

# **Bedeutung nicht-kodierender RNAs im Immunsystem**

Von der Fakultät für Biowissenschaften, Pharmazie und Psychologie

der Universität Leipzig

genehmigte

**DISSERTATION**

zur Erlangung des akademischen Grades

*doctor rerum naturalium*

(Dr. rer. nat.)

vorgelegt

von Master of Science Nadine Hösler

geboren am 3. Juli 1984 in Leipzig

Dekan: Prof. Dr. Erich Schröger

Gutachter: Prof. Dr. Torsten Schöneberg  
Prof. Dr. Freidemann Horn

Tag der Verteidigung 19. Juni 2015

---

## Bibliographische Darstellung

Nadine Hösler

### **Bedeutung nicht-kodierender RNAs im Immunsystem**

Fakultät für Biowissenschaften, Pharmazie und Psychologie  
Universität Leipzig

*Dissertation*

180 Seiten, 223 Literaturangaben, 50 Abbildungen, 7 Tabellen

---

Immer mehr Berichte deuten darauf hin, dass nicht-kodierende RNAs an der Regulation des Immunsystems beteiligt sind. In dieser Arbeit wurden nicht-kodierende RNAs identifiziert, die durch zwei unterschiedliche immunologische Prozesse in zwei verschiedenen Zelltypen reguliert wurden. Zum einen wurde das Transkriptom von Multiplen Myelom-Zellen in Abhängigkeit von der Interleukin-6-Stimulation untersucht. Dabei wurden einige sehr lange, IL-6-regulierte macroRNAs identifiziert, die STAIRs (*STAT3-induced RNAs*). Bei den STAIRs handelt es sich wahrscheinlich um funktionelle, kontinuierliche, nicht-kodierende macroRNAs, die im Zellkern angereichert sind. Einige STAIRs dienen eventuell zusätzlich oder ausschließlich als Primärtranskript für gespleißte, lange ncRNAs (lncRNAs), die weitere Funktionen in der Zelle ausüben können. Die STAIRs weisen eine große Bandbreite an Gewebsspezifität auf und bei den Untersuchungen in dieser Arbeit zeigten sich Hinweise, dass sie sich für verschiedene Krebserkrankungen als Biomarker eignen könnten. Die zweite Transkriptomanalyse wurde bei der Aktivierung naiver T-Zellen durchgeführt. Dabei offenbarte sich, dass die Zellen bei diesem Prozess einen dramatischen Wechsel ihres Transkriptionsprogrammes vollziehen und eine Vielzahl nicht Protein-kodierender Gene reguliert werden. Es wurde die Regulation von ncRNAs, die bisher noch nicht im Zusammenhang mit T-Zellen beschrieben wurden, beobachtet und erneut unbekannte, differentiell exprimierte Bereiche identifiziert. Im Anschluss wurde STAIR18, eine nicht-kodierende RNA, die durch die beiden untersuchten Signalwege reguliert wird, eingehender untersucht. Es zeigte sich, dass STAIR18 im menschlichen Genom dupliziert ist und beide Loci die gespleißte, lange ncRNA152 in diversen Varianten transkribieren. ncRNA152 ist hauptsächlich im Zytoplasma lokalisiert und befindet sich dort anscheinend in perinukleären Aggregaten. Die verschiedenen ncRNA152-Isoformen scheinen unterschiedliche Funktionen auszuführen. Einerseits ist eine Wirkung als *competing endogenous RNA* wahrscheinlich. Eine weitere Aufgabe der ncRNA152 scheint darin zu bestehen, das STAT3-Primärtranskript zu stabilisieren oder dessen Prozessierung zu fördern.

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
<b>1.1</b>	<b>Nicht-kodierende RNAs</b>	<b>1</b>
1.1.1	Funktionen langer nicht-kodierender RNAs	2
1.1.2	Lange nicht-kodierende RNAs in Krebserkrankungen	4
<b>1.2</b>	<b>Die Signaltransduktion von IL-6 und STAT3</b>	<b>5</b>
1.2.1	Die IL-6/STAT3-Signalkaskade	5
1.2.2	Der Transkriptionsfaktor STAT3	7
1.2.3	Interleukin-6 und STAT3 in Krebserkrankungen	9
1.2.4	STAT3-regulierende nicht-kodierende RNAs	12
<b>1.3</b>	<b>T-Zellen</b>	<b>13</b>
1.3.1	T-Zellaktivierung	14
1.3.2	Lange nicht-kodierende RNAs in T-Zellen	16
<b>1.4</b>	<b>Zielstellung</b>	<b>18</b>
<b>2</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>20</b>
<b>2.1</b>	<b>Bioinformatische Methoden</b>	<b>20</b>
2.1.1	Evaluierung von Tiling Array-Daten	20
2.1.2	Evaluierung von Hochdurchsatz-Sequenzierungen	21
2.1.3	Auswertung von Mikroarray-Daten	21
2.1.4	DNA-Sequenzanalysen	22
2.1.5	Design von Oligonukleotiden	23
2.1.6	Statistische Auswertung	24
<b>2.2</b>	<b>Molekularbiologische Methoden</b>	<b>25</b>
2.2.1	Zellfraktionierung	25
2.2.2	Isolation von RNA	25
2.2.3	Reverse Transkription	26
2.2.4	Quantitative <i>real-time</i> PCR	27
2.2.5	Klonierung	29

<b>2.3 Zellbiologische Methoden</b>	<b>36</b>
2.3.1 Präparation primärer T-Helferzellen	36
2.3.2 Zellkultur und Stimulation eukaryontischer Zellen	38
2.3.3 Durchflusszytometrie	40
2.3.4 Transiente Transfektion eukaryontischer Zellen	42
2.3.5 Reporteranalysen	44
2.3.6 Fluoreszenz in situ Hybridisierung	45
2.3.7 Gewebe- und Patientenproben	48
<b>3 Ergebnisse</b>	<b>50</b>
<b>3.1 Identifizierung und Charakterisierung neuer STAT3-regulierter ncRNA-Gene</b>	<b>50</b>
3.1.1 Genomweite Untersuchung STAT3-regulierter ncRNAs	50
3.1.2 Validierung der IL-6-Tiling Array-Daten	65
3.1.3 Intrazelluläre Lokalisation der STAIRs	67
3.1.4 Expressionsprofile der STAIRs	68
<b>3.2 Identifizierung regulierter ncRNA-Gene während der T-Zellaktivierung</b>	<b>72</b>
3.2.1 Etablierung der <i>in vitro</i> Aktivierung primärer T-Zellen	72
3.2.2 Genomweite Untersuchung regulierter RNAs während der T-Zellaktivierung	74
3.2.3 Validierung der T-Zellaktivierungs-Genomdaten	83
<b>3.3 Untersuchung der nicht-kodierenden RNA STAIR18 / ncRNA152</b>	<b>83</b>
3.3.1 STAIR18 ist im humanen Genom dupliziert	84
3.3.2 Von beiden STAIR18-Loci werden gespleißte Transkripte generiert	86
3.3.3 Regulation der ncRNA152	90
3.3.4 Untersuchung des STAIR18/ncRNA152-Promotors	96
3.3.5 Intrazelluläre Lokalisation von STAIR18 und ncRNA152	101
3.3.6 Überexpression der ncRNA152 in XG-1-Zellen	106
3.3.7 Knockdown der ncRNA152 in XG-1-Zellen	107
3.3.8 Identifizierung putativer Zielgene der ncRNA152	109
<b>4 Diskussion</b>	<b>111</b>
<b>4.1 IL-6/STAT3 regulierte macroRNAs</b>	<b>111</b>
4.1.1 Charakterisierung der STAIRs	114
4.1.2 STAIRs als potentielle Biomarker	121

<b>4.2</b>	<b>Regulation von lncRNAs während der T-Zellaktivierung</b>	<b>122</b>
<b>4.3</b>	<b>Untersuchung von STAIR18/ncRNA152</b>	<b>128</b>
4.3.1	Regulation von STAIR18 und der ncRNA152	129
4.3.2	Lokalisation von STAIR18 und der ncRNA152	130
4.3.3	Manipulation der ncRNA152-Expression	131
4.3.4	Bedeutung der ncRNA152	133
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>135</b>
<b>6</b>	<b>Summary</b>	<b>138</b>
<b>7</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>141</b>
<b>8</b>	<b>Anhang</b>	<b>153</b>
	Danksagung	168
	Publikationen	169-69
	Selbstständigkeitserklärung	170

# Abbildungsverzeichnis

Abb. 1.1:	Der IL-6/STAT3-Signalweg.	6
Abb. 1.2:	Signalweg der T-Zellaktivierung.	15
Abb. 3.1:	Darstellung von STAIR1 im genomischen Kontext.	59
Abb. 3.2:	Darstellung von STAIR2 im genomischen Kontext.	60
Abb. 3.3:	Darstellung von STAIR3 im genomischen Kontext.	61
Abb. 3.4:	Darstellung von STAIR6 im genomischen Kontext.	62
Abb. 3.5:	Darstellung von STAIR15 im genomischen Kontext.	63
Abb. 3.6:	Darstellung von STAIR18 im genomischen Kontext.	64
Abb. 3.7:	Induktion der STAIRs in INA-6-Zellen nach IL-6-Stimulation.	66
Abb. 3.8:	Intrazelluläre Lokalisation der STAIRs.	67
Abb. 3.9:	Expression der STAIRs in humanen Tumorzelllinien.	69
Abb. 3.10:	Expression der STAIRs in humanen Geweben.	70
Abb. 3.11:	Expression der STAIRs in Patientenproben des Multiplen Myeloms.	71
Abb. 3.12:	Induktion von Haushaltsgenen nach T-Zellaktivierung.	73
Abb. 3.13:	Übersicht regulierter Gene während der T-Zellaktivierung.	75
Abb. 3.14:	Sequenzierungsdaten im genomischen Kontext – TREAT1.	78
Abb. 3.15:	Sequenzierungsdaten im genomischen Kontext – TREAT2.	80
Abb. 3.16:	Sequenzierungsdaten im genomischen Kontext – TREAT3.	81
Abb. 3.17:	Sequenzierungsdaten im genomischen Kontext – TREAT6.	82
Abb. 3.18:	Darstellung von STAIR18 im genomischen Kontext.	85
Abb. 3.19:	Darstellung der Duplikation von STAIR18 im genomischen Kontext.	85
Abb. 3.20:	Schematische Darstellung der ncRNA152-Gene.	86
Abb. 3.21:	Spleißvarianten der ncRNA152 im LOC541471-Locus.	88
Abb. 3.22:	Spleißvarianten der ncRNA152 im LINC00152-Locus.	89
Abb. 3.23:	IL-6-abhängige Induktion von ncRNA152 und STAIR18 in INA-6-Zellen.	91
Abb. 3.24:	IL-6-abhängige Induktion von ncRNA152 und STAIR18 in XG-1-Zellen.	92
Abb. 3.25:	IL-6-abhängige Induktion von ncRNA152 und STAIR18 in HepG2-Zellen.	93
Abb. 3.26:	Induktion der ncRNA152 und STAIR18 während der T-Zell-Aktivierung.	95
Abb. 3.27:	STAIR18/ncRNA152-Promotor und –Enhancer im genomischen Kontext.	96
Abb. 3.28:	Sequenzelemente im STAIR18/ncRNA152-Promotor.	98
Abb. 3.29:	Reportergenanalyse zur Regulation des STAIR18-Promotors durch IL-6.	100
Abb. 3.30:	Subzelluläre Verteilung von ncRNA152/STAIR18.	101
Abb. 3.31:	Lokalisation der ncRNA152 in INA-6-Zellen.	103
Abb. 3.32:	Lokalisation der ncRNA152 in XG-1- Zellen.	104
Abb. 3.33:	Lokalisation der ncRNA152 in HepG2- Zellen.	105

Abb. 3.34:	Überexpression der ncRNA152.	107
Abb. 3.35:	Knockdown der ncRNA152 in XG-1-Zellen.	108
Abb. 3.36:	Validierung der ncRNA152-Zielgene der Mikroarray-Analyse.	110
Abb. 4.1:	TREATs im genomischen Kontext.	124
Anhang Abb. I:	STAIR18 / LINC00152 - Transkriptomanalyse der T-Zellaktivierung.	153
Anhang Abb. II:	STAIR18 / LOC541471 - Transkriptomanalyse der T-Zellaktivierung.	153
Anhang Abb. III:	LINC00515 - Transkriptomanalyse der T-Zellaktivierung.	154
Anhang Abb. IV:	STAIR15 / MIAT - Transkriptomanalyse der T-Zellaktivierung.	154
Anhang Abb. V:	SNHG16 - Transkriptomanalyse der T-Zellaktivierung.	155
Anhang Abb. VI:	TREAT1 - Transkriptomanalyse der T-Zellaktivierung.	156
Anhang Abb. VII:	TREAT2 - Transkriptomanalyse der T-Zellaktivierung.	157
Anhang Abb. VIII:	TREAT3 - Transkriptomanalyse der T-Zellaktivierung.	158
Anhang Abb. IX:	TREAT4 - Transkriptomanalyse der T-Zellaktivierung.	159
Anhang Abb. X:	TREAT5 - Transkriptomanalyse der T-Zellaktivierung.	160
Anhang Abb. XI:	TREAT6 - Transkriptomanalyse der T-Zellaktivierung.	161

## Tabellenverzeichnis

Tab. I:	Charakterisierung der STAIRs.	53
Anhang Tab. I:	Validierung Tiling Array-Daten der T-Zellaktivierung.	162
Anhang Tab. II:	Gene und Primer der T-Zell-Tiling-Validierung	163
Anhang Tab. III:	STAIR18-Spleißstellen im LOC541471-Locus.	164
Anhang Tab. IV:	STAIR18-Spleißstellen im LINC00152-Locus.	165
Anhang Tab. V:	Transkriptionsfaktor-Bindungsstellen im STAIR18 Promotor.	166
Anhang Tab. VI:	Mikroarraydaten - ncRNA152-Knockdown.	167

# Abkürzungsverzeichnis

<b>A</b>	Abb.	Abbildung
	ABHD5	<i>abhydrolase domain containing 5</i>
	Airn	<i>antisense IGFR2 non-protein coding RNA</i>
	ANAPC1	<i>anaphase promoting complex subunit 1</i>
	ANRIL	<i>antisense non-coding RNA in the INK4 locus</i>
	AP-1	<i>activator protein 1</i>
	ARRDC5	<i>arrestin domain containing 5</i>
	as	antisense
	ATF-2	<i>activating transcription factor 2</i>
<b>B</b>	BAD-LAMP	<i>brain and dendritic cell LAMP</i>
	BCL2L11	<i>B-cell lymphoma 2 like 11</i>
<b>C</b>	CD	<i>cluster of differentiation</i>
	cDNA	<i>complementary DNA</i>
	Celf3	<i>CUGBP, Elav-like family member 3</i>
	Chip-Seq	Chromatin-Immünpräzipitation mit anschließender Sequenzierung
<b>D</b>	DEDD	<i>death effector domain containing</i>
	DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i>
	DCC	<i>deleted in colorectal carcinoma</i>
<b>E</b>	EST	<i>expressed sequence tags</i>
<b>G</b>	GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
	GAS5	<i>growth arrest specific 5, nicht-kodierende RNA</i>
<b>H</b>	H3K27Ac	Histon 3 am Lysin 27 acetyliert (aktive Transkription)
	H3K4Me1	Histon 3 am Lysin einfach methyliert (aktive Transkription)
	H3K4Me3	Histon 3 am Lysin trimethyliert (Promotor-assoziiert)
	HEY1	<i>hairy/enhancer-of-split related with YRPW motif 1</i>
	HOTAIR	<i>HOX transcript antisense intergenic RNA, nicht-kodierende RNA</i>
<b>I</b>	IL	Interleukin
<b>J</b>	JAK	Januskinase
<b>K</b>	k. A.	Keine Aussage
	KCNQ1OT1	<i>KCNQ1 opposite strand/antisense transcript 1</i>
<b>L</b>	LAMP	<i>lysosome associated membrane protein</i>
	LAT	<i>linker for activation of T cells</i>
	Lck	<i>lymphocyte-specific protein tyrosine kinase</i>
	lincRNA	<i>long intergenic non-coding RNA</i>



	LNA	<i>locked nucleic acids</i>
	lncRNA-ABT	<i>lncRNA activated by TGF-<math>\beta</math></i>
	lncRNA	lange nicht-kodierende RNA
<b>M</b>	MALAT1	<i>metastasis-associated lung adenocarcinoma transcript 1</i> , nicht-kodierende RNA
	MEG3	<i>maternally expressed 3</i> , nicht-kodierende RNA
	MHC	<i>major histocompatibility complex</i>
	MIAT	<i>myocardial infarction associated transcript</i> , nicht-kodierende RNA
	miRNA	<i>microRNA</i>
	mRNA	<i>messenger RNA</i>
	mTOR	mechanistic target of rapamycin
<b>N</b>	ncRNA	<i>non-coding RNA</i>
	NeST	<i>nettoie Salmonella pas Theiler's</i> , nicht-kodierende RNA, alias TMEVPG1 oder INFG-AS1
	NFAT	<i>nuclear factor of activated t cells</i>
	NF- $\kappa$ B	<i>nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells</i>
<b>O</b>	ORF	<i>open reading frame</i>
<b>P</b>	PBMC	<i>peripheral blood mononuclear cells</i>
	PCA3	<i>prostate cancer antigen 3</i> , nicht kodierende RNA
	PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
	pDC	plasmazytoide dendritische Zelle
	PDDA	Polydiallyldimethylammoniumchlorid
	PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase
	PIK3IP1	<i>phosphoinositide-3-kinase interacting protein 1</i>
	PKC	Proteinkinase C
	PLC $\gamma$	Phospholipase C $\gamma$
	PLGL	<i>plasminogen-like</i>
	PPI	Peptidyl-Prolyl- <i>cis-trans</i> -Isomerase
	PGL	<i>plasminogen-like</i>
<b>Q</b>	QKI	<i>Quaking homolog, KH domain containing, RNA binding</i>
<b>R</b>	RefSeq	NCBI RNA reference sequences collection
	RGPD	<i>RANBP2-like and GRIP domain containing</i>
	RNA	<i>ribonucleic acid</i>
	RGPD	<i>RANBP2-like and GRIP domain containing</i>
<b>S</b>	SATB1	<i>SATB homeobox 1</i>
	SETBP1	<i>SET binding protein 1</i>
	SF1	<i>splicing factor 1</i>
	SH2-Domäne	<i>Src-homology domain 2</i>
	siRNA	<i>small interfering RNA</i>
	SNHG16	<i>small nucleolar RNA host gene 16</i> , nicht kodierende RNA

	snRNA	<i>small nuclear RNA</i>
	SOCS	<i>Suppressor of cytokine signaling</i>
	SRSF1	<i>serine/arginine rich splicing factor 1</i>
	STAIR	<i>STAT3-induced RNA</i> , nicht-kodierende RNA
	STAT	<i>signal transducer and activator of transcription</i>
	SYT4	Synaptotagmin 4
<b>T</b>	Tab.	Tabelle
	TBX21	<i>T-box 21</i> , wichtiger Transkriptionsfaktor für die Th1-Differenzierung
	Th1	T-Helferzellen Typ 1
	TMEVPG1	<i>Theiler's murine encephalomyelitis virus persistence candidate gene 1</i> , nicht-kodierende RNA, alias NeST oder INFG-AS1
	TNF	Tumornekrosefaktor
	TOPAZ1	<i>testis and ovary specific PAZ domain containing 1</i>
	TREAT	<i>transcript regulated by activation in T cells</i> , nicht-kodierende RNA
	tRNA	Transfer-RNA
<b>U</b>	U6	snRNA, Bestandteil von Spleißosomen
	UFC1	<i>ubiquitin-fold modifier conjugating enzyme 1</i>
	UHRF1	<i>ubiquitin-like with PHD and ring finger domains 1</i>
	UTR	untranslatierte Region
<b>V</b>	vlincRNA	<i>very long intergenic non-coding RNA</i> , macroRNA
<b>W</b>	w/o	<i>without</i>

# 1 Einleitung

## 1.1 Nicht-kodierende RNAs

Lange Zeit wurde angenommen, dass die Hauptaufgabe zellulärer RNA in der Vermittlung von Informationen von DNA zu Proteinen besteht. Diese Ansicht änderte sich, als Sequenzierungen und Tiling Arrays die Untersuchung des humanen Transkriptom ermöglichten. Großangelegte Transkriptomstudien offenbarten, dass fast das komplette menschliche Genom transkribiert wird<sup>1-3</sup> und das, obwohl der Anteil Protein-kodierender Sequenz nur 1,2 Prozent beträgt<sup>4</sup>. Oft werden beide DNA-Stränge transkribiert und es zeigen sich sehr komplexe Strukturen ineinander verschachtelter und überlappender sense und antisense Transkripteinheiten, die auch noch unterschiedlich gespleißt werden können<sup>4</sup>. Humane Zellen produzieren demnach eine Unmenge an Transkripten, die nicht für Proteine kodieren, da sie keinen oder nur einen sehr kurzen offenen Leserahmen aufweisen, und daher als nicht-kodierende RNAs (ncRNAs) bezeichnet werden.

Auch wenn die aktuelle Literatur von kurzen RNAs dominiert wird, existiert eine steigende Anzahl an Berichten, die funktionelle, lange nicht-kodierende RNAs beschreiben. Im Moment fehlt eine zufriedenstellende Klassifizierung für diese Transkripte. Auf Grundlage einer praktischen Abgrenzung bei biochemischen Fraktionierungen werden willkürlich Transkripte als lange nicht-kodierende RNAs betrachtet, die länger als 200 Nukleotide sind. Da viele lange nicht-kodierende RNAs nur in geringem Maß exprimiert werden und die meisten eine geringere Sequenzkonservierung aufweisen als mRNAs, wurden sie anfangs als transkriptionelles Rauschen komplexer, mit evolutionärem Schutt überlagerter Genome dargestellt. In Veröffentlichungen der letzten Jahre treten lange nicht-kodierende RNAs immer öfter als zentrale Spieler der Zellbiologie in Erscheinung<sup>5-7</sup>. Im Vergleich zu Protein-kodierenden Transkripten kennen wir zurzeit nur eine kleine, aber schnell wachsende Anzahl langer nicht-kodierender RNAs, die eine Rolle bei der Regulation der Genexpression spielen. Die exakte biologische Aufgabe der großen Mehrheit dieser Transkripte ist noch immer unbekannt.

LncRNAs werden normalerweise wie mRNAs durch die RNA-Polymerase II transkribiert, viele werden auch polyadenyliert und gespleißt<sup>8</sup>. Zusätzlich weisen sie epigenetische Modifikationen auf, die für Protein-kodierende Gene üblich sind, wie die Trimethylierung des Histon 3 am Lysin 4 (H3K4Me3) im Promotor und die H3K36-Trimethylierung entlang

des transkribierten Bereiches<sup>9</sup>. Bei genauerer Betrachtung zeigen auch viele lange nicht-kodierende RNAs Stellen relativer Sequenzkonservierung<sup>10</sup> und noch mehr weisen diese auf Sekundärstrukturlevel auf<sup>11</sup>. Die Promotoren von ncRNAs sind außerdem ähnlich hoch konserviert wie die Protein-kodierender Gene<sup>10</sup>. Zudem schließt fehlende Konservierung eine Funktion der lncRNAs nicht aus, wie einige wichtige, kaum konservierte lncRNAs zeigen<sup>12</sup>. Lange nicht-kodierende RNAs weisen geringere und gewebspezifischere Expressionen als Protein-kodierende Gene auf<sup>10</sup>. Im Vergleich zu mRNAs sind die meisten nicht-kodierende RNAs nicht im Zytoplasma, sondern im Zellkern angereichert – was mit ihrer beschriebenen Rolle als Regulatoren der epigenetischen Genexpression vereinbar ist<sup>2,10</sup>. Des Weiteren wurde berichtet, dass lange nicht-kodierende RNAs mehr zur Zelllinienspezifität beitragen als Protein-kodierende Gene<sup>2</sup>. Auch phänotypische Unterschiede sowohl zwischen Individuen als auch zwischen Spezies scheinen hauptsächlich in Abweichungen nicht-Protein-kodierender Sequenzen begründet zu sein und durch die Variation der Genexpression verursacht zu werden<sup>10,13</sup>. Aus diesem Blickwinkel betrachtet, lässt sich auch die entwicklungsbiologische Komplexität von Organismen erklären. Die Wissenschaft beschäftigte sich lange mit dem Paradoxon, dass weder die Menge zellulärer DNA noch die Anzahl an Genen mit der biologischen Komplexität von Eukaryoten korreliert<sup>14,15</sup>. Zwischen der Menge an nicht-Protein-kodierenden Sequenzen und der biologischen Komplexität besteht hingegen eine starke Korrelation<sup>3,16</sup>. Zusammen mit der Beobachtung, dass auch der Großteil nicht-kodierender DNA in RNA umgesetzt wird, lässt sich ein Modell ableiten, indem Proteine weitestgehend unveränderliche Effektormoleküle darstellen, die durch eine immer komplexere Zusammenstellung nicht-kodierender RNAs reguliert werden und somit die Evolution und Entwicklung komplexer Organismen ermöglicht wurde<sup>17</sup>.

### 1.1.1 Funktionen langer nicht-kodierender RNAs

lncRNAs erfüllen wichtige Aufgaben in fast allen Aspekten der Zellbiologie – von der nukleären Organisation und epigenetischer Regulation bis zur Steuerung der Genexpression auf dem Level der Transkription, RNA-Prozessierung und Translation<sup>18,19</sup>. Jüngste Untersuchungen haben deutlich gemacht, dass lncRNAs die Genexpression über diverse Mechanismen regulieren. Außerdem wurde gezeigt, dass ähnlich dem, was über Proteine bekannt ist, auch lange nicht-kodierende RNAs mehr als eine Funktion ausführen können<sup>20</sup>. Einige lncRNAs binden bestimmte Proteine und führen die resultierenden Komplexe zu bestimmten genomischen Orten, um epigenetische Veränderungen zu bewirken und die Genexpression zu regulieren<sup>18,21</sup>. *Cis*-regulatorische lncRNAs beeinflussen dabei die Genexpression benachbarter Gene, wohingegen andere lncRNAs entfernte Gene *in trans* regulieren können. Allerdings ist in den meisten Fällen der genaue Mechanismus, wie lncRNAs ihre Zielgene spezifisch regulieren, noch nicht aufgeklärt und ihre Bindungsstellen

im Genom sind noch weitestgehend unbekannt. Eine andere Gruppe von lncRNAs besitzt unterschiedliche Domänen, an die verschiedene Effektormoleküle binden können<sup>18,21</sup>. Diese lncRNAs dienen als Gerüst für Multiproteinkomplexe und vermitteln den Zusammenbau multipler molekularer Komponenten in einer zeit- und ortsspezifischen Weise. Viele der lncRNAs binden Chromatin-modifizierende Komplexe<sup>22</sup> – wahrscheinlich um sie zu spezifischen genomischen Orten zu führen und dort die Expression von Genen zu regulieren. In Verbindung mit anderen makromolekularen Komplexen können lncRNAs aber auch posttranskriptionell die Prozessierung oder Translation von RNAs beeinflussen. Eine weitere Klasse langer nicht-kodierender RNAs bindet Protein- oder RNA-Moleküle und nimmt diese in Beschlag, übt aber keine zusätzlichen Effekte aus<sup>18,21</sup>. Sie wirken als molekulare Fallen und verhindern, dass die gebundenen Moleküle ihre Funktion ausüben können. Sie können zum Beispiel spezifische Transkriptionsfaktoren beschlagnahmen und so die Repression oder Aktivierung von deren Zielgenen unterbinden. Des Weiteren wurde beispielsweise für die Transkripte einiger Pseudogene beschrieben, dass diese konkurrierende endogene RNAs darstellen, die als Falle für miRNAs fungieren und somit bestimmte mRNAs vor dem Abbau durch diese miRNAs schützen<sup>23</sup>.

Auch wenn das Wissen über die molekularen Mechanismen der lncRNA-Funktionen zunimmt, ist die Wirkungsweise der meisten lncRNAs noch immer nicht bekannt<sup>18,19,21</sup>. Eine erste großangelegte *in vivo* Untersuchung langer nicht-kodierender RNAs wurde 2013 veröffentlicht. Sauvageau et al. generierten Knockout-Mausmodelle für 18 ausgewählte lange intergenische nicht-kodierende RNAs (lincRNA). Drei der Mausmutanten wiesen embryonale oder postnatale Letalität auf, zwei weitere Knockout-Modelle zeigten Phänotypen mit Wachstumsdefekten<sup>24</sup>. Dies lässt erkennen, dass nicht-kodierende RNAs *in vivo* auch wichtige entwicklungsbiologische Funktionen innehaben. Selbst wenn nicht alle ausgeschalteten lincRNAs einen Phänotyp aufwiesen, sollte man negative Resultate mit Bedacht interpretieren, da selbst Knockout-Experimente umfangreich exprimierter, regulierter oder besonders hoch konservierter langer nicht-kodierender RNAs des Säuger-genoms keinen wahrnehmbaren Phänotyp zeigten<sup>25,26</sup>. Vieles deutet darauf hin, dass die stark exprimierten und konservierten ncRNAs eine Funktion innehaben. Mögliche Erklärungen, dass man nach Ausschalten dieser ncRNAs keinen Phänotyp beobachten kann, könnten die funktionelle Redundanz mit anderen RNAs oder kompensatorische Mechanismen sein. Weitere Forschung ist nötig, um das Wissen über die Funktionsweisen der lncRNAs, deren regulatorische Signalwege und Netzwerke auszubauen und unser zellbiologisches Verständnis zu verbessern.

## 1.1.2 Lange nicht-kodierende RNAs in Krebserkrankungen

Krebs ist eine große Gruppe verschiedener Erkrankungen, bei denen sich abnorme Zellen unkontrolliert teilen und dazu tendieren in andere Gewebe einzuwandern. Unter Betrachtung der umfangreichen Aufgaben, die lange nicht-kodierende RNAs in zellulären Netzwerken innehaben, ist es nicht überraschend, dass deregulierte ncRNAs auch mit humanen Erkrankungen, insbesondere Krebs, in Verbindung gebracht wurden<sup>18,27</sup>. Für einige lncRNAs konnte bereits gezeigt werden, dass sie in bestimmten Krebstypen differentiell exprimiert werden und mit einer bestimmten Prognose oder Tumormetastasierung bei diesen Erkrankungen korrelieren<sup>18,27</sup>. Transkriptionelles Profiling hat verdeutlicht, dass differentiell exprimierte lncRNAs mit der Pathogenese von Krebserkrankungen assoziiert sind<sup>28</sup>. Außerdem wurden bereits einige lange nicht-kodierende RNAs wie ANRIL (*antisense non-coding RNA in the INK4 locus*)<sup>29,30</sup>, GAS5 (*growth arrest specific 5*)<sup>31</sup>, H19<sup>32,33</sup>, HOTAIR (*HOX transcript antisense intergenic RNA*)<sup>34,35</sup>, lncRNA-ABT (*lncRNA-activated by TGF-β*)<sup>36</sup>, MALAT1 (*metastasis-associated lung adenocarcinoma transkript 1*)<sup>37-41</sup> und MEG3 (*maternally expressed 3*)<sup>42-46</sup> beschrieben, die als Tumorsuppressor oder Onkogen fungieren.

Es wird immer offensichtlicher, dass lncRNAs neben Proteinen, mRNAs und miRNAs als neue unabhängige Biomarker für die frühe Diagnose und Prognosevorhersage bei Krebserkrankungen geeignet sind<sup>18,27</sup>. Die Liste krebsassoziierter lncRNAs wächst rasant. Die Entdeckung deregulierter lncRNAs repräsentiert nicht nur ein neues Level an Komplexität in der molekularen Architektur humaner Erkrankungen, sondern eröffnet ebenfalls die Möglichkeit sie als diagnostische Marker und therapeutische Ziele zu nutzen<sup>27</sup>. Der Einsatz von lncRNAs als Biomarker könnte Vorteile haben, besonders wenn sie einfach in biologischen Flüssigkeiten detektiert werden können<sup>27</sup>. So zeigt eine aktuelle Studie mit fünf ausgewählten langen nicht-kodierenden RNAs, dass die Menge von vier der untersuchten lncRNAs im Blutplasma von Multiplen Myelom Patienten von der gesunder Spender abweicht und mit dem Stadium der Erkrankung korreliert<sup>47</sup>. Im Gegensatz zu mRNA ist nicht-kodierende RNA selbst ein funktionelles Molekül und ihr Expressionslevel könnte ein besserer Indikator einer Erkrankung sein als die Expression einer Boten-RNA. Zusätzlich legt das hoch spezifische Expressionsmuster langer nicht-kodierender RNAs nahe, dass es erfolgreich zur akkuraten Krankheitsdiagnose und Klassifizierung verwendet werden kann. Auch wenn diese Anwendung erst in der Entwicklung ist, hat der Einsatz individueller lncRNAs in der Klinik bereits begonnen. PCA3 (*prostate cancer antigen 3*), eine Prostata-spezifische lncRNA, wird in Prostatakrebs überexprimiert und in einem diagnostischen Test in Urinproben detektiert<sup>48,49</sup>. Auch das Angreifen langer nicht-kodierender RNAs zu therapeutischen Zwecken wird bereits von Firmen und Organisationen erforscht. So wird beispielsweise die Überexpression der onkogenen lncRNA H19 in vielen Tumoren zur Entwicklung einer gezielten Therapie genutzt. Hierfür wird ein Plasmid, das das

Diphtherietoxin unter Kontrolle einer H19-regulatorischen Sequenz trägt, intratumoral injiziert. Dieses Verfahren wurde bereits erfolgreich in Patienten mit Blasen-, Eierstock- und Pankreaskrebs angewandt und bewirkte eine Reduktion der Tumorgöße<sup>50</sup>. Auch die in vielen Krebsarten überexprimierte lncRNA MALAT1 wird aktuell auf seine Eignung als therapeutisches Ziel untersucht. Der Knockdown von MALAT-1 mit siRNAs oder Antisense-Oligonukleotiden bewirkte in verschiedenen Krebszellkulturen eine Reduktion der Zellproliferation und Migration<sup>37-41</sup>. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass die intratumorale Injektionen von siRNAs gegen MALAT1 bei Mäusen mit xenotransplantierten Prostatatumoren das Tumorwachstum verlangsamt und die Metastasierung reduzierten<sup>40</sup>. Allerdings sind vor dem Einsatz von lncRNAs zur Therapie weitere funktionelle und strukturelle Untersuchungen nötig, um die Biologie langer nicht-kodierender RNAs besser zu verstehen.

## **1.2 Die Signaltransduktion von IL-6 und STAT3**

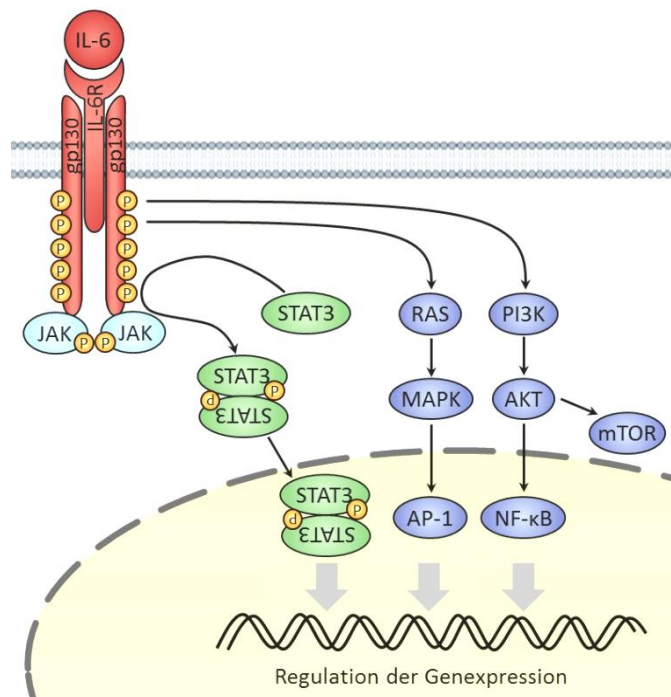
Interleukin-6 (IL-6) ist ein pleiotropes Zytokin, das in vielen Geweben und diversen Zelltypen wie Monozyten, Makrophagen, T- und B-Zellen, Neutrophilen, Fibroblasten, Epithel- und Endothelzellen, Keratinozyten, Osteoblasten und weiteren Zellen produziert wird<sup>51</sup>. Bei Infektionen, Entzündungen und Krebserkrankungen wird es sehr stark exprimiert<sup>52</sup>. Interleukin-6 ist ein Glykoprotein mit vielen verschiedenen Funktionen. Es ist bedeutsam für die terminale Differenzierung aktivierter B-Zellen zu Antikörperproduzierenden Plasmazellen und wesentlich für die Differenzierung von Th17-Zellen<sup>52</sup>. Die Akut-Phase-Antwort in der Leber wird ebenfalls durch Interleukin-6 induziert<sup>53</sup>. Es ist zusätzlich in die Regulation der Hämatopoese sowie Knochen-, Knorpel- und Lipidstoffwechsel involviert, fördert aber auch die Onkogenese<sup>53</sup>.

### **1.2.1 Die IL-6/STAT3-Signalkaskade**

Das klassische Interleukin-6-Signal wird über den IL-6-Rezeptorkomplex vermittelt, der aus zwei Untereinheiten besteht, die beide in der Plasmamembran verankert sind. Interleukin-6 bindet an den IL-6-Rezeptor (IL-6R), auch als Glykoprotein 80 bekannt (Abb. 1.1). Der an IL-6 gebundene IL-6R, kann dann mit der zweiten Untereinheit des IL-6-Rezeptorkomplexes, dem Glykoprotein 130 (gp130), interagieren und dessen Dimerisierung bewirken (Abb. 1.1). Neben Interleukin-6 nutzen auch einige weitere verwandte Zytokine die gp130-Untereinheit für ihre Signaltransduktion in die Zelle. Gp130 wird auf allen Körperzellen exprimiert, der IL-6-Rezeptor allerdings nur auf Hepatozyten und einigen Leukozyten<sup>52</sup>. Trotzdem besteht die Möglichkeit den IL-6-Signalweg auch in Zellen, die IL-6R nicht

exprimieren, zu aktivieren. Dieser Prozess wird als Trans-Signaling bezeichnet und über eine lösliche Form des IL-6-Rezeptors vermittelt. Der lösliche IL-6R wird durch die limitierte Proteolyse des membranständigen Rezeptors oder, in geringerem Ausmaß, auch durch die Translation einer alternativ gespleißten IL-6R-mRNA generiert<sup>54</sup>. Interleukin-6 kann an den löslichen IL-6-Rezeptor binden. Dieser Komplex ist dann imstande, mit dem membran- gebundenen gp130 zu interagieren und auf diese Weise den IL-6-Signalweg in verschiedenen Zellen zu induzieren<sup>54</sup>.

Der zytoplasmatische Teil der gp130-Moleküle ist mit Janus-Kinasen (JAK) assoziiert. Die Bindung von Interleukin-6 an den IL-6R bewirkt die Dimerisierung von gp130, wodurch die assoziierten JAKs so positioniert werden, dass sie sich gegenseitig phosphorylieren können. Die aktivierten JAKs phosphorylieren die zytoplasmatischen Tyrosinreste des Zytokin- receptors, die dann als Bindungsstellen für *signal transducer and activation of transcription* (STAT) und andere Signalmoleküle dienen. STAT3-Proteine binden über ihre *src-homology-2*(SH2)-Domäne an die phosphorylierten Tyrosinreste des Rezeptors und werden dort durch



**Abb. 1.1: Der IL-6/STAT3-Signalweg.** Durch das Binden von IL-6 an seinen Rezeptor können die Rezeptor-assoziierten Januskinasen (JAK) sich gegenseitig und anschließend gp130 phosphorylieren. STAT3 wird an den Rezeptor rekrutiert und ebenfalls durch die JAKs an einem Tyrosin-Rest phosphoryliert. Dies bewirkt die Dimerisierung und Translokation von STAT3 in den Zellkern, wo es an seine Bindungsstellen auf der DNA binden und die Genexpression modulieren kann. Zusätzlich können der RAS/mitogen activated protein kinase (MAPK)- sowie der Phosphoinositid-3-Kinase (PI3K)-Signalweg initiiert werden, wodurch weitere Transkriptionsfaktoren wie *nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells* (NF-κB) und *activator protein-1* (AP-1) in die Regulation der Genexpression eingreifen.



die JAKs an einem Tyrosinrest (Y705) phosphoryliert. Die aktivierten STAT3-Proteine dissoziieren vom Rezeptor ab und bilden durch die reziproke Interaktion der phosphorylierten Tyrosinreste mit den SH2-Domänen Homo- und Heterodimere. Die STAT3-Dimere translozieren in den Zellkern und binden dort an *gamma activated site* (GAS)-Elemente in Promotoren oder Enhancern und regulieren die Expression von Zielgenen (Abb. 1.1). Durch das IL-6-Signal können neben der Aktivierung von STATs auch die Ras/*mitogen activated protein kinase* (MAPK)-Signalkaskade sowie der Phosphoinositid-3-Kinase (PI3K)/Proteinkinase B (AKT)-Signalweg initiiert werden<sup>55</sup> (Abb. 1.1). Die Auswirkungen der IL-6-Signaltransduktion auf die Genexpression sind von dem jeweiligen Zelltyp und vom jeweiligen Zustand der Zelle abhängig und können die Akut-Phase- und Immunantwort, Proliferation, Überleben, Zellzyklus und Differenzierung, Migration, Angiogenese, den Knochenmetabolismus und einige andere Prozesse regulieren<sup>51-53</sup>.

Ein charakteristisches Merkmal der JAK/STAT-Signaltransduktion ist ihr schneller Beginn sowie ihr baldiges Abklingen<sup>56</sup>. Wie bereits beschrieben, wird STAT3 direkt am Zytokinrezeptor aktiviert und akkumuliert in kürzester Zeit im Zellkern, wo es die Expression seiner Zielgene reguliert<sup>56</sup>. Eines der Gene, was in den verschiedensten Zelltypen durch STAT3 induziert wird, ist *suppressor of cytokine signaling 3* (SOCS3)<sup>57</sup>. SOCS3 ist ein klassischer Rückkopplungsinhibitor, der mit STAT3 um die phosphorylierten Tyrosinreste des IL-6-Rezeptors konkurriert oder direkt an JAKs bindet und diese inhibieren kann<sup>58</sup>. Des Weiteren können auch SOCS1 oder einige Protein-Tyrosin-Phosphatasen den STAT3-Signalweg an verschiedenen Punkten terminieren<sup>56</sup>. Die Dephosphorylierung von STAT3 im Zellkern bewirkt dabei den Export der Proteine zurück ins Zytoplasma<sup>51,59</sup>. Ein weiteres Protein, das die IL-6-Signaltransduktion negativ beeinflusst, ist *protein inhibitor of activated STATs* (PIAS) 3<sup>51,55,60</sup>. PIAS3 inhibiert die DNA-Bindungsaktivität von STAT3 sowie dessen transkriptionelle Aktivierung<sup>61</sup>.

## 1.2.2 Der Transkriptionsfaktor STAT3

STAT3 ist ein ubiquitär exprimierter Transkriptionsfaktor, der essentielle Funktionen bei der Entwicklung, dem Zellwachstum und der Homöostase verschiedener Gewebe inne hat<sup>51,55</sup>. Zudem spielt STAT3 eine wesentliche Rolle bei der Differenzierung von Th17-Zellen, indem es die Transkription sowie epigenetische Modifikationen relevanter Th17-Zell-Gene moduliert<sup>62</sup>. Entsprechend reguliert es die Balance zwischen Th17- und regulatorischen T-Zellen. Darüber hinaus fördert STAT3 die Proliferation und das Überleben von T-Helferzellen<sup>62</sup>. Weiter wurde gezeigt, dass STAT3 die Entwicklung von Th2-Zellen unterstützt, indem es die Bindung von STAT6 an seine Zielgene ermöglicht<sup>63</sup>. STAT3 ist außerdem an der Generation von Gedächtnis-T-Zellen beteiligt<sup>64</sup> und essentiell für die

Differenzierung von aktivierten B-Zellen zu Antikörper-produzierenden Plasmablasten sowie die Bildung von Gedächtnis-B-Zellen<sup>65</sup>.

Wie alle STAT-Proteine, so besteht auch STAT3 aus einer N-terminalen Domäne, einer Coiled-coil-Domäne, einer DNA-Bindungsdomäne, einer Linker-Domäne, einer SH2-Domäne und letztendlich der Transaktivierungsdomäne<sup>51</sup>. STAT3 kann durch verschiedene Zytokine aktiviert werden, unter anderem, wie bereits beschrieben, durch das proinflammatorische Interleukin-6 oder aber durch das antiinflammatorische Interleukin-10<sup>56,66-68</sup>. In Abhängigkeit vom Zytokin, dem Zelltyp und dem Zustand der Zelle hat STAT3 teilweise entgegengesetzte Funktionen in verschiedenen Geweben oder manchmal sogar im selben Zelltyp<sup>67,68</sup>. Ein Beispiel hierfür sind dendritische Zellen, in denen Interleukin-6 über die Aktivierung von STAT3 seine proinflammatorische Aktivität vermittelt<sup>68</sup>. Interleukin-10 nutzt ebenfalls STAT3 zur Signaltransduktion und bewirkt im selben Zelltyp eine antiinflammatorische Antwort<sup>68</sup>. Noch komplexer wird die Signaltransduktion durch ein drittes Zytokin, Interleukin-21, das seinen Effekt durch die Aktivierung von STAT3 vermittelt und auf diese Weise in dendritischen Zellen Apoptose induziert<sup>69</sup>. Somit aktivieren drei verschiedene Zytokine STAT3 in ein und demselben Zelltyp und bewirken drei vollkommen verschiedene zelluläre Antworten. Bioinformatische Algorithmen sagen über eine Millionen putativer STAT3-Bindungsstellen im Genom von Mammalia voraus<sup>70</sup>. Wo STAT3 in einer bestimmten Zelle tatsächlich an die DNA bindet und welche Gene es reguliert, ist wahrscheinlich zusätzlich von der Zugänglichkeit des Chromatins und Cofaktoren abhängig. Man hat lange vermutet, dass STAT3 in unterschiedlichen Zelltypen verschiedene Zielgene reguliert und hat dies für eine begrenzte Anzahl an Genen bereits gezeigt<sup>51</sup>. Der Einsatz von *chromatin immunoprecipitation sequencing* (ChIP-Seq) ermöglichte in den letzten Jahren die genomweite Analyse von Transkriptionsfaktor-Bindungsstellen und hat die divergenten Zelltyp-spezifischen Bindungsmuster von STAT3 in verschiedenen Zelltypen unterstrichen, was wiederum die verschiedenen Funktionen von STAT3 im Körper reflektiert<sup>71</sup>. Die große Mehrheit der STAT3-Bindungsstellen ist demnach Zelltyp-spezifisch<sup>71</sup>. Nur ein kleiner Teil der genomischen Bindungsstellen von STAT3 ist in den verschiedenen untersuchten Zellen identisch<sup>71</sup>. Diese können als universelle STAT3-Bindungsstellen bezeichnet werden und stellen essentielle Faktoren für die Signaltransduktion von STAT3 dar<sup>71</sup>. Universelle STAT3-Bindungsstellen bestimmen die Selbstregulation des STAT3-Signalweges und enthalten unter anderem das STAT3-Gen selbst sowie die Gene für SOCS3, BCL3 (*B cell lymphoma 3*), PTPN1 (*protein tyrosin phosphatase 1B*), IRF2 (*interferon regulatory factor 2*) und BCL6<sup>71</sup>. STAT3 bindet dabei offenbar an vordefinierte Zelltyp-spezifische Stellen im Genom, die eine offene Chromatin-Struktur aufweisen und die zusätzlich für STAT3 vorbereitet sind<sup>71</sup>.

Neben seiner Aufgabe als Transkriptionsfaktor kann STAT3 die Genexpression auf epigenetischer Ebene modulieren<sup>62</sup>. Es wurde beschrieben, dass STAT3 direkt oder indirekt Histonacetyltransferasen<sup>72</sup>, Histondeacetylasen<sup>73</sup> und Methyltransferasen<sup>74</sup> an bestimmte

DNA-Abschnitte rekrutieren kann. Zusätzlich scheint STAT3 auch Funktionen außerhalb des Zellkerns zu haben. In vielen Zellen wurde es innerhalb der Mitochondrien detektiert<sup>75</sup>. Hier wirkt STAT3 als Adapterprotein, das die Elektronentransportkette und die Produktion reaktiver Sauerstoffspezies moduliert<sup>75</sup>. Ebenso wurde beschrieben, dass STAT3 in migrierenden T-Zellen an Stathmin bindet und die Dynamik der Mikrotubuli direkt reguliert<sup>76</sup>. Welche Funktion STAT3 ausübt, wird unter anderem durch posttranslationale Modifikationen wie beispielsweise Phosphorylierung, Acetylierung oder Methylierung von STAT3 bestimmt. Diese beeinflussen Interaktionen mit anderen Proteinen und wirken sich auf die Genexpression aus. Es wurde beschrieben, dass sich unphosphoryliertes STAT3 kontinuierlich zwischen Zytoplasma und Zellkern hin und her bewegt<sup>59,77</sup> und auch Dimere bilden kann<sup>77</sup>. Unphosphoryliertes STAT3 scheint ebenfalls Gene zu regulieren, allerdings hat es andere transkriptionelle Ziele als sein phosphoryliertes Gegenstück<sup>78</sup>. Unter anderem kann unphosphoryliertes STAT3 auch mit NF-κB einen Komplex bilden und so die Transkription einiger Gene regulieren. Dabei wird die DNA-Bindungs- und Transaktivierungsdomäne von NF-κB genutzt und die nukleäre Translokation durch STAT3 gewährleistet<sup>79</sup>. Tyrosin-phosphoryliertes STAT3 kann durch bestimmte Kinasen auch an einem Serinrest (S727) in der Transaktivierungsdomäne phosphoryliert werden, wodurch die Spezifität und transkriptionelle Aktivität für seine Zielgene moduliert wird<sup>51</sup>. Des Weiteren wurde gezeigt, dass STAT3, wenn es an bestimmten Promotoren gebunden und am Serin-727 phosphoryliert ist, auch reversibel durch eine Histon-Methyltransferase an einem Lysinrest (K140) dimethyliert werden kann<sup>80</sup>. Die Histon-Methyltransferase wird dabei durch STAT3 zu einem bestimmten Gen rekrutiert und kann dort potentiell die Zugänglichkeit des Chromatins durch ihre aktivierende H3K4-Methylierung beeinflussen<sup>80</sup>. Außerdem wurde in Stammzell-ähnlichen Zellen humaner Glioblastome beobachtet, dass phosphoryliertes EZH2 an STAT3 binden und dieses an einem Lysinrest (K180) methylieren kann<sup>81</sup>. Dies ist eine weitere Modifikation, die die Aktivität von STAT3 verstärkt, eventuell durch das Verhindern der Dephosphorylierung von Tyrosin-705<sup>81</sup>.

### **1.2.3 Interleukin-6 und STAT3 in Krebserkrankungen**

Interleukin-6 ist eines der am häufigsten deregulierten Zytokine bei Krebserkrankungen, wobei es bei fast allen untersuchten Tumorarten, einschließlich soliden sowie hämatologischen Tumoren, überexprimiert wird<sup>82</sup>. Dabei wirkt es sowohl auf autokrine als auch auf parakrine Weise<sup>52,82</sup>. Eine erhöhte Konzentration von Interleukin-6 ist meist mit einer schlechten Prognose assoziiert und trägt möglicherweise zu Gewichtsverlust, Nachtschweiß, Fieber und anderen paraneoplastischen Symptomen bei<sup>52,82</sup>. Gerade bei therapieresistenten Krebspatienten wird oft eine hohe Serumkonzentration von IL-6 nachgewiesen. Interleukin-6 spielt bei vielen Aspekten der Tumorgenese eine Rolle, wie der

Transformation, Proliferation, Apoptose, Wachstum, Differenzierung, Angiogenese, Migration und Invasion von Tumorzellen<sup>82</sup>.

Die fehlgeleitete Regulation von STAT3 ist ebenfalls sowohl mit soliden als auch mit hämatologischen Tumoren wie Kopf-Hals- und gastrointestinalen Tumoren, Brust-, Prostata- und Eierstockkrebs, Glioblastomen sowie Lymphomen und Leukämien assoziiert<sup>83</sup>. In der Mehrheit humaner Tumore und Krebszelllinien wurden erhöhte Mengen an phosphoryliertem STAT3 detektiert. Oft bedingt eine permanente Aktivierung bestimmter Tyrosinkinase eine dauerhafte Phosphorylierung von STAT3<sup>83</sup>. In einigen Tumoren lassen sich auch somatische Mutationen im gp130-Rezeptor, JAK2, STAT3, STAT3-inaktivierenden Phosphatasen oder SOCS3 nachweisen, die eine Hyperaktivierung von STAT3 bewirken<sup>83</sup>. Bei den meisten Krebserkrankungen ist die verstärkte Aktivierung von STAT3 durch die erhöhte Konzentration verschiedener Zytokine bedingt, allen voran Interleukin-6<sup>83</sup>. Dabei tragen verschiedene Regulationsmechanismen zum onkogenen Potential von STAT3 bei. Es fördert die Proliferation transformierter Zellen, indem es Zellzyklus- und Wachstumsgene induziert, und unterdrückt die Apoptose dadurch, dass es die Expression von Überlebensfaktoren fördert. Auch einige der Zielgene von unphosphoryliertem STAT3 sind mit Krebs assoziiert und tragen potentiell zu der Rolle von STAT3 bei der Onkogenese bei<sup>84</sup>. Ein weiterer Aspekt, wie STAT3 zur Onkogenese beiträgt, ist seine immunsupprimierende Aktivität<sup>83</sup>. STAT3 kann die Immunantwort gegen transformierte Zellen unterdrücken, indem es in Krebs- oder Immunzellen die Produktion immunstimulatorischer Moleküle hemmt und die Expression immunsuppressiver Faktoren fördert. So wird die Reifung dendritischer Zellen sowie die Aktivierung von T-Zellen und Makrophagen inhibiert und die Expression von MHC-Molekülen in Krebszellen herunterreguliert<sup>83</sup>. Zusätzlich wird die Rekrutierung und Differenzierung von regulatorischen T-Zellen und myeloiden Suppressorzellen begünstigt<sup>83</sup>. Insgesamt wird somit die Fähigkeit der Immunzellen, Tumorzellen zu erkennen und zu bekämpfen, eingeschränkt.

Aufgrund der Bedeutung des IL-6/STAT3-Signalweges bei der Karzinogenese wird versucht therapeutisch in die Signalkaskade einzugreifen und neue Behandlungen für Krebspatienten zu entwickeln. Einige klinische Studien untersuchen momentan den therapeutischen Einsatz von Antikörpern gegen Interleukin-6 oder den IL-6-Rezeptor sowohl gegen verschiedene chronisch entzündliche und autoimmune Erkrankungen als auch zur Behandlung von B-Zelllymphomen oder soliden Tumoren<sup>52</sup>. Tocilizumab ist dabei der erste in Europa (seit 2009) zugelassene anti-IL-6-Rezeptor-Antikörper, der zurzeit für die Therapie von rheumatoider Arthritis und systemischer juveniler idiopathischer Arthritis verwendet wird<sup>52,83</sup>. Außerdem wird derzeit der Einsatz von Siltuximab (CNTO 328), einem Antikörper gegen Interleukin-6, zur Behandlung des Multiplen Myeloms sowie von Nieren-, Eierstock- und Prostatakrebs in klinischen Phase-I/II-Studien untersucht<sup>52,82,83</sup>. Des Weiteren wurde in einer klinischen Phase-0-Studie eine Oligonukleotid-Falle, die die DNA-Bindungsdomäne

von STAT3 blockieren kann, erfolgreich für die Therapie von Kopf- und Halstumoren getestet<sup>85</sup>. Zusätzlich laufen klinische Studien zur Behandlung hämatologischer Neoplasien und solider Tumore mit verschiedenen JAK-Inhibitoren<sup>52,83</sup>. Die bisherigen Ergebnisse lassen hoffen, dass in den nächsten Jahren weitere wirksame Therapiemöglichkeiten für die Behandlung von Krebserkrankungen etabliert werden.

### **Das Multiple Myelom**

Das Multiple Myelom ist eine Neoplasie terminal differenzierter B-Zellen und ist durch die Akkumulation von Plasmazellen im Knochenmark gekennzeichnet<sup>52,86</sup>. Ungefähr zehn Prozent der neu diagnostizierten hämatologischen Krebserkrankungen werden dem Multiplen Myelom zugeordnet<sup>52</sup>. Noch immer ist es eine unheilbare Krankheit<sup>52,86</sup>. Die Proliferation monoklonaler Plasmazellen im Knochenmark bedingt bei dieser Erkrankung monoklonale Gammopathie, Immunsuppression und Knochendestruktion<sup>52,86</sup>. In seltenen Fällen kann sich das Multiple Myelom auch zu einer Plasmazell-Leukämie entwickeln, wobei die transformierten Plasmazellen auch in großen Mengen im Blut zu finden sind<sup>87</sup>. Viele Myelomzellen weisen chromosomale Translokationen zwischen Enhancern von Immunglobulinen und Protoonkogenen auf, wodurch die entsprechenden Onkogene aktiviert werden<sup>86</sup>. Neben genetischen Aberrationen ist die Interaktion mit benachbarten Stromazellen des Knochenmarks entscheidend für die Pathophysiologie und Pathogenese des Multiplen Myeloms<sup>86</sup>. Die Wechselwirkungen zwischen Tumor- und Stromazellen führen zu einer verstärkten Expression und Sekretion von Zytokinen und Chemokinen, die die Proliferation der Multiplen Myelom-Zellen stimulieren und sie vor Apoptose schützen<sup>86</sup>. Mittlerweile ist vor allem die Rolle von Interleukin-6 als Wachstums- und Überlebensfaktor des Multiplen Myeloms hinreichend nachgewiesen<sup>52,86</sup>. Zusätzlich aktiviert Interleukin-6 Osteoklasten und begünstigt den Knochenabbau<sup>52,86</sup>. Einige Myelom-Zellen produzieren selber IL-6, aber die Hauptquelle sind die Stromazellen des Knochenmarks<sup>52,86</sup>. Es wurde bereits gezeigt, dass die Inhibition des IL-6/STAT3-Signalweges in einigen humanen Multiplen Myelom-Zelllinien Apoptose induziert<sup>86,88</sup>. Zur Behandlung des Multiplen Myeloms werden je nach Alter und körperlicher Verfassung des Patienten Chemotherapie und Stammzelltransplantationen eingesetzt. Zudem hat die Verwendung neuer Immunmodulatoren und Proteasominhibitoren die Prognose für Patienten deutlich verbessert<sup>89</sup>. Trotz der verlängerten Überlebensrate ist das Multiple Myelom jedoch noch immer nicht heilbar, daher werden alternative Therapien zur Behandlung benötigt. Aufgrund der Bedeutung von Interleukin-6 für Multiple Myelom-Zellen liegt es nahe in den IL-6-Signalweg einzugreifen. Daher werden momentan anti-IL-6- sowie anti-IL-6-Rezeptor-Antikörper in verschiedenen klinischen Studien zur Therapie des Multiplen Myeloms getestet<sup>52</sup>. Diese allein scheinen aber keinen wesentlichen klinischen Erfolg zu haben, sodass die Kombination mit anderen Medikamenten in den Vordergrund rückt. Gleichzeitig wird auch

der Einsatz anderer Behandlungsmöglichkeiten untersucht, wie beispielsweise die Verwendung von zellbasierten Mylomimpfstoffen<sup>90</sup>.

#### 1.2.4 STAT3-regulierte nicht-kodierende RNAs

Die Arbeitsgruppe von Professor Horn untersucht seit Jahren die molekularen Mechanismen, die die schnelle und komplette Apoptose der Interleukin-6-abhängigen humanen Multiplen Myelom-Zelllinie INA-6 als Reaktion auf den Zytokin-Entzug hervorrufen<sup>88</sup>. Sie beschrieben dabei die obligatorische Rolle von STAT3 für das IL-6-vermittelte antiapoptotische Signal in INA-6-Zellen<sup>88</sup>. Zusätzlich wurde die zentrale Bedeutung von STAT3 für die antiapoptotischen als auch die proliferativen Funktionen von Interleukin-6 in XG-1-Zellen, einer weiteren humanen IL-6-abhängigen Multiplen Myelom-Zelllinie, nachgewiesen<sup>88</sup>. Die antiapoptotische Wirkung von STAT3 ließ sich aber in diesen Untersuchungen nicht durch die Induktion antiapoptotischer Proteine erklären<sup>88,91</sup>, daher wurde die Möglichkeit erwogen, dass STAT3 auch teilweise über die Regulation nicht-kodierender RNA wirkt. Zu diesem Zeitpunkt gab es bereits Hinweise, dass miRNAs als Tumorsuppressoren oder Onkogene wirken können<sup>92</sup>. Die Arbeitsgruppe von Professor Horn konnte daraufhin als Erste zeigen, dass STAT3 neben der Transkription Proteinkodierender Gene auch nicht-kodierende RNAs reguliert und dass die Induktion der microRNA-21 in Multiplen Myelom-Zellen einen Hauptanteil zu dem onkogenen und antiapoptotischen Potential von STAT3 beiträgt<sup>93</sup>. Mittlerweile weisen immer mehr Untersuchungen darauf hin, dass miRNAs eng mit dem STAT3-Signalweg assoziiert sind<sup>94</sup>. So wurden regulatorische Rückkopplungsmechanismen zwischen miRNAs und STAT3 beschrieben, die die Karzinogenese auch bei Abwesenheit genetischer Aberrationen initiieren können<sup>95-97</sup>. Neben miR21<sup>93,98-103</sup> wurde auch für miR155<sup>104-107</sup>, mir-23a<sup>108</sup>, mir-24 und mir-629<sup>96</sup>, mir-34a<sup>97</sup>, mir-125b<sup>109</sup>, mir-181b<sup>98</sup>, mir-370<sup>110</sup> und die mir17-Familie<sup>111-113</sup> gezeigt, dass sie in die STAT3-vermittelte Tumorgenese involviert sind. Die Promotoren dieser miRNAs weisen STAT3-Bindungsstellen auf, STAT3 kann ihre Transkription aktivieren und die miRNAs ihre onkogene Wirkung entfalten. Einige miRNAs können die 3'UTR (untranslatierte Region) von STAT3 angreifen und dessen Aktivität regulieren<sup>109,114-123</sup>. Andere miRNAs modulieren SOCS1<sup>124-127</sup>, SOCS3<sup>128-130</sup> oder SOCS5<sup>131,132</sup> sowie PIAS3<sup>133-137</sup>, JAK2<sup>138</sup>, IL-6R<sup>96,97,139</sup> oder IL-6<sup>140,141</sup> und beeinflussen so den IL6/STAT3-Signalweg.

Erst kürzlich wurde die erste lange nicht-kodierende RNA beschrieben, die den STAT3-Signalweg regulieren kann<sup>142</sup>. Lnc-DC wird ausschließlich in dendritischen Zellen exprimiert und beeinflusst die Differenzierung dieser Zellen, indem es im Zytoplasma mit STAT3 interagiert und die Dephosphorylierung von Tyrosin-705 durch bestimmte Phosphatasen verhindert<sup>142</sup>. Für eine weitere lange nicht-kodierende RNA, lncRNA-ABT, wurde gezeigt, dass diese für die Metastasierung hepatozellulärer Karzinome wesentlich ist<sup>36</sup>. Unter

anderem befähigt lncRNA-ABT die metastasierenden Krebszellen zur Kolonisierung, indem es die Interleukin-11 mRNA stabilisiert und somit die autokrine Induktion von IL-11 bewirkt, wodurch der IL-11/STAT3-Signalweg aktiviert wird<sup>36</sup>. Es ist wahrscheinlich, dass weitere lange nicht-kodierende RNAs den IL-6/STAT3-Signalweg modulieren oder durch diesen Signalweg reguliert werden und zu dessen onkogenem Potential beitragen.

## 1.3 T-Zellen

T-Lymphozyten gehören zu den zellulären Bestandteilen des Blutes. Sie werden im Knochenmark gebildet, reifen im Thymus und wandern anschließend als naive T-Zellen durch den Blutkreislauf und das lymphatische System. Naive T-Zellen produzieren keine Zytokine. Erst durch die Aktivierung durch antigenpräsentierende Zellen vermehren sie sich und können zu Effektor-T-Zellen differenzieren. Zusammen mit den B-Lymphozyten stellen die T-Zellen die wesentlichen Elemente der adaptiven Immunabwehr dar. T-Lymphozyten werden in zwei Untergruppen eingeteilt. T-Helferzellen initiieren und leiten die Immunantwort, wohingegen zytotoxische T-Zellen infizierte oder geschädigte Zellen eliminieren. T-Zellen sind nicht nur für die Bekämpfung von Infektionserkrankungen wichtig, sondern spielen auch eine Rolle bei Autoimmunerkrankungen, Entzündungsprozessen und Krebs. Daher ist es wichtig die Mechanismen ihrer Aktivierung und Immunregulation zu verstehen. Nach Aktivierung können T-Helferzellen zu verschiedenen Subtypen von Effektor-T-Zellen (Th1, Th2, Th17 und Treg) differenzieren, die unterschiedliche Zytokine produzieren und verschiedene Immunantworten einleiten. Die Effektor-T-Helferzellendifferenzierung wird durch die Stärke der T-Zell-Rezeptor-Stimulation, die Art des kostimulatorischen Signals und Zytokine, die auf die Zelle wirken, beeinflusst. Die funktionelle Spezialisierung wird dabei durch genetische Programme koordiniert, die verschiedene Transkriptionsfaktoren nutzen, um die Expression unterschiedlicher löslicher Mediatoren und Oberflächenmoleküle zu regulieren, wodurch die Interaktion mit anderen Immunzellen unterstützt wird<sup>143</sup>. Epigenetische Modifikationen bestimmen dabei die Stabilität oder Plastizität der T-Helferzell-Subtypen<sup>143</sup>. Typ1-T-Helferzellen (Th1) sezernieren Interferon- $\gamma$  und sind wesentlich für die Aktivierung von Makrophagen und zytotoxischen T-Zellen. Helferzellen vom Typ2 (Th2) produzieren IL-4, IL-5 sowie IL-13 und fördern die B-Zellaktivierung, wodurch die Bildung von Antikörpern angeregt wird. Th17-Zellen sind mit Entzündungsreaktionen assoziiert und wichtig für die Bekämpfung von extrazellulären Bakterien und Pilzen. Im Gegensatz zu den anderen Subpopulationen supprimieren regulatorische T-Zellen (Treg) die Immunantwort und schützen den Organismus vor den aggressiven Effektormechanismen des Immunsystems. Die Einteilung der T-Zellen wird dadurch erschwert, dass die T-Zell-Subtypen heterogen und plastisch sind. Welche Zytokine

eine T-Zelle produziert und welche Funktionen sie ausübt, kann sich im Laufe ihres Lebenszyklus als Reaktion auf äußere Bedingungen ändern.

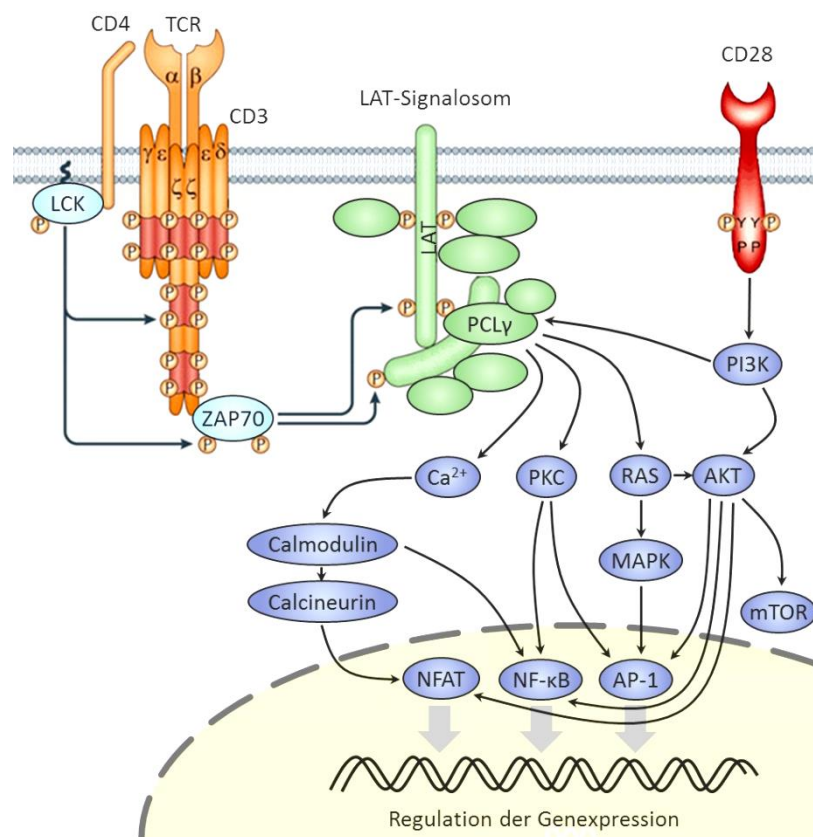
### 1.3.1 T-Zellaktivierung

T-Helferzellen sind die entscheidenden Regulatoren der Immunantwort, daher ist ihre Aktivierung stark reglementiert, um Autoreaktivität zu verhindern<sup>144</sup>. Für die maximale Aktivierung von T-Zellen werden zwei stimulierende Signale von antigenpräsentierenden Zellen benötigt – eines über den antigenspezifischen T-Zell-Rezeptor-Komplex und ein zweites kostimulatorisches Signal. Der T-Zell-Rezeptor-Komplex enthält die  $\alpha$ - und  $\beta$ -Kette, die den T-Zellrezeptor bilden und fremde Peptide, präsentiert auf dem *major histocompatibility complex* (MHC), erkennen können, sowie den CD3-Komplex, der das Signal für die T-Zellaktivierung weiterleitet. Zytotoxische T-Zellen besitzen zudem CD8-Korezeptoren, um MHC I binden zu können, über das die meisten Körperzellen Antigene auf ihrer Zelloberfläche präsentieren. Professionell antigenpräsentierende Zellen exprimieren hingegen MHC II, womit die CD4-Korezeptoren der T-Helferzellen gemeinsam mit dem T-Zell-Rezeptor interagieren können. T-Zellen im Ruhezustand, die nur über den T-Zell-Rezeptor-Komplex stimuliert werden, werden nicht komplett aktiviert und können anergisch oder sogar apoptotisch werden<sup>145</sup>. Nur die simultane Stimulation eines kostimulatorischen Rezeptors ermöglicht eine nachhaltige Aktivierung der naiven T-Zellen, charakterisiert durch die Produktion von Zytokinen, verstärktes Überleben, klonale Expansion und die Differenzierung zu Effektor- und Gedächtnis-T-Zellen<sup>144</sup>. CD28 ist dabei einer der stärksten und am besten charakterisierten kostimulatorischen Rezeptoren<sup>144</sup>.

In Abbildung 1.2 ist der Signalweg der T-Zellaktivierung dargestellt. Fremdes Peptid präsentiert auf einem MHC wird vom T-Zell-Rezeptor und seinem Korezeptor (CD4 oder CD8) erkannt und bewirkt, dass CD3 durch die *lymphocyte-specific protein tyrosine kinase* (LCK), die mit dem Korezeptor assoziiert ist, phosphoryliert wird<sup>146</sup>. Dies ermöglicht die Rekrutierung der Proteintyrosinkinase ZAP-70 an den phosphorylierten T-Zell-Rezeptor-Komplex<sup>146</sup>. Dort wird dann auch ZAP-70 durch die Tyrosinkinase LCK phosphoryliert<sup>146</sup>. Aktiviertes ZAP-70 phosphoryliert dann *linker for activation of T cells* (LAT), welches zahlreiche Signalmoleküle rekrutiert – wie die Phospholipase C $\gamma$  (PLC $\gamma$ ), um einen Multiproteinkomplex, das LAT-Signalosom, zu bilden<sup>146</sup>. Ausgehend davon werden drei Hauptsignalwege initiiert: Der Calcium-, der RAS- und der Proteinkinase C-Signalweg. Durch den Einstrom von Calcium-Ionen aus dem endoplasmatischen Retikulum in das Zytoplasma steigt die intrazelluläre Calciumkonzentration und Calcium-Ionen binden an Calmodulin, was im Gegenzug die Aktivierung von Calcineurin bewirkt und die Induktion von NF- $\kappa$ B (*nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*) vermittelt<sup>147</sup>. Aktiviertes Calcineurin dephosphoryliert NFAT-Proteine (*nuclear factor of activated t cells*), wodurch



die Translokation von NFAT in den Zellkern bewirkt wird<sup>147</sup>. Die Aktivierung der Proteinkinase C (PKC) vermittelt die Induktion von NF-κB sowie die Aktivierung von *activator protein-1* (AP-1)<sup>147</sup>. Der dritte Signalweg führt über die GTPase RAS zur Phosphorylierung von *mitogen activated protein kinase* (MAPK), was letztendlich ebenfalls zur Aktivierung von AP-1 beiträgt<sup>146</sup>. Das T-Zell-Rezeptor-Signal wird durch die Stimulation des CD28-Korezeptor verstärkt. *In vivo* wird dies durch die Bindung von CD28 an seine Liganden CD80 oder CD86, die auf aktivierten antigenpräsentierenden Zellen exprimiert werden, induziert. Dabei wird die Phosphoinositid-3-Kinase (PI3K) an das stimulierte CD28 rekrutiert, was über mehrere Schritte zur Aktivierung von AKT führt<sup>147</sup>. Dies verstärkt die nukleäre Translokation von NF-κB und hemmt den nukleären Export von NFAT<sup>147</sup>. Zusätzlich werden AP-1 und *mechanistic target of rapamycin* (mTor) aktiviert<sup>147</sup>. PI3K fördert darüber



**Abb. 1.2: Signalweg der T-Zellaktivierung.** Durch das Erkennen eines fremden Antigens, präsentiert auf MHC-Molekülen, wird die Signaltransduktion des T-Zellrezeptors (TCR) initiiert. LCK phosphoryliert den T-Zellrezeptor-Komplex sowie ZAP-70. ZAP-70 aktiviert den *linker for activation of T cells* (LAT), wodurch der Zusammenbau des LAT-Signalosoms eingeleitet wird. Die Stimulation von CD28 bewirkt die Aktivierung der Phosphoinositid-3-Kinase (PI3K). Dies führt zur Phosphorylierung von AKT und fördert ebenfalls die Aktivierung des LAT-Signalosoms. Ausgehend davon werden der Calcium-, Proteinkinase C- (PKC) und RAS-Signalweg initiiert. Diese regulieren die Genexpression über die Aktivierung von *nuclear factor of activated t cells* (NFAT), *nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells* (NF-κB) und *activator protein-1* (AP-1). [modifiziert, aus Brownlie et al. 2013<sup>146</sup>]

hinaus ebenfalls die Aktivierung des LAT-Signalsoms<sup>147</sup>. Die über diese Wege aktivierten Transkriptionsfaktoren kooperieren miteinander und induzieren ein definiertes Muster der Genexpression, das die Zellproliferation und das Überleben der Zellen fördert, sowie die Produktion von Zytokinen und die Differenzierung der Zellen induziert. Bei der *in vitro* Aktivierung von T-Zellen mit Antikörpern führt die Stimulation des T-Zell-Rezeptor-Komplexes zusammen mit der CD28-Kostimulation allein auch ohne die Zugabe von Zytokinen zur Produktion von Th1-Zytokinen wie Interleukin-2, Interferon- $\gamma$  und TNF (Tumornekrosefaktor)<sup>148</sup>.

