

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

Der Einfluss von KSRP auf die IL-5, IL-10 und IL-13 Expression sowie der
Expression des Transkriptionsfaktors c-MAF in T-Lymphozyten

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

Vorgelegt von

Nina Kuhlmann
Mainz

Mainz, 2025

Wissenschaftlicher Vorstand:

Univ.-Prof. Dr. med. Philipp Drees

1. Gutachter:

[REDACTED]

2. Gutachter:

[REDACTED]
[REDACTED]

Tag der Promotion:

01. Dezember 2025

Nachnutzungslizenz:

CC-BY-ND

1 Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	I
Tabellenverzeichnis	II
Abkürzungsverzeichnis	III
Zusammenfassung	1
Ziel der Dissertation	2
2 Literaturdiskussion	4
2.1 Genregulation von Zytokinen und Chemokinen	4
2.2 Aufbau und Lokalisation von KSRP	4
2.3 KSRP-vermittelte Mechanismen der Genregulation	6
2.4 Regulation der KSRP-Aktivität	7
2.4.1 Phosphorylierung	7
2.4.2 Ubiquitination	8
2.4.3 Lange nicht-kodierende RNA	8
2.4.4 Posttranskriptionelle Regulation der KSRP-Aktivität	9
2.5 Die Rolle von CD4 ⁺ Zellen im Kontext des adaptiven und angeborenen Immunsystems	9
2.5.1 Das adaptive Immunsystem	9
2.5.2 Die Funktion der T _H 2-assoziierten Zytokine	10
2.5.3 Das angeborene Immunsystem	11
2.6 Der Transkriptionsfaktor MAF	13
2.6.1 Rollen von c-MAF	13
2.6.2 Lokalisation	14
2.6.3 Aufbau	14
2.6.4 C-MAF im Gesamtkontext der T _H 2-Immunantwort	16
2.7 MiRNA Biogenese	16
2.7.1 Die Funktion der miR-155	16
3 Material	18
3.1 Chemikalien und Lösungen	18
3.2 Weitere Lösungen und Puffer	19
3.3 Oligonukleotide	20
3.4 Antikörper	20
3.5 Marker	21
3.6 Kits	21
3.7 Medien und Medienzusätze	21

Inhaltsverzeichnis

3.8	Zelllinien.....	22
3.9	Laborgeräte	22
3.10	Verbrauchsmaterialien	23
3.11	Software und Internetseiten	24
4	Methodik.....	25
4.1	Zellkultur	25
4.1.1	Eukaryote Suspensionszellen	25
4.1.2	Kultivierung eukaryoter Suspensionszellen.....	25
4.1.3	Kryokonservierung eukaryoter Suspensionszellen	25
4.1.4	Bestimmung der Lebendzellzahl	26
4.1.5	Induktion eukaryoter T-Zellen	26
4.2	Molekularbiologische Methoden.....	27
4.2.1	RNA-Isolation	27
4.2.2	Messung der RNA-Konzentration.....	27
4.2.3	Reverse Transkription von RNA in cDNA	27
4.2.4	Quantitative Real-Time-PCR	28
4.2.5	Agarose-Gelelektrophorese	30
4.2.6	Reverse Transkription von miRNA in cDNA.....	30
4.3	Proteinbiochemische Methoden.....	34
4.3.1	Photometrische Quantifizierung nach Bradford	34
4.3.2	Methanol-/Chloroformfällung von Proteinen.....	34
4.3.3	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-Page)	35
4.3.4	Immundetektion mittels Western Blot	35
4.3.5	Zytokinmessung mittels Cytometric Bead Array (CBA)	37
5	Ergebnisse	38
5.1	Analyse der KSRP-Expression in genetisch veränderten EL4 T-Zellen	38
5.2	Überprüfung der qRT-PCR-Produkte mittels Agarose Gelelektrophorese	40
5.3	Analyse der mRNA-Expression der T _H 2-assoziierten Zytokine IL-5, IL-10, IL-13 in EL4 T-Zellen mit verminderter Expression von KSRP nach Stimulation mit PMA für 24 h.....	41
5.4	Analyse der mRNA-Expression der T _H 2-assoziierten Zytokine IL-5, IL-10, IL-13 in EL4 T-Zellen mit verminderter Expression von KSRP nach Stimulation mit PMA und Ionomycin für 24 h	43
5.5	Analyse der mRNA-Expression der T _H 2-assoziierten Zytokine IL-5, IL-10, IL-13 in EL4 T-Zellen mit verminderter Expression von KSRP nach Stimulation mit PMA und Ionomycin für 48 h	45
5.6	Analyse der mRNA-Expression in EL4 T-Zellen mit verminderter Expression von KSRP bei geringerer Zelldichte am Beispiel IL-10	46

Inhaltsverzeichnis

5.7	Quantitative Analyse der Proteinexpression proinflammatorischer Zytokine mittels CBA in EL4 T-Zellen mit verminderter Expression von KSRP nach Stimulation mit PMA und Ionomycin für 24 h	47
5.8	Quantitative Analyse der Proteinexpression proinflammatorischer Zytokine in EL4 T-Zellen mit verminderter Expression von KSRP nach Stimulation mit PMA und Ionomycin für 48 h	50
5.9	Analyse der miR-155 in EL4 siKSRP T-Zellen.....	51
5.10	Analyse der mRNA-Expression des Transkriptionsfaktors c-MAF in EL4 T-Zellen mit verminderter Expression von KSRP nach Stimulation mit PMA und Ionomycin für 6 h, 24 h und 48 h	52
5.11	Immundetektion des Transkriptionsfaktors c-MAF mittels Western Blot Analyse in EL4 T-Zellen mit verminderter Expression von KSRP	54
6	Diskussion	56
6.1	Grundlage der Arbeit	56
6.1.1	KSRP-Expression in genetisch veränderten EL4 Zellen.....	56
6.1.2	Amplifikationsprodukte im Rahmen der quantitativen mRNA-Bestimmung.....	57
6.2	Der Einfluss von KSRP auf T _H 2-assoziierten Zytokine	57
6.3	Interleukin-5	57
6.3.1	Quantitative IL-5 mRNA-Analyse	57
6.3.2	Quantitative IL-5 Proteinbestimmung.....	58
6.4	Interleukin-10	59
6.4.1	Quantitative IL-10 mRNA-Analyse	59
6.4.2	Quantitative IL-10 Proteinbestimmung	61
6.5	Interleukin-13	62
6.5.1	Quantitative IL-13 mRNA-Analyse	62
6.5.2	Quantitative IL-13 Proteinbestimmung	62
6.6	Wie übt KSRP seinen regulatorischen Einfluss auf T _H 2-assoziierte Zytokine aus	63
6.7	Einfluss von KSRP auf den miRNA-155/c-MAF Signalweg.....	64
7	Literaturverzeichnis	67
	Danksagung	73
	Lebenslauf	74

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematischer Aufbau des Spleißproteins KSRP (16)	5
Abbildung 2: Interaktionsmöglichkeiten des Transkriptionsfaktors c-MAF (55).....	15
Abbildung 3: Überblick über den Aufbau von c-MAF (55)	15
Abbildung 4: Schematische Darstellung einer Reversen Transkription (76)	33
Abbildung 5: Vergleich der KSRP mRNA-Expression in EL4 CO-A Zellen und siKSRP Zellen.....	38
Abbildung 6: Vergleich der KSRP-Proteinkonzentration in EL4 Zellen, CO-A Zellen und siKSRP Zellen mittels Western Blot Analyse	39
Abbildung 7: Kontrolle Amplifikationsprodukte mittels Agarose Gelelektrophorese	40
Abbildung 8: KSRP-abhängige Expression von IL-5, IL-10, IL-13 nach PMA-Stimulation für 24 h .	41
Abbildung 9: KSRP-abhängige Expression von IL-5, IL-10, IL-13 nach P/I Stimulation für 24 h.....	43
Abbildung 10: KSRP-abhängige Expression von IL-5, IL-10, IL-13 nach P/I Stimulation für 48 h...	45
Abbildung 11: Ergebnisse der KSRP-abhängigen Proteinexpression verschiedener Zytokine nach Stimulation mit P/I für 24 h	48
Abbildung 12: Ergebnisse der KSRP-abhängigen Proteinexpression verschiedener Zytokine nach Stimulation mit P/I für 48 h	50
Abbildung 13: KSRP-abhängige miR-155-Expression nach Stimulation mit P/I für 6 h	51
Abbildung 14: KSRP-abhängige c-MAF-Expression nach P/I Stimulation für 6 h, 12 h, 24 h	52
Abbildung 15: KSRP-abhängige Proteinexpression von c-MAF im Rahmen einer Methodenetablierung	54

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Verwendete Chemikalien und Lösungen.....	19
Tabelle 2: Verwendete Lösungen und Puffersysteme	20
Tabelle 3: Verwendete Primer für die Quantitative Real-Time-PCR (Kapitel 4.2.4)	20
Tabelle 4: Verwendete Antikörper in der Immundetektion mittels Western Blot Analyse (Kapitel 4.3.4)	21
Tabelle 5: Verwendete Marker	21
Tabelle 6: Verwendete Kits	21
Tabelle 7: Verwendete Nährmedien und deren Zusätze zur Zellkultivierung (Kapitel: 4.1.3).....	22
Tabelle 8: Verwendete Zelllinien	22
Tabelle 9: Verwendete Laborgeräte.....	23
Tabelle 10: Verwendete Verbrauchsmaterialien	24
Tabelle 11: Verwendete Software und Internetseiten	24
Tabelle 12: Pipettierschema eines Reverse Transkription Ansatzes	28
Tabelle 13: Cyclersprogramm für Reverse Transkription (Tabelle 9)	28
Tabelle 14: Pipettierschema für das SYBR®-Green-System	29
Tabelle 15: Cyclersprogramm für das SYBR®-Green-System.....	29
Tabelle 16: Pipettierschema für das TaqMan-System.....	30
Tabelle 17: Cyclersprogramm für das TaqMan-System mit BlueProbe	30
Tabelle 18: Pipettierschema Poly(A) Schwanz Reaktion	31
Tabelle 19: Cyclersprogramm für Poly(A) Schwanz Reaktion.....	31
Tabelle 20: Pipettierschema Adapterligation	31
Tabelle 21: Cyclersprogramm Adapterligation	31
Tabelle 22: Pipettierschema Reverse Transkription.....	32
Tabelle 23: Cyclersprogramm Reverse Transkription	32
Tabelle 24: Pipettierschema Amplifikationsreaktion	32
Tabelle 25: Cyclereinstellung Amplifikationsreaktion	33
Tabelle 26: Pipettierschema qRT-PCR.....	33
Tabelle 27: Cyclereinstellung qRT-PCR	34
Tabelle 28: Pipettierschema Bradford Eichkurve	34
Tabelle 29: Pipettierschema SDS-Trenngel.....	35
Tabelle 30: Pipettierschema SDS-Sammelgel	35

Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
°C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
AG	Arbeitsgruppe
AK	Antikörper
Akt	Serin/Threonin-Kinase
ALAE	<i>Axon-enriched-long intergenic noncoding RNA</i>
AP-1, Fos/Jun	<i>activating protein-1</i>
APC	Antigen präsentierende Zelle
ARE	Adenin-Uracil-reiches Element
AS	Aminosäure
ATM	<i>Ataxia telangectasia mutated</i>
ATP	Adenosintriphosphat
AU	Arginin, Uracil
Bcl6	<i>B-cell lymphoma 6</i>
BIC	B-Zell-Integrationscluster
bp	Basenpaar
BSA	Rinderserumalbumin
BTK	Bruton-Tyrosinkinase
B-Zelle	B-Lymphozyt
bZIP-Domäne	Basis Leucin Zipper Domäne
C/EBP	<i>CCAAT/Enhancer-Binding-Proteine</i>
CAIA	<i>collagen antibody induced arthritis</i>
CBA	<i>Cytometric Bead Array</i>
CD	<i>cluster of differentiation</i>
cDNA	<i>complementary DNA</i>
c-MAF	<i>Musculoaponeurotic Fibrosarcoma</i>
CNC	<i>Cap'n'Collar transcription factor</i>
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
CREB/ATF	<i>CREB/ATF bZIP transcription factor</i>

Abkürzungsverzeichnis

CT Wert	<i>threshold cycle</i>
C-Terminus	<i>Carboxy Terminus</i>
DCP	<i>Peptidyl-dipeptidase</i>
DDX	<i>DEAD box protein</i>
DEPC	Diethyl-Pyrokarbonat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
E3-Ligase	Ubiquitin-Protein-Ligase
EL4-COA-Zellen	EL4 Kontrollzellen
EL4-siKSRP-Zellen	KSRP defiziente Zellen
EL4-Zellen	Murine T-Lymphozyten
ERK	<i>Extracellular-signal regulated kinase</i>
FAM	Fluorescein
FBXW2	<i>F-box and WD repeat domain containing 2</i>
FCS	Fötales Kälberserum
FoxP3	<i>Forkhead-Box-Protein P3</i>
FUSE	<i>Far upstream sequence element</i>
g	Gramm
γ	gamma
GAP43	<i>growth associated protein 43</i>
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GATA	GATA bindende Proteine
GIT	Guanidiniumisothiocyanat
G-Zahl g	Beschleunigungszahl Zentrifuge
h	Stunde
H ₂ O	Wasser
HuR	<i>Human antigen R</i>
IFN _γ	Interferon-gamma
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
lncRNA	<i>long-non-coding RNA</i>
iNOS	<i>inducible nitric oxid synthase</i>
IRES	<i>Internal ribosomal entry site</i>
IRF3	<i>Interferon regulatory factor 3</i>

Abkürzungsverzeichnis

ITAF	Interne Ribosomen Eintrittsstelle
T _{reg}	Regulatorische T-Zelle
JAK	Januskinase
kb	Kilobase
kDa	Kilodalton
KSRP, KHSRP, FBP2	<i>KH-type splicing regulatory protein</i>
LPS	Lipopolysaccharid
Lys	Lysin
M	Mol
MAP	<i>Mitogen-activated protein</i>
mgl.	möglich
MHC	<i>Major histocompatibility complex</i>
min	Minute
miRNA	<i>microRNA</i>
ml	Milliliter
mM	Millimol
mRNA	<i>messenger RNA</i>
NF- κ B	<i>Nuclear factor κB</i>
nm	Nanometer
NrL	<i>neural retina leucine zipper</i>
N-Terminus	Amino Terminus
nTreg	Regulatorische T-Zelle
O ₂	Sauerstoff
P/I	PMA/Ionomycin
p21, Cdkn1a	<i>cyclin-dependent kinase inhibitor 1</i>
PAMPs	<i>Pathogenassoziierte molekulare Muster</i>
PAR bZip	<i>proline and acidic amino acid-rich basic leucine zipper</i>
PARN	<i>Poly(A)-specific ribonuklease</i>
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase
PMA	Phorbol-12-myristat-13-acetat
PMN	Polymorphkernige Neutrophile
pre-miRNA	Vorläufer der miRNA

Abkürzungsverzeichnis

pri-miRNA	primäre miRNA
PRR	<i>Pattern recognition receptor</i>
qRT PCR	<i>quantitative Real Time PCR</i>
Ran-GTP	<i>Ras-related nuclear protein</i>
RBP	<i>RNA-binding protein</i>
RIG1	<i>Retinoic acid inducible gene 1</i>
RIPA	<i>Radio-Immunoprecipitation Assay</i>
RISC	<i>RNA- induced silencing complex</i>
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
ROR γ t	<i>RAR-related orphan receptor gamma</i>
ROS	<i>Reactive oxygen species</i>
RT	Reverse Transkription
s	Sekunde
S193	Serin 193
SDS	<i>Sodium dodecylsulfate</i>
shRNA	<i>shorthairpin RNA</i>
siRNA	<i>small interfering RNA</i>
SMN	<i>Survival motor neuron protein</i>
STAT	<i>Signal transduction activated transcription factor</i>
SUMO	<i>Small ubiquitin like modifier</i>
T692	Threonin 692
TAE	TRIS-Acetat-EDTA-Puffer
TAMRA	Carboxytetramethylrhodamin
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
T-bet	T-Zell-spezifischer Transkriptionsfaktor
TBK1	<i>TANK binding kinase 1</i>
TBS	Tris-Borsäure-EDTA
T _c -Zelle	Zytotoxische T-Zelle
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TF	Transkriptionsfaktor
T _{FH} -Zelle	Follikuläre T-Helferzelle
TGF	<i>Transforming growth factor</i>
T _H 2-Zelle	Typ-2-T-Helferzelle

Abkürzungsverzeichnis

Th-Zelle	T-Helferzelle
TLR	<i>Toll-like Rezeptor</i>
TNF α	Tumornekrosefaktor-alpha
TSLP	<i>Thymic stromal lymphopoietin</i>
T-Zelle	T-Lymphozyt
UTR	Untranslatierte Region
UV	Ultraviolett
V	Volt
WT	Wildtyp
α	alpha
β	beta

Zusammenfassung

Das Immunsystem des Menschen besteht aus einer angeborenen und adaptiven Immunabwehr. Zytokine spielen im Rahmen einer Immunantwort eine entscheidende regulatorische Rolle. Sie werden von verschiedenen Zellen wie T-Lymphozyten freigesetzt und sind an der Regulation, Differenzierung und Aktivierung von Immunzellen beteiligt. Dabei ist eine strenge Kontrolle des Systems notwendig, um Gewebeschäden und Autoimmunität zu verhindern (1).

Das RNA-bindende Protein KSRP greift über verschiedene Wege in die Genexpression regulatorisch ein (2). Seine Beteiligung an der Regulation der angeborenen Immunantwort ist bereits bekannt (3, 4). Käfer konnte 2019 (5) zum ersten Mal auch einen Nachweis über KSRP-vermittelte Effekte auf Zellen des adaptiven Immunsystems liefern. In murinen T-Lymphozyten, die aus der Milz von KSRP-defizienten Mäusen und Wildtyp Mäusen isoliert wurden, konnte Käfer in den KSRP-defizienten murinen Zellen im Vergleich zu den Wildtyp Zellen eine stärkere Proliferation von CD4⁺ T-Lymphozyten nachweisen. Des Weiteren detektierte er erhöhte Werte der Interleukine 5, 10 und 13 in KSRP-defizienten murinen CD4⁺ T-Zellen. Die erhöhte Expression dieser Zytokine ist mit einer T-Helfer Zell (T_H2) Immunantwort assoziiert.

In dieser Arbeit sollten diese Versuche auf die immortalisierten murine T-Lymphozyten Linie EL4 mit und ohne reduzierte KSRP-Expression übertragen werden. Es sollte getestet werden, ob sich diese Zellen eignen, um KSRP-vermittelte Effekte auf die Expression T_H2-assoziiierter Zytokine zu untersuchen. Dabei zeigten sich abhängig vom Stimulationsmuster und der Stimulationszeit eine erhöhte mRNA-Expression in den EL4 siKSRP Zellen für IL-5 und IL-13 und erniedrigte Werte in der IL-10 mRNA-Expression im Vergleich zu den EL4 Kontrollzellen. In der Proteinanalyse zeigte sich ein erhöhtes IL-5 und IL-13 Expressionsmuster. Im Fall von IL-5 und IL-13 konnte eine KSRP-abhängige Zytokinexpression in immortalisierten EL4 Zellen nachgewiesen werden. Für IL-10 schienen die eingesetzten Zellen kein geeignetes Testsystem darzustellen.

Weiterhin offen war jedoch über welchen molekularen Mechanismus der Einfluss von KSRP auf die T_H2-Immunantwort ausgeübt werden könnte.

Daher wurde in dieser Arbeit der mir-155/MAF Signalweg als möglicher indirekter Regulationsmechanismus von KSRP auf die Expression der T_H2-assoziierten Zytokine behandelt. Laut Literatur fördert KSRP die Reifung der mir-155, welche wiederum den Abbau des Transkriptionsfaktors MAF fördert (6, 7). Im Vergleich zu den Kontrollzellen, konnte in den siKSRP Zellen nach Stimulation überraschenderweise eine erhöhte mir-155-Expression sowie eine reduzierte c-MAF-Expression nachgewiesen werden.

Folglich scheint KSRP die T_H2-Zytokinexpression unabhängig von dem mir-155/MAF Signalweg zu beeinflussen. Der zugrundeliegende molekulare Mechanismus konnte nicht geklärt werden und bedarf weiteren Untersuchungen.

Ziel der Dissertation

Die Immunabwehr des Menschen beruht auf zwei Pfeilern. Das angeborene Immunsystem (Makrophagen, dendritische Zellen etc.) ermöglicht eine rasche unspezifische Reaktion auf Antigene, während die adaptive Immunantwort eine verzögerte, aber antigenspezifische Reaktion durch B- und T-Zellen vermittelt. Die strenge Regulation dieses komplexen Systems ist sowohl für eine effektive Immunantwort zur Abwehr von Pathogenen als auch für eine Hemmung der Immunantwort wichtig, um Folgen einer überschießenden Immunität wie Gewebeschäden oder Autoimmunerkrankungen zu verhindern. Zytokine spielen dabei eine entscheidende regulatorische Rolle. Sie werden von verschiedenen Zellen wie T_H1 und T_H2 -Zellen freigesetzt und sind an der Regulation, Differenzierung und Aktivierung von Immunzellen beteiligt. Die Regulation der Zytokinexpression erfolgt auf transkriptioneller, posttranskriptioneller sowie translationeller Ebene (8, 9).

RNA-bindende Proteine (RBPs) sind von Bedeutung für die posttranskriptionelle Regulation der Expression von Zytokinen auf messenger RNA (mRNA)-Ebene. Die RNA-bindenden Proteine binden bevorzugt an Adenin-Uracil (AU)-reiche Bereiche der 3' untranslatierten Region (3'UTR) der mRNA und üben darüber einen stabilisierenden oder destabilisierenden Effekt auf diese aus. In dieser Dissertation soll sich vermehrt mit dem Einfluss des RNA-bindenden Proteins KSRP beschäftigt werden, welches durch seine destabilisierende Wirkung auf die Zytokin mRNA als Negativregulator zum Zerfall dieser und somit zu einem reduzierten Zytokinpiegel beiträgt (10).

In der Arbeit von Käfer 2019 konnte gezeigt werden, dass entgegen der postulierten Funktion von KSRP und früher durchgeführter Experimente, ein Collagen Antikörper induzierte Arthritis (CAIA) Modell in KSRP-defizienten Mäusen einen milderen Verlauf der Krankheit aufweist. Des Weiteren konnten Hinweise auf die Beteiligung von KSRP an der Regulation der adaptiven Immunabwehr gefunden werden. Das Fehlen der KSRP-Expression in $CD4^+$ T-Zellen führte zu einer T_H2 Polarisation, zu einer erhöhten Proliferationsfähigkeit der Zellen sowie zu einer erhöhten IL-9 Produktion. Eine erhöhte Proliferationsrate konnte ebenfalls in den $CD3/CD28$ aktivierten $CD4^+$ T-Zellen, mit Ursprung aus der Milz von KSRP defizienten (KSRP $-/-$) Mäusen, beobachtet werden. In der Publikation von Käfer 2019 konnte zum ersten Mal ein regulatorischer Einfluss von KSRP auf die Expression der T_H2 -assoziierten Zytokine IL-4, IL-5, IL-10, IL-13, IL-9 sowie $IFN-\gamma$ nach polyklonaler Stimulation der Zellen nachgewiesen werden. Dabei konnte eine direkte Bindung von KSRP an die 3' untranslatierte Region von IL-10 und IL-13, nicht jedoch an die von IL-5 und IL-9 beobachtet werden. Neben putativen direkten KSRP-Effekten legen diese Daten auch einen indirekten regulatorischen Effekt des Proteins auf die adaptive Immunantwort nahe, welcher Gegenstand dieser Arbeit sein wird. Das Zytokin IL-4 gilt sowohl als Hauptregulator der T_H2 Polarisation als auch als Prototyp der Familie der T_H2 -assoziierten Zytokine. Im Vergleich zu den Wildtypzellen führte die polyklonale Stimulation von KSRP $-/-$ $CD4^+$ Zellen zu einer Erhöhung der IL-4-Expression auf mRNA sowie Proteinebene. Daraus lässt sich die Rolle von KSRP als Negativregulator der IL-4-Expression ableiten (5).

Anschließend an die Publikation von Käfer 2019 soll in dieser Dissertation untersucht werden mit Hilfe welcher direkten oder indirekten molekularen Mechanismen KSRP die Expression von T_H2 -abhängigen Zytokinen reguliert. Der Fokus soll hierbei auf der Expression der Zytokine IL-5, IL-10 und IL-13 auf mRNA sowie Proteinebene liegen. Hypothetisch wird davon ausgegangen, dass die Hemmung des KSRP-Gens und die dadurch verminderte Expression von KSRP zu einer Erhöhung des Interleukinspiegels führt. Es soll getestet werden, ob sich die murine T-Zelllinie EL4 für diese Untersuchung eignet.

Ziel der Dissertation

Einen posttranskriptionellen regulatorischen Einfluss besitzen die sogenannten micro RNAs (miRNA), welche selbst nicht für Proteine kodieren und bevorzugt mit den 3´ untranslatierten Regionen ihrer Ziel-mRNAs interagieren. Ein Vertreter dieser Gruppe ist die miR-155, welche in der „BIC“ Region (B-Zell-Integrationscluster) kodiert wird und pleiotrope Funktionen auf das adaptive und angeborene Immunsystem ausübt. Die miR-155 wird in verschiedenen Immunzellen exprimiert (Makrophagen, B-Zellen, T-Zellen) und ist unter anderem an der Entwicklung von regulatorischen T-Zellen sowie an der Differenzierung von CD4⁺ Zellen in T_H1 Zellen beteiligt. Für die Reifung der miR-155 wird das oben beschriebene RNA-bindende Protein KSRP benötigt (7, 11).

Für weitere Erkenntnisse über die Funktion der miR-155, insbesondere im Kontext der posttranskriptionellen Regulation der adaptiven Immunantwort, wird in dieser Dissertation mit Hilfe molekularbiologischer Methoden geprüft, ob die eingesetzten siKSRP T-Zellen in der Lage sind miR-155 zu exprimieren und ob ein Unterschied in der miR-155-Expression zwischen den siKSRP Zellen und den Kontrollzellen besteht. Laut Literatur beeinflusst KSRP die Reifung der miR-155 (11). Die zu untersuchende Hypothese geht davon aus, dass eine verminderte Expression von KSRP eine reduzierte Reifung der miR-155 zur Folge hat, was eine Modulation der Zytokinproduktion zur Folge haben könnte.

Der Transkriptionsfaktor c-MAF hat im menschlichen Körper pleiotrope Funktionen wie beispielsweise als Onkogen, Regulator der Glukagonproduktion und Differenzierung der Linsenfasern. Des Weiteren stellt c-MAF einen wichtigen Immunregulator dar, dessen Rolle zunächst nur als T_H2 Transkriptionsfaktor erforscht wurde, bis man herausfand, dass c-MAF auf fast alle Immunzellen Einfluss nimmt. Insbesondere ist in diesem Kontext der Einfluss auf die Funktion und Differenzierung von CD4⁺ Zellen zu erwähnen (6).

In dieser Arbeit wird erforscht, ob der Transkriptionsfaktor c-MAF in den EL4 siKSRP T-Zellen und Kontrollzellen exprimiert wird und ob ein Unterschied in der c-MAF-Produktion auf mRNA sowie Proteinebene zwischen diesen Zellen besteht. Hintergrund ist die Hypothese, dass es in siKSRP Zellen, durch eine verminderte miR-155-Reifung zu einer vermehrten Expression von c-MAF kommen könnte, die eine veränderte Expression der T_H2-assoziierten Zytokine IL-5, IL-10 und IL-13 zur Folge haben könnte.

2 Literaturdiskussion

2.1 Genregulation von Zytokinen und Chemokinen

Eine strenge, gut funktionierende Kontrolle der Genexpression von an der Immunantwort beteiligten Proteinen, wie Zytokinen und Chemokinen, ist sehr wichtig. Zum einen muss eine schnelle adäquate Immunantwort auf Pathogene erfolgen, zum anderen ist eine Hemmung der Immunantwort notwendig. Somit soll eine überschießende Immunität, die zu Gewebeschäden oder Autoimmunerkrankungen führen kann, verhindert werden. Die Genexpression kann auf verschiedenen Ebenen kontrolliert werden. Dazu zählen die transkriptionelle, posttranskriptionelle und translationale Ebene.

Die transkriptionelle Regulation erfolgt über Transkriptionsfaktoren (TF), welche die Transkriptionsrate des Ziel-Gens regulieren. Beim Menschen sind über 1000 verschiedenen TF bekannt. Sie binden an die Promotorregion oder an das distale Enhancer Element der Ziel-DNA. Als Folge wird entweder die lokale Chromatinstruktur verändert oder der TF interagiert direkt mit der für die Transkription notwendige RNA-Polymerase II. Aufgrund der Vielzahl an regulatorischen TF kann eine Dysfunktion dieser zu pleiotropen Erkrankungen führen (12). Der in dieser Arbeit untersuchte TF c-MAF wird im Verlauf näher betrachtet (Kapitel 2.6).

An der posttranskriptionellen Regulation der Genexpression sind unter anderem RNA-bindende Proteine beteiligt. Diese erkennen cis Elemente in der 3´ untranslatierten Region der mRNA (1) und üben einen regulatorischen Einfluss auf die Reifung vieler proinflammatorischer Mediatoren wie Zytokine aus. Sie regulieren unter anderem den Spleißvorgang, die Polyadenylierung sowie das De-Capping (1). Die mRNA dieser durch RBPs regulierten proinflammatorischen Mediatoren zeichnen sich durch AU-reiche Elemente in ihrem 3´ untranslatierten Sequenzbereich aus. Diese Region wird als Adenin-Uracil reiches Element (ARE) bezeichnet und fungiert als Bindungsstelle für RNA-bindende Proteine. RNA-bindende Proteine können, wie es bei HuR der Fall ist, sowohl eine stabilisierende Wirkung auf die Zytokin mRNA ausüben als auch, wie im Fall von KSRP, eine destabilisierende Wirkung haben (1, 2, 13).

Ein weiterer Regulationsmechanismus auf posttranskriptioneller Ebene wird durch micro RNAs gesteuert. Dabei handelt es sich um nicht kodierende, etwa 22 Nukleotide umfassende Ribonukleinsäuren, welche nach ihrer Reifung als Teil des RISC-Komplexes die mRNA-Expression beeinflusst (10). Micro RNAs sind an der Regulation vieler Gene beteiligt (14). Auf die in dieser Arbeit behandelten mir-155 wird im Verlauf genauer eingegangen (Kapitel 2.7).

2.2 Aufbau und Lokalisation von KSRP

Das an Einzelstrang Nukleinsäure-bindende RBP KSRP findet sich sowohl im humanen als auch im murinen Organismus. Beim Menschen ist es auf Chromosom 19p13.3 lokalisiert und besteht aus 21 Exons sowie einer Sequenz aus 747 Aminosäuren. Das KSRP-Gen der Maus hingegen liegt auf Chromosom 17 und besteht aus 19 Exons und einer Sequenz aus 747 Aminosäuren (15, 16).

Subzellulär findet sich KSRP aufgrund einer am Amino-Terminus (N-Terminus) angehängten Nukleus Lokalisationssequenz (NLS) überwiegend im nukleären Zellkompartiment. KSRP kann jedoch über ein Kern-Zytoplasma Shuttle ins Zytoplasma transportiert werden. Ist die Zelle oxidativem Stress ausgesetzt, akkumuliert KSRP beispielsweise in so genannten Stressgranula im Zytoplasma. Es gibt Hinweise, dass der subzelluläre KSRP-Transport durch das Dead Box

Protein DDX 1 reguliert wird. Steht wenig DDX 1 zur Verfügung, kommt es zu einer vermehrten Interaktion zwischen KSRP und dem 14-3-3 Protein, wodurch die zytoplasmatische KSRP-Konzentration steigt und der ARE-vermittelte mRNA-Abbau gefördert wird (17).

1996 entdeckte das Labor Levens das FUSE Bindeprotein FBP. Es wurden im Laufe der Zeit drei Vertreter dieser Proteinfamilie entdeckt: FBP1, FBP2 und FBP3. Bei FUSE handelt es sich um eine Adenin-Thymin (AT)-reiche Sequenz, die stromaufwärts des c-Myc Promotors liegt und durch Bindung des FBP1 die Transkription des c-Myc Gens reguliert. Des Weiteren fungiert FBP1 als RNA-bindendes Protein und hat unter anderem einen regulatorischen Einfluss auf die Translation (10, 18). Das FUSE Bindeprotein FBP2 wurde zunächst sowohl als Bestandteil des Apolipoprotein B Editierungskomplex als auch im c-scr-Prä-mRNA Spleißkomplex entdeckt (19). 1997 fanden Black und Mitarbeiter schließlich heraus, dass es sich bei dem FUSE Bindeprotein FBP2 funktional und strukturell um das RNA-bindende Protein KSRP handelt (10). Die Funktion von FBP3 ist noch weitgehend unerforscht (20).

Die Grundstruktur des RNA-bindenden Proteins KSRP gliedert sich in drei Teile: einem N-Terminus, einer zentralen Region sowie einem Carboxy-Terminus (C-Terminus). Der N-Terminus besteht aus einer Prolin- und Glycin-reichen Region, einem Kernlokalisierungssignal sowie für die FUSE-vermittelte Regulation eine Protein-Protein Erkennungsstruktur, bei der es sich vermutlich um eine α -Helixstruktur handelt. Der C-Terminus besteht aus einer Glutamin-reichen Region und enthält vier Gamma-reiche Wiederholungen, welche für die c-Myc Transkription notwendig sind. Die zentrale Region des KSRP-Proteins besteht aus vier KH-Domänen. Während die Domäne KH3 hochselektiv an Zielstrukturen mit einer Guanin-reichen Zielsequenz bindet, besitzen die Domänen KH1, KH2 und KH 4 nur eine moderater Selektivität für ihre Zielstruktur. Posttranslationelle Modifikationsstellen befinden sich sowohl im zentralen Teil des Proteins in der KH-Domäne 1 als auch im C-Terminus (10).

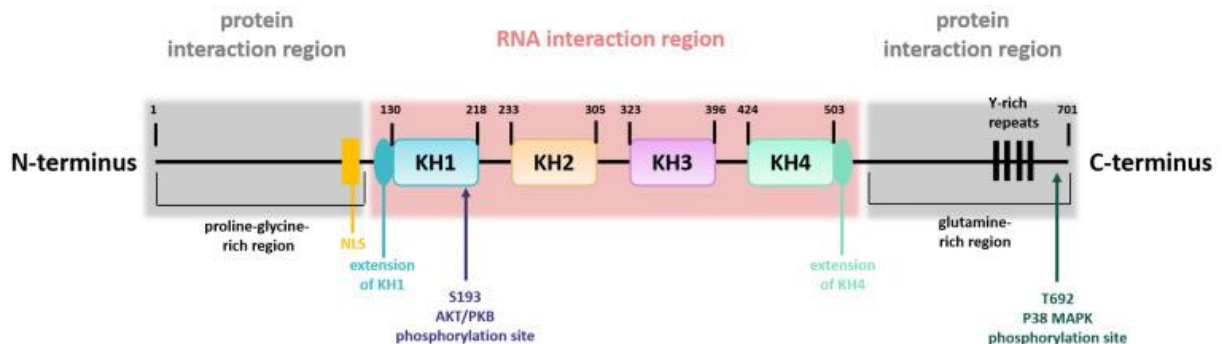


Abbildung 1: Schematischer Aufbau des Spleißproteins KSRP (16)

Abb.: Aufbau des KSRP-Proteins. Der zentrale Bereich des Proteins enthält vier KH-Domänen, welche für die Interaktion mit der Ziel-RNA benötigt werden. Eingfasst wird der zentrale Bereich von einem Prolin und Glycin-reichen N-Terminus sowie einem Glutamin-reichen C-Terminus. Die beiden Termini sind wichtige Strukturen für Protein-Protein Interaktionen. In der Abbildung sind zwei Kinase Bindungsstellen markiert. Eine Phosphorylierung dieser reguliert das RBP KSRP.

2.3 KSRP-vermittelte Mechanismen der Genregulation

KSRP greift über verschiedene Wege regulatorisch in die Genexpression ein.

Eine der wichtigsten Aufgaben von KSRP ist die als RBP. Auf der Ebene der mRNA beeinflusst

KSRP die mRNA-Stabilität proinflammatorischer Mediatoren wie Zytokine und Chemokine.

