $n = 12-16$ Messwerten. Die Säulen repräsentieren die Mittelwerte $\pm$ SEM der IL-17A-mRNA-Menge relativ zur gemessenen mRNA-Menge der über 24 h mit P/I-behandelten EL-4 Co T-Zellen (Co). Die statistische Auswertung erfolgte durch einen two-way ANOVA-Test (ns = nicht signifikant; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

Aus den Daten in Abbildung 3 geht die IL-17A-mRNA-Expression in ihrer zeitlichen Kinetik hervor. Die Daten sind auf die IL-17A-mRNA-Expression in den über 24 h mit PMA und Ionomycin behandelten EL-4 Co T-Zellen bezogen. Bei allen Stimulationszeiträumen ist eine signifikant gesteigerte mRNA-Expression zwischen den unbehandelten und den behandelten T-Zellen zu erkennen. Beide T-Zelllinien zeigen mit der Zunahme der Stimulationsdauer mit PMA und Ionomycin eine steigende IL-17A-mRNA-Menge. Bei den Behandlungen mit PMA und Ionomycin über 2 und 4 h sind vergleichbare IL-17A-mRNA-Expressionen zwischen den Zelllinien festzustellen. Die Behandlung der T-Zellen über 6 h bewirkt hingegen signifikant

niedrigere IL-17A-mRNA-Mengen in den EL-4 siKSRP T-Zellen. Die mRNA-Expression ist dabei in den EL-4 siKSRP T-Zellen ca. um den Faktor 0,7 geringer als in den EL-4 Co T-Zellen. Bei der Behandlung mit PMA und Ionomycin über 8 h ist wiederum kein signifikanter Unterschied in der IL-17A-mRNA-Expression zwischen den unterschiedlichen Zelllinien zu erkennen. Die Daten zur Stimulation über 24 h weisen einen signifikanten Unterschied in der IL-17A-mRNA-Menge auf. In den EL-4 siKSRP T-Zellen ist die gemessene IL-17A-mRNA-Menge ca. 50 % geringer als in den EL-4 Co T-Zellen.

5.1.2 Die verminderte KSRP-Expression in EL-4 T-Zellen hat keinen signifikanten Einfluss auf die mRNA-Stabilität von IL-17A

KSRP als mRNA-bindendes Protein ist ein zentraler Regulator der posttranskriptionellen mRNA-Stabilität. Wie in Kapitel 2.2.2 beschrieben, konnte ein destabilisierender Effekt von KSRP auf die mRNA einiger Cytokine bereits dargelegt werden. In Bezug auf eine mögliche posttranskriptionelle Regulation der IL-17A-mRNA durch KSRP liegen bisher keine Publikationen vor.

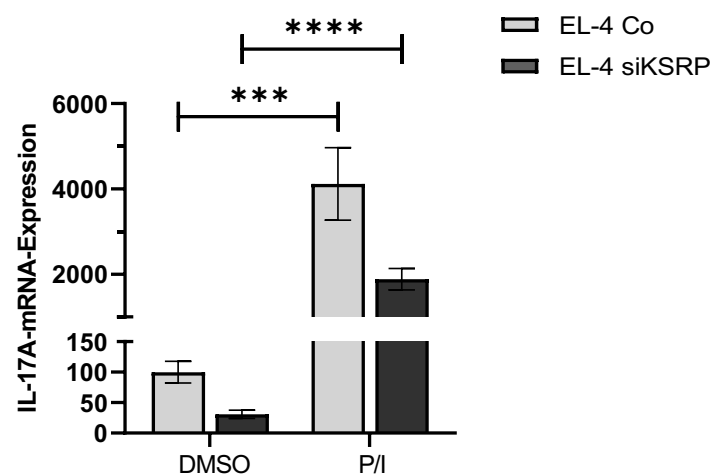


Abbildung 4: Kontrolle der mRNA-Expression von IL-17A in murinen EL-4 siKSRP und EL-4 Co T-Zellen nach der Behandlung mit PMA und Ionomycin bzw. nach der Kontrollbehandlung mit DMSO über 4 h Die EL-4 T-Zellen wurden für 4 h mit PMA (1 µg/ml) und Ionomycin (1 µg/ml) bzw. DMSO behandelt. Abgebildet ist die Auswertung der qRT-PCR-Analysen aus n = 8 Messwerten. Die Säulen repräsentieren die Mittelwerte ± SEM der IL-17A-mRNA-Mengen in Bezug auf die mRNA-Menge der für 4 h mit DMSO behandelten EL-4 Co T-Zellen. Die statistische Auswertung erfolgte durch ungepaarte t-Tests (**p < 0,01; ***p < 0,001).

Um einen Effekt von KSRP auf die IL-17A-mRNA-Stabilität zu überprüfen, wurden im Rahmen dieser Arbeit mRNA-Abbauanalysen unter Verwendung von DRB durchgeführt. 16 Stunden vor dem Versuchsbeginn wurden die EL-4 siKSRP und die EL-4 Co T-Zellen in serumarmem Medium mit 0,5 % FCS ausgesät. Nach einer Stimulation mit PMA (1 µg/ml, gelöst in

DMSO) und Ionomycin (1 µg/ml) sowie der entsprechenden Kontrollbehandlung mit DMSO wurden die Zellen über 4 h inkubiert. Zur Kontrolle der Stimulation durch PMA und Ionomycin wurde ein Teil der Zellen nicht mit DRB behandelt, sondern im Anschluss an die 4-stündige PMA/Ionomycin-Stimulation mit GIT-Puffer (siehe Tabelle 4) lysiert. Zur Analyse der mRNA-Expression wurden qRT-PCRs (siehe Kapitel 4.2.6) durchgeführt und bei der Analyse der IL-17A-mRNA-Expression auf die mRNA-Expression von TATA-Bindeprotein (TBP) normiert.

Aus Abbildung 4 geht die gesteigerte IL-17A-mRNA-Expression in beiden Zelllinien nach der Behandlung mit PMA und Ionomycin über 4 h hervor. Bei beiden T-Zelllinien ist ein signifikanter Anstieg in der mRNA-Expression von IL-17A nach der Behandlung mit PMA und Ionomycin im Vergleich zur Kontrollbehandlung mit DMSO feststellbar. Somit kann von einer erfolgreichen Stimulation der IL-17A-mRNA-Expression in beiden Zelllinien vor der DRB-Zugabe ausgegangen werden. Allerdings fällt dieser Anstieg in den EL-4 siKSRP T-Zellen geringer aus: Nach der 4-stündigen Stimulation ist in den EL-4 siKSRP T-Zellen eine um ca. 50 % geringere mRNA-Expression zu detektieren als in den EL-4 Co T-Zellen.

Im Anschluss an die Stimulation wurden die T-Zellen für 0 h, 30 min, 1 h, 2 h, 4 h und 6 h mit DRB (25 µg/ml) behandelt (siehe Kapitel 4.1.6). Durch die DRB-Behandlung wird die Transkription durch die RNA-Polymerase II gehemmt, wodurch die Neusynthese von mRNA inhibiert wird. Dies lässt Rückschlüsse auf die mRNA-Halbwertszeit bzw. die mRNA-Stabilität der vor der DRB-Zugabe bereits vorhandenen mRNA zu. Zur Untersuchung des Abbaus der IL-17A-mRNA nach der Zugabe von DRB wurden qRT-PCRs durchgeführt. Die IL-17A-mRNA-Expression wurde auf die mRNA-Expression von TBP normiert. Als Positivkontrolle wurde der Abbau der TNF-α-mRNA analysiert, von der bekannt ist, dass ihre Stabilität durch KSRP reguliert wird (Bollmann et al., 2014).

Die mRNA-Abbauanalysen unter Verwendung von DRB (Abbildung 5) zeigen keine signifikanten Unterschiede der IL-17A-mRNA-Stabilität zwischen den EL-4 siKSRP und den EL-4 Co T-Zellen. Im zeitlichen Verlauf nach DRB-Zugabe lässt sich in Abbildung 5 für die EL-4 siKSRP T-Zellen tendenziell ein geringer Rückgang der IL-17A-mRNA-Menge erkennen. Hingegen verändert sich die IL-17A-mRNA-Menge in den EL-4 Co T-Zellen im zeitlichen Verlauf der DRB-Behandlung eher nicht oder nimmt sogar tendenziell zu.

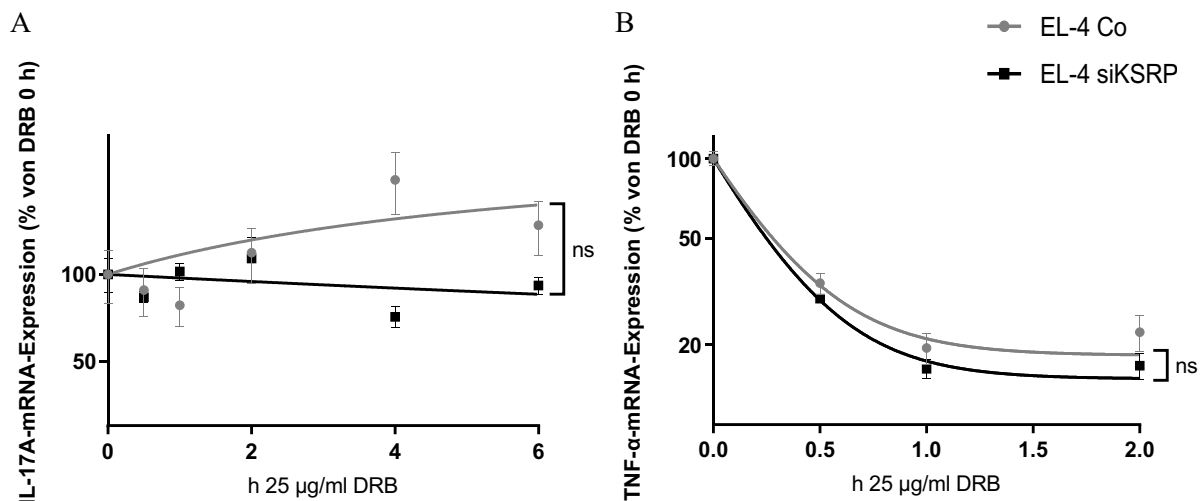


Abbildung 5: mRNA-Stabilitätsanalysen von IL-17A (A) und TNF-α (B) in murinen EL-4 siKSRP und EL-4 Co T-Zellen mittels Behandlung mit DRB zum Zeitpunkt 0 h Die mit PMA (1 µg/ml) und Ionomycin (1 µg/ml) stimulierten EL-4 T-Zellen wurden für 0 h, 30 min, 1 h, 2 h, 4 h und 6 h mit 25 µg/ml DRB inkubiert. Nach der Zelllyse mit GIT-Puffer und der RNA-Isolation wurden die mRNA-Expressionen von IL-17A und TNF-α mittels qRT-PCR bestimmt. Die relativen mRNA-Expressionen vor der Behandlung mit DRB (Zeitpunkt 0 h) wurden jeweils auf 100 % gesetzt und die gemessenen mRNA-Mengen wurden auf die zum Zeitpunkt 0 h bestimmte mRNA-Menge bezogen. Abgebildet ist die Auswertung der qRT-PCR-Analysen aus $n = 8$ Messungen. Die Symbole repräsentieren die Mittelwerte $\pm$ SEM der bestimmten mRNA-Mengen. Die statistische Auswertung erfolgte durch two-way ANOVA-Tests (ns = nicht signifikant).

Im Gegensatz zu IL-17A konnte nach der DRB-Behandlung ein deutlicher Abbau der TNF-α-mRNA in beiden Zelllinien detektiert werden. Bereits nach einer 30-minütigen Behandlung mit DRB sind in den EL-4 Co T-Zellen noch 34 % und in den EL-4 siKSRP T-Zellen noch 30 % der ursprünglichen TNF-α-mRNA-Menge zu messen. Bereits nach einer zweistündigen DRB-Behandlung stellt sich ein Plateau der TNF-α-mRNA-Menge von ca. 20 % der mRNA-Ausgangsmengen sowohl in den EL-4 Co als auch in den EL-4 siKSRP T-Zellen ein. Allerdings erfolgt der Abbau der TNF-α-mRNA in beiden T-Zelllinien in einer vergleichbaren Geschwindigkeit. Die Experimente liefern keinen Hinweis darauf, dass KSRP in der EL-4 Zelllinie den Abbau der IL-17A- und TNF-α-mRNA beeinflusst.

Dass KSRP scheinbar keinen Einfluss auf den mRNA-Abbau von IL-17A und TNF-α in EL-4 T-Zellen hat, wird in der gesonderten Darstellung der mRNA-Mengen nach der jeweiligen maximalen Behandlungsdauer mit DRB in Abbildung 6 nochmals deutlich: Nach der 6-stündigen DRB-Behandlung ist in den EL-4 Co T-Zellen eine im Vergleich zum Zeitpunkt 0 h ungefähr um den Faktor 1,5 gesteigerte IL-17A-mRNA-Menge feststellbar. Die IL-17A-mRNA-Menge in den EL-4 siKSRP T-Zellen ist hingegen auf ca. 90 % der Ausgangsmenge an mRNA gesunken. Die Unterschiede der IL-17A-mRNA-Mengen zwischen den T-Zelllinien sind nicht signifikant. Nach der DRB-Behandlung der EL-4 T-Zellen für 2 h ist ebenfalls kein signifikanter Unterschied in der mRNA-Menge von TNF-α zwischen den Zelllinien sichtbar. Die TNF-α-

mRNA-Menge ist in den EL-4 Co T-Zellen auf ca. 22 % und in den EL-4 siKSRP T-Zellen auf ca. 17 % des Ausgangswerts gesunken, was den verstärkten Abbau der TNF- α -mRNA im Vergleich zur IL-17A-mRNA in EL-4 T-Zellen erneut unterstreicht.

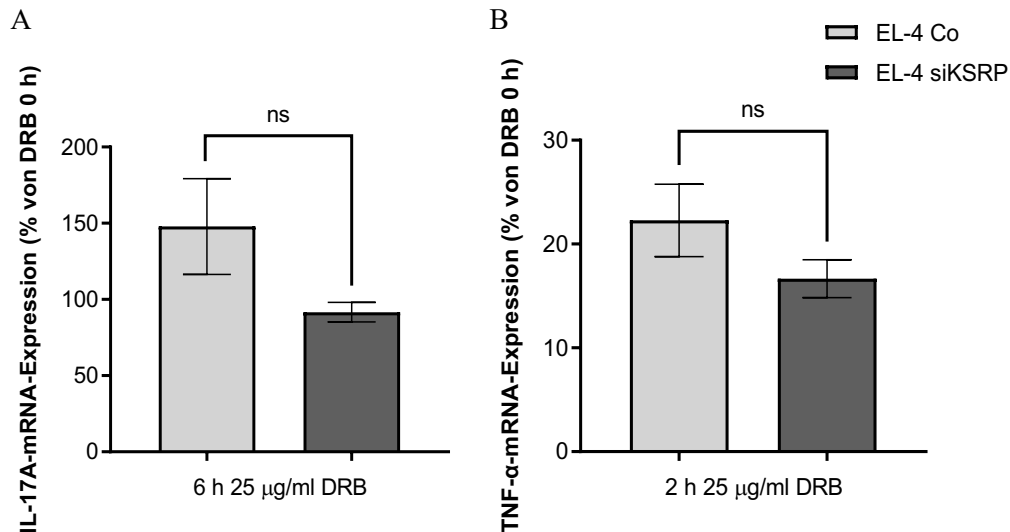


Abbildung 6: mRNA-Expression von IL-17A (A) und TNF- α (B) in murinen EL-4 siKSRP und EL-4 Co T-Zellen nach der Behandlung mit DRB für 6 h bzw. 2 h. Dargestellt sind die IL-17A- und TNF- α -mRNA-Expressionen beider mit PMA (1 μ g/ml) und Ionomycin (1 μ g/ml) stimulierter EL-4 T-Zelllinien nach der jeweiligen maximalen Behandlungszeit mit 25 μ g/ml DRB (6 h bzw. 2 h). Die Zellyse erfolgte mittels GIT-Puffer und nach der RNA-Isolation wurden die mRNA-Expressionen von IL-17A und TNF- α durch qRT-PCR bestimmt. Die mRNA-Expressionen vor der Behandlung mit DRB (Zeitpunkt 0 h) wurden auf 100 % gesetzt und die gemessenen mRNA-Mengen nach DRB-Behandlung mit DRB wurden auf die zum Zeitpunkt 0 h bestimmten mRNA-Mengen bezogen. Abgebildet ist die Auswertung der qRT-PCR-Analysen aus $n = 8$ Messungen. Die Säulen repräsentieren die Mittelwerte $\pm$ SEM der bestimmten mRNA-Mengen. Die statistische Auswertung erfolgte durch ungepaarte t-Tests (ns = nicht signifikant).

5.1.3 Eine verminderte KSRP-Expression in EL-4 T-Zellen geht mit einer reduzierten IL-17A-Proteinexpression nach Translationshemmung einher

Um eine Regulation der IL-17A-Expression durch KSRP auf translationaler Ebene zu untersuchen, wurden die EL-4 T-Zellen mit Cycloheximid (CHX), einem Hemmstoff der Translation, behandelt (siehe Kapitel 4.1.7). Die EL-4 siKSRP und die EL-4 Co T-Zellen wurden zunächst über 16 Stunden in 96-Lochplatten in Kulturmedium mit 0,5 % FCS inkubiert. Es folgte eine 5-stündige Stimulation der Zellen mit PMA (1 μ g/ml, gelöst in DMSO) und Ionomycin (1 μ g/ml). In einer Konzentration von 50 μ g/ml wurden die Zellen dann für 3, 6, 12, 18 und 24 h mit CHX behandelt. Die Zellysate wurden zentrifugiert und die proteinhaltigen Überstände zur Durchführung von Cytometric Bead Array (CBA)-Analysen (siehe Kapitel 4.1.7) abgenommen. Zur Positivkontrolle wurden – wie auch bei der Untersuchung der mRNA-Stabilität (siehe Kapitel 5.1.2) und der mRNA-Expression (siehe Kapitel 5.1.1) – neben den Proteinmengen von

IL-17A auch die Proteinmengen von TNF- α bestimmt. Aus der Literatur ist bekannt, dass KSRP die TNF- α -Expression reguliert (Bollmann et al., 2014).

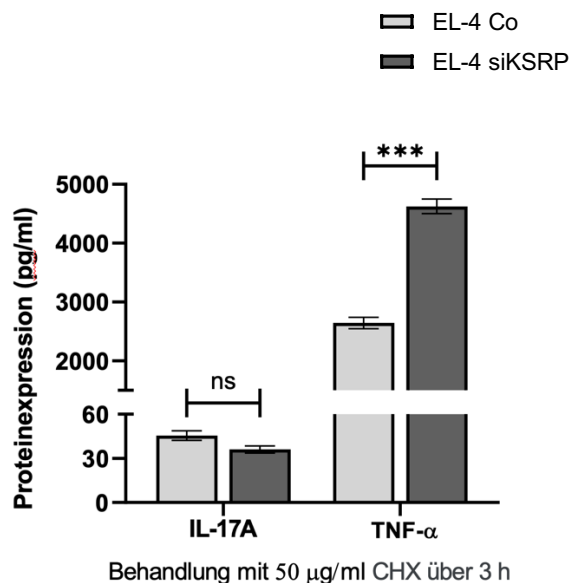


Abbildung 7: Die Proteinexpressionen von IL-17A und TNF- α in EL-4 siKSRP und EL-4 Co T-Zellen nach Behandlung mit CHX über 3 h

Die stimulierten EL-4 T-Zellen wurden für 3 h mit CHX (50 μ g/ml) behandelt. Abgebildet ist die Auswertung der CBA-Analysen aus $n = 3$ Messungen. Die Säulen repräsentieren die Mittelwerte $\pm$ SEM. Die statistische Auswertung erfolgte durch ungepaarte t -Tests (ns = nicht signifikant, *** $p < 0,001$).

Nach der 3-stündigen Behandlung der P/I-stimulierten T-Zellen mit CHX lassen sich sowohl in den EL-4 Co als auch in den EL-4 siKSRP T-Zellen signifikant höhere TNF- α -Proteinmengen im Vergleich zu den IL-17A-Proteinmengen detektieren (siehe Abbildung 7). Die IL-17A-Proteinmengen zwischen den EL-4 Co und den EL-4 siKSRP T-Zellen unterscheiden sich nach der CHX-Behandlung nicht signifikant. Hingegen ist in den EL-4 siKSRP T-Zellen eine ca. zweifache TNF- α -Proteinmenge im Vergleich zu den EL-4 Co T-Zellen zu messen.

Aus den Abbildungen 9 A und B gehen die in den Überständen gemessenen Proteinkonzentrationen von IL-17A und TNF- α nach der Behandlung mit CHX über 3, 6, 12, 18 und 24 h hervor. Die Daten sind auf die jeweiligen Proteinkonzentrationen in den EL-4 Co T-Zellen nach 3-stündiger Behandlung mit CHX bezogen. Mit der CHX-Behandlung lässt sich bei beiden Subzelllinien eine im zeitlichen Verlauf tendenziell sinkende IL-17A-Proteinmenge erkennen. Auffällig ist der prozentual deutlich stärkere Rückgang der Proteinmenge in den EL-4 siKSRP T-Zellen im Vergleich zu den EL-4 Co T-Zellen. Ab einer Translationshemmung über 18 h stellt sich in beiden Subzelllinien ein Plateau der Proteinmenge ein, wobei der signifikante Unterschied in der IL-17A-Proteinmenge zwischen den Genotypen bestehen bleibt.

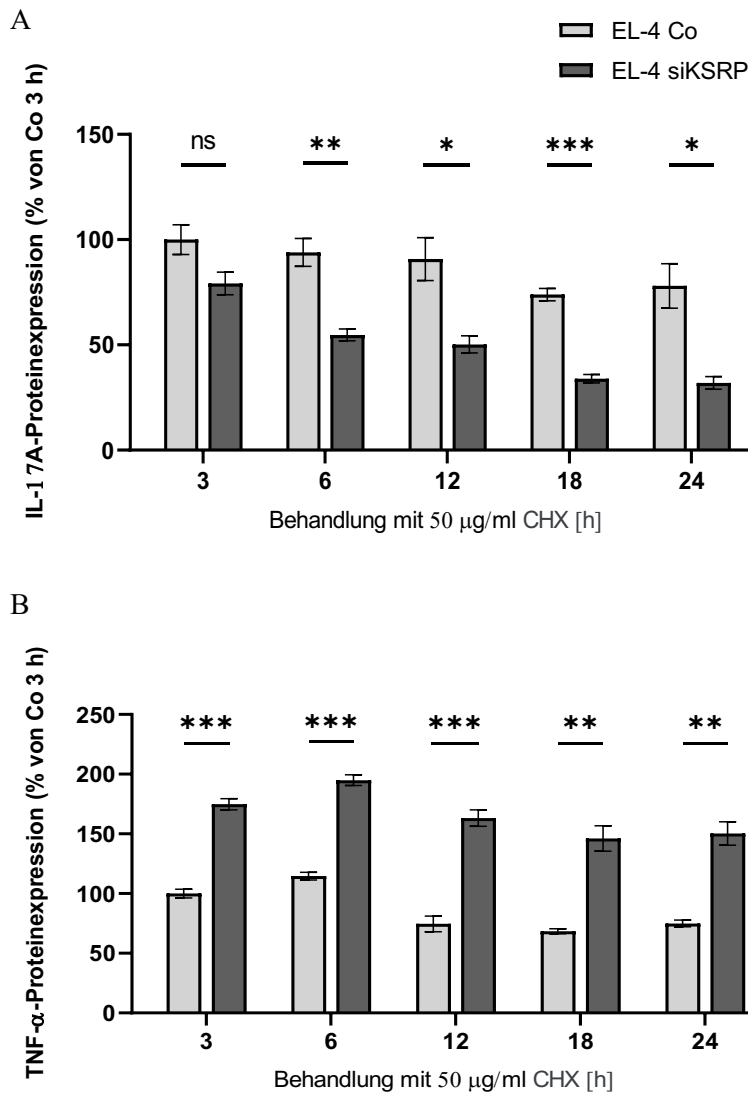


Abbildung 8: Die Proteinexpression von IL-17A (A) und TNF- α (B) in EL-4 siKSRP und EL-4 Co T-Zellen nach Behandlung mit CHX

Die stimulierten EL-4 T-Zellen wurden für jeweils 3, 6, 12, 18 und 24 h mit CHX (50 µg/ml) behandelt. Abgebildet ist die Auswertung der CBA-Analysen aus $n = 3$ Messungen. Die Säulen repräsentieren die Mittelwerte $\pm$ SEM der Proteinmengen in Bezug auf die Proteinmenge der für 3 h mit CHX behandelten EL-4 Co T-Zellen. Die statistische Auswertung erfolgte durch ungepaarte t -Tests (ns = nicht signifikant, * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

Aus den Daten zur Proteinexpression von TNF- α lässt sich hingegen bei allen CHX-Behandlungszeiträumen eine signifikant höhere Proteinmenge in den EL-4 siKSRP T-Zellen im Vergleich zu den EL-4 Co T-Zellen messen. Nach der 3-stündigen Translationshemmung ist die Proteinmenge in den EL-4 siKSRP T-Zellen um 75 % höher als in den EL-4 Co T-Zellen. Ab einer Translationshemmung über 12 h sind bei beiden Subzelllinien keine weiteren Veränderungen der TNF- α -Proteinmenge zu detektieren.

Um neben der Proteinexpression auch die mRNA-Expression untersuchen zu können, wurden die nach der Zentrifugation pelletierten T-Zellen durch GIT-Puffer (siehe Tabelle 4) lysiert und anschließend die mRNA isoliert. Zur Analyse der mRNA-Expression wurden qRT-PCRs durchgeführt und bei der Analyse der mRNA-Expression auf die mRNA-Expression von TBP normiert.