Bereits eine Stunde nach T-Zellaktivierung sind epigenetische Veränderungen an Genloci polarisierender Zytokine (zum Beispiel Interferon- $\gamma$  und Interleukin-4) nachweisbar und beginnen den Effektor-T-Zell-Typ zu bestimmen<sup>149</sup>. Während der primären Stimulation können noch alle polarisierenden Zytokine der verschiedenen T-Helferzell-Subtypen transkribiert werden. Mit Beginn der Zellteilung wird die Differenzierung zu einem Effektortyp eingeleitet und die Expression der entsprechenden polarisierenden Zytokine abhängig von STAT-Proteinen stabilisiert<sup>149</sup>. Bedingt durch das Zytokinmilieu in dem sich die Zelle befindet, werden bestimmte STAT-Proteine aktiviert, die dann die Expression der Subtyp-spezifischen Transkriptionsfaktoren (T-bet, GATA-3, ROR $\gamma$ t und Foxp3) regulieren<sup>149</sup>. Mit steigender Anzahl an Zellteilungen geht die Plastizität der Zellen, und damit die Möglichkeit Zytokine anderer Effektor-T-Helferzellen zu produzieren, immer weiter verloren und der Effektor-Phänotyp wird festgeschrieben<sup>149</sup>. Die Gene der Subtyp-spezifischen Zytokine weisen die H3K4Me3-Histonmodifikationen aktiv transkribierter Bereiche in den entsprechenden T-Zell-Subpopulationen und die hemmende H3K27Me3-Histonmarkierung in den anderen ausdifferenzierten Effektor-T-Helferzelltypen, die dieses Zytokin nicht exprimieren, auf<sup>150</sup>. Demnach wird die Differenzierung der T-Helferzellen durch das Zusammenspiel von Signaltransduktion und Epigenetik ermöglicht.

### **1.3.2 Lange nicht-kodierende RNAs in T-Zellen**

Während der Differenzierung und Aktivierung müssen T-Zellen einen dramatischen Wechsel in ihrem Transkriptionsprogramm durchführen, um schnell wichtige Gene für die Immunabwehr zu exprimieren<sup>151</sup>. Tausende von Genen werden während dieser Prozesse induziert und reprimiert, daher ist ein komplexes Netzwerk koordinierter transkriptioneller und post-transkriptioneller Ereignisse erforderlich<sup>151</sup>. Regulatorische ncRNAs spielen dabei sicherlich eine wichtige Rolle, gerade da sie oft in ganz bestimmten Entwicklungs- und Differenzierungsphasen exprimiert werden und als Antwort auf externe Signale in einer zell- und gewebsspezifischen Weise reguliert werden<sup>21</sup>. Nicht-kodierende RNAs regulieren ebenfalls zusammen mit Proteinen die Plastizität von Effektor-T-Helferzellen, die es den Zellen erlaubt sich dynamisch an ihre Umwelt anzupassen<sup>21</sup>. Es wurde berichtet, dass,

während der Aktivierung von Lymphozyten, mRNAs mit kürzeren 3'UTRs exprimiert werden. Dies wird durch die Nutzung von weiter stromaufwärts gelegenen Polyadenylierungsstellen erreicht. Die Eliminierung der verlängerten 3'UTR in aktivierten Zellen scheint die negative Regulation der Transkripte durch miRNAs zu verhindern und erhöht die Expression des entsprechenden Proteins<sup>152</sup>. Viele Beispiele belegen bereits wie miRNAs die Zellidentität und Differenzierung beeinflussen und lncRNAs, die basierend auf ihrer dreidimensionalen Struktur mit verschiedenen anderen Molekülen interagieren können, scheinen aufgrund ihrer vielfältigen Funktionsweisen ein noch größeres Regulationspotential zu besitzen<sup>21</sup>. Es ist offensichtlich, dass die ncRNA-Funktionen selbst durch die Interaktionen mit anderen RNAs und Proteinen moduliert werden und dass die Aufklärung dieses komplexen Zusammenspiels neue Hinweise liefern könnte, wie die Zellidentität aufrechterhalten und die Plastizität der Zellen reguliert wird<sup>21</sup>.

Die Wichtigkeit langer nicht-kodierender RNAs für Immunzellen wurde mittlerweile bereits für einige Beispiele belegt. Basierend auf genomweiten Studien wurden zahlreiche lncRNAs identifiziert, die in humanen und murinen zytotoxischen T-Zellen exprimiert werden<sup>153</sup>. Des Weiteren wurden in der Arbeit von Pang *et al.* 106 lncRNAs detektiert, die während der Differenzierung und Aktivierung muriner zytotoxischer T-Zellen dynamisch reguliert werden<sup>153</sup>. Eine weitere Studie analysierte die Expression und Regulation von langen intergenischen ncRNAs während der Entwicklung und Differenzierung von T-Helferzellen in Mäusen<sup>154</sup>. Hier konnten 1524 genomische Regionen identifiziert werden, die lange intergenische ncRNAs kodieren, die in den verschiedenen analysierten T-Zellsubpopulationen exprimiert wurden<sup>154</sup>. Nur ein Viertel dieser lincRNA-Cluster beinhaltet bereits annotierte nicht-kodierende Gene<sup>154</sup>. Die übrigen Transkripte waren bis zu diesem Zeitpunkt unbekannt. Die Expression der identifizierten lincRNAs war sehr spezifisch für bestimmte Subpopulationen und Phasen der T-Zelldifferenzierung<sup>154</sup>. Diese und andere Studien zeigen, dass lange nicht-kodierende RNAs in verschiedenen immunologischen Kontexten exprimiert und reguliert werden. Ihre molekulare Funktionen sind allerdings weitestgehend unerforscht<sup>151</sup>. Zu den wenigen bis dato untersuchten langen nicht-kodierenden RNAs gehört TMEVPG1 (*Theiler's murine encephalomyelitis virus persistence candidate gene 1*), das in Lymphozyten des peripheren Blutes detektiert wurde und an der Immunantwort gegen TMEV-Infektionen in Mäusen beteiligt ist<sup>155</sup>. TMEVPG1 ist beim Menschen 150 Kilobasen stromabwärts von Interferon- $\gamma$  lokalisiert und wird in die entgegengesetzte Richtung transkribiert. Es wird mittlerweile auch als *nettoie Salmonella pas Theiler's* (NeST) oder Interferon- $\gamma$  antisense RNA 1 (INFG-AS1) bezeichnet und beeinflusst in Mäusen die Expression von Interferon- $\gamma$  in Th1-Zellen<sup>156</sup>. In murinen zytotoxischen T-Zellen fördert TMEVPG1 die H3K4Me3-Histonmethylierung des IFNG-Locus und somit die Expression von Interferon- $\gamma$ <sup>157</sup>. Des Weiteren wurde für *growth arrest specific transcript 5* (GAS5) gezeigt, dass es den Wachstumsstopp in humanen T-Zellen kontrolliert<sup>158</sup>. Es wird beim Mangel von Wachstumsfaktoren<sup>158</sup> und als Reaktion auf die

Gabe von mTOR-Antagonisten<sup>159</sup> induziert. GAS5 kodiert einige snoRNAs in seinen Introns. Zusätzlich weist die GAS5-mRNA eine ungewöhnliche Faltung auf, wodurch es als Falle für Glucocorticoid-Rezeptoren wirkt, diese von den Glucocorticoid-Response-Elementen der DNA fernhält und somit deren Regulation der Transkription inhibiert<sup>160</sup>. Eine weitere interessante lncRNA ist *noncoding repressor of NFAT* (NRON), das den nukleären Transport und somit die transkriptionelle Aktivität von NFAT reguliert<sup>161,162</sup>. Schließlich wurde noch die in Mäusen Th2-spezifische nicht-kodierende RNA, lincR-Ccr2-5' AS, beschrieben, welche die Expression der benachbarten Chemokinrezeptoren (Ccr2 und Ccr3) und somit die Migration der Th2-Zellen zur Lunge reguliert<sup>154</sup>. LincR-Ccr2-5' AS hat zudem zusätzlich Einfluss auf die globale Genexpression<sup>154</sup>.

Diese ersten Hinweise für die Bedeutung regulatorischer langer nicht-kodierender RNAs für die Entwicklung, Differenzierung und Funktion von T-Zellen, lassen vermuten, dass lncRNAs entscheidend bei der Regulation der komplexen transkriptionellen und posttranskriptionellen Ereignisse mitwirken. Weitere Forschung auf diesem Gebiet wird zu einem besseren Verständnis der molekularen Abläufe beitragen und mit Sicherheit zur Identifizierung neuer diagnostischer und therapeutischer Ziele für immunvermittelte Erkrankungen führen. Aufgrund der sehr Spezies-spezifischen Expression und Funktion von langen nicht-kodierenden RNAs ist es ratsam diese Untersuchungen in humanen Zellen durchzuführen, da sich die Übertragbarkeit der Ergebnisse aus murinen Systemen auf die Verhältnisse beim Menschen als problematisch erweist. Gerade die Aktivierung und Differenzierung von Lymphozyten ist Dank der Verfügbarkeit von primären humanen Zellen besonders geeignet. In einem ersten Schritt liegt es nahe, die Expression langer nicht-kodierender RNAs in verschiedenen humanen T-Zellsubpopulationen oder die Regulation von lncRNAs bei bestimmten immunologischen Prozessen zu untersuchen.

## 1.4 Zielstellung

Die Regulation nicht-kodierender RNAs ist ungeheuer komplex und noch kaum verstanden. Im Hinblick auf die Expression nicht-kodierender RNAs ist jeder Zelltyp in einem bestimmten Zustand eine Welt für sich allein<sup>21</sup>. Um sich der globalen Architektur der Kreisläufe nicht-kodierender RNAs anzunähern, sollte die Regulation nicht-kodierender RNAs in verschiedenen Zellen und unter verschiedenen Bedingungen analysiert werden. Die Untersuchung immunologisch relevanter nicht-kodierender RNAs birgt das Potential neue diagnostische und therapeutische Ziele für maligne und immunvermittelte Erkrankungen zu identifizieren.

In dieser Arbeit werden die Veränderungen des Transkriptoms Multipler Myelom-Zellen in Abhängigkeit von der Interleukin-6-Stimulation mit Hilfe genomweiter Tiling Arrays untersucht. Dabei ist es das Ziel, neue IL-6-regulierte lange nicht-kodierende RNAs zu finden, die potentiell eine Rolle im Immunsystem und/oder der Tumorgenese spielen. Neben dem Nachweis der IL-6-abhängigen Regulation sollen einzelne ausgewählte Transkripte durch die Analyse annotierter genomischer Merkmale näher charakterisiert werden. Zudem soll ihre Expression in verschiedenen Krebszelllinien, sowie in normalen humanen Geweben und in Gewebeproben des Multiplen Myeloms untersucht werden. Diese Daten werden neue Eindrücke in die Regulation langer nicht-kodierender RNAs durch das immunmodulierende, proliferative und antiapoptotische Zytokin Interleukin-6 liefern und einen Eindruck über das Potential der IL-6-regulierten Transkripte als Tumormarker vermitteln.

Um weitere Hinweise über funktionell relevante lange nicht-kodierende RNAs des Immunsystems zu erhalten, wird die Regulation von ncRNAs während der Aktivierung von T-Helferzellen analysiert. Es sollen *ex vivo* gereinigte, primäre, humane T-Helferzellen verwendet werden. Die naiven T-Zellen sollen *in vitro* aktiviert werden, wobei die meisten Charakteristika des *in vivo* Ereignisses rekapituliert werden. Die Intention besteht darin, neue lange nicht-kodierende RNAs zu identifizieren und genauer zu charakterisieren, die potentiell an der Aktivierung und Differenzierung von T-Helferzellen beteiligt sind und die Immunantwort regulieren. Die Ergebnisse sollen dazu beitragen, die molekularen Kreisläufe und Interaktionen im Verlauf dieses Prozesses etwas besser zu verstehen.

Ein weiterer Bestandteil dieser Arbeit umfasst die funktionelle Untersuchung einer ausgewählten langen nicht-kodierenden RNA. Die Regulation der putativ immunrelevanten ncRNA soll in verschiedenen Zellsystemen untersucht und ihre intrazelluläre Lokalisation analysiert werden. Zusätzlich soll das betreffende Transkript in Zellen überexprimiert und ausgeschaltet werden. Um eventuelle Rückschlüsse über dessen Funktion ziehen zu können, werden mögliche Effekte auf die Zellen beobachtet und potentielle Auswirkungen auf die Expression von Zielgenen analysiert werden. Das Ziel dieser Untersuchungen ist es, soweit möglich, einen Eindruck der Bedeutung und Funktionsweise der ausgewählten langen ncRNA zu vermitteln und zu einem besseren Verständnis nicht-kodierender RNAs beizutragen.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Bioinformatische Methoden

#### 2.1.1 Evaluierung von Tiling Array-Daten

Tiling Array Studien wurden zur Untersuchung der RNA-Expression in INA-6-Zellen in Abhängigkeit von der IL-6-Stimulation und während der Aktivierung primärer T-Helferzellen durchgeführt. Verwendet wurde das aus 14 Chips bestehende Human Whole Genome Tiling Array Set 1.0 von Affymetrix. Diese Arrays zeichnen sich dadurch aus, dass die Sonden über alle nicht-repetitiven Bereiche des menschlichen Genoms verteilt sind. Dies erlaubt neben der Analyse bekannter Gene auch die Identifizierung unbekannter, regulierter Gene wie beispielsweise die nicht-kodierender RNAs. Die Sonden sind so angeordnet, dass eine Transkriptanalyse mit einer Auflösung von durchschnittlich 35 Basenpaaren möglich ist.

Für die Identifizierung IL-6-regulierter Transkripte wurden die RNA von 13 Stunden ohne IL-6 kultivierten, für eine Stunde restimulierten und permanent in der Anwesenheit von IL-6 gewachsenen INA-Zellen verwendet (siehe 2.3.2.1). Zur Analyse des Transkriptoms während der T-Zellaktivierung wurden die RNA primärer Effektor-T-Helferzellen und naiver CD<sup>+</sup> T-Zellen verwendet sowie die naiver T-Helferzellen nach 2-, 24- und 72-stündiger *in vitro* Aktivierung (Details zur T-Zellisolation 2.3.1 und -aktivierung 2.3.2.3). Pro Chip wurden 10 µg RNA eingesetzt. Die Fluoreszenzmarkierung und Hybridisierung der Proben sowie das Auslesen der Fluoreszenzsignale und eine bioinformatische Aufarbeitung der Daten wurde von der RNomics Arbeitsgruppe des Fraunhofer Instituts für Immunologie und Zelltherapie durchgeführt. Es wurde ein statistischer Ansatz gewählt, der Expressionssignale vom Hintergrundrauschen differenziert und dabei den allgemeinen Fehler der Tiling Arrays berücksichtigt<sup>1</sup>. Die normalisierten Expressionsdaten der IL-6-Arrays wurden anfangs im Integrated Genome Browser von Affimatrix ([http://www.affymetrix.com/partners\\_programs/programs/developer/tools/download\\_igb.affx](http://www.affymetrix.com/partners_programs/programs/developer/tools/download_igb.affx)) dargestellt und lange, differenziell exprimierte genomische Bereiche manuell von Professor Horn herausgesucht. Um differentiell exprimierte Bereiche zwischen zwei zellulären Zuständen herauszufiltern, wurde eine Intervallanalyse durchgeführt<sup>163</sup>. Ein genomischer Bereich wurde als differentiell exprimiert markiert, wenn mehrere hintereinanderliegende Sonden stark und signifikant differentiell exprimiert wurden. Unter Verwendung der hg18-Version des humanen Genoms (Stand März 2006) wurden einem Intervall chromosomale Koordinaten zugewiesen. Die Intervalle wurden zur Visualisierung von Dr. Kristin Reiche (AG RNomics) in

bigBed-Dateien umgeschrieben und zusammen mit den normalisierten Expressionsdaten im UCSC Genome Browser (<http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgGateway>) dargestellt.

## 2.1.2 Evaluierung von Hochdurchsatz-Sequenzierungen

Ein weiteres Verfahren, das zur Bestimmung der genomweiten Genexpression in T-Helferzellen während der T-Zellaktivierung angewandt wurde, ist die Hochdurchsatz-Sequenzierung. Die Ergebnisse der Hochdurchsatz-Sequenzierung geben im Vergleich zu den Tiling Array-Daten Aufschluss darüber, welcher DNA-Strang transkribiert wurde und zeigen ein genaueres Bild der Spleißereignisse. Es wurden RNA-Proben von Effektor- und naiven T-Helferzellen sowie die zwei, 24 oder 72 Stunden aktivierter T-Zellen von jeweils drei verschiedenen Spendern verwendet. Die Vorbereitung der Sequenzierproben, der Sequenzierlauf und die Aufarbeitung der Sequenzdaten wurden von der Bioinformatics & Transcriptomics Arbeitsgruppe des Umweltforschungszentrums durchgeführt. In einem ersten Schritt wurde die ribosomale RNA aus den RNA-Proben unter Verwendung des Ribo-Zero Kit (Epicentre) entsprechend des Herstellerprotokolls entfernt. Anschließend wurde mit Hilfe des ScripSeq Kit (Epicentre) nach Angaben des Herstellers eine Strang-spezifische cDNA-Bibliothek generiert. Die Sequenzierung erfolgte mit dem v3 Cluster Generation und SBS Sequencing Kits (Illumina) an einem HiSeq2000-Gerät (Illumina). Die Sequenzierdaten wurden auf die hg19-Version des menschlichen Genoms (Stand Februar 2009) gemappt. Die Anzahl der Reads für die Transkripte wurde mit Hilfe von htseqcount (<http://www-huber.embl.de/users/anderes/HTSeq/doc/index.html>) und der gencode v14-Annotation bestimmt. Die differentielle Expression wurde mit R und dem deseq2-Paket von Bioconductor abgeschätzt. Anschließend wurden die Tabellen differentiell exprimierter Gene in Excel (Microsoft) weiter ausgewertet.

## 2.1.3 Auswertung von Mikroarray-Daten

Um die Genexpression in XG-1-Zellen nach dem Stilllegen der ncRNA152 zu analysieren, wurden Human Gene Expression Microarrays (SurePrint G3 8x60K v2, Agilent Technologies) verwendet. Auf diesem DNA-Mikroarray sind Oligonukleotide (60 Nukleotide lang) aufgebracht, die 28000 bekannte mRNA- und 7400 lincRNA-Gene des menschlichen Genoms repräsentieren. Es wurden zwei verschiedene siRNA-Oligonukleotide gegen die ncRNA152 verwendet, eins gegen das erste und ein weiteres gegen das zweite Exon, um *Off-target*-Effekte, bei denen Gene ähnlicher Sequenz unbeabsichtigt reprimiert werden, auszuschließen. Als negative Kontrolle diente die medium si negative control (Life Technologies) zusätzlich wurde siSTAT3 als positive Kontrolle verwendet. Die Zellen wurden mit siRNA-Oligonukleotiden transfiziert und deren RNA nach 24 Stunden isoliert (siehe 2.2.2). Die Qualität der präparierten RNA wurde mit Hilfe des Bioanalyzer 2100 (Agilent

Technologies) untersucht und die Repression der Zielgene nach reverser Transkription (siehe 2.2.1) mittels quantitativer *real-time* PCR (siehe 2.2.4) kontrolliert. Das Herstellen markierter cDNA, die Hybridisierung sowie das Scannen der Mikroarrays erfolgte in der RNomics Arbeitsgruppe am Fraunhofer Institut für Zelltherapie und Immunologie. Die Mikroarray-Untersuchungen wurden für drei unabhängige Experimente durchgeführt.

Zur Auswertung der Daten wurde die GeneSpring GX Software (Agilent Technologies) verwendet. Als differenziell exprimierte Gene wurden nur solche bezeichnet, die in einem ungepaarten T-Test (jeweils ncRNA152-siRNA gegen negativ Kontrolle, alle drei Replikate) durch die Software als signifikant ( $p$ -Wert  $< 0,01$ ) verändert beurteilt wurden. Zusätzlich wurden die Kriterien eingeführt, dass die RNA deutlich exprimiert sein soll (*raw*-Wert größer als 100) und die Änderung mindestens 1,5-fach betragen muss.

## 2.1.4 DNA-Sequenzanalysen

Zur genaueren Charakterisierung genomischer Bereiche wurden neben den bigBed-Dateien und normalisierten Expressionsdaten der Tiling Arrays (siehe 2.1.1) zusätzlich die im UCSC Genome Browser (<http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgGateway>) verfügbaren Daten bekannter Gene, mRNAs, ESTs (*Expressed Sequence Tags*), Histonmodifizierungen, Konservierung und Chip-seq-Daten von Transkriptionsfaktoren im Browser angezeigt.

Sequenzalignments wurden mit GENTle V1.9.4 durchgeführt. Mögliche Protein-kodierenden Sequenzen wurden mit dem ORF Finder ([http://www.geneinfinity.org/sms/sms\\_orffinder.html](http://www.geneinfinity.org/sms/sms_orffinder.html)) in allen drei möglichen Leserastern analysiert. Dabei sollte das Startcodon ATG sein und das kodierte Peptid mindestens eine Länge von 15 Aminosäuren besitzen.

### Identifizierung von Transkriptionsfaktor-Bindungsstellen

Mögliche Transkriptionsfaktor-Bindungsstellen wurden mit MATCH™ 1.0 public (<http://www.gene-regulation.com/cgi-bin/pub/programs/match/bin/match.cgi>) bestimmt, welches die Sammlung von Positions-Gewichts-Matrizen der TRANSFAC® Public 6.0 Datenbank nutzt. Die Parameter wurden so angepasst, dass nur hochwertige humane Matrizen verwendet wurden. Um die falsch positiven und falsch negativen Fehlerraten zu reduzieren, wurde festgelegt, dass die Matrixähnlichkeit über 85 Prozent und die Übereinstimmung mit der Kernsequenz bei über 90 Prozent liegen soll.



## 2.1.5 Design von Oligonukleotiden

### PCR-Primer

Geeignete PCR-Primer wurden mit Hilfe der kostenlosen Primer3Plus-Software (<http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi>) ausgewählt. Die zu amplifizierende Sequenz wurde in das Programm eingeladen und folgende Einstellparameter gewählt. Die Länge der Primer sollte  $20 \pm 2$  Nukleotide betragen und die Schmelztemperatur bei  $60 \pm 3^\circ\text{C}$  liegen. Die Oligonukleotide sollten des Weiteren einen GC-Gehalt von  $50 \pm 10\%$  aufweisen. Als zusätzliches Kriterium für die Primer wurde festgelegt, dass das 3'-Ende mit Guanin oder Cytosin abschließt. Für den Einsatz in der *real-time* PCR wurde eine PCR-Produktgröße von  $300 \pm 100$  Nukleotiden gewählt. Die von der Software vorgeschlagenen Primer wurden im UCSC Genome Browser (<http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgGateway>) mit dem Hilfsprogramm BLAT im menschlichen Genom gesucht und sollten nur in der ausgewählten Zielsequenz gefunden werden. Des Weiteren wurden beide Primer auch noch zur Kontrolle in das Hilfsprogramm In-Silico PCR des UCSC Genome Browsers eingegeben und überprüft, ob das gewünschte PCR-Produkt und keine weiteren Nebenprodukte generiert werden.

Für Klonierungen wurden teilweise zusätzliche Nukleotide manuell an die Primer-Enden angefügt, um Restriktionsschnittstellen für den Einbau in Vektoren zu generieren. Neben der Restriktionsschnittstelle wurden am 5'-Ende des Primers noch drei weitere Nukleotide (Desoxythymidin) eingebaut, damit die Restriktionsenzyme das spätere PCR-Produkt auch schneiden können.

Alle Primer wurden als unmodifizierte DNA-Oligonukleotide im HPSF-Reinheitsstandard (*high purity salt free*) bei Eurofins MWG Operon bestellt.

### TaqMan-Primer und Hydrolyse-Sonde

Die Auswahl geeigneter Kombinationen von Hydrolyse-Sonde und Gen-spezifischen Primerpaar erfolgte mit dem Universal Probe Library Assay Design Center (<http://www.universalprobedesign.com>). Die Primer wurden zur Kontrolle gegen das menschliche Genom geblastet. Waren die Sequenzen des Primerpaares einmalig im Genom, so wurde das generierte PCR-Produkt noch mit dem Hilfsprogramm In-Silico PCR des UCSC Genome Browsers überprüft. Die Primer wurden als unmodifizierte DNA-Oligonukleotide im HPSF-Reinheitsgrad von Eurofins MWG Operon bezogen.

## siRNA

Der BLOCK-iT™ RNAi Designer (<http://rnaidesigner.invitrogen.com/rnaiexpress/>) wurde verwendet, um siRNA-Oligonukleotide auszuwählen. Die Sequenz der Ziel-RNA wurde in das Programm eingeladen und der GC-Gehalt der siRNA auf 35 - 55% festgelegt. Die von der Software vorgeschlagenen 21-nukleotidelangen siRNA-Sequenzen wurden mit dem Hilfsprogramm BLAT des UCSC Genome Browsers im menschlichen Genom gesucht und sollten nur in der ausgewählten Zielsequenz gefunden werden. Die gewünschte siRNA wurde von Life Technologies als Stealth RNAi™ siRNA bezogen. Dies sind modifizierte doppelsträngige RNA-Oligonukleotide, die durch gesteigerte Spezifität und Stabilität zu effektiveren Knockdown-Ergebnissen beitragen.

### 2.1.6 Statistische Auswertung

Die Berechnung des arithmetischen Mittels ( $\bar{x}$ ) von  $n$  Werten wurde in Microsoft Excel mit der Funktion MITTELWERT durchgeführt. Folgende Formel wurde dabei angewandt:

$$\bar{x} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n x_i$$

Zur Berechnung der Standardabweichung wurde die Funktion STABW von Microsoft Excel verwendet. Dieser Funktion liegt folgende Formel zugrunde:

$$s = \sqrt{\frac{1}{n-1} \sum_{i=1}^n (\bar{x} - x_i)^2}$$

Zur statistischen Auswertung wurde der Zweistichproben-t-Test für gepaarte Stichproben verwendet. Die Ermittlung des Signifikanzgrades erfolgte nach folgenden Gesichtspunkten:

$$p \leq 0,05 (*)$$

$$p \leq 0,01 (**)$$

$$p \leq 0,0001 (***)$$

## 2.2 Molekularbiologische Methoden

### 2.2.1 Zellfraktionierung

Zur Separation von zytoplasmatischen und nukleären Zellbestandteilen wurde nach dem Zusatzprotokoll von QIAGEN (*Purifikation of cytoplasmic RNA from animal cells*) verfahren.  $10^7$  permanent mit IL-6 kultivierte INA-6-Zellen wurden geerntet (300 x g, 5 min) und der Überstand entfernt. Durch Zugabe von 175 µl gekühlten RLN-Puffer und 5-minütige Inkubation auf Eis wurde die Plasmamembran lysiert. Das Lysat wurde zentrifugiert (300 x g, 2 min, 4°C), der Überstand mit dem zytoplasmatischen Extrakt in ein neues Reaktionsgefäß überführt und die RNA isoliert (siehe 2.2.2). In einem separaten Ansatz wurde die nukleäre RNA aus dem restlichen Zellpellet extrahiert (siehe 2.2.2). Die RNA-Mengen bestimmter Zieltranskripte in den Zellfraktionen wurde nach reverser Transkription (siehe 2.2.3) mittels *real-time* PCR bestimmt (siehe 2.2.4). Um die Qualität der Trennung zu beurteilen, wurde in beiden Fraktionen das Verhältnis nukleärer RNAs (U6 und MALAT1) zu zytoplasmatischen mRNAs (GAPDH und STAT3) gebildet und analysiert.

---

RLN-Puffer	50mM Tris-Cl, 140mM NaCl, 1,5mM MgCl <sub>2</sub> , 0,5% (v/v) IGEPAL frisch dazu 1000U/ml RNase-Inhibitor, 1mM DTT
------------	--

---

### 2.2.2 Isolation von RNA

Die Präparation von Gesamt-RNA erfolgte mit TRIzol® Reagent (Life Technologies) wie im Protokoll des Herstellers angegeben. Die einzelnen Arbeitsschritte wurden unter einem Abzug durchgeführt. Beim Arbeiten mit RNA wurden stets RNase-freie Filterspitzen verwendet.

Kulturmedium und zelluläre Rückstände wurden durch einmaliges Waschen der Zellen (Zentrifugation: 300 x g, 5 min) mit kaltem PBS entfernt. Für die Lyse von  $5-10 \times 10^6$  Zellen wurde diese in 1 ml TRIzol® Reagent resuspendiert und 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Adhärente Zellen wurden direkt in den Kulturschalen lysiert und anschließend in Reaktionsgefäße überführt. Bei Bedarf wurden die Zelllysate bei -80°C gelagert. Die lysierten Proben wurden mit 200 µl Chloroform versetzt, für 15 Sekunden stark geschüttelt und 3 Minuten bei Raumtemperatur stehen gelassen. Die anschließende Zentrifugation (12000 x g, 15 min, 4°C) führt zu einer Phasentrennung. Es bilden sich eine obere wässrige Phase, welche die RNA enthält, eine DNA-enhaltende Interphase und eine untere

organische Phase, in der sich Proteine befinden. Die wässrige Phase wurde mit 500 µl Isopropanol versetzt, um die RNA zu fällen. Nach 10-minütiger Inkubation wurde das RNA-Präzipitat durch Zentrifugation (12000 x g, 20 min, 4 °C) pelletiert und mit 75%igem Ethanol gewaschen (Zentrifugation: 7500 x g, 5 min, 4 °C). Der Überstand wurde möglichst rückstandslos entnommen und das Pellet 10 Minuten luftgetrocknet. Die RNA wurde anschließend in Nuklease-freiem Wasser (20-50 µl) resuspendiert und bei -80 °C gelagert.

RNA, die aus primären Zellen gewonnen wurde, wurde zusätzlich mit dem Turbo DNA-*free*™ Kit (Life Technologies) behandelt. Dieser Schritt war nötig, um die DNA-Kontaminationen dieser Proben zu verringern. Bei diesem Vorgang werden DNA-Reste durch DNase abgebaut und das Enzym in einem weiteren Schritt wieder entfernt, um Wechselwirkungen in späteren Experimenten zu verhindern.

Die RNA-Konzentration wurde am NanoPhotometer™ (Implen GmbH) bei einer Wellenlänge von 260 nm bestimmt. Eine optische Dichte von 1 entspricht dabei 40 µg/ml einzelsträngiger RNA. Die Qualität der isolierten RNA wurde bei Bedarf zusätzlich mittels Kapillarelektrophorese unter Verwendung des RNA 6000 Nano Assay Kits (Agilent Technologies) im Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies) kontrolliert.

### 2.2.3 Reverse Transkription

Die reverse Transkription bezeichnet das Umschreiben von RNA in komplementäre DNA (cDNA) mit Hilfe einer RNA-abhängigen DNA-Polymerase. Für die Synthese von cDNA wurde das RevertAid™ First Strand cDNA Synthese Kit (Fermentas) nach Herstellerangaben verwendet. 1 µg RNA wurde mit zufällig zusammengesetzten Hexamer-Oligonukleotiden gemischt und für 5 Minuten auf 65 °C erhitzt, um Sekundärstrukturen der RNA aufzuschmelzen. Bei Bedarf wurden auch genspezifische Primer verwendet. Während des langsamen Abkühlens der Proben binden die Primer an komplementäre Bereiche der RNA. Nach der Zugabe von Desoxyribonukleosidtriphosphaten (dNTPs), Ribonuklease-Inhibitor und reverser Transkriptase, erfolgte das Umschreiben 1 Stunde lang bei 42 °C. Die Enzyme wurden im Anschluss 5 Minuten bei 70 °C inaktiviert, um zu verhindern, dass deren Aktivität nachfolgende Reaktionen beeinflusst.

Für Untersuchungen zur Orientierung von ncRNA-Genen wurde das AffinityScript™ Multiple Temperature cDNA Synthesis Kit (Agilent Technologie) verwendet, da Voruntersuchungen gezeigt haben, dass bei diesem weniger unspezifisches Umschreiben stattfindet. Sense- und Antisense-Primer wurden für die cDNA-Synthese in getrennten Reaktionen eingesetzt. Die Auswertung erfolgte dann durch *real-time* PCR mit den spezifischen Sense- und Antisense-Primern.

## 2.2.4 Quantitative *real-time* PCR

### **Real-time PCR mit SYBR Green**

Die Quantifizierung der Genexpression erfolgte mittels *real-time* PCR im LightCycler® (Roche Applied Science). Es wurde das LightCycler® FastStart DNA Master<sup>PLUS</sup> SYBR GreenI Kit (Roche Applied Science) verwendet und nach Herstellerangaben verfahren. Die verwendeten Gen-spezifischen Primerpaare sind unter 2.2.5.1 angegeben. Für die quantitative *real-time* PCR mit SYBR GreenI wurde folgendes Standardprogramm verwendet:

Initiale Denaturierung		10min	95°C
42 Amplifikationszyklen		15s	95°C
		10s	55°C
		15s	72°C

Bei der Amplifikation der cDNA mit Gen-spezifischen Primern entstehen doppelsträngige PCR-Produkte, in die sich der Fluoreszenzfarbstoff (SYBR GreenI) einlagert. Das daraufhin emittierte Licht kann nach jedem Zyklus gemessen werden und ist direkt proportional zur Menge an gebildetem PCR-Produkt. Die Amplifikation des PCR-Produktes kann somit über die Fluoreszenzintensität in Echtzeit nachverfolgt werden. Aufgrund der unspezifischen Bindung von SYBR GreenI an doppelsträngige DNA würden auch amplifizierte Nebenprodukte mit gemessen werden. Um dies auszuschließen, wurde nach der PCR eine Schmelzkurve aufgenommen, die den spezifischen Schmelzpunkt des gewünschten Produktes und eventueller Nebenprodukte zeigt.

---

### SYBR Green PCR-Primer:

JUNB_for	5'- ccc cat caa cat gga aga cca aga g -3'
JUNB_rev	5'- caa gca gca gct gac agc cgt tgc -3'
ncRNA152_for	5'- cgt gcc tgt ctt cag atc ttc -3'
ncRNA152_rev	5'- ggg aat ctt tca gct gca tt -3'
ncRNA152_450_for	5'- gaa tga agg ctg aga caa gc -3'
ncRNA152_450_rev	5'- ggg gat gag tcg tga ttt tc -3'
ncRNA152_560_for	5'- ggg aat gga ggg aaa taa atg -3'
ncRNA152_560_rev	5'- ggg gat gag tcg tga ttt tc -3'
PIM1_for	5'- cca gca aat agc agc ctt tc -3'
PIM1_rev	5'- gtc cta tcc cat ccc aac ct -3'
SOCS3_for	5'- aag ctg gtg tac cac tac atg c -3'
SOCS3_rev	5'- agc tgg gtg act ttc tca tag g -3'
STAIR18_2_for	5'- gga aca ctc tga aaa aca cca a -3'

STAIR18_2_rev	5'- tga gaa tac ata tgt gtg caa gga -3'
STAIR18_3_for	5'- gcc aaa aac cag aca aag ga -3'
STAIR18_3_rev	5'- act acg ccc ggc taa ttt tt -3'
STAT3_for	5'- ctg gcc ttt ggt gtt gaa at -3'
STAT3_rev	5'- aag gca ccc aca gaa aca ac -3'
U6_for	5'- ctc gct tcg gca gca ca -3'
U6_rev	5'- aac gct tca cga att tgc gt -3'

---

### **Real-time PCR mit Hydrolyse-Sonde**

Eine weitere Variante der *real-time* PCR ist die Amplifikation von cDNA-Fragmenten mit spezifischen Primern und einer Hydrolyse-Sonde. Hierfür wurde der LightCycler® TaqMan® Master Kit (Roche Applied Science) entsprechend der Angaben des Herstellers verwendet. Es wurden Hydrolyse-Sonden der Universal Probe Library (Roche Applied Science) benutzt, die 8-9 Nukleotide lang sind. In die kurzen Sonden sind *locked nucleic acids* (LNA) eingebaut, um Spezifität und Schmelztemperatur der kurzen Sonden zu erhöhen. Die quantitative *real-time* PCR mit Hydrolyse-Sonden wurde im LightCycler® (Roche Applied Science) bei folgendem Programm durchgeführt:

Initiale Denaturierung		10min	95°C
45 Amplifikationszyklen		10s	95°C
		30s	55°C
		1s	72°C

Die Hydrolyse-Sonden sind am 5'-Ende mit Fluoreszein sowie am 3'-Ende mit einem Quencher-Molekül markiert, das die Fluoreszenz des Fluoreszeins unterdrückt. Nach Hybridisierung der Sonde an komplementäre cDNA kann diese durch die 5'→3'-Exonukleaseaktivität der *Taq*-DNA-Polymerase abgebaut werden. Dabei werden Quencher und Fluorophor voneinander separiert und der Reporter fluoresziert. Die Fluoreszenzintensität steigt proportional zur Menge des spezifischen PCR-Produktes und wird vom LightCycler® detektiert. Die Spezifität dieser Untersuchung wird durch die Kombination von Primerpaar und Sonde gewährleistet.

---

TaqMan-Primer (#XX entspricht Nummer der verwendeten Hydrolyse-Sonde):

GAPDH #60_for	5'- agc cac atc gct cag aca c -3'
GAPDH #60_rev	5'- gcc caa tac gac caa atc c -3'
STAIR1 #37_for	5'- cat gtg ctt gct gtg ttc aa -3'
STAIR1 #37_rev	5'- tat ttc tcc tgc cca tag cc -3'

STAIR2 #68_for	5'- ttc cac ctt cct ctt ctg aca -3'
STAIR2 #68_rev	5'- cct ata agt gca gtt cag ggt ca -3'
STAIR3 #16_for	5'- caa act tag gtc aga aaa aga gca -3'
STAIR3 #16_rev	5'- aca cac ata cat ccc ctc tga a -3'
STAIR6 #81_for	5'- tca ctg gta caa agg aca gag c -3'
STAIR6 #81_rev	5'- gaa ggg ttt gtt ggg gaa tta -3'
STAIR15 #68_for	5'- agc ctt ctc ccc ttc aga at -3'
STAIR15 #68_rev	5'- cgt gtc tgc ttc cca tac ct -3'
STAIR18 #60_for	5'- gga aca ctc tga aaa aca cca a -3'
STAIR18 #60_rev	5'- tag gaa tac ata tgt gtg caa gga -3'

---

## Auswertung

Der Amplifikationszyklus (Ct), in dem die Fluoreszenz der Probe einen festgelegten Schwellenwert signifikant überschreitet, wurde jeweils automatisch mit der LightCycler® Software Version 3.5 (Roche Applied Science) bestimmt. Die weitere Auswertung wurde mit Microsoft Excel 2010 durchgeführt. Die relative Quantifizierung des RNA-Levels eines Transkriptes erfolgte durch die Normierung mit dem RNA-Gehalt der Haushaltsgene Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) oder der U6 snRNA (einer kleinen nicht-kodierende nukleäre RNA des Spliceosoms) der gleichen Probe ( $\Delta Ct = Ct_{\text{Zielgen}} - Ct_{\text{Haushaltsgen}}$ ). Nach Festlegung einer Referenzprobe (z.B. unstimulierte oder unbehandelte Kontrolle) wurde der relative Unterschied der Genexpression einer Probe zu dieser Referenz über die Formel  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  berechnet ( $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{\text{Probe}} - \Delta Ct_{\text{Referenz}}$ ).

## 2.2.5 Klonierung

### 2.2.5.1 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) ist eine Methode zur exponentiellen Vervielfältigung eines spezifischen DNA-Abschnittes. Ausgehend von zwei Oligonukleotidsequenzen (Primern), welche die Zielsequenz durch komplementäre Basenpaarung flankieren, erfolgt die in vitro Amplifikation des DNA-Fragmentes mit Hilfe einer thermostabilen DNA-abhängigen DNA-Polymerase. Im Rahmen dieser Arbeit wurden die *Taq*-Polymerase (aus *Thermus aquaticus*; 5U/μl) für analytische Amplifikationen verwendet. Für präparative Amplifikationen wurde die *PfuUltra*™ Hotstart DNA-Polymerase (modifizierte *Pfu* - Polymerase aus *Pyrococcus furiosus*; 2,5U/μl; Agilent Technologie) auf Grund der

geringeren Fehlerrate eingesetzt. Ein Standard-PCR-Ansatz setzte sich folgendermaßen zusammen:

10-200ng	DNA oder cDNA
2,5µl	10x PCR-Puffer
0,5µl	dNTP-Mix (10mM)
2µl	3'-Primer (5pmol/µl)
2µl	5'-Primer (5pmol/µl)
2,5U	DNA-Polymerase
Ad 25µl	Nuklease-freies Wasser

Die PCR-Reaktion erfolgte in einem RoboCycler (Stratagene) nach folgendem Standardprotokoll:

Initiale Denaturierung	5 min	95 °C	
40 Amplifikationszyklen	30s	95 °C	Denaturierung
	30s	55 °C (variabel)	<i>Annealing</i>
	variabel	72 °C	Elongation
Finale Elongation	5 min	72 °C	

Die *Annealing*-Temperatur orientierte sich an den Schmelztemperaturen der Primer und die Elongationszeit richtete sich nach der Größe des zu amplifizierenden Produktes (1 min/kb).

PCR-Primer:

STAIR1_1_for	5' - tca agg gca aag atg gaa tc -3'
STAIR1_1_rev	5' - tgt cat tcc aag ttg cca aa -3'
STAIR1_2_for	5' - ctc agt ttg gca tcc gtt tt -3'
STAIR1_2_rev	5' - att gac ttc cca ggc ctt tt -3'
STAIR1_3_for	5' - aag ccc agg tga tgg tgt ag -3'
STAIR1_3_rev	5' - cct ggg aga gat gct tct tg -3'
STAIR2_1_for	5' - tcg gta tgt ggg ttt ggt tt -3'
STAIR2_1_rev	5' - ctg gct tct cag ctg gac tt -3'
STAIR2_2_for	5' - gtg aag ggg cat gtt gag at -3'
STAIR2_2_rev	5' - ggt gct agc cct gaa gtc tg -3'
STAIR2_3_for	5' - tgc cac cct aac ctc tca ac -3'
STAIR2_3_rev	5' - ttg tgg gac gga act cct ac -3'
STAIR3_1_for	5' - gcg agt atg gat ctc caa gg -3'
STAIR3_1_rev	5' - caa tgc tct gac ctc acg aa -3'
STAIR3_2_for	5' - tct cac ccc agg ctt tta tg -3'
STAIR3_2_rev	5' - aag gca ccc aaa agg aat ct -3'
STAIR3_3_for	5' - cca gat tct tcc caa tcc aa -3'
STAIR3_3_rev	5' - cat gga cag gtg gtg ttc tg -3'



STAIR6_1_for	5'- ggc tag gct gag gaa ggt ct -3'
STAIR6_1_rev	5'- ctg caa gtg gca tta cga ga -3'
STAIR6_2_for	5'- atc tca tcg ggt cag tgg ac -3'
STAIR6_2_rev	5'- cta atc cag cct gct cct tg -3'
STAIR6_3_for	5'- tca ctg gta caa agg aca gag c -3'
STAIR6_3_rev	5'- gaa ggg ttt gtt ggg gaa tta -3'
STAIR15_1_for	5'- tct gat gac cct ctg ggt tc -3'
STAIR15_1_rev	5'- gtg ctt taa acg ggt gca tt -3'
STAIR15_2_for	5'- gct gcc tac aga aaa gaa agc tg -3'
STAIR15_2_rev	5'- cag tgt tgc atg gtg tga tta ac -3'
STAIR15_3_for	5'- acc cct ccc tca ttc agt ct -3'
STAIR15_3_rev	5'- aag agg gcc ttt gat gga at -3'
STAIR18_1_for	5'- tgg ctg agt tgt gga cag ag -3'
STAIR18_1_rev	5'- ccc cca gta ctg cag gta aa -3'
STAIR18_2_for	5'- gga aca ctc tga aaa aca cca a -3'
STAIR18_2_rev	5'- tga gaa tac ata tgt gtg caa gga -3'
STAIR18_3_for	5'- gcc aaa aac cag aca aag ga -3'
STAIR18_3_rev	5'- act acg ccc ggc taa ttt tt -3'

---

#### Klonierungs-Primer:

ST18_Prom_-770	5'- ttt gct agc tgc taa gga tca cat gg -3'
ST18_Prom_+210	5'- ttt aag ctt ccc agg aac tgt gct g -3'
ST18_Prom_+38	5'- ttt aag ctt cag cct tca ttc tca ttg g -3'
ST18_Enh_+605	5'- ttt gga tcc gct tct cag agg tgg -3'
ST18_Enh_+1320	5'- ttt gtc gac cca agc tgg gag ctg -3'
ncRNA152_start	5'- ttt gct agc atg agt cat ctc gtt cc -3'
ncRNA152_end	5'- ttt ggg ccc ttc tgt ttt ctt tag ttt tgc -3'

---

### 2.2.5.2 Agarose-Gelelektrophorese

Für die Auftrennung von DNA-Fragmenten wurde die Methode der Agarose-Gelelektrophorese angewendet. In Abhängigkeit von der Größe der aufzutrennenden Fragmente wurden Gele mit einer Agarosekonzentration von 0,8-2% (w/v) in TAE-Puffer hergestellt. Vor dem Auftragen auf das Gel wurden die zu analysierenden Proben mit 10% (v/v) DNA-Ladepuffer versetzt. Dieser erhöht die Dichte, sodass die Proben in die Taschen sinken. Der im Ladepuffer enthaltene Farbstoff dient zusätzlich als Laufweitenkontrolle. Als Größenmarker wurden 5 µl des GeneRuler™ 1kb plus DNA Ladder (Fermentas) in eine Tasche geladen. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte in einer Kammer mit TAE-Puffer bei einer Spannung von 50 oder 100 Volt für ca. 30 Minuten. Zum Anfärben der DNA-Banden wurden die Agarose-Gele 10 Minuten in Ethidiumbromid-Lösung (10mg/l EtBr)

inkubiert. Die Auswertung und Dokumentation erfolgte im Anschluss bei UV-Licht mit einer Digitalkamera (Multimage Light Cabinet).

---

TAE-Puffer	40mM Tris, 20mM Essigsäure, 1mM EDTA; pH 8,0
DNA-Ladepuffer	10mM EDTA, 1%(w/v) SDS, 20% (v/v) Ficoll, 0,25% (w/v) Bromphenolblau, 0,25% (w/v) Xylencyanol

---

### **2.2.5.3 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen**

Nach der gelelektrophoretischen Auftrennung wurden das Gel auf einen UV-Tisch gelegt und DNA-Banden der gesuchten Größe mit einem Skalpell aus dem Gel ausgeschnitten. Die Aufreinigung der DNA wurde mit dem QIAquick® Gel Extraction Kit (QIAGEN) nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Eluiert wurde stets mit 30µl Nuklease-freiem Wasser.

### **2.2.5.4 Spalten von DNA mittels Restriktionsendonukleasen**

Restriktionsendonukleasen sind bakterielle Enzyme, die meist palindromische Sequenzen erkennen (4-8 Basenpaare) und in diesem Bereich beide DNA-Stränge hydrolytisch spalten. Je nach Restriktionsenzym entstehen gerade Enden oder kurze, ungepaarte Überhänge. Im Rahmen dieser Arbeit wurden Restriktionsenzyme der Hersteller New England BioLab, Jena Bioscience und Fermentas entsprechend der Herstellerangaben verwendet. Um 1µg DNA oder cDNA zu spalten, wurden 10 Units Restriktionsenzym eingesetzt und 1-2 Stunden bei 37°C inkubiert.

### **2.2.5.5 Dephosphorylierung von DNA-Fragmenten**

Um die Religation enzymatisch gespaltener Vektoren zu verhindern, wurden die terminalen 5'-Phosphatgruppen entfernt. Dazu wurde 1 Unit Shrimp alkalische Phosphatase (Fermentas) direkt in den Restriktionsansatz gegeben und 1 Stunde bei 37°C inkubiert. Restriktionsenzyme mit Star-Aktivität wurden zuvor für 20 Minuten bei 80°C hitzeinaktiviert.

### 2.2.5.6 Ligation von DNA-Fragmenten

Die Verknüpfung von DNA-Fragmenten mit kompatiblen Enden erfolgte mit der T4-DNA-Ligase. Dieses Enzym katalysiert die Bildung einer Phosphodiesterbindung zwischen einem 3'-Hydroxy-Ende und 5'-Phosphat-Ende zweier DNA-Fragmente. Bei dieser Reaktion wird ATP als Cofaktor benötigt. Das DNA-Insert wurde im fünffachen molaren Überschuss zum linearisierten, dephosphorylierten Vektor in einer Reaktion mit 1 Unit T4-DNA-Ligase (Roche Applied Science) eingesetzt. Als Kontrolle für die Religation diente stets ein Ligationsansatz, dem statt des Inserts nur Wasser hinzugegeben wurde. Die Ligation wurde über Nacht bei 12°C durchgeführt.

### 2.2.5.7 Herstellung und Transformation kompetenter Bakterien

Die Herstellung kompetenter *E.coli* erfolgte nach der Calciumchloridmethode. Eine Einzelkolonie von *E.coli* HB101 (ATCC 33694) wurde in 5ml LB-Medium über Nacht bei 37°C im Schüttler inkubiert. Am nächsten Tag wurden 250ml LB-Medium mit 2,5ml der Übernachtskultur angeimpft und erneut bei 37°C kultiviert bis zu einer  $OD_{595nm}$  von 0,375. Die Zellen wurden in gekühlte 50ml-Röhrchen aliquotiert und nach 10-minütiger Inkubation auf Eis zentrifugiert (1600 x g, 7min, 4°C). Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in 10ml eiskalter, steriler Calciumchlorid-Lösung (100mM) resuspendiert. Die Zellsuspensionen wurden vereinigt, zentrifugiert (1100 x g, 5min, 4°C), der Überstand entfernt und das Pellet in 50ml eiskalter, steriler Calciumchlorid-Lösung (100mM) aufgenommen. Nach 30 Minuten Inkubation auf Eis erfolgte erneut eine Zentrifugation (1100 x g, 5min, 4°C). Das Zellpellet wurde in 10ml eiskalter, steriler Calciumchlorid-Lösung (100mM) mit 15% (v/v) Glycerol resuspendiert und zu 100µl aliquotiert. Die Aliquots wurden sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren und bis zum Gebrauch bei -80°C gelagert.

Chemisch kompetente Bakterien wurden mittels Hitzeschock mit Plasmid-DNA transformiert. Dazu wurden die kompetenten *E.coli* HB101 langsam aufgetaut. Ein Ligationsansatz wurde zu einem Bakterien-Aliquot hinzugegeben und 30 Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgte der Hitzeschock für 1,5 Minuten bei 42°C. Der Transformationsansatz wurde 1 Minute auf Eis abgekühlt, mit 800µl LB-Medium versetzt und 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Nach der Zentrifugation wurde der Überstand abgekippt, das Zellpellet in der Restflüssigkeit resuspendiert und auf ampicillinhaltigen LB-Agar-Platten aufgetragen. Ampicillin diente zur Selektion, da alle in dieser Arbeit verwendeten Plasmide das erforderliche Resistenzgen tragen. Die Bakterien wurden über Nacht bei 37°C auf den LB-Agar-Platten kultiviert.

---

LB-Medium     10g/l Trypton, 5g/l Hefeextrakt, 5g/l NaCl; autoklavieren

LB-Agar        LB-Medium, 15mg/ml Agar-Agar; autoklavieren; 100µg/ml Ampicillin

---

*E. coli* HB101    F- supE44 lacY1 ara- 14 galK2 xyl-5 mtl-1 leuB6 Δ(mvrC-mrr) recA13 rpsL20  
thi-1 Δ(gpt-proA)62 hsdSB20 λ-

---

### 2.2.5.8 Kolonie-PCR

Zur schnellen Überprüfung von Bakterienklonen wurde eine Kolonie-PCR durchgeführt. Hierfür wurde der normale Standard-PCR-Ansatz mit geeigneten Primern verwendet. Anstelle von gereinigter DNA wurde ein Teil einer Einzelkolonie mit einer sterilen Pipettenspitze abgenommen und in dem PCR-Gefäß geschwenkt. Die anschließende PCR-Reaktion wurde nach dem Standard-PCR-Protokoll durchgeführt.

### 2.2.5.9 Präparation von Plasmid-DNA

Für die Gewinnung von Plasmid-DNA wurden Einzelkolonien von LB-Agar-Platten gepickt, in 5ml ampicillinhaltiges LB-Medium überführt und über Nacht bei 37°C in einem Schüttler kultiviert. 4ml dieser Übernachtskultur wurden für die Plasmidpräparation im kleinen Maßstab eingesetzt. Hierfür wurde das Plasmid Mini-Prep Kit (Jena Bioscience) entsprechend der Herstellerangaben verwendet. Die Elution der Plasmide erfolgte mit 30µl Nuklease-freiem Wasser. Im Anschluss wurde die gewonnene Plasmid-DNA meist durch die Spaltung mit geeigneten Restriktionsendonukleasen oder durch Sequenzierung der DNA kontrolliert.

Da für die Transformation von eukaryotischer Zellen größere Mengen besonders reiner Plasmid-DNA erforderlich sind, wurde der NucleoBond® Xtra Midi EF Kit (MACHEREY-NAGEL) für die Gewinnung von DNA im mittlerem Maßstab verwendet. Es wurden 100µl einer Übernachtskultur eingesetzt und nach den Angaben des Herstellers verfahren.

Die DNA-Konzentration der Proben wurde stets am NanoPhotometer™ (Implen GmbH) bei einer Wellenlänge von 260nm bestimmt. Dabei entsprechen 50µg/ml doppelsträngige DNA einer optischen Dichte von 1. Die Reinheit der DNA kann dabei zusätzlich über den Quotienten aus der Absorption bei 260nm und 280nm beurteilt werden.

---

LB-Medium	10g/l Trypton, 5g/l Hefeextrakt, 5g/l NaCl; autoklavieren; Zugabe von 100µg/ml Ampicillin direkt vor dem Gebrauch
-----------	--

---

### 2.2.5.10 DNA-Sequenzierung

Zur Kontrolle von Klonierungen und Klärung der Identität von PCR-Produkten wurden die Proben sequenziert. Die DNA-Sequenzierungen wurden durch die Core Unit DNA-Technologien des Interdisziplinären Zentrums für klinische Forschung der Universität Leipzig durchgeführt.

### 2.2.5.11 Plasmide

pcDNA3.1(+)	eukaryotischer Expressionsvektor (Life Technologies)
pc_ncRNA152_450bp	Expressionsplasmid basierend auf pcDNA3.1(+), kodiert für eine verkürzte Isoform der humanen ncRNA152 (erstellt in dieser Arbeit)
pc_ncRNA152_560bp	Expressionsplasmid basierend auf pcDNA3.1(+), kodiert für die humane ncRNA152 (erstellt in dieser Arbeit)
pCH110	eukaryotischer $\beta$ -Galktosidase-Expressionsvektor unter Kontrolle des frühen SV40 Promotor (Amersham)
pGL3-Basic	eukaryotischer Expressionsvektor, kodiert für eine modifizierte Luziferase von <i>Photinus pyralis</i> (Promega)
pGL3-mir21-Prom	Reporterplasmid basierend auf pGL3-Basic, die Luziferase steht unter Kontrolle des pri-mir21 Promotors [-1122/+23] (erstellt von Dennis Löffler)
pGL3-ST18-Prom_B	Reporterplasmid basierend auf pGL3-Basic, die Luziferase steht unter Kontrolle des STRAIR18 Promotors [-117/+38] (erstellt in dieser Arbeit)
pGL3-ST18-Prom_BC	Reporterplasmid basierend auf pGL3-Basic, die Luziferase steht unter Kontrolle des STRAIR18 Promotors [-117/+210] (erstellt in dieser Arbeit)

---

pGL3-ST18-Prom_AB	Reporterplasmid basierend auf pGL3-Basic, die Luziferase steht unter Kontrolle des STRAIR18 Promotors [-770/+38] (erstellt in dieser Arbeit)
pGL3-ST18-Prom_ABC	Reporterplasmid basierend auf pGL3-Basic, die Luziferase steht unter Kontrolle des STRAIR18 Promotors [-770/+210] (erstellt in dieser Arbeit)
pGL3-ST18-Prom_ABC+Enh	Reporterplasmid basierend auf pGL3-Basic, die Luziferase steht unter Kontrolle des STRAIR18 Promotors [-770/+210] (erstellt in dieser Arbeit)
pGL3-ST18-Prom_B+Enh	Reporterplasmid basierend auf pGL3-Basic, die Luziferase steht unter Kontrolle des STRAIR18 Promotors [-117/+38] (erstellt in dieser Arbeit)

## 2.3 Zellbiologische Methoden

### 2.3.1 Präparation primärer T-Helferzellen

Ausgangsmaterial für die Gewinnung primärer humaner T-Helferzellen waren *Buffy Coats*, die vom Institut für Transfusionsmedizin (Universitätsklinikum Leipzig) bezogen wurden. Dort wurden humane Vollblut-Spenden zuerst zentrifugiert, um Blutplasma und feste Bestandteile zu trennen. Plasma und Erythrozyten wurden anschließend mit Hilfe einer optischen Presse von den verbleibenden Blutzellen, dem sogenannten *Buffy Coat*, separiert.

#### 2.3.1.1 Dichtegradientenzentrifugation

Für die Isolation peripherer mononukleärer Zellen (PBMC) wurde ein *Buffy Coat* mit 250ml raumtemperiertem PBS verdünnt. In 50ml Zentrifugenröhrchen wurden 15ml raumtemperiertes Ficoll-Paque™ Plus (GE Healthcare) vorgelegt und die verdünnte Zellsuspension vorsichtig darüber geschichtet. Die Auftrennung der Zellen erfolgte durch 30-minütige Zentrifugation (500 x g, 20°C, Beschleunigung=4, Bremse=0). Während die Erythrozyten bei dieser Dichtegradientenzentrifugation sedimentieren, reichern sich die PBCMs in einem Interphasering an. Der Interphasering wird nach unten von der Granulozyten-enthaltenden Ficoll-Phase und nach oben von der Thrombozyten-enthaltenden Plasmaphase begrenzt. Die PBMCs wurden mit einer Pipette abgenommen und in 40ml kaltes PBS gegeben. Anschließend wurde langsam zentrifugiert (200 x g, 4°C, Beschleunigung=9, Bremse=7), um restliche Thrombozyten zu entfernen. Der Überstand

wurde verworfen und die Zellen ein weiteres Mal mit 50ml kaltem PBS gewaschen. Die Zellzahl wurde lichtmikroskopisch mit einer Neubauer-Zählkammer bestimmt.

---

PBS                      137 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 8,1 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 1,5 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; pH 7,4

---

### **2.3.1.2 Separation von Subpopulationen mit magnetischen Mikropartikeln**

Zur Anreicherung humaner T-Helferzellen wurde das magnetische Zelltrennsystem MACS (Miltenyi Biotec) mit dem human CD4<sup>+</sup> T cell Isolation Kit II (Miltenyi Biotec) verwendet. 10<sup>8</sup> PBMCs wurden in 225µl MACS-Puffer aufgenommen, mit 25µl Biotin-Antikörper-Mix gemischt und für 10 Minuten bei 6°C inkubiert. Der Antikörper-Mix enthält Biotin-gekoppelte Antikörper, die Leukozyten, die keine T-Helferzellen sind, markieren. Danach wurden 50µl Anti-Biotin MicroBeads zu den Proben hinzugegeben und weitere 15 Minuten bei 6°C inkubiert. In diesem Schritt binden die magnetischen Mikropartikel an das mit den Antikörpern gekoppelte Biotin und ermöglichen so später die Separation der markierten Zellen in einem Magnetfeld. Die Zellen wurden anschließend mit 10ml MACS-Puffer gewaschen (300 x g, 10min, 4°C). Währenddessen wurde eine mit einer Stahlkugelmatrix versehene Trennsäule (LD-Säule) in einem Magneten befestigt und mit 2ml MACS-Puffer gespült. Nach der Zentrifugation der Zellen wurde der Überstand mit den ungebundenen Partikeln komplett vom Zellpellet entfernt. Die PBMCs wurden in 500µl MACS-Puffer resuspendiert und auf die vorbereitete Säule gegeben. Die mit den magnetischen Mikropartikeln markierten Zellen werden in dem Magnetfeld in der Säule gehalten. Die nicht markierten T-Helferzellen können die Säule ungehindert passieren und in einem Zentrifugenröhrchen aufgefangen werden. Die Säule wurde noch zweimal mit 1ml MACS-Puffer gespült und die Anzahl der gewonnenen T-Helferzellen bestimmt.

Für die Separation von naiven und Effektor-T-Zellen wurde die magnetische Zelltrennung ein weiteres Mal angewandt. Die primären T-Helferzellen wurden zentrifugiert und 10<sup>8</sup> Zellen in 1,8ml MACS-Puffer aufgenommen. Nach der Zugabe von 300µl Anti-CD45RO MicroBeads (Miltenyi Biotec) wurden die Zellen 15 Minuten bei 6°C inkubiert. Die Mikropartikel binden an CD45RO, einer Isoform des *leukocyte common antigen*, auf der Oberfläche von Effektor-T-Helferzellen. Anschließend wurden die Zellen mit 10ml MACS-Puffer gewaschen (300 x g, 10min, 4°C) und in 500µl MACS-Puffer resuspendiert. Eine Trennsäule mit Stahlkugelmatrix (LS-Säule) wurde in dem Magneten befestigt und mit 3ml MACS-Puffer gespült. Die Zellsuspension wurde auf die Säule gegeben und dreimal mit 3ml MACS-Puffer gespült. Die nicht markierten Zellen, die die Säule passieren, wurden in einem

Zentrifugenröhrchen aufgefangen und beinhalten die angereicherten naiven T-Helferzellen. Die Trennsäule wurde aus dem Magneten genommen, mit 5 ml MACS-Puffer gefüllt und mit Hilfe eines Druckstempels die markierten Effektor-T-Zellen ausgespült. Die gewonnenen T-Helferzell-Subpopulationen wurden gezählt und deren Reinheit und Vitalität nach der Färbung mit geeigneten fluoreszenz-markierten Antikörpern im Durchflusszytometer bestimmt.

## **2.3.2 Zellkultur und Stimulation eukaryontischer Zellen**

Alle verwendeten Zellkulturmedien und -zusätze wurden von Life Technologie bezogen. Das verwendete Fetale Kälberserum (FKS) wurde von der Firma Lonza hergestellt. Sterile Zellkulturschalen, -flaschen und -platten stammten von Greiner Bio-One. Alle Zellen wurden in einem Heracell 150i CO<sub>2</sub> Inkubator der Firma Thermo Scientific bei 37°C und 5%CO<sub>2</sub> kultiviert. Gearbeitet wurde mit den Zellen stets unter einer sterilen Sicherheitswerkbank, um Kontaminationen zu vermeiden.

Zur Langzeitaufbewahrung wurden 10<sup>7</sup> Zellen in 900µl FKS aufgenommen und mit 100µl DMSO versetzt. Nach der Überführung in Kryoröhrchen wurden die Zellen sofort auf Eis gestellt und für 24 Stunden langsam auf -80°C gekühlt. Im Anschluss wurden die Zellen in flüssigem Stickstoff gelagert.

### **2.3.2.1 Suspensionszellen**

Im Rahmen dieser Arbeit wurden zwei IL-6-abhängige humane Myelom-Zelllinien verwendet. Die Suspensionszellen wurden in RPMI-Medium in Zellkulturflaschen kultiviert und dreimal pro Woche gesplittet.

INA-6-Zellen (Bezugsquelle: Gramatzki; Kiel) wurden aus dem Pleuraerguss eines 80-jährigen Patienten mit Plasmazytom isoliert. Sie zeigen morphologische Charakteristika von Lymphoblasten und sind durch eine konstitutive Aktivierung des MAPK-Signalweges gekennzeichnet<sup>164</sup>. Dem Kulturmedium von INA-6-Zellen muss 1 ng/ml IL-6 zugesetzt werden. Kultiviert man die Zellen ohne das Zytokin, steigt die Apoptoserate der Zellen bereits nach 4 Stunden an, bis nach zwei Tagen alle Zellen abgestorben sind. Wird IL-6 innerhalb von 12 Stunden erneut zugesetzt, können die Zellen vor irreversibler Apoptose bewahrt werden<sup>88</sup>. Für IL-6-Stimulationsexperimente wurden die Zellen zweimal mit RPMI-Medium gewaschen (300 x g, 5 min, 22 °C), um Interleukin-6 zu entfernen. Anschließend wurden die INA-6-Zellen 13 Stunden ohne IL-6 kultiviert, nach 12-stündigem Hungern für eine Stunde mit IL-6 restimuliert oder wuchsen bei permanenter Anwesenheit des Zytokins.



Auch XG-1-Zellen (Bezugsquelle: Klein; Montpellier) sind Myelomzellen, die morphologische Charakteristika von Lymphoblasten zeigen. Die Zellen produzieren in geringem Ausmaß autokrin IL-6. Ohne den Zusatz von 2 ng/ml IL-6 in ihrem Kulturmedium treten XG-1-Zellen in einen G<sub>0</sub>-Arrest ein. Die Zellen können bis zu 72 Stunden ohne das Zytokin kultiviert werden bevor sie einen irreversiblen Schaden erleiden<sup>88</sup>.

---

RPMI-Medium	RPMI 1640 + GlutaMAX™-I + 10% FKS + 1% Pen/Strep
-------------	--

---

### 2.3.2.2 Adhärenzte Zellkultur

Die humane hepatozelluläre Karzinomzelllinie HepG2 (ATCC HB-8065) wurde in DMEM/F12-Medium kultiviert. HepG2-Zellen wurden passagiert, sobald die Kultur eine Konfluenz von 80 Prozent in der Kulturschale aufwies. Die Zellen wurden mit temperierten PBS gewaschen und mit 0,05-prozentiger Trypsin/EDTA-Lösung (Life Technologies) vom Boden abgelöst. Die Reaktion wurde mit DMEM/F12-Medium abgestoppt und HepG2-Zellen mit Hilfe einer Spritze und einer Kanüle vereinzelt. Die Zellen wurden nach Bedarf im Verhältnis 1:2 bis 1:4 mit frischem Kulturmedium verdünnt und in Kulturschalen ausgesät. Falls für ein Experiment erforderlich, wurden HepG2-Zellen mit 10 ng/ml IL-6 stimuliert.

---

DMEM/F12-Medium	DMEM/F12 + GlutaMAX™-I + 10% FKS + 1% Pen/Strep
-----------------	---

PBS	137 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 8,1 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ; 1,5 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ; pH 7,4
-----	--

---

### 2.3.2.3 Kultivierung und Aktivierung primärer T-Helferzellen

Primäre humane T-Zellen wurden nach der Isolation in RPMI-Medium bei 37 °C und 5% CO<sub>2</sub> kultiviert.

Für die *in vitro* Aktivierung naiver T-Helferzellen wurden LEAF™ purified anti-human CD3 (Klon UCHT1) und CD28 (Klon 28.2) von BioLegend verwendet. Advanced surface 6-well plates (Greiner Bio One) wurden über Nacht mit anti-CD3 Antikörpern bei 6 °C beschichtet. Dafür wurden in jede Vertiefung der Platte 1 ml PBS und 2 µg anti-CD3 (Klon UCHT1) gegeben. Im Anschluss wurde die Platte dreimal mit PBS gewaschen und bei 6 °C gelagert.

$2 \times 10^6$  naive T-Helferzellen wurden in 2 ml Medium mit  $2 \mu\text{g}$  anti-CD28 in eine mit anti-CD3 beschichtete Vertiefung gegeben und bei  $37^\circ\text{C}$  und  $5\% \text{CO}_2$  für zwei, 24 oder 72 Stunden aktiviert. Die Aktivierung der Zellen wurde lichtmikroskopisch und über die Expression von Aktivierungsmarkern (CD69, CD25 und CD71) auf der Zelloberfläche mittels Durchflusszytometrie kontrolliert. Für weitere Analysen wurde RNA der aktivierten T-Helferzellen isoliert.

---

RPMI-Medium

RPMI 1640 + GlutaMAX™-I + 10% FKS + 1% Pen/Strep

---

### 2.3.3 Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie ermöglicht die simultane Analyse einzelner Zellen hinsichtlich verschiedener Parameter wie Zellgröße, Granularität, auch Expression von Oberflächenmarkern und intrazellulären Molekülen mit Hilfe von Fluoreszenzfarbstoffen. In dieser Arbeit wurde das FACSCalibur™ von BECTON DICKINSON mit den Gebrauchslösungen BD FACSTFlow™, FACSClean™ und FACSRinse™ (BD Biosciences) für die durchflusszytometrischen Messungen verwendet. Die Zellen werden durch eine Kapillare geführt und passieren einzeln zwei Laserstrahlen (488 nm und 635 nm). Dabei korreliert das auftretende Vorwärtstreulicht (FSC) mit der Zellgröße, während das seitliche Streulicht (SSC) auf die Granularität der Zelle schließen lässt. Gleichzeitig kann die Fluoreszenz mehrerer an der Zelle gekoppelter Farbstoffe mittels Spiegel- und Filtersystemen aufgetrennt und mit Detektoren gemessen werden. Die Geräteeinstellungen für die Kompensation der verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffe wurde mit Hilfe von Fluorescence Minus One Kontrollen vorgenommen. Die Auswertung der durchflusszytometrischen Analysen wurde mit dem Programm CellQuest™ Pro (BD Biosciences Version 4.0.2) durchgeführt.

#### Analyse der Zellviabilität

Die Viabilität der Zellen wurde im Durchflusszytometer mit Hilfe des Apoptosis Detection Kit II (BD Biosciences) bestimmt. Es wurden jeweils etwa  $10^5$  Zellen eingesetzt und nach den Angaben des Herstellers verfahren. Dieser Test nutzt die Translokation von Phosphatidylserin an die Außenseite der Plasmamembran in frühen Apoptosestadien zur Detektion apoptotischer Zellen. Hierfür wird fluoreszenz-gekoppeltes Annexin-V verwendet, das Calcium-abhängig mit hoher Affinität an Phospholipide binden kann. Des Weiteren wird Propidiumjodid (PI) eingesetzt, um tote Zellen zu färben. Dieser Fluoreszenzfarbstoff kann durch die perforierte Membran toter Zellen dringen und in die



## 2.3.4 Transiente Transfektion eukaryontischer Zellen

Die Transfektion bezeichnet das Einbringen von rekombinanter Fremd-DNA oder RNA in eukaryontische Zellen. Transfiziert wurden Reporter- oder Expressionsplasmide sowie Oligonukleotide zur Stilllegung von Ziel-RNAs. In dieser Arbeit wurden nur transiente Transfektionen durchgeführt, wobei die eingebrachten Nukleinsäuren extrachromosomal bleiben und innerhalb weniger Tage in der Zelle degradiert werden.

### 2.3.4.1 Calciumphosphat-Präzipitation

Für die Transfektion von HepG2-Zellen mit Luziferase-Reportervektoren (pGI3) wurde die Calciumphosphat-Methode angewandt. Ein  $\beta$ -Gal-Kontrollplasmid (pCH110- $\beta$ -Gal) wurde cotransfiziert, um die Transfektionseffizienz bestimmen zu können, die bei dieser Methode sehr stark schwanken kann. Die Zellen wurden dafür am Vortag mit einer Zelldichte von etwa  $4 \times 10^4$  Zellen pro  $\text{cm}^2$  in DMEM-Medium 6-well-Platten ausgesät. 149  $\mu\text{l}$  Calciumchlorid-Lösung (250 mM) wurden mit 0,5  $\mu\text{g}$  pGI3-Reportkonstrukt und 0,25  $\mu\text{g}$  pCH110  $\beta$ -Galaktosidaseplasmid versetzt und gevortext. Anschließend wurden langsam 150  $\mu\text{l}$  2x HBS-Puffer hinzugegeben und 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Hierbei bilden sich DNA-Calciumphosphat-Kristalle, die dann von den Zellen über Endozytose aufgenommen werden können. Das Präzipitat wurde vorsichtig zu den HepG2-Zellen getropft und diese über Nacht bei 37°C und 3%  $\text{CO}_2$  kultiviert. Die Zellen wurden zweimal mit frischem DMEM/F12-Medium gewaschen, um die Kristalle zu entfernen und in Recovery-Medium für 24 Stunden bei 37°C und 5%  $\text{CO}_2$  kultiviert. Um die Aktivierung eines Promotors oder Enhancers durch STAT3 nachzuweisen, wurde manchen Ansätzen 10 ng/ml IL-6 für 4 Stunden zugesetzt. Anschließend wurden Reporteranalysen (siehe 2.3.5) durchgeführt.

---

2x HBS-Puffer	50 mM HEPES + 280 mM NaCl + 1.5 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , pH 6,96
DMEM-Medium	DMEM + GlutaMAX™-I + 10% FKS + 1% Pen/Strep
DMEM/F12-Medium	DMEM/F12 + GlutaMAX™-I + 10% FKS + 1% Pen/Strep
Recovery-Medium	DMEM + GlutaMAX™-I + 0,5% FKS + 1% Pen/Strep

---

### 2.3.4.2 Elektroporation

Die Elektroporation ist eine transiente Transfektion bei der mit kurzen Spannungsimpulsen die Membran kurzzeitig permeabilisiert wird und Fremd-DNA oder RNA in die Zellen eindringen kann.

#### Transfektion von XG-1-Zellen

Die Transfektion von XG-1-Zellen erfolgte mit dem Neon® Transfection System (Life Technologies) nach Angabe des Herstellers. Die Zellen wurden einen Tag vor der Transfektion 1:2 gesplittet.  $5 \times 10^6$  XG-1-Zellen wurden in 100µl NEON Puffer R resuspendiert und mit 300pmol siRNA gemischt. Der Transfektionsansatz wurde mit einer 100µl-NEON® Pipettenspitze aufgenommen und in dem NEON® Transfektionsgerät mit zwei aufeinanderfolgenden 1600V-Spannungsimpulsen von je 10ms transfiziert. Anschließend wurden die Zellen direkt in 6ml vorgewärmtes RPMI-Medium mit 2 ng/µl IL-6 gegeben. Nach 24-stündiger Inkubation bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> wurden die Zellen geerntet und deren RNA isoliert (siehe 2.2.2).

