

# **Untersuchungen zur post-transkriptionalen Kontrolle der Genexpression in Maus-Makrophagen**

Von der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften  
der RWTH Aachen University zur Erlangung des akademischen Grades  
einer Doktorin der Naturwissenschaften genehmigte Dissertation

vorgelegt von

Diplom-Biochemikerin  
**Anke Liepelt**

aus Zittau

Berichter: Professorin Dr. Antje Ostareck-Lederer  
Universitätsprofessor Dr. Björn Usadel

Tag der mündlichen Prüfung: 8.10.2014

Diese Dissertation ist auf den Internetseiten der Hochschulbibliothek  
online verfügbar.

# Inhaltsverzeichnis

<b>Zusammenfassung</b>	<b>1</b>
<b>Summary</b>	<b>2</b>
<b>1 Einleitung</b>	<b>3</b>
1.1 Das Immunsystem und Inflammation . . . . .	3
1.1.1 Differenzierung von Leukozyten . . . . .	3
1.1.2 Inflammation und die Entwicklung einer Sepsis . . . . .	4
1.1.3 Makrophagen . . . . .	5
1.1.4 Aktivierung des TLR4-Signalwegs durch Lipopolysaccharide . .	6
1.2 TAK1 . . . . .	8
1.2.1 TAK1 nimmt im TLR4-Signalweg eine zentrale Position ein . .	8
1.2.2 Zelltypspezifische Funktionen . . . . .	8
1.2.3 TAK1 in der Krebsentstehung . . . . .	9
1.3 AKT2 . . . . .	10
1.4 Post-transkriptionale Kontrolle der Genexpression . . . . .	11
1.4.1 Die Initiation der Translation . . . . .	11
1.4.2 Regulation durch RNA-bindende Proteine . . . . .	13
1.4.3 Regulation durch miRNAs . . . . .	14
1.5 Post-transkriptionale Kontrolle der Genexpression während der Immunantwort . . . . .	16
1.5.1 TTP destabilisiert mRNAs und inhibiert deren Translation . . .	16
1.5.2 AUF1 aktiviert die Translation der MYC und TAK1 mRNAs . .	16
1.6 Die Funktionen von hnRNP K in der post-transkriptionalen Kontrolle .	17
1.6.1 Die Rolle von hnRNP K während der erythroiden Reifung . . .	18
1.6.2 HnRNP K beeinflusst die Stabilität der COX-2 mRNA . . . . .	20
1.7 Zielstellung . . . . .	21
<b>2 Material und Methoden</b>	<b>22</b>
2.1 Chemikalien, Enzyme, Größenstandards, Kits . . . . .	22
2.2 Antikörper . . . . .	25
2.3 Oligonukleotide, Plasmide . . . . .	26
2.4 Verbrauchsmaterialien, Geräte, Software . . . . .	30
2.5 Mikrobiologische Methoden . . . . .	31
2.5.1 Transformation von Bakterien . . . . .	31
2.5.2 Präparation von bakteriellen Plasmiden . . . . .	31
2.6 Molekularbiologische Methoden . . . . .	31
2.6.1 Klonierungen . . . . .	31
2.6.2 Restriktionsverdau und Sequenzierung . . . . .	32
2.6.3 Reinigung von Nukleinsäuren . . . . .	32
2.6.4 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren . . . . .	32

---

2.6.5	Agarose-Gelelektrophorese . . . . .	32
2.6.6	Denaturierende Gelelektrophorese mit Harnstoff . . . . .	32
2.7	Kultivierung und Analyse der RAW 264.7-Zellen . . . . .	33
2.7.1	Kultivierung, LPS-Stimulation und Ernte . . . . .	33
2.7.2	Transfektion von siRNAs . . . . .	33
2.7.3	Actinomycin D-Behandlung . . . . .	33
2.7.4	Präparation von Triton-Lysaten . . . . .	34
2.7.5	Präparation translationsaktiver zytoplasmatischer Extrakte . . .	34
2.7.6	Präparation von zytoplasmatischen Extrakten für die Dichte- gradientenzentrifugation . . . . .	34
2.7.7	FACS . . . . .	35
2.8	Analyse von Proteinen . . . . .	36
2.8.1	Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford . . . . .	36
2.8.2	Methanol-Chloroform-Fällung von Proteinen . . . . .	36
2.8.3	Polyacrylamid-Gelelektrophorese . . . . .	36
2.8.4	Western-Blot . . . . .	36
2.8.5	Silberfärbung von Proteinen im Polyacrylamid-Gel . . . . .	37
2.8.6	ELISA . . . . .	37
2.9	Präparation und Analyse von RNA . . . . .	38
2.9.1	Isolierung von Gesamt-RNA . . . . .	38
2.9.2	DNase-Verdau . . . . .	38
2.9.3	Reverse Transkription . . . . .	39
2.9.4	Semi-quantitative PCR . . . . .	39
2.9.5	Quantitative PCR . . . . .	39
2.9.6	Microarray-Analyse . . . . .	40
2.9.7	In vitro-Transkription . . . . .	41
2.9.8	In vitro-Transkription von radioaktiv markierter RNA . . . . .	41
2.9.9	Radioaktive Markierung von Oligonukleotiden . . . . .	42
2.10	In vitro-Translation . . . . .	42
2.11	UV crosslink-Experimente . . . . .	43
2.12	Immunpräzipitation . . . . .	44
2.13	Immunfluoreszenz-Färbung . . . . .	44
2.14	Saccharosedichtegradientenzentrifugation . . . . .	45
2.15	Präparation und Analyse RNA-bindender Proteine . . . . .	45
2.16	Analyse von miRNAs . . . . .	47
2.16.1	Klonierung der cDNA-Bibliotheken . . . . .	47
2.16.2	Northern Blot . . . . .	50
2.17	Statistische Auswertungen . . . . .	52
<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>53</b>
3.1	Aktivierung von Makrophagen durch LPS . . . . .	53
3.2	Identifizierung von hnRNP K-assoziierten mRNAs . . . . .	56
3.3	Die Translation der TAK1 mRNA wird durch hnRNP K inhibiert . . .	60
3.3.1	HnRNP K bindet in vitro mit der KH-Domäne 3 an spezifische Sequenzen in der 3'UTR der TAK1 mRNA . . . . .	60
3.3.2	Reduzierung der hnRNP K-Expression bewirkt eine gesteigerte Expression von TAK1 . . . . .	62

3.3.3	Die Translation der TAK1 mRNA wird durch Reduzierung der hnRNP K-Expression gefördert . . . . .	63
3.3.4	Reduzierung der hnRNP K-Expression fördert die Aktivierung der Makrophagen . . . . .	66
3.3.5	Im Verlauf der Makrophagenaktivierung kommt es zu einer Interaktion von hnRNP K mit c-Src und zu einer vermehrten Tyrosin-Phosphorylierung von hnRNP K . . . . .	68
3.3.6	Der Einfluss von hnRNP K auf die Translation von TAK1 geht im Laufe der LPS-Antwort verloren . . . . .	69
3.4	Die Translation der AKT2 mRNA wird durch hnRNP K aktiviert . . .	71
3.4.1	Die KH-Domäne 3 von hnRNP K interagiert mit der 3'UTR der AKT2 mRNA in vitro . . . . .	71
3.4.2	HnRNP K beeinflusst nicht die Stabilität der AKT2 mRNA . .	72
3.4.3	HnRNP K aktiviert die Translation von AKT2 unabhängig von der Makrophagenaktivierung . . . . .	73
3.5	Das Maus-Makrophagen-mRNA-Interaktom . . . . .	75
3.5.1	Erstellung eines Maus-Makrophagen-Interaktoms . . . . .	75
3.5.2	Klassifizierung der Proteine des Maus-Makrophagen-Interaktoms	79
3.5.3	Vergleich des Makrophagen-Interaktoms mit anderen Interaktomen	81
3.5.4	Drei RBPs sind unterschiedlich stark an polyadenylierte RNA gebunden . . . . .	82
3.6	Maus-Makrophagen-microRNA-Bibliotheken . . . . .	83
<b>4</b>	<b>Diskussion und Ausblick</b>	<b>85</b>
4.1	Die Rolle von hnRNP K in der Immunantwort . . . . .	86
4.1.1	Die Translationskontrolle der TAK1 mRNA durch hnRNP K . .	88
4.1.2	Die Translationskontrolle der AKT2 mRNA durch hnRNP K . .	90
4.1.3	Zur Phosphorylierung von hnRNP K . . . . .	91
4.1.4	Zum Mechanismus der mRNA-Translationskontrolle . . . . .	93
4.1.5	Ausblick . . . . .	95
4.2	Das regulatorische RNA-Protein-Netzwerk . . . . .	97
4.2.1	Zur RBP-Anreicherung . . . . .	97
4.2.2	Die neu identifizierten RBPs . . . . .	97
4.2.3	Die Makrophagen-spezifischen RBPs . . . . .	98
4.2.4	Regulation der RNA-Bindung durch Phosphorylierung . . . . .	98
4.2.5	Die differentiell interagierenden RBPs . . . . .	99
4.2.6	Ausblick . . . . .	100
	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>102</b>
	<b>Anhang</b>	<b>117</b>
	Weitere Quellen . . . . .	117
	Abkürzungsverzeichnis . . . . .	118
	Inkubationsbedingungen der Antikörper . . . . .	121
	Eidesstattliche Erklärung . . . . .	122
	Danksagung . . . . .	125

# Zusammenfassung

Makrophagen sind die ersten Immunzellen, die auf eindringende Krankheitserreger reagieren. Bestandteile dieser Krankheitserreger, wie z. B. Lipopolysaccharide (LPS) von gramnegativen Bakterien, lösen eine Immunantwort in der Zelle aus. Um Schaden am Organismus zu vermeiden, unterliegt diese Immunreaktion einer strengen Kontrolle. Eine Regulation ist an verschiedenen Stellen möglich: bei der Aktivierung von Kinasen, der Degradation von Proteinen der Signalwege, der transkriptionalen oder der post-transkriptionalen Aktivierung der Genexpression. Post-transkriptionale Kontrolle wird beispielsweise über die Modulation der mRNA-Stabilität und der mRNA-Translation durch RNA-bindende Proteine oder microRNAs erreicht.

Ziel dieser Arbeit war es, RNA-bindende Proteine und microRNAs, die im Rahmen der Makrophagenaktivierung durch LPS agieren, zu identifizieren und zu charakterisieren. Hierbei wurde zunächst die spezielle Funktion des Proteins *heterogeneous nuclear ribonucleoprotein* (hnRNP) K untersucht, das bereits als post-transkriptionaler Regulator beschrieben ist. Es konnten zwei mRNAs identifiziert werden, die während der Immunantwort translational durch hnRNP K reguliert werden.

In unbehandelten Makrophagen wird die mRNA der *transforming growth factor- $\beta$  activated kinase 1* (TAK1) durch hnRNP K translational inhibiert. Im Verlauf der LPS-induzierten Makrophagenaktivierung wird die Interaktion der mRNA mit hnRNP K aufgehoben und es kommt zur vermehrten Translation der TAK1 mRNA. Eine c-Src-abhängige Tyrosin-Phosphorylierung von hnRNP K könnte dabei eine Rolle spielen. Es konnte weiterhin gezeigt werden, dass eine Reduzierung der hnRNP K-Expression zu einer gesteigerten Produktion von Zytokinen, den Mediatoren der Immunantwort, führt. HnRNP K bindet auch die mRNA der Proteinkinase B- $\beta$  (AKT2) und aktiviert deren Translation sowohl in unbehandelten als auch in aktivierten Makrophagen. Hierbei sind der Mechanismus und die Konsequenzen noch unbekannt.

An der Regulation der Immunantwort auf post-transkriptionaler Ebene sind auch andere RNA-bindende Proteine und microRNAs beteiligt. Durch eine Anreicherung und Identifizierung der RNA-bindenden Proteine in Makrophagen konnte ein 'mRNA-Interaktom' erstellt werden. Das Interaktom bildet die Grundlage für die Untersuchung weiterer regulatorischer Mechanismen während der Immunantwort. Durch die Identifizierung von LPS-regulierten microRNAs wurde zudem eine Basis für die Analyse microRNA-vermittelter post-transkriptionaler Regulation geschaffen.

## Summary

Macrophages are the first line of defense against invading pathogenic organisms. Pathogenic components like lipopolysaccharides (LPS) of gram negative bacteria trigger the intracellular immune response. To avoid damage to the organism this immune reaction must be tightly controlled. A regulation is possible at different steps: at kinase activation, degradation of signaling proteins, transcriptional and post-transcriptional activation of gene expression. Post-transcriptional control is mediated for instance through modulation of mRNA stability and mRNA translation by RNA binding proteins or microRNAs.

The aim of this work was to identify and characterize RNA binding proteins and microRNAs, which operate during the LPS induced macrophage activation. Thus the specific function of the heterogeneous nuclear ribonucleoprotein (hnRNP) K, which is already described as a post-transcriptional regulator, was studied initially. Two mRNAs could be identified, which are translationally regulated by hnRNP K during inflammation.

The mRNA of transforming growth factor- $\beta$  activated kinase 1 (TAK1) is translationally inhibited by hnRNP K in untreated macrophages. During LPS induced macrophage activation the interaction between the mRNA and hnRNP K is abrogated and the translation of TAK1 mRNA is induced. A possible c-Src dependent tyrosine phosphorylation could play a role in this process. Further it was shown that the reduction of hnRNP K expression leads to an increased production of cytokines - the mediators of inflammation. HnRNP K binds the mRNA of protein kinase B- $\beta$  (AKT2) and activates its translation in untreated as well as in LPS-stimulated macrophages. The mechanism and the consequences of this regulation are yet unknown.

There are other proteins and microRNAs which are involved in the post-transcriptional regulation of the immune response. By enrichment and identification of RNA binding proteins in macrophages an 'mRNA interactome' was created. The interactome serves as a basis to study additional regulatory mechanisms during inflammation. Furthermore, by identification of LPS-regulated microRNAs a foundation was established for the analysis of microRNA mediated post-transcriptional control.

# 1 Einleitung

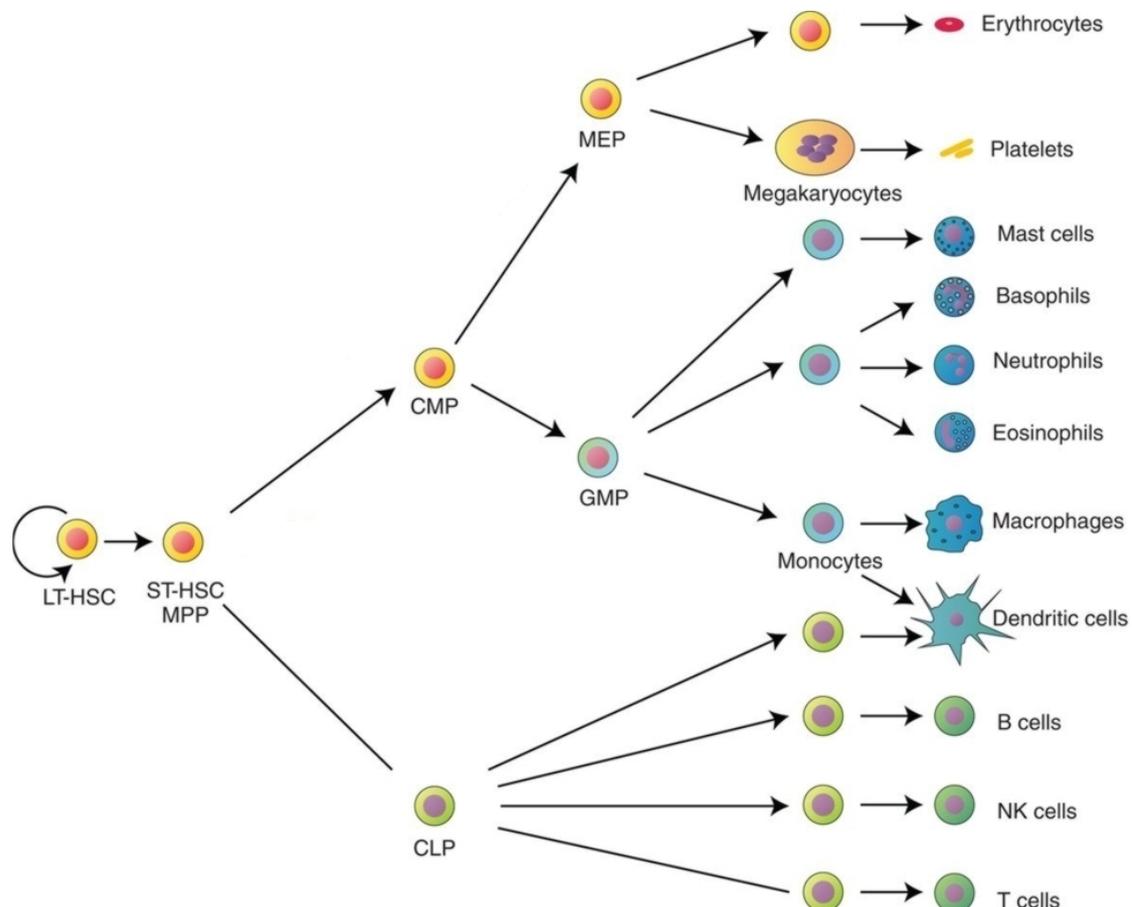
## 1.1 Das Immunsystem und Inflammation

Das Immunsystem verteidigt den Organismus gegen eindringende Pathogene, wie Viren, Bakterien, Pilze und Parasiten. Dabei wird zwischen der erworbenen und der angeborenen Immunantwort unterschieden. Die erworbene oder adaptive Immunantwort richtet sich spezifisch gegen einen Krankheitserreger und bewirkt ihm gegenüber eine dauerhafte Immunität. Die angeborene Immunantwort ist ständig und schnell verfügbar und bekämpft durch eine Vielzahl von Resistenzmechanismen ein breites Spektrum von Pathogenen. Die Immunzellen (Leukozyten), die bei der adaptiven Immunantwort hauptsächlich von Bedeutung sind, sind die B- und die T-Lymphozyten. Alle anderen Leukozyten, wie Makrophagen, Granulozyten, Mastzellen, Dendritische Zellen oder natürliche Killer (NK)-Zellen spielen bei der angeborenen Immunität eine Rolle. Einige Funktionen dieser Zellen sind aber auch für eine funktionierende adaptive Immunantwort nötig.

### 1.1.1 Differenzierung von Leukozyten

Viele Leukozyten haben eine kurze Lebensdauer und unterliegen deshalb einer ständigen Neubildung (Hämatopoese). Sie entwickeln sich aus ruhenden Vorläuferzellen aus dem Knochenmark, den hämatopoetischen Stammzellen (LT-HSC) (Abbildung 1.1). Aus diesen gehen die proliferierenden hämatopoetischen Stammzellen (ST-HSC) hervor, die dann weiter zu pluripotenten Vorläuferzellen (MPP) differenzieren. MPPs können sich zu zwei verschiedenen Arten von Stammzellen mit eingeschränkten Differenzierungsmöglichkeiten entwickeln: den gemeinsamen myeloiden Vorläuferzellen (CMP) und den gemeinsamen lymphoiden Vorläuferzellen (CLP). Zum Einen sind CMPs Vorläuferzellen für Megakaryozyten und Erythrozyten (MEP), aus denen die Blutplättchen und Erythrozyten hervorgehen. Zum Anderen können CMPs auch Vorläuferzellen für Granulozyten und Makrophagen (GMP) hervorbringen. Es gibt drei Typen von Granulozyten: Basophile, Neutrophile und Eosinophile, die anhand der Färbungseigenschaften ihrer Granula unterschieden werden. Granulozyten spielen bei der Abwehr von großen Pathogenen, wie Parasiten, eine wichtige Rolle. Aus GMPs können auch Mastzellen entstehen, deren bekannteste Funktion die Vermittlung aller-

gischer Reaktionen ist. GMPs können außerdem zu Monozyten ausdifferenzieren, die nach Einwanderung ins Gewebe zu Makrophagen reifen (siehe Kapitel 1.1.3). Sowohl Monozyten als auch CLPs können Dendritische Zellen (DC) hervorbringen. CLPs bilden weiterhin alle Klassen von Lymphozyten, wie B-Zellen, NK-Zellen und T-Zellen [Dzierzak & Philipsen, 2013; Yanez *et al.*, 2013].



**Abbildung 1.1: Hämatopoese** (Abbildung adaptiert von [Dzierzak & Philipsen, 2013]). *long-term hematopoietic stem cell* (LT-HSC), *short-term hematopoietic stem cell* (ST-HSC), *multi-potential progenitor* (MPP), *common myeloid progenitor* (CMP), *common lymphocyte progenitor* (CLP), *megakaryocyte-erythroid progenitor* (MEP), *granulocyte-macrophage progenitor* (GMP), *natural killer* (NK) cell

## 1.1.2 Inflammation und die Entwicklung einer Sepsis

Pathogene besitzen konservierte Strukturen (*pathogen-associated molecular patterns*, PAMPs), welche durch Rezeptoren einiger Leukozyten erkannt werden. Dies führt zur Aktivierung der Zellen und setzt verschiedene Mechanismen in Gang, mit dem Ziel die Pathogene zu eliminieren. Durch Phagozytose werden die Erreger aufgenommen und beseitigt. Weiterhin kommt es zu einer Freisetzung von Zytokinen, Chemokinen und anderen Mediatoren, um eine lokale Entzündung auszulösen und andere Leukozyten zu rekrutieren. Wenn eine Entzündung sich auf weitere Teile des Körpers ausbreitet,

liegt ein *systemic inflammatory response syndrome* (SIRS) vor. Dieses kann auch durch Operationen, Traumata und großflächige Wunden oder Verbrennungen verursacht werden. Wird zudem eine Infektion vermutet oder nachgewiesen, liegt per Definition eine Sepsis vor [Bone *et al.*, 1992].

Septische Patienten durchlaufen in der Regel zwei Phasen der Immunantwort. Während zu Beginn eine pro-inflammatorische Reaktion dominiert (*‘cytokine storm’*), kommt es im Verlauf der Sepsis zu einer hypo-inflammatorischen Reaktion (*‘immune-paralysis’*), ausgelöst durch Apoptose von Zellen des angeborenen und erworbenen Immunsystems [Boomer *et al.*, 2014; Hotchkiss *et al.*, 2013]. Sepsis ist die häufigste Todesursache auf Intensivstationen in Deutschland mit einer Mortalitätsrate von 48% [Engel *et al.*, 2007], wobei die zweite Phase der Immunsuppression die meisten Todesfälle verursacht [Hotchkiss *et al.*, 2013]. Die internationalen Leitlinien der *‘Surviving Sepsis Campaign’* zur Behandlung der schweren Sepsis und des septischen Schocks geben eine Reihe von Empfehlungen. So soll eine rasche Flüssigkeitsgabe und antimikrobielle Therapie erfolgen, die mit einer Fokuskontrolle und Prävention weiterer Infekte einhergeht [Dellinger *et al.*, 2013]. Konkretere therapeutische Ansätze sind jedoch nicht ausformuliert. Ursache dafür ist ein Fehlen effizient wirkender Therapeutika, da viele klinische Studien mit neuen Medikamenten erfolglos blieben. Beispielsweise wurde 2011 das lange angewandte Medikament Xigris aufgrund neuer klinischer Daten, die eine mangelnde Wirksamkeit zeigten, vom Markt genommen [Ranieri *et al.*, 2012].

### 1.1.3 Makrophagen

Ende des 19. Jahrhunderts erforschte der russische Entwicklungsbiologe und Immunologe Ilya Mechnikov (1845 - 1916) die Phagozytose und postulierte als Erster eine Rolle von Makrophagen bei der Embryonalentwicklung, der Homöostase und bei der Abwehr von Pathogenen (zusammengefasst in [Tauber, 2003]). Makrophagen sind ein Hauptbestandteil des angeborenen Abwehrmechanismus gegenüber eindringenden Krankheitserregern. Neben ihrer Funktion im Immunsystem sind Makrophagen essentiell für die Regenerierung von Erythrozyten und spielen bei der Beseitigung apoptotischer Zellen eine Rolle. Anders als bei der Immunantwort, verlaufen diese Prozesse ohne eine *‘klassische’* Aktivierung der Makrophagen. Die Unterteilung in klassische (M1) und alternative (M2) Makrophagenaktivierung ist nur unzureichend und spiegelt nicht die komplexe Heterogenität der Makrophagenpopulationen wieder [Mosser & Edwards, 2008; Gordon & Martinez, 2010]. Zur leichteren Verständlichkeit werden im folgenden die M1- und M2-Subtypen erläutert. Klassisch aktivierte Makrophagen beschreiben Effektorzellen, die im Rahmen der angeborenen Immunantwort zur Pathogenabwehr beitragen. Sie zeichnen sich durch Sekretion von pro-inflammatorischen Zytokinen und einer anti-mikrobiellen sowie tumorinhibierenden Aktivität aus [Mosser & Edwards,

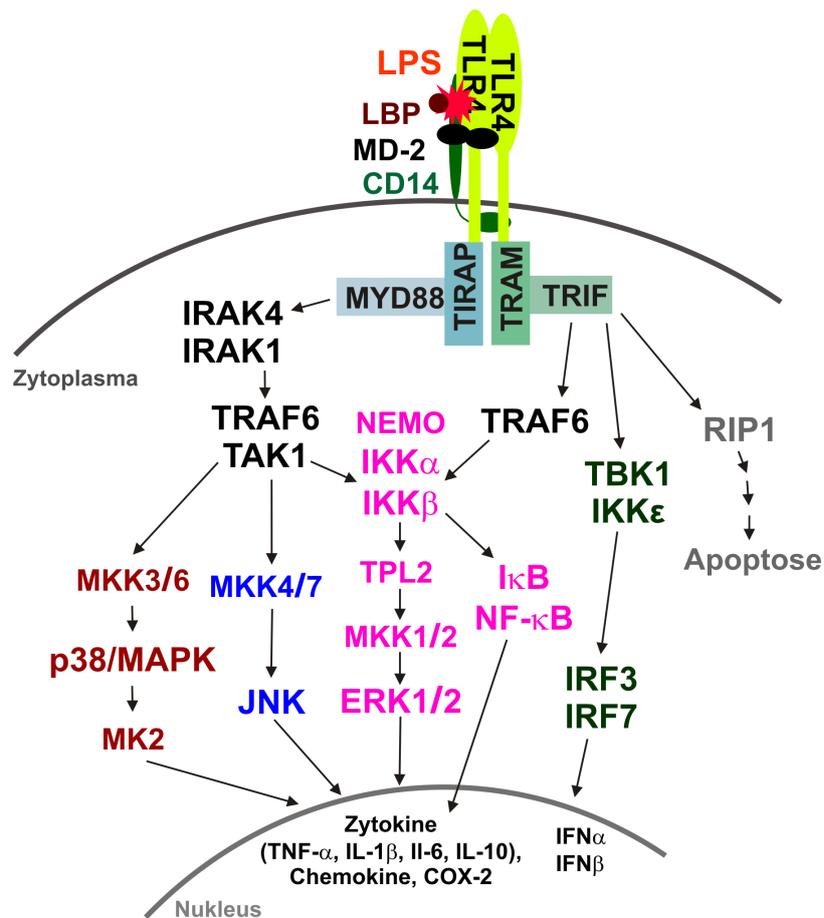
2008; Sica & Mantovani, 2012]. Alternativ aktivierte Makrophagen wirken durch Bildung von anti-inflammatorischen Zytokinen, wie Interleukin (IL)-10, immunregulatorisch. Sie können eine Endotoxin-Toleranz induzieren und zeichnen sich durch erhöhte Aktivität der Arginase 1 aus, welche zur Bildung von Proteinen der extrazellulären Matrix und damit zur Wiederherstellung von zerstörtem Gewebes beiträgt [Tacke, 2009; Mosser & Edwards, 2008; Gordon & Martinez, 2010; Ma *et al.*, 2003].

#### 1.1.4 Aktivierung des TLR4-Signalwegs durch Lipopolysaccharide

Einige Bestandteile von Pathogenen werden durch Rezeptoren auf der Zellmembran von Makrophagen erkannt, was zu deren Aktivierung führt (siehe Kapitel 1.1.2). Eine wichtige Gruppe von Rezeptoren stellen die *toll-like*-Rezeptoren (TLR) dar, von denen bisher im Menschen zehn und in der Maus zwölf identifiziert wurden [Bode *et al.*, 2012]. Man unterscheidet die TLRs nach ihrer Eigenschaft Nukleinsäuren, Proteine oder Lipide zu erkennen [O'Neill, 2006]. Lipopolysaccharide (LPS, 'Endotoxine'), die in der äußeren Membran der meisten gramnegativen Bakterien vorhanden sind, werden vom TLR4 erkannt. LPS bestehen aus einem Lipid A- und einem variablen Polysaccharid-Teil, wobei die Lipid A-Komponente ausreichend ist, um eine toxische Reaktion auszulösen [Schletter *et al.*, 1995]. Die Bindung von LPS an den TLR4 löst ein komplexes Netzwerk von Signalkaskaden aus [Oda & Kitano, 2006], welches vereinfacht in Abbildung 1.2 dargestellt ist.

LPS bildet mit dem LPS-bindenden Protein (LBP; für weitere Abkürzungen siehe Abbildung 1.2) einen Komplex, der vom CD14 erkannt und zum TLR4-MD2-Rezeptorkomplex transferiert wird. Dadurch wird die Dimerisierung des Rezeptorkomplexes induziert, was die Weiterleitung des Signals durch die intrazelluläre Domäne vom TLR4 und assoziierte Adaptorproteine auslöst [Park *et al.*, 2009]. Hierbei gibt es zwei Hauptsignalwege: den MYD88-abhängigen und den MYD88-unabhängigen Weg, die jeweils zu einer 'frühen' und 'späten' Aktivierung von NF- $\kappa$ B führen [Kawai *et al.*, 2001].

Die Assoziation der Adapterproteine TIRAP und MYD88 bildet die Grundlage für die Rekrutierung der Kinasen IRAK1 und IRAK4, was letztere dazu befähigt, sich durch Autophosphorylierung zu aktivieren [Cheng *et al.*, 2007]. IRAK4 phosphoryliert IRAK1, die daraufhin vom Rezeptorkomplex dissoziiert, um mit einem Multiproteinkomplex zu interagieren, der TRAF6, TAK1 und die TAK1-bindenden Proteine enthält (siehe auch Kapitel 1.2.1). Daraus resultiert die Aktivierung der MAP3-Kinase TAK1, die nun in der Lage ist, durch Phosphorylierung der entsprechenden MAP2-Kinasen (MKKs) den p38- oder den JNK-Signalweg zu aktivieren. Beide Wege führen zur Aktivierung von verschiedenen Untereinheiten des Transkriptionsfaktors AP-1 und zur Induktion der Transkription. Die Kinase p38 ist weiterhin in der Lage MK2 zu phosphorylieren und so die Stabilität und Translation von Zytokin-mRNAs zu beeinflussen



**Abbildung 1.2: Der TLR4-Signalweg** (Abbildung adaptiert von [O'Neill & Bowie, 2007; Gaestel *et al.*, 2009]). Lipopolysaccharide (LPS), LPS-binding protein (LBP), lymphocyte antigen 96 (MD-2), cluster of differentiation (CD), toll-like receptor 4 (TLR4), toll/IL-1 receptor domain-containing adaptor protein (TIRAP), myeloid differentiation primary response protein 88 (MYD88), IL-1 receptor-associated kinase (IRAK), TNF receptor-associated factor 6 (TRAF6), transforming growth factor- $\beta$  activated kinase 1 (TAK1), mitogen-activated protein kinase kinase (MKK), mitogen-activated protein kinase (MAPK), MAPK-activated protein kinase 2 (MK2), c-Jun N-terminal kinase (JNK), NF- $\kappa$ B essential modulator (NEMO), inhibitor of NF- $\kappa$ B kinase (IKK), tumor progression locus 2 (TPL2), extracellular signal-regulated kinase (ERK), inhibitor of NF- $\kappa$ B (I $\kappa$ B), nuclear factor- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B), TRIF-related adapter molecule (TRAM), toll/IL-1 receptor domain-containing adaptor protein inducing IFN- $\beta$  (TRIF), TRAF family member-associated NF- $\kappa$ B activator-binding kinase 1 (TBK1), interferon regulatory factor (IRF), receptor-interacting serine-threonine kinase 1 (RIP1), Interleukin (IL), Tumornekrosefaktor (TNF), Cyclooxygenase-2 (COX-2), Interferon (IFN)

(siehe auch Kapitel 1.5.1). Die aktivierte Kinase TAK1 kann auch den IKK-Komplex, bestehend aus den zwei katalytischen Untereinheiten IKK $\alpha$  und IKK $\beta$  und der regulatorischen Untereinheit NEMO, aktivieren. IKK $\beta$  phosphoryliert I $\kappa$ B, welches daraufhin abgebaut wird und NF- $\kappa$ B freisetzt. Der Transkriptionsfaktor NF- $\kappa$ B kann nun in den Kern gelangen und, wie auch AP-1, die Transkription von Genen bewirken, welche inflammatorische Proteine kodieren. Aktivierte IKK $\beta$  ist weiterhin in der Lage, TPL2 und damit den ERK-Signalweg zu aktivieren, welcher unter anderem den Kern-Export von Zytokin-mRNAs beeinflusst [Banerjee & Gerondakis, 2007; Gaestel *et al.*, 2009; Miyake, 2006; Bode *et al.*, 2012].

Der MYD88-unabhängige Signalweg wird durch Bindung von TRAM und TRIF

an die intrazelluläre Domäne des TLR4 initiiert. Vermutlich wird durch Assoziation von TRAF6 an TRIF die späte NF- $\kappa$ B-Antwort vermittelt. TRIF ist außerdem an der Aktivierung von IRF3 und IRF7 durch TBK1 und IKK $\epsilon$  beteiligt. Die durch IRF3 und IRF7 vermittelte Synthese von Interferonen ermöglicht eine negative Rückkopplung zum TLR4-Signalweg [O'Neill & Bowie, 2007; Gaestel *et al.*, 2009]. Außerdem wird durch Aktivierung von TRIF und RIP1 die LPS-abhängige Induktion der Apoptose vermittelt [Ruckdeschel *et al.*, 2004; O'Neill & Bowie, 2007].

Für die Familien der Phosphatidylinositol 3-Kinasen (PI3K) und der AKT-Kinasen sind bisher verschiedene Funktionen im TLR4-Signalweg beschrieben worden [Ruse & Knaus, 2006]. So wurde beispielsweise gezeigt, dass PI3K nach Stimulation des TLR4 mit MYD88 assoziiert und selektiv die Produktion von IL-1 $\beta$  induziert [Ojaniemi *et al.*, 2003]. Bestätigt wurde auch, dass nach LPS-Stimulation eine Aktivierung von AKT stattfindet [Salh *et al.*, 1998] und dass diese abhängig von PI3K ist [Ojaniemi *et al.*, 2003]. AKT befindet sich *downstream* von TBK1 und spielt somit eine Rolle bei der Aktivierung der IRFs [Joung *et al.*, 2011].

## 1.2 TAK1

### 1.2.1 TAK1 nimmt im TLR4-Signalweg eine zentrale Position ein

*Transforming growth factor- $\beta$  activated kinase 1* (TAK1) ist eine MAP3-Serin/Threonin-Kinase, die über verschiedene Rezeptoren aktiviert werden kann, z. B. durch TLR-Liganden oder Zytokine wie IL-1 $\beta$  und TNF- $\alpha$ . Stimulation des TLR4 mit LPS führt über mehrere Schritte zur Aktivierung von TRAF6 (siehe Kapitel 1.1.4), der zusammen mit zwei weiteren Proteinen eine Lysin 63-Polyubiquitinierung von TRAF6 katalysiert. Polyubiquitinketten, die über Lysin 63 verknüpft sind, vermitteln Signaltransduktionsreaktionen wie die Aktivierung von Proteinkinasen oder die Reparatur von DNA-Strangbrüchen. Polyubiquitiniertes TRAF6 ermöglicht die Rekrutierung des heterotrimeren TAK1-Komplexes, der außer TAK1 die TAK1-bindenden Proteine (TAB)1 und TAB2 oder TAB3 beinhaltet. TRAF6 polyubiquitiniert auch TAK1, was eine Konformationsänderung und eine Autophosphorylierung, vorrangig am Threonin 187 in der Aktivierungsschleife, induziert [Ajibade *et al.*, 2013; Dai *et al.*, 2012; Adhikari *et al.*, 2007]. Die aktivierte Kinase TAK1 kann nun IKK $\beta$ , MKK4/7 und MKK3/6 phosphorylieren und so die NF- $\kappa$ B-, JNK- oder p38-Signalwege aktivieren (siehe Kapitel 1.1.4).

### 1.2.2 Zelltypspezifische Funktionen

Ein *knock out* von TAK1 in Mäusen führt zu Entwicklungsstörungen und embryonaler Letalität [Shim *et al.*, 2005; Sato *et al.*, 2005]. Dennoch konnten durch Generierung kon-

ditionaler TAK1-*knock out*-Linien, Einblicke in zelltypspezifische Funktionen der Kinase gewonnen werden. LPS-stimulierte TAK1<sup>-/-</sup>-Fibroblasten sind in der Aktivierung des JNK-Signalweges schwer gestört [Shim *et al.*, 2005] und die Aktivierung von p38 und NF-κB nach IL-1β- oder TNF-α-Stimulation ist deutlich reduziert [Sato *et al.*, 2005]. TAK1 ist außerdem verantwortlich für die TLR4-abhängige Aktivierung der MAPK und NF-κB-Signalwege in B-Zellen [Sato *et al.*, 2005]. Eine Gendelektion von TAK1 in Makrophagen führt zur eingeschränkten Aktivierung von NF-κB und JNK nach LPS-Stimulation. Aber sowohl TAK1<sup>-/-</sup>-Makrophagen als auch TAK1<sup>-/-</sup>-Neutrophile weisen eine erhöhte Produktion von pro-inflammatorischen Zytokinen auf [Eftychi *et al.*, 2012]. Im Gegensatz zu Makrophagen, B-Zellen oder Fibroblasten, hatte eine Deletion von TAK1 in Neutrophilen eine vermehrte Phosphorylierung von IKK, p38 und JNK nach LPS-Stimulation zur Folge [Ajibade *et al.*, 2012].

### 1.2.3 TAK1 in der Krebsentstehung

Entzündung und Krebsentstehung sind eng miteinander verbunden, da viele Tumore infolge einer chronischen Entzündung entstehen. Tumorumgebendes Gewebe ist oft stark entzündet und enthält Leukozyten, wie z. B. Tumor-assoziierte Makrophagen. Auf der anderen Seite können inflammatorische Zellen in einigen Tumoren auch positiv wirken. So wird vermutet, dass Makrophagen des M1-Phänotyps eine tumorinhibierende Wirkung haben und dass diese durch NF-κB vermittelt wird [Mantovani *et al.*, 2008]. Kürzlich konnte gezeigt werden, dass auch TAK1 als Tumorsuppressor agiert. So führt eine konditionelle Deletion von TAK1 in parenchymatösen Leberzellen zu Hepatitis und Hepatokarzinogenese, verursacht durch Apoptose [Bettermann *et al.*, 2010].

NF-κB wird auch aktiviert, wenn eine Reparatur von DNA-Strangbrüchen nötig wird, wie z. B. infolge der Einwirkung ionisierender Strahlung oder chemotherapeutischer Medikamente. Auf diese Weise werden das Tumorstadium und die Resistenz der Zellen gegenüber einer Therapie und damit die Heilungschancen beeinflusst [Hadian & Krappmann, 2011]. DNA-Strangbrüche induzieren eine Lysin 63-Polyubiquitinierung von ELKS/RAB6-*interacting/CAST family member 1* (ERC1) im Zytoplasma, was die Assoziation des TAK1/TAB2/3-Komplexes bewirkt. Die darauffolgende Aktivierung von TAK1 führt zur Aktivierung des IKK-Komplexes, vermittelt durch die Untereinheit NEMO [Wu *et al.*, 2010]. Die Aktivierung von TAK1 im TLR4-Signalweg und im Rahmen der Reparatur von DNA-Strangbrüchen erfolgt demzufolge auf eine ähnliche Weise, durch eine Interaktion mit Polyubiquitinketten [Dai *et al.*, 2012].

## 1.3 AKT2

Die AKT-Familie der Serin/Threonin-Kinasen besteht aus drei Mitgliedern: AKT1, AKT2 und AKT3 (auch Proteinkinase B- $\alpha$ , - $\beta$  und - $\gamma$  bzw. *thymoma viral proto-oncogene 1 - 3*). Die AKT-Kinasen werden durch extrazelluläre Stimuli, wie Wachstumsfaktoren oder Zytokine, infolge einer Aktivierung der PI3K aktiviert. Aktive PI3K kann an der Zellmembran assoziiertes Phosphatidylinositol(4,5)-bisphosphat zu Phosphatidylinositol(3,4,5)-trisphosphat (PIP3) phosphorylieren. Die Pleckstrin-Homologie-Domäne von AKT interagiert mit PIP3 und bewirkt so dessen Rekrutierung an die Zellmembran. Die *phosphoinositide dependent protein kinase-1* (PDK1) wird auf die gleiche Weise zur Membran rekrutiert und phosphoryliert AKT am Threonin 308 [Alessi *et al.*, 1997]. Durch eine weitere Phosphorylierung am Serin 473 durch den *mammalian target of rapamycin complex 2* (mTORC2) wird AKT vollständig aktiviert [Sarbasov *et al.*, 2005; Gonzalez & McGraw, 2009].

Die drei Isoformen scheinen spezifische Funktionen zu erfüllen, welche jedoch erst im Ansatz verstanden sind. AKT1 *knock out*-Mäuse sind kleiner und isolierte Zellen weisen eine gesteigerte Apoptose auf. Mäuse, denen AKT2 fehlt, entwickeln eine Typ 2-Diabetes und einzelne Zellen sind in ihrer Glukose-Verwertung gestört. AKT3 scheint eine wichtige Rolle bei der Entwicklung des Gehirns zu spielen. Darüber hinaus deckt sich die gewebespezifische Expression der drei Isoformen mit den Phänotypen der jeweiligen *knock out*-Mäuse [Gonzalez & McGraw, 2009; Hers *et al.*, 2011].

Detaillierte Erkenntnisse zur gezielten Funktion von AKT1 und AKT2 während der Immunantwort sind aus Arbeiten der Gruppe um Christos Tsatsanis hervorgegangen. So konnte gezeigt werden, dass AKT1 und AKT2 in Makrophagen gegensätzliche Aufgaben übernehmen. AKT2<sup>-/-</sup>-Makrophagen weisen Merkmale des anti-inflammatorischen M2-Phänotyps auf, der sich durch eine reduzierte Empfindlichkeit gegenüber LPS und eine geringe Zytokinproduktion auszeichnet (siehe Kapitel 1.1.3). Makrophagen aus AKT1 *knock out*-Mäusen entwickeln hingegen einen pro-inflammatorischen Phänotyp, welcher der klassischen Aktivierung von Makrophagen (M1) mit einem hohen Level an pro-inflammatorischen Zytokinen entspricht [Arranz *et al.*, 2012]. Makrophagen in einem Maus-Modell für aseptisches *acute respiratory distress syndrome* (ARDS) durchlaufen zunächst eine M1-Phase, gefolgt von einem M2-Phänotyp. *Knock out* von AKT2 beschleunigt die M2-Aktivierung, was die Mäuse vor einem säureinduzierten Lungenschaden bewahrt [Vergadi *et al.*, 2013]. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass AKT1<sup>-/-</sup>-Makrophagen hypersensitiv gegenüber LPS sind und keine Endotoxin-Toleranz entwickeln können [Androulidaki *et al.*, 2009].

## 1.4 Post-transkriptionale Kontrolle der Genexpression

Die Expression von Proteinen ist ein mehrstufiger Prozess, der auf verschiedenen Ebenen wie Transkription, RNA-Prozessierung, mRNA-Transport, Stabilität, Translation sowie Proteinstabilität reguliert werden kann. Die Regulation der Translation trägt dabei wesentlich zur Variabilität der Proteinexpression bei [Szostak & Gebauer, 2013]. Diese Dynamik ermöglicht der Zelle eine rasche Antwort auf interne oder externe Stimuli. Eine mRNA besteht aus einem *open reading frame* (ORF), der das Polypeptid kodiert und von der 5' und der 3'untranslatierten Region (UTR) flankiert wird. Am 5'Ende befindet sich ein m<sup>7</sup>G-*cap* und am 3'Ende ein Poly(A)-Schwanz (siehe auch Abbildung 1.3), welche zur Stabilisierung der mRNA beitragen. Der Lebenszyklus einer mRNA wird im Wesentlichen durch *trans*-agierende Faktoren beeinflusst. Dies können RNA-bindende Proteine (RBPs) oder microRNAs (miRNAs) sein, welche an die 5' oder 3'UTR der betreffenden mRNA assoziieren.

### 1.4.1 Die Initiation der Translation

Der Prozess der Translation unterteilt sich in Initiation, Elongation und Termination. Die Initiation der Translation ist der geschwindigkeitsbestimmende Schritt und benötigt etwa zwölf Initiationsfaktoren (eIF) [Szostak & Gebauer, 2013]. Die Translationsinitiation kann in neun Abschnitte unterteilt werden (Abbildung 1.3) [Jackson *et al.*, 2010].

Zunächst werden die Initiationsfaktoren eIF3, eIF1 und eIF1A zur 40S ribosomalen Untereinheit rekrutiert (Abbildung 1.3 - 1). Der sogenannte ternäre Komplex bildet sich aus der mit Methionin beladenen Initiator-tRNA (tRNA<sub>i</sub>), eIF2 und GTP (Abbildung 1.3 - 2). Durch Assoziation der 40S ribosomalen Untereinheit mit den gebundenen Initiationsfaktoren an den ternären Komplex entsteht der 43S Präinitiationskomplex (Abbildung 1.3 - 3). Am m<sup>7</sup>G-*cap* formiert sich der eIF4F-Komplex, bestehend aus dem *cap*-bindenden Protein eIF4E, der RNA-Helikase eIF4A und dem Adapterprotein eIF4G. Das RNA-bindende Protein eIF4B hilft der Helikase beim Entwinden der RNA-Strukturen in der Nähe des *caps*. Durch die Interaktion von eIF4G mit dem poly(A)-bindenden Protein (PABP) wird eine Zirkularisierung der mRNA erreicht (*'closed loop'*-Konformation, Abbildung 1.3 - 4). Der 43S Präinitiationskomplex bindet nun an das 5'Ende der mRNA und bewegt sich schrittweise in Richtung 3'Ende auf der Suche nach einem Initiationskodon (Abbildung 1.3 - 5 und 6). Die Erkennung des Initiationskodons führt zur eIF5-vermittelten Hydrolyse des eIF2-gebundenen GTP und zur Bildung eines 48S Initiationskomplexes (Abbildung 1.3 - 7). Die nun folgende Dissoziation der meisten Initiationsfaktoren und die Assoziation der 60S ribosomalen Untereinheit wird durch eIF5B vermittelt (Abbildung 1.3 - 8). Hydrolyse des eIF5B-gebundenem GTP führt zur Dissoziation von eIF1A und eIF5B vom translationskompetenten Ribo-

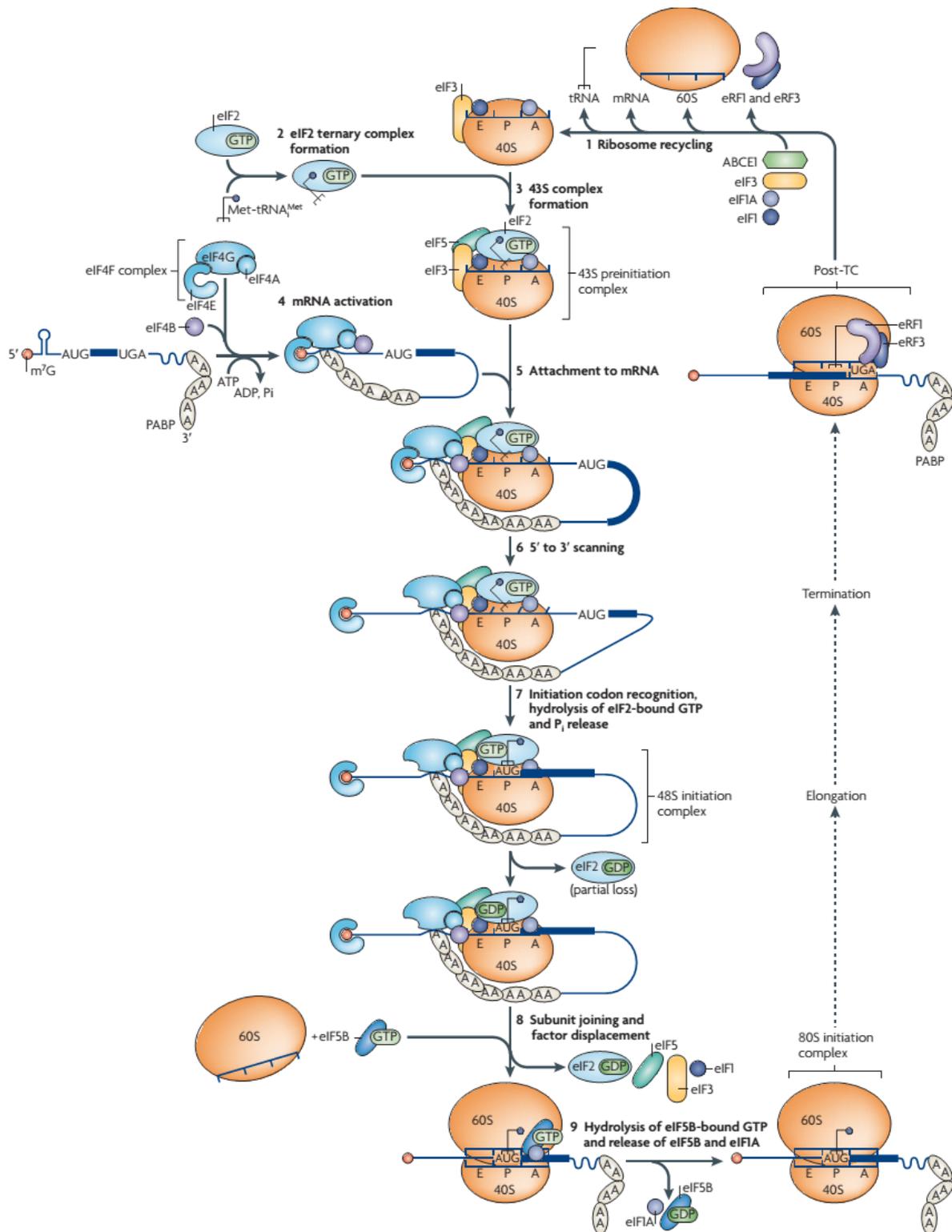


Abbildung 1.3: Die Schritte der Translationsinitiation (Abbildung adaptiert von [Jackson *et al.*, 2010]). eukaryotischer Initiationsfaktor (eIF), Guanosin-/Adenosintriphosphat (GTP/ATP), Initiator-tRNA (tRNA<sub>i</sub>), exit site (E), peptidyl site (P), aminoacyl site (A), 5' 7-methyl guanosine nucleotide cap (m<sup>7</sup>G), poly(A)-bindendes Protein (PABP), Guanosin-/Adenosindiphosphat (GDP/ADP), anorganisches Phosphat (P<sub>i</sub>), post-termination complex (post-TC), eukaryotic release factor (eRF)

som (Abbildung 1.3 - 9). Das 80S-Ribosom ist nun in der Lage das kodierte Polypeptid zu synthetisieren bis am Stoppcodon der Abbruch und die Dissoziation von der mRNA erfolgt. Die Zirkularisierung der mRNA erleichtert die erneute Verwendung der Ribosomen nach der Termination der Translation und ermöglicht es Faktoren, die an die 3'UTR binden, die Translationsinitiation zu beeinflussen [Gebauer & Hentze, 2004; Jackson *et al.*, 2010].

### 1.4.2 Regulation durch RNA-bindende Proteine

Die Regulation der Genexpression auf post-transkriptionaler Ebene erfolgt durch Proteinkomplexe, die sich normalerweise an der 5' oder der 3'UTR einer mRNA bilden. Beispielsweise binden *iron regulatory proteins* spezifisch an eine Struktur im 5'UTR ihrer Ziel-mRNAs, dem *iron response element*. Die Assoziation wird durch den intrazellulären Eisenspiegel gesteuert und führt zu einer translationalen Inhibierung der mRNAs von Ferritin und Ferroportin [Hentze *et al.*, 2010].