Gene, die über RNA-bindende Proteine wie KSRP reguliert werden zeichnen sich durch AU-reiche Elemente in ihren 3´ untranslatierten Ende aus, welche als Zielstruktur für RBPs dienen. Von Natur aus sind Zytokin mRNAs, wie die mRNA der T_H2-assoziierten Zytokine IL-5, IL-10 und IL-13 instabil (2).

KSRP wird in der Literatur als Negativregulator der mRNA-Stabilität beschrieben. Das bedeutet, dass durch die Bindung von KSRP an die Ziel-mRNA verschiedene Enzyme rekrutiert werden, die die mRNA abbauen. Dazu zählt zum einen ein Proteinkomplex, der eine 3´-5´ Exonuklease Aktivität aufweist sowie verschiedene Proteine, welche an der mRNA-Degradation beteiligt sind (Decappingenzym Dcp 1/Dcp 2, Poly(A) Ribonuklease PARN, Exosom 17-19) (10).

Die mRNA-abbauenden Enzyme binden an die zentrale Region von KSRP, Domänen KH3 und KH4 (21), welche unabhängig voneinander agieren, sodass eine große Vielfalt an Zielstrukturen entsteht. Die Domäne KH3 übt zusätzlich einen stabilisierenden Effekt auf KH4 aus (19, 22).

Ein vermehrter mRNA-Abbau unter KSRP-Einfluss konnte bei den Genen TNF- α , IL-8, IFN- γ (19, 23) sowie iNOS (24) beobachtet werden.

Als weitere wichtige Funktion fördert KSRP die Reifung von miRNAs, welche eine Guanin-Cytosin (GC)-reiche Schleifenstruktur aufweisen. Zu diesen gehören unter anderem die in dieser Arbeit behandelten mir-155, aber auch let-7a und miR-129 unterliegen der KSRP-abhängigen Reifungskontrolle (16). Die Reifung der miRNAs erfolgt über mehrere Schritte aus Vorläufer miRNAs, welche durch die Enzyme Drosha und Dicer katalysiert und mittels Exportin-5 aus dem Nukleus in das Zytoplasma transportiert werden. KSRP unterstützt diesen Prozess durch Interaktion mit Drosha und Dicer sowie dem Transportprotein Exportin-5 (25).

KSRP scheint nicht nur ARE vermittelt die mRNA proinflammatorischer Proteine zu destabilisieren, sondern auch deren Translation zu hemmen. Dhamija und Kollegen berichten über die Bindung von KSRP an die ARE der 3´ untranslatierten Region der IL-6 mRNA und das daraus resultierende Translations Silencing (26).

Weitere Funktionen von KSRP sind im Nukleus lokalisiert (16).

Die drei Mitglieder der FUSE-Bindeproteinfamilie (Far Upstream Element) FBP1, FBP2 und FBP3 zu denen auch KSRP zählt, binden an FUSE. Sie fungieren als Transkriptionsfaktor und üben einen positiven regulatorischen Effekt auf die Transkription des c-myc Protoonkogens aus, welches eine wichtige Rolle für das Zellwachstum und die Zelldifferenzierung spielt (10).

Des Weiteren besitzt KSRP einen regulatorischen Einfluss auf den Spleißvorgang von Proteinen. So fanden Min Hosung und Kollegen heraus, dass KSRP ein Teil eines Multiproteinkomplexes ist, welcher an eine intronische Spleiß Enhancer Sequenz auf dem c-src N1 Exon bindet und somit den Spleißvorgang des Onkogens c-src reguliert (27).

2.4 Regulation der KSRP-Aktivität

Die Funktion des RBP KSRP wird auf mehreren Ebenen reguliert. Insbesondere auf posttranslatonaler Ebene sind verschiedene Mechanismen der KSRP-Regulation bekannt. Zu ihnen zählen die Phosphorylierung von KSRP durch verschiedene Kinasen, Ubiquitinierung sowie Mechanismen, die durch lange nicht kodierende RNAs (lnc-RNA) vermittelt werden.

2.4.1 Phosphorylierung

Die Aktivierung des Phosphoinositid-3-Kinase/Serin-Threonin-Kinase (PI3K/Akt) -Signalwegs führt dazu, dass das KSRP-Protein an Serin 193 (S193) phosphoryliert, wodurch die Domäne KH1 entfaltet wird. Durch diesen Schritt entsteht eine Bindungsstelle, die durch das Protein 14-3-3 besetzt wird. Die daraus resultierende Proteininteraktion führt zu einer Verschiebung der KSRP-Lokalisation aus dem zytoplasmatischen in den nukleären Raum. KSRP kann im Nukleus nicht länger als Negativregulator die Stabilität von mRNAs mit AREs beeinflussen. Somit führt die Suppression der KSRP-Funktion zu einer erhöhten mRNA-Stabilität. Die Phosphorylierung von KSRP an S193 führt des Weiteren zu einer schlechteren Exosominteraktion. Das betrifft vor allem das Protein Beta-Catenin. Eine verminderte KSRP-Exosominteraktion führt zu einem verminderten Zerfall von Beta-Catenin. Die Konzentration des Protoonkogens steigt. Es wird mit verschiedenen Krebsentitäten in Verbindung gebracht.

Im Rahmen der Muskelzelldifferenzierung hat die Aktivierung des PI3K-AKT-Signalwegs einen gegensätzlichen regulatorischen Einfluss auf KSRP. Es hemmt zum einen die Funktion von KSRP die Myogenin-mRNA abzubauen, zum anderen fördert es die KSRP-Funktion zur Reifung der MyomiRs (2).

Die p38 mitogenaktivierende Proteinkinase (p38 MAP) hat ebenfalls einen regulatorischen Einfluss auf KSRP. Diese phosphoryliert KSRP an der Stelle Threonin 692 (T692) und hemmt dessen Aktivität. Das RBP KSRP führt als Negativregulator wie zuvor beschrieben zu einer Destabilisierung von mRNAs mit AREs wie IL-6 und IL-8.

IL-6 ist an verschiedenen pathologischen Prozessen wie Entzündungsreaktionen, Immunregulation oder der Onkogenese beteiligt.

IL-8 ist ein Bestandteil von Entzündungsreaktionen. Die Aktivierung der p38 MAPK, unter anderem durch IL-1 und LPS (Lipopolysaccharid), hemmt die KSRP-Aktivität und stabilisiert die Ziel-mRNA. Die durch p38 MAPK gehemmte KSRP-Aktivität führt im Rahmen der Muskelzelldifferenzierung zu einer stabilisierenden Wirkung von Myogenin und p21 (26, 28).

Bei der ATM Serin/Threonin Kinase handelt es sich um eine weitere KSRP-regulierende Kinase. Es wurde beobachtet, dass eine DNA-Schädigung die Induktion verschiedener miRNAs zur Folge hat. KSRP interagiert mit den entsprechenden miRNAs und fördert deren Reifung. Eine Phosphorylierung von KSRP erhöht dessen Aktivität. Eine verstärkte miRNA-KSRP-Wechselwirkung und daraus resultierend eine verstärkte miRNA-Reifung ist die Folge (19, 29).

Neben Kinase vermittelter Phosphorylierung und die daraus resultierende posttranslationale Regulation der KSRP-Aktivität, tragen auch Prozesse, die eine Phosphorylierung inhibieren zu einer veränderten KSRP-Funktion bei. Ein Beispiel dafür ist Resveratrol.

Das pflanzliche Polyphenol Resveratrol wirkt antientzündlich. Diese Wirkung ist am ehesten auf seinen regulatorischen Einfluss auf die KSRP-Wirkung zurückzuführen. Resveratrol verhindert die p38 MAPK-vermittelte Phosphorylierung von KSRP, wodurch die Bindung von KSRP an die Ziel-AREs verstärkt wird. Des Weiteren fördert Resveratrol die Exosom-KSRP-Interaktion. Diese beiden Wirkungen erhöhen die Aktivität von KSRP als destabilisierendes mRNA-Bindeprotein

und dienen als Erklärungsmodell für die hemmende Wirkung von Resveratrol auf die entzündungsfördernde Genexpression (30).

2.4.2 Ubiquitination

Ubiquitination ist eine Möglichkeit Proteine durch Kopplung an Ubiquitin zu regulieren. KSRP besitzt die Ubiquinierungsstellen Lysin 109 (Lys), Lys 121 und Lys 122. Das Kelch Protein 12 interagiert dabei mit dem C-Terminus von KSRP. Eine Modifikation der Lysinreste hemmt die KSRP-Aktivität translational. Das hat zur Folge, dass die ihres-abhängige Translation gehemmt wird. IRES steht für interne Ribosomen Eintrittsstellen. Diese können sowohl von Zellen als auch von Viren genutzt werden, um den Prozess der Translation zu fördern (31, 32).

Die Familie der Small ubiquitin like modifier (SUMO) üben eine reversible Proteinmodifikation aus. Sie regulieren die Stabilität, Aktivität und Lokalisation ihrer Zielproteine. Bei KSRP handelt es sich um eines dieser Zielproteine. Dabei bindet SUMO1 KSRP an Stelle K87, was zu einer Hemmung der Interaktion zwischen KSRP und dem pri-miRNA-Drosha-DGCR8-Komplex führt. Folglich steigt die KSRP-Konzentration im nukleären Kompartiment und die KSRP-induzierte miRNA-Reifung wird gehemmt (33).

Des Weiteren fungiert das Protein FBXW2, bei welchem es sich um eine Untereinheit der E3-Ubiquitinligase SCF handelt, als Entzündungsmediator in Makrophagen. KSRP wird von der E3-Ligase modifiziert, was die Funktion von KSRP hemmt und einen proinflammatorischen Effekt zur Folge hat (34).

2.4.3 Lange nicht-kodierende RNA

Lange nicht-kodierende (lnc) RNAs zeichnen sich durch eine Länge von mehr als 200 Nukleotiden aus. Sie sind hauptsächlich im nukleären Zellkompartiment lokalisiert. Über ihre Funktionsweise sind noch einige Fragen ungeklärt. Da lncRNAs schnell abgebaut werden wird diskutiert, ob weniger das RNA-Produkt als mehr der Transkriptionsvorgang der lncRNAs zu deren Funktion beiträgt. Es konnten einige lncRNAs identifiziert werden, die einen regulatorischen Einfluss auf die mRNA-Stabilität durch Interaktion mit KSRP ausüben (35). Die schnelle KSRP-vermittelte mRNA-Degradation wird unter anderem durch die Interaktion von KSRP mit der lncRNA H19 positiv beeinflusst. H19 findet sich nach der Geburt des Menschen nahezu ausschließlich in der Skelettmuskulatur. Die Interaktion zwischen KSRP und H19 konnte in undifferenzierten Maus Myoblasten (C2C12-Zellen) nachgewiesen werden, was wiederum die Interaktion zwischen KSRP und dem Myogenin Transkript fördert und dessen Abbau verstärkt (36).

Die in Epithelgeweben exprimierte lncRNA EPR hat ebenfalls einen regulatorischen Einfluss auf KSRP, was in einem verminderten mRNA-Abbau resultiert. Die Interaktion zwischen KSRP und EPR hemmt die Interaktion zwischen KSRP und der Cyclin-abhängige Kinaseinhibitor mRNA (Cdkn1a). Eine Stabilisierung des mRNA-Transkripts ist die Folge (37).

Die an der Axonentwicklung beteiligte Axon-enriched long intergenic noncoding RNA (ALAE) interagiert mit den KSRP-Domänen KH3 und KH4. Als Folge wird die Bindung von KSRP an die GAP43 mRNA verhindert. Die GAP43 mRNA wird stabilisiert, was die Axonentwicklung fördert (38).

Weitere bekannte lncRNAs, welche die KSRP-Aktivität posttranslational beeinflussen haben

einen hemmenden oder fördernden Effekt auf tumoröse Erkrankungen. Zu diesen zählen die lncRNAs AB074169 (39), LINC01305 (40) und Neat1 (41).

2.4.4 Posttranskriptionelle Regulation der KSRP-Aktivität

Nicht nur auf posttranslationaler, sondern auch auf posttranskriptioneller Ebene sind Faktoren bekannt, welche einen regulatorischen Einfluss auf die KSRP-Expression ausüben. Die Forschung liefert noch keine ausführlichen Ergebnisse über die posttranskriptionelle Regulation von KSRP. Bekannt ist jedoch, dass die micro RNAs miR-206 und miR-27b-3p die KSRP-Expression hemmen, während das RBP HuR und das survival motor neuron protein (SMN) die KSRP-Expression fördern (16).

2.5 Die Rolle von CD4⁺ Zellen im Kontext des adaptiven und angeborenen Immunsystems

2.5.1 Das adaptive Immunsystem

Für eine verzögerte, aber zielgerichtete Immunabwehr gegen Pathogene spielt das adaptive Immunsystem eine herausragende Rolle. Dieses setzt sich aus der zellulären Immunität (zytotoxische CD8⁺ T-Lymphozyten, CD4⁺ T-Helferzellen) sowie der humoralen Immunität (Antikörper produzierende Plasmazellen) zusammen. B-Zellen reifen im Knochenmark heran und differenzieren nach Antigenkontakt zu Gedächtnis- oder Plasmazellen. Bei erneutem Antigenkontakt werden die Gedächtniszellen aktiviert und ermöglichen eine rasche, adaptive Immunantwort. Plasmazellen produzieren antigenspezifische Antikörper zur Pathogenabwehr. T-Zellen reifen im Thymus heran und entwickeln sich entweder zu Gedächtniszellen oder zu Effektorzellen. Zu den T-Effektorzellen zählen neben CD4 exprimierenden T-Helferzellen (T_H-Zellen) auch CD8 tragenden zytotoxische T-Zellen (T_C-Zellen). Zytotoxische Zellen dienen der direkten Elimination infizierter Zellen. Neben der CD-Expression unterscheiden sich T-Zellen untereinander in ihrer Zytokinfreisetzung und der entsprechenden Expression von Transkriptionsfaktoren (8, 42).

CD4⁺ T-Helferzellen sind für die angeborene und adaptive Immunität wichtig. Sie sind an der Induktion von Krankheiten mit allergischer Genese aber auch an Autoimmunerkrankungen beteiligt. Naive T_H-Zellen werden nach der T-Zellrezeptor vermittelten T-Zellaktivierung in T_H1, T_H2, T_H17 oder regulatorische T-Zellen (T_{reg}) differenziert. Welchen Differenzierungsweg die naive T_H-Zelle einschlägt ist von Transkriptionsfaktoren und dem vorherrschenden Zytokinmilieu abhängig zu dem Zeitpunkt, an dem das Pathogen auf die Zelle trifft. Das Zytokinmilieu fördert einen Differenzierungsweg der naiven T_H-Zelle, während es die anderen möglichen Differenzierungswege unterdrückt (9, 43).

T_H2 Zellen dienen der Abwehr extrazellulärer Parasiten wie Helminthen. Zu den T_H2-assoziierten Zytokinen zählen IL-4, IL-5, IL-10, IL-13, IL-9 sowie IL-25. Zur Entwicklung von naiven T_H Zellen in T_H2 Zellen wird neben der Zytokinumgebung bestehend aus IL-2, IL-4, IL-7 und TSLP (Thymisch-stromales Lymphpoietin) auch bestimmte Transkriptionsfaktoren benötigt. Im Falle von T_H2 handelt es sich dabei um GATA3 und STAT6. (9, 43). IL-2 und IL-4 aktivieren STAT5 und STAT6. STAT6 induziert schließlich die Expression des Transkriptionsfaktors GATA3. In vivo ist eine IL-2 unabhängige T_H2-Differenzierung möglich. Bei diesem Prozess können neben GATA3 auch die

Transkriptionsfaktoren c-MAF, STAT3 sowie Notch/CSL einen regulatorischen Einfluss auf T_H2 Zellen ausüben (44).

Regulatorische Zellen benötigen zu ihrer Differenzierung ein Zytokinmilieu aus Transforming growth factor (TGF) und IL-2. Zusammen mit Natürlich vorkommenden regulatorischen Zellen (nTreg) sind sie für die Regulation der Homöostase, der Aktivierung und Funktion von Lymphozyten sowie der Aufrechterhaltung der Immuntoleranz verantwortlich (9, 43).

Naive T_H-Zellen differenzieren sich unter der Anwesenheit von TGF und IL-6 zu T_H17-Zellen. Diese produzieren die Interleukine IL-17a, IL-17f und IL-22. Ihre Funktion besteht in der Abwehr extrazellulärer Pilze und Bakterien (9, 43).

T_H1 Zellen benötigen für ihre Differenzierung die Zytokine IL-12 sowie IFN- γ . T_H1 Zellen produzieren IFN- γ und spielen eine wichtige Rolle in der Immunabwehr bakterieller sowie viraler Infektionen (9, 43).

In der Arbeit von Käfer der AG Pautz wurde zum ersten Mal berichtet, dass das RBP KSRP an der Regulation der T-Zell Antwort beteiligt ist und somit einen Einfluss auf das adaptive Immunsystem auszuüben scheint. Es konnte zum einen gezeigt werden, dass in KSRP defizitären CD 4⁺ Zellen der Abbau der IL-4 mRNA reduziert war. Das charakterisiert die Funktion von KSRP als Negativregulator der IL-4 Expression. Eine Überexpression von IL-4 fungiert als Induktor der T_H2 Polarisation. Zum anderen konnte eine erhöhte Expression von IL-5, IL-9, IL-10 und IL-13 in polyklonal stimulierten KSRP^{-/-} CD4⁺ Zellen im Vergleich zu der Kontrollgruppe nachgewiesen werden, jedoch nur eine direkte Bindung von KSRP an die 3' UTR-Sequenz der IL-10, IL-13 und IFN- γ mRNA (5).

2.5.2 Die Funktion der T_H2-assoziierten Zytokine

In dieser Arbeit lag der Fokus auf den T_H2 assoziierten Zytokinen IL-5, IL-10 und IL-13. Daher wird im Folgenden genauer auf die Funktion dieser drei Vertreter eingegangen.

Das Interleukin 5 wird von verschiedenen Zellen produziert. Dazu gehören unter anderem die in dieser Arbeit behandelten T_H2 Zellen aber auch Zytotoxische T-Zellen und Mastzellen. IL-5 vermittelt zum einen Wachstum und Differenzierung von B-Zellen, zum anderen erhöht es die Zahl der eosinophilen Granulozyten. Die Erhöhung der eosinophilen Granulozyten wird durch eine Vielzahl an Mechanismen umgesetzt. Dabei ist zu nennen, dass IL-5 die Reifung der eosinophilen Zellen induziert, deren Apoptose verzögert und somit das Überleben der Eosinophilen verlängert, die Adhäsion der Zellen an Endothelzellen verstärkt sowie deren Effektorfunktion verbessert. Über diesen Weg ist IL-5 entscheidend an allergischen IgE-vermittelten Erkrankungen wie dem Allergischen Asthma beteiligt.

Die Wirkung von IL-5 wird über Signaltransduktion nach Bindung von IL-5 an den IL-5 Rezeptor, welcher aus einer spezifischen α -Kette (IL-5R α) sowie einer gemeinsamen β -Kette (β c) besteht, ausgelöst. Dabei spielen verschiedene Kinasen eine Rolle. Für die Zellproliferation von eosinophilen Granulozyten sind die Kinasen Janus 2 (JAK2) und Lyn entscheidend, für die IgE-vermittelte Mastzelldegranulation ist besonders die Kinase Raf-1 zu nennen. Auch für die Wirkung von IL-5 auf B-Zellen spielen Kinasen eine wichtige Rolle. Insbesondere die Bruton-Tyrosinkinase (BTK)-Aktivierung trägt zur IL-5-abhängigen B-Zell Signalisierung bei.

IL-5 wiederum verstärkt die Genexpression verschiedener Transkriptionsfaktoren in B-Zellen. Dabei sind unter anderem c-Myc, c-Fos oder c-Jun zu nennen (45, 46).

Das Zytokin IL-10 zeichnet sich durch seine entzündungshemmende Eigenschaft aus. Es trägt zur Begrenzung einer Immunreaktion bei und ist daher wichtig für den Schutz vor Autoimmunerkrankungen.

Zunächst ging man davon aus, dass IL-10 von T_H2 Zellen exprimiert wird. Heute weiß man, dass eine Vielzahl von Zellen, sowohl des angeborenen als auch des adaptiven Immunsystems, in der Lage sind IL-10 zu exprimieren. Für die IL-10-Expression in T_H2 Zellen sind sowohl IL-4, der STAT6-Signalweg als auch die Kinase ERK (Extracellular-signal regulated kinase) notwendig. Die Wirkung von IL-10 wird durch Bindung an den IL-10 Rezeptor vermittelt. Dieser besteht aus einer α (IL10R1) und einer β (IL-10R2)-Kette.

Die IL-10-Expression wird auf verschiedenen Ebenen reguliert. Ähnliche Mechanismen finden sich in verschiedenen Immunzellen wieder. Dazu gehören unter anderem Transkriptionsfaktoren, welche hemmend oder aktivierend auf die Transkription wirken können, sowie posttranskriptionelle Regulation (47, 48).

Das Zytokin IL-13 zeichnet sich durch eine Vielzahl an proinflammatorischen und antiinflammatorischen Funktionen aus. Dabei hat es eine strukturelle Ähnlichkeit mit IL-4. Die Genloci liegen nah beieinander und einige Funktionen der beiden Zytokine sind gleich. IL-13 ist an allergischen Entzündungen sowie Infektionen mit Parasiten beteiligt. Zudem stimuliert es die B-Zellfunktion, induziert Antikörperklassenwechsel von beispielsweise IgE und fördert unter anderem die Fibroblasten-vermittelte Kollagenproduktion.

Zu den antiinflammatorischen Eigenschaften von IL-13 zählen die Hemmung von Chemokinen wie IL-8 sowie die Unterdrückung der T_H1-vermittelten Immunantwort. Des Weiteren hemmt IL-13 sowohl die T_H17 Entwicklung als auch die T_H17-vermittelte Zytokinsekretion. Sezerniert wird IL-13 überwiegend von T_H2 Zellen. Jedoch sind eine Vielzahl an Zellen der angeborenen und adaptiven Immunität in der Lage ebenfalls IL-13 zu sezernieren.

IL-13 kann seine Wirkung durch Bindung an verschiedene Rezeptoren vermitteln. Dazu gehören zum einen der IL-13R α 2 und zum anderen der Typ-II-Rezeptor, welcher aus einem IL-4 (IL-4R) und einem IL-13 (IL-13R) Rezeptor besteht und von beiden Zytokinen aktiviert werden kann. Durch Bindung an den Typ-II-Rezeptor werden verschiedene intrazelluläre Signalwege ausgelöst. In dem Zusammenhang ist die Aktivierung der Januskinase 1 sowie der Tyrosinkinase 1 zu nennen, welche STAT6 phosphorylieren, was die Verschiebung nach intranukleär zur Folge hat. Durch Bindung von IL-4 oder IL-13 an den entsprechenden Rezeptor können weitere intrazelluläre Strukturen wie STAT3, die Phosphoinositid-3-Kinase (PI3K) oder die Mitogen-aktiviertes Protein Kinase (MAPK) aktiviert werden. Die Produktion von IL-13 selbst wird durch verschiedenen Signalwege vermittelt. IL-4 vermittelt kommt es durch eine Phosphorylierung von STAT6 zu einer vermehrten Expression von GATA3. Die Expression von IL-13 ist auch IL-4 unabhängig möglich. Dabei ist der IL-2 abhängige Signalweg STAT5 sowie Notch zu nennen (49).

2.5.3 Das angeborene Immunsystem

Das angeborene Immunsystem dient der schnellen, unspezifischen Abwehr eindringender Pathogene. Zu den angeborenen Immunzellen zählen unter anderem Makrophagen, Neutrophile Granulozyten und Dendritische Zellen. Diese erkennen Pathogen-assoziierte molekulare Muster (PAMPs) und vermitteln eine unspezifische Entzündungsreaktion (50).

Antigen präsentierende Zellen (APC) halten zum einen die angeborene Immunantwort aufrecht, zum anderen dienen sie als Schnittstelle zwischen der angeborenen und adaptiven Immunität. Zu den APC zählen Dendritische Zellen, Makrophagen und B-Zellen. APC besitzen auf ihre Oberfläche Mustererkennungsrezeptoren (PRRs) wie beispielsweise Toll-like Rezeptoren (TLR), welche Pathogen und Schaden-assoziierte molekulare Muster (PAMPs, DAMPs) erkennen und

binden. Durch Bindung der pathogenen Muster an den PRR der APC wird das Pathogen internalisiert, prozessiert und auf der Oberfläche der APC über einen MHC-Komplex präsentiert. Bindet das präsentierte Pathogen an einen T-Zell Rezeptor wird die Zelle aktiviert. Somit moduliert die APC die Aktivierung, Differenzierung und Effektorfunktion der T-Zelle, als Bestandteil der adaptiven Immunität. Es werden zwei verschiedene MHC-Komplexe voneinander unterschieden. Der MHC I-Komplex wird von kernhaltigen Zellen produziert und präsentiert endogene Antigene den CD8⁺ Zellen, während der MHC II-Komplex die Präsentation von Antigenen gegenüber CD4⁺ Zellen vermittelt (8).

Das RBP KSRP wird sowohl in Zellen des angeborenen als auch des adaptiven Immunsystems exprimiert (B-Lymphozyten, T-Lymphozyten, Makrophagen, Dendritische Zellen, Neutrophile Granulozyten). Um den Einfluss von KSRP auf entzündliche Erkrankungen zu untersuchen wurde das CAIA-Mausmodell (Kollagen- Antikörper-induzierte-Arthritis) verwendet, bei welchem insbesondere Neutrophile Granulozyten und Makrophagen als Effektorzellen fungieren. Im Vergleich von CAIA-Mäusen mit Wildtyp Mäusen, zeigten die Wildtyp Mäuse sowohl eine stärkere Krankheitsausprägung als auch eine vermehrte Infiltration von Immunzellen in das entzündete Gewebe. Im Vergleich von Milzzellen aus KSRP-defizitären Mäusen mit denen aus Wildtyp Tieren, zeigten die KSRP-/- Milzzellen eine verminderte Anzahl von myeloischen Zellen sowie eine erhöhte IFN- γ Produktion, was den möglichen Schutz von KSRP-defizitären Mäusen vor der induzierten Arthritis erklären könnte (51).

KSRP übt einen regulatorischen Einfluss auf verschiedene Zellen des angeborenen Immunsystems aus. Die Differenzierung myeloischer Zellen wie Granulozyten, Monozyten und Makrophagen ist wichtig für die primäre, schnelle Abwehr von in den Organismus eindringende Pathogene. Diese wird von KSRP, der miRNA miR-129 und dem Transkriptionsfaktor RUNX 1 (Runt Related Transkriptionsfaktor 1) moduliert.

KSRP bindet an die Vorläuferform pri-miRNA-129 und fördert somit deren Reifung zur miR-129. Durch Interaktion der miR-129 mit dem Transkriptionsfaktor RUNX 1 wird die Funktion von RUNX1 gehemmt. Daraus resultiert eine gegensätzliche Regulation der Zelldifferenzierung. Die Granulopoese wird gefördert, während die Differenzierung in Monozyten und Makrophagen gehemmt wird (52).

Interferone können in drei verschiedene Gruppen eingeteilt werden: IFN1, IFN2 und IFN3. Diese spielen sowohl in der angeborenen als auch adaptiven Immunantwort eine wichtige Rolle. IFN1 und IFN3 werden bei viralen und mikrobiellen Infektionen durch Erkennung von Oberflächen Erkennungsrezeptoren (PRRs) aktiviert. Daraufhin wird intrazellulär der Januskinasen Signalweg (JAK/STAT)-Signalweg aktiviert, was zu einer Induktion der Interferon-stimulierten Gene führt. Die mRNAs der Interferone besitzen wie viele zuvor besprochene proinflammatorische Mediatoren in ihrem 3´ untranslatierten Bereich eine AU-reiche Sequenz, an welche RNA bindende Proteine wie KSRP binden und die RNA-Stabilität modulieren. Die Interferon1 und 3-mRNA wird durch KSRP vermehrt abgebaut (23).

Es ist bekannt, dass IFN1 insbesondere bei einer Virusinfektion stark exprimiert wird. Es wurde beobachtet, dass in Zellen mit KSRP-Knockout die IFN1-Expression anstieg, was zu einem Schutz gegen Herpes Simplex Typ1 und der vesikulären Stomatitis Virusinfektion führte. Das unterstützt die Rolle von KSRP als Negativregulator der IFN1-Expression (3).

Im Rahmen der angeborenen Virusabwehr ist der Retinsäure-induzierbare Gen1 Rezeptor (RIG 1) zu nennen. Er ist in der Lage 5´ Trisphosphat doppelsträngige RNA, welche von verschiedenen Viren produziert wird zu erkennen und zu binden. Die Interaktion zwischen Virus-RNA und Rezeptor induziert wiederum durch Aktivierung des Transkriptionsfaktors IRF3 und der Kinase TBK1/IKK ϵ die IFN1-Produktion. Interferon1 induziert den intrazellulären Signalweg JAK/STAT,

welcher zu einer Induktion der RIG1-Expression führt. Die antivirale angeborene Reaktion wird verstärkt. Um zum einen eine effektive Virusabwehr zu gewährleisten und zum anderen eine überschießende Immunität zu verhindern, ist eine strenge Regulation des RIG1 notwendig. KSRP bindet an die regulatorische Domäne von RIG1, wodurch die Bindung der Virus-RNA mit dem Rezeptor verhindert wird und somit dessen Aktivierung unterdrückt wird (53).

Professionelle mononukleäre Phagozyten fungieren als Teil der angeborenen Immunantwort. Sie töten invasive Pathogene durch Phagozytose mit Hilfe von nichtmikrobiellen Peptiden (z.B. Defensine) und antimikrobieller Sauerstoffspezies (ROS) direkt ab. Zu ihnen zählen neben Makrophagen und Monozyten auch Polymorphkernige Neutrophile (PMN). PMN enthalten je nach Reifegrad primäre (azurophile), sekundäre (spezifische) oder tertiäre (Gelatinase) Granula, welche eingedrungene Pathogene im Blut, Gewebe und Darmlumen abtöten können. Des Weiteren sind sie an Entzündungsreaktionen beteiligt. Sie sezernieren unter anderem Chemokine und proinflammatorische Zytokine. PMN vermitteln somit nicht nur proinflammatorische Effekte, sondern rekrutieren auch Zellen des adaptiven Immunsystems sowie T-Zellen an den Infektionsort (54).

In der AG Pautz wurde beobachtet, dass ein Fehlen von KSRP eine verbesserte Immigration der PMN an die Infektionslokalisierung zur Folge hatte, wodurch ein Einfluss von KSRP auf Polymorphkernige Neutrophile vermutet werden kann (16).

2.6 Der Transkriptionsfaktor MAF

Bei dem zuerst entdeckten Mitglied der Transkriptionsfaktorfamilie MAF handelt es sich um v-MAF als retrovirales Onkogen. C-MAF wurde im Verlauf aus Wirbeltiergenomen kloniert und gilt als zelluläres Gegenstück zu v-MAF.

Die MAF-Familie besitzt in ihrer Funktion als Transkriptionsfaktor vielfältige regulatorische Einflüsse auf die Gewebeentwicklung und Differenzierung. Unterschieden werden zum einen die kleinen MAF-Proteine, zu denen MAF-F, MAF-G, MAF-K, MAF-T und MAF-S zählen, und zum anderen die großen MAF-Proteine. Die großen MAF-Proteine umfassen c-MAF, MAF-A, MAF-B und NrL (neural retina leucine zipper). Sie besitzen im Gegensatz zu den kleinen Proteinen eine Transaktivierungsdomäne an ihrem N-Terminus.

Die MAF-Familie lässt sich wiederum einer Transkriptionsfaktorgruppe zuordnen. Die bZIP (Basis Leucin Zipper)-Familie umfasst neben den MAF-Vertretern auch noch CNC, C/EBP, PAR, CREB/ATF sowie der AP-1 Komplex Fos/Jun. Alle Vertreter der bZIP-Superfamilie besitzen strukturell eine Leucin-Zipper Struktur und haben regulatorischen Einfluss auf die Zellreifung und Differenzierung. Die MAF-Familie besitzt jedoch zusätzlich noch eine DNA-Bindungsdomäne, welche an MAREs der Zielstruktur binden und somit die Vielfalt an spezifischen DNA-Bindungen erhöht. C-MAF bindet insbesondere an die palindromischen Sequenzen T-MARE und C-MARE (55, 56).

2.6.1 Rollen von c-MAF

Mit zunehmendem Forschungsfortschritt zeigte sich, dass der regulatorische Einfluss von MAF in seiner Funktion als Transkriptionsfaktor einen breiten Einfluss auf die Gewebeentwicklung und Differenzierung zu haben scheint. Beispielsweise wird c-MAF in den α -Zellen des Pankreas exprimiert und reguliert die Glucagonexpression durch Stimulation des Glucagonpromotors (57). Des Weiteren ist c-MAF an der Linsenfaserverwicklung sowie der späten Phase der Chondrogenese beteiligt. Im Rahmen der Chondrogenese wird immer wieder auch von dem Transkriptionsfaktor Lc-MAF berichtet. Dabei handelt es sich am ehesten um eine Spleißvariante

von c-MAF mit einer längeren Sequenz und einem unterschiedlichen 3´ Ende (55, 58). Die Arbeitsgruppe Wende und Kollegen fand heraus, dass c-MAF die Entwicklung der Mechanorezeptoren zu steuern scheint (59). Die Ergebnisse der Mausexperimente der AG Imaki und Kollegen weisen auf die Beteiligung von c-MAF an der Leber und Nierenentwicklung hin (60). Zusätzlich scheint der Transkriptionsfaktor auch an der Erythropoese der fetalen Leber beteiligt zu sein (61). Neben seinem umfassenden Einfluss auf die Gewebeentwicklung scheint c-MAF auch eine große Rolle in der Regulation des Immunsystems zu spielen. Es übt einen aktivierenden oder hemmenden Einfluss auf verschiedene T_H2-assoziierte Zytokine wie IL-4, IL-10, IL-21 und IL-22 aus (62). C-MAF scheint die IL-10-Expression zu fördern, IL-22 zu unterdrücken und die IL-17 produzierenden $\gamma\delta$ -T-Zellen aufrechtzuerhalten (63, 64). C-MAF fungiert auch als Onkogen. Die Expression des MAF-Gens konnte sowohl im Multiplen Myelom als auch im T-Zell Lymphom nachgewiesen werden (65).

2.6.2 Lokalisation

Das c-MAF-Gen liegt bei der Maus auf Chromosom 8. Es sind zwei Isoformen des c-MAF-Proteins der Maus bekannt. Eine kurze Form aus 370 Aminosäuren (AS) sowie eine lange aus 380 AS. Das humane c-MAF-Gen ist auf Chromosom 16q 23.2 lokalisiert. Beim Menschen konnten bislang drei Isoformen identifiziert werden: kurz (373 AS), mittel (383 AS) und lang (403 AS). Ob es sich bei den Isoformen lediglich um einen strukturellen oder auch funktionellen Unterschied handelt, ist noch nicht abschließend geklärt (6).

2.6.3 Aufbau

Am C-Terminus des MAF-Proteins befindet sich die Leucin Zipper Domäne, welche sowohl mit anderen bZIP-Proteinen als auch mit nicht Mitgliedern der bZIP-Transkriptionsfaktorfamilie Homo und Heterodimere bildet und über diese Interaktion einen aktivierenden oder hemmenden Einfluss ausübt. Die Leucin Zipper Domäne ist Bestandteil des bZIP-Strukturmotivs, welches gemeinsames Merkmal der bZIP-Transkriptionsfamilie ist, zu der neben MAF auch noch CNC, C/EBP, PAR, CREB/ATF sowie der AP-1 Komplex Fos/Jun gezählt wird. Der N-Terminus des MAF-Proteins wird von einer Transaktivierungsdomäne flankiert, welche sich nur bei den großen aber nicht bei den kleinen Vertretern der MAF-Familie findet. Das bZIP-Strukturmotiv am C-Terminus besteht aus einer 60 bis 80 AS langen α -Helixstruktur mit der Leucin Zipper Domäne sowie einer basischen Region. Die zusätzliche DNA-Bindungsdomäne unterscheidet MAF von den anderen der bZIP-Familie zugehörigen Transkriptionsfaktoren und ermöglicht über die Bindung an MAREs eine größere Auswahl spezifischer Bindungen (55, 66).