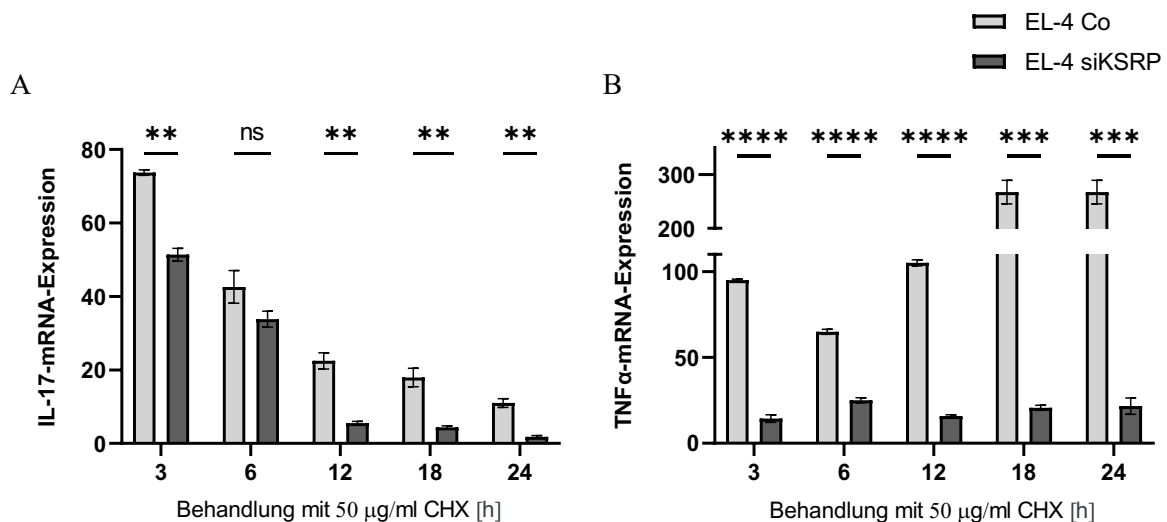


Abbildung 9: Die mRNA-Expression von IL-17A und TNF- α in murinen EL-4 Co und EL-4 siKSRP T-Zellen nach Behandlung mit CHX Die EL-4 T-Zellen wurden über einen Zeitraum von 5 h mit PMA (1 µg/ml) und Ionomycin (1 µg/ml) stimuliert. Anschließend erfolgte eine Behandlung mit CHX für 3, 6, 12, 18 und 24 h. Abgebildet ist die Auswertung der qRT-PCRs aus $n = 3$ Messungen. Die Säulen repräsentieren die Mittelwerte $\pm$ SEM der IL-17A- und TNF- α -mRNA-Mengen. Die mRNA-Mengen sind bezogen auf die mRNA-Menge der Proben der jeweiligen Zelllinie, die im Anschluss an die 5-stündige Stimulation mit PMA und Ionomycin für 3 h ohne Behandlung mit CHX inkubiert wurden. Die statistische Auswertung erfolgte durch ungepaarte t-Tests (ns = nicht signifikant; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$).

Mit der Dauer der CHX-Behandlung sind sinkende mRNA-Mengen von IL-17A in beiden T-Zelllinien festzustellen. Auffallend ist dabei der stärkere Abfall der IL-17A-mRNA-Menge im zeitlichen Verlauf in den EL-4 siKSRP T-Zellen bezogen auf die gemessene mRNA-Menge der jeweiligen Subzelllinie nach 3-stündiger Inkubation der Zellen ohne CHX-Behandlung. In den EL-4 siKSRP T-Zellen ist nach der Translationshemmung über 3 h eine um die Hälfte verminderte IL-17A-mRNA-Menge im Vergleich zur Kontrollbehandlung mit CHX feststellbar. Im weiteren Verlauf fällt die mRNA-Menge stetig, bis nach der 24-stündigen CHX-Behandlung noch 2 % der mRNA-Menge in Bezug auf die Kontrollbehandlung zu messen sind. Auch bei den EL-4 Co T-Zellen ist ein stetiger Rückgang der mRNA-Menge über die Dauer der Translationshemmung abzulesen. Nach der 3-stündigen CHX-Behandlung sind jedoch noch 74 % der IL-17A-mRNA-Menge in Bezug auf die Kontrollbehandlung vorhanden, was einer um 23 % höheren mRNA-Menge im Vergleich zur Messung in den EL-4 siKSRP T-Zellen entspricht. Auch nach 24-stündiger Behandlung mit CHX sind noch 11 % der mRNA zu detektieren. Dies entspricht einer um den Faktor 5,5 höheren IL-17A-mRNA-Menge im Vergleich zu den EL-4 siKSRP T-Zellen nach gleicher Behandlung.

Die gemessenen mRNA-Mengen von TNF- α zeigen nach einer 3- und 6-stündigen CHX-Behandlung einen Rückgang der mRNA-Menge um 5 bzw. 35 %. Mit der CHX-Behandlung über 12 h ist hingegen eine um 5 % gesteigerte mRNA-Menge im Vergleich zum Ausgangswert zu

detektieren. Nach der 24-stündigen Behandlung ist die mRNA-Menge dann um den Faktor 2,7 im Vergleich zum Ausgangswert ohne CHX-Behandlung gesteigert. In den EL-4 siKSRP ist nach der CHX-Behandlung über 3 h eine um 86 % reduzierte TNF- α -mRNA-Menge im Vergleich zur Kontrollbehandlung über 3 h festzustellen. Mit zunehmender Dauer der CHX-Behandlung sind vergleichsweise geringe Schwankungen in der mRNA-Menge zu erkennen. Nach der 24-stündigen CHX-Behandlung sind 22 % der mRNA-Ausgangsmenge vorhanden.

5.1.4 Analysen der mRNA-Expression des IL-1-Rezeptorantagonisten in murinen EL-4 Co T-Zellen im Vergleich zu EL-4 siKSRP T-Zellen

Ishigame et al. (2006) konnten in IL-1-Rezeptorantagonist (IL-1-RA)-depletierten Mäusen eine verstärkte Signalwirkung von IL-1 feststellen, die wiederum mit erhöhten Expressionen von IL-17, IL-6 und TNF- α einherging. Es wurde vermutet, dass die gesteigerte Autoimmunität der Mäuse mit verminderter IL-1-RA-Expression T-Zell-abhängig ist (Ishigame et al., 2006). Im Rahmen des hier durchgeführten Versuchs wurden EL-4 T-Zellen auf eine KSRP-abhängige Expression von IL-1-RA untersucht. Dazu wurden die EL-4 T-Zelllinien über einen Zeitraum von 16 Stunden in serumarmem Medium inkubiert. Anschließend erfolgte die Stimulation mit PMA (1 μ g/ml, gelöst in DMSO) und Ionomycin (1 μ g/ml) (siehe Kapitel 4.1.5) sowie die Kontrollbehandlung mit dem Lösungsmittel DMSO über verschiedene Zeiträume (2, 4, 6 und 8 h). Nach der Lyse der Zellen mit GIT-Puffer (siehe Tabelle 4) und der RNA-Isolation wurde die mRNA-Expression mittels qRT-PCR (siehe Kapitel 4.2.6) untersucht. Bei der Analyse der IL-1RA-mRNA-Expression wurde auf die mRNA-Expression von TATA-Bindeprotein (TBP) normiert. Im Vergleich zu den unbehandelten T-Zellen ist eine deutliche Zunahme der IL-1-RA-mRNA-Expression in den mit PMA und Ionomycin stimulierten T-Zellen bestimmt worden.

Die Untersuchung der Expression von IL-1-RA (siehe Abbildung 10) ergab eine signifikant verminderte IL-1-RA-mRNA-Menge in EL-4 siKSRP T-Zellen im Vergleich zu den EL-4 Co T-Zellen bei allen untersuchten Stimulationszeiträumen mit PMA und Ionomycin. Bei den EL-4 Co T-Zellen ist eine maximale Induktion der IL-1-RA-mRNA-Expression nach der 4-stündigen Stimulation zu erkennen. Im Vergleich zur Stimulation über 2 h liegt nach der Stimulation über 4 h eine ca. verdreifachte IL-1-RA-mRNA-Menge vor. Mit der Zunahme der Stimulationsdauer sinkt die mRNA-Menge in den EL-4 Co T-Zellen wieder. Im Gegensatz dazu ist in den EL-4 siKSRP T-Zellen bei allen Stimulationszeiträumen eine signifikant verringerte IL-1-

RA-mRNA-Expression im Vergleich zu den EL-4 Co T-Zellen zu messen. Der größte Unterschied in der IL-1-RA-mRNA-Expression zwischen den Subzelllinien ist nach der 4-stündigen Stimulation festzustellen: In den EL-4 siKSRP T-Zellen liegt eine um 74 % geringere IL-1-RA-mRNA-Menge im Vergleich zu den EL-4 Co T-Zellen vor.

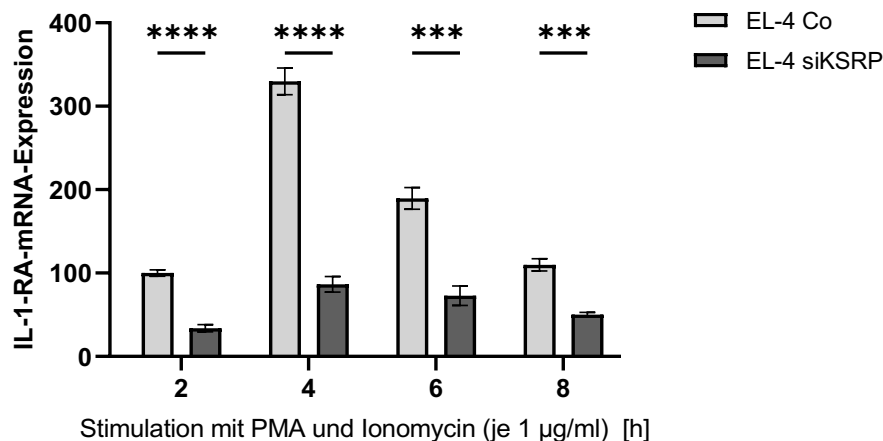


Abbildung 10: Die mRNA-Expression IL-1-RA in murinen EL-4 siKSRP T-Zellen und EL-4 Co T-Zellen nach Stimulation mit PMA und Ionomycin. Die EL-4 T-Zellen wurden für jeweils 2, 4, 6 und 8 h mit PMA (1 µg/ml) und Ionomycin (1 µg/ml) stimuliert. Abgebildet ist die Auswertung der qRT-PCR-Analysen von $n = 4$ Messwerten. Die Säulen repräsentieren die Mittelwerte $\pm$ SEM der IL-1-RA-mRNA-Menge relativ zur gemessenen mRNA-Menge der über 2 h mit P/I-behandelten EL-4 Co T-Zellen. Die statistische Auswertung erfolgte durch ungepaarte t -Tests (** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$).

5.2 Die Aktivierung der p38-MAPK verändert sich in EL-4 T-Zellen mit verminderter KSRP-Expression nicht

Die p38-MAPK moduliert als Reaktion auf extrazelluläre Stimuli nachgeschaltete Kinasen, die die Aktivität verschiedener RBP regulieren. Somit ist die p38-MAPK indirekt an der posttranskriptionellen und translationalen Genregulation von Entzündungsmediatoren beteiligt (Soni, 2019). Die p38-MAPK selbst wird durch vorgeschaltete Signalwege in ihrer Aktivität reguliert. Im Rahmen dieser Versuchsreihe sollte ein Einfluss von KSRP auf die Aktivität der p38-MAPK in murinen EL-4 T-Zellen untersucht werden. Hierzu wurde die Phosphorylierung der p38-MAPK vergleichend zwischen EL-4 siKSRP und EL-4 Co T-Zellen überprüft. In 6-Lochplatten wurden die EL-4 T-Zellen für 16 Stunden in Medium mit 0,5 % FCS inkubiert. Anschließend wurden die Zellen für 30 min mit PMA (1 µg/ml, gelöst in DMSO) und Ionomycin (1 µg/ml) stimuliert und ein Teil der Zellen zur Lösungsmittelkontrolle mit DMSO behandelt (siehe Kapitel 4.1.5). Die Zelllyse erfolgte mit auf 95 °C erhitztem Laemmli-Puffer (siehe Tabelle 5). Für den mechanischen Zellaufschluss wurden die Zellen sonifiziert und jeweils 40 µl jedes Lysats zur SDS-Gelelektrophorese (siehe Kapitel 4.3.4) auf ein 10 %iges Polyacrylamidgel

(siehe Tabelle 22) aufgetragen. Zur Detektion des Proteins erfolgte eine Western Blot-Analyse (siehe Kapitel 4.3.5) unter Verwendung von Antikörpern gegen p38-MAPK und Phospho-p38-MAPK (p-p38-MAPK). Zur Normierung wurde ein Antikörper gegen β -Tubulin eingesetzt (siehe Tabelle 10).

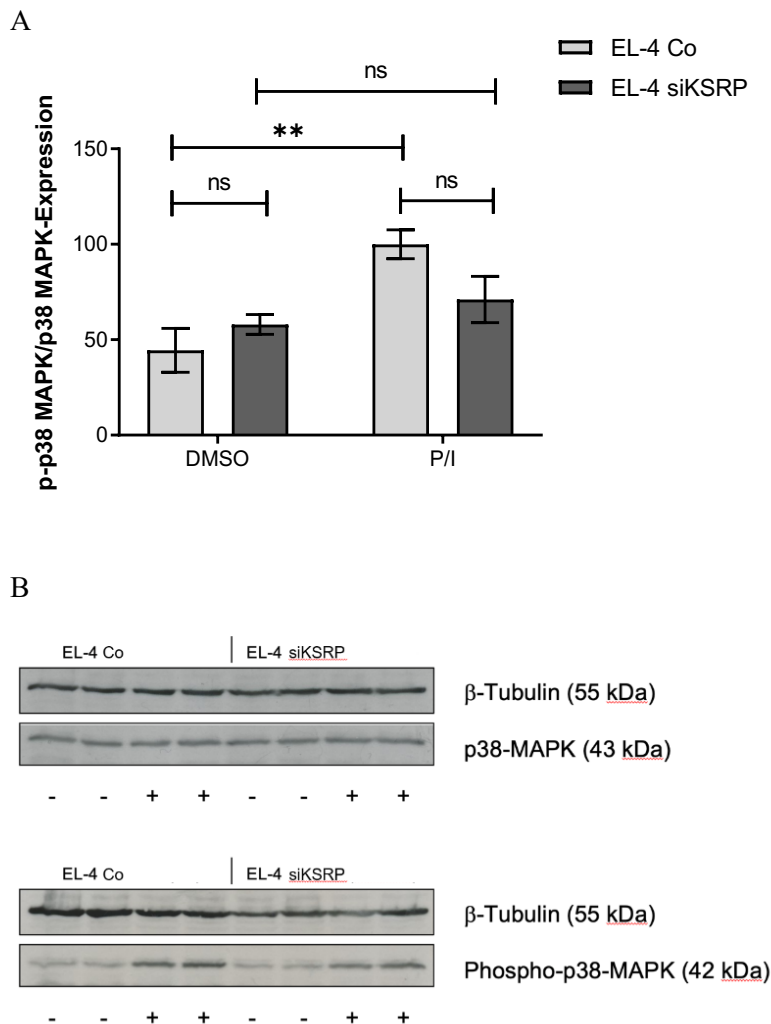


Abbildung 11: Untersuchung einer KSRP-abhängigen Veränderung in der Aktivierung der p38-MAPK in EL-4 T-Zellen

Die EL-4 Co und EL-4 siKSRP T-Zellen wurden für 30 min mit PMA (1 μ g/ml) und Ionomycin (1 μ g/ml) bzw. dem Lösungsmittel DMSO inkubiert. Anschließend wurde die Proteinexpression der p38-MAPK und der Phospho-p38-MAPK (p-p38-MAPK) mittels Western Blots dargestellt. Die Normierung erfolgte auf das Haushaltsgen β -Tubulin.

A: Abgebildet sind die Analysen der Western-Blots von $n = 3$ Experimenten. Die Säulen repräsentieren die Mittelwerte $\pm$ SEM des Verhältnisses zwischen der p-p38-MAPK- und der p38-MAPK-Proteinexpression. Die Daten sind auf das Expressionsverhältnis von den über 30 min mit P/I-behandelten EL-4 Co T-Zellen bezogen. Die statistische Auswertung erfolgte durch einen two-way ANOVA-Test mit Sidak-Korrektur; ns = nicht signifikant; ** $p < 0,01$.

B: Repräsentativ sind die Western Blots eines durchgeführten Experiments dargestellt. ((+): Behandlung mit PMA und Ionomycin, (-): Kontrollbehandlung mit Lösungsmittel)

Aus den Daten in Abbildung 11 A gehen keine signifikanten Veränderungen im Verhältnis zwischen der p38-MAPK- und der p-p38-MAPK-Proteinexpression zwischen EL-4 siKSRP und EL-4 Co T-Zellen hervor. Weder nach der Kontrollbehandlung mit DMSO noch nach der Stimulation der Zellen mit PMA und Ionomycin sind Genotyp-spezifische Unterschiede in der Aktivierung der p38-MAPK erkennbar. Lediglich in den EL-4 Co T-Zellen kann eine signifikant erhöhte Aktivierung – also eine verstärkte Phosphorylierung der p38-MAPK – in den stimulierten Zellen im Vergleich zu den mit der Lösungsmittelkontrolle behandelten Zellen festgestellt werden. Die Differenz der Aktivierungsverhältnisse liegt hier durchschnittlich bei ca.

45 %. Insgesamt ergeben sich aus den Ergebnissen keine Hinweise darauf, dass KSRP an der Regulation der p38-MAPK beteiligt ist.

5.3 Analysen einer KSRP-abhängigen Expression von CXCL3 in Mausmodellen

5.3.1 Herstellung eines geeigneten Primersystems für qRT-PCR-Analysen zur Untersuchung der CXCL3-mRNA-Expressionen

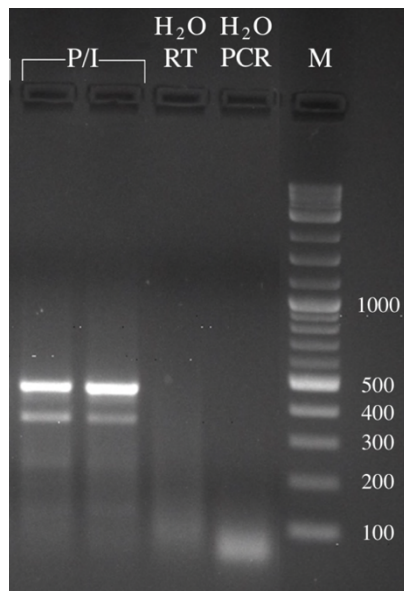
Wie in Kapitel 1 beschreiben, führte die AG Pautz bisher nicht veröffentlichte RNA-Seq-Analysen durch. Die Analysen wurden vergleichend an CD4⁺ T-Zellen aus C57BL/6 KSRP^{-/-}-Mäusen bzw. C57BL/6 WT-Mäusen (siehe Kapitel 2.4.2) durchgeführt, die mit CD3 und CD28 polyklonal stimuliert wurden. Die Ergebnisse der RNA-Seq-Analysen zeigten eine 2,3-fache Hochregulation der Genexpression von CXCL3 in KSRP-depletierten CD4⁺ T-Zellen im Vergleich zu den WT-Zellen.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollten die Ergebnisse der RNA-Seq-Analysen durch Zellkulturexperimente an EL-4 CD4⁺ T-Zellen verifiziert werden. Zunächst wurden drei Primerpaar-Varianten für CXCL3 hergestellt und unter Verwendung der Primerpaare PCR-Analysen an den EL-4 T-Zellen durchgeführt. Die EL-4 T-Zellen wurden dafür über 8 h mit PMA und Ionomycin behandelt (siehe Kapitel 4.1.5). Die entstandenen PCR-Produkte wurden mittels Gelelektrophorese (siehe Kapitel 4.2.5) aufgetrennt und visualisiert, um die korrekte Größe der PCR-Fragmente sicherzustellen. Auf den Agarosegelen waren keine PCR-Produkte mit der zu erwartenden Fragmentgröße von 112 Basenpaare (bp) zu erkennen. Stattdessen waren unspezifische Fragmente mit einer Größe von ca. 380 und 500 bp sichtbar (siehe Abbildung 12 A). Dies lässt eine geringe oder nicht vorliegende CXCL3-Expression in den EL-4 T-Zellen vermuten.

Im Folgenden wurden dieselben Primersysteme für PCR-Analysen an LPS-stimulierten renalen Tubulusepithelzellen (RTEC) verwendet, die aus MRL-Fas^{lpr} WT-Mäusen (Kapitel 2.4.2.2) isoliert worden sind (siehe Kapitel 4.4.1). Nach der gelelektrophoretischen Auftrennung war eine Produktgröße von 112 bp zu erwarten. In Abbildung 12 B ist das Agarosegel der aufgetrennten qRT-PCR-Produkte unter Verwendung von Primerpaarvariante 2 dargestellt. Ausgewählt wurde diese Primervariante, da sie im Vergleich zu den anderen Primerpaaren die höchste Spezifität aufwies. Für qRT-PCR-Analysen mit SYBR Green (siehe Kapitel 4.2.6) ist eine hohe Spezifität der Primer essenziell. Die Spezifität eines Primers ist im Agarosegel daran zu erkennen, dass ausschließlich PCR-Produkte derselben Fragmentgröße vorliegen. Bei der LPS-sti-

mulierten Probe (LPS) weisen alle erkennbaren PCR-Produkte dieselbe zu erwartende Fragmentgröße von 112 bp auf. Somit wurde der Primer für die nachfolgenden Versuche zur Untersuchung der CXCL3-Expression verwendet.

A) EL-4 T-Zellen



B) RTEC

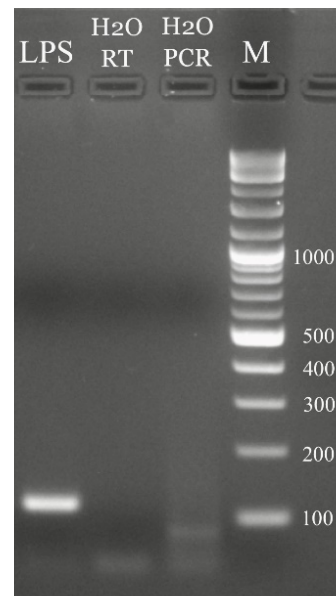


Abbildung 12: Agarosegele der qRT-PCR mit Proben aus EL-4 T-Zellen (A) und renalen Tubulusepithelzellen (RTEC) von MRL-Fas^{lpr} WT-Mäusen (B) unter Verwendung von CXCL3-Primervariante 2

Dargestellt sind die Bilder zweier 2 %iger Agarosegele mit den aufgetrennten Proben nach der qRT-PCR mit CXCL3-Primervariante 2. Die bei der qRT-PCR verwendeten cDNA-Proben in Abbildung A stammen aus EL-4 T-Zellen, die für 8 h mit PMA und Ionomycin (P/I) behandelt wurden. In Abbildung B wurde eine Probe (LPS) von RTEC aus MRL-Fas^{lpr} WT-Mäusen verwendet. Die RTEC sind über 24 h mit LPS stimuliert worden. Als Negativkontrollen dienen Wasserproben der entsprechenden Reversen Transkription (H₂O RT) und der qRT-PCR (H₂O PCR). Als Marker (M) wurde der 1 kb Plus DNA Ladder von New England Biolabs eingesetzt. Die Markerbanden sind mit der jeweiligen Größe in bp beschriftet.

5.3.2 Analysen einer KSRP-abhängigen Expression von CXCL3 in MRL-FAS^{lpr}-Mäusen

5.3.2.1 Renale Tubulusepithelzellen von MRL-FAS^{lpr} KSRP^{-/-}-Mäusen weisen eine erhöhte Induzierbarkeit der CXCL3-mRNA-Expression auf

Um mögliche posttranskriptionelle Regulationsmechanismen von KSRP auf die CXCL3-Expression zu untersuchen, wurden RTEC aus den Nieren von MRL-Fas^{lpr} KSRP^{+/+}- und MRL Fas^{lpr} KSRP^{-/-}-Mäusen isoliert (siehe Kapitel 4.4.1). In den MRL Fas^{lpr} KSRP^{-/-}-Mäusen wird aufgrund einer genetischen Veränderung kein KSRP-Protein mehr produziert (siehe Kapitel 2.4.2.2). Die isolierten RTEC aus beiden Mausstämmen wurden kultiviert und in Passage 2 zur Versuchsdurchführung verwendet.

Zunächst wurde die CXCL3-mRNA-Expression in den RTEC der MRL-Fas^{lpr} KSRP^{+/+}- und MRL Fas^{lpr} KSRP^{-/-}-Mäuse nach LPS-Stimulation untersucht. Unter Kontrollbedingungen zeigte sich nach 3 h kein Unterschied in der CXCL3-mRNA-Expression zwischen RTEC aus MRL-Fas^{lpr} KSRP^{+/+}-Mäusen und RTEC aus MRL Fas^{lpr} KSRP^{-/-}-Mäusen. Hingegen konnte nach einer Stimulation der RTEC für 3 h mit LPS (1 µg/ml) eine signifikant höhere Induzierbarkeit der RTEC aus MRL Fas^{lpr} KSRP^{-/-}-Mäusen festgestellt werden: Durchschnittlich war die CXCL3-mRNA-Expression in diesen Zellen um Faktor 1,6 höher als in den aus MRL-Fas^{lpr} KSRP^{+/+}-Mäusen isolierten RTEC (siehe Abbildung 13).