#### Transfektion primärer T-Helferzellen

Primäre T-Helferzellen wurden mit dem AMAXA™ Human T Cell Nucleofector™ Kit (Lonza) entsprechend des Herstellerprotokolls für unstimulierte T-Zellen transfiziert. Für eine Transfektion wurde  $6 \times 10^6$  naive T-Zellen eingesetzt. Die Zellen wurden in 80µl Human T Cell Nucleofector™ Solution (Lonza) aufgenommen und mit 15µl Stealth RNAi™ siRNA (20mM, Life Technologies) versetzt. Die Zellsuspension wurde in Küvetten überführt und das Programm X-001 im AMAXA™ Nucleofector™ II Device (Lonza) durchgeführt. Die transfizierten Zellen wurden in RPMI-Medium in 6-well-Platten bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> kultiviert. Wenn erforderlich wurden die Zellen nach 18 Stunden (Erholungsphase) für 24 Stunden aktiviert. Anschließend wurden die Zellen im Durchflusszytometer kontrolliert (Viabilität und Aktivierungsmarker) und deren RNA für weitere Untersuchungen isoliert (siehe 2.2.2).

---

RPMI-Medium	RPMI 1640 + GlutaMAX™-I + 10% FKS + 1% Pen/Strep
-------------	--

---

siRNA-Oligonukleotide

siSTAT3	5' - uuu guu gac ggg ucu gaa guu gag a - 3'
si152 E1	5' - ugc ugu gaa gau cug aag aca ggc a - 3'

si152 E2                    5' - aaa ugc aga ggc cuc aga guc cac a - 3'  
si152 E2.2                5' - aaa uau cac agg cag acc acc cgc a - 3'

---

## 2.3.5 Reporteranalysen

In Reporterassays kann die transkriptionelle Aktivität genregulatorischer Elemente über die Expression eines Reportergens bestimmt werden. Dazu werden Reportergene, deren Genprodukte leicht zu detektieren sind (z.B. Luziferase,  $\beta$ -Galaktosidase), unter die Kontrolle regulatorisch aktiver Promotor- bzw. Enhancerbereiche gestellt. Die Quantifizierung des Reporterproteins ermöglicht Rückschlüsse auf die Transkriptionsaktivität der genregulatorischen Elemente. Durch das An- und Ausschalten bestimmter Signalwege kann auch die Regulation der Promotoren und Enhancer durch Transkriptionsfaktoren untersucht werden (z.B. durch IL-6-Zugabe induzierte Aktivierung von STAT3).

Im Rahmen dieser Arbeit wurden HepG2-Zellen mit je 0,5  $\mu$ g pGL3-Reportkonstrukt und 0,25  $\mu$ g pCH110- $\beta$ -Gal in 6-well-Platten nach der Calciumphosphat-Methode transfiziert. Nach 24 Stunden erfolgte die 4-stündige Stimulation mit IL-6 (10ng/ml). Im Anschluss wurden die Zellen mit 150  $\mu$ l Lysepuffer des Luziferase Assay Systems (Promega) aufgeschlossen und die Lysate für die folgenden Nachweise der Reporterproteine eingesetzt.

Für die Auswertung der Transkriptionsaktivität der genregulatorischen Elemente wurden die Luziferasewerte auf die  $\beta$ -Galaktosidaseaktivität bezogen. Die dabei erhaltene dimensionslose Zahl wird als relative Lichteinheit (RLE) bezeichnet. Die Induktion eines Promotors oder Enhancers durch IL-6 ergab sich durch die Division des stimulierten Wertes durch den unstimulierten Wert.

### 2.3.5.1 Luziferase-Nachweis-System

Die zu untersuchenden Promotoren und Enhancer wurden in das Reporterplasmid pGL3 (Promega) vor beziehungsweise hinter das Luziferasegen (aus *Photinus pyralis*) kloniert. Die exprimierte Luziferase wurde mit dem Luziferase Assay System (Promega) in weißen 96-well-LIA-Mikrotiterplatten (greiner bio-one) nachgewiesen. Dabei katalysiert Luziferase in Anwesenheit von ATP,  $Mg^{2+}$  und Sauerstoff die Oxidation von Luziferin zu Oxyluziferin. Das bei dieser Reaktion emittierte Licht ist proportional zur Konzentration des Reporterproteins und wurde mit dem LUMIstar OPTIMA Luminometer (BMG LABTECH) und der OPTIMA Software (Version 2.20) gemessen. Die Versuchsdurchführung orientierte sich an den Empfehlungen des Herstellers.

### 2.3.5.2 $\beta$ -Galaktosidase-Nachweis-System

In dieser Arbeit wurde das Reporterplasmid pCH110 als interner Standard zur Normalisierung der gemessenen Luziferasewerte eingesetzt. Dieses Reporterplasmid kodiert das  $\beta$ -Galaktosidasegen unter Kontrolle des stimulationsunabhängigen, konstitutiv aktiven SV40-Promotors. Die Quantifizierung der  $\beta$ -Galaktosidase erfolgte in weißen 96-well-LIA-Mikrotiterplatten (greiner bio-one) mit dem chemiluminescent  $\beta$ -Gal Reporter Assay (Roche Applied Science). Es wurde nach Angaben des Herstellers verfahren. Der Nachweise beruht darauf, dass die  $\beta$ -Galaktosidase die Deglykosylierung des Galacton-Dioxetan-Substrates katalysiert, was zur Akkumulation des protonierten Dioxetan führt. Durch Erhöhung des pH-Wertes in den stark basischen Bereich (über 12) zerfällt das Dioxetan unter Emission von Licht. Die Detektion des emittierten Lichtes erfolgte auch hier mit dem LUMIstar OPTIMA Luminometer (BMG LABTECH) und der OPTIMA Software (Version 2.20).

### 2.3.6 Fluoreszenz in situ Hybridisierung

Die Fluoreszenz in situ Hybridisierung ist eine sensitive molekularbiologische Technik, um spezifische Nukleinsäure-Sequenzen in ihrer natürlichen Umgebung (*in situ*) zu detektieren. In dieser Arbeit wurden fluoreszenz-markierte DNA-Sonden eingesetzt, die komplementär zur Ziel-RNA sind und mit dieser ein Doppelstrang-Hybrid ausbilden. Die Fluoreszenz der gebundenen Sonde wurde anschließend mit Hilfe eines Fluoreszenz-Mikroskops detektiert und ermöglichte die Lokalisation der Ziel-RNA.

#### Fixierung und Permeabilisierung der Zellen

Die Zellen wurden auf beschichtete Glasobjektträger ausgesät. Für HepG2-Zellen wurden die Objektträger zuvor für 30 Minuten mit 100  $\mu$ l 0,01%-igem Poly-L-Lysin (Sigma-Aldrich) bei Raumtemperatur inkubiert, mit 1ml Wasser gespült und getrocknet. Anschließend wurden die HepG2-Zellen von ihrer Kulturschale abtrypsiniert und mit Hilfe einer Spritze vereinzelt.  $5 \times 10^4$  Zellen wurden in 200  $\mu$ l Medium auf den Poly-L-Lysin-beschichteten Objektträger aufgebracht und zum Anwachsen für einen Tag bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert.

Damit Suspensionszellen wie INA-6 und XG-1 auf den Glasobjektträgern haften bleiben, wurde Polydiallyldimethylammoniumchlorid (PDDA) eingesetzt. Das PDDA wurde 1 zu 500 verdünnt und die Objektträger darin für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden die Objektträger kurz mit destilliertem Wasser gespült und luftgetrocknet. Es wurden je 200  $\mu$ l Suspensionszellkultur direkt auf die PDDA-beschichteten

Objektträger gegeben. Nach Inkubation bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> für eine halbe Stunde adhären die Suspensionszellen auf dem Objektträger.

Die Objektträger mit den auf ihnen haftenden Zellen wurden kurz mit PBS gespült und für 15 Minuten in 2% Formaldehyd (in PBS) fixiert. Damit die Hybridisierungs sonden später in die Zelle und den Zellkern eindringen können, wurden die Zellen für 30 Sekunden in CSK-Puffer auf Eis permeabilisiert. Wichtig in diesem Schritt sind, dass die Zellmorphologie aufrecht erhalten und ein Verlust der Ziel-Nukleinsäuren verhindert wird. Optional wurden einige Objektträger nach der Permeabilisierung für eine Stunde bei 37°C in RNase A-Lösung (1mg RNase A auf 10µl PBS) inkubiert. Anschließend wurden die Objektträger dreimal für 30 Minuten in PBS gewaschen. Dann wurden sie einmal mit 2xSSC-Puffer (SSC buffer 20x, Sigma-Aldrich) gespült und zweimal in 70%-igem Ethanol für 5 Minuten gewaschen.

---

PBS	137mM NaCl; 2,7mM KCl; 8,1mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ; 1,5mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ; pH 7,4
CSK-Puffer	100mM NaCl; 300mM Saccharose; 3mM MgCL <sub>2</sub> ; 10mM PIPES; pH 6,8 gefiltrert, sterilisiert und bei -20°C gelagert; frisch dazu 0,5% v/v Triton X-100 (Sigma-Aldrich) und 2mM Ribonucleoside Vanadyl Complex (New England Biolabs)

---

### **Herstellung der Hybridisierungs sonden**

RNA wurde aus INA-6-Zellen isoliert (siehe 2.2.2) und mit Oligo-dT-Primern in cDNA umgeschrieben (siehe 2.2.1). Anschließend wurde ein mehrere kilobasenlanges DNA-Fragment mit spezifischen Primern durch PCR amplifiziert (siehe 2.2.5.1). Das PCR-Produkt wurde gelelektrophoretisch aufgetrennt und aus dem Agarosegel isoliert (siehe 2.2.5.3). Zur Herstellung der Hybridisierungs sonden wurden in das DNA-Fragment mittels Nick-Translation Fluorochrom-konjugierte Nukleotide eingebaut.

Dafür wurde das Nick Translation Kit (Abbott) verwendet und nach den Angaben des Herstellers verfahren. Die Nick-Translation von 1µg DNA wurde für zwei Stunden bei 15°C durchgeführt. Dabei induziert die beigefügte DNase I an statistisch verteilten Stellen der DNA Einzelstrangbrüche. An diesen Bruchstellen vermittelt die enthaltene Polymerase I durch ihre 5'-3'-Polymeraseaktivität den Einbau der zugegeben Nukleotide (dNTPs und markierte dUTPs) in die doppelsträngige DNA und entfernt gleichzeitig die alten Nukleotide durch ihre 5'-3'-Exonukleaseaktivität. Zur Markierung der Sonde wurde Green 496 dUTP (Enzo Life Sciences) eingesetzt. Dieses Nukleotid ist an ein Fluorochrom gekoppelt, welches durch die Absorption von Licht einer bestimmten Wellenlänge (Maximum bei 496nm) auf



ein höheres Energieniveau angeregt wird. Kehrt dieses angeregte Molekül in den Grundzustand zurück, emittiert es Licht mit einer höheren Wellenlänge (Maximum bei 520nm).

Die Nick-Translation wurde durch eine 10-minütige Inkubation bei 70°C abgestoppt und die Größe der generierten Hybridisierungssonde auf einem Agarosegel kontrolliert (Hauptschmier bei 300bp). Die markierte Sonde und 80µg salmon sperm DNA (Life Technologies) wurden zusammen mit Ethanol präzipitiert und luftgetrocknet. Das Pellet wurde mit 40µl Formamid (Sigma Aldrich) resuspendiert, welches die doppelsträngige DNA-Struktur destabilisiert und somit die Schmelztemperatur herabsetzt. Direkt vor ihrer Anwendung wird die Hybridisierungssonde für 7 Minuten bei 75°C denaturiert, um DNA-Einzelstränge zu erhalten. Nach der Zugabe von 40µl Hybridisierungspuffer wird die fertige Hybridisierungssonde auf Eis gelagert, bis die Objektträger für die Hybridisierung vorbereitet sind.

---

Hybridisierungspuffer 4x SSC; 40% w/v Dextransulfat; 2 mg/ml BSA; 400mM  
Ribonucleoside Vanadyl Complex (New England Biolabs)

---

Primer für Hybridisierungssonden:

ACTB\_fwd: 5' - agc aca gag cct cgc ctt t - 3'  
ACTB\_rev: 5' - ggt gtg cac ttt tat tca act gg - 3'  
ncRNA152\_for: 5' - agc atg cat ctc gtt cc - 3'  
ncRNA152\_rev: 5' - ttc tgt ttt ctt tag ttt tgc - 3'

---

### Hybridisierung

Vor dem Hybridisieren der Sonde wurden die Objektträger in einer aufsteigenden Ethanol-Reihe (80%, 95% und 100%) für jeweils 3 Minuten dehydriert und anschließend luftgetrocknet. Danach wurden je 10µl der vorbereiteten Hybridisierungssonde auf die Zellen gegeben und das Ganze mit einem Deckgläschen bedeckt. Die Hybridisierung erfolgte über Nacht bei 37°C in einer Feuchtekammer. Dabei lagert sich die fluoreszenz-markierte Sonde an komplementäre Nukleinsäuresequenzen an. Die Deckgläschen wurden am nächsten Tag wieder entfernt und die Objektträger dreimal in frisch hergestelltem 50%-igem Formamid (in 2x SSC, pH 7.2) bei 42°C gewaschen, um ungebundene Sonden zu entfernen. Auch der folgende fünfminütige Waschschrift in 2x SSC bei 42°C wurde dreimal wiederholt. Anschließend wurde das Chromatin im Zellkern mit 4',6-Diamidino-2-

phenylindol-dihydrochlorid (DAPI) gegengefärbt. Dazu wurden 10 µl ProLong® Gold antifade reagent with DAPI (LIFE Technologies) auf die Zellen gegeben und ein Deckgläschen zum Eindeckeln benutzt. Nachdem eventuell vorhandene Luftbläschen durch leichten Druck auf das Deckglas entfernt wurden, wurde zur Konservierung durchsichtiger Nagellack an den Kanten des Deckgläschens aufgetragen.

### **Fluoreszenzmikroskopie**

Die Auswertung der Fluoreszenz in situ Hybridisierung erfolgte mit Hilfe eines inversen Axio Observer.Z1 Fluoreszenzmikroskops von Carl Zeiss. Für die Aufnahme mehrdimensionaler Bilder wurde das Bildaufnahmeprogramm ZEN 2010 (Version 6.0, Carl Zeiss) verwendet. Mit einem 63x Öl-Objektiv (Auflösung 0,23 µm) wurden unter Verwendung der jeweiligen spezifischen Parametern die DAPI- und FITC-Fluoreszenz sowie ein Durchlichtbild aufgenommen. Um dreidimensionale Bilder zu generieren, wurden Aufnahmen des Präparates in bis zu 30 Ebenen und einem Intervall von 0,3 µm angefertigt. Die Auswertung und Bearbeitung wurde mit der Bildbearbeitungssoftware AxioVision 40 (V 4.8.2.0, Carl Zeiss) durchgeführt. Helligkeit und Kontrast der einzelnen Bilder wurden optimiert und eine 3D-Rekonstruktion mit der Oberflächen-Rendering-Methode erstellt. Die dreidimensionalen Bilder zeigen die kombinierten DAPI- und FITC-Färbungen und veranschaulichen die Lokalisation der Ziel-RNA innerhalb der Zelle.

### **2.3.7 Gewebe- und Patientenproben**

*Buffy Coats* zur Gewinnung von primären humanen PBMCs wurden vom Institut für Transfusionsmedizin (Universitätsklinikum Leipzig) bezogen.

Die in dieser Arbeit verwendeten RNA-Proben verschiedener Gewebe stammen aus dem FirstChoice® Human Total RNA Survey Panel von Ambion. Die Proben dieser Sammlung bestehen jeweils aus einem Pool von mindestens drei gesunden Spendern.

Patientenproben wurden freundlicherweise von Dr. Renate Burger von der Universität Kiel zur Verfügung gestellt. Die Entnahme der Gewebeproben erfolgte im unbehandelten Zustand der Patienten in der Regel direkt nach der Erstdiagnose.

<b>Patient</b>	<b>Geschlecht</b>	<b>Erkrankung</b>	<b>Gewebe</b>	<b>Plasmazellgehalt</b>
1	W	Plasmazelleukämie (primär)	Peripheres Blut	88%
2	W	Multiples Myelom mit leukämischer Aussaat	Peripheres Blut	94%
6	W	Multiples Myelom	Knochenmark	15%
7	W	Multiples Myelom	Knochenmark	20%
8	M	Multiples Myelom	Knochenmark	40%
9	M	Multiples Myelom	Knochenmark	10% - 15%
10	M	Multiples Myelom	Knochenmark	50%
11	M	Multiples Myelom	Knochenmark	50%
12	M	Multiples Myelom	Pleuraerguss	87%

## **3 Ergebnisse**

### **3.1 Identifizierung und Charakterisierung neuer STAT3-regulierter ncRNA-Gene**

Durch den Fortschritt in der Entwicklung neuer Technologien ist es Wissenschaftlern seit einigen Jahren möglich das gesamte Transkriptom von Zellpopulationen zu analysieren. Mit Hilfe von hochauflösenden Tiling Arrays, die das gesamte Genom abbilden, oder Sequenzierungen können auch bisher noch nicht charakterisierte und nicht-kodierende Transkripte untersucht werden. Unter der Annahme, dass Transkripte, die durch essentielle Signalwege reguliert werden, sehr wahrscheinlich funktionell sind, wurden lange nicht-kodierende RNAs analysiert, die in Abhängigkeit des STAT3-Aktivierungszustandes differentiell exprimiert werden. Die identifizierten, STAT3-regulierten Transkripte sollten anschließend näher charakterisiert werden.

#### **3.1.1 Genomweite Untersuchung STAT3-regulierter ncRNAs**

Die Arbeitsgruppe von Professor Horn hat genomweite Untersuchungen durchgeführt, um neue, potentiell funktionelle, lange nicht-kodierende RNAs zu finden, die durch den proliferativen und anti-apoptotischen STAT3-Signalweg reguliert werden. Hierfür wurde die Multiple Myelom-Zelllinie INA-6 verwendet, deren Überleben von Interleukin-6 abhängig ist<sup>164</sup>. In diesen Zellen wird zudem das IL-6-Signal fast ausschließlich über den Transkriptionsfaktor STAT3 vermittelt<sup>88</sup>. Für die systematische Suche nach langen, STAT3-regulierten, nicht-kodierenden RNAs wurden Tiling Arrays benutzt. Diese Arrays bilden das gesamte, nicht-repetitive menschliche Genom unverfälscht ab und ermöglichen somit die Untersuchung von neuen unbekanntem Transkripten.

RNA wurde aus INA-6-Zellen in drei verschiedenen Zuständen präpariert. Ein Ansatz wurde für 13 Stunden ohne Interleukin-6 kultiviert und somit der für das Überleben dieser Zellen essentielle STAT3-Signalweg ausgeschaltet. Die INA-6-Zellen können zu diesem Zeitpunkt durch die erneute Zugabe von Interleukin-6 noch vor der Apoptose bewahrt werden. In einem zweiten Ansatz wurden die Zellen nach 12-stündigem IL-6-Entzug für eine Stunde mit dem Zytokin restimuliert, sodass in diesen Zellen frühe und transiente STAT3-Zielgene induziert sind. Der dritte Ansatz beinhaltete permanent mit Interleukin-6 kultivierte INA-6-Zellen, bei denen STAT3 ein kontinuierliches anti-apoptotisches Signal vermittelt. Die RNA-Qualität wurde mit einem Agilent Bioanalyser überprüft und die erfolgreiche Aktivierung

des STAT3-Signalwegs über die Induktion von Zielgenen (JUNB, PIM1 und SOCS3) mittels quantitativer *real-time* PCR kontrolliert. Die Fluoreszenzmarkierung und Hybridisierung der Proben sowie das Auslesen der Fluoreszenzsignale und eine bioinformatische Aufarbeitung der Daten wurde von der RNomics Arbeitsgruppe des Fraunhofer Instituts für Immunologie und Zelltherapie durchgeführt. Insgesamt zeigen die Ergebnisse der Tiling Arrays eine rege IL-6-abhängige Transkriptionsaktivität sowohl von Protein-kodierenden Genen als auch in intronischen Bereichen und außerhalb bekannter Gene. Die Tiling Array-Daten wurden von Professor Horn weitergehend manuell im Integrated Genome Browser ausgewertet (siehe 2.1.1). Dabei wurden 20 sehr lange, differentiell exprimierte macroRNAs entdeckt, die nicht mit bekannten Genen der RefSeq-Annotation zusammenfallen (Genomversion hg18, März 2006). Diese Transkripte umfassen intergenische oder intronische Bereiche von bis zu 400 Kilobasen und wurden *STAT3-induced RNAs* (STAIRs) genannt.

### 3.1.1.1 Charakterisierung der STAIRs

Sechs der mittels Tiling Array-Analyse identifizierten STAIRs wurden ausgewählt und im Rahmen dieser Arbeit näher untersucht (Tab. I). Für die weitere Charakterisierung dieser STAIRs wurden von Dr. Kristin Reiche (AG RNomics) generierte bigBed-Dateien der stark exprimierten Intervalle sowie die normalisierten Expressionsdaten im UCSC Genome Browser dargestellt (siehe auch 2.1.1). Zusätzlich wurde der RefSeq Genes Track, der humane Protein-kodierende und nicht-kodierende Gene der NCBI RNA reference sequences collection (RefSeq) beinhaltet, benutzt, um bekannte Gene in der Umgebung der ausgewählten Transkripte anzuzeigen. Bei der visuellen Betrachtung ist zu erkennen, dass die STAIRs nach IL-6-Entzug in INA-6-Zellen nur schwach exprimiert sind (Abb. 3.1\_B – 3.6\_B; Seite 59 - 64). Nach einstündiger Restimulation wurden dann auf den Tiling Arrays starke Signale über Intervalle von bis zu 120 Kilobasen detektiert. Aufgrund der Ungenauigkeiten der Tiling Array-Daten und der repetitiven Bereiche, die auf diesen Arrays nicht abgebildet sind, lässt sich anhand der Fluoreszenzsignale nicht eindeutig feststellen, ob es sich um kontinuierliche macroRNAs handelt. Bei permanenter Kultivierung mit Interleukin-6 verlängert sich das transkribierte Intervall bei STAIR1 und STAIR2 noch weiter (Abb. 3.1\_B und 3.2\_B), wobei der Transkriptionsstart mit dem nach Restimulation übereinzustimmen scheint. Da die RNA-Polymerase II zwischen 1,3 und 4,3 Kilobasen pro Minute synthetisieren kann<sup>165</sup>, was einem Transkript von 80 bis 275 Kilobasen pro Stunde entsprechen würde, liegt die Vermutung nahe, dass es sich bei den STAIRs um kontinuierliche Transkripte handelt, deren Länge von der Geschwindigkeit der Polymerase begrenzt ist. Somit entsprechen die nach permanenter IL-6-Stimulation detektierten Bereiche der Gesamtlänge der STAIRs.

Des Weiteren zeigen die STAIRs einen Abfall der Signalintensität über die Länge des Transkriptes, wodurch sich das exakte 3'-Ende der macroRNAs nur schwer bestimmen lässt. Dieses Phänomen lässt sich ebenfalls bei den Fluoreszenzsignalen längerer intronischer Bereiche Protein-kodierender Gene beobachten<sup>166</sup>, sodass man auch demzufolge darauf schließen kann, dass die STAIRs kontinuierliche macroRNAs mit einem einzigen Transkriptionsstart darstellen.

Vergleicht man die differentiell exprimierten Bereiche mit den Genen der RefSeq-Annotation (Abb. 3.1\_C – 3.6\_C), zeigt sich, dass fünf der Transkripte in intergenischen Regionen liegen, das heißt sie überlappen nicht mit bekannten Protein-kodierenden Genen, nur STAIR2 (Abb. 3.2) befindet sich im Intron des Protein-kodierenden Gens DCC (*deleted in colorectal carcinoma*). Außerdem fällt STAIR3 mit dem vorhergesagten Gen C20orf103 zusammen (Abb. 3.3). Die hypothetische mRNA erstreckt sich genau über die Länge des STAIR3 und liegt auf dem Plusstrang von Chromosom 20. C20orf103 weist sechs Exons auf und besitzt einen potentiellen offenen Leserahmen, der ein 281 aminosäurelanges Protein kodieren könnte. Im 3' Bereich von STAIR6 liegt die noch nicht validierte microRNA 138-1. Des Weiteren überlappt STAIR15 (Abb. 3.5) mit der annotierten nicht-kodierenden RNA *myocardial infarction associated transcript* (MIAT). Allerdings lassen die Tiling Array-Signale die Exon-Intron-Struktur der gespleißten MIAT RNA nicht deutlich wiedererkennen, sodass nicht bestimmt werden kann, ob STAIR15 mit MIAT identisch ist oder es sich um ein alternatives Transkript handelt. Im Bereich von STAIR18 ist auf dem Minusstrang von Chromosom 2 die vorhergesagte, nicht-kodierende RNA LOC541471 annotiert (Abb. 3.6). Der vermerkte Transkriptionsstart dieser gespleißten ncRNA fällt genau mit einem Ende von STAIR18 zusammen, das sich anhand des plötzlich ansteigenden Fluoreszenzsignals deutlich von der Umgebung abgrenzt. Die kürzere Transkriptvariante 2 dieser hypothetischen nicht-kodierenden RNA liegt innerhalb des differentiell exprimierten Bereiches, die längere Isoform 1 ragt über STAIR18 hinaus.

Eine mögliche Prozessierung der STAIRs kann anhand der Tiling Array-Daten nicht eindeutig nachgewiesen werden. Auch die Orientierung der differentiell exprimierten Bereiche lässt sich an den Tiling Array-Signalen normalerweise nicht ablesen, nur die abnehmende Fluoreszenzintensität der über 100 Kilobasen langen Transkripte gibt einen Hinweis auf den codogenen Strang. Wie in den Abbildungen 3.1\_B, 3.2\_B und 3.4\_B ersichtlich nimmt das Fluoreszenzsignal von STAIR1, STAIR2 und STAIR6 von links nach rechts ab. Demnach liegen diese Transkripte wahrscheinlich auf dem Plusstrang. Darauf weist auch die zunehmende Transkriptlänge von STAIR1 und STAIR2 in diese Richtung nach permanenter IL-6-Stimulation hin. Das Tiling Array-Signal von STAIR18 nimmt in Abbildung 3.6\_B hingegen von rechts nach links ab, was darauf hindeutet, dass die Transkription vom Minusstrang erfolgt wie auch das überlappende LOC541471. Bei den nur 17 und 20 Kilobasen langen

Transkripten von STAIR3 und STAIR15 lässt sich kein Abfall der Fluoreszenzintensität über die Länge beobachten, somit ergibt sich auch kein Hinweis auf deren Orientierung.

**Tab. I: Charakterisierung der STAIRs.**

Transkript	Position (Genomversion hg18)	Länge	Genomische Region	Ableitung der Orientierung	
				Fluoreszenz- intensität	Histon- modifikation
<b>STAIR1</b>	Chr18: 39.841.200 - 40.261.200	400 kb	intergenisch	+	k. A.
<b>STAIR2</b>	Chr18: 48.174.300 - 48.474.300	300 kb	intronisch	+	k. A.
<b>STAIR3</b>	Chr20: 9.443.000 - 9.460.000	17 kb	intergenisch	k. A.	+
<b>STAIR6</b>	Chr3: 44.009.300 - 44.139.300	130 kb	intergenisch	+	+
<b>STAIR15</b>	Chr22: 25.382.800 - 25.402.800	20 kb	intergenisch	k. A.	k. A.
<b>STAIR18</b>	Chr2: 111.869.700-111.969.700	100 kb	intergenisch	-	-

### Evolutionäre Konservierung

Im nächsten Schritt wurde die Sequenzähnlichkeit in verschiedenen Wirbeltieren analysiert. Dazu wurde der Vertebrate Multiz Alignment & Conservation Track des UCSC Genome Browsers, der die evolutionäre Konservierung in 17 Vertebraten darstellt, verwendet. Die Exons wichtiger Protein-kodierender Gene sind meist stark konserviert, da eine einzige Mutation ein Protein wesentlich verändern kann und dies meist einen negativen Einfluss auf dessen Funktion hat. Nicht-kodierende RNAs sind hingegen meist durch eine schwache Sequenzkonservierung gekennzeichnet, da sie oft eine strukturabhängige Funktion ausführen und die RNA-Struktur weitaus weniger anfällig für Sequenzunterschiede ist<sup>12</sup>. Die STAIRs beinhalten einige kurze in Mammalia konservierte Domänen, allerdings sind sie insgesamt nicht stark konserviert (Abb. 3.1\_E – 3.6\_E). Im STAIR3-Locus fällt auf, dass sich genau an den Positionen der Exons des hypothetischen C20orf103 Gens kurze konservierte Bereiche befinden (Abb. 3.3\_C+E). Dies ist ein Hinweis auf die Existenz dieses vorhergesagten Gens. Die Tiling Array-Signale könnten die Exon-Intron-Struktur von C20orf103 erahnen lassen (Abb. 3.3\_B). Da das Fluoreszenzsignal jedoch über das gesamte Transkript sehr hoch ist, wird STAIR3 vermutlich eine kontinuierliche macroRNA darstellen. STAIR3 könnte demnach das Primärtranskript der potentiellen C20orf103 mRNA sein. Eine mögliche Prozessierung der macroRNA zur mRNA lässt sich aus den Tiling Array Daten nicht eindeutig ableiten. Analysiert man die Konservierung im Bereich von STAIR15, fällt auf, dass die Exons der überlappenden nicht-kodierenden RNA MIAT nicht gut erhalten sind (Abb.

3.5\_C+E). Konserviert sind lediglich der Promotor sowie ein Teil des letzten Exons von MIAT. Gleiches lässt sich für das mit STAIR18 überlappende LOC541471 feststellen – auch hier ist die Sequenz des Promotors, nicht aber die der Exons der vorhergesagten, ncRNA konserviert. Demnach zeigt sich auch anhand der hier untersuchten Transkripte, dass die Sequenz nicht-kodierender RNAs kaum konserviert wird und keinem großen Selektionsdruck unterliegt.

### **Histonmodifizierungen**

Hinweise zur Transkriptionsregulation der STAIRs wurden mit Hilfe bekannter Histonmodifizierungen der ENCODE Tracks analysiert. Das einfach methylierte Lysin 4 (H3K4Me1) sowie ein acetyliertes Lysin 27 von Histon 3 (H3K27Ac) deuten auf eine aktiv transkribierte Region hin. Ist Lysin 4 des Histons hingegen trimethyliert (H3K4Me3), lässt dies auf einen Promotorbereich schließen. Allerdings beträgt die Auflösung dieser Histonmarkierungen nur etwa 200 Basen und nicht alle Gene weisen diese Kennzeichnung auf. Für die sehr langen Regionen von STAIR1 und STAIR2 zeigen die ENCODE Tracks keine deutlichen Histonmodifikationen, sodass keine weiteren Rückschlüsse über die Regulation der Transkription in diesen Bereichen gezogen werden können (Abb. 3.1\_D und 3.2\_D). Hingegen findet man an einem Ende von STAIR3 einen Bereich von zwei Kilobasen, der durch eine H3K4Me3-Markierung gekennzeichnet ist (Abb. 3.3\_D). Dies deutet auf einen Promotor hin und würde dafür sprechen, dass STAIR3 von diesem Ende aus transkribiert wird und somit auf dem Plusstrang liegt. Des Weiteren findet man innerhalb des exprimierten Bereiches auch H3K4Me1- und H3K27Ac-Modifikationen, die auf Transkriptionsaktivität hindeuten. Auch STAIR6 besitzt die charakteristischen Histonmarkierungen eines RNA-Polymerase-II-Genes, die Promotor-assoziierte Modifikation H3K4Me3 am Anfang und H3K4Me1 sowie H3K27Ac über den gesamten transkribierten Bereich (Abb. 3.4\_D). Neben dem abnehmenden Tiling Array-Signal in diese Richtung ist dies ein weiterer Hinweis, dass STAIR6 auf dem Plusstrang von Chromosom 3 kodiert ist. Bei STAIR15 existieren an beiden Enden konservierte Bereiche, die die H3K4Me3-Markierung aufweisen (Abb. 3.5\_D). Auf der einen Seite kennzeichnet diese den Promotor der überlappenden nicht-kodierenden RNA MIAT. Die Modifikation am anderen Ende von STAIR15, im letzten Exon von MIAT lokalisiert, könnte auf einen weiteren Promotor möglicherweise eines Antisense-Transkriptes hindeuten. Die Histonmarkierung für aktive Transkription, H3K4Me1, findet sich im gesamten Bereich von MIAT und darüber hinaus. Die aktive H3K27Ac-Modifikation ist hingegen im 3'-Bereich von MIAT konzentriert, überlappend mit der H3K4Me1-Kennzeichnung. Hieraus ergeben sich zwei Möglichkeiten. STAIR15 könnte das Primärtranskript von MIAT repräsentieren oder aber eine antisense RNA zu MIAT darstellen, deren Promotor im 3'-Exon von MIAT lokalisiert ist. STAIR18 ist an einer Seite durch eine H3K4Me3-Markierung gekennzeichnet (Abb. 3.6\_D). An dieser Position wird der exprimierte Bereich durch das Tiling Array-Signal auch deutlich von der



Umgebung abgegrenzt, somit liegt die Vermutung nahe, dass hier der Promotor und der Transkriptionsstart von STAIR18 liegen. Demzufolge würde STAIR18 wie das überlappende LOC541471-Gen vom Minusstrang transkribiert werden, worauf bereits das in diese Richtung abfallende Fluoreszenzsignal hingedeutet hat. Die mit aktiver Transkription assoziierten Histonmodifikationen H4K4Me3 und H3K27Ac wurden über den gesamten Bereich von STAIR18 und auch darüber hinaus sehr häufig detektiert, sodass die macroRNA die charakteristische Kennzeichnung eines RNA-Polymerase-II-Genes trägt.

### **Überlappende ESTs**

Zur weiteren Charakterisierung der STAIRs wurden diese im UCSC Genome Browser mit gespleißten und ungespleißten humanen *expressed sequence tags* (EST) verglichen. ESTs sind kurze sequenzierte cDNAs, die normalerweise Fragmente transkribierter Gene repräsentieren. Ungespleißte ESTs, die nur einmal sequenziert wurden, haben an sich noch keine große Aussagekraft. Findet man sie hingegen in einem Locus konzentriert, deutet dies auf eine rege Transkription in diesem Bereich hin. Des Weiteren könnten mit den STAIRs überlappende gespleißte ESTs Hinweise auf eine mögliche Prozessierung der macroRNAs geben.

Im Bereich von STAIR1 findet man drei gespleißte ESTs, die antisense zu der vermuteten Orientierung der macroRNA liegen (Abb. 3.1\_F). Diese ESTs erstrecken sich nicht über einen wesentlichen Teil des differentiell exprimierten Bereiches beziehungsweise beschränken sich nicht auf diesen. Des Weiteren gibt es einige ungespleißte ESTs in diesem Locus, die meisten davon konzentrieren sich in einem konservierten Bereich im 5'-Teil von STAIR1. Untersucht man diese Region genauer, stellt sich heraus, dass es sich hierbei wahrscheinlich um ein durch Retrotransposition entstandenes Pseudogen von Keratin 8 (KRT8) handelt, das sich mehrfach im Genom wiederfinden lässt. Deutliche Hinweise auf eine Prozessierung von STAIR1 ergeben sich aus diesen Beobachtungen nicht.

Bei der Analyse vorhandener ESTs im Bereich von STAIR2 findet man gespleißte ESTs, die mit der DCC mRNA übereinstimmen (Abb. 3.2\_F). Zusätzlich existieren im ersten Intron von DCC ungefähr 20 einzelne ungespleißte ESTs, die sich über die gesamte Länge von STAIR2 verteilen. Auf eine möglich posttranskriptionelle Modifizierung von STAIR2 lässt dieses Ergebnis nicht schließen.

Im STAIR3-Locus existieren mehrere gespleißte ESTs, die mit der vorhergesagten C20orf103 mRNA übereinstimmen (Abb. 3.3\_F). Ein weiteres gespleißtes EST beginnt am 5'-Ende des potentiellen Gens, wird allerdings vom Antisense-Strang transkribiert und liegt größten Teils außerhalb des Bereiches von STAIR3. Zusätzlich gibt es ein ungespleißtes ESTs kurz vor dem letzten Exon des vorhergesagten Gens sowie mehrere überlappend mit der 5'- und

3'-UTR von C20orf103. Deutliche Hinweise auf Transkription in diesem Bereich neben dem hypothetischen C20orf103 Gen ergeben sich aus diesen Beobachtungen nicht.

Analysiert man die sequenzierten cDNAs im Bereich von STAIR6, findet man nur kurze ungespleißte Sequenzen (Abb. 3.4\_F). Diese verteilen sich über die gesamte Region mit einer Häufung am potentiellen Transkriptionsstart, überlappend mit der H3K4Me3-Markierung (Abb. 3.4\_D), sowie einem noch größeren EST-Cluster am 3'-Ende der macroRNA, der auch ein etwas stärkeres Tiling Array-Signal (Abb. 3.4\_B) aufweist. Demzufolge scheint vor allem der elf kilobasenlange 3'-Bereich von STAIR6, in dem sich insgesamt 70 ESTs befinden, stark exprimiert zu werden. Die darin lokalisierte potentielle microRNA 138-1 (Abb. 3.4\_C) deutet darauf hin, dass es sich hierbei um deren Primärtranskript handeln könnte.

Im STAIR15-Locus lassen sich gespleißte ESTs finden, die Fragmente von MIAT repräsentieren, sowie ungespleißte ESTs überlappend mit dem letzten Exon dieses Gens (Abb. 3.5\_F). Ausgehend von der H3K4Me3-Histonmodifikation (Abb. 3.5\_D) im 3'-Exon der annotierten ncRNA, die einen potentiellen Promotor kennzeichnet, existieren gespleißte ESTs in 5'- sowie 3'-Richtung. Es gibt keinen Hinweis auf Antisense-Transkripte zur annotierten ncRNA, die einen wesentlichen Teil von STAIR15 überspannen. Demzufolge repräsentiert die differentiell exprimierte macroRNA am wahrscheinlichsten das Primärtranskript von MIAT.

Im Bereich von STAIR18 existieren zahlreich ESTs (zusammengefasst in Abb. 3.6\_F). Es wurden fast 80 cDNAs sequenziert, die mit der kurzen gespleißten Transkriptvariante 2 der LOC541471 ncRNA übereinstimmen. Gut 30 ESTs entsprechen der längeren Isoform 1 und weitere 30 gespleißte cDNAs zeigen diese Transkriptvariante noch um zwei bis drei 3'-Exons verlängert. Des Weiteren findet man zwei gespleißte ESTs, die innerhalb des Introns im 5'-Teil des putativen LOC541471 Gens beginnen und in antisense Richtung über das Gen hinaus transkribiert werden. Diese Resultate zeigen, dass die vorhergesagte ncRNA LOC541471 tatsächlich in verschiedenen Transkriptvarianten exprimiert wird. STAIR18 könnte das Primärtranskript dieser nicht-kodierenden RNA repräsentieren.

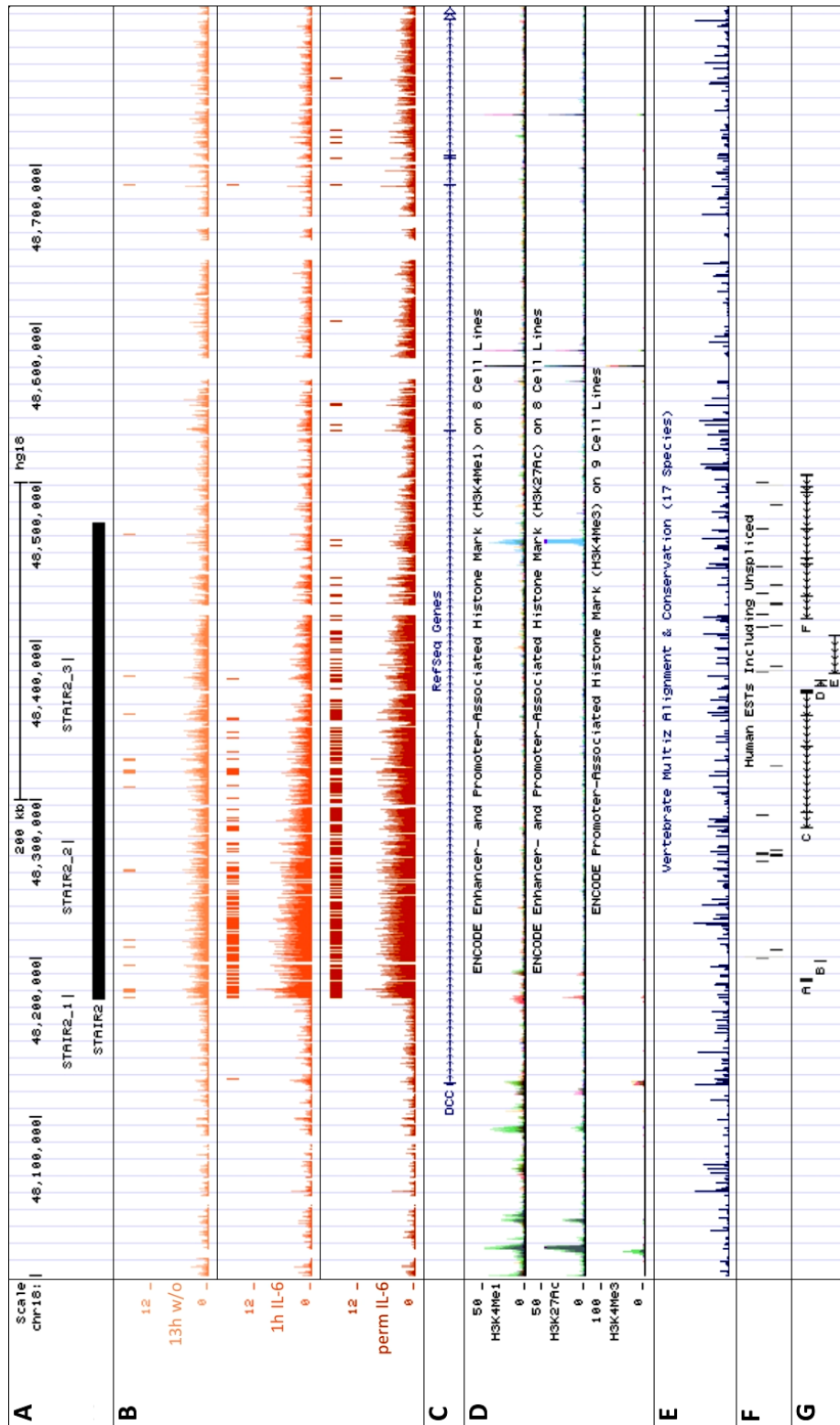
### **Protein-kodierendes Potential**

Zur Stärkung der Hypothese, dass es sich bei den STAIRs um nicht-kodierende RNAs handelt, wurden bioinformatische Methoden angewandt, um deren Protein-kodierendes Potential abzuschätzen. Viele Programme untersuchen *open reading frames* (ORF) lediglich über das Vorhandensein möglicher Start- und Stoppcodone. Auf diese Weise werden vor allem kleine ungespleißte ORF gefunden, die kurze Peptide kodieren könnten. Da die STAIRs sehr lange Bereiche umfassen, werden mit dieser Methode nur aufgrund der Sequenzlänge zahlreiche potentielle ORF angezeigt. Die Ergebnisse liefern daher keine zusätzlichen

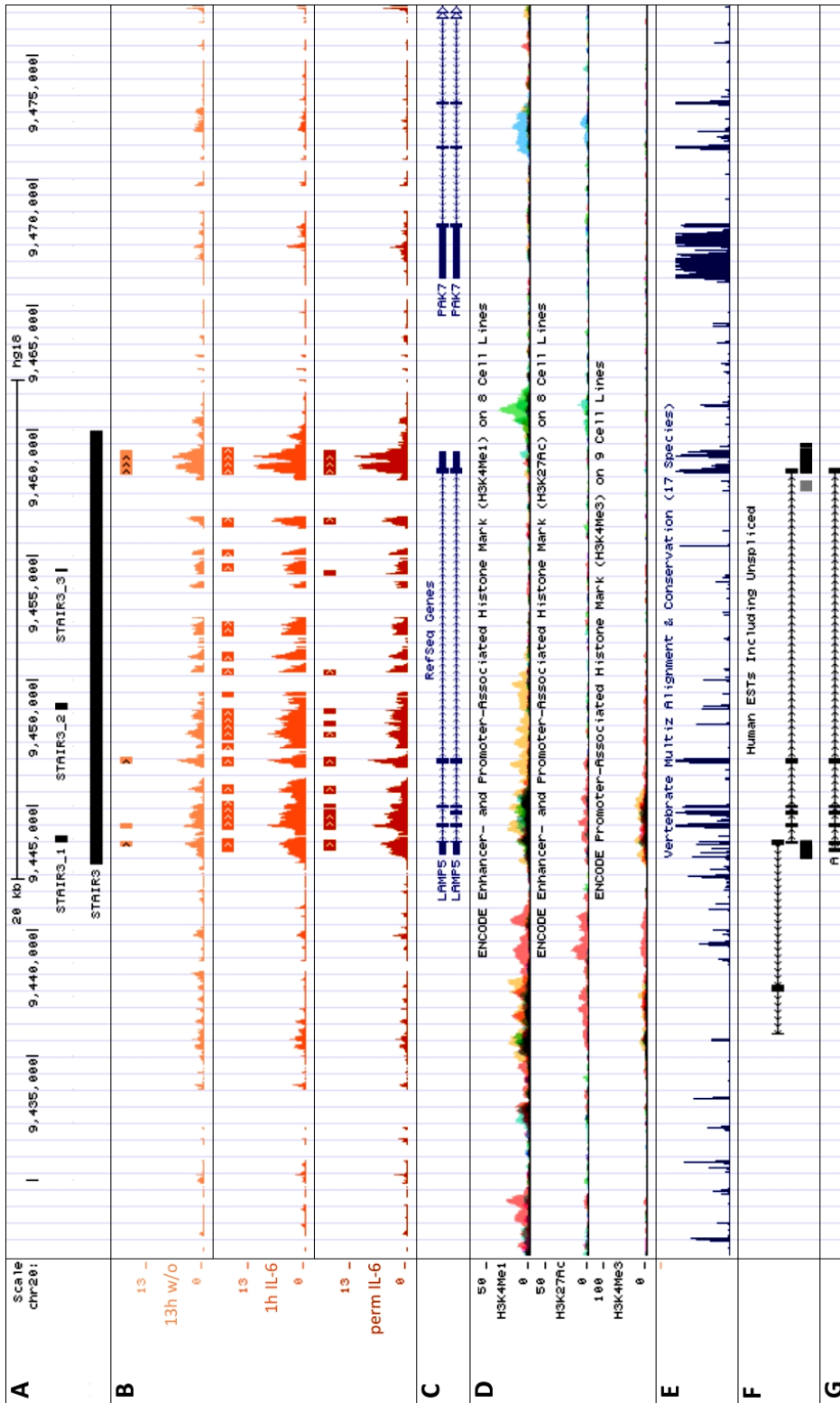
Erkenntnisse, solange sie nicht mit weiteren Daten abgeglichen werden. Für die STAIRs wurde daher eine GENSCAN-Analyse durchgeführt. Der dabei verwendete Algorithmus untersucht Sequenzen auf das Vorhandensein von ORFs unter Beachtung potentieller Exon-Intron-Strukturen<sup>167</sup>. Die Resultate der Analyse wurden im UCSC Genome Browser dargestellt (Abb. 3.1\_G – 3.6\_G). Die mittels GENSCAN-Algorithmus ermittelten potentiellen Protein-kodierenden Transkripte im Bereich von STAIR1 und STAIR2 (Abb. 3.1\_G und 3.2\_G) erstrecken sich nicht über einen wesentlichen Teil der differentiell exprimierten Bereiche beziehungsweise sind antisense zur angenommenen Orientierung der macroRNAs, auch mit den annotierten ESTs (Abb. 3.1\_F und 3.2\_F) stimmen sie nicht überein. Daher scheinen in den Regionen von STAIR1 und STAIR2 keine Proteine kodiert zu sein. Im Bereich von STAIR1 sind die Transkripte E (vorhergesagtes Peptid 200 Aminosäuren lang) und H (vorhergesagtes Peptid 467 Aminosäuren lang) am interessantesten (Abb. 3.1\_G), da sie die gleiche Orientierung wie die macroRNA besitzen und eine potentielle Kozak-Sequenz aufweisen, die möglicherweise von Ribosomen erkannt werden kann und die Proteinbiosynthese initiiert. Innerhalb der STAIR2-Region wurde nur das kurze Transkript D (vorhergesagtes Peptid 88 Aminosäuren lang) vorhergesagt, dessen Orientierung mit der der macroRNA übereinstimmt und eine potentiell Kozak-Sequenz besitzt (Abb. 3.2\_G). Im STAIR3-Locus findet man mit der GENSCAN-Analyse ein Transkript, das bis auf das erste Exon mit den vorhandenen gespleißten ESTs und somit auch mit der vorhergesagten C20orf103-mRNA identisch ist (Abb. 3.3\_G). Dies zeigt, dass der verwendete Algorithmus sehr gut geeignet ist, um ORFs zu finden. Des Weiteren liegt die Vermutung nahe, dass die STAIR3 macroRNA weiter zur C20orf103-mRNA prozessiert werden kann, eine putative Kozak-Sequenz ist vorhanden. Die im Bereich von STAIR6 ermittelten GENSCAN-Transkripte A, C und D sind antisense zur vermuteten Orientierung (Abb. 3.4\_G). Transkript B würde auf dem gleichen Strang wie die STAIR6 macroRNA liegen, allerdings gleicht die Sequenz um das Startcodon keiner Kozak-Sequenz und bisher wurde noch keine passende cDNA sequenziert, sodass es keinen Hinweis darauf gibt, dass dieser offene Leserahmen wirklich abgeschrieben und translatiert wird. Im STAIR15-Locus lassen sich mit der GENSCAN-Analyse zwei potentielle offene Leserahmen ermitteln (Abb. 3.5\_G). Transkript A umspannt einen großen Teil von STAIR15 und könnte ein 46 Aminosäure langes Peptid kodieren. Allerdings weißt dieser ORF keine Kozak-Sequenz auf und es wurde auch noch kein passendes EST detektiert. Zusätzlich findet man mit GENSCAN im 3'-Exon von MIAT ein Antisense-Transkript B mit einem 153 Nukleotide-langen offenen Leserahmen, das möglicherweise ausgehend von der dort lokalisierten Promotor-assoziierten Histonkennzeichnung transkribiert werden könnte. Ein annotierter EST, der dieser vermeintlichen mRNA entspricht, wurde zuerst als Hinweis auf die Existenz des Protein-kodierenden Transkriptes interpretiert, allerdings stellte sich heraus, dass dieser EST durch Exon-Amplifikation generiert wurde<sup>168</sup> und somit die tatsächliche Expression noch nicht nachgewiesen worden ist. Selbst für den Fall, dass dieses Transkript eventuell sehr Zelltypspezifisch exprimiert wird, ist eine Translation in ein Peptid unwahrscheinlich, da die

Sequenz kein Startcodon aufweist und somit auch keine Kozak-Sequenz vorhanden ist, die von den Ribosomen erkannt werden kann und die Proteinbiosynthese initiiert. Im Bereich von STAIR18 lassen sich mit dem GENSCAN-Algorithmus drei potentielle offene Leserahmen finden (Abb. 3.6\_G), aber bei detaillierterer Betrachtung stimmt keines dieser drei Transkripte mit Exons sequenzierter ESTs überein. Zudem weist lediglich Transkript A (vorhergesagtes Peptid 373 Aminosäuren lang) die gleiche Orientierung wie STAIR18 und eine putative Kozak-Sequenz auf. Ob Transkript A wirklich exprimiert und translatiert wird, sollte noch experimentell überprüft werden, aber bis jetzt gibt es dafür keine konkreten Hinweise, daher wird weiter davon ausgegangen, dass STAIR18 eine nicht-kodierende RNA repräsentiert und dessen Transkription nicht zur Synthese eines Proteins dient.





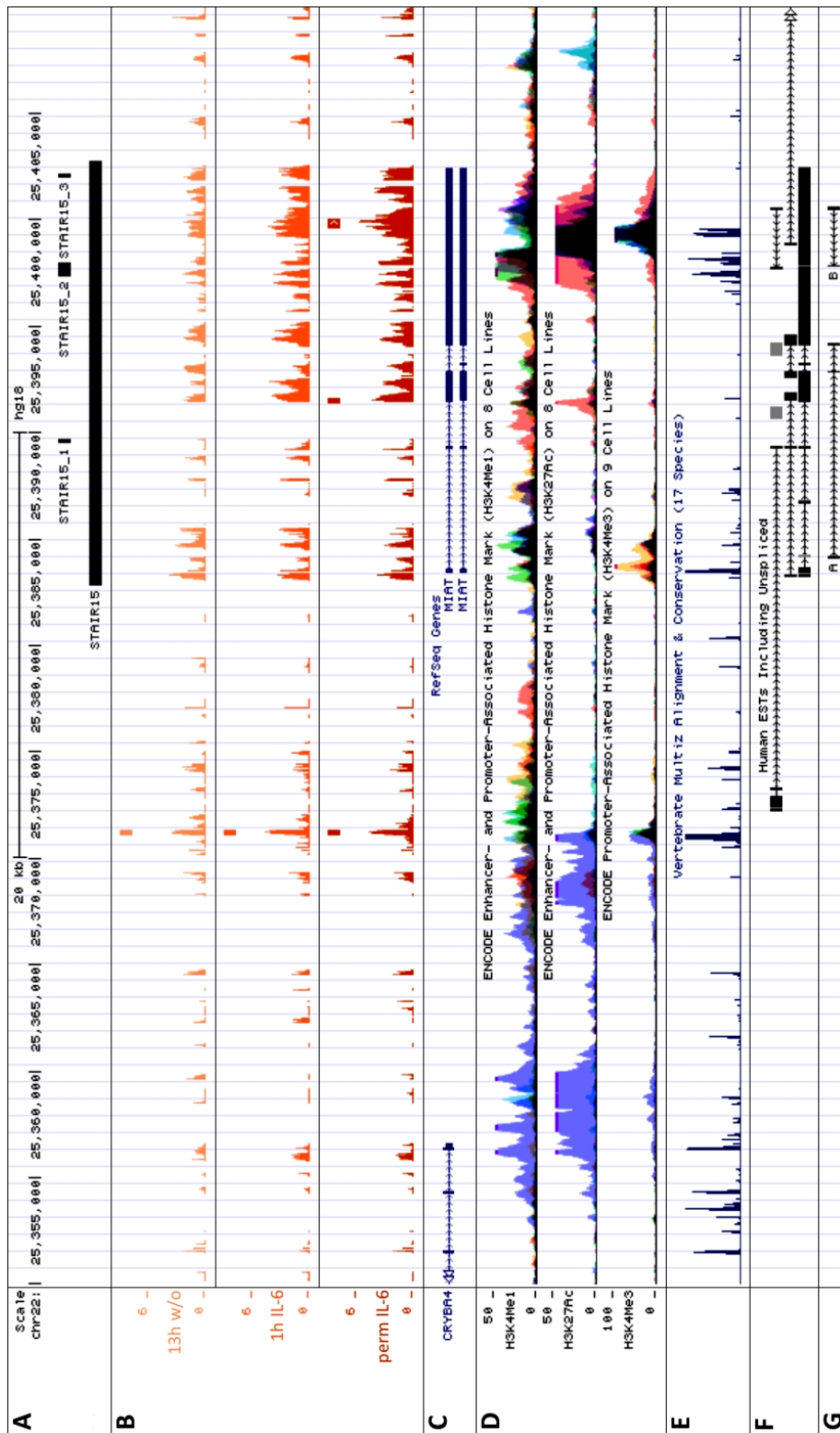
**Abb. 3.2: Darstellung von STAIR2 im genomischen Kontext.** (A) Gezeigt sind aus dem UCSC Genome Browser Chromosomenkoordinaten (hg18-Version), Position der verwendeten Primer und macroRNA. (B) Abbildung der Tiling Array-Daten sowie der stark exprimierten Intervalle von RNA-Proben aus INA-6-Zellen nach 13-stündigen IL-6-Entzug, einstündiger und permanenter Stimulation. Dargestellt sind desweiteren annotierte Gene (C), Histonmodifikationen (D), Konservierung in Vertebraten (E) sowie gespleißte und ungespleißte ESTs im ausgewählten Bereich (F). (G) Dargestellt sind die potentiell protein-kodierende Transkripte der GENSCAN-Analyse. DCC= *deleted in colorectal cancer*, *netrin 1 receptor*



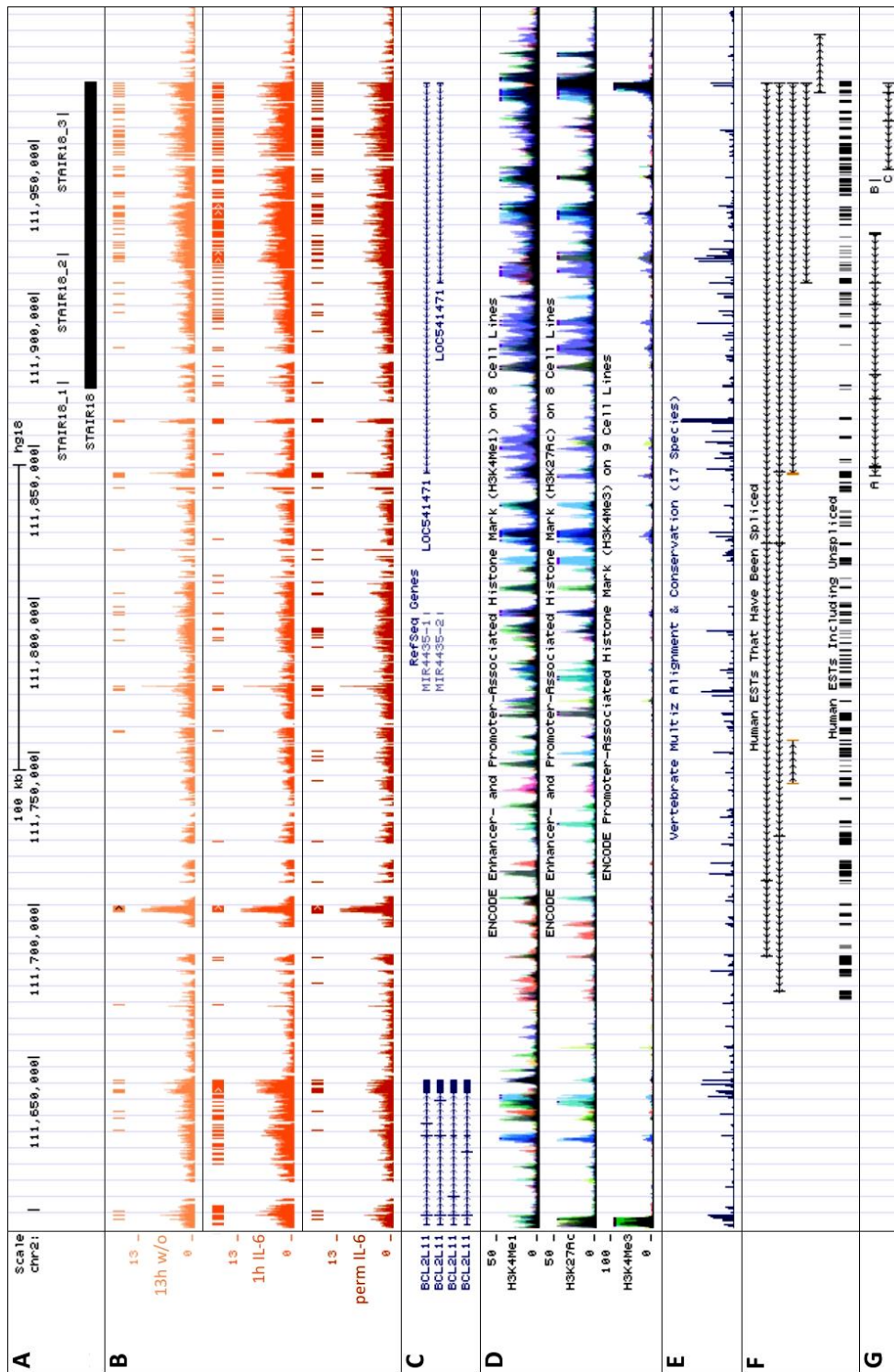
**Abb. 3.3: Darstellung von STAIR3 im genomischen Kontext.** (A) Gezeigt sind Chromosomenkoordinaten (hg18), Position der verwendeten Primer und macroRNA. (B) Abbildung der Tiling Array-Daten sowie der stark exprimierten Intervalle der INA-6-Zellen nach 13-stündigen IL-6-Entzug, einstündiger und permanenter Stimulation. Dargestellt sind desweiteren annotierte Gene (C), Histomodifikationen (D), Konservierung in Vertebraten (E) sowie gespleißte und ungespleißte ESTs im ausgewählten Bereich (F). (G) Dargestellt sind die potentiell Protein-kodierende Transkripte der GENSCAN-Analyse. LAMP5= lysosomal-associated membrane protein 5; PAK7= p21 protein (Cdc42/Rac)-activated kinase 7







**Abb. 3.5: Darstellung von STAIR15 im genomischen Kontext.** (A) Gezeigt sind Chromosomenkoordinaten (hg18-Version), Position der verwendeten Primer und macroRNA. (B) Abbildung der Tiling Array-Daten sowie der stark exprimierten Intervalle der INA-6-Zellen nach 13-stündigen IL-6-Entzug, einständiger und permanenter Stimulation. Dargestellt sind desweiteren annotierte Gene (C), Histonmodifikationen (D), Konservierung in Vertebraten (E) sowie gespleißte und ungespleißte ESTs im ausgewählten Bereich (F). (G) Dargestellt sind die potentiell Protein-kodierende Transkripte der GENSCAN-Analyse. CRYBA4= *crystallin beta A4*; MIRT= *myocardial infarction associated transcript*



**Abb. 3.6: Darstellung von STAIR18 im genomischen Kontext.** (A) Gezeigt sind Chromosomenkoordinaten (hg18-Version), Position der verwendeten Primer und macroRNA. (B) Abbildung der Tiling Array-Daten sowie der stark exprimierten Intervalle von RNA-Proben aus INA-6-Zellen nach 13-stündigen IL-6-Entzug, einstuändiger und permanenter Stimulation. Dargestellt sind desweiteren annotierte Gene (C), Histonmodifikationen (D), Konservierung in Vertebraten (E) sowie gespleißte und ungespleißte ESTs im ausgewählten Bereich (F). (G) Dargestellt sind die potentiell Protein-kodierende Transkripte der GENSCAN-Analyse. BCL2L11= BCL2-like 11

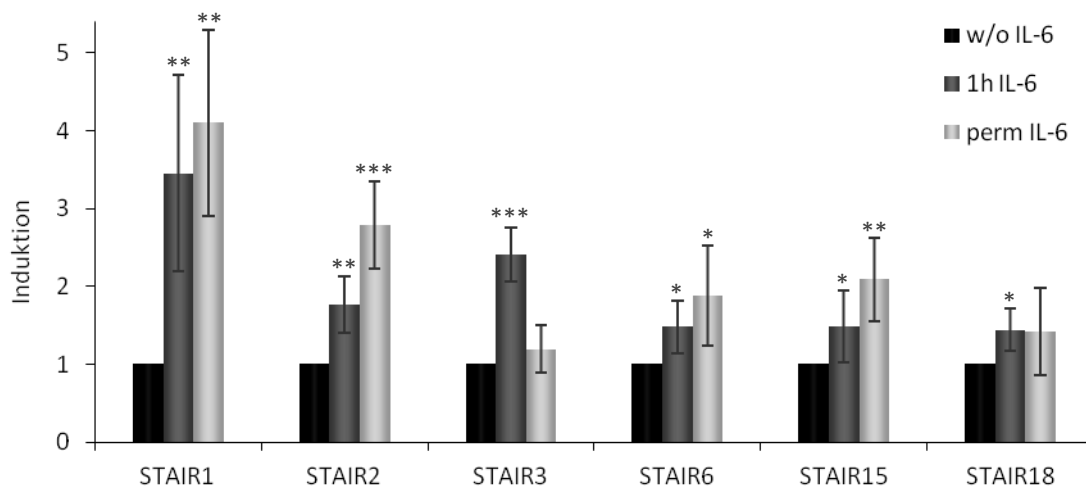
## 3.1.2 Validierung der IL-6-Tiling Array-Daten

### Induktion der STAIRs durch IL-6

Um die Validität des Tiling Array-Experimentes zu untersuchen, wurde die Expression der STAIRs mittels *real-time* PCR nachgemessen. Dazu wurden TaqMan-Primerpaare für die macroRNAs designt. Aus INA-6-Zellen wurde RNA nach 13-stündigem IL-6-Entzug, einstündiger Restimulation oder permanenter Anwesenheit des Zytokins isoliert. Da für die Untersuchung der ungespleißten Transkripte keine exonübergreifenden Primer genutzt werden konnten, wurden die RNA-Proben mit DNase behandelt, um DNA-Verunreinigungen zu entfernen, die die Ergebnisse der nachfolgenden PCR-Analyse verfälschen würden. Nach erfolgter cDNA-Synthese wurde eine quantitative *real-time* PCR mit Hydrolyse-Sonden durchgeführt (siehe 2.2.4). Die Ergebnisse wurden mit Hilfe des Haushaltgens GAPDH standardisiert. Anschließend wurde die Induktion der Transkription bezogen auf die gehungerte Probe berechnet und in einem Diagramm dargestellt (Abb. 3.7). Die erfolgreiche Stimulation durch Interleukin-6 wurde zudem durch die Induktion etablierter STAT3-Zielgene bestätigt (Daten nicht gezeigt). Eine Stunde nach Zugabe von IL-6 ist die Expression aller untersuchten STAIRs in INA-6-Zellen erhöht. Am stärksten wurden STAIR1 (3,5-fach) und STAIR3 (2,4-fach) induziert. Die Expression der übrigen STAIRs hat sich knapp verdoppelt. Nach permanenter IL-6-Stimulation stieg die Expression von STAIR1, STAIR2, STAIR6 und STAIR15 weiter an. Die Induktion von STAIR3 war hingegen transient und fiel nach andauernder IL-6-Behandlung der Zellen wieder ab. Die Expression von STAIR18 blieb nach einstündiger und permanenter IL-6-Stimulation konstant 1,4-fach erhöht. Da es sich bei STAIR2 um eine intronische macroRNA handelt wurde auch die IL-6-abhängige Expression der DCC-mRNA analysiert. Diese Experimente wurden von Dr. Katja Schramedei durchgeführt und die Daten in ihrer Diplomarbeit veröffentlicht<sup>169</sup>. Die reife DCC-mRNA wird demnach erst nach permanenter IL-6-Stimulation um den Faktor zwei induziert. Dass eine Stunde nach Zytokingabe noch kein Effekt zu beobachten war, wurde aufgrund der enormen Länge des Gens von über einer Millionen Basenpaaren so erwartet. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass eine permanente IL-6-Stimulation in INA-6-Zellen zu einer Verdopplung der Proteinmenge von DCC führt<sup>169</sup>. Demnach könnten STAIR2 und DCC koreguliert werden. Weiter wurde untersucht, ob die Abnahme der Fluoreszenzintensität über die Länge von STAIR1, wie sie in den Tiling Array-Daten zu sehen ist (Abb. 3.1\_B), die wirkliche Transkription widerspiegelt oder nur ein Artefakt der Mikroarrays darstellt. Hierfür wurden zusätzlich zu dem existierenden Primerpaar für STAIR1 zwei weitere designt und für die Quantifizierung mittels *real-time* PCR mit SYBR Green verwendet. Das Primerpaar STAIR1\_1 ist das am weitesten stromaufwärts gelegene, ungefähr 20 Kilobasen stromabwärts vom vermuteten Transkriptionsstart. An dieser Position wird die Transkription auch am stärksten durch Interleukin-6 induziert (11-fach nach einer Stunde, 6,5-fach nach permanenter Stimulation). Als nächstes folgt 60 Kilobasen stromabwärts

hinter dem ersten Primerpaar der *real-time* PCR-Ansatz mit Hydrolysesonde. Hier liegt die Induktion wie bereits beschrieben bei 3,5-fach nach einer Stunde und 4,1-fach nach permanenter IL-6-Stimulation (Abb. 3.7). Misst man die Expression von STAIR1 mit dem Primerpaar STAIR1\_2 110 Kilobasen stromabwärts des Transkriptionsstarts liegt die Erhöhung nach einer Stunde nur bei 2,3-fach und bei 3,1-fach nach permanenter Aktivierung des IL-6-Signalweges. Demnach ist die in den Tiling Array-Daten beobachtete Abnahme der Fluoreszenzintensität mit zunehmender Länge des STAIRs ein reelles Phänomen und kein systematischer Fehler der Methode.

Zusammenfassend bestätigen diese Ergebnisse die Daten des Tiling Array-Experiments und zeigen, dass die IL-6-abhängige Induktion von Genen in diesem Zellsystem eine sehr gute Reproduzierbarkeit aufweist. Demzufolge ist die genomweite Analyse des Transkriptoms mittels Tiling Arrays ein geeignetes Verfahren, um unbekannte, differentiell exprimierte RNAs zu finden.



**Abb. 3.7: Induktion der STAIRs in INA-6-Zellen nach IL-6-Stimulation.** INA-6-Zellen wurde für 13 Stunden IL-6 entzogen (w/o IL-6), IL-6 wurde nach 12-stündigem Entzug für 1 Stunde wieder zugegeben (1h IL-6) oder die Zellen wurden permanent mit IL-6 kultiviert (perm IL-6). IL-6 wurde in einer Konzentration von 1ng/ml verwendet. Die RNA der Zellen wurde präpariert, in cDNA umgeschrieben und die RNA-Menge durch real-time PCR mit Hydrolyse-Sonden quantifiziert. Standardisiert wurde auf GAPDH. Die RNA-Menge der STAIRs wurde auf die jeweilige gehungerte Probe normalisiert. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichung aus 6 unabhängigen Experimenten.

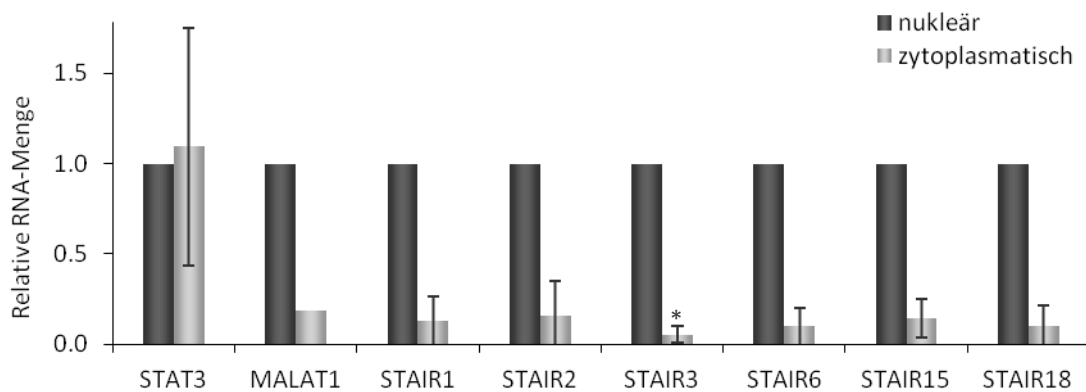
### Orientierung der STAIRs

Um die aus den Tiling Array-Daten abgeleitete Orientierung der STAIRs (Tab. I) zu überprüfen, wurde RNA von INA-6-Zellen mit dem jeweiligen Vorwärts- beziehungsweise Rückwärtsprimer eines STAIRs spezifisch in cDNA umgeschrieben. Anschließend wurden die

auf diese Weise synthetisierte cDNA über PCR mit den spezifischen STAIR-Primerpaaren (for+ rev) amplifiziert. Eine vom Plusstrang transkribierte RNA würde nur mit dem Rückwärtsprimer in cDNA umgeschrieben und danach amplifiziert werden können. Liegt das Gen hingegen auf dem Minusstrang, erhält man nur nach cDNA-Synthese mit dem Vorwärtsprimer ein PCR-Produkt. Die Ergebnisse bestätigen die Vermutungen zur Orientierung der STAIRs (Daten nicht gezeigt). Alle STAIRs mit Ausnahme von STAIR18 sind auf dem Plusstrang des jeweiligen Chromosoms lokalisiert.

### 3.1.3 Intrazelluläre Lokalisation der STAIRs

Aufgrund ihrer enormen Länge ist davon auszugehen, dass die IL-6/STAT3-regulierten macroRNAs im Zellkern lokalisiert sind. Diese Hypothese sollte experimentell überprüft und die subzelluläre Verteilung der STAIRs untersucht werden. In einem ersten Schritt wurde die Expression der Transkripte in Zellkern- und Zytoplasma-Extrakten aus INA-6-Zellen analysiert. Hierfür wurde eine Zellfraktionierung durchgeführt (siehe 2.2.1) und anschließend die relative RNA-Menge in den einzelnen Zellkompartimenten im Vergleich zu GAPDH bestimmt. Das Ergebnis dieser Untersuchungen ist in Abbildung 3.8 dargestellt. Die Verteilung der STAT3 mRNA ist als Beispiel einer überwiegend im Zytoplasma lokalisierten Boten-RNA abgebildet. MALAT1 hingegen zeigt die Distribution einer nukleären RNA. Im Vergleich zu diesen beiden Kontroll-Transkripten zeigt sich deutlich, dass die macroRNAs sowie MALAT1 fast ausschließlich im Zellkern von INA-6-Zellen zu finden sind (Abb. 3.8).



**Abb. 3.8: Intrazelluläre Lokalisation der STAIRs.** Zytoplasmatische und nukleäre Zellbestandteile von INA-6-Zellen wurden separiert. Anschließend wurde die RNA aus den Extrakten der Zellkompartimente getrennt voneinander präpariert, in cDNA umgeschrieben und die RNA-Menge durch real-time PCR mit SYBR Green quantifiziert. Es wurde auf GAPDH standardisiert und auf die nukleäre Probe normalisiert. Dargestellt ist das Ergebnis aus zwei unabhängigen Experimenten. (Diese Daten wurden bereits in einer anderen Darstellungsform von mir publiziert<sup>170</sup>)

### 3.1.4 Expressionsprofile der STAIRs

Die Expression der STAIRs zu untersuchen, ist eine schwierige Aufgabe, da die Struktur der extrem langen Transkripte nicht bekannt ist. Ob es sich um eine lange durchgängige RNA handelt, die eventuell posttranskriptionell prozessiert wird, oder mehrere kurze Transkripte existieren, die vielleicht auch unabhängig voneinander transkribiert werden können, war zum Zeitpunkt dieser Untersuchungen nicht bekannt. Entsprechend der bioinformatischen Analyse könnte STAIR3 zur hypothetischen C20orf103 mRNA, STAIR15 zu der bereits beschriebenen nicht-kodierenden RNA MIAT und STAIR18 zu der vorhergesagten ncRNA LOC541471 prozessiert werden. Um einen Überblick über die Expression der STAIR macroRNAs zu bekommen, wurden jeweils drei Primerpaare konstruiert, die über das ganze Transkript verteilt sind (Abb. 3.1\_A -Abb. 3.6\_A). Für STAIR3 und STAIR18 wurden diese Primer so gewählt, dass diese in den Introns der vorhergesagten gespleißten RNAs liegen und dementsprechend nur deren Primärtranskripte amplifizieren würden (Abb. 3.3\_A und Abb. 3.6\_A). Das für die Detektion von STAIR15 verwendete Primerpaar STAIR15\_1 liegt im zweiten Intron von MIAT (Abb. 3.5\_A). STAIR15\_2 und \_3 überlappen mit dem 3'-Exon der gespleißten ncRNA, sodass bei der Analyse aller drei Primerpaare möglicherweise Rückschlüsse auf die Verteilung des gespleißten MIAT-Transkriptes und der STAIR15 macroRNA abgeleitet werden können.