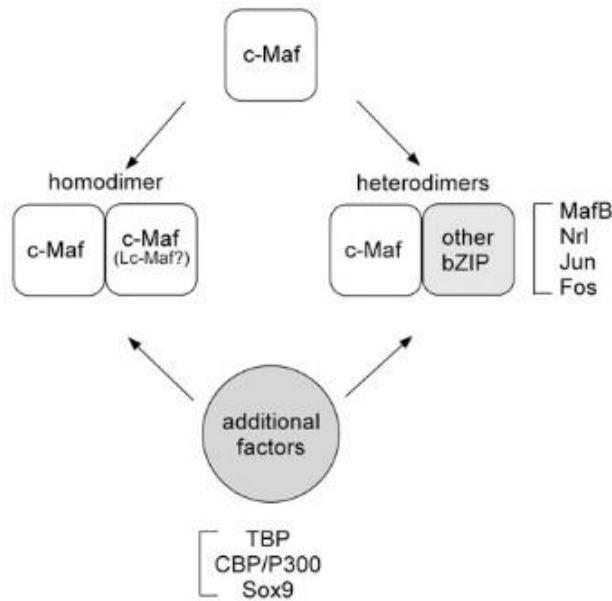


Abbildung 2: Interaktionsmöglichkeiten des Transkriptionsfaktors c-MAF (55)

Die Abbildung gibt einen Überblick über die verschiedenen Interaktionsmöglichkeiten des Transkriptionsfaktors c-MAF. Dieser bildet über seine am C-Terminus lokalisierten Leucin Zipper Domäne Homodimere mit c-MAF-Proteinen oder Heterodimere mit c-MAF oder anderen Vertretern der bZIP-Transkriptionsfamilie. C-MAF interagiert auch mit Faktoren, welche nicht der bZIP-Transkriptionsfamilie zuzuordnen sind.

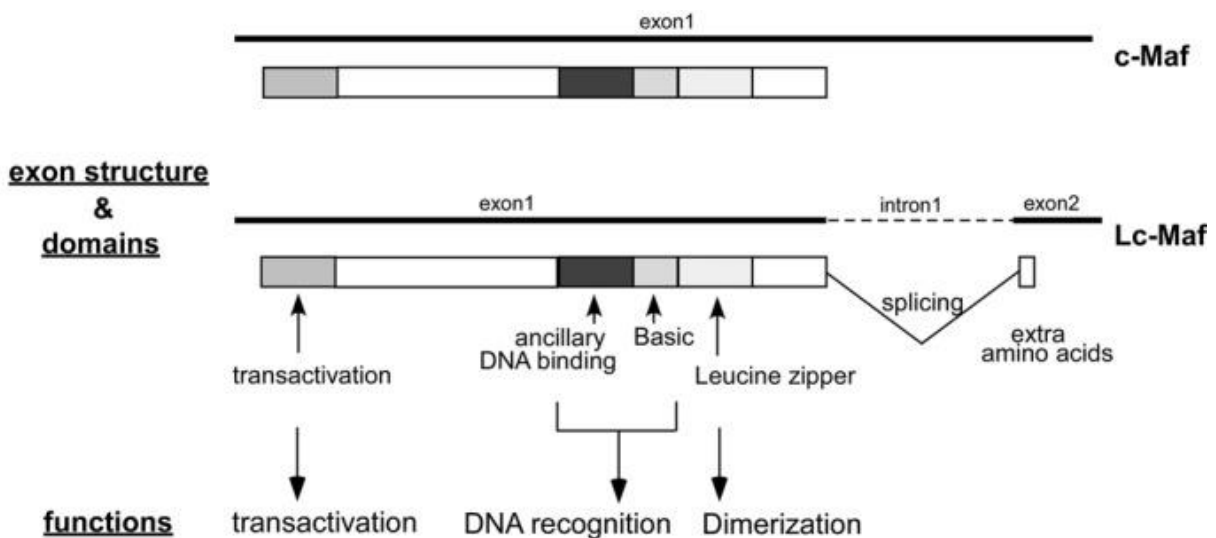


Abbildung 3: Überblick über den Aufbau von c-MAF (55)

Die Abbildung zeigt den Aufbau des Transkriptionsfaktors c-MAF sowie dessen Spleißvariante Lc-MAF, welches eine zusätzliche AS-Sequenz enthält und somit ein verändertes 3' Ende aufweist. Am N-Terminus befindet sich eine Transaktivierungsdomäne, welche sich lediglich bei den Vertretern der großen MAF-Proteine findet. Am C-Terminus ist das bZIP-Strukturmotiv, bestehend aus einer α -Helix, einer Leucin Zipper Domäne sowie einer basischen Region. Mittels des Leucin Zippers bildet es Homo und Heterodimere mit anderen bZIP-Familienmitgliedern sowie nicht der bZIP-Familie angehörigen Transkriptionfaktoren. Die basische DNA-Bindungsdomäne findet sich exklusiv bei den MAF-Proteinen, nicht jedoch bei den anderen bZIP-Familienmitgliedern. Die MAF-Proteine interagieren über die DNA-Bindungsdomäne mit den MAREs der Zielstruktur.

2.6.4 C-MAF im Gesamtkontext der T_H2-Immunantwort

Abhängig von der jeweiligen T_H-Subpopulation führt der TF c-MAF zu unterschiedlichen regulatorischen Effekten. C-MAF gilt als Negativregulator der IL-2 Expression. Des Weiteren fungiert c-MAF als Positivregulator der Expression des T_H2 Leitzytokins IL-4. In der Literatur wird eine direkte Bindung des TF an den IL-4 Genlocus beschrieben (67).

Eine Interaktion ist auch zwischen der IL-10 Promotorregion und dem TF zu beobachten, die eine erhöhte IL-10-Expression zur Folge hat. Das Zytokin IL-10 übt einen entzündungshemmenden Effekt aus und verhindert somit eine übermäßige entzündliche Reaktion im Rahmen eines Infekts. Der Transkriptionsfaktor c-MAF erhöht die Expression von IL-10 in vivo. Eine ausreichende IL-10-Expression scheint sowohl über einen direkten als auch über einen indirekten Einfluss von c-MAF ausgeübt zu werden. C-MAF bindet zum einen direkt an das MARE-Motiv in der IL-10 Promotorregion, zum anderen kommt es zu einer Interaktion mit anderen Transkriptionsregulatoren. Bei den Transkriptionsregulatoren scheinen insbesondere STAT6, GATA3 und IRF4 eine Rolle zu spielen. Eine direkte Bindung an den Genlocus der weiteren T_H2-assoziierten Zytokine IL-5 und IL-13 wird nicht beschrieben. (6).

In der Literatur wird über die Regulation von c-MAF durch miR-155 berichtet (6). In der 3' UTR von c-MAF wurde ein konservierter miR-155 Seed Match gefunden, an den miR-155 bindet und die c-MAF Expression negativ beeinflusst (7).

2.7 MiRNA Biogenese

Micro RNAs (miRNA) sind kleine, nicht codierende etwa 22 Nukleotide umfassende Ribonukleinsäuren, die erstmals im Fadenwurm entdeckt wurden (68) .

Die Reifung der miRNAs erfolgt meist über den durch die RNase Enzyme Drosha und Dicer katalysierten kanonischen Weg. Im Nukleus katalysiert Drosha die Umwandlung der Vorläuferstufen pri-miRNA in die pre-miRNA. Die pre-miRNA bindet an das Exportin-5 sowie das Ran-GTP und wird so in das zytoplasmatische Kompartiment transportiert. Im Zytoplasma fördert Dicer die Umwandlung von der pre-miRNA in die Reife miRNA. Diese wird im Anschluss in den RNA-Induced-Silencing-Komplex (RISC) geladen (10).

MiRNAs üben einen posttranskriptionellen regulatorischen Effekt auf die Ziel-mRNA aus, indem sie die mRNA-Translation und mRNA-Stabilität im Zytoplasma beeinflussen. Somit sind miRNAs an vielen malignen und nicht-malignen Prozessen beteiligt (69). Es wird davon ausgegangen, dass es über 2000 miRNAs beim Menschen gibt und etwa 60% der Gene über miRNAs einen regulatorischen Einfluss erfahren. Eine miRNA hat vermutlich eine Wirkung auf viele Ziel-mRNAs und andersrum wird eine mRNA wahrscheinlich von vielen miRNAs reguliert. Das verdeutlicht die breite Wirkung dieser Ribonukleinsäuren (14).

2.7.1 Die Funktion der miR-155

Das RNA-bindende Protein KSRP übt einen regulatorischen Einfluss auf die miRNA Biogenese aus. Als Teil des Drosha-Dicer Komplex bindet KSRP an die GC-reichen Schleifen der Vorläufer miRNA und fördert deren Reifung. Über diesen Weg übt KSRP einen indirekten Einfluss auf zelluläre Prozesse wie Proliferation, Apoptose und Differenzierung aus (25).

Die miRNA-155 gehört zu den durch KSRP regulierten miRNAs. Sie wird aus dem B-Zell Integrationscluster (BIC) prozessiert. Exprimiert wird die miRNA-155 in aktivierten B- und T-Zellen, Monozyten sowie Makrophagen (14).

Literaturdiskussion

Die miRNA-155 hat einige immunologische Funktionen. Sie ist an der Differenzierung hämatopoetischer Zellen beteiligt, hat in B-Zellen einen regulatorischen Einfluss auf deren Differenzierung, Reifung und Antikörperklassenwechsel. Des Weiteren beeinflusst die miRNA-155 die T-Zell Polarisation und die Entwicklung regulatorischer T-Zellen.

KSRP beeinflusst auch andere micro RNA-Gruppen. Dazu gehört unter anderem die miRNA-129. Sie fördert die Polarisation von Makrophagen, ist an der Proliferation von CD4⁺ Zellen beteiligt und hemmt den Transkriptionsfaktor RUNX, welcher eine Rolle in der Differenzierung von Monozyten und neutrophilen Granulozyten eine Rolle spielt (16). Auch die zuerst entdeckte miRNA Let-7 wird durch KSRP reguliert und hat neben seiner Funktion als Tumorsuppressor auch immunologischen Einfluss. Let-7a fördert die IL-6-Expression durch Makrophagen und prägt den immunologischen Phänotyp in Makrophagen unter hypoxischen Bedingungen (16, 70).

3 Material

3.1 Chemikalien und Lösungen

Produkt	Hersteller
Agarose	Eurogentee
Ammoniumperoxidsulfat (APS)	AppliChem
Bovine Serum Albumin (BSA)	AppliChem
Bradford-Reagenz	Bio-Rad
Bromphenolblau	AppliChem
Chloroform	AppliChem
Detection Reagent 1 (Peroxide Solution)	Thermo Fisher Scientific
Detection Reagent 1 (Peroxide Solution)	Rockland
Detection Reagent 2 (Luminol Enhancer Solution)	Thermo Fisher Scientific
Detection Reagent 2 (Luminol Enhancer Solution)	Rockland
Diethyl-Pyrokarbonat (DEPC)	Roth
Dimethylsulfoxid (DMSO)	AppliChem
dNTPs (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) 100mM	VWR
Dithiothreitol (DTT)	AppliChem
Eisessig	Merck KGaA
Entwicklerflüssigkeit	Carestream Health
Ethanol	AppliChem
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	AppliChem
Fixiererflüssigkeit	Agfa
Gel Ladepuffer (6x) purple	Biolabs
Glycerin	Roth
Glycin	AppliChem
Guanidiniumisothiocyanat (GIT)	Roth
IGEPAL® CA-630 (NP-40)	Sigma-Aldrich
Isopropanol (2-Propanol)	AppliChem
Magermilchpulver	AppliChem
Methanol	AppliChem
N-Laurylsarcosin	AppliChem
N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine (TEMED)	AppliChem
Natriumacetat	Roth
Natriumchlorid (NaCl)	Roth
Natriumcitrat	AppliChem
Phosphat-gepufferte Salzlösung (PBS)	Sigma
Phosphatase Inhibitor Cocktail 2,3	Sigma-Aldrich
Ponceau S	Roth
Roti®-Aqua- Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol (für RNA-Isolation)	Roth
Rotiphorese®Gel 30 (Acrylamid)	Roth
RotiSafe	Roth
Salzsäure	AppliChem
Sodium dodecylsulfate (SDS) ultra pure	Roth

Material

Tris	Roth
Trypanblau 0,4 %	Serva
Tween® 20	Roth
Xylencyanol	AppliChem
β-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich und Gibco

Tabelle 1: Verwendete Chemikalien und Lösungen

3.2 Weitere Lösungen und Puffer

Bezeichnung	Anwendungsgebiet	Zusammensetzung
Blottingpuffer	Immundetektion mittels Western Blot (Kapitel 4.3.4)	25mM Tris 192mM Glycin 20% Methanol
DEPC- H ₂ O	RNA-Isolation (Kapitel 4.2.1)	200 µl Diethyl-Pyrokarbonat (DEPC) angesetzt in 1 l Millipore H ₂ O (autoklaviert)
DNA-Ladepuffer (10x)	Agarose Gelelektrophorese (Kapitel 4.2.5)	0,1% Bromphenolblau 0,1% Xylencyanol 50% Glycerin
GIT-Puffer	Zelllyse bei RNA-Analyse (Kapitel 4.1.5)	4 M Guanidiniumisothiocyanat 25 mM Natriumcitrat, pH 7,0 0,5% N-Laurylsarcosine 0,1 M β-Mercaptoethanol
Laemmli-Puffer (2x)	Methanol/Chloroformfällung von Proteinen (Kapitel 4.3.2)	5x Laemmli-Puffer Millipore-H ₂ O 100µl DTT/ml
Laemmli-Puffer (5x)	Immundetektion mittels Western Blot (Kapitel 4.3.4)	312,5 mM Tris-HCl pH 6,8 5 mM EDTA 15% SDS 0,015% Bromphenolblau 50% Glycerin vor Gebrauch Zugabe 40 mM DTT
Laufpuffer (5x) (pH 8,3)	Immundetektion mittels Western Blot (Kapitel 4.3.4)	124 mM Tris 960 mM Glycin 17,3 mM SDS
Millipore- H ₂ O	Bradford Analyse (Kapitel 4.3.1)	Destilliertes, Nuklease-freies, deionisiertes Wasser
PCR- H ₂ O	PCR (Kapitel 4.2.3, 4.2.4, 4.2.6)	Braun
Ponceau S Färbelösung	Immundetektion mittels Western Blot (Kapitel 4.3.4)	0,5% Ponceau S 1% Eisessig
RIPA-Puffer	Zelllyse bei proteinbiochemischer Analyse (Kapitel 4.1.5) Bradford Analyse (Kapitel 4.3.1) Methanol/Chloroformfällung von Proteinen (Kapitel 4.3.2)	50 mM Tris/HCl, pH 7,4 150 mM Natriumchlorid 1% NP-40/IGEPAL 2 mM EDTA 10% Glycerin Zugabe der Protease- &

Material

		Phosphatase-Inhibitoren kurz vor Gebrauch
TAE- Puffer (0,8x) mit Rotisafe	Agarose Gelelektrophorese (Kapitel 4.2.5)	0,8x TAE-Puffer 30µl/l Rotisafe kurz vor Gebrauch
TAE-Puffer (10x)	Agarose Gelelektrophorese (Kapitel 4.2.5)	400 mM Tris/Natriumhydroxid, pH 8,0 1,14 % Essigsäure 20 mM EDTA
TBS (10x)	Immundetektion mittels Western Blot (Kapitel 4.3.4)	10 mM Tris/Salzsäure, pH 7,8 150 mM Natriumchlorid
TBST-Puffer	Immundetektion mittels Western Blot (Kapitel 4.3.4)	0,1% Tween® 20 10% TBS, 10x
Transfer- Puffer	Immundetektion mittels Western Blot (Kapitel 4.3.4)	25 mM Tris/HCl, pH 8,3 960 mM Glycin 20% Methanol

Tabelle 2: Verwendete Lösungen und Puffersysteme

3.3 Oligonukleotide

Bezeichnung	5'-Primer (forward)	3'-Primer (reverse)
mu IL-5	GCTCTGTTGACAAGCAATGAGACG	CTCTTGCAGGTAATCCAGGAACTG
mu IL-10	CCCTGGGTGAGAAGCTGAAG	CGGAGAGAGGTACAAACGAGG
mu IL-13	AGACCAGACTCCCCTGTGCA	TGGGTCTGTAGATGGCATTG
mu cMAF 4	AGCAGTTGGTGACCATGTCG	TGGAGATCTCCTGCTTGAGG
KSRP+/-	GGGCTGCCTACTACTCTCAC	CCACTTGTGCTTGCTTCTTG
Bezeichnung Haushaltsgene	5'-Primer (forward)	3'-Primer (reverse)
mu GAPDH	TTCACCACCATGGAGAAGGC	GGCATGGACTGTGGTCATGA
hu6U	TCGCTTCGGCAGCACATATAC	TTTGCCTGTCATCCTTGCC

Tabelle 3: Verwendete Primer für die Quantitative Real-Time-PCR (Kapitel 4.2.4)

3.4 Antikörper

Antikörper	Größe (kDa)	Herkunft	Hersteller	Verdünnung	Blockier/-Verdünnung slösung
Primärantikörper KSRP-WB Kontrolle					
GAPDH	37	Hase	Cell Signaling Technology	1: 1000	1% BSA in TBST
KSRP	75	Hase	Novus Biologicals	1: 1000	1% BSA in TBST
Primärantikörper c-MAF WB Analyse					
c-MAF	50	Hase	Cusabio Technology	1: 500	1% BSA, 3% Milchpulver in TBST

Material

GAPDH	37	Maus	Santa Cruz Techno-logy	1: 2000	1% BSA, 3% Milchpulver in TBST
Sekundärantikörper					
Anti-mouse		Maus	Sigma	1: 10000	1% BSA, 3% Milchpulver in TBST
Anti-rabbit		Hase	Sigma	1: 5000 1: 10000	1% BSA, 3% Milchpulver 1% BSA in TBST

Tabelle 4: Verwendete Antikörper in der Immundetektion mittels Western Blot Analyse (Kapitel 4.3.4)

3.5 Marker

Bezeichnung	Produktname	Hersteller	Anwendungsgebiet
DNA-Marker	GeneRuler 1kb (250-10000 bp)	Thermo Scientific	Agarose Gelelektrophorese (Kapitel 4.2.5)
RNA-Marker	Protein Marker VI (10-245) prestained	AppliChem	Immundetektion mittels Western Blot (Kapitel 4.3.4)

Tabelle 5: Verwendete Marker

3.6 Kits

Bezeichnung	Hersteller
BlueProbe qRT Mix	Biozym
dNTP set 100 mM (dATP, DCTP, DGTP, dTTP)	appliedbiosystems
M-MulV Reverse Transkriptase	NEB
Mouse Cytokine Flex Set (CBA) IL-1b, IL-2, IL-4, IL-5, IL-9, IL-10, IL-13, IL-17a, TNF- α , IFN- γ	BD Biosciences
TaqMan® Advanced miRNA Assay (20x)	appliedbiosystems
TaqMan® Fast Advanced Master Mix (2x)	appliedbiosystems
TaqMan® Fast Advanced miRNA cDNA Synthesis Master Mix (2x)	appliedbiosystems
PrecisionPLUS qPCR Master Mix (2x)	Primerdesign

Tabelle 6: Verwendete Kits

3.7 Medien und Medienzusätze

Nährmedium	Hersteller
DMEM-Standardmedium	Sigma-Aldrich Gibco
Zusätze	
Fötales Kälberserum (10%), (0,5%)	Sigma-Aldrich

Material

Natriumpyruvat-Lösung (1%)	Sigma-Aldrich
Penicillin/Streptomycin (1%)	Sigma-Aldrich
β-Mercaptoethanol (0,1%)	Sigma-Aldrich und Gibco
Puromycin (4 µg/ml)	InVivoGen

Tabelle 7: Verwendete Nährmedien und deren Zusätze zur Zellkultivierung (Kapitel: 4.1.3)

3.8 Zelllinien

Zelllinien	Zelltypus	Beschreibung	Resistenz	Hersteller
EL4- Zellen	Suspensionszellen murine Lymphozyten	native Zelle	Puromycin	AG Pautz
EL4pBullet_pGIPZ CO 1A	Suspensionszellen murine Lymphozyten	Kontrollzelle nach erfolgter retroviraler Transduktion ohne Eingriff in die Genaktivität	Puromycin	AG Pautz
EL4pBullet_pGIPZ siRNA_KSRP	Suspensionszellen murine Lymphozyten	Zelle mit reduzierter KSRP-Genaktivität mittels retroviraler Transduktion	Puromycin	AG Pautz

Tabelle 8: Verwendete Zelllinien

3.9 Laborgeräte

Funktion	Gerät	Modell	Hersteller
Elektrophorese	Gleichstromquelle für Agarose Gelelektrophorese	GPS 200/400	Pharmacia
	Gleichstromquelle für SDS Gelelektrophorese	Power Pac HC	Bio-Rad
Kühlung	-20°C Gefrierschrank	Protan Comfort	Liebherr
	-80°C Gefrierschrank	Hera Freeze	Thermo Fisher
	+4°C Kühlschrank	Comfort	Liebherr
	Stickstofftank	Cryo 200	Thermo Fisher
	Zelleinfrierbehälter	Nalagene Cryo 1 Freezing Container	Thermo Fisher
Messgeräte	Chemidoc XRS		Bio-Rad
	PCR-Gerät	T100 Thermal Cycler	Bio-Rad
	Quantitatives Realtime PCR-Gerät	CFX Connect™	Bio-Rad
	Spektrometer	FluoStar Optima	BMG
	Spektrophotometer	NanoDrop ND-100	Peqlab
	Waage	Analytic AC 120 S (0,1 mg-121 g)	Sartorius
Pipetten	Einkanalpipetten	0,5 – 10 µl	Brand
		10 – 100 µl	
		100 – 1000 µl	
	0,5 – 10 µl	Eppendorf	

Material

		10 – 100 µl	
		200 – 1000 µl	
	Mehrkanalpipette	0,5 – 10 µl	Greiner Bio-One
	Pipetboy	Acu und comfort	IBS
Schüttler	Reaktionsgefäßschüttler		Heidolph
			VWR
	VF 2	IKA Labortechnik	
	Schwenkschüttler	DRS-12	NeoLab
Wärme	Heizblock	DB 2A	Techne
			PeqLab
	Mikrowelle	900& Grill	Severin
	Wasserbad	Julabo TW20	Julabo
Aqualine AL12		Lauda	
Zentrifuge	Kühlzentrifuge	GT 1R	Fisherbrand™
		Biofuge fresco	Heraeus
		Micro Star 17 R	VWR
		Micro Star 17	VWR
		Rotina 35R	Hettich
	Plattenzentrifuge	MPS 1000	Labnet
	Tischzentrifuge		Biozym
Galaxy Mini		Merck eurolab	
Sonstiges	Brutschrank	Hera Cell 150	Heraeus
	Eismaschine		Ziegra
	Hämozytometer	Neubauer Zählkammer	Labotec
	Magnetrührer	Ikamag RCT	IKA Labortechnik
		Combimag RCT	
	Mikroskop	Leica DMIL	Leica
	Semi-Dry-Blotter	Trans-Blot® Turbo (Transfer System)	Bio-Rad
	Sonifikator	Biorupter® Plus	diagenode
	Sterile Werkbank	Herasafe	Heraeus
		Guard One	StarLab
Vakuumpumpe	INTEGRA Vacusafe Comfort	Integra Biosciences	

Tabelle 9: Verwendete Laborgeräte

3.10 Verbrauchsmaterialien

Material	Modell	Hersteller
Deckgläschen	18 x 18 mm	VWR
Film Western Blot	high performance chemiluminescence film	GE Healthcare
Kryoröhrchen	Nalgene Cryoware	Thermo Fisher
Nitrocellulose-Membran	Amersham™ Protran™ 0,2 µm NC	GE HealthCare
Objektträger	76 x 26 mm	DIAGONAL GmbH & Co. KG
Pasteurpipetten	150 mm, Glas	Roth

Material

PCR-Gefäße	96-Loch-Platte für cDNA-Synthese	Biozym Scientific
	Sapphire 8-Loch-Streifen mit Deckel	Greiner Bio-One
	Sapphire 96-Loch-Platte für qRT-PCR	
	Sapphire Deckelkette für 8er Streifen	
Petrischalen	10 cm	Greiner Bio-One
Plastikpipettenspitzen	0,5 – 10 µl	Biozym/Starlab
	10 – 100 µl	
	100 – 1000 µl	
Reaktionsgefäße	1,5 ml	Sarstedt AG & Co. KG
	2 ml	
	15 ml	Greiner Bio-One
	50 ml	
Whatman-Papier	3 mm Chr	Whatman
Zellkulturflasche mit Filtertop	200 ml	Greiner Bio-One
Zellkulturlochplatten	6-Loch (Wachstumsfläche: 9,6 cm ²)	Greiner Bio-One
	24-Loch (Wachstumsfläche: 1,9 cm ²)	
	96-Loch (Wachstumsfläche: 0,34 cm ²)	

Tabelle 10: Verwendete Verbrauchsmaterialien

3.11 Software und Internetseiten

Bezeichnung	Anbieter
CFX Manager	Bio-Rad
FCAP Array™ Software	BD Bioscience
FluoStar Optima Software	BMG
Graph Pad Prism	GraphPad Software Inc.
ImageLab™	Bio-Rad
MS Office	Microsoft
MS Excel	Microsoft
Quantity One	Bio-Rad
blast.ncbi.nlm.nih.gov	National Library of Medicine

Tabelle 11: Verwendete Software und Internetseiten

4 Methodik

4.1 Zellkultur

4.1.1 Eukaryote Suspensionszellen

In dieser Arbeit wurden murine EL4 T-Zellen (Tabelle 8) verwendet. Mittels einer retroviralen Transduktion wurde ein shorthairpin RNA (shRNA) produzierender Plasmidvektor mit dem Ziel einer dauerhaften Runterregulation des KSRP-kodierenden Gens eingebracht. Nach erfolgreicher Transduktion wird die spezifisch gegen KSRP gerichtete shRNA zu einer small interfering RNA (siRNA) prozessiert, die an den sogenannten RISC (RNA induced silencing complex) bindet und ein Abbau der Ziel-mRNA (KSRP) zur Folge hat. Der eingebrachte Vektor enthielt ein Puromycin Resistenzgen zur Selektion von Zellen, die stabil diese KSRP spezifische shRNA exprimieren. Durch Zugabe von Puromycin (Tabelle 7) in das bei der Kultivierung von Zellen verwendete Vollmedium (Tabelle 7) konnten so nur EL4 Zellen wachsen, in deren genomischer DNA das Plasmid integriert war. Als Kontrollzellen dienten EL4 Zellen (CO-A-Zellen), die stabil mit dem Plasmidvektor ohne shRNA transduziert worden waren und in diesen somit nicht mit einer Runterregulation der KSRP-Expression zu rechnen war. Die stabile Transduktion wurde laborintern durchgeführt.

4.1.2 Kultivierung eukaryoter Suspensionszellen

Die Arbeiten mit eukaryoten Suspensionszellen (Tabelle 8) erfolgten zur Verringerung von Verunreinigungen stets unter einer sterilen Reinluftwerkbank. Alle verwendeten Materialien wurden mit 70%igem Ethanol (Tabelle 1) gereinigt oder erst unter der Werkbank aus ihrer sterilen Verpackung entnommen. Nach Verwendung wurde die Reinluftwerkbank mit Ethanol und UV-Licht gereinigt. Die murinen T-Lymphozyten wurden in steril verpackten Kulturflaschen mit Filtertop in einem Vollmedium (Tabelle 7) bei 37 °C, mit 5 % CO₂-Begasung und 90 % Luftfeuchtigkeit in einem Brutschrank kultiviert.

Um ein effizientes Wachstum der Zellen unter diesen Bedingungen zu gewährleisten, mussten diese etwa alle drei Tage geteilt werden. Nach lichtmikroskopischer Kontrolle der Zellkonfluenz wurde die Zellsuspension geschwenkt und in ein 50 ml Röhrchen überführt. Abhängig von der Dichte des Zellwachstums wurden in der Regel 30 ml frisches Vollmedium und 100-200 µl Zellsuspension geschwenkt und unter beschriebenen Bedingungen kultiviert. Wurden stabil transduzierte Zellen kultiviert, wurde dem Vollmedium zur Selektion 4 µg/ml des Antibiotikums Puromycin (Tabelle 7) zugesetzt.

4.1.3 Kryokonservierung eukaryoter Suspensionszellen

Die Kryokonservierung von Suspensionszellen (Tabelle 8) dient deren langfristigen Aufbewahrung und bietet die Möglichkeit die verwendeten Zellreihen zu einem späteren Zeitpunkt wieder in Kultur zu nehmen. Dazu wurde die einzufrierende Zellsuspension unter der Reinluftwerkbank zunächst in ein 50 ml Röhrchen überführt und bei 200 xg, 15 °C für 5 min zentrifugiert. Der dabei entstandene Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in FCS mit 10%igem DMSO (Tabelle 1) in Kryoröhrchen aliquotiert. Diese wurden im nächsten Schritt in

einer mit Isopropanol (Tabelle 1) gefüllten Box langsam mit je -1 °C/min auf -80 °C runtergekühlt, bevor die Zellen langfristig in -196 °C kaltem flüssigen Stickstoff gelagert wurden.

Um die kryokonservierten Zellen in Kultur zu nehmen, wurde die Zellsuspension zunächst bei 37 °C in einem Wasserbad aufgetaut. Im Anschluss wurden je 500 µl der Zellsuspension auf eine 6-Lochplatte überführt und mit 5 ml Vollmedium (Tabelle 7) versetzt. Die Zellsuspension wurde über Nacht unter oben beschriebenen Bedingungen (Kapitel 4.1.2) kultiviert, am Folgetag bei lichtmikroskopisch sichtbarer Zellkonfluenz in 50 ml Röhrchen überführt und bei 200 xg, 15 °C für 5 min zentrifugiert. Der entstandene Überstand wurde verworfen und das Pellet in 20 ml Vollmedium in eine Zellkulturflasche mit Filtertop aufgenommen. Handelte es sich um stabil transduzierte Zellen, wurden frühestens nach 24 h der Zellsuspension 4 µg/ml des Selektionsantibiotikums Puromycin (Tabelle 7) zugesetzt.

4.1.4 Bestimmung der Lebendzellzahl

Zur Bestimmung der Lebendzellzahl innerhalb der Zellsuspension wurden 50 µl dieser mit 0,4%iger Trypanblau-Lösung (Tabelle 1) in einem Verhältnis von 1:2 verdünnt. Trypanblau ist lediglich in der Lage eine geschädigte Zellmembran zu überwinden und dient daher als Selektionskriterium zwischen vitalen und blau gefärbten nicht vitalen Zellen. Die quantitative Bestimmung der Zellzahl erfolgt mittels einer aus vier Groß- und je 16 Kleinquadraten bestehenden Neubauer Zählkammer. Zwischen der Neubauer Zählkammer und einem Deckglas wurde die gefärbte Zellsuspension pipettiert und im Anschluss die vitalen Zellen innerhalb der vier Großquadrate unter dem Lichtmikroskop gezählt. Zellen, die auf den Trennlinien zwischen den Quadraten lagen, wurden nur zur Hälfte berücksichtigt. Mit folgender Formel berechnet sich die Lebendzellzahl:

$$\frac{\text{Zellzahl}}{\text{ml}} = \frac{\text{Anzahl der gezählten Zellen in allen Großquadraten (x)}}{\text{Anzahl der Großquadrate (4) x Verdünnungsfaktor (x) x Kammerfaktor (10^4) x Volumen (x ml)}}$$

Formel 1: Berechnung der Lebendzellzahl mittels Neubauer Zählkammer

4.1.5 Induktion eukaryoter T-Zellen

Für die Expressionsanalyse proinflammatorischer Gene auf RNA- und Proteinebene wurden die EL4 Zellen (Tabelle 8) induziert. Mit Hilfe der Neubauer Zählkammer wurde zunächst die Zellzahl der Ausgangszellsuspension bestimmt und anschließend in einer Konzentration von 10³, 10⁴, 10⁵ sowie 10⁶ Zellen/Loch in eine 24-Lochplatte oder 96-Lochplatte zur Durchführung von RNA und CBA-FACS Analysen ausgesät. Die Zellen für die Protein-Analysen wurden in einer Konzentration von 3x10⁶ in 10 cm Platten ausgesät. In diesem Schritt wurde Serum-reduziertes Medium mit 0,5 % FCS (Tabelle 7) verwendet. Die Zellinduktion erfolgte mit je 1 µg/ml PMA oder einer Kombination aus PMA und Ionomycin (Tabelle 1). Als Kontrolle wurde DMSO (Tabelle 1) verwendet. Nach der zuvor festgelegten Stimulationszeit wurden die Zellen lysiert.

Für weitere Untersuchungen auf RNA-Ebene wurden die Zellen mit GIT-Puffer (Tabelle 2) lysiert. Dazu wurde die Zellsuspension zunächst in Eppendorf Gefäße überführt, bei 400 xg für 5 min zentrifugiert, der Überstand verworfen und das entstandene Pellet mit 200 µl PBS (Tabelle 1) gewaschen. Nach kurzem Mischen wurde erneut zentrifugiert, der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 200 µl GIT-Puffer mit β-Mercaptoethanol (Tabelle 1) unter dem Abzug

aufgenommen. Nach erneutem Mischen wurden die Proben bei -20°C bis zur weiteren Verarbeitung eingefroren.

Für eine Proteinanalyse mittels Western Blot wurden die Zellen mit RIPA-Puffer (Tabelle 2) lysiert. Dazu wurde die Zellsuspension in ein 50 ml Röhrchen überführt, bei 400 xg für 5 min zentrifugiert und der entstandene Überstand verworfen. Das Pellet wurde in RIPA-Puffer (versetzt mit 1/10 Proteaseinhibitor und 1/100 Phosphataseinhibitor) (Tabelle 2) aufgenommen, vermischt und bei -80°C gelagert.

4.2 Molekularbiologische Methoden

4.2.1 RNA-Isolation

Die Isolation der Gesamt-RNA aus den mittels GIT-Puffer (Tabelle 2) lysierten Zellen erfolgt nach der Methodik nach Piotr Chomczynski und Nicoletta Sacchi (71). Die folgenden Schritte wurden auf Eis durchgeführt, um eine Denaturierung der RNA bei Raumtemperatur zu verhindern. Die Arbeiten wurden ab der Zugabe von Phenol (Tabelle 1) zum Schutz der durchführenden Person unter einem Abzug durchgeführt. Es wurde DEPC-Wasser (Tabelle 2) verwendet.

Die zuvor lysierten Zellpellets wurden mit je 0,1 Volumen des eingesetzten GIT-Puffers mit 2 M Natriumacetat (Tabelle 1) angesäuert. Unter dem Abzug wurden je 1 Volumen Phenol (Tabelle 1) zur Entfernung von Protein in den Proben zugesetzt. Die Proben wurden gemischt, für 15 min auf Eis stehen lassen und schließlich zur Phasentrennung bei 16200 xg und 4°C für 20 min zentrifugiert. Die entstandene organische Interphase enthielt die DNA und wurde verworfen, während die obere wässrige Phase die RNA enthielt und vorsichtig in ein neues Reaktionsgefäß überführt wurde. Im Anschluss wurde den Proben je 1 Volumen Isopropanol (Tabelle 1) zugesetzt, gemischt und für mindestens 60 min bei -20°C in Fällung stehen lassen. Nach der Fällung wurden die Proben bei 16200 xg , 4°C für 20 min zentrifugiert. Der entstandene Überstand wurde verworfen, das Pellet mit 80%igem Ethanol (Tabelle 1) gewaschen, unter gleichen Bedingungen erneut zentrifugiert, der Überstand erneut verworfen und das Pellet für etwa 10min trocknen lassen. Das Pellet enthält die Gesamt-RNA. Es wurde in $30\mu\text{l}$ DEPC-Wasser aufgenommen, kurz gemischt und bis zur weiteren Verarbeitung bei -20°C gelagert.

4.2.2 Messung der RNA-Konzentration

Zur Konzentrationsbestimmung der Gesamt-RNA in den Proben nach durchgeführter RNA-Isolation wurde eine spektrometrische Messung mittels Nanodrop2000© von PeqLab (Tabelle 9) durchgeführt. Das Absorptionsmaximum von RNA liegt bei einer Wellenlänge von 260 nm. Der Absorptionsquotient 260/280 dient als Maß für die Reinheit der Proben und sollte daher von der Spannbreite 1,8-2 nicht abweichen.

Zur Messung wurde je $1\mu\text{l}$ der Probe eingesetzt.

Im Anschluss wurde die RNA auf $50\text{ ng}/\mu\text{l}$ verdünnt.