Da zumeist aber eine Regulation durch Proteine erfolgt, die an die 3'UTR einer mRNA binden, werden im Folgenden verschiedene Mechanismen der 3'UTR-vermittelten Regulation näher beschrieben [Szostak & Gebauer, 2013]:

1. Das ribosomale Protein L13a, ein Bestandteil des IFN- $\gamma$ -*activated inhibitor of translation* (GAIT)-Komplexes, konkurriert mit der Interaktion von eIF4G und eIF3 und inhibiert so die Rekrutierung des 43S Präinitiationskomplexes [Mukhopadhyay *et al.*, 2009].
2. In Erythroblasten wird die Translation der 15-Lipoxygenase (r15-LOX) mRNA inhibiert. Durch Bindung der beiden Proteine *heterogeneous nuclear ribonucleoprotein* (hnRNP) K und hnRNP E1 wird die Rekrutierung der großen ribosomalen Untereinheit blockiert. Erst in reifen Retikulozyten wird die translationale Repression der r15-LOX mRNA aufgehoben [Ostareck *et al.*, 1997, 2001] (siehe auch Kapitel 1.6.1).
3. Einige RBPs können die Elongation der Translation verhindern. Durch Bindung von hnRNP E1 und dem Elongationsfaktor eEF1A1 an strukturierte Elemente in der 3'UTR ihrer Ziel-mRNAs wird die Translokation des Ribosoms verhindert und so ihre Translation inhibiert [Hussey *et al.*, 2011]. Diese RNA-Strukturelemente sind in mRNAs vorhanden, deren kodierte Proteine an der *epithelial-mesenchymal transition* (EMT), und somit an der Embryonalentwicklung und Tumorgenese beteiligt sind [Hussey *et al.*, 2011].
4. Durch Rekrutierung des Deadenylase-Komplexes können RBPs auch die Stabilität und damit die Translationseffizienz ihrer Ziel-mRNA beeinflussen. Auf diese

Weise werden einige Zytokin-mRNAs in Makrophagen durch das Protein Tristetraprolin (TTP) destabilisiert [Marchese *et al.*, 2010] (siehe auch Kapitel 1.5.1).

5. Die Funktion von microRNAs kann positiv oder negativ durch RBPs moduliert werden. So ist z. B. hnRNP K in der Lage, die microRNA-16 von der 3'UTR der COX-2 mRNA zu verdrängen, was deren Stabilisierung bewirkt [Shanmugam *et al.*, 2008] (siehe Kapitel 1.6.2).
6. Durch Verpackung von mRNAs in Ribonukleotidprotein (RNP)-Partikel, die die Translation temporär unterbinden, kann die Expression von Proteinen in bestimmten Regionen der Zelle determiniert werden [Besse & Ephrussi, 2008]. Ein Beispiel hierfür ist das *zipcode*-bindende Protein 1 (ZBP1), welches bereits im Nukleus an die  $\beta$ -Aktin mRNA bindet [Huttelmaier *et al.*, 2005]. Im Zytoplasma wird die Translation der mRNA solange verhindert, bis ihr Bestimmungsort an der Zellperipherie erreicht ist, wo das Protein z. B. für Wachstum benötigt wird [Huttelmaier *et al.*, 2005].

### 1.4.3 Regulation durch miRNAs

MicroRNAs (miRNAs, miRs) sind etwa 21 nt lange nicht-kodierende RNAs, die in fast allen Eukaryoten vorkommen und an vielen biologischen Prozessen beteiligt sind. Eine miRNA assoziiert mit einem Protein der Argonaute-Familie und einem Protein der GW182-Familie im miRNA-*induced silencing complex* (miRISC) [Fabian & Sonenberg, 2012]. Durch partiell komplementäre Basenpaarung mit Sequenzen in der 3'UTR, erkennt der miRISC seine Ziel-mRNA (Abbildung 1.4). GW182 interagiert über seine *silencing domain* (SD) mit PABP sowie den PAN2-PAN3 und CCR4-NOT Deadenylase-Komplexen. Der miRISC inhibiert die Translation seiner Ziel-mRNA und leitet ihre Deadenylierung ein. Je nach zellulärem Kontext kann die mRNA in einer inaktiven Form gespeichert oder vollständig abgebaut werden. Der weitere Abbau erfolgt durch Entfernen des 5'caps durch das mRNA-*decapping enzyme* DCP2 und Degradation der mRNA in 5' - 3'-Richtung durch die Exoribonuklease XRN1 (Abbildung 1.4) [Izaurralde, 2012; Huntzinger & Izaurralde, 2011; Braun *et al.*, 2013].

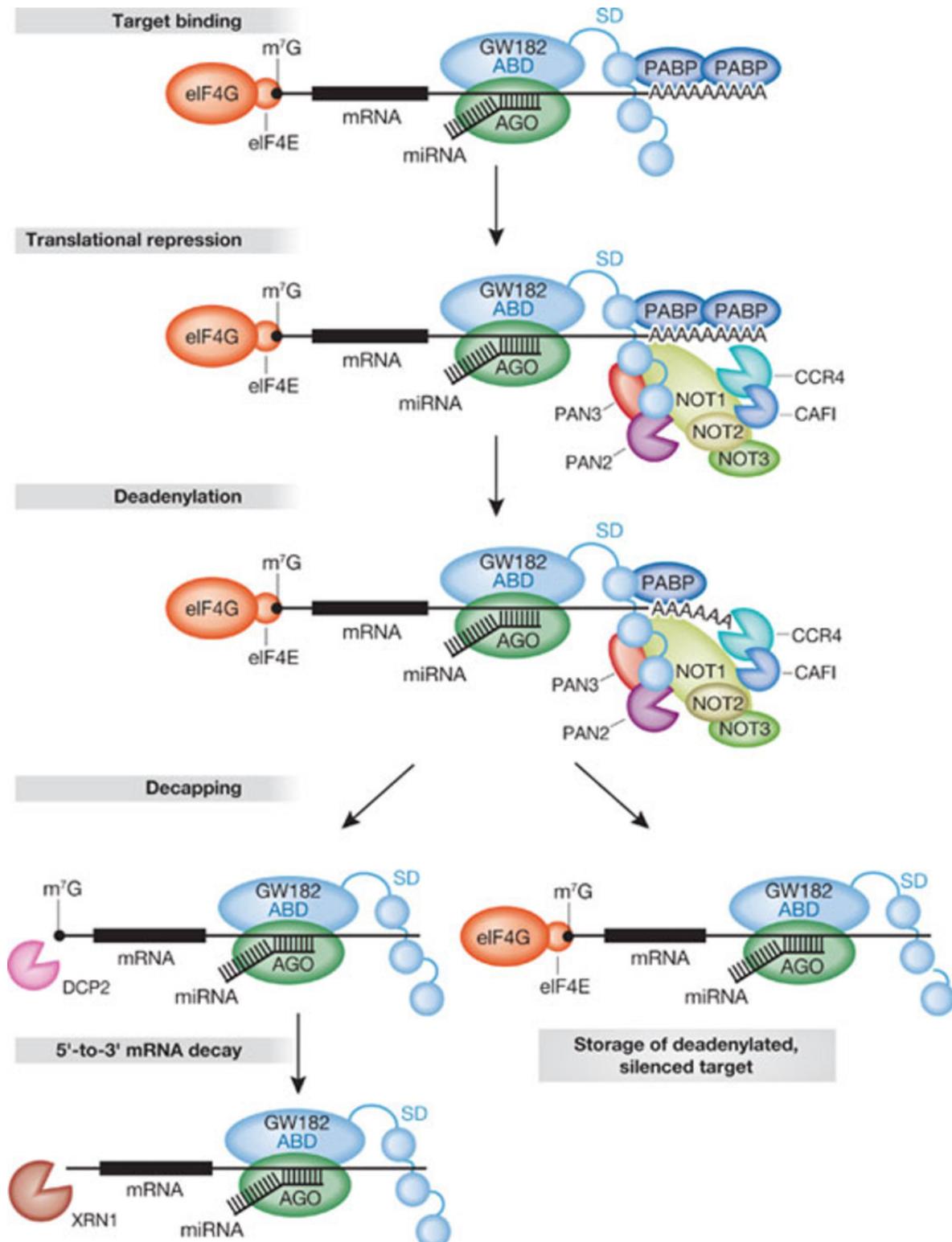


Abbildung 1.4: Die Inhibition der Proteinexpression durch den miRISC (Abbildung adaptiert von [Izaurrealde, 2012]). Argonaute Protein (AGO), *glycine tryptophan repeat-containing protein of 182 kDa* (GW182), *AGO binding domain* (ABD), *silencing domain* (SD), *poly(A) specific ribonuclease subunit* (PAN), Untereinheiten des CCR4-NOT Deadenylase-Komplexes (NOT, CCR4, CAF1), *mRNA-decapping enzyme* (DCP), 5'-3' Exoribonuklease 1 (XRN1)

## 1.5 Post-transkriptionale Kontrolle der Genexpression während der Immunantwort

Während einer Immunantwort ist eine rasche und flexible Anpassung der Expression von immunologischen Effektorproteinen besonders wichtig. Zwei Proteine, die als post-transkriptionale Regulatoren die Immunantwort beeinflussen, sollen im Folgenden näher beschrieben werden.

### 1.5.1 TTP destabilisiert mRNAs und inhibiert deren Translation

Das Zink-Finger-Protein TTP ist eines der am besten charakterisierten Beispiele für die Regulation der Inflammation auf post-transkriptionaler Ebene. TTP bindet an AU-reiche Elemente (ARE) in der 3'UTR von mRNAs, die für Proteine kodieren, welche die Entzündung, Zellproliferation oder Angiogenese fördern. Dazu gehören TNF- $\alpha$ , IL-10, COX-2, *granulocyte macrophage colony-stimulating factor* (GM-CSF) oder *vascular endothelial growth factor* (VEGF) [Sanduja *et al.*, 2012]. Diese Interaktion bewirkt eine Destabilisierung der mRNA durch Rekrutierung des Deadenylase-Komplexes und Abbau der mRNA [Marchese *et al.*, 2010]. Aktivierung von Makrophagen durch LPS führt zur Phosphorylierung von TTP durch MK2, als Folge der Aktivierung von p38. Dies ermöglicht die Bindung von 14-3-3-Proteinen, welche die Assoziation des Deadenylase-Komplexes verhindern [Tiedje *et al.*, 2010; Clement *et al.*, 2011]. Die Phosphorylierung von TTP durch MK2 bewirkt außerdem eine Stabilisierung des Proteins [Hitti *et al.*, 2006]. Bindung von TTP kann aber auch zu einer translationalen Inhibierung der mRNA führen, wofür mehrere Mechanismen vorgeschlagen wurden [Gaestel, 2013]. Eine Interaktion von TTP mit PABP könnte die Zirkularisierung der mRNA verhindern (siehe Kapitel 1.4.1). Ein weiteres Modell basiert auf dem Austausch der beiden Proteine TTP und *human antigen R* (HuR), in Abhängigkeit von der Phosphorylierung des Proteins TTP. So wird die TNF- $\alpha$  mRNA durch gebundenes TTP destabilisiert und translationale inhibiert. Die Aktivierung der Zellen durch LPS führt zur Phosphorylierung von TTP und einer verringerten Affinität von TTP zum ARE, was die Bindung von HuR ermöglicht und eine translationale Aktivierung der TNF- $\alpha$  mRNA zur Folge hat [Tiedje *et al.*, 2012].

### 1.5.2 AUF1 aktiviert die Translation der MYC und TAK1 mRNAs

*AU-rich element RNA-binding protein 1* (AUF1) ist ein RNA-bindendes Protein, das auch als hnRNP D bekannt ist. Durch alternatives Spleißen der prä-mRNA werden vier Isoformen erzeugt: p37<sup>AUF1</sup>, p40<sup>AUF1</sup>, p42<sup>AUF1</sup> und p45<sup>AUF1</sup> [Wagner *et al.*, 1998], welche unterschiedliche Bindungsaffinitäten zu AREs aufweisen. Durch Assoziation von

AUF1 an ein ARE in der 3'UTR einer mRNA wird in vielen Fällen eine Destabilisierung dieser mRNA bewirkt. Ziele dieser Regulation sind beispielsweise die mRNAs von TNF- $\alpha$ , IL-10 und GM-CSF. Die Stabilität einiger mRNAs kann aber auch positiv durch die Bindung von AUF1 an das ARE beeinflusst werden [Gratacos & Brewer, 2010]. Außerdem ist bekannt, dass AUF1 direkten Einfluss auf die Translation einer mRNA nehmen kann. So konkurriert AUF1 mit dem Protein TIA1 *cytotoxic granule-associated RNA binding protein-like 1* (TIAR) um die Bindung des ARE in der 3'UTR der MYC mRNA, wobei eine Assoziation von AUF1 deren Translation begünstigt [Liao *et al.*, 2007]. Sarkar und Kollegen konnten weiterhin zeigen, dass die TAK1 mRNA in THP-1-Monozyten von AUF1 gebunden und dadurch dessen Translation aktiviert wird. Ein *knock down* von AUF1 verminderte die LPS-abhängige Induktion von IL-10. Durch Transfektion der p40<sup>AUF1</sup>-Isoform konnte die IL-10-Expression wieder hergestellt werden [Sarkar *et al.*, 2011]. Allerdings wurde noch nicht untersucht, ob die Interaktion von AUF1 über ein ARE in der 3'UTR der TAK1 mRNA vermittelt wird.

## 1.6 Die Funktionen von hnRNP K in der post-transkriptionalen Kontrolle

Wie bereits im Kapitel 1.4.1 erwähnt, sind hnRNP K und hnRNP E1 in der Lage die Translationsinitiation zu inhibieren. Im Folgenden wird dabei im Wesentlichen auf die Rolle von hnRNP K näher eingegangen. Die Domänenstruktur von hnRNP K ist in Abbildung 1.5 dargestellt.



**Abbildung 1.5: Domänenstruktur von hnRNP K.** Die Aminosäuresequenzen und damit auch die funktionale Domänenstruktur von humanem hnRNP K (Isoform b) und murinem hnRNP K sind zu 100% identisch. *nuclear localization signal* (NLS), K-Homologie (KH)-Domäne, *kinase interaction domain* (KID), Prolin-reiche Motive (P), hnRNP K *nuclear shuttling domain* (KNS), dimethylierte Arginin-Reste (schwarze Striche), phosphorylierte Serin-Reste (blaue Striche), phosphorylierter Tyrosin-Rest (roter Strich)

HnRNP K besitzt drei K-Homologie (KH)-Domänen [Siomi *et al.*, 1993; Gibson *et al.*, 1993]. Hierbei handelt es sich um ein 65 bis 70 Aminosäuren umfassendes Motiv [Dejgaard & Leffers, 1996; Musco *et al.*, 1996], welches oft zu mehreren Kopien in einem Protein vorliegt. KH-Domänen binden an einzelsträngige RNA und DNA, wobei von der geformten Bindungstasche vier Nukleotide beherbergt werden können [Valverde *et al.*, 2008]. Zwischen der zweiten und der dritten KH-Domäne befindet

sich die *kinase interaction domain* (KID). Eine Interaktion der KID von hnRNP K mit den isolierten Src-Homologie (SH)-Domänen der Tyrosinkinase c-Src, Fyn und Lyn konnte *in vitro* nachgewiesen werden [Taylor & Shalloway, 1994; Weng *et al.*, 1994]. Die drei Proteine zählen zusammen mit sechs weiteren zur Familie der Src-Kinasen. Die Assoziation von c-Src mit hnRNP K wird über drei Prolin-reiche Motive und eine weitere Region nahe der KH2 vermittelt [Van Seuning *et al.*, 1995; Adolph *et al.*, 2007]. Am N-Terminus befindet sich ein klassisches, zweiteiliges *nuclear localization signal* (NLS), welches für die Kernlokalisierung von hnRNP K verantwortlich ist [Michael *et al.*, 1995]. Zwischen der KID und KH3 befindet sich außerdem eine hnRNP K *nuclear shuttling domain* (KNS), welche den bi-direktionalen Transport zwischen Nukleus und Zytoplasma ermöglicht [Michael *et al.*, 1997]. Phosphorylierung von hnRNP K an den Serinen 284 und 353 durch ERK führt zur Akkumulation des Proteins im Zytoplasma [Habelhah *et al.*, 2001].

### 1.6.1 Die Rolle von hnRNP K während der erythroiden Reifung

Erythrozyten entwickeln sich wie alle Zellen des Immunsystems durch Ausdifferenzierung von hämatopoetischen Stammzellen im Knochenmark (siehe Abbildung 1.1 und Kapitel 1.1.1). Diese Differenzierung verläuft über das Stadium des Erythroblasten, welcher nach Verlust des Kerns als Retikulozyt bezeichnet wird und nun in die Blutbahn übergeht. Die finale Differenzierung vom Retikulozyten zum Erythrozyten (Reifung) dauert im Menschen etwa eine Woche und schließt unter anderem den Verlust der Mitochondrien ein [Dzierzak & Philipsen, 2013; Ney, 2011]. Der Abbau der Mitochondrien wird durch die *arachidonate 15-lipoxygenase*, auch retikulozytenspezifische 15-Lipoxygenase (r15-LOX) genannt, eingeleitet. Dieses Enzym katalysiert die Dioxygenierung von Phospholipiden in der Mitochondrienmembran und ermöglicht so den proteolytischen Abbau der mitochondrialen Proteine [Rapoport & Schewe, 1986].

Die r15-LOX mRNA wird bereits im Knochenmark synthetisiert und in translationsinaktiver Form in RNPs gespeichert [Hohne *et al.*, 1988]. Über eine in der r15-LOX mRNA 3'UTR lokalisierte Sequenz, dem *differentiation control element* (DICE) wird die Inhibition der Translation der r15-LOX mRNA vermittelt [Ostareck-Lederer *et al.*, 1994; Ostareck *et al.*, 1997]. Zwei regulatorische Proteine, hnRNP K und hnRNP E1, binden spezifisch an dieses Sequenzelement [Ostareck *et al.*, 1997]. Die Assoziation des hnRNP K/E1-Komplexes verhindert das Hinzutreten der großen ribosomalen Untereinheit zur kleinen ribosomalen Untereinheit am Startcodon und damit die Bildung eines translationskompetenten 80S-Ribosoms [Ostareck *et al.*, 1997, 2001]. Dieser Mechanismus wurde zunächst mit Hilfe von Retikulozytenlysat für die r15-LOX mRNA des Kaninchens aufgeklärt.

Im Kaninchen besteht das DICE aus zehn direkten Wiederholungen eines 19 nt

langen Sequenzelements, das reich an Cytidin und Uridin ist [Fleming *et al.*, 1989; Ostareck *et al.*, 1997]. In der 3'UTR der humanen r15-LOX mRNA liegen nur vier Wiederholungen des Sequenzelements vor [Sigal *et al.*, 1988], welche aber ausreichend sind, um die Translation der mRNA zu inhibieren [Ostareck-Lederer *et al.*, 1994]. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass bereits mit zwei Wiederholungen der 19 nt langen Sequenz eine ähnliche Inhibition stattfindet, wie mit zehn Wiederholungen [Ostareck *et al.*, 1997]. Die phylogenetische Verwandtschaft ist zwischen der Kaninchen-, der humanen r15-LOX und der murinen 12/15-LOX am größten [Schewe, 2002]. Das Maus-Homologe der r15-LOX ist in seiner Primärstruktur zu 74% identisch mit dem humanen Protein und zu 71% identisch mit der r15-LOX aus dem Kaninchen. Kaninchen- und humane r15-LOX sind zu 81% identisch [NCBI Blast]. Auch die 3'UTR der murinen 15-LOX mRNA ist der humanen r15-LOX mRNA 3'UTR sehr ähnlich, allerdings fehlen dort die wiederholten CU-reichen Sequenzelemente.

Thisted und Kollegen konnten mit Hilfe von Systematischer Evolution von Liganden durch exponentielle Anreicherung (SELEX) die Konsensus-Sequenz für die Bindung von hnRNP K an RNAs auf das Motiv 5'-UC<sub>3-4</sub>(U/A)(A/U)-3' eingrenzen [Thisted *et al.*, 2001]. Durch Röntgen- und NMR-Strukturaufklärung konnte die RNA-Bindung der dritten KH-Domäne von hnRNP K weiter charakterisiert werden. So wurde festgestellt, dass die Domäne an Tetranukleotide der Sequenz T/CCCC und U/CCCC bindet, wobei die Dissoziationskonstanten für die DNA- und RNA-Liganden ähnlich sind [Backe *et al.*, 2005].

Im Verlauf der erythroiden Reifung kommt es zu einer Interaktion von hnRNP K und der Tyrosinkinase c-Src, was zur Aktivierung von c-Src und zur Phosphorylierung von hnRNP K am Tyrosin 458 durch c-Src führt [Ostareck-Lederer *et al.*, 2002; Messias *et al.*, 2006]. Tyrosin 458 befindet sich in der KH3 von hnRNP K, die für die Bindung des DICE verantwortlich ist [Messias *et al.*, 2006]. Phosphorylierung am Tyrosin 458 hat einen Verlust der DICE-Bindungsaktivität von hnRNP K zur Folge und führt damit zur Aufhebung der translationalen Inhibition der r15-LOX mRNA [Ostareck-Lederer *et al.*, 2002; Messias *et al.*, 2006].

Die *protein arginine N-methyltransferase* (PRMT) 1 methyliert hnRNP K an fünf Argininresten (256, 258, 268, 296 und 299), was zu einer verminderten Interaktion mit c-Src führt [Ostareck-Lederer *et al.*, 2006]. Studien in K562-Zellen zeigten, dass während der induzierten erythroiden Reifung methyliertes durch nicht-methyliertes hnRNP K ersetzt wird und dadurch die Interaktion und Aktivierung mit c-Src stattfinden kann [Naarmann *et al.*, 2008].

Auch die c-Src mRNA wird von hnRNP K, nicht jedoch von hnRNP E1, gebunden, wobei der Interaktionsbereich auf das 3'UTR-Element Src3 eingegrenzt werden konnte. Die Assoziation von hnRNP K bewirkt eine Inhibierung der Translation der c-Src mRNA indem die Bildung des translationskompetenten 80S-Ribosoms verhindert wird

[Naarmann *et al.*, 2008]. HnRNP K reguliert die Aktivität von c-Src an zwei Schritten: der mRNA-Translation und der Aktivierung der enzymatischen Aktivität.

### 1.6.2 HnRNP K beeinflusst die Stabilität der COX-2 mRNA

Cyclooxygenase-2 (COX-2) oder auch *prostaglandin endoperoxide synthase* (PTGS) 2 ist ebenfalls ein Enzym des Arachidonsäure-Stoffwechsels. Im Gegensatz zur konstitutiv exprimierten COX-1, wird die Expression von COX-2 durch Stimuli wie Zytokine oder LPS induziert. Durch ihre enzymatische Aktivität entstehen Prostaglandine, die z. B. Fieber und Schmerz herbeiführen. Hemmung der Cyclooxygenase-Aktivität kann durch nichtsteroidale Antirheumatika, wie Aspirin oder Ibuprofen erfolgen [Smith *et al.*, 2000]. Die 3'UTR von COX-2 beinhaltet mehrere AREs [Jones *et al.*, 1993] und es konnte die Relevanz eines 116 nt langen Segmentes, welches sechs AREs enthält, für eine post-transkriptionale Regulation der COX-2 Expression gezeigt werden [Dixon *et al.*, 2000]. Shanmugam und Kollegen haben die gegensätzlichen Funktionen von hnRNP K und miR-16 in der Regulation der COX-2 mRNA Stabilität untersucht. Stimulation der humanen Monozyten-Zelllinie THP-1 mit dem pro-inflammatorischen Peptid S100b führt zu einer Zunahme der COX-2 mRNA. Die experimentellen Daten legen nahe, dass nach der Stimulation eine Assoziation von hnRNP K mit der 3'UTR der COX-2 mRNA erfolgt. Das hat zur Folge, dass die an die AREs gebundene miR-16 verdrängt wird. Durch Verhinderung der miRISC-abhängigen Destabilisierung der COX-2 mRNA wird so dessen Abundanz in den Zellen erhöht [Shanmugam *et al.*, 2008]. Dabei wurde jedoch nicht untersucht, ob hnRNP K direkt an die COX-2 3'UTR bindet und gezieltere Studien wären notwendig, um diesen Mechanismus zu belegen.

## 1.7 Zielstellung

Die Reaktion des Immunsystems auf eindringende Pathogene unterliegt einer strengen Kontrolle. Ein Ungleichgewicht kann zur Entwicklung chronischer Krankheiten, Autoimmunität, Krebs oder Sepsis führen. Makrophagen gehören zu den Zellen der angeborenen Immunantwort, die als erste auf eindringende Krankheitserreger reagieren. Sie initiieren durch die Erkennung spezifischer Oberflächenmuster der Pathogene deren Beseitigung. Die zelluläre Reaktion der Makrophagen manifestiert sich in der Aktivierung eines komplexen Netzwerkes aus Signalwegen und der daraus resultierenden Ausschüttung von inflammatorischen Mediatoren. Eine Regulation ist dabei an verschiedenen Stellen möglich: unter anderem der Aktivierung von Kinasen, der Degradation von Proteinen der Signalwege, der transkriptionalen oder der post-transkriptionalen Aktivierung der Genexpression.

Ziel dieser Arbeit war die Untersuchung von post-transkriptionalen Regulationsmechanismen in aktivierten Makrophagen die durch miRNAs oder RBPs erfolgt. Der Schwerpunkt lag dabei auf der Regulation durch RNA-bindende Proteine.

HnRNP K ist ein wichtiges regulatorisches RNA-bindendes Protein während der erythroiden Reifung. HnRNP K reguliert die Translation der r15-LOX mRNA, die für ein wichtiges Enzym in der Erythropoese kodiert. Des Weiteren kontrolliert hnRNP K die Stabilität der COX-2 mRNA in Monozyten, den Vorläuferzellen der Makrophagen.

Daraus ergab sich die Hypothese, dass hnRNP K auch während der Immunantwort in Maus-Makrophagen als Regulator der Genexpression von Bedeutung ist. Ein Ziel dieser Arbeit war es, mRNAs zu identifizieren, die post-transkriptional durch hnRNP K reguliert werden. Dafür wurden murine Makrophagen verwendet, die durch den TLR4-Liganden LPS aktiviert werden. Es sollte der Einfluss von hnRNP K auf die Translation von Ziel-mRNAs im Rahmen dieser Aktivierung analysiert werden. Gleichzeitig sollte untersucht werden, ob und inwieweit hnRNP K auf diese Weise die Immunantwort in Makrophagen beeinflusst.

Neben der detaillierten Analyse des RNA-bindenden Proteins hnRNP K, wurden erste Untersuchungen durchgeführt, um einen Überblick über die Gesamtheit der potentiell post-transkriptional regulatorischen Proteine in aktivierten Makrophagen zu erhalten. Dazu sollten die RNA-bindenden Proteine aus Makrophagen spezifisch gereinigt und identifiziert werden.

Neben RNA-bindenden Proteinen sind auch miRNAs in der Lage die Genexpression zu beeinflussen. Ein drittes Ziel war die Erstellung von miRNA-Bibliotheken, die es ermöglichen sollen, miRNAs, die während der Aktivierung von Makrophagen reguliert werden, zu identifizieren.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Chemikalien, Enzyme, Größenstandards, Kits

Chemikalien	Firma
16S/23S rRNA ( <i>E. coli</i> )	Roche-Diagnostics
1-Methylimidazol	Sigma-Aldrich
4% PFA in PBS	Sigma-Aldrich
5x Transkriptionspuffer	Stratagene
6x DNA Loading Dye	Fermentas
Aceton	VWR
Acrylamid/Bisacrylamid (19:1)	Roth
Acrylamid/Bisacrylamid (37,5:1)	Roth
Actinomycin D	Sigma-Aldrich
Agar	Roth
Agarose	Invitrogen
Aminosäuren	Sigma-Aldrich
Ammoniumacetat	Applichem
Ammoniumthiocyanat	Roth
Ampicillin	Roth
APS	Merck
$\beta$ -Glycerophosphat	Sigma-Aldrich
$\beta$ -Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich
Borsäure	Applichem
Brefeldin A	eBioscience
Bromphenolblau	Merck
BSA	NEB
BSA (Albumin Fraktion V, für Western Blot)	Applichem
Calciumchlorid	Applichem
Cap-Analogon (m <sup>7</sup> GpppG)	Kedar
Chloroform	Applichem
Cycloheximid	Sigma-Aldrich
Dimethylpimelimidat	Sigma-Aldrich
DMEM	Invitrogen
DMSO	Sigma-Aldrich
dNTPs	Fermentas
DTT	Gerbu
EDC	Sigma-Aldrich
EDTA (Titriplex III)	Merck
Essigsäure	Roth
Ethanol	Merck
Ethanolamin	Applichem
Ficoll 400	Sigma-Aldrich
FKS	Biochrom
Formaldehyd	Sigma-Aldrich
Formamid	Applichem
Gel loading Buffer II	life technologies
GelRed	Biotium
Glukose	Merck
Glycerin	Roth

<b>Chemikalien</b>	<b>Firma</b>
Glycin	Roth
Glykogen	Roche-Diagnostics
Guanidiniumthiocyanat	Roth
Harnstoff	Applichem
HCl	Applichem
Heparin	Roche-Diagnostics
Hepes	Gerbu
Hoechst (33258)	Invitrogen
Isopropanol	VWR
Kaliumacetat	Applichem
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Applichem
KOH	Applichem
Kreatinkinase	Roche-Diagnostics
Kreatinphosphat	Sigma-Aldrich
LB-Medium	Roth
Leupeptin	Applichem
LiDS	Sigma-Aldrich
Lithiumchlorid	Sigma-Aldrich
LPS ( <i>E. coli</i> )	Sigma-Aldrich
Magnesiumacetat	Applichem
Magnesiumchlorid	Applichem
magnetische oligo(dT) <sub>25</sub> -beads	NEB
Methanol	VWR
Milchpulver	Sucofin
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Applichem
Natriumacetat	Applichem
Natriumcarbonat	Sigma-Aldrich
Natriumchlorid	Roth
Natriumcitrat	Applichem
Natriumfluorid	Applichem
Natriummolybdat	Applichem
Natriumtetraborat	Applichem
Natriumthiosulfat	Sigma-Aldrich
Natriumvanadat	Applichem
normal human serum	Sigma-Aldrich
normal mouse serum	Sigma-Aldrich
normal rabbit serum	Sigma-Aldrich
NP-40	Sigma-Aldrich
NTPs	Promega
Penicillin und Streptomycin	Invitrogen
Pepstatin	Applichem
PMSF	Roth
p-Nitrophenylphosphat	Sigma-Aldrich
Polyvinylpyrrolidon K30	Sigma-Aldrich
ProLong Gold Antifade reagent with DAPI	Invitrogen
Protease-Inhibitor Cocktail (EDTA-frei)	Roche-Diagnostics
Protein A Sepharose	GE Healthcare
Protein G-Sepharose	Roche-Diagnostics
Roti-Quant (nach Bradford)	Roth
ROX reference dye	Invitrogen
Saccharose	Merck
Saponin	Sigma-Aldrich
Silbernitrat	Merck
SYBR Green	Sigma-Aldrich
TEMED	Applichem
Trichloressigsäure	Merck

<b>Chemikalien</b>	<b>Firma</b>
Tris-Base	Merck
Triton X-100	Sigma-Aldrich
tRNA (bovine)	Sigma-Aldrich
tRNA (Hefe)	Roche-Diagnostics
Tween-20	Merck
unmodifizierte magnetische <i>beads</i>	NEB
wassergesättigtes Phenol	Roth
Xylencyanol	ICN Biomedicals

<b>Radiochemikalien</b>	<b>Firma</b>
$\alpha$ -32P UTP	Hartmann Analytic
$\gamma$ -32P ATP	Hartmann Analytic

<b>Enzyme</b>	<b>Firma</b>
2x PCR Master Mix	Promega
2x SYBR Green PCR Master Mix	life technologies
alkalische Phosphatase	Roche-Diagnostics
GoTaq Flexi DNA Polymerase	Promega
M-MLV RT	Promega
Pfu Turbo DNA Polymerase	Agilent
Phusion High-Fidelity DNA Polymerase	NEB
Restriktionsendonukleasen	NEB
RiboLock Ribonuclease Inhibitor	Fermentas
RNase A	Fermentas
RNase T1	life technologies
RQ1 DNase	Promega
T3 oder T7 RNA Polymerase	Stratagene
T4 DNA Ligase	NEB
T4 DNA Polymerase	NEB
T4 PNK	NEB
T4 RNA Ligase 2 (truncated)	NEB
T4 RNA-Ligase 1	NEB

<b>Größenstandards</b>	<b>Firma</b>
1 kb ladder	Invitrogen
50 bp ladder	Fermentas
GeneRuler Ultra Low Range DNA Ladder	Fermentas
PageRuler Prestained Protein Ladder	Fermentas
RiboRuler, high range	Fermentas
RiboRuler, low range	Fermentas

Kits / Systeme	Firma
ECL Prime WB Detection reagents	GE Healthcare
High Pure PCR Product Purification Kit	Roche-Diagnostics
Luciferase Assay System I	Promega
MEGAscript T3 Kit	life technologies
MEGAscript T7 Kit	life technologies
MinElute Gel Extraktion Kit	Qiagen
MinElute PCR Purification Kit	Qiagen
peqGOLD Plasmid Miniprep Kit I	peqlab
Plasmid Midi Kit	Qiagen
SuperScript III First-Strand Synthesis SuperMix	life technologies
SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate	Thermo Scientific
TNF- $\alpha$ ELISA Ready-SET-GO!	eBioscience

## 2.2 Antikörper

### Primärantikörper für Western-Blot und Immunfluoreszenz

Antigen	Firma / Quelle (Klon)	Typ
$\alpha$ -Tubulin	Sigma-Aldrich (DM1A)	Maus, monoklonal
c-Src	Abcam	Kaninchen, polyklonal
eIF6	BD Biosciences (23/eIF-6)	Maus, monoklonal
ERK 1/2	Cell Signaling	Kaninchen, polyklonal
Firefly Luciferase	Santa Cruz (Luci17)	Maus, monoklonal
GAPDH	Abcam (6C5)	Maus, monoklonal
gespaltene Caspase-3	Cell Signaling	Kaninchen, polyklonal
Histon H3	Abcam	Kaninchen, polyklonal
hnRNP K	Santa Cruz (D-6)	Maus, monoklonal
hnRNP K	[Naarmann <i>et al.</i> , 2008]	Ratte, monoklonal
HuR	Santa Cruz (3A2)	Maus, monoklonal
p38	Santa Cruz	Kaninchen, polyklonal
phospho-ERK 1/2	Cell Signaling	Kaninchen, polyklonal
phospho-p38	Cell Signaling (28B10)	Maus, monoklonal
phospho-Tyrosin	Santa Cruz (PY99)	Maus, monoklonal
pro-Caspase-3	Cell Signaling	Kaninchen, polyklonal
rpS3	Santa Cruz	Kaninchen, polyklonal
TAK1	Imgenex	Kaninchen, polyklonal
Vinculin	Sigma-Aldrich (hVIN-1)	Maus, monoklonal

### Konjugierte Sekundärantikörper für Western-Blot und Immunfluoreszenz

Antigen, Konjugat	Firma
anti-Kaninchen - Cy3	Dianova
anti-Kaninchen - HRP	GE Healthcare Life Sciences
anti-Maus - Cy5	Dianova
anti-Maus - HRP	GE Healthcare Life Sciences
anti-Ratte - FITC	Dianova

## Fluorochrom-konjugierte Primärantikörper für FACS

Antigen, Konjugat	Firma (Klon)
CD11b - APC	eBioscience (M1/70)
CD14 - PerCP-Cy5.5	BD Biosciences (rmC5-3)
CD40 - PE	BD Biosciences (3/23)
CD80 - PE	BD Biosciences (16-10A1)
CD86 - PE	BD Biosciences (GL1)
F4/80 - Biotin	AbD Serotec (CI:A3-1)
Gr1 - PerCP-Cy5.5	BD Biosciences (RB6-8C5)
TNF- $\alpha$ - FITC	eBioscience (MP6-XT22)
Streptavidin - PE-Cy7	eBioscience

## 2.3 Oligonukleotide, Plasmide

Soweit nicht anders beschrieben, wurden alle Oligonukleotide von der Firma MWG erworben.

### Primer für die reverse Transkription

Name	Sequenz	Firma
oligo(dT) <sub>18</sub>	TTTTTTTTTTTTTTTTTTTT	MWG
random hexamers	NNNNNN (N = A, C, G, T)	NEB

### Primer für die (semi) quantitative PCR

Name	Orientierung	Sequenz
18S rRNA	<i>sense</i>	CTGGATACCGCAGCTAGGAATA
	<i>antisense</i>	CCGGTCCAAGAATTTACCTCT
28S rRNA	<i>sense</i>	CCCAGTGCTCTGAATGTCAA
	<i>antisense</i>	AGTGGGAATCTCGTTCATCC
ALOX5	<i>sense</i>	ATTGCCATCCAGCTCAACCAAACC
	<i>antisense</i>	TGGCGATACCAAACACCTCAGACA
AKT1	<i>sense</i>	GCCTGAGGAGCGGGAAGAATGG
	<i>antisense</i>	GGTGCCCTTGCCCAGTAGC
AKT2	<i>sense</i>	GGCCCCTGACCAGACCTTACCC
	<i>antisense</i>	CCGCATCCACTCTTCCCTCTCATC
AKT2 3'UTR	<i>sense</i>	CTCCCACCACACCCCAGAA
	<i>antisense</i>	CAGCAGGGATGGGCGAAAAC
AKT3	<i>sense</i>	ATACACCAGAGGAAAGAGAAGAGT
	<i>antisense</i>	GACGCATCCATCTCTTCTTCT
CARM1	<i>sense</i>	CTTCCATGGAGTGGACCTGT
	<i>antisense</i>	ATGCAGCATGTGGAATTTGA
CAT	<i>sense</i>	GGAATTCCGTATGGCAATGA
	<i>antisense</i>	GATTGGCTGAGACGAAAAAC
CD115	<i>sense</i>	CTACTGCTGTTGCTGCTCTTGT
	<i>antisense</i>	CGGCTCCTAGAGTCTTACCAA

Name	Orientierung	Sequenz
c-Src	<i>sense</i> <i>antisense</i>	TCGCCGTGCAGGACAGAATAC CCTCTCCCTGGGTGCAACA
COG7	<i>sense</i> <i>antisense</i>	AGGATGGATAGCTGGAACACA CTTGCTCAGGAGGGAATGG
COX-2	<i>sense</i> <i>antisense</i>	CTCAGCCAGGCAGCAAATC GAATCCAGTCCGGGTACAGTCACA
DOCK10	<i>sense</i> <i>antisense</i>	GCCCCGAGCAGAACACAAG CACCGCCCTTGGATGATGA
ERC1	<i>sense</i> <i>antisense</i>	ATGTCCTCCAGAAGAAGATAGAAA AGCTGTGTCTGTGTTAGTGGTGTC
FCER1G	<i>sense</i> <i>antisense</i>	GTGATCTTGTCTTGCTCCTTTTG GGTGTTCAGGCCCGTGTAGA
Firefly Luciferase	<i>sense</i> <i>antisense</i>	CCTTCCGCATAGAACTGCCT GGTTGGTACTAGCAACGCAC
GAPDH	<i>sense</i> <i>antisense</i>	TTGTGGAAGGGCTCATGAC TCATACTTGGCAGGTTTCTCCAG
ICAM2	<i>sense</i> <i>antisense</i>	AGAAACTGTCCCCCAAGAGG GTCCTGCATCGGCTCATAGA
IL-1 $\beta$	<i>sense</i> <i>antisense</i>	AAACCTTTGACCTGGGCTGTCTG AGAGGATGGGCTCTTCTTC
IL-6	<i>sense</i> <i>antisense</i>	GAGGATACCACTCCCAACAGACC AAGTGCATCATCGTTGTTTCATACA
IL-10	<i>sense</i> <i>antisense</i>	GGCTGAGGCGCTGTCATCG TCATTCATGGCCTTGTAGACACC
IRAK1	<i>sense</i> <i>antisense</i>	ACAGCTATCAAGGTTTCGTCAC AGAAGAATGTCCAGTCGTTGAG
IRAK1BP1	<i>sense</i> <i>antisense</i>	AGGTCTGCATTACATTTACTGAAT AGGCCTGCCGCCGAAGATT
IRAK4	<i>sense</i> <i>antisense</i>	TCCTAGAGAAGCGGCAACAGTG AGAAGCTGTGGAACCGAGTGTC
IRF7	<i>sense</i> <i>antisense</i>	ATCTTCGACTTCAGCACTTTCTTC GGCTCCAGCTTCACCAG
JUN	<i>sense</i> <i>antisense</i>	AGAGCGGTGCCTACGGCTACAGTAA CGACGTGAGAAGGTCCGAGTTCTTG
LITAF	<i>sense</i> <i>antisense</i>	ACCGCCCCGTCCAGATGT CTACGCAGAACGGGATGAAGC
MED9	<i>sense</i> <i>antisense</i>	TTACTCCTTTTTGCCGTTGGTTC CGTTCTTGGTCCTCACTTGCTCT
MYO10	<i>sense</i> <i>antisense</i>	ATCCTTCAAAGCAGCCCAATCA CCGGGATTCTGCCTCACTACTC
NDUFV1	<i>sense</i> <i>antisense</i>	GCCTCCAATTTGCAGGTAGCTAT CACGCACCACAAACACATCA
NKRF	<i>sense</i> <i>antisense</i>	GAAGGTATTGATATTGGGGAGAT CTTTTTAGGAGGATTCTGACCAT
PARP4	<i>sense</i> <i>antisense</i>	TGAGCCTGAATGACGTGAGTAAA AGGCAGCAAGCGGTAGAACTC
PCGF1	<i>sense</i> <i>antisense</i>	CACTACGGAACGAGGAGGAG TTTTGCAGAAGGTGTGGAGA
PCGF2	<i>sense</i> <i>antisense</i>	GGACAAGGAGAAGACAGGAGTG TAGTATTCCTTCAGGGGCTCAT
PIK3CA	<i>sense</i> <i>antisense</i>	GTACATCTGGGCCACTTCGTC CCTATGGAGCCACAGACACTAC
Renilla Luciferase	<i>sense</i> <i>antisense</i>	GTTGTGCCACATATTGAGCC CCAAACAAGCACCCCAATCATG
TAK1	<i>sense</i> <i>antisense</i>	CGTCTTCTGCCAGTGAGATG ATCTTTTGCTCTCCACTTAGCTT

Name	Orientierung	Sequenz
TNF- $\alpha$	<i>sense</i>	TCCCCAAAGGGATGAGAAG
	<i>antisense</i>	GCACCACTAGTTGGTTGTC
TRP53BP2	<i>sense</i>	TCCAAAATGATGCCGATGTTCCCT
	<i>antisense</i>	CTTCGGCTAAATGGCAGTCGTTCC

### Primer für Klonierungen

Name	Orientierung	Sequenz
pBSIIKS(+)-Luc	<i>sense</i>	ATGGAAGACGCCAAAAACATAAAG
	<i>antisense</i>	GGGTTACAATTTGGACTTTCCGC
pBSIIKS(+)-Luc-TAK1 3'UTR-1.1-pA-NB	<i>sense</i>	CGCGTCGACATGATTCTCTGGG
	<i>antisense</i>	CCGCTCGAGCTCTCCTTAAGCA
pBSIIKS(+)-Luc-TAK1 3'UTR-1.2-pA-NB	<i>sense</i>	TGGCAGCTGTGCTTAAGGAGAG
	<i>antisense</i>	CCCGCTCGAGATCTTAGGGATTTATT
pBSIIKS(+)-Luc-TAK1 3'UTR-2-pA-NB	<i>sense</i>	CGCGTCGACTATTTTTTTCAGTCCATG
	<i>antisense</i>	CCGCTCGAGCCAACCACTTGTA
pBSIIKS(+)-Luc-TAK1 3'UTR-3-pA-NB	<i>sense</i>	CGCGTCGACTATTTTTTGTGAAG
	<i>antisense</i>	CCGCTCGAGTAGATAGCTTTACTA
pBSIIKS(+)-Luc-TAK1 3'UTR-4-pA-NB	<i>sense</i>	GCTATCTACTTTTATTCTGTCCAGG
	<i>antisense</i>	CCGCTCGAGTATGCTAGGAACT
pBSIIKS(+)-Luc-TAK1 3'UTR-5.1-pA-NB	<i>sense</i>	CAGTACAGTGTACCATAGTCATG
	<i>antisense</i>	CCGCTCGAGGAACTAATGGATA
pBSIIKS(+)-Luc-TAK1 3'UTR-5.3-pA-NB	<i>sense</i>	CAGTACAGTGTACCATAGTCATG
	<i>antisense</i>	CCGCTCGAGAAGGAATTCCAA
pBSIIKS(+)-Luc-TAK1 3'UTR-6-pA-NB	<i>sense</i>	CCATTAGTTTCTCCTCGTTGCTTC
	<i>antisense</i>	CCGCTCGAGAATGAATGAAGTTT
pBSIIKS(+)-AKT2 3'UTR-1	<i>sense</i>	AACTGCAGCCCTCTGCCACC
	<i>antisense</i>	GACGTCGACATTCCTCCTGCTTTATTG
pBSIIKS(+)-AKT2 3'UTR-2	<i>sense</i>	AACTGCAGGAGGAATGTTCCGGG
	<i>antisense</i>	GACGTCGACCTGGTCTGAAATGAG

### Oligonukleotide für die Klonierung der miRNA-Bibliotheken

Name	Sequenz
3' Adapter #1	<u>TACTA</u> TCGTATGCCGTCTTCTGCTTG ( <i>barcode</i> )
3' Adapter #2	T <u>GTAAT</u> TCGTATGCCGTCTTCTGCTTG ( <i>barcode</i> )
3' Adapter #3	TT <u>TACA</u> TCGTATGCCGTCTTCTGCTTG ( <i>barcode</i> )
3' Adapter #4	TAT <u>GAT</u> TCGTATGCCGTCTTCTGCTTG ( <i>barcode</i> )
5' Adapter	GUUCAGAGUUCUACAGUCCGACGAUC
Primer ce273	AATGATACGGCGACCACCGACAGGTTTCAGAGTTCTACAGTCCGA
Primer ce275	CAAGCAGAAGACGGCATACGA

## Oligonukleotide für Northern Blots

Name	Sequenz
miR-125b 5'arm	TCACAAGTTAGGGTCTCAGGGA
miR-146a 5'arm	AACCCATGGAATTCAGTTCTCA
miR-146b 5'arm	AGCCTATGGAATTCAGTTCTCA
miR-155 5'arm	ACCCCTATCACAATTAGCATTA
U6 snRNA	GAATTTGCGTGTTCATCCTTGCGCAGGGGCCATGCTAA

## siRNAs

Name	Sequenz
hnRNP K #1	CUGAUGAGAUGGUUGAAUdTdT
hnRNP K #3	GAACACAGGACCAGAUACAdTdT
Kontrolle	AGGUAGUGUAAUCGCCUUGdTdT

## Plasmide

Name	Firma / Quelle
pBluescript II KS(+)	Stratagene
pT3-Luc	[Iizuka <i>et al.</i> , 1994]
pT3-Luc-pA	[Iizuka <i>et al.</i> , 1994]
pBSIIS(+)-Luc	diese Arbeit
pBSIIS(+)-Luc-pA	Isabel Naarmann-de Vries
pBSIIS(+)-Luc-pA-NB	Isabel Naarmann-de Vries
pBSIIS(+)-Luc-TAK1 3'UTR-1.1-pA-NB	diese Arbeit
pBSIIS(+)-Luc-TAK1 3'UTR-1.2-pA-NB	diese Arbeit
pBSIIS(+)-Luc-TAK1 3'UTR-2-pA-NB	diese Arbeit
pBSIIS(+)-Luc-TAK1 3'UTR-3-pA-NB	diese Arbeit
pBSIIS(+)-Luc-TAK1 3'UTR-4-pA-NB	diese Arbeit
pBSIIS(+)-Luc-TAK1 3'UTR-5.1-pA-NB	diese Arbeit
pBSIIS(+)-Luc-TAK1 3'UTR-5.3-pA-NB	diese Arbeit
pBSIIS(+)-Luc-TAK1 3'UTR-6-pA-NB	diese Arbeit
pBSIIS(+)-TAK1 3'UTR-1.1	diese Arbeit
pBSIIS(+)-TAK1 3'UTR-1.2	diese Arbeit
pBSIIS(+)-TAK1 3'UTR-2	diese Arbeit
pBSIIS(+)-TAK1 3'UTR-3	diese Arbeit
pBSIIS(+)-TAK1 3'UTR-4	diese Arbeit
pBSIIS(+)-TAK1 3'UTR-5.1	diese Arbeit
pBSIIS(+)-TAK1 3'UTR-5.3	diese Arbeit
pBSIIS(+)-TAK1 3'UTR-6	diese Arbeit
pBSIIS(+)-AKT2 3'UTR-1	diese Arbeit
pBSIIS(+)-AKT2 3'UTR-2	diese Arbeit
pBSIISK 241 bp [10 R] (DICE)	[Ostareck-Lederer <i>et al.</i> , 1994]

## 2.4 Verbrauchsmaterialien, Geräte, Software

Verbrauchsmaterialien	Firma
Amersham Hyperfilm ECL	GE Healthcare
Amicon Ultra 10.000 MWCO	Millipore
Chroma Spin-100 columns	Takara Bio
GeneChip Mouse Genome 430 2.0 array	Affymetrix
Hybond-N Membran	GE Healthcare
illustra MicroSpin G-25 Columns	GE Healthcare
Immobilon-P Membran (PVDF)	Millipore
RNA 6000 Nano kit	Agilent
Spin-X Plastic Centrifuge Tube Filters	Sigma-Aldrich

Geräte	Firma
<i>semi dry</i> Blot Apparatur	Biorad
2100 Bioanalyzer	Agilent
7300 Real Time PCR System	life technologies
ApoTome.2 Fluoreszenzmikroskop	Zeiss
FACSCanto-II	BD Biosciences
GenePulser II	Biorad
ImageQuant LAS 4000	Fujifilm
Luminometer	Berthold Technologies
Nanodrop 2000	peqlab
Nass-Blot-Apparatur	Biorad
StepOnePlus Real Time PCR System	life technologies
UV Stratalinker 2400	Stratagene
Szintillationszähler	Wallac
Ultrazentrifuge und SW40 Ti-Rotor	Beckman Coulter

Software	Firma
ArrayStar	DNASTAR
AxioVision	Zeiss
FlowJo	TreeStar
GraphPad Prism	GraphPad Software
Lasergene 8	DNASTAR
MultiGauge	Fujifilm
SigmaPlot	Systat Software
StepOne Software	life technologies

## 2.5 Mikrobiologische Methoden

### 2.5.1 Transformation von Bakterien

Zur Transformation wurden die chemokompetenten Bakterien (*E. coli* XL1 blue) mit der Plasmid-DNA vermischt und für 30 min auf Eis inkubiert. Es folgte ein Hitzeschock für 45 sec bei 42°C und eine erneute Inkubation für 2 min auf Eis. Die Bakterien wurden mit 300 µl LB-Medium versetzt und für 30 min bei 37°C geschüttelt. Nach dem Ausplattieren auf Ampicillin-haltigem Agar wurde über Nacht bei 37°C im Brutschrank inkubiert.

### 2.5.2 Präparation von bakteriellen Plasmiden

Plasmidpräparationen aus transformierten Bakterien im Mini- oder im Midi-Maßstab wurden jeweils aus 3 ml oder 100 ml Übernacht-Kulturen in LB-Medium nach Angaben des Herstellers durchgeführt.

## 2.6 Molekularbiologische Methoden

### 2.6.1 Klonierungen

Zur Klonierung von pBSIIKS-Luc-pA-NB wurde zunächst der Firefly Luciferase ORF aus dem Plasmid pT3-Luc [Iizuka *et al.*, 1994] amplifiziert und *blunt end* in den mit SmaI geschnittenen Vektor pBluescript II KS (+) kloniert. Das daraus resultierende Plasmid pBSIIKS(+)-Luc wurde mit ApaI linearisiert und mit T4 DNA Polymerase behandelt, so dass glatte Enden entstanden. Eine poly(A)<sub>98</sub>-Sequenz wurde aus dem Plasmid pT3-Luc-pA [Iizuka *et al.*, 1994] mit EcoRI und BamHI heraus geschnitten und ebenfalls mit T4 DNA Polymerase glatte Enden erzeugt. Der linearisierte Vektor wurden mit der poly(A)-Sequenz ligiert, woraus das Plasmid pBSIIKS(+)-Luc-pA hervorging. Zusätzliche Restriktionsschnittstellen zur späteren Linearisierung wurden mittels komplementärer Oligonukleotide hinter der poly(A)-Sequenz in die KpnI-Schnittstelle eingeführt, um das Plasmid pBSIIKS(+)-Luc-pA-NB zu erhalten. Die TAK1 mRNA 3'UTR-Fragmente wurden mittels RT-PCR aus RAW 264.7 Gesamt-RNA amplifiziert und *blunt end*/XhoI in den entsprechend geschnittenen pBSIIKS(+)-Luc-pA-NB kloniert. Die TAK1 mRNA 3'UTR-Fragmente der resultierenden Plasmide wurden anschließend mit XmaI/XhoI in pBluescript II KS (+) subkloniert. Die AKT2 mRNA 3'UTR-Fragmente wurden mittels RT-PCR aus RAW 264.7 Gesamt-RNA amplifiziert und PstI/SalI in den entsprechend geschnittenen pBluescript II KS (+) kloniert.