#### 3.1.4.1 Expression der STAIRs in Tumorzelllinien

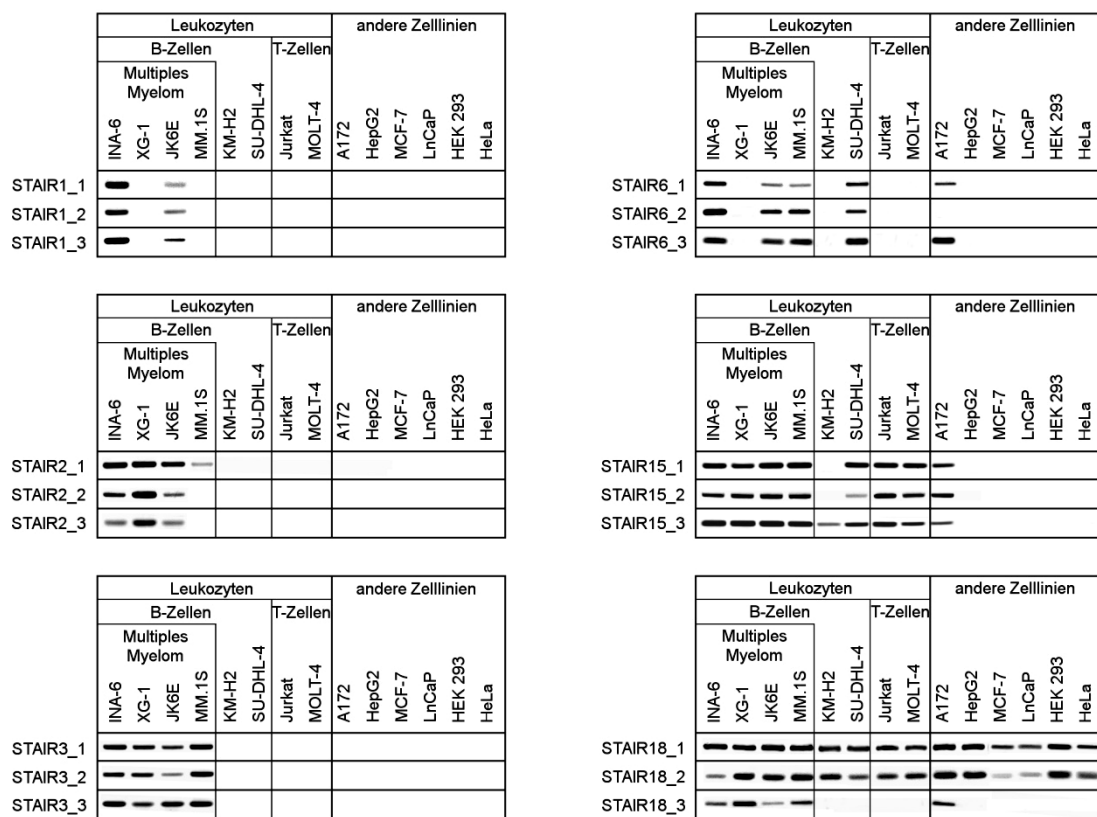
Die Expression der STAIRs wurde in verschiedenen humanen Krebszelllinien untersucht (Abb. 3.9). STAIR1 konnte dabei außer in den INA-6-Zellen nur noch in JK6E-Zellen nachgewiesen werden. Auch die Expression von STAIR2 und STAIR3 ist spezifisch für Multiple Myelom-Zelllinien (INA-6, XG-1, JK6E, MM.1S). In MM.1S-Zellen ist für STAIR2 allerdings nur ein Signal mit dem Primerpaar STAIR2\_1 nachweisbar, die weiter stromabwärts gelegenen Fragmente konnten bei dieser Zelllinie nicht amplifiziert werden.

STAIR6 wird in einigen der untersuchten Zellen mit B-Zell-Ursprung exprimiert (INA-6, JK6E, MM.1S, SU-DHL4), Ausnahmen sind die Zelllinien XG-1 und KM-H2. Außerdem können in den Glioblastomzellen A172 mit den Primerpaaren STAIR6\_1 und Stair6\_3 passende Fragmente amplifiziert werden. Da STAIR6\_2 hier aber kein Signal liefert, wird das durchgängige Transkript wohl nicht exprimiert.

STAIR15 kann mit Ausnahme der KM-H2-Zellen in allen untersuchten Tumorzelllinien, deren Ursprung Leukozyten waren, mit allen drei Primerpaaren nachgewiesen werden. STAIR15\_3 wie auch STAIR15\_2 liegen hierbei im letzten Exons der annotierten nicht-kodierenden RNA MIAT, STAIR15\_1 befindet sich in einem Intron (Abb. 3.5\_A), sodass beim Nachweis aller

drei Fragmente von der Expression der macroRNA ausgegangen werden kann. Auch in den Glioblastomzellen A172 wird STAIR15 offensichtlich exprimiert.

STAIR18 scheint ubiquitär exprimiert zu werden, wobei das Primerpaar STAIR18\_3 nur in den Multiplen Myelom- (INA-6, XG-1, JK6E, MM.1S) und A172-Zellen ein Signal liefert. STAIR18\_3 liegt von den drei Primerpaaren am weitesten stromaufwärts innerhalb der macroRNA, ungefähr 10 Kilobasen hinter dem angenommenen Transkriptionsstart. Demzufolge könnte STAIR18 in den Zelllinien, wo dieses Primerpaar kein Signal liefert, prozessiert worden sein, einen alternativen Transkriptionsstart haben oder es handelt sich doch um alternative überlappende Transkripte, die hier mit den Primerpaaren STAIR18\_1 und STAIR18\_2 amplifiziert werden. Eine genauere Aussage lassen diese Daten nicht zu.

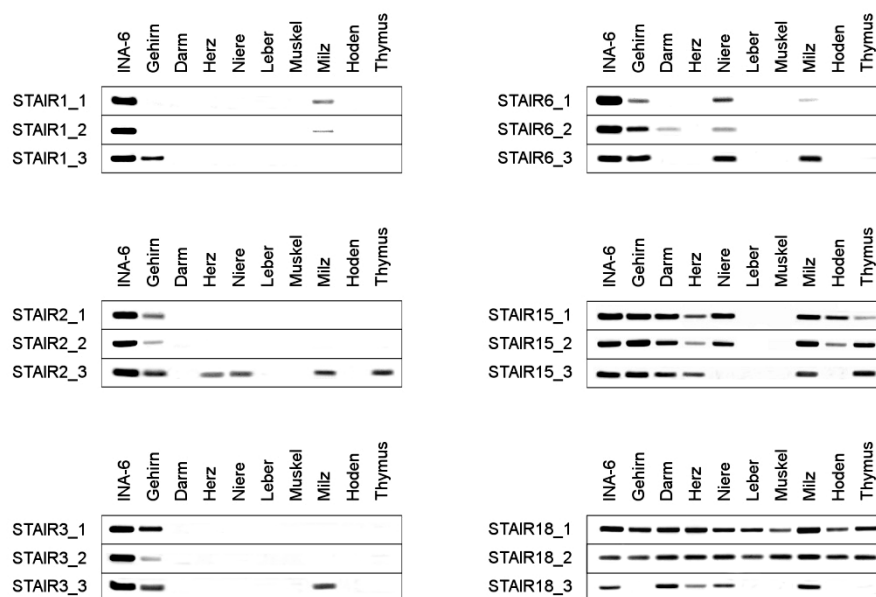


**Abb. 3.9: Expression der STAIRs in humanen Tumorzelllinien.** RNA der angegebenen Zellen wurde präpariert, in cDNA umgeschrieben, mittels PCR amplifiziert und gelelektrophoretisch aufgetrennt. Für die Detektion jeder macroRNA wurden drei verschiedene Primerpaare verwendet. Dargestellt sind jeweils die spezifischen, detektierten DNA-Banden nach Färbung der 1,5%-tigen Agarosegele mit Ethidiumbromid.

### 3.1.4.2 Expression der STAIRs in humanen Geweben

Die STAIRs sollten im Folgenden hinsichtlich ihrer Gewebsspezifität untersucht werden. Dazu wurden gepoolte RNA Proben (FirstChoice® Human Total RNA Survey Panel von Ambion) von neun verschiedenen humanen Geweben verwendet. Die Expression wurde mittels PCR mit jeweils drei verschiedenen Primerpaaren bestimmt.

Die Bilder zeigen in den Proben teilweise unterschiedliche Muster der drei PCR-Produkte, die jeweils ein STAIR repräsentieren sollen (Abb. 3.10). Oft kann beispielsweise nur eines der PCR-Produkte nachgewiesen werden. Manchmal ließen sich zwei der Regionen amplifizieren, aber die dritte brachte kein Signal. Dies könnte auf unabhängige überlappende Transkripte oder aber kürzere oder gespleißte Varianten des STAIRs hindeuten. Mit den vorhandenen Daten lässt sich dies leider nicht genauer analysieren. Die Expression eines STAIRs wird angenommen, wenn alle drei PCR-Produkte in einer Probe nachgewiesen werden können. STAIR1 lässt sich in seiner kompletten Länge in keinem Gewebe nachweisen. Die Gelbilder deuten weiter an, dass STAIR2 und STAIR3 im Gehirn exprimiert werden. Auch die Fragmente von STAIR6 lassen sich im Gehirn und zudem noch in Nierengewebe amplifizieren. STAIR15 wird in Gehirn, Darm, Herz, Milz und Thymus exprimiert. In Nieren- und Hodengewebe konnte STAIR15\_3 nicht nachgewiesen werden. STAIR18\_1 und STAIR18\_2 werden wie in den humanen Tumorzelllinien auch in den



**Abb. 3.10: Expression der STAIRs in humanen Geweben.** RNA der angegebenen Gewebe wurde in cDNA umgeschrieben, mittels PCR amplifiziert und gelelektrophoretisch aufgetrennt. Für die Detektion jeder macroRNA wurden drei verschiedene Primerpaare verwendet. Dargestellt sind jeweils die spezifischen, detektierten DNA-Banden nach Färbung der 1,5%-tigen Agarosegele mit Ethidiumbromid.

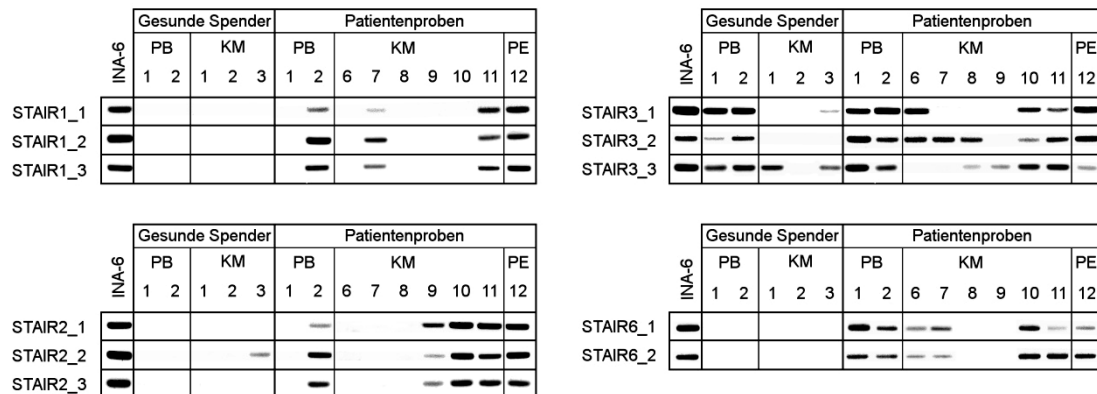


untersuchten Geweben ubiquitär exprimiert. STAIR18\_3 ist wieder nur in einigen Proben (Darm, Herz, Niere, Milz) nachweisbar. Möglicherweise wird STAIR18 nicht in allen Geweben in seiner ganzen Länge exprimiert.

### 3.1.4.3 Expression der STAIRs in Patientenproben

Um einen Einblick zu bekommen, ob STAIR1, STAIR2, STAIR3 und STAIR6, die fast nur in Multiplen Myelom-Zelllinien exprimiert wurden (siehe 3.1.4.1), als Tumormarker für die Diagnose dieser Erkrankung dienen könnten, wurden mononukleäre Zellen des peripheren Blutes (PB) und Knochenmarkproben (KM) von gesunden Spendern und Patienten mit Multiplen Myelom bzw. Plasmazelleukämie untersucht (siehe 2.3.7) (Abb. 3.11). Aufgrund des begrenzten Probenmaterials konnten hier nur zwei Primerpaare für STAIR6 untersucht werden. STAIR1, STAIR2 und STAIR6 können weder in Zellen des Blutes (PB) noch im Knochenmark (KM) der gesunden Probanden nachgewiesen werden (Ausnahme STAIR2\_2 in KM 3). Hingegen findet man in den Patientenproben (außer bei Patient 8) eines oder mehrere dieser drei STAIRs exprimiert. In den Gewebeproben von Patient 2, 11 und 12 sind sogar alle analysierten STAIRs detektierbar.

STAIR3 wird bei gesunden Spendern und Patienten mit Multiplem Myelom in den mononukleären Zellen des peripheren Blutes (PB) sowie im Pleuraerguß (PE) und einigen Knochenmarkproben (KM) der Krebspatienten exprimiert. Allerdings lässt es sich nicht komplett in gesundem Knochenmarkgewebe nachweisen. In den aus dem Knochenmark



**Abb. 3.11: Expression der STAIRs in Patientenproben des Multiplen Myeloms.** RNA wurde aus Patientenproben präpariert, in cDNA umgeschrieben, mittels PCR amplifiziert und gelelektrophoretisch aufgetrennt. Für die Detektion jeder macroRNA wurden soweit möglich drei verschiedene Primerpaare verwendet. Dargestellt sind jeweils die spezifischen, detektierten DNA-Banden nach Färbung der 1,5%-tigen Agarosegele mit Ethidiumbromid. PB = peripheres Blut; KM = Knochenmark; PE = Pleuraerguss

von Patienten gewonnenen Proben können alle drei Fragmente von STAIR3 nur bei den Patienten 10 und 11 nachgewiesen werden.

Diese Ergebnisse geben Grund zu der Annahme, dass die Expression von STAIR1, STAIR2 und STAIR6 mit dem Multiplen Myelom assoziiert sein könnte. Demzufolge könnten diese macroRNAs geeignete Marker für die Diagnose oder den Verlauf der Erkrankung darstellen.

## **3.2 Identifizierung regulierter ncRNA-Gene während der T-Zellaktivierung**

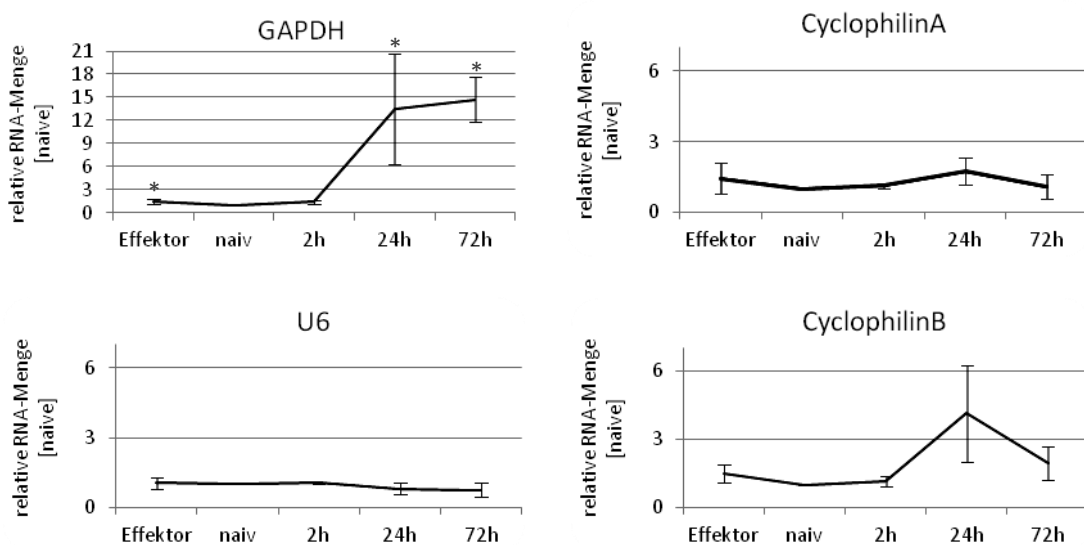
Ein weiterer Bestandteil dieser Arbeit war die Identifizierung nicht-kodierender RNAs, die durch die Aktivierung naiver T-Helferzellen reguliert werden. Die Aktivierung von T-Zellen spielt bei der Regulation des Immunsystems eine zentrale Rolle. Naive T-Zellen zirkulieren in Blut und Lymphe. Erkennen sie mit ihrem T-Zell-Rezeptor Fremdantigen auf dem *major histocompatibility complex II* (MHC II) von professionellen antigenpräsentierenden Zellen und sind weitere kostimulatorische Signale vorhanden, werden die T-Zellen aktiviert. Sie proliferieren und differenzieren zu Effektor-Zellen und wandern zu den Entzündungsstellen, wo sie zur Immunabwehr beitragen, indem sie Zytokine ausschütten und andere Immunzellen regulieren. Die Aktivierung naiver T-Helferzellen kann *in vitro* auch antigenunabhängig durch die Stimulation von Oberflächenproteinen mit Antikörpern simuliert werden. Die simultane Stimulation der T-Zell-Rezeptor-Komplexe mit anti-CD3-Antikörpern und der kostimulatorischen Glykoproteine CD28 mit anti-CD28-Antikörpern löst die Aktivierungskaskade der T-Zellen aus. Somit können die Veränderungen der T-Helferzellen nach Aktivierung untersucht und der Einfluss bestimmter Faktoren auf den Ablauf analysiert werden.

### **3.2.1 Etablierung der *in vitro* Aktivierung primärer T-Zellen**

Für die Untersuchungen der T-Zellaktivierung wurden naive T-Helferzellen aus *Buffy Coats* isoliert (siehe 2.3.1). Hierfür wurden die mononukleären Zellen des peripheren Blutes (PBMCs) der Spender durch eine Dichtegradientenzentrifugation von den restlichen Blutbestandteilen separiert und die T-Helferzellen mit Hilfe von Antikörper-gekoppelten magnetischen Mikropartikeln negativ selektioniert. Anschließend wurden die Gedächtnis- und Effektor-T-Zellen (Effektor) mit magnetischen Mikropartikeln gegen die auf der Oberfläche dieser Zellen exprimierte Isoform der Proteintyrosinphosphatase CD45 von den naiven T-Helferzellen (naiv) getrennt. Die Effektorzellen stellen eine T-Zellpopulation dar, die zu einem früheren Zeitpunkt *in vivo* aktiviert wurde. Ein Teil der naiven T-Helferzellen

wurde mit anti-CD3- und anti-CD28-Antikörpern aktiviert (siehe 2.3.2.3) und die Zellen zu verschiedenen Zeitpunkten nach Aktivierung (2 h, 24 h, und 72 h) analysiert. Die erfolgreiche Stimulation der Zellen wurde durch die Induktion etablierter Oberflächenmarker (CD25, CD69 und CD71) mit Hilfe der Durchflusszytometrie bestätigt (siehe 2.3.3). Als besonders problematisch bei der *in vitro* Aktivierung stellte sich die Fixierung der anti-CD3-Antikörper auf dem Boden der Zellkulturgefäße dar. Zur Optimierung der Beschichtung der Plastikoberflächen mit anti-CD3-Antikörpern wurden verschiedene Antikörperklone (UCHT1 vs. Okt3), Antikörperkonzentrationen, Puffer, Inkubationstemperaturen und Inkubationszeiten geprüft, um eine bessere Adhäsion der Antikörper zu erreichen. Erst die Verwendung von 6-Well-Platten mit *advanced surface* führte zu einer guten Anheftung der anti-CD3-Antikörper am Boden der Zellkulturgefäße und somit zu einer effektiven Aktivierung der T-Helferzellen.

Ein Problem bei der Verwendung von Primärkulturen anstelle von Zelllinien ist der geringe RNA-Gehalt der primären Zellen, zudem ist die Zellzahl, die man pro Spender erhält, limitiert. Da für die Durchführung der Array-Experimente eine größere Menge RNA eingesetzt werden muss, war es nötig, die RNA von mehreren Spendern für die Genomanalysen zu poolen. Eine weitere Erkenntnis der Voruntersuchungen war, dass die RNA-Menge der T-Zellen nach Aktivierung zunimmt (10-fach nach 72 Stunden), somit konnten für die späteren Zeitpunkte der Kinetik weniger Zellen eingesetzt werden. Dies war



**Abb. 3.12: Induktion von Haushaltsgenen nach T-Zellaktivierung.** Effektor-T-Helferzellen und naive CD4<sup>+</sup> T-Zellen wurden aus Buffy Coats isoliert (Effektor und naiv). Naive T-Helferzellen wurden mit 1µg/ml platten-gebundenen anti-CD3- und 1µg/ml anti-CD28-Antikörper aktiviert und nach 2, 24 und 72 Stunden geerntet (2h, 24h und 72h). Die RNA der Zellen wurde präpariert, in cDNA umgeschrieben und die Expression der Haushaltsgene mittels real-time PCR mit SYBR Green I quantifiziert. Normalisiert wurde auf naive T-Zellen. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichung aus drei unabhängigen Experimenten.

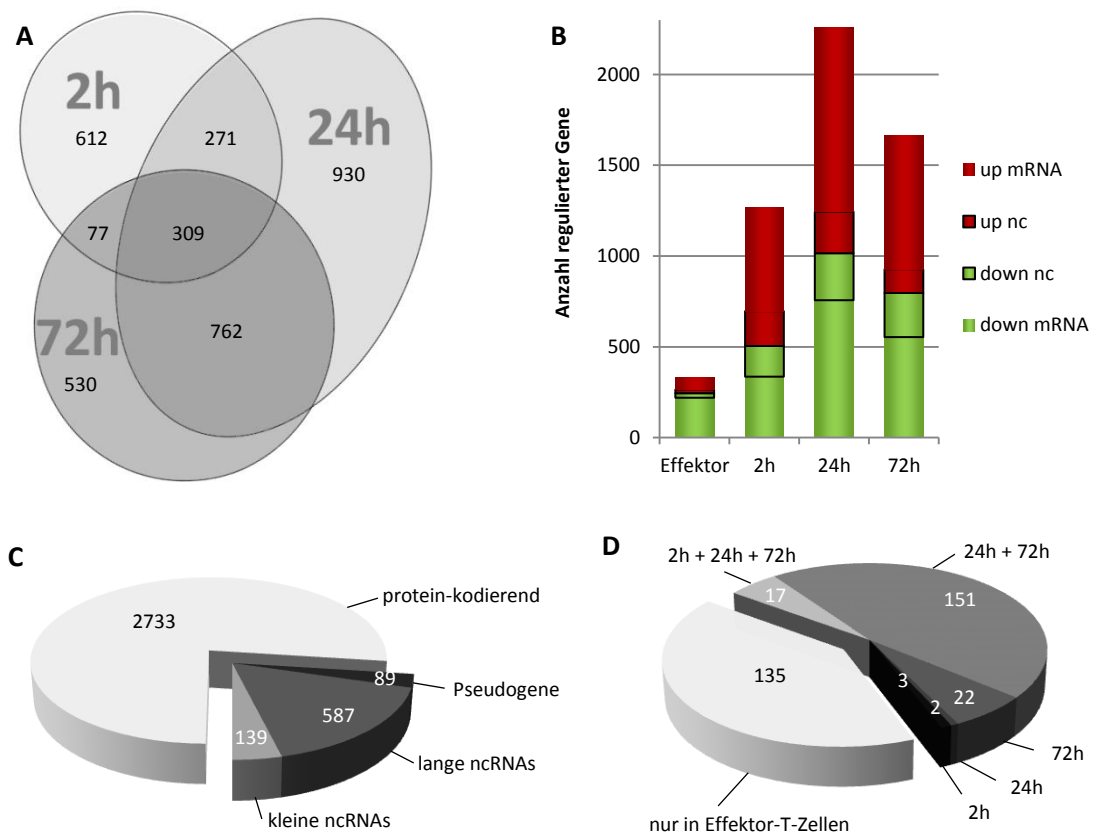
weniger durch die Proliferation der Zellen begründet, da sich nach drei Tagen nur die Hälfte der Zellen geteilt hat, als vielmehr durch einen massiven Anstieg der Transkriptionsrate. Eine weitere Problematik war, dass das routinemäßig in unsere Arbeitsgruppe verwendete Haushaltsgen GAPDH während der T-Zellaktivierung induziert wird (Abb. 3.12). Daher wurden verschiedene Haushaltsgene untersucht, um einen geeigneten Kandidaten für die Normalisierung der Genexpression zu finden. U6 snRNA, welche Bestandteil des Spleißosoms ist, erwies sich als geeignetes Haushaltsgen, da dessen Expression während der T-Zellaktivierung konstant ist (Abb. 3.12).

### **3.2.2 Genomweite Untersuchung regulierter RNAs während der T-Zellaktivierung**

In Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe Proteomics des Helmholtz-Zentrums für Umweltforschung, insbesondere der Nachwuchsgruppe Bioinformatics & Transcriptomics, wurden Tiling Array-Experimente (siehe 2.1.1) durchgeführt, um nicht-kodierende RNAs zu identifizieren, die bei der Aktivierung von T-Helferzellen reguliert werden. Dafür wurden direkt aus dem Blut isolierte Effektor- und naive T-Helferzellen sowie für zwei, 24 oder 72 Stunden *in vitro* aktivierte T-Zellen verwendet (siehe 2.3.1 und 2.3.2.3). Reinheit und Viabilität der Zellpopulationen sowie die erfolgreiche Aktivierung der naiven T-Helferzellen wurden nach der Färbung mit den entsprechenden Fluoreszenz-gekoppelten Antikörpern im Durchflusszytometer kontrolliert (siehe 2.3.3). Die RNA der Zellen wurde präpariert und deren Qualität mit Hilfe eines Bioanalyzers überprüft (siehe 2.2.2). Da für die Tiling Array-Experimente eine größere Menge RNA (140 µg pro Probe) verwendet werden muss, war es nötig, die RNA von 15 Spendern zu poolen. Die Fluoreszenzmarkierung und Hybridisierung der Proben sowie das Auslesen der Fluoreszenzsignale und die bioinformatische Aufarbeitung der Daten wurde von der Bioinformatics & Transcriptomics Arbeitsgruppe des Helmholtz-Zentrums für Umweltforschung durchgeführt.

Zusätzlich wurden die RNA-Proben dreier Spender mit Hilfe der Hochdurchsatz-Sequenzierung analysiert (siehe 2.1.2). Hierfür hat die Arbeitsgruppe Bioinformatics & Transcriptomics die ribosomale RNA aus den Proben entfernt und Strang-spezifische cDNA-Bibliotheken hergestellt. Die Hochdurchsatz-Sequenzierung wurde anschließend mit dem HiSeq2000-System von Illumina am Helmholtz-Zentrum für Umweltforschung durchgeführt und die Daten bioinformatisch aufgearbeitet. Die Ergebnisse der Hochdurchsatz-Sequenzierung liefern weitere Informationen über die detektierten Transkripte zusätzliche zu den Tiling Array-Daten. Es kann bestimmt werden, ob der Plus- oder Minusstrang transkribiert wurde, und Spleißereignisse werden genauer angezeigt.

Die Evaluierung der Transkriptomdaten zeigt, dass eine Vielzahl von Genen nach der Aktivierung der naiven T-Helferzellen reguliert wird (Abb. 3.13\_A und B). Bereits zwei Stunden nach Aktivierung ist die Expression von 1269 Genen im Vergleich zu naiven T-Zellen verändert (Abb. 3.13\_A). Die modifizierte Genexpression bleibt für ungefähr die Hälfte dieser Transkripte auch nach 24 Stunden bestehen (Abb. 3.13\_A). Zusätzlich wurden 1684 weitere Gene 24 Stunden nach Aktivierung reguliert (Abb. 3.13\_A). 72 Stunden nach Aktivierung hat sich die Expression von 1193 Transkripten wieder normalisiert und es lassen sich noch einmal 530 bis dahin konstant exprimierte Gene detektieren, deren Expression erst spät im Verlauf der T-Zellaktivierung verändert wurde (Abb. 3.13\_A). Insgesamt



**Abb. 3.13: Übersicht regulierter Gene während der T-Zellaktivierung.** Effektor-T-Helferzellen und naive CD4<sup>+</sup> T-Zellen wurden aus Buffy Coats isoliert und naive T-Zellen für 2, 24 und 72h *in vitro* aktiviert. Die RNA der Zellen wurde isoliert und mittels Hochdurchsatz-Sequenzierung analysiert. A) Die Ellipsen zeigen die Anzahl der regulierten Gene 2h, 24h und 72h nach Aktivierung im Vergleich zu naiven T-Helferzellen. In den Schnittflächen ist die Anzahl an regulierten Genen angegeben, die in den jeweiligen Proben überlappen. (B) Anteil der annotierten, hoch- und herunterregulierten Protein-kodierenden und nicht-kodierenden Gene. (C) Dargestellt ist der Anteil der verschiedenen RNA-Typen der gesamten regulierten Gene. (D) Abgebildet sind die differentiell exprimierte Gene der Effektor-T-Zellen im Vergleich zu naiven T-Helferzellen und deren Überlappung mit regulierten Genen der aktivierten T-Zellproben.

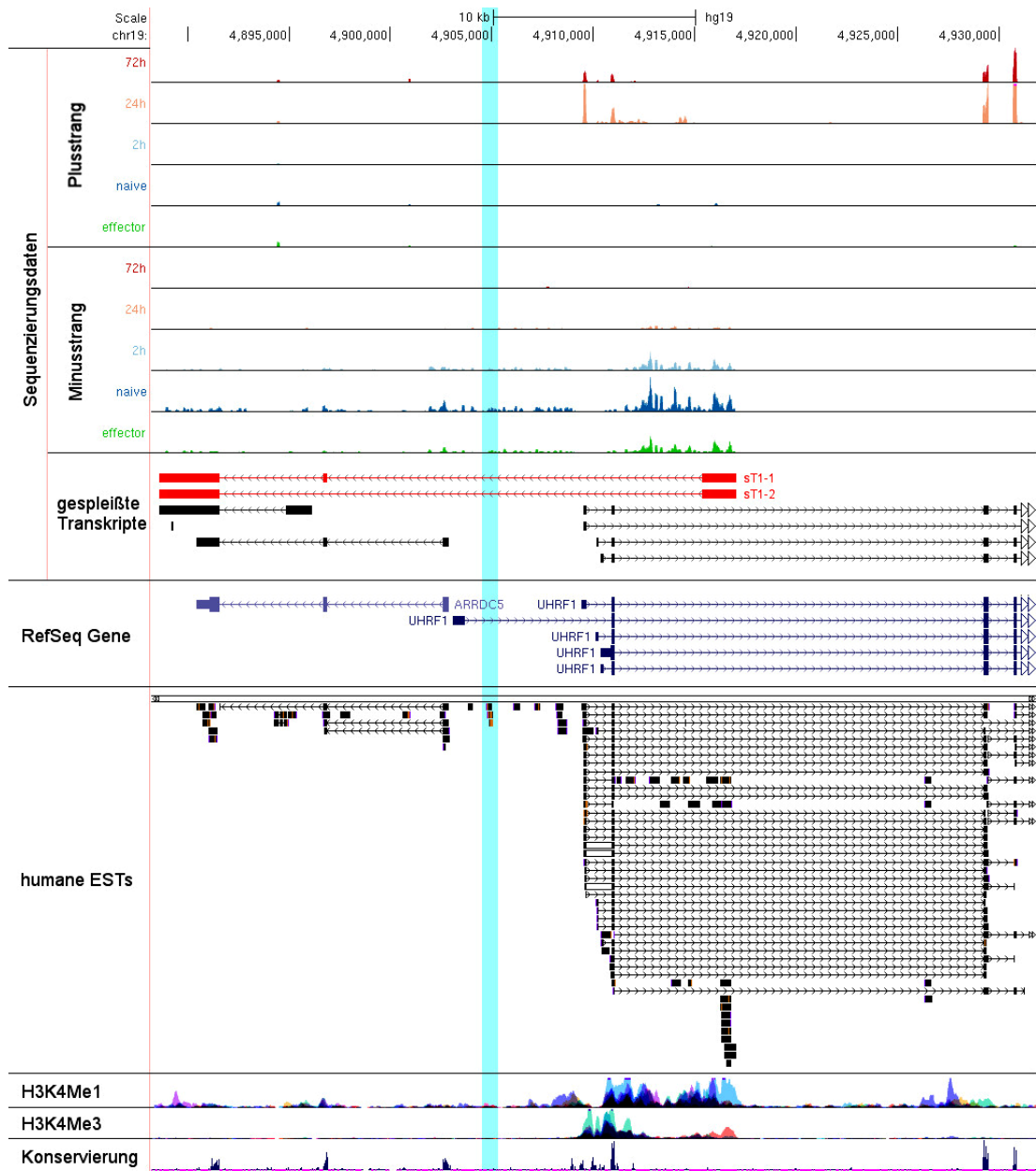
scheinen sich die aktivierten T-Zellen unter den gewählten Bedingungen auch ohne Zugabe zusätzlicher Zytokine in Th1-Helferzellen zu differenzieren, worauf die Induktion von Genen, die den Th1-Phänotyp festlegen, wie TBX21, Interferon- $\gamma$ , Tumornekrosefaktor (TNF) und dem IL-12-Rezeptor- $\beta$ 2 hinweist (Daten nicht gezeigt). Die Anteile hoch- und herunterregulierter Gene sind insgesamt während der Aktivierung sehr ausgeglichen (Abb. 3.13\_B). Zwei Stunden nach Stimulation der naiven T-Helferzellen ist die Menge herunterregulierter Gene etwas geringer (40 Prozent), was anscheinend im verzögerten Abbau von mRNAs begründet ist. Ungefähr drei Viertel der bei der T-Zellaktivierung differentiell exprimierten Gene kodiert Proteine (Abb. 3.13\_B und C). Ein Viertel der regulierten Transkripte sind nicht-kodierende RNAs, wobei 139 kleine ncRNAs wie miRNAs, snRNAs und snoRNAs, 89 Pseudogene und eine heterogene Gruppe von 587 langen nicht-kodierenden RNAs (lncRNAs) identifiziert wurden (Abb. 3.13\_C). Bei der Untersuchung differentiell exprimierter Gene zwischen naiven und Effektor-T-Zellen zeigt sich, dass über die Hälfte der veränderten Transkripte auch während der T-Zellaktivierung reguliert werden. Dies verdeutlicht noch einmal, dass es sich bei den aus dem Blut isolierten Effektor- und Gedächtnis-T-Helferzellen um eine Population handelt, die bereits früher *in vivo* aktiviert wurde. Interessant ist ebenfalls, dass in Effektor-T-Zellen hauptsächlich Gene im Vergleich zu naiven Zellen herunterreguliert sind und nur 13,6 Prozent der differentiellen Transkripte nicht-kodierende RNAs repräsentieren (Abb. 3.13\_B und D). Es hat den Anschein, dass viele nicht-kodierende RNAs während der T-Zellaktivierung reguliert werden, um die erforderlichen transkriptionellen und post-transkriptionellen Ereignisse, die mit dem dramatischen Wechsel des Transkriptionsprogramms einhergehen, zu koordinieren. Hat die T-Helferzelle ihren Effektorphänotyp ausgebildet, sind wahrscheinlich viele der Regulatormoleküle nicht mehr von Nöten, da die veränderte Genexpression epigenetisch festgeschrieben wurde.

### **Identifizierung neuer unbekannter Transkripte**

Um neue Transkripte zu identifizieren, die während der T-Zellaktivierung reguliert werden, wurde von der Arbeitsgruppe Bioinformatics & Transcriptomics eine Intervallanalyse<sup>163</sup> der Tiling Array-Daten durchgeführt und so stark und differentiell exprimierte Bereiche des Genoms detektiert (siehe 2.1.1). Die Ergebnisse wurden von mir stichprobenartig im UCSC Genome Browser untersucht. Dabei konnten neben bekannten Genen auch neue unbekannte Transkripte identifiziert werden, die während der T-Zellaktivierung reguliert werden und nicht mit bekannten Genen der RefSeq-Annotation zusammenfallen. Diese Transkripte umfassen reprimierte oder induzierte, intergenische oder intronische Bereiche von 300 Basenpaaren bis zu 91 Kilobasen und wurden *transcripts regulated by activation in T cells* (TREATs) genannt. Sechs TREATs wurden weiteruntersucht und sind im Anhang zusammen mit den normalisierten Tiling Array-Daten im genomischen Kontext dargestellt (Anhang Abb. VI -XI). Eine weitere interessante Beobachtung war, dass zwei der in dieser

Arbeit identifizierten, durch Interleukin-6 induzierten nicht-kodierenden RNAs, STAIR15 und STAIR18, auch während der Aktivierung von T-Helferzellen heraufreguliert werden (Anhang Abb. I, II und IV). STAIR18 wird dabei bereits zwei Stunden nach Stimulation der T-Zellen induziert und fällt danach langsam wieder ab (Anhang Abb. I und II). In Effektor-T-Zellen wird STAIR18 stärker exprimiert als in naiven T-Helferzellen. Die Expression von STAIR15 steigt erst 72 Stunden nach Aktivierung an und ist in den Effektor-T-Zellen deutlich stärker als in naiven T-Zellen (Anhang Abb. IV). Anhand der Daten der Hochdurchsatz-Sequenzierung lässt sich zudem feststellen, dass das kürzlich annotierte MIATNB (MIAT *neighbor*), dessen Transkription im 5'-Exon von MIAT beginnt und die selbe Orientierung aufweist, ebenfalls während der Aktivierung der T-Zellen reguliert wird, allerdings unterschiedlich zu MIAT (Anhang Abb. IV). MIATNB ist in naiven T-Zellen am stärksten exprimiert und wird nach Stimulation der Zellen reprimiert (Daten nicht gezeigt). STAIR15 und STAIR18 werden demnach durch zwei unterschiedliche Prozesse in verschiedenen Lymphozyten reguliert und spielen daher womöglich eine entscheidende Rolle im Immunsystem.

Im nächsten Schritt wurden die neu identifizierten TREATs mithilfe der Sequenzierungsdaten weiter analysiert. Die Sequenzierung liefert strangspezifische Expressionsdaten. Zusätzlich gibt sie Aufschluss über die Prozessierung der Transkripte, indem sie Informationen über Spleißereignisse übermittelt. Bei der Untersuchung von TREAT1 zeigte sich, dass in diesem Bereich hauptsächlich der Minusstrang transkribiert wird (Abb. 3.14). Es hat den Anschein, dass es für das Protein-kodierende Gen ARRDC5 (*arrestin domain containing 5*) einen noch nicht annotierten, weiter 5'-gelegenden Transkriptionsstart gibt, der mit dem UHRF1-Gen (*ubiquitin-like with PHD and ring finger domains 1*) auf dem Gegenstrang überlappt (Abb. 3.14). Hier weist auch eine moderate H3K4Me3-Histonmodifizierung auf einen möglichen Promoter hin (Abb. 3.14). Zusätzlich wurden bereits viele ESTs in diesem Bereich detektiert. Die sequenzierten Transkripte (sT1-1 und sT1-2) bestehen aus dem annotierten ARRDC5 3'-Exon, sowie einem alternativen 5'-Exon, teilweise mit (sT1-1) oder ohne das zweite ARRDC5-Exon (sT1-2) (Abb. 3.14). Beide Varianten des Transkriptes (sT1-1 und sT1-2) würden wenn überhaupt nur für eine stark verkürzte Form des AARDC5-Proteins kodieren (bestehend aus den 204 bzw. 148 carboxyterminalen Aminosäuren des 343 Aminosäuren langen Proteins), fraglich ist allerdings ob Ribosomen die entsprechenden Startcodone erkennen und die Translation initiieren können. Soweit dies die Sequenzierungsdaten zulassen scheinen die Transkripte sT1-1 und sT1-2 auf die gleiche Weise wie auch ARRDC5 reguliert zu werden und nach der Aktivierung der T-Helferzellen ausgeschaltet (Abb. 3.14). Die Expression von UHRF1 wird hingegen erst 24 Stunden nach der T-Zellaktivierung induziert (Abb. 3.14). TREAT1 ist im ersten Intron dieser putativen ARRDC5-Transkripte lokalisiert (Abb. 3.14). Demnach könnte es Bestandteil dessen Primärtranskriptes sein oder eine selbständige, ungespleißte RNA darstellen. Die tatsächliche Länge von TREAT1 lässt sich anhand der Sequenzierungsdaten nicht genau bestimmen. Die maximale Länge entspricht vermutlich dem Primärtranskript



**Abb. 3.14 Sequenzierungsdaten im genomischen Kontext – TREAT1.** Transcript regulated by activation in T cells 1 (chr19: 4 904 700 - 4 905 000 (hg19) Türkis hinterlegt) scheint ein Transkript antisense zu UHRF1 darzustellen. Gezeigt sind aus dem UCSC Genome Browser Chromosomenkoordinaten und die Ergebnisse der Hochdurchsatz-Sequenzierungen für den Plus- und Minusstrang von RNA-Proben primärer, naiver und Effektor-T-Zellen sowie die 2, 24 und 72h *in vitro* aktivierter T-Zellen. Darunter folgt eine Darstellung welche Transkripte sequenziert wurden. Weiter sind annotierte Gene (RefSeq), Histonmodifikationen (ENCODE), die Konservierung in Vertebraten (Vertebrate Cons) sowie gespleißte und ungespleißte ESTs im ausgewählten Bereich. ARRDC5= *arrestin domain containing 5*; UHRF1=*ubiquitin-fold modifier conjugating enzyme 1*

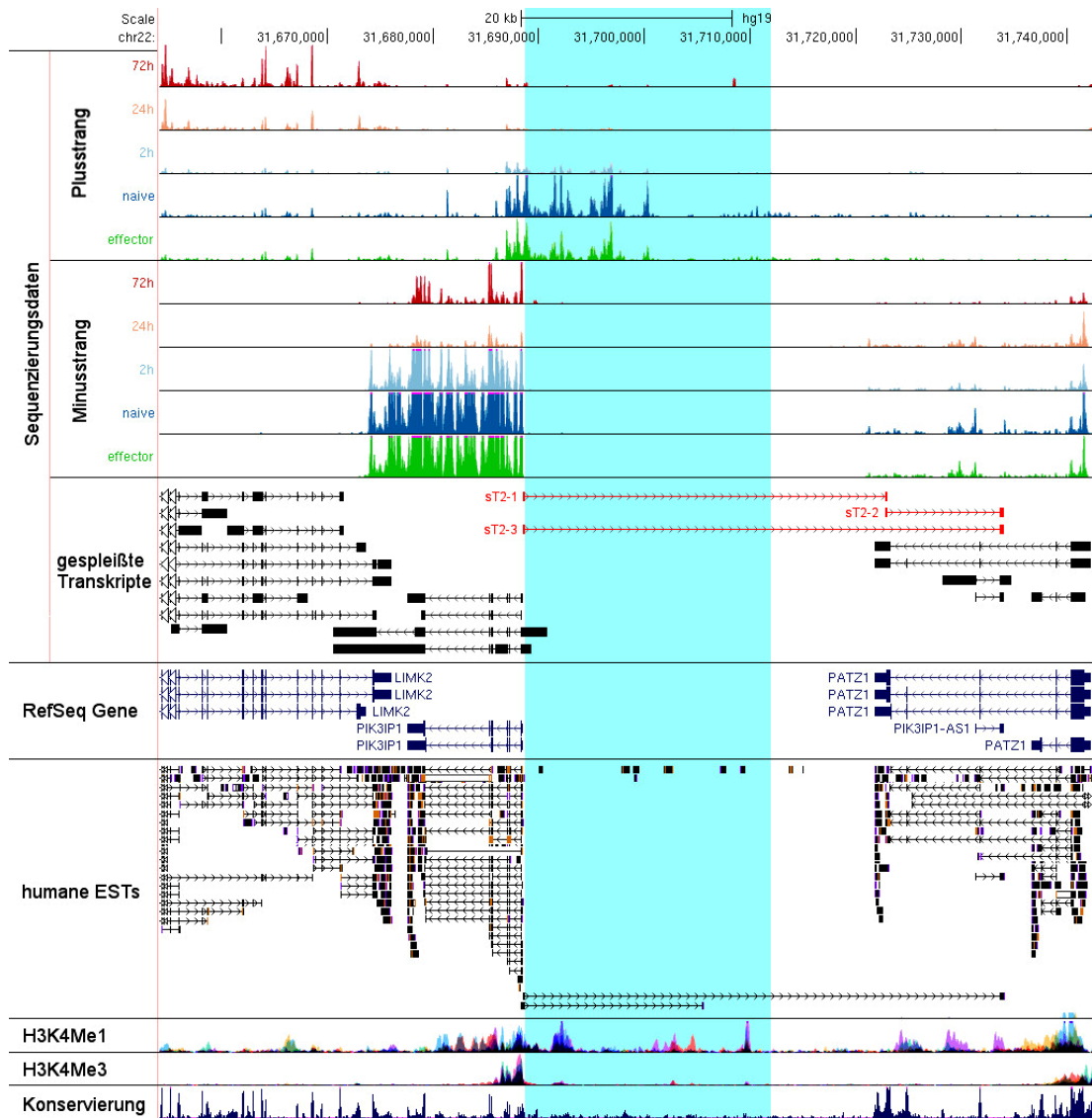


der zwei putativen ARRDC5-Isoformen (sT1-1 und sT1-2) und würde 28,5 Kilobasen betragen.

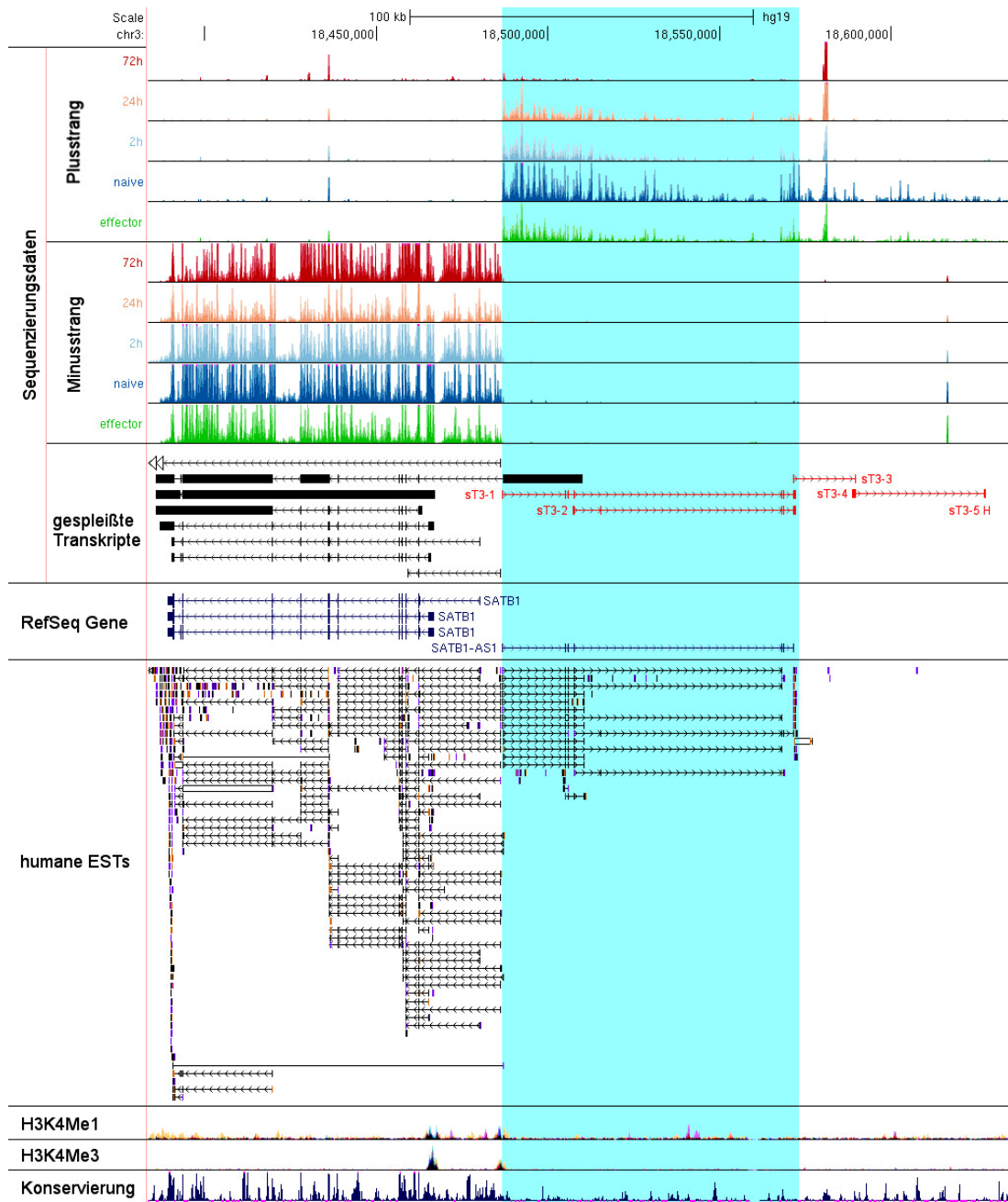
Bei der Analyse der Sequenzierungsdaten im Bereich von TREAT2 stellte sich heraus, dass hier die Transkription hauptsächlich vom Plusstrang und somit antisense zu *phosphoinositide-3-kinase interacting protein 1* (PIK3IP1) erfolgt (Abb. 3.15). Ein Anstieg der Expression vom Plusstrang ist im Bereich des PIK3IP1-Promoters zu verzeichnen und umfasst einen Bereich von ungefähr 14 Kilobasen (Abb. 3.15). Des Weiteren wurden zwei gespleißte Transkripte (sT2-1 und sT2-3) sequenziert, die überlappend mit dem Transkriptionsstart von PIK3IP1 beginnen und antisense zu diesem Protein-kodierenden Gen transkribiert werden (Abb. 3.15). Zusätzlich wurde in gleicher Orientierung ein weiteres prozessiertes Transkript (sT2-2) detektiert, das aus dem zweiten Exon von sT2-1 und dem zweiten Exon von sT2-3 besteht (Abb. 3.15). Vermutlich handelt es sich demnach um zwei gleich lange Transkripte (sT2-1+sT2-2 und sT2-3) mit einem fakultativen mittleren Exon, die ungefähr einen Bereich von 45 Kilobasen umspannen. Das Transkript sT2-3 ist mit einem annotierten EST identisch und wurde bereits einmal in neuroendokrinen Tumorgewebe detektiert (Abb. 3.15). Weiter ist ersichtlich, dass das zweite Exon von sT2-2 und sT2-3 mit dem zweiten Exon des annotierten PIK3IP1-AS1-Gens (PIK3IP1 antisense RNA 1) übereinstimmt, das in der validierten RefSeq-Variante nicht in T-Zellen sequenziert werden konnte (Abb. 3.15). Demzufolge wird es sich bei den sequenzierten Transkripten um verschiedene Isoformen der PIK3IP1-AS RNA handeln, die vom selben Promotor wie PIK3IP1 transkribiert werden und ebenso wie die sense mRNA während der T-Zellaktivierung herunterreguliert werden.

Auch bei TREAT3 handelt es sich um ein Transkript, das vom Promotor eines Protein-kodierenden Gens, in diesem Fall *SATB homeobox 1* (SATB1), in Antisense-Richtung abgeschrieben wird (Abb. 3.16). In der aktualisierten RefSeq-Annotation (2014) wurde mittlerweile die gespleißte SATB1 antisense RNA 1 (SATB1-AS1) vermerkt, die sehr genau mit dem Bereich von TREAT3 übereinstimmt (Abb. 3.16). Bei der Sequenzierung der T-Zellproben wurden Transkripte detektiert, die SATB1-AS1 entsprechen (sT3-1) bzw. ein zusätzliches mittleres Exon aufweisen (sT3-2) (Abb. 3.16). Das Vorkommen von sT3-2 ist in T-Helferzellen dabei deutlich geringer als das von sT3-1. Aber auch diese Isoform von SATB1-AS1 wurde bereits in zwei ESTs aus Nebenschilddrüsentumor detektiert (Abb. 3.16). Die Transkripte sT3-3, sT3-4 und sT3-5 zeigen an, dass es vereinzelt gespleißte Transkripte gibt, die von der SATB1 antisense RNA 1 in 3'-Richtung noch weiter gehen (Abb. 3.16). Reguliert wird die Transkription von SATB1-AS1 etwas anders als SATB1. In beide Richtungen nimmt die Transkription vom SATB1-Promotor nach zwei und 24 Stunden nach T-Zellaktivierung ab (Abb. 3.16). Auch in Effektor-T-Zellen ist die Expression der sense und antisense RNA geringer als in den naiven T-Zellen (Abb. 3.16). 72 Stunden nach Stimulation

der T-Zellen wird die SATB1-mRNA allerdings wieder verstärkt transkribiert, SATB1-AS1 schein zu diesem Zeitpunkt hingegen fast gänzlich ausgeschaltet zu sein (Abb. 3.16).

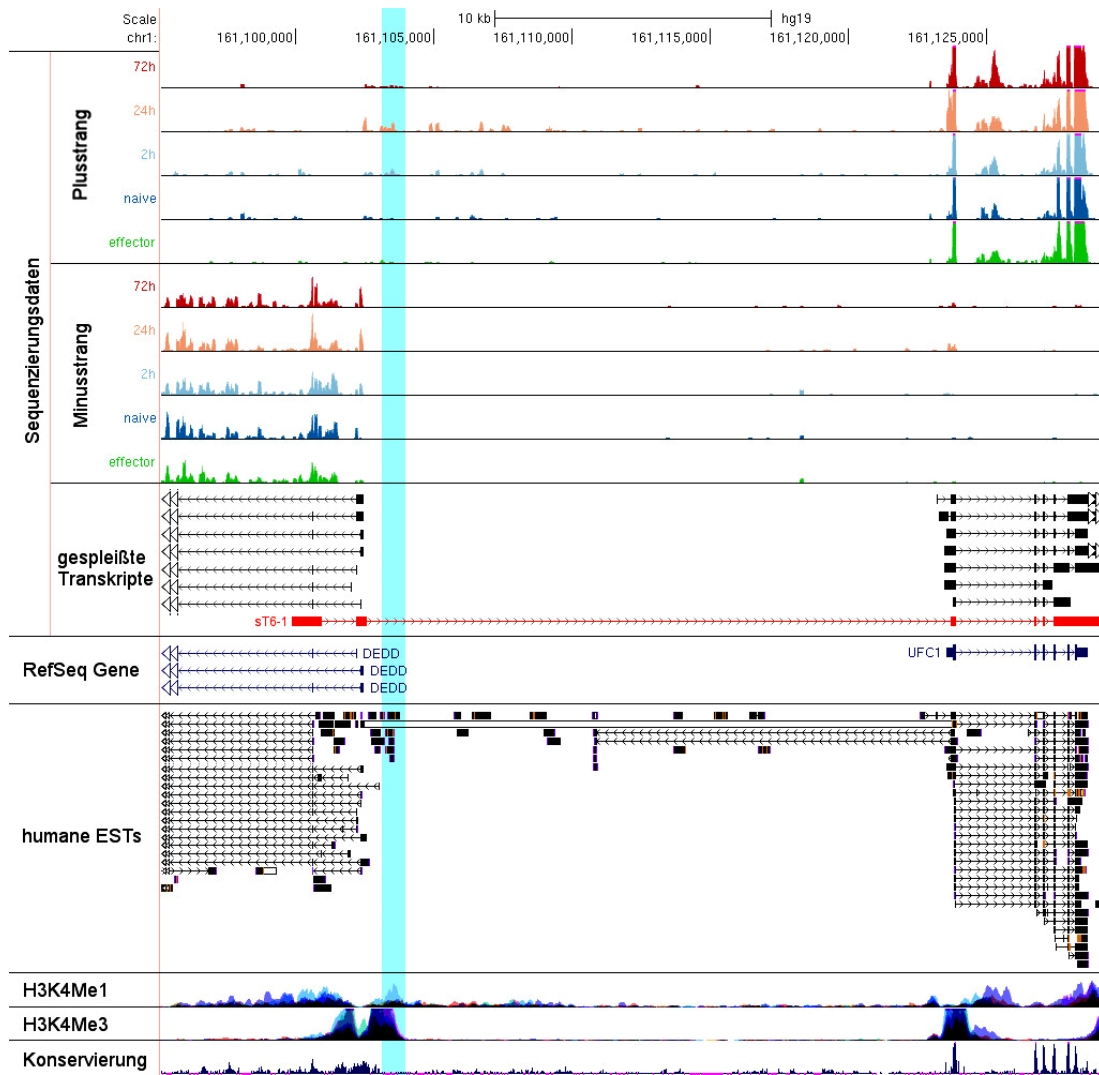


**Abb. 3.15 Sequenzierungsdaten im genomischen Kontext – TREAT2.** Transcript regulated by activation in T cells 2 (chr22: 31 689 000 - 31 712 000 (hg19) Türkis hinterlegt) scheint ein antisense-Transkript von PIK3IP1 zu repräsentieren. Gezeigt sind aus dem UCSC Genome Browser Chromosomenkoordinaten und die Ergebnisse der Hochdurchsatz-Sequenzierungen für den Plus- und Minusstrang von RNA-Proben primärer, naiver und Effektor-T-Zellen sowie die 2, 24 und 72h *in vitro* aktivierter T-Zellen. Darunter folgt eine Darstellung welche Transkripte sequenziert wurden. Dargestellt sind des Weiteren annotierte Gene, Histonmodifikationen, die Konservierung in Vertebraten sowie gespleißte und ungespleißte ESTs im ausgewählten Bereich. PIK3IP1= *phosphoinositide-3-kinase interacting protein 1*; PATZ1= *POZ (BTB) and AT containing zinc finger 1*



**Abb. 3.16 Sequenzierungsdaten im genomischen Kontext – TREAT3.** Transcript regulated by activation in T cells 3 (chr1: 18 589 400 - 18 680 400 (hg19) Türkis hinterlegt) scheint SATB1-AS1 zu repräsentieren. Gezeigt sind Chromosomenkoordinaten aus dem UCSC Genome Browser und die Ergebnisse der Hochdurchsatz-Sequenzierungen für den Plus- und Minusstrang von RNA-Proben primärer, naiver und Effektor-T-Zellen sowie die 2, 24 und 72h *in vitro* aktivierter T-Zellen. Darunter folgt eine Darstellung welche Transkripte sequenziert wurden. Dargestellt sind des Weiteren annotierte Gene (RefSeq), Histonmodifikationen (ENCODE), die Konservierung in Vertebraten (Vertebrate Cons) sowie gespleißte und ungespleißte ESTs im ausgewählten Bereich. SATB1= *SATB homeobox 1*

Die Sequenzierungsdaten von TREAT6 zeigen, dass die Transkription in diesem Bereich vom Plusstrang erfolgt (Abb. 3.17). Vermutlich wird die gleiche Promoterregion wie von *death effector domain containing* (DEDD) benutzt. TREAT6 liegt im Intron eines gespleißten sequenzierten Transkriptes (sT6-1) (Abb. 3.17). sT6-1 ist sehr gering exprimiert und stimmt mit einem EST überein, das in Knochenmarksgewebe detektiert wurde (Abb. 3.17). Es scheint eine seltene Isoform von *ubiquitin-fold modifier conjugating enzyme 1* (UFC1)



**Abb. 3.17 Sequenzierungsdaten im genomischen Kontext – TREAT6.** Transcript regulated by activation in T cells 6 (chr1: 161 103 100 - 161 103 900 (hg19) Türkis hinterlegt) repräsentiert ein Transkript, das vom Plusstrang transkribiert wird. Gezeigt sind aus dem UCSC Genome Browser Chromosomenkoordinaten und die Ergebnisse der Hochdurchsatz-Sequenzierungen für den Plus- und Minusstrang von RNA-Proben primärer, naiver und Effektor-T-Zellen sowie die 2, 24 und 72h *in vitro* aktivierter T-Zellen. Darunter folgt eine Darstellung welche Transkripte sequenziert wurden. Dargestellt sind des Weiteren annotierte Gene (RefSeq), Histonmodifikationen (ENCODE), die Konservierung in Vertebraten (Vertebrate Cons) sowie gespleißte und ungespleißte ESTs im ausgewählten Bereich. DEDD= *death effector domain containing*; UFC1= *ubiquitin-fold modifier conjugating enzyme 1*

darzustellen, da es drei Exons mit der mRNA gemeinsam hat. Im Bereich von TREAT6 wurden keine weiteren Spleißereignisse detektiert. Einige ungespleißte ESTs sind in der Region annotiert. Demnach handelt es sich anscheinend um eine ungespleißte RNA – eventuell ist es auch Bestandteil des Primärtranskriptes von sT6-1. Sowohl DEDD als auch TREAT6 und UFC1 werden anscheinend während der T-Zellaktivierung in der gleichen Art und Weise reguliert. Ihre Expression ist 24 Stunden nach Stimulation am stärksten und nach 72 Stunden bereits wieder gesunken.

### 3.2.3 Validierung der T-Zellaktivierungs-Genomdaten

Für die Validierung der Transkriptom-Daten wurden mehrere differentiell exprimierte Transkripte ausgewählt und mittels *real-time* PCR überprüft. Dabei wurden Gene analysiert wie Tumornekrosefaktor (TNF) oder microRNA 155, die bekanntermaßen direkt nach T-Zellaktivierung induziert werden<sup>171,172</sup>, aber auch nicht-kodierende RNAs wie *myocardial infarction associated transcript* (MIAT), *small nucleolar RNA host gene 16* (SNHG16), *long intergenic non-protein-coding RNA 515* (LINC00515) und 152 (LINC00152 bzw. LOC541471) (Anhang Abb. I - V), die bisher noch nicht im Zusammenhang mit T-Zellen beschrieben wurden. Auch die Expression der neu identifizierten *transcripts regulated by activation in T cells* (TREATs) (Anhang Abb. VI - XI) wurde mittels qPCR untersucht. Dazu wurden neue Primer designt, die RNA-Proben von Effektor-, naiven und aktivierten (2h, 24h und 72h) T-Helferzellen in cDNA umgeschrieben und die Genexpression anschließend unter Verwendung der verschiedenen Transkript-spezifischen Primerpaare mittels *real-time* PCR nachgemessen. Die Messwerte wurden gegen die des Haushaltsgens U6 normalisiert und die veränderte Genexpression bezogen auf die naiver T-Zellen berechnet. Die im Tiling Array beobachtete Repression oder Induktion aller untersuchten Transkripte konnte mittels qPCR verifiziert werden, wobei die Veränderung der Genexpression sogar stärker war als in den ursprünglichen Transkriptom-Daten (Anhang Tab. I). Dies unterstützt auch die Hypothese, dass es sich bei den TREATs um reale Transkripte handelt, die während der T-Zellaktivierung reguliert werden und möglicherweise eine Rolle bei der Aktivierung und Differenzierung der T-Helferzellen spielen.

## 3.3 Untersuchung der nicht-kodierenden RNA STAIR18 / ncRNA152

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Regulation der macroRNA STAIR18 in gleich zwei unterschiedlichen Prozessen in verschiedenen Lymphozyten beobachtet. STAIR18 wurde als knapp 100 Kilobasen lange nicht-kodierende RNA identifiziert, die durch Interleukin-6 in

Multiplen Myelom-Zellen induziert wird. Überraschenderweise zeigte sich bei der Untersuchung differentiell exprimierter Transkripte während der Aktivierung von T-Helferzellen, dass STAIR18 auch bei diesem Prozess reguliert wird. Da STAIR18 demnach durch zwei verschiedene Signalwege induziert wird und daher womöglich eine entscheidende Rolle im Immunsystem spielt, ist diese macroRNA in den Vordergrund dieser Arbeit gerückt, und wird im Folgenden eingehender untersucht.

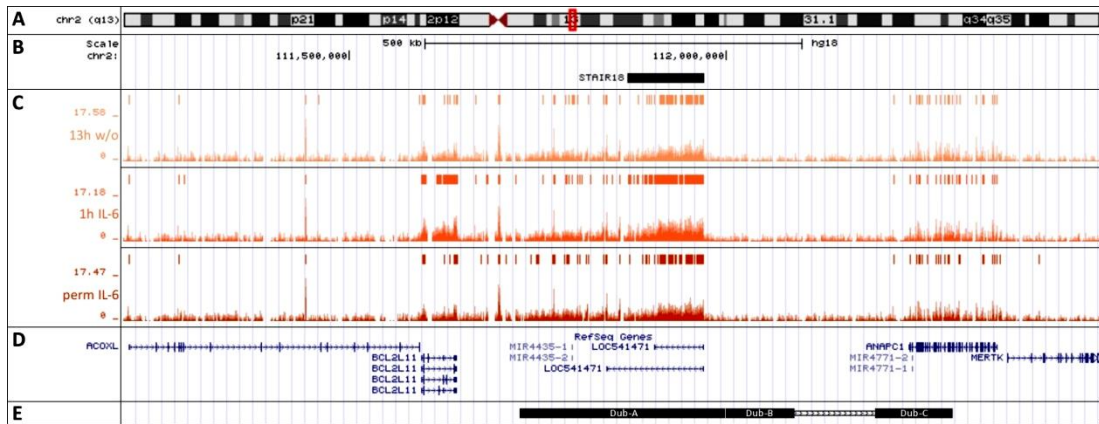
### 3.3.1 STAIR18 ist im humanen Genom dupliziert

Bei der Untersuchung von STAIR18 fiel auf, dass geblastete Sequenzabschnitte der macroRNA nicht nur im erwarteten Bereich q13 des langen Armes von Chromosom 2 vorkamen (Abb. 3.18), sondern auch immer wieder in der Region p11.2 auf dem kurzen Arm dieses Chromosoms zu finden waren (Abb. 3.19). Daraufhin wurde überprüft, inwieweit beide Abschnitte des menschlichen Genoms identisch sind. Hierfür wurde die Sequenz von Chromosom 2 q13 im UCSC Genome Browser systematisch in 25 Kilobasen-Segmenten gegen das menschliche Genom geblastet. Die Analyse ergab, dass ein 460 Kilobasen langes Fragment (DubA, DubB und DubC) zweimal auf Chromosom 2 vorkommt. Somit sind nicht nur STAIR18 sondern auch die benachbarten microRNA-Gene (MIR4435-1, MIR4435-2, MIR4771-1 und MIR-4771-2) dupliziert. Beide Regionen sind bis auf eine Insertion (zwischen DubA und DubB) und eine Deletion (zwischen DubB und DubC) von jeweils ungefähr 100 Kilobasen zu 99,3 Prozent identisch. In Abbildung 3.18\_E und 3.19\_E ist die Lage des duplizierten Bereiches im genomischen Kontext an beiden Stellen auf Chromosom 2 dargestellt. Die Orientierung des duplizierten Fragments ist an den zwei Positionen entgegengesetzt.

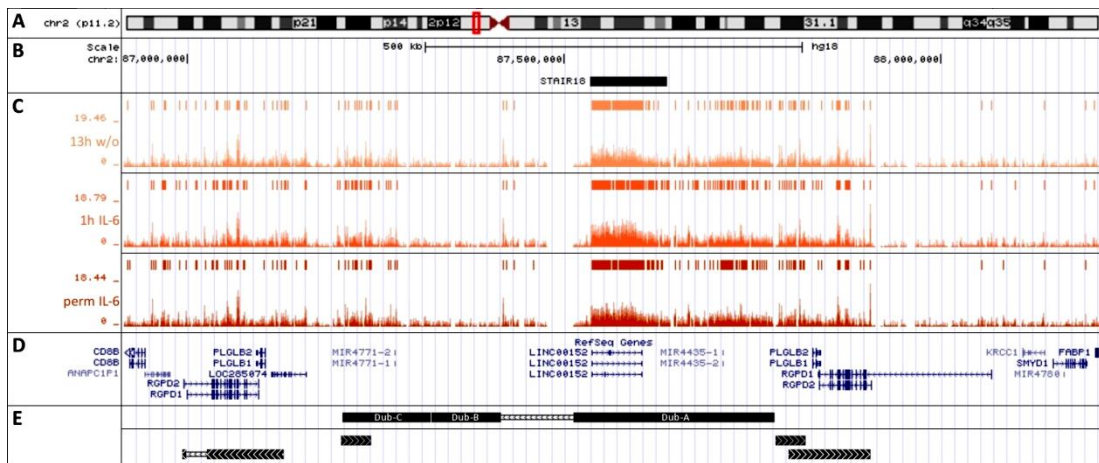
Da die Identität beider Regionen von STAIR18 äußerst hoch ist, wurde vermutet, dass der Bereich erst vor kurzer Zeit im Verlauf der Evolution dupliziert wurde. Im nächsten Schritte wurde analysiert, bei welcher Spezies die Duplikation das erste Mal aufgetreten ist. Hierzu wurde STAIR18 als erstes gegen verschiedene Genome der nächsten mit dem Menschen verwandten Hominidae geblastet. Die Sequenz der 100 Kilobasen langen macroRNA ist in Orang-Utans (zu 97,1% identisch), Gorillas (zu 98,4% identisch) und Schimpansen (zu 98,7% identisch) stark konserviert. Dies entspricht der durchschnittlichen genomischen Divergenz des Menschen zu den jeweiligen anderen Hominidae<sup>173</sup>. Dupliziert ist STAIR18 allerdings in keiner der anderen Gattungen. Demnach hat die Duplikation erst bei unseren direkten Vorfahren stattgefunden. Analysiert man die Umgebung von STAIR18 in verschiedenen Mammalia, so entspricht diese immer der Region des humanen Chromosom 2 q13, in der die macroRNA von den Genen BCL2L11 (*B-cell lymphoma 2 like 11*) und ANAPC1 (*anaphase promoting complex subunit 1*) flankiert wird (Abb. 3.18). Demnach handelt es sich bei dem Bereich innerhalb des humanen Chromosom 2 p11.2 um die bei der Entwicklung des



Menschen neu entstandene Duplikation (Abb. 3.19). Untersucht man die flankierenden Bereiche des inserierten Fragmentes, stellt man fest, dass diese auf beiden Seiten der Duplikation identisch sind (Abb. 3.19\_E\_unten). Auch die PLGLB- (*plasminogen-like B1 und B2*) und RGPLD-Gene (*RANBP2-like and GRIP domain containing 1 und 2*) sind dupliziert. Es ist daher sehr wahrscheinlich, dass hier vor kurzer Zeit während der Evolution des



**Abb. 3.18: Darstellung von STAIR18 im genomischen Kontext.** (A) Lage von STAIR18 auf dem langen Arm von Chromosom 2. (B) Gezeigt sind Chromosomenkoordinaten (hg18-Version) und Position der macroRNA. (C) Abbildung der Tiling Array-Daten sowie der stark exprimierten Intervalle generiert aus der RNA von INA-6-Zellen nach 13-stündigem IL-6-Entzug, einstündiger und permanenter Stimulation. Dargestellt sind des Weiteren annotierte Gene (RefSeq) (D) und die duplizierten Bereiche in der Umgebung von STAIR18 (E).



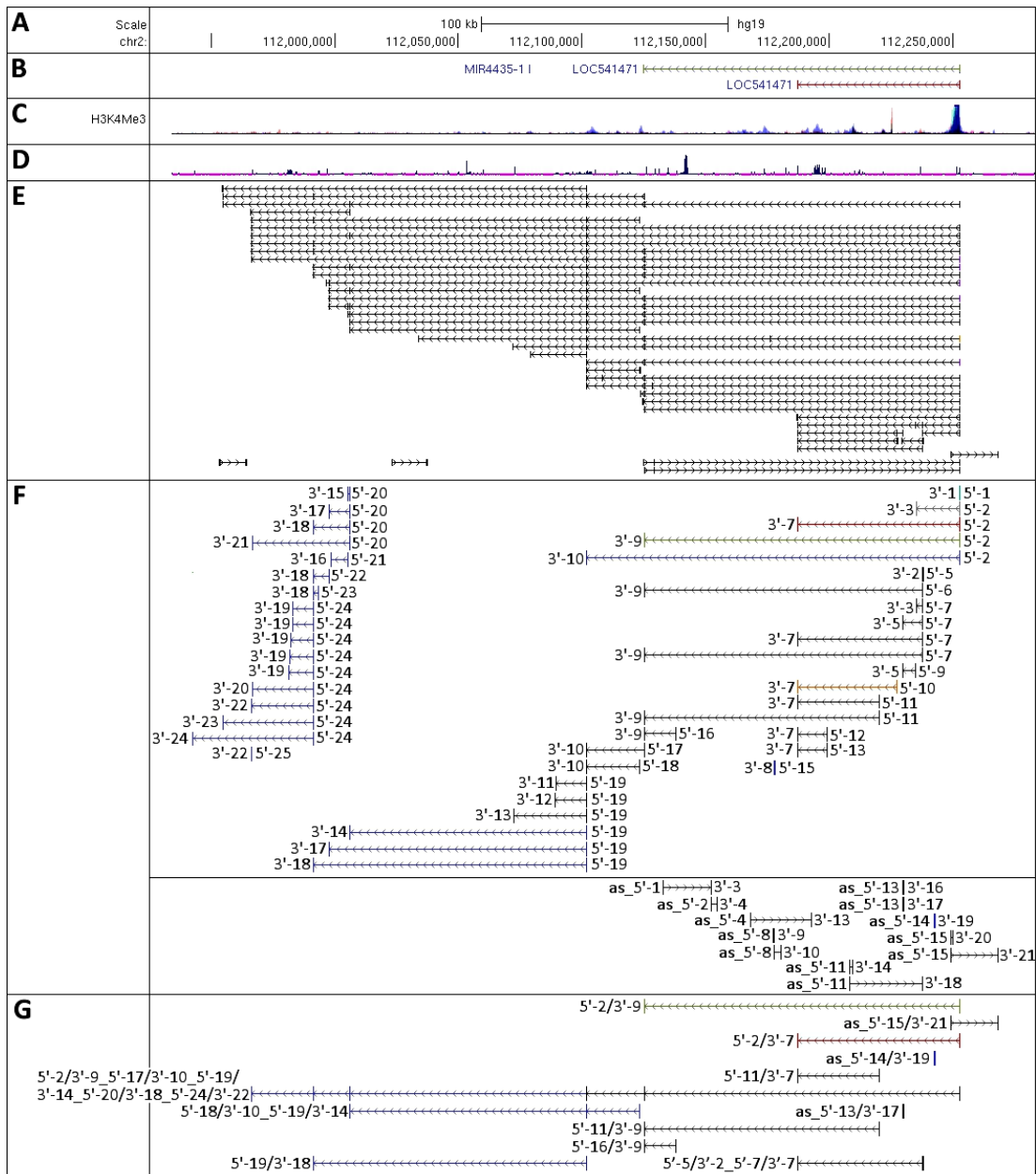
**Abb. 3.19: Darstellung der Duplikation von STAIR18 im genomischen Kontext.** (A) Lage des duplizierten STAIR18 auf dem kurzen Arm von Chromosom 2. (B) Gezeigt sind Chromosomenkoordinaten (hg18-Version) und Position der macroRNA. (C) Abbildung der Tiling Array-Daten sowie der stark exprimierten Intervalle generiert aus der RNA von INA-6-Zellen nach 13-stündigem IL-6-Entzug, einstündiger und permanenter Stimulation. (D) Dargestellt sind die annotierten Gene (RefSeq). (E) Oben sind die duplizierten Bereiche der Umgebung von STAIR18 gezeigt und unten sind die repetitiven, flankierenden Bereiche des inserierten Fragmentes abgebildet.