4.2.3 Reverse Transkription von RNA in cDNA

Der Schritt der Reversen Transkription dient dazu die isolierte und auf $50\text{ ng}/\mu\text{l}$ verdünnte Gesamt-RNA in komplementäre cDNA umzuschreiben (72). Die Proben wurden auf Eis gelagert, um eine Denaturierung der RNA bei Raumtemperatur zu verhindern und die Arbeiten unter einer

Reinluftwerkbank durchgeführt, um Verunreinigungen zu minimieren. Das verwendete Reverse Transkriptase-Kit M-MuLV von NEB (Tabelle 6) wurde nach unten aufgeführtem Schema pipettiert und der PCR-Cycler nach folgendem Schema eingestellt. Die in dem Kit enthaltene Multiscribe RT katalysiert die einzelnen Reaktionsschritte.

Bei der Reversen Transkription lagert sich im ersten Schritt ein einzelsträngiger Primer sequenzspezifisch an die Gesamt-RNA an. Im zweiten Schritt katalysiert eine Reverse Transkriptase die Anlagerung von DNA-Nukleotiden an die RNA, wodurch ein Hybriddoppelstrang aus RNA und DNA gebildet wird. Das Enzym RNase baut den RNA-Strang ab und eine DNA-Polymerase I ergänzt den Einzelstrang zu einem cDNA-Doppelstrang.

Die synthetisierte cDNA wurde bei -20°C gelagert oder im Anschluss für die Durchführung einer Real Time PCR eingesetzt.

Material	Volumen/Ansatz in µl
10 xRT-Puffer	2,0
25 x dNTP-Mix	0,8
Hexa Oligos, 10 pmol/µl	2,0
M-MuL Reverse Transkriptase	0,125
Nukleasefreies Wasser	4,7
RNA-Probe, 50 ng/µl	10,0
Gesamt	20,0

Tabelle 12: Pipettierschema eines Reverse Transkription Ansatzes

Temperatur in °C	Zeit	Reaktion
25	10 min	Primeranlagerung
37	120 min	Reverse Transkription
85	5 sec	Denaturierung RT
4	unbegrenzt	Kühlung

Tabelle 13: Cyclerprogramm für Reverse Transkription (Tabelle 9)

4.2.4 Quantitative Real-Time-PCR

Die Quantitative Real-Time-PCR ermöglicht sowohl die Amplifikation eines cDNA-Abschnitts als auch die Quantifizierung (73) dessen und gibt so Aufschluss über die mRNA-Expression der zu untersuchenden Gene. Zur Quantifizierung wurde der Fluoreszenzfarbstoff SYBR®-Green (Tabelle 6) eingesetzt, welcher in die DNA-Doppelhelix Struktur interkaliert. Das Fluoreszenzsignal wird in der Elongationsphase detektiert und verhält sich proportional zur Masse des PCR-Produkts. Es handelt sich um ein sondenfreies Vorgehen, weshalb zur qualitativen Überprüfung des PCR-Produkts eine Schmelzkurve angefertigt wird. Da jedes Fragment einen spezifischen Schmelzpunkt besitzt, wird dieses bei einer bestimmten Temperatur denaturiert, wodurch das Fluoreszenzsignal signifikant abnimmt. Somit ist eine Unterscheidung zwischen einem spezifischen Fragment und anderen Fragmenten wie beispielsweise unspezifischen PCR-Produkten möglich.

Eine Quantifizierung ist auch mit einem sondenbasierten Vorgehen möglich. Bei der eingesetzten TaqMan Sonde (Tabelle 6) handelt es sich um eine sequenzspezifische Oligonukleotidsequenz, die neben den beiden Primern ebenfalls an die cDNA-Matrize bindet.

Methodik

Am 5´-Ende der Sonde ist ein fluoreszierender Farbstoff (z.B. 6-Carboxyfluorescein (FAM)) angehängt und am 3´-Ende befindet sich ein sogenannter Quencher (z.B. Carboxytetramethylrhodamin (TAMRA)), der die Lichtemission des Farbstoffs FAM absorbiert. Während der Elongationsphase fungiert die eingesetzte Taq-Polymerase als 5´-3´-Exonuclease, welche die Sonde spaltet und somit den inhibierenden Quencher räumlich von dem Farbstoff trennt. Das emittierte Licht kann nun gemessen und zur Quantifizierung herangezogen werden. Die Emission verhält sich proportional zur mRNA-Expression des untersuchten Gens.

Die Auswertung erfolgte auf Grundlage des CT-Wertes nach der $2(-\Delta\Delta C(T))$ -Methode (74). Dieser entspricht dem PCR-Zyklus, bei dem ein signifikanter Unterschied der Fluoreszenzstärke im Vergleich zum Hintergrundsignal detektiert werden konnte.

Die Arbeiten wurden auf Eis und unter einer Reinluftwerkbank durchgeführt, um Kontaminationen zu verringern. Das Pipettierschema und die Cyclereinstellung (Tabelle 9) ist im Folgenden tabellarisch aufgeführt.

Materialien	Volumen/Ansatz in μl
2x PrecisionPLUS qPCR Master Mix	10,0
10 μM 5´-Primer	0,6
10 μM 3´-Primer	0,6
Nukleasefreies Wasser	6,8
cDNA	2,0
Gesamt	20,0

Tabelle 14: Pipettierschema für das SYBR®-Green-System

Temperatur in $^{\circ}\text{C}$	Zeit	Zyklusanzahl	Reaktion
95	2min	1	Initiale Denaturierung
94	15sec	45	Denaturierung
60	1min	45	Hybridisierung/Elongation
95	30sec	1	Terminale Denaturierung
60	30sec	1	Hybridisierung
60-95	10sec/Zyklus		Schmelzkurve
20	unbegrenzt		Kühlung

Tabelle 15: Cyclerprogramm für das SYBR®-Green-System

Materialien	Volumen/Ansatz in μl
BlueProbe qRT-Mix (Biozym)	12,5
5´-Primer (10 mM)	1,0
3´-Primer (10mM)	1,0
TaqSonde	0,5
RNase freies Wasser	8,0
cDNA	2,0
Gesamt	25,0

Tabelle 16: Pipettierschema für das TaqMan-System

Temperatur in °C	Zeit	Zyklusanzahl	Reaktion
95	2 min	1	Initiale Denaturierung
95	5 sec	44	Denaturierung
60	30 sec	44	Annealing/Elongation
8	unbegrenzt		Kühlung

Tabelle 17: Cyclerprogramm für das TaqMan-System mit BlueProbe

4.2.5 Agarose-Gelelektrophorese

Eine Agarose-Gelelektrophorese dient der Auftrennung von Nukleinsäure-Fragmenten entsprechend ihrer Größe (75). Diese wurde durchgeführt, um zu überprüfen, ob es sich bei den qRT-PCR-Produkten tatsächlich um die durch die eingesetzten Primer amplifizierte Fragmente handelt. Dazu wurde das Produkt aufgetrennt, seine Fragmentgröße anhand des Markers bestimmt und mit der aus der Datenbank blast.ncbi.nlm.nih.gov (Tabelle 11) vorhergesagten Größe abgeglichen.

Für die Agarose-Gelelektrophorese wurde ein 2%iges Gel benötigt, da dieses Fragmentgrößen zwischen 100-500 kb auftrennt. Dazu wurden 100 ml 0,8 TAE Puffer (Tabelle 2) mit 2 g des Polysaccharids Agarose (Tabelle 1) aufgekocht und anschließend für 30 min gerührt. Anschließend wurde noch 7 µl/100 ml Gel des Farbstoffs Rotisafe (Tabelle 1) hinzugegeben, welcher in die DNA-Struktur interkaliert, um die im weiteren Verlauf entstehenden Banden unter UV-Licht sichtbar machen zu können. Die Gelkomponenten wurden in eine Gelkammer gegossen. Das Einsetzen eines Kamms formte die Probekammern. Durch das Erkalten der Komponenten bildete sich ein stabiles Gel mit gleichmäßiger Porengröße. Den zu analysierenden Proben wurde 3 µl DNA-Ladepuffer/20 µl qRT-PCR-Produkt (Tabelle 2) hinzugefügt, welches die Probe beschwert und anfärbt. Zur Kontrolle der Bandenhöhe wurde neben den Proben auch ein Marker (Tabelle 5) in die Geltaschen aufgetragen. Es wurde eine Spannung von 100 V angelegt (Tabelle 9). Aufgrund der negativen Ladung der Nukleinsäuren wandern die Proben im elektrischen Feld in Richtung Anode. Kleinere Fragmente werden dabei schneller aufgetrennt als größere. Nach 25-45 min wurden die Banden mit UV-Licht sichtbar gemacht und fotografiert.

4.2.6 Reverse Transkription von miRNA in cDNA

Für die Expressionsanalyse der microRNA (miRNA) mir-155 wurden murine CO-A- sowie siKSRP-Suspensionszellen (Tabelle 8) wie zuvor beschrieben auf einer 24-Lochplatte ausgesät, mit 1 µg/ml PMA und Ionomycin (Tabelle 1) für 6 h stimuliert und mit GIT-Puffer (Tabelle 2) lysiert. Nach beschriebener RNA-Isolation und spektrometrischer Messung der RNA-Konzentration mittels Nanodrop2000© (Tabelle 9), wurden die Proben auf 5 ng/µl verdünnt. Die folgenden Arbeitsschritte wurden stets auf Eis unter dem Abzug durchgeführt.

Vor der eigentlichen Reversen Transkription musste zunächst die cDNA-Vorlage vorbereitet werden (Tabelle 6).

Hierzu wird an das 3´-Ende der miRNA ein Poly(A) Schwanz angehängt.

In ein 1,5 ml Reaktionsgefäß wurde nach unten aufgeführtem Schema der Poly(A)-Mix pipettiert,

zentrifugiert und je 2 µl Probe und 3 µl Poly(A)-Mix in eine 96-Lochplatte überführt. Diese wurde gemischt sowie zentrifugiert, um Luftpinschlüsse zu vermeiden. Der PCR-Cycler (Tabelle 9) wurde wie aufgeführt programmiert.

Nach abgeschlossener Polyadenylierung wurde umgehend mit dem nächsten Schritt begonnen.

Materialien	Volumen/Ansatz in µl
10 x Poly(A) Puffer	0,5
ATP	0,5
Poly(A) Polymerase	0,3
RNasefreies Wasser	1,7
Gesamt	3,0

Tabelle 18: Pipettierschema Poly(A) Schwanz Reaktion

Temperatur in °C	Zeit	Reaktion
37	45 min	Polyadenylierung
65	10 min	Stop Reaktion
4	unbegrenzt	Kühlung

Tabelle 19: Cyclerprogramm für Poly(A) Schwanz Reaktion

Im nächsten Vorbereitungsschritt wird ein Adapter, der als Vorwärts-Primer für die spätere Amplifikationsreaktion dient, an das 5´-Ende der miRNA angehängt.

In ein 1,5 ml Reaktionsgefäß wurde entsprechend der folgenden Tabelle der Ligations-Mix pipettiert, gemischt und zentrifugiert. Je 10 µl des Ligations-Mix wurden der 96-Lochplatte hinzugefügt. Diese wurde erneut gemischt und zentrifugiert. Die Cyclereinstellung kann der Tabelle entnommen werden. Im Anschluss wurde umgehend mit der Reversen Transkription fortgefahren.

Materialien	Volumen/Ansatz in µl
5 x DNA-Ligase Puffer	3,0
50 % PEG 8000	4,5
25 x Ligation Adapter	0,6
RNA-Ligase	1,5
RNasefreies Wasser	0,4
Gesamt	10,0

Tabelle 20: Pipettierschema Adapterligation

Temperatur in °C	Zeit	Reaktion
16	60 min	Ligation
4	unbegrenzt	Kühlung

Tabelle 21: Cyclerprogramm Adapterligation

Während der Reversen Transkription bindet ein Universalprimer an den zuvor angefügten Poly(A)-Schwanz und schreibt die miRNA in cDNA um. Dafür wurde in einem 1,5 ml

Methodik

Reaktionsgefäß der folgende RT-Mix hergestellt, gemischt, zentrifugiert und je 15 µl in die 96-Lochplatte überführt. Diese wurde erneut gemischt und zentrifugiert. Die Cyclereinstellung kann der Tabelle entnommen werden. Nach Durchführung der Reversen Transkription können die Proben bei -20°C für zwei Monate gelagert werden.

Materialien	Volumen/Ansatz in µl
5 x RT Puffer	6,0
dNTP-Mix, 25mM	1,2
20 x Universalprimer	1,5
10 x RT Enzym-Mix	3,0
RNasefreies Wasser	3,3
Gesamt	15,0

Tabelle 22: Pipettierschema Reverse Transkription

Temperatur in °C	Zeit	Reaktion
42	15 min	Reverse Transkription
85	5 min	Stop Reaktion
4	unbegrenzt	Kühlung

Tabelle 23: Cyclerprogramm Reverse Transkription

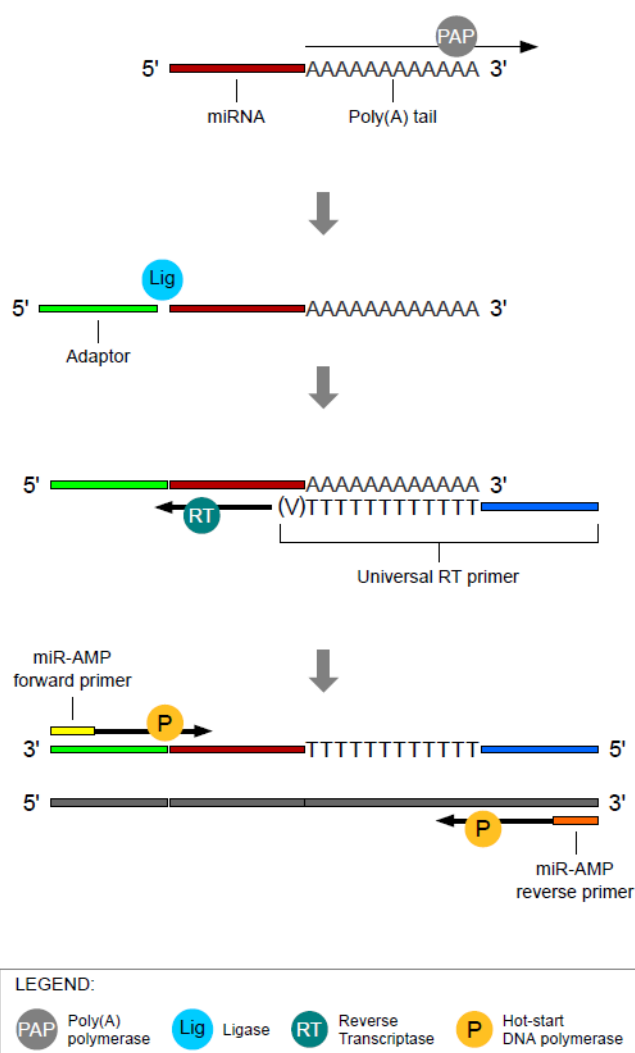
Im folgenden Amplifikationsschritt wird die hergestellte einzelsträngige cDNA durch eine DNA-Polymerase in 5´-Richtung zu einem Doppelstrang ergänzt. Für diesen Reaktionsschritt wurde erneut der entsprechende Mix pipettiert, gemischt und zentrifugiert. Je 45 µl des Mix wurden zusammen mit 5 µl des RT-Produkts auf eine neue 96-Lochplatte überführt. Diese wurde erneut gemischt und zentrifugiert. Die Cyclereinstellung kann der Tabelle entnommen werden. Im Anschluss könne die Proben für maximal zwei Monate bei -20 °C gelagert werden.

Materialien	Volumen/Ansatz in µl
2 x miR-Amp Master-Mix	25,0
20 x miR-Amp Primer-Mix	2,5
RNasefreies Wasser	17,5
Gesamt	45,0

Tabelle 24: Pipettierschema Amplifikationsreaktion

Temperatur in °C	Zeit	Zyklusanzahl	Reaktion
95	5 min	1	Enzymaktivierung
95	3 sec	14	Denaturierung
60	30 sec	14	Annealing, Extending
99	10 min	1	Stop Reaktion
4	unbegrenzt	1	Kühlung

Tabelle 25: Cyclereinstellung Amplifikationsreaktion



Poly(A) tailing reaction

Starting with a total RNA sample, poly(A) polymerase is used to add a 3'-adenosine tail to the miRNA.

Adaptor ligation reaction

The miRNA with poly(A) tail undergoes adaptor ligation at the 5' end. The adaptor acts as the forward-primer binding site for the miR-Amp reaction.

Reverse transcription (RT) reaction

A Universal RT primer binds to the 3' poly(A) tail and the miRNA is reverse transcribed. The resulting cDNA is suitable for all TaqMan® Advanced miRNA Assays.

miR-Amp reaction

Universal forward and reverse primers increase the number of cDNA molecules.

Abbildung 4: Schematische Darstellung einer Reversen Transkription (76)

Die Amplifikation und Quantifizierung der RT-Produkte erfolgt mittels einer qRT-PCR. Die RT-Produkte wurden in einem Verhältnis 1/10 verdünnt. Der benötigte PCR-Mix wurde nach aufgeführtem Schema in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß pipettiert, gemischt und zentrifugiert. Im Anschluss wurden je 15 µl des PCR-Mix mit 5 µl RT-Produkt in eine qRT-PCR taugliche 96-Lochplatte transferiert und zentrifugiert. Zur Auswertung der miRNA wurde mit dem Haushaltsgen huU6 eine sondenbasierte qRT-PCR mit BlueProbe (Tabelle 6) durchgeführt.

Materialien	Volumen/Ansatz in µl
TaqMan® Fast Advanced Master Mix (2x)	10,0
TaqMan® Advanced miRNA Assay (20x)	1,0
RNase freies Wasser	4,0
Gesamt	15,0

Tabelle 26: Pipettierschema qRT-PCR

Temperatur in °C	Zeit	Zyklusanzahl	Reaktion
95	20 sec	1x	Enzymaktivierung
95	3 sec	40x	Denaturierung
60	30 sec	40x	Annealing/Extending

Tabelle 27: Cyclereinstellung qRT-PCR

4.3 Proteinbiochemische Methoden

4.3.1 Photometrische Quantifizierung nach Bradford

Zur quantitativen Bestimmung der Proteinkonzentration in einem Zelllysate wurde eine photometrische Messung nach Bradford durchgeführt (77). Bei dieser Methode wurde der Farbstoff Coomassie-Brilliant-Blau G-250 verwendet. Bindet der Farbstoff an Protein, liegt er in seiner blauen, komplexgebundenen anionischen Form vor mit einem Absorptionsmaximum von 595 nm. Die rote, unkomplexierte kationische Form dagegen weist ein Absorptionsmaximum von 470 nm auf.

Als Referenz wurde eine Standardreihe mit festgelegten BSA-Konzentrationen (Tabelle 1) nach unten aufgeführtem Schema angefertigt. Der Standardreihe wurde RIPA-Puffer (Tabelle 2) hinzugefügt, da die Proben mit RIPA-Puffer lysiert wurden. Für den Probenansatz wurden 10 µl Probe in einem Verhältnis 1/10 oder 1/5 mit RIPA-Puffer verdünnt und mit 790 µl Millipore Wasser (Tabelle 2) resuspendiert. Im Anschluss wurde sowohl der Eichkurve als auch den Probenansätzen 200 µl Bradford Stammlösung (Tabelle 1) hinzugefügt und 200 µl jeder Lösung doppelt untereinander in eine 96-Lochplatte pipettiert. Ab Zugabe der Bradford Stammlösung waren die Lysate etwa eine Stunde in einem stabilen Zustand. Die photometrische Messung erfolgte im FluostarOptima® (Tabelle 9) bei 595 nm. Die gemessene Extinktion verhält sich proportional zu der Proteinkonzentration. Bestimmt wurde der Mittelwert der Proben.

Ansatz	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Ripa-Puffer in µl	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
BSA (1mg/ml) in µl	0	1	2	4	6	8	10	12	14	16	18	20
Millipore Wasser in µl	790	789	788	786	784	782	780	778	776	774	772	770

Tabelle 28: Pipettierschema Bradford Eichkurve

4.3.2 Methanol-/Chloroformfällung von Proteinen

Für eine Western Blot Analyse wurde 100 µg Protein je Probe benötigt. Bei unzureichender Proteinmenge der Proben wurde zuvor zur Anreicherung eine Methanol-/Chloroformfällung durchgeführt (78). Die Arbeitsschritte erfolgten unter einem Abzug. Die Proben wurden stets auf Eis gelagert.

Zunächst wurde die gewünschte Proteinmenge festgelegt und das dafür benötigte Probevolumen und RIPA-Volumen (Tabelle 2) auf Grundlage der Proteinbestimmung nach Bradford berechnet. Dem Probenansatz wurde das vierfache Methanol-, das dreifache DEPC Wasser- und das einfache Chloroform-Volumen zugesetzt (Tabelle 1, Tabelle 2), gemischt und anschließend zur Phasenbildung bei 16200 xg, 4 °C für 10 min zentrifugiert. Das Protein befindet sich in der Interphase. Die obere Phase wurde verworfen. Den Proben wurde erneut das vierfache Volumen Methanol zugesetzt und bei 16200 xg, 4 °C für 10 min zentrifugiert. Der

Überstand wurde verworfen und das Proteinpellet im Reaktionsgefäß wurde für 10 min über Kopf stehend getrocknet. Im Anschluss wurde das Pellet in 20 µl 2xLämmli Puffer (Tabelle 2) gelöst. Durch Erhitzen der Proben auf 95 °C für 5 min wurde die Proteinstruktur denaturiert. Im Anschluss wurden die Proben bei -20 °C gelagert oder direkt weiterverarbeitet.

4.3.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-Page)

Die denaturierende SDS-Acrylamidgelelektrophorese trennt ein Proteinlysate entsprechend dessen Molekulargewicht auf (79). Das anionische Detergenz SDS (Tabelle 1) bildet mit Proteinen konstant negativ geladene Komplexe. Dadurch wird deren ursprüngliche Eigenladung überlagert. Für das diskontinuierliche Polyacrylamidgel-System werden zwei verschiedene Gele eingesetzt, welche sich unter anderem in ihrer Porengröße voneinander unterscheiden. Im grobporigen Sammelgel konzentrieren sich die Proteine, während im engporigeren Trenngel die eigentliche Proteintrennung stattfindet. Die Proteinstruktur wird mit Hilfe des zuvor beschriebenen Erhitzens auf 95 °C, dem Einsatz von SDS und dem die Disulfidbrücken spaltenden DTT (Tabelle 1) denaturiert (80).

Die beiden Gele wurden nach unten aufgeführtem Schema angesetzt. Zuerst wurde das Trenngel zwischen zwei Glasplatten mit einem Abstand von 1,5 mm zueinander gegossen und für eine glatte Gelkante mit Ethanol (Tabelle 1) überschichtet. Nach 30 min war das Gel ausgehärtet, das Ethanol wurde abgekippt und das Sammelgel gegossen. Für die Bildung von Geltaschen wurde ein Plastikkamm bis zur vollständigen Polymerisation in das Sammelgel gesteckt.

Trenngel	10 %; 1,5 mm Geldicke	12,5 %, 1,5 mm Geldicke
Wasser	6,695 ml	5,288 ml
1,5 M Tris-Puffer (pH 8,8)	4,22 ml	4,22 ml
10 % SDS	168,75 µl	168,75 µl
30 % Acrylamid	5,625 ml	7,032 ml
TEMED	11,25 µl	11,25 µl
APS	112,5 µl	112,5 µl

Tabelle 29: Pipettierschema SDS-Trenngel

Sammelgel (4 %)	1,5 mm Geldicke
Wasser	4,6 ml
0,5 M Tris-Puffer (pH 6,8)	1,875 ml
10 % SDS	75 µl
30 % Acrylamid	975 µl
TEMED	9,75 µl
APS	49,5 µl

Tabelle 30: Pipettierschema SDS-Sammelgel

4.3.4 Immundetektion mittels Western Blot

Die Immundetektion mittels Western Blot beschreibt den Transfer von zuvor mittels SDS-Page aufgetrennten Proteinen auf eine Nitrocellulosemembran (Tabelle 10), um diese im Anschluss spezifisch durch den Einsatz von Antikörpern nachweisen zu können (81, 82).

Der Transfer auf die Nitrocellulosemembran erfolgte mit Hilfe eines Semi-Dry-Blotters (Tabelle 9). Nach erfolgter Auftrennung mittels SDS-Page wurde das Sammelgel verworfen und das Trenngel entsprechend der zu erwartenden Bandenhöhe zugeschnitten. In zuvor getränktem Transferpuffer wurden in folgender Reihenfolge drei Whatman-Filterpapiere (Tabelle 10), die Nitrocellulosemembran, das SDS-Polyacrylamidgel und abschließend drei Whatman-Filterpapiere bündig und ohne Lufteinschlüsse auf die Anodenplatte des Blotters gelegt und dieser auf 40 V für 30 min für die KSRP-Analyse (Kapitel 5.1) und auf 12 V für 45 min für die c-MAF-Analyse (Kapitel 5.11) eingestellt.

Um den Erfolg des Proteintransfers zu überprüfen, wurde die Nitrozellulosemembran in Ponceau S (Tabelle 1) für 1 min inkubiert und anschließend zweimal mit Leitungswasser gespült. Bei erfolgtem Proteintransfer war eine Rotfärbung der transferierten Proteinbanden auf der Nitrozellulosemembran zu beobachten. Zur Absättigung unspezifischer Bindungen wurde die Nitrocellulosemembran mit einer Blockierlösung vollständig bedeckt und für 60 min gleichmäßig geschüttelt. Als Blockierlösung kamen sowohl 1 % Rinderserumalbumin (BSA) gelöst in 1xTBS mit 0,1 % Tween als auch 3 % Magermilchpulver gelöst in 1xTBS mit 0,1 % Tween (Tabelle 1) zum Einsatz. Der Primärantikörper wurde mit der jeweils eingesetzten Blockierlösung entsprechend einer zuvor festgelegten Konzentration verdünnt, die Nitrocellulosemembran mit dem verdünnten Antikörper bedeckt und über Nacht bei 4 ° C geschüttelt. Primärantikörper (Tabelle 4) wurde sowohl gegen das Haushaltsgen GAPDH, als auch gegen die nachzuweisenden Proteine c-MAF und KSRP eingesetzt.

Die Nitrocellulosemembran wurde im Anschluss in drei Durchläufen mit Hilfe von 1xTBS mit 0,1 % Tween je 10 min auf dem Schüttler von nicht gebundenen Resten des primären Antikörpers gereinigt.

Der sekundäre AK (Tabelle 4) wurde ebenfalls mit der zuvor eingesetzten Blockierlösung entsprechend einer zuvor festgelegten Konzentration verdünnt. Dabei war zu beachten, dass der sekundäre AK spezifisch die Spezies des primären Antikörpers erkannte und mit einem Enzymsystem gekoppelt war, das eine Nachweisreaktion der Antikörperbindung ermöglichte. Im Rahmen dieser Arbeit waren die verwendeten sekundären Antikörper mit einer Peroxidase gekoppelt.

Die Nitrocellulosemembran wurde für mindestens eine Stunde bei Raumtemperatur mit dem verdünnten sekundären AK geschüttelt.

Die zuvor beschriebenen drei Waschschrte wurden nach der Inkubation des sekundären AK wiederholt.

Die Proteinbanden auf der Nitrocellulosemembran wurden mittels Chemilumineszenz dargestellt. Dafür wurde die Nitrozellulosemembran mit 1xTBS geschüttelt und anschließend für eine Minute bei Raumtemperatur mit einem 2-Komponenten Chemilumineszenz Substrat aus 600 µl Oxidin und 600 µl Enhanced Luminol Reagent (Tabelle 1) auf dem Schüttler inkubiert. In diesem Schritt katalysiert die Peroxidase des sekundären Antikörpers die Oxidation von Luminol. Eine Lichtemission ist die Folge. Im Anschluss wurde die Membran in Frischhaltefolie blasenfrei eingewickelt und unter vollständigem Lichtausschluss durch Auflegen der Membran auf einen Positivfilm entwickelt. Dabei wurde dieser, je nach Stärke der Emissionsintensität, für wenige Sekunden bis Minuten belichtet, anschließend je etwa 1 min in der Entwicklerlösung (Tabelle 1), in Leitungswasser, in einer Fixierlösung (Tabelle 1) und anschließend erneut in Leitungswasser geschwenkt. Zusätzlich wurde der Film nach Inkubation mit Oxidin und Enhanced Luminol Reagent im Chemidoc© (Tabelle 9) entwickelt. Die Auswertung der Banden erfolgte mit Hilfe des Programms ImageLab™ von Bio-Rad (Tabelle 11).

4.3.5 Zytokinmessung mittels Cytometric Bead Array (CBA)

Das Cytometric Bead Array dient der quantitativen Bestimmung von Proteinen (83). Hierzu werden Kügelchen, so genannte Beads, eingesetzt. Diese weisen für unterschiedliche Zytokine bestimmte Fluoreszenzmuster auf, wodurch verschiedene Beadpopulationen zu unterscheiden sind. Daher können mehrere Zytokine gemeinsam gemessen werden. Die Zytokine werden über einen Antikörper an die entsprechenden Beads gekoppelt. Die daraus resultierende Fluoreszenz wird mittels Durchflusszytometrie bestimmt und verhält sich proportional zur gebundenen Proteinmenge.

Die verwendeten Suspensionszellen wurden in einer 96-Lochplatte in einer Konzentration von je 10^3 , 10^4 , 10^5 und 10^6 pro Loch ausgesät und mit PMA und Ionomycin (Tabelle 1) (je $1\mu\text{g}/\text{ml}$) für 24 h und 48 h induziert. Im Anschluss wurde die 96-Lochplatte bei 120 g für 5 min zentrifugiert, der Überstand in ein Reaktionsgefäß überführt und die Proben bis zur eigentlichen CBA-Analyse bei $-20\text{ }^\circ\text{C}$ verwahrt. Diese wurde von der Arbeitsgruppe Grabbe/Bros der Universitätsmedizin der Johannes-Gutenberg-Universität durchgeführt.

Für die CBA-Analyse wurden zunächst je Probe $0,2\ \mu\text{l}$ des Capture Beads in ein Reaktionsgefäß überführt. Dieser Master Mix (Tabelle 6) wurde im Anschluss mit PBS 1 % FCS (Tabelle 1, Tabelle 7) auf $12\ \mu\text{l}$ je Probe aufgefüllt, gemischt und $10\ \mu\text{l}$ dieses Master Mix in ein FACS-Röhrchen überführt. Nach Zugabe von $10\ \mu\text{l}$ Probe erfolgte eine Inkubation für 1 h bei Raumtemperatur unter Lichtausschluss. Nach erfolgter Inkubation wurde pro Probe von jedem PE Detection Reagent $0,2\ \mu\text{l}$ in ein Eppendorfgefäß pipettiert. Dieser Master Mix wurde mit PBS 1 % FCS auf $12\ \mu\text{l}$ je Probe aufgefüllt. Daraufhin wurden $10\ \mu\text{l}$ des PE Detection Reagent Master Mix zu den Proben transferiert und erneut für 1 h bei Raumtemperatur unter Lichtausschluss inkubiert. Im nächsten Schritt wurde dem Reaktionsgefäß je $500\ \mu\text{l}$ PBS 1 % FCS hinzugefügt, bei 200 g für 5 min zentrifugiert und der entstandene Überstand verworfen. Den Proben wurden $80\text{-}100\ \mu\text{l}$ PBS 1 % FCS hinzugefügt und im Anschluss gemessen.

Quantitativ mittels CBA wurden die Zytokine IFN- γ , IL-1b, TNF- α , IL-2, IL-4, IL-5, IL-9, IL10, IL-17a sowie IL-13 gemessen.

5 Ergebnisse

5.1 Analyse der KSRP-Expression in genetisch veränderten EL4 T-Zellen

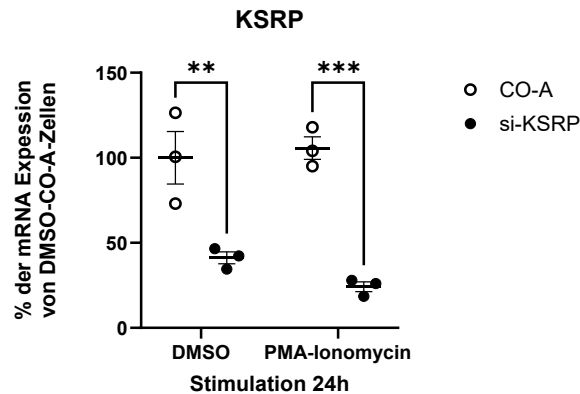


Abbildung 5: Vergleich der KSRP mRNA-Expression in EL4 CO-A Zellen und siKSRP Zellen

Murine EL4 siKSRP T-Zellen (siKSRP) und EL4 Kontroll-T-Zellen wurden in einer 24-Lochplatte mit einer Konzentration von 10^5 Zellen/Loch ausgesät und für 24 h mit DMSO oder der Kombination aus PMA und Ionomycin (P/I) ($1 \mu\text{g/ml}$) stimuliert. Die quantitative mRNA-Expressionsanalyse wurde mittels qRT-PCR durchgeführt und auf die Expression des Haushaltsgens GAPDH normiert. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM ($n=3/\text{Experiment}$) aus einem durchgeführten Experiment (**: $p < 0,01$, verschieden von DMSO behandelten CO-A Zellen; ***: $p < 0,001$, verschieden von mit PMA und Ionomycin behandelten CO-A Zellen, two-way-ANOVA, Bonferroni Korrektur).

In dieser Arbeit wurde eine murine EL4 T-Zelllinie verwendet, deren KSRP-Expression durch eine shRNA runterreguliert wurde. Diese Zellen sollten als zelluläres Modell für die Untersuchung des Effekts von KSRP auf verschiedene T_H2 -assoziierten Zytokine in T-Zellen dienen. Als Kontrollzellen (CO-A Zellen) dienten EL4 Zellen ohne eine shRNA-Expression (Kapitel 4.1.1). Um sicherzustellen, dass die verwendeten EL4 siKSRP Suspensionszellen tatsächlich eine verminderte KSRP-Expression aufweisen, wurde dies zu Beginn der Arbeit überprüft. Murine EL4 siKSRP T-Zellen und EL4 Kontrollzellen wurden unter sterilen Bedingungen in Kulturmedium mit 10 % FCS kultiviert.

Die Suspensionszellen wurden in serumreduziertem Medium ausgesät und für 24 h mit einer Kombination aus PMA und Ionomycin (P/I) ($1 \mu\text{g/ml}$) oder DMSO zur Lösungsmittelkontrolle stimuliert. Die induzierten Zellen wurden mit GIT-Puffer lysiert, die RNA isoliert und mittels Reverse Transkription in cDNA umgeschrieben. Im Anschluss wurde eine qRT-PCR zur quantitativen Analyse der mRNA-Expression von KSRP durchgeführt (Kapitel 4.1.5- 4.2.4). In der Abbildung sind die Mittelwerte der KSRP mRNA-Expression in EL4 siKSRP- sowie in EL4 CO-A Zellen mit P/I und ohne P/I Induktion (DMSO) dargestellt. Der Bezug wurde auf die mit DMSO behandelten EL4 CO-A Zellen gesetzt. Die Expression der KSRP mRNA zeigte sich in den nicht stimulierten EL4 siKSRP Zellen um etwa das 2,5-fache im Vergleich zu den EL4 CO-A Zellen vermindert und in den P/I stimulierten EL4 siKSRP Zellen um etwa das 4-fache im Vergleich zu

Ergebnisse

den EL4 CO-A Zellen reduziert. Die Normierung der Daten auf das Haushaltsgen HPRT (Daten nicht gezeigt) lieferten vergleichbare Resultate.