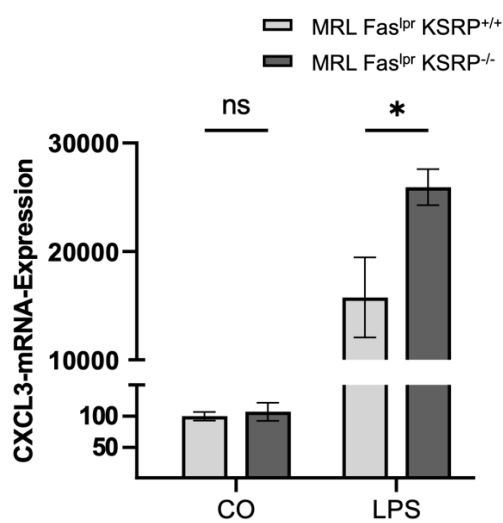


Abbildung 13: Untersuchung KSRP-abhängiger Unterschiede in der Induktion der CXCL3-mRNA-Expression in RTEC von MRL Fas^{lpr} KSRP^{-/-}-Mäusen und MRL Fas^{lpr} KSRP^{+/+}-Mäusen nach 3-stündiger Kontroll- und LPS-Behandlung

Die RTEC von MRL Fas^{lpr}-Mäusen wurden für 3 h mit LPS (1 µg/ml) behandelt. Zur Kontrolle wurde ein Teil der RTEC für den gleichen Zeitraum in Kulturmedium mit 0,5 % FCS inkubiert (CO). Die Säulen repräsentieren die Mittelwerte ± SEM der CXCL3-mRNA-Menge relativ zur gemessenen mRNA-Menge der über 3 h CO-behandelten RTEC aus MRL Fas^{lpr} KSRP^{+/+}-Mäusen aus n = 1–2 Experimenten. Die statistische Auswertung erfolgte durch unpaarte t-Tests (ns = nicht signifikant, * p < 0,05).

Zur weiteren Untersuchung KSRP-abhängiger Veränderungen der Induzierbarkeit der CXCL3-mRNA-Expression wurden die isolierten RTEC von MRL Fas^{lpr} KSRP^{-/-}-Mäusen und MRL Fas^{lpr} KSRP^{+/+}-Mäusen zunächst in 24-Lochplatten ausgesät und über 16 h inkubiert (siehe Kapitel 4.1.4). Es folgte eine Stimulation der Zellen mit LPS für 24 h (siehe Kapitel 4.1.5), wobei ein Teil der Zellen zur Kontrolle unstimuliert blieb. Nachfolgend wurde die mRNA-Expression von CXCL3 mittels qRT-PCR (siehe Kapitel 4.2.6) analysiert und auf die mRNA-Expression von TBP normiert.

Zwischen den aus MRL Fas^{lpr} KSRP^{-/-}-Mäusen und MRL Fas^{lpr} KSRP^{+/+}-Mäusen isolierten RTEC lässt sich nach 24-stündiger Inkubation ohne Behandlung mit LPS kein signifikanter Unterschied in der mRNA-Expression von CXCL3 messen (Abbildung 14). Eine Behandlung mit LPS (1 µg/ml) über 24 h geht hingegen mit einer signifikant höheren CXCL3-mRNA-Expression in den MRL Fas^{lpr} KSRP^{-/-}-Mäusen einher. In den RTEC aus MRL Fas^{lpr} KSRP^{-/-}-

Mäusen ist im Vergleich zu den RTEC aus MRL Fas^{lpr} KSRP^{+/+}-Mäusen eine 1,6-fach gesteigerte CXCL3-mRNA-Menge zu detektieren.

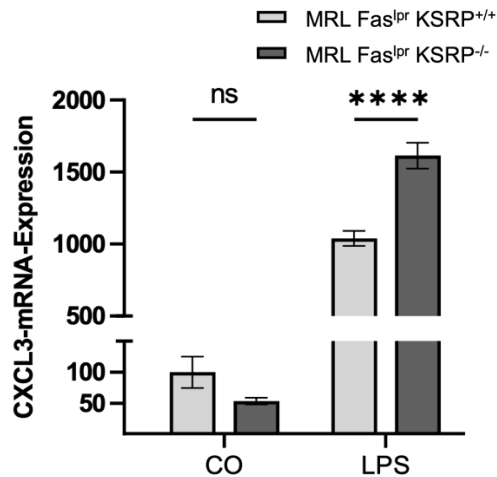


Abbildung 14: Untersuchung eines KSRP-abhängigen Unterschieds in der Induktion der CXCL3-mRNA-Expression in RTEC von MRL Fas^{lpr} KSRP^{-/-}-Mäusen und MRL Fas^{lpr} KSRP^{+/+}-Mäusen nach 24-stündiger Kontroll- und LPS-Behandlung

Die RTEC von MRL Fas^{lpr}-Mäusen wurden für 24 h mit LPS (1 µg/ml) behandelt. Zur Kontrolle wurde ein Teil der RTEC für den gleichen Zeitraum in Kulturmedium mit 0,5 % FCS inkubiert (CO). Die Säulen repräsentieren die Mittelwerte ± SEM der CXCL3-mRNA-Menge relativ zur gemessenen mRNA-Menge der über 24 h CO-behandelten RTEC aus MRL Fas^{lpr} KSRP^{+/+}-Mäusen aus n = 2 Experimenten. Die statistische Auswertung erfolgte durch ungepaarte t-Tests (ns = nicht signifikant; **** p < 0,0001).

Insgesamt liefern die Daten aus der Untersuchung zur KSRP-abhängigen Induzierbarkeit der CXCL3-Expression in RTEC Hinweise darauf, dass KSRP unter proinflammatorischen Bedingungen die Expression von CXCL3 negativ beeinflussen kann.

5.3.2.2 Analysen der Regulation der CXCL3-mRNA-Stabilität in renalen Tubulusepithelzellen von MRL-Fas^{lpr} KSRP^{-/-}-Mäusen im Vergleich zu MRL-Fas^{lpr} KSRP^{+/+}-Mäusen

In Kapitel 2.2.2 wurde die Vermittlung eines beschleunigten Zerfalls ARE-haltiger Transkripte als eine der am besten charakterisierten Funktionen von KSRP beschrieben. Im Rahmen dieser Versuchsreihe sollte untersucht werden, ob KSRP an der Regulation der Stabilität der CXCL3-mRNA, die nachweislich ARE in ihrer 3'UTR enthält (Winzen et al., 2007), in RTEC beteiligt ist. Zur Untersuchung einer KSRP-abhängigen Regulation der CXCL3-Expression wurden RTEC aus den Nieren von MRL Fas^{lpr} KSRP^{+/+}- und MRL Fas^{lpr} KSRP^{-/-}-Mäusen isoliert und in Passage 2 16 Stunden vor Versuchsbeginn in 24-Lochplatten ausgesät und inkubiert (siehe Kapitel 4.1.4). Es folgte eine Stimulation der Zellen mit bakteriellem Lipopolysaccharid (LPS) für 3 h (siehe Kapitel 4.1.5). Im Anschluss wurden die Zellen für 0, 1, 2 und 4 h mit DRB behandelt (siehe Kapitel 4.1.6). In qRT-PCR-Analysen wurden die CXCL3-mRNA-Mengen der Zellen untersucht und auf die mRNA-Menge von Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) normiert (siehe Kapitel 4.2.6). Zur Kontrolle der Abbauanalysen von CXCL3

wurden zusätzlich die mRNA-Mengen von CXCL1 mitbestimmt. Für CXCL1 als weiteres Mitglied der GRO-Chemokinfamilie wurde in der Literatur bereits eine posttranskriptionelle Regulierung des mRNA-Abbaus durch KSRP und TTP beschrieben (Bollmann et al., 2014; Datta et al., 2008).

Wie in Abbildung 13 bereits dargestellt, konnte 3 h nach der LPS Stimulation, also zum Zeitpunkt der Zugabe von DRB, in den MRL Fas^{lpr} KSRP^{-/-}-RTEC eine 1,6-fache CXCL3-Expression im Vergleich zu den RTEC aus WT-Mäusen festgestellt werden.

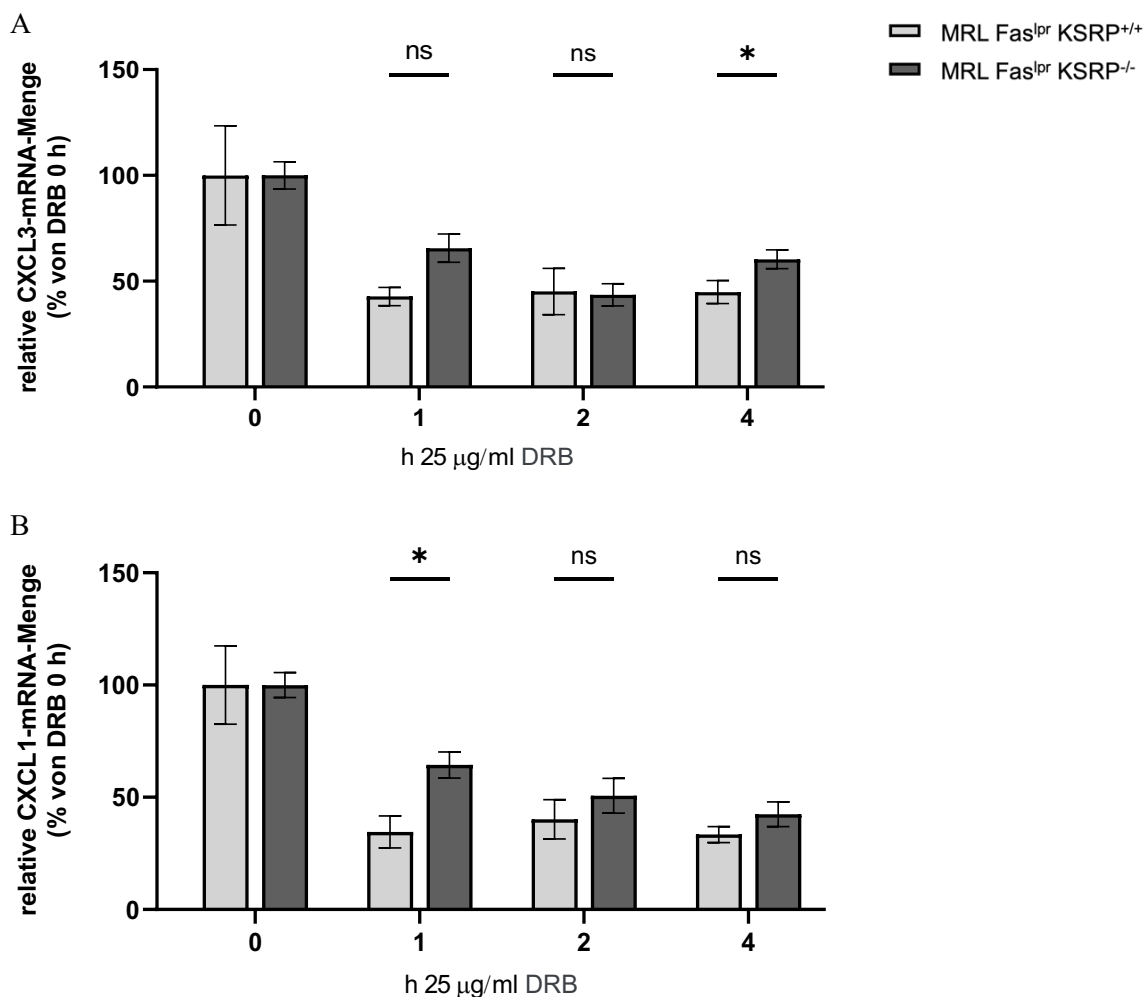


Abbildung 15: mRNA-Stabilitätsanalysen von CXCL3 (A) und CXCL1 (B) in RTEC von MRL Fas^{lpr} KSRP^{+/+}- und MRL Fas^{lpr} KSRP^{-/-}-Mäusen mittels Behandlung mit DRB zum Zeitpunkt 0 h Die für 3 h mit LPS (1 µg/ml) stimulierten RTEC von MRL Fas^{lpr} KSRP^{+/+}- und MRL Fas^{lpr} KSRP^{-/-}-Mäusen wurden für 0 h, 1 h, 2 h und 4 h mit 25 µg/ml DRB inkubiert. Nach der Zellyse mit GIT-Puffer und der RNA-Isolation wurden die mRNA-Expressionen von CXCL3 und CXCL1 mittels qRT-PCR bestimmt. Die relativen mRNA-Expressionen vor der Behandlung mit DRB (Zeitpunkt 0 h) wurden jeweils auf 100 % gesetzt und die gemessenen mRNA-Mengen wurden auf die zum Zeitpunkt 0 h bestimmte mRNA-Menge bezogen. Abgebildet ist die Auswertung der qRT-PCR-Analysen aus n = 1–2 Experimenten. Die Säulen repräsentieren die Mittelwerte ± SEM der bestimmten mRNA-Mengen. Die statistische Auswertung erfolgte durch ungepaarte t-Tests (ns = nicht signifikant, * p < 0,05).

In Abbildung 15 sind die detektierten mRNA-Mengen von CXCL3 und CXCL1 nach der DRB-Zugabe zum Zeitpunkt 0 h graphisch dargestellt. Nach der einstündigen Behandlung mit DRB

geht aus Abbildung 15 A ein deutlicher Rückgang der CXCL3-mRNA-Menge um ca. die Hälfte der Ausgangsmenge bei beiden Genotypen hervor. Es lassen sich zunächst keine genotypspezifischen Unterschiede erkennen. Bereits nach einer DRB-Behandlung über 1–2 h lassen sich bei beiden MRL Fas^{lpr}-Mauslinien nur noch geringe Veränderungen der mRNA-Mengen erkennen. Nach der 4-stündigen DRB-Behandlung sind leicht höhere mRNA-Mengen in RTEC von MRL Fas^{lpr} KSRP^{-/-} im Vergleich zu MRL Fas^{lpr} KSRP^{+/+}-Mäusen bestimmt worden. Dies könnte ein Hinweis auf einen langsameren Abbau von CXCL3-mRNA in KSRP-defizienten Zellen sein.

Aus den Daten in Abbildung 15 B gehen die detektierten mRNA-Mengen von CXCL1 hervor. Hier lässt sich ebenfalls ein deutlicher Rückgang der mRNA-Menge nach der DRB-Behandlung über eine Stunde ablesen. Jedoch ist nach der einstündigen Behandlung eine signifikant höhere mRNA-Menge von CXCL1 in RTEC von MRL Fas^{lpr} KSRP^{-/-}-Mäusen bestimmt worden. Dies deutet auf einen durch KSRP-vermittelten, langsameren CXCL1-mRNA-Abbau in RTEC hin. Ab einer DRB-Behandlung über 2 h ist keine Fortsetzung des mRNA-Abbaus mehr erkennbar. Insgesamt liefern die Daten der mRNA-Abbauanalysen erste Hinweise auf einen möglichen destabilisierenden Effekt von KSRP auf die CXCL3-mRNA-Stabilität unter proinflammatorischen Bedingungen.

5.3.3 Analysen einer KSRP-abhängigen Expression von CXCL3 in C57BL/6-Mäusen

5.3.3.1 Renale Tubulusepithelzellen von C57BL/6 KSRP^{-/-}-Mäusen weisen eine erhöhte Induzierbarkeit der CXCL3-mRNA-Expression auf

Nachdem in MRL-Fas^{lpr}-Mäusen KSRP-abhängige Unterschiede in der CXCL3-mRNA-Expression von RTEC beobachtet werden konnten (siehe Kapitel 5.3.2.1), sollte die Induzierbarkeit von RTEC in der Mauslinie C57BL/6 überprüft werden. Die RTEC wurden aus den Nieren von C57BL/6 KSRP^{+/+}- und C57BL/6 KSRP^{-/-}-Mäusen (siehe Kapitel 2.4.2.1) isoliert und anschließend kultiviert. In Passage 2 wurden die RTEC in 24-Lochplatten ausgesät und für 16 h inkubiert (siehe Kapitel 4.1.4). Die anschließende Stimulation erfolgte für 6 und 24 h mit LPS (1 µg/ml). Die durch qRT-PCR-Analysen bestimmten CXCL3-mRNA-Expressionen wurden auf die Expression von TBP normiert (siehe Kapitel 4.2.6).

Die Daten der mRNA-Expression von RTEC aus C57BL/6-Mäusen (siehe Abbildung 16) lassen nach Kontrollbehandlungen für 6 und 24 h verminderte CXCL3-mRNA-Expressionen in

den aus C57BL/6 KSRP^{-/-}-Mäusen isolierten RTEC erkennen. Die CXCL-3-mRNA-Expressionen sind in RTEC von C57BL/6 KSRP^{-/-}-Mäusen jeweils ca. um 40 % reduziert.

Eine Stimulation der RTEC über 6 h mit LPS geht mit einer um Faktor 0,8 signifikant verminderten CXCL3-mRNA-Menge in RTEC von C57BL/6 KSRP^{-/-}-Mäusen einher. Ein umgekehrter Effekt durch die verminderte KSRP-Expression ist hingegen nach einer LPS-Stimulation über 24 h feststellbar: RTEC aus C57BL/6 KSRP^{-/-}-Mäusen zeigen hier eine um Faktor 1,5 signifikant gesteigerte CXCL3-mRNA-Expression im Vergleich zu den Kontrollzellen.

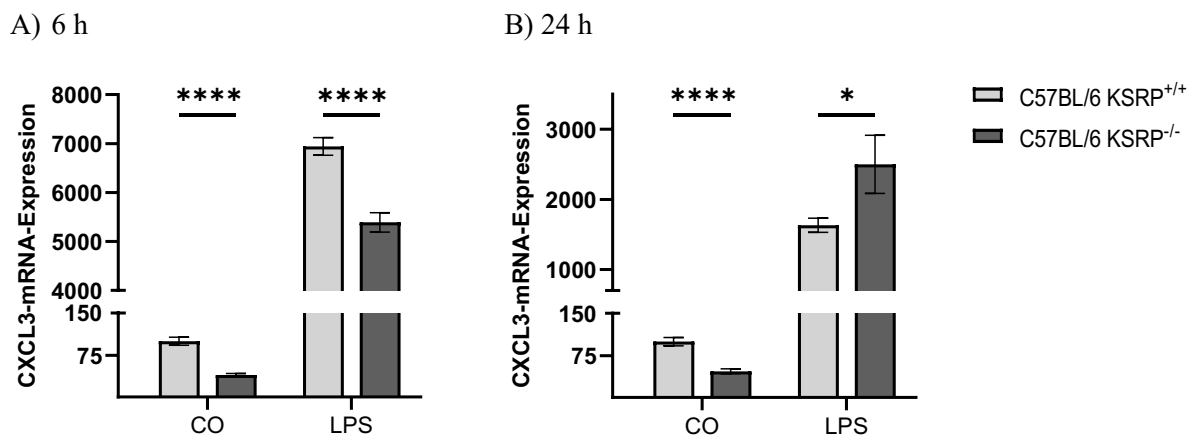


Abbildung 16: Untersuchung eines KSRP-abhängigen Unterschieds in der Induktion der CXCL3-mRNA-Expression in RTEC von C57BL/6 KSRP^{-/-} im Vergleich zu C57BL/6 KSRP^{+/+}-Mäusen. Die RTEC aus C57BL/6-Mäusen wurden für 6 h (A) und 24 h (B) mit LPS (1 µg/ml) behandelt. Zur Kontrolle blieb ein Teil der RTEC über dieselben Zeiträume unbehandelt (CO). Die Säulen repräsentieren die Mittelwerte ± SEM der CXCL3-mRNA-Mengen relativ zur gemessenen mRNA-Menge der unbehandelten C57BL/6 KSRP^{-/-} aus n = 2 Experimenten. Die statistische Auswertung erfolgte durch ungepaarte t-Tests (* p < 0,05; **** p < 0,0001).

5.3.3.2 Analysen der Induktion der mRNA-Expression von CXCL3 in Peritonealzellen von C57BL/6 KSRP^{-/-} im Vergleich zu C57BL/6 KSRP^{+/+}-Mäusen

Neben den RTEC sollte untersucht werden, ob mit Peritonealzellen ein weiteres zelluläres Testsystem für die Untersuchung eines möglichen Einflusses von KSRP auf die CXCL-3 Expression etabliert werden kann. Im Rahmen dieser Versuchsreihe wurde daher der Einfluss von KSRP auf die Induktion der CXCL3-mRNA-Expression in Peritonealzellen von C57BL/6-Mäusen (siehe Kapitel 2.4) untersucht. Bei den aus dem Peritoneum isolierten Zellen handelt es sich überwiegend um Makrophagen. Aber auch andere Immunzellen, wie B- und T-Zellen, sind Teil des Zellgemisches (Ray & Dittel, 2010). Die Peritonealzellen wurden wie in Kapitel 4.4.2 aufgeführt aus dem Bauchraum der Versuchstiere isoliert. Es wurden die Peritonealzellen von jeweils zwei C57BL/6-Weibchen und zwei C57BL/6-Männchen pro Genotyp und Behand-

lung (CO und CM) untersucht. Zunächst wurden die isolierten Peritonealzellen in 24-Lochplatten ausgesät und für 2 h inkubiert (siehe Kapitel 4.1.4). Es folgte eine Behandlung der Zellen mit LPS (1 µg/ml) und INF-γ (0,3 mg/ml) und eine anschließende Inkubation für 6 und 24 h. Zur Kontrolle blieb ein Teil der Zellen über diese Zeiträume unbehandelt. Die Peritonealzellen wurden mit GIT-Puffer (siehe Tabelle 4) lysiert und die RNA aus den Zellen isoliert. Normiert auf die Expression des Haushaltsgens 18S wurde in qRT-PCR-Analysen die mRNA-Expressionen von CXCL3 bestimmt (siehe Kapitel 4.2.6).

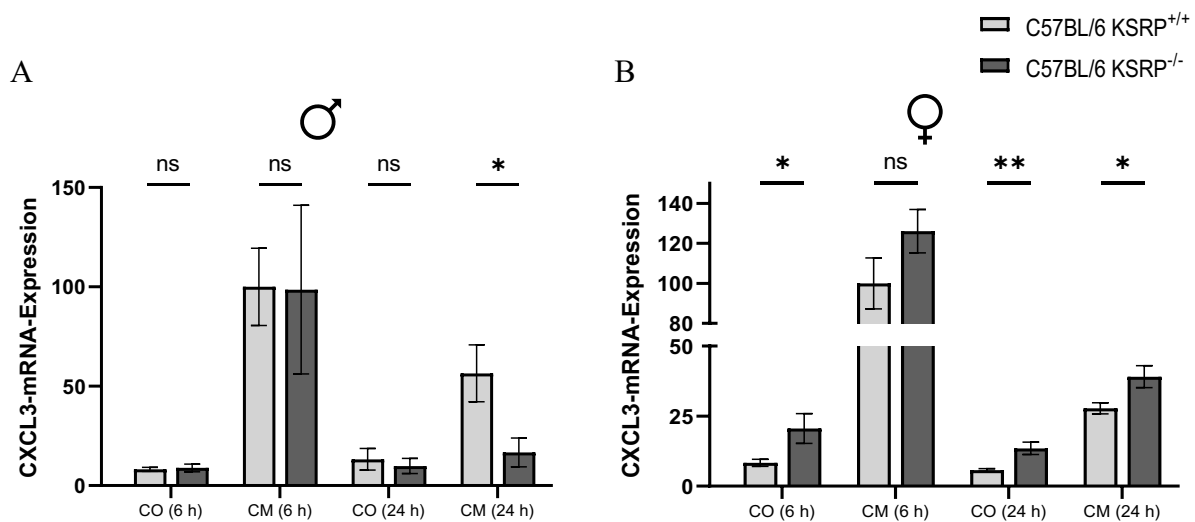


Abbildung 17: Untersuchungen der Induktion der mRNA-Expression von CXCL3 in Peritonealzellen von C57BL/6 KSRP^{+/+}- im Vergleich zu C57BL/6 KSRP^{-/-}-Mäusen Die aus C57BL/6-Mäusen isolierten Peritonealzellen wurden für 6 und 24 h mit LPS (1 µg/ml) und INF-γ (0,3 µg/ml) (CM) inkubiert. Zur Kontrolle blieb ein Teil der Zellen über dieselben Zeiträume unbehandelt (CO). Die Säulen repräsentieren die Mittelwerte ± SEM der CXCL3-mRNA-Menge relativ zur gemessenen mRNA-Menge der über 6 h CM-behandelten C57BL/6 KSRP^{+/+}-Mäuse aus n = 2 Experimenten. In Abbildung A) sind die Daten der C57BL/6-Männchen und in Abbildung B) die Daten der C57BL/6-Weibchen dargestellt. Die statistische Auswertung erfolgte durch ungepaarte t-Tests (ns = nicht signifikant; * p < 0,05; ** p < 0,01).

Aus Abbildung 17 lassen sich geschlechtsspezifische Unterschiede im Einfluss von KSRP auf die mRNA-Expression von CXCL3 in den Peritonealzellen von C57BL/6-Mäusen erkennen. Die Untersuchung der mRNA-Induktion in Peritonealzellen männlicher C57BL/6-Mäuse (siehe Abbildung 17 A) zeigt keine Genotyp-spezifischen Unterschiede bei den über 6 h und 24 h unbehandelten Zellen sowie bei der Behandlung der Zellen über 6 h mit LPS und INF-γ. Die Daten zur Behandlung mit LPS und INF-γ über einen Zeitraum von 24 h lassen hingegen eine um Faktor 3 signifikant verminderte CXCL3-mRNA-Expression in Peritonealzellen von männlichen C57BL/6 KSRP^{-/-}-Mäusen erkennen. Im Gegensatz dazu wurden bei den weiblichen Versuchstieren deutliche Genotyp-spezifische Unterschiede in der mRNA-Expression von CXCL3 festgestellt (siehe Abbildung 17 B): In den für 6 und 24 h unbehandelten Peritonealzellen wurde eine signifikant um Faktor 2,4 bzw. 2,5 verstärkte CXCL3-mRNA-Expression in

Peritonealzellen aus C57BL/6 KSRP^{-/-}-Mäusen gemessen. Auch eine 6-stündige Behandlung mit LPS und INF- γ führte zu einer durchschnittlich um 26 % gesteigerten CXCL3-mRNA-Expression in den KSRP-depletierten Peritonealzellen im Vergleich zu den WT-Peritonealzellen, wobei keine statistische Signifikanz vorlag. Die Aktivierung der Peritonealzellen mit LPS und INF- γ über 24 h ging ebenfalls mit erhöhten Mengen an CXCL3-mRNA in den Peritonealzellen von weiblichen C57BL/6 KSRP^{-/-}-Mäusen einher. Die CXCL3-mRNA-Expression war hier signifikant um Faktor 1,4 erhöht.