## 2.6.2 Restriktionsverdau und Sequenzierung

Zur Linearisierung von Plasmiden für die *in vitro*-Transkription, zur Kontrolle der Identität von Plasmiden und zur Klonierung wurden die angegebenen Restriktionsendonukleasen nach Angaben des Herstellers verwendet. Die Sequenzierungen wurden von der Firma MWG durchgeführt.

## 2.6.3 Reinigung von Nukleinsäuren

Die Aufreinigung von PCR-Produkten erfolgte mit dem High Pure PCR Product Purification Kit oder mit dem MinElute PCR Purification Kit. Die Extraktion von DNA-Fragmenten aus dem Agarosegel erfolgte mit dem MinElute Gel Extraktion Kit jeweils nach Angaben des Herstellers.

## 2.6.4 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Konzentration von Nukleinsäuren wurde durch Messung der Absorption bei 260 nm bestimmt, wobei eine Absorption von 1 einer DNA-Konzentration von 50 ng/μl bzw. einer RNA-Konzentration von 40 ng/μl entspricht.

## 2.6.5 Agarose-Gelelektrophorese

Zur Analyse von DNA wurde die Agarose in TBE-Puffer durch Aufkochen gelöst und GelRed 1:20.000 verdünnt zugegeben. Falls notwendig, wurden die Proben mit 4x DNA-Ladepuffer versetzt. Die Elektrophorese erfolgte bei 100 V.

Zur Analyse von RNA wurde die Agarose in TAE-Puffer durch Aufkochen gelöst und GelRed 1:10.000 verdünnt zugegeben. Die Proben wurden mit dem gleichen Volumen RNA-Ladepuffer (Gel loading Buffer II) versetzt und für 5 min bei 90°C denaturiert. Die Elektrophorese erfolgte bei 50 V.

Der Fluoreszenzfarbstoff GelRed interkaliert in die Nukleinsäuren und kann mittels UV-Licht angeregt und in einem ImageQuant LAS 4000-Gerät detektiert werden.

<u>TBE-Puffer:</u>	<u>TAE-Puffer:</u>	<u>4x DNA-Ladepuffer</u>
89 mM Tris-Base	40 mM Tris-Base	0,2% (w/v) Bromphenolblau
89 mM Borsäure	20 mM Essigsäure	0,2% (w/v) Xylencyanol
2 mM EDTA	1 mM EDTA	50% (v/v) Glycerin

## 2.6.6 Denaturierende Gelelektrophorese mit Harnstoff

Um RNA oder DNA von geringer Größe aufzutrennen, wurden denaturierende Harnstoffgele eingesetzt. Die Proben wurden vorher mit dem gleichen Volumen Formamid-Ladepuffer gemischt, 30 sec bei 95°C denaturiert und direkt auf das Harnstoffgel aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte in TBE bei 400 V.

<u>Gellösung:</u>	<u>Formamid-Ladepuffer:</u>
TBE-Puffer	90% (v/v) Formamid
7 M Harnstoff	0,025% (w/v) Xylencyanol
6-15% (w/v) Acrylamid/Bisacrylamid (19:1)	0,025% (w/v) Bromphenolblau
0,0008% (w/v) APS	
0,0004% (v/v) TEMED	

## 2.7 Kultivierung und Analyse der RAW 264.7-Zellen

### 2.7.1 Kultivierung, LPS-Stimulation und Ernte

Die murine RAW 264.7-Zelllinie geht aus Lymphomen hervor, die durch den Abelson *leukemia virus* induziert wurden [Raschke *et al.*, 1978]. Die RAW 264.7-Zellen (TIB-71, ATCC) wurden in DMEM, versetzt mit 10% hitzeinaktiviertem FKS sowie 1% Penicillin und Streptomycin, kultiviert. Nach dem Auftauen wurden die Zellen zunächst für eine Woche kultiviert. Die Zellen wurden mit einer Dichte von  $4 \times 10^6$  Zellen pro 15 cm-Platte ausgesät und nach 2-tägiger Kultivierung verwendet bzw. passagiert. Zur Stimulation wurden 10 ng/ml LPS (*E.coli*, Serotyp 0111:B4) ins Kulturmedium gegeben. Wenn nicht anders beschrieben wurden die Zellen zur Ernte mit kaltem PBS gewaschen und mit einem Zellschaber abgelöst. Die Zellen wurden auf Eis gesammelt, für 5 min bei 4°C und 300 g zentrifugiert und erneut mit PBS gewaschen.

<u>PBS pH 7,4:</u>
10 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
2 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
137 mM Natriumchlorid
2,7 mM Kaliumchlorid

### 2.7.2 Transfektion von siRNAs

Eine Millionen RAW 264.7-Zellen wurden in DMEM ohne FKS und Antibiotika mit 500 pmol siRNA gemischt und bei 0,36 kV und 500 µF für 7 msec transfiziert. Im Anschluss wurden die Zellen mit einer Dichte von  $5 \times 10^6$  Zellen pro 10 cm-Platte bzw.  $1 \times 10^6$  Zellen pro *well* einer 6-*well*-Platte ausgesät. Die Ernte erfolgte 24 h nach der Transfektion.

### 2.7.3 Actinomycin D-Behandlung

Zur Analyse der mRNA-Stabilitäten wurden die Zellen für 0, 1 und 2 h mit 5 µg/ml Actinomycin D im Kulturmedium inkubiert. Die Kultivierung erfolgte in 6-*well*-Platten (siehe Kapitel 2.7.2).

### 2.7.4 Präparation von Triton-Lysaten

Die Zellen wurden nach der Ernte in einem der Zellmenge angepasstem Volumen Tritonlysepuffer resuspendiert und nach 30-minütiger Inkubation auf Eis für 10 min bei 4°C und 20.800 g zentrifugiert. Das erhaltene Lysat wurde von den präzipitierten Zelltrümmern getrennt und bei -80°C gelagert. Zur Detektion phosphorylierter Proteine im Western-Blot wurden dem Tritonlysepuffer noch Phosphatase-Inhibitoren zugesetzt.

<u>Tritonlysepuffer:</u>	<u>Phosphatase-Inhibitoren:</u>
50 mM Tris pH 7,4	37,3 mM p-Nitrophenylphosphat
300 mM Natriumchlorid	10 µM Natriumvanadat
1 % (v/v) Triton X-100	10 mM Natriumfluorid
1 mM DTT	10 mM β-Glycerophosphat
1 mM PMSF	50 µM Natriummolybdat
1 µg/ml Pepstatin	
2 µg/ml Leupeptin	

### 2.7.5 Präparation translationsaktiver zytoplasmatischer Extrakte

Die Präparation von translationsaktivem zytoplasmatischem Extrakt wurde in Anlehnung an das von Barton und Flanegan publizierte Protokoll durchgeführt [Barton & Flanegan, 1993]. Dazu wurden die Zellen wie im Kapitel 2.7.1 beschrieben geerntet, aber nach dem Ablösen dreimal mit isotonem Puffer gewaschen. Das Zellpellet wurde vollständig vom Puffer befreit, eingewogen, im gleichen Volumen (w/v) hypotonem Puffer resuspendiert und für 15 min auf Eis inkubiert. Die Zellen wurden mit Hilfe eines Glas-*dounce*-Homogenisators oder einer 26 *gauge*-Kanüle aufgebrochen und die Zellkerne wurden durch Zentrifugation bei 20.000 g und 4°C für 10 min abgetrennt. Der erhaltene zytoplasmatische Extrakt wurde von den präzipitierten Zelltrümmern getrennt und bei -150°C gelagert. 25 15 cm-Platten ergaben dabei durchschnittlich 1 mg Zellpellet mit einer Gesamtproteinmenge von 10 bis 15 mg im Extrakt.

<u>Isotoner Puffer:</u>	<u>Hypotoner Puffer:</u>
35 mM Hepes/KOH pH 7,6	10 mM Hepes/KOH pH 7,6
146 mM Natriumchlorid	10 mM Kaliumacetat
11 mM Glukose	0,5 mM Magnesiumacetat
	5 mM DTT
	Protease-Inhibitor Cocktail (EDTA-frei)

### 2.7.6 Präparation von zytoplasmatischen Extrakten für die Dichtegradientenzentrifugation

Vor der Ernte wurden die Zellen für 10 min mit 100 µg/ml Cycloheximid im Kulturmedium inkubiert. Cycloheximid ist ein Antibiotikum, welches die Peptidyltransferase-reaktion der Translation inhibiert [Obrig *et al.*, 1971]. Die Zellen wurden dreimal

mit kaltem PBS mit 100 µg/ml Cycloheximid gewaschen und mit einem Zellschaber abgelöst. Nach Zentrifugation für 5 min bei 4°C und 300 g wurde das Zellpellet in seinem fünffachen Volumen (v/v) Lysepuffer resuspendiert und für 2 min auf Eis inkubiert. Es folgte der Zellaufschluss mit einem Glas-*dounce*-Homogenisator und eine 10-minütige Inkubation auf Eis. Die Zellkerne und -trümmer wurden durch Zentrifugation für 10 min bei 13.000 g und 4°C abgetrennt und der Überstand (zytoplasmatischer Extrakt) bei -150°C gelagert. Aus  $1 \times 10^6$  Zellen wurde im Durchschnitt eine Proteinmenge von 400 µg im Extrakt gewonnen.

UZ-Puffer:

150 mM Kaliumchlorid  
20 mM Hepes pH 7,6  
5 mM Magnesiumchlorid

Lysepuffer:

UZ-Puffer  
1 mM DTT  
100 µg/ml Cycloheximid  
0,5% (v/v) NP-40  
50 U/ml RiboLock  
Protease-Inhibitor Cocktail (EDTA-frei)

**2.7.7 FACS**

*Fluorescence activated cell sorting* (FACS)-Analysen wurden in Zusammenarbeit mit Dr. Felix Heymann und Prof. Frank Tacke von der Medizinischen Klinik III bzw. mit Dr. Jana Mossanen durchgeführt. Die Zellen wurden wie im Kapitel 2.7.1 beschrieben geerntet, in FACS-Färbepuffer resuspendiert und für 20 min bei 4°C mit den entsprechenden Antikörpern wie in Tabelle A.3 beschrieben inkubiert. Nach dem Waschen wurden die Zellen in PBS mit Hoechst resuspendiert und im FACS gemessen. Durch Ausschluss von F4/80- und CD11b-negativen Zellen wurde sichergestellt, dass nur Makrophagen analysiert werden.

Zur intrazellulären Anfärbung von TNF- $\alpha$  wurden die Zellen für 6 h mit 3 µg/ml Brefeldin A im Kulturmedium inkubiert. Brefeldin A ist ein Proteintransportinhibitor, der eine Akkumulation von Proteinen im Endoplasmatischen Retikulum bewirkt [Pelham, 1991]. Die Zellen wurden nach der Ernte bei 4°C für 15 min mit 0,2% Formaldehyd fixiert, anschließend gewaschen und bei Raumtemperatur für 15 min mit 0,1% Saponin permeabilisiert. Die intrazelluläre Färbung von TNF- $\alpha$  wurde in 0,1% Saponin für 15 min bei 4°C durchgeführt (siehe Tabelle A.3). Vor der Analyse wurden die Zellen gewaschen und in PBS resuspendiert.

FACS-Färbepuffer:

PBS pH 7,4  
0,9% (v/v) normal mouse serum  
0,9% (v/v) normal rabbit serum  
0,9% (v/v) normal human serum  
3% (w/v) BSA  
2 mM EDTA

## 2.8 Analyse von Proteinen

### 2.8.1 Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford

Das Roti-Quant-Reagenz wurde vor Verwendung 1:5 mit Wasser verdünnt. Zur Messung wurde 1 µl einer Probe mit 1 ml verdünntem Reagenz gemischt, für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert und die Absorption bei 595 nm bestimmt. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe von Eichgeraden, die mit BSA erstellt wurden.

### 2.8.2 Methanol-Chloroform-Fällung von Proteinen

Zur Analyse von Proteinen aus den Saccharosedichtegradienten-Fractionen wurden diese vor der Detektion im Western-Blot angereichert. Dafür wurden 300 µl jeder Gradientenfraction mit 900 µl Methanol, 300 µl Chloroform und 450 µl Wasser versetzt, wobei die Proben zwischen den einzelnen Schritten für 15 sec gevortext wurden. Nach Zentrifugation für 15 min bei 14.000 rpm befanden sich die Proteine in der Interphase. Der Überstand wurde verworfen, die Proteine durch Zugabe von 20 µg Glykogen und 900 µl Methanol gefällt und für 15 min bei 14.000 rpm präzipitiert. Der Überstand wurde vollständig entfernt und das Präzipitat nach dem Trocknen in 2x SDS-Probenpuffer resuspendiert.

### 2.8.3 Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Je nach benötigter Auftrennung wurden 8 bis 15%ige Polyacrylamid-Gele verwendet. Vor dem Beladen wurden die Proteinproben mit 2x SDS-Probenpuffer gemischt und für 5 min bei 95°C aufgeköcht. Die Elektrophorese erfolgte in Laufpuffer bei 180 V.

#### Sammelgel

5% (w/v) Acrylamid/Bisacrylamid (37,5:1)  
125 mM Tris/HCl pH 6,8  
0,1% (w/v) APS  
0,0004% (v/v) TEMED

#### Trenngel

8-15% (w/v) Acrylamid/Bisacrylamid (37,5:1)  
375 mM Tris/HCl pH 8,7  
0,1% (w/v) APS  
0,0004% (v/v) TEMED

#### 2x SDS-Probenpuffer

250 mM Tris/HCl pH 6,8  
4% (w/v) SDS  
20% (v/v) Glycerin  
10% (v/v) β-Mercaptoethanol  
0,02% (w/v) Bromphenolblau

#### Laufpuffer

250 mM Glycin  
25 mM Tris  
3,5 mM SDS

### 2.8.4 Western-Blot

Nach Auftrennung der Proteine durch Polyacrylamid-Gelelektrophorese wurden diese durch Elektrophorese auf eine PVDF-Membran übertragen. Der Transfer erfolgte in

Transferpuffer bei 25 V und 4°C über Nacht in einer Nass-Blot-Apparatur. Die Membran wurde anschließend für 1 h bei Raumtemperatur geblockt und mit dem Primärantikörper für 1 h bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4°C schüttelnd inkubiert. Nach dreimaligem Waschen für je 5 min mit TBST erfolgte die Inkubation des Sekundärantikörpers für 1 h bei Raumtemperatur. Die Inkubationsbedingungen unterscheiden sich je nach verwendetem Primärantikörper und sind in Tabelle A.1 aufgeführt. Nach fünfmaligem Waschen für je 5 min mit TBST wurde die Membran mit dem Substrat für die an den Sekundärantikörper gekoppelte *horseradish peroxidase* (HRP) inkubiert. Für gut detektierbare Proteine wurde das SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate und für schlechter detektierbare Proteine die ECL Prime WB Detection reagents verwendet. Nach Inkubation für 1 min bei Raumtemperatur erfolgte die Detektion in einem ImageQuant LAS 4000-Gerät.

<u>Transferpuffer:</u>	<u>TBST:</u>
25 mM Tris-Base	50 mM Tris/HCl pH 7,4
190 mM Glycin	150 mM Natriumchlorid
	0,05% (v/v) Tween-20

### 2.8.5 Silberfärbung von Proteinen im Polyacrylamid-Gel

Nach der Elektrophorese (siehe Kapitel 2.8.3) wurde das Polyacrylamid-Gel für 5 min in Fixierlösung fixiert und danach mit Wasser gewaschen. Es erfolgte eine Vorbehandlung für 5 min in 50% (v/v) Aceton und für 1 min mit 0,03% (w/v) Natriumthiosulfat, gefolgt von einem Waschschrift. Anschließend wurde das Gel mit Imprägnierlösung für 8 min imprägniert und nach erneutem Waschen in Entwicklerlösung für 10 bis 60 sec inkubiert. Die Entwicklung wurde durch Zugabe von 1% (v/v) Essigsäure abgestoppt, sobald die gewünschte Färbeintensität erreicht war.

<u>Fixierlösung:</u>	<u>Imprägnierlösung:</u>	<u>Entwicklerlösung:</u>
50% (v/v) Aceton	0,2% (w/v) Silbernitrat	2% (w/v) Natriumcarbonat
1,25% (w/v) Trichloressigsäure	1% (v/v) Formaldehyd	0,04% (v/v) Formaldehyd
0,04% (v/v) Formaldehyd		0,008% (w/v) Natriumthiosulfat

### 2.8.6 ELISA

Der *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA) dient der Quantifizierung von sekretierten Proteinen im Zellkulturmedium. Der Zellkulturüberstand wurde dafür vor der Ernte der Zellen gesammelt und für 5 min bei 20.000 g und 4°C zentrifugiert, um Zelltrümmer abzutrennen. Der Überstand wurde in ein neues Gefäß überführt und zur Analyse 1:5 bis 1:100 mit Assay Diluent verdünnt. Die Detektion von TNF- $\alpha$  erfolgte nach den Angaben des Herstellers.

## 2.9 Präparation und Analyse von RNA

### 2.9.1 Isolierung von Gesamt-RNA

Bei Bedarf wurden vor der Extraktion 50 pg Firefly Luciferase oder CAT RNA pro Reaktion als Extraktionskontrolle zugegeben. Für die Isolation von Gesamt-RNA aus Zellen wurden die Proben mit 750 µl Trizol-Reagenz versetzt, 15 sec gevortext und für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Zugabe von 200 µl Chloroform wurde erneut 15 sec gevortext und für 3 min bei Raumtemperatur inkubiert. Durch Zentrifugation für 15 min bei 12.000 g wurde die Phasentrennung erreicht. Die obere Phase wurde in ein neues Gefäß überführt, 10 µg Glykogen zugegeben und die RNA durch Zugabe von 500 µl Isopropanol gefällt. Nach 10-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurde für 15 min bei 20.000 g und 4°C zentrifugiert. Das Präzipitat wurde anschließend mit 80%igem Ethanol gewaschen und der Überstand vollständig entfernt. Nach dem Trocknen wurde die RNA in RNase-freiem Wasser gelöst.

Zur Isolation von RNA nach der Immunpräzipitation (IP, siehe Kapitel 2.12) wurden 750 µl Trizol-Reagenz direkt auf die *beads* gegeben und das Protokoll wie oben beschrieben durchgeführt.

Zur Isolation von RNA aus den Gradientenfractionen (siehe Kapitel 2.14) wurden 300 µl jeder Fraktion mit 800 µl Trizol-Reagenz versetzt, 15 sec gevortext, 300 µl Chloroform zugegeben, erneut 15 sec gevortext und für 3 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach erfolgter Phasentrennung wurde die obere Phase in ein neues Gefäß überführt, nochmals 500 µl Chloroform zugegeben und für 5 min bei 12.000 g zentrifugiert. Die obere Phase wurde in ein neues Gefäß überführt, 20 µg Glykogen zugegeben, die RNA durch Zugabe von 700 µl Isopropanol gefällt und das Protokoll wie oben beschrieben zu Ende geführt.

#### Trizol-Reagenz:

0,8 M Guanidiniumthiocyanat

0,4 M Ammoniumthiocyanat

0,1 M Natriumacetat pH 5

5% (v/v) Glycerin

38% (v/v) wassergesättigtes Phenol (pH 4,5 - 5)

### 2.9.2 DNase-Verdau

Zur semi-quantitativen Analyse von mRNAs mittels RT-PCR wurde die isolierte Gesamt-RNA zunächst mit DNase behandelt. Pro 3 µg RNA wurde 1 U RQ1-DNase zugesetzt und in RQ1-Puffer für 30 min bei 37°C inkubiert. Nach Phenol/Chloroform- und Chloroform-Extraktion wurden 10 µg Glykogen zugegeben und die RNA durch Zugabe von 1,3 M Ammoniumacetat und dem 3,5-fachen Volumen Ethanol gefällt. Nach

Zentrifugation für 30 min bei 20.000 g und 4°C wurde das Präzipitat mit 80% Ethanol gewaschen und der Überstand vollständig entfernt. Die RNA wurde in RNase-freiem Wasser gelöst und die Konzentration erneut bestimmt. Anschließend wurde eine cDNA-Synthese wie im Kapitel 2.9.3 beschrieben durchgeführt.

### 2.9.3 Reverse Transkription

Zur cDNA-Synthese wurden 2 µg RNA mit 20 pmol Primer zuerst für 5 min bei 70°C denaturiert. Nach Zugabe von 0,5 mM dNTPs, RT-Puffer und 150 U M-MLV RT wurde für 1 h bei 42°C inkubiert und anschließend das Enzym für 20 min bei 70°C denaturiert.

### 2.9.4 Semi-quantitative PCR

Die Primer für die semi-quantitative PCR und die quantitative PCR wurden so entworfen, dass sie die Exon-Exon-Grenzen der mRNA überspannen und die PCR-Produkte eine Größe von 100 bis 300 bp aufweisen.

Eine Reaktion (25 µl) enthielt:

GoTaq Flexi Puffer

2 µl cDNA (siehe Kapitel 2.9.3)

200 µM dNTPs

10 pmol *sense* Primer

10 pmol *antisense* Primer

1,5 mM Magnesiumchlorid

1 U GoTaq Flexi DNA Polymerase

Das PCR-Programm war wie folgt: Denaturierung für 3 min bei 94°C, 15 - 34 Zyklen von 30 sec bei 94°C, 45 sec bei 57°C und 30 sec bei 72°C, anschließend 10 min bei 72°C. Die Zyklenzahl richtete sich nach der Expression der jeweiligen mRNA. Die Analyse der PCR-Produkte erfolgte auf einem GelRed-gefärbten 2%igem Agarosegel.

### 2.9.5 Quantitative PCR

Um die Expression von mRNAs quantitativ zu bestimmen wurde eine qPCR durchgeführt. Da diese Methode sensitiver ist als die semi-quantitative PCR wurde die cDNA (siehe Kapitel 2.9.3) vor der Analyse mindestens 1:5 mit Wasser verdünnt. Es wurden zwei verschiedene Geräte verwendet. Zur Untersuchung endogener mRNAs wurden gleiche Mengen RNA analysiert.

Eine Reaktion (15  $\mu$ l, 7300 System) enthielt:

PCR Master Mix

SYBR Green

ROX reference dye

200 nM *sense* Primer

200 nM *antisense* Primer

5  $\mu$ l verdünnte cDNA

Eine Reaktion (10  $\mu$ l, StepOnePlus System) enthielt:

Power SYBR Green PCR Master Mix

200 nM *sense* Primer

200 nM *antisense* Primer

4,6  $\mu$ l verdünnte cDNA

Die relative Expression wurde mit der  $\Delta\Delta$ Ct-Methode ermittelt [Livak & Schmittgen, 2001], indem auf die Extraktionskontrolle oder ein Referenzgen normalisiert wurde.

## 2.9.6 Microarray-Analyse

Zur Identifizierung von an hnRNP K assoziierten mRNAs wurden Microarray-Analysen in Duplikaten durchgeführt. Aus jeweils gleichen Mengen zytoplasmatischen Extrakten wurden die mRNPs präzipitiert (siehe Kapitel 2.12). Die kopräzipitierte RNA sowie die RNA aus einer äquivalenten Menge Extrakt wurde mittels Trizol-Reagenz isoliert (siehe Kapitel 2.9.1). Die RNA wurde in 20  $\mu$ l RNase-freiem Wasser gelöst und jeweils 500 ng der Gesamt-RNA und gleiche Volumina der kopräzipitierten RNA für die Microarrays (Mouse Genome 430 2.0) eingesetzt. Die folgenden Schritte der RNA-Qualitätskontrolle, Generierung von biotinylierter RNA, Hybridisierung, Waschen und Scannen der Chips wurden durch die Chip Facility im IZKF Aachen durchgeführt.

Die Vorverarbeitung und die Analyse der Daten wurde mit dem Programm ArrayStar durchgeführt. Dabei wurde die *Robust Multi-array Average* (RMA)-Methode angewendet [Irizarry *et al.*, 2003], welche *quantile normalization* und *median polish summarization* beinhaltet. Wegen der großen Variation der Werte der Luciferase-Kontroll-IP (persönliche Information, L. Gan), wurden die Daten der hnRNP K-IP mit den gemittelten Werten der Luciferase-IP verglichen. Es wurden die Gene selektiert, welche in den 0 h-Proben eine Hochregulation  $> 2$  aufwiesen und in den 6 h-Proben eine Hochregulation  $< 2$ . Um auch die Genexpression einzubeziehen, wurde die gleiche Auswertung auch nach Vergleich der hnRNP K-IP mit der Gesamt-RNA durchgeführt. Beide Methoden wurden sowohl mit jeweils dem ersten und dem zweiten Replikat, als auch mit den gemittelten Werten beider Replikate durchgeführt. Die Ergebnislisten aller Aus-

wertungen wurden zusammengefasst und Einträge mit sehr geringer Kopienzahl (Werte unter 20) wurden ausgeschlossen. Waren die Werte der gemittelten Luciferase-IP größer als die der hnRNP K-IP wurden auch diese mRNAs ausgeschlossen. Unter Nichtberücksichtigung der nicht-annotierten Gene, wurden somit 2163 Einträge identifiziert, was 1901 einzelnen mRNAs entsprach.

Alle Daten sind MIAME-konform [Brazma *et al.*, 2001] und wurden im *Gene Expression Omnibus* zur Einsicht hinterlegt (*accession number*: GSE48463).

### 2.9.7 In vitro-Transkription

Für die Herstellung von RNA für die *in vitro*-Translation, für Konkurrenzexperimente und für Extraktions- und *spike in*-Kontrollen wurden zunächst die Plasmide mit entsprechenden Restriktionsendonukleasen linearisiert. 1 µg der linearisierten DNA wurde für die *in vitro*-Transkription mit dem MEGAscript T3 bzw. T7 Kit eingesetzt. Die Transkription erfolgte nach Angaben des Herstellers. Die RNA wurde anschließend mit Phenol und mit Phenol/Chloroform extrahiert und über Chroma Spin-100 columns nach Herstellerangaben gereinigt. Nach Zugabe von 10 µg Glykogen, 1/10 Volumen 3 M Natriumacetat und dem 2,5-fachen Volumen Ethanol erfolgte eine Fällung über Nacht bei -20°C. Die RNA wurde am darauffolgenden Tag durch Zentrifugation für 30 min bei 14.000 rpm und 4°C präzipitiert und nach dem Waschen des Präzipitats in 40 µl RNase-freiem Wasser gelöst. Die Integrität der Transkripte wurde mittels Agarose-Gelelektrophorese überprüft.

Für die Transkription der RNA für die *in vitro*-Translationsexperimente wurden 40 mM Cap-Analagon (m<sup>7</sup>GpppG) zugegeben und die Menge an GTP auf 15 mM reduziert.

### 2.9.8 In vitro-Transkription von radioaktiv markierter RNA

Eine Reaktion (10 µl) enthielt:

Transkriptionspuffer

1 µg linearisierte DNA

5 mM DTT

1 µl NTP Mix (10 mM ATP, 10 mM CTP, 10 mM GTP, 1 mM UTP)

40 U RiboLock

1 µl T3 oder T7 RNA Polymerase

2,5 µl α-32P UTP (3.000 Ci/mmol)

Die Reaktion wurde für 45 min bei 37°C inkubiert, mit TE-Puffer (10 mM Tris/HCl pH 8, 1 mM EDTA) auf 100 µl aufgefüllt und eine Probe zur Szintillationsmessung entnommen. Der Rest wurde mit wassergesättigtem Phenol und anschließend mit

Phenol/Chloroform extrahiert. Nach Zugabe von 1 µg tRNA (Hefe), 25 µl 4 M Ammoniumacetat und 320 µl Ethanol und Fällung der RNA über Nacht bei -20°C erfolgte eine Zentrifugation für 30 min bei 14.000 rpm und 4°C. Das Präzipitat wurde in einem kleinen Volumen RNase-freiem Wasser resuspendiert und eine Probe zur Szintillationsmessung entnommen, wodurch die genaue Berechnung der RNA-Konzentration ermöglicht wurde.

### 2.9.9 Radioaktive Markierung von Oligonukleotiden

Eine Reaktion (20 µl) enthielt:

20 pmol Oligonukleotid  
γ-32P ATP (3.000 Ci/mmol)  
T4 PNK Puffer  
10 U T4 PNK

Die Reaktion wurde für 30 min bei 37°C inkubiert und durch 2-minütige Zentrifugation bei 700 g über G25 spin columns wurden die nicht eingebauten Nukleotide entfernt. Durch Zugabe von EDTA mit einer Endkonzentration von 18 mM wurde das Enzym inaktiviert. Die Aktivität der markierten Sonden wurde durch Szintillationsmessung bestimmt und 3.000.000 cpm pro Northern Blot eingesetzt.

### 2.10 In vitro-Translation

Eine Reaktion (10 µl) enthielt:

45 µg zytoplasmatischer Extrakt (siehe Kapitel 2.7.5)  
0,1 mM Aminosäuren  
16 mM Hepes pH 7,6  
2,5 mM Magnesiumacetat  
60 mM Kaliumacetat  
0,8 mg/ml bovine tRNA  
0,8 mM ATP  
0,1 mM GTP  
0,04 mg/ml Kreatinkinase  
20 mM Kreatinphosphat  
50 fmol RNA (siehe Kapitel 2.9.7)

Die Reaktionen wurden für 30 min bei 37°C im Wasserbad inkubiert. Zur Bestimmung der Aktivität der Firefly-Luciferase wurden 8 µl Reaktion mit 30 µl Luciferase Assay System I gemischt und im Luminometer gemessen. Zur Bestimmung der RNA-

Stabilitäten wurde überprüft, welcher Anteil der exogenen Reporterkonstrukte nach der 30-minütigen Translation noch vorhanden war. Dafür wurde nach Zugabe einer Extraktionskontrolle die Gesamt-RNA isoliert, die mRNAs der Firefly-Luciferase und der Extraktionskontrolle mittels qPCR detektiert und das Verhältnis der Reporterkonstrukte nach Translation im Vergleich mit vor der Translation berechnet.

## 2.11 UV crosslink-Experimente

Direkte Wechselwirkungen von RNA und Proteinen können *in vitro* mittels UV *crosslink*-Experimenten untersucht werden. Dazu wurde rekombinantes Protein mit radioaktiv markierter RNA (siehe Kapitel 2.9.8) inkubiert und durch Bestrahlung mit UV-Licht kovalent miteinander verknüpft. Die überhängenden Enden der RNA wurden enzymatisch abgebaut, der verbleibende Protein-Oligonukleotid-Komplex durch Polyacrylamid-Gelelektrophorese aufgetrennt und mittels Autoradiographie detektiert.

Eine Reaktion (10 µl) enthielt:

Bindungspuffer

100 mM Kaliumchlorid

40 U RiboLock

1 µg 16S/23S rRNA (*E. coli*)

14,5 - 40 fmol radioaktiv markierte RNA

4,5 µl rekombinantes Protein oder hnRNP K-Verdünnungspuffer

Die Reaktionen wurden 15 min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend mit 55 µg Heparin versetzt, um unspezifische Bindungen zu reduzieren. Die kovalente Verknüpfung der Proteine mit der gebundenen RNA erfolgte durch Bestrahlung mit UV-Licht einer Wellenlänge von 254 nm für 10 min, wobei eine Entfernung von 3 bis 4 cm eingehalten und die Proben auf Eis belassen wurden. Die nicht vom Protein geschützte RNA wurde durch Zugabe von 4 µg RNase A, 11,2 U RNase T1 und 10x RNase-Verdünnungspuffer für 15 min bei 37°C abgebaut. Die Proben wurden mit dem gleichen Volumen 2x SDS-Probenpuffer versetzt, für 5 min bei 80°C aufgeköcht und auf einem Polyacrylamid-Gel aufgetrennt. Das Gel wurde nach der Elektrophorese zweimal für 10 min in Fixierlösung (10% Essigsäure, 10% Ethanol) fixiert und getrocknet. Zur Detektion der radioaktiven Signale wurde ein Film aufgelegt.

5x Bindungspuffer:

50 mM Hepes pH 7,4

15 mM Magnesiumchlorid

25% (v/v) Glycerin

5 mM DTT

10x RNase-Verdünnungspuffer:

100 mM Tris pH 7,5

10 mM Magnesiumchlorid

1M Kaliumchlorid

hnRNP K-Verdünnungspuffer:

20 mM Hepes pH 7,4

100 mM Kaliumchlorid

5% (v/v) Glycerin

1 mM DTT

## 2.12 Immunpräzipitation

### Kovalente Kopplung des Antikörpers:

Für die Microarrays und die Validierung wurde ein monoklonaler Antikörper gegen hnRNP K aus der Maus verwendet und kovalent an Protein A-Sepharose gekoppelt, mit dem Kontrollantikörper gegen Firefly Luciferase wurde ebenso verfahren. Für das Experiment in Abbildung 3.23 wurde ein monoklonaler Antikörper gegen hnRNP K aus der Ratte verwendet und an Protein G-Sepharose gekoppelt. Dafür wurden 20  $\mu\text{l}$  Sepharose mit 10 ng (Maus oder Firefly Luciferase) bzw. 1  $\mu\text{l}$  (Ratte) Antikörper pro  $\mu\text{g}$  zytoplasmatischer Extrakt für 1 h in PBS inkubiert. Alle Inkubationsschritte erfolgten bei Raumtemperatur unter Rotation. Zur kovalenten Verknüpfung der Sepharose mit dem Antikörper folgte eine 30-minütige Inkubation in 0,2 M Natriumtetraborat pH 9,1 mit 20 mM Dimethylpimelimidat. Durch Inkubation in 0,2 M Ethanolamin pH 8 für 2 h wurden die restlichen reaktiven Gruppen abgesättigt.

### Immunpräzipitation aus zytoplasmatischen Extrakten:

Für die Immunpräzipitation von mRNPs wurden 20  $\mu\text{l}$  gekoppelte Sepharose mit der jeweils aufgeführten Menge zytoplasmatischem Extrakt in 500  $\mu\text{l}$  IP-Puffer für 1,5 h unter Rotation inkubiert. Wenn nicht anders angegeben, erfolgten alle Schritte bei 4°C. Die *beads* wurden 2 min bei 5.000 g abzentrifugiert und zweimal mit 500  $\mu\text{l}$  IP-Puffer gewaschen. Zur Proteinanalyse wurden die *beads* in 2 x SDS-Probenpuffer aufgenommen und zur Analyse der RNA mit 750  $\mu\text{l}$  Trizol-Reagenz versetzt und wie in Kapitel 2.9.1 beschrieben weiterverarbeitet.

#### IP-Puffer:

20 mM Hepes pH 7,4  
100 mM Kaliumchlorid  
5 mM Magnesiumacetat  
0,025% (v/v) Triton X-100  
1 mM DTT  
0,5 mM PMSF  
2  $\mu\text{g}/\text{ml}$  Leupeptin

## 2.13 Immunfluoreszenz-Färbung

Zur Immunfluoreszenz-Färbung wurden die Zellen auf Deckgläschen verteilt und wie in Kapitel 2.7.1 beschrieben für 48 h im Brutschrank inkubiert. Mit Ausnahme der Antikörper-Inkubation erfolgten alle Schritte bei Raumtemperatur. Die Fixierung der

Zellen erfolgte mit 4% PFA in PBS für 30 min und die Permeabilisierung mit 0,35% Triton X-100 in PBS für 10 min. Um unspezifische Wechselwirkungen zu reduzieren, wurde mit 2% BSA in PBS für 25 min geblockt. Die Inkubation mit dem Primärantikörper erfolgte in 0,2% BSA in PBS für 1 h bei 37°C. Nach dreimaligem Waschen mit PBS erfolgte die Inkubation mit dem Sekundärantikörper ebenfalls in 0,2% BSA in PBS für 1 h bei 37°C. Die Verdünnungen der Antikörper sind in Tabelle A.2 aufgeführt. Die Deckgläschen wurden fünf Mal mit PBS gewaschen, kurz in Wasser und Ethanol getaucht und getrocknet. Anschließend wurden sie auf einen Objektträger mit 11 µl ProLong Gold Antifade reagent with DAPI gelegt und über Nacht getrocknet. Die Bilder wurden mit einem ApoTome.2 mittels AxioVision aufgenommen.

## 2.14 Saccharosedichtegradientenzentrifugation

Es wurden 12 ml lineare Gradienten von 15 bis 45% (w/v) Saccharose versetzt mit 100 µg/ml Cycloheximid hergestellt. 600 µg zytoplasmatischer Extrakt (siehe Kapitel 2.7.6) wurde auf die Gradienten geladen und für 2 h bei 4°C und 35.000 rpm zentrifugiert, wobei die Bremse deaktiviert wurde. Die Gradienten wurden anschließend vom Boden her (schwerste Fraktion) abgepumpt und 19 Fraktionen mit einem Volumen von jeweils 600 µl wurden aufgefangen. Mit einem Schreiber wurde bei einer Wellenlänge von 260 nm ein Gradientenprofil aufgezeichnet.

## 2.15 Präparation und Analyse RNA-bindender Proteine

### Anreicherung der RBPs:

Das verwendete Protokoll ist angelehnt an die beiden Veröffentlichungen von Alfredo Castello [Castello *et al.*, 2012, 2013]. Für jede Probe wurden zehn 15 cm-Platten mit RAW 264.7-Zellen verwendet. Für den *in vivo-crosslink* wurden die Zellen auf der Platte zweimal mit kaltem PBS gewaschen. Das PBS wurde vollständig entfernt und die Platten auf Eis in einem Stratalinker platziert, wobei der Abstand zu den UV-Lampen ca. 15 cm betrug. Die Zellen wurden mit UV-Licht der Wellenlänge 254 nm mit einer Energie von 0,15 J/cm<sup>2</sup> (entspricht etwa 1 min) bestrahlt. Direkt danach wurden 5 ml kaltes PBS zugegeben und die Zellen mit dem Zellschaber von der Platte abgelöst. Es folgte ein Zentrifugationsschritt bei 500 g und 4°C für 5 min, der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in 35 ml kaltem Lysepuffer resuspendiert. Nach 10-minütiger Inkubation auf Eis, wurde das Lysat zur Homogenisierung dreimal durch eine Kanüle mit einem Durchmesser von 0,45 mm gedrückt. An diesem Punkt wurden polyadenylierte Renilla Luciferase-RNA und nicht-polyadenylierte Firefly Luciferase-RNA als *spike in*-Kontrollen zugegeben und die *input*-Proben entnommen. Zur Aktivierung wurden

3 ml magnetische oligo(dT)<sub>25</sub>-beads dreimal mit 9 ml Lysepuffer gewaschen und dann mit dem Lysat für 1 h bei 4°C unter Rotation inkubiert. Alle folgenden Schritte wurden bei 4°C durchgeführt. Die Trennung der beladenen *beads* vom Lysat erfolgte durch Inkubation in einen Magnetständer, das Lysat wurde abgenommen und aufbewahrt. Die *beads* wurden nun mit jeweils 35 ml der folgenden Puffer für 5 min unter Rotation gewaschen: Lysepuffer, zweimal Puffer 1, zweimal Puffer 2 und zweimal Puffer 3. Die Abtrennung der *beads* erfolgte erneut im Magnetständer, der Überstand wurde verworfen. Als letzter Schritt erfolgte eine Elution mit 0,5 ml Elutionspuffer durch Schütteln bei 750 rpm und 50°C für 3 min. Die leeren oligo(dT)<sub>25</sub>-beads wurden nun zur Regeneration dreimal mit 9 ml Lysepuffer gewaschen. Die regenerierten *beads* wurden mit dem Lysat, welches von der ersten Inkubation aufbewahrt wurde, für eine weitere Isolierungsrunde verwendet.

Lysepuffer:

20 mM Tris/HCl pH 7,5  
 500 mM Lithiumchlorid  
 0,5% (w/v) LiDS  
 1 mM EDTA  
 5 mM DTT

Puffer 1:

20 mM Tris/HCl pH 7,5  
 500 mM Lithiumchlorid  
 0,1% (w/v) LiDS  
 1 mM EDTA  
 5 mM DTT

Puffer 2:

20 mM Tris/HCl pH 7,5  
 500 mM Lithiumchlorid  
 1 mM EDTA  
 5 mM DTT

Puffer 3:

20 mM Tris/HCl pH 7,5  
 200 mM Lithiumchlorid  
 1 mM EDTA  
 5 mM DTT

Elutionspuffer:

20 mM Tris/HCl pH 7,5  
 1 mM EDTA

**Isolierung der RNA:**

Für eine Analyse der präzipitierten RNA müssen zunächst die kovalent gebundenen Proteine entfernt werden. Zum Verdau der Proteine in den *input*-Proben und Elutionen wurde 5x Proteinase K-Puffer und 40 U RiboLock zugegeben und eine 30-minütige Vorinkubation bei 65°C durchgeführt. Nach Zugabe von 20 µg Proteinase K wurden die Proben für 1 h bei 50°C inkubiert. Es wurde die CAT RNA als Extraktionskontrolle zugegeben und die RNA wie im Kapitel 2.9.1 beschrieben isoliert.

5x Proteinase K-Puffer:

50 mM Tris/HCl pH 7,5  
 750 mM Natriumchlorid  
 1% (w/v) SDS  
 50 mM EDTA  
 2,5 mM DTT  
 25 mM Calciumchlorid

**Isolierung der Proteine:**

Zum Verdau der RNA wurde 5x RNase-Puffer, 280 U RNase T1 und 4 µg RNase A zugegeben und für 1 h bei 37°C inkubiert. Die Elutionen wurden dann mit einem Amicon Ultra 10.000 MWCO durch Zentrifugation bei 4°C und 3.220 g konzentriert, wobei das obere Reservoir zweimal mit Puffer 4 aufgefüllt wurde.

5x RNase-Puffer:

50 mM Tris/HCl pH 7,5  
750 mM Natriumchlorid  
0,25% (v/v) NP-40  
2,5 mM DTT

Puffer 4:

10 mM Tris/HCl pH 7,5  
50 mM Natriumchlorid

**Analyse der Proteine im Massenspektrometer:**

Die Analyse der Proteinproben wurde durch Jeroen Krijgsveld (EMBL Heidelberg) durchgeführt. Hierbei wurden die Proben -/+ LPS-Behandlung, welche mit UV-Licht bestrahlt wurden, mit der nicht-bestrahlten Kontrolle verglichen. Da diese Kontrollen wenig Proteine enthalten (vergleiche Abbildung 3.34 A, Spuren 4, 5, 9 und 10) und der Hintergrund normalerweise konstant ist (persönliche Information, J. Krijgsveld), wurden die jeweiligen Kontrollen von 0 h und 2 h LPS vereint. Die Proben wurden verdaut und mit unterschiedlich schweren stabilen Isotopen markiert. Anschließend wurden die Peptide durch isoelektrische Fokussierung in zwölf Fraktionen unterteilt, welche mittels LC-MS-MS analysiert wurden. Die Proteine wurden anhand ihrer Fragmentierungsmuster identifiziert. Durch Vergleich der *peak*-Intensitäten der unterschiedlich schweren Isotope im Massenspektrometer-Spektrum konnte die relative Quantifizierung der Proteine ermittelt werden, welche als Proteinverhältnis angegeben wurde.

**2.16 Analyse von miRNAs****2.16.1 Klonierung der cDNA-Bibliotheken**

Die Klonierung der miRNA-Bibliotheken aus Gesamt-RNA und Größen-fraktionierter RNA wurde im Labor von Gunter Meister (Universität Regensburg) in Anlehnung an das von Pfeffer veröffentlichte Protokoll durchgeführt [Pfeffer, 2007].

**Größenfraktionierung:**

50 µg Gesamt-RNA wurden auf einem 12%igem Harnstoffgel aufgetrennt. Mittels eines radioaktiv markierten Größenstandards (siehe Kapitel 2.9.9) für microRNAs wurde die

Laufhöhe der miRNA-Fraktion auf dem Gel abgeschätzt. Die entsprechenden Stücke wurden aus dem Harnstoffgel ausgeschnitten, geschreddert, mit 200 µl Elutionspuffer (300 mM Natriumchlorid, 2 mM EDTA) gemischt und über Nacht bei 25°C schüttelnd bei 1.000 rpm inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Gelstücke durch Zentrifugation über Spin-X Plastic Centrifuge Tube Filters für 2 min bei 14.000 rpm abgetrennt. Die Elution wurde mit dem 2,5-fachen Volumen Ethanol versetzt, über Nacht bei -20°C präzipitiert und dann für 30 min bei 17.000 g und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Präzipitat mit kaltem 80%igem Ethanol gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation für 30 min bei 17.000 g und 4°C wurde das Präzipitat getrocknet und in RNase-freiem Wasser resuspendiert.

### **Ligation des 3'Adapters:**

Eine Reaktion (18 µl) enthielt:

10 µg RNA

Ligationspuffer

16,7% (v/v) DMSO

50 pmol 3'adenylierter Adapter (wurde von A. Dueck zur Verfügung gestellt)

Die Reaktion wurde für 30 sec bei 95°C denaturiert und nach Zugabe von 2 µl T4 RNA Ligase 2 (truncated) für 1 h bei 37°C inkubiert. Anschließend folgte eine Hitzeinaktivierung des Enzyms für 10 min bei 65°C. Für die Klonierung der vier miRNA-Bibliotheken wurden vier 3'Adapter mit unterschiedlichen *barcodes* verwendet.

10x Ligationspuffer:

0,5 M Tris/HCl pH 7,6

0,1 M Magnesiumchlorid

0,1 M β-Mercaptoethanol

1 mg/ml BSA

### **Ligation des 5'Adapters:**

Eine Reaktion (18 µl) enthielt:

Ligationspuffer

2 mM ATP

16,7% (v/v) DMSO

100 pmol 5'Adapter

Der Ansatz wurde zur 3'-Adapter-Ligationsreaktion zugegeben und für 30 sec bei 95°C denaturiert. Nach Zugabe von 2 µl T4 RNA-Ligase 1 wurde für 1 h bei 37°C inkubiert.

### **cDNA-Synthese:**

Die Synthese der cDNA wurde mit dem SuperScript III First-Strand Synthesis SuperMix Kit durchgeführt.

Eine Reaktion (8 µl) enthielt:

- 6 µl RNA von der 5'Adapter-Ligationsreaktion (siehe oben)
- 100 pmol Primer ce275
- 1 µl Annealing Buffer

Die Reaktion wurde für 5 min bei 65°C denaturiert und anschließend auf Eis abgekühlt. Nach Zugabe von 10 µl 2x First-Strand Reaction Mix und 2 µl SuperScript III/RNaseOUT Enzyme Mix wurde für 50 min bei 50°C und anschließend für 5 min bei 85°C inkubiert.

### **Pilot-PCR:**

Um die erfolgreiche Klonierung zu überprüfen und um eine geeignete Zykluszahl für die darauffolgende finale PCR abzuschätzen, wurde eine Pilot-PCR durchgeführt.

Eine Reaktion (10 µl) enthielt:

- Phusion HF buffer
- 20 pmol Primer ce273
- 20 pmol Primer ce275
- 0,25 mM dNTPs
- 0,2 U Phusion DNA Polymerase
- 1 µl cDNA (siehe oben)

Das PCR-Programm war wie folgt: Reaktivierung für 1 min bei 98°C, 20 Zyklen von 10 sec bei 98°C, 30 sec bei 60°C und 15 sec bei 72°C, anschließend 10 min bei 72°C. Die PCR-Reaktion wurde mit 2 µl 6x DNA Loading Dye gemischt und auf einem 6%igem Harnstoffgel aufgetrennt. Das Gel wurde für 5 min mit GelRed nach Herstellerangaben in TBE inkubiert und die DNA unter UV-Licht detektiert. Die klonierten miRNAs migrierten auf einer Höhe von ca. 100 bp, während Adapter-Dimere bei 75 bp migrierten.

**Finale PCR:**

Eine Reaktion (50 µl) enthielt:

Phusion HF buffer

100 pmol Primer ce273

100 pmol Primer ce275

1,25 mM dNTPs

0,5 U Phusion DNA Polymerase

9 µl cDNA (siehe oben)

Das PCR-Programm war wie folgt: Reaktivierung für 1 min bei 98°C, 22 Zyklen von 10 sec bei 98°C, 30 sec bei 60°C und 15 sec bei 72°C, anschließend 10 min bei 72°C.

**Reinigung der PCR-Produkte durch Gelelution:**

Die gesamte PCR-Reaktion wurden mit 10 µl 6x DNA Loading Dye gemischt und auf einem 6%igem Harnstoffgel aufgetrennt. Das Gel wurde mit GelRed gefärbt, die Banden, welche die gewünschten PCR-Produkte enthalten, markiert und ausgeschnitten. Die Gelstücke wurden anschließend geschreddert, mit 200 µl Elutionspuffer (300 mM Natriumchlorid, 2 mM EDTA) gemischt und über Nacht bei 25°C schüttelnd bei 1.000 rpm inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Gelstücke durch Zentrifugation durch Spin-X Plastic Centrifuge Tube Filters für 2 min bei 14.000 rpm abgetrennt. Die Elution wurde mit dem 2,5-fachen Volumen Ethanol versetzt, über Nacht bei -20°C präzipitiert und dann für 30 min bei 17.000 g und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Präzipitat mit kaltem 80%igem Ethanol gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation für 30 min bei 17.000 g und 4°C wurde das Präzipitat getrocknet und in RNase-freiem Wasser resuspendiert.

Die klonierten und amplifizierten cDNA-Bibliotheken wurden durch die Firma Fasteris SA (Plan-les-Ouates, Schweiz) auf einem Illumina Genome Analyzer IIx sequenziert. Die Auswertung der Daten wurde von der Firma InterRNA Genomics B.V. (Utrecht, Niederlande) durchgeführt.

**2.16.2 Northern Blot**

Der Nachweis spezifischer miRNAs erfolgte mit Modifizierungen nach einem von Pall und Hamilton publizierten Protokoll [Pall & Hamilton, 2008] und wurde im Labor von Gunter Meister (Universität Regensburg) durchgeführt.

**Transfer und Vernetzung der miRNAs:**

10 µg Gesamt-RNA wurde auf einem 12%igem Harnstoffgel aufgetrennt und danach die miRNAs auf eine Hybond-N Membran übertragen. Der Transfer erfolgte hierbei in Wasser für 30 min bei 20 V in einer *semi dry* Blot-Apparatur. Bei diesem Verfahren werden miRNAs effizient transferiert, während längere RNAs schlechter übertragen werden. Anschließend wurden die miRNAs durch chemische Vernetzung kovalent mit der Membran verbunden. Dafür wurde die Membran mit EDC-Reagenz für 1h bei 50°C inkubiert.

EDC-Reagenz pH 8:

6 ml Wasser

0,128 mM 1-Methylimidazol

75 µl 1 M HCl

188,25 mg EDC

**Hybridisierung:**

Die Hybridisierungslösung muss vor der Verwendung auf 50°C angewärmt werden. Die Membran wurde mit Hybridisierungspuffer, in dem die radioaktiv markierte Oligonukleotid-Sonde (siehe Kapitel 2.9.9) verdünnt wurde, über Nacht bei 50°C inkubiert.

Hybridisierungslösung:

5x SSC

7% (w/v) SDS

20 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> pH 7,2

Denhardt's Lösung

50x Denhardt's Lösung:

1% (w/v) BSA (Albumin Fraktion V)

1% (w/v) Polyvinylpyrrolidon K30

1% (w/v) Ficoll 400

20x SSC pH 7:

3 M Natriumchlorid

0,3 M Natriumcitrat

**Waschen und Exposition:**

Am darauffolgenden Tag wurde die Hybridisierungslösung abgenommen und die Membran zweimal für 10 min mit Waschpuffer I bei 50°C gewaschen. Nach einem weiteren Waschschrift mit Waschpuffer II für 10 min bei 50°C wurde die Membran in Folie eingewickelt und zur Detektion ein Phosphoimager-*Screen* aufgelegt.

Waschpuffer I:

5x SSC

1% (w/v) SDS

Waschpuffer II:

SSC

1% (w/v) SDS

## 2.17 Statistische Auswertungen

Wenn mehrere Experimente durchgeführt wurden, wurden die Mittelwerte der erzielten Ergebnisse und eine Standardabweichung berechnet, letztere wurde in den Diagrammen durch Fehlerbalken angegeben. Die Standardabweichung wurde in der Annahme ermittelt, dass die Ergebnisse eine Stichprobe repräsentieren und ist ein Maß dafür, wie weit die Werte um den Mittelwert streuen.