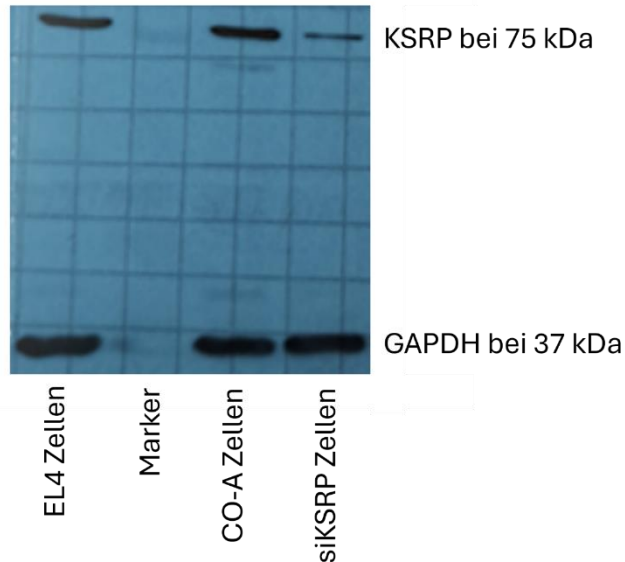


Abbildung 6: Vergleich der KSRP-Proteinkonzentration in EL4 Zellen, CO-A Zellen und siKSRP Zellen mittels Western Blot Analyse

Kryokonservierte murine EL4, EL4 siKSRP und EL4 Kontroll T-Zellen wurden in Kultur genommen, nach erfolgter Konfluenz mit RIPA-Puffer lysiert und anschließend homogenisiert. Die photometrische Bestimmung der Proteinkonzentration in den Proben erfolgte mittels Bradford Assay. Die Proteine wurden entsprechend ihres Molekulargewichts mit Hilfe einer SDS Polyacrylamid Gelelektrophorese aufgetrennt und im Anschluss mittels Western Blot detektiert. Dargestellt sind die Ergebnisse der Immundetektion auf einem Positivfilm. Die oberen Banden bilden das KSRP-Protein ab und die unteren GAPDH. Die Bandenzuordnung ist wie folgt von links nach rechts: EL4 Zellen; Marker; EL4 CO-A Zellen; EL4 siKSRP Zellen.

Um sicherzustellen, dass die verwendeten siKSRP Suspensionszellen tatsächlich eine verminderte KSRP-Expression aufweisen, wurde neben der zuvor beschriebenen Kontrolle der KSRP mRNA-Expression zusätzlich die Expression auf Proteinebene kontrolliert. Dazu wurden die Zellen in RIPA aufgenommen und mittels Ultraschalls homogenisiert. Zusätzlich wurden sie zur besseren Verarbeitung bei 17008 g, 4 °C für 5 min zentrifugiert. Der dabei entstandene Überstand wurde für die weiteren Arbeitsschritte verwendet. Die Auftrennung der Proteine erfolgte mittels SDS Polyacrylamid Gelelektrophorese in einem 10 % SDS-Gel. Die Geltaschen wurden mit 50 µg Protein je Tasche beladen. Der Proteintransfer erfolgte mittels Semidry Verfahren (Kapitel: 4.3.3). Die Immundetektion mittels Western Blot wurde entsprechend Protokoll durchgeführt (Kapitel 4.3.4). Als Blockier Lösung kam 1 % BSA in TBS zum Einsatz. Als Primärantikörper wurden KSRP (75 kDa) und GAPDH (37 kDa) als Ladekontrolle je in einer Verdünnung 1:1000 verwendet. Als Sekundärantikörper wurde ein anti-rabbit Antikörper gekoppelt mit Peroxidase in einer Verdünnung von 1:10000 eingesetzt (Tabelle 4). Die Banden auf der Höhe von 75 kDa stellen die KSRP-Proteinmenge dar, bei den Banden mit der Größe von 37 kDa handelt es sich um GAPDH, das als Ladungskontrolle eingesetzt. Die vergleichbare Intensität der GAPDH Banden zeigt an, dass bei jeder Probe die gleiche Menge Protein eingesetzt wurde. Die Ergebnisse der Western Blot Analyse zeigen, dass die Expression des KSRP-Proteins

in den EL4 siKSRP Zellen im Vergleich zu den EL4 und den EL4 CO-A Zellen vermindert ist (Abbildung 6). Diese Zellen können daher zur Untersuchung von KSRP-vermittelten Effekten eingesetzt werden.

5.2 Überprüfung der qRT-PCR-Produkte mittels Agarose Gelelektrophorese

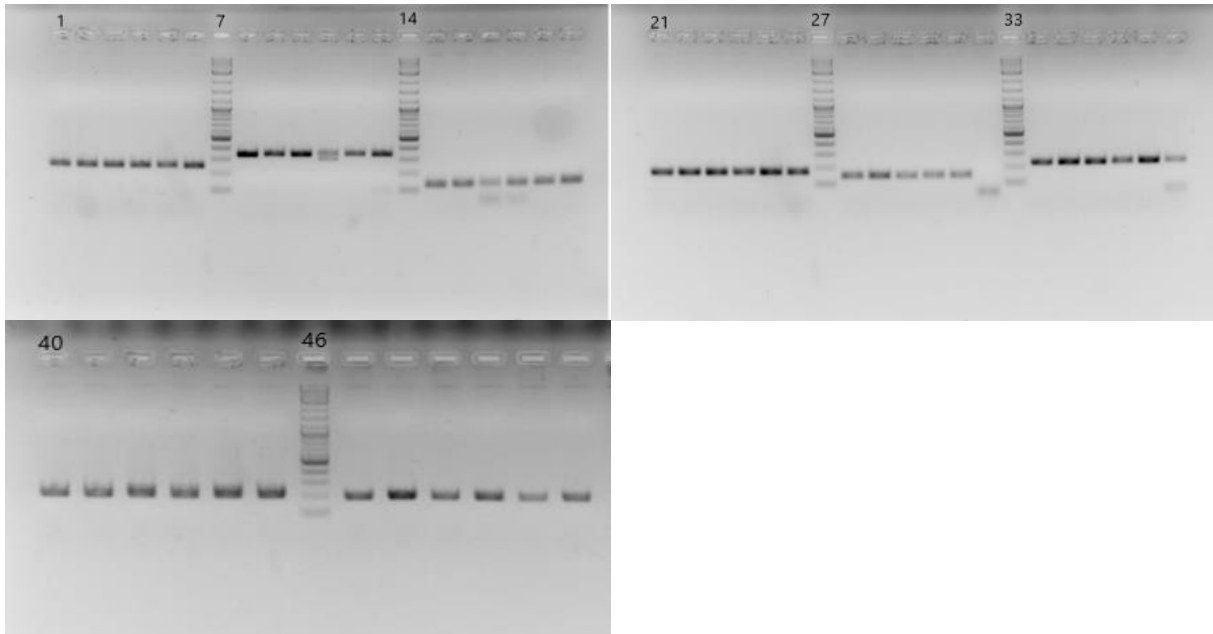


Abbildung 7: Kontrolle Amplifikationsprodukte mittels Agarose Gelelektrophorese

Murine EL4 siKSRP T-Zellen (siKSRP) und EL4 Kontrollzellen wurden entsprechend der beschriebenen Methodik ausgesät, stimuliert und die mRNA-Expression quantitativ mittels qRT-PCR bestimmt (Kapitel 4.1.4-4.2.4). Dargestellt sind die Banden verschiedener qRT-PCR Produkte, die mittels Agarose Gelelektrophorese entsprechend ihrer Fragmentgröße aufgetrennt wurden. In der ersten Abbildung sind die PCR Produkte IL-5 in Spur 1-6, IL-10 von 8-13 und IL-13 von 15-20 dargestellt. Der verwendete Marker zur Detektion der Bandenhöhe wurde in Position 7 und 14 aufgetragen. In Abbildung 2 werden die Amplifikationsprodukte von HPRT auf Position 21-26, IL-2 von 28-32 sowie c-MAF von 34-39 dargestellt. Der Marker sitzt in den Spuren 27 und 33. In der 3. Abbildung sind in Spur 40-45 GAPDH, 47-52 18S und auf Position 46 der Marker aufgetragen.

Nach erfolgreicher Charakterisierung der EL4 siKSRP Zellen, sollte die mRNA-Expression von IL-5, IL-10, IL-13, sowie c-MAF nach Stimulation von EL4 CO-A Zellen sowie EL4 siKSRP Zellen mittels qRT-PCR quantifiziert werden. Um sicherzugehen, dass im Rahmen der PCR-Reaktion das richtige Amplifikat durch spezifische Primerbindung gebildet wird, wurde dies mittels einer Agarose Gelelektrophorese kontrolliert (Kapitel 4.2.5). Die Größe der Amplifikationsprodukte wurde anhand des aufgetragenen Markers bestimmt und mit denen die aus der Datenbank (blast.ncbi.nlm.nih.gov) Analyse vorhergesagt wurden abgeglichen.

In Abbildung 1 sind von links nach rechts IL-5 (240 bp), IL-10 (329 bp) und IL-13 (123 bp) aufgeführt. In Abbildung 2 sind die Banden von HPRT (164 bp), IL-2 (140 bp) und c-MAF (215 bp) zu sehen und in Abbildung 3 wurden die PCR-Produkte der Haushaltsgene GAPDH (201-238 bp)

Ergebnisse

und 18S (186 bp) aufgetrennt. Es handelt sich um das korrekte Amplifikationsprodukt. Die verwendeten Primer (Tabelle 3) können für die weiteren qRT-PCR Analysen eingesetzt werden.

5.3 Analyse der mRNA-Expression der T_H2-assoziierten Zytokine IL-5, IL-10, IL-13 in EL4 T-Zellen mit verminderter Expression von KSRP nach Stimulation mit PMA für 24 h

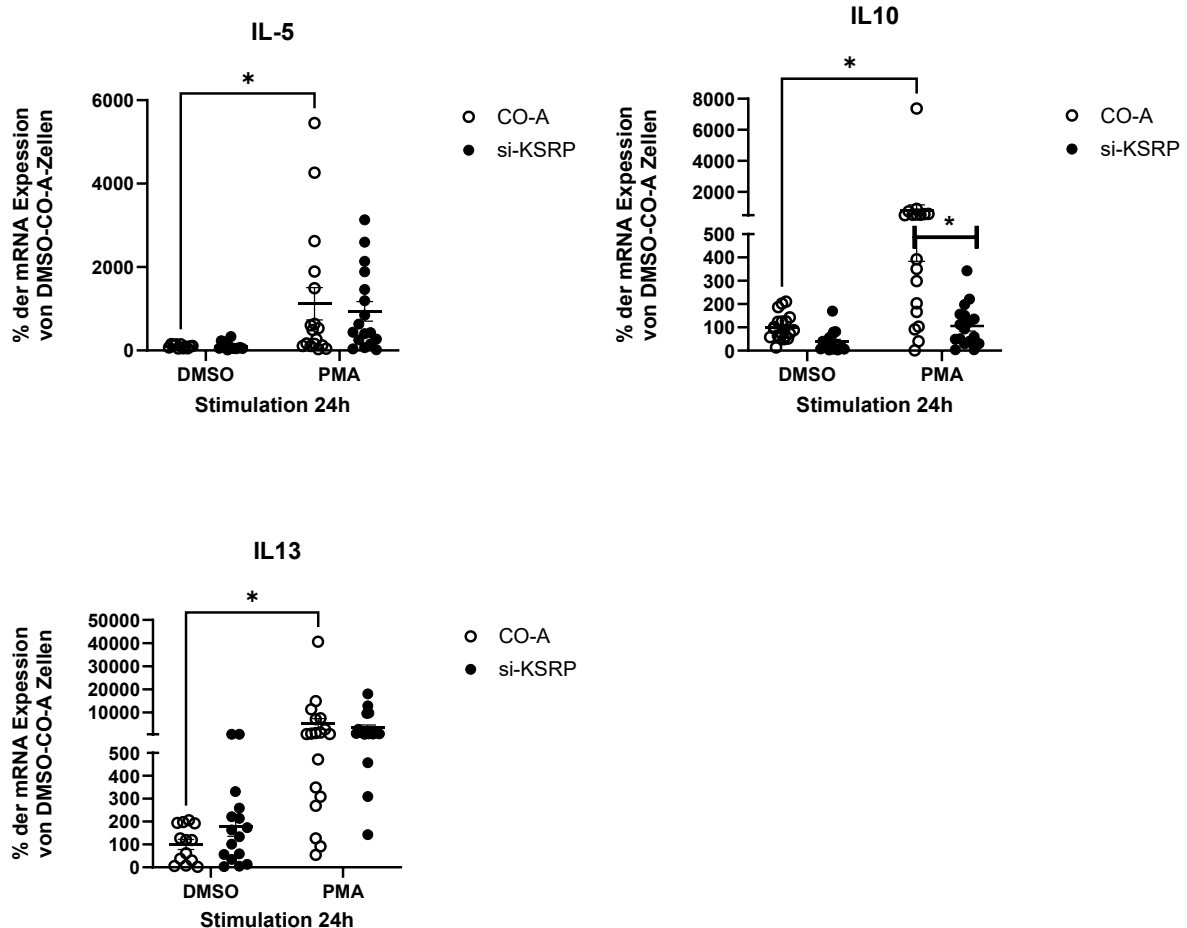


Abbildung 8: KSRP-abhängige Expression von IL-5, IL-10, IL-13 nach PMA-Stimulation für 24 h

Murine EL4 siKSRP T-Zellen (siKSRP) und EL4 Kontrollzellen wurden in einer 24-Lochplatte mit einer Konzentration von 10^5 Zellen/Loch ausgesät und für 24 h mit DMSO oder PMA (1 μ g/ml) stimuliert. Die quantitative mRNA-Expressionsanalyse wurde mittels qRT-PCR durchgeführt und auf die Expression des Haushaltsgens GAPDH normiert. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM ($n=3$, $n=4$ /Experiment) aus fünf durchgeführten Experimenten (IL-5: *: $p<0,05$; IL-10: * $p<0,05$; IL-13: * $p<0,05$ im Vergleich zu DMSO behandelte Zellen; (IL-5: keine Signifikanz; IL-10: # $p<0,05$; IL-13: keine Signifikanz verschieden bezogen auf P/I behandelte EL4 CO-A Zellen, two-way-ANOVA, Bonferroni Korrektur).

Vorangegangene Ergebnisse der AG Pautz zeigen, dass das RBP KSRP als Negativregulator der Expression von T_H2-assoziierten Zytokine fungiert (5).

Im Rahmen dieser Arbeit sollte mit Hilfe der EL4 siKSRP Zellen exploriert werden, ob KSRP an der Regulation der Expression der T_H2-assoziierten Zytokine IL-5, IL-10 und IL-13 beteiligt ist. Die

Ergebnisse

Suspensionszellen wurden in serumreduziertem Medium mit 0,5 % FCS ausgesät und für 24 h mit PMA (1 µg/ml) oder DMSO als Lösungsmittelkontrolle stimuliert. Die Zellen wurden mit GIT-Puffer lysiert, die RNA analysiert und mittels Reverse Transkription in cDNA umgeschrieben. Im Anschluss wurde eine qRT-PCR zur quantitativen Analyse der mRNA-Expression von IL-5, IL-10 und IL-13 durchgeführt (Kapitel 4.1.4-4.2.4).

In der Abbildung sind die Mittelwerte der mRNA-Expression von IL-5, IL-10 und IL-13 in PMA induzierten und mit DMSO behandelten EL4 siKSRP sowie EL4 CO-A Zellen gezeigt.

Eine Induktion der IL-5 mRNA-Expression nach Stimulation der Zellen mit PMA ist in den EL4 CO-A Zellen nachzuweisen. Die mRNA-Expression steigt im Vergleich zu den mit DMSO behandelten Zellen in den CO-A Zellen um etwa das 11-fache signifikant an. Auch in den EL4 siKSRP Zellen scheint eine Induktion der IL-5 mRNA-Expression nach PMA-Stimulation um etwa das 9-fache stattzufinden. Aufgrund der großen Varianz konnte allerdings keine statistische Signifikanz für diesen Effekt nachgewiesen werden.

In den PMA induzierten EL4 siKSRP Zellen konnte kein Unterschied in der IL-5 mRNA-Expression im Vergleich zu den mit PMA behandelten EL4 CO-A Zellen detektiert werden. Die PMA induzierte IL-5 mRNA-Expression liegt in beiden Zelllinien auf einem ähnlichen Niveau.

Bei Betrachtung der Induktion der IL-10 mRNA-Expression nach Stimulation der Zellen mit PMA ist in den EL4 CO-A Zellen ein signifikanter Anstieg um etwa das 8-fache zu erkennen. In den EL4 siKSRP Zellen ist eine Induktion der IL-10 mRNA-Expression um etwa das 3-fache nicht auszuschließen. Allerdings stellte sich dieser Effekt als nicht signifikant dar. In den PMA induzierten EL4 siKSRP Zellen konnte eine signifikante Verminderung der IL-10 mRNA-Expression im Vergleich zu den mit PMA behandelten EL4 CO-A Zellen um etwa das 7,5-fache detektiert werden.

Eine Induktion der IL-13 mRNA-Expression nach Stimulation der Zellen mit PMA ist in den EL4 CO-A Zellen nachzuweisen. Die mRNA-Expression steigt im Vergleich zu den mit DMSO behandelten Zellen in den CO-A Zellen signifikant um etwa das 50-fache an. In den siKSRP Zellen scheint ein Anstieg um etwa das 19-fache vorzuliegen, welcher allerdings möglicherweise aufgrund der großen Varianz nicht signifikant nachgewiesen werden konnte. In den PMA induzierten EL4 siKSRP Zellen konnte kein Unterschied in der IL-13 mRNA-Expression im Vergleich zu den mit PMA behandelten EL4 CO-A Zellen detektiert werden. Die PMA induzierte IL-13 mRNA-Expression liegt in beiden Zelllinien auf einem ähnlichen Niveau.

Die Normierung der Daten auf das Haushaltsgen HPRT (Daten nicht gezeigt) lieferte vergleichbare Resultate.

5.4 Analyse der mRNA-Expression der T_H2-assoziierten Zytokine IL-5, IL-10, IL-13 in EL4 T-Zellen mit verminderter Expression von KSRP nach Stimulation mit PMA und Ionomycin für 24 h

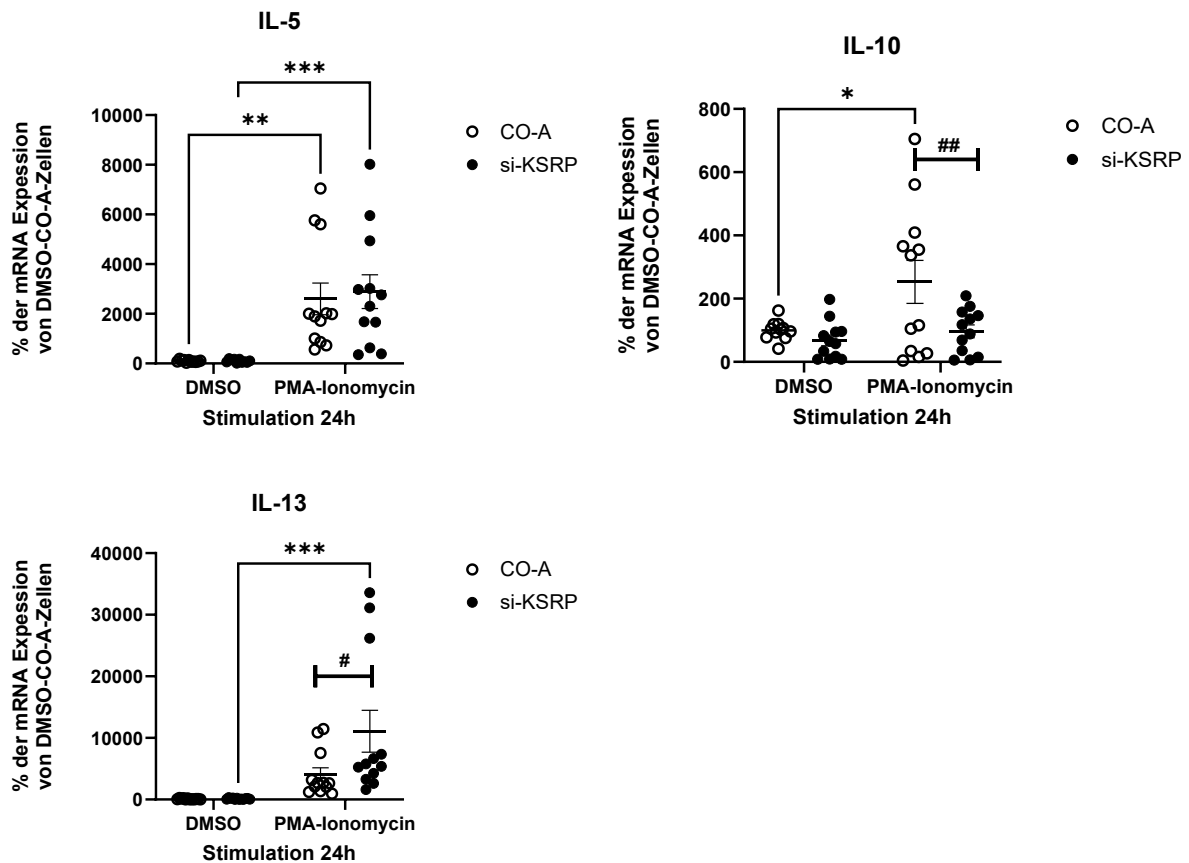


Abbildung 9: KSRP-abhängige Expression von IL-5, IL-10, IL-13 nach P/I Stimulation für 24 h
 Murine EL4 siKSRP T-Zellen (siKSRP) und EL4 Kontrollzellen wurden in einer 96-Lochplatte mit einer Konzentration von 10^5 Zellen/Loch ausgesät und für 24 h mit DMSO oder der Kombination aus PMA und Ionomycin ($1\mu\text{g}/\text{ml}$) stimuliert. Die quantitative mRNA-Expressionsanalyse wurde mittels qRT-PCR durchgeführt und auf die Expression des Haushaltsgens GAPDH normiert. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM ($n=3/\text{Experiment}$) aus vier durchgeführten Experimenten (IL-5: ***: $p<0,001$; **: $p<0,01$; IL-10: * $p<0,05$; IL-13: *** $p<0,001$ im Vergleich zu DMSO behandelte Zellen; IL-5: keine Signifikanz; IL-10: ## $p<0,01$; IL-13: # $p<0,05$ verschieden bezogen auf P/I behandelte EL4 CO-A Zellen, two-way-ANOVA, Bonferroni Korrektur).

Mit dem Ziel signifikante Ergebnisse zu erzielen und zu reproduzieren, wurde die Versuchsdurchführung modifiziert. Die Stimulation der Zellen erfolgte nun zusätzlich zu dem Stimulanz PMA auch mit Ionomycin ($1\mu\text{g}/\text{ml}$). Zusätzlich wurden die Zellen nicht mehr in einer 24-Lochplatte sondern einer 96-Lochplatte ausgesät. Als Lösungsmittelkontrolle wurde weiterhin DMSO verwendet. Die weitere Methodik unterschied sich nicht von der Durchführung des zuvor beschriebenen Interleukinversuchs (Kapitel 4.1.4-4.2.4).

Eine Induktion der IL-5 mRNA-Expression nach Stimulation der Zellen mit P/I ist sowohl in den EL4 siKSRP als auch den EL4 CO-A Zellen nachzuweisen. Die mRNA-Expression steigt im Vergleich zu den jeweiligen mit DMSO behandelten Zellen in den CO-A Zellen um etwa das 26-

Ergebnisse

fache und in den siKSRP Zellen um etwa das 28-fache an. Dieser Unterschied ist in beiden Fällen signifikant. Allerdings konnte in den P/I induzierten EL4 siKSRP Zellen kein Unterschied in der IL-5 mRNA-Expression im Vergleich zu den mit P/I behandelten EL4 CO-A Zellen detektiert werden. Die P/I induzierte IL-5 mRNA-Expression liegt in beiden Zelllinien auf einem ähnlichen Niveau.

Bei Betrachtung der Induktion der IL-10 mRNA-Expression nach Stimulation der Zellen mit P/I ist lediglich in den EL4 CO-A Zellen ein Anstieg zu erkennen. Die mRNA-Expression steigt im Vergleich zu den mit DMSO behandelten Zellen in den CO-A Zellen signifikant um etwa das 2,5-fache an. In den P/I induzierten EL4 siKSRP Zellen konnte eine signifikante Verminderung der IL-10 mRNA-Expression im Vergleich zu den mit P/I behandelten EL4 CO-A Zellen um etwa das 2,5-fache detektiert werden.

Eine Induktion der IL-13 mRNA-Expression nach Stimulation der Zellen mit P/I ist in den EL4 siKSRP Zellen nachzuweisen. Die mRNA-Expression steigt im Vergleich zu den mit DMSO behandelten Zellen in den siKSRP Zellen signifikant um etwa das 85-fache an. In den CO-A Zellen scheint eine Induktion der IL-13 mRNA-Expression nach P/I Stimulation um etwa das 40-fache stattzufinden. Aufgrund der großen Varianz konnte allerdings keine statische Signifikanz für diesen Effekt nachgewiesen werden.

In den P/I induzierten EL4 siKSRP Zellen zeigte sich ein signifikanter Anstieg um das 2,5-fache in der IL-13 mRNA-Expression im Vergleich zu den mit P/I behandelten EL4 CO-A Zellen. Die Normierung der Daten auf das Haushaltsgen HPRT (Daten nicht gezeigt) lieferte vergleichbare Resultate.

5.5 Analyse der mRNA-Expression der T_H2-assoziierten Zytokine IL-5, IL-10, IL-13 in EL4 T-Zellen mit verminderter Expression von KSRP nach Stimulation mit PMA und Ionomycin für 48 h

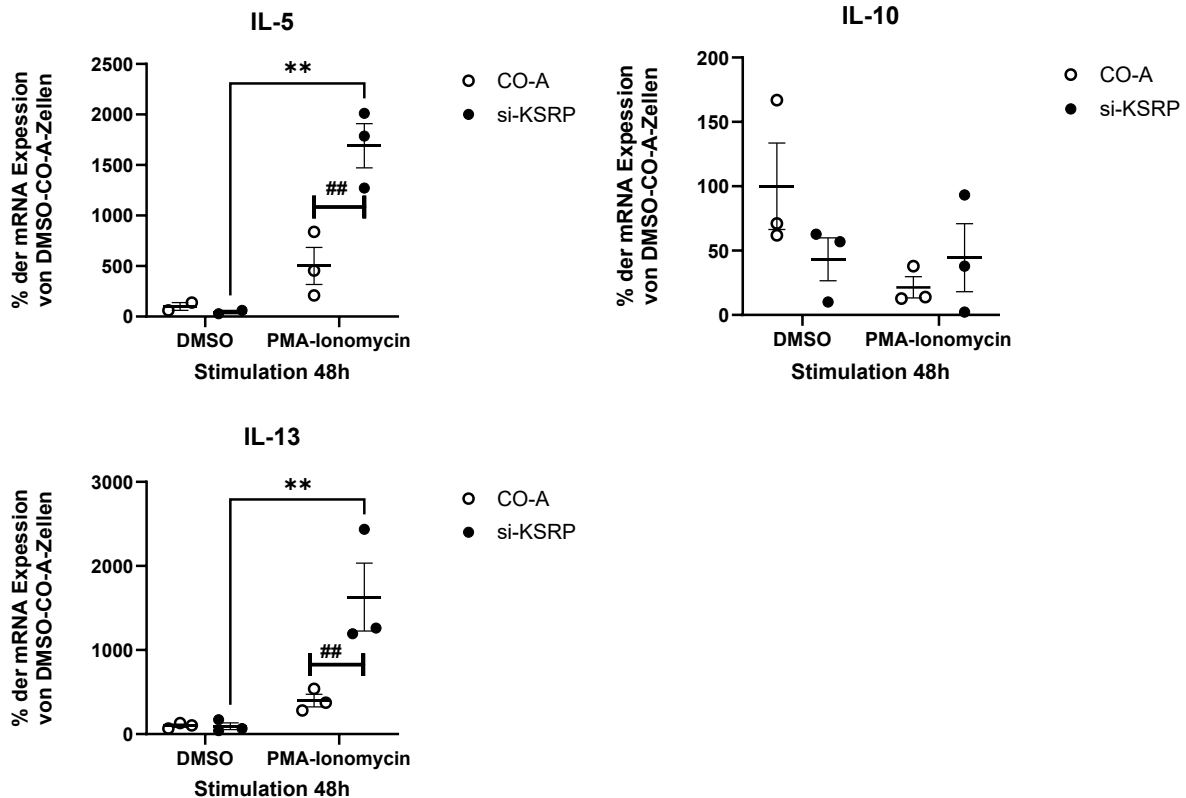


Abbildung 10: KSRP-abhängige Expression von IL-5, IL-10, IL-13 nach P/I Stimulation für 48 h
 Murine EL4 siKSRP T-Zellen (siKSRP) und EL4 Kontrollzellen wurden in einer 96-Lochplatte mit einer Konzentration von 10^5 Zellen/Loch ausgesät und für 48 h mit DMSO oder der Kombination aus PMA und Ionomycin ($1 \mu\text{g/ml}$) stimuliert. Die quantitative mRNA-Expressionsanalyse wurde mittels qRT-PCR durchgeführt und auf die Expression des Haushaltsgens GAPDH normiert. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM ($n=3/\text{Experiment}$) aus einem durchgeführten Experiment (IL-5: **: $p < 0,01$; IL-10: keine Signifikanz; IL-13: **: $p < 0,01$ im Vergleich zu DMSO behandelte Zellen; IL-5: #: $p < 0,01$; IL-10: keine Signifikanz; IL-13: #: $p < 0,01$ verschieden bezogen auf P/I behandelte EL4 CO-A Zellen, two-way-ANOVA, Bonferroni Korrektur).

In dem vorausgegangenen Zytokinversuch (Kapitel 5.4) konnte man eine Induktion der mRNA-Expression durch die Stimulation der Zellen mit P/I für 24h in den EL4 CO-A Zellen für die IL-5 und IL-10 mRNA-Expression und in den EL4 siKSRP Zellen für die IL-5 und IL-13 mRNA-Expression beobachten. Eine signifikant erhöhte IL-13 mRNA-Expression sowie eine reduzierte IL-10 mRNA-Expression konnte in den stimulierten EL4 siKSRP Zellen im Vergleich zu den EL4 CO-A Zellen beobachtet werden. Um diese richtungsweisenden Ergebnisse zu reproduzieren und mit der Hoffnung signifikante Ergebnisse auch für die anderen Zytokine zu erhalten wurde die Versuchsdurchführung erneut modifiziert. Die Stimulationszeit der Zellen unter P/I wurde von 24h auf 48h erhöht. Die weitere Methodik unterschied sich nicht weiter von der Durchführung des vorherigen Interleukinversuchs (Kapitel 5.4,4.1.4-4.2.4). In der Abbildung sind die

Ergebnisse

Mittelwerte der mRNA-Expression von IL-5, IL-10 und IL-13 in P/I induzierten und mit DMSO behandelten EL4 siKSRP sowie EL4 CO-A Zellen gezeigt.

Eine Induktion der IL-5 mRNA-Expression nach Stimulation der Zellen mit P/I ist in den EL4 siKSRP Zellen nachzuweisen. Die mRNA-Expression steigt im Vergleich zu den mit DMSO behandelten siKSRP-Zellen um etwa das 37-fache signifikant an. In den CO-A Zellen findet augenscheinlich ebenfalls eine Induktion der IL-5 mRNA-Expression nach Stimulation mit P/I um etwa das 5-fache statt. Dieser Effekt ist jedoch nicht signifikant, was möglicherweise mit einer geringen Probenzahl zusammenhängen könnte.

In den P/I induzierten EL4 siKSRP Zellen konnte eine signifikante Erhöhung der IL-5 mRNA-Expression im Vergleich zu den mit P/I behandelten EL4 CO-A Zellen um etwa das 3,5-fache detektiert werden.

Bei Betrachtung der Induktion der IL-10 mRNA-Expression nach Stimulation der Zellen mit P/I ist keine deutliche Veränderung zu erkennen. Die IL-10 mRNA-Expression liegt bei allen untersuchten Proben auf einem ähnlichen Niveau. Tendenziell führt die verlängerte P/I Stimulationsdauer eher zu einer Verminderung der IL-10 mRNA-Expression sowohl in den EL4 CO-A als auch in den siKSRP Zellen.

Eine Induktion der IL-13 mRNA-Expression nach Stimulation der Zellen mit P/I ist in den EL4 siKSRP Zellen nachzuweisen. Die mRNA-Expression steigt im Vergleich zu den mit DMSO behandelten Zellen in den siKSRP Zellen um etwa das 18-fache an. Dieser Anstieg ist signifikant. Auch in den CO-A Zellen scheint eine Induktion der IL-13 mRNA-Expression nach P/I Stimulation stattzufinden. Aufgrund der geringen Probenanzahl konnte jedoch keine Signifikanz bei diesem Effekt beobachtet werden.

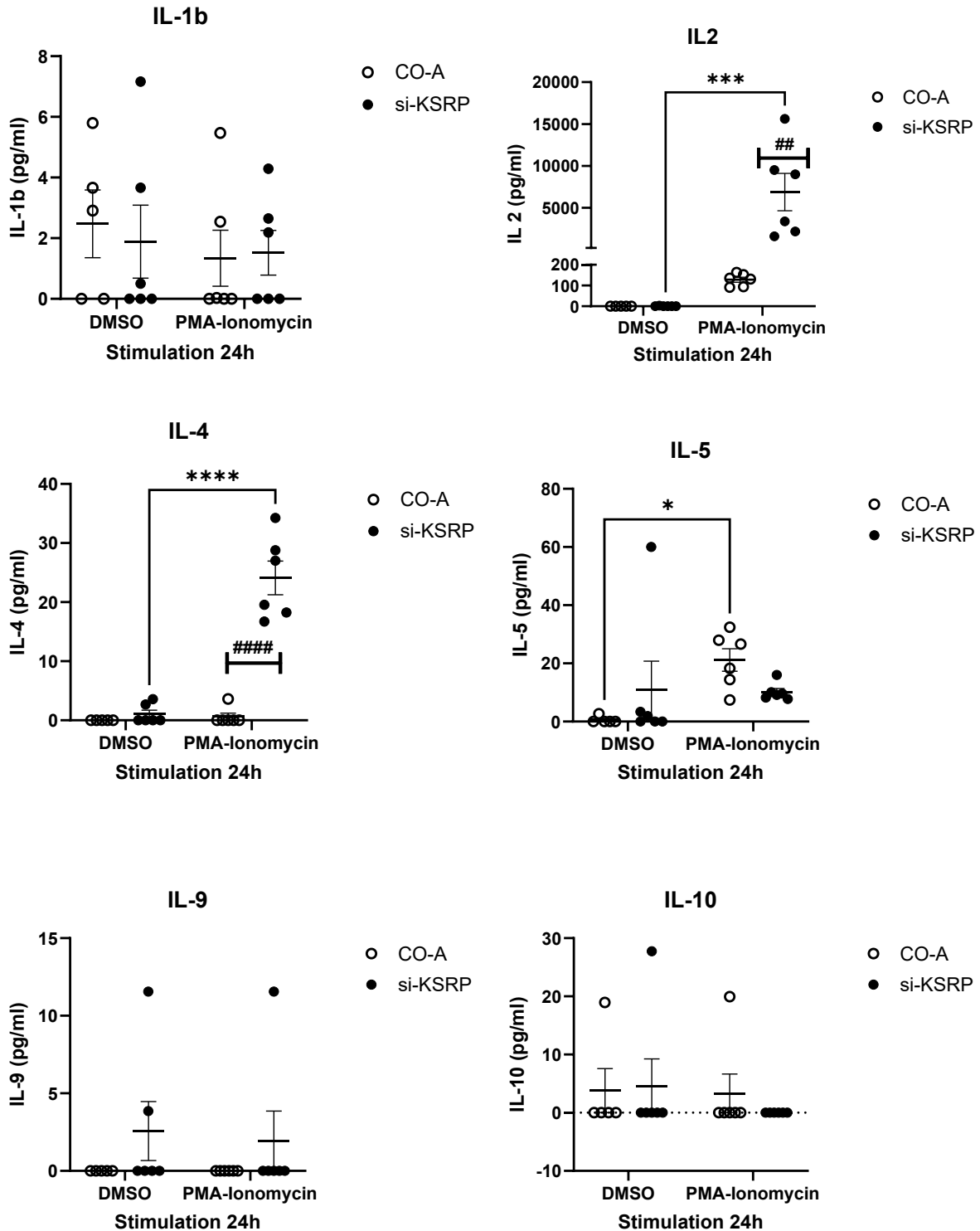
In den P/I induzierten EL4 siKSRP Zellen zeigte sich ein signifikanter Anstieg um das 4-fache in der IL-13 mRNA-Expression im Vergleich zu den mit P/I behandelten EL4 CO-A Zellen. Die Normierung der Daten auf das Haushaltsgen HPRT (Daten nicht gezeigt) lieferte vergleichbare Resultate.

5.6 Analyse der mRNA-Expression in EL4 T-Zellen mit verminderter Expression von KSRP bei geringerer Zelldichte am Beispiel IL-10

In einem nächsten Schritt sollten die Ergebnisse der mRNA-Expressionsanalysen auf Proteinebene bestätigt werden. Hierzu wurde die Methode der CBA-Analyse durchgeführt, die es ermöglicht zeitgleich mehrere Zytokine quantitativ zu analysieren (Kapitel 4.3.5).