Insgesamt lässt sich aus den Daten erkennen, dass ein KSRP-knockout in weiblichen C57BL/6-Mäusen mit erhöhten CXCL3-mRNA-Expressionen einhergeht, während dieser Effekt in männlichen Versuchstieren nicht zu beobachten ist.

6 Diskussion

6.1 Analyse einer Regulation der IL-17A-Expression durch KSRP in murinen EL-4 T-Zellen

6.1.1 KSRP hat keinen negativ regulatorischen Einfluss auf die IL-17A-mRNA-Expression in stimulierten EL-4 T-Zellen

KSRP reguliert als RNA-BP nachweislich die Expressionen zahlreicher Entzündungsmediatoren auf verschiedenen Ebenen der Genexpression. Zur Regulation des proinflammatorischen Cytokins IL-17A durch KSRP gehen aus der Literatur bisher wenige Studien an humanen Myelom-, Epithel- und Lungenzellen hervor (siehe Anhang, Tabelle 23). In kürzlich durchgeführten RNA-Seq-Analysen der AG Pautz/Kleinert wurde in polyklonal (CD3/CD8) stimulierten T-Lymphocyten aus C57BL6 KSRP^{-/-}-Mäusen eine ca. 2,3-fach erhöhte IL-17A-mRNA-Expression im Vergleich zu T-Lymphocyten aus Wildtyp-Mäusen bestimmt (siehe Anhang, Tabelle 23). Da der FDR-Wert dieser Daten jedoch größer als 0,05 ist, sind die Daten statistisch nicht signifikant. Zudem wurden in unveröffentlichten CBA-Analysen von Frau Nina Kuhlmann (siehe Kapitel 2.3.3.2) in EL-4 T-Zellen mit reduzierter KSRP-Expression (EL-4 siKSRP) nach Stimulation mit PMA und Ionomycin über 24 h erhöhte IL-17A-Proteinlevel im Vergleich zu den Kontrollzellen (EL-4 Co) festgestellt. Ausgehend von diesen Daten erfolgten nun im Rahmen der vorliegenden Arbeit weitere Analysen an EL-4 T-Zellen zum Einfluss von KSRP auf die IL-17A-Expression.

Im ersten Schritt wurde der Einfluss von KSRP auf die mRNA-Expression von IL-17A in murinen EL-4 T-Zellen mit verminderter Expression von KSRP (EL-4 siKSRP) oder entsprechenden Kontrollzellen (EL-4 Co) untersucht. Wie in Abbildung 3 dargestellt ist, führte die PMA/Ionomycin-Stimulation dieser Zellen zu einem kontinuierlichen Anstieg der IL-17A-mRNA-Expression. Dies bedeutet, dass EL-4 T-Zellen in der Lage sind, IL-17A-mRNA zu exprimieren. Darüber hinaus zeigen die Ergebnisse der Abbildung 3, dass nach der PMA/Ionomycin-Stimulation in den EL-4 siKSRP T-Zellen im zeitlichen Verlauf verminderte IL-17A-mRNA-Level im Vergleich zu den EL-4 Co T-Zellen gemessen wurden. Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass KSRP in PMA/Ionomycin-stimulierten EL-4 T-Zellen eine positiv regulatorische Funktion für die IL-17A-mRNA-Expression hat. In der Literatur wird KSRP als überwiegend negativer Regulator proinflammatorischer Cytokine beschrieben (siehe Kapitel 2.2.2), der häufig über eine Modulation der mRNA-Stabilität zu einer Verringerung der Expression führt. Diese Hypothese scheint auf die PMA/Ionomycin-induzierte IL-17A-mRNA-Expression

allerdings nicht zuzutreffen. Gründe hierfür könnten sein, dass die aus der Literatur stammenden Daten vorwiegend nicht in T-Zellen, sondern in HeLa-Zellen, neuronalen Zellen und Zellen epithelialen Ursprungs erhoben wurden (siehe Anhang, Tabelle 23). Daher kann zum jetzigen Zeitpunkt nicht ausgeschlossen werden, dass in Immunzellen und insbesondere in T-Zellen andere KSRP-vermittelte Mechanismen zum Tragen kommen als in Nicht-Immunzellen. Die Daten in Abbildung 3 unterstützen auf den ersten Blick nicht die oben genannten Ergebnisse aus den RNA-Seq-Analysen primärer T-Zellen. Allerdings war bei diesen RNA-Seq Analysen der Fehler relativ groß, weshalb nicht abschließend beurteilt werden kann, ob sich diese Ergebnisse in Wiederholungsexperimenten verifizieren lassen. Anzumerken ist, dass in der Literatur durchaus Daten anderer totalgenomischer Analysen zu finden sind, deren Ergebnisse ebenfalls von den RNA-Seq-Analysen der AG Pautz/Kleinert abweichen: Okholm et al. (2020) führten RNA-Seq-Analysen an humanen K562-Myelomazellen durch (Bioproject PRJNA608915) und stellten eine signifikant verminderte IL-17A-Expression in siKSRP-behandelten K562-Myelomazellen fest (siehe Anhang, Tabelle 23). Auch aus den Daten von Fujita et al. (2017) zu Untersuchungen an humanen Epithelzellen (Bioprojekt PRJNA388429) geht eine reduzierte IL-17A-Expression in siKSRP-behandelten Zellen hervor (siehe Anhang, Tabelle 23). Zwar ist der genaue Mechanismus dieser Regulation nicht bekannt, allerdings liefern die Daten von Okholm et al. (2020) und Fujita et al. (2017) Hinweise darauf, dass KSRP die Expression mancher proinflammatorischer Gene fördern könnte und nicht als rein negativer Regulator der proinflammatorischen Genexpression verstanden werden sollte.

Die möglichen Abweichungen in den Befunden aus den RNA-Seq-Analysen der AG Pautz/Kleinert und den hier präsentierten Befunden aus EL-4 T-Zellen könnten in den Unterschieden der verwendeten Zellen und der Versuchsdurchführung begründet sein: Die AG Pautz/Kleinert untersuchte die IL-17A-Expression in primären T-Zellen, die aus den Milzen von C57BL6 KSRP^{-/-}-Mäusen und Wildtyptieren isoliert wurden. Bei diesen Zellen handelt es sich um immunkompetente, naive CD4⁺ T-Zellen. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden die IL-17A-mRNA-Expressionen hingegen an der T-Zellkulturlinie EL-4 untersucht. Die verwendeten EL-4 Zellen sind immortalisierte CD4⁺ T-Zellen, die sich durch ihre Tumoreigenschaften in ihrem Verhalten von primären T Zellen unterscheiden können. Prinzipiell werden CD4⁺ T-Zellen je nach zellulären Eigenschaften in verschiedene Gruppen von T-Helferzellen unterteilt, die durch ein spezifisches Cytokin-Expressionsmuster charakterisiert sind: Während Th1-Zellen verstärkt INF- γ sezernieren, sind Th2-Zellen durch ihre Freisetzung von IL-4, IL-5 und IL-13 gekennzeichnet. Th17-Zellen sind entsprechend ihrer Bezeichnung durch eine Expression von IL-17 charakterisiert (Zhu & Zhu, 2020). Die EL-4 T-Zellen zeigen eine deutliche

Expression der IL-17-mRNA, was dafür spricht, dass sie gewisse Eigenschaften von Th17-Zellen besitzen könnten. Wahrscheinlich handelt es sich aber nicht um typische/klassische Th17-Zellen, da sie nach der PMA/Ionomycin-Stimulation auch andere Cytokine, wie IL-5 und IL-13, exprimieren (unveröffentlichte Daten der AG Pautz), die eher typisch für Th2-Zellen sind. Somit ist es schwierig, die Zellen anhand des Cytokinmusters eindeutig einer Th-Zellpopulation zuzuordnen. Dies könnte ein weiterer Grund für die zunächst unerwarteten Befunde der IL-17-mRNA Expression in EL-4 siKSRP sein.

Ein anderer möglicher Grund für die abweichenden Ergebnisse zwischen der RNA-Seq-Analyse und den Analysen an den EL-4 T-Zellen könnte die Aktivierung der Zellen mit unterschiedlichen Stimulantien sein. Die AG Pautz/Kleinert wählte eine 24-stündige, polyklonale Stimulation der primären T-Zellen mit anti-CD3 und anti-CD28. Die EL-4 T-Zellen wurden hingegen über Zeiträume von 2 bis 24 h mit PMA und Ionomycin stimuliert. Die Behandlung mit PMA und Ionomycin führte zu einer eindeutigen Induktion der IL-17A-mRNA-Expression in den EL-4 T-Zellen. Die Signalwege, die zur Induktion der IL-17A-mRNA Expression führen, sind möglicherweise nicht komplett identisch. Weil die Stimulation des T-Zellrezeptors wie Ionomycin zum Kalziumeinstrom führt und PMA wie CD28 die Proteinkinase C stimuliert, sollten die nachgeschalteten Signale aber sehr ähnlich sein. In zukünftigen Untersuchungen könnte überprüft werden, ob T-Zellen der EL-4 Zellkulturlinie mit CD3/CD28 stimulierbar sind und der KSRP-abhängige Effekt auf die IL-17A-Expression gleich bleibt.

Außerdem könnten längere Stimulationszeiträume getestet werden. In der Literatur variieren die Stimulationszeiträume ähnlicher Versuche zwischen 24 h bis hin zu 5 Tagen: Beispielsweise untersuchten Lee et al. (2012) in der humanen T-Zelllinie HuT 102 eine Regulation der IL-17A-Expression durch das RNA-BP Tristetrapolin (TTP). Zur Stimulation der humanen T-Zellen wählten Lee et al. eine Behandlung der Zellen mit anti-CD3 und anti-CD28 für 24 und 48 h (H. H. Lee et al., 2012). In einer weiteren Studie von Chen et al. (2013) wurden Analysen zur IL-17-Expression in Mäusen mit einer Defizienz des RNA-BP *Human antigen R* (HuR) und Wildtypmäusen durchgeführt. In vergleichenden Experimenten wurden die aus den Milzen isolierten, naiven CD4⁺ T-Zellen zur Aktivierung über 3, 4 und 5 Tage mit anti-CD3 und anti-CD28 behandelt (J. Chen et al., 2013).

In zukünftigen Folgeexperimenten zur Analyse einer KSRP-abhängigen IL-17A-mRNA-Expression sollte getestet werden, ob primäre T-Zellen oder die hier verwendete EL-4 Zellkulturlinie geeigneter sind. Die EL-4 T-Zellen als eine immortalisierte Zelllinie haben den Vorteil, dass im Gegensatz zu primären T-Zellen keine wiederholten Isolationen der Zellen erforderlich

sind. Durch diese einfachere Versuchsdurchführung sind die EL-4 T-Zellen zur molekularbiologischen Untersuchung KSRP-vermittelter Effekte sehr interessant. Darüber hinaus sind die molekularbiologischen Analysen an primären T-Zellen deutlich komplexer. Zum Beispiel müssten zur Untersuchung KSRP-abhängiger Genregulationsmechanismen Reportergene eingesetzt werden. Auch die für die Reportergenanalysen benötigten Transfektionsversuche sind in Primärzellen deutlich schwieriger durchzuführen als in der etablierten Zelllinie.

Ein weiterer interessanter Ansatz zur Untersuchung der IL-17-Expression wäre die Polarisierung von T-Zellen zu Th17-Zellen. Es ist bekannt, dass sich primäre T-Zellen durch die Zugabe folgender Cytokine und Antikörper zu Th17-Zellen differenzieren lassen: IL-6 50 ng/mL (PeproTech), TGF- β 1 ng/mL (PeproTech), IL-23 20 ng/mL (PeproTech), anti-IL-4 10 μ g/mL (11B11; BD) und anti-IFN- γ 10 μ g/mL (XMG1.2; BD) (Peng et al., 2020). Durch die Polarisierung werden vorhandene Effekte, die man in primären T-Zellen gesehen hat, verstärkt (J. Chen et al., 2013). Es ist unklar, ob ein Effekt dadurch völlig umgekehrt wird. Zudem ist nicht bekannt, ob eine Th17-Polarisierung mit EL-4 T-Zellen möglich ist. Man könnte testen, ob durch eine Polarisierung ein eindeutigerer Phänotyp entsteht und dieser einen Einfluss auf die KSRP-vermittelte IL-17-mRNA-Produktion hat.

Insgesamt gehen aus der oben genannten Versuchsreihe zur Untersuchung einer KSRP-abhängigen IL-17A-mRNA-Expression keine Ergebnisse hervor, die mit den in den CBA-Analysen gemessenen erhöhten IL-17A-Proteinmengen in EL-4 siKSRP T-Zellen vereinbar sind. Möglicherweise liegen also nachgeschaltete posttranskriptionelle, translationale oder posttranslationale Regulationsmechanismen zugrunde, was im Folgenden weiter untersucht wurde.

6.1.2 KSRP bewirkt keine Destabilisierung der IL-17A-mRNA in stimulierten EL-4 T-Zellen

Bei den in Kapitel 6.1.1 beschriebenen KSRP-abhängigen Unterschieden der IL-17-Expression in T-Zellen ist unklar, ob es sich um einen direkten oder indirekten Effekt von KSRP handelt. Es ist bekannt, dass KSRP die Genexpression einiger Entzündungsmediatoren über die Regulation der posttranskriptionellen mRNA-Stabilität beeinflusst (Kapitel 2.2.2). Um festzustellen, ob auch IL-17 über die posttranskriptionelle mRNA-Stabilität durch KSRP reguliert wird, wurden mRNA-Stabilitätsanalysen durchgeführt (siehe Abbildung 5). Dazu wurden die EL-4 T-Zellen mit DRB, einem Transkriptionsinhibitor, behandelt und die IL-17A-mRNA-Mengen kontinuierlich bis zu 6 h nach Beginn der DRB-Behandlung gemessen. Zur Kontrolle wurde parallel der mRNA-Abbau von TNF- α untersucht. Für TNF- α konnte innerhalb der ersten 1,5

h nach der DRB-Behandlung ein rascher Rückgang der mRNA-Mengen verzeichnet werden. Dies beweist, dass ein Transkriptionsstopp durch DRB stattgefunden hat. Erstaunlicherweise ließ sich über den Beobachtungszeitraum von 6 h kein deutlicher Rückgang der IL-17A-mRNA-Level erkennen. Zudem konnte weder für TNF- α noch für IL-17A ein Einfluss von KSRP auf die mRNA-Stabilität festgestellt werden.

Für zukünftige Analysen der IL-17A-mRNA-Stabilität in EL-4 T-Zellen sollten die IL-17-mRNA-Mengen über mehr als 6 h nach Transkriptionsstopp bestimmt werden, um den Abbau der mRNA untersuchen zu können. Möglicherweise können damit KSRP-abhängige Unterschiede in der IL-17-mRNA-Stabilität beobachtet werden, die mit einem Beobachtungszeitraum über 6 h nicht detektiert werden konnten.

Aus der Literatur gehen andere mRNA-Stabilitätsanalysen von IL-17A und TNF- α hervor, deren Ergebnisse z.T. von den oben präsentierten abweichen: Bollmann et al. (2014) stellten in mRNA-Abbauanalysen an humanen Kolorektalen Adenokarzinomzellen (DLD-1 Zellen) signifikant erhöhte TNF- α -mRNA-Level in DLD-1 siKSRP Zellen im Vergleich zu DLD-1 Kontrollzellen fest (Bollmann et al., 2014). Dies deutet auf eine Destabilisierung der TNF- α -mRNA durch KSRP in DLD-1 Zellen hin. Dieser Befund steht in Widerspruch zu den Stabilitätsanalysen in den EL-4 T-Zellen. Jedoch ist zu beachten, dass diese Ergebnisse nur bedingt vergleichbar sind, da die Analysen in unterschiedlichen Zellsystemen vorgenommen wurden. Zur Stabilitätsanalyse der IL-17A-mRNA finden sich ebenfalls veröffentlichte Daten: Lee et al. (2012) untersuchten in der humanen T-Zelllinie HuT 102 eine Regulation der IL-17A-Expression durch das RNA-BP Tristetrapolin (TTP). Vergleichbar zu KSRP wird auch TTP in der Literatur als überwiegend negativer Regulator einiger Entzündungsmediatoren beschrieben (Sanduja et al., 2012). Lee et al. analysierten die IL-17A-mRNA-Stabilität vergleichend in HuT 102 mit einer unveränderten TTP-Expression und HuT 102, die nach Transfektion mittels eines Vektorkonstrukts eine TTP-Überexpression aufwiesen. Nach einer 2-stündigen Behandlung mit Actinomycin D, das wie DRB die Transkription in den T-Zellen hemmt, wurde in den HuT 102 mit TTP-Überexpression eine signifikant verminderte IL-17A-mRNA-Halbwertszeit im Vergleich zu den Kontrollzellen bestimmt. Darüber hinaus konnten Lee et al. ein ARE-Cluster innerhalb der 3'-UTR der IL-17A-mRNA identifizieren, das eine direkte Interaktion zwischen TTP und der IL-17A-mRNA vermittelt. Die Untersuchungen von Lee et al. zeigen insgesamt einen ARE-vermittelten, destabilisierenden Effekt von TTP auf die IL-17A-mRNA (H. H. Lee et al., 2012). Mit diesem Befund stimmen die IL-17A-mRNA-Stabilitätsanalysen von Peng et

al. in Th17-Zellen überein: In Th17-Zellen aus TTP-depletierten Mäusen wurde eine ca. dreifach erhöhte Halbwertszeit der IL-17A-mRNA gemessen. Klinisch führte die Depletion des RNA-BP zu chronischen Hautentzündungen und einer Zunahme von Th17-Zellen in den betroffenen Hautarealen (Peng et al., 2020).

Ein weiteres RNA-BP, für das eine regulatorische Funktion in der IL-17-Expression dargelegt werden konnte, ist das *Human antigen R* (HuR). Im Gegensatz zu KSRP und TTP scheint HuR ein überwiegend positiver Regulator einiger proinflammatorischer Cytokine zu sein. Bisher wurde u.a. eine ARE-vermittelte mRNA-Stabilisierung der Cytokine IL-4, IL-13 und TNF- α durch HuR beschrieben (Casolaro et al., 2008; Dan et al., 2015; Yarovinsky et al., 2006). Chen et al. analysierten im Rahmen von Untersuchungen zur autoimmunen Enzephalomyelitis eine Regulation der IL-17A-mRNA-Expression und -Stabilität durch HuR in Th17-Zellen. Übereinstimmend mit der bekannten regulatorischen Funktion von HuR ging in Th17-Zellen mit verminderter HuR-Expression eine herabregulierte IL-17A-mRNA-Expression einher. Zudem konnte eine signifikant verminderte IL-17-mRNA-Stabilität in Th17-Zellen mit reduzierter HuR-Expression bestimmt werden. Mittels Pulldown-Analysen wurde außerdem gezeigt, dass HuR direkt an die 3'-UTR der IL-17-mRNA bindet (J. Chen et al., 2013).

Die in den oben genannten Analysen gezeigten Einflüsse von TTP und HuR auf die IL-17-mRNA-Stabilität steht in Kontrast zum hier bestimmten, scheinbar fehlenden Einfluss von KSRP auf den Abbau der IL-17A-mRNA in EL-4 T-Zellen. Es ist allerdings bekannt, dass die Expression und Stabilität einzelner Transkripte nicht allein durch *ein* RNA-BP, sondern meist durch ein Zusammenwirken verschiedener RNA-BP als sogenannter Ribonukleokomplex bestimmt wird. Dabei können stabilisierend und destabilisierend wirkende RNA-BP um eine Bindestelle an einem Transkript konkurrieren. Zudem kann die Bindung eines RNA-BP die Rekrutierung anderer RNA-BP auslösen oder verhindern. Die Stabilität eines Transkripts wird also durch ein dynamisches Netzwerk aus RNA-BP und anderen Faktoren reguliert (Akira & Maeda, 2021; Gerstberger et al., 2014). Somit erscheinen Studien, die nicht nur die Regulation durch einzelne RNA-BP, sondern auch den (kombinierten) Einfluss mehrerer RNA-BP betrachten, für das Verständnis der Genexpression relevant. In einer Studie zur Untersuchung der diabetischen Nephropathie wurden die Rollen von TTP und HuR in der posttranskriptionellen Regulation der IL-17-Expression in Podozyten untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass die beiden RNA-BP gegensätzliche Wirkung auf die mRNA-Stabilität und Expression von IL-17A haben und über die Balance zwischen beiden RNA-BP die Pathogenese der diabetischen Nephropathie

(Podozytenschädigung, Inflammation) moduliert wird. Interessanterweise wurde in dieser Studie festgestellt, dass es unter hyperglykämischen Bedingungen zu einer Phosphorylierung beider RNA-BP kommt. Es wurde vermutet, dass durch die Phosphorylierungen die Affinität von TTP an die IL-17A-mRNA vermindert und die Affinität von HuR gesteigert werden. Durch diese Gleichgewichtsverschiebung überwiegt der stabilisierende Einfluss von HuR auf die IL-17A-mRNA (Guo et al., 2020). Auch für KSRP konnte bereits eine Interaktion mit anderen RNA-BP dargelegt werden: Linker et al. wiesen in humanen DLD-1-Zellen mittels Immunpräzipitation eine Interaktion zwischen TTP und KSRP nach, die durch eine Cytokinbehandlung verstärkt wurde. Darüber hinaus wurde in dieser Studie gezeigt, dass KSRP und HuR in DLD1-Zellen dieselbe mRNA-Bindestelle an iNOS erkennen und um diese Bindestelle konkurrieren. Durch die Cytokinbehandlung wurde die Bindung von HuR gefördert, wodurch die iNOS-mRNA-Stabilität zunahm (Linker et al., 2005). Aus den oben genannten Studien von Guo et al. und Linker et al. lässt sich schlussfolgern, dass die Cytokinexpression und mRNA-Stabilität von IL-17A sehr wahrscheinlich durch zahlreiche RNA-BP reguliert werden. Möglicherweise wird durch die siRNA-vermittelte KSRP-Herabregulation in den EL-4 siKSRP T-Zellen die Affinität zur IL-17A-mRNA anderer destabilisierend wirkender RNA-BP verstärkt, wodurch es nicht wie erwartet zu einer erhöhten IL-17A-Stabilität in EL-4 siKSRP T-Zellen gekommen ist. Zusätzlich oder alternativ könnte durch die verminderte KSRP-Expression der Effekt von stabilisierend wirkenden RNA-BP vermindert werden, was den unerwarteten Befund in den EL-4 T-Zellen ebenfalls erklären könnte.

Zwar konnte in dieser Versuchsreihe kein direkter Effekt von KSRP auf die Expression von IL-17A über eine Steuerung der mRNA-Stabilität nachgewiesen werden, allerdings könnte KSRP indirekt an der Regulation von IL-17A beteiligt sein: KSRP könnte bereits auf transkriptioneller Ebene über die Steuerung eines Faktors, der die Expression von IL-17A reguliert, eingreifen. Beispielsweise könnte KSRP die Regulation der Zugänglichkeit von DNA-Abschnitten, die für die Transkription von IL-17A notwendig sind, modulieren. Mögliche Mechanismen hierfür wären die Steuerung der Methylierung von DNA oder Histonen durch KSRP. Darüber hinaus könnte KSRP mit Faktoren, die für die Initiation der Transkription bedeutsam sind, wie dem Kernpromotor, der RNA-Polymerase II, Transkriptionsfaktoren und Kofaktoren, interagieren und darüber an der IL-17A-Regulation beteiligt sein. Am Beispiel des RNA-BP Arid5a wurde dargelegt, dass sich RNA-BP und IL-17 auch wechselseitig beeinflussen können. So präsentierten Amatya et al. (2018) einen Feed-forward-Mechanismus, über den IL-17 die Expression von Arid5a u.a. NF- κ B-abhängig induziert. Arid5a führt über verschiedene Regulationswege

zu einer verstärkten Signalwirkung von IL-17: Zum einen stabilisiert Arid5a über seine Bindung an ARE in der 3'-UTR IL-17-induzierte Transkripte (u.a. IL-6, CXCL1, CXCL5) und hemmt die Expression der Endoribonuklease Regnase-1, was die Degradation der Transkripte vermindert. Zum anderen fördert Arid5a die Translation IL-17-induzierter mRNAs, indem es mit dem Translationsinitiationskomplex interagiert und die Expression wichtiger TF fördert. Darüber hinaus wird diskutiert, ob Arid5a über seine stabilisierende Wirkung auf IL-6, STAT3 und Ox40 die Th 17-Differenzierung unterstützt und so indirekt die IL-17-Expression verstärkt (Amatya et al., 2018; Nyati et al., 2019). Auch KSRP könnte über diese wechselseitigen Steuerungsmechanismen indirekt an der IL-17A-Regulation und seiner Signalwirkung beteiligt sein.