Wenn möglich, wurde die statistische Signifikanz der Unterschiede zwischen zwei Ergebnissen mit dem Student'schen t-Test ermittelt. Es wurde ein zweiseitiger heteroskedastischer t-Test durchgeführt und die erhaltenen p-Werte wie folgt im Diagramm dargestellt: \* =  $p \leq 0,05$ , \*\* =  $p \leq 0,01$ , \*\*\* =  $p \leq 0,001$ . Der p-Wert gibt die Wahrscheinlichkeit an, ein solches Ergebnis zu erhalten, wenn die beiden verglichenen Populationen deckungsgleich sind (Nullhypothese).

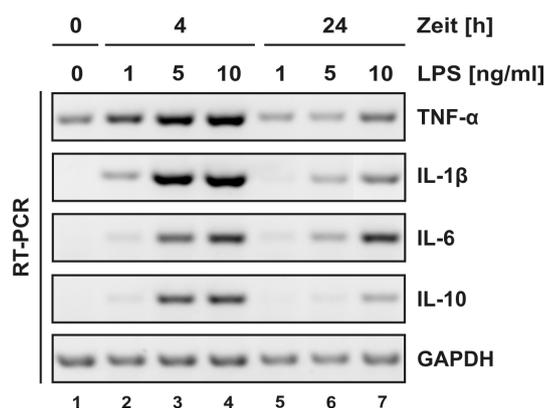
Die Anreicherungsanalysen, welche in Abbildung 3.37 B, C und D dargestellt sind, wurden mit Hilfe der *Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery* (DAVID, [Huang da *et al.*, 2009a,b]) durchgeführt. Das Programm berechnet einen p-Wert für jeden Term, wobei ein modifizierter Exakter Fisher-Test (*EASE score*) angewendet wird. Um die erhaltenen p-Werte zu korrigieren wurde die Methode des multiplen Testens nach Benjamini-Hochberg angewendet [Huang da *et al.*, 2009b]. Der Analyse wurden folgende Kriterien zu Grunde gelegt:

- *EASE score*  $\leq 0,1$
- mindestens drei Proteine konnten einem Term zugeordnet werden
- korrigierter p-Wert  $\leq 0,05$

## 3 Ergebnisse

### 3.1 Aktivierung von Makrophagen durch LPS

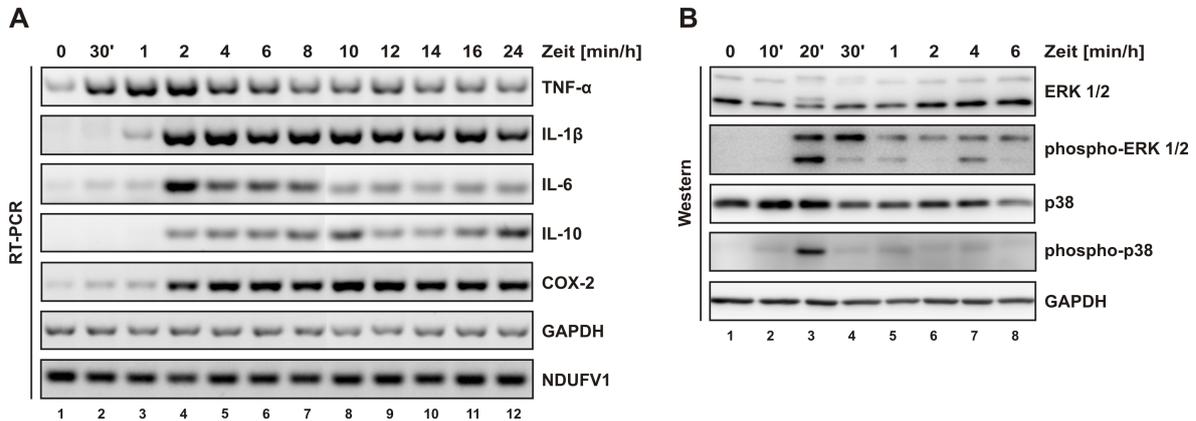
Zunächst sollen verschiedene Aspekte der Aktivierung von Makrophagen durch LPS anhand der murinen Makrophagen-Zelllinie RAW 264.7 untersucht werden. Für die Stimulation der Makrophagen wurde eine LPS-Präparation von *Escherichia coli* verwendet. Um die minimal effektive Konzentration an LPS zu ermitteln, die eine gut detektierbare Expression von Zytokin-mRNAs hervorruft, wurden Titrationen durchgeführt. Begonnen wurde mit einer Konzentration von 1000 ng/ml LPS im Kulturmedium [Daten nicht gezeigt], die dann schrittweise auf 1 ng/ml reduziert wurde. In Abbildung 3.1 ist eine Titration mit 1, 5 und 10 ng/ml LPS dargestellt. Nach einer Behandlung der RAW 264.7-Zellen mit 10 ng/ml LPS konnten die mRNAs der proinflammatorischen Zytokine TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  und IL-6 sowie des anti-inflammatorischen Zytokins IL-10 gut in der RT-PCR nachgewiesen werden (vergleiche Spuren 1, 4 und 7). Geringere LPS-Konzentration waren dagegen nicht ausreichend, um eine Induktion der Zytokin-mRNAs zu detektieren (vergleiche Spuren 1 - 3, 5 und 6). Für alle folgenden Experimente wurde deshalb zur Behandlung der Makrophagen eine Konzentration von 10 ng/ml LPS im Kulturmedium eingesetzt.



**Abbildung 3.1: Titration der LPS-Konzentration.** RAW 264.7 wurden unbehandelt belassen oder mit 1, 5 oder 10 ng/ml LPS für jeweils 4 h oder 24 h stimuliert. Die Expression der Zytokin-mRNAs oder der GAPDH mRNA als Kontrolle wurde mittels RT-PCR analysiert.

In einer Zeitreihe wurde zunächst die LPS-abhängige Induktion der Zytokin- und der COX-2 mRNAs untersucht (Abbildung 3.2 A). Diese folgte einer jeweils spezifischem Kinetik, so wurde beispielsweise die TNF- $\alpha$  mRNA schon innerhalb von 30 min syn-

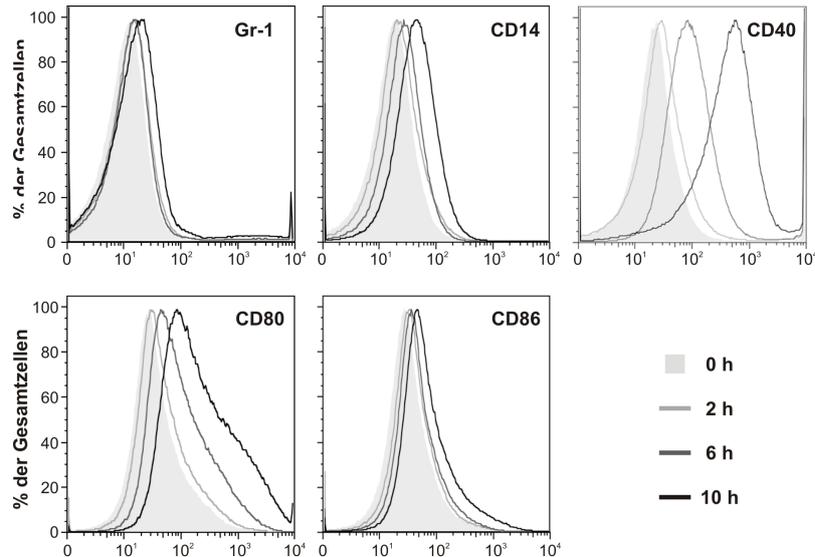
thetisiert und nahm nach 2 h bereits wieder ab. Die Bindung von LPS an den TLR4 initiiert intrazelluläre Signalkaskaden, wie den ERK- oder den p38/MAPK-Signalweg. Diese Proteinkinasen werden früh im Verlauf der LPS-Antwort phosphoryliert und dadurch aktiviert. Die Phosphorylierung von ERK 1/2 erreichte 20 bis 30 min nach LPS-Stimulation in Maximum, während die Phosphorylierung von p38 fast ausschließlich bei 20 min detektierbar war (Abbildung 3.2 B).



**Abbildung 3.2: Expression von Zytokin-mRNAs und Phosphorylierung von Proteinkinasen im Verlauf der LPS-Antwort.** **A)** RAW 264.7 wurden für bis zu 24 h mit LPS stimuliert und die Expression von Zytokin-mRNAs und der COX-2 mRNA mittels RT-PCR analysiert. GAPDH und NDUFV1 dienten als Kontrollen. **B)** RAW 264.7 wurden für bis zu 6 h mit LPS stimuliert und die Expression sowie Phosphorylierung von ERK 1/2 und p38 im Western-Blot detektiert, GAPDH diente als Kontrolle.

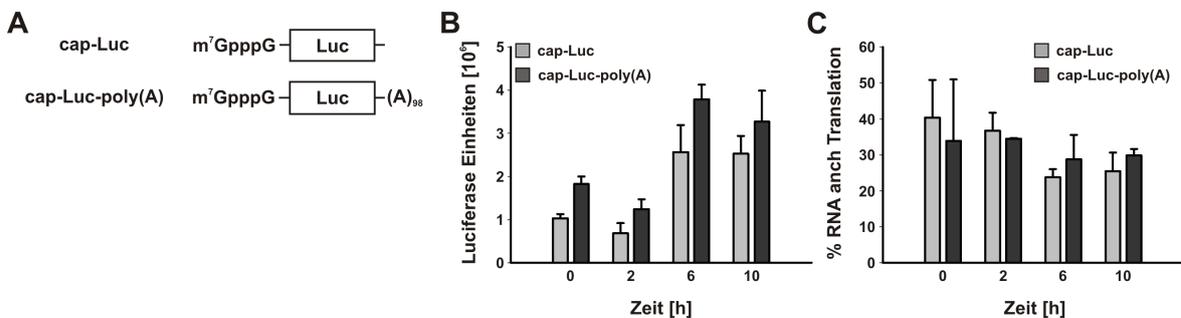
Eine weitere Eigenschaft, die mit der Makrophagenaktivierung einhergeht, ist die Induktion von Oberflächenproteinen wie Gr-1, CD14, CD40, CD80 und CD86 [Tacke & Randolph, 2006; D'Anto *et al.*, 2009], die mittels FACS detektiert werden kann. Gr-1 ist ein Oberflächenprotein, was spezifisch auf Neutrophilen und Monozyten vorkommt. CD14 ist der Rezeptor für den LBP-LPS-Komplex und transferiert diesen zum TLR4. CD40 gehört zur Familie der TNF-Rezeptoren. Stimulation von CD40 durch CD154 führt zur Reifung von antigen-präsentierenden Zellen und in Makrophagen zur Produktion von Zytokinen und Stickstoffmonoxid [van Kooten & Banchereau, 2000]. CD80 und CD86 sind wichtig für die Kostimulation von T-Zellen. Nach LPS-Stimulation der RAW 264.7-Zellen konnte eine moderate Induktion von Gr1, CD14 und CD86 sowie eine starke Induktion von CD40 und CD80 beobachtet werden (Abbildung 3.3).

Damit die Makrophagen nach ihrer Aktivierung in der Lage sind vermehrt Zytokine auszuschütten, muss deren Translationsrate gesteigert werden. Um zu untersuchen, ob die Einwirkung von LPS einen Einfluss auf die generelle Translationsaktivität der Makrophagen hat, wurden *in vitro*-Translationsexperimente durchgeführt. Hierfür wurden nach verschiedenen Zeitpunkten der LPS-Stimulation translationsaktive zytoplasmatische Extrakte präpariert. RNA-Reporterkonstrukte bestehend aus einem Firefly Luciferase ORF ohne oder mit poly(A)-Schwanz (schematisch dargestellt in Abbildung 3.4 A) wurden in zytoplasmatischem Extrakt translatiert und die Aktivität des



**Abbildung 3.3: Induktion von aktivierungsspezifischen Oberflächenmarkern.** RAW 264.7 wurden für bis zu 10 h mit LPS stimuliert und die Expression von Oberflächenproteinen mittels FACS detektiert.

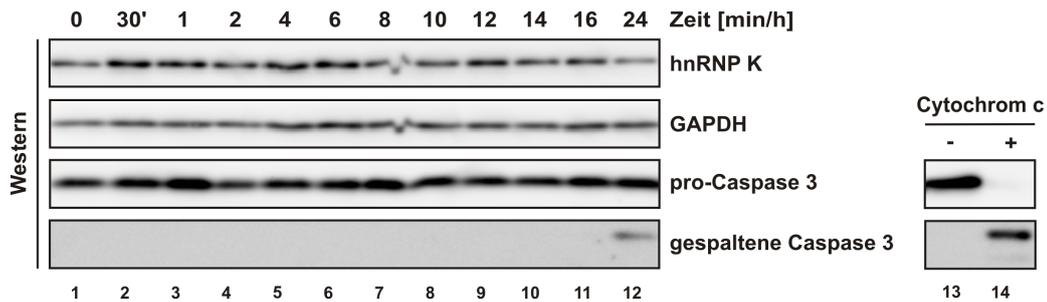
entstandenen Enzyms photometrisch bestimmt. In Abbildung 3.4 B ist gezeigt, dass beide Reporter-RNAs in Extrakten, die nach mindestens 6-stündiger LPS-Behandlung gewonnen wurden, vermehrt translatiert wurden. Eine Beeinflussung der Stabilität der Reporterkonstrukte konnte ausgeschlossen werden, da jeweils vergleichbare Mengen der Reporter-RNA nach Abschluss der Translation isoliert werden konnten (Abbildung 3.4 C).



**Abbildung 3.4: Translation und Stabilität von Reporter-RNAs.** A) Schematische Darstellung der Reporterkonstrukte bestehend aus einem 5' cap und einem Firefly Luciferase ORF ohne oder mit poly(A)-Schwanz ((A)<sub>98</sub>). B) RAW 264.7 wurden für die angegebenen Zeitpunkte mit LPS stimuliert und die Translation der Reporter-RNA in zytoplasmatischen Extrakten untersucht. Das gebildete Enzym wurde anhand der Umsetzung eines Substrates quantitativ bestimmt. C) Quantifizierung der verbleibenden Menge der Reporter-RNA nach der Translation mittels qPCR.

Da die Rolle von hnRNP K als post-transkriptionaler Regulator untersucht werden soll, wurde zunächst dessen Expression im Verlauf der LPS-Antwort analysiert. Im Western-Blot konnte hnRNP K zu allen Zeitpunkten detektiert werden (Abbildung 3.5). Die beobachtete leichte Variation der hnRNP K Expression konnte in weiteren Experimenten nicht bestätigt werden [Daten nicht gezeigt]. Es wurde weiterhin

überprüft, ob durch Einwirkung von LPS Apoptose induziert wird. Proteolyse der pro-Caspase 3 zur aktiven gespaltenen Caspase 3 ist ein Merkmal der Apoptose. Das Spaltprodukt der pro-Caspase 3 konnte jedoch erst nach 24 h LPS-Behandlung detektiert werden (Abbildung 3.5, Spur 12). Daher konnte ausgeschlossen werden, dass die Makrophagen durch eine Behandlung mit LPS bis maximal 16 h apoptotisch werden. Soweit nicht anders vermerkt, wurden die folgenden Experimente nach 6-stündiger LPS-Behandlung durchgeführt, da die mRNAs der untersuchten Zytokine nachweisbar waren (siehe Abbildung 3.2 A).



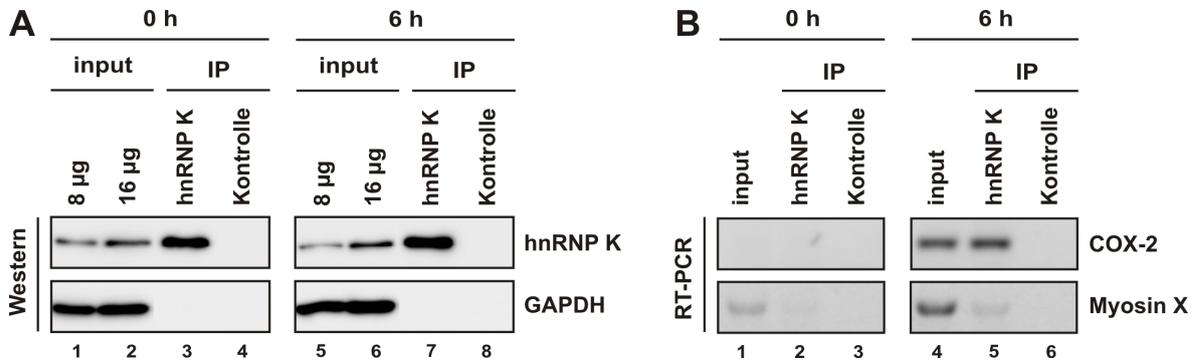
**Abbildung 3.5: Expression von hnRNP K und Aktivierung der Caspase 3.** RAW 264.7 wurden für bis zu 24 h mit LPS stimuliert. Die Expression von hnRNP K, pro-Caspase 3 und gespaltenen Caspase 3 wurde im Western-Blot analysiert, GAPDH diente als Kontrolle. Extrakt von Jurkat-Zellen, die mit Cytochrom c behandelt wurden, diente als Positivkontrolle für die erfolgte Spaltung der pro-Caspase 3.

## 3.2 Identifizierung von hnRNP K-assoziierten mRNAs

Ein Ziel der Arbeit ist es, mRNAs zu identifizieren, die in Makrophagen post-transkriptional durch hnRNP K reguliert werden. Es wurde die Hypothese aufgestellt, dass eine Regulation in Abhängigkeit der Assoziation von hnRNP K an eine Ziel-mRNA stattfindet. Mittels RIP-Chip (Immunpräzipitation eines RBPs gekoppelt mit reverser Transkription der gebundenen RNA und Analyse mit Microarrays) sollten mRNAs identifiziert werden, deren Interaktion mit hnRNP K sich durch die Einwirkung von LPS verändert.

Um dies zu untersuchen wurden mRNPs, die hnRNP K beinhalten, spezifisch gereinigt. Hierfür wurden translationsaktive zytoplasmatische Extrakte von unbehandelten und LPS-aktivierten Makrophagen verwendet. Aus den Extrakten wurden hnRNP K-mRNPs mittels Immunpräzipitation gereinigt (Abbildung 3.6 A). Es konnte gezeigt werden, dass hnRNP K spezifisch mit einem Antikörper gegen hnRNP K (Spuren 3 und 7), aber nicht mit einem Kontrollantikörper (Spuren 4 und 8) präzipitiert wird. Eine unspezifische Assoziation von GAPDH lag nicht vor. Es ist bekannt, dass die COX-2 mRNA in humanen THP-1-Monozyten nach Behandlung mit einem pro-inflammatorischem Peptid mit hnRNP K kopräzipitiert [Shanmugam *et al.*, 2008] (siehe Kapitel 1.6.2). Diese mRNA wurde in RAW 264.7-Zellen nach LPS-Behandlung stark

induziert (Abbildung 3.6 B, Spuren 1 und 4) und wies auch in den murinen Makrophagen eine Assoziation mit hnRNP K auf (Spur 5). Als Negativkontrolle diente die Myosin X mRNA, die in unbehandelten und LPS-stimulierten Zellen nicht bzw. nur in sehr geringem Maße von hnRNP K gebunden wurde (Spuren 2 und 5).



**Abbildung 3.6: Immunpräzipitation von hnRNP K und assoziierten mRNAs.** RAW 264.7 wurden unbehandelt belassen oder für 6 h mit LPS stimuliert. Immunpräzipitationen mit einem Antikörper gegen hnRNP K oder einem Kontrollantikörper gegen die Firefly Luciferase wurden in zytoplasmatischen Extrakten durchgeführt. Die Spezifität der Reinigung wurde auf Protein- (A) und mRNA-Ebene (B) untersucht, wobei GAPDH und Myosin X jeweils als Negativkontrolle dienen.

Aus zwei biologischen Replikaten wurden hnRNP K-assoziierte mRNAs mittels Microarrays identifiziert. Dafür wurden jeweils gleiche Mengen an zytoplasmatischem Extrakt aus unbehandelten Zellen und nach 6 h LPS-Stimulation für die Immunpräzipitationen verwendet. Die RNA aus den Präzipitationen und den *inputs* wurde isoliert, in cDNA umgeschrieben und auf den Chips hybridisiert (siehe Kapitel 2.9.6). In die Auswertung wurden mRNAs eingeschlossen, welche in unbehandelten RAW 264.7-Zellen an hnRNP K gebunden waren, deren Interaktion aber nach 6 h LPS-Behandlung reduziert war. Nach diesen Kriterien verblieben 1901 mRNAs, die zunächst mit der *Gene Ontology* (GO)-Datenbank annotiert und mit *protein annotation through evolutionary relationship* (PANTHER, [Thomas *et al.*, 2003]) nach ihren biologischen Prozessen eingruppiert wurden (Abbildung 3.7). Von den 3404 Funktionen, die den kodierten Proteinen insgesamt zugeordnet werden konnten erfüllt der größte Teil eine Funktion im Metabolismus, dies trifft allerdings auch auf das Mausgenom insgesamt zu [Daten nicht gezeigt].

Schwerpunkt dieser Arbeit ist die Untersuchung der Regulation des Immunsystems. Aus diesem Grund wurde der Fokus auf mRNAs gelegt, deren kodierte Proteine bei der Immunantwort von Bedeutung sind. Mit Hilfe der *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes* (KEGG) [Kanehisa & Goto, 2000] konnten 16 der 1901 mRNAs den TLR-Signalwegen zugeordnet werden [Daten nicht gezeigt]. Von den 1901 mRNAs wurden 21 mRNAs zur Validierung mittels qPCR ausgewählt (Tabelle 3.1). Dabei handelt es sich hauptsächlich um mRNAs, die für Komponenten des TLR4-Signalweges, Transkriptionsfaktoren und Oberflächenproteine kodieren.

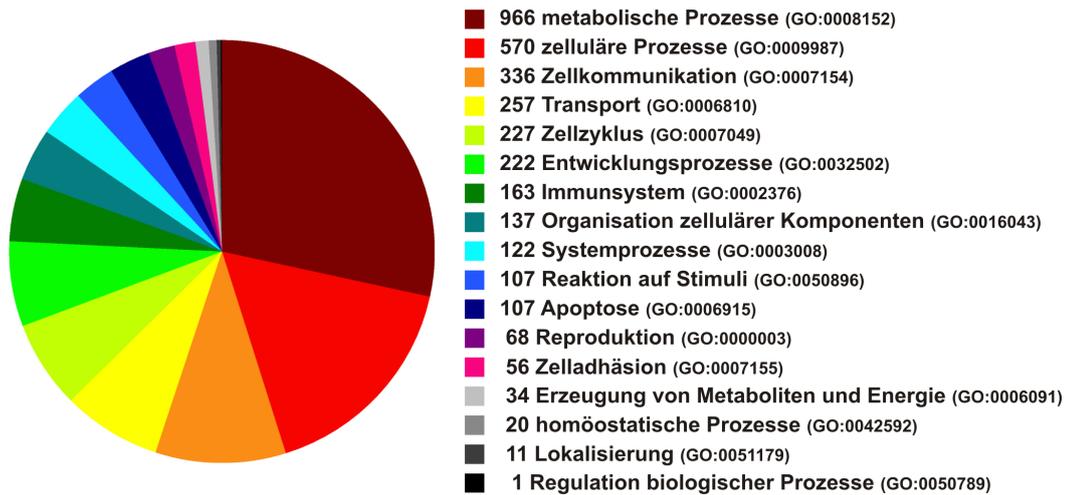


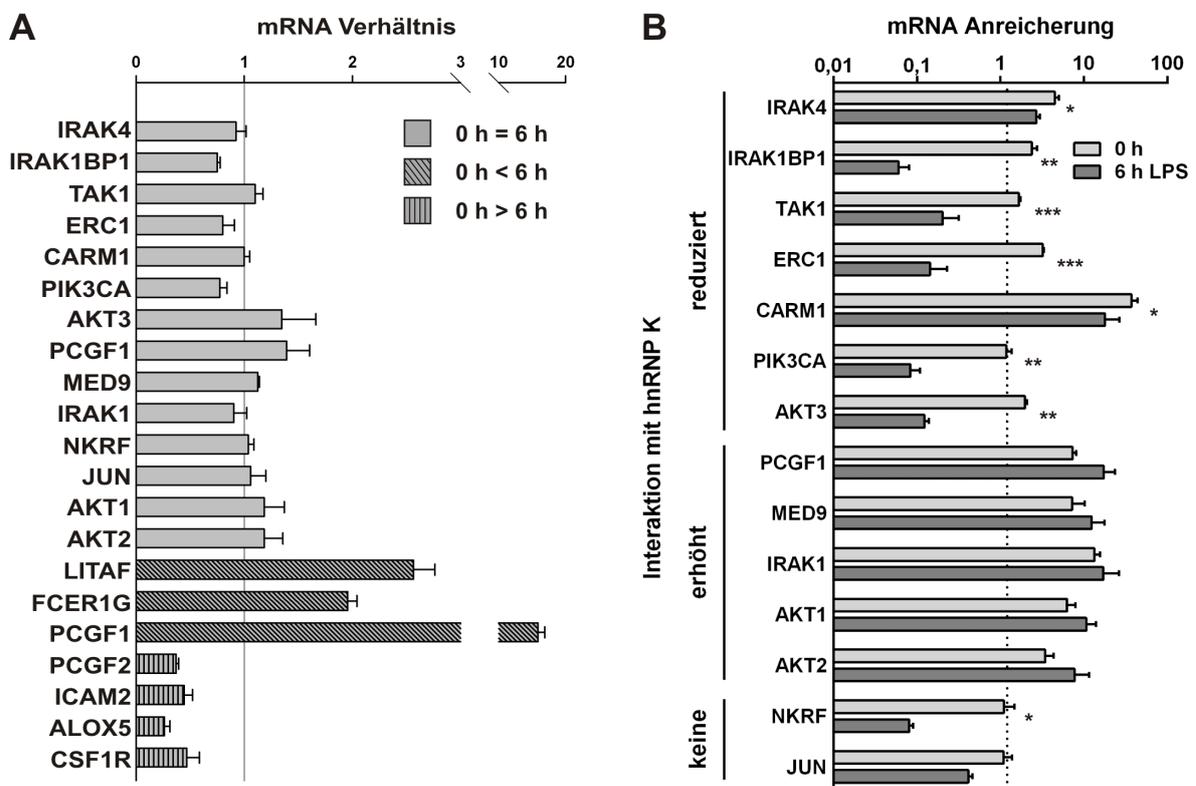
Abbildung 3.7: Zuordnung der 1901 mRNAs zu ihren annotierten biologischen Prozessen. 1850 mRNAs konnten mit Hilfe des PANTHER Klassifizierungssystems annotiert und insgesamt 3404 Funktionen konnten in der Kategorie 'biologischer Prozess' zugeordnet werden.

Symbol	Name	Funktion
PCGF1	<i>polycomb group ring finger 1</i>	transkriptionaler Repressor
PCGF2	<i>polycomb group ring finger 2</i>	
MED9	<i>mediator of RNA Polymerase II transcription, subunit 9 homolog (yeast)</i>	transkriptionaler Aktivator
IRAK1	<i>interleukin-1 receptor-associated kinase 1</i>	Kinase im TLR4-Signalweg
CARM1	<i>coactivator-associated arginine methyltransferase 1</i>	NF- $\kappa$ B-Koaktivator
LITAF	<i>LPS-induced TN factor</i>	Transkriptionsfaktor
ICAM2	<i>intercellular adhesion molecule 2</i>	Zelladhäsion
FCER1G	<i>Fc receptor, IgE, high affinity I, gamma polypeptide</i>	Vermittlung allergischer Reaktionen
ALOX5	<i>arachidonate 5-lipoxygenase</i>	
CSF1R	<i>colony stimulating factor 1 receptor</i>	Differenzierung von Makrophagen
PIK3CA	<i>phosphatidylinositol 3-kinase, catalytic, alpha polypeptide</i>	TLR4- und andere Signalwege
IRAK1BP1	<i>interleukin-1 receptor-associated kinase 1 binding protein 1</i>	TLR4-Signalweg
IRAK4	<i>interleukin-1 receptor-associated kinase 4</i>	Kinase im TLR4-Signalweg
TAK1	<i>mitogen-activated protein kinase kinase kinase 7</i>	
NKRF	<i>NF-kappaB repressing factor</i>	transkriptionaler Repressor
ERC1	<i>ELKS/RAB6-interacting/CAST family member 1</i>	TLR4-Signalweg, DNA damage response
JUN	<i>Jun oncogene</i>	Transkriptionsfaktor
AKT1	<i>thymoma viral proto-oncogene 1</i>	TLR4- und andere Signalwege
AKT2	<i>thymoma viral proto-oncogene 2</i>	
AKT3	<i>thymoma viral proto-oncogene 3</i>	
IRF7	<i>interferon regulatory factor 7</i>	Transkriptionsfaktor

Tabelle 3.1: Die 21 für die Validierung ausgewählten Ziel-mRNAs mit ihren wichtigsten Funktionen.

Um zwischen einer möglichen Aktivierung der Transkription und translationaler Kontrolle besser unterscheiden zu können, wurde zunächst die Expression der Ziel-

mRNAs in unbehandelten Zellen mit 6 h LPS-Behandlung verglichen. Für 14 der 21 mRNAs konnte keine Änderung der Expression festgestellt (Abbildung 3.8 A). Die anderen sieben Ziel-mRNAs wiesen eine so starke Expressionsänderung auf, dass sie aus der weiteren Analyse ausgeschlossen wurden. Im Folgenden wurde die Assoziation der 14 gleich exprimierten Ziel-mRNAs an hnRNP K untersucht. Abbildung 3.8 B zeigt die Bindung der Ziel-mRNAs an hnRNP K in unbehandelten Zellen im Vergleich zu 6 h LPS-Behandlung. In Extrakten von unbehandelten Zellen zeigten sieben mRNAs eine Interaktion mit hnRNP K, die in aktivierten Makrophagen reduziert oder aufgehoben war. Für fünf Ziel-mRNAs konnte eine Assoziation an hnRNP K in Extrakt von unbehandelten Zellen festgestellt werden, die nach 6 h LPS noch verstärkt war. Allerdings war bei letzteren die Bindungsänderung nicht signifikant. Für die mRNAs von NKRF und JUN konnte weder in Extrakten aus unbehandelten Makrophagen noch aus LPS-stimulierten Zellen eine Interaktion mit hnRNP K gezeigt werden.



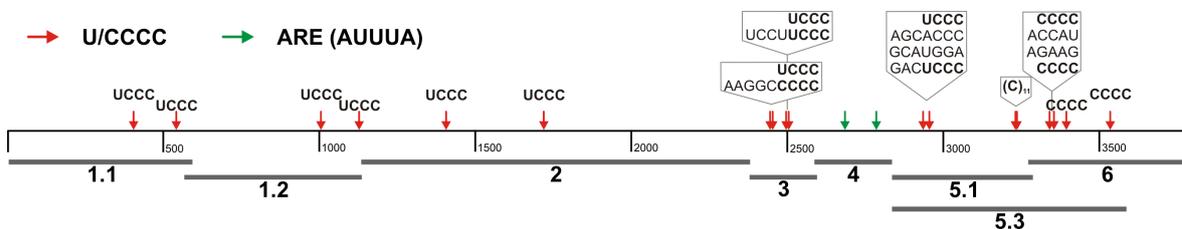
**Abbildung 3.8: Validierung der in den Microarrays identifizierten Ziel-mRNAs.** A) Aus zytoplasmatischen Extrakten von unbehandelten RAW 264.7-Zellen und nach 6 h LPS-Behandlung wurde die Gesamt-RNA isoliert und mittels qPCR die Abundanz der 21 Ziel-mRNAs untersucht. B) Nach hnRNP K- und Kontroll-Immünpräzipitation wurde die kopräzipitierte RNA isoliert und mittels qPCR analysiert. In der Auswertung wurden die mit dem Kontrollantikörper präzipitierten mRNAs als Hintergrund verrechnet und auf fünf Negativkontrollen normalisiert.

Die folgenden Kapitel beschreiben die Untersuchungen zweier Ziel-mRNAs auf ihre Regulation durch hnRNP K: TAK1 und AKT2.

### 3.3 Die Translation der TAK1 mRNA wird durch hnRNP K inhibiert

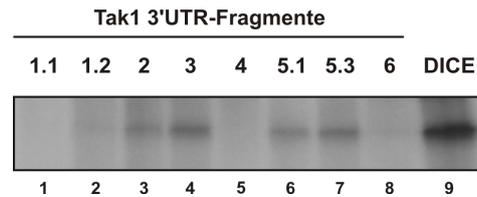
#### 3.3.1 HnRNP K bindet in vitro mit der KH-Domäne 3 an spezifische Sequenzen in der 3'UTR der TAK1 mRNA

HnRNP K assoziiert bevorzugt an CU-reiche Sequenzen [Thisted *et al.*, 2001] und weiterhin konnte gezeigt werden, dass die KH-Domäne 3 von hnRNP K Tetranukleotide der Sequenz U/CCCC bindet [Backe *et al.*, 2005] (siehe Kapitel 1.6.1). In der ca. 3800 nt langen TAK1 3'UTR befinden sich 18 dieser Tetranukleotid-Motive, wobei die Mehrzahl näher am 3'Ende lokalisiert ist (siehe Abbildung 3.9, rote Pfeile). Mit Hilfe der Datenbank AREsite [Gruber *et al.*, 2010] konnten zudem mehrere AREs der Sequenz AUUUA identifiziert werden, von denen sich zwei in der Region mit den meisten hnRNP K Bindungsmotiven befinden (Abbildung 3.9, grüne Pfeile). Um nun zu untersuchen, welcher Teil der TAK1 3'UTR die direkte Interaktion zwischen hnRNP K und der TAK1 mRNA vermittelt, wurden verschiedene Fragmente der 3'UTR kloniert (Abbildung 3.9, graue Balken). Ausgehend von der Verteilung der U/CCCC-Motive wurden insgesamt sieben Fragmente kloniert, die zwei oder mehr Motive enthalten (Fragmente 1.1 - 3 und 5.1 - 6). Außerdem wurde ein Fragment kloniert, welches keine U/CCCC-Motive, aber die beiden AREs beinhaltet (Fragment 4).



**Abbildung 3.9: Schematische Darstellung der 3'UTR der TAK1 mRNA.** U/CCCC-Motive und AREs sind oberhalb der 3'UTR durch Pfeile markiert und die entsprechende Sequenz ist angegeben. Die Fragmente, welche für Interaktionsstudien kloniert wurden, sind unterhalb der 3'UTR durch Balken gekennzeichnet.

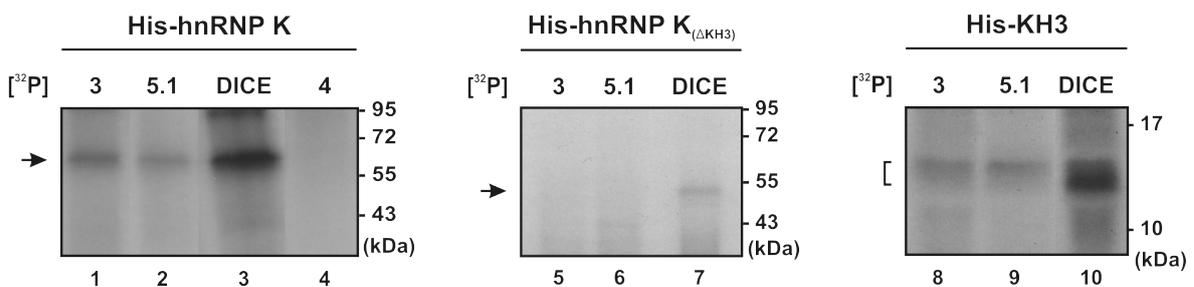
Die Fragmente wurden in den Transkriptionsvektor pBluescript II KS(+) kloniert und in radioaktiv markierte Transkripte umgeschrieben. Diese wurden mit rekombinantem His-hnRNP K in UV *crosslink*-Experimenten eingesetzt. Als Positivkontrolle wurde das ca. 300 nt lange DICE verwendet (siehe Kapitel 1.6.1). Es konnte eine Interaktion von hnRNP K mit den Tak1 3'UTR-Fragmenten 2, 3, 5.1 und 5.3 sowie mit dem DICE (Abbildung 3.10, Spuren 3, 4, 6, 7 und 9), jedoch nicht mit den Fragmenten 1.1, 1.2, 4 und 6 (Spuren 1, 2, 5 und 8) festgestellt werden. Da Fragment 2 nur zwei weit voneinander entfernte Bindungsmotive für hnRNP K besitzt und die Bindung an Fragment 5.3 durch die Motive vermittelt wird, die sich auch in Fragment 5.1 befinden (vergleiche Spuren 6-8 und Abbildung 3.9), wurden diese nicht weiter untersucht.



**Abbildung 3.10: UV *crosslink* mit hnRNP K und den Tak1 3'UTR-Fragmenten.** Die radioaktiv markierte RNA wurden mit rekombinantem His-hnRNP K inkubiert und durch Bestrahlung mit UV-Licht der Wellenlänge 254 nm kovalente Verknüpfungen eingeführt. Nach enzymatischem Abbau der überstehenden RNA-Enden wurden die Proteine auf einem Polyacrylamid-Gel aufgetrennt und die radioaktiven Signale mit einem Film detektiert. Als Positivkontrolle wurde das DICE verwendet.

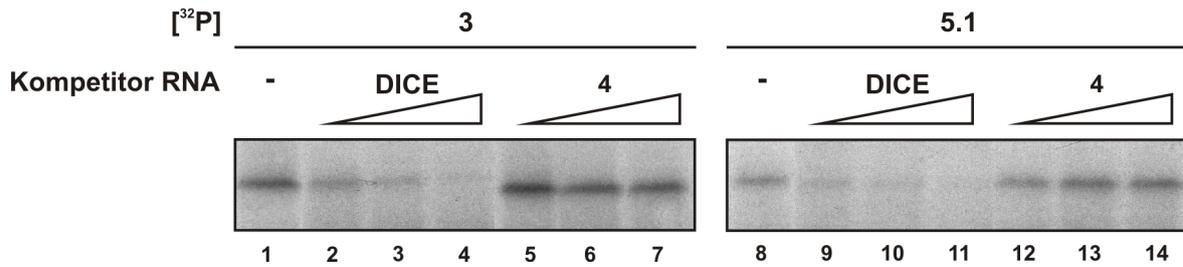
Um zu überprüfen, ob die Bindung an die TAK1 3'UTR über die KH-Domäne 3 von hnRNP K vermittelt wird, wurden eine Deletionsmutante, welcher die KH3 fehlt (His-hnRNP K<sub>(ΔKH3)</sub>), sowie die isolierte KH3 (His-KH3) eingesetzt. Für das UV *crosslink*-Experiment in Abbildung 3.11 wurden gleiche molare Mengen von hnRNP K Wildtyp und His-hnRNP K<sub>(ΔKH3)</sub> verwendet.

Die Abwesenheit von KH3 führte zu einem Verlust der Bindung an die Tak1 3'UTR Fragmente 3 und 5.1 (vergleiche Spuren 1 und 2 mit Spuren 5 und 6). Es konnte eine schwache Bindung von His-hnRNP K<sub>(ΔKH3)</sub> an das DICE detektiert werden (Spur 7), welche vermutlich aus der unspezifischen RNA-Bindung der anderen beiden KH-Domänen resultiert. Um schließlich nachzuweisen, dass KH3 alleine für die Bindung an die TAK1 3'UTR-Fragmente 3 und 5.1 ausreichend ist, wurde ein UV *crosslink*-Experiment mit der isolierten KH3 durchgeführt. Hierbei konnte gezeigt werden, dass KH-Domäne 3 von hnRNP K in der Lage ist, die Interaktion mit den beiden U/CCCC-reichen Tak1 3'UTR-Fragmenten zu vermitteln (Abbildung 3.11, Spuren 8 - 10).



**Abbildung 3.11: UV *crosslink* mit verschiedenen rekombinanten hnRNP K-Proteinen.** HnRNP K Wildtyp, hnRNP K<sub>(ΔKH3)</sub> oder KH3 wurden mit den TAK1 3'UTR-Fragmenten 3, 4 und 5.1 inkubiert, das DICE diente als Positivkontrolle.

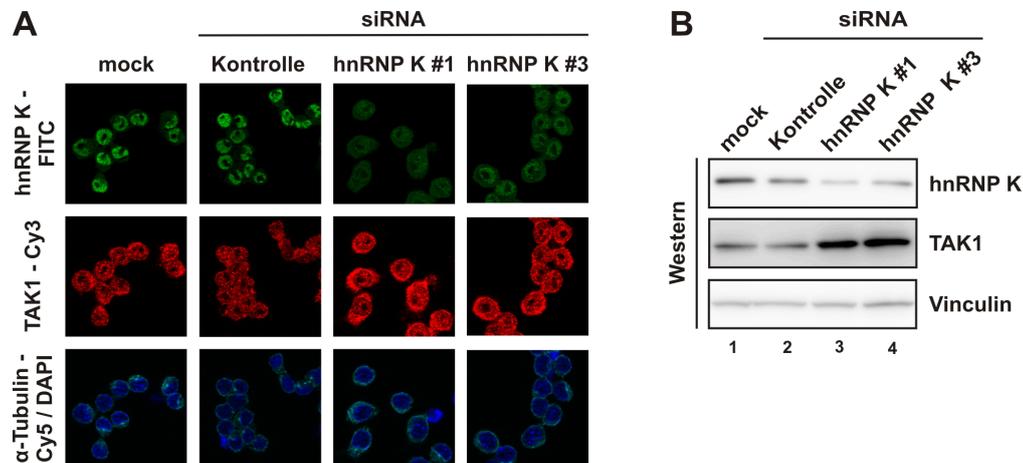
Um die Spezifität dieser Interaktion zu untersuchen, wurden das DICE und das Fragment 4 der TAK1 mRNA 3'UTR als unmarkierte Kompetitor-RNAs zugegeben (Abbildung 3.12). Das DICE bewirkte bereits bei einem 50-fachen molaren Überschuss eine starke Reduzierung der hnRNP K-TAK1 3'UTR-Interaktion (Spuren 2 - 4 und 9 - 11). Das TAK1 3'UTR-Fragment 4 war dagegen selbst bei einem 500-fachen molaren Überschuss nicht in der Lage die hnRNP K-TAK1 3'UTR-Interaktion zu vermindern (Spuren 5 - 7 und 12 - 14).



**Abbildung 3.12: Kompetition der Interaktion.** HnRNP K wurde mit den radioaktiv markierten TAK1 3'UTR-Fragmenten 3 und 5.1 in Gegenwart von einem 50-, 100- und 200-fachen molarem Überschuss an DICE oder einem 50-, 200- und 500-fachen Überschuss an TAK1 3'UTR-Fragment 4 inkubiert.

### 3.3.2 Reduzierung der hnRNP K-Expression bewirkt eine gesteigerte Expression von TAK1

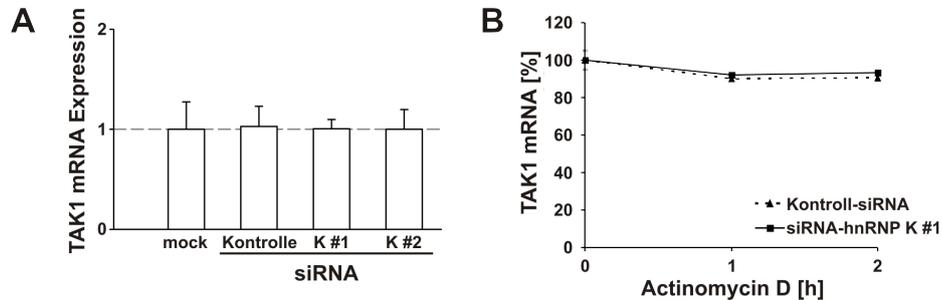
Um die Konsequenzen der hnRNP K-TAK1 mRNA-Interaktion *in vivo* zu untersuchen, wurde die Expression von hnRNP K durch zwei spezifische siRNAs (hnRNP K #1 und #3) reduziert. Die Expression von TAK1 wurde mit Immunfluoreszenz-Mikroskopie (Abbildung 3.13 A) und im Western-Blot (Abbildung 3.13 B) analysiert. Nach siRNA-vermittelter Reduzierung der hnRNP K-Expression konnte mehr TAK1 Protein detektiert werden als nach Transfektion einer Kontroll-siRNA oder nach einer *mock*-Transfektion.



**Abbildung 3.13: Expression von TAK1 nach *knock down* von hnRNP K.** RAW 264.7 wurden ohne siRNA (*mock*), mit einer unspezifischen Kontroll-siRNA oder zwei siRNAs gegen hnRNP K transfiziert. **A)** HnRNP K wurde mittels Immunfluoreszenz mit einem FITC-gekoppelten Antikörper und TAK1 mit einem Cy3-gekoppelten Antikörper detektiert. Färbung von  $\alpha$ -Tubulin (Cy5) und DAPI dienten zur Abgrenzung von Zytoplasma und Kern. **B)** Die Expression von hnRNP K und TAK1 wurde im zytoplasmatischen Extrakt detektiert. Vinculin diente als Kontrolle.

Um auszuschließen, dass die beobachtete Zunahme des TAK1 Proteins auf eine Zunahme der TAK1 mRNA zurückzuführen ist, wurden deren Expression und Stabilität nach hnRNP K *knock down* untersucht. Die Menge an TAK1 mRNA blieb konstant, wenn die beiden hnRNP K-spezifischen siRNAs transfiziert wurden (Abbildung 3.14 A).

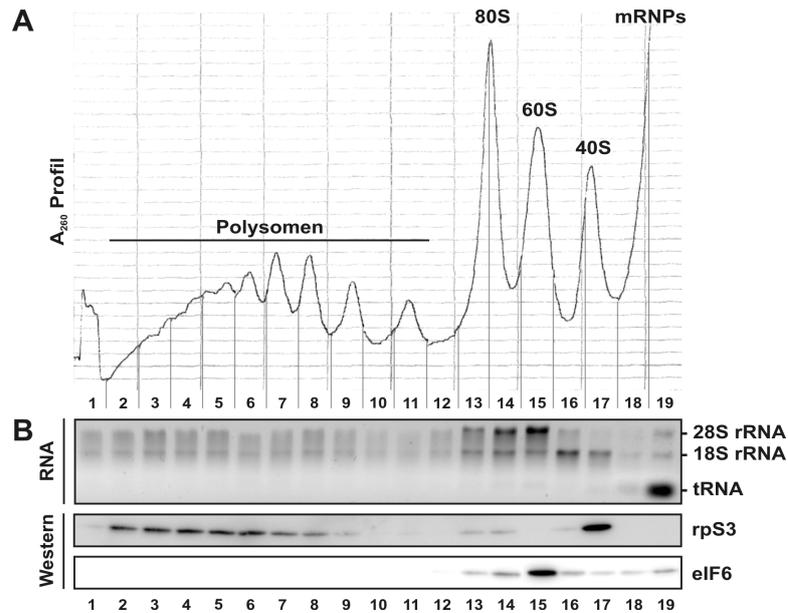
Weiterhin konnte kein wesentlicher Unterschied in der Abbaukinetik der TAK1 mRNA zwischen Kontroll-siRNA- und hnRNP K-siRNA-Transfektion festgestellt werden (Abbildung 3.14 B). Folglich ist die gesteigerte Menge an TAK1 Protein nicht auf eine transkriptionale Aktivierung oder eine Stabilisierung der TAK1 mRNA zurückzuführen und lässt eine translationale Regulation durch hnRNP K vermuten.



**Abbildung 3.14: Expression und Stabilität der TAK1 mRNA nach hnRNP K *knock down*.** **A)** RAW 264.7 wurden ohne siRNA (*mock*), mit einer unspezifischen Kontroll-siRNA oder zwei siRNAs gegen hnRNP K transfiziert und die Expression der TAK1 mRNA mittels qPCR analysiert und auf die NDUFV1 mRNA normalisiert. **(B)** RAW 264.7 wurden mit einer unspezifischen Kontroll-siRNA oder mit einer siRNA gegen hnRNP K transfiziert. Die Zellen wurden unbehandelt belassen oder durch Zugabe von Actinomycin D für 1 h oder 2 h die Transkription inhibiert. Die Stabilität der TAK1 mRNA wurde untersucht.

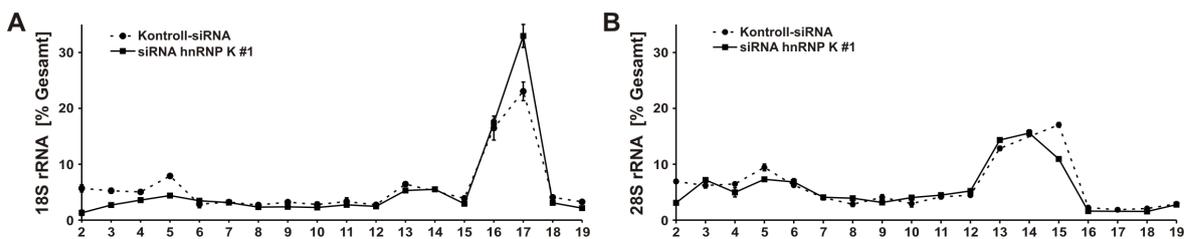
### 3.3.3 Die Translation der TAK1 mRNA wird durch Reduzierung der hnRNP K-Expression gefördert

Um zu überprüfen, ob die vermehrte Expression von TAK1 auf eine translationale Aktivierung infolge des hnRNP K *knock downs* zurückzuführen ist, wurde die Migration der TAK1 mRNA in Polysomengradienten analysiert. Nach Transfektion einer Kontroll-siRNA oder einer hnRNP K-spezifischen siRNA erfolgte eine Behandlung der Zellen mit Cycloheximid, um die Translation zu inhibieren (siehe Kapitel 2.7.6). Zytoplasmatische Extrakte wurden präpariert und auf kontinuierlichen Saccharosedichtegradienten aufgetrennt. Es wurde ein Profil der Absorption bei 260 nm aufgezeichnet (Abbildung 3.15 A) und 19 Fraktionen aufgefangen, beginnend mit der schwersten. Zur Definition der verschiedenen ribosomalen Komplexe wurde die Gesamt-RNA aus jeder Fraktion isoliert und die 18S und 28S rRNA auf einem Agarosegel sichtbar gemacht (Abbildung 3.15 B). Das ribosomale Protein der kleinen Untereinheit rpS3 und der Translationsinitiationsfaktor eIF6 dienten als Markerproteine für die 40S-, 60S- und 80S-haltigen Fraktionen und wurden mittels Western-Blot detektiert. Es ist bekannt, dass eIF6 nur an die große ribosomale Untereinheit assoziiert, bevor sich das komplette Ribosom formiert [Ceci *et al.*, 2003]. Die 40S-ribosomale Untereinheit war hauptsächlich in Fraktion 17 und die 60S-ribosomale Untereinheit in Fraktion 15. Fraktionen 13 und 14 enthalten die 80S-Ribosomen, Fraktionen 1 bis 11 die Polysomen und Fraktionen 18 und 19 die mRNPs.



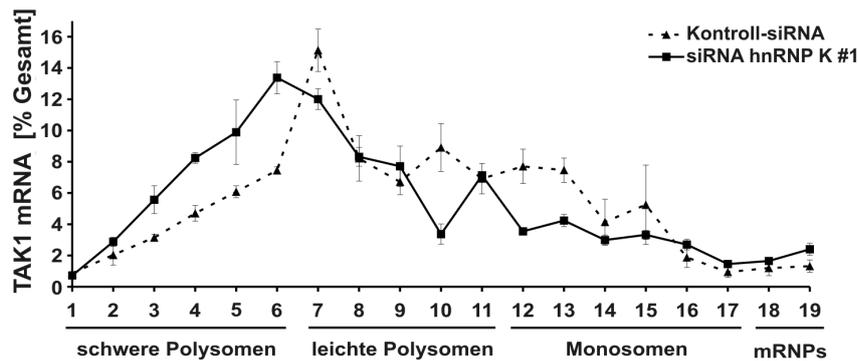
**Abbildung 3.15: Polysomengradienten von unbehandelten RAW 264.7-Zellen.** Zytoplasmatischer Extrakt von unbehandelten RAW 264.7 wurde mittels Saccharosedichtegradienten in 19 Fraktionen aufgetrennt. **A)** Profil der Absorption bei 260 nm. **B)** Die ribosomale RNA aus den einzelnen Fraktionen wurde auf einem Agarosegel sichtbar gemacht und rpS3 und eIF6 wurden im Western-Blot detektiert. Die Positionen der ribosomalen Komplexe sind im Gradientenprofil gekennzeichnet.

Um zu überprüfen, ob ein *knock down* von hnRNP K einen generellen Einfluss auf die Translation hat, wurde die Verteilung der ribosomalen RNAs untersucht. Es konnten keine gravierenden Unterschiede in der Verteilung der 18S und der 28S rRNA in Gradienten nach Kontroll- und hnRNP K-siRNA-Transfektion festgestellt werden (Abbildung 3.16).