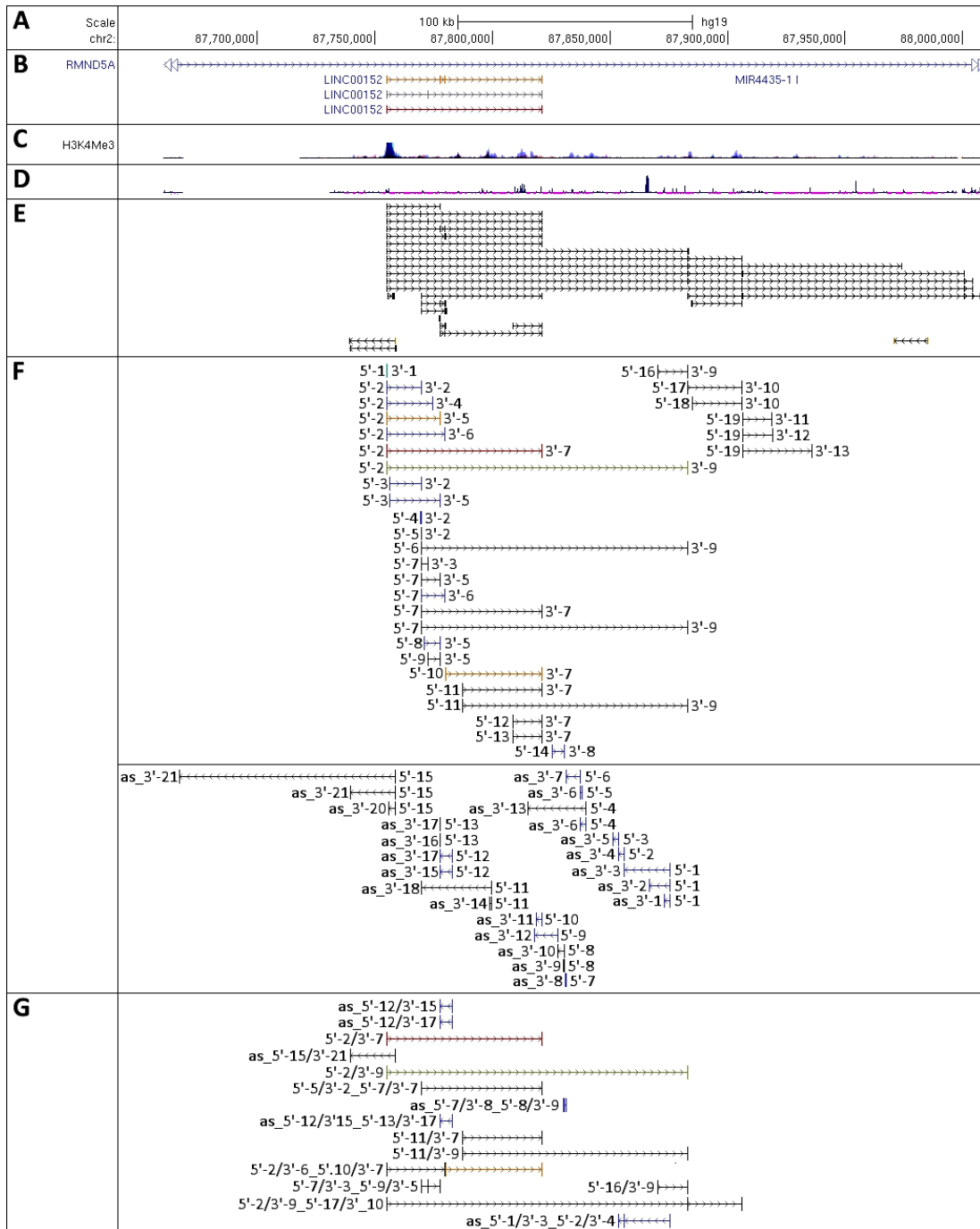


Gene unterscheiden sich in einer Deletion und fünf Substitutionen jeweils einer Base (Abb. 3.20\_A), zudem ist der Transkriptionsstart bei der LINC00152 38 Basenpaare weiter stromabwärts annotiert. Die Identität beider ncRNAs ist sehr hoch, aber die sequenzierten cDNAs, die der jeweiligen annotierten lncRNA entsprechen, indizieren, dass tatsächlich beide Gene exprimiert werden und demnach beide STAIR18-Bereiche transkriptionell aktiv sind. Da die ESTs zudem zeigen, dass neben den annotierten LOC541471- und LINC00152-Isoformen noch weitere Spleißvarianten auftreten können, wurden die Spleißereignisse innerhalb der beiden STAIR18-Loci mit Hilfe der Sequenzierungsdaten der T-Zellaktivierung analysiert.

In Abbildung 3.21\_E und 3.22\_E sind die in T-Zellen detektierten Spleißstellen dargestellt. Wie häufig die angegebenen Spleißstellen sequenziert wurden, ist im Anhang in den Tabellen III und IV aufgelistet, dabei ist zu beachten, dass eine Spleißstelle auch mehrmals auf das menschliche Genom aliniert sein kann. Bei Spleißereignissen, die auf beide STAIR18-Loci gemappt wurden, kann in der Regel nicht bestimmt werden von welchem Bereich sie transkribiert wurden. In diesen Fällen ist es möglich, dass die entsprechenden Transkripte von nur einem oder beiden Orten generiert wurden. Die Ergebnisse zeigen, dass von beiden STAIR18-Bereichen diverse gespleißte Transkripte sequenziert wurden (Abb. 3.21 und 3.22). Es konnten sense und antisense Spleißereignisse zusätzlich zu den annotierten lncRNAs detektiert werden. Diese entsprechen teilweise publizierten ESTs (angegeben in Anhang Tab. III und IV), aber es wurden auch gänzlich unbekannte Spleißvarianten nachgewiesen. Aus den abundanten Spleißereignissen wurden die häufiger vorkommenden Transkriptvarianten der beiden STAIR18-Loci abgeleitet (Abb. 3.21\_G und 3.22\_G). Von beiden Stellen des Genoms wurden in sense Orientierung die Spleißereignisse 5'-2/3'-7, das mit der LOC541471 Variante 2 beziehungsweise der LINC00152 Variante 3 übereinstimmt, und 5'-2/3'-9, das der LOC541471 Variante 1 entspricht, am häufigsten in T-Zellen sequenziert, wobei die längere der beiden Isoformen vom ursprünglichen STAIR18-Locus häufiger vorkommt als die kürzere. Die Spleißstellen 5'-11/3'-7, 5'-11/3'-9 und 5'-16/3'-9 wurden ebenfalls auf beide STAIR18-Bereiche aliniert und könnten auf alternative Transkriptionsstartstellen hindeuten. Auch die Transkriptvariante 5'-5/3'-2\_5'-7/3'-7 könnte mit einem zusätzlichen Transkriptionsstart assoziiert sein. Diese Isoform wurde ebenfalls auf beide Orte gemappt, allerdings stimmen die Sequenzierungen häufiger mit dem LINC00152-Locus überein. Es existieren zudem bereits ESTs, die dieses Spleißmuster aufweisen. Viele gespleißtes ESTs stimmen auch mit den Transkriptvarianten 5'-2/3'-9\_5'-17/3'-10\_5'-19/3'-14\_5'-20/3'-18\_5'-24/3'-22, 5'-18/3'-10\_5'-19/3'-14 und 5'-19/3'-18 überein. Sie werden wahrscheinlich vom LOC541471-Locus generiert und ihre Prozessierung könnte eventuelle mit der Expression der microRNA-4435-1 assoziiert sein. Das Transkript 5'-2/3'-6\_5'-10/3'-7 ist hingegen spezifisch für die duplizierte STAIR18-Region und hat die letzte Spleißstelle mit der LINC00152-Varante 1 gemeinsam.



**Abb. 3.21: Spleißvarianten der ncRNA152 im LOC541471-Locus.** Gezeigt sind Chromosomenkoordinaten (hg19-Version) (A), annotierten Gene (RefSeq) (B), die Promotor-assoziierte H3K4Me3-Histonmodifikation (ENCODE) (C) und die Konservierung in Vertebraten (Vertebrate Cons) (D) im Ursprungslocus von STAIR18. (E) Abbildung der zusammengefassten, gespleißten ESTs. (F) Dargestellt sind die bei der Hochdurchsatz-Sequenzierung der T-Zell-RNA verschiedener Aktivierungszustände (naive, 2h, 24h, 72h, Effektor) detektierten sense und antisense Spleißstellen. (G) Abgebildet sind die abundanten, entsprechend ihrer Häufigkeit geordneten, abgeleiteten, sense und antisense Spleißvarianten in T-Zellen. **Grün**=LOC541471-Variante1 (5'-2/3'-9); **Rot**=LOC541471-Variante2 (5'-2/3'-7); **Türkis**=450bp Isoform der ncRNA152 (5'-1/3'-1); **Blau**=Spleißstellen, die für diesen STAIR18-Locus spezifisch sind.



**Abb. 3.22: Spleißvarianten der ncRNA152 im LINC00152-Locus.** Gezeigt sind Chromosomenkoordinaten (hg19-Version) (A), annotierten Gene (RefSeq) (B), H3K4Me3-Histonmodifikation (ENCODE) (C) und die Konservierung in Vertebraten (Vertebrate Cons) (D) im duplizierten Locus von STAIR18. (E) Abbildung der zusammengefassten, gespleißten ESTs. (F) Dargestellt sind die bei der Hochdurchsatz-Sequenzierung der T-Zell-RNA (naive, 2h, 24h, 72h, Effektor) detektierten sense und antisense Spleißstellen. (G) Abgebildet sind die abundanten, entsprechend ihrer Häufigkeit geordneten, abgeleiteten Spleißvarianten in T-Zellen. **Orange**=LINC00152-Variante1 (5'-2/3'-5\_5'-x/3'-6\_5'-10/3'-7); **Grau**=LINC00152-Variante2 (5'-2/3'-2\_5'-9/3'-7); **Rot**=LINC00152-Variante3 (5'-2/3'-7); **Türkis**=450bp ncRNA152 (5'-1/3'-1); **Blau**=Spleißstellen, die für diesen STAIR18-Locus spezifisch sind.

Überlappend mit STAIR18 sind bis jetzt nur vereinzelte gespleißte antisense ESTs publiziert (Abb. 3.21\_E und 3.22\_E). Am häufigsten wurde davon die antisense cDNA as\_5'-15/3'-21 sequenziert (Anhang Tab. III und IV). Diese Spleißstelle wurde auch in den T-Zellen oft detektiert und kann an beide Stellen des humanen Genoms aliniert werden, wobei die Sequenzierungen häufiger mit dem duplizierten Locus übereinstimmen. Insgesamt konnten mehr antisense Spleißereignisse vom LINC00152-Locus als vom Ursprungsort von STAIR18 nachgewiesen werden. Die einzige für den LOK541471-Locus spezifische, in T-Zellen sequenzierte Spleißstelle ist 5'-14/3'-19, für die zuvor noch keine übereinstimmende cDNA dokumentiert wurde (Abb. 3.21\_G). In der duplizierten Region wurden stattdessen die abundanten, gespleißten antisense Transkripte as\_5'-12/3'-15, as\_5'-12/3'-17 und as\_5'-12/3'-15\_5'-13/3'-17 sowie as\_5'-7/3'-8\_5'-8/3'-9 und as\_5'-1/3'-3\_5'-2/3'-4 detektiert, die bis dato noch nicht als ESTs annotiert wurden (Abb. 3.22\_G).

Im Folgenden wird in dieser Arbeit für das bessere Verständnis nicht mehr zwischen LOC541471 und LINC00152 unterschieden und stattdessen von der ncRNA152 gesprochen, die beide ncRNAs einschließt. Der exakte Transkriptionsstart der ncRNA152 lässt sich nicht bestimmen, da die publizierten ESTs sowie die Sequenzierungsdaten der T-Zellen an dieser Stelle an beiden genomischen Orten stark variieren.

### 3.3.3 Regulation der ncRNA152

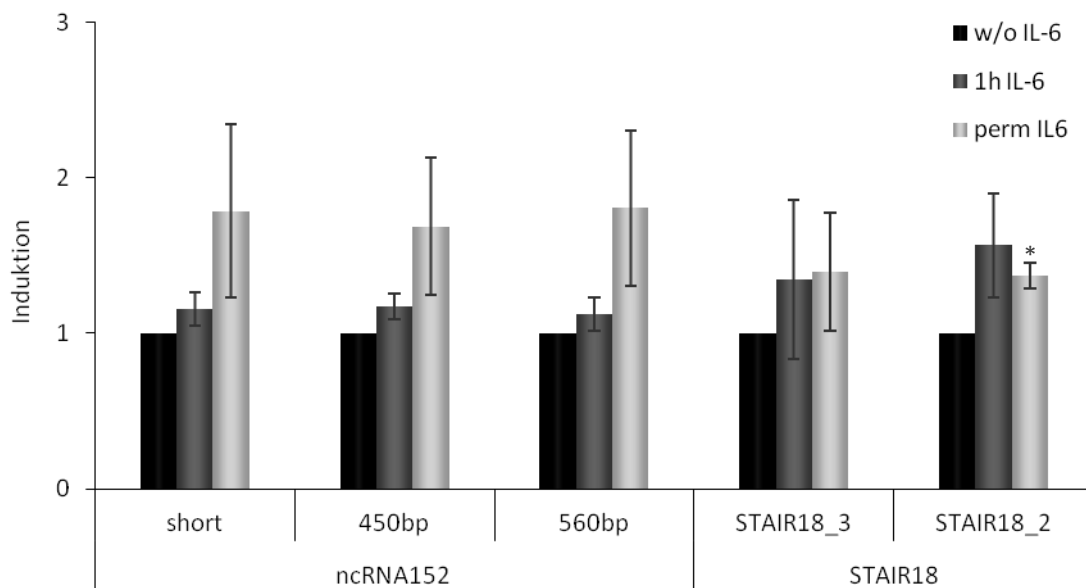
Zur weiteren Charakterisierung der ncRNA152 wurde untersucht, ob nicht nur die Expression der überlappenden macroRNA STAIR18, sondern auch das gespleißte Transkript durch Interleukin-6 oder bei der Aktivierung von T-Zellen induziert wird. Bei der Sequenzierung der ncRNA152 stellte sich heraus, dass nicht nur die annotierte 560 bp Transkriptvariante exprimiert wird, sondern auch eine weitere 450 bp Isoform, die eine zusätzliche Spleißstelle innerhalb des ersten Exons der ncRNA152 aufweist (Abb. 3.20\_B). Daraufhin wurden neben dem PCR-Primerpaar ncRNA152\_short, welches beide Isoformen amplifiziert, zwei weitere Isoform-spezifische Primerpaare designt, um zwischen den beiden Transkriptvarianten zu unterscheiden (Abb. 3.20\_C). Zusätzlich wurden auch immer zwei Primerpaare (STAIR18\_3 und STAIR18\_2) zum Messen der STAIR18 macroRNA verwendet, um Hinweise auf eine mögliche Kopplung der Transkription von STAIR18 und ncRNA152 zu erhalten. Beide STAIR18-Primerpaare binden im Intron der ncRNA152, wobei STAIR18\_3 zehn Kilobasen hinter dem ersten Exon und STAIR18\_2 neun Kilobasen vor dem zweiten Exon der ncRNA liegt.

### 3.3.3.1 Induktion der ncRNA152 durch IL-6

Im Folgenden wurde untersucht, ob neben der bereits demonstrierten Induktion der macroRNA STAIR18 durch Interleukin-6 (Abb. 3.7) auch die überlappende gespleißte ncRNA152 durch IL-6 reguliert wird. Hierfür wurden drei unterschiedliche Zelllinien (INA-6, XG-1 und HepG2) mit Interleukin-6 behandelt und zu verschiedenen Zeitpunkten RNA der Zellen isoliert. Nach erfolgter cDNA-Synthese wurde eine quantitative *real-time* PCR mit SYBR Green durchgeführt (siehe 2.2.4). Die Ergebnisse wurden mit Hilfe des Haushaltsgens U6 standardisiert. Anschließend wurde die Induktion der Transkription bezogen auf die unbehandelte Probe (w/o IL-6) berechnet und in einem Diagramm dargestellt. Die erfolgreiche Stimulation durch Interleukin-6 wurde zudem durch die Induktion etablierter STAT3-Zielgene bestätigt (Daten nicht gezeigt).

#### INA-6

In der IL-6-abhängigen Multiplen Myelom-Zelllinie INA-6 lässt sich sowohl die Expression der STAIR18 macroRNA als auch die der ncRNA152 um knapp den Faktor zwei induzieren (Abb. 3.23). Die Transkription von STAIR18 hat bereits nach ungefähr einer Stunde ihr Maximum erreicht und bleibt bei permanenter Interleukin-6-Stimulation auf dem gleichen

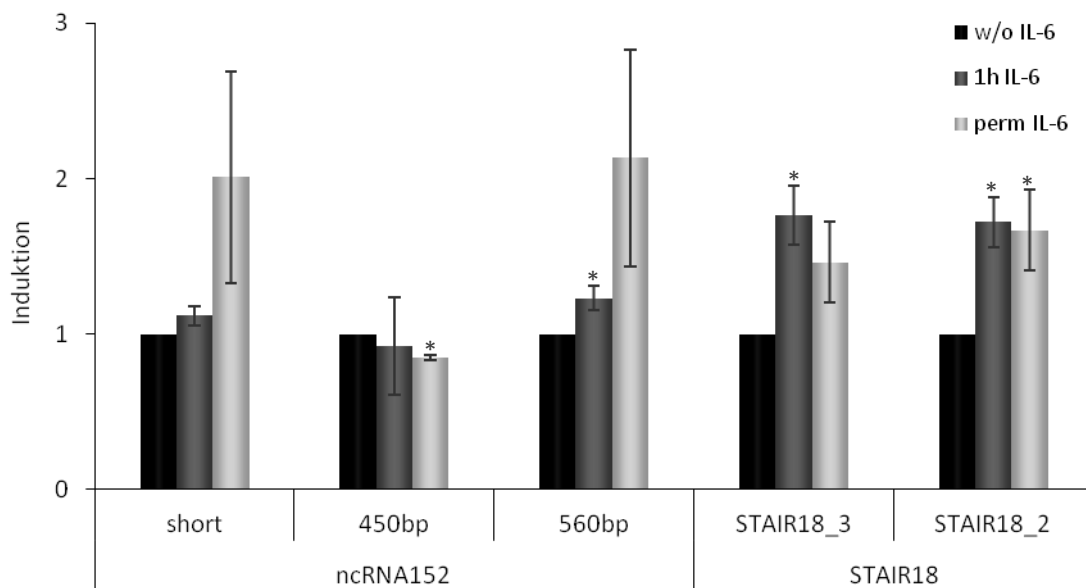


**Abb. 3.23: IL-6-abhängige Induktion von ncRNA152 und STAIR18 in INA-6-Zellen.** INA-6-Zellen wurde für 13 Stunden IL-6 entzogen (w/o IL-6), IL-6 wurde nach 12-stündigem Entzug für 1 Stunde wiederzugegeben (1h IL-6) oder die Zellen wurden permanent mit IL-6 kultiviert (perm IL6). IL-6 wurde in einer Konzentration von 1 ng/ml verwendet. Die RNA der Zellen wurde präpariert, in cDNA umgeschrieben und die RNA-Menge durch real-time PCR mit SYBR Green quantifiziert. Es wurde auf U6 snRNA standardisiert und auf die gehungerte Probe normalisiert. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichung aus drei unabhängigen Experimenten.

Level, wohingegen die Menge der gespleißten ncRNA nach einer Stunde erst langsam anfängt zuzunehmen und sich erst später bei permanenter Anwesenheit des Zytokins die Expression verdoppelt hat (Abb. 3.23). Die zwei Isoformen der ncRNA152 zeigen keine Unterschiede in ihrer Induzierbarkeit durch Interleukin-6, lediglich die RNA-Menge der 450 bp Transkriptvariante ist deutlich geringer (Faktor 10) als die der 560 bp Isoform (Daten nicht gezeigt).

### XG-1

Die IL-6-abhängige Induktion von STAIR18 und ncRNA152 wurde in XG-1 einer weiteren Multiplen Myelom-Zelllinie untersucht. Wie auch in den INA-6-Zellen lässt sich die RNA-Menge von ncRNA152 und STAIR18 durch IL-6 verdoppeln (Abb. 3.24). In XG-1-Zellen ist die maximale Expression von STAIR18 ebenfalls bereits nach einer Stunde erreicht und nimmt nach permanenter Stimulation wieder minimal ab (Abb. 3.24). Die RNA-Menge der 560 bp Transkriptionsvariante verdoppelt sich in XG-1- wie in den INA-6-Zellen erst nach permanenter IL-6-Stimulation (Abb. 3.24). Ein Unterschied zwischen beiden Zelllinien ist die Expression der 450 bp Isoform der ncRNA152. Deren Expression ist in XG-1-Zellen noch einmal deutlich geringer (50-fach geringer als 560 bp Transkript). Außerdem lässt sich die

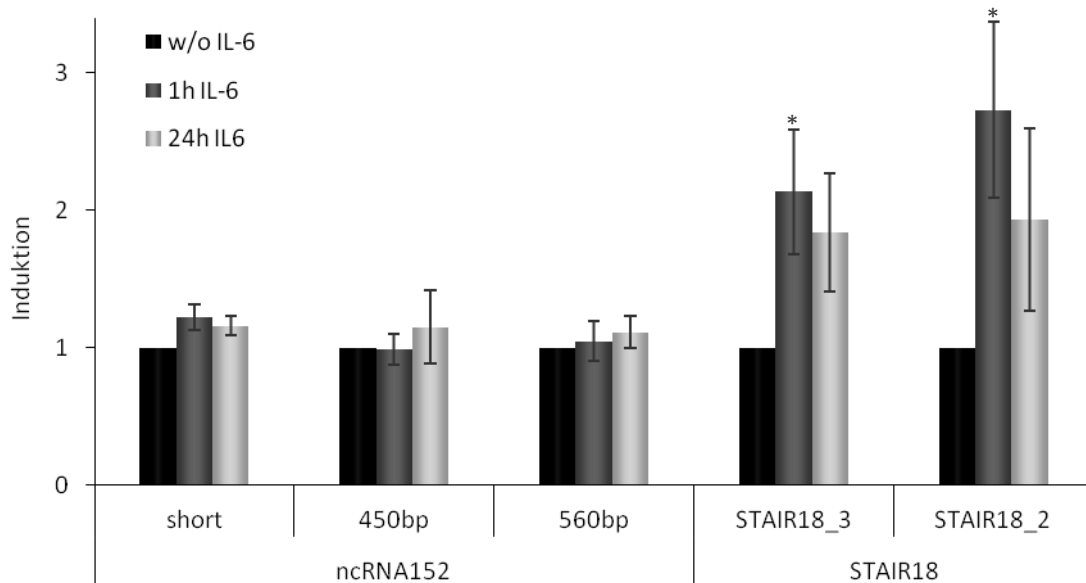


**Abb. 3.24: IL-6-abhängige Induktion von ncRNA152 und STAIR18 in XG-1-Zellen.** XG-1-Zellen wurde für 72 Stunden IL-6 entzogen (w/o IL-6), IL-6 wurde nach 72-stündigem Entzug für 1 Stunde wiederzugegeben (1h IL-6) oder die Zellen wurden permanent mit IL-6 kultiviert (perm IL-6). IL-6 wurde in einer Konzentration von 2 ng/ml verwendet. Die RNA der Zellen wurde präpariert, in cDNA umgeschrieben und die RNA-Menge durch real-time PCR mit SYBR Green quantifiziert. Es wurde auf U6 snRNA standardisiert und auf die gehungerte Probe normalisiert. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichung aus drei unabhängigen Experimenten.

Expression der kürzeren Transkriptvariante der ncRNA152 nicht durch Interleukin-6 induzieren.

## HepG2

Um die Regulation der ncRNA152 und der macroRNA STAIR18 durch Interleukin-6 neben den Multiplen Myelom-Zelllinien noch in einem weiteres Zellsystem zu analysieren, wurden HepG2-Zellen für eine oder 24 Stunden mit IL-6 stimuliert. Diese Leberkarzinom-Zellen exprimieren den IL-6-Rezeptor und sind somit auch in der Lage, das IL-6-Signal in die Zellen weiterzuleiten. Die Induktion von STAIR18 verläuft so wie in INA-6 und XG-1-Zellen. Die Expression der macroRNA verdoppelt sich nach Interleukin-6-Gabe, dabei erreicht sie ihr Maximum nach ungefähr einer Stunde und fällt nach 24 Stunden minimal ab (Abb. 3.25). Im Gegensatz zu den Multiplen Myelom-Zellen lässt sich keine der beiden ncRNA152-Isoformen durch Interleukin-6 induzieren (Abb. 3.25). Das Expressionslevel der beiden Transkriptvarianten entspricht dem der XG-1-Zellen, somit ist auch in den HepG2-Zellen die 450 bp Isoform deutlich geringer (50-fach) als die 560 bp Variante exprimiert (Daten nicht gezeigt).



**Abb. 3.25: IL-6-abhängige Induktion von ncRNA152 und STAIR18 in HepG2-Zellen.** HepG2-Zellen wurden ohne IL-6 kultiviert (w/o IL-6) oder es wurden 10ng/ml IL-6 für eine (1h IL-6) oder 24 Stunden (24h IL-6) zugegeben. Die RNA der Zellen wurde präpariert, in cDNA umgeschrieben und die RNA-Menge durch real-time PCR mit SYBR Green I quantifiziert. Es wurde auf U6 snRNA standardisiert und auf die gehungerte Probe normalisiert. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichung aus drei unabhängigen Experimenten.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass sich die Expression der STAIR18-macroRNA in allen untersuchten Zelllinien durch die Stimulation mit Interleukin-6 verdoppelt (Abb. 3.23 - 3.25). Die stärkste Induktion sieht man hierbei bereits nach einer Stunde. Die Analysen der beiden ncRNA152-Isoformen hat ergeben, dass die 560 bp Transkriptvariante immer dominant exprimiert wird, wobei die 450 bp Isoform in INA-6-Zellen häufiger vorkommt als in den beiden anderen untersuchten Zelllinien. Die Regulation der ncRNA152-Isoformen durch Interleukin-6 ist Zelltyp-spezifisch und im Vergleich zu der STAIR18 macroRNA zeitlich verzögert. Dies deutet darauf hin, dass STAIR18 als Primärtranskript für die ncRNA152 fungiert und die Prozessierung zur gespleißten ncRNA etwas zeitversetzt stattfindet. Die 560 bp Transkriptvariante lässt sich in beiden analysierten Multiplen Myelom-Zelllinien durch IL-6 induzieren, nicht aber in HepG2-Zellen. Ein Einfluss von Interleukin-6 auf die Expression der 450 bp Isoform lässt sich hingegen nur in INA-6-Zellen demonstrieren. Dies lässt vermuten, dass einige Zelltyp-spezifische Faktoren beim Spleißen der ncRNA152 beteiligt sind.

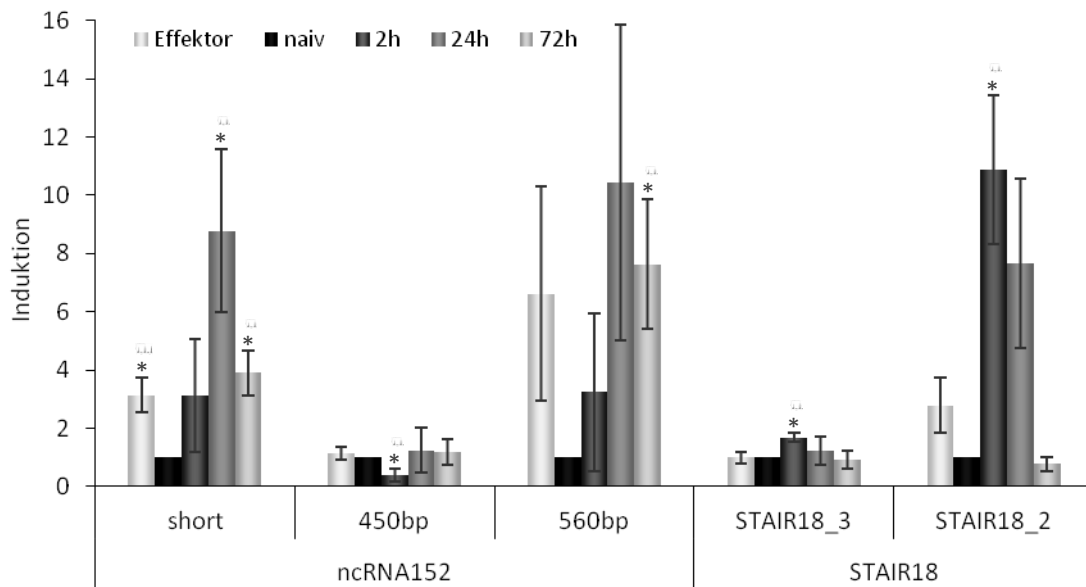
### **3.3.3.2 Regulation der ncRNA152 während der T-Zellaktivierung**

Bei der Analyse der T-Zellaktivierungs-Tiling Array-Daten ist aufgefallen, dass auch die STAIR18 macroRNA nach Aktivierung der T-Zellen hochreguliert wird. Daher wurde die Regulation der ncRNA152 und der macroRNA STAIR18 während der T-Zellaktivierung mittels *real-time* PCR nachgemessen. Hierfür wurden naive und Effektor-T-Zellen aus *Buffy Coats* isoliert (siehe 2.3.1). Ein Teil der naiven T-Helferzellen wurde aktiviert (siehe 2.3.2.3) und die Zellen zu verschiedenen Zeitpunkten (2 h, 24 h, und 72 h) geerntet. Die erfolgreiche Stimulation der Zellen wurde durch die Induktion etablierter Oberflächenmarker mit Hilfe der Durchflusszytometrie bestätigt (siehe 2.3.3). Nach cDNA-Synthese wurde eine quantitative *real-time* PCR mit SYBR Green durchgeführt (siehe 2.2.4). Die Daten wurden mit Hilfe des Haushaltsgens U6 standardisiert. Im Anschluss wurde die Induktion der Transkription bezogen auf die naiven T-Zellen (naiv) berechnet und in einem Diagramm dargestellt (Abb. 3.26). Während der Aktivierung der naiven T-Helferzellen wird die Expression der STAIR18 macroRNA induziert. Dabei ist das maximale Transkriptionslevel bereits nach zwei Stunden erreicht. Nach 24 Stunden ist die Expression von STAIR18 bereits um 30 Prozent zurückgegangen und 72 Stunden nach Aktivierung ist sie wieder bis zum Ausgangswert der naiven T-Zellen gesunken. Vergleicht man die direkt aus dem Blut isolierten Gedächtnis- und Effektor-T-Zellen (Effektor) mit naive T-Helferzellen (naiv) so kann man feststellen, dass auch diese Population irgendwann *in vivo* aktivierter Zellen dreimal so viel STAIR18 exprimieren. Es sei darauf hingewiesen, dass das STAIR18\_3-Primerpaar keine so deutliche Regulation anzeigt wie die STAIR18\_2-Primer. Die Analyse der gespleißten ncRNA152 ergibt ein ähnliches Bild wie das der macroRNA. Die Transkriptmenge der 560 bp Transkriptvariante hat sich zwei Stunden nach Aktivierung der



naiven T-Helferzellen bereits verdreifacht, ist nach 24 Stunden weiter angestiegen (10-fach) und fällt nach 72 Stunden etwas ab – liegt dann allerdings noch immer deutlich über dem Wert der naiven T-Zellen. Die direkt aus dem Blut isolierten Effektor- und Gedächtnis-T-Helferzellen exprimieren die 560 bp Isoform der ncRNA152 auch deutlich stärker als naive T-Zellen. Die 450 bp ncRNA152 Transkriptvariante wird hingegen während der T-Zellaktivierung kaum reguliert. Es zeigt sich lediglich eine kurze Abnahme der Expression zwei Stunden nach Aktivierung.

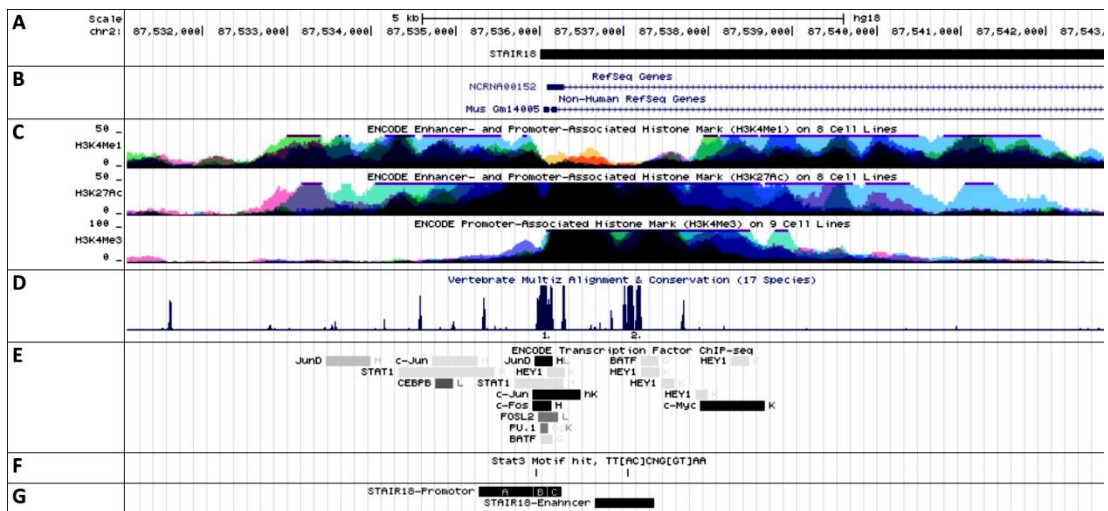
Die macroRNA STAIR18 wird den Untersuchungsergebnissen zufolge während der T-Zellaktivierung deutlich induziert, dabei erreicht die Expression ihr Maximum bereits nach zwei Stunden und fällt nach 72 Stunden wieder auf den Ausgangswert zurück. Die 560 bp Isoform der ncRNA152 wird im Gegensatz erst noch prozessiert und erreicht ihre höchste Expression erst nach 24 Stunden. Das gespleißte Transkript scheint dann aber in den Zellen stabiler zu sein.



**Abb. 3.26: Induktion der ncRNA152 und STAIR18 während der T-Zell-Aktivierung.** Effektor-T-Helferzellen und naive CD4<sup>+</sup> T-Zellen wurden aus Buffy Coats isoliert (Effektor und naiv). Naive T-Helferzellen wurden mit 1µg/ml platten-gebundenen anti-CD3- und 1µg/ml anti-CD28-Antikörper aktiviert und nach 2, 24 und 72 Stunden geerntet (2h, 24h und 72h). Die RNA der Zellen wurde präpariert, in cDNA umgeschrieben und die RNA-Menge durch real-time PCR mit SYBR Green I quantifiziert. Es wurde auf U6 snRNA standardisiert und auf naive T-Zellen normalisiert. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichung aus drei unabhängigen Experimenten.

### 3.3.4 Untersuchung des STAIR18/ncRNA152-Promotors

Im Folgenden sollte die Regulation der Transkription von STAIR18/ncRNA152 näher untersucht werden. Hierfür wurde der Bereich fünf Kilobasen stromabwärts und -aufwärts des putativen STAIR18/ncRNA152-Transkriptionsstarts genauer im UCSC Genome Browser analysiert (Abb. 3.27). Wie bereits bei der Charakterisierung der STAIRs (3.1.1.1) beschrieben weist der 5'-Bereich des ncRNA152-Genes eine Promotor-assoziierte H3K4Me3-Histonmarkierung auf, die sich über eine Länge von drei Kilobasen erstreckt (Abb. 3.27\_C). Innerhalb dieses Bereiches findet man zwei 200 Basen lange, stark konservierte Abschnitte (Abb. 3.27\_D). Der erste überlappt mit dem Transkriptionsstart der ncRNA152 und kennzeichnet wahrscheinlich den Promotor, der zweite liegt ungefähr eine Kilobase stromaufwärts und könnte ein Enhancerelement darstellen. Zur weiteren Analyse dieser putativen Regulationselemente wurden der ENCODE Transkription Factor Chip-seq Track des UCSC Genome Browsers betrachtet (Abb. 3.27\_E). Dieser zeigt Bindungsstellen einiger wichtiger Transkriptionsfaktoren im Genom, die durch Chromatin-Immunpräzipitation mit anschließender Sequenzierung (Chip-Seq) der präzipitierten DNA identifiziert wurden. Am Transkriptionsstart der ncRNA binden demnach einige Transkriptionsfaktoren. Man findet hauptsächlich Proteine aus der Jun-Familie (c-Jun und JunD), der Fos-Familie (c-Fos und FOSL2) und der ATF-Familie (BATF), die den dimeren Transkriptionsfaktor *activator protein 1* (AP-1) bilden können. Des Weiteren wurden auch



**Abb. 3.27: STAIR18/ncRNA152-Promotor und –Enhancer im genomischen Kontext.** (A) Gezeigt sind Chromosomenkoordinaten (hg18-Version) und Start der macroRNA. Abgebildet sind des Weiteren annotierte Gene (human und murin RefSeq) (B), Histonmodifikationen (ENCODE) (C), Konservierung in Vertebraten (Vertebrate Cons) (D) sowie Chip-Seq-Daten einiger Transkriptionsfaktoren (ENCODE) (E). (F) Dargestellt sind die Positionen von STAT3-Konsensussequenzen ( $TT^A/C CNG^T/G AA$ ). (G) Abgebildet sind die untersuchten Bereiche STAIR18-Promotor (Abschnitt A, B und C) und STAIR18-Enhancer.

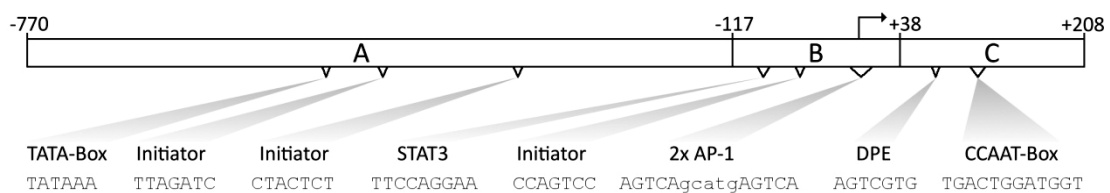
STAT1 und der Repressor *hairy/enhancer-of-split related with YRPW motif 1* (HEY1) in dem betrachteten Abschnitt an der DNA detektiert.

### Konsensussequenzen

Da die Transkription von STAIR18 in INA-6-Zellen durch Stimulation mit Interleukin-6 induziert wird, liegt die Vermutung nahe, dass diese macroRNA durch STAT3 reguliert wird. Im UCSC Genome Browser sind allerdings keine Chip-Seq-Daten für STAT3 annotiert. Daher wurde fünf Kilobasen stromabwärts und -aufwärts des putativen STAIR18/ncRNA152-Transkriptionsstarts nach der Konsensussequenz  $TT^A/cCNG^T/gAA$  einer optimalen STAT3-Bindungsstelle<sup>174</sup> gesucht. Zweimal wurde das Bindungsmotiv in diesem Abschnitt gefunden (Abb. 3.27\_F). Eine potentielle STAT3-Bindungsstelle liegt an Position -93/-84 der ncRNA152, überlappend mit dem ersten stark konservierten Bereich und putativen Promotor. Ein zweites Mal findet man die Konsensussequenz von STAT3 bei +997/+1006 innerhalb des zweiten konservierten Abschnittes, dem potentiellen Enhancerelement.

Anhand dieser Ergebnisse ist anzunehmen, dass der Promotor für STAIR18 und die ncRNA152 innerhalb des Bereiches von 800 Basenpaaren stromabwärts und 200 Basenpaaren stromaufwärts des Transkriptionsstarts liegen wird (Abb. 3.27\_G). Dieser Abschnitt beinhaltet den ersten stark konservierten Bereich einschließlich der potentiellen STAT3-Bindungsstelle und wurde auf das Vorhandensein weiterer Sequenzelemente untersucht. Mit dem Programm MATCH™ 1.0 public wurden mögliche Transkriptionsfaktor-Bindungsstellen identifiziert (Anhang Tab. V). Das Ergebnis zeigt zwei kurz hintereinander liegende AP-1-Konsensussequenzen -7 bis +11 vom ncRNA152-Transkriptionsstart (Abb. 3.28). Da an dieser Position auch Chip-Seq-Daten für AP-1-Proteine vorliegen, kann davon ausgegangen werden, dass es sich hier um eine reale AP-1-Bindestelle handelt. Des Weiteren wurde auch mit dieser Methode das STAT3-Bindungsmotiv bei -93/-84 gefunden (Abb. 3.28). An dieser Stelle wurde wie im ENCODE Transkription Factor Chip-seq Track ersichtlich bereits STAT1 an der DNA detektiert (Abb. 3.27\_E). Dies ist nicht verwunderlich, da auch STAT1 als Homo- oder Heterodimer mit STAT3 an die STAT3-Konsensussequenz TTCCAGGAA binden kann<sup>175</sup>. Ob auch STAT3 an dieser Position bindet und die Transkription von STAIR18/ncRNA152 regulieren kann, müsste experimentell überprüft werden. Das Sequenzmotiv für eine CCAAT-Box liegt an Position +104/+116 auf dem Minusstrang eher ungewöhnlich im transkribierten Bereich, daher ist nicht sicher, ob dieses Sequenzelement eine Funktion bei der Transkription von STAIR18/ncRNA152 hat (Abb. 3.28). Normalerweise liegt die CCAAT-Box in RNA-Polymerase-II-Promotoren ungefähr 100 Basenpaare stromabwärts des Transkriptionsstarts. Weitere in Pol-II-Kernpromotoren vorkommende Elemente sind BRE-Sequenz, TATA-Box, Initiator und das Downstream-Promotorelement (DPE). Typischerweise enthält ein Promotor nur einen Teil dieser Sequenzelemente. Die entsprechenden Konsensussequenzen wurden manuell im putativen STAIR18/ncRNA152-

Promotor gesucht. Dabei wurde keine BRE-Sequenz gefunden. Eine TATA-Box gibt es nur weit entfernt vom Transkriptionsstart bei -496/-490 (Abb. 3.28). Konsensussequenzen des Initiator befinden sich nur deutlich vor dem annotierten Transkriptionsstart der ncRNA152 ([-444/-437], [-319/-312], [-58/-51]) und nicht wie üblich überlappend mit diesem (Abb. 3.28). Ein DPE-Element, dass oft anstelle einer TATA-Box vorkommt und vom TFIID-Komplex erkannt wird, liegt an Position +67/+74 (Abb. 3.28). Welche dieser Sequenzelemente an der Initiation der Transkription von STAIR18/ncRNA152 beteiligt sind, lässt sich nur experimentell durch die Analyse der Promotoraktivität und die gezielte Deletion oder Mutation einzelner Abschnitte nachweisen.



**Abb. 3.28: Sequenzelemente im STAIR18/ncRNA152-Promotor.** Schematische Darstellung der klonierten Promotorbereiche A, B und C von -770 bis +208 der ncRNA152. Des Weiteren sind die Positionen verschiedener Sequenzelemente sowie die jeweilige Konsensussequenz gezeigt.

### Reportergenassays

Für experimentelle Untersuchungen des putativen STAIR18/ncRNA152-Promotors wurde der Bereich -770/+208 der ncRNA152, inklusive der potentiellen STAT3-Bindungsstelle, mittels PCR aus genomischer DNA amplifiziert. Das 978bp-Fragment (STAIR18-Promotor\_ABC) wurde über die Schnittstellen NheI und HindIII vor das Luziferasegen in den pGl3-Basic-Vektor kloniert und dessen Identität durch Sequenzierung verifiziert. Anschließend wurden 5'- und 3'-Abschnitte aus dem STAIR18-Promotor mit Restriktionsenzymen herausgeschnitten und weitere Reporterplasmide mit verkürzten Varianten des Promotors generiert (STAIR18-Promotor\_AB, BC und B). Die Promotoraktivität der STAIR18-Promorterteile AB, B und BC sollte eine grobe Einschätzung ermöglichen inwieweit die einzelnen Abschnitte zur Regulation der Transkription beitragen.

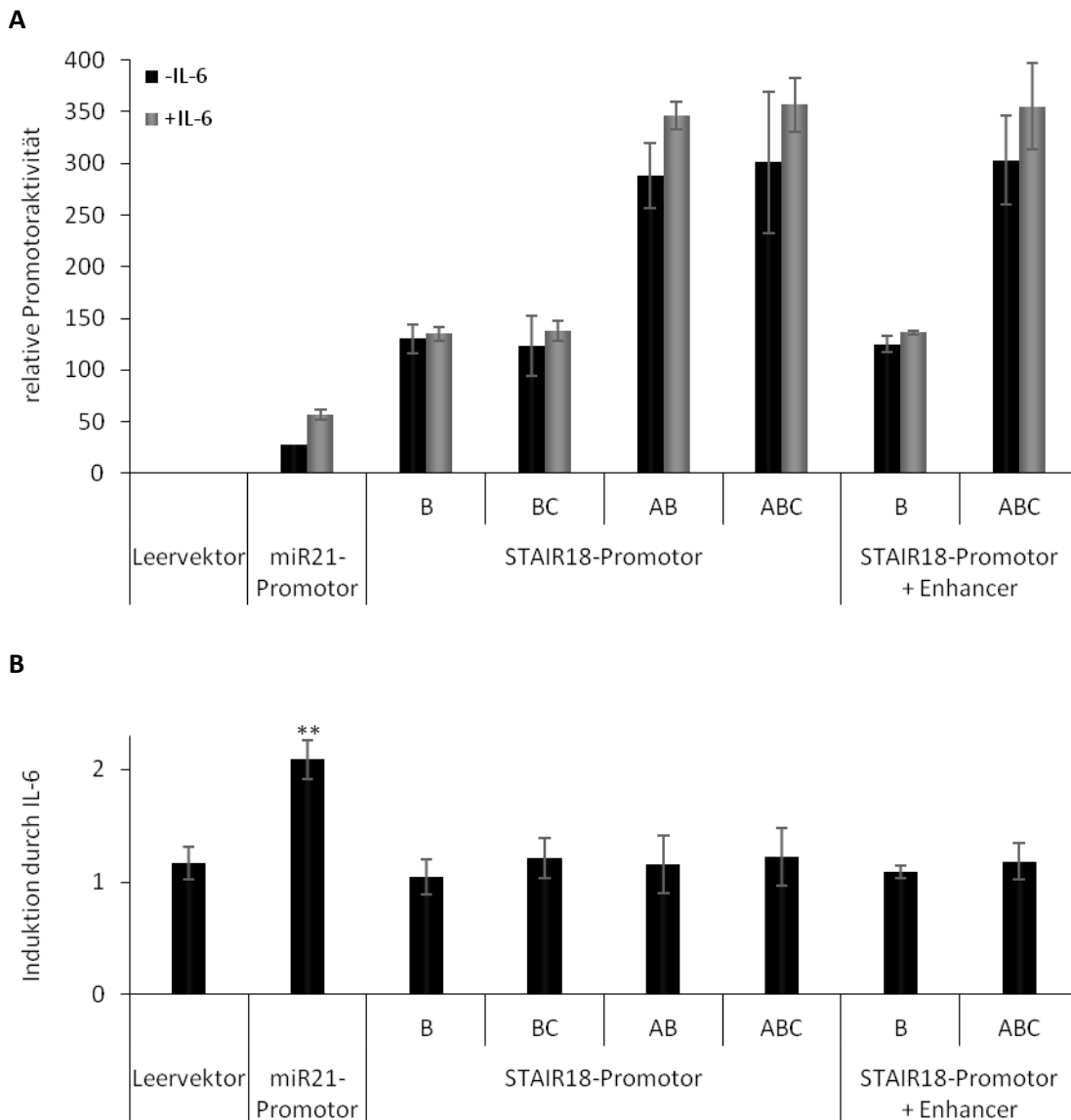
Da für unsere Arbeitsgruppe die Induktion durch IL-6 von größerem Interesse ist, wurde zusätzlich das potentielle Enhancerelement [+605/+1319] der ncRNA152 näher untersucht. Dieser Abschnitt wurde gewählt, da er sehr stark in Vertebraten konserviert ist und die Konsensussequenz einer optimalen STAT3-Bindungsstelle beinhaltet. Es wurden Reporterkonstrukte hergestellt, in die zusätzlich zur kürzesten (STAIR18-Promotor\_B) oder längsten Variante des STAIR18-Promotors (STAIR18-Promotor\_ABC) noch das potentielle Enhancerelement [+605/+1319] der ncRNA152 hinter das Luziferasegen kloniert wurde. Hierfür wurden die Restriktionsschnittstellen BamHI und Sall verwendet. Im Ergebnis

entstanden die Reporterplasmide pGL3-STAIR18-Promotor\_B+Enhancer und pGL3-STAIR18-Promotor\_ABC+Enhancer.

Als Zellsystem für die Reporterassays wurden HepG2-Zellen gewählt, die als Leberzellen den IL-6-Rezeptor exprimieren und dementsprechend responsiv für die Stimulation mit Interleukin-6 sind. Die in vorherigen Experimenten verwendeten Multiple Myelom-Zelllinien eignen sich leider nicht für diese Experimente, da sie sich nur sehr schwer transfizieren lassen. Die Transfektion der Reporterkonstrukte in HepG2-Zellen erfolgte mittels Calciumphosphat-Präzipitation (siehe 2.3.4.1). Nach 24 Stunden wurde die Stimulation mit IL-6 für vier Stunden durchgeführt. Anschließend folgte die Bestimmung der Reporteraktivität. Da unsere Arbeitsgruppe bereits zuvor die Regulation einer nicht-kodierenden RNA, der microRNA-21, durch Interleukin-6 nachgewiesen hat<sup>93</sup>, wurde die Induktion des miR21-Promotors zur Kontrolle der IL-6-Stimulation analysiert. Zur Normierung der Luciferaseexpression wurde außerdem ein konstitutiv aktiver  $\beta$ -Galaktosidase-Expressionsvektor kotransfiziert.

In Abbildung 3.29 sind die Ergebnisse der Reporterassays dargestellt. Der in das Reporterplasmid klonierte, 155 bp-Kernbereich STAIR18-Promotor\_B weist bereits allein eine starke Promotoraktivität auf, die die des unstimulierten miR21-Promotors deutlich übersteigt (4,8-fach). Nimmt man den weiter stromabwärts gelegenen Abschnitt A des Promotors mit hinzu, verdoppelt sich die Transkription des Reporters noch einmal. Der stromaufwärts im transkribierten Bereich von ncRNA152 liegende Teil des STAIR18-Promotors, der sowohl das potentielle DPE-Element als auch die Konsensussequenz einer CCAAT-Box enthält, hat hingegen keine weiteren Auswirkungen auf die Promotoraktivität. Auch der hinter das Reporterplasmid klonierte STAIR18-Enhancer beeinflusst die Transkription der Luciferase nicht. Nach Stimulation der mit den Reporterplasmiden transfizierten Zellen mit Interleukin-6 verdoppelt sich die Promotoraktivität des miR21-Promotors (Abb. 3.29 B). Die Aktivität der verschiedenen STAIR18-Promotor-Konstrukte wird hingegen nicht signifikant durch das Zytokin beeinflusst. Die Regulation der STAIR18/ncRNA152-Transkription durch Interleukin-6 kann demnach in diesem Experiment nicht gezeigt werden. Es ist dennoch möglich, dass STAT3 im natürlichen Kontext an den STAIR18-Promotor und/oder Enhancer bindet und die Transkription von STAIR18/ncRNA152 reguliert. Vielleicht fehlen in den Reporterkonstrukten wichtige inhibitorische Elemente, die normalerweise die Basisaktivität des Promotors reduzieren und denen der aktivierte IL-6-Signalweg entgegen wirkt. Eine weitere Erklärung für die zuvor beobachtete Induktion der STAIR18/ncRNA152-Expression durch Interleukin-6 wäre, dass andere, weiter vom Transkriptionsstart des Gens entfernte STAT3-Bindungsstellen für die Regulation der Transkription wichtig sind. Möglicherweise spielen auch andere zellspezifische Transkriptionsfaktoren eine Rolle, die mit STAT3 interagieren. Die Analyse der

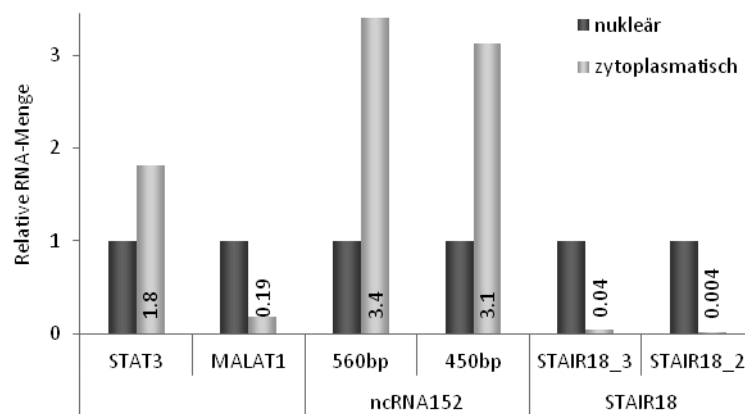
Reporterkonstrukte in einem anderen Zellsystem, das dem Multiplem Myelom ähnlicher ist, könnte hierüber Aufschluss geben.



**Abb. 3.29: Reporteranalyse zur Regulation des STAIR18-Promotors durch IL-6.** HepG2-Zellen wurden mit pGL3-Reporterkonstrukten, die Luziferase unter Kontrolle der angegebenen Promotoren kodieren, mittels Calciumphosphat-Präzipitation transfiziert. Zur Normalisierung wurde der  $\beta$ -Galaktosidase exprimierende Vektor pCH110 kotransfiziert. Nach 24 Stunden erfolgte die 4-stündige Stimulation mit IL-6 (10ng/ml). Die Zellen wurden lysiert und die Luziferase- und  $\beta$ -Galaktosidaseaktivitäten ermittelt. Die Luziferaseaktivität wurde auf die der  $\beta$ -Galaktosidase normalisiert. **(A)** Dargestellt ist die Promotoraktivität bezogen auf den unstimulierten Leervektor. **(B)** Gezeigt ist die Induktion der Promotoraktivität durch IL-6. Die normalisierten Messwerte der mit IL-6 stimulierten Proben wurden durch die Werte der unstimulierten Proben dividiert. Dargestellt sind jeweils Mittelwerte und Standardabweichung aus drei unabhängigen Experimenten.

### 3.3.5 Intrazelluläre Lokalisation von STAIR18 und ncRNA152

Um weitere Erkenntnisse über STAIR18 und die ncRNA152 zu gewinnen, die dazu beitragen können Hypothesen über deren Prozessierung und molekulare Funktion zu entwickeln, wurde deren subzelluläre Verteilung untersucht. In einem ersten Schritt wurde die Expression der Transkripte in Zellkern- und Zytoplasma-Extrakten aus INA-6-Zellen analysiert. Hierfür wurde eine Zellfraktionierung durchgeführt (siehe 2.2.1) und anschließend die relative RNA-Menge in den einzelnen Zellkompartimenten im Vergleich zu GAPDH bestimmt. Das Ergebnis dieser Untersuchungen ist in Abbildung 3.30 dargestellt. Die Verteilung der STAT3 mRNA ist als Beispiel einer überwiegend im Zytoplasma lokalisierten Boten-RNA abgebildet. MALAT1 hingegen zeigt die Distribution einer nukleären RNA. Im Vergleich zu diesen beiden Kontroll-Transkripten zeigt sich deutlich, dass die ungespleißte STAIR18 macroRNA fast ausschließlich im Zellkern zu finden ist. Wohingegen die gespleißte ncRNA152 hauptsächlich im Zytoplasma lokalisiert ist. Die ncRNA152 wird demnach wahrscheinlich ähnlich wie eine mRNA nach ihrer Prozessierung aus dem Zellkern transportiert.



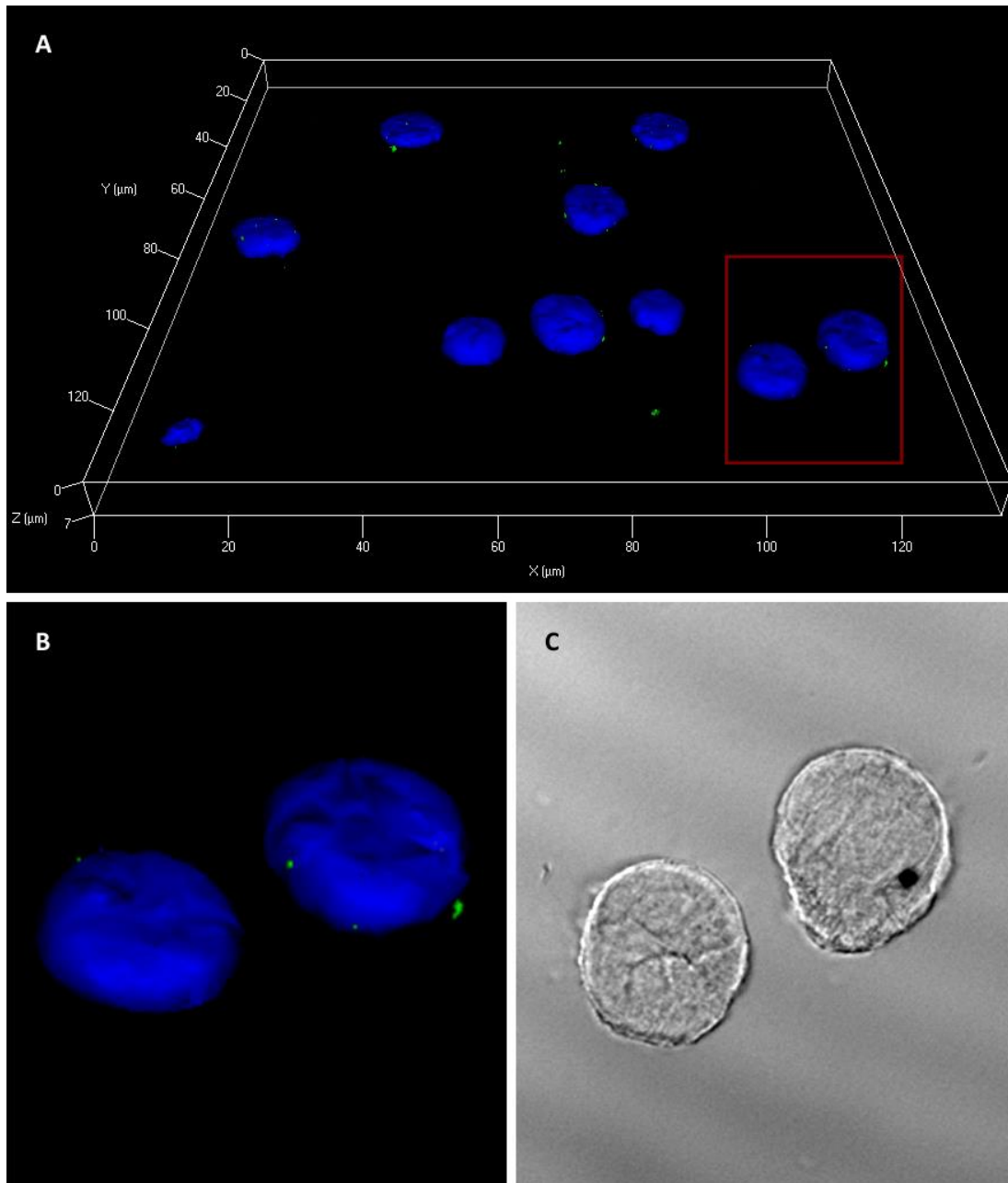
**Abb. 3.30: Subzelluläre Verteilung von ncRNA152/STAIR18.** Zytoplasmatische und nukleäre Zellbestandteile von INA-6-Zellen wurden separiert. Anschließend wurde die RNA aus den Extrakten der Zellkompartimente getrennt voneinander präpariert, in cDNA umgeschrieben und die RNA-Menge durch real-time PCR mit SYBR Green quantifiziert. Es wurde auf GAPDH standardisiert und auf die nukleäre Probe normalisiert. Dargestellt ist das Ergebnis eines repräsentativen Experimentes.

#### 3.3.5.1 RNA Fluoreszenz in situ Hybridisierung

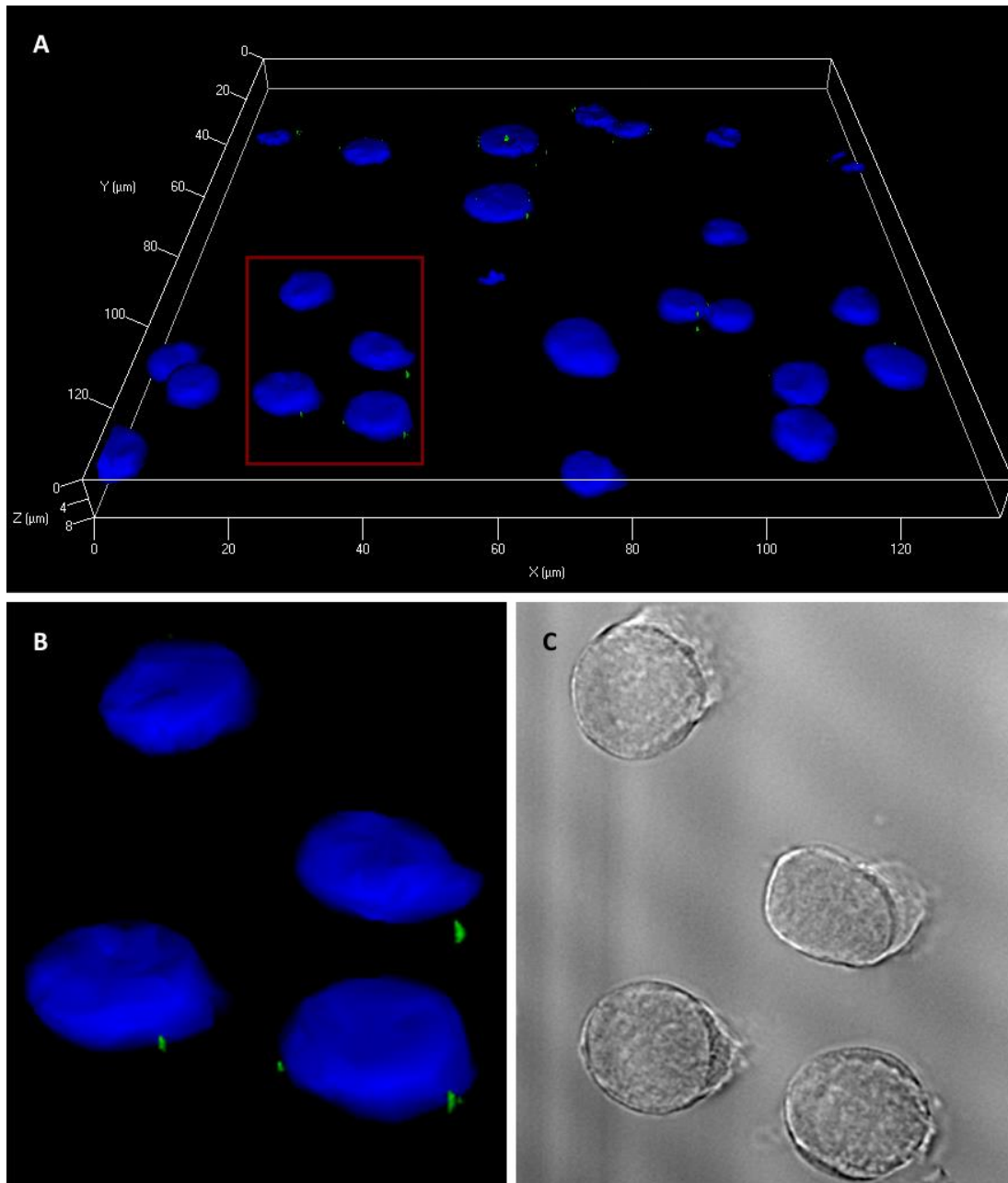
Zur genauen Lokalisation der ncRNA152 in der Zelle wurde die Methode der RNA Fluoreszenz in situ Hybridisierung angewandt. Hierfür wurde eine spezifische fluoreszenzmarkierte DNA-Sonde, komplementär zur 560bp-Variante der ncRNA152, hergestellt (siehe 2.3.6). Die Lokalisation der ncRNA wurde in drei verschiedenen Zelllinien (INA-6, XG-1 und HepG2) untersucht. Dafür wurden die Zellen auf Glasobjektträgern fixiert und

permeabilisiert. Anschließend erfolgte die Hybridisierung der fluoreszenz-markierten Sonde. Das Chromatin im Zellkern wurde mit DAPI gegengefärbt und die gebundene Hybridisierungssonde mittels Fluoreszenzmikroskopie detektiert. Um einen besseren räumlichen Eindruck zugewinnen, wurden die Präparate in mehreren Ebenen aufgenommen und mit Hilfe einer speziellen Bildbearbeitungssoftware 3D-Rekonstruktionen generiert. Die dreidimensionalen Bilder (Abb. 3.31\_A+B – 3.33\_A+B) zeigen die kombinierten DAPI- und FITC-Färbungen und veranschaulichen die Lokalisation der ncRNA152 (grün) innerhalb der Zelle, wobei der Zellkern blau dargestellt ist. Zur besseren Orientierung innerhalb der Zelle ist zusätzlich die Durchlichtaufnahme eines in B ausgewählten Bildausschnittes gezeigt (Abb. 3.31\_C – 3.33\_C). INA-6- sowie XG-1-Zellen sind kugelige Blasten, die nur einen schmalen Zytoplasmasaum um den Zellkern aufweisen (Abb. 3.31\_C + 3.32\_C). Die ncRNA152 wird in diesen Zellen außerhalb des Zellkerns detektiert (Abb. 3.31\_B + 3.32\_B). Man findet pro Zelle ein bis fünf grün-fluoreszierende Aggregate der gespleißten RNA im Zytoplasma. HepG2-Zellen zeigen eine andere Morphologie als die analysierten Multiplen Myelom-Zelllinien. Es sind platte, polygonale Leberkarzinomzellen mit viel Zytoplasma (Abb. 3.33\_C). In HepG2-Zellen waren, ähnlich wie bei den beiden anderen Zelllinien, ein bis sieben Signale der ncRNA152 detektierbar, wobei die fluoreszierenden Aggregate hauptsächlich perinukleär lokalisiert zu sein scheinen (Abb. 3.33\_B). Genauerem Aufschluss darüber, ob es sich um ein bestimmtes Zellkompartiment handelt, in welchem die prozessierte ncRNA zu finden ist, oder ob sie Bestandteil spezifischer RNA-Protein-Komplexe ist, müssen weiterführende Experimente liefern.

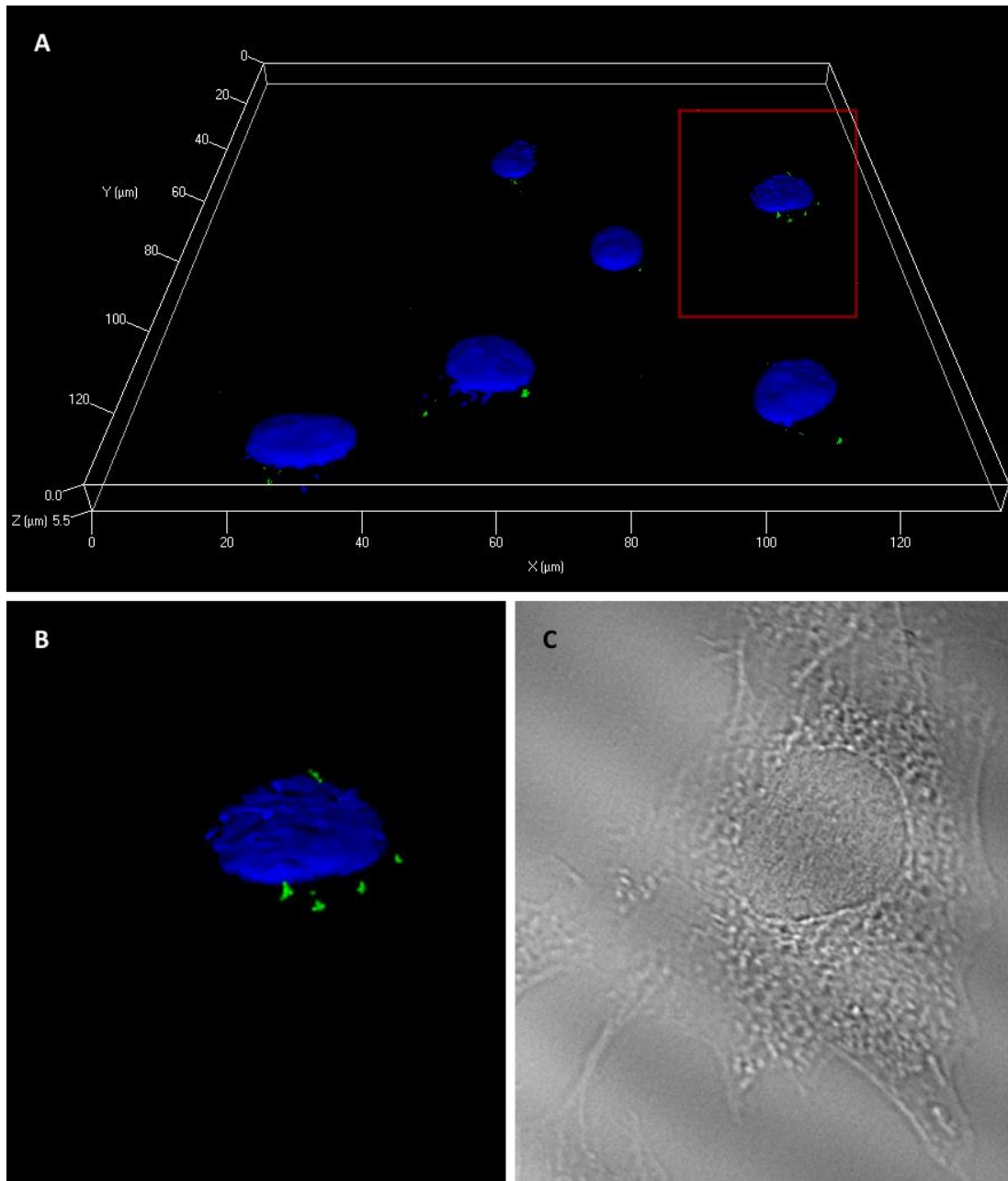




**Abb. 3.31: Lokalisation der ncRNA152 in INA-6-Zellen.** INA-6-Zellen wurden auf Objektträgern fixiert, permeabilisiert und eine FITC-markierte DNA-Sonde für die ncRNA152 hybridisiert. Die subzelluläre Lokalisation der ncRNA152 wurde mittels mehrdimensionaler Fluoreszenzmikroskopie analysiert (63x Öl-Objektiv). **(A)** 3D-Rekonstruktion erstellt mittels Oberflächen-Rendering-Methode. Das dreidimensionale Bild zeigt die kombinierten Dapi- und FITC-Färbungen (Zellkern=blau, ncRNA152-Sonde=grün). **(B)** Dreifache Vergrößerung eines ausgewählten Bildausschnittes (in (A) durch rotes Rechteck gekennzeichnet) der 3D-Darstellung. **(C)** Durchlichtaufnahme des ausgewählten, vergrößerten Bildausschnittes B.



**Abb. 3.32: Lokalisation der ncRNA152 in XG-1- Zellen.** XG-1-Zellen wurden auf Objektträgern fixiert, permeabilisiert und eine FITC-markierte DNA-Sonde für die ncRNA152 hybridisiert. Die subzelluläre Lokalisation der ncRNA152 wurde mittels mehrdimensionaler Fluoreszenzmikroskopie analysiert (63x Öl-Objektiv). **(A)** 3D-Rekonstruktion erstellt mittels Oberflächen-Rendering-Methode. Das dreidimensionale Bild zeigt die kombinierten Dapi- und FITC-Färbungen (Zellkern=blau, ncRNA152-Sonde=grün). **(B)** Dreifache Vergrößerung eines ausgewählten Bildausschnittes (in A) durch rotes Rechteck gekennzeichnet) der 3D-Darstellung. **(C)** Durchlichtaufnahme des ausgewählten, vergrößerten Bildausschnittes B.



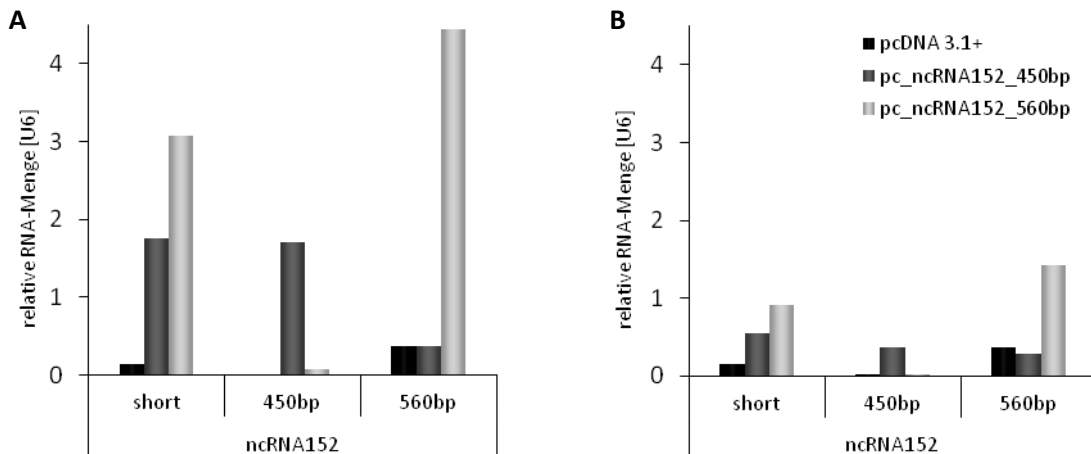
**Abb. 3.33: Lokalisation der ncRNA152 in HepG2- Zellen.** HepG2-Zellen wurden auf Objektträgern fixiert, permeabilisiert und eine FITC-markierte DNA-Sonde für die ncRNA152 hybridisiert. Die subzelluläre Lokalisation der ncRNA152 wurde mittels mehrdimensionaler Fluoreszenzmikroskopie analysiert (63x Öl-Objektiv). **(A)** 3D-Rekonstruktion erstellt mittels Oberflächen-Rendering-Methode. Das dreidimensionale Bild zeigt die kombinierten Dapi- und FITC-Färbungen (Zellkern=blau, ncRNA152-Sonde=grün). **(B)** Dreifache Vergrößerung eines ausgewählten Bildausschnittes (in (A) durch rotes Rechteck gekennzeichnet) der 3D-Darstellung. **(C)** Durchlichtaufnahme des ausgewählten, vergrößerten Bildausschnittes B.