Weiterhin ist zu beachten, dass neben RNA-BP auch andere Faktoren, wie microRNAs (miRNAs), long-noncoding RNAs (lncRNAs) und zirkuläre RNAs (circRNAs), wichtige Modulatoren der posttranskriptionellen Genregulation sind (Akira & Maeda, 2021). Für eine Reihe von miRNAs wurde eine Regulation der IL-17A-Expression und -Stabilität nachgewiesen (Salvi et al., 2019). miRNAs haben eine ähnliche Funktionsweise wie KSRP: Über die Bindung an die 3'-UTR von mRNAs fördern sie den mRNA-Abbau und inhibieren die Translation der mRNA (Bushati & Cohen, 2007). Weil KSRP die Reifung von miRNA-Vorstufen begünstigt, bewirkt es darüber indirekt eine mRNA-Destabilisierung. Eine verminderte KSRP-Expression sollte erwartungsgemäß zu einer reduzierten Reifung von miRNAs und damit zu einer erhöhten mRNA-Stabilität führen (Gherzi et al., 2014). In den EL-4 siKSRP T-Zellen war dieser Effekt auf die IL-17A-mRNA-Stabilität aber nicht festzustellen. Ähnlich wie RNA-BP untereinander können auch miRNAs und RNA-BP um die Bindestelle an der 3'-UTR einer mRNA konkurrieren (Jiang & Coller, 2012). Möglicherweise wird durch die ausbleibende Reifung mancher miRNAs in den EL-4 siKSRP T-Zellen die Affinität anderer destabilisierend wirkender miRNAs oder RNA-BP an die 3'-UTR von IL-17A erhöht, sodass das Transkript trotz der verminderten KSRP-Expression nicht stabilisiert wird. Alternativ könnte durch die verminderte KSRP-Expression der Einfluss anderer RNA-BP verstärkt werden. Diese RNA-BP könnten ebenfalls die miRNA-Reifung fördern, sodass die Destabilisierung der IL-17A-mRNA durch die miRNA erhalten bleibt oder sogar zunimmt.

Aus den hier vorgenommenen Analysen zum Einfluss von KSRP auf die IL-17A-mRNA-Stabilität gehen keine Befunde hervor, die die erhöhte IL-17A-Proteinexpression in EL-4 siKSRP T-Zellen erklären würden.

6.1.3 KSRP wirkt stabilisierend auf das IL-17A-Protein

Nachdem die IL-17A-mRNA-Expression und -Stabilität auf eine Regulation durch KSRP überprüft wurden und aus den CBA-Analysen von Frau Nina Kuhlmann bereits Daten zur IL-17A-Proteinexpression vorlagen, sollte im folgenden Schritt ein Einfluss von KSRP auf die posttranslationale IL-17A-Proteinstabilität überprüft werden. Dafür wurden EL-4 Co und EL-4 siKSRP T-Zellen über 5 h mit PMA und Ionomycin stimuliert und im Anschluss für 3 bis 24 h mit Cycloheximid (CHX), einem Translationshemmer, behandelt. Mit Hilfe des CBA-Assays wurden die IL-17A-Proteinmengen in den Überständen der Zellen bestimmt. Zum Vergleich wurden die TNF- α -Proteinmengen mit untersucht.

Die Messung der vorhandenen Proteinkonzentrationen von IL-17A und TNF- α nach einer 3-stündigen CHX-Behandlung zeigten deutlich niedrigere IL-17A-Konzentrationen im Vergleich zu den TNF- α -Konzentrationen (siehe Abbildung 7). Wie in Abbildung 8A gezeigt ist, kommt es in den EL-4 Co und EL-4 siKSRP T-Zellen zu einem zeitabhängigen Abbau des IL-17A-Proteins nach der Zugabe von CHX. Bemerkenswert ist, dass die IL-17A-Proteinmenge in den EL-4 siKSRP T-Zellen bei allen beobachteten Zeitpunkten geringer ist als in den EL-4 Co T-Zellen. Aus den Daten geht somit ein schnellerer Abbau des IL-17A-Proteins in den EL-4 siKSRP T-Zellen im Vergleich zu den EL-4 Co T-Zellen hervor. Daraus lässt sich folgern, dass KSRP in EL-4 T-Zellen einen stabilisierenden Effekt auf das IL-17A-Protein hat. Es bleibt unklar, ob die Stabilisierung durch KSRP direkt oder indirekt über zwischengeschaltete Faktoren vermittelt wird, deren de-novo Synthese von CHX inhibiert wird. Zum Beispiel könnte KSRP einen Faktor inhibieren, der destabilisierend auf das Protein wirkt oder einen Faktor fördern, der zur Proteinstabilisierung beiträgt. Im Gegensatz dazu stehen die Daten zum Einfluss von KSRP auf die Proteinstabilität von TNF- α : Diese zeigen zu jedem Zeitpunkt der CHX-Gabe eine erhöhte Proteinmenge in den EL-4 siKSRP T-Zellen (siehe Abbildung 8B). Dies spricht für eine Förderung des TNF- α -Proteinabbaus durch KSRP, was im Gegensatz zur stabilisierenden Wirkung von KSRP auf das IL-17A-Protein steht.

Aus der Literatur ist bereits bekannt, dass KSRP einen Effekt auf die Translationskontrolle verschiedener Entzündungsmediatoren hat. Dhamija et al. konnten in stimulierten HeLa-Zellen mit einer reduzierten KSRP-Expression gesteigerte IL-6-Proteinmengen feststellen und diesen Effekt auf eine verstärkte Polysomenassoziation des Transkripts zurückführen. Es konnte gezeigt werden, dass für die Translationskontrolle eine Bindung von KSRP an ARE in der 3'-UTR der IL-6-mRNA notwendig ist (Dhamija et al., 2011). Über diesen Mechanismus könnte die erhöhte Proteinmenge von TNF- α zu erklären sein.

Während ein Einfluss von KSRP auf die Proteinexpression verschiedener inflammatorischer Cytokine bereits untersucht wurde, liegen wenige Daten zur posttranslationalen Regulation durch RNA-BP vor. Generell sind bisher wenige Regulationsmechanismen identifiziert worden, über die IL-17A und TNF- α posttranslational gesteuert werden. Rutz et al. präsentierten eine suppressive posttranslationale Regulation von IL-17A durch die Deubiquitinase DUBA in anti-CD3 behandelten murinen Th17-Zellen, die über die Ubiquitin Ligase UBR5 und ROR γ t vermittelt wird (Rutz et al., 2015). Die posttranslationale Modifikation von TNF- α und deren Bedeutung in der Pathogenese der rheumatoiden Arthritis beschreiben Moelants et al.: Da TNF- α als unreifes pro-TNF- α exprimiert wird, ist für seine biologische Funktion zunächst eine Spaltung durch Matrix-Metalloproteinasen und andere Metalloproteasen erforderlich. Über die proteolytische Spaltung des Cytokins kann die Bioverfügbarkeit und Aktivität von TNF- α posttranslational moduliert werden (Moelants et al., 2013). Gerade weil über die Veränderung der posttranslationalen Proteinmodifikation deutlich raschere Änderungen der Cytokinlevel möglich sind als über die veränderte Proteinneusynthese und im Rahmen von Entzündungsprozessen dynamische Cytokinregulationen stattfinden, erscheinen weitere Untersuchungen posttranslationaler Modifikationen sinnvoll (H. Lin & Carroll, 2018).

Neben den Proteinmengen in den Überständen wurden auch die mRNA-Expressionen von IL-17A und TNF- α in den CHX-behandelten Zellen im zeitlichen Verlauf bestimmt (siehe Abbildung 9). Die gemessenen IL-17A-mRNA-Mengen zeigten mit der Dauer der CHX-Behandlung einen stetigen Rückgang. Dabei sind durchgängig niedrigere mRNA-Mengen in den EL-4 siKSRP T-Zellen bestimmt worden. Dies deckt sich mit den in Kapitel 6.1.1 diskutierten Ergebnissen zur IL-17A-mRNA-Expression in PMA/Ionomycin stimulierten EL-4 T-Zellen. Durch die Translationshemmung mit CHX ist zu erwarten, dass Proteine, die für die Transkription der IL-17-mRNA benötigt werden, nicht mehr in ausreichender Menge synthetisiert werden und die mRNA-Expression abnimmt. Die rückläufigen IL-17A-mRNA-Mengen stimmen mit diesen Erwartungen überein. In den EL-4 siKSRP T-Zellen sind geringe TNF- α -mRNA-Level bestimmt worden, die sich über den Behandlungszeitraum mit CHX kaum verändern. Dieser Befund lässt vermuten, dass es möglicherweise einen KSRP-abhängigen Faktor gibt, der die Transkription oder die posttranskriptionelle Regulation von TNF- α beeinflusst und dessen De-novo-Synthese durch CHX inhibiert wird. Dieser Faktor scheint schon innerhalb der ersten 3 h nach der CHX-Behandlung abgebaut oder in seiner Funktion herabreguliert zu sein, da die mRNA-Mengen nach der 3-stündigen Behandlung gering sind und sich in den Kontrollen über 24 h kaum verändern. In den EL-4 Co T-Zellen sind hingegen tendenziell steigende TNF- α -mRNA-Mengen bestimmt worden. Möglicherweise ist dies auf einen Faktor zurückzuführen,

der die TNF- α -Expression negativ beeinflusst und durch die CHX-Behandlung abgebaut oder inaktiviert wird. Um welche Faktoren es sich genau handelt und welche Regulationsmechanismen zugrunde liegen, ist nicht bekannt.

Insgesamt geht aus den im Kapitel 6.1 diskutierten Befunden kein Regulationsmechanismus hervor, der die im CBA-Assay gemessene erhöhte Proteinexpression von IL-17A in EL-4 siKSRP T-Zellen erklären würde. Die Analysen der IL-17A-mRNA-Expression sowie die Analysen zur Stabilität der IL-17A-mRNA und des IL-17A-Proteins lassen keinen direkten Effekt von KSRP auf die IL-17-Expression erkennen, der mit den Ergebnissen des CBA-Assays einhergehen würde. Stattdessen deuten die vorliegenden Daten eher auf eine Stabilisierung der IL-17A-mRNA und des IL-17A-Proteins durch KSRP hin. Dieser Befund liefert allerdings keine Erklärung für die erhöhte Proteinkonzentration von IL-17A, die in den CBA-Analysen in Kulturüberständen von EL-4 siKSRP T-Zellen detektiert wurden. In den EL-4 T-Zellen kommen vermutlich andere, komplexere Regulationsmechanismen zum Tragen, die in dieser Arbeit nicht identifiziert werden konnten. Die oben diskutierten IL-17-Expressionsdaten nach Translationshemmung lassen annehmen, dass KSRP indirekt an der Regulation von IL-17 beteiligt ist, indem es einen Faktor reguliert, der die Expression, die Stabilität oder die Prozessierung des IL-17-Proteins begünstigt. Die AG Pautz konnte kürzlich in einem in-vivo Asthma-Modell u.a. in naiven CD4⁺ T-Zellen aus KSRP-defizienten Mäusen ebenfalls erhöhte IL-17A-Expressionen feststellen. Dieser Befund sowie die Ergebnisse aus den RNA-Seq-Analysen der AG Pautz bekräftigen eine negative Regulation von IL-17A durch KSRP in T-Zellen. Wie im Kapitel 6.1.1 diskutiert wurde, sollte für künftige Untersuchungen der IL-17A-Expression getestet werden, ob primäre T-Zellen und eine polyklonale Stimulation mit anti-CD3 und anti-CD28 geeigneter sind als die mit PMA/Ionomycin stimulierte EL-4 T-Zellkulturlinie.

6.2 KSRP fördert die Expression des IL-1-Rezeptorantagonisten in EL-4 T-Zellen

Da es Literaturdaten (Ishigame et al., 2006; Na et al., 2020; Yoshizaki et al., 2019) gibt, die zeigen, dass in IL-1-Rezeptorantagonist (IL-1-RA)-depletierten Mäusen eine erhöhte IL-17A-Expression zu messen ist, sollte der Einfluss der KSRP-Expression auf die IL-1-RA-Expression in EL-4 T-Zellen untersucht werden. Über Effekte von KSRP auf die Expression des IL-1-Rezeptorantagonisten sind nur wenige Literaturwerte zu finden (z.B. (Schmidtke et al., 2021)). Wie in Abbildung 10 gezeigt ist, findet sich in EL-4 siKSRP T-Zellen bei allen untersuchten Stimulationszeiträumen mit PMA/Ionomycin eine signifikante Reduktion der IL-1-RA-Expression im Vergleich zu EL-4 Co T-Zellen. Dieser Befund bestätigt die von Schmidtke et al. (2021)

publizierten Daten, die zeigen, dass in den Nieren von 19 Wochen alten Weibchen von MRL-Fas^{lpr} KSRP^{-/-}-Mäusen im Vergleich zu MRL-Fas^{lpr} KSRP^{+/+}-Weibchen eine signifikante Reduktion der IL-1-RA-Proteinexpression zu finden ist (Schmidtke et al., 2021). Die IL-1-RA-Daten bieten jedoch keine Erklärung für die Reduktion der IL-17A-Expression in den EL-4 T-Zellen, da nach den Literaturdaten eigentlich eine Erhöhung der IL-17A-Expression bei Reduktion der IL-1-RA-Expression zu erwarten wäre. Der IL-1-RA ist ein bisher noch nicht beschriebenes Zielgen von KSRP. Die hier präsentierte KSRP-vermittelte Erhöhung der IL-1RA-Expression könnte zu einem antiinflammatorischen Effekt von KSRP beitragen. Um die zugrundeliegenden direkten oder indirekten Mechanismen dieser Regulation festzustellen, sollten Untersuchungen auf verschiedenen Ebenen der Genexpression vorgenommen werden.

6.3 KSRP hat keinen Einfluss auf die Aktivierung der p38-MAPK in EL-4 T-Zellen

Die p38-MAPK hat wichtige Funktionen in posttranskriptionellen Mechanismen der Genregulation und ist darüber entscheidend an der raschen Steuerung von Immunantworten beteiligt (O’Neil et al., 2018). Sie reguliert u.a. über die Phosphorylierung von RNA-BP deren subzelluläre Lokalisierung, mRNA-Bindungsaffinität sowie deren Interaktion mit anderen RNA-BP (Tiedje et al., 2014). Bisher konnte ein Einfluss der p38-MAPK auf die Funktionen von TTP, HuR, KSRP und andere RNA-BP gezeigt werden (Briata et al., 2005; O’Neil et al., 2018; H. Wang et al., 2019). Über die Regulation der RNA-BP beeinflusst die p38-MAPK indirekt die mRNA-Stabilität zahlreicher proinflammatorischer Mediatoren (Briata et al., 2005). Die p38-MAPK selbst wird wie viele andere Kinasen durch Phosphorylierungen aktiviert (Cuadrado & Nebreda, 2010).

Hier sollte untersucht werden, ob eine veränderte KSRP-Expression in EL-4 T-Zellen Auswirkungen auf die Aktivität der p38-MAPK hat. Zur Untersuchung einer solchen Regulation wurden die Proteinexpressionen der p38-MAPK und der Phospho-p38-MAPK in EL-4 Co und EL-4 siKSRP T-Zellen durch Western Blot Analysen bestimmt. Die Analysen ergaben keine Genotyp-spezifischen Unterschiede in der p38-MAPK Proteinaktivität. Dieser Befund zeigt, dass die Aktivität der p38-MAPK in EL-4 T-Zellen scheinbar keinem Einfluss durch KSRP unterliegt und die Expression von Entzündungsmediatoren nicht über diese Feedback-Regulation gesteuert wird. KSRP scheint in EL-4 T-Zellen nicht an Signalwegen beteiligt zu sein, die die Aktivierung der p38-MAPK vermitteln.

Neben der p38-MAPK wurden für die Ataxia Teleangiectasia mutated (ATM)-Kinase und die Phosphatidylinositol-3-Kinase-Akt/Proteinkinase B (PKB) in der Literatur beschrieben, dass

sie die Funktion von KSRP über Phosphorylierungen regulieren (Palzer et al., 2022). KSRP könnte an der Regulation der Aktivität dieser beiden Kinasen in EL-4 T-Zellen beteiligt sein, was weiter untersucht werden könnte.

6.4 Analysen einer KSRP-abhängigen CXCL3-Expression in Mausmodellen

6.4.1 KSRP induziert die CXCL3-mRNA-Expression in renalen Tubulusepithelzellen

Der Ausgangspunkt für die Analysen eines Einflusses von KSRP auf die Expression von CXCL3 waren die Befunde aus unveröffentlichten RNA-Seq-Analysen der AG Pautz/Kleinert. In polykonal stimulierten T-Zellen von C57BL/6 KSRP^{-/-}-Mäusen wurde eine signifikant erhöhte CXCL3-mRNA-Expression im Vergleich zu den Wildtypzellen bestimmt (siehe Anhang, Tabelle 23). Dieser Befund lässt eine negative Regulation der CXCL3-mRNA-Expression durch KSRP in den primären T-Zellen vermuten. Zur weiteren Analyse dieses Effekts wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit ein geeignetes Primersystem für qRT-PCR-Analysen hergestellt und damit der Einfluss von KSRP auf die CXCL3-mRNA-Expression in EL-4 T-Zellen überprüft. In den EL-4 T-Zellen ließ sich allerdings keine ausreichende CXCL3-Expression feststellen, weshalb die Zellen für weitere Untersuchungen nicht verwendet wurden. In renalen Tubulusepithelzellen (RTEC) aus MRL-Fas^{lpr} KSRP^{+/+}-Mäusen und MRL Fas^{lpr} KSRP^{-/-}-Mäusen sowie aus C57BL/6 KSRP^{+/+}- und C57BL/6 KSRP^{-/-}-Mäusen wurde hingegen eine CXCL3-mRNA-Expression gemessen.

In der Literatur finden sich aktuell noch sehr wenige Daten zur Genregulation von CXCL3. Es ist Teil der CXC-Chemokinfamilie und gehört zur Subgruppe der GRO-Chemokine. Mitglieder dieser Chemokinfamilie haben ähnliche Funktionen in der Immunantwort (z.B. Rekrutierung von Neutrophilen) und binden z.T. durch ihre strukturelle Ähnlichkeit dieselben Chemokinrezeptoren (Palomino & Marti, 2015). Die vergleichbaren Eigenschaften der GRO-Chemokine lassen vermuten, dass auch ihre Genexpression ähnlich reguliert sein könnte.

In RTEC von MRL-Fas^{lpr} KSRP^{+/+}- und MRL Fas^{lpr} KSRP^{-/-}-Mäusen wurde durch die Behandlung mit LPS die CXCL3-mRNA-Expression induziert. Zur Induktionskontrolle wurden die mRNA-Ausgangsmengen vor der Stimulation bestimmt und diese mit der CXCL3-mRNA-Expression nach der LPS-Stimulation über 3 h verglichen. Die Analysen ergaben eine signifikant höhere Induzierbarkeit zur CXCL3-mRNA-Expression in RTEC von MRL Fas^{lpr} KSRP^{-/-}-Mäusen als in den RTEC von MRL Fas^{lpr} KSRP^{+/+}-Mäusen. In den unstimulierten RTEC war dieser Unterschied nicht zu erkennen (siehe Abbildung 13). Vergleichbare Ergebnisse lieferten die anschließenden Untersuchungen, bei denen die RTEC über 24 h mit LPS stimuliert wurden

(siehe Abbildung 14). Die Induzierbarkeit zur CXCL3-mRNA-Expression sollte daraufhin in RTEC aus einem weiteren Mausmodell, den C57BL/6 KSRP^{+/+}- und C57BL/6 KSRP^{-/-}-Mäusen, verifiziert werden. Vergleichbar zu den Befunden in den MRL Fas^{lpr}-Mäusen wurde nach einer 24-stündigen LPS-Stimulation eine stärker induzierte CXCL3-mRNA-Expression in RTEC von C57BL/6 KSRP^{-/-}-Mäusen bestimmt.

Die Befunde aus den LPS-stimulierten RTEC von MRL Fas^{lpr}- und C57BL/6-Mäusen sprechen insgesamt für einen negativen regulatorischen Einfluss von KSRP auf die Genexpression von CXCL3 unter proinflammatorischen Bedingungen. Dies stimmt mit der bekannten Rolle von KSRP als negativer Regulator proinflammatorischer Mediatoren überein (Gherzi et al., 2014). Der zugrundeliegende Regulationsmechanismus geht aus den oben genannten Daten aber nicht hervor. Die im Kapitel 6.4.2 ausführlicher diskutierten Ergebnisse zur CXCL3-mRNA-Stabilitätsanalyse an RTEC von MRL-Fas^{lpr} KSRP^{+/+}- und MRL Fas^{lpr} KSRP^{-/-}-Mäusen geben Hinweise darauf, dass KSRP posttranskriptionell einen destabilisierenden Effekt auf die CXCL3-mRNA haben und CXCL3 darüber negativ regulieren könnte. Ein solcher KSRP-vermittelter mRNA-Abbau würde mit den Daten von Graham et al. einhergehen, die in humanen Glioblastomzellen eine Destabilisierung der CXCL3-mRNA durch KSRP nachweisen konnten (Graham et al., 2010) (siehe Kapitel 6.4.2). Aus der Literatur gehen ansonsten keine weiteren Regulationsmechanismen von KSRP auf die CXCL3-Expression hervor.

Bekanntlich ist KSRP ein multifunktionelles Protein, das über verschiedene Angriffspunkte auf unterschiedlichen Ebenen in die Genexpression von Entzündungsmediatoren eingreifen kann (Briata et al., 2013). Potenziell könnte der negative Einfluss von KSRP auf die CXCL3-mRNA-Expression in RTEC auch über andere posttranskriptionelle Mechanismen vermittelt werden. Aus der Literatur geht hervor, dass KSRP über die mRNA-Prozessierung in die Genregulation eingreifen kann und z.B. am Spleißen von pre-mRNA beteiligt ist (Briata et al., 2013). Durch eine KSRP-vermittelte Regulation des alternativen Spleißens – insbesondere im Bereich des *open reading frame* (ORF) und der 3'UTR der CXCL3-mRNA – könnten verschiedene Faktoren beeinflusst werden, die für die Stabilität der CXCL3-mRNA entscheidend sind: Beispielsweise könnten cis-Elemente in der CXCL3-mRNA, die an der mRNA-Lokalisation beteiligt sind, oder miRNA-Bindestellen und ARE durch das alternative Spleißen in ihrer Struktur und Anzahl verändert werden. Zudem könnte durch das alternative Spleißen der Nonsense-mediated-decay (NMD) und die mRNA-Qualitätskontrolle im Nukleus moduliert werden (Mockenhaupt & Makeyev, 2015). Eine weitere Funktion von KSRP liegt in der Reifung einer Reihe von miRNAs über die Interaktionen mit Drosha und Dicer. KSRP könnte die Reifung

von miRNAs fördern, die zu einer Destabilisierung der CXCL3-mRNA führen und damit indirekt einen Effekt auf die CXCL3-Genexpression haben. Darüber hinaus ist es möglich, dass durch den KSRP-knockout die CXCL3-mRNA-Affinitäten anderer RNA-BP verändert werden und die verstärkte Induktion zur CXCL3-mRNA-Expression in den KSRP-knockout-Mäusen auf den Effekt anderer RNA-BP zurückzuführen ist. Neben diesen posttranskriptionellen Regulationsmechanismen könnte KSRP auch einen Einfluss auf die Transkription haben. Beispielsweise könnte KSRP einen Faktor hemmen, der für die Transkription von CXCL3 benötigt wird, oder einen Repressor der Transkription von CXCL3 fördern. Neben transkriptionellen Mechanismen könnte KSRP die CXCL3-Expression auf Ebene der Translation regulieren. Über Rückkopplungsschleifen zwischen Translation und Transkription könnte KSRP indirekt die Induzierbarkeit der RTEC verändern.

Bei den oben beschriebenen Ergebnissen fällt auf, dass die Expressionsdaten der über 6 h mit LPS stimulierten RTEC von C57BL/6-Mäusen von den anderen dargestellten CXCL3-Expressionsergebnissen abweichen. Es zeigte sich hier eine verminderte Induzierbarkeit zur CXCL3-mRNA-Expression in RTEC von C57BL/6 KSRP^{-/-}-Mäusen. Dies spricht für eine Förderung der CXCL3-Expression durch KSRP zu diesem Stimulationszeitpunkt. In der Literatur sind totalgenomische Analysen von Okholm et al. (Bioprojekt PRJNA608915) vorhanden, in denen in humanen Hepatozyten (HepG2) mit herabregulierter KSRP-Expression ebenfalls eine verringerte CXCL3-mRNA-Expression festgestellt wurde (siehe Anhang, Tabelle 23). Zudem liegen Daten zur Regulation des verwandten Chemokins CXCL1 durch KSRP vor, in denen ein ähnlicher Effekt von KSRP beschrieben wurde: Käfer et al. wiesen in isoliertem Gelenkgewebe aus einem Arthritis-Mausmodell signifikant verminderte CXCL1-mRNA-Expressionen in Mäusen mit einem KSRP-knockout im Vergleich zu den Wildtyptieren nach. Klinisch zeigte sich die Ausschaltung des KSRP-Gens in einem verzögerten und mildereren Verlauf der Arthritis. Aus den Daten von Käfer et al. geht hervor, dass KSRP entzündliche Immunprozesse in-vivo verstärken kann, wobei die genauen Regulationsmechanismen nicht bekannt sind (Käfer et al., 2017). Die RTEC von C57BL/6 KSRP^{-/-}-Mäusen zeigten zwar nach der 6-stündigen LPS-Stimulation eine geringer induzierte CXCL3-Expression im Vergleich zu den Wildtyptieren, allerdings war nach der 24-stündigen Stimulation eine verstärkte Induktion zur CXCL3-Expression in diesen Zellen zu messen. Möglicherweise reguliert KSRP einen Faktor, der die CXCL3-Expression verstärkt, aber im zeitlichen Verlauf zwischen der 6- und 24-stündigen Stimulation abgebaut wird. Durch den Abbau könnten anschließend negative regulatorische Mechanismen von KSRP überwiegen, sodass es zu einer Umkehr des Effekts von KSRP auf die CXCL3-Expression kommt. Um den Effekt von KSRP in RTEC von C57BL/6 KSRP^{-/-}-Mäusen näher

zu beleuchten, könnten weitere Expressionsanalysen mit Stimulationszeiten zwischen 6 und 24 h vorgenommen werden.