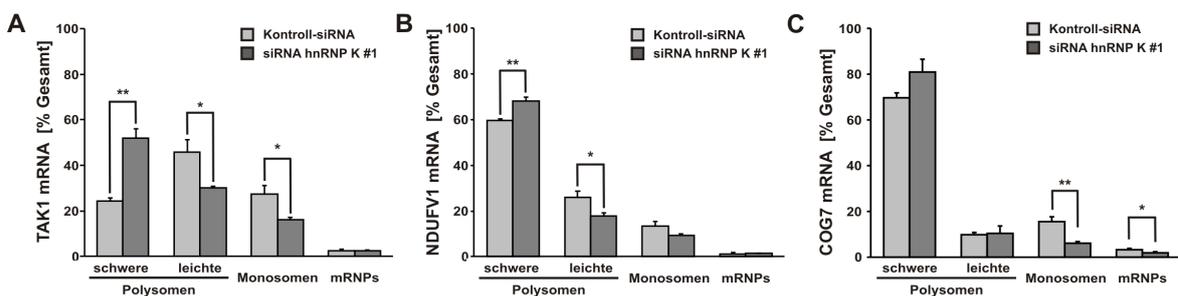
**Abbildung 3.16: Verteilung der ribosomalen RNA in den Polysomengradienten.** RAW 264.7 wurden mit einer unspezifischen Kontroll-siRNA oder mit einer siRNA gegen hnRNP K transfiziert und die zytoplasmatischen Extrakte im Saccharosedichtegradienten aufgetrennt. Die Verteilung der 18S rRNA (**A**) und der 28S rRNA (**B**) in den 19 Gradientenfraktionen wurde mittels qPCR analysiert.

In jeder Gradientenfraktion wurde die TAK1 mRNA mittels qPCR detektiert und deren prozentuale Verteilung berechnet (Abbildung 3.17). Nach Transfektion einer Kontroll-siRNA war die TAK1 mRNA hauptsächlich in den Monosomen und den leichten Polysomen zu finden (Fraktionen 7-15). Nach Transfektion einer hnRNP K-spezifischen siRNA erfolgte hingegen eine Umverteilung der TAK1 mRNA in Richtung der schweren Polysomen (Fraktionen 3-11).



**Abbildung 3.17: Verteilung der endogenen TAK1 mRNA im Polysomengradienten.** RAW 264.7 wurden mit einer unspezifischen Kontroll-siRNA oder mit einer siRNA gegen hnRNP K transfiziert und die zytoplasmatischen Extrakte im Saccharosedichtegradienten aufgetrennt. Die Verteilung der TAK1 mRNA in den 19 Gradientenfraktionen wurde mittels qPCR analysiert.

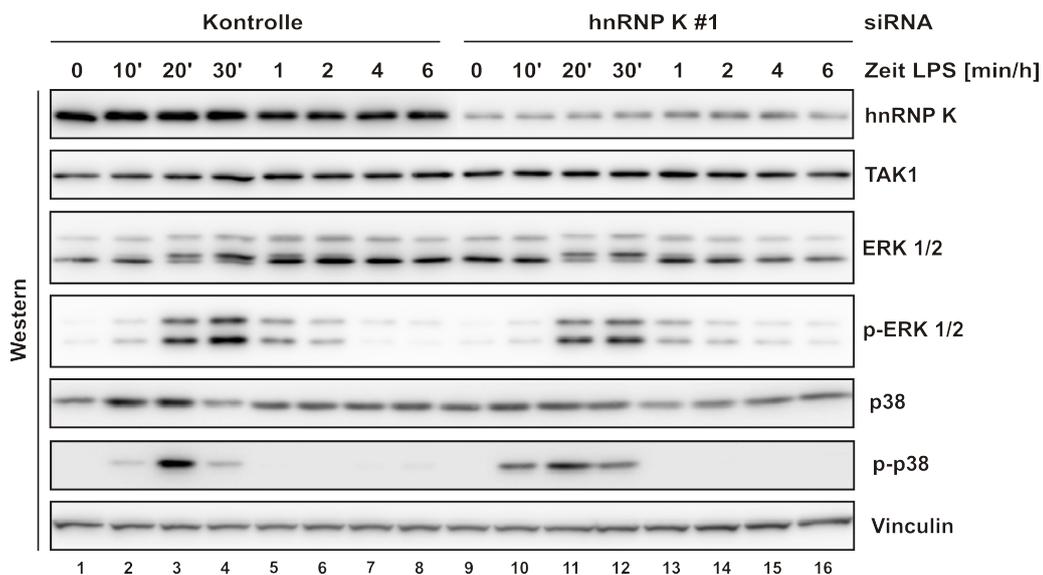
Die Fraktionen, die schweren Polysomen (Fraktionen 1 bis 6), leichten Polysomen (Fraktionen 7 bis 11), Monosomen (Fraktionen 12 bis 17) und mRNPs (Fraktionen 18 und 19) entsprechen, wurden zusammengefasst und der prozentuale Anteil der TAK1 mRNA berechnet (Abbildung 3.18 A). Eine Umverteilung von den Monosomen und leichten Polysomen zu schweren Polysomen wird dadurch weiter verdeutlicht. Als Kontrollen wurden zwei endogene mRNAs analysiert, die in den Microarray-Analysen als nicht an hnRNP K assoziiert identifiziert wurden. Die Verteilungen der mRNAs von *nicotinamide adenine dinucleotide dehydrogenase (ubiquinone) flavoprotein 1* (NDUFV1) und *conserved oligomeric Golgi complex subunit 7* (COG7) im Polysomengradienten wurden nur unwesentlich durch einen hnRNP K-*knock down* beeinflusst (Abbildung 3.18 B und C). Diese Daten legen nahe, dass die beobachtete vermehrte Expression von TAK1 infolge einer Reduzierung der hnRNP K-Expression auf eine verstärkte Translation der TAK1 mRNA zurückzuführen ist.



**Abbildung 3.18: Verteilung der endogenen TAK1 mRNA und zweier Kontroll-mRNAs in schweren und leichten Polysomen, Monosomen und mRNPs.** Der prozentuale Anteil der TAK1 mRNA (A), der NDUFV1 mRNA (B) und der COG7 mRNA (C) nach Kontroll-siRNA-Transfektion oder hnRNP K-*knock down* in den entsprechenden Fraktionen wurde zusammengefasst.

### 3.3.4 Reduzierung der hnRNP K-Expression fördert die Aktivierung der Makrophagen

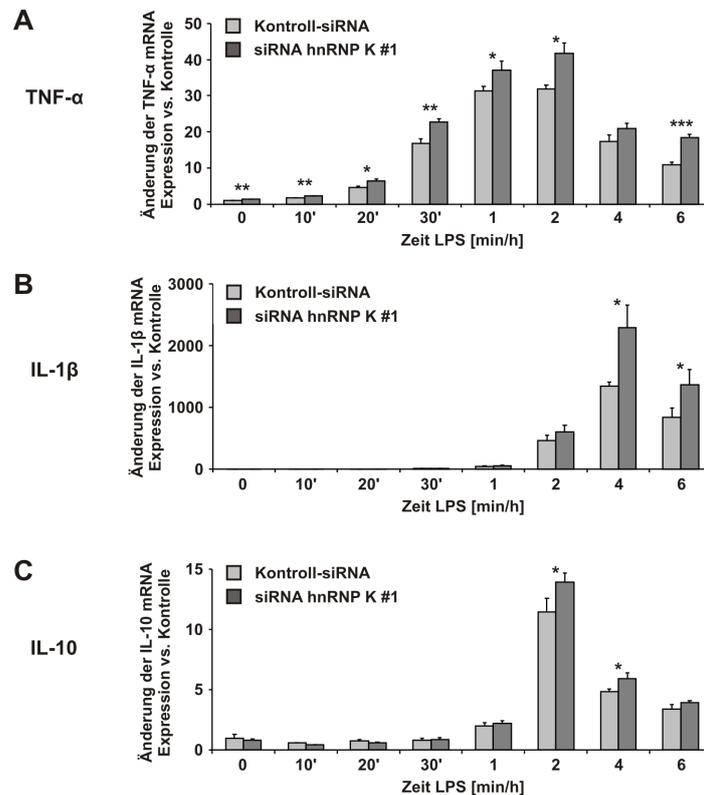
Um zu untersuchen, welchen Einfluss die mit einem hnRNP K-*knock down* einhergehende vermehrte Expression von TAK1 auf die Immunantwort hat, wurde dieser mit einer LPS-Zeitreihe kombiniert (Abbildung 3.19). In unbehandelten Makrophagen und nach 10 bis 20 min LPS-Stimulation konnte nach Transfektion der hnRNP K-spezifischen siRNA im Vergleich mit der Kontroll-siRNA mehr TAK1 Protein detektiert werden (vergleiche Spuren 1 - 3 und 9 - 11). Zu späteren Zeitpunkten war hingegen kein Unterschied in der TAK1 Expression mehr detektierbar (vergleiche Spuren 4 - 8 und 12 - 16).



**Abbildung 3.19: Expression von TAK1 und Phosphorylierung von Kinasen nach hnRNP K *knock down* in einer LPS-Zeitreihe.** RAW 264.7 wurden mit einer Kontroll-siRNA oder einer siRNA gegen hnRNP K transfiziert und für bis zu 6 h mit LPS stimuliert. Die Expression von hnRNP K, TAK1, ERK 1/2 und p38, sowie die Phosphorylierung von ERK 1/2 und p38 wurden im Western-Blot verfolgt. Vinculin diente als Kontrolle.

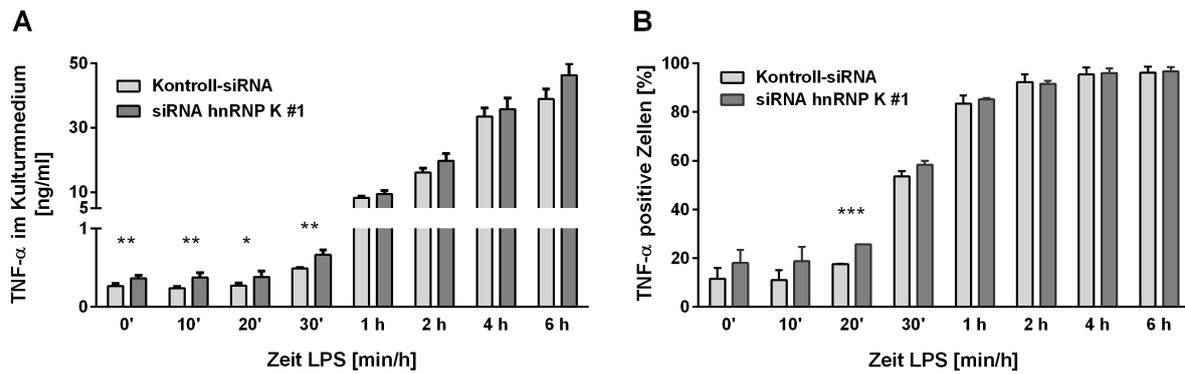
TAK1 nimmt im TLR4-Signalweg eine zentrale Position ein, da sich nachgeordnet mehrere Signalwege, wie beispielsweise der ERK- und der p38-Signalweg, abspalten (siehe Kapitel 1.2.1). Im Kapitel 3.1 konnte bereits gezeigt werden, dass die Phosphorylierung von ERK 1/2 in RAW 264.7-Zellen nach 20- bis 30-minütiger LPS-Behandlung ein Maximum erreicht (siehe Abbildung 3.2). Eine siRNA-vermittelte Reduktion der hnRNP K-Expression hatte auf die Phosphorylierung von ERK 1/2 keinen Einfluss (Abbildung 3.19, vergleiche Spuren 3 und 4 mit Spuren 11 und 12). Die Phosphorylierung von p38 erreichte in nicht-transfizierten Zellen (Abbildung 3.2 B, Spur 3) und in nach Kontroll-siRNA-Transfektion (Abbildung 3.19, Spur 3) bei 20 min ihr Maximum. Nach Transfektion einer siRNA gegen hnRNP K schien die Phosphorylierung von p38 bereits nach 10 min zu beginnen und bis 30 min anzuhalten als nach einer Kontroll-siRNA-Transfektion (Abbildung 3.19, vergleiche Spuren 2 - 4 mit Spuren 10 - 12).

Weiterhin wurde untersucht, ob eine Reduktion von hnRNP K und die damit verbundene vermehrte TAK1-Expression einen Einfluss auf die Zytokinsynthese hat. Dafür wurde zunächst die Induktion der TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  und IL-10 mRNAs in einer LPS-Zeitreihe untersucht. Nach *knock down* von hnRNP K konnte eine vermehrte Expression der drei Zytokin-mRNAs im Verlaufe der LPS-Antwort beobachtet werden (Abbildung 3.20).



**Abbildung 3.20: Expression von Zytokin-mRNAs nach hnRNP K *knock down* in einer LPS-Zeitreihe.** RAW 264.7 wurden mit einer Kontroll-siRNA oder einer siRNA gegen hnRNP K transfiziert und für bis zu 6 h mit LPS stimuliert. Die Expression der mRNAs von TNF- $\alpha$  (A), IL-1 $\beta$  (B) und IL-10 (C) wurde mittels qPCR analysiert, auf die NDUFV1 mRNA normalisiert und im Verhältnis zu unbehandelten Kontroll-Zellen dargestellt.

Um zu untersuchen, ob das TNF- $\alpha$  Protein auch gebildet und sekretiert wird, wurde ein ELISA durchgeführt. Nach siRNA-vermittelter Reduktion der hnRNP K-Expression konnte eine im Vergleich zur Kontrolle vermehrte TNF- $\alpha$  Sekretion ins Kulturmedium beobachtet werden (Abbildung 3.21 A). In einem weiteren Experiment wurden die Zellen mit Brefeldin A behandelt, um die intrazelluläre Anfärbung von TNF- $\alpha$  und damit die Quantifizierung im FACS zu ermöglichen (siehe Kapitel 2.7.7). Der Anteil TNF- $\alpha$ -positiver Zellen war nach der Transfektion einer hnRNP K-spezifischen siRNA höher als nach der Transfektion einer Kontroll-siRNA (Abbildung 3.21 B). Die vermehrte Zytokinproduktion nach hnRNP K *knock down* glich sich im Laufe der LPS-Antwort an die der Kontroll-siRNA-transfizierten Zellen an, ähnlich wie es auch bei der TAK1 Expression beobachtet werden konnte (siehe Abbildung 3.19).

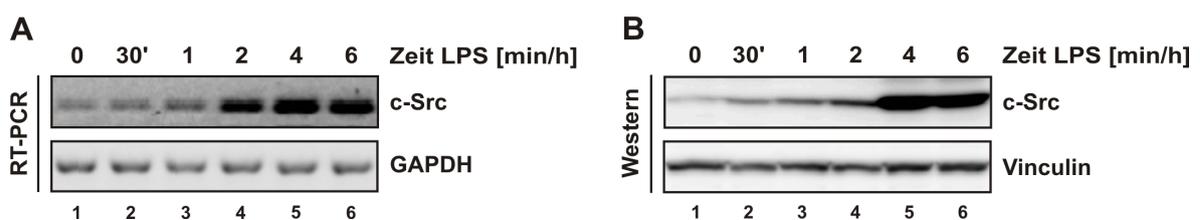


**Abbildung 3.21: TNF- $\alpha$  Proteinexpression nach hnRNP K *knock down*.** RAW 264.7 wurden mit einer Kontroll-siRNA oder einer siRNA gegen hnRNP K transfiziert und für bis zu 6 h mit LPS stimuliert. **A)** Die Sekretion von TNF- $\alpha$  wurde mittels ELISA analysiert und im Verhältnis zu unbehandelten Kontroll-Zellen dargestellt. **B)** Der Anteil TNF- $\alpha$ -positiver Zellen wurde im FACS ermittelt.

### 3.3.5 Im Verlauf der Makrophagenaktivierung kommt es zu einer Interaktion von hnRNP K mit c-Src und zu einer vermehrten Tyrosin-Phosphorylierung von hnRNP K

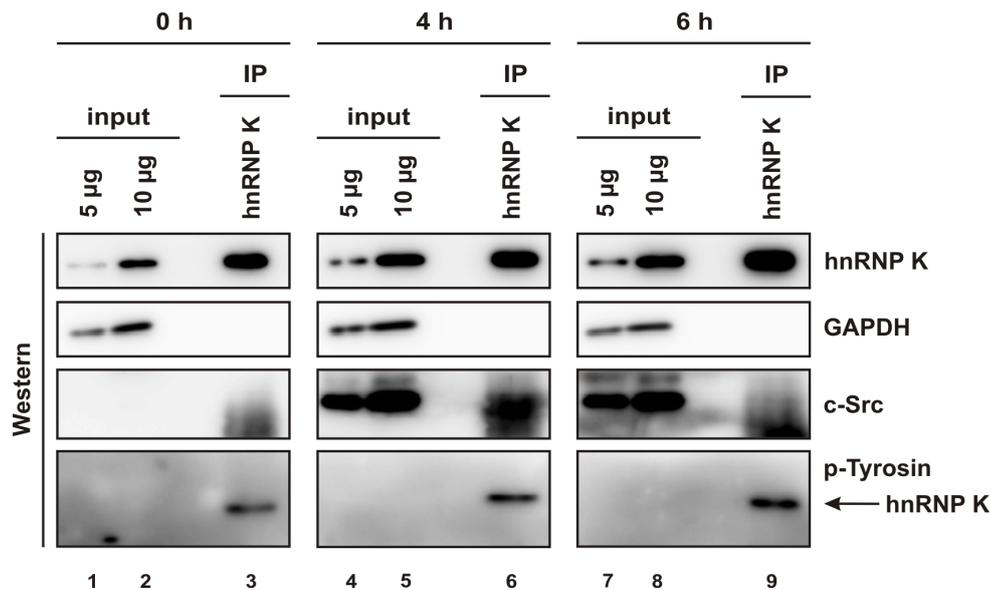
Bisher konnte gezeigt werden, dass ein hnRNP K-*knock down* zur vermehrten Translation der TAK1 mRNA führte und auch zur vermehrten Bildung von Zytokinen im Verlauf der Makrophagenaktivierung. Die Interaktion von hnRNP K mit der TAK1 mRNA, die in unbehandelten Zellen beobachtet werden konnte, war nach 6 h LPS-Behandlung aufgehoben (siehe Abbildung 3.8). In Kapitel 1.6.1 wurde schon beschrieben, dass hnRNP K während der erythroiden Reifung durch c-Src am Tyrosin 458 in der KH-Domäne 3 phosphoryliert wird, was zum Verlust der DICE-Bindungsaktivität führt.

Im Folgenden sollte untersucht werden, ob c-Src während der Aktivierung von Makrophagen eine ähnliche Funktion übernimmt. Dafür wurde zunächst die Expression von c-Src im Verlauf der LPS-Antwort analysiert. Die c-Src mRNA wurde durch LPS induziert (Abbildung 3.22 A). Eine Induktion des c-Src Proteins konnte nach 30 min LPS-Stimulation detektiert werden und die Expression erreichte nach 4 h ein Maximum (Abbildung 3.22 B, vergleiche Spuren 1, 2 und 5). In beiden Fällen war jedoch eine geringfügige Expression in unbehandelten RAW 264.7-Zellen nachweisbar.



**Abbildung 3.22: Expression der c-Src mRNA und des Proteins in einer LPS-Zeitreihe.** RAW 264.7 wurden für bis zu 6 h mit LPS stimuliert und die Expression der c-Src mRNA mittels RT-PCR (**A**) und des c-Src Proteins mittels Western-Blot analysiert (**B**). GAPDH und Vinculin dienten jeweils als Kontrolle.

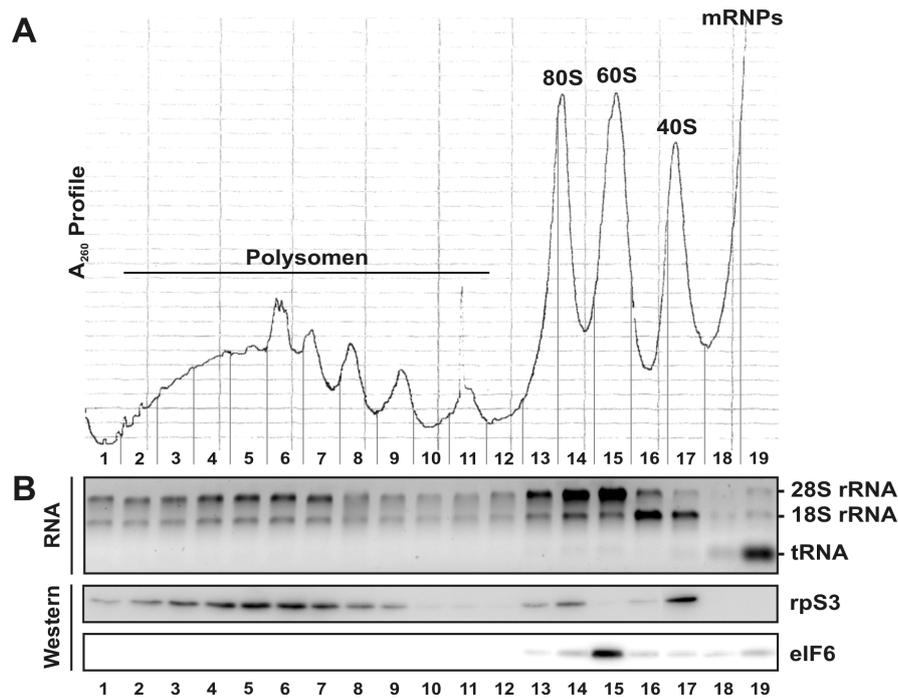
Um festzustellen, ob es während der Makrophagenaktivierung zu einer Interaktion zwischen der Tyrosinkinase c-Src und hnRNP K und zu dessen Phosphorylierung kommt, wurde eine Immunpräzipitation von hnRNP K zu verschiedenen Zeitpunkten der Makrophagenaktivierung durchgeführt. Dabei konnte nach 4-stündiger LPS-Behandlung eine Kopräzipitation von c-Src festgestellt werden (Abbildung 3.23, Spur 6). Diese war nach 6 h LPS-Stimulation nicht mehr detektierbar, wobei hier eine verstärkte Tyrosin-Phosphorylierung von hnRNP K nachgewiesen werden konnte (Abbildung 3.23, Spur 9).



**Abbildung 3.23: Interaktion mit c-Src und Tyrosin-Phosphorylierung von hnRNP K.** RAW 264.7 wurden unbehandelt belassen oder für 4 h oder 6 h mit LPS stimuliert. HnRNP K wurde aus zytoplasmatischen Extrakten präzipitiert. Eine Kopräzipitation von c-Src und die Tyrosin-Phosphorylierung von hnRNP K wurden im Western-Blot detektiert. GAPDH diente dabei als Kontrolle.

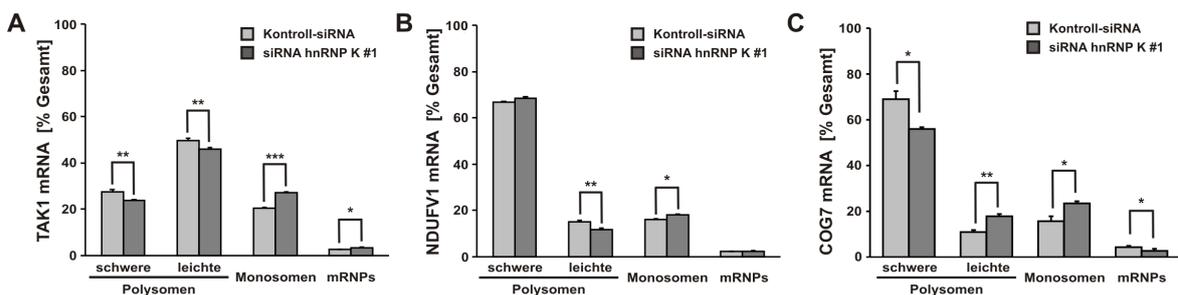
### 3.3.6 Der Einfluss von hnRNP K auf die Translation von TAK1 geht im Laufe der LPS-Antwort verloren

In unbehandelten RAW 264.7-Zellen bindet hnRNP K die TAK1 mRNA und ein hnRNP K *knock down* steigert die TAK1 mRNA-Translation (siehe Abbildungen 3.8 B und 3.17). Im Verlauf der Makrophagenaktivierung wird diese Interaktion aufgehoben (siehe Abbildung 3.8 B). Es stellte sich nun die Frage, wie sich ein *knock down* von hnRNP K in aktivierten Makrophagen auf die Translation von TAK1 auswirken würde. Um dies zu untersuchen wurden Polysomengradienten nach Transfektion einer Kontroll-siRNA und einer siRNA gegen hnRNP K nach 6-stündiger LPS-Stimulation präpariert und, wie schon im Kapitel 3.3.3 beschrieben, charakterisiert (Abbildung 3.24).



**Abbildung 3.24: Polysomengradienten von LPS-aktivierten RAW 264.7-Zellen.** Zytoplasmatischer Extrakt von RAW 264.7-Zellen nach 6 h LPS-Stimulation wurde mittels Saccharosedichtegradienten in 19 Fraktionen aufgetrennt. **A)** Profil der Absorption bei 260 nm. **B)** Die ribosomale RNA aus den einzelnen Fraktionen wurde auf einem Agarosegel sichtbar gemacht und rpS3 und eIF6 wurden im Western-Blot detektiert. Die Positionen der ribosomalen Komplexe sind im Gradientenprofil gekennzeichnet.

Nach 6-stündiger LPS-Behandlung konnte nur eine geringe Änderung der TAK1 mRNA-Verteilung nach hnRNP K *knock down* detektiert werden (Abbildung 3.25 A). Die Verteilungen der endogenen NDUFV1 und COG7 mRNAs im Polysomengradienten wurden ebenso nur minimal durch einen hnRNP K *knock down* beeinflusst (Abbildung 3.25 B und C).



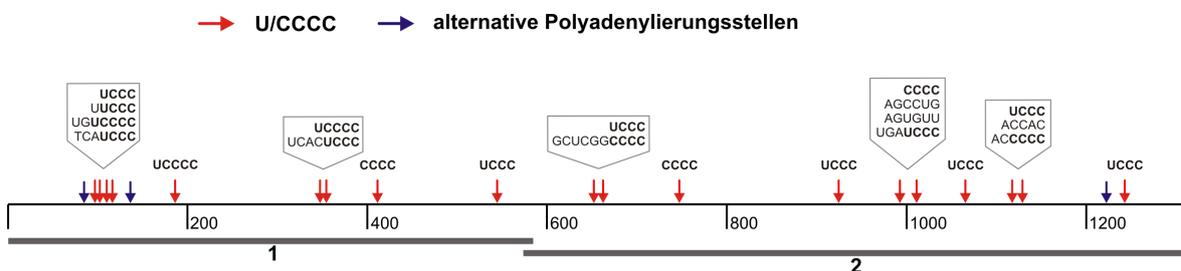
**Abbildung 3.25: Verteilung der endogenen mRNA in schweren und leichten Polysomen, Monosomen und mRNPs.** Der prozentuale Anteil der TAK1 mRNA (**A**) und der NDUFV1 mRNA (**B**) nach Kontroll-siRNA-Transfektion oder hnRNP K-*knock down* in den entsprechenden Fraktionen wurde zusammengefasst.

## 3.4 Die Translation der AKT2 mRNA wird durch hnRNP K aktiviert

### 3.4.1 Die KH-Domäne 3 von hnRNP K interagiert mit der 3'UTR der AKT2 mRNA in vitro

Die 3'UTR der AKT2 mRNA ist mit ca. 1300 nt nur ein Drittel so lang wie die TAK1 3'UTR, enthält aber etwa genauso viele U/CCCC-Motive: 19 Motive in der 3'UTR der AKT2 mRNA und 18 Motive in der 3'UTR der TAK1 mRNA. Diese sind relativ gleichmäßig über die gesamte Sequenz verteilt, bilden aber an einigen Stellen Gruppen (Abbildung 3.26, rote Pfeile). Weiterhin sind in der 3'UTR der AKT2 mRNA alternative Polyadenylierungsstellen vorhanden, welche mit Hilfe der *PolyA Cleavage Site & 3'UTR Database* (PACdb, [Brockman *et al.*, 2005]) identifiziert wurden (Abbildung 3.26, blaue Pfeile).

Durch Benutzung einer weiter 5' gelegenen Spaltungs- und Polyadenylierungsstelle entsteht eine mRNA mit verkürzter 3'UTR, welche der Regulation durch RBPs oder miRNAs zum Teil entkommen kann [Sandberg *et al.*, 2008]. Durch Analyse der Translation von Ziel-mRNAs der let-7 miRNA konnte beispielsweise gezeigt werden, dass eine mögliche Regulation unentdeckt bleiben kann, wenn mehrere 3'UTR Isoformen exprimiert werden [Clancy *et al.*, 2011].

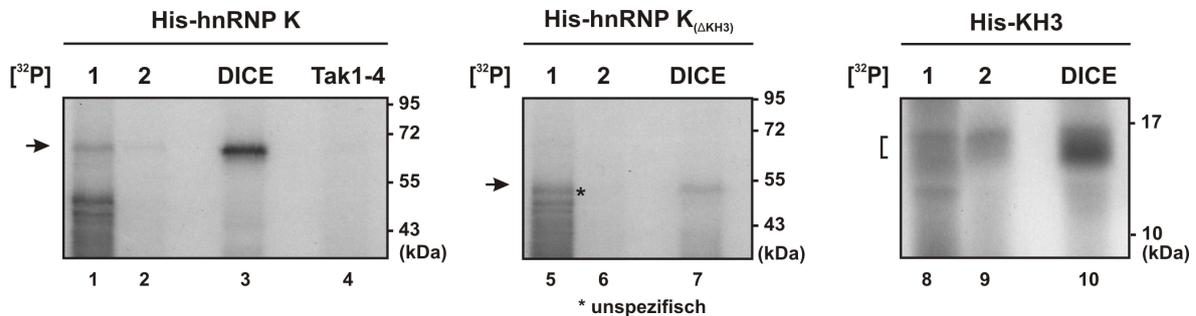


**Abbildung 3.26: Schematische Darstellung der 3'UTR der AKT2 mRNA.** U/CCCC-Motive sind oberhalb der 3'UTR durch rote Pfeile markiert, mögliche alternative Polyadenylierungsstellen durch blaue Pfeile. Die Fragmente, welche für Interaktionsstudien kloniert wurden, sind unterhalb der 3'UTR durch Balken gekennzeichnet.

Es wurden zwei Fragmente der AKT2 mRNA 3'UTR für Interaktionsstudien kloniert (Abbildung 3.26, graue Balken). Um zu untersuchen, ob hnRNP K direkt mit den AKT2 mRNA 3'UTR-Fragmenten interagiert, wurden UV *crosslink*-Experimente durchgeführt. Hierfür wurden, genau wie für die TAK1 mRNA 3'UTR-Fragmente, verschiedene rekombinante hnRNP K-Varianten verwendet.

Das AKT2 mRNA 3'UTR Fragment 1 und in geringerem Maße auch das Fragment 2 interagierten mit His-hnRNP K Wildtyp (Abbildung 3.27, Spuren 1 und 2). Diese Bindung wurde aufgehoben, wenn die KH3 in der Deletionsmutante His-hnRNP K<sub>(ΔKH3)</sub> fehlte (Spuren 5 und 6). Die isolierte KH-Domäne 3 von hnRNP K (His-KH3) in-

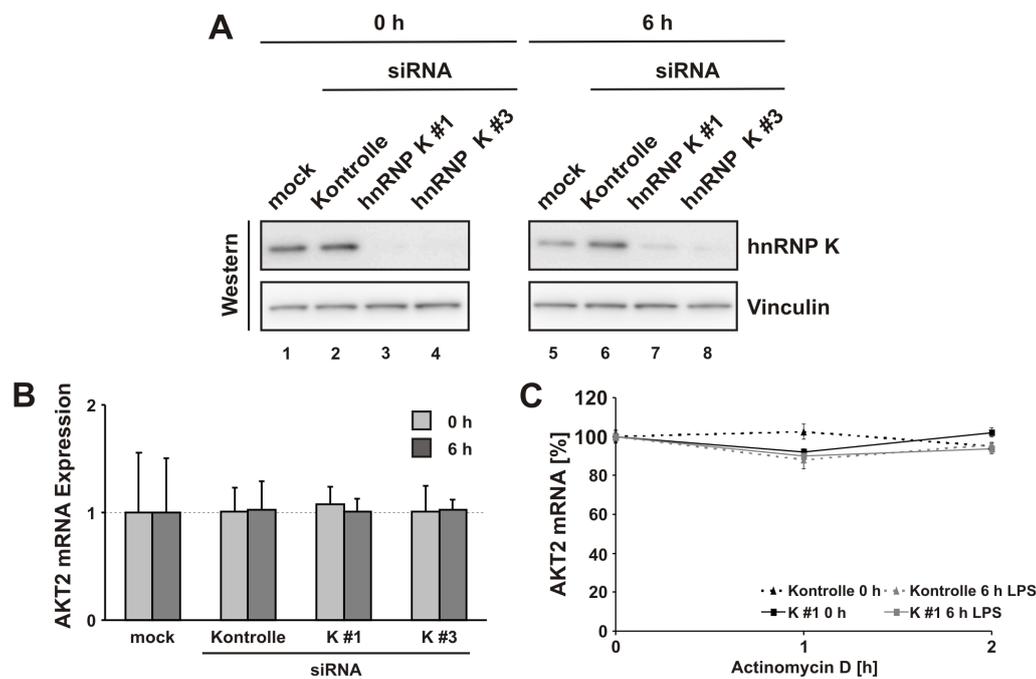
teragierte mit den AKT2 mRNA 3'UTR-Fragmenten 1 und 2 (Spuren 8 und 9). Die beobachtete stärkere Bindung an das AKT2 3'UTR-Fragment 1 geht einher mit der höheren Dichte an hnRNP K-Bindungsmotiven in diesem Abschnitt der 3'UTR (siehe Abbildung 3.26).



**Abbildung 3.27: UV crosslink mit verschiedenen rekombinanten hnRNP K-Proteinen.** HnRNP K Wildtyp, hnRNP K<sub>(ΔKH3)</sub> oder KH3 wurde mit den AKT2 3'UTR-Fragmenten 1 und 2 inkubiert, das TAK1 3'UTR-Fragment 4 diente als Negativkontrolle und das DICE als Positivkontrolle.

### 3.4.2 HnRNP K beeinflusst nicht die Stabilität der AKT2 mRNA

Um den Einfluss von hnRNP K auf die AKT2 mRNA *in vivo* zu untersuchen, wurde die Expression von hnRNP K reduziert und die Expression sowie Stabilität der AKT2 mRNA analysiert. Hierbei wurde ein Primerpaar verwendet, welches am 3'Ende der AKT2 3'UTR bindet und somit spezifisch ein Fragment der längsten AKT2 3'UTR-Isoform amplifiziert. Die reduzierte Expression von hnRNP K wurde im Western-Blot bestätigt (Abbildung 3.28 A). Eine Reduzierung von hnRNP K hatte sowohl in unbehandelten Zellen als auch nach 6 h LPS-Stimulation keine Auswirkung auf die AKT2 mRNA Expression oder Stabilität (Abbildung 3.28 B und C).

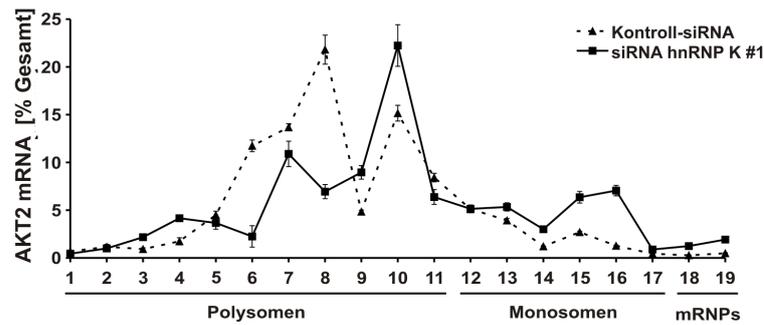


**Abbildung 3.28: Expression und Stabilität der AKT2 mRNA nach hnRNP K *knock down*.** RAW 264.7 wurden ohne siRNA (*mock*), mit einer unspezifischen Kontroll-siRNA oder zwei siRNAs gegen hnRNP K transfiziert und unbehandelt belassen oder für 6 h mit LPS stimuliert. **A)** Die verringerte Expression von hnRNP K wurde im Western-Blot bestätigt, Vinculin diente als Kontrolle. **B)** Die Expression der AKT2 mRNA wurde mittels qPCR analysiert und auf die NDUFV1 mRNA normalisiert. **C)** RAW 264.7 wurden mit einer unspezifischen Kontroll-siRNA oder einer siRNA gegen hnRNP K transfiziert und unbehandelt belassen oder für 6 h mit LPS stimuliert. Zur Inhibierung der Transkription wurden die Zellen für 1 h oder 2 h mit Actinomycin D inkubiert. Die Stabilität der AKT2 mRNA wurde mittels qPCR analysiert.

### 3.4.3 HnRNP K aktiviert die Translation von AKT2 unabhängig von der Makrophagenaktivierung

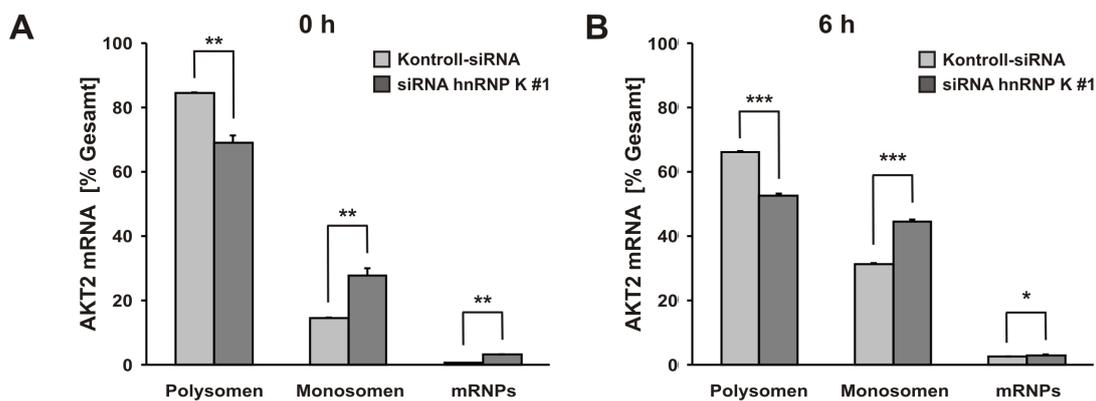
Um zu bestimmen, welchen Einfluss die Interaktion von hnRNP K mit der AKT2 mRNA auf deren Translation hat, wurde die Verteilung der AKT2 mRNA in Polysomengradienten analysiert. Hierzu wurden, wie schon in den Kapiteln 3.3.3 und 3.3.6 beschrieben und in den Abbildungen 3.15 und 3.24 dargestellt, zytoplasmatische Extrakte im Saccharosedichtegradienten aufgetrennt. Die prozentuale Verteilung der endogenen AKT2 mRNA in den einzelnen Fraktionen wurde analysiert. In unbehandelten Makrophagen führte ein *knock down* von hnRNP K zu einer leichten Umverteilung der AKT2 mRNA von den Polysomen in die Monosomen, also zu einer Reduzierung der AKT2-Translation (Abbildung 3.29).

Dies wird auch in der Abbildung 3.30 A verdeutlicht, nachdem die Verteilung der AKT2 mRNA in Polysomen, Monosomen und mRNPs zusammengefasst wurde. In aktivierten Makrophagen zeigte sich eine ähnliche Umverteilung (vergleiche Abbildung 3.30 A und B). Die Verteilungen der Kontroll-mRNAs von NDUFV1 und COG7 jeweils für unbehandelte Zellen und nach 6-stündiger LPS-Stimulation wurden bereits in den oben genannten Kapiteln gezeigt. Aktivierung der Makrophagen schien



**Abbildung 3.29: Verteilung der endogenen AKT2 mRNA im Polysomengradienten.** RAW 264.7 wurden mit einer unspezifischen Kontroll-siRNA oder mit einer siRNA gegen hnRNP K transfiziert und die zytoplasmatischen Extrakte im Saccharosedichtegradienten aufgetrennt. Die Verteilung der AKT2 mRNA in den 19 Gradientenfraktionen wurde mittels qPCR analysiert.

außerdem eine Reduktion der AKT2-Translation zu bewirken, da nach 6-stündiger LPS-Behandlung der Anteil der AKT2 mRNA in den Polysomen reduziert und in den Monosomen erhöht wurde. Dies konnte unabhängig von einem hnRNP K-*knock down* beobachtet werden (vergleiche Abbildung 3.30 A und B).



**Abbildung 3.30: Verteilung der endogenen AKT2 mRNA in Polysomen, Monosomen und mRNPs.** RAW 264.7 wurden mit einer unspezifischen Kontroll-siRNA oder mit einer siRNA gegen hnRNP K transfiziert und unbehandelt belassen (A) oder für 6 h mit LPS stimuliert (B). Zytoplasmatische Extrakte wurden im Saccharosedichtegradienten aufgetrennt und der prozentuale Anteil der AKT2 mRNA in den entsprechenden Fraktionen zusammengefasst.

Bei Verwendung eines Primerpaars, welches ein Fragment im ORF amplifiziert, anstelle des AKT2 3'-Primerpaars konnte keine signifikante Veränderung der AKT2 mRNA-Verteilung detektiert werden [Daten nicht gezeigt].

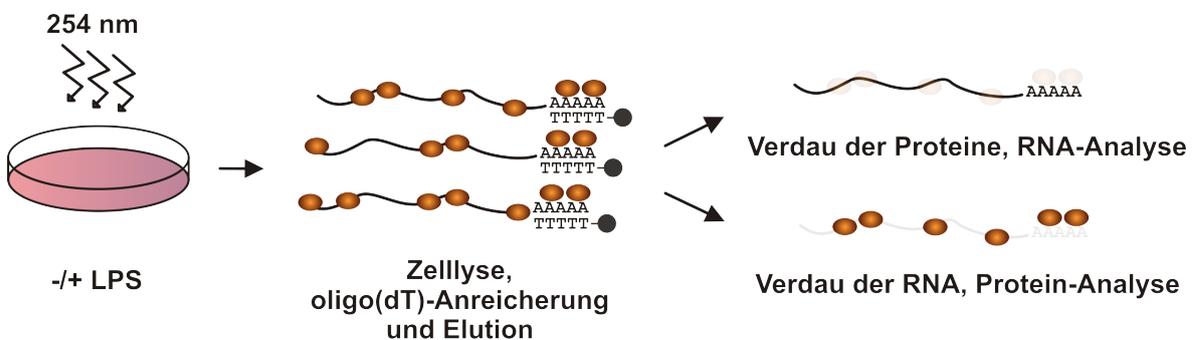
Trotz Versuche mit verschiedenen spezifischen Antikörpern war es im Rahmen dieser Arbeit leider nicht möglich, das AKT2 Protein im Western Blot zu detektieren. Die Analyse der Expression von AKT2 nach hnRNP K *knock down* wäre nützlich, um die in den Polysomenexperimenten beobachteten Veränderungen der AKT2 Translation zu validieren.

## 3.5 Das Maus-Makrophagen-mRNA-Interaktom

Die Immunantwort in Makrophagen kann durch post-transkriptionale Kontrolle der Genexpression reguliert werden. Ziele dieser Regulation können sowohl Proteine der Signalwege (TAK1, AKT2) aber auch Zytokine (TNF- $\alpha$ , IL-10) oder andere Mediatoren (COX-2, GM-CSF, VEGF) sein (siehe Kapitel 1.5). In den vorangegangenen Kapiteln wurde im Speziellen die Funktion des Regulators hnRNP K untersucht. Ein weiteres Ziel dieser Arbeit ist es, einen Überblick über die Gesamtheit der potentiell post-transkriptional regulatorischen Proteine in aktivierten Makrophagen zu erhalten. Das folgende Kapitel befasst sich daher mit der Identifizierung und Klassifizierung von Proteinen, die anhand ihrer Eigenschaft der RNA-Bindung als Regulatoren in Frage kommen.

### 3.5.1 Erstellung eines Maus-Makrophagen-Interaktoms

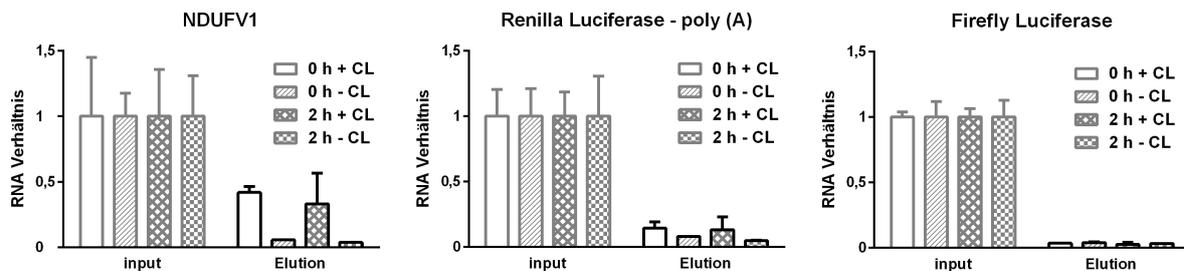
Um die Gesamtheit der mRNA-bindenden Proteine in Makrophagen zu identifizieren, wurden Proteine, die an polyadenylierte RNA assoziieren, angereichert. Das Verfahren ist im Kapitel 2.15 beschrieben und in Abbildung 3.31 schematisch dargestellt. Um eine mögliche Änderung der Bindung einzelner Proteine nach der Aktivierung festzustellen, wurde die Methode sowohl in unbehandelten Makrophagen als auch in Makrophagen nach 2-stündiger LPS-Behandlung durchgeführt.



**Abbildung 3.31: Schematische Darstellung der Anreicherung von mRNA-bindenden Proteinen.** RAW 264.7 wurden unbehandelt belassen oder für 2 h mit LPS stimuliert. Die Zellen wurden mit UV-Licht der Wellenlänge 254 nm bestrahlt (*crosslink*, CL), um kovalente Verknüpfungen zwischen der RNA und assoziierten Proteinen herzustellen, und anschließend unter denaturierenden Bedingungen lysiert. Komplexe aus polyadenylierter RNA und gebundenen Proteinen wurden mittels magnetischer oligo(dT)-*beads* angereichert. Zur Qualitätskontrolle der RNA wurden bei einem Teil der Elution die Proteine verdaut und zur Analyse der Proteine wurde die RNA enzymatisch abgebaut.

Die angereicherten RNA-Protein-Komplexe wurden nach der Elution zunächst einer Qualitätskontrolle unterzogen. Um die spezifische Anreicherung polyadenylierter RNA überprüfen zu können, wurden vor der Inkubation mit den magnetischen oligo(dT)-*beads* zwei *spike in*-Kontroll-RNAs zugegeben: polyadenylierte Renilla Luciferase und Firefly Luciferase ohne poly(A)-Schwanz. Bei einem Teil des *inputs* und der eluier-

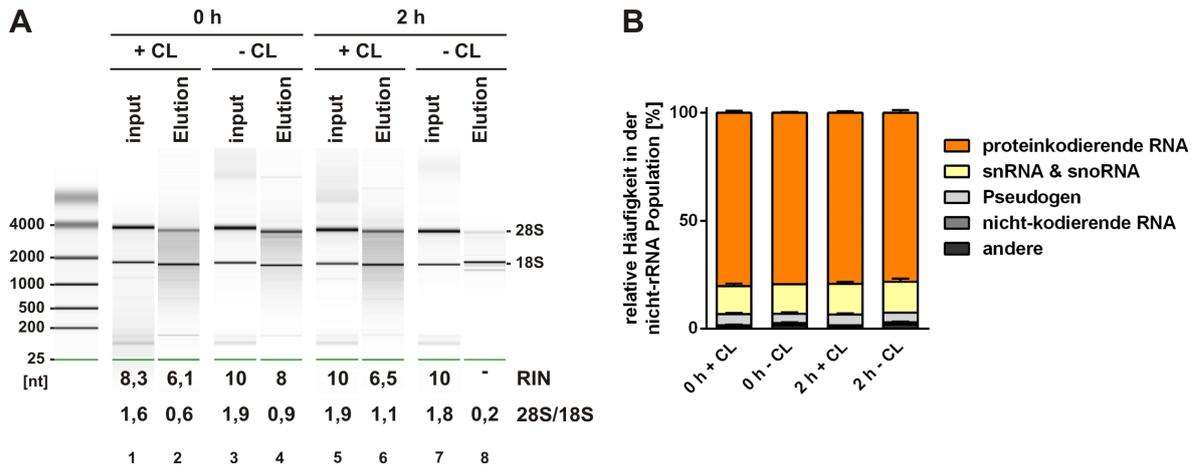
ten Komplexe erfolgte ein Abbau der Proteinfraction durch Proteinase K-Behandlung. Die daraufhin isolierte RNA wurde in cDNA umgeschrieben und mittels qPCR analysiert (Abbildung 3.32). Dabei konnte eine ca. 12-fache Anreicherung der endogenen NDUFV1 mRNA (links) und eine 4- bis 5-fache Anreicherung der polyadenylierten *spike in*-Kontrolle (Renilla Luciferase, Mitte) gegenüber der nicht-polyadenylierten Kontrolle (Firefly Luciferase, rechts) in den Elutionen der *crosslink*-Proben gemessen werden.



**Abbildung 3.32: Qualitätskontrolle der eluierten RNA mittels qPCR.** Das Verhältnis einer endogenen mRNA (NDUFV1), der polyadenylierten *spike in*-Kontrolle (Renilla Luciferase-poly(A)) und der nicht-polyadenylierten *spike in*-Kontrolle (Firefly Luciferase) in *input* und Elution wurde untersucht. Neben den *crosslink*-Proben (+ CL), dienten Zellen, die nicht mit UV-Licht bestrahlt wurden (- CL), als Kontrolle.

Eine Anreicherung polyadenylierter RNA kann auch mit Hilfe eines Nano Chips detektiert werden. Hierbei erfolgt eine elektrophoretische Größen-Auftrennung der RNA in einer Polymermatrix. Durch Interkalation eines Fluoreszenzfarbstoffes in die RNA, kann diese detektiert, quantifiziert und als Elektropherogramm oder Gel-ähnliche Abbildung dargestellt werden (Abbildung 3.33 A). Die *input*-Proben wiesen jeweils zwei deutliche Banden auf, die der 28S und der 18S rRNA entsprechen (Spuren 1, 3, 5 und 7). Die *RNA Integrity Number* (RIN), ein automatisch berechneter Schätzwert der Qualität der RNA [Schroeder *et al.*, 2006], lag bei drei der vier *input*-Proben bei dem Idealwert von 10. Das Verhältnis von 28S zu 18S lag nahe dem Normbereich von 2. Die rRNA-Banden der Elutionen waren dagegen schwächer ausgeprägt und sowohl die RIN als auch das rRNA-Verhältnis waren reduziert (Spuren 2, 4, 6 und 8). Dies spricht für eine Reduktion der rRNA bzw. eine Anreicherung polyadenylierter RNA, welche sich anhand des stärkeren Hintergrundes darstellt (Anreicherung von mRNAs unterschiedlicher Größe). Die eluierte und gereinigte RNA-Fraktion wurde in Kooperation mit Stuart Archer und Thomas Preiss (Australian National University, Canberra, Australien) sequenziert und kategorisiert. Dabei konnten die meisten *reads* neben rRNA den proteinkodierenden (und in der Regel polyadenylierten) RNAs zugeordnet werden (Abbildung 3.33 B).

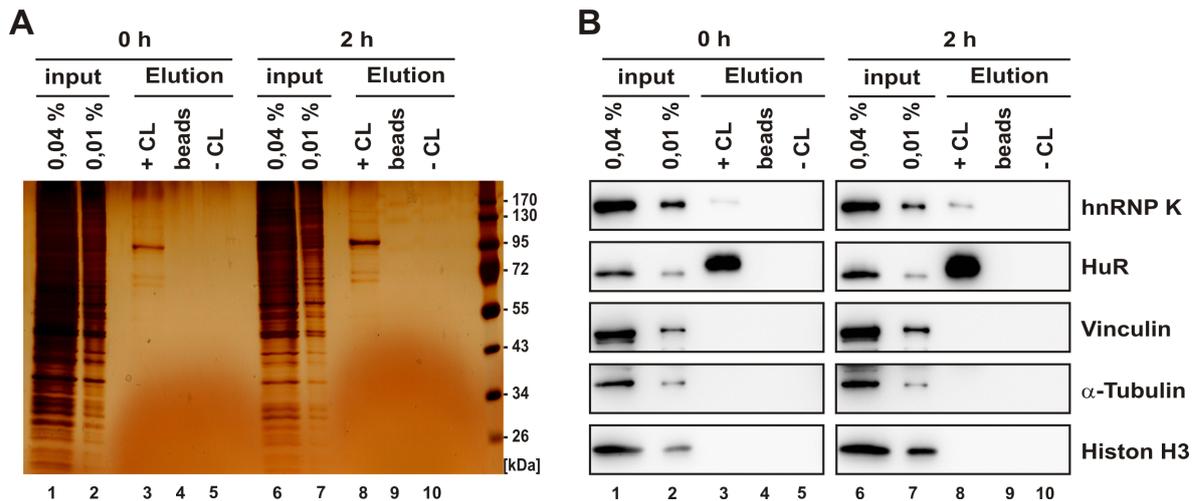
Neben der RNA-Qualitätskontrolle sollte die Anreicherung auch auf Proteinebene untersucht werden. Dafür wurde die RNA bei einem Teil des *inputs* und der Elutionen enzymatisch abgebaut und die Proteinfraction aufkonzentriert. Auf dem silbergefärbten



**Abbildung 3.33: Qualitätskontrolle der eluierten RNA mittels Nano Chip und *deep sequencing*.** **A)** RNA aus den *inputs* und den Elutionen wurde mit einem RNA 6000 Nano Kit untersucht. Als Indikator für die RNA-Qualität sind die RIN und das 28S/18S-Verhältnis angegeben. **B)** RNA aus den Elutionen wurde sequenziert, die *reads* dem Maus-Transkriptom zugeordnet und alle nicht rRNA-*reads* den Kategorien proteinkodierende RNA, snRNA & snoRNA, Pseudogen, nicht-kodierende RNA oder andere zugeordnet.