Um die optimale Zelldichte für diesen experimentellen Ansatz zu explorieren, wurden mit 10^3 , 10^4 , 10^5 und 10^6 Zellen/Loch verschiedene Zell Konzentrationen getestet. Anhand der mRNA-Expressionsanalysen von IL-10 wurde als optimale Konzentration die Zelldichte von 10^5 Zellen/Loch bestätigt (Kapitel 4.1.4-4.2.4). Bei den anderen Zell Konzentrationen waren die Varianz der Ergebnisse zu hoch und sie wurden daher als ungeeignet verworfen (Daten nicht gezeigt).

5.7 Quantitative Analyse der Proteinexpression proinflammatorischer Zytokine mittels CBA in EL4 T-Zellen mit verminderter Expression von KSRP nach Stimulation mit PMA und Ionomycin für 24 h



Ergebnisse

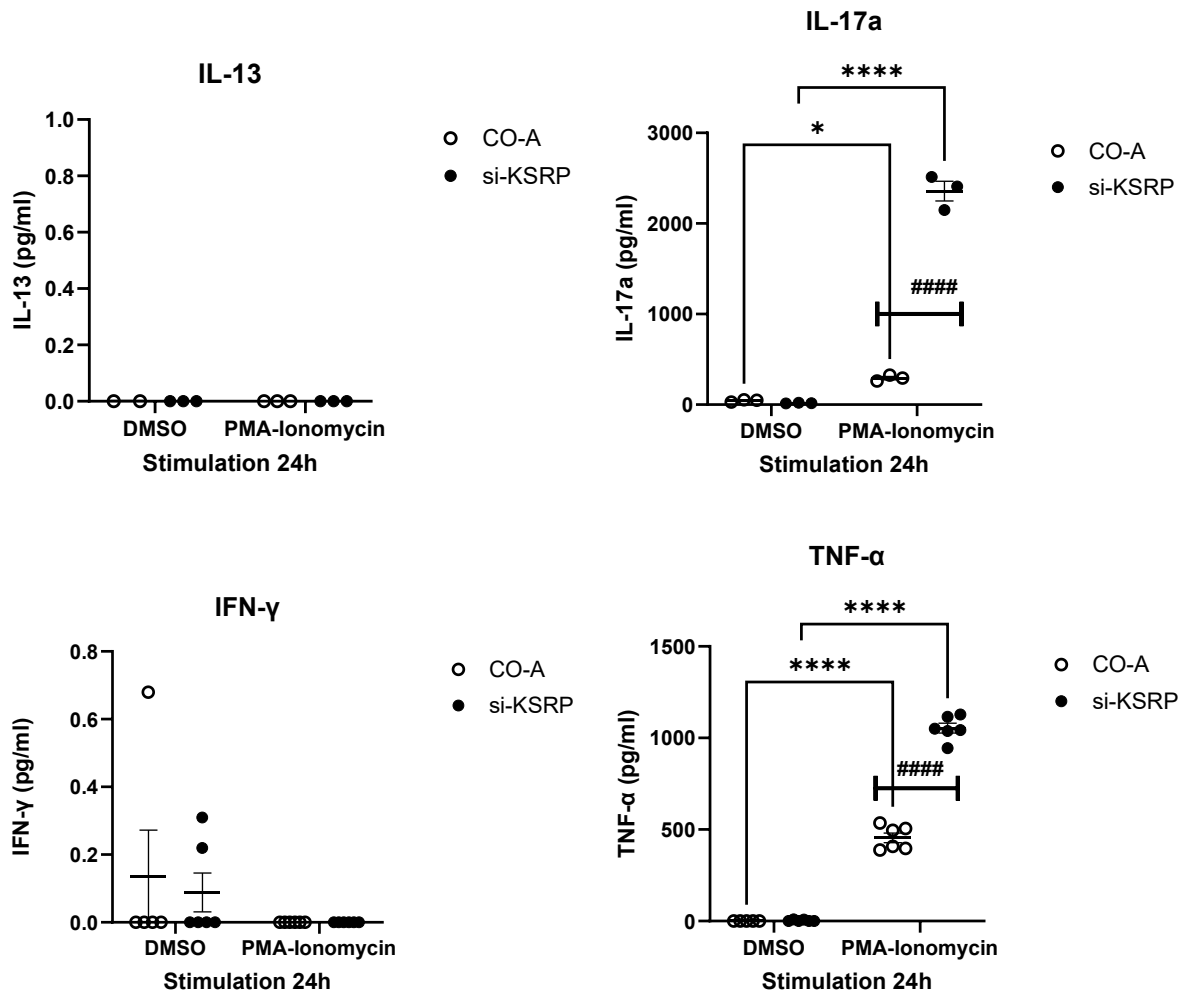


Abbildung 11: Ergebnisse der KSRP-abhängigen Proteinexpression verschiedener Zytokine nach Stimulation mit P/I für 24 h

Murine EL4 siKSRP T-Zellen (siKSRP) und EL4 Kontrollzellen wurden in einer 96-Lochplatte mit einer Konzentration von 10^5 Zellen/Loch ausgesät und für 24 h mit DMSO oder einer Kombination aus PMA und Ionomycin ($1 \mu\text{g/ml}$) stimuliert. Die Platte wurde zentrifugiert und der Überstand für die weitere Analyse eingesetzt. Die quantitative Bestimmung der Proteine erfolgte mittels der Durchflusszytometrie Cytometric Bead Array (CBA). Dargestellt sind die absoluten Messwerte ($n=3/\text{Experiment}$) aus einem durchgeführten Experiment (IL-1b: keine Signifikanz; IL-2: $***p < 0,001$; IL-4: $****p < 0,001$; IL-5: $*p < 0,05$; IL-9: keine Signifikanz; IL-10: keine Signifikanz; IL-13: keine Signifikanz; IL-17a: $****p < 0,001$; $*p < 0,05$; IFN- γ : keine Signifikanz; TNF- α : $****p < 0,001$; $****p < 0,001$ im Vergleich zu DMSO behandelte Zellen; IL-1b: keine Signifikanz; IL-2: $##p < 0,01$; IL-4: $####p < 0,001$; IL-5: keine Signifikanz; IL-9: keine Signifikanz; IL-10: keine Signifikanz; IL-13: keine Signifikanz; IL-17a: $####p < 0,001$; IFN- γ : keine Signifikanz; TNF- α : $####p < 0,001$ verschieden bezogen auf P/I behandelte EL4 CO-A Zellen, two-way-ANOVA, Bonferroni Korrektur).

Zur quantitativen Analyse der Expression von T_H2 -assoziierten und weiteren Zytokinen wurde ein Cytometric Bead Array durchgeführt. Zur Vorbereitung dieser Analyse wurden murine T-Zellen mit verminderter KSRP-Expression sowie Kontrollzellen ausgesät und mit der Lösungsmittelkontrolle DMSO oder einer Kombination aus PMA und Ionomycin ($1 \mu\text{g/ml}$) für 24 h inkubiert (Kapitel 4.1.5). Der dabei entstandene Überstand wurde für die Durchflusszytometrie CBA eingesetzt (Kapitel 4.3.5).

Ergebnisse

In der Abbildung sind die absoluten Messwerte der Proteinexpression der siKSRP sowie der CO-A Zellen im induzierten und nicht induzierten Zustand aufgeführt.

Eine Induktion der IFN- γ , IL-10, IL-1b, IL-9 sowie IL-13-Proteinexpression nach Stimulation der Zellen mit P/I ist weder in den EL4 siKSRP Zellen noch den EL4 CO-A Zellen nachzuweisen. Es besteht kein signifikanter Unterschied. Es konnte in den P/I induzierten EL4 siKSRP Zellen kein Unterschied in der jeweiligen Proteinexpression im Vergleich zu den mit P/I behandelten EL4 CO-A Zellen detektiert werden. Die P/I induzierte Proteinexpression liegt in beiden Zelllinien auf einem ähnlichen Niveau.

Eine Induktion der IL-2-Proteinexpression nach Stimulation der Zellen mit P/I ist in den EL4 siKSRP Zellen nachzuweisen. Die Proteinexpression steigt im Vergleich zu den mit DMSO behandelten Zellen in den siKSRP Zellen um etwa das 11340-fache an. Dieser Effekt ist signifikant. In den EL4 CO-A Zellen ist ein leichter Induktionseffekt der Proteinexpression im Vergleich zu den mit DMSO behandelten Zellen auf etwa 128 pg/ml zu erkennen. Dieser Effekt stellt sich jedoch nicht als signifikant dar. In den P/I induzierten EL4 siKSRP Zellen konnte ein Anstieg in der IL-2-Proteinexpression im Vergleich zu den mit P/I behandelten EL4 CO-A Zellen um etwa das 54-fache detektiert werden. Dieser Unterschied ist als signifikant einzuordnen.

Nach Behandlung mit P/I weisen die EL4 siKSRP Zellen im Vergleich zu den mit DMSO behandelten Zellen eine erhöhte Expression des IL-4 Proteins um etwa das 23-fache auf. Die Induktion durch P/I ist in den EL4 siKSRP Zellen signifikant. In den EL4 CO-A Zellen ist keine sichere Induktion der IL-4-Proteinexpression erkennbar. In den mit P/I behandelten EL4 siKSRP Zellen ist eine signifikante Erhöhung der IL-4-Proteinexpression im Vergleich zu den P/I behandelten EL4 CO-A Zellen zu beobachten. Es ist ein Anstieg der IL-4-Proteinexpression in den siKSRP Zellen etwa um das 40-fache im Vergleich zu den CO-A Zellen zu beobachten.

Eine Induktion der IL-5-Proteinexpression nach Stimulation der Zellen mit P/I ist lediglich in den EL4 CO-A Zellen nachzuweisen. Die Proteinexpression steigt im Vergleich zu den jeweiligen mit DMSO behandelten Zellen in den CO-A Zellen um etwa das 39-fache an. Dieser Unterschied ist signifikant. In den EL4 siKSRP Zellen ist nach 24 h Stimulation mit P/I kein offensichtlicher Unterschied in der IL-5-Expression im Vergleich zu den mit DMSO behandelten EL4 siKSRP Zellen zu sehen. In den P/I induzierten EL4 siKSRP Zellen gibt es Hinweise auf eine Reduktion der IL-5-Proteinexpression im Vergleich zu den mit P/I behandelten EL4 CO-A Zellen. Allerdings ist dieser Unterschied nicht signifikant.

Bei Betrachtung der Induktion der IL-17a Proteinexpression nach Stimulation der Zellen mit P/I ist sowohl in den EL4 CO-A Zellen als auch den EL4 siKSRP Zellen ein Anstieg zu erkennen. Die Expression des IL-17a Proteins steigt im Vergleich zu den mit DMSO behandelten Zellen in den CO-A Zellen um etwa das 7-fache und in den siKSRP Zellen um etwa das 138-fache an. Dieser Unterschied ist in beiden Fällen signifikant. In den P/I induzierten EL4 siKSRP Zellen konnte eine signifikante Erhöhung der IL-17a-Proteinexpression im Vergleich zu den mit P/I behandelten EL4 CO-A Zellen um etwa das 8-fache detektiert werden.

Bei Betrachtung der Induktion der TNF- α -Proteinexpression nach Stimulation der Zellen mit P/I ist sowohl in den EL4 CO-A Zellen als auch den EL4 siKSRP Zellen ein Anstieg zu erkennen. Die Expression des TNF- α Proteins steigt im Vergleich zu den mit DMSO behandelten Zellen in den CO-A Zellen von 0 auf etwa 455 pg/ml und in den siKSRP Zellen um etwa das 358-fache an. Dieser Unterschied ist in beiden Fällen signifikant. In den P/I induzierten EL4 siKSRP Zellen konnte eine signifikante Erhöhung der TNF- α Proteinexpression im Vergleich zu den mit P/I behandelten EL4 CO-A Zellen um etwa das 2,5-fache detektiert werden.

5.8 Quantitative Analyse der Proteinexpression proinflammatorischer Zytokine in EL4 T-Zellen mit verminderter Expression von KSRP nach Stimulation mit PMA und Ionomycin für 48 h

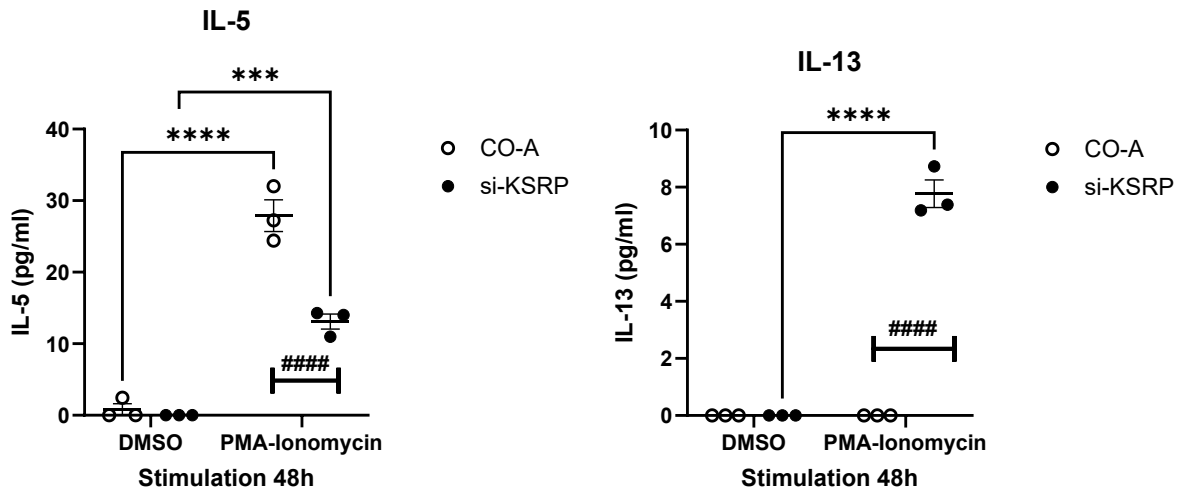


Abbildung 12: Ergebnisse der KSRP-abhängigen Proteinexpression verschiedener Zytokine nach Stimulation mit P/I für 48 h

Murine EL4 siKSRP T-Zellen (siKSRP) und EL4 Kontrollzellen wurden in einer 96-Lochplatte mit einer Konzentration von 10^5 Zellen/Loch ausgesät und für 48 h mit DMSO oder einer Kombination aus PMA und Ionomycin ($1 \mu\text{g/ml}$) stimuliert. Die Platte wurde zentrifugiert und der Überstand für die weitere Analyse eingesetzt. Die quantitative Bestimmung der Proteine erfolgte mittels der Durchflusszytometrie Cytometric Bead Array. Dargestellt sind die absoluten Messwerte ($n=3/\text{Experiment}$) aus einem durchgeführten Experiment. Die linke Abbildung stellt die quantitative Analyse der IL-5-Proteinexpression dar (IL-5: **** $p < 0,001$; *** $p < 0,001$ im Vergleich zu DMSO behandelte Zellen; #### $p < 0,001$ verschieden bezogen auf P/I behandelte EL4 CO-A Zellen, two-way-ANOVA, Bonferroni Korrektur). In der rechten Grafik sind die Ergebnisse der quantitativen IL-13-Proteinexpression aufgetragen (IL-13: **** $p < 0,001$; im Vergleich zu DMSO behandelte Zellen; #### $p < 0,001$ verschieden bezogen auf P/I behandelte EL4 CO-A Zellen, two-way-ANOVA, Bonferroni Korrektur).

Die CBA FACS Analyse (Kapitel 4.3.5) wurde wiederholt, die Stimulationsdauer aber auf 48 h verlängert. Alle anderen Versuchsbedingungen unterschieden sich zu dem 24 h Stimulationsansatz nicht (Kapitel 4.1.5). Dies diente dazu herauszufinden, ob die Stimulationszeit einen signifikanten Einfluss auf die Zytokinexpression hat. Es werden lediglich die Daten mit einem von den 24 h abweichenden Ergebnissen gezeigt.

Eine Induktion der IL-5-Proteinexpression nach Stimulation der Zellen mit P/I ist sowohl in den EL4 siKSRP als auch den EL4 CO-A Zellen nachzuweisen. Die IL-5-Proteinexpression steigt im Vergleich zu den jeweiligen mit DMSO behandelten Zellen in den CO-A Zellen von um etwa das 34-fache und in den siKSRP Zellen von 0 auf etwa 13 pg/ml. Dieser Unterschied ist in beiden Fällen signifikant. In den P/I induzierten EL4 siKSRP Zellen konnte eine signifikante Verminderung in der IL-5-Proteinexpression im Vergleich zu den mit P/I behandelten EL4 CO-A Zellen um etwa die Hälfte detektiert werden.

Ergebnisse

Nach Behandlung mit P/I für 24 h weisen lediglich die EL4 siKSRP Zellen eine signifikant erhöhte Expression des IL-13 Proteins im Vergleich zu den mit DMSO behandelten Zellen auf. In den EL4 CO-A Zellen ist kein Anstieg der IL-13-Proteinexpression zu detektieren. In den EL4 siKSRP Zellen steigt die Protein Expression von 0 auf etwa 8 pg/ml an. In den mit P/I behandelten EL4 siKSRP Zellen ist eine signifikante Erhöhung der IL-13-Proteinexpression im Vergleich zu den P/I behandelten EL4 CO-A Zellen um etwa das 8-fache zu beobachten.

5.9 Analyse der miR-155 in EL4 siKSRP T-Zellen

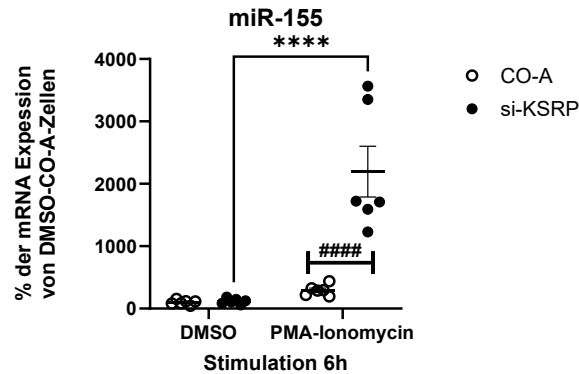


Abbildung 13: KSRP-abhängige miR-155-Expression nach Stimulation mit P/I für 6 h

Murine EL4 siKSRP T-Zellen (siKSRP) und EL4 Kontrollzellen wurden in einer 24-Lochplatte mit einer Konzentration von 10^5 Zellen/Loch ausgesät und für 6 h mit DMSO oder der Kombination aus PMA und Ionomycin ($1 \mu\text{g/ml}$) stimuliert. Das Umschreiben in cDNA sowie die quantitative mRNA-Expressionsanalyse mittels qRT-PCR wurden mit dem TaqMan Kit von applied biosystems durchgeführt und auf die Expression des Haushaltgens hu6U normiert. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM ($n=2/\text{Experiment}$) aus drei durchgeführten Experimenten (miR-155: **** $p < 0,001$ im Vergleich zu DMSO behandelte Zellen; #### $p < 0,001$ verschieden bezogen auf P/I behandelte EL4 CO-A-Zellen, two-way-ANOVA, Bonferroni Korrektur).

In der Literatur wird beschrieben, dass die Reifung der micro RNA-155 (miR-155) von KSRP positiv reguliert wird und somit beim Fehlen von KSRP eine verminderte Reifung der miR-155 zu erwarten ist (25), (Kapitel 2.7). Sollte dies auch in T-Zellen der Fall sein, könnte dies indirekt über eine möglich veränderte Expression des Transkriptionsfaktors c-MAF einen indirekten negativ regulatorischen Einfluss auf T_H2 -assoziierte Zytokine wie IL-5, IL-10 und IL-13 haben. Um diese Hypothese zu überprüfen, muss zunächst untersucht werden, ob EL4 Zellen überhaupt in der Lage sind die miR-155 zu exprimieren und ob dies durch eine verminderte KSRP-Expression beeinflusst wird. Für die Expressionsanalyse der miR-155 wurden EL4 siKSRP sowie EL4 CO-A Zellen mit serumreduziertem Medium ausgesät, mit DMSO oder der Kombination aus $1 \mu\text{g/ml}$ PMA und Ionomycin für 6 h induziert und mit GIT-Puffer lysiert. Die Gesamt-RNA wurde extrahiert, spektrometrisch bestimmt und auf $5 \text{ ng}/\mu\text{l}$ verdünnt. Für die weiteren Arbeitsschritte wurde das TaqMan Kit von applied biosystems verwendet (Tabelle 6). Dieses dient dem Nachweis der reifen miR-155, nicht jedoch der unreifen Vorläuferstufen. Zur Normierung des PCR-Produkts wurde die Expression des Haushaltgens hu6U herangezogen. Dieses wurde mit Hilfe des sondenbasierten TaqMan BlueProbe Systems quantifiziert (Kapitel 4.1.4-4.2.4). Die Normierung auf die Haushaltsgene GAPDH und HPRT zeigten vergleichbare Resultate.

Ergebnisse

In der Abbildung sind die Mittelwerte der miRNA-Expression der siKSRP sowie der CO-A Zellen im induzierten und nicht induzierten Zustand aufgeführt.

Durch Behandlung der Zellen mit P/I über 6 h ist in den EL4 siKSRP Zellen ein signifikanter Anstieg der miR-155 mRNA-Expression im Vergleich zu den mit DMSO behandelten Zellen zu beobachten. Der Anstieg der miR-155 mRNA-Expression beträgt etwa den Faktor 15 durch die Induktion mit P/I. Auch in den EL4 CO-A Zellen scheint eine Stimulation der miR-155 mRNA-Expression nach P/I Behandlung stattzufinden. Allerdings konnte dieser Anstieg um etwa das 3-fache nicht signifikant nachgewiesen werden. Die mit P/I behandelten EL4 siKSRP Zellen weisen eine signifikante um das etwa 7,5-fache erhöhte miR-155-Expression auf im Vergleich zu den mit P/I behandelten EL4 CO-A Zellen.

5.10 Analyse der mRNA-Expression des Transkriptionsfaktors c-MAF in EL4 T-Zellen mit verminderter Expression von KSRP nach Stimulation mit PMA und Ionomycin für 6 h, 24 h und 48 h

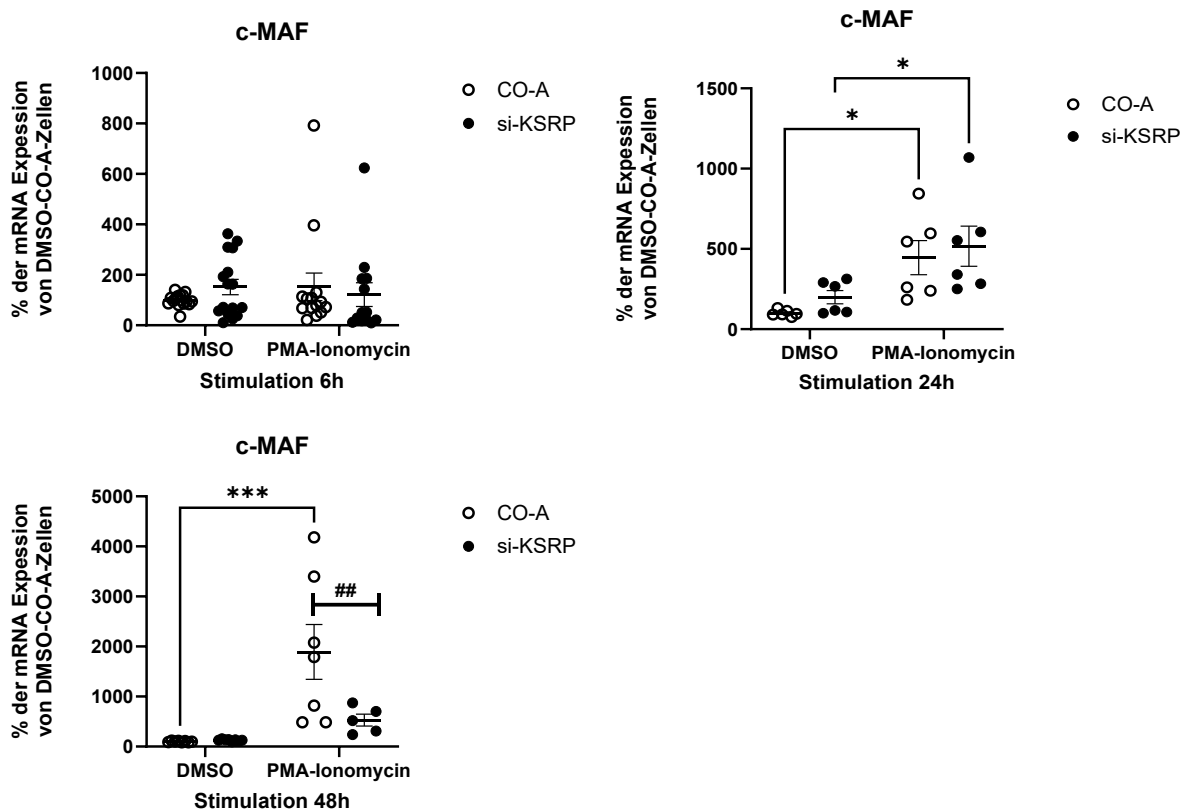


Abbildung 14: KSRP-abhängige c-MAF-Expression nach P/I Stimulation für 6 h, 12 h, 24 h
Murine EL4 siKSRP T-Zellen (siKSRP) und EL4 Kontrollzellen wurden in einer 24- oder 96-Lochplatte mit einer Konzentration von 10^5 Zellen/Loch ausgesät und für 6 h, 24 h und 48 h mit DMSO oder der Kombination aus PMA und Ionomycin ($1 \mu\text{g/ml}$) stimuliert. Die quantitative mRNA-Expressionsanalyse wurde mittels qRT-PCR durchgeführt und auf die Expression des Haushaltsgens GAPDH normiert. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM der durchgeführten Experimente (6 h: keine Signifikanz; 24 h: * $p < 0,05$; * $p < 0,05$; 48 h: *** $p < 0,001$ im Vergleich zu DMSO behandelte Zellen; 6 h: keine Signifikanz; 24 h: keine Signifikanz; 48 h: ## $p < 0,01$ verschieden bezogen auf P/I behandelte EL4 CO-A Zellen, two-way-ANOVA, Bonferroni Korrektur).

Ergebnisse

Es gibt Hinweise, dass der Transkriptionsfaktor c-MAF über miR-155 (6) und damit vielleicht indirekt über das RBP KSRP reguliert werden könnte (Kapitel 6.7). Um zu explorieren, ob die verwendeten EL4 T-Suspensionszellen c-MAF exprimieren und ob darüber hinaus eine signifikante Änderung in der c-MAF-Expression in EL4 T-Zellen mit reduzierter KSRP-Expression zu beobachten ist, wurde dieses Experiment durchgeführt. Murine EL4 siKSRP T-Zellen und EL4 Kontrollzellen wurden unter sterilen Bedingungen in Kulturmedium mit 10 % FCS kultiviert. Die Suspensionszellen wurden in serumreduziertem Medium mit 0,5 % FCS ausgesät und für 6 h, 24 h und 48 h mit einer Kombination aus PMA und Ionomycin (1 µg/ml) oder DMSO zur Lösungsmittelkontrolle stimuliert. Die induzierten Zellen wurden mit GIT-Puffer lysiert, die RNA analysiert und mittels Reverse Transkription in cDNA umgeschrieben. Im Anschluss wurde eine qRT-PCR zur quantitativen Analyse der mRNA von c-MAF durchgeführt und auf die Expression des Haushaltsgens GAPDH normiert (Kapitel 4.1.4-4.2.4).

In der Abbildung sind die Mittelwerte der mRNA-Expression der siKSRP sowie der CO-A Zellen im induzierten und nicht induzierten Zustand aufgeführt.

Eine Induktion der c-MAF mRNA-Expression nach 6 h Stimulationszeit ist weder in den EL4 CO-A noch den EL4 siKSRP Zellen im Vergleich zu den jeweils mit DMSO behandelten Zellen nachzuweisen. Es besteht kein signifikanter Unterschied vor und nach der Behandlung der Zellen mit P/I. Auch in den P/I induzierten EL4 siKSRP Zellen konnte kein Unterschied in der c-MAF mRNA-Expression im Vergleich zu den mit P/I behandelten EL4 CO-A Zellen detektiert werden. Die P/I induzierte c-MAF mRNA-Expression liegt in beiden Zelllinien auf einem ähnlichen Niveau.

Bei Betrachtung der Induktion der c-MAF mRNA-Expression nach Stimulation der Zellen mit P/I für 24 h ist sowohl in den EL4 CO-A Zellen ein leichter Anstieg um etwa das 4,5-fache als auch in den EL4 siKSRP Zellen um etwa das 2,5-fache im Vergleich zu den mit DMSO behandelten Zellen zu erkennen. Dieser Unterschied ist in beiden Fällen signifikant. Allerdings konnte in den P/I induzierten EL4 siKSRP Zellen kein Unterschied in der c-MAF mRNA-Expression im Vergleich zu den mit P/I behandelten EL4 CO-A Zellen detektiert werden. Die P/I induzierte c-MAF mRNA-Expression liegt in beiden Zelllinien auf einem ähnlichen Niveau.

Nach Behandlung der Zellen mit P/I für 48 h weisen die EL4 CO-A Zellen eine signifikant erhöhte Expression der c-MAF mRNA um etwa das 19-fache im Vergleich zu den mit DMSO behandelten Zellen auf. In den EL4 siKSRP Zellen scheint ein Anstieg der c-MAF mRNA-Expression durch Induktion mit P/I um etwa das 4-fache im Vergleich zu den mit DMSO behandelten Zellen zu erfolgen. Dieser Effekt konnte jedoch nicht signifikant nachgewiesen werden. In den mit P/I behandelten EL4 siKSRP Zellen ist eine signifikante Veränderung der c-MAF mRNA-Expression im Vergleich zu den P/I behandelten EL4 CO-A Zellen zu beobachten. Es ist eine Verminderung der c-MAF mRNA-Expression in den siKSRP Zellen auf etwa um 1/3 im Vergleich zu den CO-A Zellen zu beobachten.

5.11 Immundetektion des Transkriptionsfaktors c-MAF mittels Western Blot Analyse in EL4 T-Zellen mit verminderter Expression von KSRP

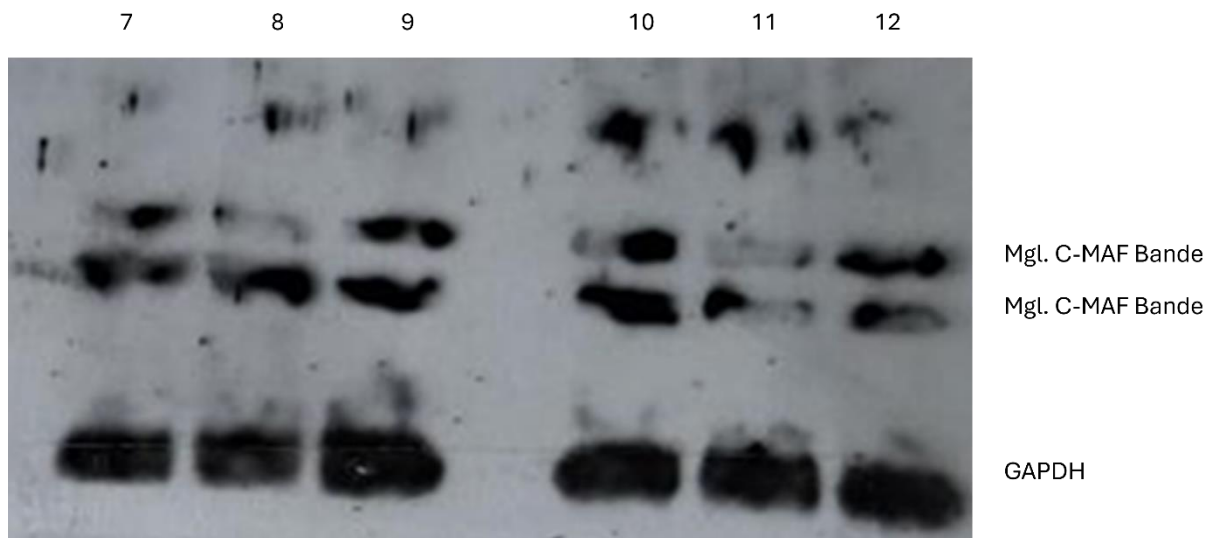


Abbildung 15: KSRP-abhängige Proteinexpression von c-MAF im Rahmen einer Methodenetablierung

Murine EL4, EL4-siKSRP und EL4-Kontroll T-Zellen wurden in einer 10 cm Platte in einer Konzentration von 3×10^6 /Platte ausgesät und für 48 h mit DMSO oder der Kombination aus PMA und Ionomycin ($1 \mu\text{g/ml}$) behandelt. Im Anschluss wurden die Zellen mit RIPA-Puffer lysiert und homogenisiert. Die photometrische Bestimmung der Proteinkonzentration in den Proben erfolgte mittels Bradford Assay. Die Proteine wurden entsprechend ihres Molekulargewichts mit Hilfe einer SDS Polyacrylamid Gelelektrophorese aufgetrennt und im Anschluss mittels Western Blot detektiert. Dargestellt sind die Ergebnisse der Immundetektion auf einem Positivfilm. Die oberen beiden Banden bilden potenziell das c-MAF-Protein ab und die unteren Banden GAPDH, das zur Normierung verwendet wurde. Die Bandenzuordnung verhält sich wie folgt: 7= EL4-DMSO; 8= EL4-stimuliert; 9= CO-A-DMSO; 10= CO-A-stimuliert; 11= siKSRP-DMSO; 12= siKSRP-stimuliert.

Neben der c-MAF mRNA-Expressionsanalyse sollte auch die Detektion des c-MAF-Proteins mittels Western Blot in EL4 T-Zellen etabliert werden.

Murine EL4 siKSRP Zellen und CO-A Zellen wurden in serumreduziertem Medium mit 0,5 % FCS ausgesät und mit DMSO oder einer Kombination aus PMA und Ionomycin ($1 \mu\text{g/ml}$) für 24 h oder 48 h induziert (Kapitel 4.1.5). Da für die Immundetektion von c-MAF mittels Western Blot zunächst ein Protokoll für den c-MAF Primärantikörper etabliert werden musste, weichen die weiteren Arbeitsschritte in einigen Punkten von der in dieser Arbeit bereits beschriebenen Western Blot Methodik ab (Kapitel 4.3). Die wesentlichen Änderungen sind im Folgenden beschrieben.

Im Rahmen der Methanol-/Chloroformfällung wurde die Proteinmenge auf $120 \mu\text{g}$ /Probe eingestellt. Für die anschließende SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese wurde ein 12,5%iges Trenngel eingesetzt, um einen möglichst großen räumlichen Abstand zwischen der Bande des Haushaltsgens GAPDH (37kD) und der c-MAF Bande (50kD) zu erzielen, da bei der späteren Belichtung des Positivfilms in früheren Durchläufen die GAPDH Bande die c-MAF Bande überstrahlte.

Als Primärantikörper wurde der GAPDH AK der Marke Santa Cruz (Tabelle 4) in einer Verdünnung

Ergebnisse

von 1:2000 und der c-MAF AK von Cusabio 1:500 (Tabelle 4) in 1 % Milchpulver eingesetzt. Um unspezifische Banden möglichst effektiv abzusättigen, wurde der Blockiervorgang mit einer Mischung aus 1 % BSA und 3 % Milchpulver durchgeführt (Tabelle 1) und die Nitrocellulosemembran im Anschluss noch einmal für 10 min mit 3 % Milchpulver gewaschen. Wegen der hohen Intensität von GAPDH wurde die Entwicklung der beiden Proteine nacheinander durchgeführt. Im ersten Schritt wurde der zu dem c-MAF AK passende Sekundärantikörper anti-rabbit (Tabelle 4) in einer Verdünnung von 1:5000 für 2 h inkubiert und mit der Chemilumineszenz Lösung von Rockland (Tabelle 1) inkubiert, welche sich durch eine besonders hohe Sensitivität auszeichnet. Vor der Entwicklung von GAPDH wurde die Nitrocellulosemembran 3x für je 10 min mit 1xTBS 0,1 % Tween gewaschen. Im Anschluss wurde die Nitrocellulosemembran mit dem zum Primär AK passenden Sekundär AK anti-mouse (Tabelle 4) in einer Verdünnung von 1:10000 für 1 h inkubiert und mit der Chemilumineszenzlösung von Thermo Scientific (Tabelle 1) behandelt, welche eine geringere Sensitivität als das Produkt von Rockland besitzt.