### 3.3.6 Überexpression der ncRNA152 in XG-1-Zellen

Über die molekulare Funktion der ncRNA152-Transkriptvarianten war bis dato nichts bekannt, daher sollten die beiden Isoformen in XG-1-Zellen überexprimiert und der Einfluss dieser Veränderung auf die Zellen analysiert werden. Um die ncRNA152 zu überexprimieren, wurden beide Isoformen in den eukaryotischen Expressionsvektor pcDNA3.1(+) kloniert (siehe 2.2.5). Hierfür wurde RNA aus INA-6-Zellen mit Oligo-dT-Primern umgeschrieben, um vom polyadenylierten 3'-Ende bis zum 5'-Anfang eine komplette cDNA-Kopie des Transkriptes zu erhalten. Diese cDNA wurde anschließend mit Primern amplifiziert, die gleichzeitig eine Nhe I beziehungsweise eine Apa I-Schnittstelle an den Enden des Fragmentes einfügen. Das PCR-Produkt sowie der pcDNA3.1(+)-Vektor wurden mit den entsprechenden Restriktionsenzymen geschnitten. Insert und Vektor wurden ligiert und in kompetente Bakterien transformiert. Klone mit dem gewünschten Vektorkonstrukt wurden mit Hilfe von Kolonie-PCRs identifiziert, anschließend vervielfältigt und deren Vektor-DNA präpariert.

Die generierten Expressionsvektoren pc\_ncRNA152\_450bp und pc\_ncRNA152\_560bp wurden mittels Elektroporation in XG-1-Zellen transfiziert. INA-6-Zellen waren als Modellsystem für diese Experimente leider nicht geeignet, da sie sich nur schwer transfizieren lassen und sehr sensibel auf Elektroporationen reagieren. Durch die Kotransfektion eines GFP-exprimierenden Vektors konnte neben der Zellviabilität auch die Transfektionseffizienz im Durchflusszytometer gemessen werden. Zusätzlich wurde die RNA der Zellen nach 24 und 48 Stunden präpariert, umgeschrieben und mittels *real-time* PCR analysiert, um zu überprüfen, ob die eingeschleusten Vektoren ihre jeweils kodierte ncRNA auch exprimieren. Abbildung 3.34\_A zeigt deutlich die Überexpression der beiden ncRNA152-Isoformen 24 Stunden nach Transfektion der entsprechenden Expressionsvektoren. Nach Transfektion der 560 bp Transkriptvariante lässt sich auch ein Anstieg der 450 bp Isoform nachweisen. Demzufolge scheint auch ein kleiner Anteil der vom Vektor exprimierten 560 bp ncRNA152 weiter prozessiert und noch einmal im ersten Exon gespleißt zu werden. 48 Stunden nach Transfektion sinkt die Expression der eingeschleusten ncRNA152 Isoformen bereits um 70 Prozent im Vergleich zum Vortag (Abb. 3.34\_B). Da es sich bei der gewählten Methode nur um eine transiente Transfektion handelt, erklärt sich, dass ein Hauptteil der eingeschleusten DNA anscheinend bereits nach zwei Tagen abgebaut ist. Einen Hinweis, dass die Überexpression der ncRNA152-Isoformen einen Einfluss auf die Viabilität der Zellen hat, ergibt sich nicht (Daten nicht gezeigt). Transfektionseffizienz und Zellviabilität lagen bei all diesen Experimenten jeweils bei ungefähr 50 Prozent, unabhängig mit welchem der Vektoren die Zellen transfiziert wurden. Die transfizierten Zellen könnten noch weiteren funktionellen Test unterzogen werden, um herauszufinden, ob die Überexpression der ncRNA152-Isoformen einen Einfluss auf die Zellen hat. Hierbei ist man allerdings durch die sehr kurze Halbwertszeit der Expressions-

vektoren sehr eingeschränkt. Zudem würde weiterer Stress direkt nach der Elektroporation zum Absterben der XG-1-Zellen führen. Es besteht die Möglichkeit das veränderte Transkriptom der Zellen nach Überexpression der ncRNA152 zu analysieren und auf diese Weise etwas über die Funktion der beiden Transkriptvarianten zu erfahren. Der Wechsle zu einem anderen, besser transfizierbaren Zellsystem ist denkbar, vielleicht auch der Versuch einer stabilen Transfektion.



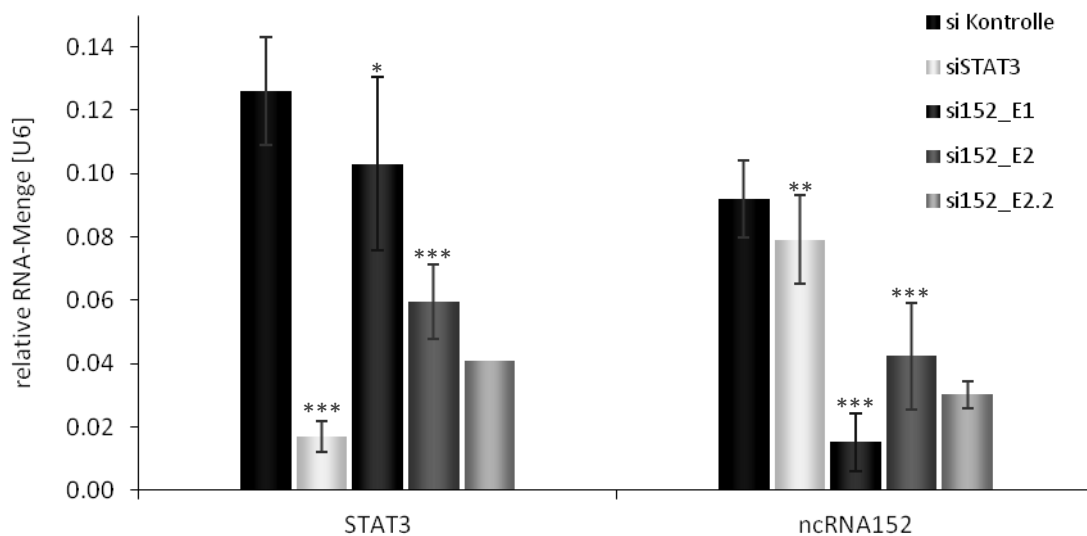
**Abb. 3.34: Überexpression der ncRNA152.** XG-1-Zellen wurden mit Expressionsvektoren, die die angegebene Isoform der ncRNA152 kodieren, bzw. dem Kontrollvektor (pcDNA3.1+) mittels des Neon® Transfection Systems transfiziert. Nach 24 und 48 Stunden wurde RNA der Zellen präpariert, in cDNA umgeschrieben und die RNA-Menge durch real-time PCR mit SYBR Green quantifiziert. Angegeben ist die relative RNA-Menge der ncRNA152-Isoformen (short=450bp+560bp) bezogen auf U6 snRNA 24 (A) und 48 Stunden (B) nach Transfektion. Dargestellt ist das Ergebnis eines repräsentativen Experimentes.

### 3.3.7 Knockdown der ncRNA152 in XG-1-Zellen

Eine weitere Möglichkeit, etwas über die Funktion eines unbekanntes Genes zu erfahren, ist zu untersuchen, was sich nach dem Ausschalten des Transkriptes in den betroffenen Zellen verändert. Auch für diese Experimente wurden die XG-1-Zellen als Modellsystem verwendet. Für das Ausschalten der ncRNA152 wurden siRNA-Oligonukleotide designt. Die siRNA si152\_E1 ist gegen das erste Exon der ncRNA152 gerichtet, si152\_E2 und si152\_E2.2 sind komplementär zu Bereichen im zweiten Exon der ncRNA. Alle drei siRNAs können sowohl die 560 bp als auch die 450 bp Transkriptvariante der ncRNA152 binden und ausschalten. Zusätzlich wurden XG-1-Zellen mit einer in unserer Arbeitsgruppe bereits etablierten siRNA gegen die STAT3 mRNA (siSTAT3) transfiziert. Diese siRNA diente zum einen als Kontrolle, ob sich die Zellen gut transfizieren ließen, da man nicht ganz sicher sein konnte, ob auch die analysierte nicht-kodierende RNA einfach über RNA-Interferenz ausgeschaltet werden kann oder ob die ncRNA152 beispielsweise innerhalb der Zelle in einem Kompartiment vorkommt, welches für diesen Mechanismus nicht zugänglich ist. Des

Weiteren konnte so analysiert werden, ob der STAT3-Knockdown auch einen Einfluss auf die Expression der ncRNA152 hat, da ja bereits gezeigt wurde, dass die ncRNA in den XG-1-Zellen durch Interleukin-6 reguliert wird (siehe 3.3.3.1) und das IL-6-Signal in diesen Zellen hauptsächlich über STAT3 vermittelt wird<sup>88</sup>.

Die XG-1-Zellen wurden mittels Elektroporation mit den entsprechenden siRNA-Oligonukleotiden transfiziert (siehe 2.3.4.2). 24 Stunden nach Transfektion wurde die RNA der Zellen isoliert, in cDNA umgeschrieben und mittels *real-time* PCR analysiert. Die Auswirkungen der siRNA-Transfektionen auf die Expression von STAT3 und die ncRNA152 sind in Abbildung 3.35 dargestellt. Die Viabilität der Zellen wurde durch keine der transfizierten siRNAs beeinflusst (Daten nicht gezeigt). Der Knockdown der STAT3 mRNA mit siSTAT3 hat gut funktioniert. Die Expression von STAT3 ging auf 14 Prozent zurück, gleichzeitig wurde die ncRNA152-Menge um 14 Prozent reduziert. Dies lässt sich durch die Auswirkungen der reduzierten STAT3-Expression auf den IL-6-Signalweg erklären, der unter anderem die ncRNA152 reguliert. Die Tatsache, dass der Effekt des STAT3-Knockdowns auf die ncRNA152 so gering ist, wird in der längeren Halbwertszeit des STAT3-Proteins begründet sein. Die ncRNA152-Transkriptmenge konnte mit der siRNA152\_E1 in etwa mit derselben Effizienz wie der STAT3-Knockdown auf 17 Prozent des Kontrollwertes reduziert werden, somit ist die ncRNA auch für die RNA-Interferenz zugänglich. Die siRNAs



**Abb. 3.35: Knockdown der ncRNA152 in XG-1-Zellen.** XG-1-Zellen wurden mit siRNA-Oligonukleotiden gegen STAT3 (siSTAT3) oder die ncRNA152 (si152\_E1, E2 und E2.2), bzw. mit negativer Kontroll-siRNA (si Kontrolle) mit Hilfe des Neon<sup>®</sup> Transfection Systems transfiziert. Nach 24 Stunden wurde RNA der Zellen präpariert, in cDNA umgeschrieben und die RNA-Menge durch real-time PCR mit SYBR Green quantifiziert. Angegeben ist die relative RNA-Menge von STAT3 und der ncRNA152 bezogen auf U6 snRNA. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichung aus fünf unabhängigen Experimenten (für si152\_E2.2 n=2).

gegen das zweite Exon der ncRNA152 waren nicht ganz so effektiv. Mit ihnen konnte die Expression auf 46 (si152\_E2) beziehungsweise 33 Prozent (si152\_E2.2) verringert werden. Überraschender Weise scheint der Knockdown der siRNA152 sich auch auf die STAT3 mRNA-Menge auszuwirken. Die gegen die ncRNA152 wirksamere siRNA152\_E1 reduziert die Expression von STAT3 um 18 Prozent. Die siRNAs gegen das zweite Exon von STAT3 sind hingegen gegen STAT3 genauso wirksam wie gegen die ncRNA152. Da beide siRNA-Oligos (si152\_E2 und siRNA\_E2.2) diesen Effekt vermitteln, ist ein *Off-target*-Effekt unwahrscheinlich. Es sind weitere Untersuchungen nötig, um dieses Phänomen aufzuklären. Neben den in dieser Arbeit beschriebenen Isoformen der ncRNA152 existieren noch weitere sequenzierte Transkripte in diesem Bereich, die zusätzliche oder alternative Exons aufweisen. Möglicherweise haben diese Transkriptvarianten unterschiedliche Funktionen und würden die unterschiedliche Wirkung der gegen das erste oder zweite Exon der ncRNA152 gerichteten siRNAs erklären.

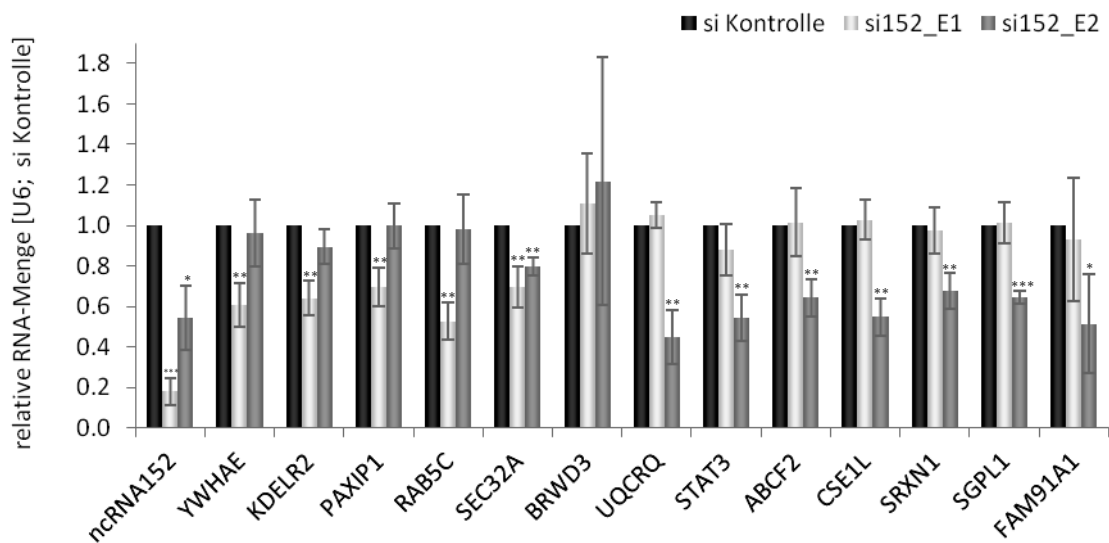
### 3.3.8 Identifizierung putativer Zielgene der ncRNA152

Um Hinweise auf die Funktion der ncRNA152 zu bekommen, wurde die Veränderung der Genexpression nach dem Ausschalten der ncRNA mit Hilfe von Mikroarrays analysiert (siehe 2.1.3). Für den Knockdown der ncRNA wurden zwei verschiedene siRNAs gegen die ncRNA152 verwendet, si152\_E1 gegen das erste oder si152\_E2 gegen das zweite Exon der ncRNA. Zum Vergleich dienten die Daten von XG-1-Zellen, die mit negativer Kontroll-siRNA transfiziert wurden. 24 Stunden nach Transfektion (siehe 2.3.4.2) wurde die RNA der Zellen isoliert und deren Qualität mit Hilfe des Bioanalyzers überprüft. Zusätzlich wurde die erfolgreiche Repression der ncRNA152 nach reverser Transkription der RNA (siehe 2.2.1) mittels quantitativer *real-time* PCR (siehe 2.2.4) kontrolliert. Das Herstellen markierter cDNA, die Hybridisierung sowie das Scannen der Mikroarrays erfolgte in der RNomics Arbeitsgruppe am Fraunhofer Institut für Zelltherapie und Immunologie. Die Mikroarray-Untersuchungen wurden für drei unabhängige Experimente durchgeführt.

Die Auswertung der Daten ist in Kapitel 2.1.3 näher beschrieben und die Ergebnisse sind im Anhang in Tabelle VI gezeigt. Es wurden sehr stringente Kriterien bei der Evaluation angewandt ( $p < 0,01$ , Signalstärke  $> 50$ ), sodass je nach verwendeter siRNA nur jeweils acht veränderte Zielgene der ncRNA152 dieser Selektion standhalten konnten. Die einzige Überlappung der beiden Gensets (si152\_E1 und si152\_E2) stellt die ncRNA152 selbst dar. Auch wenn man die Auswahlkriterien lockert ( $p < 0,05$ , Signalstärke  $> 10$ ) gibt es keine weitere Übereinstimmung der regulierten Gene nach Knockdown der ncRNA152 mit si152\_E1 und si152\_E2 (Daten nicht gezeigt). Des Weiteren fällt auf, dass bis auf eine Ausnahme (BRWD3) alle differentiell exprimierten Gene herunterreguliert sind. Die Mikroarray-Daten bestätigen ebenfalls die Beobachtung der Knockdown-Experimente, dass

die STAT3 mRNA nach Transfektion mit si152\_E2 nicht aber mit si152\_E1 deutlich reprimiert wird.

Die Ergebnisse der Mikroarray-Experimente wurden anschließend validiert, indem Primer für die differentiell exprimierten Gene designiert wurden und die entsprechenden Transkripte in cDNAs mit der jeweiligen siRNA transfizierter XG-1-Zellen nachgemessen wurden. Die Mikroarray-Daten (Anhang Tab. VI) konnten durch die Ergebnisse der *real-time* PCR (Abb. 3.36) bestätigt werden. Es zeigte sich zudem eine sehr gute Übereinstimmung zwischen den Daten der Mikroarrays und den mittels *real-time* PCR ermittelten Werten der veränderten Genexpression. Die ausgewählten Gene wurden auch in den PCR-Daten jeweils nur durch eine der beiden siRNAs deutlich reguliert. Nur SEC32A wurde beim Knockdown der ncRNA152 mit beiden siRNAs reprimiert, allerdings nur um 20 beziehungsweise 30 Prozent. Im nächsten Schritte sollten erst einmal die verschiedenen Isoformen der ncRNA152, die weitere oder alternative Exon beinhalten und in dieser Arbeit nicht analysiert wurden, weiter charakterisiert werden, um eine Erklärung zu finden warum siRNAs gegen das erste beziehungsweise zweite Exon der ncRNA so unterschiedliche Auswirkungen auf die Genexpression der Zellen haben.



**Abb. 3.36: Validierung der ncRNA152-Zielgene der Mikroarray-Analyse.** XG-1-Zellen wurden mit siRNA-Oligonukleotiden gegen die ncRNA152 (si152\_E1, E2 und E2.2), bzw. mit negativer Kontroll-siRNA (si Kontrolle) mit Hilfe des Neon® Transfection Systems transfiziert. Nach 24 Stunden wurde RNA der Zellen präpariert, in cDNA umgeschrieben und die RNA-Menge durch *real-time* PCR mit SYBR Green quantifiziert. Angegeben ist die relative RNA-Menge des jeweils angegebenen Gens bezogen auf U6 snRNA und normalisiert auf siKontrolle-Proben. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichung aus vier unabhängigen Experimenten.



## 4 Diskussion

Lange galt in der Molekularbiologie die Maxime, dass RNA nur als Mittler zwischen DNA und Proteinen dient. Die Ansicht, dass lediglich Proteine funktionelle Komponenten der Zellen darstellen, musste mit der Erkenntnis, dass auch RNAs in die Regulation der Genomorganisation und Genexpression involviert sind, revidiert werden. Transkriptomanalysen mit Hilfe von Sequenzierungen und Tiling Arrays haben gezeigt, dass der Großteil der Säugergenome transkribiert wird<sup>176</sup>. Dabei wird immer offenkundiger, dass die Genome komplexer Organismen eine ungeahnt hohe Anzahl nicht-Protein-kodierender RNAs exprimieren, von denen viele regulatorische Funktionen ausüben. Regulatorische RNAs wirken offenbar auf verschiedenen Ebenen und sind im Besonderen für epigenetische Prozesse von Bedeutung, die Differenzierung und Entwicklung kontrollieren<sup>177</sup>. Mittlerweile mehren sich die Hinweise, dass das menschliche Genom sogar eine größere Anzahl an Genen für regulatorische RNAs als solche, die für Proteine kodieren, aufweist. Somit offenbart sich, dass man das Ausmaß und die Art der Genregulation in komplexen Organismen lange fundamental missverstanden hat<sup>177</sup>. Das Bild, das jetzt entsteht, ist das einer außerordentlich komplexen transkriptionellen Landschaft in multizellulären Organismen mit überlappenden, intergenischen und intronischen, sense und antisense, kurzen und langen RNAs, die verschachtelte Exons, verschiedene Promotoren, unterschiedliche Spleißmuster und alternative Polyadenylierungsstellen haben<sup>177</sup>. Es werden eine Vielzahl langer nicht-kodierender RNAs exprimiert, die ein großes regulatorisches Potential besitzen und die anscheinend ein wesentlicher Bestandteil eines komplexen, regulatorischen, intrazellulären Netzwerkes sind. Selbst die Auffassung einer einfachen Protein-kodierenden Sequenz muss neu überdacht werden, da sich zeigt, dass nicht nur Proteine verschiedene Funktionen haben können, sondern auch die mRNAs selbst und ihre Sequenz weitere Zwecke erfüllen können<sup>20,178</sup>. Des Weiteren können sowohl lange nicht-kodierende RNAs als auch mRNAs weiter prozessiert werden um subsidiäre RNA-Spezies zu produzieren<sup>179</sup>.

### 4.1 IL-6/STAT3 regulierte macroRNAs

Interleukin-6 ist ein Zytokin mit vielen verschiedenen Funktionen, das vor allem bei Infektionen, Entzündungen und Krebserkrankungen sehr stark exprimiert wird<sup>52</sup>. Es

vermittelt seine Effekte unter anderem über den Transkriptionsfaktor STAT3<sup>52</sup>, der in den meisten Geweben und auch schon sehr früh während der Embryonalentwicklung exprimiert wird<sup>51</sup>. STAT3 hat essentielle Funktionen bei der Entwicklung, dem Zellwachstum und der Homöostase verschiedener Gewebe<sup>51,55</sup> und kann sowohl pro- als auch anti-inflammatorische Effekte vermitteln, wobei die verschiedenen Wirkungsweisen von STAT3 noch immer nicht genau verstanden sind<sup>57</sup>. Es gibt immer mehr Hinweise, dass die Regulation von nicht-kodierenden RNAs durch STAT3 eine große Bedeutung hat<sup>93,94,180</sup>. Bis jetzt wurden jedoch ausschließlich miRNA beschrieben, deren Transkription durch STAT3 aktiviert wird. Dies ist die erste Studie, in der das STAT3-abhängige Transkriptom auf globaler Ebene untersucht wurde. Des Weiteren wurden erstmals lange nicht-kodierende RNAs analysiert, die durch den IL-6/STAT3-Signalweg reguliert werden. Für die Untersuchungen wurde die humane Multiple Myelom-Zellen INA-6 verwendet, deren Überleben von Interleukin-6 abhängig ist. Zudem konnte unsere Arbeitsgruppe bereits zeigen, dass das IL-6-Signal in diesen Zellen fast ausschließlich über STAT3 vermittelt wird<sup>88</sup>. RNA wurde von diesen Zellen nach 13-stündigem IL-6-Entzug, nach Restimulation für eine Stunde und von Zellen, die permanent in Anwesenheit von Interleukin-6 kultiviert wurden, isoliert. Die genomweite RNA-Expression wurde mit Tiling Arrays analysiert, die den gesamten nicht-repetitiven Teil des menschlichen Genoms abdecken und somit auch die Analyse bis dato unbekannter, regulierter Transkripte ermöglichen. Die bioinformatische Auswertung wurde von der AG RNomics (Fraunhofer IZI) durchgeführt und auf differentiell exprimierte Fragmente, die in mindestens einem Zustand hoch exprimiert sind, beschränkt. Dabei wurden in Abhängigkeit vom IL-6-Stimulus 130-394 differentiell exprimierte Fragmente gefunden<sup>166</sup>. Die Tiling Array-Daten der IL-6/STAT3-Signalkaskade wurden mit nicht-kodierenden RNAs, die durch zwei weitere onkologische Signalwege (p53 und Zellzyklus-Regulation) reguliert werden, verglichen und die Ergebnisse von Hackermüller *et al.* publiziert<sup>166</sup>. Dabei konnte festgestellt werden, dass die neu identifizierten, bei den untersuchten Prozessen differentiell exprimierten, langen nicht-kodierenden Transkripte Zelltyp-spezifischer exprimiert werden als Protein-kodierende RNAs<sup>166</sup>. Unter den differentiell exprimierten Sequenzen sind annotierte, lange nicht-kodierende RNAs angereichert, aber die überwiegende Mehrheit der regulierten Sequenzen repräsentiert unbekannte Transkripte<sup>166</sup>. Interessanter Weise zeigte sich unter den differentiell exprimierten Transkripten des IL-6/STAT3-Signalweges, im Gegensatz zu Zellzyklus- und p53-regulierten RNAs, keine Anreicherung Protein-kodierender Sequenzen<sup>166</sup>. Beeindruckende 87 Prozent der differentiell exprimierten Sequenzen nach IL-6-Stimulus sind nicht-kodierend, wobei der Hauptteil von intergenischen Regionen transkribiert wird<sup>166</sup>. Dies könnte ein weiterer Hinweis auf die herausragende Bedeutung der Regulation nicht-kodierender Gene durch STAT3 sein.

Bei der manuellen Inspektion der Tiling Array-Daten durch Professor Horn wurden überraschend 20 sehr lange, differentiell exprimierte Transkripte gefunden. Die

identifizierten macroRNAs umfassen Bereiche von bis zu 400 Kilobasen. Für diese Transkripte wurde die Bezeichnung STAIRs (STAT3-*induced* RNAs) eingeführt. Zumindest auf den ersten Blick erinnern die STAIRs an macroRNAs wie beispielsweise Airn (*antisense IGFR2 non-protein coding RNA*) oder KCNQ1OT1 (KCNQ1 opposite strand/antisense transcript 1), die zur Aufrechterhaltung des Imprintings in normalen Geweben beitragen<sup>181</sup>. Es ist denkbar, dass die Expression der unerwartet vielen, enorm langen macroRNAs durch die zahlreichen genetischen Aberrationen der INA-6-Zellen bedingt wird. Allerdings konnten analoge macroRNAs auch in den anderen analysierten Zellsystemen identifiziert werden<sup>166</sup>. Zudem wurden kürzlich ähnliche macroRNAs, vlincRNAs (*very long intergenic non-coding* RNAs), beschrieben, die verbreitete und bis dato nicht registrierte Transkripte humaner Zellen repräsentieren<sup>182</sup>. Es handelt sich bei den vlincRNAs um transkribierte Regionen von 50 bis über 700 Kilobasen Länge, die über das gesamte humane Genom verteilt sind<sup>182</sup>. vlincRNAs wurden in Tumorzellen, aber auch primären Zelllinien und normalen Gewebe gefunden und zeigen ein sehr Zelltyp-spezifisches Expressionsmuster<sup>182</sup>. Die Anzahl der exprimierten vlincRNAs in einer Zelle korreliert mit der Pluripotenz oder dem Grad der malignen Transformation<sup>182</sup>. Die Transkripte, die von diesen vlinc-Regionen produziert werden, sind im Vergleich zu vielen nicht-kodierenden RNAs mit geringem Expressionslevel in den Zellen relativ abundant<sup>182</sup>. Zudem handelt es sich bei den vlincRNAs offensichtlich um funktionelle RNAs, worauf die syntenische Konservierung einiger vlincRNAs zwischen Mensch und Maus sowie die Häufung Krankheits-assoziiertes SNPs (single nucleotide polymorphism) in vlincRNA-Regionen hindeuten<sup>182</sup>. Zusätzlich wurde gezeigt, dass das Ausschalten von ausgewählten vlincRNAs durch siRNAs in den meisten Fällen Apoptose in den Zellen induziert<sup>182</sup>. Somit könnte es sich auch bei den identifizierten STAIRs um vlincRNA-ähnliche, funktionelle macroRNAs handeln.

Die in den Tiling Array-Daten beobachtete Induktion der STAIRs durch Interleukin-6 konnte mittels quantitativer *real-time* PCR validiert werden und bestätigte, dass die IL-6-abhängige Induktion von Genen in diesem Zellsystem reproduzierbar ist. In den Tiling Array-Daten wurde zudem die Abnahme der Fluoreszenzintensität über die Länge der besonders großen macroRNAs beobachtet. Mittels qPCR mit mehreren Primerpaaren an verschiedenen Positionen von STAIR1 konnte gezeigt werden, dass dies ein reelles Phänomen darzustellen scheint und keinen systematischen Fehler der Methode repräsentiert. Auch bei der Untersuchung Protein-kodierender Gene wird der Abfall der Tiling Array-Signalintensität zu ihren 3'-Enden deutlich<sup>166</sup>. Da sich die neu identifizierten macroRNAs in diesem Punkt genauso wie kodierende Transkripte verhalten, ist dies außerdem ein weiterer Hinweis, dass es sich bei den STAIRs um kontinuierliche Transkripte handelt. Insgesamt bestätigen die Ergebnisse dieser Arbeit darüber hinaus, dass die genomweite Analyse des Transkriptoms mittels Tiling Arrays ein geeignetes Verfahren ist, um unbekannte, differentiell exprimierte RNAs zu detektieren.

### 4.1.1 Charakterisierung der STAIRs

Sechs IL-6/STAT3-regulierte macroRNAs wurden im Rahmen dieser Arbeit weiter analysiert. Trotz ihrer Länge von bis zu 400 Kilobasen, repräsentieren die untersuchten STAIRs wahrscheinlich kontinuierliche Transkripte. Dies lässt sich einerseits aus den Tiling Array-Daten ableiten, die keine Hinweise auf ein mögliches Spleißen der STAIRs zeigen. Zusätzlich deutet bei den längeren STAIRs die Zeit-abhängige Verlängerung des transkribierten Bereiches, in der bekannten Geschwindigkeit der RNA-Polymerase II, sowie der charakteristische Abfall des Tiling Array-Signals vom 5'- zum 3'-Ende des Transkriptes darauf hin, dass es sich um durchgängige macroRNAs handelt<sup>166</sup>. So wie die meisten langen nicht-kodierenden RNAs<sup>10</sup> sind die STAIRs insgesamt kaum konserviert. Dies deutet darauf hin, dass die macroRNAs womöglich keinem Selektionsdruck hinsichtlich ihrer Sequenz unterliegen. Verschiedene Ursachen können dafür in Frage kommen. Zum einen könnte die Sequenz der Transkripte nicht gut konserviert sein, da diese keine essentielle Funktion ausüben. Dies würde allerdings bedeuten, dass der Transkriptionsfaktor STAT3 die Produktion zahlreicher überflüssiger RNAs induziert. Weiterhin ist es möglich, dass die STAIRs evolutionär sehr jung sind und sich im Verlauf der Menschwerdung sehr stark entwickelt und verändert haben. Für einen großen Teil der langen nicht-kodierenden RNAs trifft zu, dass sie spezifisch für Primaten sind<sup>10</sup>. Eine weitere Erklärung ist, dass die Sequenz der macroRNAs irrelevant für ihre Funktion ist. RNA ist kein lineares Molekül sondern kann sich in komplexe dreidimensionale Strukturen falten. Für ncRNAs ist daher häufig nicht so sehr die Sequenz, jedoch ihre Sekundärstruktur entscheidend für die Interaktion mit Proteinen und DNA<sup>10,11,183</sup>. Wie viele lange ncRNAs zeigen die STAIRs zumindest Stellen relativer Sequenzkonservierung und ihre Promotoren sind ähnlich gut konserviert wie die Protein-kodierender Gene<sup>10</sup>. Somit sind die STAIRs offensichtlich ebenso wie die vlincRNAs sehr lange, ungespleißte Transkripte, die von kanonischen RNA-Polymerase-II-Promotoren reguliert werden<sup>182</sup>. In dieser Arbeit konnte experimentell nachgewiesen werden, dass die STAIRs im Zellkern angereichert sind. Somit bestätigen auch die untersuchten, IL-6/STAT3-regulierten macroRNAs, dass nicht-kodierende RNAs hauptsächlich im Zellkern lokalisiert sind<sup>10</sup>. Es ist sehr unwahrscheinlich, dass die langen, ungespleißten Versionen dieser macroRNAs für Proteine kodieren – gerade auch aufgrund ihrer nukleären Lokalisation. Vermutlich werden die STAIRs in die Regulation der Genexpression involviert sein, wie es bis jetzt für wenige einzelne macroRNAs gezeigt wurde. Aber die aktuellsten Ergebnisse über vlincRNAs lassen vermuten, dass die Genregulation über macroRNAs ein allgemeiner Mechanismus in humanen Zellen sein könnte<sup>182</sup>. Für einige STAIRs, wie STAIR3 und STAIR15, ist sehr flagrant, dass sie womöglich zusätzlich oder ausschließlich als Primärtranskripte für gespleißte RNAs dienen, die weitere Funktionen in der Zelle ausführen können. Mit Ausnahme von STAIR3 ergaben sich bei den Untersuchungen aber keine evidenten Hinweise, dass die macroRNAs zu Protein-kodierenden RNAs prozessiert werden.

Dementsprechend wird weiter davon ausgegangen, dass es sich bei den STAIRs um kontinuierliche, potentiell funktionelle, nicht-kodierende macroRNAs handelt.

Die STAIRs zeigen eine große Reichweite an Gewebsspezifität. Während STAIR1 nur in einigen Multiplen Myelom-Zellen und in keinem der analysierten gesunden Gewebe detektiert werden kann, scheint STAIR18 ubiquitär exprimiert zu werden und wurde, zumindest mit zwei Primerpaaren, in allen untersuchten Geweben nachgewiesen. Dennoch zeigen die untersuchten, IL-6/STAT3-regulierten macroRNAs insgesamt eine sehr Gewebespezifische Expression. Dies entspricht dem Charakteristikum langer nicht-kodierender RNAs, deren Expression im Vergleich zu mRNAs strenger für bestimmte Zelltypen limitiert ist<sup>10,182</sup>. Bis jetzt ist für keines der STAIRs bewiesen, dass es als macroRNA eine Funktion ausübt, aber die Beobachtungen, dass sie durch den IL-6-Signalweg reguliert werden und anscheinend in recht großen Mengen als lange, kontinuierliche Transkripte im Zellkern von INA-6-Zellen vorkommen, unterstützen diese These. Zusätzlich wird STAIR15 auch während des Zellzyklus<sup>166</sup> sowie STAIR15 und STAIR18 im Verlauf der T-Zellaktivierung reguliert. Des Weiteren gibt es Hinweise, dass STAIR1 und STAIR2 benachbarte Gene in *cis* regulieren<sup>166</sup>.

### **STAIR1**

STAIR1 stellt mit ungefähr 400 Kilobasen die längste identifizierte macroRNA dar. Es handelt sich um eine intergenische ncRNA, die zwischen den Protein-kodierenden Genen SYT4 (Synaptotagmin 4) und SETBP1 (SET *binding* protein 1) auf dem Plusstrang von Chromosom 18 lokalisiert ist. Insgesamt ist STAIR1 nicht sehr stark konserviert. Allerdings konnten innerhalb der macroRNA ein paar konservierte Elemente detektiert werden, deren Reihenfolge und Abstände in verschiedenen untersuchten Genomen erhalten sind<sup>166</sup>. Ob STAIR1 gespleißt wird, ist ungewiss. Die Tiling Array-Signale geben darüber keine Auskunft. Ein paar gespleißte ESTs überlappen mit der macroRNA, aber keine sequenzierte cDNA ist auf den Bereich von STAIR1 beschränkt oder umspannt einen wesentlichen Teil der IL-6/STAT3-induzierten, transkribierten Region. Jedoch kann die Tatsache, dass ein putatives gespleißtes Transkript noch nicht detektiert wurde, auch der sehr begrenzten, Zelltyp-spezifischen Expression von STAIR1 geschuldet sein. Dafür, dass in dem Bereich von STAIR1 ein Protein-kodierendes Transkript exprimiert wird, konnte kein ersichtlicher Hinweis gefunden werden. Somit deutet alles darauf hin, dass es sich um eine nicht-kodierende macroRNA handelt. Bei der Analyse der von ENCODE generierten Daten über Histon-Modifikationen, die die überlagerten Ergebnisse aus sieben Zelllinien zeigen, konnten im Bereich von STAIR1 nicht die charakteristische Markierung von Polymerase-II-Genen detektiert werden. Allerdings konnte durch die in unserer Arbeitsgruppe von Dr. Conny Blumert durchgeführte Chromatin-Immünpräzipitation mit H3K4Me3-Antikörpern in INA-6-Zellen eine starke Anreicherung dieses Kennzeichens aktiver Promotoren am

Transkriptionsstart von STAIR1 nachgewiesen werden<sup>166</sup>. Des Weiteren konnte in den Multiplen Myelom-Zellen ein gehäuftes Vorkommen der mit aktiver Transkription assoziierten H3K36Me3-Modifikation entlang des transkribierten Bereiches von STAIR1 gezeigt werden<sup>166</sup>. Dass die Anreicherung dieser Histon-Modifikationen von STAIR1 nicht in den von ENCODE untersuchten Zelllinien beobachtet werden konnte, ist wiederum ein Hinweis auf eine sehr strikt Zelltyp-spezifische Expression dieser macroRNA. Bei der Expressionsanalyse konnte STAIR1 von 14 untersuchten Tumorzelllinien nur in INA-6-Zellen, in denen es im Rahmen dieser Arbeit identifiziert wurde, und einer weiteren Multiplen Myelom-Zelllinie, JK6E, detektiert werden. STAIR1 konnte auch in keinem der analysierten Gewebe in seiner kompletten Länge nachgewiesen werden. Eine sehr schwache Expression in der Milz ist möglich, allerdings konnte das untersuchte, am weitesten 3'-gelegene Fragment, hier nicht detektiert werden. Interessant, im Hinblick auf die potentielle Verwendung als Biomarker, ist vor allem die Beobachtung, dass STAIR1 in vier von neun Patientenproben mit Multiplen Myelom exprimiert wurde, aber in keinem der Gewebe gesunder Spender. Weiter wurden von unseren Kollegen Daten generiert und publiziert, die zeigen, dass STAIR1 bei der Progression von Astrozytomen heraufreguliert wird und seine Expression mit der des benachbarten SETBP1-Gens korreliert<sup>166</sup>. SETBP1 kodiert ein überwiegend nukleäres Protein, das mit dem SET-Onkogen und anderen Proteinen mit SET-Domäne interagieren kann<sup>184</sup>. Schon aufgrund der enormen Länge von STAIR1 liegt die Vermutung nahe, dass diese macroRNA eine lokale Funktion ausübt. Die Hypothese, dass STAIR1 SETBP1 in *cis* reguliert, wird weiter dadurch bekräftigt, dass eine hohe Expression von SET<sup>185</sup> und SETBP1<sup>186</sup> mit myeloiden Leukämien, Krebserkrankungen bei denen STAT3 bekanntermaßen als ein zentrales Onkogen fungiert, assoziiert ist.

## **STAIR2**

Die zweite, mit Hilfe der Tiling Arrays identifizierte, IL-6/STAT3-regulierte macroRNA wurde STAIR2 genannt. Es handelt sich um eine intronische ncRNA, die sich im ersten Intron des DCC-Gens befindet. STAIR2 wird ebenso wie DCC vom Plusstrang von Chromosom 18 transkribiert und umspannt einen Bereich von ungefähr 300 Kilobasen. Die Untersuchungen von Dr. Katja Schramedei legen die Vermutung nahe, dass STAIR2 und das Tumorsuppressorgen DCC koreguliert werden könnten<sup>169</sup>. STAIR2 gleicht in seinen Charakteristika sehr STAIR1. Auch STAIR2 ist insgesamt nicht stark konserviert und es konnten keine Hinweise auf gespleißte Transkripte innerhalb der macroRNA gefunden werden. Weiter konnten keine offensichtlichen Protein-kodierenden Transkripte detektiert werden. STAIR2 wird ebenfalls sehr Zelltyp-spezifisch exprimiert. In den verschiedenen untersuchten Tumorzelllinien konnte es nur in Multiplen Myelom-Zellen (INA-6, XG-1 und JK6E) nachgewiesen werden und bei der Analyse verschiedener humaner Gewebe zeigte sich nur eine schwache Expression im Gehirn. STAIR2 hat auch die Assoziation mit Krebserkrankungen mit STAIR1 gemeinsam. Es wurde in dieser Arbeit in über der Hälfte der

analysierten primären Multiplen Myelom-Proben detektiert. Zudem konnte gezeigt werden, dass STAIR2 ebenfalls während der Progression von Astrozytomen heraufreguliert wird<sup>166</sup>. Aufgrund der enormen Länge von STAIR2 lässt sich eine mögliche *cis*-regulatorische Funktion vermuten. Gerade da es potentiell auch mit DCC koreguliert wird, ist eine Regulation der Transkription oder epigenetische Modifikation des Tumorsuppressors durch STAIR2 denkbar.

### STAIR3

Im Gegensatz zu den anderen untersuchten IL-6/STAT3-regulierten macroRNAs zeigt STAIR3 nur eine transiente Induktion nach IL-6-Stimulus in INA-6-Zellen. STAIR3 liegt auf dem Plusstrang von Chromosom 20 und überlappt mit der vorhergesagten C20orf103-mRNA. Dieser Bereich weist die charakteristischen Histonmodifikationen eines RNA-Polymerase-II-Genes auf. Ein Ende des Transkriptes ist durch die Promotor-assoziierte H3K4Me3-Modifikation gekennzeichnet. Zusätzlich konnte Histon 3 mit K4Me1 und K27Ac entlang der transkribierten macroRNA detektiert werden. Weiter wurde beobachtet, dass innerhalb von STAIR3 einige kürzere Abschnitte eine besonders starke Konservierung aufweisen und dass diese mit den Exons von C20orf103 überlappen. Das Tiling Array-Signal ist im gesamten Bereich von STAIR3 sehr hoch und spiegelt daher die Exon-Intron-Struktur der C20orf103-mRNA nicht eindeutig wieder – lässt das gespleißte Transkript aber erahnen. Bei der weiteren Analyse ergaben sich neben dem C20orf103-Transkript keine Hinweise auf weitere Spleißereignisse innerhalb des Bereichs von STAIR3. Demnach liegt die Vermutung nahe, dass STAIR3 das Primärtranskript des Protein-kodierenden Gens darstellt. Vor kurzem wurde das von C20orf103 kodierte 280 Aminosäure-lange Protein erstmals im Menschen identifiziert und in die *lysosome-associated membrane protein* (LAMP)-Familie eingeordnet<sup>187</sup>. Da sich die Expression des Moleküls auf das Gehirn und humane, plasmazytoide dendritische Zellen (pDC) beschränkt, wurde es als *brain and dendritic cell* (BAD) LAMP bezeichnet<sup>187</sup>. Die Autoren spekulieren, dass BAD-LAMP mit Mulipass-Membranproteinen interagieren kann und als Co-Chaperon in nicht-aktivierten pDCs und Neuronen fungiert<sup>187</sup>.

In den in dieser Arbeit analysierten Geweben wurde die STAIR3 macroRNA nur im Gehirn und im peripheren Blut exprimiert. Dies stimmt mit der beschriebenen Expression der BAD-LAMP mRNA überein<sup>187</sup>. Des Weiteren wurde STAIR3 in dieser Arbeit in allen vier untersuchten Multiplen Myelom-Zelllinien nachgewiesen und in keiner andern analysierten Tumorzelllinie detektiert. Diese Beobachtung deckt sich mit publizierten Ergebnissen, die BAD-LAMP nur in der seltenen Neoplasie blastischer pDCs, die in dieser Arbeit nicht analysiert wurde, und keinem anderen hämatologischen Tumor detektieren konnten (das Multiple Myelom war in diese Untersuchungen nicht einbezogen)<sup>187</sup>. In primären Patientenproben des Multiplen Myeloms konnte die macroRNA nicht nur im peripheren

Blut, wie auch bei gesunden Spendern, sondern zusätzlich im Pleuraerguß und bei einigen Patienten im Knochenmark nachgewiesen werden. Demnach könnte STAIR3/BAD-LAMP potentiell als Biomarker für einige spezielle Krebserkrankungen verwendet werden, was zudem dadurch bestärkt wird, dass BAD-LAMP als eines von acht Genen identifiziert wurde, das bei Magenkrebs Patienten ein erhöhtes Risiko für ein postoperatives Rezidiv prognostizieren kann<sup>188</sup>. In Folgeuntersuchungen wäre erst zu klären, ob die beobachtete Überexpression der STAIR3 macroRNA im Multiplen Myelom auch mit einer erhöhten Expression des BAD-LAMP-Proteins korreliert. Eine Funktion der macroRNA unabhängig von der des Proteins ist noch immer denkbar, müsste aber experimentell überprüft werden.

## **STAIR6**

STAIR6 ist intergenisch und 130 Kilobasen lang. Es ist auf dem Plusstrang von Chromosom 3 zwischen den Protein-kodierenden Genen ABHD5 (*abhydrolase domain containing 5*) und TOPAZ1 (*testis and ovary specific PAZ domain containing 1*) lokalisiert. Die Konservierung von STAIR6 ist insgesamt nicht stark. Am Transkriptionsstart des IL-6-abhängig transkribierten Bereiches kann die Promotor-assoziierte H3K4Me3-Histonmodifikation detektiert werden und entlang der macroRNA lassen sich die mit aktiver Transkription verknüpften Modifikationen H3K4Me1 und H3K27Ac nachweisen. Somit zeigt STAIR6 die typische Kennzeichnung eines Polymerase-II-Gens. Es wurden viele kurze ungespleißte ESTs detektiert, die sich am potentiellen Transkriptionsstart und in einem 11 Kilobasen-langen Bereich am 3'Ende der macroRNA häufen. Im 3'-Bereich von STAIR6 befindet sich auch eine annotierte microRNA, mir-138-1. Diese wurde bereits als Tumor-suppressive microRNA im Kontext des Nierenzellkarzinoms beschrieben<sup>189</sup>. Mit Hilfe bioinformatischer Analysen wurde innerhalb von STAIR6 nur ein offener Leserahmen in der entsprechenden Orientierung vorhergesagt, der aber nur einen Teil des transkribierten Bereiches überlappt und nicht durch eine passende sequenzierte cDNA bestätigt wird. In humanem Gewebe konnte STAIR6 in Gehirn und Niere komplett mit allen drei verwendeten Primerpaaren nachgewiesen werden. Möglicherweise wird es auch schwach in der Milz exprimiert – hier konnte aber das mittlere Fragment nicht amplifiziert werden. Bei der Analyse der Expression in Tumorzelllinien konnte STAIR6 in Multiplen Myelom-Zellen (INA-6, JK6E und MM.1S) und SUDHL-4, einer malignen Zelllinie mit B-Zellursprung, detektiert werden. In den Glioblastom-Zellen, A172, ließen sich sowohl das 3' als auch das 5'-Fragment nachweisen. Die Untersuchung primärer Gewebeproben lieferte Hinweise auf eine potentielle Assoziation der STAIR6-Expression mit Krebserkrankungen wie dem Multiplen Myelom. Die macroRNA wurde dabei in sieben der neun analysierten Patientenproben detektiert, konnte aber weder im peripheren Blut noch im Knochenmark gesunder Spender nachgewiesen werden. Interessant wäre es in weiteren Untersuchungen zu bestimmen, ob die potentiell Tumor-assoziierte Expression von STAIR6 in Leukozyten mit einer erhöhten



Expression von mir-138 korreliert und ob die macroRNA in diesem Kontext zusätzlich oder ausschließlich eine microRNA-unabhängige Funktion ausübt.

## STAIR15

Das 20 Kilobasen-lange, intergenische STAIR15 überlappt mit der annotierten, langen nicht-kodierenden RNA MIAT, die auch unter den Namen *Gomafu* (japanisch für gepunktetes Muster) oder *retinal noncoding RNA 2* (RNCR2) bekannt ist. MIAT ist ein polyadenyliertes, mRNA-ähnliches Transkript mit mehreren Exons<sup>190</sup>. Es wurden mehrere Isoformen von MIAT identifiziert, die eine Länge von bis zu 9 Kilobasen aufweisen<sup>190</sup>. Die MIAT-Transkripte sind im Zellkern verteilt und zeigen ein punktiertes Muster, das nicht mit bekannten Kernkörperchen überlappt<sup>190</sup>. Verschiedene Studien haben belegt, dass MIAT eine Rolle bei der Entwicklung retinaler Zellen<sup>191,192</sup>, der Gehirnentwicklung<sup>193</sup> und postmitotischen neuronalen Funktionen<sup>190,194,195</sup> spielt. MIAT moduliert in murinen embryonalen Stammzellen Oct4-Level und somit die Differenzierung zu Ektoderm<sup>196</sup>. Zudem ist seine Dysregulation mit einem Risiko für Myokardinfarkte assoziiert<sup>197</sup> und scheint in die Pathogenese von Schizophrenie involviert zu sein<sup>194</sup>. Einige Hinweise suggerieren, dass MIAT eine Funktion beim alternativen Spleißen innehat. So wurden Interaktionen zwischen MIAT und den Spleißfaktoren SP1 (*splicing factor 1*)<sup>198</sup>, QKI (*Quaking homolog, KH domain containing, RNA binding*)<sup>194</sup>, SRSF1 (*serine/arginine rich splicing factor 1*)<sup>194</sup> oder Celf3 (*CUGBP Elav-like family member 3*)<sup>199</sup> beschrieben. Des Weiteren wird bei der Dysregulation von MIAT immer wieder aberrantes Spleißen beobachtet<sup>194,198,200</sup>, aber der genaue Mechanismus, wie MIAT das Spleißen anderer RNAs moduliert, ist noch nicht bekannt.

Im Locus von STAIR15 und MIAT wird die mit aktiver Transkription assoziierte H3K4Me3-Histonmodifikation sehr häufig detektiert. Die für Polymerase-II-Promotoren typische H3K4Me3-Kennzeichnung tritt überlappend mit dem Transkriptionsstart von MIAT sowie in dessen 3'-Exon auf. Die weiter stromabwärts gelegene Promotor-Markierung überlappt mit dem Transkriptionsstart einer erst kürzlich annotierten ncRNA, MIAT *neighbor* (MIATNB), die in 3'-Richtung noch deutlich über den Bereich von STAIR15 hinausragt. Bisher wurde noch kein Antisense-Transkript sequenziert, das die Tiling Array-Signale von STAIR15 hervorrufen würde. Demnach handelt es sich bei STAIR15 am wahrscheinlichsten um das ungespleißte MIAT-Primärtranskript. STAIR15 und die überlappende ncRNA MIAT zeigen nur eine schwache Sequenzkonservierung – lediglich der Promotor und Teile des 3'-Exons sind in den Vertebraten konserviert. Rapicavoli *et al.* konnten allerdings durch eine Syntenie-basierte Suche putative MIAT Homologe in Hühnern und Krallenfröschen identifizieren<sup>191</sup>. Neben den humanen und murinen MIAT konnte auch bereits für das Homolog des Huhns die charakteristische nukleäre Expression gezeigt werden<sup>198</sup>.

MIAT wurde in der Maus bisher nur in spezifischen neuronalen Zellen<sup>190,192</sup> und embryonalen Stammzellen<sup>196</sup> beschrieben. Auch im Huhn wurde MIAT in neuronalen Zellen untersucht, da es von den vier analysierten Hühnergeweben nur im Gehirn detektiert wurde<sup>198</sup>. In humanem Gewebe konnte eine starke Expression neben dem Gehirn allerdings auch in der Milz beobachtet werden<sup>197</sup>. Geringe RNA-Mengen ließen sich zusätzlich noch in weiteren Geweben detektieren<sup>197</sup>. In dieser Arbeit wurde STAIR15/MIAT in allen untersuchten leukozytären Tumorzelllinien, mit Ausnahme von KM-H2, sowie in den Glioblastom-Zellen A172 nachgewiesen. Die Expression von STAIR15/MIAT wurde ebenfalls in gesunden, humanen Geweben sowohl im Gehirn als auch in der Milz gezeigt. Zusätzlich wurde es im Darm, Thymus und schwach im Herzen des Menschen detektiert. Die mäßige Expression in Thymus und Darm deckt sich mit den Ergebnissen von Ishii *et al.*<sup>197</sup>. Diskrepanzen gibt es hingegen bei dem Vorkommen von MIAT in Herz und Leber. In dieser Arbeit konnte STAIR15/MIAT nicht in der Leber nachgewiesen werden – dieses Ergebnis wird auch durch die Transkriptomanalysen von Gibb *et al.* bestätigt<sup>28</sup>. Die hier beobachtete schwache Expression im Herzen wurde allerdings in keiner der beiden anderen Publikationen detektiert<sup>28,197</sup>, sodass die in dieser Arbeit amplifizierten Fragmente womöglich auf eine Verunreinigung der kardialen RNA-Probe zurückzuführen sind. Insgesamt aber zeigt sich, dass die Expression von MIAT zumindest im Menschen nicht auf neuronale Zellen beschränkt ist und ihre Funktion auch in anderen Geweben untersucht werden sollte. Interessant ist in dieser Hinsicht beispielsweise, dass STAIR15/MAIT nicht nur durch IL-6/STAT3 sondern in humanen Vorhautzellen auch während des Zellzyklus und bei der Aktivierung primärer T-Zellen reguliert wird<sup>166</sup>. Dabei könnten bei der Sequenzierung der T-Zellproben neben den annotierten MIAT-Isoformen noch weitere neue Spleißvarianten detektiert werden.

## **STAIR18**

STAIR18 ist eine intergenische macroRNA, die sich über eine Länge von 100 Kilobasen erstreckt. Der Transkriptionsstart von STAIR18 fällt mit dem der annotierten, vorhergesagten, nicht-kodierende RNA LOC541471 (mittlerweile auch MIR4435-1HG genannt) zusammen, deren zwei Transkriptvarianten bereits häufig bei cDNA-Sequenzierungen detektiert werden konnten. Ein starkes Signal für die Promotor-assoziierte H3K4Me1-Histonmodifikation überlappt mit dem Transkriptionsstart von STAIR18/LOC541471. Zusammen mit den Modifikationen H3K4Me1 und H3K27Ac, die über den gesamten Bereich von STAIR18 und darüber hinaus nachgewiesen wurden, ist STAIR18 wie ein klassisches Polymerase-II-Gen gekennzeichnet. Bei der Suche nach potentiellen offenen Leserahmen, überlappend mit der macroRNA, wurde ein putatives Proteinkodierendes Transkript vorhergesagt, das für ein 373 Aminosäure-langes Peptid kodieren könnte. Allerdings spiegeln die Tiling Array-Signale das entsprechende Spleißmuster nicht wieder und es wurde bis jetzt auch noch keine analoge cDNA sequenziert. Die Existenz

dieser putativen mRNA sowie die des potentiell kodierten Peptides sollte in weiteren Untersuchungen überprüft werden, da bis jetzt aber keine eindeutigen Hinweise vorliegen, dass die Expression von STAIR18 zur Synthese eines Peptides führt, wird vorerst weiter davon ausgegangen, dass es sich bei diesem Transkript um eine nicht-kodierende macroRNA handelt, die eventuell das Primärtranskript der LOC541471-ncRNA darstellt.

STAIR18 scheint ubiquitär exprimiert zu werden und wurde in allen untersuchten Tumorzelllinien und Geweben mit zwei verschiedenen Primerpaaren nachgewiesen. Das zusätzlich verwendete, am weitesten 5'-gelegene Primerpaar für die Detektion von STAIR18 zeigte hingegen eine Gewebe-spezifische Expression. Dies kann verschiedene Ursachen haben. Möglicherweise wird STAIR18 Zelltyp-spezifisch prozessiert, besitzt einen alternativen Transkriptionsstart oder aber STAIR18 repräsentiert alternative, überlappende Transkripte, die unterschiedlich reguliert und exprimiert werden. Eine weitere Erklärung, die erst durch die Ergebnisse dieser Arbeit ersichtlich wurden, ist, dass dieses Primerpaar spezifisch für den ursprünglichen STAIR18-Locus auf dem langen Arm von Chromosom 2 ist, die beiden anderen verwendeten Primerpaare hingegen zusätzlich zum duplizierten Locus komplementär sind. Demnach könnten die zwei verschiedenen STAIR18-Loci unterschiedlich reguliert werden und der mit LOC541471 überlappende Locus Zelltyp-spezifisch transkribiert werden, was in weiteren Untersuchungen analysiert werden müsste. Nicht nur die macroRNA STAIR18, wie in dieser Arbeit gezeigt, sondern auch die LINC00152 wird ubiquitär exprimiert<sup>28</sup>. Dies indiziert zudem, dass die macroRNA und/oder die überlappende ncRNA152 bei allgemeinen biologischen Prozessen von Bedeutung sind.

#### **4.1.2 STAIRS als potentielle Biomarker**

In der Mehrheit humaner Tumoren und Krebszelllinien wurden erhöhte Mengen an phosphoryliertem STAT3 detektiert<sup>83</sup>. Häufig ist die vermehrte Expression oder Phosphorylierung von STAT3 zudem mit einer schlechten Prognose assoziiert<sup>83</sup>. Auch die Expression der STAIRs scheint mit bestimmten Krebserkrankungen zu korrelieren. Die Ergebnisse dieser Arbeit deuten darauf hin, dass die Expression von STAIR1, STAIR2, STAIR3 und STAIR6 ein Hinweis auf das Multiple Myelom sein kann. Somit haben diese vier STAIRs das Potential als Biomarker für Diagnose und Therapie dieser Neoplasie zu dienen. In weiteren Untersuchungen muss geklärt werden, ob die Expression einzelner STAIRs oder deren Kombination eventuell bestimmte Krankheitsverläufe oder die Wirkung spezieller Therapien voraussagen kann. Des Weiteren wurde bereits gezeigt, dass STAIR1 und STAIR2 während der Progression von Astrozytomen heraufreguliert werden und somit auch für die Klassifizierung dieser Tumoren bedeutsam sein könnten<sup>166</sup>. Für das mit STAIR3 überlappende BAD-LAMP wurde bereits seine Eignung als Biomarker für blastische pDC Neoplasien demonstriert<sup>201</sup> und es scheint zusätzlich, zusammen mit sieben anderen

Genen, bei Magenkrebs Patienten ein erhöhtes Risiko für ein postoperatives Rezidiv vorherzusagen<sup>188</sup>.

Auch die Dysregulation der in diversen Geweben exprimierten STAIRs, 15 und 18, ist anscheinend mit Krebserkrankungen assoziiert. Durch die Expressionsanalysen langer, polyadenylierter, nicht-kodierender RNAs von Gibb *et al.* wurde die erste Generation eines Atlas für die Expression von lncRNAs in normalen humanen Gewebe sowie Krebsgewebe generiert<sup>28</sup>. Dabei wurden auch die mit STAIR15 überlappende ncRNA MIAT und die LINC00152, die vom duplizierten STAIR18-Locus transkribiert wird, analysiert. Demnach scheint die Expression der MIAT-ncRNA in einigen Krebsgeweben (Hirntumor, Retinoblastom, Gallenblasen-, Magen- und Speiseröhrenkrebs) reduziert zu sein, was auf eine Rolle als Tumorsuppressor-lncRNA hindeuten könnte<sup>28</sup>. Die LINC00152 wird hingegen in verschiedenen Krebsgeweben (Gallenblasenkrebs, Hodgkin Lymphom, Weichteilsarkom, Retinoblastom, Bronchialkarzinom, Hirntumor und Magenkrebs) überexprimiert<sup>28</sup>. Zusätzlich wurde die Hypomethylierung des LINC00152-Locuses in Leberzellkarinomen beschrieben<sup>202</sup> sowie die Überexpression der ncRNA in Magenkrebs nachgewiesen<sup>203–205</sup>. Die Verwendung von LINC00152 als Biomarker für Magenkrebs wird zudem dadurch bekräftigt, dass die ncRNA mit der Invasion dieser Tumoren korreliert und eine erhöhte Expression auch im Magensaft nachweisbar ist<sup>204</sup>, wodurch eine Messung auch ohne Biopsie durchführbar wäre.

Die Korrelation der STAIRs mit verschiedenen Krebserkrankungen verdeutlicht, dass die identifizierten macroRNAs anscheinend eine allgemeinere Relevanz in der Onkogenese besitzen. Weitere Untersuchungen über eine mögliche ursächliche Funktion der STAIRs bei der Tumorgenese werden zusätzlich Aufschluss über die potentielle Verwendung dieser macroRNAs als Biomarker oder therapeutische Ziele liefern.

## **4.2 Regulation von lncRNAs während der T-Zellaktivierung**

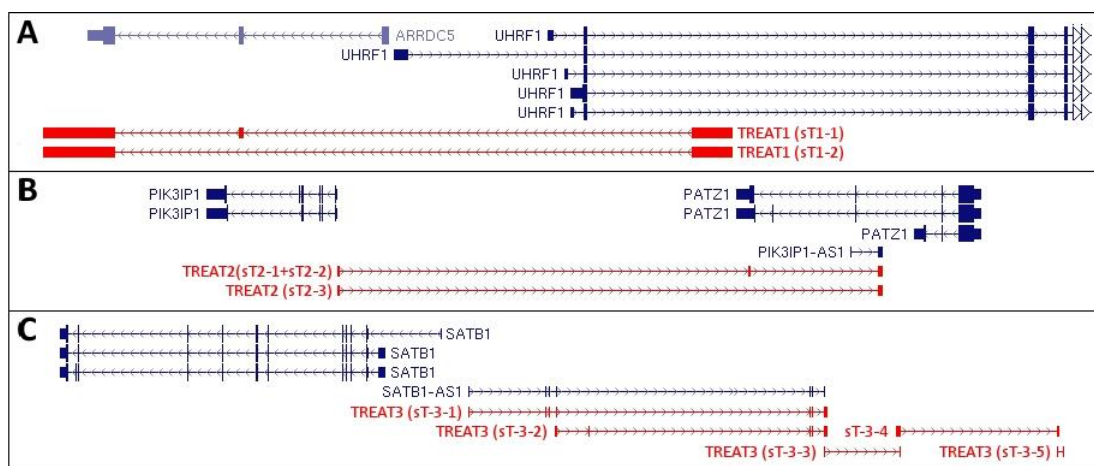
Das Immunsystem muss viele verschiedene Aufgaben bewältigen. Dafür ist es nötig, dass die Immunzellen moduliert werden können und sich dynamisch anzupassen. Das Verstehen der Regeln und die Definition der Faktoren, die dabei eine Rolle spielen, könnte zur Identifizierung neuer therapeutischer Ziele für immunvermittelte Erkrankungen führen. Es gibt bereits viele Beispiele wie miRNAs die Zellidentität und Differenzierung beeinflussen, und lncRNAs scheinen aufgrund ihrer vielfältigen Funktionsweisen ein noch größeres Regulationspotential zu besitzen<sup>21</sup>.

Die Bedeutung langer nicht-kodierender RNAs für die Entwicklung, Differenzierung und Funktion von T-Helferzellen wurde bereits für einige wenige Transkripte gezeigt. So wurde beispielsweise beschrieben, dass lange ncRNAs die Expression von Zytokinen<sup>156</sup> und Chemokinrezeptoren<sup>154</sup> regulieren, einen Wachstumsstopp in T-Zellen induzieren<sup>158</sup> oder die Lokalisation von Transkriptionsfaktoren<sup>161,162</sup> beeinflussen können und somit die Immunantwort modulieren. Eine genomweite Untersuchung langer nicht-kodierender RNAs während der Aktivierung und Differenzierung von T-Helferzellen wurde bisher nur mit murinen Zellen durchgeführt<sup>154</sup>. Allerdings könnte sich die Übertragung der Ergebnisse auf die Verhältnisse beim Menschen als problematisch erweisen, da sich einerseits Details der Differenzierung und Effektorfunktionen zwischen Mensch und Maus unterscheiden und andererseits die Expression und Funktion langer nicht-kodierender RNAs sehr Spezies-spezifisch ist<sup>10</sup>. Aus diesem Grund sollte im Rahmen dieser Arbeit die Regulation des Transkriptom humaner T-Zellen untersucht werden. Dieses System bot sich zudem in Anlehnung an die Experimente in Multiplen Myelom-Zellen an, da STAT3 auch für T-Helferzellen eine wichtige Rolle spielt und essentielle Funktionen nicht nur für die Differenzierung von Th17-Zellen sondern auch für die Proliferation und das Überleben von T-Helferzellen besitzt<sup>62</sup>. STAT3 reguliert dabei nicht nur die Expression sondern auch epigenetische Modifikationen von Genen<sup>62</sup>.

Naive und Effektor-T-Zellen wurden von den übrigen mononukleären Zellen des peripheren Blutes gesunder Spender isoliert. Die Verwendung von *ex vivo* gereinigten primären T-Helferzellen bot dabei die Möglichkeit, naive T-Zellen *in vitro* mit Hilfe von Antikörpern (anti-CD3 und anti-CD28) zu aktivieren und dabei zu verschiedenen Zeitpunkten (2, 24 und 72 Stunden) die RNA der Zellen zu isolieren und die dynamischen Veränderungen des Transkriptom mit Hilfe von Tilling Arrays und Hochdurchsatz-Sequenzierungen während der T-Zellaktivierung zu analysieren. Auf diese Weise konnten differentiell exprimierte Transkripte im Verlauf der Aktivierung sowie zwischen naiven und Effektor-T-Zellen detektiert werden. Während der Aktivierung der T-Zellen wurden sehr viele Gene reguliert. Dies zeigt, dass die T-Zellen einen dramatischen Wechsel in ihrem Transkriptionsprogramm durchführen, um schnell wichtige Gene für die Immunabwehr zu exprimieren. Dabei war der Anteil induzierter und reprimierter Gene annähernd gleich. Ein Viertel der regulierten, annotierten Transkripte entfiel auf nicht-kodierende RNAs. Weiter konnte belegt werden, dass der Hauptteil, der zwischen naiven und Effektor-T-Zellen differentiell exprimierten Gene, auch bei der Aktivierung der naiven T-Zellen reguliert wird. Dies entspricht den Erwartungen, da die aus dem Blut isolierten Effektor- und Gedächtnis-T-Zellen, Immunzellen repräsentieren, die bereits *in vivo* aktiviert wurden. Insgesamt deuten die Ergebnisse darauf hin, dass zur Koordination der transkriptionellen und post-transkriptionellen Ereignisse, die mit der Aktivierung der T-Zellen einhergehen, die Expression vieler regulatorischer, nicht-kodierende RNAs moduliert wird. Nachdem der

Effektorphänotyp etabliert wurde, sind anscheinend viele der Regulatormoleküle nicht mehr erforderlich, da die veränderte Genexpression epigenetisch festgeschrieben wurde.

Wie bereits für die Identifizierung IL-6/STAT3-regulierter, langer nicht-kodierender RNAs, so wurden auch anhand der Tiling Array-Daten der T-Zellen stark und während der Aktivierung differentiell exprimierte Bereiche des Genoms bestimmt, sodass neben annotierten Genen zusätzlich unbekannte Transkripte detektiert werden konnten. Sechs abhängig vom Aktivierungszustand der T-Zellen regulierte, unerforschte, genomische Bereiche wurden ausgewählt und detaillierter analysiert. Die reprimierten oder induzierten Transkripte wurden TREATs (*transkripts regulated by activation in T cells*) genannt und umfassen intergenische sowie intronische Bereiche von bis zu 91 Kilobasen. Von diesen werden drei TREATs im Folgenden detailliert diskutiert. Um Informationen über die Orientierung der TREATs und mögliche Spleißereignisse in diesen Bereichen zu erhalten, wurden die Daten der Hochdurchsatz-Sequenzierung der T-Zellproben genutzt. So zeigte sich beispielsweise, dass TREAT1 eine selbstständige, ungespleißte RNAs darstellen könnte oder womöglich Teil des Primärtranskriptes zweier putativer ARRDC5-Isoformen (*arrestin domain containing 5*) mit einem bisher unbekanntem, alternativen Transkriptionsstart ist, der im Intron des gegenläufigen UHRF1-Gens (*ubiquitin-like with PHD and ring finger domains 1*) liegt (Abb. 4.1A). ARRDC5 ist in Vertebraten konserviert, allerdings ist seine Funktion noch gänzlich unerforscht. Bei RNA-Sequenzierungen wurde ARRDC5 in einigen Geweben detektiert. Das ARRDC5-Protein wurde bisher allerdings nur in einer Studie in Thrombozyten nachgewiesen<sup>206</sup>. Der in dieser Arbeit detektierte alternative Transkriptionsstart wird zusätzlich durch moderate Chip-Seq-Signale der Promotor-assoziierten H3K4Me3-Histonmodifikation und einige sequenzierte cDNAs in diesem Bereich bekräftigt. Die zwei sequenzierten, neuen ARRDC5-Isoformen könnten wenn überhaupt nur ein stark verkürztes ARRDC5-Protein kodieren, allerdings ist fraglich ob die entsprechenden Startcodone von



**Abb. 4.1: TREATs im genomischen Kontext.** Dargestellt sind TREAT1 (A), TREAT2 (B) und TREAT3 (C) sowie überlappende und benachbarte Gene.

Ribosomen erkannt werden können. Gerade da das Protein nur einmal detektiert wurde, lässt dies vermuten, dass die ARRDC5-Transkripte auch eine andere Funktion innehaben als das Protein zu kodieren. Interessant ist in dieser Hinsicht auch die Beobachtung, dass UHRF1, in dessen Intron sich das erste Exon der neuen ARRDC5-Varianten befindet (Abb. 4.1A), entgegengesetzt zu ARRDC5 reguliert zu werden scheint. Die Transkription vom alternativen ARRDC5-Promotor findet in naiven und Effektor-T-Zellen statt, ist bereits zwei Stunden nach Stimulation der naiven T-Zellen reduziert und später im Verlauf der Aktivierung nicht mehr nachweisbar. Die Expression des UHRF1-Genes wird hingegen erst 24 und 72 Stunden nach Aktivierung induziert. Für UHRF1 ist bekannt, dass es während des Zellzykluses reguliert und stark in proliferierenden Zellen exprimiert wird<sup>207</sup>. UHRF1 erkennt Modifikationen sowohl an DNA als auch an Histonen und rekrutiert Moleküle, die diese Markierungen katalysieren, so können epigenetische Modifikationen auf Tochterzellen übertragen werden<sup>207</sup>. Zudem ist UHRF1 als Onkogen bekannt, das Krebszellen in einem proliferativen Zustand hält und deren Differenzierung verhindert<sup>207,208</sup>. Eventuell ist die Transkription von UHRF1 und den neu identifizierten ARRDC5-Isoformen in einer Art und Weise miteinander verknüpft, dass das Ablesen des einen Gens die Transkription des anderen ausschließt. Womöglich konkurrieren beide Promotoren um Transkriptionsfaktoren, die RNA-Polymerase oder Chromatinmodifikationen, sodass immer nur eines der Transkripte synthetisiert werden kann<sup>209</sup>. Vorstellbar ist ebenfalls, dass durch die Transkription der neuen ARRDC5-Isoformen Transkriptionsfaktoren vom UHRF1-Promotor entfernt werden oder, dass die ARRDC5-Transkripte Histon-modifizierende Moleküle rekrutieren, so Chromatin lokal reorganisieren und auf diese Weise die Expression des UHRF1-Genes reprimieren<sup>209</sup>.

Für das anhand der Tiling Array-Daten identifizierte TREAT2 ergab die Analyse der Hochdurchsatz-Sequenzierung, dass es anscheinend in T-Zellen zu zwei bisher unbekanntem Varianten der langen nicht-kodierenden RNA PIK3IP1-AS1 (PIK3IP1 antisense RNA 1) prozessiert wird (Abb. 4.1B). Die beiden neuen PIK3IP1-AS1-Isoformen werden vom PIK3IP1-Promoter antisense zum Protein-kodierenden Gen transkribiert und ebenso wie PIK3IP1 (PIK3 *interacting protein* 1) nach Aktivierung der naiven T-Zellen herunterreguliert. Für PIK3IP1, das als negativer Regulator von PI3K (*phosphoinositide-3-kinase*) und der T-Zellaktivierung beschrieben ist, wurde die transiente Reduktion der Expression nach der Aktivierung muriner Th2-Zellen bereits gezeigt<sup>210</sup>. In primären, human T-Helferzellen scheint die durch die Aktivierung der Zellen bewirkte Abnahme der PIK3IP1-mRNA allerdings deutlich stärker zu sein und länger anzudauern. Zudem wurde in dieser Arbeit ein Hinweis erbracht, dass PIK3IP1 von einem bidirektionalen Promotor transkribiert wird, der die Transkription eines Protein-kodierenden und eines nicht-kodierenden Gens steuert. Dies ist ein relativ häufiges Phänomen, da sieben Prozent der annotierten mRNAs mit Kopf an Kopf liegenden, langen nicht-kodierenden, antisense RNAs assoziiert sind<sup>209,211</sup>. Sense und antisense Transkript von PIK3IP1 werden anscheinend koreguliert. Die PIK3IP1-AS1-

Varianten könnte die Expression des bidirektionalen, Protein-kodierenden Gens aktivieren, indem durch ihre Transkription lokal der Zustand des Chromatins beeinflusst wird. Zudem ist auch in diesem Szenario denkbar, dass die langen nicht-kodierenden RNAs Histonremodellierende Komplexe rekrutieren, somit die Zugänglichkeit der DNA erhöhen und die Expression von PIK3IP1 steigern.

Im Bereich von TREAT3 konnte ebenfalls ein Antisense-Transkript, das von dem bidirektionalen Promotor eines Protein-kodierenden Gens, in diesem Fall SATB1 (*SATB homeobox 1*), transkribiert wird, nachgewiesen werden (Abb. 4.1C). SATB1 moduliert die Struktur des Chromatins und reguliert die Genexpression. Für viele biologische Prozesse ist SATB1 essentiell wie die T-Zellaktivierung<sup>212,213</sup>, wo es die räumlich und zeitlich geordnete Genexpression sicherstellt, die Differenzierung von T-Zellen<sup>213,214</sup> und der Epidermis<sup>215</sup>, sowie die Progression verschiedener Krebsarten<sup>216</sup>. Das bei der Hochdurchsatz-Sequenzierung der T-Zellproben im Bereich von TREAT3 am häufigsten sequenzierte Transkript entspricht dem seit kurzen annotierten SATB1-AS1 (SATB1 antisense RNA 1) (Abb. 4.1C). Zudem konnte eine weitere SATB1-AS1-Isoform mit einem zusätzlichen Exon detektiert werden, die mit zwei publizierten ESTs übereinstimmt. Des Weiteren konnten gespleißte Transkripte nachgewiesen werden, die zeigen, dass in 3'-Richtung verlängerte SATB1-AS1-Varianten existieren. Sense und antisense Transkript werden vom SATB1-Promotor weitestgehend synchron exprimiert, lediglich 72 Stunden nach Aktivierung der naiven T-Zellen nimmt die Expression der SATB1-mRNA wieder zu, SATB1-AS1 wird hingegen weiter reprimiert und kaum noch transkribiert. Aufgrund der Funktionen, die SATB1 bei der Entwicklung<sup>212</sup>, Aktivierung<sup>212,213</sup> und Differenzierung<sup>213,214</sup> von T-Zellen besitzt, ist es im Besonderen naheliegend die Rolle von SATB1-AS1 in dem verwendeten Zellsystem zu erforschen. Vielleicht unterstützt SATB1-AS1 den Chromatinorganisator SATB1 bei der Faltung des Chromatins in Schleifen oder der Regulation der Genexpression<sup>213</sup>, da es wahrscheinlich ist, dass beide Transkripte eines bidirektionalen Promotors an den gleichen Prozessen beteiligt sind<sup>209</sup>. Denkbar wäre beispielsweise auch, dass SATB1-AS1 die post-transkriptionelle Modifikation von SATB1 beeinflusst. Weiterführende Experimente empfehlen sich demnach, um diese Hypothesen zu überprüfen.