Gel ist zu erkennen, dass in der *crosslink*-Probe ein charakteristisches Muster an Proteinen angereichert werden konnte (Abbildung 3.34 A, vergleiche Spuren 1 und 2 mit Spur 3 und Spuren 6 und 7 mit Spur 8). Um die Spezifität zu kontrollieren wurde auf die UV-Behandlung verzichtet (– CL, Spuren 5 und 10) oder unmodifizierte magnetische *beads* ohne oligo(dT) eingesetzt (*beads*, Spuren 4 und 9). Mittels Western-Blot konnten in den mit UV-Licht bestrahlten Proben zwei bekannte RNA-bindende Proteine (hnRNP K und HuR) nachgewiesen werden, nicht aber in den jeweiligen Kontrollen (Abbildung 3.34 B, Spuren 3-5 und 8-10). Eine Kontamination durch nicht-RNA-bindende Strukturproteine wie Vinculin oder  $\alpha$ -Tubulin konnte ausgeschlossen werden.

Die massenspektrometrische Analyse der angereicherten Proteine wurde von Jeroen Krijgsveld (EMBL, Heidelberg) mit jeweils zwei biologischen Replikaten durchgeführt. Die RAW 264.7-Zellen wurden unbehandelt belassen oder für 2 h mit LPS stimuliert und anschließend mit UV-Licht bestrahlt. Als Kontrolle für den Hintergrund dienten unbestrahlte Zellen. Das Vorgehen zur Identifizierung und Quantifizierung der Proteine ist im Kapitel 2.15 beschrieben. Dabei wurde jeweils das Proteinverhältnis der unbehandelten Zellen und der Hintergrund-Kontrolle, der Zellen nach 2 h LPS-Behandlung und der Hintergrund-Kontrolle sowie der LPS-aktivierten und der unbehandelten Zellen ermittelt. In den zwei biologischen Replikaten konnten insgesamt 747 Proteine identifiziert werden. 463 Proteine wurden in unbehandelten Makrophagen quantifiziert und 374 davon konnten als mRNA-interagierend definiert werden. 463 Proteine wurden in Makrophagen nach 2 h LPS-Behandlung quantifiziert und 396 konnten als mRNA-interagierend definiert werden. Zugrunde gelegt wurde hierbei eine *false discovery rate* (FDR)  $\leq 1\%$ .

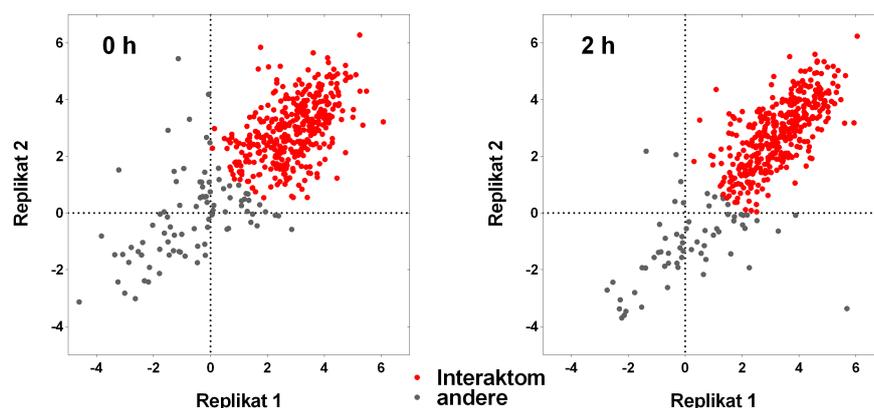


**Abbildung 3.34: Anreicherung von spezifischen RNA-bindenden Proteinen.** Silbergefärbtes Polyacrylamid-Gel (A) und Western-Blot (B) der *inputs* und Elutionen nach oligo(dT)-Anreicherung. Detektiert wurden bekannte RBPs (hnRNP K und HuR) und Strukturproteine (Vinculin,  $\alpha$ -Tubulin und Histon H3). Als Spezifitätskontrollen dienten Zellen, die nicht mit UV-Licht bestrahlt wurden (- CL), oder unmodifizierte magnetische *beads* (*beads*).

Die Kriterien zur Definition eines Proteins als RNA-bindendes Protein waren folgende:

- Das Protein muss in beiden Replikaten detektierbar sein.
- Das Proteinverhältnis muss  $> 1$  in beiden Replikaten sein.
- Der korrigierte p-Wert 0 h oder 2 h LPS *versus* Kontrolle muss  $< 0,1$  sein.

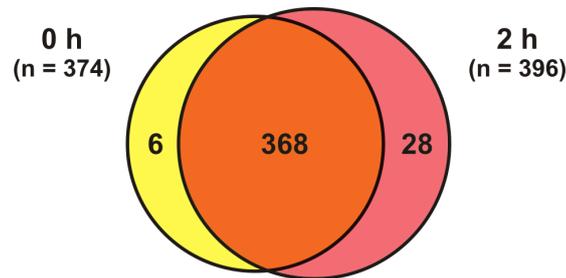
Auftragung der Proteinverhältnisse der Replikate in einem Streudiagramm verdeutlichte eine gute Reproduzierbarkeit (Abbildung 3.35). Proteine, auf die die oben genannten Kriterien zutreffen, sind rot markiert; quantifizierte Proteine, die aber nicht als mRNA-interagierend definiert werden konnten, sind grau markiert.



**Abbildung 3.35: Reproduzierbarkeit der Replikate.** Die Proteinverhältnisse in log2 der beiden Replikate von unbehandelten Makrophagen (links) und nach 2 h LPS-Behandlung (rechts) wurden jeweils gegeneinander aufgetragen. Die Proteine des Interaktoms sind rot markiert.

Von den 374 in unbehandelten Makrophagen identifizierten RBPs und den 396 RBPs, die nach 2 h LPS-Behandlung identifiziert wurden, sind 368 Proteine identisch. Daraus

ergibt sich für das RAW 264.7-mRNA-Interaktom eine Gesamtzahl von 402 RNA-bindenden Proteinen (Abbildung 3.36).

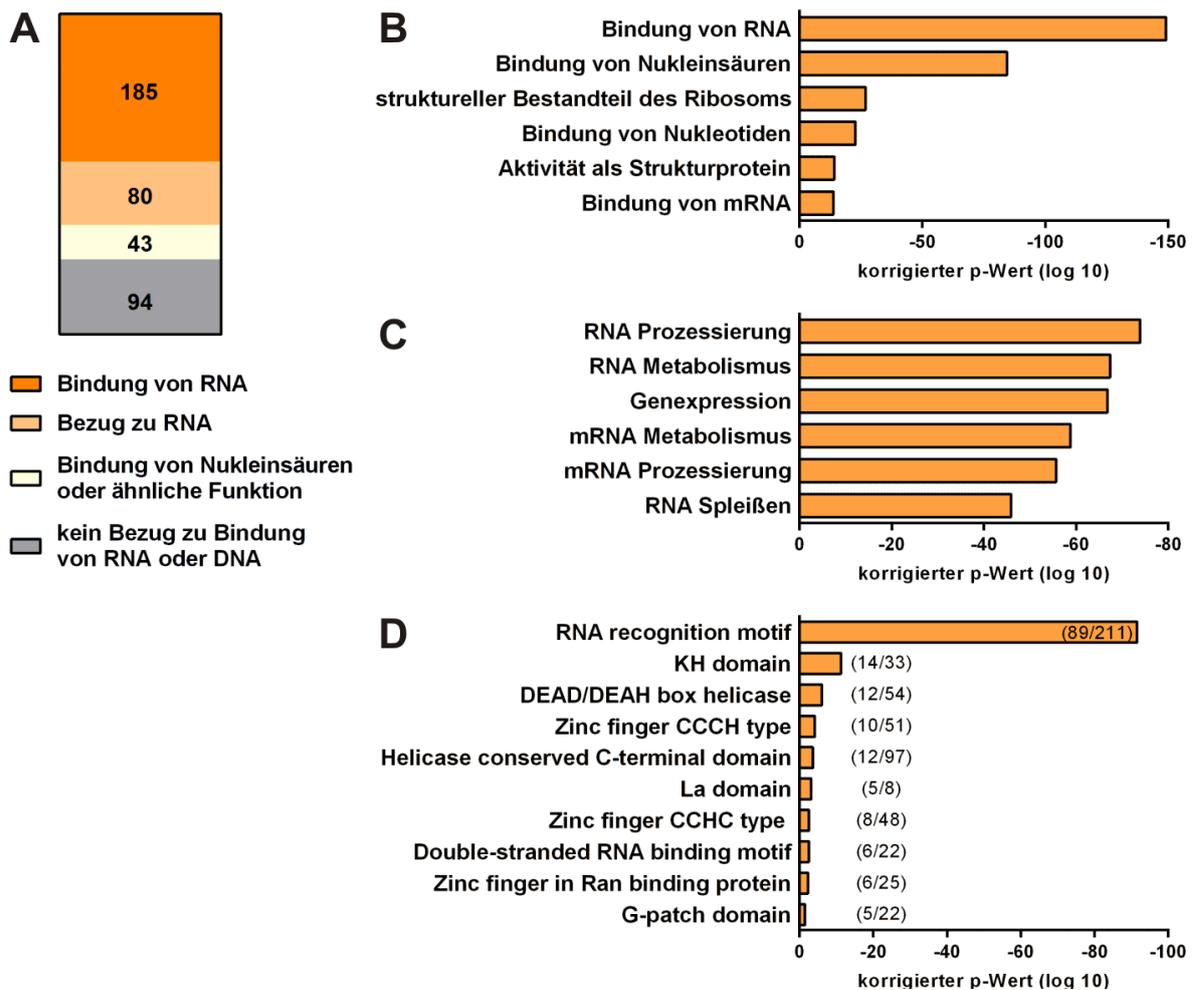


**Abbildung 3.36: Die 402 Proteine des RAW 264.7-Interaktoms.** Überschneidung von Proteinen, die in unbehandelten Makrophagen angereichert wurden mit Proteinen, die nach 2 h LPS-Behandlung angereichert wurden.

### 3.5.2 Klassifizierung der Proteine des Maus-Makrophagen-Interaktoms

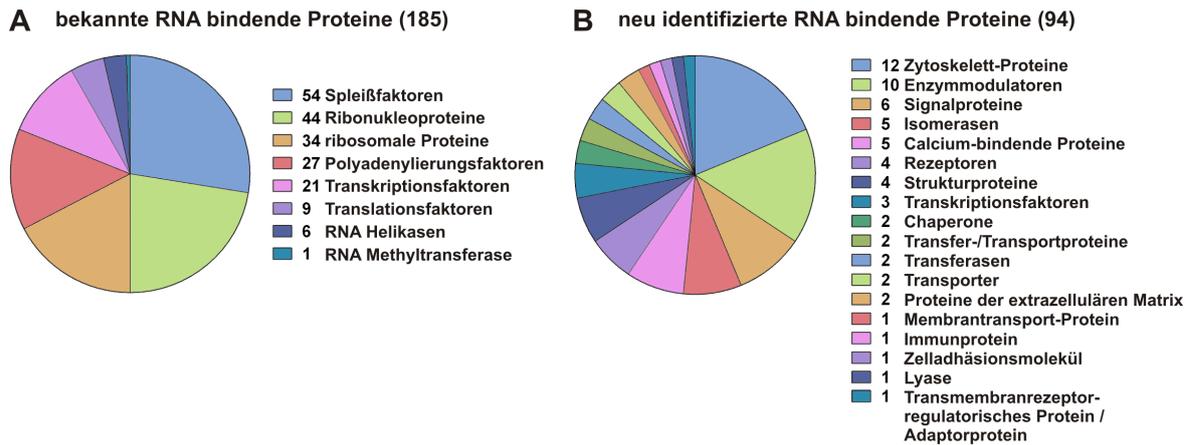
Die 402 Proteine des RAW 264.7-Interaktoms wurden mit Hilfe der *Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery* (DAVID, [Huang da *et al.*, 2009a,b]) annotiert. Es wurden die Einträge der GO-Datenbanken ‘Molekulare Funktion’ und ‘Biologischer Prozess’ sowie der Proteindomänen-Datenbank Pfam heruntergeladen. 185 Proteinen des Interaktoms konnte mit Hilfe von GO die molekulare Funktion ‘RNA-Bindung’ zugeordnet werden (Abbildung 3.37 A). Die weiteren Proteine wurden manuell in die Kategorien ‘RNA-verwandt’ oder ‘Bindung von Nukleinsäuren oder verwandt’ eingeordnet. Die verbleibenden 94 Proteine, die nicht zugeordnet werden konnten, stellen neu identifizierte RBPs dar (‘kein Bezug zu Bindung von RNA oder DNA’). Neben der Eingruppierung der RBPs nach ihrer Funktion im Zusammenhang mit der Bindung von Nukleinsäuren wurde eine Anreicherungsanalyse aller GO-Terme der Kategorien ‘Molekulare Funktion’ und ‘Biologischer Prozess’ durchgeführt und die sechs Terme mit der höchsten Überrepräsentation im Vergleich zum gesamten Mausgenom dargestellt (Abbildung 3.37 B und C). Solch eine Analyse wurde auch für die funktionalen Proteindomänen der Proteine im Interaktom durchgeführt und die zehn Domänen mit der höchsten Überrepräsentation dargestellt (Abbildung 3.37 D). Hierbei zeigte sich, dass durch die Anreicherung jeweils 42% aller im Mausgenom kodierten Proteine mit einem RNA *recognition motif* oder einer KH-Domäne angereichert werden konnten (89 von 211 RNA *recognition motifs* bzw. 14 von 33 KH-Domänen).

Um einen Einblick in die Funktionen der 185 bekannten RNA-bindenden Proteine im Kontext des RNA-Metabolismus zu erhalten, wurden diese mittels PANTHER *protein class* [Thomas *et al.*, 2003; Mi *et al.*, 2013] zugeordnet (Abbildung 3.38 A). Hierbei waren alle wichtigen Schritte des RNA-Metabolismus wie Transkription, Spleißen,



**Abbildung 3.37: Eigenschaften der Proteine des Interaktoms.** **A)** Einordnung der 402 Proteine anhand ihrer beschriebenen Funktionen im Zusammenhang mit der Bindung von Nucleinsäuren. **B und C)** Die Anreicherung von Termen in den GO-Kategorien ‘Molekulare Funktion’ und ‘Biologischer Prozess’ wurde untersucht. Es sind jeweils die sechs Terme mit den kleinsten korrigierten p-Werten (berechnet mit der Methode nach Benjamini-Hochberg) dargestellt. **D)** Die Anreicherung von Proteindomänen in Pfam wurde untersucht. Es sind jeweils die zehn Domänen mit den kleinsten korrigierten p-Werten dargestellt. Werte in Klammern geben jeweils die Anzahl der identifizierten Domänen im Interaktom und die Gesamtanzahl der Domänen im Mausgenom an.

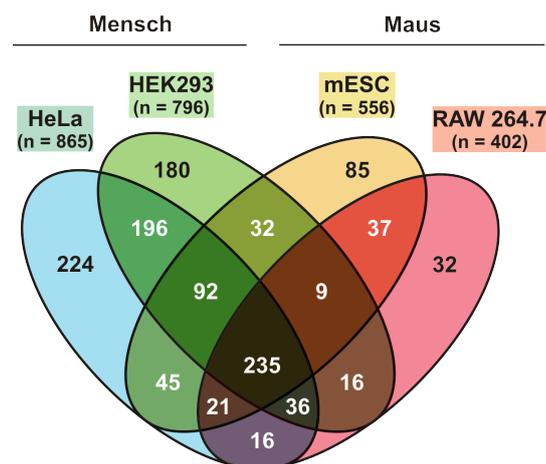
Polyadenylierung und Translation vertreten. Um herauszufinden, welche kanonischen Funktionen die 94 neu identifizierten RBPs normalerweise in der Zelle erfüllen, wurden diese ebenfalls mit Hilfe von PANTHER *protein class* untersucht (Abbildung 3.38 B). So stellt ein großer Teil der neu identifizierten RBPs Zytoskelett-Proteine dar (12 von 64 bekannten Funktionen) oder fungiert als Enzymmodulator (10 von 64 bekannten Funktionen).



**Abbildung 3.38: Funktionen der bekannten und neu identifizierten RBPs.** A) Einordnung der 185 bekannten RBPs nach ihren Funktionen im RNA-Metabolismus mit Hilfe von PANTHER *protein class*. B) Klassifizierung der Funktionen der 94 neu identifizierten RNA-bindenden Proteine mit Hilfe von PANTHER *protein class*.

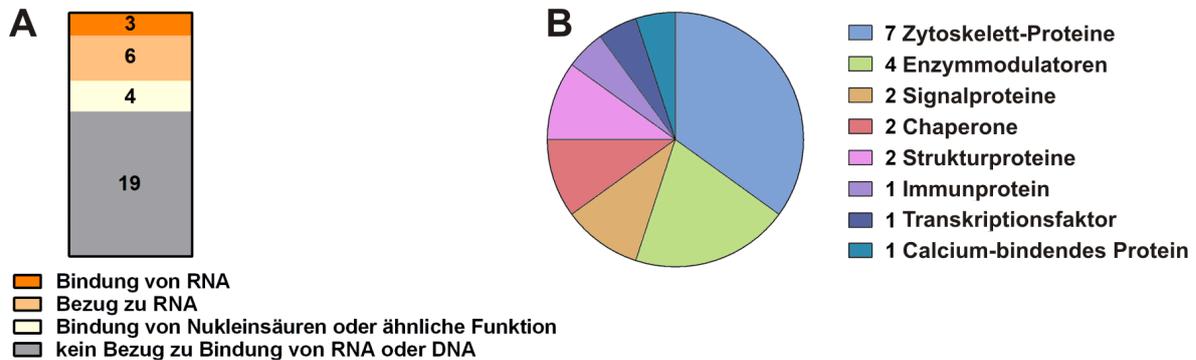
### 3.5.3 Vergleich des Makrophagen-Interaktoms mit anderen Interaktomen

Bisher konnten Alfredo Castello und Kollegen in der humanen HeLa-Zelllinie 860 RNA-bindende Proteine identifizieren [Castello *et al.*, 2012]. Weiterhin wurden in humanen HEK293-Zellen 797 RBPs identifiziert [Baltz *et al.*, 2012] und in murinen embryonalen Stammzellen (mESC) 555 RBPs [Kwon *et al.*, 2013]. Der Vergleich dieser drei Interaktome mit dem RAW 264.7-Interaktom zeigte, dass 32 der 402 RBPs nur in Maus-Makrophagen vorkommen oder nur in diesen Zellen mit polyadenylierter RNA angereichert werden konnten (Abbildung 3.39).



**Abbildung 3.39: Vergleich mit anderen Interaktomen.** Die bisher identifizierten RNA-bindenden Proteine aus HeLa-Zellen, HEK293-Zellen, aus murinen embryonalen Stammzellen (mESC) und aus RAW 264.7-Zellen wurden miteinander verglichen. Die 860 in HeLa-Zellen identifizierten RBPs entsprechen 865 Maus-Homologen und die 797 in HEK293-Zellen identifizierten RBPs 797 Maus-Homologen (siehe [Kwon *et al.*, 2013]), wobei bei letzteren ein doppelter Eintrag entfernt wurde (entspricht der angegebenen Zahl 796). Kwon und Kollegen konnten zudem ein Protein validieren, was nicht in ihrer Interaktom-Liste aufgeführt wurde (daraus resultiert die angegebene Zahl 556).

Für 19 der 32 ausschließlich in RAW 264.7 identifizierten RBPs ist bislang keine Funktion im Zusammenhang mit der Bindung von RNA oder DNA beschrieben (Abbildung 3.40 A), sie stellen daher neue Makrophagen-spezifische RNA-bindende Proteine dar. Klassifizierung dieser 19 neu identifizierten RBPs mit PANTHER *protein class* ergab, dass sieben Proteine normalerweise eine Funktion als Zytoskelett-Protein und vier als Enzymmodulator erfüllen (Abbildung 3.40 B).



**Abbildung 3.40: RAW 264.7-spezifische RNA-bindende Proteine.** A) Einordnung der 32 Makrophagen-spezifischen RBPs anhand ihrer beschriebenen Funktionen im Zusammenhang mit der Bindung von Nucleinsäuren. B) Klassifizierung der 19 neu identifizierten Makrophagen-spezifischen RBPs mit Hilfe von PANTHER *protein class*.

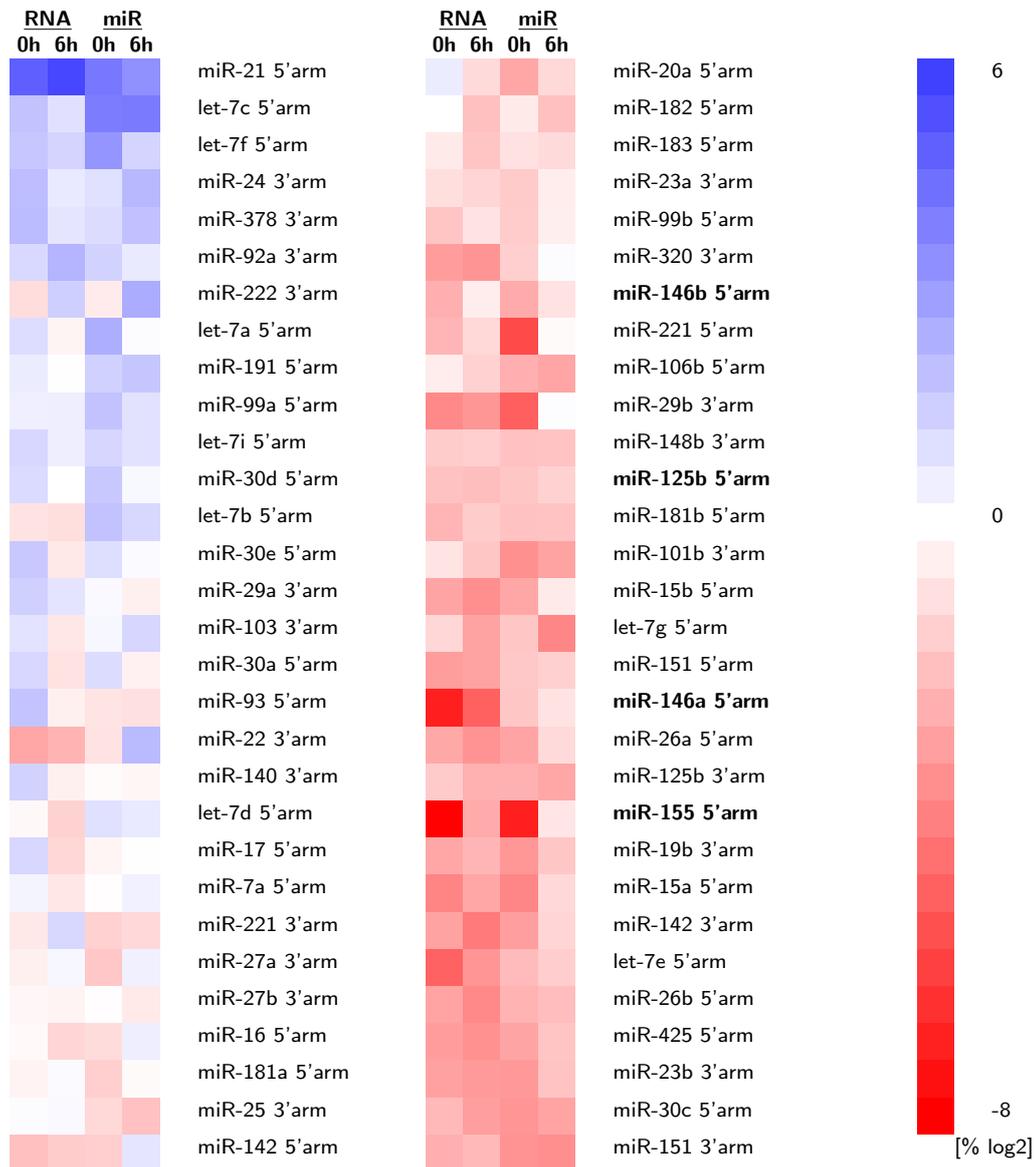
### 3.5.4 Drei RBPs sind unterschiedlich stark an polyadenylierte RNA gebunden

537 Proteine konnten im Vergleich von Makrophagen nach 2 h LPS-Behandlung zu unbehandelten Makrophagen quantifiziert werden, aber nur drei Proteine konnten als unterschiedlich interagierend definiert werden: der Transkriptionsfaktor Jun-B, *ribosomal RNA processing 12 homolog* (RRP12) und das RNA-bindende Zinkfinger-Protein ZFP36 (Tristetraprolin, TTP). Hierbei wurden die folgenden Kriterien angewendet:

- Das Protein muss jeweils in beiden Replikaten von 0 h und 2 h LPS *versus* Kontrolle detektierbar sein.
- Das Protein muss auch in beiden Replikaten von 2 h LPS *versus* 0 h LPS detektierbar sein.
- Das Proteinverhältnis muss  $> 1$  in beiden Replikaten sein.
- Der korrigierte p-Wert 2 h LPS *versus* 0 h muss  $< 0,1$  sein.

### 3.6 Maus-Makrophagen-microRNA-Bibliotheken

Neben RNA-bindenden Proteinen sind auch nicht-kodierende RNAs, wie miRNAs, in der Lage die Expression von Proteinen zu beeinflussen. Da die regulatorische Funktion einer miRNA auch von ihrer zellulären Abundanz abhängt, wurden miRNA-Bibliotheken generiert. Diese sollen es erlauben, miRNAs, die während der Makrophagenaktivierung induziert oder herunter reguliert werden, zu identifizieren.

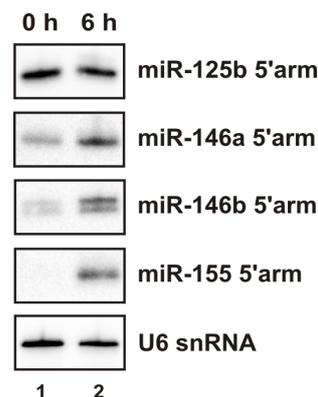


**Tabelle 3.2: Top 60 der identifizierten miRNAs mit den meisten reads.** Angegeben ist die relative Häufigkeit der reads in jeder Bibliothek in log2. 'RNA' entspricht der miRNA-Population, die aus Gesamt-RNA kloniert wurde und 'miR' der miRNA-Population, die aus Größen-fraktionierter RNA kloniert wurde. Hervorgehoben sind miRNAs, welche für die Validierung ausgewählt wurden.

Um die Expression der miRNAs während der Aktivierung vergleichen zu können, wurden die miRNA-Populationen aus unbehandelten Makrophagen und nach 6 h LPS-Stimulation präpariert. Dies wurde mit Unterstützung von Anne Dueck und Gunter

Meister (Universität Regensburg) durchgeführt. Dabei wurde zum einen von Gesamt-RNA ausgegangen, zum anderen von Größen-fraktionierter RNA in der Größe von miRNAs. Die angewendete Methode erlaubt eine spezifische Klonierung der miRNAs und damit eine Anreicherung gegenüber anderer RNA-Spezies (siehe Kapitel 2.16.1). Auf die Klonierung der miRNA-Populationen folgte *deep sequencing* durch die Firma Fasteris SA (Plan-les-Ouates, Schweiz) auf einem Illumina Genome Analyzer IIx. Die Auswertung der Daten wurde von InteRNA Genomics B.V. (Utrecht, Niederlande) durchgeführt. Dafür wurde das Analyseprogramm miR-Intess und die miRNA-Datenbank Mirbase Version 16 benutzt. Auf diese Weise konnten in den Makrophagen 219 annotierte miRNAs identifiziert werden und weiterhin drei bislang unbekannte miRNAs. Die 60 miRNAs mit den meisten *reads* in allen vier Bibliotheken sind in Tabelle 3.2 als *heatmap* dargestellt.

Um die LPS-abhängige Regulation einiger miRNAs zu validieren, wurden Northern-Blots durchgeführt. Hierfür wurden vier miRNAs ausgewählt, deren Regulation aus der Literatur bekannt ist. In humanen THP-1-Monozyten werden die miRNAs 146a/b und 155 nach 8-stündiger LPS-Stimulation stark induziert [Taganov *et al.*, 2006]. LPS-Aktivierung von RAW 264.7-Zellen über 6 h führte ebenfalls zu einer Induktion von miR-155, aber auch zu einer leichten Verringerung der miR-125-Expression [Tili *et al.*, 2007]. Im Northern-Blot konnte eine Induktion von miR-146a/b und miR-155 nach 6 h LPS-Behandlung detektiert werden (Abbildung 3.41). Beim Vergleich der Signale von miR-125 und der U6 snRNA im Northern-Blot konnte keine Veränderung festgestellt werden. Die Veränderung der miR-125-Expression in den Sequenzierdaten (siehe Tabelle 3.2) ist jedoch auch nur minimal und tendiert jeweils in verschiedene Richtungen. Es konnte also die in der Literatur beschriebene Induktion von drei der vier miRNAs sowohl in den Sequenzierdaten als auch im Northern-Blot bestätigt werden.



**Abbildung 3.41: Detektion einiger ausgewählter miRNAs mittels Northern-Blot.** RAW 264.7 wurden unbehandelt belassen oder für 6 h mit LPS stimuliert. Die isolierte Gesamt-RNA wurde auf einem Harnstoffgel aufgetrennt, auf eine Membran überführt und mit einer radioaktiv markierten Sonde detektiert. Eine Sonde gegen die U6 snRNA diente als Kontrolle.

## 4 Diskussion und Ausblick

*Toll-like*-Rezeptoren erkennen spezifisch Oberflächenmuster von eindringenden Pathogenen und aktivieren ein intrazelluläres Netzwerk an Signalwegen. Diese Immunantwort zeichnet sich durch komplexe Interaktionen zwischen den unterschiedlichen Signalkaskaden sowie Rückkopplungsmechanismen aus [Oda & Kitano, 2006]. Um ein Ungleichgewicht von inflammatorischen Faktoren und damit beispielsweise die Entstehung chronischer Krankheiten zu verhindern, unterliegt die Immunantwort einer strengen Kontrolle. Dies wird unter anderem durch transkriptionale und post-transkriptionale Regulation der Genexpression erreicht. Häufig wird so die Expression von Zytokinen und Chemokinen und damit extrazelluläre Vorgänge wie Entzündungsreaktionen oder die Rekrutierung von Leukozyten gesteuert. Auch die Kontrolle der Expression von Komponenten der Signalwege, von Rezeptoren oder von Transkriptionsfaktoren ist möglich, was zu einer noch höheren Komplexität beiträgt [Ivanov & Anderson, 2013].

Ein klassisches Beispiel für eine transkriptionale Aktivierung und damit verbundene Rückkopplung ist der Inhibitor von NF- $\kappa$ B: I $\kappa$ B- $\alpha$ . Der Transkriptionsfaktor NF- $\kappa$ B wird durch I $\kappa$ B- $\alpha$  im Zytoplasma lokalisiert bis ein Stimulus zur Ubiquitinierung und Degradation von I $\kappa$ B- $\alpha$  und zur Freisetzung und Kernlokalisierung von NF- $\kappa$ B führt. Dort aktiviert NF- $\kappa$ B die Expression von I $\kappa$ B- $\alpha$ , welcher wiederum durch Bindung an NF- $\kappa$ B für dessen Lokalisierung und Inhibierung im Zytoplasma sorgt [Sun *et al.*, 1993; Brown *et al.*, 1993]. Außerdem konnte gezeigt werden, dass LPS die Transkription der beiden Kinasen IKK $\epsilon$  [Shimada *et al.*, 1999] und MKK3 [Eichelbaum & Krijgsveld, 2014] im TLR4-Signalweg induziert.

Im Gegensatz zur transkriptionalen Kontrolle ist die Regulation der Genexpression auf post-transkriptionaler Ebene weitaus effektiver und dynamischer. Denn eine Regulation der mRNA-Stabilität und/oder der Translation von Zytokinen, wie Interleukinen oder Tumornekrosefaktoren, ermöglicht eine schnelle Ausschüttung dieser Entzündungsmediatoren [Palanisamy *et al.*, 2012]. Zur Analyse der Regulation von Proteinen des TLR4-Signalwegs sind bisher nur wenig Studien durchgeführt worden. Bekannt ist beispielsweise, dass die Translation der Kinase TAK1 in humanen Monozyten durch das ARE-bindende Protein AUF1 gefördert wird [Sarkar *et al.*, 2011] (siehe Kapitel 1.5.2). Die miRNAs 146a und 146b werden NF- $\kappa$ B-abhängig durch LPS induziert und inhibieren die Synthese von IRAK1 und TRAF6 im TLR4-Signalweg. So erfolgt eine negative Rückkopplung, die zu einer Eindämmung der Immunantwort

führt [Taganov *et al.*, 2006].

Die Regulation der Expression von Effektorproteinen der Immunantwort auf post-transkriptionaler Ebene stellt also einen wichtigen Kontrollpunkt dar. So kann eine schnelle und effektive Anpassung erreicht werden oder eine fein abgestimmte Modulation erfolgen. Mit der Aufklärung eines weiteren regulatorischen Mechanismus, der translationalen Inhibierung der TAK1 mRNA durch hnRNP K, konnte mit dieser Arbeit ein neuer Teil zum Gesamtverständnis der Immunregulation beigetragen werden.

## 4.1 Die Rolle von hnRNP K in der Immunantwort

In Erythroblasten inhibiert hnRNP K die Translation der c-Src und der r15-LOX mRNAs durch Bindung an deren 3'UTRs. Im Laufe der Reifung zu Erythrozyten kommt es zu einer Aufhebung dieser Bindung und somit auch der translationalen Repression (siehe Kapitel 1.6.1). Ein Ziel dieser Arbeit war es, mRNAs zu identifizieren, die während einer Inflammation post-transkriptional durch hnRNP K reguliert werden. Dafür wurden nach einer Immunpräzipitation von hnRNP K die in den mRNPs enthaltenen mRNAs durch Microarrays identifiziert. Durch Vergleich von unbehandelten Zellen mit einer 6-stündigen LPS-Behandlung konnten 1901 mRNAs identifiziert werden, die in unbehandelten Zellen an hnRNP K assoziierten und deren Bindung in aktivierten Makrophagen reduziert war.

Entgegen den Erwartungen befanden sich unter den 1901 mRNAs keine Interleukine, Tumornekrosefaktoren oder Interferone und nur wenige Chemokine. Auffällig war hingegen eine große Anzahl von Kinasen und anderen Proteinen, die an intrazellulären Prozessen der Immunantwort beteiligt sind. Aus den 1901 potentiell regulierten mRNAs wurden zunächst 21 Kandidaten für die Validierung mittels qPCR ausgewählt, wobei der Schwerpunkt auf mRNAs gelegt wurde, die für Proteine des TLR4-Signalwegs kodieren (siehe Tabelle 3.1). Weil sich die Expression von sieben mRNAs nach LPS-Aktivierung zu stark veränderte, wurden diese aus der weiteren Validierung ausgeschlossen (siehe Abbildung 3.8 A). Für sieben der 14 verbliebenen mRNAs konnten die mittels Microarray-Analysen gewonnenen Ergebnisse bestätigt werden. Diese wiesen in unbehandelten RAW 264.7-Zellen eine Assoziation mit hnRNP K auf, die nach der Aktivierung reduziert oder aufgehoben wurde (siehe Abbildung 3.8 B). Fünf weitere mRNAs wurden sowohl in unbehandelten als auch in aktivierten Makrophagen von hnRNP K gebunden und zwei mRNAs zeigten in der qPCR-Validierung keine Assoziation mit hnRNP K (siehe Abbildung 3.8 B).

Es ist nicht ungewöhnlich, dass die Ergebnisse aus Microarray- und qPCR-Experimenten voneinander abweichen [Morey *et al.*, 2006]. Die Gründe dafür liegen in der unterschiedlichen Aufarbeitung und Amplifikation der Proben sowie der Detektion und Normalisierung der erhaltenen Daten. Bei der Bearbeitung der Microarray-Rohdaten

benutzte Algorithmen (wie *median polish*, siehe Kapitel 2.9.6) können zudem unterschiedliche Ergebnisse liefern [Giorgi *et al.*, 2010].

In Experimenten mit primären murinen Makrophagen, die aus Knochenmarkszellen von C57BL/6-Mäusen ausdifferenziert wurden (*bone marrow-derived macrophages*, BMDM), konnte die differentielle Assoziation von fünf der sieben in RAW 264.7-Zellen validierten mRNAs bestätigt werden [Liepelt *et al.*, 2014]. Die mRNAs von IRAK4, TAK1, CARM1, PI3KCA und AKT3 wiesen eine Assoziation mit hnRNP K in unbehandelten BMDM auf, welche nach 6-stündiger LPS-Behandlung reduziert oder aufgehoben war. Es konnte allerdings keine Interaktion zwischen hnRNP K und den mRNAs von IRAK1BP1 und ERC1 festgestellt werden [Liepelt *et al.*, 2014]. So wurde für einen Teil der identifizierten Kandidaten sichergestellt, dass die differentielle Bindung an hnRNP K nicht nur in einer immortalisierten Zelllinie stattfindet sondern auch in primären Makrophagen. Die sieben mRNAs mit reduzierter Bindung an hnRNP K nach Aktivierung der RAW 264.7-Zellen (IRAK4, IRAK1BP1, TAK1, ERC1, CARM1, PI3KCA und AKT3) und die fünf mRNAs, welche sowohl in unbehandelten als auch aktivierten Makrophagen mit hnRNP K interagierten (PCGF1, MED9, IRAK1, AKT1 und AKT2), sind in Tabelle 4.1 aufgelistet.

Symbol	Funktionen	Referenzen
<b>IRAK4</b>	wichtige Kinase im TLR4-Signalweg	siehe Kapitel 1.1.4
<b>IRAK1BP1</b> (SIMPL)	beeinflusst die Kernlokalisierung von spezifischen NF- $\kappa$ B-Untereinheiten und trägt so zu einem anti-inflammatorischen (M2)-Phänotyp bei	[Conner <i>et al.</i> , 2008, 2010]
<b>TAK1</b> (MAP3K7)	zentrale Kinase im TLR4-Signalweg, Tumorsuppressor, DNA <i>damage response</i>	siehe Kapitel 1.2
<b>ERC1</b> (CAST1, ELKS)	DNA <i>damage response</i>	siehe Kapitel 1.2.3
<b>CARM1</b> (PRMT4)	Koaktivator von NF- $\kappa$ B für die Transkription bestimmter Zytokine und Chemokine	[Covic <i>et al.</i> , 2005; Jayne <i>et al.</i> , 2009]
<b>PI3KCA</b> (p110 $\alpha$ )	Regulation der Produktion spezifischer Zytokine, vermittelt Phagozytose und Pinozytose in Makrophagen	[Lee <i>et al.</i> , 2007; Tamura <i>et al.</i> , 2009]
<b>AKT3</b> (PKB- $\gamma$ )	induziert durch Phosphorylierung von AGO2 die miRNA-gesteuerte translationale Repression	[Horman <i>et al.</i> , 2013]
<b>PCGF1</b> (NSPC1)	Untereinheit des Polycomb-Repressor-Komplexes, welcher durch <i>gene silencing</i> auch die Differenzierung von Makrophagen beeinflusst	[Nunes <i>et al.</i> , 2001; De Santa <i>et al.</i> , 2007]
<b>MED9</b> (MED25)	Untereinheit des Mediator-Komplexes, welcher essentiell für die Transkription ist; Aktivierung von NF- $\kappa$ B durch direkte Interaktion mit Untereinheiten des Komplexes	[Tomomori-Sato <i>et al.</i> , 2004; van Essen <i>et al.</i> , 2009]
<b>IRAK1</b>	wichtige Kinase im TLR4-Signalweg	siehe Kapitel 1.1.4
<b>AKT1</b> (PKB- $\alpha$ )	Polarisierung von Makrophagen in Richtung des M1-	siehe Kapitel 1.3
<b>AKT2</b> (PKB- $\beta$ )	oder M2-Phänotyps	

**Tabelle 4.1: Die sieben validierten mRNAs mit reduzierter Bindung an hnRNP K nach Makrophagenaktivierung und die fünf mRNAs, die unabhängig von der Aktivierung mit hnRNP K interagierten.** Die jeweiligen Funktionen (während der Immunantwort) sind näher erläutert.

Von den sieben validierten Kandidaten wurde TAK1 und von den fünf Kandidaten mit gleich bleibender Bindung AKT2 weiter untersucht.

#### 4.1.1 Die Translationskontrolle der TAK1 mRNA durch hnRNP K

In UV *crosslink*-Experimenten konnte eine direkte Bindung von rekombinantem hnRNP K an die TAK1 3'UTR-Fragmente 3 und 5.1 gezeigt werden (siehe Abbildung 3.10). Eine Deletion der KH-Domäne 3 von hnRNP K hatte den Verlust der Bindung an die TAK1 3'UTR-Fragmente zur Folge, während mit der isolierten KH-Domäne 3 von hnRNP K eine Bindung detektierbar war (siehe Abbildung 3.11). Dieses Ergebnis ist vergleichbar mit früheren Untersuchungen, in denen gezeigt wurde, dass die KH-Domäne 3 von hnRNP K die Bindung an poly(C) [Dejgaard & Leffers, 1996] bzw. an das DICE vermittelt [Messias *et al.*, 2006]. Allerdings konnte beim UV *crosslink*-Experiment mit hnRNP K<sub>( $\Delta$ KH3)</sub> und dem DICE noch ein schwaches Signal detektiert werden. Die im Vergleich mit KH3 schwächere RNA-Bindung der anderen beiden KH-Domänen (KH1 und KH2) wurde bereits in *dot blot*-Experimenten [Dejgaard & Leffers, 1996] und in *yeast three-hybrid*-Analysen demonstriert [Paziewska *et al.*, 2004]. Auch in *pull down*-Experimenten konnte eine Zunahme der unspezifischen Bindung von hnRNP K beobachtet werden, wenn die KH3 deletiert ist [Naarmann-de Vries *et al.*, 2013]. Die Bindung von hnRNP K an die TAK1 3'UTR-Fragmente 3 und 5.1 konnte durch Zugabe des DICE aufgehoben werden. Mit dem Fragment 4 der TAK1 mRNA 3'UTR, welches die ARE-Sequenzen enthält, konnte keine Konkurrenz detektiert werden (siehe Abbildung 3.12).

Durch Reduzierung von endogenem hnRNP K in RAW 264.7-Zellen durch RNAi wurde die Relevanz dieser Interaktion deutlich. Sowohl in der Immunfluoreszenzfärbung als auch im Western-Blot war ein Anstieg des Proteinlevels von TAK1 nachweisbar (siehe Abbildung 3.13). Auch diese Ergebnisse konnten durch Dr. Jana Mossanen in primären Makrophagen (BMDM) bestätigt werden [Liepelt *et al.*, 2014]. Durch Untersuchung der TAK1 mRNA-Expression und -Stabilität in RAW 264.7-Zellen konnte eine Regulation auf der Ebene der Transkription ausgeschlossen werden (siehe Abbildung 3.14). Mit Hilfe der Dichtegradientenzentrifugation konnte eine Aktivierung der Translation der TAK1 mRNA nach hnRNP K *knock down* gezeigt werden (siehe Abbildung 3.17). Die relativ gleichmäßige Verteilung der TAK1 mRNA über die verschiedenen Gradientenfraktionen nach Kontroll-siRNA-Transfektion wies nach hnRNP K *knock down* ein breites Maximum in den schweren Polysomen auf. Die Translation der TAK1 mRNA wurde also durch eine Reduzierung der hnRNP K-Expression noch gesteigert, was im Einklang mit den Ergebnissen aus Abbildung 3.13 ist.

Betrachtet man den zeitlichen Verlauf einer LPS-Aktivierung nach hnRNP K *knock down*, lässt sich anfangs ein deutlicher Unterschied in der TAK1 Proteinexpression

zwischen den Kontroll- und hnRNP K-siRNA-transfizierten Zellen beobachten, der sich nach 1 h LPS-Stimulation angleicht (siehe Abbildung 3.19). Dies ist ein erster Hinweis darauf, dass die Bindung von hnRNP K an die TAK1 mRNA 3'UTR und die damit verbundene Translationsinhibition eventuell schon nach 30-minütiger LPS-Behandlung aufgehoben ist. Interessanterweise wird die Phosphorylierung von p38, nicht jedoch von ERK durch einen *knock down* von hnRNP K beeinflusst, obwohl beide Kinasen sich nachgelagert von TAK1 im TLR4-Signalweg befinden.

Die Kinase p38 beeinflusst die Expression von Zytokinen durch Aktivierung von Transkriptionsfaktoren aber auch post-transkriptional durch Regulation der Aktivitäten von RBPs [Bode *et al.*, 2012]. So wird z. B. TTP durch MK2 phosphoryliert, nachdem diese durch p38 aktiviert wurde (siehe Kapitel 1.5.1). Die Phosphorylierung von TTP verhindert den Abbau der IL-1 $\beta$  mRNA [Chen *et al.*, 2006] sowie der TNF- $\alpha$  und IL-10 mRNAs durch den Deadenylation-Komplex [Marchese *et al.*, 2010; Tiedje *et al.*, 2010; Clement *et al.*, 2011] und aktiviert zudem die Translation der TNF- $\alpha$  mRNA [Tiedje *et al.*, 2012]. In RAW 264.7-Zellen konnte nach Reduzierung der hnRNP K-Expression eine erhöhte Expression der mRNAs von TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  und IL-10 detektiert werden (siehe Abbildung 3.20). Zudem konnte für TNF- $\alpha$  auch eine gesteigerte Proteinsynthese und Sekretion beobachtet werden (siehe Abbildung 3.21). Eine Reduktion von hnRNP K führt in Makrophagen zu einer erhöhten Expression von TAK1, einer früheren Aktivierung des p38-Signalwegs und einer vermehrten Produktion von Zytokinen. Zu welchen Teilen die beobachteten Expressionsänderungen durch transkriptionale oder post-transkriptionale Mechanismen bedingt sind, lässt sich mit der vorliegenden begrenzten Datenlage schwer abschätzen. Weitere Experimente sind notwendig, um die Beteiligung von MK2, JNK oder IKK und NF- $\kappa$ B zu untersuchen (siehe auch Ausblick, Kapitel 4.1.5).

In den Microarray-Analysen und der qPCR-Validierung wurde die TAK1 mRNA nach 6 h LPS-Behandlung nicht mehr von hnRNP K gebunden. Mittels Dichtegradientenzentrifugation konnte außerdem gezeigt werden, dass die Translation der TAK1 mRNA nach 6-stündiger LPS-Stimulation nicht mehr durch einen *knock down* von hnRNP K beeinflusst wird (siehe Abbildung 3.25 A). Da beide Experimente nur den Zustand nach 6 h LPS-Aktivierung abbilden, kann noch keine Aussage über den Zeitpunkt der Dissoziation der TAK1 mRNA von hnRNP K getroffen werden. Hierfür müssten Dichtegradientenzentrifugationsexperimente nach kürzeren Zeitpunkten der Aktivierung durchgeführt werden. So könnte man beispielsweise überprüfen, ob die Regulation im Bereich von 20 bis 30 min stattfindet (siehe oben). In diesem Fall sollte die Verteilung der TAK1 mRNA nach 20 min der von unbehandelten Zellen ähneln, und die nach 30 min der von aktivierten Zellen nach 6-stündiger LPS-Stimulation.

Es ist möglich, dass eine basale Expression an TAK1 Protein notwendig ist, um nach Pathogenkontakt den TLR4-Signalweg schnell zu aktivieren. Im Verlauf der LPS-

Antwort wird die translationale Inhibierung der TAK1 mRNA durch hnRNP K aufgehoben. Eine daraus resultierende weitere Steigerung des TAK1 Proteinlevels könnte die Aktivierung des TLR4-Signalwegs und damit die Immunantwort weiter verstärken.

#### 4.1.2 Die Translationskontrolle der AKT2 mRNA durch hnRNP K

In UV *crosslink*-Experimenten konnte eine Interaktion von hnRNP K mit beiden Fragmenten des AKT2 mRNA 3'UTRs nachgewiesen werden, die auch über die KH-Domäne 3 vermittelt wurde (siehe Abbildung 3.27). Nach Reduzierung der hnRNP K-Expression waren die Abundanz und die Stabilität der AKT2 mRNA nicht beeinträchtigt (siehe Abbildung 3.28). Die Reduzierung von hnRNP K in RAW 264.7-Zellen hatte auch eine reduzierte AKT2 mRNA-Translation zur Folge. Die unterschiedliche Verteilung der endogenen AKT2 mRNA in Kontroll- und hnRNP K-siRNA-transfizierten Zellen war jedoch schwächer ausgeprägt als bei der TAK1 mRNA (vergleiche Abbildung 3.29 mit Abbildung 3.17). Nach hnRNP K *knock down* konnte eine Reduktion der AKT2 mRNA in den Polysomen von 85% auf 69% beobachtet werden, ganz ähnlich verhielt es sich nach 6 h LPS-Stimulation (siehe Abbildung 3.30). HnRNP K bindet also die AKT2 mRNA sowohl in unbehandelten Zellen als auch nach deren Stimulation, und aktiviert dabei die AKT2-Translation.

In der Literatur werden einige Beispiele beschrieben, dass hnRNP K auch als Aktivator der Translation agieren kann. So bindet hnRNP K zusammen mit hnRNP E1 und E2 an die *c-MYC internal ribosome entry site* (IRES) und stimuliert dadurch die *cap*-unabhängige Translation der *c-MYC* mRNA [Evans *et al.*, 2003]. Die in der vorliegenden Arbeit beobachtete Aktivierung der AKT2 mRNA-Translation ist jedoch abhängig von der Bindung von hnRNP K an die 3'UTR von AKT2, da sie nur mit einem Primerpaar detektierbar war, das die vollständige 3'UTR erkennt.

Nagano und Kollegen untersuchten die Funktion von hnRNP K in Fibroblasten. Die Behandlung mit dem *platelet derived growth factor* (PDGF) führt zu Veränderungen der Zellmorphologie und zu erhöhter Zellmotilität. Es wurde gezeigt, dass hnRNP K an die mRNA der Ubiquitinligase *myosin regulatory light-chain-interacting protein* (MIR) bindet nachdem die Zellen mit PDGF stimuliert wurden. Diese Interaktion wird durch den Einsatz eines Inhibitors gegen die Kinasen der Src-Familie verhindert und hnRNP K wird PDGF-abhängig phosphoryliert. Weiterhin wurde eine Src-abhängige translationale Aktivierung von MIR festgestellt, die zur Ubiquitinierung und zum Abbau einer Myosin-Untereinheit und damit zu den morphologischen Veränderungen führt [Nagano *et al.*, 2006]. Dabei bleibt offen, ob hnRNP K direkt mit der RNA interagiert und wie das Protein an der translationalen Aktivierung beteiligt sein könnte.

Eine weitere Arbeit befasst sich mit der Rolle von hnRNP K in der Angiotensin II-vermittelten Induktion von VEGF. In murinen Nierentubulus-Zellen stimuliert Angio-

tensin II die Bindung von hnRNP K an die VEGF mRNA, was zu einer vermehrten Translation von VEGF führt. Dabei scheint die Rekrutierung von hnRNP K abhängig von einer Phosphorylierung am Serin 302 zu sein, welche durch c-Src und die Proteinkinase C  $\delta$  vermittelt wird [Feliars *et al.*, 2007]. Allerdings wurde auch hier keine direkte Interaktion von hnRNP K mit der VEGF mRNA gezeigt. Eine Bindung von hnRNP K an die VEGF mRNA konnte jedoch in Extrakten einer Brustkrebs-Zelllinie beobachtet und eine direkte Interaktion mit der 3'UTR der VEGF mRNA *in vitro* nachgewiesen werden [de Vries *et al.*, 2013].