Insgesamt geht aus den diskutierten Ergebnissen hervor, dass EL-4 T-Zellen für zukünftige Analysen der Genregulation von CXCL3 nicht geeignet sind, weil sie das Chemokin nur sehr gering oder gar nicht exprimieren. Da die Expression und Regulation von Entzündungsmediatoren zwischen der EL-4 T-Zellkulturlinie und primären T-Zellen variieren könnten, wäre eine Untersuchung einer CXCL3-Expression in primären T-Zellen zu empfehlen. Ansonsten erscheinen die hier untersuchten RTEC von MRL Fas^{lpr}- und C57BL/6-Mäusen zur Analyse KSRP-abhängiger Veränderungen der CXCL3-Expression sehr geeignet. Neben weiteren posttranskriptionellen Regulationsmechanismen sollten auch Regulationen der Transkription und Translation durch KSRP untersucht werden. Außerdem könnten für zukünftige Expressionsanalysen – insbesondere an RTEC von C57BL/6-Mäusen – weitere Stimulationszeiten der RTEC gewählt werden.

6.4.2 KSRP könnte einen destabilisierenden Effekt auf die CXCL3-mRNA-Stabilität in renalen Tubulusepithelzellen haben

Um einen Einfluss von KSRP auf die CXCL3-mRNA-Stabilität zu untersuchen, wurden LPS-stimulierte RTEC aus den Nieren von MRL Fas^{lpr} KSRP^{+/+}- und MRL Fas^{lpr} KSRP^{-/-}-Mäusen mit DRB behandelt und anschließend die CXCL3-mRNA-Mengen über 4 h bestimmt. Zur Kontrolle der CXCL3-Abbauanalysen wurden auch die mRNA-Mengen von CXCL1 gemessen. Sowohl für CXCL3 als auch für CXCL1 gehen aus der Literatur Daten hervor, die zeigen, dass KSRP bzw. TTP den mRNA-Abbau der Chemokine fördern (Datta et al., 2008; Graham et al., 2010; Herjan et al., 2013; Winzen et al., 2007).

Die Abbauanalysen ergaben einen deutlichen Rückgang der mRNA-Mengen beider Chemokine mit einem verstärkten mRNA-Abbau innerhalb der ersten Stunde nach DRB-Behandlung. Dies deutet auf eine kurze Halbwertszeit beider Transkripte hin. Die bestimmten mRNA-Mengen zeigten überwiegend keine Genotyp-spezifischen Unterschiede. Jedoch waren nach der einstündigen DRB-Behandlung erhöhte CXCL1-mRNA-Mengen und nach der 4-stündigen DRB-Behandlung erhöhte CXCL3-mRNA-Mengen in RTEC von MRL Fas^{lpr} KSRP^{-/-}-Mäusen im Vergleich zu den Wildtypzellen zu detektieren. Diese Befunde könnten Hinweise auf einen negativen Einfluss von KSRP auf die mRNA-Stabilität von CXCL1 und CXCL3 in RTEC sein.

Aus der Literatur geht bereits eine posttranskriptionelle Steuerung der CXCL-1-mRNA-Stabilität durch andere RNA-BP hervor. Datta et al. beschrieben eine Regulation der CXCL1-

mRNA-Stabilität durch das RNA-BP TTP. Sowohl in humanen embryonalen Nierenzellen (HEK-293-Zellen) als auch in Makrophagen konnte ein destabilisierender Effekt von TTP auf die CXCL1-mRNA nachgewiesen werden. Dabei wurde gezeigt, dass TTP über mehrere ARE in der 3'-UTR direkt an die CXCL1-mRNA binden kann und darüber den mRNA-Abbau vermittelt (Datta et al., 2008). Auch eine Destabilisierung von CXCL3 durch RNA-BP würde mit vorhandenen Literaturdaten übereinstimmen. Aus den veröffentlichten Daten von Graham et al. geht eine Regulation der CXCL3-mRNA-Stabilität durch KSRP in humanen Glioblastomzellen (T98G-Zellen) hervor. Graham et al. wiesen in ihrer Studie zunächst einen beschleunigten CXCL3-mRNA-Abbau durch die Hemmung der Phosphatidylinositol-3 (PI3)-Kinase nach (Graham et al., 2010). Aus der Literatur ist bekannt, dass KSRP der PI3-Kinase nachgeschaltet ist und die KSRP-Aktivität durch die Kinase reguliert wird (Ruggiero et al., 2007). Im nächsten Schritt wurde zusätzlich zur Inhibition der PI3-Kinase die KSRP-Expression in den Zellen durch eine Transfektion mit siRNA reduziert. Nachfolgend konnte gezeigt werden, dass der KSRP-knockdown zu einer Stabilisierung der CXCL3-mRNA führt. Dieses Ergebnis lässt einen destabilisierenden Effekt von KSRP auf die CXCL3-mRNA vermuten (Graham et al., 2010). Winzen et al. und Herjan et al. konnten eine Regulation der CXCL3-mRNA-Stabilität durch KSRP in HeLa-Zellen nachweisen: In den Analysen von Winzen et al. wurden IL-1-stimulierte HeLa-Zellen zur Untersuchung des mRNA-Abbaus über 3 h mit Actinomycin D behandelt. Nach der Behandlung wurden erhöhte CXCL3-mRNA-Mengen in HeLa-Zellen mit einem KSRP-knockdown festgestellt, was ebenfalls für einen destabilisierenden Effekt von KSRP auf die CXCL3-mRNA spricht. Mittels einer Datenbankrecherche konnten Winzen et al. darüber hinaus ARE der Klasse II innerhalb der CXCL3-mRNA feststellen (Winzen et al., 2007). In späteren Analysen wurde gezeigt, dass die ARE in der 3'-UTR der CXCL3-mRNA essenziell für einen KSRP- und TTP-vermittelten mRNA-Abbau sind (Graham et al., 2010; Herjan et al., 2013). Es ist bekannt, dass KSRP über ARE direkt an die 3'-UTR von Transkripten bindet und über die Rekrutierung von Exonukleasen und Zerfallsenzymen die Degradation des gebundenen Transkripts bewirkt (Briata et al., 2013). Sofern KSRP den CXCL3-mRNA-Abbau in den RTEC aus MRL Fas^{lpr} KSRP^{-/-}-Mäusen beschleunigt, ist wahrscheinlich, dass der Abbau über die direkte Bindung von KSRP an ARE in der 3'-UTR vermittelt wird.

6.4.3 KSRP könnte die CXCL3-mRNA-Expression in Peritonealzellen geschlechtsspezifisch induzieren

Zur weiteren Untersuchung einer KSRP-abhängigen Induktion zur CXCL3-Expression wurden Peritonealzellen aus dem Bauchraum von C57BL/6 KSRP^{+/+}- und C57BL/6 KSRP^{-/-}-Mäusen

isoliert. Bei den isolierten Peritonealzellen handelt es sich neben B- und T-Zellen überwiegend um Makrophagen (Ray & Dittel, 2010). Abhängig von ihrer Differenzierung, ihrer Polarisation und der Aktivierung durch das lokale Mikromilieu sind Makrophagen an inflammatorischen und immunregulatorischen Prozessen beteiligt (Funes et al., 2018; Shapouri-Moghaddam et al., 2018).

Die Peritonealzellen wurden auf einen Einfluss von KSRP auf die CXCL3-mRNA-Expressionen untersucht. Aus den Ergebnissen der Analysen (siehe Abbildung 17) lässt sich in unstimulierten Peritonealzellen sowie in über 24 h LPS-stimulierten Peritonealzellen von C57BL/6-Weibchen eine stärker induzierte CXCL3-mRNA-Expression in C57BL/6 KSRP^{-/-}-Mäusen erkennen. Im Gegensatz zu den weiblichen Tieren war in den über 24 h stimulierten Peritonealzellen von männlichen C57BL/6 KSRP^{-/-}-Mäusen eine verringerte Induktion zur CXCL3-mRNA-Expression zu messen. Insgesamt legen die Ergebnisse einen geschlechtsspezifischen Unterschied im Einfluss von KSRP auf die CXCL3-Expression nahe. In den Peritonealzellen der C57BL/6-Weibchen scheint KSRP ein negativer Regulator der CXCL3-Expression zu sein, was mit der bekannten Rolle von KSRP übereinstimmen würde (Gherzi et al., 2014). In C57BL/6-Männchen scheint KSRP die CXCL3-mRNA-Expression hingegen eher positiv zu regulieren. Da es sich um initiale Daten handelt, die auf einer kleinen untersuchten Tierzahl basieren, müssen diese Effekte in Folgeexperimenten verifiziert werden. Dennoch handelt es sich hier um einen interessanten Befund, der weiterverfolgt werden sollte.

Aus der Literatur gehen bisher keine Daten zur Expression von CXCL3 in Makrophagen hervor. Jedoch wurden die Expressionen der verwandten Chemokine CXCL1 und CXCL2 in Makrophagen untersucht. In in-vivo-Studien an C57BL/6-Mäusen konnten nach einer peritonealen LPS-Injektion erhöhte mRNA-Expressionen von CXCL1 und CXCL2 in Gewebemakrophagen nachgewiesen werden. Gleichzeitig konnten die Chemokine in dem Peritonitis-Mausmodell als essentielle Mediatoren für die Neutrophilenrekrutierung erkannt werden (De Filippo et al., 2008). Darüber hinaus zeigten Bollmann et al. in LPS- und INF- γ -behandelten Peritonealzellen von C57BL/6 KSRP^{-/-}-Mäusen eine verstärkte CXCL1-mRNA-Expression (Bollmann et al., 2014). Die genannten Literaturdaten gehen mit den Ergebnissen aus den C57BL/6-Weibchen einher. Die genauen Regulationsmechanismen, über die KSRP die CXCL3-mRNA-Expression in den weiblichen C57BL/6-Mäusen beeinflusst, bleiben zunächst unklar. Wie in Kapitel 6.4.1 diskutiert wurde, kommen verschiedene Regulationsmechanismen auf unterschiedlichen Ebenen der Genexpression für den Effekt von KSRP in Frage. Wahrscheinlich handelt es sich – ähnlich wie bei RTEC – um posttranskriptionelle Regulationsmechanismen.

Der geschlechtsspezifische Effekt von KSRP auf die CXCL3-mRNA-Expression in den Peritonealzellen lässt vermuten, dass KSRP den Immunprozess über eine hormonelle Steuerung beeinflussen könnte. In der Literatur sind bisher zwar Daten vorhanden, aus denen hervorgeht, dass KSRP an der posttranskriptionellen Regulation von Hormonen, wie z.B. Parathormon, beteiligt ist (Nechama et al., 2009), ein geschlechtsspezifischer Unterschied im Einfluss von KSRP auf die Genregulation von Entzündungsmediatoren wird hingegen nicht beschrieben. Weil aus der Literatur geschlechtsspezifische Unterschiede in der Immunantwort bekannt sind (Moulton, 2018) und die oben genannten Daten Hinweise auf eine mögliche geschlechtsspezifische Immunmodulation durch KSRP liefern, sollten weitere Untersuchungen vorgenommen werden. Die Peritonealzellen scheinen für diese Analysen geeignet zu sein. Während im Rahmen dieser Arbeit ausschließlich Peritonealzellen aus C57BL/6-Mäusen verwendet wurden, wäre zu überprüfen, ob KSRP z.B. auch in MRL Fas^{lpr}-Mäusen einen geschlechtsspezifischen Einfluss auf die Regulation von CXCL3 hat. Interessant wäre es zudem zu untersuchen, ob die geschlechtsspezifische Regulation durch KSRP auch in dem verwandten, ebenfalls von Peritonealzellen exprimierten Chemokin CXCL1 festzustellen ist.

Insgesamt geht aus den im Kapitel 6.4 diskutierten Daten hervor, dass KSRP die Induktion zur CXCL3-Expression in murinen Tubulusepithelzellen sowie in Peritonealzellen überwiegend negativ reguliert. Zudem lieferten die Daten Hinweise, dass KSRP die CXCL3-Expression über einen direkten Effekt auf die CXCL3-mRNA-Stabilität regulieren könnte. Darüber zeigte sich anhand der Daten, dass der Einfluss von KSRP eventuell geschlechtsabhängig sein könnte.

7 Zusammenfassung

Viele autoimmune und chronisch-entzündliche Erkrankungen werden durch eine dysregulierte Genexpression proinflammatorischer Mediatoren verursacht. Um langfristig neue Therapieansätze für diese Erkrankungen zu entwickeln, müssen die molekularbiologischen Regulationsmechanismen der Genexpression verstanden werden. Wichtige Elemente zur Kontrolle der proinflammatorischen Genexpression sind RNA-Bindeproteine (RNA-BP). Über die Modulation der Transkription, der posttranskriptionellen mRNA-Stabilität sowie der Translation können RNA-BP auf verschiedenen Ebenen in die Genexpression eingreifen. In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss des RNA-Bindeproteins *KH-type splicing regulatory protein* (KSRP) auf die Genexpression der Entzündungsmediatoren IL-17A und CXCL3 untersucht. Aus bisher unveröffentlichten Daten der AG Pautz lagen Hinweise vor, dass KSRP die mRNA-Expression beider Entzündungsmediatoren regulieren könnte.

Zur Analyse der IL-17A-Expression wurde die murine CD4⁺ T-Zelllinie EL-4 verwendet. Es war bereits eine EL-4 Zelllinie etabliert, die durch eine verminderte Expression von KSRP charakterisiert ist (EL-4 siKSRP). Nach einer PMA/Ionomycin-Stimulation zeigte sich eine deutliche Induktion der IL17A-mRNA-Expression in beiden Zelllinien, die aber in den EL-4 siKSRP T-Zellen weniger stark ausgeprägt war als in den Kontrollzellen. Im Gegensatz zur Literatur legen diese Daten einen positiven regulatorischen Effekt von KSRP auf die IL-17A-mRNA-Expression nahe. Die mRNA-Stabilitätsanalysen lieferten keinen Hinweis darauf, dass KSRP einen direkten Effekt auf die IL17A-mRNA-Stabilität in EL-4 Zellen hat. Indirekte Mechanismen, wie eine KSRP-vermittelte Regulation von Faktoren in vorgeschalteten Signalwegen, können nicht ausgeschlossen werden.

In vorausgegangenen, unveröffentlichten CBA-Analysen der AG Pautz wurden höhere IL-17A-Proteinmengen in EL-4 siKSRP T-Zellen im Vergleich zu den Kontrollzellen (EL-4 Co) gemessen. Um einen möglichen zugrundeliegenden Regulationsmechanismus auf Proteinebene zu untersuchen, wurde die posttranslationale IL-17A-Proteinstabilität auf eine Regulation durch KSRP überprüft. Dabei wurde ein stabilisierender Effekt von KSRP auf IL-17A festgestellt. Die Untersuchungen zur Regulation der p38-MAPK durch KSRP ergaben keine Genotyp-spezifischen Unterschiede. KSRP scheint in EL-4 T-Zellen also nicht an Signalwegen beteiligt zu sein, die die Aktivierung der p38-MAPK vermitteln. Die in dieser Arbeit erhobenen Daten können somit keine direkte Erklärung für den von der AG Pautz beobachteten Anstieg der IL-17A-Proteinexpression im Zellkulturüberstand von EL4 siKSRP Zellen liefern. Es müssten noch weitere Untersuchungen folgen, um diesen Widerspruch aufzuklären. In zukünftigen Analysen

könnte ein Einfluss von KSRP auf transkriptioneller oder translationaler Ebene überprüft werden. Zudem sollten zusätzlich andere zelluläre Testsysteme, wie primäre T-Zellen, für Analysen einer KSRP-abhängigen IL-17A-Expression verwendet werden.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde zudem die Expression des IL-1-Rezeptorantagonisten (IL-1-RA) in EL-4 T-Zellen untersucht. Bislang war der IL-1-RA nicht als Zielgen von KSRP bekannt. Die mit PMA/Ionomycin stimulierten EL-4 T-Zellen zeigten eine reduzierte IL-1-RA-Expression im Vergleich zu den EL-4 Co T-Zellen. Weil KSRP darüber einen anti-inflammatorischen Effekt haben könnte, sollten dieser Ansatz weiterverfolgt werden und die zugrundeliegenden Regulationsmechanismen analysiert werden.

Im zweiten Teil dieser Arbeit wurde untersucht, ob KSRP an der Genregulation des Chemokins CXCL3 beteiligt ist. CXCL3 ist Teil der CXC-Chemokinfamilie, die ähnliche Funktionen in der Immunantwort und z.T. gleiche Signaltransduktionswege haben. Damit sind auch Parallelen in der Regulation ihrer Genexpression zu erwarten. Ein Einfluss von KSRP auf die CXCL3-mRNA-Expression wurde in verschiedenen Zellsystemen analysiert. In der EL-4 T-Zelllinie konnten keine hinreichenden CXCL3-mRNA-Expressionen festgestellt werden, weshalb die Zellen für die Untersuchung ungeeignet waren. Für weitere Analysen wurden renale Tubulusepithelzellen (RTEC) aus MRL-Fas^{lpr} KSRP^{+/+}- und MRL Fas^{lpr} KSRP^{-/-}-Mäusen sowie aus C57BL/6 KSRP^{+/+}- und C57BL/6 KSRP^{-/-}-Mäusen isoliert. In den RTEC beider Mauslinien konnte nach einer Stimulation mit Lipopolysaccharid eine verstärkte Induktion zur CXCL3-mRNA-Expression in den KSRP-knockout Mäusen festgestellt werden. Darüber hinaus ergaben sich aus den mRNA-Stabilitätsanalysen an RTEC von MRL Fas^{lpr} KSRP^{-/-}-Mäusen Hinweise auf einen beschleunigten CXCL3-mRNA-Abbau durch KSRP. Insgesamt lässt sich aus den Daten ein negativer regulatorischer Effekt von KSRP auf die CXCL3-mRNA in primären RTEC erkennen.

Abschließend wurde die CXCL3-Expression in einem dritten Zellsystem untersucht. Es wurden Peritonealzellen aus dem Bauchraum von C57BL/6 KSRP^{+/+}- und C57BL/6 KSRP^{-/-}-Mäusen isoliert und ebenfalls Stimulationsversuche mit LPS durchgeführt. Interessanterweise konnten hier geschlechtsspezifische Unterschiede in der Regulation durch KSRP festgestellt werden. KSRP scheint die CXCL3-mRNA-Expression nur in den weiblichen Versuchstieren negativ zu regulieren. Weil bisher wenige Daten zur Regulation von CXCL3 durch KSRP vorliegen und ein geschlechtsspezifischer Einfluss von KSRP bisher nicht aus der Literatur hervorgeht, sollten diese Ansätze weiterverfolgt werden.

8 Literaturverzeichnis

- Akira, S., & Maeda, K. (2021). Control of RNA Stability in Immunity. *Annual Review of Immunology*, 39, 481–509. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-101819-075147>
- Allshire, R. C., & Madhani, H. D. (2018). Ten principles of heterochromatin formation and function. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 19(4), 229–244. <https://doi.org/10.1038/nrm.2017.119>
- Amatya, N., Childs, E. E., Cruz, J. A., Aggor, F. E. Y., Garg, A. V., Berman, A. J., Gudjonsson, J. E., Atasoy, U., & Gaffen, S. L. (2018). IL-17 integrates multiple self-reinforcing, feed-forward mechanisms through the RNA binding protein Arid5a. *Science Signaling*, 11(551). <https://doi.org/10.1126/scisignal.aat4617>
- Amirouche, A., Tadesse, H., Lunde, J. A., Bélanger, G., Côté, J., & Jasmin, B. J. (2013). Activation of p38 signaling increases utrophin A expression in skeletal muscle via the RNA-binding protein KSRP and inhibition of AU-rich element-mediated mRNA decay: implications for novel DMD therapeutics. *Human Molecular Genetics*, 22(15), 3093–3111. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddt165>
- Amirouche, A., Tadesse, H., Miura, P., Bélanger, G., Lunde, J. A., Côté, J., & Jasmin, B. J. (2014). Converging pathways involving microRNA-206 and the RNA-binding protein KSRP control post-transcriptionally utrophin A expression in skeletal muscle. *Nucleic Acids Research*, 42(6), 3982–3997. <https://doi.org/10.1093/nar/gkt1350>
- Andrews, B. S., Eisenberg, R. A., Theofilopoulos, A. N., Izui, S., Wilson, C. B., McConahey, P. J., Murphy, E. D., Roths, J. B., & Dixon, F. J. (1978). Spontaneous murine lupus-like syndromes. Clinical and immunopathological manifestations in several strains. *The Journal of Experimental Medicine*, 148(5), 1198–1215. <https://doi.org/10.1084/jem.148.5.1198>
- Attwood, J. T., Yung, R. L., & Richardson, B. C. (2002). DNA methylation and the regulation of gene transcription. *Cellular and Molecular Life Sciences : CMLS*, 59(2), 241–257. <https://doi.org/10.1007/s00018-002-8420-z>
- Barreau, C., Paillard, L., & Osborne, H. B. (2005). AU-rich elements and associated factors: are there unifying principles? *Nucleic Acids Research*, 33(22), 7138–7150. <https://doi.org/10.1093/nar/gki1012>
- Bhattacharyya, S., Kumar, P., Tsuchiya, M., Bhattacharyya, A., & Biswas, R. (2013). Regulation of miR-155 biogenesis in cystic fibrosis lung epithelial cells: antagonistic role of two mRNA-destabilizing proteins, KSRP and TTP. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 433(4), 484–488. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2013.03.025>
- Bicknell, A. A., & Ricci, E. P. (2017). When mRNA translation meets decay. *Biochemical Society Transactions*, 45(2), 339–351. <https://doi.org/10.1042/BST20160243>
- Blanc, V., & Davidson, N. O. (2010). APOBEC-1-mediated RNA editing. *Wiley Interdisciplinary Reviews. Systems Biology and Medicine*, 2(5), 594–602. <https://doi.org/10.1002/wsbm.82>
- Blauvelt, A., & Chiricozzi, A. (2018). The Immunologic Role of IL-17 in Psoriasis and Psoriatic Arthritis Pathogenesis. *Clinical Reviews in Allergy & Immunology*, 55(3), 379–390. <https://doi.org/10.1007/s12016-018-8702-3>
- Bollmann, F., Art, J., Henke, J., Schrick, K., Besche, V., Bros, M., Li, H., Siuda, D., Handler, N., Bauer, F., Erker, T., Behnke, F., Mönch, B., Härdle, L., Hoffmann, M., Chen, C.-Y., Förstermann, U., Dirsch, V. M., Werz, O., ... Pautz, A. (2014). Resveratrol post-transcriptionally regulates pro-inflammatory gene expression via regulation of KSRP RNA binding activity. *Nucleic Acids Research*, 42(20), 12555–12569. <https://doi.org/10.1093/nar/gku1033>

- Boo, S. H., & Kim, Y. K. (2020). The emerging role of RNA modifications in the regulation of mRNA stability. *Experimental & Molecular Medicine*, 52(3), 400–408. <https://doi.org/10.1038/s12276-020-0407-z>
- Borish, L. C., & Steinke, J. W. (2003). 2. Cytokines and chemokines. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 111(2 Suppl), S460-75. <https://doi.org/10.1067/mai.2003.108>
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72, 248–254. <https://doi.org/10.1006/abio.1976.9999>
- Briata, P., Chen, C.-Y., Giovarelli, M., Pasero, M., Trabucchi, M., Ramos, A., & Gherzi, R. (2011). KSRP, many functions for a single protein. *Frontiers in Bioscience (Landmark Edition)*, 16, 1787–1796. <https://doi.org/10.2741/3821>
- Briata, P., Chen, C.-Y., Ramos, A., & Gherzi, R. (2013). Functional and molecular insights into KSRP function in mRNA decay. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1829(6–7), 689–694. <https://doi.org/10.1016/j.bbagr.2012.11.003>
- Briata, P., Forcales, S. V., Ponassi, M., Corte, G., Chen, C.-Y., Karin, M., Puri, P. L., & Gherzi, R. (2005). p38-dependent phosphorylation of the mRNA decay-promoting factor KSRP controls the stability of select myogenic transcripts. *Molecular Cell*, 20(6), 891–903. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2005.10.021>
- Burnette, W. N. (1981). “Western blotting”: electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate--polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. *Analytical Biochemistry*, 112(2), 195–203. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(81\)90281-5](https://doi.org/10.1016/0003-2697(81)90281-5)
- Bushati, N., & Cohen, S. M. (2007). microRNA functions. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 23, 175–205. <https://doi.org/10.1146/annurev.cellbio.23.090506.123406>
- Butcher, M. J., & Zhu, J. (2021). Recent advances in understanding the Th1/Th2 effector choice. *Faculty Reviews*, 10, 30. <https://doi.org/10.12703/r/10-30>
- Caiazza, F., Oficjalska, K., Toso, M., Phelan, J. J., Noonan, S., Martin, P., Killick, K., Breen, L., O'Neill, F., Nolan, B., Furney, S., Power, R., Fennelly, D., Craik, C. S., O'Sullivan, J., Sheahan, K., Doherty, G. A., & Ryan, E. J. (2019). KH-Type Splicing Regulatory Protein Controls Colorectal Cancer Cell Growth and Modulates the Tumor Microenvironment. *The American Journal of Pathology*, 189(10), 1916–1932. <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2019.07.004>
- Casolaro, V., Fang, X., Tancow, B., Fan, J., Wu, F., Srikantan, S., Asaki, S. Y., De Fanis, U., Huang, S.-K., Gorospe, M., Atasoy, U. X., & Stellato, C. (2008). Posttranscriptional regulation of IL-13 in T cells: role of the RNA-binding protein HuR. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 121(4), 853-9.e4. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2007.12.1166>
- Charo, I. F., & Ransohoff, R. M. (2006). The many roles of chemokines and chemokine receptors in inflammation. *The New England Journal of Medicine*, 354(6), 610–621. <https://doi.org/10.1056/NEJMr052723>
- Chen, C. Y., & Shyu, A. B. (1995). AU-rich elements: characterization and importance in mRNA degradation. *Trends in Biochemical Sciences*, 20(11), 465–470. [https://doi.org/10.1016/s0968-0004\(00\)89102-1](https://doi.org/10.1016/s0968-0004(00)89102-1)
- Chen, J., Cascio, J., Magee, J. D., Techasintana, P., Gubin, M. M., Dahm, G. M., Calaluze, R., Yu, S., & Atasoy, U. (2013). Posttranscriptional gene regulation of IL-17 by the RNA-binding protein HuR is required for initiation of experimental autoimmune encephalomyelitis. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 191(11), 5441–5450. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1301188>