### **Zusammenfassung**

Die anhand der Tiling Array-Daten detektierte, differentielle Expression ausgewählter Transkripte während der T-Zellaktivierung konnte mittels quantitativer *real-time* PCR validiert werden. Dabei wurden Gene analysiert, deren Induktion nach der Aktivierung von naiven T-Helferzellen bereits nachgewiesen wurde (TNF, miRNA155), ebenso wie nicht-kodierende RNAs, die bisher noch nicht im Zusammenhang mit T-Zellen beschrieben wurden (LINC00515, SNHG16, STAIR15/MIAT, STAIR18/LINC00152/LOC541471) und die neu



identifizierten TREATs. Die Regulation von Genen in dem verwendeten Zellsystem, der *in vitro* Aktivierung humaner T-Helferzellen, erwies sich dabei als reproduzierbar und die genomweite Analyse des Transkriptoms mittels Tiling Arrays erneut als ein geeignetes Verfahren, um unbekannte, differentiell exprimierte Gene zu detektieren. Das STAIR15 und STAIR18, zwei zuvor als IL-6/STAT3-regulierte macroRNAs detektierte Transkripte, auch als differentiell exprimierte RNAs bei der Aktivierung von T-Zellen nachgewiesen werden konnten, bekräftigt zudem, dass es sich bei den identifizierten Transkripten um funktionelle RNAs handelt, die für allgemeine biologische Prozesse relevant sind. Durch die Kombination mit der Hochdurchsatz-Sequenzierung konnte für die T-Zellen zusätzlich festgestellt werden von welchem Strang die Transkription in einem bestimmten Bereich erfolgt und welche gespleißten Transkripte existieren, somit wurde eine neue Qualität der Transkriptom-analyse ermöglicht, die ein viel detailliertes Bild der exprimierten Transkripte generiert.

Die identifizierten, regulierten Transkripte steuern womöglich nicht nur die Aktivierung, sondern könnten auch die Differenzierung der T-Zellen beeinflussen. Nach Aktivierung der T-Helferzellen entwickelten sich die naiven Zellen unter den gewählten Bedingungen zu Th1-Effektorzellen. Demnach ist es wahrscheinlich, dass von den detektierten, differentiell exprimierten RNAs auch einige nicht-kodierende Transkripte zur Etablierung des Th1-Phänotyps beitragen. Es wurde bereits gezeigt, dass verschiedenen T-Helferzell-Subtypen unterschiedliche lincRNA exprimieren und dass anscheinend ein Großteil dieser Subtyp-spezifischen lincRNAs durch Schlüsseltranskriptionsfaktoren der T-Zelldifferenzierung reguliert wird<sup>154</sup>. Für einige Beispiele, wie TMEVPG1<sup>217</sup> und lincR-Ccr2-5'<sup>154</sup>, wurde bereits belegt, dass sie die Funktion der jeweiligen Effektor-T-Zellen beeinflussen. Nicht-kodierende RNAs, die die Differenzierung zu einem bestimmten T-Helferzell-Subtyp diktieren, wurden bis jetzt noch nicht beschrieben. Allerdings wurden beispielweise gezeigt, dass lincRNAs die Differenzierung von embryonalen Stammzellen beeinflussen<sup>218</sup>, sodass zu vermuten ist, dass auch die T-Zelldifferenzierung von langen nicht-kodierenden RNAs moduliert werden kann. Das verwendete System der *in vitro* Aktivierung primärer T-Helferzellen bietet zusätzlich die Möglichkeit funktionelle Untersuchungen langer nicht-kodierender RNAs durchzuführen. Demnach könnten auch bei der Aktivierung der Zellen gezielt Transkripte ausgeschaltet werden und die Auswirkung auf die Differenzierung der T-Zellen analysiert werden. Der Vorteil besteht nicht nur darin, dass es sich um humane Zellen handelt und so Speziesunterschiede keine Rolle spielen, sondern auch dass die primären T-Zellen keine transformierten Turmozellen sind. Da es sich bei humanen T-Zelllinien bekanntermaßen um entartete Zellen handelt, die sich bereits in einer Art aktiviertem Zustand befinden und die tatsächlichen Ereignisse des *in vivo* Prozesses nur bedingt widerspiegeln, sind diese Zelllinien auch nur bedingt für die Untersuchung der T-Zellaktivierung geeignet. Die *in vitro* Aktivierung primärer, humaner T-Zellen ist demnach das optimale Modell, um die Funktion langer nicht-kodierender RNAs bei der Aktivierung und Differenzierung naiver T-Helferzellen zu untersuchen. Die dynamischen Veränderungen

des Transkriptoms im Verlauf dieser Prozesse wurden im Rahmen dieser Arbeit bereits wie beschrieben analysiert. Ausgehend von diesen Ergebnissen können nun im Anschluss ausgewählte Transkripte in diesem System manipuliert werden, um deren Bedeutung bei der T-Zellaktivierung und -differenzierung aufzuklären und zu eruieren mit welchen Molekülen sie interagieren.

### **4.3 Untersuchung von STAIR18/ncRNA152**

Bei der Suche nach Transkripten, die durch essentielle immunologische Signalwege reguliert werden, ist in dieser Arbeit eine macroRNA im Besonderen aufgefallen. STAIR18 wird nicht nur in Multiplen Myelom-Zellen direkt nach Stimulation mit Interleukin-6 induziert, sondern seine Transkription wird auch in T-Helferzellen bereits zwei Stunden nach deren Aktivierung deutlich gesteigert. Demzufolge wird diese macroRNA in zwei unterschiedlichen Zellen des Immunsystems durch zwei unterschiedliche Signalwege induziert und ist höchstwahrscheinlich von besonderer Bedeutung für die Regulation immunologischer Prozesse. Aus diesem Grund wurde STAIR18 ausgewählt und experimentell eingehender untersucht, um dessen molekulare Funktion aufzuklären. Dabei fiel als erstes auf, dass STAIR18 im humanen Genom dupliziert ist. Die beiden STAIR18-Bereiche sind einmal auf dem langen und einmal auf dem kurzen Arm von Chromosom 2 lokalisiert und zu über 99 Prozent identisch. Die Untersuchung verschiedener Genome nahe verwandter Hominidae deutet darauf hin, dass die Duplikation von STAIR18 erst spät in der Evolution bei der Entwicklung des Menschen durch nicht-homologe Rekombination entstanden ist.

Innerhalb beider STAIR18-Loci sind gespleißte, lange nicht-kodierende RNAs annotiert, LOC541471 und LINC00152. Demzufolge repräsentiert STAIR18 womöglich das Primärtranskript dieser lncRNAs. Die LOC541471-Variante 2 ist dabei zu 99 Prozent identisch zur LINC00152-Variante 3. Die Identität beider ncRNAs ist sehr hoch, daher wurde in dieser Arbeit auch von der ncRNA152 gesprochen, wenn nicht zwischen den beiden Varianten unterschieden wurde. Publierte, sequenzierte cDNAs deuten darauf hin, dass tatsächlich beide STAIR18-Bereiche transkribiert und prozessiert werden. Zudem konnte anhand der Hochdurchsatz-Sequenzierung der T-Zellproben sowie mittels Capture-Sequenzierung von INA-6-RNA durch Dr. Stefanie Binder nachgewiesen werden, dass sowohl LOC541471 als auch LINC00152 in diesen Zellen exprimiert werden<sup>219</sup>. Zusätzlich verdeutlichten die Ergebnisse der Sequenzierungen, dass beide ncRNAs in diversen Spleißvarianten in den Zellen vorkommen und zum Teil alternative Transkriptionsstartstellen benutzt werden. Darüber hinaus werden in den Bereichen von STAIR18 auch Antisense-Transkripte generiert, die sich zwischen den zwei Loci deutlicher unterscheiden als die Sense-RNAs.

### 4.3.1 Regulation von STAIR18 und der ncRNA152

Es konnte gezeigt werden, dass die Expression der macroRNA STAIR18 und die der gespleißte ncRNA152 in INA-6-Zellen sowie in einer weiteren Multiplen Myelom-Zelllinie, XG-1, durch Interleukin-6 verdoppelt wird. Dabei ist die Induktion der ncRNA152 im Vergleich zu der macroRNA zeitlich etwas verzögert. Dies deutet darauf hin, dass die Transkription von STAIR18 aufgrund seiner Länge knapp eine Stunde dauert, die macroRNA recht stabil ist und die Prozessierung der ncRNA152 erst nach vollständiger Transkription beginnt. In der Leberkarzinom-Zelllinie HepG2 wird STAIR18 ebenfalls nach Stimulation mit Interleukin-6 verdoppelt. Die ncRNA152 wird zwar auch in diesen Zellen ähnlich stark wie in den Multiplen Myelom-Zellen exprimiert aber sie wird nicht durch IL-6 induziert. Dies deutet darauf hin, dass STAIR18 als Primärtranskript für die ncRNA152 dient und vermutlich Zelltyp-spezifische Spleißfaktoren an der Prozessierung der lncRNA beteiligt sind.

Zudem konnte nachgewiesen werden, dass sowohl STAIR18 als auch die ncRNA152 in Effektor- und Gedächtnis-T-Zellen stärker exprimiert werden als in naiven T-Helferzellen und sehr stark bei der T-Zellaktivierung induziert werden. Dabei ist auch hier zu beobachten, dass der Anstieg der Expression der macroRNA sofort nach der Stimulation beginnt und die lncRNA erst ein bisschen später zunimmt, was vermuten lässt, dass die Prozessierung etwas verzögert stattfindet. Die gespleißte ncRNA152 scheint dann aber in den Zellen stabiler zu sein, da die Menge von STAIR18 72 Stunden nach Aktivierung wieder auf das Level der naiven T-Zellen zurückgeht, die Expression der lncRNA zwar auch sinkt aber deutlich über dem Wert der unstimulierten Zellen bleibt.

In dieser Arbeit wurde der STAIR18/ncRNA152-Promotor untersucht. Dabei wurde festgestellt, dass offensichtlich ein 155 Basenpaar-langer Bereich um den Transkriptionsstart für die Regulation der Transkription der ncRNA essentiell ist. Der STAIR18/ncRNA152-Kernpromotor beinhaltet ein Initiator-Element, das allerdings nicht wie üblich mit dem Transkriptionsstart der ncRNA152 überlappt, sondern abhängig vom STAIR18-Locus 20 oder 58 Basenpaare vor der annotierten Startstelle liegt. Zudem befinden sich innerhalb dieses Promotorbereiches putative Transkriptionsfaktorbindungsstellen für AP-1 und STAT3, die mit der Transkriptionsmaschinerie interagieren und die Transkriptionsrate von STAIR18 beeinflussen können. Mittels Reporterexperimenten konnte nachgewiesen werden, dass es sich um einen sehr starken Promotor handelt, wobei die Transkription vom STAIR18/ncRNA152-Promotor noch einmal verdoppelt werden konnte, wenn der Bereich, der vor das Reporter gen kloniert wurde, um ein paar hundert zusätzliche, stromabwärts-gelegene Basenpaare erweitert wurde. Die Promotoraktivität konnte in dem verwendeten Zellsystem nicht durch die Stimulation mit Interleukin-6 und die damit verbundene Aktivierung von STAT3 gesteigert werden. Auch der Einbau eines konservierten, potentiellen Enhancerelementes von STAIR18 in das Reporterplasmid, welches ebenfalls die

STAT3-Konsensussequenz enthält, konnte die Transkription selbst in Anwesenheit von Interleukin-6 nicht weiter erhöhen. Demnach konnte nicht geklärt werden, wie die Expression von STAIR18 durch die Stimulation der Zellen mit IL-6 aktiviert wird. Eventuell fehlen in den Reporterkonstrukten essentielle inhibitorische Elemente, die im normalen Kontext die Basisaktivität des Promotors reduzieren und deren Wirkung durch die Aktivierung des IL-6-Signalwegs aufgehoben wird. Denkbar ist auch, dass Zelltyp-spezifische Transkriptionsfaktoren mit STAT3 interagieren und somit die Transkriptionssteigerung ermöglichen. STAT3 könnte auch an Bindungsstellen, die weiter vom Transkriptionsstart entfernt sind und hier nicht untersucht wurden, binden und die Transkription von STAIR18 regulieren. Weitere Experimente, wenn möglich in einem anderen Zellsystem, sind nötig um herauszufinden über welche Elemente die STAIR18-Transkription reguliert wird. Die vermehrte Expression von STAIR18 nach der Stimulation naiver T-Helferzellen wird wahrscheinlich zumindest teilweise über die Aktivierung von AP-1 bewirkt, aber auch hierfür steht die experimentelle Verifizierung noch aus. Da sich primäre T-Zellen nur schwer mit Vektoren transfizieren lassen, sollte man versuchen Reporter-genexperimente in Jurkat-Zellen durchzuführen. Auch wenn diese Zellen sich ohne externe Stimulation bereits in einer Art aktivierten Zustand befinden, sollten Rückschlüsse über die Regulation von STAIR18 möglich sein.

### 4.3.2 Lokalisation von STAIR18 und der ncRNA152

Bereits im ersten Teil dieser Arbeit wurde gezeigt, dass die STAIR18 macroRNA, wie für ein so langes Transkript vermutet, im Zellkern lokalisiert ist. Die gespleißte ncRNA152 ist in ihrer Länge und dem polyadenylierten 3'-Ende<sup>28</sup> der Klasse der mRNAs sehr ähnlich und könnte demnach auch ins Zytoplasma transportiert werden, daher wurde das Vorkommen dieser lncRNA in zytoplasmatischen und nukleären RNA-Präparationen von INA-6-Zellen analysiert. Dabei stellte sich heraus, dass die ncRNA152 nach ihrer Prozessierung tatsächlich ins Zytoplasma transloziert. Mittels RNA Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung konnte die ncRNA152 in verschiedenen Zellen angefärbt werden. Dabei wurde beobachtet, dass sich die lncRNA im Zytoplasma anscheinend in Aggregaten befindet, die hauptsächlich perinukleär lokalisiert sind. Je nach Zelltyp wurden ein bis fünf oder sieben dieser ncRNA152-Aggregate in einer Zelle detektiert. Ob es sich dabei um ein bestimmtes Zellkompartiment handelt, sollte in weiteren Experimenten analysiert werden. Es wurde bereits beschrieben, dass sich ein relevanter Anteil langer nicht-kodierender RNAs im Zytoplasma befindet, was indiziert, dass sie in zelluläre Prozesse wie beispielsweise die Regulation der Protein-Lokalisation, Translation und mRNA-Stabilität involviert sind<sup>177</sup>. Für einige zytoplasmatische ncRNAs wurde deren Funktion bereits untersucht. So ist die lange nicht-kodierende RNA NRON anscheinend Bestandteil eines großen, zytoplasmatischen RNA-Protein-Scaffold-Komplexes, indem neben anderen Proteinen phosphoryliertes NFAT

und NFAT-Kinasen lokalisiert sind<sup>162</sup>. Möglicherweise dient die NRON-RNA dabei als Gerüst und reguliert die Stabilität des Komplexes. Eine Erhöhung der intrazellulären Calcium-Konzentration induziert die Dephosphorylierung von NFAT durch Calcineurin, infolgedessen löst sich NFAT aus dem RNA-Protein-*Scaffold*-Komplex und transloziert in den Zellkern, wodurch die Transkription von NFAT-Zielgenen induziert wird<sup>162</sup>. Das Ausschalten von NRON bewirkt nach Erhöhung der intrazellulären Calcium-Konzentration eine beschleunigte und verstärkte Dephosphorylierung und nukleäre Akkumulation von NFAT, möglicherweise dadurch, dass es ohne den RNA-Protein-*Scaffold*-Komplex von rephosphorylierenden Kinasen abgeschirmt ist<sup>162</sup>. Weitere lange nicht-kodierende RNAs, die eine Funktion im Zytoplasma ausüben sind antisense RNAs mit repetitiven SINEB2-Elementen, die einen 5'-Teil der sense mRNA überlappen<sup>220</sup>. Diese langen nicht-kodierenden RNAs fördern die CAP-Komplex unabhängige Initiation der Translation der sense mRNA und steigern somit die Expression des entsprechenden Proteins. Eine andere Gruppe zytoplasmatischer lncRNAs kann die Stabilität von mRNAs regulieren. Ein Teil dieser lang nicht-kodierende RNAs bilden über imperfekte Basenpaarungen ihres Alu-Elementes mit der 3'-UTR einiger mRNAs einen Duplex, an den Staufen1 rekrutiert wird und die Degradation der mRNA vermittelt<sup>221</sup>. Andere lncRNAs wirken als *competing endogenous RNAs* (ceRNAs). Sie besitzen microRNA *response* Elemente und konkurrieren mit mRNAs oder auch anderen ncRNAs um die Bindung von gemeinsamen microRNAs, wodurch die anderen Transkripte vor der Inhibierung durch diese microRNA geschützt werden<sup>23</sup>. Die LINC00152 wurde bereits auf das Vorhandensein von potentiellen microRNA *response* Elementen von Magenkrebs-assoziierten microRNAs untersucht<sup>205</sup>. Dabei wurden in der ncRNA putative Bindungsstellen für miR-18a, miR-18b, miR-31, miR-139, miR-195 und miR-497 detektiert<sup>205</sup>. Zudem wurde über eine Regressionsanalyse diverser Genexpressionsdaten verschiedener Krebsarten ermittelt, dass LINC00152 wahrscheinlich mit Thrombospondin 1 über miR-18a interagiert<sup>205</sup>. Experimentell wurde jedoch noch nicht bestätigt, dass LINC00152 wirklich als ceRNA fungiert und microRNAs von anderen Transkripten fernhält, dies sollte aber als eine mögliche Funktion der ncRNA152 auch in den in dieser Arbeit verwendeten Zellsystemen in Betracht gezogen und untersucht werden.

### 4.3.3 Manipulation der ncRNA152-Expression

Um Hinweise auf die Funktion der ncRNA152 zu erhalten, sollte die lncRNA im Rahmen dieser Arbeit ausgeschaltet und überexprimiert werden. Zu diesem Zweck wurden siRNAs gegen die ncRNA152 designt beziehungsweise eukaryotische Expressionsvektoren hergestellt, die dann jeweils in XG-1-Zellen transfiziert wurden. Sowohl Überexpression als auch Knockdown wurden erfolgreich durchgeführt und die entsprechende Veränderung der ncRNA152-Expression validiert. Dabei konnte in beiden Fällen keine Auswirkung der modifizierten ncRNA152-Expression auf die Viabilität der XG-1-Zellen festgestellt werden.

Bei den Überexpressionsexperimenten der ncRNA152 wurde konstatiert, dass ein Teil der überexprimierten 560 bp Isoform in den Zellen innerhalb des ersten Exons zusätzlich gespleißt und somit zur 450 bp Variante prozessiert wird. Zudem stellte sich heraus, dass die Expression der transfizierten ncRNA152 bereits nach 48 Stunden deutlich gesunken ist und die eingeschleuste Plasmid-DNA offensichtlich sehr schnell abgebaut wird. Somit sind auch folgende funktionelle Tests aufgrund der kurzen Halbwertszeit der Expressionsvektoren sehr limitiert. In diesem Zellsystem könnte man am ehesten versuchen die Veränderungen des Transkriptoms der transfizierten Zellen zu untersuchen und auf diese Weise eventuell Rückschlüsse über die Funktion der ncRNA152 ziehen. Unter der Annahme, dass ncRNA152 wirklich als ceRNA fungiert, sollte man auf Transkripte achten, die durch die Überexpression heraufreguliert werden und analysieren ob gemeinsame *microRNA response* Elemente existieren. Weiter ist zu überlegen die Überexpression in einem anderen, besser transfizierbaren Zellsystem durchzuführen oder zu versuchen die ncRNA152 stabil zu transfizieren, um weitere funktionelle Untersuchungen durchführen zu können.

Bei der Transfektion von XG-1-Zellen mit siRNAs gegen die ncRNA152 wurde festgestellt, dass die siRNA gegen das erste Exon der lncRNA sein Ziel deutlich effektiver ausschaltet als eine siRNA gegen das zweite Exon. Überraschend war die Beobachtung, dass der Knockdown der ncRNA152 auch die Expression der STAT3-mRNA reduziert. Paradoxerweise ist der Effekt auf die STAT3-mRNA mit den siRNAs gegen das zweite ncRNA152-Exon stärker als mit dem Oligonukleotid, das gegen das erste Exon gerichtet ist. Dies erscheint auf den ersten Blick nicht sehr plausibel, aber ein *Off-target*-Effekt ist unwahrscheinlich, da in dieser Arbeit gezeigt wurde, dass zwei verschiedene siRNAs gegen das zweite Exon die gleiche Wirkung haben. Dies wird zusätzlich durch die Ergebnisse unserer Arbeitsgruppe von Dr. Stefanie Binder bestätigt, die die gleiche Beobachtung in INA-6-Zellen mit insgesamt zwei siRNAs gegen das erste ncRNA152-Exon und dreien gegen das zweite Exon machen konnte<sup>219</sup>. Die unterschiedlichen Effekte des Ausschaltens des ersten und zweiten Exons zeigten sich auch bei der Analyse der differentiellen Expression in XG-1-Zellen mittels Mikroarrays. Dabei wurden neben der ncRNA152 selber keine Transkripte detektiert, die in beiden Knockdown-Ansätzen auf dieselbe Art und Weise flagrant reguliert wurden. Lediglich die mRNA von SEC32A (*Sec23 homolog A*), das wahrscheinlich eine Rolle beim Transport von Proteinen zwischen endoplasmatischem Retikulum und Golgi-Apparat eine Rolle spielt, wurde in beiden Fällen moderat modifiziert. Die Mikroarray-Daten offenbarten ebenfalls, dass durch beide Knockdowns der ncRNA152 fast ausschließlich Gene herunterreguliert werden. Dies ist konform mit einer möglichen Funktion der lncRNA als ceRNA. Somit sollten im nächsten Schritt übereinstimmende *microRNA response* Elemente in den reprimierten Transkripten und der ncRNA152 untersucht werden.

#### 4.3.4 Bedeutung der ncRNA152

Die LINC00152 gehört zu den polyadenylierten lncRNAs, die über verschiedene Gewebe eine sehr hohe Gesamtexpression aufweisen<sup>28</sup>, daher ist sie nicht nur in unserer Arbeitsgruppe aufgefallen. In den letzten zwei Jahren ist sie in einigen Studien in Erscheinung getreten. Sie scheint allgemein durch zellulären Stress reguliert zu werden<sup>222,223</sup> und wird in vielen Krebstypen (Gallenblasenkarzinom, Lymphknotenkrebs, Retinoblastom, Muskelkrebs, Bronchialkarzinom, Hirntumor und Magenkrebs) verstärkt exprimiert<sup>28,203–205</sup>. Es wurde auch beschrieben, dass der LINC00152-Lokus in Leberzellkarzinomen hypomethyliert ist<sup>202</sup>. Weiter zeigte sich, dass die Expression der LINC00152 mit der Invasivität bei Magenkrebs korreliert und die lncRNA anscheinend ein geeigneter Biomarker für diese Krebserkrankung ist, da die erhöhte Expression auch im Magensaft der Patienten detektiert und dementsprechend ohne Biopsie analysiert werden kann<sup>204</sup>. Über die molekulare Funktion der ncRNA152 ist bislang aber noch nichts veröffentlicht worden, außer der Vermutung, dass sie aufgrund putativer microRNA *response* Elemente als ceRNA fungieren könnte, was durch die Ergebnisse dieser Arbeit weiter bekräftigt wird. Auf die verschiedenen ncRNA152-Isoformen wurde bislang in keiner Publikation eingegangen. Wie anhand unserer genomweiten Sequenzierungen ersichtlich, gibt es diverse Isoformen der ncRNA152. Die Existenz verschiedener ncRNA152-Spleißvarianten und alternativer Transkriptionsstartstellen konnte in unserer Arbeitsgruppe von Dr. Stefanie Binder auch zusätzlich mittels *real-time* PCR und RNA *capture sequencing* bestätigt werden<sup>219</sup>. Weiter hat sie nicht nur die Reduktion von STAT3 auf mRNA- sondern zusätzlich auf Protein-Ebene nach Transfektion von ncRNA152-Exon2-siRNAs nachweisen können. Dr. Stefanie Binder konnte zudem mittels *chromatin isolation by RNA purification* (ChIRP) eine direkte Interaktion zwischen der ncRNA152 und dem Primärtranskript der STAT3-mRNA verifizieren<sup>219</sup>. Demnach wurde erstmals die positive Rückkopplung zwischen der ncRNA152 und STAT3 beschrieben, wobei die lncRNA direkt an ihr Zielgen bindet und somit zumindest nicht ausschließlich als ceRNA wirkt. In ihren Experimenten zeigte sich zudem, dass siRNAs gegen das erste Exon von ncRNA152 im Gegensatz zu XG-1-Zellen die Viabilität von INA-6-Zellen einschränken. Demzufolge haben verschiedene Transkriptvarianten der ncRNA152 wahrscheinlich unterschiedliche Funktionen und können von Zelltyp zu Zelltyp variieren, wodurch die Komplexität deutlich erhöht wird. Eine ncRNA152-Isoform, die das erste Exon enthält, scheint demnach die Zellviabilität zumindest in INA-6-Zellen zu beeinflussen und eine andere Transkriptvariante mit dem zweiten annotierten Exon, über einen Rückkopplungsmechanismus die Stabilität oder die Prozessierung des STAT3-Primärtranskriptes zu steigern. Weiter deuten die aktuellsten Ergebnisse unserer Arbeitsgruppe, erhoben von Ivonne Zipfel, darauf hin, dass STAIR18 in 3'-Richtung noch deutlich länger transkribiert wird und offenbar auch als Primärtranskript für die miRNA-4435 dient. Die Ergebnisse dieser Arbeit legten den Grundstein für alle weiteren Untersuchungen zu STAIR18 und der ncRNA152 in unserer Arbeitsgruppe. Es bleibt die nicht ganz leichte

Aufgabe auseinanderzuidividieren, welche Aufgaben die STAIR18 macroRNA, die verschiedenen Isoformen der ncRNA152 und die microRNA-4435 erfüllen, um zu verstehen wie diese nicht-kodierende RNA zur Entstehung und Progression verschiedener Krebserkrankungen beiträgt mit dem Ziel sie in Zukunft als neuen diagnostischen und therapeutischen Marker einsetzen zu können.



## 5 Zusammenfassung

Zellen des Immunsystems müssen oft einen dramatischen Wechsel in ihrem Transkriptionsprogramm durchführen, um schnell wichtige Gene für die Immunabwehr zu exprimieren und den Körper zu schützen. Während der Aktivierung und Differenzierung von Immunzellen werden tausende von Genen induziert und reprimiert, daher ist ein komplexes Netzwerk koordinierter transkriptioneller und post-transkriptioneller Ereignisse erforderlich. Die Hinweise mehrten sich, dass dabei regulatorische, nicht-kodierende RNAs essentielle Aufgaben übernehmen. So werden ncRNAs als Reaktion auf externe Signale in einer Zell- und Gewebespezifischen Weise reguliert und häufig in ganz bestimmten Entwicklungs- und Differenzierungsphasen exprimiert. Viele der bis jetzt noch nicht komplett verstandenen zellulären Prozesse könnten maßgeblich durch nicht-kodierende RNAs reguliert werden. Für viele microRNAs wurde bereits gezeigt, dass sie die Zellidentität und Differenzierung beeinflussen und lange nicht-kodierende RNAs, scheinen ein noch größeres Regulationspotential zu besitzen. Die Aufklärung des komplexen Zusammenspiels zwischen ncRNAs und anderen Molekülen könnte dazu beitragen die Regulation der Immunantwort besser zu verstehen.

Im Rahmen dieser Arbeit sollten immunologisch relevante nicht-kodierende RNAs identifiziert und charakterisiert werden, die perspektivisch als potentielle, neue diagnostische und therapeutische Biomarker für maligne und immunvermittelte Erkrankungen eingesetzt werden können. Zu diesem Zweck wurden die Veränderungen des Transkriptom in zwei verschiedenen Zelltypen und bei zwei unterschiedlichen, immunologischen Prozessen analysiert. Zum einen wurde die differentielle Expression in Abhängigkeit von der Stimulation mit Interleukin-6 in einer malignen Multiplen Myelom-Zelllinie untersucht. Mit Hilfe von Tiling Arrays wurde das gesamte Genom der Zellen zu verschiedenen Zeitpunkten analysiert. Dabei wurden einige sehr lange, IL-6-regulierte macroRNAs identifiziert, die die Bezeichnung STAIRs (STAT3-induced RNAs) erhielten. Die STAIRs ähneln bekannten macroRNAs, die in Imprinting-Prozesse involviert sind, oder auch den vlincRNAs, die als funktionelle, relativ abundante, Zelltyp-spezifische Transkripte von bis zu mehreren hundert Kilobasen Länge beschrieben wurden. Insgesamt sind die STAIRs kaum konserviert. Sie weisen lediglich Stellen relativer Sequenzkonservierung auf, dabei werden sie von allgemeinen Polymerase-II-Promotoren transkribiert, die ähnlich stark wie die Protein-kodierender Gene konserviert sind. Einige STAIRs dienen eventuell zusätzlich oder ausschließlich als Primärtranskript für gespleißte lncRNAs, die weitere Funktionen in

der Zelle ausüben können. Mit Ausnahme eines STAIRs konnte kein evidenten Proteinkodierendes Potential innerhalb der transkribierten Bereiche festgestellt werden, somit handelt es sich sehr wahrscheinlich um funktionelle, kontinuierliche, nicht-kodierende macroRNAs. Die STAIRs weisen ein großes Spektrum an Gewebsspezifität auf, von Multiplen Myelom-spezifischen Transkripten bis zu einer ubiquitär exprimierten macroRNA ist alles vertreten. Es konnte zudem gezeigt werden, dass die STAIRs im Zellkern angereichert sind, was anhand ihrer enormen Länge anzunehmen war. Die Ergebnisse dieser Arbeit deuten darauf hin, dass sich vier der STAIRs als potentielle Biomarker für das Multiple Myelom eignen. Zudem ergab die Literaturrecherche, dass die Expression der meisten STAIRs auch mit weiteren Krebserkrankungen zu korrelieren scheint, was indiziert, dass sie eine Rolle bei der Onkogenese spielen.

Der zweite immunologisch relevante Prozess bei dem die Regulation von langen nicht-kodierenden RNAs untersucht wurde ist die Aktivierung von naiven T-Zellen. Dafür wurden primäre, humane T-Helferzellen *in vitro* aktiviert und das Transkriptom zu verschiedenen Zeitpunkten mit Hilfe von Tiling Arrays und Hochdurchsatz-Sequenzierungen analysiert. Es wurde beobachtet, dass die T-Zellen einen monumentalen Wechsel ihres Transkriptionsprogrammes absolvieren, dabei sind ein Viertel der regulierten, annotierten Transkripte nicht-kodierende RNAs. In Effektorzellen sind im Vergleich zu naiven T-Zellen hauptsächlich Gene herunterreguliert und der Anteil differentiell exprimierter ncRNAs ist deutlich geringer. Dementsprechend scheinen zur Koordination der transkriptionellen und posttranskriptionellen Ereignisse, die mit der Aktivierung der T-Zellen einhergehen, viele regulatorische, nicht-kodierende RNAs moduliert zu werden, die die veränderte Genexpression epigenetisch festschreiben und danach für den etablierten Effektorphänotyp nicht mehr nötig sind. Auch während der T-Zellaktivierung wurden unbekannte, differentiell exprimierte Bereiche identifiziert und TREATs (*transkripts regulated by activation in T cells*) genannt. Neben der Modulation von Genen, deren Induktion nach T-Zellaktivierung bereits bekannt war, wurde auch die Regulation von nicht-kodierenden RNAs, die bisher noch nicht im Zusammenhang mit T-Zellen beschrieben wurden, sowie die der neu identifizierten TREATs validiert. Die Daten der parallel durchgeführten Hochdurchsatz-Sequenzierung wurden herangezogen, um zusätzlich Informationen über die Orientierung der TREATs und potentielle Spleißereignisse zu erhalten. Hierbei zeigten sich komplexe Strukturen ineinander verschachtelter und überlappender, sense und antisense Transkripte, die zudem noch in diversen Spleißvarianten in den Zellen vorkommen. Es wurden bidirektionale Promotoren beobachtet, die die Transkription ihrer sense und antisense Transkripte teilweise unterschiedlich regulieren, sowie überlappende Transkripte, die ihre Expression womöglich gegenseitig beeinflussen. Interessant war auch die Feststellung, dass zwei der zuvor als IL-6-regulierte Transkripte identifizierten STAIRs ebenfalls bei der T-Zellaktivierung moduliert werden. Dies bekräftigt zudem die Annahme,

dass die identifizierten macroRNAs funktionell sind und eine Rolle bei allgemeinen biologischen Prozessen spielen.

STAIR18 wurde daraufhin in dieser Arbeit genauer analysiert, da es durch die beiden untersuchten, immunologisch relevanten Signalwege sehr schnell induziert wurde. Es wurde festgestellt, dass STAIR18 während der Entwicklung des Menschen durch nicht-homologe Rekombination dupliziert wurde. Beide Loci sind fast identisch, da die Duplikation vor nicht allzu langer Zeit stattgefunden hat, und generieren gespleißte, lange nicht-kodierende RNAs, die sich kaum unterscheiden. STAIR18 fungiert demnach zusätzlich oder ausschließlich als Primärtranskript für eine lange nicht-kodierende RNA. Die ncRNA152 kommt dabei in diversen Spleißvarianten vor und nutzt teilweise unterschiedliche Transkriptionsstartstellen. Wie STAIR18 so wird auch die ncRNA152 nach Stimulation mit Interleukin-6 induziert und während der T-Zellaktivierung reguliert. Die Expression der gespleißten ncRNA nimmt im Vergleich zur macroRNA erst etwas später zu, was vermuten lässt, dass die Prozessierung ein bisschen verzögert stattfindet. Die Transkription wird von einem sehr starken, konservierten Promotor reguliert, der ein etwas stromabwärts gelegenes Initiator-Element sowie Konsensussequenzen für AP-1 und STAT3 aufweist. Im Gegensatz zur nukleären macroRNA ist die ncRNA152 hauptsächlich im Zytoplasma lokalisiert. Mittels RNA *in situ* Hybridisierung konnte beobachtet werden, dass sich die lncRNA dort anscheinend in perinukleären Aggregaten befindet. Welche Funktion die ncRNA152 inne hat, konnte nicht abschließend geklärt werden. Es konnte gezeigt werden, dass von den STAIR18-Loci sowohl die macroRNA als auch diverse gespleißte Transkripte generiert werden. Die verschiedenen ncRNA152-Isoformen scheinen zudem unterschiedliche Funktionen auszuführen. Einerseits ist eine Wirkung als *competing endogenous* RNA wahrscheinlich, da die Sequenz der ncRNA152 putative microRNA *response* Elemente aufweist. Zudem offenbarten Mikroarray-Experimente, dass durch das Ausschalten dieser lncRNA veränderte Gene hauptsächlich reprimiert werden. Dies könnte dadurch hervorgerufen werden, dass microRNAs, die sonst an die ncRNA152 binden würden nach deren Knockdown andere Transkripte inhibieren. Eine weitere Aufgabe der ncRNA152 scheint darin zu bestehen das STAT3-Primärtranskript zu stabilisieren oder dessen Prozessierung zu fördern, somit liefert diese Arbeit die ersten Hinweise auf einen positiven Rückkopplungsmechanismus zwischen der nicht-kodierenden RNA und STAT3. Diese Arbeit bildet die Grundlage für weitere funktionelle Untersuchungen von STAIR18 und der ncRNA152. Es bleibt zu klären welche Aufgaben die macroRNA und die verschiedenen von ihr abgeleiteten Transkripte in den Zellen erfüllen und wie diese nicht-kodierenden RNAs zur Entstehung und Progression von Krebserkrankungen beitragen.

## 6 Summary

Cells of the immune system often have to undergo dramatic changes in their transcriptional program in order to express important genes for the immune response rapidly and to protect our body. During the activation and differentiation of immune cells thousands of genes are induced and repressed. Therefore a complex network coordinating transcriptional and post-transcriptional events is required. There is increasing evidence that during these processes regulatory non-coding RNAs take over essential functions. Such ncRNAs are modulated in response to external stimuli in a cell- and tissue-specific manner and are often expressed at specific stages of development and differentiation. Many of those still not fully characterized cellular processes may significantly be regulated by non-coding RNAs. For plenty of microRNAs it has been proven that they influence cell identity and differentiation, and long non-coding RNAs seem to possess an even greater regulatory potential. Elucidating the interaction between ncRNAs and other molecules may contribute to understand the immune response regulation better.

Within the scope of this work relevant immunological non-coding RNAs should be identified and characterized which could be used as potential new diagnostic and therapeutic biomarkers for malignant and immune-mediated diseases in the future. For this purpose transcriptome alterations in two different cell types and during two distinct immunological processes were analyzed. On the one hand differential expression in dependence on interleukin-6 was investigated within a malignant multiple myeloma cell line. Using tiling arrays the whole genome of these cells was analyzed at different time points. Thereby some very long IL-6-regulated macroRNAs were identified which obtained the denomination STAIRs (STAT3-induced RNAs). These STAIRs resemble known macroRNAs which are involved in imprinting processes or also vlincRNAs which were described as functional, quite abundant, cell type-specific transcripts of up to several hundred kilo bases length. Overall the STAIRs are hardly conserved. They exhibit only spots of relative sequence conservation, although they are transcribed from common RNA polymerase II promoters, whose conservation is as strong as those of protein coding genes. Some STAIRs serve possibly in addition or exclusively as primary transcript for spliced lncRNAs which might fulfill further functions within the cell. With the exception of one STAIR no protein coding potential within the transcribed regions was realized, thus they supposedly represent functional, continuous, non-coding macroRNAs. The STAIRs show a large spectrum of tissue specificity, reaching from multiple myeloma-specific transcripts to more

or less ubiquitously expressed macroRNAs. Furthermore, it could be demonstrated that STAIRs are enriched in the nucleus which was expected due to their enormous length. The results of this work suggest that four of the STAIRs are suited as potential biomarkers for multiple myeloma. In addition, literature search revealed that the expression of most STAIRs seems also to correlate with further cancer diseases, indicating that they play a role in oncogenesis.

The second immunologically relevant process where the regulation of long non-coding RNAs was investigated is the activation of naive T cells. Primary human T helper cells were activated *in vitro* and the transcriptome was analyzed at different time points using tiling arrays and high-throughput sequencing. It was observed that T cells undergo a monumental change in their transcription programs upon activation. Within this process, one quarter of the regulated annotated transcripts are non-coding RNA. In effector cells, genes were mostly down regulated in comparison to naive T cells and the fraction of differential expressed ncRNAs is obviously smaller. Accordingly, it appears that for the coordination of transcriptional and post-transcriptional events accompanying the activation of T cells many long non-coding RNAs are modulated which define the altered gene expression epigenetically and are subsequently not required for the established effector phenotype. Also during T cell activation, novel differentially expressed regions were identified and termed TREATS (transcripts regulated by activation in T cells). Besides the modulation of genes, whose induction after T cell activation was already known, also the regulation of non-coding RNAs which so far had not been described in the context of T cells as well as the newly identified TREATs were validated. Data of the additionally executed high-throughput sequencing were consulted in order to retrieve information about the orientation of the TREATs and potential splicing events. The results revealed a complex architecture of interlacing and overlapping sense and antisense transcripts which moreover exist in diverse splice variants within the cells. Bidirectional promoters were observed which partially regulate the transcription of their sense and antisense transcripts differently as well as overlapping transcripts which possibly influence each other's expression. Another interesting discovery was that two of the STAIRs, previously identified as IL-6-regulated transcripts, are modulated during T cell activation as well. In addition, this confirms the assumption that the identified macroRNAs are functional and play a role in common biological processes.

Thereupon STAIR18 was analyzed within this work in greater detail, given that it was rapidly induced by both investigated immunological relevant pathways. It was found that STAIR18 was duplicated by non-homologous recombination during human development. Both loci are almost identical indicating that duplication took place rather recently, and they generate spliced, long non-coding RNAs which hardly vary. Thus STAIR18 serves in addition or exclusively as primary transcript for a long non-coding RNA. ncRNA152 appears in

diverse splice variants and partially uses different transcription start sites. Like STAIR18, ncRNA152 is also induced upon stimulation with interleukin-6 and regulated during T cell activation. The expression of the spliced ncRNA increases in comparison to the macroRNA slightly later, suggesting that processing occurs delayed. The transcription is regulated by a rather strong, conserved promoter which contains a small downstream initiator element and exhibits consensus sequences for AP-1 and STAT3. In contrast to the nuclear macroRNA, ncRNA152 is located primarily in the cytoplasm. By RNA *in-situ* hybridization it could be observed that the lncRNA seems to be arranged in perinuclear aggregates. Which function ncRNA152 possesses could not be resolved yet. It could be shown that a macroRNA as well as diverse spliced transcripts are generated from both STAIR18 loci. Furthermore, the various ncRNA152 isoforms seem to execute different functions. On the one hand an effect as competing endogenous RNA is probable, because the sequence of ncRNA152 exhibits putative microRNA response elements. Additionally, microarray experiments revealed that genes altered by the knockdown of this lncRNA are mostly repressed. This could be evoked by microRNAs which otherwise bind to ncRNA152 and after its knockdown inhibit other transcripts. One further function of ncRNA152 appears to consist in stabilizing the STAT3 primary transcript and supporting its processing. Therefore, the work provides the first evidence for a positive feedback mechanism between the non-coding RNA and STAT3. This work establishes a basis for further functional investigations of STAIR18 and ncRNA152. It remains to be resolved which function the macroRNA and the different derived transcripts fulfill within the cells and how these non-coding RNAs contribute to the development and progression of cancers.

# 7 Literaturverzeichnis

1. Kapranov, P., Cheng, J., Dike, S., Nix, D. a, *et al.* **RNA maps reveal new RNA classes and a possible function for pervasive transcription.** *Science (80- ).* 316, 1484–8 (2007).
2. Djebali, S., Davis, C. A., Merkel, A., Dobin, A., *et al.* **Landscape of transcription in human cells.** *Nature* 489, 101–8 (2012).
3. Liu, G., Mattick, J. S. & Taft, R. J. **A meta-analysis of the genomic and transcriptomic composition of complex life.** *Cell cycle* 12, 2061–72 (2013).
4. Bernstein, B. E., Birney, E., Dunham, I., Green, E. D., *et al.* **An integrated encyclopedia of DNA elements in the human genome.** *Nature* 489, 57–74 (2012).
5. Mercer, T. R. & Mattick, J. S. **Structure and function of long noncoding RNAs in epigenetic regulation.** *Nat. Struct. Mol. Biol.* 20, 300–7 (2013).
6. Singh, D. K. & Prasanth, K. V. **Functional insights into the role of nuclear-retained long noncoding RNAs in gene expression control in mammalian cells.** *Chromosom. Res.* 21, 695–711 (2013).
7. Mattick, J. S. **Probing the phenomics of noncoding RNA.** *Elife* 2, e01968 (2013).
8. Cabili, M. N., Trapnell, C., Goff, L., Koziol, M., *et al.* **Integrative annotation of human large intergenic noncoding RNAs reveals global properties and specific subclasses.** *Genes Dev.* 25, 1915–27 (2011).
9. Guttman, M., Amit, I., Garber, M., French, C., *et al.* **Chromatin signature reveals over a thousand highly conserved large non-coding RNAs in mammals.** *Nature* 458, 223–7 (2009).
10. Derrien, T., Johnson, R., Bussotti, G., Tanzer, A., *et al.* **The GENCODE v7 catalog of human long noncoding RNAs: analysis of their gene structure, evolution, and expression.** *Genome Res.* 22, 1775–89 (2012).
11. Johnsson, P., Lipovich, L., Grandér, D. & Morris, K. V. **Evolutionary conservation of long non-coding RNAs; sequence, structure, function.** *Biochim. Biophys. Acta* 1840, 1063–71 (2014).
12. Pang, K. C., Frith, M. C. & Mattick, J. S. **Rapid evolution of noncoding RNAs: lack of conservation does not mean lack of function.** *Trends Genet.* 22, 1–5 (2006).
13. Mattick, J. S. **Non-coding RNAs: the architects of eukaryotic complexity.** *EMBO Rep.* 2, 986–91 (2001).
14. Thomas, C. a. **The genetic organization of chromosomes.** *Annu. Rev. Genet.* 5, 237–56 (1971).
15. Hahn, M. W. & Wray, G. a. **The g-value paradox.** *Evol. Dev.* 4, 73–5 (2002).
16. Taft, R. J., Pheasant, M. & Mattick, J. S. **The relationship between non-protein-coding DNA and eukaryotic complexity.** *BioEssays* 29, 288–99 (2007).
17. Lozada-Chávez, I., Stadler, P. F. & Prohaska, S. J. **“Hypothesis for the modern RNA world”: a pervasive non-coding RNA-based genetic regulation is a prerequisite for the emergence of multicellular complexity.** *Orig. life Evol. Biosph.* 41, 587–607 (2011).
18. Maruyama, R. & Suzuki, H. **Long noncoding RNA involvement in cancer.** *BMB Rep.* 45, 604–11 (2012).

19. Mercer, T. R., Dinger, M. E. & Mattick, J. S. **Long non-coding RNAs: insights into functions.** *Nat. Rev. Genet.* 10, 155–9 (2009).
20. Dinger, M. E., Gascoigne, D. K. & Mattick, J. S. **The evolution of RNAs with multiple functions.** *Biochimie* 93, 2013–8 (2011).
21. Pagani, M., Rossetti, G., Panzeri, I., de Candia, P., *et al.* **Role of microRNAs and long-non-coding RNAs in CD4(+) T-cell differentiation.** *Immunol. Rev.* 253, 82–96 (2013).
22. Khalil, A. M., Guttman, M., Huarte, M., Garber, M., *et al.* **Many human large intergenic noncoding RNAs associate with chromatin-modifying complexes and affect gene expression.** *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106, 11667–72 (2009).
23. Tay, Y., Rinn, J. & Pandolfi, P. P. **The multilayered complexity of ceRNA crosstalk and competition.** *Nature* 505, 344–52 (2014).
24. Sauvageau, M., Goff, L. A., Lodato, S., Bonev, B., *et al.* **Multiple knockout mouse models reveal lincRNAs are required for life and brain development.** *Elife* 2, e01749 (2013).
25. Nakagawa, S., Naganuma, T., Shioi, G. & Hirose, T. **Paraspeckles are subpopulation-specific nuclear bodies that are not essential in mice.** *J. Cell Biol.* 193, 31–9 (2011).
26. Ahituv, N., Zhu, Y., Visel, A., Holt, A., *et al.* **Deletion of ultraconserved elements yields viable mice.** *PLoS Biol.* 5, e234 (2007).
27. Sánchez, Y. & Huarte, M. **Long non-coding RNAs: challenges for diagnosis and therapies.** *Nucleic Acid Ther.* 23, 15–20 (2013).
28. Gibb, E. a, Vucic, E. a, Enfield, K. S. S., Stewart, G. L., *et al.* **Human cancer long non-coding RNA transcriptomes.** *PLoS One* 6, e25915 (2011).
29. Yap, K. L., Li, S., Muñoz-Cabello, A. M., Raguz, S., *et al.* **Molecular interplay of the noncoding RNA ANRIL and methylated histone H3 lysine 27 by polycomb CBX7 in transcriptional silencing of INK4a.** *Mol. Cell* 38, 662–74 (2010).
30. Zhang, E., Kong, R., Yin, D., You, L. & Sun, M. **Long noncoding RNA ANRIL indicates a poor prognosis of gastric cancer and promotes tumor growth by epigenetically silencing of miR-99a/miR-449a.** *Oncotarget* 5, (2014).
31. Pickard, M. R., Mourtada-Maarabouni, M. & Williams, G. T. **Long non-coding RNA GAS5 regulates apoptosis in prostate cancer cell lines.** *Biochim. Biophys. Acta* 1832, 1613–23 (2013).
32. Matouk, I. J., DeGroot, N., Mezan, S., Ayesh, S., *et al.* **The H19 non-coding RNA is essential for human tumor growth.** *PLoS One* 2, e845 (2007).
33. Yang, F., Bi, J., Xue, X., Zheng, L., *et al.* **Up-regulated long non-coding RNA H19 contributes to proliferation of gastric cancer cells.** *FEBS J.* 279, 3159–65 (2012).
34. Gupta, R. a, Shah, N., Wang, K. C., Kim, J., *et al.* **Long non-coding RNA HOTAIR reprograms chromatin state to promote cancer metastasis.** *Nature* 464, 1071–6 (2010).
35. Xu, Z.-Y., Yu, Q.-M., Du, Y.-A., Yang, L.-T., *et al.* **Knockdown of long non-coding RNA HOTAIR suppresses tumor invasion and reverses epithelial-mesenchymal transition in gastric cancer.** *Int. J. Biol. Sci.* 9, 587–97 (2013).
36. Yuan, J., Yang, F., Wang, F., Ma, J., *et al.* **A long noncoding RNA activated by TGF- $\beta$  promotes the invasion-metastasis cascade in hepatocellular carcinoma.** *Cancer Cell* 25, 666–81 (2014).
37. Guo, F., Li, Y., Liu, Y., Wang, J., *et al.* **Inhibition of metastasis-associated lung adenocarcinoma transcript 1 in CaSki human cervical cancer cells suppresses cell proliferation and invasion.** *Acta Biochim. Biophys. Sin. (Shanghai)*. 42, 224–9 (2010).



38. Tano, K., Mizuno, R., Okada, T., Rakwal, R., *et al.* **MALAT-1 enhances cell motility of lung adenocarcinoma cells by influencing the expression of motility-related genes.** *FEBS Lett.* 584, 4575–80 (2010).
39. Ying, L., Chen, Q., Wang, Y., Zhou, Z., *et al.* **Upregulated MALAT-1 contributes to bladder cancer cell migration by inducing epithelial-to-mesenchymal transition.** *Mol. Biosyst.* 8, 2289–94 (2012).
40. Ren, S., Liu, Y., Xu, W., Sun, Y., *et al.* **Long noncoding RNA MALAT-1 is a new potential therapeutic target for castration resistant prostate cancer.** *J. Urol.* 190, 2278–87 (2013).
41. Gutschner, T., Hämmerle, M., Eissmann, M., Hsu, J., *et al.* **The noncoding RNA MALAT1 is a critical regulator of the metastasis phenotype of lung cancer cells.** *Cancer Res.* 73, 1180–9 (2013).
42. Wang, P., Ren, Z. & Sun, P. **Overexpression of the long non-coding RNA MEG3 impairs in vitro glioma cell proliferation.** *J. Cell. Biochem.* 113, 1868–74 (2012).
43. Ying, L., Huang, Y., Chen, H., Wang, Y., *et al.* **Downregulated MEG3 activates autophagy and increases cell proliferation in bladder cancer.** *Mol. Biosyst.* 9, 407–11 (2013).
44. Qin, R., Chen, Z., Ding, Y., Hao, J., *et al.* **Long non-coding RNA MEG3 inhibits the proliferation of cervical carcinoma cells through the induction of cell cycle arrest and apoptosis.** *Neoplasma* 60, 486–92 (2013).
45. Lu, K., Li, W., Liu, X., Sun, M., *et al.* **Long non-coding RNA MEG3 inhibits NSCLC cells proliferation and induces apoptosis by affecting p53 expression.** *BMC Cancer* 13, 461 (2013).
46. Sun, M., Xia, R., Jin, F., Xu, T., *et al.* **Downregulated long noncoding RNA MEG3 is associated with poor prognosis and promotes cell proliferation in gastric cancer.** *Tumour Biol.* 35, 1065–73 (2014).
47. Isin, M., Ozgur, E., Cetin, G., Erten, N., *et al.* **Investigation of circulating lncRNAs in B-cell neoplasms.** *Clin. Chim. Acta.* 431, 255–9 (2014).
48. De la Taille, A. **ProgenSA PCA3 test for prostate cancer detection.** *Expert Rev. Mol. Diagn.* 7, 491–7 (2007).
49. Lee, G. L., Dobi, A. & Srivastava, S. **Prostate cancer: diagnostic performance of the PCA3 urine test.** *Nat. Rev. Urol.* 8, 123–4 (2011).
50. Smaldone, M. C. & Davies, B. J. **BC-819, a plasmid comprising the H19 gene regulatory sequences and diphtheria toxin A, for the potential targeted therapy of cancers.** *Curr. Opin. Mol. Ther.* 12, 607–16 (2010).
51. Levy, D. E. & Darnell, J. E. **Stats: transcriptional control and biological impact.** *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 3, 651–62 (2002).
52. Burger, R. **Impact of interleukin-6 in hematological malignancies.** *Transfus. Med. hemotherapy Off. Organ der Dtsch. Gesellschaft für Transfusionsmedizin und Immunhämatologie* 40, 336–43 (2013).
53. Mihara, M., Hashizume, M., Yoshida, H., Suzuki, M. & Shiina, M. **IL-6/IL-6 receptor system and its role in physiological and pathological conditions.** *Clin. Sci.* 122, 143–59 (2012).
54. Rose-John, S. **IL-6 trans-signaling via the soluble IL-6 receptor: importance for the pro-inflammatory activities of IL-6.** *Int. J. Biol. Sci.* 8, 1237–47 (2012).
55. Horn, F., Henze, C. & Heidrich, K. **Interleukin-6 signal transduction and lymphocyte function.** *Immunobiology* 202, 151–67 (2000).
56. Schindler, C., Levy, D. E. & Decker, T. **JAK-STAT signaling: from interferons to cytokines.** *J. Biol. Chem.* 282, 20059–63 (2007).

57. Hutchins, A. P., Diez, D. & Miranda-saavedra, D. **Genomic and computational approaches to dissect the mechanisms of STAT3 's universal and cell type-specific functions.** *JAK-STAT* 2, 1–10 (2013).
58. Schmitz, J. **SOCS3 Exerts Its Inhibitory Function on Interleukin-6 Signal Transduction through the SHP2 Recruitment Site of gp130.** *J. Biol. Chem.* 275, 12848–12856 (2000).
59. Vinkemeier, U. **Getting the message across, STAT! Design principles of a molecular signaling circuit.** *J. Cell Biol.* 167, 197–201 (2004).
60. Wormald, S. & Hilton, D. J. **Inhibitors of cytokine signal transduction.** *J. Biol. Chem.* 279, 821–4 (2004).
61. Chung, C. D. **Specific Inhibition of Stat3 Signal Transduction by PIAS3.** *Science (80- ).* 278, 1803–1805 (1997).
62. Durant, L., Watford, W. T., Ramos, H. L., Laurence, A., *et al.* **Diverse targets of the transcription factor STAT3 contribute to T cell pathogenicity and homeostasis.** *Immunity* 32, 605–15 (2010).
63. Stritesky, G. L., Muthukrishnan, R., Sehra, S., Goswami, R., *et al.* **The transcription factor STAT3 is required for T helper 2 cell development.** *Immunity* 34, 39–49 (2011).
64. Siegel, A. M., Heimall, J., Freeman, A. F., Hsu, A. P., *et al.* **A critical role for STAT3 transcription factor signaling in the development and maintenance of human T cell memory.** *Immunity* 35, 806–18 (2011).
65. Avery, D. T., Deenick, E. K., Ma, C. S., Suryani, S., *et al.* **B cell-intrinsic signaling through IL-21 receptor and STAT3 is required for establishing long-lived antibody responses in humans.** *J. Exp. Med.* 207, 155–71 (2010).
66. Hutchins, A. P., Diez, D. & Miranda-Saavedra, D. **The IL-10/STAT3-mediated anti-inflammatory response: recent developments and future challenges.** *Brief. Funct. Genomics* 12, 489–98 (2013).
67. O'Shea, J. J. & Murray, P. J. **Cytokine signaling modules in inflammatory responses.** *Immunity* 28, 477–487 (2008).
68. Braun, D. a, Fribourg, M. & Sealfon, S. C. **Cytokine response is determined by duration of receptor and signal transducers and activators of transcription 3 (STAT3) activation.** *J. Biol. Chem.* 288, 2986–93 (2013).
69. Wan, C.-K., Oh, J., Li, P., West, E. E., *et al.* **The Cytokines IL-21 and GM-CSF have Opposing Regulatory Roles in the Apoptosis of Conventional Dendritic Cells.** *Immunity* 38, 514–527 (2013).
70. Vallania, F., Schiavone, D., Dewilde, S., Pupo, E., *et al.* **Genome-wide discovery of functional transcription factor binding sites by comparative genomics : The case of Stat3.** *PNAS* 106, 5117–5122 (2009).
71. Hutchins, A. P., Diez, D., Takahashi, Y., Ahmad, S., *et al.* **Distinct transcriptional regulatory modules underlie STAT3's cell type-independent and cell type-specific functions.** *Nucleic Acids Res.* 41, 2155–70 (2013).
72. Hou, T., Ray, S., Lee, C. & Brasier, A. R. **The STAT3 NH2-terminal domain stabilizes enhanceosome assembly by interacting with the p300 bromodomain.** *J. Biol. Chem.* 283, 30725–34 (2008).
73. Icardi, L., Mori, R., Gesellchen, V., Eyckerman, S., *et al.* **The Sin3a repressor complex is a master regulator of STAT transcriptional activity.** *PNAS* 109, 12058–63 (2012).
74. Thomas, N. S. B. **The STAT3-DNMT1 connection.** *JAK-STAT* 1, 257–260 (2012).
75. Szczepanek, K., Chen, Q., Derecka, M., Salloum, F. N., *et al.* **Mitochondrial-targeted Signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) protects against ischemia-induced changes in the electron transport chain and the generation of reactive oxygen species.** *J. Biol. Chem.* 286, 29610–20 (2011).

76. Verma, N. K., Dourlat, J., Davies, A. M., Long, A., *et al.* **STAT3-stathmin interactions control microtubule dynamics in migrating T-cells.** *J. Biol. Chem.* 284, 12349–62 (2009).
77. Vogt, M., Domszalai, T., Kleshchanok, D., Lehmann, S., *et al.* **The role of the N-terminal domain in dimerization and nucleocytoplasmic shuttling of latent STAT3.** *J. Cell Sci.* 124, 900–9 (2011).
78. Yang, J. & Stark, G. R. **Roles of unphosphorylated STATs in signaling.** *Cell Res.* 18, 443–51 (2008).
79. Yang, J., Liao, X., Agarwal, M. K., Barnes, L., *et al.* **Unphosphorylated STAT3 accumulates in response to IL-6 and activates transcription by binding to NFκB.** *Genes Dev.* 21, 1396–408 (2007).
80. Yang, J., Huang, J., Dasgupta, M., Sears, N., *et al.* **Reversible methylation of promoter-bound STAT3 by histone-modifying enzymes.** *PNAS* 107, 21499–504 (2010).
81. Kim, E., Kim, M., Woo, D.-H., Shin, Y., *et al.* **Phosphorylation of EZH2 activates STAT3 signaling via STAT3 methylation and promotes tumorigenicity of glioblastoma stem-like cells.** *Cancer Cell* 23, 839–52 (2013).
82. Guo, Y., Xu, F., Lu, T., Duan, Z. & Zhang, Z. **Interleukin-6 signaling pathway in targeted therapy for cancer.** *Cancer Treat. Rev.* 38, 904–10 (2012).
83. Sansone, P. & Bromberg, J. **Targeting the interleukin-6/Jak/stat pathway in human malignancies.** *J. Clin. Oncol.* 30, 1005–14 (2012).
84. Yang, J., Chatterjee-kishore, M., Staugaitis, S. M., Nguyen, H., *et al.* **Novel Roles of Unphosphorylated STAT3 in Oncogenesis and Transcriptional Regulation** **Transcriptional Regulation.** *Cancer Res.* 65, 939–947 (2005).
85. Sen, M., Thomas, S. M., Kim, S., Yeh, J. I., *et al.* **First-in-human trial of a STAT3 decoy oligonucleotide in head and neck tumors: implications for cancer therapy.** *Cancer Discov.* 2, 694–705 (2012).
86. Bommert, K., Bargou, R. C. & Stühmer, T. **Signalling and survival pathways in multiple myeloma.** *Eur. J. Cancer* 42, 1574–80 (2006).
87. Jiménez-Zepeda, V. H. & Domínguez, V. J. **Plasma cell leukemia: a rare condition.** *Ann. Hematol.* 85, 263–7 (2006).
88. Brocke-Heidrich, K., Kretzschmar, A. K., Pfeifer, G., Henze, C., *et al.* **Interleukin-6-dependent gene expression profiles in multiple myeloma INA-6 cells reveal a Bcl-2 family-independent survival pathway closely associated with Stat3 activation.** *Blood* 103, 242–51 (2004).
89. Kumar, S. K., Rajkumar, S. V., Dispenzieri, A., Lacy, M. Q., *et al.* **Improved survival in multiple myeloma and the impact of novel therapies.** *Clin. TRIALS AND Obs.* 111, 2516–2520 (2008).
90. Nguyen-Pham, T.-N., Lee, Y.-K., Kim, H.-J. & Lee, J.-J. **Immunotherapy using dendritic cells against multiple myeloma: how to improve?.** *Clin. Dev. Immunol.* 2012, 397648 (2012).
91. Brocke-Heidrich, K., Ge, B., Cvijic, H., Pfeifer, G., *et al.* **BCL3 is induced by IL-6 via Stat3 binding to intronic enhancer HS4 and represses its own transcription.** *Oncogene* 25, 7297–304 (2006).
92. Esquela-Kerscher, A. & Slack, F. J. **Oncomirs - microRNAs with a role in cancer.** *Nat. Rev. Cancers* 6, 259–69 (2006).
93. Löffler, D., Brocke-Heidrich, K., Pfeifer, G., Stocsits, C., *et al.* **Interleukin-6 dependent survival of multiple myeloma cells involves the Stat3-mediated induction of microRNA-21 through a highly conserved enhancer.** *Blood* 110, 1330–3 (2007).
94. Zhang, J., Zhang, A., Wang, Y., Liu, N., *et al.* **New insights into the roles of ncRNA in the STAT3 pathway.** *Futur. Oncol.* 8, 723–730 (2012).
95. Meng, F., Henson, R., Wehbe-Janek, H., Smith, H., *et al.* **The MicroRNA let-7a modulates interleukin-6-dependent STAT-3 survival signaling in malignant human cholangiocytes.** *J. Biol. Chem.* 282, 8256–64 (2007).

96. Hatzia Apostolou, M., Polyta rchou, C., Aggelidou, E., Drakaki, A., *et al.* **An HNF4 $\alpha$ -miRNA inflammatory feedback circuit regulates hepatocellular oncogenesis.** *Cell* 147, 1233–47 (2011).
97. Rokavec, M., Öner, M. G., Li, H., Jackstadt, R., *et al.* **IL-6R/STAT3/miR-34a feedback loop promotes EMT-mediated colorectal cancer invasion and metastasis.** *J. Clin. Invest.* 124, 1853–1867 (2014).
98. Iliopoulos, D., Jaeger, S. a, Hirsch, H. a, Bulyk, M. L. & Struhl, K. **STAT3 activation of miR-21 and miR-181b-1 via PTEN and CYLD are part of the epigenetic switch linking inflammation to cancer.** *Mol. Cell* 39, 493–506 (2010).
99. Yang, C. H., Yue, J., Pfeffer, S. R., Handorf, C. R. & Pfeffer, L. M. **MicroRNA miR-21 regulates the metastatic behavior of B16 melanoma cells.** *J. Biol. Chem.* 286, 39172–8 (2011).
100. Han, L., Yue, X., Zhou, X., Lan, F.-M., *et al.* **MicroRNA-21 expression is regulated by  $\beta$ -catenin/STAT3 pathway and promotes glioma cell invasion by direct targeting RECK.** *CNS Neurosci. Ther.* 18, 573–83 (2012).
101. Wang, Y.-Y., Sun, G., Luo, H., Wang, X.-F., *et al.* **MiR-21 modulates hTERT through a STAT3-dependent manner on glioblastoma cell growth.** *CNS Neurosci. Ther.* 18, 722–8 (2012).
102. Leone, E., Morelli, E., Di Martino, M. T., Amodio, N., *et al.* **Targeting miR-21 inhibits in vitro and in vivo multiple myeloma cell growth.** *Clin. cancer Res.* 19, 2096–106 (2013).
103. Luo, X., Gu, J., Zhu, R., Feng, M., *et al.* **Integrative analysis of differential miRNA and functional study of miR-21 by seed-targeting inhibition in multiple myeloma cells in response to berberine.** *BMC Syst. Biol.* 8, 82 (2014).
104. Jiang, S., Zhang, H.-W., Lu, M.-H., He, X.-H., *et al.* **MicroRNA-155 functions as an OncomiR in breast cancer by targeting the suppressor of cytokine signaling 1 gene.** *Cancer Res.* 70, 3119–27 (2010).
105. Li, P., Grgurevic, S., Liu, Z., Harris, D., *et al.* **Signal transducer and activator of transcription-3 induces microRNA-155 expression in chronic lymphocytic leukemia.** *PLoS One* 8, e64678 (2013).
106. Yan, X.-L., Jia, Y.-L., Chen, L., Zeng, Q., *et al.* **Hepatocellular carcinoma-associated mesenchymal stem cells promote hepatocarcinoma progression: role of the S100A4-miR155-SOCS1-MMP9 axis.** *Hepatology* 57, 2274–86 (2013).
107. Xu, S., Xu, Z., Liu, B., Sun, Q., *et al.* **LIFR $\alpha$ -CT3 induces differentiation of a human acute myelogenous leukemia cell line HL-60 by suppressing miR-155 expression through the JAK/STAT Pathway.** *Leuk. Res.* 38, 1237–44 (2014).
108. Wang, B., Hsu, S.-H., Frankel, W., Ghoshal, K. & Jacob, S. T. **Stat3-mediated activation of microRNA-23a suppresses gluconeogenesis in hepatocellular carcinoma by down-regulating glucose-6-phosphatase and peroxisome proliferator-activated receptor gamma, coactivator 1 alpha.** *Hepatology* 56, 186–97 (2012).
109. Liu, L., Li, H., Li, J., Zhong, H., *et al.* **miR-125b suppresses the proliferation and migration of osteosarcoma cells through down-regulation of STAT3.** *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 416, 31–8 (2011).
110. Cao, X., Liu, D., Yan, X., Zhang, Y., *et al.* **Stat3 inhibits WTX expression through up-regulation of microRNA-370 in Wilms tumor.** *FEBS Lett.* 587, 639–44 (2013).
111. Brock, M., Trenkmann, M., Gay, R. E., Michel, B. a, *et al.* **Interleukin-6 modulates the expression of the bone morphogenic protein receptor type II through a novel STAT3-microRNA cluster 17/92 pathway.** *Circ. Res.* 104, 1184–91 (2009).
112. Lin, H.-Y., Chiang, C.-H. & Hung, W.-C. **STAT3 upregulates miR-92a to inhibit RECK expression and to promote invasiveness of lung cancer cells.** *Br. J. Cancer* 109, 731–8 (2013).

113. Zhu, H., Han, C., Lu, D. & Wu, T. **miR-17-92 Cluster Promotes Cholangiocarcinoma Growth: Evidence for PTEN as Downstream Target and IL-6/Stat3 as Upstream Activator.** *Am. J. Pathol.* 184, 2828–39 (2014).
114. Carraro, G., El-Hashash, A., Guidolin, D., Tiozzo, C., *et al.* **miR-17 family of microRNAs controls FGF10-mediated embryonic lung epithelial branching morphogenesis through MAPK14 and STAT3 regulation of E-Cadherin distribution.** *Dev. Biol.* 333, 238–50 (2009).
115. Wang, Y., Lu, Y., Toh, S. T., Sung, W.-K., *et al.* **Lethal-7 is down-regulated by the hepatitis B virus x protein and targets signal transducer and activator of transcription 3.** *J. Hepatol.* 53, 57–66 (2010).
116. CAI, B., LI, J., WANG, J., LUO, X., *et al.* **T ISSUE-SPECIFIC STEM CELLS microRNA-124 Regulates Cardiomyocyte Differentiation of Bone.** *Stem Cells* 30, 1746–1755 (2012).
117. Du, L., Subauste, M. C., DeSevo, C., Zhao, Z., *et al.* **miR-337-3p and its targets STAT3 and RAP1A modulate taxane sensitivity in non-small cell lung cancers.** *PLoS One* 7, e39167 (2012).
118. Wei, J., Wang, F., Kong, L.-Y., Xu, S., *et al.* **miR-124 inhibits STAT3 signaling to enhance T cell-mediated immune clearance of glioma.** *Cancer Res.* 73, 3913–26 (2013).
119. Koukos, G., Polytarchou, C., Kaplan, J. L., Morley-Fletcher, A., *et al.* **MicroRNA-124 regulates STAT3 expression and is down-regulated in colon tissues of pediatric patients with ulcerative colitis.** *Gastroenterology* 145, 842–52.e2 (2013).
120. Zhang, J., Lu, Y., Yue, X., Li, H., *et al.* **MiR-124 suppresses growth of human colorectal cancer by inhibiting STAT3.** *PLoS One* 8, e70300 (2013).
121. Zhao, G., Zhang, J., Shi, Y., Qin, Q., *et al.* **MiR-130b is a prognostic marker and inhibits cell proliferation and invasion in pancreatic cancer through targeting STAT3.** *PLoS One* 8, e73803 (2013).
122. Lu, Y., Yue, X., Cui, Y., Zhang, J. & Wang, K. **MicroRNA-124 suppresses growth of human hepatocellular carcinoma by targeting STAT3.** *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 441, 873–9 (2013).
123. Li, Y., Zhang, Z., Liu, X., Huang, T., *et al.* **miR-124 functions as a tumor suppressor in the endometrial carcinoma cell line HEC-1B partly by suppressing STAT3.** *Mol. Cell. Biochem.* 388, 219–31 (2014).
124. Su, C., Hou, Z., Zhang, C., Tian, Z. & Zhang, J. **Ectopic expression of microRNA-155 enhances innate antiviral immunity against HBV infection in human hepatoma cells.** *Virology* 8, 354 (2011).
125. Kobayashi, N., Uemura, H., Nagahama, K. & Okudela, K. **Identification of miR-30d as a novel prognostic maker of prostate cancer . ABSTRACT .** *Oncotarget* 3, 1455–1471 (2012).
126. Huang, C., Li, H., Wu, W., Jiang, T. & Qiu, Z. **Regulation of miR-155 affects pancreatic cancer cell invasiveness and migration by modulating the STAT3 signaling pathway through SOCS1.** *Oncol. Rep.* 30, 1223–30 (2013).
127. Amodio, N., Bellizzi, D., Leotta, M., Raimondi, L., *et al.* **miR-29b induces SOCS-1 expression by promoter demethylation and negatively regulates migration of multiple myeloma and endothelial cells.** *Cell Cycle* 12, 3650–3662 (2013).
128. Moffatt, C. E. & Lamont, R. J. **Porphyromonas gingivalis induction of microRNA-203 expression controls suppressor of cytokine signaling 3 in gingival epithelial cells.** *Infect. Immun.* 79, 2632–7 (2011).
129. Collins, A. S., McCoy, C. E., Lloyd, A. T., O'Farrelly, C. & Stevenson, N. J. **miR-19a: an effective regulator of SOCS3 and enhancer of JAK-STAT signalling.** *PLoS One* 8, e69090 (2013).

130. Kneitz, B., Krebs, M., Kalogirou, C., Schubert, M., *et al.* **Survival in patients with high-risk prostate cancer is predicted by miR-221, which regulates proliferation, apoptosis, and invasion of prostate cancer cells by inhibiting IRF2 and SOCS3.** *Cancer Res.* 74, 2591–603 (2014).
131. Zhuang, G., Wu, X., Jiang, Z., Kasman, I., *et al.* **Tumour-secreted miR-9 promotes endothelial cell migration and angiogenesis by activating the JAK-STAT pathway.** *EMBO J.* 31, 3513–23 (2012).
132. Jiang, S., Li, C., McRae, G., Lykken, E., *et al.* **MeCP2 reinforces STAT3 signaling and the generation of effector CD4+ T cells by promoting miR-124-mediated suppression of SOCS5.** *Sci. Signal.* 7, ra25 (2014).
133. Brock, M., Trenkmann, M., Gay, R. E., Gay, S., *et al.* **MicroRNA-18a enhances the interleukin-6-mediated production of the acute-phase proteins fibrinogen and haptoglobin in human hepatocytes.** *J. Biol. Chem.* 286, 40142–50 (2011).
134. Mycko, M. P., Cichalewska, M., Machlanska, A., Cwiklinska, H., *et al.* **MicroRNA-301a regulation of a T-helper 17 immune response controls autoimmune demyelination.** *PNAS* 109, E1248–57 (2012).
135. Wu, W., Takanashi, M., Borjigin, N., Ohno, S., *et al.* **MicroRNA-18a modulates STAT3 activity through negative regulation of PIAS3 during gastric adenocarcinogenesis.** *Br. J. Cancer* 108, 653–61 (2013).
136. Shi, L., Wan, Y., Sun, G., Zhang, S., *et al.* **miR-125b inhibitor may enhance the invasion-prevention activity of temozolomide in glioblastoma stem cells by targeting PIAS3.** *BioDrugs* 28, 41–54 (2014).
137. Xiong, Q., Zhong, Q., Zhang, J., Yang, M., *et al.* **Identification of Novel miR-21 Target Proteins in Multiple Myeloma Cells by Quantitative Proteomics.** *J. Proteome Res.* 11, 2078–2090 (2012).
138. Wu, H., Huang, M., Cao, P., Wang, T., *et al.* **MiR-135a targets JAK2 and inhibits gastric cancer cell proliferation.** *Cancer Biol. Ther.* 13, 281–288 (2012).
139. Gong, J., Zhang, J.-P., Li, B., Zeng, C., *et al.* **MicroRNA-125b promotes apoptosis by regulating the expression of Mcl-1, Bcl-w and IL-6R.** *Oncogene* 32, 3071–9 (2013).
140. Yang, X., Liang, L., Zhang, X.-F., Jia, H.-L., *et al.* **MicroRNA-26a suppresses tumor growth and metastasis of human hepatocellular carcinoma by targeting interleukin-6-Stat3 pathway.** *Hepatology* 58, 158–70 (2013).
141. Li, F., Li, X., Qiao, L., Shi, F., *et al.* **miR-98 suppresses melanoma metastasis through a negative feedback loop with its target gene IL-6.** *Exp. Mol. Med.* 46, e116 (2014).
142. Wang, P., Xue, Y., Han, Y., Lin, L., *et al.* **The STAT3-binding long noncoding RNA Inc-DC controls human dendritic cell differentiation.** *Science (80-. ).* 344, 310–3 (2014).
143. Murphy, K. M. & Stockinger, B. **Effector T cell plasticity: flexibility in the face of changing circumstances.** *Nat. Immunol.* 11, 674–80 (2010).
144. Sharpe, A. H. & Abbas, A. K. **T-cell costimulation--biology, therapeutic potential, and challenges.** *N. Engl. J. Med.* 355, 973–5 (2006).
145. Parijs, L. V. **Homeostasis and Self-Tolerance in the Immune System: Turning Lymphocytes off.** *Science (80-. ).* 280, 243–248 (1998).
146. Brownlie, R. J. & Zamoyska, R. **T cell receptor signalling networks: branched, diversified and bounded.** *Nat. Rev. Immunol.* 13, 257–69 (2013).
147. Yamagishi & Makoto, T. W. **New Paradigm of T cell Signaling: Learning from Malignancies.** *J. Clin. Cell. Immunol.* (2012). at <<http://www.omicsonline.org/2155-9899/2155-9899-S12-007.php?aid=9738>>
148. Skånland, S. S., Moltu, K., Berge, T., Aandahl, E. M. & Taskén, K. **T-cell co-stimulation through the CD2 and CD28 co-receptors induces distinct signalling responses.** *Biochem. J.* 460, 399–410 (2014).