Es ist unwahrscheinlich, dass ein Protein alleine eine Aktivierung der Translation einer gebundenen mRNA bewirken kann. Dies geschieht indirekt, z. B. durch die Verdrängung eines Repressors oder den Verlust der Bindungsaktivität zur RNA bzw. zu einem Kofaktor [Jackson *et al.*, 2010]. Die Bindung von hnRNP K an die AKT2 mRNA könnte also beispielsweise die Assoziation eines anderen Proteins verhindern, welches sonst zu einer translationalen Inhibierung führen würde.

### 4.1.3 Zur Phosphorylierung von hnRNP K

Im Verlauf der erythroiden Reifung wird durch die Phosphorylierung von hnRNP K am Tyrosin 458 in der KH-Domäne 3 die Bindung an das DICE in der r15-LOX mRNA 3'UTR aufgehoben [Ostareck-Lederer *et al.*, 2002; Messias *et al.*, 2006]. Diese Phosphorylierung wird durch c-Src katalysiert, wofür die Aktivierung der Kinase durch direkte Interaktion mit hnRNP K notwendig ist [Ostareck-Lederer *et al.*, 2002]. Die Dissoziation von hnRNP K und hnRNP E1 vom DICE ermöglicht nun die Translation der r15-LOX mRNA. HnRNP K bindet außerdem die c-Src mRNA und inhibiert dadurch deren Translation [Naarmann *et al.*, 2008]. Auch hier kommt es im Verlauf der erythroiden Reifung zur Dissoziation von hnRNP K und der Translation der mRNA, wobei der genaue Mechanismus noch nicht vollständig aufgeklärt ist.

Es wird vermutet, dass die in Makrophagen beobachtete translationale Inhibierung der TAK1 mRNA ebenso durch eine Phosphorylierung von hnRNP K durch c-Src aufgehoben werden könnte. In RAW 264.7-Zellen konnte eine basale Expression der c-Src mRNA und des Proteins nachgewiesen werden (siehe Abbildung 3.22). Eine Expression des c-Src Proteins in unbehandelten Makrophagen wurde schon früher in RAW 264.7-Zellen [Kang *et al.*, 2006] und in humanen *peripheral blood mononuclear cells* (PBMC) [Smolinska *et al.*, 2008] gezeigt. Nach 30-minütiger LPS-Behandlung war in RAW 264.7-Zellen ein Anstieg des c-Src Proteinlevels detektierbar, das nach 4 h ein Maximum erreichte (siehe Abbildung 3.22 B). In den ersten vier Stunden der LPS-Antwort in Makrophagen kommt es zu einer Interaktion zwischen hnRNP K und der Kinase c-Src (siehe Abbildung 3.23). Um eine Aussage über den genauen zeitlichen Verlauf treffen zu können, sind weitere Experimente zu früheren Zeitpunkten der LPS-

Aktivierung nötig, z. B. im Bereich der ersten Stunde. Eine Tyrosin-Phosphorylierung von hnRNP K ist bereits in unbehandelten Makrophagen detektierbar, wird aber im Verlauf der LPS-Stimulation verstärkt (siehe Abbildung 3.23). Neben dem Tyrosin 458 enthält hnRNP K noch weitere 16 Tyrosine und der verwendete Antikörper ist nicht in der Lage zwischen ihnen zu unterscheiden. Es lässt sich also nicht mit Sicherheit sagen, dass die beobachtete Zunahme allein auf einen Anstieg der Phosphorylierung von Tyrosin 458 zurückzuführen ist. Neben weiteren Experimenten zu früheren Zeitpunkten wäre hier ein spezifischer Nachweis der Tyrosin 458-Phosphorylierung notwendig. Dafür käme z. B. eine massenspektrometrische Analyse in Frage.

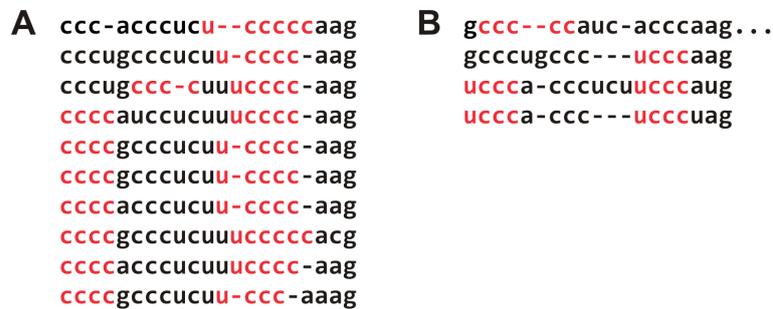
Die Familie der Src-Kinasen scheint essentiell für eine funktionale Immunantwort zu sein. Nach Vorbehandlung mit PP2, einem Inhibitor der Src-Kinasen, war die LPS-induzierte Produktion von COX-2 und TNF- $\alpha$  in RAW 264.7-Zellen und in peritonealen Makrophagen stark eingeschränkt [Leu *et al.*, 2006]. In humanen PBMC konnte dies auch für die TNF- $\alpha$  und IL-10 mRNAs gezeigt werden [Smolinska *et al.*, 2008]. Durch Stimulation einer humanen Glioblastom-Zelllinie mit IL-1 $\beta$  kommt es innerhalb von 30 min zu einem Anstieg der c-Src-Aktivität [Funakoshi-Tago *et al.*, 2003]. In mehreren Arbeiten wird eine Assoziation von c-Src mit TRAF6 demonstriert [Liu *et al.*, 2012; Funakoshi-Tago *et al.*, 2003; Wang *et al.*, 2006]. In LPS-stimulierten humanen Lungen-Endothel-Zellen wurde zudem beobachtet, dass TRAF6 c-Src polyubiquitiniert und c-Src TRAF6 phosphoryliert [Liu *et al.*, 2012]. Diese Studien zeigen, dass eine Dissoziation von hnRNP K von der TAK1 mRNA tatsächlich durch eine c-Src-abhängige Phosphorylierung ausgelöst werden könnte.

Dieser Mechanismus wurde auch bei anderen Proteinen, die KH-Domänen enthalten, nachgewiesen. Die Bindung von ZBP1 an die  $\beta$ -Aktin mRNA und deren translationale Inhibition wird durch die KH-Domänen 3 und 4 in ZBP1 vermittelt [Farina *et al.*, 2003; Huttelmaier *et al.*, 2005]. Die Bindung wird durch c-Src-katalysierte Phosphorylierung eines Tyrosins in der Nähe der KH-Domäne 3 von ZBP1 aufgehoben [Huttelmaier *et al.*, 2005].

Auch eine andere Tyrosinkinase könnte für die Phosphorylierung von hnRNP K verantwortlich sein. In primären Mastzellen wird die Kinase Lyn, welche auch zur Familie der Src-Kinasen gehört, bereits 5 min nach LPS-Stimulation aktiviert [Avila *et al.*, 2012]. Weiterhin ist die Aktivierung der MAP-Kinasen und des NF- $\kappa$ B-Signalwegs in Lyn<sup>-/-</sup> Mastzellen gestört und die TNF- $\alpha$ -Sekretion ist reduziert [Avila *et al.*, 2012]. Eine Interaktion von hnRNP K mit der isolierten SH3-Domäne von Lyn konnte bereits *in vitro* demonstriert werden [Weng *et al.*, 1994] und eine schwache Interaktion von hnRNP K mit Wildtyp-Lyn konnte in Extrakten von transfizierten HeLa-Zellen nachgewiesen werden [Adolph *et al.*, 2007].

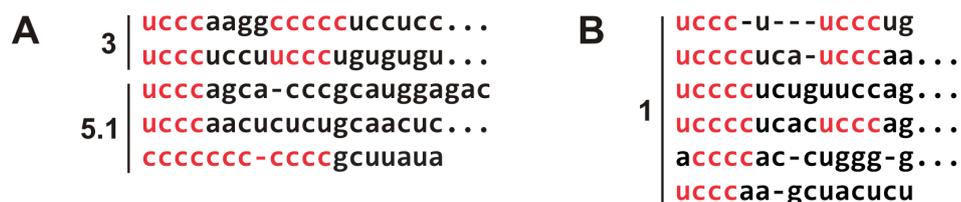
#### 4.1.4 Zum Mechanismus der mRNA-Translationskontrolle

Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass hnRNP K an die 3'UTR der TAK1 mRNA bindet und somit dessen Translation inhibiert (siehe Kapitel 4.1.1). Außerdem wurde eine Assoziation von hnRNP K an die 3'UTR von AKT2 demonstriert, die zu einer translationalen Aktivierung führte (siehe Kapitel 4.1.2). Im Kapitel 1.6.1 wurde bereits auf die Sequenzspezifität der KH-Domäne 3 von hnRNP K eingegangen. Backe und Kollegen konnten zeigen, dass die KH-Domäne 3 spezifisch an Tetranukleotide der Sequenz U/CCCC bindet [Backe *et al.*, 2005]. In der 3'UTR der r15-LOX mRNA des Kaninchens sind zehn Wiederholungen eines Motivs vorhanden, welches ein bis zwei dieser Tetranukleotid-Sequenzen enthält (Abbildung 4.1 A). In der 3'UTR der humanen r15-LOX befinden sich vier Wiederholungen dieses Motivs (Abbildung 4.1 B).



**Abbildung 4.1: U/CCCC-Motive des DICE in der r15-LOX mRNA 3'UTR des Kaninchens (A) und des Menschen (B).** Teile der 3'UTRs der Kaninchen r15-LOX mRNA [Fleming *et al.*, 1989] und der humanen r15-LOX mRNA [Sigal *et al.*, 1988] und die darin enthaltenen hnRNP K-Bindungsmotive [Backe *et al.*, 2005] sind dargestellt.

Auch im Falle der TAK1 und AKT2 mRNAs wurde die Bindung von hnRNP K über dessen KH-Domäne 3 vermittelt (siehe Abbildungen 3.11 und 3.27). Da die Bindungsstelle von hnRNP K in der 3'UTR beider mRNAs eingegrenzt werden konnte, wurden die darin lokalisierten Motive genauer betrachtet. Die Bindung von hnRNP K an die TAK1 mRNA konnte auf die 3'UTR-Fragmente 3 und 5.1 eingegrenzt werden (siehe Abbildung 3.10). Hier sind insgesamt fünf Wiederholungen des U/CCCC-Motivs enthalten (Abbildung 4.2 A), zwei im TAK1 3'UTR-Fragment 3 und drei im Fragment 5.1. Im AKT2 3'UTR-Fragment 1, welches stärker von hnRNP K gebunden wird als Fragment 2, befinden sich insgesamt sechs Wiederholungen des Sequenzmotivs (Abbildung 4.2 B).



**Abbildung 4.2: U/CCCC-Motive in der TAK1 (A) und AKT2 (B) mRNA 3'UTR.**

Sowohl im DICE der r15-LOX mRNA des Kaninchens als auch des Menschen ist eine Konservierung der die Tetranukleotide umgebenden Sequenzen erkennbar, was bei den Sequenzen der TAK1 und AKT2 3'UTRs nur bedingt der Fall ist (vergleiche Abbildungen 4.1 und 4.2). Um zu bestimmen, ob eine Interaktion von hnRNP K mit diesen U/CCCC-Motiven stattfindet, sollte die Länge der 3'UTR-Fragmente weiter eingegrenzt und in UV *crosslink*-Experimenten eine Assoziation von hnRNP K bzw. KH3 untersucht werden. Durch Mutation einzelner Nukleotide könnte die Spezifität der Sequenzen noch weiter eingegrenzt werden.

In unbehandelten Makrophagen bindet hnRNP K an mindestens zwölf mRNAs und nach 6-stündiger LPS-Stimulation ist die Interaktion mit einigen dieser mRNAs aufgehoben (siehe Abbildung 3.8). Die funktionale Konsequenz der Interaktion wurde im Rahmen dieser Arbeit für zwei mRNAs näher untersucht. Dabei wurde eine translationale Inhibierung der TAK1 mRNA festgestellt, die im Verlauf der Makrophagenaktivierung aufgehoben wird. Es wurde außerdem gezeigt, dass die Aufhebung der Interaktion zwischen hnRNP K und der TAK1 mRNA die Folge einer Tyrosin-Phosphorylierung von hnRNP K sein könnte (siehe Kapitel 4.1.3). Die Interaktion von hnRNP K mit der AKT2 mRNA ändert sich im Verlauf der Aktivierung nur geringfügig.

Es ist denkbar, dass die Funktion von hnRNP K jeweils durch unterschiedliche Kofaktoren beeinflusst wird. So ist beispielsweise im Fall der Inhibierung der r15-LOX mRNA auch hnRNP E1 unbedingt notwendig, da nur ein gleichzeitiger *knock down* beider Proteine die Translation der r15-LOX wiederherstellen kann [Naarmann *et al.*, 2008]. Die translationale Inhibierung der c-Src mRNA hingegen ist nur von hnRNP K und nicht von hnRNP E1 abhängig [Naarmann *et al.*, 2008]. An der translationalen Inhibierung von r15-LOX ist zudem die DEAD *box helicase* 6 (DDX6) beteiligt, indem sie die Lokalisierung der mRNA in RNP-*granules* vermittelt, von denen die großen ribosomalen Untereinheiten ausgeschlossen werden [Naarmann *et al.*, 2010]. In THP-1-Monozyten wird die Bildung von *processing bodies* (P-*bodies*) durch LPS induziert [Pauley *et al.*, 2010]. P-*bodies* sind cytoplasmatische Strukturen, in denen translationale inhibierte mRNPs akkumulieren [Anderson & Kedersha, 2009]. Neben dem mRNA-*decapping enzyme* 1A (DCP1A) ist auch DDX6 ein Bestandteil dieser Strukturen [Cougot *et al.*, 2004]. In Vorexperimenten konnte eine Kopräzipitation von DDX6 mit hnRNP K-mRNPs und eine LPS-abhängige Zunahme der P-*bodies* beobachtet werden [Daten nicht gezeigt].

In Erythroblasten binden sowohl hnRNP K als auch hnRNP E1 an das DICE. Um zu untersuchen, ob hnRNP E1 auch in die Translationskontrolle von TAK1 involviert ist, sollte man zunächst in einem UV *crosslink*-Experiment eine mögliche direkte Interaktion von hnRNP E1 mit den TAK1 3'UTR-Fragmenten überprüfen. Weiterhin sollte der Einfluss eines *knock down* von hnRNP E1 bzw. eines Doppel-*knock down* von hnRNP K und E1 auf die Translation der TAK1 mRNA untersucht werden.

Wie bereits im Kapitel 4.1.2 angedeutet, erfolgt die translationale Aktivierung einer

mRNA beispielsweise durch Verdrängung eines Proteins, welches destabilisierend oder als Translationsinhibitor wirkt. Eine Suche nach AREs in der AKT2 3'UTR mit der Datenbank AREsite [Gruber *et al.*, 2010] ergab keine Treffer. Mit Hilfe der Datenbank Diana Lab [Maragkakis *et al.*, 2009a,b] wurde die 3'UTR nach potentiellen microRNA-Bindungsstellen durchsucht. Hierbei wurde eine mögliche Assoziation der microRNAs 429, 124a, 194 und 761 vorhergesagt. In den Sequenzierdaten der RAW 264.7 miRNA-Bibliotheken (siehe Kapitel 3.6) konnte jedoch nur eine Expression von miR-194 detektiert werden. Die relative Häufigkeit dieser microRNA im Vergleich von 0 h und 6 h LPS-Behandlung veränderte sich nicht [Daten nicht gezeigt]. Die Bindungsstelle der miR-194 im AKT2 3'UTR befindet sich im 3'UTR-Fragment 2, zwischen zwei U/CCCC-Motiven. Es wäre also denkbar, dass hnRNP K durch seine Bindung die Assoziation des miRISC an die AKT2 3'UTR verhindert und so die Translation aktiviert, ähnlich wie es auch für die COX-2 mRNA vermutet wird [Shanmugam *et al.*, 2008].

Arranz und Kollegen konnten zeigen, dass AKT2<sup>-/-</sup>-Makrophagen eine Polarisierung in Richtung des M2-Phänotyps aufweisen [Arranz *et al.*, 2012] (siehe Kapitel 1.3). Möglicherweise sorgt die translationale Aktivierung durch hnRNP K dafür, dass ein gewisses AKT2 Proteinlevel aufrecht erhalten wird, um eine anti-inflammatorische Polarisierung zu verhindern. Die AKT1 mRNA wird ebenfalls in unbehandelten und aktivierten Makrophagen von hnRNP K gebunden (siehe Abbildung 3.8). Erste Ergebnisse zeigten jedoch, dass ein *knock down* von hnRNP K die Verteilung der AKT1 mRNA in Polysomengradienten nicht beeinflusst [Daten nicht gezeigt].

#### 4.1.5 Ausblick

Um die Rolle, die hnRNP K in der Regulation der Immunantwort spielt, detaillierter aufzuklären, sind weitere Experimente notwendig. Von besonderem Interesse ist dabei die Aufhebung der Interaktion zwischen hnRNP K und der TAK1 mRNA 3'UTR. Wie bereits im Kapitel 4.1.1 vorgeschlagen, sollte hierfür die Verteilung der TAK1 mRNA auf Polysomengradienten analysiert werden, die nach kürzeren Aktivierungszeiten gewonnen wurden. So könnte die Relevanz der Aufhebung der Inhibition besser in den zeitlichen Verlauf der Makrophagenaktivierung eingeordnet werden. Weiterhin könnte untersucht werden, ob ähnlich wie p38 auch andere Signalwege von der TAK1-Regulation betroffen sind. So könnte man die Phosphorylierung von IKK $\beta$ , ein direktes Substrat der Kinase TAK1, detektieren. Im Falle einer differentiellen IKK $\beta$ -Phosphorylierung wäre es interessant, sich auch die Kernlokalisierung oder die Aktivierung von NF- $\kappa$ B, beispielsweise in *gel-shift*-Experimenten [Sarkar *et al.*, 2011] anzuschauen. Auch könnte die Beteiligung des JNK-Signalweges durch Analyse dessen Phosphorylierung in Abhängigkeit eines hnRNP K *knock down* analysiert werden. Ebenso könnte man untersuchen ob für die beobachtete Induktion der Zytokin-mRNAs

neben einer Aktivierung von Transkriptionsfaktoren *downstream* von p38 auch posttranskriptionale Prozesse beteiligt sind. Dafür sollte zunächst die Phosphorylierung von MK2 und TTP nach hnRNP K *knock down* untersucht werden.

Weiterhin sollte die mögliche Rolle einer hnRNP K-Phosphorylierung näher untersucht werden. Um herauszufinden, ob eine Phosphorylierung durch c-Src für den Bindungsverlust von hnRNP K an die TAK1 mRNA verantwortlich ist, wäre eine gezielte Inhibierung der Kinase durch einen Inhibitor oder mittels RNAi hilfreich. Der für diesen Zweck oft verwendete Inhibitor PP2 ist jedoch nicht sehr geeignet, da er auch alle anderen Mitglieder der Src-Familie hemmt. Kürzlich gelang es aber einen spezifischeren Inhibitor für c-Src zu entwickeln, der nur minimale *off-target*-Effekte aufweist [Brandvold *et al.*, 2012]. Eine Alternative zur direkten Inhibierung der Kinase-Aktivität von c-Src wäre RNAi gegen die c-Src mRNA. Auch hierfür wurde vor Kurzem eine neue Methode mit drastisch reduzierten *off-target*-Effekten vorgestellt [siTools]. Zur Identifizierung der phosphorylierten (Tyrosin-) Reste könnte hnRNP K jeweils aus unbehandelten, LPS-stimulierten und c-Src-inhibierten Zellen isoliert und im Massenspektrometer analysiert werden. Um letztendlich zu zeigen, ob die Phosphorylierung des Tyrosin 458 ausreichend ist, um die RNA-Bindung von hnRNP K aufzuheben, sollten UV *crosslink*-Experimente mit der Phosphomimetik-Mutante hnRNP K Y458D [Messias *et al.*, 2006] durchgeführt werden.

Längerfristig wäre es nötig, die physiologischen Konsequenzen der Regulation zu untersuchen. Dr. Jana Mossanen hat bereits begonnen einige der Experimente in primären Maus-Makrophagen nachzuvollziehen [Liepelt *et al.*, 2014]. Ein nächster Schritt wäre beispielsweise der in ein Maus-Modell. Ein myeloid-spezifischer *knock out* von hnRNP K könnte Hinweise auf eine Immunregulation liefern.

## 4.2 Das regulatorische RNA-Protein-Netzwerk

Um die komplexe Organisation und die dynamischen Interaktionen von mRNPs in aktivierten Makrophagen besser zu verstehen, ist die Identifizierung aller RBPs der erste Schritt. Eine mRNA trägt typischerweise mehrere *cis*-Elemente, die von unterschiedlichen RBPs gebunden und reguliert werden können. Die Kombination all dieser Interaktionen bestimmt das Schicksal der mRNA. Es genügt also nicht, nur die Gesamtheit der RBPs in der Zelle zu betrachten, gleichzeitig muss eine *in vivo*-Analyse aller assoziierten RBPs einer spezifischen mRNA durchgeführt werden. Nicht selten reguliert ein RBP eine Gruppe von mRNAs, die für funktional verwandte Proteine kodieren, wie beispielsweise im Fall des GAIT-Komplexes [Mukhopadhyay *et al.*, 2009]. Mehr noch wurde kürzlich die Existenz von post-transkriptionalen regulatorischen Netzwerken zwischen RNA, Enzymen und ihren Metaboliten ('REM') postuliert [Hentze & Preiss, 2010]. Vor Kurzem wurden vier Arbeiten publiziert, in denen eine globale Identifizierung aller RBPs eines Zelltyps ('Interaktom') durchgeführt wurde. Zwei davon befassten sich mit den humanen Zelllinien HeLa [Castello *et al.*, 2012] und HEK293 [Baltz *et al.*, 2012], eine mit murinen embryonalen Stammzellen [Kwon *et al.*, 2013] und eine mit *Saccharomyces cerevisiae* [Mitchell *et al.*, 2013]. Im Rahmen dieser Arbeit wurde das Maus-Makrophagen-Interaktom aus RAW 264.7-Zellen identifiziert.

### 4.2.1 Zur RBP-Anreicherung

Ein kritischer Punkt für die erfolgreiche Identifizierung eines Interaktoms ist die spezifische Anreicherung polyadenylierter RNA. In dieser Arbeit wurde dies mit Hilfe von *spike in*-Kontrollen verifiziert, die vor der Anreicherung in das Lysat gegeben wurden. Diese wurden nach der Isolierung mittels qPCR und *deep sequencing* detektiert und eine scheinbare Anreicherung der polyadenylierten gegenüber der nicht-polyadenylierten *spike in*-Kontrolle berechnet. In den Proben nach UV *crosslink* (+ CL) wurde mit beiden Methoden eine 4- bis 6-fache Anreicherung detektiert (siehe Abbildung 3.32; Sequenzierergebnisse nicht gezeigt). Aus der Abbildung 3.32 geht weiterhin hervor, dass in den Proben nach UV *crosslink* mehr polyadenylierte mRNA angereichert werden konnte als in den unbestrahlten Proben. Eine befriedigende Erklärung für dieses Phänomen konnte bisher noch nicht gefunden werden. Eine zusätzliche Analyse des Überstandes, also der RNA, die nicht mittels oligo(dT) präzipitiert wurde, könnte bei der Klärung hilfreich sein.

### 4.2.2 Die neu identifizierten RBPs

Für 94 der 402 Proteine des RAW 264.7-Interaktoms wurde bislang noch keine Funktion im Zusammenhang mit der Bindung von RNA oder DNA beschrieben (siehe Ab-

bildung 3.37 A). Wie bereits erwähnt, ist ein Zusammenspiel der RNA-Bindung und der enzymatischen Aktivität eines Proteins denkbar [Hentze & Preiss, 2010]. Unter den neu identifizierten RBPs des RAW 264.7 mRNA-Interaktoms befinden sich einige RBPs mit enzymatischer Aktivität. Castello und Kollegen identifizierten in ihrer Studie 17 Enzyme des intermediären Metabolismus, von drei zudem experimentell validiert wurden [Castello *et al.*, 2012].

### 4.2.3 Die Makrophagen-spezifischen RBPs

Durch Vergleich mit den Interaktomen aus HeLa [Castello *et al.*, 2012], HEK293 [Baltz *et al.*, 2012] und mESC [Kwon *et al.*, 2013] konnten 32 RBPs identifiziert werden, die nur im RAW 264.7-Interaktom vorhanden sind (siehe Abbildung 3.39).

Für 19 der 32 RAW 264.7-spezifischen RBPs wurde bislang noch keine Funktion im Zusammenhang mit der Bindung von Nukleinsäuren beschrieben. Auffällig ist der relativ hohe Anteil neu identifizierter RBPs von 59% *versus* 24% im Gesamt-Interaktom (vergleiche Abbildungen 3.40 A und 3.37 A). Dies spiegelt wahrscheinlich wider, dass weniger Arbeiten zu murinen als zu humanen Zelllinien publiziert sind.

Ein RAW 264.7-spezifischer Kandidat, der auch ein interessantes neues RNA-bindendes Protein darstellt, ist die Prostaglandin E Synthase 3 (PTGES3). Hierbei handelt es sich um eine Glutathion-abhängige Prostaglandin E<sub>2</sub>-Synthase [Tanioka *et al.*, 2000]. PTGES3, oder p23, wurde zuerst als Komponente des Steroid Rezeptor-Komplexes, welcher auch das Hitzeschockprotein Hsp90 enthält, identifiziert [Johnson & Toft, 1994]. Eine Funktion von p23 als Kofaktor des Hsp90-Chaperonewegs ist mittlerweile anerkannt. So soll p23 die ATP-abhängige Bindung von Hsp90 an Ziel-Proteine erleichtern [Felts & Toft, 2003].

### 4.2.4 Regulation der RNA-Bindung durch Phosphorylierung

Wie bereits im Kapitel 4.1.3 diskutiert, wird über die Phosphorylierung von Proteinen ihre RNA-Bindungsaktivität reguliert. Dies wurde beispielsweise für Tyrosine innerhalb oder in der Nähe der KH-Domänen von hnRNP K und ZBP1 gezeigt [Ostareck-Lederer *et al.*, 2002; Messias *et al.*, 2006; Huttelmaier *et al.*, 2005]. *KH-type splicing regulatory protein* (KSRP) wird während der Differenzierung von Muskelzellen durch p38 phosphoryliert, was zum Bindungsverlust an AREs und zur Stabilisierung der mRNAs führt [Briata *et al.*, 2005]. Die Bindung von hnRNP E1 und eEF1A1 an ein strukturiertes Motiv in der 3'UTR von mRNAs inhibiert deren Translation [Hussey *et al.*, 2011] (siehe Kapitel 1.4.1). *Transforming growth factor* (TGF)- $\beta$ -induzierte Phosphorylierung von hnRNP E1 durch AKT2 führt zur Dissoziation von hnRNP E1 von seiner Ziel-mRNA und zur Aufhebung der translationalen Repression [Chaudhury *et al.*, 2010]. Für das ARE-bindende Protein HuR sind sogar mehrere Mechanismen bekannt.

Phosphorylierung durch die Janus Kinase 3 verhindert die Lokalisierung von HuR in *stress granules* und reduziert die Interaktion mit seinen Ziel-mRNAs, was deren Destabilisierung zur Folge hat [Yoon *et al.*, 2013]. Phosphorylierung von HuR durch die Proteinkinase C- $\delta$  hingegen fördert die Assoziation an AREs und stabilisiert das Transkript [Doller *et al.*, 2010].

Zusammenfassend kann also festgestellt werden, dass die Phosphorylierung eines Proteins seine Eigenschaft der RNA-Bindung und damit seine Funktion als post-transkriptionaler Regulator beeinflussen kann. Während der Makrophagenaktivierung könnte die Phosphorylierung von RBPs zur Kontrolle der Genexpression beitragen. Kürzlich wurden die dynamischen Veränderungen der Proteinphosphorylierung in primären murinen Makrophagen nach LPS-Aktivierung untersucht [Weintz *et al.*, 2010]. Für einen Teil der Proteine des RAW 264.7 Interaktoms konnten Weintz und Kollegen in BMDM eine Veränderung der Phosphorylierung feststellen [Weintz *et al.*, 2010]. Dies liefert einen ersten Ansatzpunkt, diese Proteine auch in RAW 264.7-Zellen auf eine mögliche differentielle Phosphorylierung im Rahmen einer LPS-Aktivierung zu überprüfen (siehe auch Ausblick, Kapitel 4.2.6).

#### 4.2.5 Die differentiell interagierenden RBPs

Es konnten insgesamt nur drei Proteine identifiziert werden, die nach 2-stündiger LPS-Stimulation stärker angereichert wurden als in unbehandelten Makrophagen (siehe Kapitel 3.5.4). Das kann verschiedene Gründe haben. Möglicherweise kommt es nicht zum kompletten Bindungsverlust eines Proteins an RNA, sondern nur zu einem Austausch der RNA-Liganden. Die Dissoziation einer mRNA von einem RBP könnte es dem Protein ermöglichen, direkt mit einer anderen mRNA zu interagieren. Daraus ergibt sich weiterhin die Möglichkeit, dass die Unterschiede zwischen gebundenem RBP und freiem RBP zu gering sein könnten, um mit dieser Methode sicher detektiert zu werden. Dafür spricht, dass nur für drei Proteine kleine korrigierte p-Werte berechnet werden konnten, während die p-Werte für die meisten der anderen Proteine deutlich schlechter waren [Daten nicht gezeigt]. Um sicherere Ergebnisse zu erhalten, sollten mehr als zwei Replikate durchgeführt und die Methode einer Optimierung unterzogen werden, wie z. B. eine Variation der Inkubationstemperatur.

In einer kürzlich veröffentlichten Arbeit von Katrin Eichelbaum und Jeroen Krijgsveld wurde die Induktion von Proteinen nach 2-stündiger LPS-Aktivierung von RAW 264.7-Zellen quantifiziert [Eichelbaum & Krijgsveld, 2014]. Die Änderung der Bindung der drei differentiell interagierenden RBPs an polyadenylierte RNA sowie die LPS-abhängige Induktion der Expression sind in Tabelle 4.2 zusammengefasst.

Für Jun-B und ZFP36 konnte eine verstärkte Expression gezeigt werden [Eichelbaum & Krijgsveld, 2014]. Die beobachtete verstärkte Bindung der beiden RBPs könnte also

	Bindung	Expression
<b>Jun-B</b>	7,83	3,59
<b>RRP12</b>	3,98	0,97
<b>ZFP36</b>	3,14	5,58

**Tabelle 4.2: Unterschiedlich interagierende RNA-bindende Proteine (eigene Daten und [Eichelbaum & Krijgsveld, 2014]).** Die Änderung der Bindung an polyadenylierte RNA sowie die Änderung der Expression der Proteine im Gesamt-Zelllysate nach 2 h LPS-Behandlung sind dargestellt.

eine Folge ihrer erhöhten Abundanz in der Zelle darstellen. Somit verbleibt RRP12 als einziger Kandidat, der nach Aktivierung der Makrophagen eine gesteigerte Interaktion mit polyadenylierter RNA aufweist. RRP12 ist ein Ribosom-Synthesefaktor, der an der Reifung und am Kernexport der großen und der kleinen ribosomalen Untereinheit beteiligt ist [Oeffinger *et al.*, 2004]. Weiterhin wird eine Rolle für RRP12 im Zellzyklus und bei der Reparatur von DNA-Strangbrüchen vermutet [Dosil, 2011]. RRP12 wird in BMDM nicht differentiell phosphoryliert, Jun-B und TTP dagegen schon [Weintz *et al.*, 2010].

#### 4.2.6 Ausblick

Zunächst sollte die RNA-Bindung einiger Proteine des Maus-Makrophagen-Interaktoms validiert werden. Dafür käme zum einen eine Detektion mit spezifischen Antikörpern in der Elution nach oligo(dT)-Anreicherung in Frage. Eine andere Möglichkeit wäre, das Protein nach dem UV *crosslink* spezifisch zu präzipitieren und assoziierte RNA nach radioaktiver Markierung mittels Autoradiographie nachzuweisen. Für eine Validierung wären beispielsweise PTGES3 und RRP12 sowie eine Auswahl der neu identifizierten RBPs aussichtsreiche Kandidaten. Im nächsten Schritt sollten die assoziierten RNA-Populationen der Proteine, deren RNA-Bindung auf diese Weise bestätigt wurde, analysiert werden. Dafür könnte man die *individual nucleotide resolution cross-linking and immunoprecipitation* (iCLIP)-Methode anwenden, welche es ermöglicht, die Proteinbindungsstelle an der RNA auf ein Nukleotid genau zu bestimmen [Konig *et al.*, 2010, 2011; Huppertz *et al.*, 2013]. Alternativ könnten photoaktivierbare Nukleotide in die RNA inkorporiert werden (*photoactivatable ribonucleoside enhanced CLIP*, PAR-CLIP), was die Effizienz des UV *crosslinks* noch steigert [Hafner *et al.*, 2010a,b]. Bei beiden Methoden erfolgt anschließend eine Generierung von cDNA-Bibliotheken der assoziierten RNA-Fragmente, die mittels Hochdurchsatzsequenzierung analysiert werden können. Durch geeignete Datenauswertung könnten beispielsweise RNA-Interaktionsmotive definiert und unterschiedlich gebundene mRNAs bzw. unterschiedlich besetzte Bindungsstellen in Abhängigkeit von der LPS-Behandlung identifiziert werden.

Besonders interessant wäre eine Analyse der RNA-Populationen von Proteinen, die

während der Makrophagenaktivierung differentiell phosphoryliert werden. Für solche Kandidaten-RBPs sollte neben der Validierung ihrer RNA-Bindung auch überprüft werden, ob die differentielle Phosphorylierung auch in RAW 264.7-Zellen präsent ist. Auch könnte untersucht werden, in welcher Proteindomäne die Phosphorylierung stattfindet. Weiterführende Analysen wären neben der Sequenzierung auch funktionale Experimente, um die Relevanz der Modifizierung für die gebundene mRNA zu untersuchen. Neben post-translationalen Modifikationen könnte auch eine Abspaltung der RNA-bindenden Domäne des RBPs [Naarmann-de Vries *et al.*, 2013], Abbau des kompletten Proteins oder Metabolit-induzierte Konformationsänderungen [Hentze & Preiss, 2010] für eine Änderung der RNA-Bindungseigenschaften in Frage kommen.

Eine Analyse der Anreicherung bestimmter Proteindomänen in den neu identifizierten RBPs der vier Interaktome könnte erste Hinweise auf bislang unbekannte RNA-bindende Domänen liefern [Sibley *et al.*, 2012]. RAW 264.7-Proteom-Daten [Eichelbaum & Krijgsveld, 2014] und BMDM-Phosphoproteom-Daten [Weintz *et al.*, 2010] könnten integriert werden, um einen globalen Überblick über die Regulation der Expression und Phosphorylierung einzelner Proteine während der Makrophagenaktivierung zu erhalten. Man könnte sogar die miRNA-Expressionsdaten (siehe Kapitel 3.6) hinzuziehen, um potentielle Regulationen vorhersagen zu können. Um die Besetzung einer spezifischen mRNA mit RBPs zu analysieren, wären zudem *pull down*-Experimente und die Identifizierung der assoziierten Proteine im Massenspektrometer denkbar [Weinlich *et al.*, 2009; Naarmann *et al.*, 2010; de Vries *et al.*, 2013].

# Literaturverzeichnis

- Adhikari, A., Xu, M., & Chen, Z. J. (2007). Ubiquitin-mediated activation of TAK1 and IKK. *Oncogene*, 26(22):3214–26.
- Adolph, D., Flach, N., Mueller, K., Ostareck, D. H., & Ostareck-Lederer, A. (2007). Deciphering the cross talk between hnRNP K and c-Src: the c-Src activation domain in hnRNP K is distinct from a second interaction site. *Mol Cell Biol*, 27(5):1758–70.
- Ajibade, A. A., Wang, H. Y., & Wang, R. F. (2013). Cell type-specific function of TAK1 in innate immune signaling. *Trends Immunol*.
- Ajibade, A. A., Wang, Q., Cui, J., Zou, J., Xia, X., Wang, M., Tong, Y., Hui, W., Liu, D., Su, B., Wang, H. Y., & Wang, R. F. (2012). TAK1 negatively regulates NF-kappaB and p38 MAP kinase activation in Gr-1+CD11b+ neutrophils. *Immunity*, 36(1):43–54.
- Alessi, D. R., James, S. R., Downes, C. P., Holmes, A. B., Gaffney, P. R., Reese, C. B., & Cohen, P. (1997). Characterization of a 3-phosphoinositide-dependent protein kinase which phosphorylates and activates protein kinase Balpha. *Curr Biol*, 7(4):261–9.
- Anderson, P. & Kedersha, N. (2009). RNA granules: post-transcriptional and epigenetic modulators of gene expression. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 10(6):430–6.
- Androulidaki, A., Iliopoulos, D., Arranz, A., Doxaki, C., Schworer, S., Zacharioudaki, V., Margioris, A. N., Tsihchlis, P. N., & Tsatsanis, C. (2009). The kinase Akt1 controls macrophage response to lipopolysaccharide by regulating microRNAs. *Immunity*, 31(2):220–31.
- Arranz, A., Doxaki, C., Vergadi, E., Martinez de la Torre, Y., Vaporidi, K., Lagoudaki, E. D., Ieronymaki, E., Androulidaki, A., Venihaki, M., Margioris, A. N., Stathopoulos, E. N., Tsihchlis, P. N., & Tsatsanis, C. (2012). Akt1 and Akt2 protein kinases differentially contribute to macrophage polarization. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 109(24):9517–22.
- Avila, M., Martinez-Juarez, A., Ibarra-Sanchez, A., & Gonzalez-Espinosa, C. (2012). Lyn kinase controls TLR4-dependent IKK and MAPK activation modulating the activity of TRAF-6/TAK-1 protein complex in mast cells. *Innate Immun*, 18(4):648–60.
- Backe, P. H., Messias, A. C., Ravelli, R. B., Sattler, M., & Cusack, S. (2005). X-ray crystallographic and NMR studies of the third KH domain of hnRNP K in complex with single-stranded nucleic acids. *Structure*, 13(7):1055–67.
- Baltz, A. G., Munschauer, M., Schwanhausser, B., Vasile, A., Murakawa, Y., Schueler, M., Youngs, N., Penfold-Brown, D., Drew, K., Milek, M., Wyler, E., Bonneau, R., Selbach, M., Dieterich, C., & Landthaler, M. (2012). The mRNA-bound proteome

- and its global occupancy profile on protein-coding transcripts. *Mol Cell*, 46(5):674–90.
- Banerjee, A. & Gerondakis, S. (2007). Coordinating TLR-activated signaling pathways in cells of the immune system. *Immunol Cell Biol*, 85(6):420–4.
- Barton, D. J. & Flanagan, J. B. (1993). Coupled translation and replication of poliovirus RNA in vitro: synthesis of functional 3D polymerase and infectious virus. *J Virol*, 67(2):822–31.
- Besse, F. & Ephrussi, A. (2008). Translational control of localized mRNAs: restricting protein synthesis in space and time. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 9(12):971–80.
- Bettermann, K., Vucur, M., Haybaeck, J., Koppe, C., Janssen, J., Heymann, F., Weber, A., Weiskirchen, R., Liedtke, C., Gassler, N., Muller, M., de Vos, R., Wolf, M. J., Boege, Y., Seleznik, G. M., Zeller, N., Erny, D., Fuchs, T., Zoller, S., Cairo, S., Buendia, M. A., Prinz, M., Akira, S., Tacke, F., Heikenwalder, M., Trautwein, C., & Luedde, T. (2010). TAK1 suppresses a NEMO-dependent but NF-kappaB-independent pathway to liver cancer. *Cancer Cell*, 17(5):481–96.
- Bode, J. G., Ehrling, C., & Haussinger, D. (2012). The macrophage response towards LPS and its control through the p38(MAPK)-STAT3 axis. *Cell Signal*, 24(6):1185–94.
- Bone, R. C., Balk, R. A., Cerra, F. B., Dellinger, R. P., Fein, A. M., Knaus, W. A., Schein, R. M., & Sibbald, W. J. (1992). Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. The ACCP/SCCM Consensus Conference Committee. American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine. *Chest*, 101(6):1644–55.
- Boomer, J. S., Green, J. M., & Hotchkiss, R. S. (2014). The changing immune system in sepsis: Is individualized immuno-modulatory therapy the answer? *Virulence*, 5(1).
- Brandvold, K. R., Steffey, M. E., Fox, C. C., & Soellner, M. B. (2012). Development of a highly selective c-Src kinase inhibitor. *ACS Chem Biol*, 7(8):1393–8.
- Braun, J. E., Huntzinger, E., & Izaurralde, E. (2013). The role of GW182 proteins in miRNA-mediated gene silencing. *Adv Exp Med Biol*, 768:147–63.
- Brazma, A., Hingamp, P., Quackenbush, J., Sherlock, G., Spellman, P., Stoeckert, C., Aach, J., Ansorge, W., Ball, C. A., Causton, H. C., Gaasterland, T., Glenisson, P., Holstege, F. C., Kim, I. F., Markowitz, V., Matese, J. C., Parkinson, H., Robinson, A., Sarkans, U., Schulze-Kremer, S., Stewart, J., Taylor, R., Vilo, J., & Vingron, M. (2001). Minimum information about a microarray experiment (MIAME)-toward standards for microarray data. *Nat Genet*, 29(4):365–71.
- Briata, P., Forcales, S. V., Ponassi, M., Corte, G., Chen, C. Y., Karin, M., Puri, P. L., & Gherzi, R. (2005). p38-dependent phosphorylation of the mRNA decay-promoting factor KSRP controls the stability of select myogenic transcripts. *Mol Cell*, 20(6):891–903.
- Brockman, J. M., Singh, P., Liu, D., Quinlan, S., Salisbury, J., & Graber, J. H. (2005). PACdb: PolyA Cleavage Site and 3'-UTR Database. *Bioinformatics*, 21(18):3691–3.

- Brown, K., Park, S., Kanno, T., Franzoso, G., & Siebenlist, U. (1993). Mutual regulation of the transcriptional activator NF-kappa B and its inhibitor, I kappa B-alpha. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 90(6):2532–6.
- Castello, A., Fischer, B., Eichelbaum, K., Horos, R., Beckmann, B. M., Strein, C., Davey, N. E., Humphreys, D. T., Preiss, T., Steinmetz, L. M., Krijgsveld, J., & Hentze, M. W. (2012). Insights into RNA biology from an atlas of mammalian mRNA-binding proteins. *Cell*, 149(6):1393–406.
- Castello, A., Horos, R., Strein, C., Fischer, B., Eichelbaum, K., Steinmetz, L. M., Krijgsveld, J., & Hentze, M. W. (2013). System-wide identification of RNA-binding proteins by interactome capture. *Nat Protoc*, 8(3):491–500.
- Ceci, M., Gaviraghi, C., Gorrini, C., Sala, L. A., Offenhauser, N., Marchisio, P. C., & Biffo, S. (2003). Release of eIF6 (p27BBP) from the 60S subunit allows 80S ribosome assembly. *Nature*, 426(6966):579–84.
- Chaudhury, A., Hussey, G. S., Ray, P. S., Jin, G., Fox, P. L., & Howe, P. H. (2010). TGF-beta-mediated phosphorylation of hnRNP E1 induces EMT via transcript-selective translational induction of Dab2 and ILEI. *Nat Cell Biol*, 12(3):286–93.
- Chen, Y. L., Huang, Y. L., Lin, N. Y., Chen, H. C., Chiu, W. C., & Chang, C. J. (2006). Differential regulation of ARE-mediated TNFalpha and IL-1beta mRNA stability by lipopolysaccharide in RAW264.7 cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 346(1):160–8.
- Cheng, H., Addona, T., Keshishian, H., Dahlstrand, E., Lu, C., Dorsch, M., Li, Z., Wang, A., Ocain, T. D., Li, P., Parsons, T. F., Jaffee, B., & Xu, Y. (2007). Regulation of IRAK-4 kinase activity via autophosphorylation within its activation loop. *Biochem Biophys Res Commun*, 352(3):609–16.
- Clancy, J. L., Wei, G. H., Echner, N., Humphreys, D. T., Beilharz, T. H., & Preiss, T. (2011). mRNA isoform diversity can obscure detection of miRNA-mediated control of translation. *RNA*, 17(6):1025–31.
- Clement, S. L., Scheckel, C., Stoecklin, G., & Lykke-Andersen, J. (2011). Phosphorylation of tristetraprolin by MK2 impairs AU-rich element mRNA decay by preventing deadenylase recruitment. *Mol Cell Biol*, 31(2):256–66.
- Conner, J. R., Smirnova, I., Moseman, A. P., & Poltorak, A. (2010). IRAK1BP1 inhibits inflammation by promoting nuclear translocation of NF-kappaB p50. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107(25):11477–82.
- Conner, J. R., Smirnova, I., & Poltorak, A. (2008). Forward genetic analysis of Toll-like receptor responses in wild-derived mice reveals a novel antiinflammatory role for IRAK1BP1. *J Exp Med*, 205(2):305–14.
- Cougot, N., Babajko, S., & Seraphin, B. (2004). Cytoplasmic foci are sites of mRNA decay in human cells. *J Cell Biol*, 165(1):31–40.
- Covic, M., Hassa, P. O., Saccani, S., Buerki, C., Meier, N. I., Lombardi, C., Imhof, R., Bedford, M. T., Natoli, G., & Hottiger, M. O. (2005). Arginine methyltransferase

- CARM1 is a promoter-specific regulator of NF-kappaB-dependent gene expression. *Embo Journal*, 24(1):85–96.
- Dai, L., Aye Thu, C., Liu, X. Y., Xi, J., & Cheung, P. C. (2012). TAK1, more than just innate immunity. *IUBMB Life*, 64(10):825–34.
- D'Anto, V., Eckhardt, A., Hiller, K. A., Spagnuolo, G., Valletta, R., Ambrosio, L., Schmalz, G., & Schweikl, H. (2009). The influence of Ni(II) on surface antigen expression in murine macrophages. *Biomaterials*, 30(8):1492–501.
- De Santa, F., Totaro, M. G., Prosperini, E., Notarbartolo, S., Testa, G., & Natoli, G. (2007). The histone H3 lysine-27 demethylase Jmjd3 links inflammation to inhibition of polycomb-mediated gene silencing. *Cell*, 130(6):1083–94.
- de Vries, S., Naarmann-de Vries, I. S., Urlaub, H., Lue, H., Bernhagen, J., Ostareck, D. H., & Ostareck-Lederer, A. (2013). Identification of DEAD-box RNA helicase 6 (DDX6) as a cellular modulator of vascular endothelial growth factor expression under hypoxia. *J Biol Chem*, 288(8):5815–27.
- Dejgaard, K. & Leffers, H. (1996). Characterisation of the nucleic-acid-binding activity of KH domains. Different properties of different domains. *Eur J Biochem*, 241(2):425–31.
- Dellinger, R. P., Levy, M. M., Rhodes, A., Annane, D., Gerlach, H., Opal, S. M., Sevransky, J. E., Sprung, C. L., Douglas, I. S., Jaeschke, R., Osborn, T. M., Nunnally, M. E., Townsend, S. R., Reinhart, K., Kleinpell, R. M., Angus, D. C., Deutschman, C. S., Machado, F. R., Rubenfeld, G. D., Webb, S., Beale, R. J., Vincent, J. L., & Moreno, R. (2013). Surviving Sepsis Campaign: international guidelines for management of severe sepsis and septic shock, 2012. *Intensive Care Med*, 39(2):165–228.
- Dixon, D. A., Kaplan, C. D., McIntyre, T. M., Zimmerman, G. A., & Prescott, S. M. (2000). Post-transcriptional control of cyclooxygenase-2 gene expression. The role of the 3'-untranslated region. *J Biol Chem*, 275(16):11750–7.
- Doller, A., Schlepckow, K., Schwalbe, H., Pfeilschifter, J., & Eberhardt, W. (2010). Tandem phosphorylation of serines 221 and 318 by protein kinase Cdelta coordinates mRNA binding and nucleocytoplasmic shuttling of HuR. *Mol Cell Biol*, 30(6):1397–410.
- Dosil, M. (2011). Ribosome synthesis-unrelated functions of the preribosomal factor Rrp12 in cell cycle progression and the DNA damage response. *Mol Cell Biol*, 31(12):2422–38.
- Dzierzak, E. & Philipsen, S. (2013). Erythropoiesis: development and differentiation. *Cold Spring Harb Perspect Med*, 3(4):a011601.
- Eftychi, C., Karagianni, N., Alexiou, M., Apostolaki, M., & Kollias, G. (2012). Myeloid TAK1 [corrected] acts as a negative regulator of the LPS response and mediates resistance to endotoxemia. *PLoS One*, 7(2):e31550.
- Eichelbaum, K. & Krijgsveld, J. (2014). Rapid temporal dynamics of transcription, protein synthesis and secretion during macrophage activation. *Mol Cell Proteomics*.

- Engel, C., Brunkhorst, F. M., Bone, H. G., Brunkhorst, R., Gerlach, H., Grond, S., Gruendling, M., Huhle, G., Jaschinski, U., John, S., Mayer, K., Oppert, M., Olthoff, D., Quintel, M., Ragaller, M., Rossaint, R., Stuber, F., Weiler, N., Welte, T., Bogatsch, H., Hartog, C., Loeffler, M., & Reinhart, K. (2007). Epidemiology of sepsis in Germany: results from a national prospective multicenter study. *Intensive Care Med*, 33(4):606–18.
- Evans, J. R., Mitchell, S. A., Spriggs, K. A., Ostrowski, J., Bomsztyk, K., Ostarek, D., & Willis, A. E. (2003). Members of the poly (rC) binding protein family stimulate the activity of the c-myc internal ribosome entry segment in vitro and in vivo. *Oncogene*, 22(39):8012–20.
- Fabian, M. R. & Sonenberg, N. (2012). The mechanics of miRNA-mediated gene silencing: a look under the hood of miRISC. *Nat Struct Mol Biol*, 19(6):586–93.
- Farina, K. L., Huttelmaier, S., Musunuru, K., Darnell, R., & Singer, R. H. (2003). Two ZBP1 KH domains facilitate beta-actin mRNA localization, granule formation, and cytoskeletal attachment. *J Cell Biol*, 160(1):77–87.
- Feliers, D., Lee, M. J., Ghosh-Choudhury, G., Bomsztyk, K., & Kasinath, B. S. (2007). Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K contributes to angiotensin II stimulation of vascular endothelial growth factor mRNA translation. *Am J Physiol Renal Physiol*, 293(2):F607–15.
- Felts, S. J. & Toft, D. O. (2003). p23, a simple protein with complex activities. *Cell Stress Chaperones*, 8(2):108–13.
- Fleming, J., Thiele, B. J., Chester, J., O’Prey, J., Janetzki, S., Aitken, A., Anton, I. A., Rapoport, S. M., & Harrison, P. R. (1989). The complete sequence of the rabbit erythroid cell-specific 15-lipoxygenase mRNA: comparison of the predicted amino acid sequence of the erythrocyte lipoxygenase with other lipoxygenases. *Gene*, 79(1):181–8.
- Funakoshi-Tago, M., Tago, K., Sonoda, Y., Tominaga, S., & Kasahara, T. (2003). TRAF6 and C-SRC induce synergistic AP-1 activation via PI3-kinase-AKT-JNK pathway. *Eur J Biochem*, 270(6):1257–68.
- Gaestel, M. (2013). What goes up must come down: molecular basis of MAPKAP kinase 2/3-dependent regulation of the inflammatory response and its inhibition. *Biol Chem*, 394(10):1301–15.
- Gaestel, M., Kotlyarov, A., & Kracht, M. (2009). Targeting innate immunity protein kinase signalling in inflammation. *Nat Rev Drug Discov*, 8(6):480–99.
- Gebauer, F. & Hentze, M. W. (2004). Molecular mechanisms of translational control. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 5(10):827–35.
- Gibson, T. J., Thompson, J. D., & Heringa, J. (1993). The KH domain occurs in a diverse set of RNA-binding proteins that include the antiterminator NusA and is probably involved in binding to nucleic acid. *FEBS Lett*, 324(3):361–6.
- Giorgi, F. M., Bolger, A. M., Lohse, M., & Usadel, B. (2010). Algorithm-driven artifacts in median Polish summarization of microarray data. *BMC Bioinformatics*, 11:553.