- Chesné, J., Braza, F., Mahay, G., Brouard, S., Aronica, M., & Magnan, A. (2014). IL-17 in severe asthma. Where do we stand? *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 190(10), 1094–1101. <https://doi.org/10.1164/rccm.201405-0859PP>
- Chien, M.-H., Lee, W.-J., Yang, Y.-C., Li, Y.-L., Chen, B.-R., Cheng, T.-Y., Yang, P.-W., Wang, M.-Y., Jan, Y.-H., Lin, Y.-K., Lee, J.-M., Hsiao, M., Chen, J.-S., & Hua, K.-T. (2017). KSRP suppresses cell invasion and metastasis through miR-23a-mediated EGR3 mRNA degradation in non-small cell lung cancer. *Biochimica et Biophysica Acta. Gene Regulatory Mechanisms*, 1860(10), 1013–1024. <https://doi.org/10.1016/j.bbagr.2017.08.005>
- Chomczynski, P., & Sacchi, N. (1987). Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Analytical Biochemistry*, 162(1), 156–159. <https://doi.org/10.1006/abio.1987.9999>
- Connerty, P., Ahadi, A., & Hutvagner, G. (2015). RNA Binding Proteins in the miRNA Pathway. *International Journal of Molecular Sciences*, 17(1). <https://doi.org/10.3390/ijms17010031>
- Corley, M., Burns, M. C., & Yeo, G. W. (2020). How RNA-Binding Proteins Interact with RNA: Molecules and Mechanisms. *Molecular Cell*, 78(1), 9–29. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2020.03.011>
- Cramer, P. (2019). Organization and regulation of gene transcription. *Nature*, 573(7772), 45–54. <https://doi.org/10.1038/s41586-019-1517-4>
- Cuadrado, A., & Nebreda, A. R. (2010). Mechanisms and functions of p38 MAPK signalling. *The Biochemical Journal*, 429(3), 403–417. <https://doi.org/10.1042/BJ20100323>
- Dan, C., Jinjun, B., Zi-Chun, H., Lin, M., Wei, C., Xu, Z., Ri, Z., Shun, C., Wen-Zhu, S., Qing-Cai, J., & Wu, Y. (2015). Modulation of TNF- α mRNA stability by human antigen R and miR181s in sepsis-induced immunoparalysis. *EMBO Molecular Medicine*, 7(2), 140–157. <https://doi.org/10.15252/emmm.201404797>
- Darnell, J. E. J. (2013). Reflections on the history of pre-mRNA processing and highlights of current knowledge: a unified picture. *RNA (New York, N.Y.)*, 19(4), 443–460. <https://doi.org/10.1261/rna.038596.113>
- Datta, S., Biswas, R., Novotny, M., Pavicic, P. G. J., Herjan, T., Mandal, P., & Hamilton, T. A. (2008). Tristetraprolin regulates CXCL1 (KC) mRNA stability. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 180(4), 2545–2552. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.180.4.2545>
- Dave, P., & Chao, J. A. (2020). Insights into mRNA degradation from single-molecule imaging in living cells. *Current Opinion in Structural Biology*, 65, 89–95. <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2020.06.003>
- Davis-Smyth, T., Duncan, R. C., Zheng, T., Michelotti, G., & Levens, D. (1996). The far upstream element-binding proteins comprise an ancient family of single-strand DNA-binding transactivators. *The Journal of Biological Chemistry*, 271(49), 31679–31687. <https://doi.org/10.1074/jbc.271.49.31679>
- De Filippis, K., Henderson, R. B., Laschinger, M., & Hogg, N. (2008). Neutrophil chemokines KC and macrophage-inflammatory protein-2 are newly synthesized by tissue macrophages using distinct TLR signaling pathways. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 180(6), 4308–4315. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.180.6.4308>
- Dean, J. L. E., Sully, G., Clark, A. R., & Saklatvala, J. (2004). The involvement of AU-rich element-binding proteins in p38 mitogen-activated protein kinase pathway-mediated mRNA stabilisation. *Cellular Signalling*, 16(10), 1113–1121. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2004.04.006>

- Dhamija, S., Kuehne, N., Winzen, R., Doerrie, A., Dittrich-Breiholz, O., Thakur, B. K., Kracht, M., & Holtmann, H. (2011). Interleukin-1 activates synthesis of interleukin-6 by interfering with a KH-type splicing regulatory protein (KSRP)-dependent translational silencing mechanism. *The Journal of Biological Chemistry*, 286(38), 33279–33288. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.264754>
- Díaz-Moreno, I., Hollingworth, D., Kelly, G., Martin, S., García-Mayoral, M., Briata, P., Gherzi, R., & Ramos, A. (2010). Orientation of the central domains of KSRP and its implications for the interaction with the RNA targets. *Nucleic Acids Research*, 38(15), 5193–5205. <https://doi.org/10.1093/nar/gkq216>
- Disteldorf, E. M., Krebs, C. F., Paust, H.-J., Turner, J.-E., Nouailles, G., Tittel, A., Meyer-Schwesinger, C., Stege, G., Brix, S., Velden, J., Wiech, T., Helmchen, U., Steinmetz, O. M., Peters, A., Bennstein, S. B., Kaffke, A., Llanto, C., Lira, S. A., Mittrücker, H.-W., ... Panzer, U. (2015). CXCL5 drives neutrophil recruitment in TH17-mediated GN. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*, 26(1), 55–66. <https://doi.org/10.1681/ASN.2013101061>
- Elkon, R., Ugalde, A. P., & Agami, R. (2013). Alternative cleavage and polyadenylation: extent, regulation and function. *Nature Reviews. Genetics*, 14(7), 496–506. <https://doi.org/10.1038/nrg3482>
- Elton, T. S., Selemon, H., Elton, S. M., & Parinandi, N. L. (2013). Regulation of the MIR155 host gene in physiological and pathological processes. *Gene*, 532(1), 1–12. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2012.12.009>
- Erson-Bensan, A. E. (2016). Alternative polyadenylation and RNA-binding proteins. *Journal of Molecular Endocrinology*, 57(2), F29–34. <https://doi.org/10.1530/JME-16-0070>
- Espel, E. (2005). The role of the AU-rich elements of mRNAs in controlling translation. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 16(1), 59–67. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2004.11.008>
- Fabian, M. R., Sonenberg, N., & Filipowicz, W. (2010). Regulation of mRNA translation and stability by microRNAs. *Annual Review of Biochemistry*, 79, 351–379. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-060308-103103>
- Field, A., & Adelman, K. (2020). Evaluating Enhancer Function and Transcription. *Annual Review of Biochemistry*, 89, 213–234. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-011420-095916>
- Fu, Y., Xiang, Y., Li, H., Chen, A., & Dong, Z. (2022). Inflammation in kidney repair: Mechanism and therapeutic potential. *Pharmacology & Therapeutics*, 237, 108240. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2022.108240>
- Fujita, Y., Masuda, K., Hamada, J., Shoda, K., Naruto, T., Hamada, S., Miyakami, Y., Kohmoto, T., Watanabe, M., Takahashi, R., Tange, S., Saito, M., Kudo, Y., Fujiwara, H., Ichikawa, D., Tangoku, A., Otsuji, E., & Imoto, I. (2017). KH-type splicing regulatory protein is involved in esophageal squamous cell carcinoma progression. *Oncotarget*, 8(60), 101130–101145. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.20926>
- Funes, S. C., Rios, M., Escobar-Vera, J., & Kalergis, A. M. (2018). Implications of macrophage polarization in autoimmunity. *Immunology*, 154(2), 186–195. <https://doi.org/10.1111/imm.12910>
- Furukawa, F., Tanaka, H., Sekita, K., Nakamura, T., Horiguchi, Y., & Hamashima, Y. (1984). Dermatopathological studies on skin lesions of MRL mice. *Archives of Dermatological Research*, 276(3), 186–194. <https://doi.org/10.1007/BF00414018>
- García-Mayoral, M. F., Díaz-Moreno, I., Hollingworth, D., & Ramos, A. (2008). The sequence selectivity of KSRP explains its flexibility in the recognition of the RNA targets. *Nucleic Acids Research*, 36(16), 5290–5296. <https://doi.org/10.1093/nar/gkn509>

- García-Mayoral, M. F., Hollingworth, D., Masino, L., Díaz-Moreno, I., Kelly, G., Gherzi, R., Chou, C.-F., Chen, C.-Y., & Ramos, A. (2007). The structure of the C-terminal KH domains of KSRP reveals a noncanonical motif important for mRNA degradation. *Structure (London, England : 1993)*, 15(4), 485–498. <https://doi.org/10.1016/j.str.2007.03.006>
- Ge, Y., Huang, M., & Yao, Y.-M. (2020). Biology of Interleukin-17 and Its Pathophysiological Significance in Sepsis. *Frontiers in Immunology*, 11, 1558. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.01558>
- Gerstberger, S., Hafner, M., & Tuschl, T. (2014). A census of human RNA-binding proteins. In *Nature reviews. Genetics* (Vol. 15, Issue 12, pp. 829–845). <https://doi.org/10.1038/nrg3813>
- Gherzi, R., Chen, C.-Y., Ramos, A., & Briata, P. (2014). KSRP controls pleiotropic cellular functions. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 34, 2–8. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2014.05.004>
- Gherzi, R., Chen, C.-Y., Trabucchi, M., Ramos, A., & Briata, P. (2010). The role of KSRP in mRNA decay and microRNA precursor maturation. *Wiley Interdisciplinary Reviews. RNA*, 1(2), 230–239. <https://doi.org/10.1002/wrna.2>
- Gherzi, R., Lee, K.-Y., Briata, P., Wegmüller, D., Moroni, C., Karin, M., & Chen, C.-Y. (2004). A KH domain RNA binding protein, KSRP, promotes ARE-directed mRNA turnover by recruiting the degradation machinery. *Molecular Cell*, 14(5), 571–583. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2004.05.002>
- Ghosh, A., & Lima, C. D. (2010). Enzymology of RNA cap synthesis. *Wiley Interdisciplinary Reviews. RNA*, 1(1), 152–172. <https://doi.org/10.1002/wrna.19>
- Giovarelli, M., Bucci, G., Ramos, A., Bordo, D., Wilusz, C. J., Chen, C.-Y., Puppo, M., Briata, P., & Gherzi, R. (2014). H19 long noncoding RNA controls the mRNA decay promoting function of KSRP. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111(47), E5023–8. <https://doi.org/10.1073/pnas.1415098111>
- Graham, J. R., Hendershott, M. C., Terragni, J., & Cooper, G. M. (2010). mRNA degradation plays a significant role in the program of gene expression regulated by phosphatidylinositol 3-kinase signaling. *Molecular and Cellular Biology*, 30(22), 5295–5305. <https://doi.org/10.1128/MCB.00303-10>
- Greber, B. J., & Nogales, E. (2019). The Structures of Eukaryotic Transcription Pre-initiation Complexes and Their Functional Implications. *Sub-Cellular Biochemistry*, 93, 143–192. https://doi.org/10.1007/978-3-030-28151-9_5
- Gruber, A. J., & Zavolan, M. (2019). Alternative cleavage and polyadenylation in health and disease. *Nature Reviews. Genetics*, 20(10), 599–614. <https://doi.org/10.1038/s41576-019-0145-z>
- Gu, C., Wu, L., & Li, X. (2013). IL-17 family: cytokines, receptors and signaling. *Cytokine*, 64(2), 477–485. <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2013.07.022>
- Gulati, K., Gangele, K., Agarwal, N., Jamsandekar, M., Kumar, D., & Poluri, K. M. (2018). Molecular cloning and biophysical characterization of CXCL3 chemokine. *International Journal of Biological Macromolecules*, 107(Pt A), 575–584. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.09.032>
- Guo, J., Lei, M., Cheng, F., Liu, Y., Zhou, M., Zheng, W., Zhou, Y., Gong, R., & Liu, Z. (2020). RNA-binding proteins tristetraprolin and human antigen R are novel modulators of podocyte injury in diabetic kidney disease. *Cell Death & Disease*, 11(6), 413. <https://doi.org/10.1038/s41419-020-2630-x>
- Haberle, V., & Stark, A. (2018). Eukaryotic core promoters and the functional basis of transcription initiation. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 19(10), 621–637. <https://doi.org/10.1038/s41580-018-0028-8>

- Hamilton, T., Novotny, M., Pavicic, P. J. J., Herjan, T., Hartupée, J., Sun, D., Zhao, C., & Datta, S. (2010). Diversity in post-transcriptional control of neutrophil chemoattractant cytokine gene expression. *Cytokine*, 52(1–2), 116–122. <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2010.04.003>
- Hashimoto, H., Vertino, P. M., & Cheng, X. (2010). Molecular coupling of DNA methylation and histone methylation. *Epigenomics*, 2(5), 657–669. <https://doi.org/10.2217/epi.10.44>
- He, L., Liu, J., Collins, I., Sanford, S., O’Connell, B., Benham, C. J., & Levens, D. (2000). Loss of FBP function arrests cellular proliferation and extinguishes c-myc expression. *The EMBO Journal*, 19(5), 1034–1044. <https://doi.org/10.1093/emboj/19.5.1034>
- Herjan, T., Novotny, M., & Hamilton, T. A. (2013). Diversity in sequence-dependent control of GRO chemokine mRNA half-life. *Journal of Leukocyte Biology*, 93(6), 895–904. <https://doi.org/10.1189/jlb.0812370>
- Hirano, T. (2021). IL-6 in inflammation, autoimmunity and cancer. *International Immunology*, 33(3), 127–148. <https://doi.org/10.1093/intimm/dxaa078>
- Hong, S., Healy, H., & Kassianos, A. J. (2020). The Emerging Role of Renal Tubular Epithelial Cells in the Immunological Pathophysiology of Lupus Nephritis. *Frontiers in Immunology*, 11, 578952. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.578952>
- Hsiao, H.-H., Nath, A., Lin, C.-Y., Folta-Stogniew, E. J., Rhoades, E., & Braddock, D. T. (2010). Quantitative characterization of the interactions among c-myc transcriptional regulators FUSE, FBP, and FIR. *Biochemistry*, 49(22), 4620–4634. <https://doi.org/10.1021/bi9021445>
- Huang, J., Xu, X., & Yang, J. (2021). miRNAs Alter T Helper 17 Cell Fate in the Pathogenesis of Autoimmune Diseases. *Frontiers in Immunology*, 12, 593473. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.593473>
- Ishigame, H., Nakajima, A., Saijo, S., Komiyama, Y., Nambu, A., Matsuki, T., Nakae, S., Horai, R., Kakuta, S., & Iwakura, Y. (2006). The role of TNF α and IL-17 in the development of excess IL-1 signaling-induced inflammatory diseases in IL-1 receptor antagonist-deficient mice. *Ernst Schering Research Foundation Workshop*, 56, 129–153. https://doi.org/10.1007/3-540-37673-9_8
- Iwakura, Y., Nakae, S., Saijo, S., & Ishigame, H. (2008). The roles of IL-17A in inflammatory immune responses and host defense against pathogens. *Immunological Reviews*, 226, 57–79. <https://doi.org/10.1111/j.1600-065X.2008.00699.x>
- Jaenisch, R., & Bird, A. (2003). Epigenetic regulation of gene expression: how the genome integrates intrinsic and environmental signals. *Nature Genetics*, 33 Suppl, 245–254. <https://doi.org/10.1038/ng1089>
- Jarczák, D., & Nierhaus, A. (2022). Cytokine Storm-Definition, Causes, and Implications. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(19). <https://doi.org/10.3390/ijms231911740>
- Jiang, P., & Collier, H. (2012). Functional interactions between microRNAs and RNA binding proteins. *MicroRNA (Sharīqah, United Arab Emirates)*, 1(1), 70–79. <https://doi.org/10.2174/2211536611201010070>
- Kaeberlein, M., & Kennedy, B. K. (2008). Protein translation, 2008. *Aging Cell*, 7(6), 777–782. <https://doi.org/10.1111/j.1474-9726.2008.00439.x>
- Käfer, R., Schmidtke, L., Schrick, K., Montermann, E., Bros, M., Kleinert, H., & Pautz, A. (2019). The RNA-Binding Protein KSRP Modulates Cytokine Expression of CD4(+) T Cells. *Journal of Immunology Research*, 2019, 4726532. <https://doi.org/10.1155/2019/4726532>
- Käfer, R., Schrick, K., Schmidtke, L., Montermann, E., Hobernik, D., Bros, M., Chen, C.-Y., Kleinert, H., & Pautz, A. (2017). Inactivation of the KSRP gene modifies collagen antibody induced arthritis. *Molecular Immunology*, 87, 207–216. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2017.05.003>

- Kelley, V. E., & Roths, J. B. (1985). Interaction of mutant *lpr* gene with background strain influences renal disease. *Clinical Immunology and Immunopathology*, 37(2), 220–229. [https://doi.org/10.1016/0090-1229\(85\)90153-9](https://doi.org/10.1016/0090-1229(85)90153-9)
- Khabar, K. S. A. (2017). Hallmarks of cancer and AU-rich elements. *Wiley Interdisciplinary Reviews. RNA*, 8(1). <https://doi.org/10.1002/wrna.1368>
- Khan, D., & Ansar Ahmed, S. (2015). Regulation of IL-17 in autoimmune diseases by transcriptional factors and microRNAs. *Frontiers in Genetics*, 6, 236. <https://doi.org/10.3389/fgene.2015.00236>
- King, P. H., & Chen, C.-Y. (2014). Role of KSRP in control of type I interferon and cytokine expression. *Journal of Interferon & Cytokine Research : The Official Journal of the International Society for Interferon and Cytokine Research*, 34(4), 267–274. <https://doi.org/10.1089/jir.2013.0143>
- Kolls, J. K., & Lindén, A. (2004). Interleukin-17 family members and inflammation. *Immunity*, 21(4), 467–476. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2004.08.018>
- Koopman, W. J., & Gay, S. (1988). The MRL-*lpr/lpr* mouse. A model for the study of rheumatoid arthritis. *Scandinavian Journal of Rheumatology. Supplement*, 75, 284–289. <https://doi.org/10.3109/03009748809096780>
- Kovarik, P., Ebner, F., & Sedlyarov, V. (2017). Posttranscriptional regulation of cytokine expression. *Cytokine*, 89, 21–26. <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2015.11.007>
- Krol, J., Loedige, I., & Filipowicz, W. (2010). The widespread regulation of microRNA biogenesis, function and decay. *Nature Reviews. Genetics*, 11(9), 597–610. <https://doi.org/10.1038/nrg2843>
- Kumar, R., Theiss, A. L., & Venuprasad, K. (2021). ROR γ t protein modifications and IL-17-mediated inflammation. *Trends in Immunology*, 42(11), 1037–1050. <https://doi.org/10.1016/j.it.2021.09.005>
- Lambert, S. A., Jolma, A., Campitelli, L. F., Das, P. K., Yin, Y., Albu, M., Chen, X., Taipale, J., Hughes, T. R., & Weirauch, M. T. (2018). The Human Transcription Factors. *Cell*, 172(4), 650–665. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.01.029>
- Lee, C.-G., Sahoo, A., & Im, S.-H. (2009). Epigenetic regulation of cytokine gene expression in T lymphocytes. *Yonsei Medical Journal*, 50(3), 322–330. <https://doi.org/10.3349/ymj.2009.50.3.322>
- Lee, H. H., Yoon, N. A., Vo, M.-T., Kim, C. W., Woo, J. M., Cha, H. J., Cho, Y. W., Lee, B. J., Cho, W. J., & Park, J. W. (2012). Tristetraprolin down-regulates IL-17 through mRNA destabilization. *FEBS Letters*, 586(1), 41–46. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2011.11.021>
- Lee, Y., & Rio, D. C. (2015). Mechanisms and Regulation of Alternative Pre-mRNA Splicing. *Annual Review of Biochemistry*, 84, 291–323. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-060614-034316>
- Lellek, H., Kirsten, R., Diehl, I., Apostel, F., Buck, F., & Greeve, J. (2000). Purification and molecular cloning of a novel essential component of the apolipoprotein B mRNA editing enzyme-complex. *The Journal of Biological Chemistry*, 275(26), 19848–19856. <https://doi.org/10.1074/jbc.M001786200>
- Li, N., Cao, M., Yi, S., Cheng, J., Wang, L., Tao, Y., Wu, D., Peng, J., Zhang, M., Qi, P., & Zhao, J. (2018). Effects of the RNA-binding protein, KSRP, on innate immune response against *Helicobacter pylori* infection in mice. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 495(2), 1573–1579. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2017.12.016>
- Li, Xiaoxia, Bechara, R., Zhao, J., McGeachy, M. J., & Gaffen, S. L. (2019). IL-17 receptor-based signaling and implications for disease. *Nature Immunology*, 20(12), 1594–1602. <https://doi.org/10.1038/s41590-019-0514-y>

- Li, Xuelin, Lin, W.-J., Chen, C.-Y., Si, Y., Zhang, X., Lu, L., Suswam, E., Zheng, L., & King, P. H. (2012). KSRP: a checkpoint for inflammatory cytokine production in astrocytes. *Glia*, 60(11), 1773–1784. <https://doi.org/10.1002/glia.22396>
- Lin, H., & Carroll, K. S. (2018). Introduction: Posttranslational Protein Modification. In *Chemical reviews* (Vol. 118, Issue 3, pp. 887–888). <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.7b00756>
- Lin, W.-J., Zheng, X., Lin, C.-C., Tsao, J., Zhu, X., Cody, J. J., Coleman, J. M., Gherzi, R., Luo, M., Townes, T. M., Parker, J. N., & Chen, C.-Y. (2011). Posttranscriptional control of type I interferon genes by KSRP in the innate immune response against viral infection. *Molecular and Cellular Biology*, 31(16), 3196–3207. <https://doi.org/10.1128/MCB.05073-11>
- Lindahl, H., & Olsson, T. (2021). Interleukin-22 Influences the Th1/Th17 Axis. *Frontiers in Immunology*, 12, 618110. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.618110>
- Linker, K., Pautz, A., Fechir, M., Hubrich, T., Greeve, J., & Kleinert, H. (2005). Involvement of KSRP in the post-transcriptional regulation of human iNOS expression-complex interplay of KSRP with TTP and HuR. *Nucleic Acids Research*, 33(15), 4813–4827. <https://doi.org/10.1093/nar/gki797>
- Liu, B.-C., Tang, T.-T., Lv, L.-L., & Lan, H.-Y. (2018). Renal tubule injury: a driving force toward chronic kidney disease. *Kidney International*, 93(3), 568–579. <https://doi.org/10.1016/j.kint.2017.09.033>
- Liu, B., Li, J., & Cairns, M. J. (2014). Identifying miRNAs, targets and functions. *Briefings in Bioinformatics*, 15(1), 1–19. <https://doi.org/10.1093/bib/bbs075>
- Liu, J., Qian, C., & Cao, X. (2016). Post-Translational Modification Control of Innate Immunity. *Immunity*, 45(1), 15–30. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2016.06.020>
- Liu, T., Li, S., Ying, S., Tang, S., Ding, Y., Li, Y., Qiao, J., & Fang, H. (2020). The IL-23/IL-17 Pathway in Inflammatory Skin Diseases: From Bench to Bedside. *Frontiers in Immunology*, 11, 594735. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.594735>
- Liu, W., Chou, C.-F., Liu, S., Crossman, D., Yusuf, N., Wu, Y., & Chen, C.-Y. (2019). KSRP modulates melanoma growth and efficacy of vemurafenib. *Biochimica et Biophysica Acta. Gene Regulatory Mechanisms*, 1862(8), 759–770. <https://doi.org/10.1016/j.bbagr.2019.06.005>
- Liu, X., Bushnell, D. A., & Kornberg, R. D. (2013). RNA polymerase II transcription: structure and mechanism. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1829(1), 2–8. <https://doi.org/10.1016/j.bbagr.2012.09.003>
- Loffreda, A., Rigamonti, A., Barabino, S. M. L., & Lenzken, S. C. (2015). RNA-Binding Proteins in the Regulation of miRNA Activity: A Focus on Neuronal Functions. *Biomolecules*, 5(4), 2363–2387. <https://doi.org/10.3390/biom5042363>
- Londoño Jimenez, A., Mowrey, W. B., Putterman, C., Buyon, J., Goilav, B., & Broder, A. (2018). Brief Report: Tubulointerstitial Damage in Lupus Nephritis: A Comparison of the Factors Associated With Tubulointerstitial Inflammation and Renal Scarring. *Arthritis & Rheumatology (Hoboken, N.J.)*, 70(11), 1801–1806. <https://doi.org/10.1002/art.40575>
- Lubberts, E. (2015). The IL-23-IL-17 axis in inflammatory arthritis. *Nature Reviews. Rheumatology*, 11(7), 415–429. <https://doi.org/10.1038/nrrheum.2015.53>
- Mayr, C. (2019). What Are 3' UTRs Doing? *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 11(10). <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a034728>
- Medeiros, N. I., & Gomes, J. A. S. (2019). Cytometric Bead Array (CBA) for Measuring Cytokine Levels in Chagas Disease Patients. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 1955, 309–314. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9148-8_23
- Medzhitov, R. (2008). Origin and physiological roles of inflammation. *Nature*, 454(7203), 428–435. <https://doi.org/10.1038/nature07201>