149. Grogan, J. L., Mohrs, M., Harmon, B., Lacy, D. a, *et al.* **Early transcription and silencing of cytokine genes underlie polarization of T helper cell subsets.** *Immunity* 14, 205–15 (2001).
150. Wei, G., Wei, L., Zhu, J., Zang, C., *et al.* **Global Mapping of H3K4me3 and H3K27me3 Reveals Specificity and Plasticity in Lineage Fate Determination of Differentiating CD4+ T Cells.** *Immunity* 30, 155–167 (2009).
151. Fitzgerald, K. a & Caffrey, D. R. **Long noncoding RNAs in innate and adaptive immunity.** *Curr. Opin. Immunol.* 26, 140–6 (2014).
152. Sandberg, R., Neilson, J. R., Sarma, A., Sharp, P. a & Burge, C. B. **Proliferating cells express mRNAs with shortened 3' untranslated regions and fewer microRNA target sites.** *Science (80-. )*. 320, 1643–7 (2008).
153. Pang, K. C., Dinger, M. E., Mercer, T. R., Malquori, L., *et al.* **Genome-wide identification of long noncoding RNAs in CD8+ T cells.** *J. Immunol.* 182, 7738–48 (2009).
154. Hu, G., Tang, Q., Sharma, S., Yu, F., *et al.* **Expression and regulation of intergenic long noncoding RNAs during T cell development and differentiation.** *Nat. Immunol.* 14, 1190–8 (2013).
155. Vigneau, S., Rohrllich, P. & Brahic, M. **Tmevpg1 , a Candidate Gene for the Control of Theiler ' s Virus Persistence , Could Be Implicated in the Regulation of Gamma Interferon Tmevpg1 , a Candidate Gene for the Control of Theiler ' s Virus Persistence , Could Be Implicated in the Regulation of.** *J. Virol.* 77, 5632–5638 (2003).
156. Collier, S. P., Collins, P. L., Williams, C. L., Boothby, M. R. & Aune, T. M. **Cutting edge: influence of Tmevpg1, a long intergenic noncoding RNA, on the expression of Ifng by Th1 cells.** *J. Immunol.* 189, 2084–8 (2012).
157. Gomez, J. A., Wapinski, O. L., Yang, Y. W., Bureau, J.-F., *et al.* **The NeST long ncRNA controls microbial susceptibility and epigenetic activation of the interferon- $\gamma$  locus.** *Cell* 152, 743–54 (2013).
158. Mourtada-Maarabouni, M., Hedge, V. L., Kirkham, L., Farzaneh, F. & Williams, G. T. **Growth arrest in human T-cells is controlled by the non-coding RNA growth-arrest-specific transcript 5 (GAS5).** *J. Cell Sci.* 121, 939–946 (2008).
159. Mourtada-maarabouni, M., Hasan, A. M., Farzaneh, F. & Williams, G. T. **Inhibition of Human T-Cell Proliferation by Mammalian Target of Rapamycin ( mTOR ) Antagonists Requires Noncoding RNA.** *Mol. Pharmacol.* 78, 19–28 (2010).
160. Kino, T., Hurt, D. E., Ichijo, T., Nader, N. & Chrousos, G. P. **Noncoding RNA gas5 is a growth arrest- and starvation-associated repressor of the glucocorticoid receptor.** *Sci. Signal.* 3, ra8 (2010).
161. Willingham, a T., Orth, a P., Batalov, S., Peters, E. C., *et al.* **A strategy for probing the function of noncoding RNAs finds a repressor of NFAT.** *Science (80-. )*. 309, 1570–3 (2005).
162. Sharma, S., Findlay, G. M., Bandukwala, H. S., Oberdoerffer, S., *et al.* **Dephosphorylation of the nuclear factor of activated T cells (NFAT) transcription factor is regulated by an RNA-protein scaffold complex.** *PNAS* 108, 17235–17235 (2011).
163. Otto, C., Reiche, K. & Hacker Müller, J. **Detection of differentially expressed segments in tiling array data.** *Bioinformatics* 28, 1471–9 (2012).
164. Burger, R., Guenther, A., Bakker, F., Schmalzing, M., *et al.* **Gp130 and ras mediated signaling in human plasma cell line INA-6: a cytokine-regulated tumor model for plasmacytoma.** *Hematol. J.* 2, 42–53 (2001).
165. Maiuri, P., Knezevich, A., De Marco, A., Mazza, D., *et al.* **Fast transcription rates of RNA polymerase II in human cells.** *EMBO Rep.* 12, 1280–5 (2011).
166. Hacker Müller, J., Reiche, K., Otto, C., Hösl er, N., *et al.* **Cell cycle, oncogenic and tumor suppressor pathways regulate numerous long and macro non-protein coding RNAs.** *Genome Biol.* 15, 1–23 (2014).

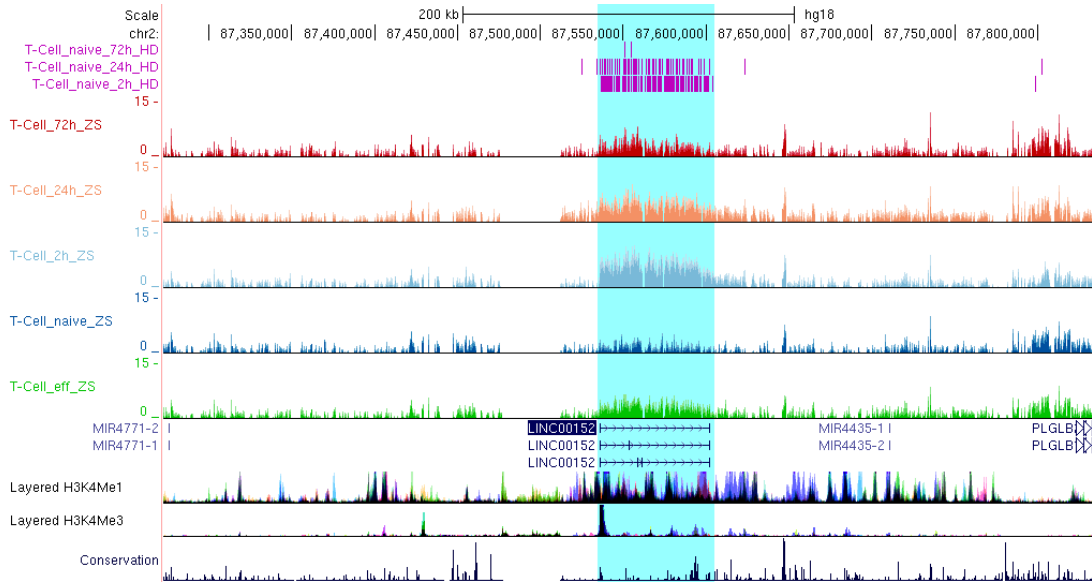
167. Burge, C. & Karlin, S. **Prediction of complete gene structures in human genomic DNA.** *J. Mol. Biol.* 268, 78–94 (1997).
168. Trofatter, J. a, Long, K. R., Murrell, J. R., Stotler, C. J., *et al.* **An expression-independent catalog of genes from human chromosome 22.** *Genome Res.* 5, 214–224 (1995).
169. Schramedei, K. **Untersuchungen zur Funktion nicht-kodierender RNAs im STAT3-Pathway.** S. 62 (Universität Leipzig, 2008).
170. Grollmütz, N. **Regulation and function of Stat3-controlled ncRNAs in tumor cells.** 41–42 (Charité-Universitätsmedizin Berlin, 2008).
171. Goldfeld, A. E., Tsai, E., Kincaid, R., Belshaw, P. J., *et al.* **Calcineurin mediates human tumor necrosis factor alpha gene induction in stimulated T and B cells.** *J. Exp. Med.* 180, 763–8 (1994).
172. Haasch, D., Chen, Y.-W., Reilly, R. M., Chiou, X. G., *et al.* **T cell activation induces a noncoding RNA transcript sensitive to inhibition by immunosuppressant drugs and encoded by the proto-oncogene, BIC.** *Cell. Immunol.* 217, 78–86 (2002).
173. Chen, F. C. & Li, W. H. **Genomic divergences between humans and other hominoids and the effective population size of the common ancestor of humans and chimpanzees.** *Am. J. Hum. Genet.* 68, 444–56 (2001).
174. Wegenka, U. M., Buschmann, J., Lütticken, C., Heinrich, P. C. & Horn, F. **Acute-phase response factor, a nuclear factor binding to acute-phase response elements, is rapidly activated by interleukin-6 at the posttranslational level.** *Mol. Cell. Biol.* 13, 276–88 (1993).
175. Horvath, C. M., Wen, Z. & Darnell, J. E. **A STAT protein domain that determines DNA sequence recognition suggests a novel DNA-binding domain.** *Genes Dev.* 9, 984–994 (1995).
176. Rosenbloom, K. R., Dreszer, T. R., Long, J. C., Malladi, V. S., *et al.* **ENCODE whole-genome data in the UCSC Genome Browser: update 2012.** *Nucleic Acids Res.* 40, D912–7 (2012).
177. Morris, K. V & Mattick, J. S. **The rise of regulatory RNA.** *Nat. Rev. Genet.* 15, 423–37 (2014).
178. Mercer, T. R., Wilhelm, D., Dinger, M. E., Soldà, G., *et al.* **Expression of distinct RNAs from 3' untranslated regions.** *Nucleic Acids Res.* 39, 2393–403 (2011).
179. Mercer, T. R., Dinger, M. E., Bracken, C. P., Kolle, G., *et al.* **Regulated post-transcriptional RNA cleavage diversifies the eukaryotic transcriptome.** *Genome Res.* 20, 1639–50 (2010).
180. Cao, Q., Li, Y.-Y., He, W.-F., Zhang, Z.-Z., *et al.* **Interplay between microRNAs and the STAT3 signaling pathway in human cancers.** *Physiol. Genomics* 45, 1206–14 (2013).
181. Latos, P. A. & Barlow, D. P. **Regulation of imprinted expression by macro non-coding RNAs.** *RNA Biol.* 6, 100–106 (2009).
182. Laurent, G., Shtokalo, D., Dong, B., Tackett, M. R., *et al.* **VlincRNAs controlled by retroviral elements are a hallmark of pluripotency and cancer.** *Genome Biol.* 14, R73 (2013).
183. Smith, M. a, Gesell, T., Stadler, P. F. & Mattick, J. S. **Widespread purifying selection on RNA structure in mammals.** *Nucleic Acids Res.* 41, 8220–36 (2013).
184. Minakuchi, M., Kakazu, N., Gorrin-rivas, M. J., Abe, T., *et al.* **Identification and characterization of SEB, a novel protein that binds to the acute undifferentiated leukemia-associated protein SET.** *Eur. J. Biochem.* 1351, 1340–1351 (2001).
185. Cristóbal, I., Garcia-Orti, L., Cirauqui, C., Cortes-Lavaud, X., *et al.* **Overexpression of SET is a recurrent event associated with poor outcome and contributes to protein phosphatase 2A inhibition in acute myeloid leukemia.** *Haematologica* 97, 543–50 (2012).
186. Trimarchi, T., Ntziachristos, P. & Aifantis, I. **A new player SETs in myeloid malignancy.** *Nat. Genet.* 45, 846–7 (2013).



187. Defays, A., David, A., de Gassart, A., De Angelis Rigotti, F., *et al.* **BAD-LAMP is a novel biomarker of nonactivated human plasmacytoid dendritic cells.** *Blood* 118, 609–17 (2011).
188. Lee, J., Sohn, I., Do, I.-G., Kim, K.-M., *et al.* **Nanostring-based multigene assay to predict recurrence for gastric cancer patients after surgery.** *PLoS One* 9, e90133 (2014).
189. Yamasaki, T., Seki, N., Yamada, Y., Yoshino, H., *et al.* **Tumor suppressive microRNA-138 contributes to cell migration and invasion through its targeting of vimentin in renal cell carcinoma.** *Int. J. Oncol.* 41, 805–17 (2012).
190. Sone, M., Hayashi, T., Tarui, H., Agata, K., *et al.* **The mRNA-like noncoding RNA Gomafu constitutes a novel nuclear domain in a subset of neurons.** *J. Cell Sci.* 120, 2498–506 (2007).
191. Rapicavoli, N. A., Poth, E. M. & Blackshaw, S. **The long noncoding RNA RNCR2 directs mouse retinal cell specification.** *BMC Dev. Biol.* 10, 1–10 (2010).
192. Blackshaw, S., Harpavat, S., Trimarchi, J., Cai, L., *et al.* **Genomic analysis of mouse retinal development.** *PLoS Biol.* 2, E247 (2004).
193. Mercer, T. R., Qureshi, I. A., Gokhan, S., Dinger, M. E., *et al.* **Long noncoding RNAs in neuronal-glia fate specification and oligodendrocyte lineage maturation.** *BMC Neurosci.* 11, 1–15 (2010).
194. Barry, G., Briggs, J. A., Vanichkina, D. P., Poth, E. M., *et al.* **The long non-coding RNA Gomafu is acutely regulated in response to neuronal activation and involved in schizophrenia-associated alternative splicing.** *Mol. Psychiatry* 19, 486–94 (2014).
195. Mercer, T. R., Dinger, M. E., Sunkin, S. M., Mehler, M. F. & Mattick, J. S. **Specific expression of long noncoding RNAs in the mouse brain.** *PNAS* 105, 716–721 (2008).
196. Sheik Mohamed, J., Gaughwin, P. M., Lim, B., Robson, P. & Lipovich, L. **Conserved long noncoding RNAs transcriptionally regulated by Oct4 and Nanog modulate pluripotency in mouse embryonic stem cells.** *RNA* 16, 324–37 (2010).
197. Ishii, N., Ozaki, K., Sato, H., Mizuno, H., *et al.* **Identification of a novel non-coding RNA, MIAT, that confers risk of myocardial infarction.** *J. Hum. Genet.* 51, 1087–99 (2006).
198. Tsuiji, H., Yoshimoto, R., Hasegawa, Y., Furuno, M., *et al.* **Competition between a noncoding exon and introns: Gomafu contains tandem UACUAAC repeats and associates with splicing factor-1.** *Genes Cells* 16, 479–90 (2011).
199. Ishizuka, A., Hasegawa, Y., Ishida, K., Yanaka, K. & Nakagawa, S. **Formation of nuclear bodies by the lncRNA Gomafu-associating proteins Celf3 and SF1.** *Genes to cells* 19, 704–21 (2014).
200. Aprea, J., Prenninger, S., Dori, M., Ghosh, T., *et al.* **Transcriptome sequencing during mouse brain development identifies long non-coding RNAs functionally involved in neurogenic commitment.** *EMBO J.* 32, 3145–60 (2013).
201. Defays, A., David, A., de Gassart, A., De Angelis Rigotti, F., *et al.* **BAD-LAMP is a novel biomarker of nonactivated human plasmacytoid dendritic cells.** *Blood* 118, 609–17 (2011).
202. Neumann, O., Kesselmeier, M., Geffers, R., Pellegrino, R., *et al.* **Methylome analysis and integrative profiling of human HCCs identify novel protumorigenic factors.** *Hepatology* 56, 1817–27 (2012).
203. Cao, W.-J., Wu, H.-L., He, B.-S., Zhang, Y.-S. & Zhang, Z.-Y. **Analysis of long non-coding RNA expression profiles in gastric cancer.** *World J. Gastroenterol.* 19, 3658–64 (2013).
204. Pang, Q., Ge, J., Shao, Y., Sun, W., *et al.* **Increased expression of long intergenic non-coding RNA LINC00152 in gastric cancer and its clinical significance.** *Tumour Biol.* 35, 5441–7 (2014).

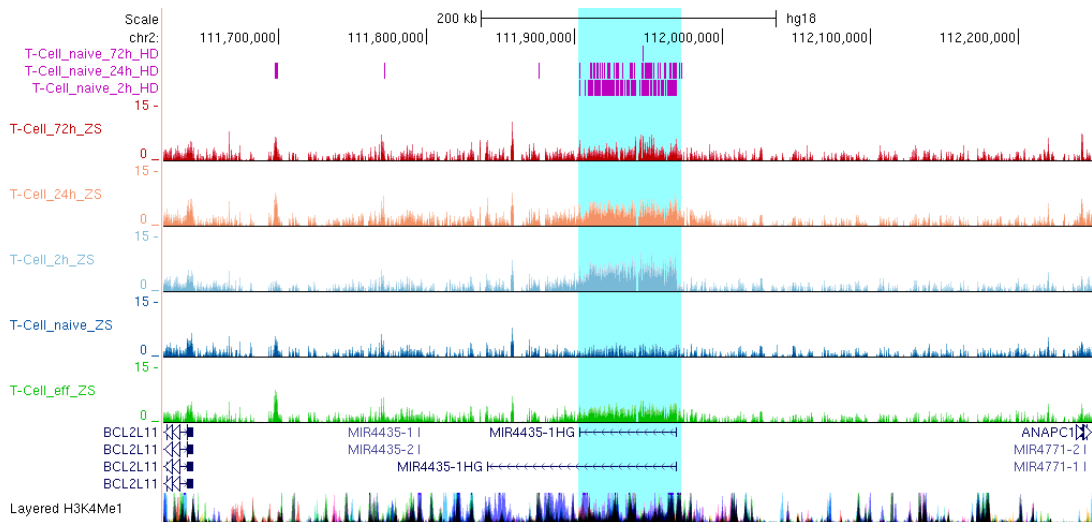
205. Xia, T., Liao, Q., Jiang, X., Shao, Y., *et al.* **Long noncoding RNA associated-competing endogenous RNAs in gastric cancer.** *Sci. Rep.* 4, 6088 (2014).
206. Burkhart, J. M., Vaudel, M., Gambaryan, S., Radau, S., *et al.* **The first comprehensive and quantitative analysis of human platelet protein composition allows the comparative analysis of structural and functional pathways.** *Blood* 120, e73–82 (2012).
207. Bronner, C., Krifa, M. & Mousli, M. **Increasing role of UHRF1 in the reading and inheritance of the epigenetic code as well as in tumorigenesis.** *Biochem. Pharmacol.* 86, 1643–9 (2013).
208. Mudbhary, R., Hoshida, Y., Chernyavskaya, Y., Jacob, V., *et al.* **UHRF1 overexpression drives DNA hypomethylation and hepatocellular carcinoma.** *Cancer Cell* 25, 196–209 (2014).
209. Wei, W., Pelechano, V., Järvelin, A. I. & Steinmetz, L. M. **Functional consequences of bidirectional promoters.** *Trends Genet.* 27, 267–76 (2011).
210. DeFrances, M. C., Debelius, D. R., Cheng, J. & Kane, L. P. **Inhibition of T-cell activation by PIK3IP1.** *Eur. J. Immunol.* 42, 2754–9 (2012).
211. Lepoivre, C., Belhocine, M., Bergon, A., Griffon, A., *et al.* **Divergent transcription is associated with promoters of transcriptional regulators.** *BMC Genomics* 14, 1–20 (2013).
212. Alvarez, J. D., Yasui, D. H., Niida, H., Joh, T., *et al.* **The MAR-binding protein SATB1 orchestrates temporal and spatial expression of multiple genes during T-cell development.** *Genes Dev.* 14, 521–535 (2000).
213. Cai, S., Lee, C. C. & Kohwi-Shigematsu, T. **SATB1 packages densely looped, transcriptionally active chromatin for coordinated expression of cytokine genes.** *Nat. Genet.* 38, 1278–88 (2006).
214. Notani, D., Gottimukkala, K. P., Jayani, R. S., Limaye, A. S., *et al.* **Global regulator SATB1 recruits beta-catenin and regulates T(H)2 differentiation in Wnt-dependent manner.** *PLoS Biol.* 8, e1000296 (2010).
215. Fessing, M. Y., Mardaryev, A. N., Gdula, M. R., Sharov, A. a, *et al.* **p63 regulates Satb1 to control tissue-specific chromatin remodeling during development of the epidermis.** *J. Cell Biol.* 194, 825–39 (2011).
216. Wang, M., Yin, B., Matsueda, S., Deng, L., *et al.* **Identification of special AT-rich sequence binding protein 1 as a novel tumor antigen recognized by CD8+ T cells: implication for cancer immunotherapy.** *PLoS One* 8, e56730 (2013).
217. Collier, S. P., Collins, P. L., Williams, C. L., Boothby, M. R. & Aune, T. M. **Cutting edge: influence of Tmevpg1, a long intergenic noncoding RNA, on the expression of Ifng by Th1 cells.** *J. Immunol.* 189, 2084–8 (2012).
218. Guttman, M., Donaghey, J., Carey, B. W., Garber, M., *et al.* **lincRNAs act in the circuitry controlling pluripotency and differentiation.** *Nature* 477, 295–300 (2011).
219. Binder, S. **STAIR18 - eine STAT3-induzierte nicht-codierende RNA reguliert das Überleben von Multiplen Myelomzellen.** 180 (Universität Leipzig, 2014).
220. Carrieri, C., Cimatti, L., Biagioli, M., Beugnet, A., *et al.* **Long non-coding antisense RNA controls Uchl1 translation through an embedded SINEB2 repeat.** *Nature* 491, 454–7 (2012).
221. Gong, C. & Maquat, L. E. **lncRNAs transactivate STAU1-mediated mRNA decay by duplexing with 3' UTRs via Alu elements.** *Nature* 470, 284–8 (2011).
222. Tani, H. & Torimura, M. **Identification of short-lived long non-coding RNAs as surrogate indicators for chemical stress response.** *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 439, 547–51 (2013).
223. Tani, H., Onuma, Y., Ito, Y. & Torimura, M. **Long Non-Coding RNAs as Surrogate Indicators for Chemical Stress Responses in Human-Induced Pluripotent Stem Cells.** *PLoS One* 9, e106282 (2014).

# 8 Anhang



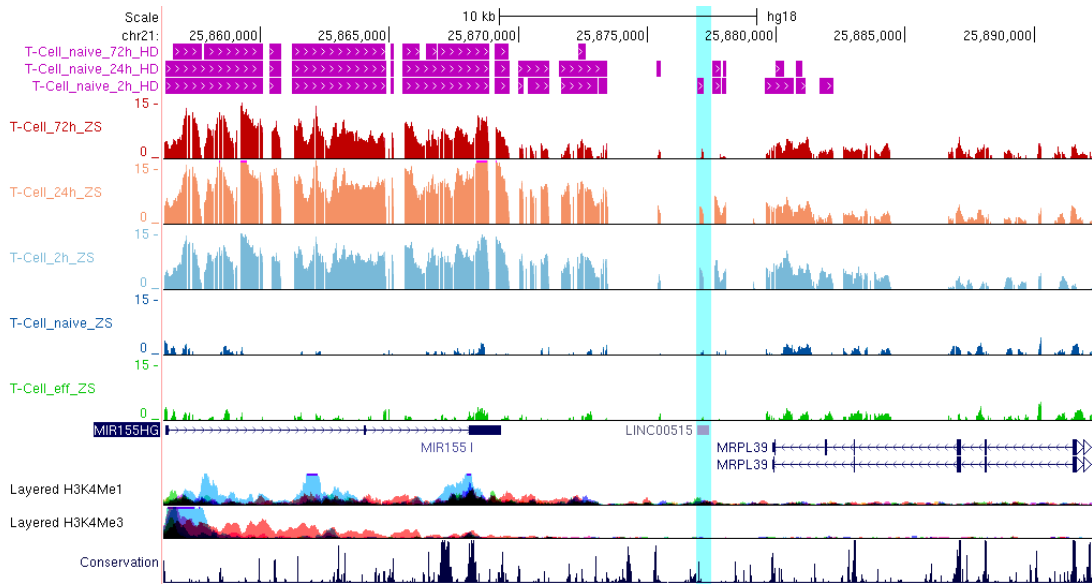
**Anhang Abb. I: STAIR18 / LINC00152 - Transkriptomanalyse der T-Zellaktivierung.**

Gezeigt sind Chromosomenkoordinaten und die Ergebnisse der Intervallanalyse (hoch exprimierte, differentielle Bereiche in Pink dargestellt). Darunter folgen die Tiling Array-Daten der verschiedenen T-Zellaktivierungszustände (Effektor, naive, 2h, 24h und 72h). Dargestellt sind des Weiteren annotierte Gene, Histonmodifikationen und die Konservierung in Vertebraten.



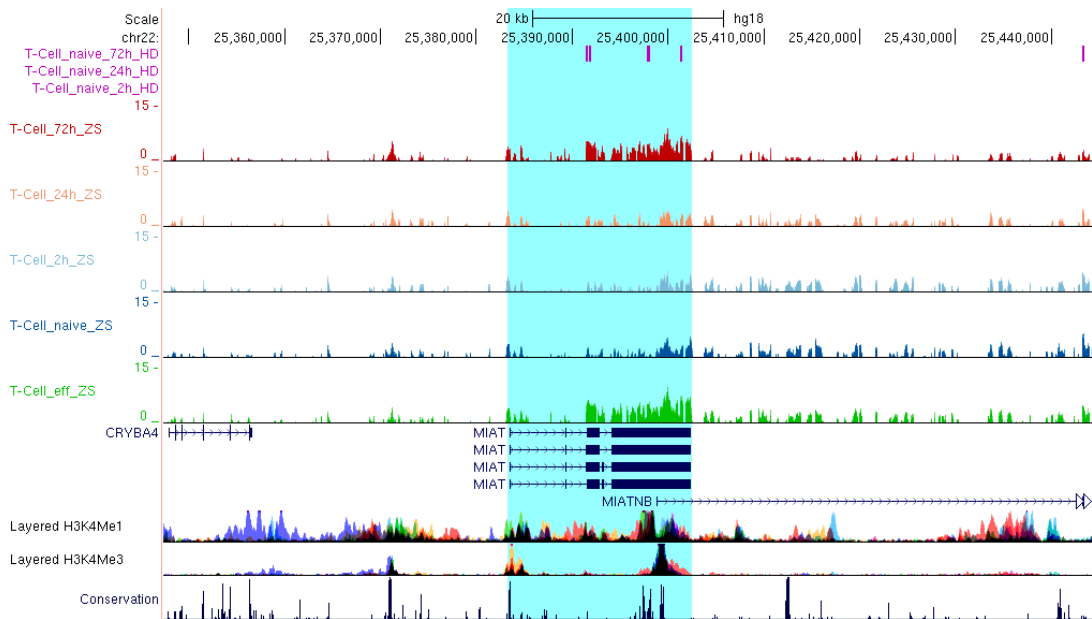
**Anhang Abb. II: STAIR18 / LOC541471 - Transkriptomanalyse der T-Zellaktivierung.**

MIR4435-HG (MIR4435 host gene). Gezeigt sind Chromosomenkoordinaten und die Ergebnisse der Intervallanalyse (hoch exprimierte, differentielle Bereiche in Pink dargestellt). Darunter folgen die Tiling Array-Daten der verschiedenen T-Zellaktivierungszustände (Effektor, naive, 2h, 24h und 72h). Dargestellt sind des Weiteren annotierte Gene, Histonmodifikationen und die Konservierung in Vertebraten.



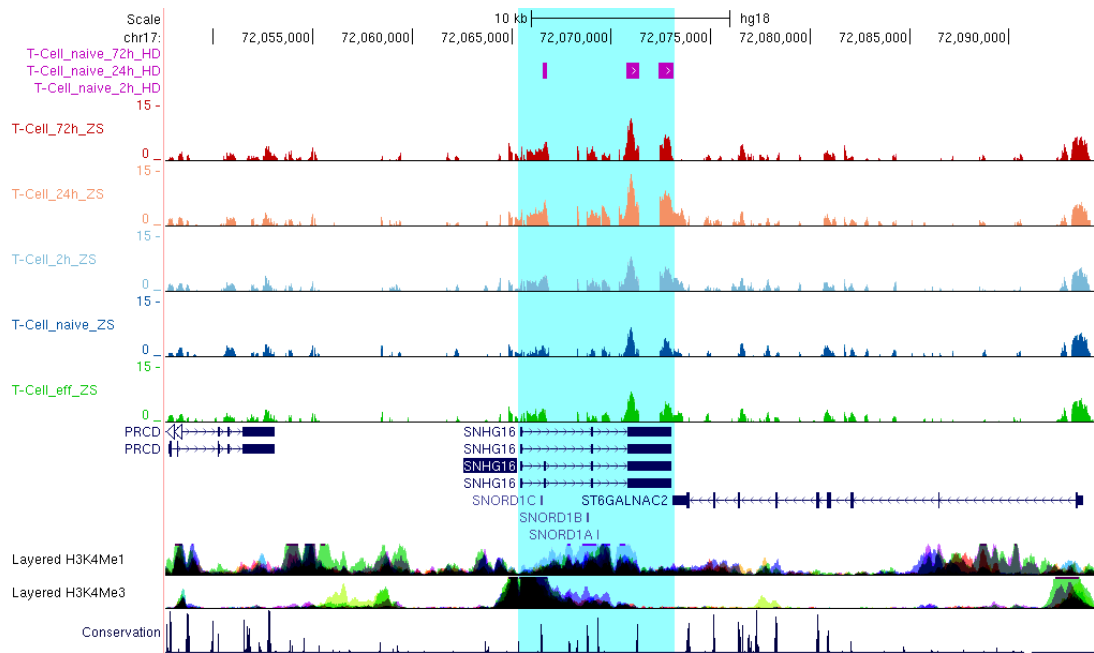
**Anhang Abb. III: LINC00515 - Transkriptomanalyse der T-Zellaktivierung.**

Gezeigt sind Chromosomenkoordinaten und die Ergebnisse der Intervallanalyse (hoch exprimierte, differentielle Bereiche in Pink dargestellt). Darunter folgen die Tiling Array-Daten der verschiedenen T-Zellaktivierungszustände (Effektor, naive, 2h, 24h und 72h). Dargestellt sind des Weiteren annotierte Gene, Histonmodifikationen und die Konservierung in Vertebraten.



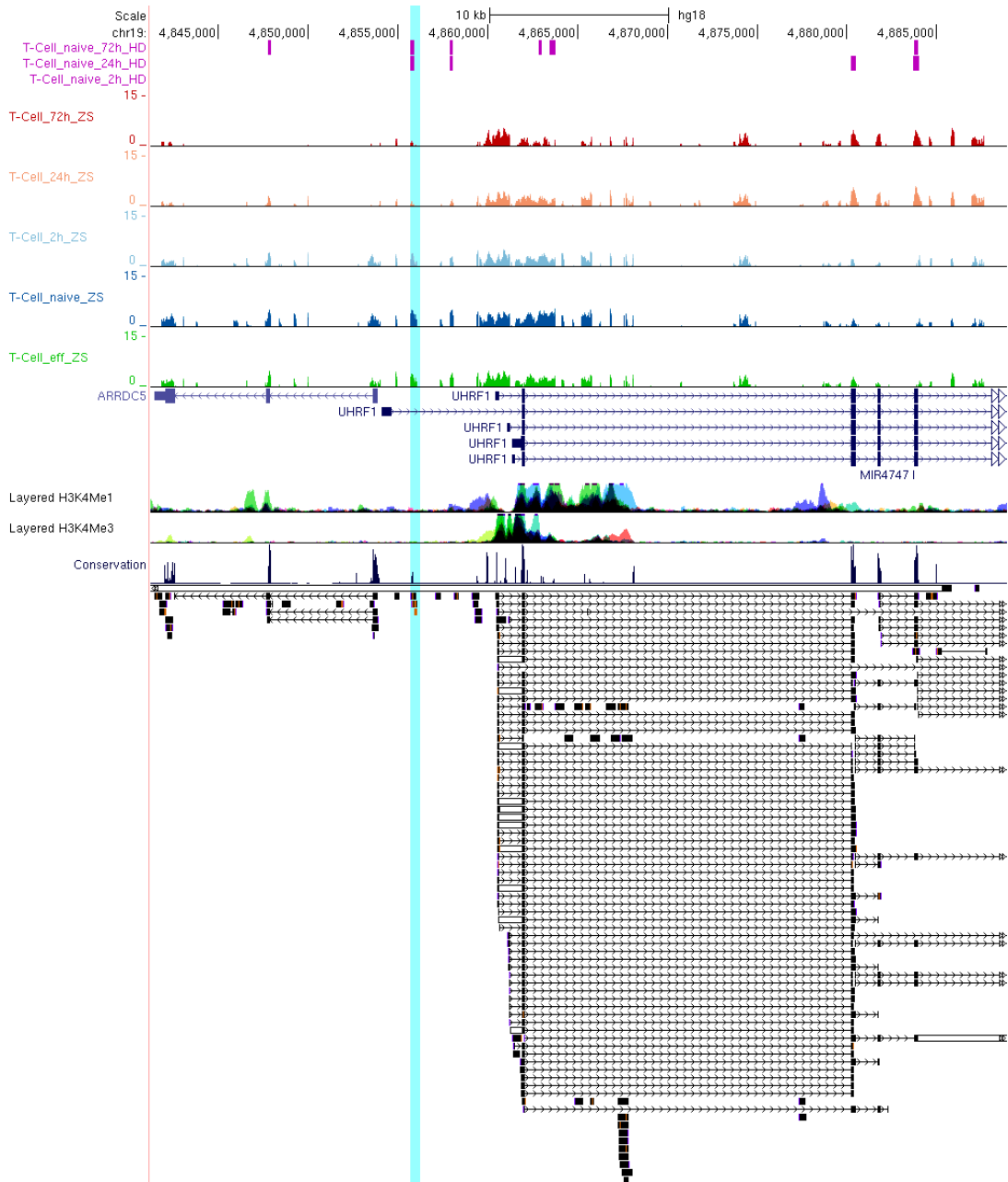
**Anhang Abb. IV: STAIR15 / MIAT - Transkriptomanalyse der T-Zellaktivierung.**

MIAT (myocardial infarction associated transcript, alias Gomafu oder RNCR2). Gezeigt sind Chromosomenkoordinaten und die Ergebnisse der Intervallanalyse (hoch exprimierte, differentielle Bereiche in Pink dargestellt). Darunter folgen die Tiling Array-Daten der verschiedenen T-Zellaktivierungszustände (Effektor, naive, 2h, 24h und 72h). Dargestellt sind des Weiteren annotierte Gene, Histonmodifikationen und die Konservierung in Vertebraten.



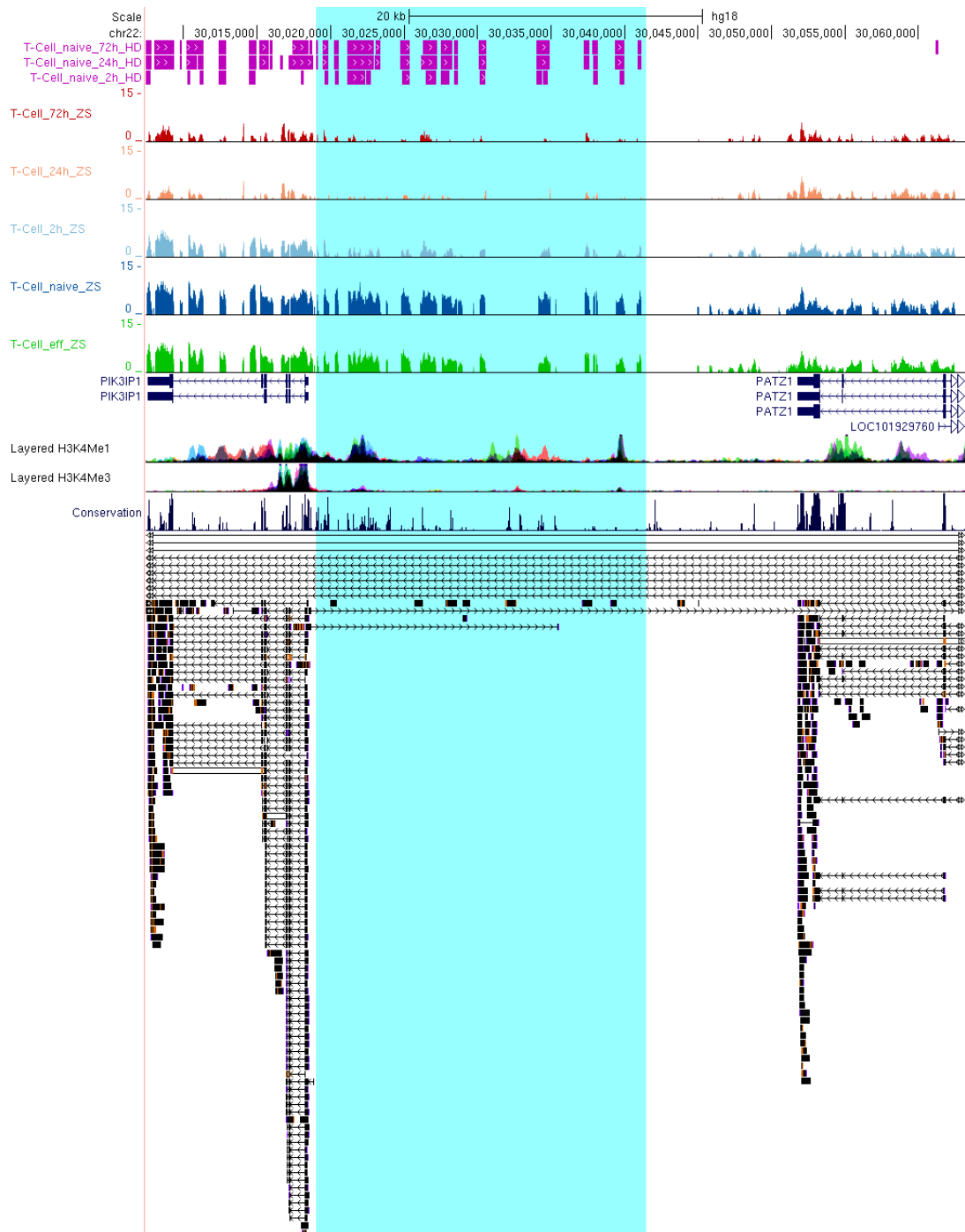
### Anhang Abb. V: SNHG16 - Transkriptomanalyse der T-Zellaktivierung.

SNHG16 (small nucleolar RNA host gene 16; alias ncRAN ). Gezeigt sind Chromosomenkoordinaten und die Ergebnisse der Intervallanalyse (hoch exprimierte, differentielle Bereiche in Pink dargestellt). Darunter folgen die Tiling Array-Daten der verschiedenen T-Zellaktivierungszustände (Effektor, naive, 2h, 24h und 72h). Dargestellt sind des Weiteren annotierte Gene, Histonmodifikationen und die Konservierung in Vertebraten.



**Anhang Abb. VI: TREAT1 - Transkriptomanalyse der T-Zellaktivierung.**

Transcript regulated by activation in T cells 1 (chr19: 4 855 700 - 4 856 000 (hg18) Türkis hinterlegt) scheint ein Transkript antisense zu UHRF1 darzustellen. Gezeigt sind Chromosomenkoordinaten und die Ergebnisse der Intervallanalyse (hoch exprimierte, differentielle Bereiche in Pink dargestellt). Darunter folgen die Tiling Array-Daten der verschiedenen T-Zellaktivierungszustände (Effektor, naive, 2h, 24h und 72h). Dargestellt sind des Weiteren annotierte Gene, Histonmodifikationen, die Konservierung in Vertebraten sowie gespleißte und ungespleißte ESTs im ausgewählten Bereich.

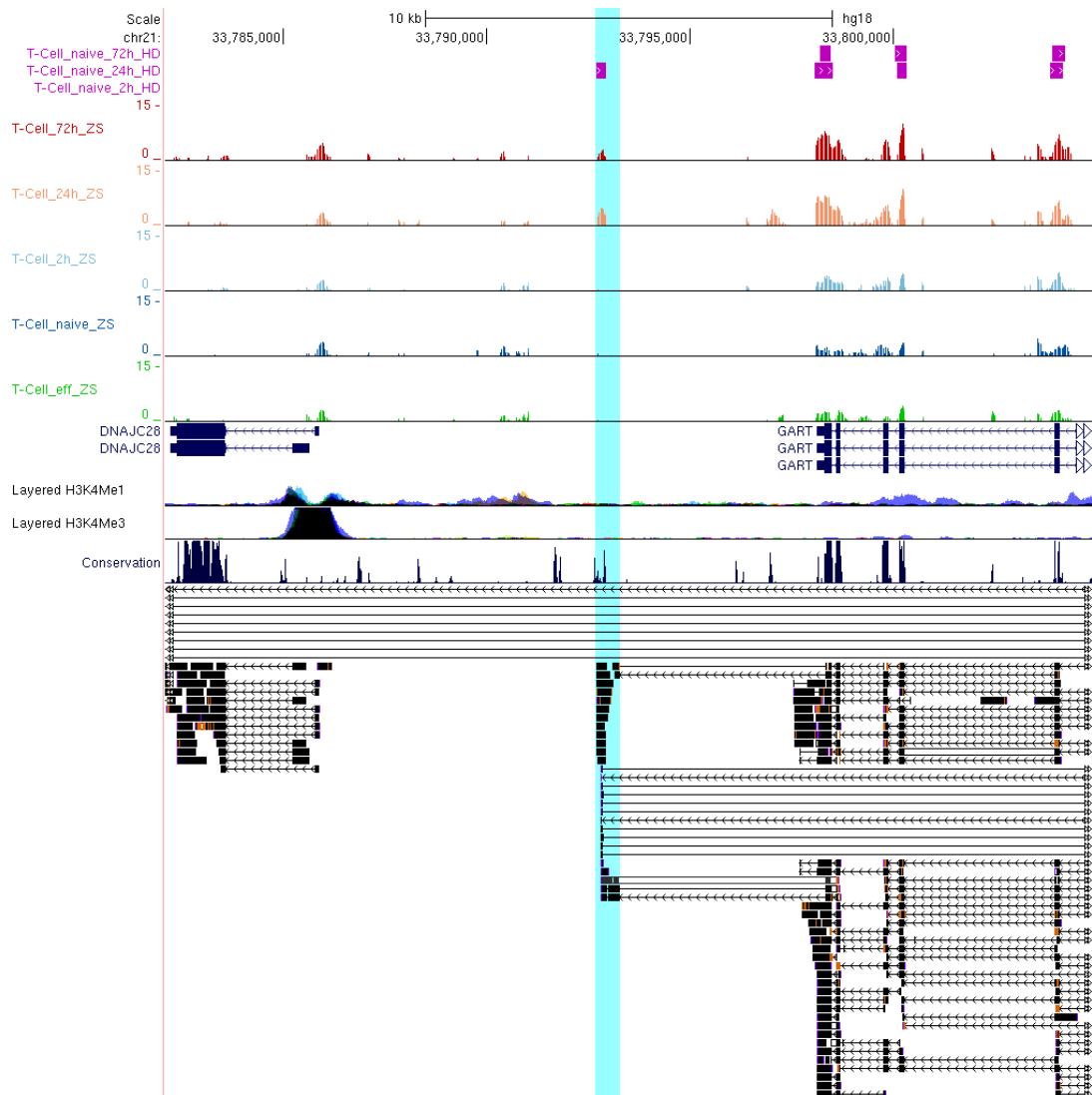


**Anhang Abb. VII: TREAT2 - Transkriptomanalyse der T-Zellaktivierung.**

Transcript regulated by activation in T cells 2 (chr22: 30 019 000 - 30 042 000 (hg18) Türkis hinterlegt) scheint ein antisense-Transkript von PIK3IP1 zu repräsentieren. Gezeigt sind Chromosomenkoordinaten und die Ergebnisse der Intervallanalyse (hoch exprimierte, differenzielle Bereiche in Pink dargestellt). Darunter folgen die Tiling Array-Daten der verschiedenen T-Zellaktivierungszustände (Effektor, naive, 2h, 24h und 72h). Dargestellt sind des Weiteren annotierte Gene, Histonmodifikationen, die Konservierung in Vertebraten sowie gespleißte und ungespleißte ESTs im ausgewählten Bereich.



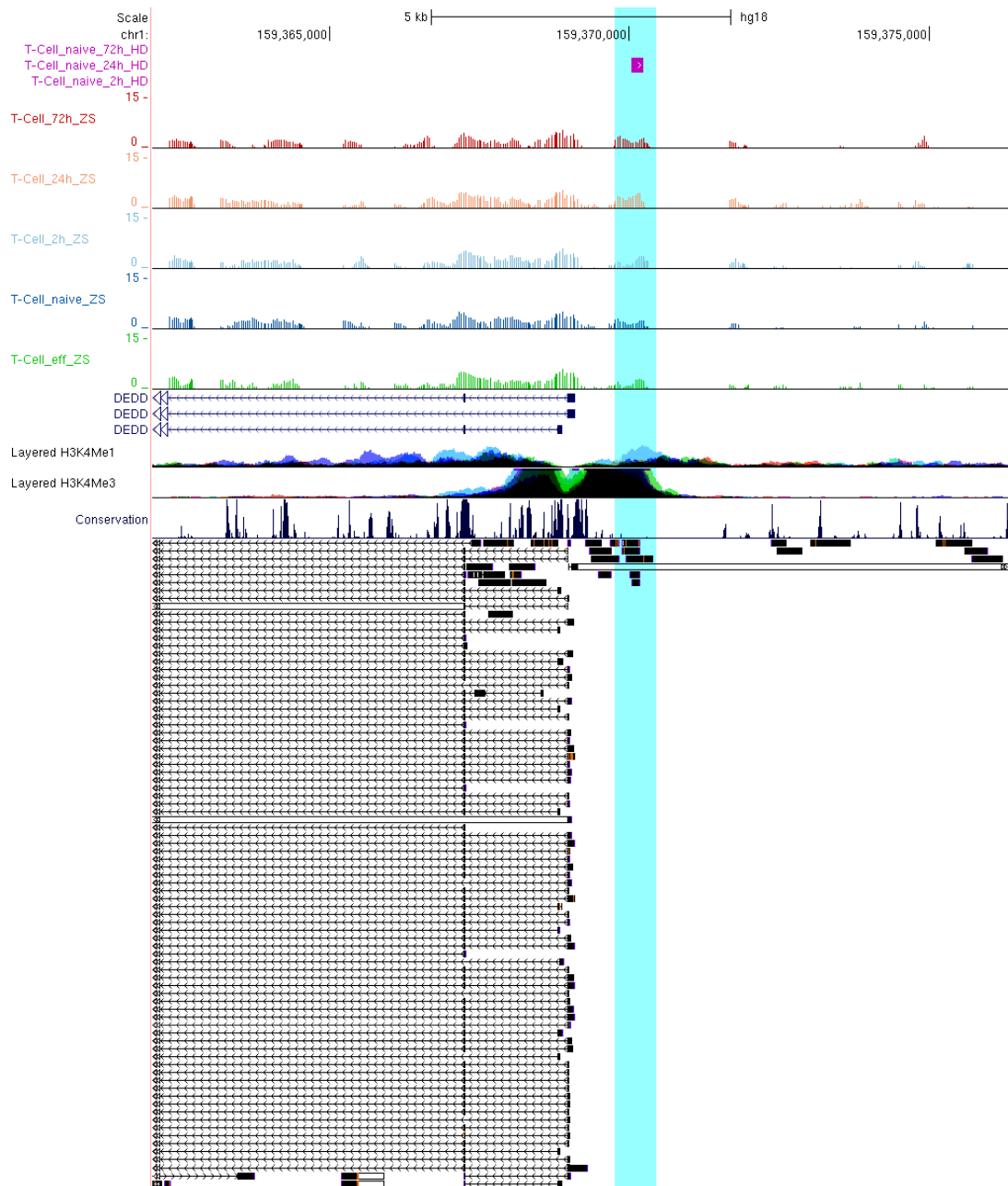




### Anhang Abb. IX: TREAT4 - Transkriptomanalyse der T-Zellaktivierung.

Transcript regulated by activation in T cells 4 (chr21: 33 792 700 - 33 793 300 (hg18) Türkis hinterlegt). Es handelt sich eventuell um ein alternatives 3'-Exon von GART. Gezeigt sind Chromosomenkoordinaten und die Ergebnisse der Intervallanalyse (hoch exprimierte, differentielle Bereiche in Pink dargestellt). Darunter folgen die Tiling Array-Daten der verschiedenen T-Zellaktivierungszustände (Effektor, naive, 2h, 24h und 72h). Dargestellt sind des Weiteren annotierte Gene, Histonmodifikationen, die Konservierung in Vertebraten sowie gespleißte und ungespleißte ESTs im ausgewählten Bereich.





**Anhang Abb. XI: TREAT6 - Transkriptomanalyse der T-Zellaktivierung.**

Transcript regulated by activation in T cells 6 (chr1: 159 369 700 - 159 370 500 (hg18) Türkis hinterlegt) repräsentiert ein Transkript, das vom Plusstrang transkribiert wird. Gezeigt sind Chromosomenkoordinaten und die Ergebnisse der Intervallanalyse (hoch exprimierte, differentielle Bereiche in Pink dargestellt). Darunter folgen die Tiling Array-Daten der verschiedenen T-Zellaktivierungszustände (Effektor, naive, 2h, 24h und 72h). Dargestellt sind des Weiteren annotierte Gene, Histonmodifikationen, die Konservierung in Vertebraten sowie gespleißte und ungespleißte ESTs im ausgewählten Bereich.

**Anhang Tab. I: Validierung Tiling Array-Daten der T-Zellaktivierung.** Zur Validierung der Tiling Arrays wurden einige differentiell exprimiert Transkripte mittels real-time PCR nachgemessen (Primer siehe Anhang Tab. II). Angegeben ist der *log2-fold change* der Proben im Vergleich zu naiven T-Zellen (qPCR). Zusätzlich sind die Ergebnisse der Intervall-Analyse gezeigt. Hierbei wurde für stark und im Vergleich zu naiven T-Zellen signifikant differentiell exprimierte Bereiche der *log2-fold change* berechnet (Tiling).

Gensymbol	RNA-Typ	Effektor		2h		24h		72h	
		Tiling	qPCR	Tiling	qPCR	Tiling	qPCR	Tiling	qPCR
GAPDH	mRNA	-	0,5	-	0,4	1,6	4,0	1,8	4,5
PPIA	mRNA	-	0,0	-	0,1	1,4	1,0	1,6	0,1
TNF	mRNA	-	1,8	3,0	8,3	2,8	8,3	1,7	4,9
pre-mir-155	miRNA	-	1,4	3,1	8,2	4,1	11,6	2,3	5,8
pre-mir-21	miRNA	-	2,0	2,9	6,5	2,4	6,7	2,2	4,1
pre-mir-29a	miRNA	-	1,3	1,9	6,5	1,8	7,3	-	2,5
U1	snRNA	-	-0,2	-	1,6	2,3	4,2	-	3,1
tRNA59-Ile	tRNA	-	-	3,0	7,2	2,6	7,9	-	5,1
tRNA33-His	tRNA	-	-	3,5	3,5	2,5	3,4	-	1,4
tRNA54-Lys	tRNA	-	1,8	3,9	9,6	3,6	11,1	-	7,9
tRNA9-Lys	tRNA	-	0,8	2,8	6,0	1,8	7,0	-	3,2
LINC00152/STAIR18	lncRNA	-	3,8	1,7	3,1	1,8	5,1	-	4,2
LINC00515	lncRNA	-	0,8	2,4	5,8	1,9	6,0	-	1,6
MIAT/STAIR15	lncRNA	-	4,1	-	0,9	-	0,0	1,7	3,7
SNHG16	lncRNA	-	1,0	-	1,3	2,1	3,4	-	-0,7
TREAT1	unbekannt	-	-1,0	-	-0,4	-1,7	-1,9	-1,6	-0,5
TREAT2	unbekannt	-	0,0	-1,7	-2,2	-2,3	-3,5	-2,1	-4,4
TREAT3	unbekannt	-	-1,1	-2,0	-0,9	-1,9	-1,1	-2,1	-2,2
TREAT4	unbekannt	-	1,9	-	0,4	1,8	2,2	-	2,3
TREAT5	unbekannt	-	1,5	-	1,3	2,4	4,2	-	2,2
TREAT6	unbekannt	-	0,1	-	1,2	2,8	2,4	-	-0,6

## Anhang Tab. II: Gene und Primer der T-Zell-Tiling-Validierung

Gensymbol	Genname	Forwärts-Primer	Rückwärts-Primer
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase	GTCAGTGGTGGACCTGACCT	AGGGGAGATTCAGTGTGGTG
PPIA	Peptidyl-Prolyl-cis-trans-Isomerase A	ATCCTAGAGGTGGCGGATTT	CACTCAGGTCTGAGCCACAA
TNF	Tumornekrosefaktor	AACCTCCTCTCTGCCATCAA	GGAAGACCCCTCCCAGATAG
pre-mir-155	Precursorform der microRNA 155	GTTAATGCTAATCGTGATAGGG	GCTAATATGTAGGAGTCAGTTGGA
pre-mir-21	Precursorform der microRNA 21	GCTTATCAGACTGATGTTGACTG	CAGCCCATCGACTGGTG
pre-mir-29a	Precursorform der microRNA 29a	ATGACTGATTTCTTTTGGTG	ATAACCGATTCAGATGGTG
U1	U1 small nuclear RNA	GCAGAGCCGTTCCTTAC	CTAGCGGGGAGTGTGTTCTC
tRNA59-Ile	Transport-RNA59 für Isoleucin (Anticodon AAT)	CTTAACCTTGCCCCGAGAAA	GGTGCCTATAGCCCCTTTGT
tRNA33-His	Transport RNA33 für Histidin (Anticodon GTG)	TTCAACATACTGGAGTGGAGACA	CAAGGCAACAAGCGTAGACA
tRNA54-Lys	Transport-RNA54 für Lysin (Anticodon TTT)	TTCGGGCGTTTGTAGTTTTC	TTCTCCCTGAAAACACGTC
tRNA9-Lys	Transport-RNA9 für Lysin (Anticodon CTT)	CGGCTAGCTCAGTCGGTAGA	CGCCCGCAAGAGTATTACA
LINC00152	long intergenic non-protein coding RNA 152	CGTGCCTGTCTTCAGATCTTC	GGGAATCTTTCAGCTGCATT
LINC00515	long intergenic non-protein coding RNA 515	TCCGTAGTCCCTGACCTCCAC	GGATGTGCAGCTTTTCCTTT
MIAT	myocardial infarction associated transcript	ACCCCTCCCTCATTTCAGTCT	AAGAGGGCCTTTGATGGAAT
SNHG16	small nucleolar RNA host gene 16	ATTAAAGGTGGTGGCTGTGG	AAAGAACGCATGGCGATTAC
TREAT1	Transcript regulated by activation in T cells 1	TGCAAAAGGGAAACTGAAGC	ACAGCCAAGACAAGAAATAAGG
TREAT2	Transcript regulated by activation in T cells 2	GTGGGAGGGTCCATATGTTT	AATGAACCCCTCGCTGCATAC
TREAT3	Transcript regulated by activation in T cells 3	AGTTCCTCCAGCTGGTCTCT	TTGGTTTCCAAGAGCTTCC
TREAT4	Transcript regulated by activation in T cells 4	TTGCAATGCTCAGAATACAGG	CTTCCAACCTCCAGGCTTTG
TREAT5	Transcript regulated by activation in T cells 5	GCCATTCCTGATTTGTGTT	CACAGTCATTTGCAAACTGG
TREAT6	Transcript regulated by activation in T cells 6	ATGATGGTCTGCCTGTGGA	TTGAGTCCCAACCCACATT

**Anhang Tab. III: STAIR18-Spleißstellen im LOC541471-Locus.** Angegeben sind die Häufigkeiten der sequenzierten Spleißereignisse in T-Zellen verschiedener Aktivierungszustände und die Anzahl der übereinstimmenden ESTs. **Grün**=LOC541471-Variante1 (5'-2/3'-9); **Rot**=LOC541471-Variante2 (5'-2/3'-7); **Türkis**=450bp Isoform der ncRNA152 (5'-1/3'-1); **Blau**=Spleißstellen, die für diesen STAIR18-Locus spezifisch sind.

Spleißstelle		Effektor	naiv	2h	24h	72h	Σ	ESTs	
sense	5'-1	3'-1	-	-	-	1	-	1	1
	5'-2	3'-3	-	-	-	1	-	1	-
	5'-2	3'-7	16	3	3	26	3	51	78
	5'-2	3'-9	10	2	7	42	-	61	56
	5'-2	3'-10	3	-	-	2	-	5	5
	5'-5	3'-2	-	-	-	1	10	11	1
	5'-6	3'-9	-	-	-	6	-	6	-
	5'-7	3'-3	-	1	-	-	1	2	1
	5'-7	3'-5	-	-	1	-	-	1	1
	5'-7	3'-7	-	-	-	6	1	7	1
	5'-7	3'-9	-	-	-	3	-	3	-
	5'-9	3'-5	-	-	4	-	-	4	-
	5'-10	3'-7	-	-	2	3	-	5	2
	5'-11	3'-7	-	-	4	15	-	19	-
	5'-11	3'-9	11	6	-	-	-	17	-
	5'-12	3'-7	-	-	-	1	-	1	-
	5'-13	3'-7	-	-	-	10	-	10	-
	5'-15	3'-8	1	-	-	-	-	1	-
	5'-16	3'-9	1	1	2	9	-	13	-
	5'-17	3'-10	3	-	-	7	-	10	27
	5'-18	3'-10	4	-	-	6	-	10	5
	5'-19	3'-11	-	-	-	1	-	1	-
	5'-19	3'-12	2	-	-	-	-	2	-
	5'-19	3'-13	1	-	-	-	-	1	1
	5'-19	3'-14	6	2	-	9	-	17	10
5'-19	3'-17	2	-	-	-	-	2	2	
5'-19	3'-18	-	-	-	11	-	11	6	
5'-20	3'-15	4	-	-	2	-	6	3	
5'-20	3'-17	2	-	-	-	-	2	1	
5'-20	3'-18	-	-	-	4	-	4	1	
5'-20	3'-21	-	-	-	1	-	1	-	
5'-21	3'-16	-	-	1	-	-	1	1	
5'-22	3'-18	2	-	-	1	-	3	-	
5'-23	3'-18	1	-	-	-	-	1	-	
5'-24	3'-19	3	-	-	-	-	3	-	
5'-24	3'-20	1	-	-	1	-	2	-	
5'-24	3'-22	-	-	-	4	-	4	4	
5'-24	3'-22	2	-	-	-	-	2	1	
5'-24	3'-23	1	-	-	-	-	1	-	
5'-25	3'-22	2	-	-	3	-	5	-	
antisense	5'-1	3'-3	-	1	-	-	-	1	-
	5'-2	3'-4	-	1	-	-	-	1	-
	5'-4	3'-13	3	-	-	-	-	3	-
	5'-8	3'-9	-	9	-	-	-	9	-
	5'-8	3'-10	10	-	-	-	-	10	-
	5'-11	3'-14	-	-	2	-	-	2	-
	5'-11	3'-18	-	-	-	1	-	1	-
	5'-13	3'-16	3	-	-	-	-	3	-
	5'-13	3'-17	15	2	-	-	-	17	-
	5'-14	3'-19	-	-	21	5	-	26	-
	5'-15	3'-20	-	-	-	1	-	1	-
5'-15	3'-21	4	2	-	36	17	59	2	

**Anhang Tab. IV: STAIR18-Spleißstellen im LINC00152-Locus.** Angegeben sind die Häufigkeiten der sequenzierten Spleißereignisse in T-Zellen verschiedener Aktivierungszustände und die Anzahl der übereinstimmenden ESTs. Orange=LINC00152-Variante1 (5'-2/3'-5\_5'-x/3'-6\_5'-10/3'-7); Grau=LINC00152-Variante2 (5'-2/3'-2\_5'-9/3'-7); Rot=LINC00152-Variante3 (5'-2/3'-7); Türkis=450bp Isoform der ncRNA152 (5'-1/3'-1); Blau=Spleißstellen, die für diesen STAIR18-Locus spezifisch sind.

Spleißstelle		Effektor	naiv	2h	24h	72h	Σ	ESTs	
sense	5'-1	3'-1	-	-	-	1	-	1	-
	5'-2	3'-2	-	-	3	5	-	8	-
	5'-2	3'-4	-	-	1	-	-	1	-
	5'-2	3'-5	-	-	7	-	-	7	3
	5'-2	3'-6	2	-	7	6	-	15	1
	5'-2	3'-7	35	5	17	69	11	137	72
	5'-2	3'-9	35	4	2	27	-	68	14
	5'-3	3'-2	-	-	-	1	-	1	-
	5'-3	3'-5	-	-	-	1	-	1	-
	5'-4	3'-2	1	-	-	-	-	1	-
	5'-5	3'-2	-	-	-	20	12	32	4
	5'-6	3'-9	-	-	-	5	-	5	2
	5'-7	3'-3	-	1	11	-	1	13	-
	5'-7	3'-5	-	-	6	-	-	6	-
	5'-7	3'-6	-	-	3	-	-	3	1
	5'-7	3'-7	-	-	-	20	10	30	2
	5'-7	3'-9	-	-	-	7	-	7	-
	5'-8	3'-5	1	-	-	-	-	1	-
	5'-9	3'-5	-	-	6	-	-	6	-
	5'-10	3'-7	-	-	2	3	-	5	3
5'-11	3'-7	-	-	4	16	-	20	-	
5'-11	3'-9	11	6	-	-	-	17	-	
5'-12	3'-7	-	-	-	1	-	1	-	
5'-13	3'-7	-	-	-	10	-	10	1	
5'-14	3'-8	1	-	-	-	-	1	-	
5'-16	3'-9	1	1	2	9	-	13	-	
5'-17	3'-10	3	-	-	7	-	10	13	
5'-18	3'-10	4	-	-	-	-	4	1	
5'-19	3'-11	-	-	-	1	-	1	-	
5'-19	3'-12	2	-	-	-	-	2	-	
5'-19	3'-13	1	-	-	-	-	1	-	
antisense	5'-1	3'-1	1	-	-	-	-	1	-
	5'-1	3'-2	1	4	-	-	-	5	-
	5'-1	3'-3	5	3	1	-	-	9	-
	5'-2	3'-4	5	3	-	-	-	8	-
	5'-3	3'-5	2	-	-	-	-	2	-
	5'-4	3'-6	-	-	-	2	-	2	-
	5'-4	3'-13	3	-	-	-	-	3	-
	5'-5	3'-6	1	-	-	3	-	4	-
	5'-6	3'-7	-	1	-	-	-	1	-
	5'-7	3'-8	8	1	-	-	-	9	-
	5'-8	3'-9	29	9	-	-	-	38	-
	5'-8	3'-10	8	-	-	-	-	8	-
	5'-9	3'-12	1	-	-	-	-	1	-
	5'-10	3'-11	-	-	-	1	-	1	-
	5'-11	3'-14	-	-	2	-	-	2	-
	5'-11	3'-18	-	-	-	1	-	1	-
	5'-12	3'-15	123	39	16	83	9	270	-
	5'-12	3'-17	101	24	7	43	3	178	-
5'-13	3'-16	3	-	-	-	-	3	-	
5'-13	3'-17	15	3	6	-	-	24	1	
5'-15	3'-20	-	-	-	1	-	1	-	
5'-15	3'-21	4	2	-	48	21	75	5	

**Anhang Tab. V: Transkriptionsfaktor-Bindungsstellen im STAIR18 Promotor.** Vorhergesagte Sequenzelemente des STAIR18/ncRNA152-Promotors [-800/200]. Die Untersuchung wurde mit dem MATCH™ 1.0 public Programm durchgeführt.

	Position(Strang)	Faktorname	core match	matrix match	Konsensussequenz
<b>A</b>	-759 (+)	c-Myc/Max	0.941	0.937	gatCACATggat
	-634 (+)	FOXJ2	1.000	0.968	ttgcagatAAACAttctc
	-633 (+)	Freac-7	1.000	0.978	tgacagATAAAcattct
	-631 (-)	HFH-3	1.000	0.959	cagatAAACAttc
	-630 (-)	FOXD3	0.996	0.918	agataAACATtc
	-630 (+)	GATA-X	1.000	0.966	aGATAAcatt
	-610 (-)	Nkx2-5	0.915	0.931	cTATTAag
	-553 (-)	Oct-1	0.992	0.937	atctaGAATAttctt
	-550 (+)	Oct-1	0.992	0.934	tagaaTATTCTtgaa
	-527 (+)	CDP CR1	0.910	0.898	gATGGAtaga
	-512 (-)	AP-1	1.000	0.947	ggtaAGTCAtg
	-499 (+)	Freac-7	1.000	0.967	aacttATAAAcagggc
	-469 (-)	Barbie Box	1.000	0.925	cagacaGCTTTgaa
	-434 (-)	SOX-9	1.000	0.931	gtgaATTGTtatgt
	-376 (+)	HNF-4	1.000	0.852	accagagCAAAGtaaactc
	-292 (+)	Oct-1	0.982	0.939	aagaaTTTCAtaca
	-264 (+)	HLF	0.939	0.898	ATTACaaaat
	-229 (-)	COUP-TF/HNF-4	0.988	0.890	gcacacaaaGTTCA
	-143 (-)	USF	0.929	0.941	ccATGTGg
<b>B</b>	-110 (+)	Elk-1	0.938	0.920	ggatcAGGAaggct
	-93 (+)	Elk-1	0.938	0.921	cttccAGGAagggc
	-92 (+)	STATx	0.933	0.960	TTCCAggaa
	-92 (-)	STATx	0.956	0.973	ttccAGGAA
	-77 (+)	RFX1	0.982	0.943	cagggaccctgGGAACcg
	-7 (-)	AP-1	1.000	0.989	tatgAGTCAGc
	-6 (-)	NF-E2	1.000	0.973	atgagTCAGCa
	-6 (+)	AP-1	1.000	1.000	atgAGTCAG
	+3 (-)	AP-1	1.000	0.972	catgAGTCAtc
	+4 (+)	AP-1	1.000	0.988	atgAGTCAt
	+4 (-)	AP-1	0.989	0.981	aTGAGTcat
<b>C</b>	+49 (+)	FOXD3	0.906	0.886	ttTTTTTttttt
	+105 (-)	CCAAT box	0.950	0.930	tgACTGGatggt
	+134 (+)	Oct-1	1.000	0.970	caaatTGACAttcc
	+142 (-)	Hand1/E47	1.000	0.946	cattCCAGAcaagcgg
	+164 (-)	USF	0.960	0.921	agccCGTGcc



**Anhang Tab. VI: Mikroarraydaten - ncRNA152-Knockdown.** In XG-1-Zellen wurden die ncRNA152 mit siRNA-Oligonukleotiden gegen das erste (si152\_E1) **(A)** bzw. zweite Exon (si152\_E2) **(B)** reduziert. Die Auswirkungen auf die Genexpression wurden mit Mikroarrays analysiert. Es wurde ein ungepaarter T-Test jeweils einer ncRNA152-siRNA gegen die Negativ-Kontrolle (Kontr.) durchgeführt. Die Mikroarray-Analysen basieren auf 3 unabhängigen Experimenten. Zum Filtern der Daten wurde ein Signifikanzniveau von  $p < 0,01$ , eine x-fache Veränderung von  $> 1,5$  sowie Signalstärke von  $> 50$  festgelegt.

### A

Gensymbol	Probe	p-Wert	Veränderung		Signalstärke		Genname
				x-fach	Kontr.	si152_E1	
NCRNA00152	A_24_P273143	0,0018	down	2.92	2103	1039	non-protein coding RNA 152
NCRNA00152	A_19_P00806397	0,0026	down	2.24	1715	1088	non-protein coding RNA 152
RAB5C	A_23_P107211	0,0027	down	1.83	891	707	RAB5C, member RAS oncogene family
LOC649395	A_24_P169574	0,0058	down	1.66	1756	1363	Pseudogen von YWHAE
YWHAE	A_24_P33444	0,0030	down	1.65	2004	1571	tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein, epsilon polypeptide
PAXIP1	A_23_P59426	0,0005	down	1.60	1002	855	PAX interacting (with transcription-activation domain) protein 1
BRWD3	A_32_P489130	0,0067	up	1.59	128	162	bromodomain and WD repeat domain containing 3
KDEL2	A_23_P19938	0,0064	down	1.55	1517	1247	endoplasmic reticulum protein retention receptor 2
SEC23A	A_23_P140170	0,0020	down	1.55	189	141	Sec23 homolog A (S. cerevisiae)

### B

Gensymbol	Probe	p-Wert	Veränderung		Signalstärke		Genname
				x-fach	Kontr.	si152_E2	
UQCRCQ	A_23_P213718	0,0008	R	2.53	4746	3474	ubiquinol-cytochrome c reductase, complex III subunit VII, 9.5kDa
STAT3	A_24_P116805	0,0002	R	1.77	390	509	signal transducer and activator of transcription 3
CSE1L	A_23_P17393	0,0002	R	1.75	660	539	CSE1 chromosome segregation 1-like (yeast)
NCRNA00152	A_24_P273143	0,0016	R	1.74	2103	1039	non-protein coding RNA 152
SGPL1	A_33_P3327847	0,0050	R	1.67	143	122	sphingosine-1-phosphate lyase 1
FAM91A1	A_24_P845072	0,0015	R	1.65	175	158	family with sequence similarity 91, member A1
FAM91A1	A_33_P3591761	0,0005	R	1.64	125	107	family with sequence similarity 91, member A1
SRXN1	A_23_P320113	0,0081	R	1.62	284	244	sulfiredoxin 1
CSE1L	A_33_P3284029	0,0002	R	1.61	877	730	CSE1 chromosome segregation 1-like (yeast)
ABCF2	A_23_P215175	0,0003	R	1.57	1056	918	ATP-binding cassette, sub-family F, member 2

# Danksagung

Ich danke Professor Dr. Torsten Schöneberg für die Möglichkeit meine Promotion an der Fakultät für Biowissenschaften, Psychologie und Pharmazie der Universität Leipzig durchzuführen sowie für die Begutachtung dieser Arbeit.

Mein ganz besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Professor Dr. Friedemann Horn für die Gelegenheit auf einem aktuellen und spannenden Forschungsgebiet zu arbeiten. Ich bin sehr dankbar für die großzügige Freiheit, die er mir bei der Durchführung gewährte, und seine Unterstützung bei der Umsetzung eigener Ideen. Gleichzeitig förderte er diese Arbeit durch Anregungen und fachliche Ratschläge in zahlreichen Diskussionen. Weiterhin danke ich ihm für die Möglichkeit an zahlreichen internationalen, wissenschaftlichen Konferenzen teilzunehmen.

Bei allen ehemaligen und derzeitigen Mitgliedern der Arbeitsgruppe von Professor Horn bedanke ich mich für die schöne Zusammenarbeit, die zahlreichen Hilfen und Ratschläge, die den Laboralltag bereichert haben, sowie die heiteren Gespräche am Mittagstisch. Außerordentlicher Dank gilt dabei Dr. Katja Brocke-Heidrich für ihre Betreuung und dafür, dass sie mich immer wieder auch über die Arbeit hinaus inspirierte.

Ich danke den Mitarbeitern der Arbeitsgruppe RNomics des Fraunhofer Instituts für Immunologie und Zellersatztherapie für die Unterstützung bei den Microarray-Experimenten sowie der Arbeitsgruppe Bioinformatics & Transcriptomics des Helmholtz-Zentrums für Umweltforschung für die Durchführung der Hochdurchsatz-Sequenzierungen. Meinen Dank auch an Dr. Renate Burger von der Universität Kiel für die Bereitstellung von Patientenproben.

Bei Dr. Stefanie Binder, Ivonne Zipfel und Tanja Bus bedanke ich mich zudem für das Korrekturlesen von Teilen meiner Arbeit.

Von ganzem Herzen danke ich meiner Familie, die mich immer unterstützt hat und zusammen mit vielen Freunden mein Privatleben unbeschreiblich bereichert.

# Publikationsverzeichnis

Ein Teil dieser Arbeit wurde beziehungsweise wird publiziert in:

Hackermüller J, Reiche K, Otto C, Hösler N, Blumert C, Brocke-Heidrich K, Böhlig L, Nitsche A, Kasack K, Ahnert P, Krupp W, Engeland K, Stadler P, Horn F. **Cell cycle, oncogenic and tumor suppressor pathways regulate numerous long and macro non-protein coding RNAs.** *Genome Biology* 15, 1–23 (2014)

Binder S\*, Hösler N\*, Zipfel I, Blumert C, Buschmann T., Reiche K, Brocke-Heidrich K, Burger R, Stadler P, Hackermüller J, Horn F. **STAIR18 – a STAT3-induced long noncoding RNA regulates survival of multiple myeloma cells.** *Blood* (Manuskript in Vorbereitung)

\* gleichberechtigte Erstautoren

## Vorträge

- Juni 2010      13st Meeting on T-Cells Subsets and Functions, Marburg  
“Identification of ncRNAs regulating differentiation and function of CD4<sup>+</sup> T cells”
- Dez. 2011      LIFE-Doktorandenkolloquium, Leipzig  
„How to work with primary human T helper cells“

## Ausgewählte Posterpräsentationen

- Okt. 2010      EMBL Symposium “The Non-Coding Genome”, Heidelberg  
“Stat3-regulated ncRNAs in tumor cells”
- Okt. 2011      9<sup>th</sup> joint meeting of ICS-ISICR “Cytokines and Interferons”, Florenz (Italien)  
“Identification of ncRNAs regulating differentiation and function of CD4<sup>+</sup> T cells”
- April 2012      Keystone Symposia “Non-coding RNAs”, Snowbird, Utha (USA)  
„IL-6-regulated non-coding RNAs in tumor cells“

# Selbstständigkeitserklärung

Hiermit erkläre ich, die vorliegende Dissertation selbständig und ohne unzulässige fremde Hilfe angefertigt zu haben. Es wurden keine anderen Quellen genutzt als jene, die im Literaturverzeichnis angeführt sind. Sämtliche Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder unveröffentlichten Schriften entnommen wurden, sind als solche kenntlich gemacht. Ferner sind alle von anderen Personen bereitgestellten Materialien oder Dienstleistungen als solche gekennzeichnet. Ich versichere, nicht die Hilfe eines Promotionsberaters in Anspruch genommen zu haben. Zudem hat keine Person von mir geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen. Die Arbeit wurde bisher weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer Prüfungsbehörde zum Zwecke einer Promotion vorgelegt. Ich habe keine früheren erfolglosen Promotionsversuche unternommen.

Leipzig, den 08.01.2015

Nadine Hösler