- Gonzalez, E. & McGraw, T. E. (2009). The Akt kinases: isoform specificity in metabolism and cancer. *Cell Cycle*, 8(16):2502–8.
- Gordon, S. & Martinez, F. O. (2010). Alternative activation of macrophages: mechanism and functions. *Immunity*, 32(5):593–604.
- Gratacos, F. M. & Brewer, G. (2010). The role of AUF1 in regulated mRNA decay. *Wiley Interdiscip Rev RNA*, 1(3):457–73.
- Gruber, A. R., Fallmann, J., Kratochvill, F., Kovarik, P., & Hofacker, I. L. (2010). AREsite: a database for the comprehensive investigation of AU-rich elements. *Nucleic Acids Res*, 39(Database issue):D66–9.
- Habelhah, H., Shah, K., Huang, L., Ostareck-Lederer, A., Burlingame, A. L., Shokat, K. M., Hentze, M. W., & Ronai, Z. (2001). ERK phosphorylation drives cytoplasmic accumulation of hnRNP-K and inhibition of mRNA translation. *Nat Cell Biol*, 3(3):325–30.
- Hadian, K. & Krappmann, D. (2011). Signals from the nucleus: activation of NF-kappaB by cytosolic ATM in the DNA damage response. *Sci Signal*, 4(156):pe2.
- Hafner, M., Landthaler, M., Burger, L., Khorshid, M., Hausser, J., Berninger, P., Rothballer, A., Ascano, M., J., Jungkamp, A. C., Munschauer, M., Ulrich, A., Wardle, G. S., Dewell, S., Zavolan, M., & Tuschl, T. (2010a). Transcriptome-wide identification of RNA-binding protein and microRNA target sites by PAR-CLIP. *Cell*, 141(1):129–41.
- Hafner, M., Landthaler, M., Burger, L., Khorshid, M., Hausser, J., Berninger, P., Rothballer, A., Ascano, M., Jungkamp, A. C., Munschauer, M., Ulrich, A., Wardle, G. S., Dewell, S., Zavolan, M., & Tuschl, T. (2010b). PAR-CLIP—a method to identify transcriptome-wide the binding sites of RNA binding proteins. *J Vis Exp*, (41).
- Hentze, M. W., Muckenthaler, M. U., Galy, B., & Camaschella, C. (2010). Two to tango: regulation of Mammalian iron metabolism. *Cell*, 142(1):24–38.
- Hentze, M. W. & Preiss, T. (2010). The REM phase of gene regulation. *Trends Biochem Sci*, 35(8):423–6.
- Hers, I., Vincent, E. E., & Tavare, J. M. (2011). Akt signalling in health and disease. *Cell Signal*, 23(10):1515–27.
- Hitti, E., Iakovleva, T., Brook, M., Deppenmeier, S., Gruber, A. D., Radzioch, D., Clark, A. R., Blackshear, P. J., Kotlyarov, A., & Gaestel, M. (2006). Mitogen-activated protein kinase-activated protein kinase 2 regulates tumor necrosis factor mRNA stability and translation mainly by altering tristetraprolin expression, stability, and binding to adenine/uridine-rich element. *Mol Cell Biol*, 26(6):2399–407.
- Hohne, M., Thiele, B. J., Prehn, S., Giessmann, E., Nack, B., & Rapoport, S. M. (1988). Activation of translationally inactive lipxygenase mRNP particles from rabbit reticulocytes. *Biomed Biochim Acta*, 47(1):75–8.

- Horman, S. R., Janas, M. M., Litterst, C., Wang, B., MacRae, I. J., Sever, M. J., Morrissey, D. V., Graves, P., Luo, B., Umesalma, S., Qi, H. H., Miraglia, L. J., Novina, C. D., & Orth, A. P. (2013). Akt-mediated phosphorylation of argonaute 2 downregulates cleavage and upregulates translational repression of MicroRNA targets. *Mol Cell*, 50(3):356–67.
- Hotchkiss, R. S., Monneret, G., & Payen, D. (2013). Sepsis-induced immunosuppression: from cellular dysfunctions to immunotherapy. *Nat Rev Immunol*, 13(12):862–74.
- Huang da, W., Sherman, B. T., & Lempicki, R. A. (2009a). Bioinformatics enrichment tools: paths toward the comprehensive functional analysis of large gene lists. *Nucleic Acids Res*, 37(1):1–13.
- Huang da, W., Sherman, B. T., & Lempicki, R. A. (2009b). Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources. *Nat Protoc*, 4(1):44–57.
- Huntzinger, E. & Izaurralde, E. (2011). Gene silencing by microRNAs: contributions of translational repression and mRNA decay. *Nat Rev Genet*, 12(2):99–110.
- Huppertz, I., Attig, J., D’Ambrogio, A., Easton, L. E., Sibley, C. R., Sugimoto, Y., Tadjnik, M., Konig, J., & Ule, J. (2013). iCLIP: Protein-RNA interactions at nucleotide resolution. *Methods*.
- Hussey, G. S., Chaudhury, A., Dawson, A. E., Lindner, D. J., Knudsen, C. R., Wilce, M. C., Merrick, W. C., & Howe, P. H. (2011). Identification of an mRNP complex regulating tumorigenesis at the translational elongation step. *Mol Cell*, 41(4):419–31.
- Huttelmaier, S., Zenklusen, D., Lederer, M., Dichtenberg, J., Lorenz, M., Meng, X., Bassell, G. J., Condeelis, J., & Singer, R. H. (2005). Spatial regulation of beta-actin translation by Src-dependent phosphorylation of ZBP1. *Nature*, 438(7067):512–5.
- Iizuka, N., Najita, L., Franzusoff, A., & Sarnow, P. (1994). Cap-dependent and cap-independent translation by internal initiation of mRNAs in cell extracts prepared from *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol*, 14(11):7322–30.
- Irizarry, R. A., Hobbs, B., Collin, F., Beazer-Barclay, Y. D., Antonellis, K. J., Scherf, U., & Speed, T. P. (2003). Exploration, normalization, and summaries of high density oligonucleotide array probe level data. *Biostatistics*, 4(2):249–64.
- Ivanov, P. & Anderson, P. (2013). Post-transcriptional regulatory networks in immunity. *Immunol Rev*, 253(1):253–72.
- Izaurralde, E. (2012). Elucidating the temporal order of silencing. *EMBO Rep*, 13(8):662–3.
- Jackson, R. J., Hellen, C. U., & Pestova, T. V. (2010). The mechanism of eukaryotic translation initiation and principles of its regulation. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 11(2):113–27.
- Jayne, S., Rothgiesser, K. M., & Hottiger, M. O. (2009). CARM1 but not its enzymatic activity is required for transcriptional coactivation of NF-kappaB-dependent gene expression. *J Mol Biol*, 394(3):485–95.

- Johnson, J. L. & Toft, D. O. (1994). A novel chaperone complex for steroid receptors involving heat shock proteins, immunophilins, and p23. *J Biol Chem*, 269(40):24989–93.
- Jones, D. A., Carlton, D. P., McIntyre, T. M., Zimmerman, G. A., & Prescott, S. M. (1993). Molecular cloning of human prostaglandin endoperoxide synthase type II and demonstration of expression in response to cytokines. *J Biol Chem*, 268(12):9049–54.
- Joung, S. M., Park, Z. Y., Rani, S., Takeuchi, O., Akira, S., & Lee, J. Y. (2011). Akt contributes to activation of the TRIF-dependent signaling pathways of TLRs by interacting with TANK-binding kinase 1. *J Immunol*, 186(1):499–507.
- Kanehisa, M. & Goto, S. (2000). KEGG: kyoto encyclopedia of genes and genomes. *Nucleic Acids Res*, 28(1):27–30.
- Kang, J. L., Jung, H. J., Lee, K., & Kim, H. R. (2006). Src tyrosine kinases mediate crystalline silica-induced NF-kappaB activation through tyrosine phosphorylation of IkkappaB-alpha and p65 NF-kappaB in RAW 264.7 macrophages. *Toxicol Sci*, 90(2):470–7.
- Kawai, T., Takeuchi, O., Fujita, T., Inoue, J., Muhlradt, P. F., Sato, S., Hoshino, K., & Akira, S. (2001). Lipopolysaccharide stimulates the MyD88-independent pathway and results in activation of IFN-regulatory factor 3 and the expression of a subset of lipopolysaccharide-inducible genes. *J Immunol*, 167(10):5887–94.
- Konig, J., Zarnack, K., Rot, G., Curk, T., Kayikci, M., Zupan, B., Turner, D. J., Luscombe, N. M., & Ule, J. (2010). iCLIP reveals the function of hnRNP particles in splicing at individual nucleotide resolution. *Nat Struct Mol Biol*, 17(7):909–15.
- Konig, J., Zarnack, K., Rot, G., Curk, T., Kayikci, M., Zupan, B., Turner, D. J., Luscombe, N. M., & Ule, J. (2011). iCLIP–transcriptome-wide mapping of protein-RNA interactions with individual nucleotide resolution. *J Vis Exp*, (50).
- Kwon, S. C., Yi, H., Eichelbaum, K., Fohr, S., Fischer, B., You, K. T., Castello, A., Krijgsveld, J., Hentze, M. W., & Kim, V. N. (2013). The RNA-binding protein repertoire of embryonic stem cells. *Nat Struct Mol Biol*, 20(9):1122–30.
- Lee, J. S., Nauseef, W. M., Moeenrezakhanlou, A., Sly, L. M., Noubir, S., Leidal, K. G., Schlomann, J. M., Krystal, G., & Reiner, N. E. (2007). Monocyte p110alpha phosphatidylinositol 3-kinase regulates phagocytosis, the phagocyte oxidase, and cytokine production. *J Leukoc Biol*, 81(6):1548–61.
- Leu, T. H., Charoenfuprasert, S., Yen, C. K., Fan, C. W., & Maa, M. C. (2006). Lipopolysaccharide-induced c-Src expression plays a role in nitric oxide and TNFalpha secretion in macrophages. *Mol Immunol*, 43(4):308–16.
- Liao, B., Hu, Y., & Brewer, G. (2007). Competitive binding of AUF1 and TIAR to MYC mRNA controls its translation. *Nat Struct Mol Biol*, 14(6):511–8.
- Liepelt, A., Mossanen, J. C., Denecke, B., Heymann, F., De Santis, R., Tacke, F., Marx, G., Ostareck, D. H., & Ostareck-Lederer, A. (2014). Translation control of TAK1 mRNA by hnRNP K modulates LPS-induced macrophage activation. *RNA*.

- Liu, A., Gong, P., Hyun, S. W., Wang, K. Z., Cates, E. A., Perkins, D., Bannerman, D. D., Puche, A. C., Toshchakov, V. Y., Fang, S., Auron, P. E., Vogel, S. N., & Goldblum, S. E. (2012). TRAF6 protein couples Toll-like receptor 4 signaling to Src family kinase activation and opening of paracellular pathway in human lung microvascular endothelia. *J Biol Chem*, 287(20):16132–45.
- Livak, K. J. & Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*, 25(4):402–8.
- Ma, J., Chen, T., Mandelin, J., Ceponis, A., Miller, N. E., Hukkanen, M., Ma, G. F., & Konttinen, Y. T. (2003). Regulation of macrophage activation. *Cell Mol Life Sci*, 60(11):2334–46.
- Mantovani, A., Allavena, P., Sica, A., & Balkwill, F. (2008). Cancer-related inflammation. *Nature*, 454(7203):436–44.
- Maragkakis, M., Alexiou, P., Papadopoulos, G. L., Reczko, M., Dalamagas, T., Giannopoulos, G., Goumas, G., Koukis, E., Kourtis, K., Simossis, V. A., Sethupathy, P., Vergoulis, T., Koziris, N., Sellis, T., Tsanakas, P., & Hatzigeorgiou, A. G. (2009a). Accurate microRNA target prediction correlates with protein repression levels. *BMC Bioinformatics*, 10:295.
- Maragkakis, M., Reczko, M., Simossis, V. A., Alexiou, P., Papadopoulos, G. L., Dalamagas, T., Giannopoulos, G., Goumas, G., Koukis, E., Kourtis, K., Vergoulis, T., Koziris, N., Sellis, T., Tsanakas, P., & Hatzigeorgiou, A. G. (2009b). DIANA-microT web server: elucidating microRNA functions through target prediction. *Nucleic Acids Res*, 37(Web Server issue):W273–6.
- Marchese, F. P., Aubareda, A., Tudor, C., Saklatvala, J., Clark, A. R., & Dean, J. L. (2010). MAPKAP kinase 2 blocks tristetraprolin-directed mRNA decay by inhibiting CAF1 deadenylase recruitment. *J Biol Chem*, 285(36):27590–600.
- Messias, A. C., Harnisch, C., Ostareck-Lederer, A., Sattler, M., & Ostareck, D. H. (2006). The DICE-binding activity of KH domain 3 of hnRNP K is affected by c-Src-mediated tyrosine phosphorylation. *J Mol Biol*, 361(3):470–81.
- Mi, H., Muruganujan, A., Casagrande, J. T., & Thomas, P. D. (2013). Large-scale gene function analysis with the PANTHER classification system. *Nat Protoc*, 8(8):1551–66.
- Michael, W. M., Choi, M., & Dreyfuss, G. (1995). A nuclear export signal in hnRNP A1: a signal-mediated, temperature-dependent nuclear protein export pathway. *Cell*, 83(3):415–22.
- Michael, W. M., Eder, P. S., & Dreyfuss, G. (1997). The K nuclear shuttling domain: a novel signal for nuclear import and nuclear export in the hnRNP K protein. *EMBO J*, 16(12):3587–98.
- Mitchell, S. F., Jain, S., She, M., & Parker, R. (2013). Global analysis of yeast mRNPs. *Nat Struct Mol Biol*, 20(1):127–33.

- Miyake, K. (2006). Roles for accessory molecules in microbial recognition by Toll-like receptors. *J Endotoxin Res*, 12(4):195–204.
- Morey, J. S., Ryan, J. C., & Van Dolah, F. M. (2006). Microarray validation: factors influencing correlation between oligonucleotide microarrays and real-time PCR. *Biol Proced Online*, 8:175–93.
- Mosser, D. M. & Edwards, J. P. (2008). Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nat Rev Immunol*, 8(12):958–69.
- Mukhopadhyay, R., Jia, J., Arif, A., Ray, P. S., & Fox, P. L. (2009). The GAIT system: a gatekeeper of inflammatory gene expression. *Trends Biochem Sci*, 34(7):324–31.
- Musco, G., Stier, G., Joseph, C., Castiglione Morelli, M. A., Nilges, M., Gibson, T. J., & Pastore, A. (1996). Three-dimensional structure and stability of the KH domain: molecular insights into the fragile X syndrome. *Cell*, 85(2):237–45.
- Naarmann, I. S., Harnisch, C., Flach, N., Kremmer, E., Kuhn, H., Ostareck, D. H., & Ostareck-Lederer, A. (2008). mRNA silencing in human erythroid cell maturation: heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K controls the expression of its regulator c-Src. *J Biol Chem*, 283(26):18461–72.
- Naarmann, I. S., Harnisch, C., Muller-Newen, G., Urlaub, H., Ostareck-Lederer, A., & Ostareck, D. H. (2010). DDX6 recruits translational silenced human reticulocyte 15-lipoxygenase mRNA to RNP granules. *RNA*, 16(11):2189–204.
- Naarmann-de Vries, I. S., Urlaub, H., Ostareck, D. H., & Ostareck-Lederer, A. (2013). Caspase-3 cleaves hnRNP K in erythroid differentiation. *Cell Death Dis*, 4:e548.
- Nagano, K., Bornhauser, B. C., Warnasuriya, G., Entwistle, A., Cramer, R., Lindholm, D., & Naaby-Hansen, S. (2006). PDGF regulates the actin cytoskeleton through hnRNP-K-mediated activation of the ubiquitin E3-ligase MIR. *EMBO J*, 25(9):1871–82.
- Ney, P. A. (2011). Normal and disordered reticulocyte maturation. *Curr Opin Hematol*, 18(3):152–7.
- Nunes, M., Blanc, I., Maes, J., Fellous, M., Robert, B., & McElreavey, K. (2001). NSPc1, a novel mammalian Polycomb gene, is expressed in neural crest-derived structures of the peripheral nervous system. *Mech Dev*, 102(1-2):219–22.
- Obrig, T. G., Culp, W. J., McKeehan, W. L., & Hardesty, B. (1971). The mechanism by which cycloheximide and related glutarimide antibiotics inhibit peptide synthesis on reticulocyte ribosomes. *J Biol Chem*, 246(1):174–81.
- Oda, K. & Kitano, H. (2006). A comprehensive map of the toll-like receptor signaling network. *Mol Syst Biol*, 2:2006 0015.
- Oeffinger, M., Dlakic, M., & Tollervey, D. (2004). A pre-ribosome-associated HEAT-repeat protein is required for export of both ribosomal subunits. *Genes Dev*, 18(2):196–209.

- Ojaniemi, M., Glumoff, V., Harju, K., Liljeroos, M., Vuori, K., & Hallman, M. (2003). Phosphatidylinositol 3-kinase is involved in Toll-like receptor 4-mediated cytokine expression in mouse macrophages. *Eur J Immunol*, 33(3):597–605.
- O'Neill, L. A. (2006). How Toll-like receptors signal: what we know and what we don't know. *Curr Opin Immunol*, 18(1):3–9.
- O'Neill, L. A. & Bowie, A. G. (2007). The family of five: TIR-domain-containing adaptors in Toll-like receptor signalling. *Nat Rev Immunol*, 7(5):353–64.
- Ostareck, D. H., Ostareck-Lederer, A., Shatsky, I. N., & Hentze, M. W. (2001). Lipoxygenase mRNA silencing in erythroid differentiation: The 3'UTR regulatory complex controls 60S ribosomal subunit joining. *Cell*, 104(2):281–90.
- Ostareck, D. H., Ostareck-Lederer, A., Wilm, M., Thiele, B. J., Mann, M., & Hentze, M. W. (1997). mRNA silencing in erythroid differentiation: hnRNP K and hnRNP E1 regulate 15-lipoxygenase translation from the 3' end. *Cell*, 89(4):597–606.
- Ostareck-Lederer, A., Ostareck, D. H., Cans, C., Neubauer, G., Bomsztyk, K., Superti-Furga, G., & Hentze, M. W. (2002). c-Src-mediated phosphorylation of hnRNP K drives translational activation of specifically silenced mRNAs. *Mol Cell Biol*, 22(13):4535–43.
- Ostareck-Lederer, A., Ostareck, D. H., Rucknagel, K. P., Schierhorn, A., Moritz, B., Huttelmaier, S., Flach, N., Handoko, L., & Wahle, E. (2006). Asymmetric arginine dimethylation of heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K by protein-arginine methyltransferase 1 inhibits its interaction with c-Src. *J Biol Chem*, 281(16):11115–25.
- Ostareck-Lederer, A., Ostareck, D. H., Standart, N., & Thiele, B. J. (1994). Translation of 15-lipoxygenase mRNA is inhibited by a protein that binds to a repeated sequence in the 3' untranslated region. *Embo Journal*, 13(6):1476–81.
- Palanisamy, V., Jakymiw, A., Van Tubergen, E. A., D'Silva, N. J., & Kirkwood, K. L. (2012). Control of cytokine mRNA expression by RNA-binding proteins and microRNAs. *J Dent Res*, 91(7):651–8.
- Pall, G. S. & Hamilton, A. J. (2008). Improved northern blot method for enhanced detection of small RNA. *Nat Protoc*, 3(6):1077–84.
- Park, B. S., Song, D. H., Kim, H. M., Choi, B. S., Lee, H., & Lee, J. O. (2009). The structural basis of lipopolysaccharide recognition by the TLR4-MD-2 complex. *Nature*, 458(7242):1191–5.
- Pauley, K. M., Satoh, M., Pauley, B. A., Dominguez-Gutierrez, P. R., Wallet, S. M., Holliday, L. S., Cha, S., Reeves, W. H., & Chan, E. K. (2010). Formation of GW/P bodies as marker for microRNA-mediated regulation of innate immune signaling in THP-1 cells. *Immunol Cell Biol*, 88(2):205–12.
- Paziewska, A., Wyrwicz, L. S., Bujnicki, J. M., Bomsztyk, K., & Ostrowski, J. (2004). Cooperative binding of the hnRNP K three KH domains to mRNA targets. *FEBS Lett*, 577(1-2):134–40.
- Pelham, H. R. (1991). Multiple targets for brefeldin A. *Cell*, 67(3):449–51.

- Pfeffer, S. (2007). Identification of virally encoded microRNAs. *Methods Enzymol*, 427:51–63.
- Ranieri, V. M., Thompson, B. T., Barie, P. S., Dhainaut, J. F., Douglas, I. S., Finfer, S., Gardlund, B., Marshall, J. C., Rhodes, A., Artigas, A., Payen, D., Tenhunen, J., Al-Khalidi, H. R., Thompson, V., Janes, J., Macias, W. L., Vangerow, B., & Williams, M. D. (2012). Drotrecogin alfa (activated) in adults with septic shock. *N Engl J Med*, 366(22):2055–64.
- Rapoport, S. M. & Schewe, T. (1986). The maturational breakdown of mitochondria in reticulocytes. *Biochim Biophys Acta*, 864(3-4):471–95.
- Raschke, W. C., Baird, S., Ralph, P., & Nakoinz, I. (1978). Functional macrophage cell lines transformed by Abelson leukemia virus. *Cell*, 15(1):261–7.
- Ruckdeschel, K., Pfaffinger, G., Haase, R., Sing, A., Weighardt, H., Hacker, G., Holzmann, B., & Heesemann, J. (2004). Signaling of apoptosis through TLRs critically involves toll/IL-1 receptor domain-containing adapter inducing IFN-beta, but not MyD88, in bacteria-infected murine macrophages. *J Immunol*, 173(5):3320–8.
- Ruse, M. & Knaus, U. G. (2006). New players in TLR-mediated innate immunity: PI3K and small Rho GTPases. *Immunol Res*, 34(1):33–48.
- Salh, B., Wagey, R., Marotta, A., Tao, J. S., & Pelech, S. (1998). Activation of phosphatidylinositol 3-kinase, protein kinase B, and p70 S6 kinases in lipopolysaccharide-stimulated Raw 264.7 cells: differential effects of rapamycin, Ly294002, and wortmannin on nitric oxide production. *J Immunol*, 161(12):6947–54.
- Sandberg, R., Neilson, J. R., Sarma, A., Sharp, P. A., & Burge, C. B. (2008). Proliferating cells express mRNAs with shortened 3' untranslated regions and fewer microRNA target sites. *Science*, 320(5883):1643–7.
- Sanduja, S., Blanco, F. F., Young, L. E., Kaza, V., & Dixon, D. A. (2012). The role of tristetrapirolin in cancer and inflammation. *Front Biosci (Landmark Ed)*, 17:174–88.
- Sarbassov, D. D., Guertin, D. A., Ali, S. M., & Sabatini, D. M. (2005). Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex. *Science*, 307(5712):1098–101.
- Sarkar, S., Han, J., Sinsimer, K. S., Liao, B., Foster, R. L., Brewer, G., & Pestka, S. (2011). RNA-binding protein AUF1 regulates lipopolysaccharide-induced IL10 expression by activating I $\kappa$ B kinase complex in monocytes. *Mol Cell Biol*, 31(4):602–15.
- Sato, S., Sanjo, H., Takeda, K., Ninomiya-Tsuji, J., Yamamoto, M., Kawai, T., Matsumoto, K., Takeuchi, O., & Akira, S. (2005). Essential function for the kinase TAK1 in innate and adaptive immune responses. *Nat Immunol*, 6(11):1087–95.
- Schewe, T. (2002). 15-lipoxygenase-1: a prooxidant enzyme. *Biol Chem*, 383(3-4):365–74.
- Schletter, J., Heine, H., Ulmer, A. J., & Rietschel, E. T. (1995). Molecular mechanisms of endotoxin activity. *Arch Microbiol*, 164(6):383–9.

- Schroeder, A., Mueller, O., Stocker, S., Salowsky, R., Leiber, M., Gassmann, M., Lightfoot, S., Menzel, W., Granzow, M., & Ragg, T. (2006). The RIN: an RNA integrity number for assigning integrity values to RNA measurements. *BMC Mol Biol*, 7:3.
- Shanmugam, N., Reddy, M. A., & Natarajan, R. (2008). Distinct roles of heterogeneous nuclear ribonuclear protein K and microRNA-16 in cyclooxygenase-2 RNA stability induced by S100b, a ligand of the receptor for advanced glycation end products. *J Biol Chem*, 283(52):36221–33.
- Shim, J. H., Xiao, C., Paschal, A. E., Bailey, S. T., Rao, P., Hayden, M. S., Lee, K. Y., Bussey, C., Steckel, M., Tanaka, N., Yamada, G., Akira, S., Matsumoto, K., & Ghosh, S. (2005). TAK1, but not TAB1 or TAB2, plays an essential role in multiple signaling pathways in vivo. *Genes Dev*, 19(22):2668–81.
- Shimada, T., Kawai, T., Takeda, K., Matsumoto, M., Inoue, J., Tatsumi, Y., Kanamaru, A., & Akira, S. (1999). IKK-i, a novel lipopolysaccharide-inducible kinase that is related to IkappaB kinases. *Int Immunol*, 11(8):1357–62.
- Sibley, C. R., Attig, J., & Ule, J. (2012). The greatest catch: big game fishing for mRNA-bound proteins. *Genome Biol*, 13(7):163.
- Sica, A. & Mantovani, A. (2012). Macrophage plasticity and polarization: in vivo veritas. *J Clin Invest*, 122(3):787–95.
- Sigal, E., Craik, C. S., Highland, E., Grunberger, D., Costello, L. L., Dixon, R. A., & Nadel, J. A. (1988). Molecular cloning and primary structure of human 15-lipoxygenase. *Biochem Biophys Res Commun*, 157(2):457–64.
- Siomi, H., Matunis, M. J., Michael, W. M., & Dreyfuss, G. (1993). The pre-mRNA binding K protein contains a novel evolutionarily conserved motif. *Nucleic Acids Res*, 21(5):1193–8.
- Smith, W. L., DeWitt, D. L., & Garavito, R. M. (2000). Cyclooxygenases: structural, cellular, and molecular biology. *Annu Rev Biochem*, 69:145–82.
- Smolinska, M. J., Horwood, N. J., Page, T. H., Smallie, T., & Foxwell, B. M. (2008). Chemical inhibition of Src family kinases affects major LPS-activated pathways in primary human macrophages. *Mol Immunol*, 45(4):990–1000.
- Sun, S. C., Ganchi, P. A., Ballard, D. W., & Greene, W. C. (1993). NF-kappa B controls expression of inhibitor I kappa B alpha: evidence for an inducible autoregulatory pathway. *Science*, 259(5103):1912–5.
- Szostak, E. & Gebauer, F. (2013). Translational control by 3'-UTR-binding proteins. *Brief Funct Genomics*, 12(1):58–65.
- Tacke, F. (2009). [Monocyte subpopulations in inflammation processes: principles and perspectives]. *Dtsch Med Wochenschr*, 134(33):1645–8.
- Tacke, F. & Randolph, G. J. (2006). Migratory fate and differentiation of blood monocyte subsets. *Immunobiology*, 211(6-8):609–18.

- Taganov, K. D., Boldin, M. P., Chang, K. J., & Baltimore, D. (2006). NF-kappaB-dependent induction of microRNA miR-146, an inhibitor targeted to signaling proteins of innate immune responses. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103(33):12481–6.
- Tamura, N., Hazeki, K., Okazaki, N., Kametani, Y., Murakami, H., Takaba, Y., Ishikawa, Y., Nigorikawa, K., & Hazeki, O. (2009). Specific role of phosphoinositide 3-kinase p110alpha in the regulation of phagocytosis and pinocytosis in macrophages. *Biochem J*, 423(1):99–108.
- Tanioka, T., Nakatani, Y., Semmyo, N., Murakami, M., & Kudo, I. (2000). Molecular identification of cytosolic prostaglandin E2 synthase that is functionally coupled with cyclooxygenase-1 in immediate prostaglandin E2 biosynthesis. *J Biol Chem*, 275(42):32775–82.
- Tauber, A. I. (2003). Metchnikoff and the phagocytosis theory. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 4(11):897–901.
- Taylor, S. J. & Shalloway, D. (1994). An RNA-binding protein associated with Src through its SH2 and SH3 domains in mitosis. *Nature*, 368(6474):867–71.
- Thisted, T., Lyakhov, D. L., & Liebhaber, S. A. (2001). Optimized RNA targets of two closely related triple KH domain proteins, heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K and alphaCP-2KL, suggest Distinct modes of RNA recognition. *J Biol Chem*, 276(20):17484–96.
- Thomas, P. D., Campbell, M. J., Kejariwal, A., Mi, H., Karlak, B., Daverman, R., Diemer, K., Muruganujan, A., & Narechania, A. (2003). PANTHER: a library of protein families and subfamilies indexed by function. *Genome Res*, 13(9):2129–41.
- Tiedje, C., Kotlyarov, A., & Gaestel, M. (2010). Molecular mechanisms of phosphorylation-regulated TTP (tristetraprolin) action and screening for further TTP-interacting proteins. *Biochem Soc Trans*, 38(6):1632–7.
- Tiedje, C., Ronkina, N., Tehrani, M., Dhamija, S., Laass, K., Holtmann, H., Kotlyarov, A., & Gaestel, M. (2012). The p38/MK2-driven exchange between tristetraprolin and HuR regulates AU-rich element-dependent translation. *PLoS Genet*, 8(9):e1002977.
- Tili, E., Michaille, J. J., Cimino, A., Costinean, S., Dumitru, C. D., Adair, B., Fabbri, M., Alder, H., Liu, C. G., Calin, G. A., & Croce, C. M. (2007). Modulation of miR-155 and miR-125b levels following lipopolysaccharide/TNF-alpha stimulation and their possible roles in regulating the response to endotoxin shock. *J Immunol*, 179(8):5082–9.
- Tomomori-Sato, C., Sato, S., Parmely, T. J., Banks, C. A., Sorokina, I., Florens, L., Zybaylov, B., Washburn, M. P., Brower, C. S., Conaway, R. C., & Conaway, J. W. (2004). A mammalian mediator subunit that shares properties with *Saccharomyces cerevisiae* mediator subunit Cse2. *J Biol Chem*, 279(7):5846–51.
- Valverde, R., Edwards, L., & Regan, L. (2008). Structure and function of KH domains. *FEBS J*, 275(11):2712–26.
- van Essen, D., Engist, B., Natoli, G., & Sacconi, S. (2009). Two modes of transcriptional activation at native promoters by NF-kappaB p65. *PLoS Biol*, 7(3):e73.

- van Kooten, C. & Banchereau, J. (2000). CD40-CD40 ligand. *J Leukoc Biol*, 67(1):2–17.
- Van Seuningen, I., Ostrowski, J., Bustelo, X. R., Sleath, P. R., & Bomsztyk, K. (1995). The K protein domain that recruits the interleukin 1-responsive K protein kinase lies adjacent to a cluster of c-Src and Vav SH3-binding sites. Implications that K protein acts as a docking platform. *J Biol Chem*, 270(45):26976–85.
- Vergadi, E., Vaporidi, K., Theodorakis, E. E., Doxaki, C., Lagoudaki, E., Ieronymaki, E., Alexaki, V. I., Helms, M., Kondili, E., Soennichsen, B., Stathopoulos, E. N., Margioris, A. N., Georgopoulos, D., & Tsatsanis, C. (2013). Akt2 Deficiency Protects from Acute Lung Injury via Alternative Macrophage Activation and miR-146a Induction in Mice. *J Immunol*, 192(1):394–406.
- Wagner, B. J., DeMaria, C. T., Sun, Y., Wilson, G. M., & Brewer, G. (1998). Structure and genomic organization of the human AUF1 gene: alternative pre-mRNA splicing generates four protein isoforms. *Genomics*, 48(2):195–202.
- Wang, K. Z., Wara-Aswapati, N., Boch, J. A., Yoshida, Y., Hu, C. D., Galson, D. L., & Auron, P. E. (2006). TRAF6 activation of PI 3-kinase-dependent cytoskeletal changes is cooperative with Ras and is mediated by an interaction with cytoplasmic Src. *J Cell Sci*, 119(Pt 8):1579–91.
- Weinlich, S., Huttelmaier, S., Schierhorn, A., Behrens, S. E., Ostareck-Lederer, A., & Ostareck, D. H. (2009). IGF2BP1 enhances HCV IRES-mediated translation initiation via the 3'UTR. *RNA*, 15(8):1528–42.
- Weintz, G., Olsen, J. V., Fruhauf, K., Niedzielska, M., Amit, I., Jantsch, J., Mages, J., Frech, C., Dolken, L., Mann, M., & Lang, R. (2010). The phosphoproteome of toll-like receptor-activated macrophages. *Mol Syst Biol*, 6:371.
- Weng, Z., Thomas, S. M., Rickles, R. J., Taylor, J. A., Brauer, A. W., Seidel-Dugan, C., Michael, W. M., Dreyfuss, G., & Brugge, J. S. (1994). Identification of Src, Fyn, and Lyn SH3-binding proteins: implications for a function of SH3 domains. *Mol Cell Biol*, 14(7):4509–21.
- Wu, Z. H., Wong, E. T., Shi, Y., Niu, J., Chen, Z., Miyamoto, S., & Tergaonkar, V. (2010). ATM- and NEMO-dependent ELKS ubiquitination coordinates TAK1-mediated IKK activation in response to genotoxic stress. *Mol Cell*, 40(1):75–86.
- Yanez, A., Goodridge, H. S., Gozalbo, D., & Gil, M. L. (2013). TLRs control hematopoiesis during infection. *Eur J Immunol*, 43(10):2526–33.
- Yoon, J. H., Abdelmohsen, K., Srikantan, S., Guo, R., Yang, X., Martindale, J. L., & Gorospe, M. (2013). Tyrosine phosphorylation of HuR by JAK3 triggers dissociation and degradation of HuR target mRNAs. *Nucleic Acids Res*, 42(2):1196–208.

# Anhang

## Weitere Quellen

AREsite	<a href="http://rna.tbi.univie.ac.at/cgi-bin/AREsite.cgi">http://rna.tbi.univie.ac.at/cgi-bin/AREsite.cgi</a>
DAVID	<a href="http://david.abcc.ncifcrf.gov">http://david.abcc.ncifcrf.gov</a>
Diana Lab	<a href="http://diana.cslab.ece.ntua.gr/microT">http://diana.cslab.ece.ntua.gr/microT</a>
KEGG	<a href="http://www.genome.jp/kegg">http://www.genome.jp/kegg</a>
NCBI Blast	<a href="http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi">http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi</a>
PACdb	<a href="http://harlequin.jax.org/pacdb">http://harlequin.jax.org/pacdb</a>
PANTHER	<a href="http://www.pantherdb.org">http://www.pantherdb.org</a>
siTools	<a href="http://www.sitoolsbiotech.com">http://www.sitoolsbiotech.com</a>

Janeway Immunologie    Kenneth M. Murphy, Paul Travers, Mark Walport (2009).  
Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg

## Abkürzungsverzeichnis

ABD	AGO <i>binding domain</i>
ADP	Adenosindiphosphat
AGO	Argonaute Protein
AKT	<i>thymoma viral proto-oncogene</i>
ALOX5	<i>arachidonate 5-lipoxygenase</i>
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ARDS	<i>acute respiratory distress syndrome</i>
ARE	AU-rich element
ATP	Adenosintriphosphat
AUF1	AU-rich element RNA-binding protein 1
BMDM	<i>bone marrow-derived macrophages</i>
bp	Basenpaare
BSA	bovines Serumalbumin
CARM1	<i>coactivator-associated arginine methyltransferase 1</i>
CAT	Chloramphenicol Acetyltransferase
CD	<i>cluster of differentiation</i>
CL	<i>crosslink</i>
CLP	<i>common lymphocyte progenitor</i>
CMP	<i>common myeloid progenitor</i>
COG7	<i>conserved oligomeric Golgi complex subunit 7</i>
COX-2	Cyclooxygenase-2
cpm	<i>counts per minute</i>
CSF1R	<i>colony stimulating factor 1 receptor</i>
DC	Dendritische Zellen
DCP	mRNA-decapping enzyme
DDX6	DEAD box helicase 6
DICE	<i>differentiation control element</i>
DMEM	<i>Dulbecco's modified eagle medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
(d)NTP	(Desoxy-) Ribonukleosidtriphosphat
DOCK10	<i>dedicator of cytokinesis 10</i>
dT	Desoxyribothymidin
DTT	Dithiothreitol
EDC	1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
eIF	eukaryotischer Initiationsfaktor
ELISA	<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>
EMT	<i>epithelial-mesenchymal transition</i>
ERC1	ELKS/RAB6-interacting/CAST family member 1
eRF	<i>eukaryotic release factor</i>
ERK	<i>extracellular-signal regulated kinase</i>
FACS	<i>fluorescence activated cell sorting</i>
FCER1G	<i>Fc receptor, IgE, high affinity I, gamma polypeptide</i>
FDR	<i>false discovery rate</i>
FKS	fetales Kälberserum
GAIT	<i>gamma-interferon-activated inhibitor of translation</i>
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GDP	Guanosindiphosphat
GM-CSF	<i>granulocyte macrophage colony-stimulating factor</i>
GMP	<i>granulocyte-macrophage progenitor</i>
GO	<i>Gene Ontology</i>
GTP	Guanosintriphosphat
GW182	<i>glycine tryptophan repeat-containing protein of 182 kDa</i>
hnRNP	<i>heterogeneous nuclear ribonucleoprotein</i>
HRP	<i>horseradish peroxidase</i>
Hsp	Hitzeschockprotein

HuR	<i>human antigen R</i>
ICAM2	<i>intercellular adhesion molecule 2</i>
i-CLIP	<i>individual nucleotide resolution crosslinking and immunoprecipitation</i>
IFN	<i>Interferon</i>
IκB	<i>Inhibitor von NF-κB</i>
IKK	<i>IκB Kinase</i>
IL	<i>Interleukin</i>
IP	<i>Immunpräzipitation</i>
IRAK	<i>IL-1 receptor-associated kinase</i>
IRAK1BP1	<i>IRAK1-binding protein 1</i>
IRES	<i>internal ribosome entry site</i>
IRF	<i>interferon regulatory factor</i>
JNK	<i>c-Jun N-terminal kinase</i>
JUN	<i>Jun oncogene</i>
KID	<i>kinase interaction domain</i>
KH	<i>hnRNP K-Homologie-Domäne</i>
KNS	<i>hnRNP K nuclear shuttling domain</i>
KSRP	<i>KH-type splicing regulatory protein</i>
LBP	<i>LPS-binding protein</i>
LiDS	<i>Lithiumdodecylsulfat</i>
LITAF	<i>LPS-induced TN factor</i>
LPS	<i>Lipopolysaccharide</i>
LT-HSC	<i>long-term hematopoietic stem cell</i>
Luc	<i>Luciferase</i>
m <sup>7</sup> G	<i>5' 7-methyl guanosine nucleotide cap</i>
MAPK	<i>mitogen-activated protein kinase</i>
MD-2	<i>lymphocyte antigen 96</i>
MED9	<i>mediator of RNA Polymerase II transcription, subunit 9 homolog (yeast)</i>
MEP	<i>megakaryocyte-erythroid progenitor</i>
mESC	<i>murine embryonale Stammzellen</i>
MIR	<i>myosin regulatory light-chain-interacting protein</i>
miRISC	<i>miRNA-induced silencing complex</i>
miRNA, miR	<i>microRNA</i>
MK2	<i>MAPK-activated protein kinase 2</i>
MKK	<i>mitogen-activated protein kinase kinase</i>
MPP	<i>multipotential progenitor</i>
mTORC2	<i>mammalian target of rapamycin complex 2</i>
MYD88	<i>myeloid differentiation primary response protein 88</i>
MYO10	<i>Myosin X</i>
NDUFV1	<i>nicotinamide adenine dinucleotide dehydrogenase (ubiquinone) flavoprotein 1</i>
NEMO	<i>NF-κB essential modulator</i>
NF-κB	<i>nuclear factor-κB</i>
NK	<i>natural killer</i>
NKRF	<i>NF-kappaB repressing factor</i>
NLS	<i>nuclear localization signal</i>
NMR	<i>nuclear magnetic resonance</i>
nt	<i>Nukleotid(e)</i>
ORF	<i>open reading frame</i>
PABP	<i>Poly(A)-bindendes Protein</i>
PAMP	<i>pathogen-associated molecular pattern</i>
PAN	<i>poly(A) specific ribonuclease subunit</i>
PAR-CLIP	<i>photoactivatable ribonucleoside enhanced CLIP</i>
PARP4	<i>poly (ADP-ribose) polymerase family, member 4</i>
PBMC	<i>peripheral blood mononuclear cells</i>
P-body	<i>processing body</i>
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PCGF	<i>polycomb group ring finger</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>

PDGF	<i>platelet derived growth factor</i>
PDK1	<i>phosphoinositide dependent protein kinase-1</i>
PFA	Paraformaldehyd
P <sub>i</sub>	anorganisches Phosphat
PI3K	Phosphatidylinositol 3-Kinase
PIK3CA	<i>phosphatidylinositol 3-kinase, catalytic, alpha polypeptide</i>
PIP3	Phosphatidylinositol(3,4,5)-trisphosphat
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PNK	Polynukleotidkinase
post-TC	<i>post-termination complex</i>
PRMT1	<i>Protein arginine N-methyltransferase 1</i>
PTGES3	Prostaglandin E Synthase 3
PTGS 2	<i>prostaglandin endoperoxide synthase 2</i>
r15-LOX	retikulozytenspezifische 15-Lipoxygenase
RBP	RNA-bindendes Protein
RIN	RNA <i>Integrity Number</i>
RIP1	<i>receptor-interacting serine-threonine kinase 1</i>
RNAi	RNA-Interferenz
RNP	Ribonukleotidprotein
rpm	<i>revolutions per minute</i>
RT	Reverse Transkriptase oder reverse Transkription
SD	<i>silencing domain</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat
SELEX	Systematische Evolution von Liganden durch exponentielle Anreicherung
SH	Src-Homologie-Domäne
siRNA	<i>small interfering RNA</i>
SIRS	<i>systemic inflammatory response syndrome</i>
snRNA	<i>small nuclear RNA</i>
snoRNA	<i>small nucleolar RNA</i>
ST-HSC	<i>short-term hematopoietic stem cell</i>
TAB	TAK1-bindendes Protein
TAK1	TGF- $\beta$ <i>activated kinase 1</i>
TBK1	TRAF <i>family member-associated NF-<math>\kappa</math>B activator-binding kinase 1</i>
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TGF- $\beta$	<i>transforming growth factor-<math>\beta</math></i>
TIAR	<i>TIA1 cytotoxic granule-associated RNA binding protein-like 1</i>
TIRAP	<i>toll/IL-1 receptor domain-containing adaptor protein</i>
TLR	<i>toll-like receptor</i>
TNF	Tumornekrosefaktor
TPL2	<i>tumor progression locus 2</i>
TRAF6	TNF <i>receptor-associated factor 6</i>
TRAM	TRIF- <i>related adapter molecule</i>
TRIF	<i>toll/IL-1 receptor domain-containing adaptor protein inducing IFN-<math>\beta</math></i>
tRNA <sub>i</sub>	Initiator-tRNA
TRP53BP2	<i>transformation related protein 53 binding protein 2</i>
TTP	Tristetraprolin
U	<i>Unit</i>
UTP	Uridintriphosphat
UTR	untranslatierte Region
UV	ultraviolette Strahlung
v/v	<i>volume per volume</i>
VEGF	<i>vascular endothelial growth factor</i>
w/v	<i>weight per volume</i>
XRN1	5'-3' Exoribonuklease 1
ZBP1	<i>zipcode-bindendes Protein 1</i>

Zur Abkürzung von Nukleotiden und Aminosäuren wurden die Einbuchstabenkodierungen verwendet.

## Inkubationsbedingungen der Antikörper

Antigen	Blocken	Primärantikörper	Sekundärantikörper
$\alpha$ -Tubulin	5% Milch/TBST	1:5000	anti-Maus 1:5000
c-Src	5% Milch/TBST	1:500	anti-Kaninchen 1:5000
eIF6	5% Milch/TBST	1.500	anti-Maus 1:2000
ERK 1/2	5% BSA/TBST	1:1000 in 5% BSA/TBST (über Nacht bei 4°C)	anti-Kaninchen 1:5000
GAPDH	5% Milch/TBST	1:5000	anti-Maus 1:5000
gespaltene/ pro-Caspase-3	5% Milch/TBST	1:200	anti-Maus 1:2000
Histon H3	5% Milch/PBST	1:50.000 in PBST	anti-Kaninchen 1:5000
hnRNP K (Maus)	5% Milch/TBST	1:5000	anti-Maus 1:5000
HuR	5% Milch/TBST	1:200	anti-Maus 1:2000
p38	5% Milch/PBST	1:200 in 5% Milch/PBST (über Nacht bei 4°C)	anti-Kaninchen 1:5000
phospho- ERK 1/2	5% BSA/TBST	1:1000 in 5% BSA/TBST (über Nacht bei 4°C)	anti-Kaninchen 1:5000
phospho-p38	5% BSA/TBS + 0,1% Tween-20	1:2000 in 5% BSA/TBS + 0,1% Tween-20 (über Nacht bei 4°C)	anti-Maus 1:2000 in 5% BSA/TBS + 0,1% Tween-20
phospho-Tyrosin	1% Milch + 1% BSA/TBST	1:1000 in 1% Milch + 1% BSA/TBST	anti-Maus 1:2000 in 1% Milch + 1% BSA/TBST
rpS3	5% Milch/PBST	1:500 in 5% Milch/PBST (über Nacht bei 4°C)	anti-Kaninchen 1:2000 (2 h bei Raumtemperatur)
TAK1	5% BSA/TBST	1:2000 in 5% BSA/TBST (3 h bei Raumtemperatur)	anti-Kaninchen 1:5000
Vinculin	5% Milch/TBST	1:3000	anti-Maus 1:5000

**Tabelle A.1: Verwendete Antikörper für den Western Blot.** Soweit nicht anders vermerkt, wurden die Antikörper 1 h bei Raumtemperatur und in 5% Milch/TBST inkubiert.

Antigen	Primärantikörper	Sekundärantikörper
$\alpha$ -Tubulin	1:800	anti-Maus - Cy5 1:800
hnRNP K (Ratte)	1:20	anti-Ratte - FITC 1:400
TAK1	1:100	anti-Kaninchen - Cy3 1:400

**Tabelle A.2: Verwendete Antikörper für die Immunfluoreszenz.**

Antigen	Verdünnung	Streptavidin-Konjugat
CD11b - APC	1:400	
CD14 - PerCP-Cy5.5	1:200	
CD40 - PE	1:200	
CD80 - PE	1:200	
CD86 - PE	1:200	
F4/80 - Biotin	1:400	Streptavidin - PE-Cy7 1:400
Gr1 - PerCP-Cy5.5	1:400	
TNF- $\alpha$	1:200	

**Tabelle A.3: Verwendete Antikörper und Streptavidin-Konjugate für FACS.**

## Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, Anke Liepelt, dass ich die Dissertation mit dem Titel:

**Untersuchungen zur post-transkriptionalen  
Kontrolle der Genexpression in Maus-Makrophagen**

selbständig verfasst habe.

Bei der Anfertigung wurden folgende Hilfen Dritter in Anspruch genommen:

1. Ich habe die Versuche, mit den nachfolgend benannten Ausnahmen, mit den im Kapitel 'Material und Methoden' beschriebenen Hilfsmitteln in der Experimentellen Arbeitsgruppe der Klinik für Operative Intensivmedizin und Intermediate Care durchgeführt.
2. Die Anfertigung erfolgte unter der Leitung von Prof. Dr. rer. nat. Antje Ostareck-Lederer in der Experimentellen Arbeitsgruppe der Klinik für Operative Intensivmedizin und Intermediate Care im Universitätsklinikum Aachen. Die fachliche Betreuung wurde von Prof. Dr. rer. nat. Björn Usadel vom Lehrstuhl für Botanik und Institut für Biologie I der RWTH Aachen übernommen.
3. Die FACS- und ELISA-Analysen wurden in Zusammenarbeit mit Prof. Frank Tacke und Dr. Felix Heymann von der Medizinischen Klinik III sowie mit Dr. Jana Mossanen von der Klinik für Operative Intensivmedizin und Intermediate Care durchgeführt.
4. Die Microarray-Analysen, Teile der Datenauswertung und die Nano Chip-Experimente wurden durch die Chip Facility im IZKF Aachen durchgeführt.
5. Die Klonierung der miRNA-Bibliotheken und die Northern-Blots wurden im Labor von Prof. Gunter Meister von der Universität Regensburg durchgeführt. Die Sequenzierung wurde von FASTERIS SA (Plan-les-Ouates, Schweiz) und die Datenauswertung von InteRNA Genomics B.V. (Utrecht, Niederlande) vorgenommen.
6. Die Generierung des Makrophagen-Interaktoms wurde in Zusammenarbeit mit Prof. Matthias Hentze, Dr. Alfredo Castello Palomares und Dr. Jeroen Krijgsveld vom EMBL Heidelberg durchgeführt. Die Sequenzierung der eluierten RNA und die Datenauswertung wurden von Dr. Stuart Archer und Prof. Thomas Preiss von der Australian National University (Canberra, Australien) vorgenommen. Die Klassifizierung der Proteine des Interaktoms wurde unter Anleitung von Prof. Björn Usadel vom Lehrstuhl für Botanik und Institut für Biologie I der RWTH Aachen durchgeführt.
7. Der Western-Blot von c-Src und die qPCR-Messungen der 18S und 28S rRNA sowie der COG7 mRNA wurden von Rebecca De Santis von der Experimentellen Arbeitsgruppe der Klinik für Operative Intensivmedizin und Intermediate Care durchgeführt.

Ich habe keine entgeltliche Hilfe von Vermittlungs- bzw. Beratungsdiensten in Anspruch genommen. Niemand hat von mir unmittelbar oder mittelbar entgeltliche Leistungen für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen.

Ich versichere, dass durch die Veröffentlichung meiner Dissertation keine Urheberrechte verletzt werden.

Ich habe die Dissertation an folgendem Institut angefertigt:  
Experimentelle Arbeitsgruppe der Klinik für Operative Intensivmedizin und Intermediate Care am Universitätsklinikum der RWTH Aachen.

Die Dissertation wurde bisher nicht für eine Prüfung oder Promotion oder für einen ähnlichen Zweck zur Beurteilung eingereicht, noch wurde ein vorheriger Promotionsantrag gestellt.

Ich versichere, dass ich die vorstehenden Angaben nach bestem Wissen vollständig und der Wahrheit entsprechend gemacht habe.

Anke Liepelt

Teile dieser Arbeit wurden bereits vorab veröffentlicht:

Liepelt, A., Mossanen, J. C., Denecke, B., Heymann, F., De Santis, R., Tacke, F., Marx, G., Ostareck, D. H., & Ostareck-Lederer, A. (2014). Translation control of TAK1 mRNA by hnRNP K modulates LPS-induced macrophage activation. *RNA*.

Europäische Patentanmeldung (EP 2 671 890 A1): Ostareck-Lederer, A., Ostareck, D., Marx, G., Liepelt, A., Kloos, J. (2013). Modulation of TLR4-signaling pathway.

## Danksagung

Ich danke meinen Mentoren Prof. Antje Ostareck-Lederer und PD Dr. Dirk Ostareck für die Überlassung des interessanten Themas sowie für die persönliche Betreuung und Unterstützung.

Bei Prof. Gernot Marx möchte ich mich für die Unterstützung, die freundliche Aufnahme in die Klinik sowie für hilfreiche Diskussionen bedanken.

Ich danke allen ehemaligen und jetzigen Mitarbeitern der Experimentellen Arbeitsgruppe für die nette Zusammenarbeit. Besonderer Dank geht dabei an Nadine Simons, Dr. Jana Mossanen, Rebecca De Santis und Dr. Isabel Naarmann-de Vries.

Bei Prof. Frank Tacke und seinen Mitarbeitern, vor allem Dr. Felix Heymann, möchte ich mich für die Hilfe bei den dort durchgeführten Experimenten bedanken.

Prof. Gunter Meister und Anne Dueck danke ich für die essentielle Hilfe bei der Durchführung der miRNA-Experimente.

Bei der Chip Facility, namentlich Dr. Bernd Denecke, Lin Gan und Beate Kratz, möchte ich mich für die Durchführung der Microarray-Analysen sowie die darüber hinausgehende Hilfestellung bedanken.

Ich danke Prof. Matthias Hentze, Dr. Alfredo Castello Palomares und Dr. Jeroen Krijgsveld für die Hilfe bei der Generierung des Makrophagen-Interaktoms, sowie für viele ertragreiche Diskussionen. Prof. Thomas Preiss sowie Dr. Stuart Archer danke ich für die Ausführung der Sequenzierung und der Datenauswertung. Prof. Björn Usadel danke ich für die Hilfe bei der Klassifizierung der Proteine.

Bei Prof. Bernhard Lüscher und Dr. Jörg-Vervoorts-Weber möchte ich mich für die Möglichkeit des radioaktiven Arbeitens in ihrem Labor bedanken, bei Prof. Rudolf Leube und Dr. Reinhard Windoffer für die Möglichkeit der Nutzung des ApoTome und bei Uschi Schneider für die Benutzung der Entwicklermaschine.

Zwei ganz besonderen Menschen, Uli und Ioana, danke ich für viele wunderschöne Momente.

Nicht zuletzt gilt meine ganz besondere Wertschätzung meiner Familie und Thomas für die unablässige Unterstützung.

Danke.