- Michlewski, G., & Cáceres, J. F. (2019). Post-transcriptional control of miRNA biogenesis. *RNA (New York, N.Y.)*, 25(1), 1–16. <https://doi.org/10.1261/rna.068692.118>
- Miller, M. C., & Mayo, K. H. (2017). Chemokines from a Structural Perspective. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(10). <https://doi.org/10.3390/ijms18102088>
- Min, H., Turck, C. W., Nikolic, J. M., & Black, D. L. (1997). A new regulatory protein, KSRP, mediates exon inclusion through an intronic splicing enhancer. *Genes & Development*, 11(8), 1023–1036. <https://doi.org/10.1101/gad.11.8.1023>
- Miossec, P., & Kolls, J. K. (2012). Targeting IL-17 and TH17 cells in chronic inflammation. *Nature Reviews. Drug Discovery*, 11(10), 763–776. <https://doi.org/10.1038/nrd3794>
- Mockenhaupt, S., & Makeyev, E. V. (2015). Non-coding functions of alternative pre-mRNA splicing in development. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 47–48, 32–39. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2015.10.018>
- Moelants, E. A. V, Mortier, A., Van Damme, J., & Proost, P. (2013). Regulation of TNF- α with a focus on rheumatoid arthritis. *Immunology and Cell Biology*, 91(6), 393–401. <https://doi.org/10.1038/icb.2013.15>
- Mohibi, S., Chen, X., & Zhang, J. (2019). Cancer the 'RBP' eutics-RNA-binding proteins as therapeutic targets for cancer. *Pharmacology & Therapeutics*, 203, 107390. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2019.07.001>
- Moulton, V. R. (2018). Sex Hormones in Acquired Immunity and Autoimmune Disease. *Frontiers in Immunology*, 9, 2279. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.02279>
- Na, H. S., Park, J.-S., Cho, K.-H., Kwon, J. Y., Choi, J., Jhun, J., Kim, S. J., Park, S.-H., & Cho, M.-L. (2020). Interleukin-1-Interleukin-17 Signaling Axis Induces Cartilage Destruction and Promotes Experimental Osteoarthritis. *Frontiers in Immunology*, 11, 730. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.00730>
- Nagasu, A., Mukai, T., Iseki, M., Kawahara, K., Tsuji, S., Nagasu, H., Ueki, Y., Ishihara, K., Kashiwara, N., & Morita, Y. (2019). Sh3bp2 Gain-Of-Function Mutation Ameliorates Lupus Phenotypes in B6.MRL-Fas(lpr) Mice. *Cells*, 8(5). <https://doi.org/10.3390/cells8050402>
- Nechama, M., Peng, Y., Bell, O., Briata, P., Gherzi, R., Schoenberg, D. R., & Naveh-Manly, T. (2009). KSRP-PMR1-exosome association determines parathyroid hormone mRNA levels and stability in transfected cells. *BMC Cell Biology*, 10, 70. <https://doi.org/10.1186/1471-2121-10-70>
- Nozaki, Y. (2020). The Network of Inflammatory Mechanisms in Lupus Nephritis. *Frontiers in Medicine*, 7, 591724. <https://doi.org/10.3389/fmed.2020.591724>
- Nyati, K. K., Agarwal, R. G., Sharma, P., & Kishimoto, T. (2019). Arid5a Regulation and the Roles of Arid5a in the Inflammatory Response and Disease. *Frontiers in Immunology*, 10, 2790. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.02790>
- O'Neil, J. D., Ammit, A. J., & Clark, A. R. (2018). MAPK p38 regulates inflammatory gene expression via tristetraprolin: Doing good by stealth. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 94, 6–9. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2017.11.003>
- Okholm, T. L. H., Sathe, S., Park, S. S., Kamstrup, A. B., Rasmussen, A. M., Shankar, A., Chua, Z. M., Fristrup, N., Nielsen, M. M., Vang, S., Dyrskjøt, L., Aigner, S., Damgaard, C. K., Yeo, G. W., & Pedersen, J. S. (2020). Transcriptome-wide profiles of circular RNA and RNA-binding protein interactions reveal effects on circular RNA biogenesis and cancer pathway expression. *Genome Medicine*, 12(1), 112. <https://doi.org/10.1186/s13073-020-00812-8>
- Palomino, D. C. T., & Marti, L. C. (2015). Chemokines and immunity. *Einstein (Sao Paulo, Brazil)*, 13(3), 469–473. <https://doi.org/10.1590/S1679-45082015RB3438>

- Palzer, K.-A., Bolduan, V., Käfer, R., Kleinert, H., Bros, M., & Pautz, A. (2022). The Role of KH-Type Splicing Regulatory Protein (KSRP) for Immune Functions and Tumorigenesis. *Cells*, 11(9). <https://doi.org/10.3390/cells11091482>
- Passmore, L. A., & Collier, J. (2022). Roles of mRNA poly(A) tails in regulation of eukaryotic gene expression. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 23(2), 93–106. <https://doi.org/10.1038/s41580-021-00417-y>
- Patra, S. K., Patra, A., Rizzi, F., Ghosh, T. C., & Bettuzzi, S. (2008). Demethylation of (Cytosine-5-C-methyl) DNA and regulation of transcription in the epigenetic pathways of cancer development. *Cancer Metastasis Reviews*, 27(2), 315–334. <https://doi.org/10.1007/s10555-008-9118-y>
- Peng, H., Ning, H., Wang, Q., Lai, J., Wei, L., Stumpo, D. J., Blackshear, P. J., Fu, M., Hou, R., Hoft, D. F., & Liu, J. (2020). Tristetraprolin Regulates T(H)17 Cell Function and Ameliorates DSS-Induced Colitis in Mice. *Frontiers in Immunology*, 11, 1952. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.01952>
- Pope, S. D., & Medzhitov, R. (2018). Emerging Principles of Gene Expression Programs and Their Regulation. *Molecular Cell*, 71(3), 389–397. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2018.07.017>
- Porrua, O., Boudvillain, M., & Libri, D. (2016). Transcription Termination: Variations on Common Themes. *Trends in Genetics : TIG*, 32(8), 508–522. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2016.05.007>
- Puppo, M., Bucci, G., Rossi, M., Giovarelli, M., Bordo, D., Moshiri, A., Gorlero, F., Gherzi, R., & Briata, P. (2016). miRNA-Mediated KHSRP Silencing Rewires Distinct Post-transcriptional Programs during TGF- β -Induced Epithelial-to-Mesenchymal Transition. *Cell Reports*, 16(4), 967–978. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2016.06.055>
- Qi, Y.-L., Li, Y., Man, X.-X., Sui, H.-Y., Zhao, X.-L., Zhang, P.-X., Qu, X.-S., Zhang, H., Wang, B.-X., Li, J., Qi, S.-F., Jia, L.-L., Luan, H.-Y., Zhang, C.-B., & Wang, W.-Q. (2020). CXCL3 overexpression promotes the tumorigenic potential of uterine cervical cancer cells via the MAPK/ERK pathway. *Journal of Cellular Physiology*, 235(5), 4756–4765. <https://doi.org/10.1002/jcp.29353>
- Rajaratnam, K., Schnoor, M., Richardson, R. M., & Rajagopal, S. (2019). How do chemokines navigate neutrophils to the target site: Dissecting the structural mechanisms and signaling pathways. *Cellular Signalling*, 54, 69–80. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2018.11.004>
- Ramanathan, A., Robb, G. B., & Chan, S.-H. (2016). mRNA capping: biological functions and applications. *Nucleic Acids Research*, 44(16), 7511–7526. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw551>
- Rauscher, R., & Ignatova, Z. (2015). Tuning innate immunity by translation. *Biochemical Society Transactions*, 43(6), 1247–1252. <https://doi.org/10.1042/BST20150166>
- Ray, A., & Dittel, B. N. (2010). Isolation of mouse peritoneal cavity cells. *Journal of Visualized Experiments : JoVE*, 35. <https://doi.org/10.3791/1488>
- Reyes, N., Figueroa, S., Tiwari, R., & Geliebter, J. (2021). CXCL3 Signaling in the Tumor Microenvironment. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 1302, 15–24. https://doi.org/10.1007/978-3-030-62658-7_2
- Ring, H. Z., Vameghi-Meyers, V., Nikolic, J. M., Min, H., Black, D. L., & Francke, U. (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. <https://doi.org/10.1006/geno.1998.5725>
- Romero-Cordoba, S. L., Salido-Guadarrama, I., Rodriguez-Dorantes, M., & Hidalgo-Miranda, A. (2014). miRNA biogenesis: biological impact in the development of cancer. *Cancer Biology & Therapy*, 15(11), 1444–1455. <https://doi.org/10.4161/15384047.2014.955442>

- Rossi, M., Bucci, G., Rizzotto, D., Bordo, D., Marzi, M. J., Puppo, M., Flinois, A., Spadaro, D., Citi, S., Emionite, L., Cilli, M., Nicassio, F., Inga, A., Briata, P., & Gherzi, R. (2019). LncRNA EPR controls epithelial proliferation by coordinating Cdkn1a transcription and mRNA decay response to TGF- β . *Nature Communications*, 10(1), 1969. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-09754-1>
- Ruggiero, T., Trabucchi, M., Ponassi, M., Corte, G., Chen, C.-Y., al-Haj, L., Khabar, K. S. A., Briata, P., & Gherzi, R. (2007). Identification of a set of KSRP target transcripts upregulated by PI3K-AKT signaling. *BMC Molecular Biology*, 8, 28. <https://doi.org/10.1186/1471-2199-8-28>
- Rutz, S., Kayagaki, N., Phung, Q. T., Eidenschenk, C., Noubade, R., Wang, X., Lesch, J., Lu, R., Newton, K., Huang, O. W., Cochran, A. G., Vasser, M., Fauber, B. P., DeVoss, J., Webster, J., Diehl, L., Modrusan, Z., Kirkpatrick, D. S., Lill, J. R., ... Dixit, V. M. (2015). Deubiquitinase DUBA is a post-translational brake on interleukin-17 production in T cells. *Nature*, 518(7539), 417–421. <https://doi.org/10.1038/nature13979>
- Saiki, R. K., Gelfand, D. H., Stoffel, S., Scharf, S. J., Higuchi, R., Horn, G. T., Mullis, K. B., & Erlich, H. A. (1988). Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science (New York, N.Y.)*, 239(4839), 487–491. <https://doi.org/10.1126/science.2448875>
- Sainsbury, S., Bernecky, C., & Cramer, P. (2015). Structural basis of transcription initiation by RNA polymerase II. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 16(3), 129–143. <https://doi.org/10.1038/nrm3952>
- Salvi, V., Gianello, V., Tiberio, L., Sozzani, S., & Bosisio, D. (2019). Cytokine Targeting by miRNAs in Autoimmune Diseases. *Frontiers in Immunology*, 10, 15. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.00015>
- Sanduja, S., Blanco, F. F., Young, L. E., Kaza, V., & Dixon, D. A. (2012). The role of tristetraprolin in cancer and inflammation. *Frontiers in Bioscience (Landmark Edition)*, 17(1), 174–188. <https://doi.org/10.2741/3920>
- Schinocca, C., Rizzo, C., Fasano, S., Grasso, G., La Barbera, L., Ciccia, F., & Guggino, G. (2021). Role of the IL-23/IL-17 Pathway in Rheumatic Diseases: An Overview. *Frontiers in Immunology*, 12, 637829. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.637829>
- Schmidtke, L., Meineck, M., Saurin, S., Otten, S., Gather, F., Schrick, K., Käfer, R., Roth, W., Kleinert, H., Weinmann-Menke, J., & Pautz, A. (2021). Knockout of the KH-Type Splicing Regulatory Protein Drives Glomerulonephritis in MRL-Fas(lpr) Mice. *Cells*, 10(11). <https://doi.org/10.3390/cells10113167>
- Schmidtke, L., Schrick, K., Saurin, S., Käfer, R., Gather, F., Weinmann-Menke, J., Kleinert, H., & Pautz, A. (2019). The KH-type splicing regulatory protein (KSRP) regulates type III interferon expression post-transcriptionally. *The Biochemical Journal*, 476(2), 333–352. <https://doi.org/10.1042/BCJ20180522>
- Schneider-Poetsch, T., Ju, J., Eyler, D. E., Dang, Y., Bhat, S., Merrick, W. C., Green, R., Shen, B., & Liu, J. O. (2010). Inhibition of eukaryotic translation elongation by cycloheximide and lactimidomycin. *Nature Chemical Biology*, 6(3), 209–217. <https://doi.org/10.1038/nchembio.304>
- Schultz, C. W., Preet, R., Dhir, T., Dixon, D. A., & Brody, J. R. (2020). Understanding and targeting the disease-related RNA binding protein human antigen R (HuR). *Wiley Interdisciplinary Reviews. RNA*, 11(3), e1581. <https://doi.org/10.1002/wrna.1581>
- Seddiki, N., Brezar, V., Ruffin, N., Lévy, Y., & Swaminathan, S. (2014). Role of miR-155 in the regulation of lymphocyte immune function and disease. *Immunology*, 142(1), 32–38. <https://doi.org/10.1111/imm.12227>
- Sehgal, P. B., Darnell, J. E. J., & Tamm, I. (1976). The inhibition by DRB (5,6-dichloro-1-beta-D-ribofuranosylbenzimidazole) of hnRNA and mRNA production in HeLa cells. *Cell*, 9(3), 473–480. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(76\)90092-1](https://doi.org/10.1016/0092-8674(76)90092-1)

- Shapouri-Moghaddam, A., Mohammadian, S., Vazini, H., Taghadosi, M., Esmacili, S.-A., Mardani, F., Seifi, B., Mohammadi, A., Afshari, J. T., & Sahebkar, A. (2018). Macrophage plasticity, polarization, and function in health and disease. *Journal of Cellular Physiology*, 233(9), 6425–6440. <https://doi.org/10.1002/jcp.26429>
- Sidali, A., Teotia, V., Solaiman, N. S., Bashir, N., Kanagaraj, R., Murphy, J. J., & Surendranath, K. (2021). AU-Rich Element RNA Binding Proteins: At the Crossroads of Post-Transcriptional Regulation and Genome Integrity. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(1). <https://doi.org/10.3390/ijms23010096>
- Signor, S. A., & Nuzhdin, S. V. (2018). The Evolution of Gene Expression in cis and trans. *Trends in Genetics : TIG*, 34(7), 532–544. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2018.03.007>
- Siwaszek, A., Ukleja, M., & Dziembowski, A. (2014). Proteins involved in the degradation of cytoplasmic mRNA in the major eukaryotic model systems. *RNA Biology*, 11(9), 1122–1136. <https://doi.org/10.4161/rna.34406>
- Slobodin, B., & Dikstein, R. (2020). So close, no matter how far: multiple paths connecting transcription to mRNA translation in eukaryotes. *EMBO Reports*, 21(9), e50799. <https://doi.org/10.15252/embr.202050799>
- Sokulsky, L. A., Garcia-Netto, K., Nguyen, T. H., Girkin, J. L. N., Collison, A., Mattes, J., Kaiko, G., Liu, C., Bartlett, N. W., Yang, M., & Foster, P. S. (2020). A Critical Role for the CXCL3/CXCL5/CXCR2 Neutrophilic Chemotactic Axis in the Regulation of Type 2 Responses in a Model of Rhinoviral-Induced Asthma Exacerbation. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 205(9), 2468–2478. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1901350>
- Stumpo, D. J., Lai, W. S., & Blackshear, P. J. (2010). Inflammation: cytokines and RNA-based regulation. *Wiley Interdisciplinary Reviews. RNA*, 1(1), 60–80. <https://doi.org/10.1002/wrna.1>
- Teif, V. B., & Bohinc, K. (2011). Condensed DNA: condensing the concepts. *Progress in Biophysics and Molecular Biology*, 105(3), 208–222. <https://doi.org/10.1016/j.pbiomolbio.2010.07.002>
- Tiedje, C., Holtmann, H., & Gaestel, M. (2014). The role of mammalian MAPK signaling in regulation of cytokine mRNA stability and translation. *Journal of Interferon & Cytokine Research : The Official Journal of the International Society for Interferon and Cytokine Research*, 34(4), 220–232. <https://doi.org/10.1089/jir.2013.0146>
- Towbin, H., Staehelin, T., & Gordon, J. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 76(9), 4350–4354. <https://doi.org/10.1073/pnas.76.9.4350>
- Trabucchi, M., Briata, P., Filipowicz, W., Ramos, A., Gherzi, R., & Rosenfeld, M. G. (2011). KSRP Promotes the Maturation of a Group of miRNA Precursors. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 700, 36–42. https://doi.org/10.1007/978-1-4419-7823-3_4
- Uehata, T., & Takeuchi, O. (2020). RNA Recognition and Immunity-Innate Immune Sensing and Its Posttranscriptional Regulation Mechanisms. *Cells*, 9(7). <https://doi.org/10.3390/cells9071701>
- Verbeke, H., Geboes, K., Van Damme, J., & Struyf, S. (2012). The role of CXC chemokines in the transition of chronic inflammation to esophageal and gastric cancer. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1825(1), 117–129. <https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2011.10.008>
- Wang, H., Zhao, X., Yun, W., Chen, L.-H., & Li, S.-T. (2019). Effect of Inhibiting p38 on HuR Involving in β -AChR Post-transcriptional Mechanisms in Denervated Skeletal Muscle. *Cellular and Molecular Neurobiology*, 39(7), 1029–1037. <https://doi.org/10.1007/s10571-019-00698-0>

- Wang, R., & Wang, G. (2019). Protein Modification and Autophagy Activation. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 1206, 237–259. https://doi.org/10.1007/978-981-15-0602-4_12
- Wang, Y., & Pan, L. (2022). Knockdown of CXCL3-inhibited apoptosis and inflammation in lipopolysaccharide-treated BEAS-2B and HPAEC through inactivating MAPKs pathway. *Allergologia et Immunopathologia*, 50(4), 10–16. <https://doi.org/10.15586/aei.v50i4.621>
- Wei, M., Huang, J., Li, G.-W., Jiang, B., Cheng, H., Liu, X., Jiang, X., Zhang, X., Yang, L., Bao, L., & Wang, B. (2021). Axon-enriched lincRNA ALAE is required for axon elongation via regulation of local mRNA translation. *Cell Reports*, 35(5), 109053. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2021.109053>
- Wessel, D., & Flügge, U. I. (1984). A method for the quantitative recovery of protein in dilute solution in the presence of detergents and lipids. *Analytical Biochemistry*, 138(1), 141–143. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(84\)90782-6](https://doi.org/10.1016/0003-2697(84)90782-6)
- White, E. J. F., Matsangos, A. E., & Wilson, G. M. (2017). AUF1 regulation of coding and noncoding RNA. *Wiley Interdisciplinary Reviews. RNA*, 8(2). <https://doi.org/10.1002/wrna.1393>
- Winzen, R., Thakur, B. K., Dittrich-Breiholz, O., Shah, M., Redich, N., Dhamija, S., Kracht, M., & Holtmann, H. (2007). Functional analysis of KSRP interaction with the AU-rich element of interleukin-8 and identification of inflammatory mRNA targets. *Molecular and Cellular Biology*, 27(23), 8388–8400. <https://doi.org/10.1128/MCB.01493-07>
- Xie, Y., & Ren, Y. (2019). Mechanisms of nuclear mRNA export: A structural perspective. *Traffic (Copenhagen, Denmark)*, 20(11), 829–840. <https://doi.org/10.1111/tra.12691>
- Xin, H., Cao, Y., Shao, M.-L., Zhang, W., Zhang, C.-B., Wang, J.-T., Liang, L.-C., Shao, W.-W., Qi, Y.-L., Li, Y., Zhang, Z.-Y., Yang, Z., Sun, Y.-H., Zhang, P.-X., Jia, L.-L., & Wang, W.-Q. (2018). Chemokine CXCL3 mediates prostate cancer cells proliferation, migration and gene expression changes in an autocrine/paracrine fashion. *International Urology and Nephrology*, 50(5), 861–868. <https://doi.org/10.1007/s11255-018-1818-9>
- Yarovinsky, T. O., Butler, N. S., Monick, M. M., & Hunninghake, G. W. (2006). Early exposure to IL-4 stabilizes IL-4 mRNA in CD4⁺ T cells via RNA-binding protein HuR. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 177(7), 4426–4435. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.177.7.4426>
- Yoshizaki, T., Itoh, S., Yamaguchi, S., Numata, T., Nambu, A., Kimura, N., Suto, H., Okumura, K., Sudo, K., Yamaguchi, A., & Nakae, S. (2019). IL-25 exacerbates autoimmune aortitis in IL-1 receptor antagonist-deficient mice. *Scientific Reports*, 9(1), 17067. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-53633-0>
- Zhang, J., & Chen, Q. M. (2013). Far upstream element binding protein 1: a commander of transcription, translation and beyond. *Oncogene*, 32(24), 2907–2916. <https://doi.org/10.1038/onc.2012.350>
- Zhang, Jin, & Chen, X. (2008). Posttranscriptional regulation of p53 and its targets by RNA-binding proteins. *Current Molecular Medicine*, 8(8), 845–849. <https://doi.org/10.2174/156652408786733748>
- Zhang, Y., Sun, Z., Jia, J., Du, T., Zhang, N., Tang, Y., Fang, Y., & Fang, D. (2021). Overview of Histone Modification. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 1283, 1–16. https://doi.org/10.1007/978-981-15-8104-5_1
- Zhao, H., Wang, X., Yi, P., Si, Y., Tan, P., He, J., Yu, S., Ren, Y., Ma, Y., Zhang, J., Wang, D., Wang, F., & Yu, J. (2017). KSRP specifies monocytic and granulocytic differentiation through regulating miR-129 biogenesis and RUNX1 expression. *Nature Communications*, 8(1), 1428. <https://doi.org/10.1038/s41467-017-01425-3>

- Zhao, Q.-Q., Jiang, C., Gao, Q., Zhang, Y.-Y., Wang, G., Chen, X.-P., Wu, S.-B., & Tang, J. (2020). Gene expression and methylation profiles identified CXCL3 and CXCL8 as key genes for diagnosis and prognosis of colon adenocarcinoma. *Journal of Cellular Physiology*, 235(5), 4902–4912. <https://doi.org/10.1002/jcp.29368>
- Zhu, X., & Zhu, J. (2020). CD4 T Helper Cell Subsets and Related Human Immunological Disorders. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(21). <https://doi.org/10.3390/ijms21218011>

9 Anhang

Bioinformatische Analyse aller bis September 2022 in öffentlichen Datenbanken (Pubmed, SRA, Array-Express, Geo, Bioproject) zu findenden totalen Genexpressionsdaten von humanen oder murinen Zellen bzw. Geweben mit herabregulierter KSRP-Expression (siKSRP vs. siCo).

Tabelle 23: Darstellung der Expressionswerte für die in der Arbeit untersuchten Gene in murinen oder humanen Zellen mit durch siRNA herabregulierter KSRP-Expression im Vergleich zu mit Kontroll-siRNA behandelten Zellen

Die Daten stammen aus frei zugänglichen totalgenomischen Expressionsanalysen (RNA-Seq oder Array). FDR = false discovery rate; kD = keine Daten)

Gen	siKSRP vs siCo	FDR p- value	Bioproject / Publikation	Spezies	Zellen	Zelltyp
Humane Zellen						
CXCL1	kD	kD	(Winzen et al., 2007)	human	HeLa	Epithelzellen
CXCL3	kD	kD				
IL-17A	kD	kD				
IL1-RA	kD	kD				
TNF-α	>2	kD				
CXCL1	3,291	0,190	PRJNA608915	human	HepG2	Hepatocyten
CXCL3	0,653	0,042	(Okholm et al., 2020)			
IL-17A	kD	kD				
IL1-RA	kD	kD				
TNF-α	kD	kD				
CXCL1	kD	kD	PRJNA608915	human	K562	Myelomazellen
CXCL3	kD	kD	(Okholm et al., 2020)			
IL-17A	0,362	0,005				
IL1-RA	kD	kD				
TNF-α	kD	kD				
CXCL1	1,000	1,000	PRJNA325776	human	CL1-0	Lungenzellen
CXCL3	0,841	1,000				
IL-17A	0,993	1,000				
IL1-RA	0,958	0,860				
TNF-α	1,007	1,000				
CXCL1	0,546	0,939	PRJNA388429	human	ESCC	Epithelzellen
CXCL3	1,019	0,906	(Fujita et al., 2017)			
IL-17A	0,026	0,814				
IL1-RA	25,643	0,695				
TNF-α	8,388	0,925				
CXCL1	1,000	0,8007	PRJNA395685	human	CL1-0	Lungenzellen
CXCL3	0,847	0,8182				
IL-17A	0,973	0,8573				
IL1-RA	0,959	0,9998				
TNF-α	1,231	0,6646				

CXCL1	1,102	0,882	PRJNA445699	human	SW80	Epithelzellen
CXCL3	1,050	0,814	(Caiazza et al., 2019)			
IL-17A	1,057	0,995				
IL1-RA	1,079	0,845				
TNF-α	1,058	0,811				
Murine Zellen						
CXCL1	0,454	0,279	PRJNA773717	murin	N2A	Neuroblasten
CXCL3	kD	kD				
IL-17A	kD	kD				
IL1-RA	0,373	kD				
TNF-α	0,053	kD				
CXCL1	3,614	kD	AG Pautz/Kleinert	murin	primär	T-Zellen
CXCL3	3,754	0,002				
IL-17A	2,251	0,875				
IL1-RA	1,981	0,999				
TNF-α	0,865	0,999				
CXCL1	0,387	kD	PRJNA312753	murin	NMuMG	Epithelzellen
CXCL3	kD	kD				
IL-17A	kD	kD				
IL1-RA	0,149	kD				
TNF-α	kD	kD				
CXCL1	1,840	0,969	PRJNA312753	murin	NMuMG + TGFb	Epithelzellen
CXCL3	kD	kD				
IL-17A	kD	kD				
IL1-RA	0,176	0,969				
TNF-α	kD	kD				

10 Danksagung

11 Tabellarischer Lebenslauf