In der Abbildung ist der nach oben beschriebener Technik entwickelte Positivfilm abgebildet. Dargestellt ist das Ergebnis nach einer Stimulationszeit von 48 h. Bei der unteren Bande handelt es sich um GAPDH, das als Ladekontrolle aufgetragen wurde. Die beiden Banden darüber kommen beide als c-MAF Bande in Frage, wobei laut vorhergesagtem Molekulargewicht von etwa 50 kDa es sich mit höherer Wahrscheinlichkeit um die untere Bande handeln müsste. Die Intensität der GAPDH Banden dient als Kontrolle über die aufgetragene Proteinmenge. In der Abbildung zeigen sich die GAPDH Banden mit gleicher Intensität, was zeigt, dass in allen Spuren eine vergleichbare Menge Protein aufgetragen wurde. Die Banden auf Höhe 50 kDa zeigen an, dass der Primärantikörper in jeder Probe gebunden hat. Eine Expression des c-MAF-Proteins ist somit in EL4, CO-A und siKSRP T-Zellen grundsätzlich nachzuweisen. Bei Betrachtung der Intensität der jeweiligen c-MAF Banden ist jedoch kein signifikanter Unterschied zwischen den Zellen mit aktivem und herunterreguliertem KSRP-Gen zu detektieren. Die Banden 11 und 12 mit herunterregulierten KSRP-Genaktivität wirken in ihrer Intensität im Vergleich zu den EL4 und CO-A Zellen leicht reduziert und könnten ein Hinweis auf den Einfluss von KSRP auf die c-MAF Expression in T-Zellen darstellen. Auch die Behandlung mit DMSO oder P/I scheint auf die Proteinexpression von c-MAF keinen Einfluss zu haben.

6 Diskussion

6.1 Grundlage der Arbeit

In dieser Arbeit liegt der Fokus auf den CD4⁺ T_H2 Zellen. Sie vermitteln als Teil des adaptiven Immunsystems die humorale Immunität (42). T_H2 Zellen exprimieren die T_H2-assoziierten Zytokine IL-4, IL-5, IL-9, IL-10, IL-13 sowie den Transkriptionsfaktor GATA3 und haben die Funktion eine adäquate Immunantwort auf extrazelluläre Pathogene zu vermitteln (5, 44). Die Zytokine IL-5, IL-10 und IL-13 stehen dabei im Mittelpunkt der Arbeit. Sie üben unterschiedliche Funktionen aus. IL-5 ist unter anderem am Wachstum und der Differenzierung von eosinophilen Granulozyten beteiligt. IL-10 inhibiert beispielsweise die Funktion von Makrophagen und IL-13 ist an der Differenzierung von B-Zellen beteiligt und hemmt die Produktion von T_H1 Zellen (9).

2019 wurde das erste Mal in der Literatur ein regulatorischer Einfluss des RBP KSRP auf die T_H2-assoziierten Zytokine IL-4, IL-5, IL-10, IL-13, IL-9 sowie IFN- γ beschrieben. Dabei wurden CD4⁺ T-Zellen aus der Milz von Wildtyp-Tieren sowie KSRP-defiziente Zellen polyklonal stimuliert. Es zeigte sich eine vermehrte Expression der Zytokine IL-5-, IL-9-, IL-10- und IL-13 in den KSRP-defizienten Zellen murinen Ursprungs. Des Weiteren konnte eine direkte Bindung des RBP KSRP an die 3' UTR der IL-10 sowie IL-13 mRNA in der Arbeit von Käfer nachgewiesen werden (5).

Die Ergebnisse von Käfer 2019 wiesen zum ersten Mal darauf hin, dass KSRP die Regulation der T_H2-assoziierten Zytokine mit regulieren könnte. Welcher molekularbiologische Mechanismus dabei vorliegt, ist jedoch noch unbekannt und Teil der Forschung dieser Arbeit.

6.1.1 KSRP-Expression in genetisch veränderten EL4 Zellen

In dieser Arbeit wurde an die Arbeit von Käfer angeknüpft. Für weitere Analysen über den Zusammenhang zwischen dem RBP KSRP und T_H2-assoziierten Zytokine sollten jedoch keine primären Zellen, sondern immortalisierte EL4 T-Zellen verwendet werden (Tabelle 8). Die Verwendung einer immortalisierten Zelllinie im Vergleich zu Primärzellen bietet einige Vorteile um Experimente wie mRNA-Stabilitätsanalysen oder KSRP-abhängige Zytokin-Expressionsanalysen durchzuführen. Der Einsatz von immortalisierten Zellen vermindert den Verbrauch von Versuchstieren, sind leicht zu kultivieren und haben eine hohe Verfügbarkeit. In die in dieser Arbeit verwendete immortalisierte EL4 Zelllinie wurde mittels retroviraler Transduktion ein shRNA-produzierender Plasmidvektor eingebracht, um die KSRP-Genexpression in den Zellen herunterzuregulieren (Kapitel 4.1.1).

Um zu überprüfen, dass diese EL4 Zelllinie für die geplanten Versuche geeignet ist, muss sichergestellt sein, dass in den shRNA-Zellen die KSRP-Expression auch tatsächlich vermindert ist und das nach Stimulation vergleichbare Effekte wie in Primärzellen nachzuweisen sind.

Die Charakterisierung der KSRP-Expression mittels qRT-PCR (Kapitel 5.1) ergab eine signifikante Verminderung der KSRP mRNA-Expression in EL4 siKSRP Zellen im Vergleich zu den EL4 Kontrollzellen. In der Western Blot Analyse zeigte sich passend dazu ebenfalls eine reduzierte KSRP-Proteinexpression in den EL4 siKSRP Zellen im Vergleich zu den EL4 CO-A Zellen. Daraus war zu schließen, dass die gewählte Zelllinie für weitere Analysen mit der Frage nach einer KSRP-abhängigen Zytokinexpression geeignet waren.

6.1.2 Amplifikationsprodukte im Rahmen der quantitativen mRNA-Bestimmung

Ein weiterer wichtiger Punkt bei der Frage, ob es sich bei den verwendeten EL4 Zellen um ein geeignetes Testsystem für die geplanten Versuche handelt, war, ob die mRNA der T_H2-assoziierten Zytokine und Transkriptionsfaktoren in den Zellen mittels qRT-PCR, eindeutig nachzuweisen sind (Kapitel 5.2). Da mit der SYBRgreen Methode gearbeitet wurde, ist es bei diesem Test wichtig, dass die Amplifikationsprodukte die erwartete Sequenzgröße haben und nur eine Bande in der Agarose Gelelektrophorese zu sehen ist. Der Farbstoff lagert sich sequenzunspezifisch in doppelsträngige DNA ein. Wenn mehrere Produkte entstehen würden, würde sich der Farbstoff in alle Produkte einlagern, was die Quantifizierung verfälschen würde. Eine weitere Überprüfung im Rahmen SYBRgreen Methode ist die Durchführung einer Schmelzkurven Analyse. Dabei müssen alle Proben denselben Schmelzpunkt aufweisen. Des Weiteren wird immer eine Wasserkontrolle durchgeführt, in welcher keine Bande zu sehen sein darf. Dabei passten alle Amplifikationsprodukte zu der erwarteten Sequenzgröße.

Aus dem Experiment war zu schließen, dass die eingesetzten Oligonukleotide zuverlässig die korrekte DNA-Sequenz banden und somit für die weiteren Versuche verwendet werden konnten. Des Weiteren zeigte das Ergebnis des Versuchs, dass in den verwendeten EL4 Zellen die mRNA der entsprechenden Zytokine nachweisbar ist (Kapitel 4.2.5).

6.2 Der Einfluss von KSRP auf T_H2-assoziierten Zytokine

KSRP als RBP reguliert die Genexpression verschiedener proinflammatorischer Mediatoren wie TNF- α oder iNOS auf posttranskriptioneller Ebene (24). Dafür bindet es an die ARE-Region der mRNA, wodurch verschiedene RNA-abbauende Enzyme rekrutiert werden. Somit gilt KSRP als Negativregulator der pro-inflammatorischen Genexpression (10).

In dieser Arbeit lag der Fokus auf der Analyse von KSRP-vermittelten Effekten auf die Expression der Zytokine IL-5, IL-10 und IL-13 und darauf, ob diese in immortalisierten siKSRP Zellen vergleichbar reguliert werden wie in KSRP defizienten Primärzellen.

6.3 Interleukin-5

6.3.1 Quantitative IL-5 mRNA-Analyse

In dieser Arbeit wurden immortalisierte EL4 Kontrollzellen sowie EL4 siKSRP Zellen mit PMA oder einer Kombination aus PMA und Ionomycin stimuliert und die Expression der IL-5 mRNA-Expression im Anschluss mittels einer qRT-PCR Analyse quantitativ bestimmt (Kapitel 4.1.4.-4.2.4).

Dabei konnte eine Stimulation der IL-5 mRNA-Expression sowohl in den EL4 siKSRP als auch der EL4 CO-A Zellen beobachtet werden. Das bestätigte zunächst, dass die EL4 Zellen in der Lage waren das T_H2-assoziierte Zytokin IL-5 zu exprimieren. Eine Induktion der IL-5 mRNA-Expression war schon bei der Induktion der Zellen mittels PMA detektierbar (Kapitel 5.3). PMA ist an der Aktivierung verschiedener intrazellulärer Signalwege beteiligt. Beispielsweise induziert es Proteinkinase C-vermittelte Signalwege (84). Diese Signale scheinen daher an der IL-5-Expression beteiligt zu sein.

Jedoch exprimierten die Zellen bei Induktion mittels PMA in Kombination mit Ionomycin eine signifikant höhere Menge an IL-5 mRNA (Kapitel 5.4). Somit scheint Ionomycin im Falle von IL-5 einen Einfluss auf die verwendeten EL4-Zellen zu haben. Bei Ionomycin handelt es sich um ein Calciumionophor (85). An der IL-5-Expression scheinen Ca^{2+} -abhängige Signalwege beteiligt zu sein. Zu überlegen wäre, ob der Einsatz einer anderen Substanz zur Stimulation der Zellen noch eindeutigere Ergebnisse liefern würde. Hierbei könnte man über den Einsatz beispielsweise von Anti CD3/Anti CD 28 Antikörper nachdenken, um T-Zellen zu stimulieren. Zusätzlich zu der Stimulationsart der Zellen war auch die Induktionszeit eine wichtige Variable. Bereits nach 24 h konnte eine erfolgreiche Induktion der IL-5 mRNA-Expression in EL4 Zellen nachgewiesen werden (Kapitel 5.4.). Allerdings konnte erst nach 48 h Stimulationszeit ein signifikanter Unterschied zwischen den stimulierten EL4 CO-A und den stimulierten EL4 siKSRP Zellen detektiert werden (Kapitel 5.3-5.5). Dabei wiesen die EL4 siKSRP Zellen eine erhöhte IL-5 mRNA-Expression im Vergleich zu den Kontrollzellen auf. Zu überlegen wäre die Stimulationszeit noch zu erhöhen.

KSRP wird in der Literatur als Negativregulator der proinflammatorischen Mediatoren beschrieben (10, 24). Somit war das erzielte Ergebnis passend zu den Erwartungen.

Der Mechanismus wie KSRP die IL-5-Expression reguliert ist zum aktuellen Zeitpunkt nicht klar. In der Literatur konnte keine direkte Bindung von KSRP an IL-5 nachgewiesen werden (5). Daher gibt es zum jetzigen Zeitpunkt keinen Hinweis, dass KSRP die IL-5 mRNA-Expression auf posttranskriptioneller Ebene reguliert. Passend dazu liefert die Literatur keinen eindeutigen Beweis, dass IL-5 überhaupt auf der Ebene der mRNA-Stabilität reguliert wird (86, 87). Zudem wäre es denkbar, dass KSRP die IL-5 mRNA-Expression nur indirekt reguliert. Dafür würde die lange Stimulationszeit von 48 h passen, die in dem Experiment notwendig waren, um einen signifikanten Unterschied in der IL-5-Expression zwischen den Kontrollzellen und den KSRP defizienten Zellen nach Stimulation mit P/I zu erzielen. Denkbar wäre auch, dass nicht nur KSRP, sondern auch ein anderer Vertreter der RBP mit IL-5 interagiert. In der Literatur wird beschrieben, dass das RBP TTP direkt die IL-5-Expression in ILC2-Zellen (lymphatische Zellen der Gruppe 2) reguliert. TTP induziert den mRNA-Abbau, weshalb in TTP-defizienten Mäusen eine erhöhte IL-5-Expression nachgewiesen werden konnte (88).

6.3.2 Quantitative IL-5 Proteinbestimmung

Zusätzlich zu der quantitativen IL-5 mRNA-Bestimmung, wurde mit den CO-A und siKSRP Zellen ebenfalls eine quantitative Analyse der IL-5-Proteinexpression mittels CBA durchgeführt (Kapitel 5.7,5.8). Dabei erfolgte die Stimulation der Zellen mit PMA und Ionomycin für 24 h sowie 48 h.

Nach einer Stimulationszeit von 24 h konnte im Überstand eine Induktion der IL-5 Expression in EL4 CO-A und EL4 siKSRP Zellen beobachtet werden. In den EL4 siKSRP Zellen war nach 24 h Stimulation mit P/I kein offensichtlicher Unterschied in der IL-5-Expression im Vergleich zu den mit DMSO behandelten EL4 siKSRP Zellen zu sehen. Nach einer Stimulationszeit von 48 h zeigte sich das überraschende Ergebnis einer reduzierten IL-5-Proteinexpression in den mit P/I behandelten EL4 siKSRP Zellen im Vergleich zu den EL4 CO-A Zellen. Dieses Ergebnis passt nicht zu der Grundannahme bei dem RBP handele es sich um einen Negativregulator der IL-5-Expression (10), ist jedoch aufgrund der niedrigen N-Zahl vorsichtig zu interpretieren. Eine Wiederholung des Versuchs mit einer höheren N-Zahl sollte durchgeführt werden, um das Ergebnis verifizieren zu können. Das Ergebnis ist auch überraschend, da Käfer in seiner Arbeit mittels CBA-Analyse in KSRP-/- $CD4^+$ T-Zellen eine erhöhte IL-5-Proteinexpression im Vergleich zu den Wildtypzellen detektieren konnte (5). Dieser Effekt stellte sich jedoch erst nach einer

Induktionszeit von 72 h ein. Es wäre also zu überlegen die CBA-Analyse nach einer längeren Stimulationszeit zu wiederholen, um herauszufinden welche Bedeutung die Variable Zeit in EL4 Zellen dabei spielt. Des Weiteren ist zu bedenken, dass es sich bei den verwendeten Zellen von Käfer um Primärzellen murinen Ursprungs und nicht um wie in dieser Arbeit eingesetzten immortalisierten EL4-Zellen handelt. Somit scheint es einen entscheidenden Unterschied zwischen den Zellen zu geben.

Insgesamt deuten die Daten daraufhin, dass die KSRP-vermittelten Unterschiede in der IL-5 mRNA-Expression auch in EL-4 Zellen detektierbar sind. Prinzipiell scheinen sich die Zellen als Testsystem zu eignen um KSRP-vermittelte Effekte auf die IL-5-Expression zu untersuchen. Allerdings muss die Stimulationsdauer noch optimiert werden. Der KSRP-vermittelte Effekt tritt zeitverzögert auf. In der Literatur konnte keine direkte Bindung von KSRP an die 3'UTR der IL-5 mRNA detektiert werden (5). Das weist darauf hin, dass KSRP indirekt die IL-5-Expression beeinflusst, indem es einen Effekt auf vorangeschaltete Signaltransduktionswege ausüben könnte. Einer dieser möglichen vorgeschalteten Signalwege könnte der JAK/STAT 6 Signalweg sein. IL-4 gilt als Leitzytokin der T_H2 -Immunantwort. Bindet IL-4 an den IL-4 Rezeptor wird eine interne Signalkaskade ausgelöst. Der TF STAT6 wird durch die Januskinase phosphoryliert, in den Nukleus transloziert und induziert dort den TF GATA3, was eine Erhöhung der Expression T_H2 -assoziiertes Zytokine, wie IL-5, zur Folge hat. KSRP könnte sowohl mit den TF als auch dem Leitzytokin IL-4 interagieren (89-91) und auf diese Art in die Regulation der IL-5-Expression eingreifen.

Das Interleukin IL-5 wird von verschiedenen Zellen produziert und erfüllt verschiedene Aufgaben. IL-5 erhöht unter anderem die Zahl der eosinophilen Granulozyten auf vielfältige Weise. Über diesen Weg ist IL-5 entscheidend an allergischen IgE-vermittelten Erkrankungen wie Asthma beteiligt (46).

Wenn KSRP tatsächlich eine wichtige Rolle in der IL-5-Expression spielen sollte, wäre in KSRP-Knockout Mäusen zu erwarten, dass allergisches Asthma schwerwiegender verläuft als in Kontrollmäusen. Es wäre nämlich davon auszugehen, dass durch eine erhöhte IL-5-Expression auch vermehrt eosinophile Granulozyten rekrutieren werden sollten. Um diese Theorie weiter zu verfolgen, könnte man ein Ovalbumin induziertes allergisches Asthma Modell verwenden.

6.4 Interleukin-10

6.4.1 Quantitative IL-10 mRNA-Analyse

In der Literatur konnte in in-vitro Experimenten der Nachweis einer direkten Bindung des RBP KSRP an die 3' UTR der IL-10 mRNA erbracht werden (5). Ob diese Bindung allerdings eine funktionale Bedeutung hat ist noch offen.

Nach Stimulation wurde in immortalisierten EL4 CO-A Zellen und EL4 siKSRP Zellen eine quantitative IL-10 mRNA-Analyse durchgeführt (Kapitel 4.1.4-4.2.4). Dabei zeigte sich schon bei der alleinigen Induktion der Zellen mit PMA (Kapitel 5.3) ein messbarer Anstieg der IL-10 mRNA-Expression bei den EL4 CO-A und EL4 siKSRP Zellen. Durch den Einsatz einer Doppelstimulation mittels PMA und Ionomycin (Kapitel 5.4) konnte der Stimulationserfolg reproduziert werden. Daraus ergibt sich die Schlussfolgerung, dass die durch PMA induzierte Proteinkinase C einen Effekt auf die IL-10-Expression auszuüben scheint (85).

Betrachtet man die Stimulationszeit, so konnte schon nach 24 h ein Stimulationserfolg nachgewiesen werden, der zu einem messbaren Anstieg der IL-10 mRNA-Expression führt. (Kapitel 5.4). Ebenso zeigte sich nach dieser Zeit bereits eine Reduktion der IL-10 mRNA-

Diskussion

Expression in den stimulierten EL4 siKSRP Zellen im Vergleich zu den stimulierten EL4 CO-A Zellen. Nach einer Stimulationszeit von 48 h (Kapitel 5.5) waren diese Effekte allerdings nicht mehr zu beobachten. Die Variable Zeit scheint somit eine wichtige Einflussgröße zu sein. Im Vergleich zu IL-5 scheint die IL-10-Expression einer anderen Zeitkinetik zu folgen. Der Zeitpunkt der maximalen Induktion liegt anscheinend innerhalb der ersten 24 h, danach scheint die Expression der IL-10 mRNA wieder abzunehmen.

Man könnte den Versuch mit kürzeren Stimulationszeiten von zum Beispiel 12 h wiederholen, um die Zeitkinetik zu optimieren. Zu keinem der beobachteten Zeitpunkte sieht man allerdings in den siKSRP Zellen im Vergleich zu Kontrollzellen eine erhöhte IL-10-Expression. Dies würde man jedoch erwarten, wenn KSRP wie in der Literatur beschrieben (16) als negativer Regulator der IL-10 mRNA-Stabilität agieren würde.

In der Arbeit von Käfer wurden CD4⁺ T-Zellen für 48 h polykonal mit CD3/CD28 Antikörpern stimuliert und erst nach dieser Zeit war eine erhöhte IL-10 mRNA-Expression in den KSRP-defizienten Zellen nachzuweisen. Dieses Ergebnis stimmt mit der in der Literatur beschriebenen Rolle von KSRP als posttranskriptioneller Regulator der mRNA-Stabilität eher überein. Nach 24 h konnte dieser Effekt bei Käfer nicht nachgewiesen werden. Jedoch handelte es sich in den Versuchen von Käfer um Primärzellen und nicht um immortalisierte EL4 Zellen (5). Somit scheint im Fall von IL-10 kein direkter Rückschluss von immortalisierten Zellen auf Primärzellen möglich zu sein.

Für Experimente um die KSRP-vermittelte IL-10-Regulation zu untersuchen stellen die verwendeten EL-4 Zellen nach den Ergebnissen dieser Analysen kein geeignetes Testsystem dar. Des Weiteren scheint KSRP einen komplexen Einfluss auf die Genexpression T_H2-assoziiierter Zytokine auszuüben. Die IL-10-Expression wird allerdings auf verschiedenen Ebenen reguliert. Ähnliche Mechanismen finden sich in verschiedenen Immunzellen wieder. Dazu gehören neben der posttranskriptionellen Regulation unter anderem Transkriptionsfaktoren, welche hemmend oder aktivierend auf die Transkription wirken können (47, 48).

In der Literatur gibt es durchaus Hinweise, dass RBP die IL-10-Stabilität beeinflussen. Es wird von der Regulation der IL-10-Expression auf posttranskriptioneller Ebene durch das RBP TTP in aktivierten Makrophagen berichtet. TTP bindet dabei direkt an die 3'UTR der IL-10 mRNA. Es handelt sich um ein RBP, welches die Ziel-mRNA destabilisiert und negativ die IL-10/STAT3-Reaktion reguliert. So zeigten TTP-defiziente Mäuse, welche mittels LPS stimuliert wurden, eine erhöhte IL-10-Expression sowie eine erhöhte Menge des TF STAT3. Die Kinase p38 MAPK wiederum hemmt den TTP-vermittelten IL-10 mRNA-Abbau (92, 93).

Des Weiteren wird berichtet, dass das RBP AUF-1 direkt an die ARE-Region der 3' UTR der IL-10 mRNA bindet und dessen Halbwertszeit beeinflusst. In Melanomzellen führten reduzierte AUF-1 Werte zu einer vermehrten Expression von IL-10 (94).

Ein weiteres RBP ist HuR. Es handelt sich um ein RBP, welches posttranskriptionell die mRNA von entzündungsfördernden Mediatoren stabilisiert. HuR ist ein direktes Ziel von IL-10, welches die Funktion des RBP auf die mRNA verschiedener Zytokine hemmt. So konnte durch ein HuR-Knockout in murinen Myokardzellen die entzündungshemmende Wirkung von IL-10 nachgeahmt werden (95). Auf transkriptioneller Ebene konnte in HuT 78 T-Zellen eine Regulation der IL-10-Expression durch den TF NF- κ B gezeigt werden. In der 5'-Region des IL-10-Gens befinden sich drei Erkennungssequenzen für den TF (96). Zu überlegen wäre, ob die genannten RBP in Abwesenheit von KSRP die Regulation IL-10 mRNA-Stabilität beeinflussen und man in weiteren Versuchen den Fokus auf diese legen könnte. Des Weiteren wäre zu überlegen die Relevanz der in vitro Daten über eine direkte Bindung von KSRP an die IL-10 mRNA von Käfer 2019 in vivo mittels einer RNA-Immunpräzipitation zu überprüfen.

Das sich Ergebnisse in unterschiedlichen Zelllinien voneinander unterscheiden können wurde in der Literatur in der Vergangenheit schon beschrieben. So zeigte sich beispielsweise *in vitro* in immortalisierten KSRP-defizienten HeLa- Zellen eine erhöhte IL-2 mRNA-Expression. Dadurch schloss man auf den Einfluss von KSRP auf die mRNA-Stabilität in diesen Zellen (97). In der Arbeit von Käfer wurden primäre CD4⁺ KSRP^{-/-} und Wildtyp-Zellen verwendet. Es konnte weder auf mRNA noch auf Proteinebene ein Einfluss von KSRP auf die IL-2-Expression in murinen Primärzellen nachgewiesen werden (5).

Neben der Wahl der Stimulanz sowie der Stimulationszeit, wurde als weitere Versuchsvariable die Konzentration der ausgesäten und induzierten Zellen in ihrem Reaktionsgefäß evaluiert (Kapitel 5.6). Dabei wurde in Vorbereitung auf die CBA-Proteinanalysen exemplarisch für die anderen T_H2-assoziierten Zytokine die IL-10 mRNA-Expression nach Aussäen und Induktion der Zellen in unterschiedlichen Konzentrationen quantitativ bestimmt (Kapitel 4.1.4.-4.2.4). Dabei zeigte sich eine Zelldichte von 10⁵ Zellen/Loch als ideale Zellkonzentration.

6.4.2 Quantitative IL-10 Proteinbestimmung

Zusätzlich zu der quantitativen IL-10 mRNA-Bestimmung, wurde aus den P/I stimulierten EL4 CO-A und EL4 siKSRP Zellen ebenfalls eine quantitative Analyse der Proteinexpression mittels CBA durchgeführt (Kapitel 5.7,5.8). Dabei erfolgte die Stimulation der Zellen mit PMA und Ionomycin für 24 h sowie 48 h. Jedoch konnte keine Induktion der IL-10-Proteinexpression nachgewiesen werden, noch konnte ein Unterschied zwischen den stimulierten EL4 CO-A und den mit P/I behandelten EL4 siKSRP Zellen detektiert werden. In dem Paper von Käfer konnte nach der Stimulation von CD4⁺ T-Zellen in den KSRP-defizienten Zellen im Vergleich zu Kontrollzellen eine erhöhte IL-10-Proteinexpression mittels CBA-Analyse nachgewiesen werden. Allerdings konnte dieser Effekt erst nach einer Stimulationszeit von 72 h signifikant nachgewiesen werden. Daher könnte man die CBA-Analyse mit den immortalisierten Zellen noch einmal nach einer längeren Induktionszeit wiederholen. Jedoch ist zu bedenken, dass es sich in der Arbeit von Käfer um Primärzellen und nicht um immortalisierte EL4 Zellen handelte (5). In dieser Arbeit wurde PMA und Ionomycin eingesetzt, Käfer stimulierte polyklonal mit CD3/CD28 Antikörpern (5, 98). Daher könnte man die Versuche mit CD3/CD28 Antikörpern polyklonal stimulierten immortalisierten Zellen wiederholen, um zu schauen welcher Einfluss das gewählte Stimulanz besitzt und ob bei einer polyklonalen Stimulation Ergebnisse erzielt werden, welche denen der Primärzellen ähnlicher sind.

Zum jetzigen Zeitpunkt kann aus den vorliegenden Ergebnissen geschlossen werden, dass es sich bei den verwendeten EL4 Zellen um kein geeignetes Testsystem zur Untersuchung der KSRP-abhängigen IL-10-Expression handelt. Zunächst ging man davon aus, dass IL-10 von T_H2-Zellen exprimiert wird. Heute weiß man, dass eine Vielzahl von Zellen, sowohl des angeborenen als auch des adaptiven Immunsystems, in der Lage sind IL-10 zu exprimieren (47). Zu überlegen wäre, ob sich ein anderes zelluläres Testsystem als T-Zellen besser eignet, um KSRP-vermittelte Effekte auf die IL-10-Expression zu untersuchen.

6.5 Interleukin-13

6.5.1 Quantitative IL-13 mRNA-Analyse

In der Literatur konnte der Nachweis einer direkten Bindung des RBP KSRP an die IL-13 mRNA in *in vitro* Experimenten mit Lysaten von immortalisierten EL4 T-Zellen erbracht werden (5). Ob die Ergebnisse dieses *in vitro* Ansatzes bedeuten, dass eine KSRP-vermittelte Regulation der IL-13-Expression in EL4 stattfindet, wurde im Rahmen dieser Arbeit überprüft. Dafür wurden zunächst EL4 CO-A und EL4 siKSRP Zellen stimuliert und im Anschluss erfolgte die quantitative IL-13 mRNA-Analyse mittels qRT-PCR (Kapitel 4.1.4-4.2.4). Nachdem die Zellen mit PMA induziert wurden, zeigte sich bereits eine positive Stimulation der Zellen im Vergleich zu den mit dem Lösungsmittel DMSO behandelten Zellen (Kapitel 5.3). Nach Einsatz einer Doppelstimulation von P/I konnte ein Unterschied zwischen den stimulierten EL4 CO-A und den mit P/I behandelten EL4 siKSRP Zellen detektiert werden (Kapitel 5.4). Dieser Effekt deutet auf einen Einfluss des Ionophors Ionomycin vermittelten intrazellulären Ca^{2+} Einstroms auf die IL-13 mRNA-Expression in EL4 siKSRP Zellen hin. Das könnte ein Hinweis sei, dass der Calcineurin/ NFAT Signalweg an der IL-13-Expression beteiligt sein könnte. In der Literatur wird beschrieben, dass die Vertreter der NFAT Familie NFATc1 und NFATc2 an der Regulation des Zytokins IL-13 in Mastzellen beteiligt sind (99). Betrachtet man sich die Variable Stimulationszeit, so war sowohl nach 24 h (Kapitel 5.4) als auch nach 48 h (Kapitel 5.5) Induktionszeit eine Erhöhung der IL-13 mRNA-Expression in den induzierten EL4 siKSRP Zellen im Vergleich zu den stimulierten Kontrollzellen zu detektieren.

Somit entsprach das Ergebnis der Erwartung KSRP würde die IL-13 mRNA-Stabilität negativ beeinflussen. Auch in der quantitativen IL-13 mRNA-Analyse aus polyklonal stimulierten $CD4^+$ KSRP-defizienten T-Zellen im Vergleich mit Wildtypzellen zeigten sich vergleichbare Ergebnisse (5). In diesem Fall scheint also eine Übertragung des beobachteten Effekts von KSRP auf die IL-13 mRNA-Expression von Primärzellen auf immortalisierten Zellen zulässig.

In der Literatur ist bekannt, dass die IL-13-Expression auf posttranskriptioneller Ebene reguliert wird. In aktivierten Jurkat T-Zellen konnte die Bindung des RBP HuR an die 3'UTR der IL-13 mRNA nachgewiesen werden. HuR übte dabei einen stabilisierenden Effekt auf die IL-13 mRNA aus (100). Des Weiteren konnte nachgewiesen werden, dass das RBP TTP, welches einen destabilisierenden Effekt auf die Ziel-mRNA aufweist, posttranskriptionell die IL-13-Expression reguliert. In menschlichem Gliomgewebe fand man einen Zusammenhang zwischen einer geringen TTP-Expression und daraus resultierend einer vermehrten IL-13 Induktion (101). Auch in ILC2 Zellen konnte nachgewiesen werden, dass TTP als posttranskriptioneller Negativregulator der IL-13-Expression fungiert (88).

In der Literatur findet sich kein Einfluss des RBP AUF-1 auf die IL-13 mRNA-Stabilität. Betrachtet man die transkriptionelle regulatorische Ebene der IL-13 Expression, so wird berichtet, dass der TF NFkB notwendig für die Induktion der IL-13 Induktion sei. Das ergab sich aus Experimenten an humanen Mastzellen (102). Zu überlegen wäre, ob KSRP auf transkriptioneller Ebene einen Einfluss auf die IL-13-Expression haben könnte. Auch könnte man in Zukunft untersuchen, ob KSRP indirekt über andere Signalwege die IL-13-Expression reguliert.

6.5.2 Quantitative IL-13 Proteinbestimmung

Zusätzlich zu der IL-13-Expression auf mRNA-Ebene, wurde mittels CBA-Analyse auch eine quantitative Bestimmung der Proteinexpression in P/I stimulierten EL4 CO-A und EL4 siKSRP Zellen durchgeführt (Kapitel 4.3.5). Die Analyse erfolgte nach unterschiedlichen Stimulationszeiten. Nach einer P/I Behandlungszeit von 24 h (Kapitel 5.7) zeigten sich keine

auswertbaren Ergebnisse. Allerdings konnte nach einer Induktion der Zellen über 48 h (Kapitel 5.8) bereits eine erhöhte Proteinexpression in den induzierten EL4 siKSRP Zellen im Vergleich zu den stimulierten Kontrollzellen beobachtet werden. Unter der Grundannahme bei KSRP handele es sich um einen Negativregulator der T_H2 Immunantwort, überrascht das Ergebnis nicht. 2019 wurde die IL-13-Proteinexpression ebenfalls mittels CBA-Analyse von Käfer mit CD4⁺ Primärzellen aus KSRP-defizienten und Wildtyp Mäusen bestimmt. Auch bei diesem Experiment zeigte sich eine erhöhte Zytokinexpression in den KSRP^{-/-} Zellen. Allerdings war in den Primärzellen eine Stimulationszeit von 72 h notwendig, um signifikante Ergebnisse zu erzielen (5). Dies könnte auf die unterschiedlichen Zellen zurückzuführen sein. Zusammenfassend ist zu sagen, dass eine Negativregulation von KSRP auf die IL-13-Expression sowohl auf mRNA als auch auf Proteinebene in EL4-siKSRP Zellen bestätigt werden konnte.

Die verwendeten EL4 Zellen eignen sich als Testsystem um die KSRP-vermittelten IL-13-Expression zu untersuchen. In weiterführenden Experimenten könnte man die Zellen verwenden, um Experimente durchzuführen mit der Fragestellung wie KSRP die Halbwertszeit von IL-13 beeinflusst. Für Halbwertszeit Analysen bestimmt man die mRNA-Stabilität der zu untersuchenden Zytokine nach unterschiedlich langen Behandlungszeiten der Probe mit 5,6-Dichlorobenzimidazole 1-β-D-Ribofuranoside (DRB). DRB hemmt die Transkription und man kann dann den Abbau der mRNA des zu untersuchenden Zytokins bestimmen (103). Neben posttranskriptionellen Mechanismen sind auch andere Signalwege bekannt, die die Produktion von IL-13 regulieren.

Die Produktion von IL-13 selbst wird durch verschiedenen Signalwege vermittelt. IL-4 vermittelt kommt es durch eine Phosphorylierung von STAT6 zu einer vermehrten Expression von GATA3. Die Expression von IL-13 ist auch IL-4 unabhängig möglich. Dabei ist der IL-2 abhängige Signalweg STAT5 sowie Notch zu nennen (49). Um weiter zu untersuchen welcher molekularbiologische Mechanismus der KSRP-abhängigen IL-13-Expression zugrunde liegt, könnte man sich ausgewählte Signalwege genauer anschauen. Dafür würde man den zu untersuchenden Signalweg inhibieren und explorieren welcher Einfluss die Inhibition auf die KSRP-vermittelte Zytokinexpression hat.

Wenn KSRP tatsächlich eine wichtige Rolle in der IL-13-Expression spielen sollte, wäre in einem in vivo Mausmodell wie beispielsweise einem Ovalbumin induziertes Asthmodell mit KSRP Knockout Mäusen zu erwarten, dass allergisches Asthma schwerwiegender verläuft als in Kontrollmäusen. Es wäre nämlich davon auszugehen, dass eine erhöhte IL-13 Expression eine proinflammatorische Wirkung durch Stimulation der B-Zellfunktion, vermehrtem AK Klassenswitch und höhere IgE-Mengen bewirkt (49).

6.6 Wie übt KSRP seinen regulatorischen Einfluss auf T_H2-assoziierte Zytokine aus

In den durchgeführten Versuchen konnte lediglich eine Aussage darüber getroffen werden, ob die verwendeten Zellen die benannten Zytokine IL-5, IL-10 und IL-13 exprimieren und wie sich die EL4 siKSRP Zellen dabei von den EL4 Kontrollzellen unterscheiden. Allerdings konnte bei diesen Experimenten (Kapitel 5.3-5.8) keine Aussage darüber getroffen werden, über welchen Mechanismus KSRP dabei auf die Zytokinexpression wirken könnte.

Aus der Literatur ist bekannt, dass das RBP KSRP direkt an die 3' UTR der IL-10 und IL-13 mRNA bindet, ob das jedoch einen Einfluss auf die Zytokinexpression hat, ist unbekannt. Eine direkte Bindung an die 3' UTR der IL-5 und IL-9 mRNA konnte nicht beobachtet werden (5). Es ist also

naheliegend, dass KSRP über verschiedene, auch indirekte, Regulationsmechanismen die Expression T_H2 -assoziierter Zytokine beeinflussen könnte. Im Weiteren wurde daher der Fokus auf einen möglichen Einfluss von KSRP auf den miR-155/c-MAF Signalweg gelegt.

6.7 Einfluss von KSRP auf den miRNA-155/c-MAF Signalweg

Es handelt sich bei miRNAs um kurze etwa 22 Nukleotide umfassende Ribonukleinsäuren, welche einen regulatorischen Effekt auf viele zelluläre Prozesse ausüben(68). Dabei sind insbesondere Entzündungs- sowie immunologische Prozesse zu nennen. Die Reifung der miRNA-155 wird von dem Multiproteinkomplex Drosha und Dicer katalysiert. In der Literatur wird berichtet KSRP binde an die Vorläufer miR-155 und fördere damit dessen Reifung (69). Die miR-155 wiederum binde direkt an den TF c-MAF, welcher konservierte miR-155 Seed Matches in seiner 3' UTR enthalte und reguliere diesen negativ auf posttranskriptioneller Ebene. Daher moduliere miR-155 die c-MAF-Expression herab und führe zu einer abgeschwächten T_H2 -Antwort (7). Dazu passend konnte in miR-155 defizienten T-Zellen eine erhöhte IL-4-Expression beobachtet werden (104).

In dieser Arbeit sollte untersucht werden, ob eine KSRP-abhängige Reifung der miR-155 auch in immortalisierten EL4 T-Lymphozyten nachzuweisen ist. Dafür wurden sowohl EL4 siKSRP-Zellen als auch EL4 CO-A Zellen mit P/I stimuliert (Kapitel 5.9). Dabei zeigte sich sowohl in den EL4 siKSRP Zellen als auch in den EL4 CO-A Zellen eine Stimulation der miR-155-Expression. Daraus war zu schließen, dass die eingesetzte Zelllinie in der Lage ist miR-155 zu exprimieren. Bei Betrachtung der stimulierten Zelllinien untereinander fiel jedoch auf, dass in den mit P/I behandelten EL4 siKSRP Zellen eine erhöhte miR-155-Expression nachzuweisen war als in den induzierten Kontrollzellen. Dieses Ergebnis stimmt nicht mit den bisher publizierten Daten überein, da unter der Annahme bei KSRP handele es sich um ein miR-155 reifeförderndes Protein, eine erniedrigte miR-155-Expression in den EL4 siKSRP-Zellen zu erwarten wäre (25). Bei diesem Versuch wurde lediglich eine geringe N-Zahl verwendet. Gegebenenfalls sollte dieser Versuch mit einer höheren Probenzahl durchgeführt werden um das Ergebnis zu reevaluieren. Auch die Variable Zeit könnte eine Rolle spielen. Möglich ist auch, dass die Reifung der KSRP-abhängigen miR-155 zellspezifisch verläuft.

Zum aktuellen Zeitpunkt scheint es sich bei den eingesetzten EL4 Zellen um kein geeignetes Testsystem zur Analyse der KSRP-abhängigen miR-155-Expression zu handeln. Möglicherweise übt KSRP seinen Einfluss auf entzündungsfördernde Mediatoren unabhängig der miR-155 aus.

In der Literatur wird über die Regulation von c-MAF durch miR-155 berichtet (6). Mir-155 reguliert durch Bindung an die 3' UTR der c-MAF mRNA diese negativ (7). Des Weiteren induziert c-MAF zum einen die Expression des T_H2 Leitzytokins IL-4 durch Transaktivierung des IL-4 Promotors, zum anderen erhöht es die Expression verschiedener T_H2 -assoziierter Zytokine (7, 67). Imbratta und Kollegen berichten über eine positive Regulation von IL-10 in vivo durch Bindung von c-MAF an den IL-10 Promotor und an weitere transkriptionsfördernde Faktoren. Eine Bindung an den IL-5 und IL-13 Genlocus konnte nicht beobachtet werden. Auf die Expression von IL-2 scheint c-MAF negativ regulatorisch in vivo T-Zellen zu wirken (6).

Es stellte sich die Frage, ob das RBP KSRP indirekt, über die miR-155 Reifung, welche einen negativen regulatorischen Einfluss auf den TF c-MAF ausübt, negativ die T_H2 Zellantwort regulieren könnte (7, 69). Auch denkbar wäre ein direkter regulatorischer Einfluss von KSRP auf den TF c-MAF auf transkriptioneller Ebene. Noch nicht veröffentlichte RNA-Sequenz Daten aus AG Pautz zeigen, dass in T-Zellen aus KSRP Knockout Mäusen eine erhöhte c-MAF-Expression

detektiert werden konnte. Daher besteht potentiell die Möglichkeit, dass KSRP, wenn nicht über miR-155, über andere Wege c-MAF direkt oder indirekt regulieren könnte. Diese RNA-Sequenz Analysen sollten noch in EL4 Zellen oder primären T-Zellen verifiziert werden.

Zunächst musste geprüft werden, ob die verwendeten EL4 T-Lymphozyten in der Lage sind den TF c-MAF zu exprimieren.

Dazu wurden EL4 siKSRP Zellen und EL4 CO-A Zellen für unterschiedliche Zeiten mit P/I stimuliert (Kapitel 5.10). Nach einer Stimulationszeit von 24 h konnte in beiden Zelllinien eine erfolgreiche Induktion detektiert werden. Daraus ist zu schließen, dass die verwendeten Zellen c-MAF nach Stimulation exprimieren. Ein signifikanter Unterschied der c-MAF mRNA-Expression im Vergleich der induzierten EL4 siKSRP Zellen mit den mit P/I behandelten EL4 CO-A Zellen konnte erst nach 48 h beobachtet werden. Dabei zeigte sich in den induzierten EL4 siKSRP Zellen eine reduzierte c-MAF mRNA-Expression im Vergleich zu den mit P/I behandelten Kontrollzellen. Dieses Ergebnis entsprach nicht den Erwartungen, die anhand der Vorergebnisse der RNA-Sequenz Analysen vorhanden waren. Geht man von einer positiven KSRP-abhängigen Regulation der miR-155 aus sowie einem vermehrten Abbau von c-MAF durch miR-155, so wäre in den EL4 siKSRP Zellen eine Erhöhung der c-MAF mRNA-Expression zu erwarten gewesen. Ein Grund hierfür könnte sein, dass die verwendeten EL4 Zellen möglicherweise nicht für diese Untersuchung geeignet sind. Um dies abzusichern könnte man das Experiment mit einer anderen Zelllinie wiederholen. Denkbar wäre aber auch, dass c-MAF nicht durch KSRP indirekt oder direkt transkriptionell beeinflusst wird und das RBP KSRP keine Rolle in dem miR-155/c-MAF Signalweg spielt.

Dieses Phänomen wurde allerdings zunächst nur auf mRNA-Ebene betrachtet. Um eine mögliche c-MAF-Proteinexpression in EL4 T-Lymphozyten zu erforschen, waren weitere Analysen notwendig (Kapitel 5.11).

Es wurden erneut EL4 siKSRP Zellen sowie EL4 Kontrollzellen für 48 h mit P/I behandelt und die Proteinexpression anschließend mittels Western Blot Analyse ausgewertet (Kapitel 4.1.4, 4.1.5, 4.3.1-4.3.4). Da es noch keine etablierte Methode für den Nachweis der c-MAF Proteinexpression aus EL-4 T-Lymphozyten mittels Western Blot Analyse gab, musste diese zunächst etabliert werden.

Um das qualitativ bestmögliche Versuchsergebnis zu erhalten, wurden viele Modifikationen des Versuchsaufbaus sowie der verwendeten Chemikalien vorgenommen. Dabei ergaben sich zwei Hauptprobleme. Zum einen das sehr starke Signal des eingesetzten Haushaltsgens GAPDH, welches weitere potenzielle Banden überstrahlte und zum anderen Stärke und Lokalisation des potenziellen MAF-Signals. Durch Optimierung der Proteinauftrennung und der eingesetzten Chemilumineszenz wurde versucht diese Probleme zu lösen. Für ein klares MAF-Signal wurden Primärantikörper verschiedener Firmen und in unterschiedlichen Verdünnungen eingesetzt. Bei Betrachtung der potenziellen c-MAF Bande fällt auf, dass potenziell zwei Banden auf dem Film als c-MAF Bande in Frage kommen (Kapitel 5.11). Da laut Herstellerangaben c-MAF eine Größe von etwa 50 kDa haben soll, liegt die Vermutung nahe, dass es sich tendenziell eher um die untere der beiden Banden handelt. Doch auch bei Betrachtung der Bandenintensität, welche mit der gebildeten Proteinmenge korrelieren, lässt sich keine Aussage über mögliche Unterschiede in der c-MAF-Expression treffen. Allerdings scheint es keine Unterschiede in der c-MAF-Proteinexpression zwischen induzierten und mit Lösungsmittel behandelten Zellen zu geben.

Ergebnisse aus der Literatur zeigen allerdings, dass die Aktivierung des T-Zell Rezeptors die Expression des Transkriptionsfaktors c-MAF in T-Zellen induzieren kann (105). In der Literatur ist auch beschrieben, dass neben der Aktivierung des T-Zell Rezeptors zusätzliche Faktoren, wie

Diskussion

zum Beispiel IL-4 oder IL-6, die Induktion der c-MAF-Expression verbessern können (6). In weiterführenden Experimenten könnte man daher die EL4 T-Zellen zusätzlich zu P/I mit einem dieser Zytokine behandeln. Des Weiteren hat der Versuchsansatz gezeigt, dass die verschiedenen getesteten c-MAF Antikörper für eine Western Blot Applikation nicht gut geeignet zu sein scheinen. Selbst nach einer Vielzahl von Optimierungsschritten, blieb die Identifikation einer spezifischen c-MAF Bande schwierig. Eine alternative Möglichkeit die Proteinexpression zu analysieren wäre die Durchflusszytometrie wie beispielsweise FACS. Hier könnte man mit Hilfe von Fluoreszenz-markierten c-MAF Antikörpern in permeabilisierten Zellen, die c-MAF vielleicht spezifischer und sensitiver nachweisen als im Western Blot. Ebenso wäre es hilfreich, wenn man Daten aus einem in-vivo Modell hätte, um eine mögliche KSRP-vermittelte Regulation von c-MAF zu untersuchen. Da c-MAF in der Literatur als TF beschrieben ist der unter anderem an der Aktivierung von T_H2 Zellen beteiligt ist (67) und unsere Daten auch darauf hinweisen, dass KSRP ein Regulator der T_H2 Immunantwort sein könnte, würde es sich anbieten diese Fragestellung in einem in vivo Modell einer T_H2-vermittelten Erkrankung wie dem allergischen Asthma zu untersuchen.

Zusammenfassend ist zu sagen, dass die c-MAF Ergebnisse auf mRNA-Ebene in Zellen mit verminderter KSRP-Expression gegensätzliche Ergebnisse zu den erwarteten ergaben und die Analyse der Proteinexpression keine eindeutige Aussage über eine mögliche Beeinflussung der c-MAF-Expression durch KSRP ermöglicht. Die in der AG vorhanden Daten aus der RNA-Sequenz Analyse, die eine Erhöhung der c-MAF-Expression zeigten, lassen sich erstmal nicht bestätigen.

7 Literaturverzeichnis

1. Garcia-Maurino SM, Rivero-Rodriguez F, Velazquez-Cruz A, Hernandez-Vellisca M, Diaz-Quintana A, De la Rosa MA, et al. RNA Binding Protein Regulation and Cross-Talk in the Control of AU-rich mRNA Fate. *Front Mol Biosci.* 2017;4:71.
2. Briata P, Chen CY, Ramos A, Gherzi R. Functional and molecular insights into KSRP function in mRNA decay. *Biochim Biophys Acta.* 2013;1829(6-7):689-94.
3. Lin WJ, Zheng X, Lin CC, Tsao J, Zhu X, Cody JJ, et al. Posttranscriptional control of type I interferon genes by KSRP in the innate immune response against viral infection. *Mol Cell Biol.* 2011;31(16):3196-207.
4. Bolduan V, Palzer KA, Hieber C, Schunke J, Fichter M, Schneider P, et al. The mRNA-Binding Protein KSRP Limits the Inflammatory Response of Macrophages. *Int J Mol Sci.* 2024;25(7).
5. Kafer R, Schmidtke L, Schrick K, Montermann E, Bros M, Kleinert H, et al. The RNA-Binding Protein KSRP Modulates Cytokine Expression of CD4(+) T Cells. *J Immunol Res.* 2019;2019:4726532.
6. Imbratta C, Hussein H, Andris F, Verdeil G. c-MAF, a Swiss Army Knife for Tolerance in Lymphocytes. *Front Immunol.* 2020;11:206.
7. Rodriguez A, Vigorito E, Clare S, Warren MV, Couttet P, Soond DR, et al. Requirement of bic/microRNA-155 for normal immune function. *Science.* 2007;316(5824):608-11.
8. Gaudino SJ, Kumar P. Cross-Talk Between Antigen Presenting Cells and T Cells Impacts Intestinal Homeostasis, Bacterial Infections, and Tumorigenesis. *Front Immunol.* 2019;10:360.
9. Murphy KM, Weaver C. *Janeway Immunologie.* 9. Auflage ed. Berlin: Springer Spektrum; 2018.
10. Gherzi R, Chen CY, Trabucchi M, Ramos A, Briata P. The role of KSRP in mRNA decay and microRNA precursor maturation. *Wiley Interdiscip Rev RNA.* 2010;1(2):230-9.
11. Bhattacharyya S, Kumar P, Tsuchiya M, Bhattacharyya A, Biswas R. Regulation of miR-155 biogenesis in cystic fibrosis lung epithelial cells: antagonistic role of two mRNA-destabilizing proteins, KSRP and TTP. *Biochem Biophys Res Commun.* 2013;433(4):484-8.
12. Papavassiliou KA, Papavassiliou AG. Transcription Factor Drug Targets. *J Cell Biochem.* 2016;117(12):2693-6.
13. Ho JJD, Man JHS, Schatz JH, Marsden PA. Translational remodeling by RNA-binding proteins and noncoding RNAs. *Wiley Interdiscip Rev RNA.* 2021;12(5):e1647.
14. Elton TS, Selemón H, Elton SM, Parinandi NL. Regulation of the MIR155 host gene in physiological and pathological processes. *Gene.* 2013;532(1):1-12.
15. Ring HZ, Vameghi-Meyers V, Nikolic JM, Min H, Black DL, Francke U. Mapping of the KHSRP gene to a region of conserved synteny on human chromosome 19p13.3 and mouse chromosome 17. *Genomics.* 1999;56(3):350-2.
16. Palzer KA, Bolduan V, Kafer R, Kleinert H, Bros M, Pautz A. The Role of KH-Type Splicing Regulatory Protein (KSRP) for Immune Functions and Tumorigenesis. *Cells.* 2022;11(9).
17. Chou CF, Lin WJ, Lin CC, Luber CA, Godbout R, Mann M, et al. DEAD box protein DDX1 regulates cytoplasmic localization of KSRP. *PLoS One.* 2013;8(9):e73752.
18. Zhang J, Chen QM. Far upstream element binding protein 1: a commander of transcription, translation and beyond. *Oncogene.* 2013;32(24):2907-16.
19. Gherzi R, Chen CY, Ramos A, Briata P. KSRP controls pleiotropic cellular functions. *Semin Cell Dev Biol.* 2014;34:2-8.
20. Zhou W, Chung YJ, Parrilla Castellar ER, Zheng Y, Chung HJ, Bandle R, et al. Far Upstream Element Binding Protein Plays a Crucial Role in Embryonic Development, Hematopoiesis, and Stabilizing Myc Expression Levels. *Am J Pathol.* 2016;186(3):701-15.

21. Garcia-Mayoral MF, Hollingworth D, Masino L, Diaz-Moreno I, Kelly G, Gherzi R, et al. The structure of the C-terminal KH domains of KSRP reveals a noncanonical motif important for mRNA degradation. *Structure*. 2007;15(4):485-98.
22. Briata P, Chen CY, Giovarelli M, Pasero M, Trabucchi M, Ramos A, et al. KSRP, many functions for a single protein. *Front Biosci (Landmark Ed)*. 2011;16(5):1787-96.
23. Schmidtke L, Schrick K, Saurin S, Kafer R, Gather F, Weinmann-Menke J, et al. The KH-type splicing regulatory protein (KSRP) regulates type III interferon expression post-transcriptionally. *Biochem J*. 2019;476(2):333-52.
24. Linker K, Pautz A, Fechir M, Hubrich T, Greeve J, Kleinert H. Involvement of KSRP in the post-transcriptional regulation of human iNOS expression-complex interplay of KSRP with TTP and HuR. *Nucleic Acids Res*. 2005;33(15):4813-27.
25. Trabucchi M, Briata P, Garcia-Mayoral M, Haase AD, Filipowicz W, Ramos A, et al. The RNA-binding protein KSRP promotes the biogenesis of a subset of microRNAs. *Nature*. 2009;459(7249):1010-4.
26. Dhamija S, Kuehne N, Winzen R, Doerrie A, Dittrich-Breiholz O, Thakur BK, et al. Interleukin-1 activates synthesis of interleukin-6 by interfering with a KH-type splicing regulatory protein (KSRP)-dependent translational silencing mechanism. *J Biol Chem*. 2011;286(38):33279-88.
27. Min H, Turck CW, Nikolic JM, Black DL. A new regulatory protein, KSRP, mediates exon inclusion through an intronic splicing enhancer. *Genes Dev*. 1997;11(8):1023-36.
28. Winzen R, Thakur BK, Dittrich-Breiholz O, Shah M, Redich N, Dhamija S, et al. Functional analysis of KSRP interaction with the AU-rich element of interleukin-8 and identification of inflammatory mRNA targets. *Mol Cell Biol*. 2007;27(23):8388-400.
29. Briata P, Bordo D, Puppo M, Gorlero F, Rossi M, Perrone-Bizzozero N, et al. Diverse roles of the nucleic acid-binding protein KHSRP in cell differentiation and disease. *Wiley Interdiscip Rev RNA*. 2016;7(2):227-40.
30. Bollmann F, Art J, Henke J, Schrick K, Besche V, Bros M, et al. Resveratrol post-transcriptionally regulates pro-inflammatory gene expression via regulation of KSRP RNA binding activity. *Nucleic Acids Res*. 2014;42(20):12555-69.
31. Kung YA, Hung CT, Chien KY, Shih SR. Control of the negative IRES trans-acting factor KHSRP by ubiquitination. *Nucleic Acids Res*. 2017;45(1):271-87.
32. Lin JY, Li ML, Shih SR. Far upstream element binding protein 2 interacts with enterovirus 71 internal ribosomal entry site and negatively regulates viral translation. *Nucleic Acids Res*. 2009;37(1):47-59.
33. Yuan H, Deng R, Zhao X, Chen R, Hou G, Zhang H, et al. SUMO1 modification of KHSRP regulates tumorigenesis by preventing the TL-G-Rich miRNA biogenesis. *Mol Cancer*. 2017;16(1):157.
34. Wang C, Xu W, Chao Y, Liang M, Zhang F, Huang K. E3 Ligase FBXW2 Is a New Therapeutic Target in Obesity and Atherosclerosis. *Adv Sci (Weinh)*. 2020;7(20):2001800.
35. Ard R, Allshire RC, Marquardt S. Emerging Properties and Functional Consequences of Noncoding Transcription. *Genetics*. 2017;207(2):357-67.
36. Giovarelli M, Bucci G, Ramos A, Bordo D, Wilusz CJ, Chen CY, et al. H19 long noncoding RNA controls the mRNA decay promoting function of KSRP. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2014;111(47):E5023-8.
37. Rossi M, Bucci G, Rizzotto D, Bordo D, Marzi MJ, Puppo M, et al. LncRNA EPR controls epithelial proliferation by coordinating Cdkn1a transcription and mRNA decay response to TGF-beta. *Nat Commun*. 2019;10(1):1969.
38. Wei M, Huang J, Li GW, Jiang B, Cheng H, Liu X, et al. Axon-enriched lincRNA ALAE is required for axon elongation via regulation of local mRNA translation. *Cell Rep*. 2021;35(5):109053.
39. Gou Q, Gao L, Nie X, Pu W, Zhu J, Wang Y, et al. Long Noncoding RNA AB074169 Inhibits Cell Proliferation via Modulation of KHSRP-Mediated CDKN1a Expression in Papillary Thyroid Carcinoma. *Cancer Res*. 2018;78(15):4163-74.

40. Huang X, Liu X, Du B, Liu X, Xue M, Yan Q, et al. LncRNA LINC01305 promotes cervical cancer progression through KHSRP and exosome-mediated transfer. *Aging (Albany NY)*. 2021;13(15):19230-42.
41. Huang J, Sachdeva M, Xu E, Robinson TJ, Luo L, Ma Y, et al. The Long Noncoding RNA NEAT1 Promotes Sarcoma Metastasis by Regulating RNA Splicing Pathways. *Mol Cancer Res*. 2020;18(10):1534-44.
42. Eisenbarth SC, Baumjohann D, Craft J, Fazilleau N, Ma CS, Tangye SG, et al. CD4(+) T cells that help B cells - a proposal for uniform nomenclature. *Trends Immunol*. 2021;42(8):658-69.
43. Zhu J, Paul WE. Peripheral CD4+ T-cell differentiation regulated by networks of cytokines and transcription factors. *Immunol Rev*. 2010;238(1):247-62.
44. Zhu X, Zhu J. CD4 T Helper Cell Subsets and Related Human Immunological Disorders. *Int J Mol Sci*. 2020;21(21).
45. Takatsu K, Nakajima H. IL-5 and eosinophilia. *Curr Opin Immunol*. 2008;20(3):288-94.
46. Takatsu K. Interleukin-5 and IL-5 receptor in health and diseases. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci*. 2011;87(8):463-85.
47. Saraiva M, O'Garra A. The regulation of IL-10 production by immune cells. *Nat Rev Immunol*. 2010;10(3):170-81.
48. Ouyang W, Rutz S, Crellin NK, Valdez PA, Hymowitz SG. Regulation and functions of the IL-10 family of cytokines in inflammation and disease. *Annu Rev Immunol*. 2011;29:71-109.
49. Iwaszko M, Bialy S, Bogunia-Kubik K. Significance of Interleukin (IL)-4 and IL-13 in Inflammatory Arthritis. *Cells*. 2021;10(11).
50. Stogerer T, Stager S. Innate Immune Sensing by Cells of the Adaptive Immune System. *Front Immunol*. 2020;11:1081.
51. Kafer R, Schrick K, Schmidtke L, Montermann E, Hobernik D, Bros M, et al. Inactivation of the KSRP gene modifies collagen antibody induced arthritis. *Mol Immunol*. 2017;87:207-16.
52. Zhao H, Wang X, Yi P, Si Y, Tan P, He J, et al. KSRP specifies monocytic and granulocytic differentiation through regulating miR-129 biogenesis and RUNX1 expression. *Nat Commun*. 2017;8(1):1428.
53. Soonthornvacharin S, Rodriguez-Frandsen A, Zhou Y, Galvez F, Huffmaster NJ, Tripathi S, et al. Systems-based analysis of RIG-I-dependent signalling identifies KHSRP as an inhibitor of RIG-I receptor activation. *Nat Microbiol*. 2017;2:17022.
54. Silva LM, Munoz-Caro T, Burgos RA, Hidalgo MA, Taubert A, Hermosilla C. Far beyond Phagocytosis: Phagocyte-Derived Extracellular Traps Act Efficiently against Protozoan Parasites In Vitro and In Vivo. *Mediators Inflamm*. 2016;2016:5898074.
55. Hong E, Di Cesare PE, Haudenschild DR. Role of c-Maf in Chondrocyte Differentiation: A Review. *Cartilage*. 2011;2(1):27-35.
56. Kataoka K. Multiple mechanisms and functions of maf transcription factors in the regulation of tissue-specific genes. *J Biochem*. 2007;141(6):775-81.
57. Kataoka K, Shioda S, Ando K, Sakagami K, Handa H, Yasuda K. Differentially expressed Maf family transcription factors, c-Maf and MafA, activate glucagon and insulin gene expression in pancreatic islet alpha- and beta-cells. *J Mol Endocrinol*. 2004;32(1):9-20.
58. Huang W, Lu N, Eberspaecher H, De Crombrughe B. A new long form of c-Maf cooperates with Sox9 to activate the type II collagen gene. *J Biol Chem*. 2002;277(52):50668-75.
59. Wende H, Lechner SG, Cheret C, Bourane S, Kolanczyk ME, Pattyn A, et al. The transcription factor c-Maf controls touch receptor development and function. *Science*. 2012;335(6074):1373-6.
60. Imaki J, Tsuchiya K, Mishima T, Onodera H, Kim JI, Yoshida K, et al. Developmental contribution of c-maf in the kidney: distribution and developmental study of c-maf mRNA in normal mice kidney and histological study of c-maf knockout mice kidney and liver. *Biochem Biophys Res Commun*. 2004;320(4):1323-7.

61. Kusakabe M, Hasegawa K, Hamada M, Nakamura M, Ohsumi T, Suzuki H, et al. c-Maf plays a crucial role for the definitive erythropoiesis that accompanies erythroblastic island formation in the fetal liver. *Blood*. 2011;118(5):1374-85.
 62. Parker ME, Barrera A, Wheaton JD, Zuberbuehler MK, Allan DSJ, Carlyle JR, et al. c-Maf regulates the plasticity of group 3 innate lymphoid cells by restraining the type 1 program. *J Exp Med*. 2020;217(1).
 63. Pokrovskii M, Hall JA, Ochayon DE, Yi R, Chaimowitz NS, Seelamneni H, et al. Characterization of Transcriptional Regulatory Networks that Promote and Restrict Identities and Functions of Intestinal Innate Lymphoid Cells. *Immunity*. 2019;51(1):185-97 e6.
 64. Zuberbuehler MK, Parker ME, Wheaton JD, Espinosa JR, Salzler HR, Park E, et al. The transcription factor c-Maf is essential for the commitment of IL-17-producing gammadelta T cells. *Nat Immunol*. 2019;20(1):73-85.
 65. Morito N, Yoh K, Fujioka Y, Nakano T, Shimohata H, Hashimoto Y, et al. Overexpression of c-Maf contributes to T-cell lymphoma in both mice and human. *Cancer Res*. 2006;66(2):812-9.
 66. Wende H, Lechner SG, Birchmeier C. The transcription factor c-Maf in sensory neuron development. *Transcription*. 2012;3(6):285-9.
 67. Ho IC, Lo D, Glimcher LH. c-maf promotes T helper cell type 2 (Th2) and attenuates Th1 differentiation by both interleukin 4-dependent and -independent mechanisms. *J Exp Med*. 1998;188(10):1859-66.
 68. Hammond SM. An overview of microRNAs. *Adv Drug Deliv Rev*. 2015;87:3-14.
 69. Ruggiero T, Trabucchi M, De Santa F, Zupo S, Harfe BD, McManus MT, et al. LPS induces KH-type splicing regulatory protein-dependent processing of microRNA-155 precursors in macrophages. *FASEB J*. 2009;23(9):2898-908.
 70. Nicastro G, Garcia-Mayoral MF, Hollingworth D, Kelly G, Martin SR, Briata P, et al. Noncanonical G recognition mediates KSRP regulation of let-7 biogenesis. *Nat Struct Mol Biol*. 2012;19(12):1282-6.
 71. Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem*. 1987;162(1):156-9.
 72. Telesnitsky A, Goff SP. Reverse Transcriptase and the Generation of Retroviral DNA. In: Coffin JM, Hughes SH, Varmus HE, editors. *Retroviruses*. Cold Spring Harbor (NY)1997.
 73. Mullis KB, Faloona FA. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol*. 1987;155:335-50.
 74. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*. 2001;25(4):402-8.
 75. Voytas D. Agarose gel electrophoresis. *Curr Protoc Immunol*. 2001;Chapter 10:10 4 1- 4 8.
 76. thermofisher. TaqMan™ Advanced miRNA Assays USER GUIDE. Zitiert am 03.12.2024. https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/100027897_TaqManAdv_miRNA_Assays_UG.pdf
- 2024.
77. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*. 1976;72:248-54.
 78. Wessel D, Flugge UI. A method for the quantitative recovery of protein in dilute solution in the presence of detergents and lipids. *Anal Biochem*. 1984;138(1):141-3.
 79. Smith BJ. SDS Polyacrylamide Gel Electrophoresis of Proteins. *Methods Mol Biol*. 1984;1:41-55.
 80. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 1970;227(5259):680-5.
 81. Burnette WN. "Western blotting": electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate--polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. *Anal Biochem*. 1981;112(2):195-203.

82. Towbin H, Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1979;76(9):4350-4.
83. Morgan E, Varro R, Sepulveda H, Ember JA, Apgar J, Wilson J, et al. Cytometric bead array: a multiplexed assay platform with applications in various areas of biology. *Clin Immunol*. 2004;110(3):252-66.
84. Tahara E, Kadara H, Lacroix L, Lotan D, Lotan R. Activation of protein kinase C by phorbol 12-myristate 13-acetate suppresses the growth of lung cancer cells through KLF6 induction. *Cancer Biol Ther*. 2009;8(9):801-7.
85. Ai W, Li H, Song N, Li L, Chen H. Optimal method to stimulate cytokine production and its use in immunotoxicity assessment. *Int J Environ Res Public Health*. 2013;10(9):3834-42.
86. Umland SP, Razac S, Shah H, Nahrebne DK, Egan RW, Billah MM. Interleukin-5 mRNA stability in human T cells is regulated differently than interleukin-2, interleukin-3, interleukin-4, granulocyte/macrophage colony-stimulating factor, and interferon-gamma. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 1998;18(5):631-42.
87. Thomas MA, Karlen S, D'Ercole M, Sanderson CJ. Analysis of the 5' and 3'UTRs in the post-transcriptional regulation of the interleukin-5 gene. *Biochim Biophys Acta*. 1999;1444(1):61-8.
88. Hikichi Y, Motomura Y, Takeuchi O, Moro K. Posttranscriptional regulation of ILC2 homeostatic function via tristetraprolin. *J Exp Med*. 2021;218(12).
89. Goenka S, Kaplan MH. Transcriptional regulation by STAT6. *Immunol Res*. 2011;50(1):87-96.
90. Wei L, Vahedi G, Sun HW, Watford WT, Takatori H, Ramos HL, et al. Discrete roles of STAT4 and STAT6 transcription factors in tuning epigenetic modifications and transcription during T helper cell differentiation. *Immunity*. 2010;32(6):840-51.
91. Ho IC, Miaw SC. Regulation of IL-4 Expression in Immunity and Diseases. *Adv Exp Med Biol*. 2016;941:31-77.
92. Gaba A, Grivennikov SI, Do MV, Stumpo DJ, Blackshear PJ, Karin M. Cutting edge: IL-10-mediated tristetraprolin induction is part of a feedback loop that controls macrophage STAT3 activation and cytokine production. *J Immunol*. 2012;189(5):2089-93.
93. Tudor C, Marchese FP, Hitti E, Aubareda A, Rawlinson L, Gaestel M, et al. The p38 MAPK pathway inhibits tristetraprolin-directed decay of interleukin-10 and pro-inflammatory mediator mRNAs in murine macrophages. *FEBS Lett*. 2009;583(12):1933-8.
94. Brewer G, Sacconi S, Sarkar S, Lewis A, Pestka S. Increased interleukin-10 mRNA stability in melanoma cells is associated with decreased levels of A + U-rich element binding factor AUF1. *J Interferon Cytokine Res*. 2003;23(10):553-64.
95. Krishnamurthy P, Lambers E, Verma S, Thorne T, Qin G, Losordo DW, et al. Myocardial knockdown of mRNA-stabilizing protein HuR attenuates post-MI inflammatory response and left ventricular dysfunction in IL-10-null mice. *FASEB J*. 2010;24(7):2484-94.
96. Mori N, Prager D. Activation of the interleukin-10 gene in the human T lymphoma line HuT 78: identification and characterization of NF-kappa B binding sites in the regulatory region of the interleukin-10 gene. *Eur J Haematol*. 1997;59(3):162-70.
97. Gherzi R, Lee KY, Briata P, Wegmuller D, Moroni C, Karin M, et al. A KH domain RNA binding protein, KSRP, promotes ARE-directed mRNA turnover by recruiting the degradation machinery. *Mol Cell*. 2004;14(5):571-83.
98. Olsen I, Sollid LM. Pitfalls in determining the cytokine profile of human T cells. *J Immunol Methods*. 2013;390(1-2):106-12.
99. Klein M, Klein-Hessling S, Palmetshofer A, Serfling E, Tertilt C, Bopp T, et al. Specific and redundant roles for NFAT transcription factors in the expression of mast cell-derived cytokines. *J Immunol*. 2006;177(10):6667-74.
100. Casolaro V, Fang X, Tancowny B, Fan J, Wu F, Srikantan S, et al. Posttranscriptional regulation of IL-13 in T cells: role of the RNA-binding protein HuR. *J Allergy Clin Immunol*. 2008;121(4):853-9 e4.

Literaturverzeichnis

101. Zeng B, Zhu D, Su Z, Li Z, Yu Z. Tristetraprolin exerts tumor suppressive functions on the tumorigenesis of glioma by targeting IL-13. *Int Immunopharmacol.* 2016;39:63-70.
102. Lorentz A, Klopp I, Gebhardt T, Manns MP, Bischoff SC. Role of activator protein 1, nuclear factor-kappaB, and nuclear factor of activated T cells in IgE receptor-mediated cytokine expression in mature human mast cells. *J Allergy Clin Immunol.* 2003;111(5):1062-8.
103. Sehgal PB, Darnell JE, Jr., Tamm I. The inhibition by DRB (5,6-dichloro-1-beta-D-ribofuranosylbenzimidazole) of hnRNA and mRNA production in HeLa cells. *Cell.* 1976;9(3):473-80.
104. Thai TH, Calado DP, Casola S, Ansel KM, Xiao C, Xue Y, et al. Regulation of the germinal center response by microRNA-155. *Science.* 2007;316(5824):604-8.
105. Lovat PE, Hannam-Harris AC, Watson JG. Enumeration of lymphocyte subpopulations by immunofluorescent staining of whole blood smears. *J Immunol Methods.* 1987;97(1):37-40.

Danksagung

Mit Abschluss dieser Arbeit erreiche ich einen für mich persönlich sehr großen Meilenstein. Zudem geht ein Lebensabschnitt zu Ende und ich möchte die Chance nutzen zurückzublicken und ein großes Dankeschön an all diejenigen zu richten, die mich in dieser Phase meines Lebens begleitet und auf unterschiedliche Art und Weise unterstützt haben.

Zuallererst möchte ich mich an meine Doktormutter [REDACTED] wenden, die mir die Chance gab in ihrer Arbeitsgruppe meine praktische und theoretische Arbeit durchzuführen. Für ihre fachlich kompetente, engagierte und stets zuverlässige Betreuung während der gesamten Zeit möchte ich mich herzlich bedanken. Ich habe mich als Doktorandin sehr gut aufgehoben gefühlt und besonders den empathischen Umgang sehr zu schätzen gewusst.

Des Weiteren geht ein großes Dankeschön an alle Mitarbeiterinnen der Arbeitsgruppe, die mich mit ihrer langjährigen Erfahrung kompetent und geduldig in die Welt der praktischen Labormethodik eingeführt haben und mir immer mit Rat und Tat zur Seite standen. Vielen Dank an [REDACTED].

Ich möchte mich auch bei den Postdocs, Doktorandinnen und Studentinnen, die mich auf meinem Weg begleitet haben für die fachliche Unterstützung, Ratschläge und auch immer wieder aufbauenden Worte und gemeinsame schöne Momente herzlich bedanken. Danke an [REDACTED].

Mein weiterer Dank gilt [REDACTED] sowie [REDACTED] für ihre fachlich kompetente Unterstützung und der Möglichkeit Teile meiner Versuche außerhalb der eigenen Arbeitsgruppe durchführen zu können bedanken. Vielen Dank auch an [REDACTED], der sich immer wieder mit Ideen und wertvollen Denkanstößen eingebracht hat.

All dies wäre ohne die geduldige und mentale Unterstützung meines Partners, Familie und Freunde nicht möglich gewesen. Ein besonders großer Dank geht dabei an meine Eltern. Sie haben mich schon immer bedingungslos in all meinen Zielen mit viel Liebe unterstützt und fest an mich geglaubt. Das empfinde ich als großes Privileg.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Nina Kuhlmann
Geburtsdatum: 11.02.1997
Geburtsort: Mainz

Schulbildung

2003 - 2007 Grundschole Kirchheimbolanden
2007 - 2016 Nordpfaizgymnasium Kirchheimbolanden
März 2016 Schulabschluss: Abitur

Akademischer Werdegang

Okt.2016- April.2019 Studium der Humanmedizin Eberhard-Karls-Universität Tübingen
April 2019 1.Staatsexamen Humanmedizin in Tübingen
Seit April 2019 Studium der Humanmedizin im klinischen Abschnitt Universitätsmedizin
Mainz
April 2023 2.Staatsexamen Humanmedizin in Mainz
Mai 2024 3. Staatsexamen Humanmedizin in Mainz